

DOI 10.17516/1997-1389-0360

УДК 581.526.325:543.9:004.9

Computer Processing and Analysis of Scanned Zooplankton Samples: Guidelines

Olesya E. Yolgina^a,
Alexander P. Tolomeev^{a, b} and Olga P. Dubovskaya^{*a, b}

^a*Institute of Biophysics SB RAS
Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center SB RAS»
Krasnoyarsk, Russian Federation*
^b*Siberian Federal University
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 14.12.2020, received in revised form 12.06.2021, accepted 22.09.2021, published online 12.01.2022

Abstract. Guidelines for computer analysis of images obtained by scanning zooplankton samples using ImageJ / Fiji and ilastik software have been developed. Instructions are given for post-processing of the primary pre-scanned material, which includes segmentation of zooplankton images and creating collections for subsequent recognition in the Object Classification / ilastik module. Creating these collections optimizes the work with large high-resolution image files and simplifies constructing a classifier. The method proved effective for studying spatial distribution of size structure in the population of copepod *Arctodiaptomus salinus* in Lake Shira. The technique was also tested on samples of natural zooplankton from lakes in the northern part of Minusinsk Lowlands (Republic of Khakassia) which have different species compositions and abundance of planktonic organisms. The capacity of bioimage analysis (BIA) for identification of zooplankton species is limited. However, in combination with traditional microscopy, it can be also used for studying the taxonomic structure of zooplankton. Based on the research results, the advantages, limitations and implications of BIA methods for processing zooplankton samples are discussed.

Keywords: zooplankton, bioimage analysis, zooscan, microscopy, size structure, taxonomic structure.

Acknowledgements. This work was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research No. 19–04–00362 and a joint grant from the Russian Foundation for Basic Research, the Government

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: dubovskaya@ibp.krasn.ru
ORCID: 0000-0002-9124-4566 (Tolomeev A.)

of the Krasnoyarsk Territory and the Regional Science Foundation No. 19–44–240010, and partly by Russian Federal Tasks of Fundamental Research to Institute of Biophysics SB RAS (project no. 51.1.1) and to Siberian Federal University (No. FSRZ-2020-0006).

Citation: Yolgina O. E., Tolomeev A. P., Dubovskaya O. P. Computer processing and analysis of scanned zooplankton samples: guidelines. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2022, 15(1), 5-30. DOI: 10.17516/1997-1389-0360

Компьютерная обработка и анализ сканированных проб зоопланктона: методические рекомендации

О. Е. Ёлгина^а, А. П. Толомеев^{а,б}, О. П. Дубовская^{а,б}
*^аИнститут биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН
Российская Федерация, Красноярск
^бСибирский федеральный университет
Российская Федерация, Красноярск*

Аннотация. Разработаны методические рекомендации для компьютерного анализа получаемых в результате сканирования проб зоопланктона изображений с помощью программного обеспечения ImageJ/Fiji и ilastik. Приведены инструкции для постобработки первичного отсканированного материала, процедур сегментирования и создания коллекций изображений зоопланктеров с целью последующего распознавания в модуле Object Classification / ilastik. Предлагаемая методика оптимизирует работу с большими файлами изображений в высоком разрешении благодаря созданию коллекций и упрощает задачу построения классификатора. Методика оказалась эффективной для решения задачи изучения пространственного распределения размерной структуры популяции копепод *Arctodiaptomus salinus* в оз. Шира. Кроме того, методика тестировалась на пробах естественного зоопланктона озер Северо-Минусинской котловины (Республика Хакасия), имеющих разные видовой состав и численность планктонных организмов. Возможности видовой идентификации зоопланктеров по сканированным пробам были ограничены, однако в сочетании с традиционной микроскопией метод биоимидж-анализа (БИА) также позволяет выполнять исследования таксономической структуры зоопланктона. На основе результатов тестирования приводится обсуждение преимуществ, ограничений и перспектив развития методов БИА для обработки проб зоопланктона.

Ключевые слова: зоопланктон, визуализация (биоимидж-анализ), сканирование, микроскопирование, размерная структура, таксономическая структура.

Благодарности. Работа поддержана грантом РФФИ № 19–04–00362 и совместным грантом РФФИ, Правительства Красноярского края и Краевого фонда науки № 19–44–240010, частично – Государственным заданием в рамках программы фундаментальных исследований РФ (тема

№ 51.1.1) и Государственным заданием Министерства науки и высшего образования Российской Федерации Сибирскому федеральному университету (№ FSRZ-2020-0006).

Цитирование: Ёлгина, О. Е. Компьютерная обработка и анализ сканированных проб зоопланктона: методические рекомендации / О. Е. Ёлгина, А. П. Толмеев, О. П. Дубовская // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2022. 15(1). С. 5–30. DOI: 10.17516/1997-1389-0360

Введение

Биоимидж-анализ (БИА) является универсальным инструментом для широкого спектра биологических дисциплин, позволяющим извлекать количественные показатели из цифровых изображений исследуемых объектов различных уровней организации – от субклеточного до популяционного (Miura, Sladoje, 2020; Rebollo, Bosch, 2019). Цифровой материал, обрабатываемый методами БИА, может представлять из себя сложный комплекс данных, от 2D-изображений, полученных с помощью фотокамер или планшетного сканера, до сканирующей конфокальной микроскопии (5D-изображения, включающие съемку в разных спектральных диапазонах в трехмерном пространстве и с временным разрешением). Уровень качества (разрешения снимков) и сложности (многоканальности) получаемого материала постоянно повышается.

В последние десятилетия для оптимизации сбора информации в водоеме и обработки проб морские биологи активно используют цифровые технологии, в частности методы визуализации, как *in situ*, так и в лаборатории (обзоры Benfield et al., 2007; Lombard et al., 2019). Однако использование дорогостоящей и высокотехнологичной аппаратуры не всегда доступно исследователям. Многие подводные аппараты существуют в ограниченном количестве и являются уникальными разработками отдельных институтов, например FIDO-Ф, VPR, LAPIS, ZOOVIS-SC и т. д. (Benfield et al., 2007). Примером применения

метода визуализации *in situ* служит получение профиля планктона и взвешенных частиц с помощью коммерчески доступного аппарата UVP – underwater video (vision) profiler (например, Jouandet et al., 2011). В пресноводных экологических исследованиях также начинают применять современные технологии получения фото- и видеоматериала, включая 3D-видеорегистрацию биологических объектов *in situ* (например, Simoncelli et al., 2019).

Альтернативой дорогостоящему оборудованию может быть использование бытовых экшн-камер и планшетных сканеров. Полученные с помощью этих устройств цифровые изображения зоопланктона могут быть обработаны методами БИА и программами, использующими алгоритмы машинного обучения. Этот подход может дать эффективные методики для решения проблемы рутинной обработки проб зоопланктона. Данный принцип был, например, реализован в проекте ZOOSCAN (Grosjean et al., 2004), который включал инструмент для сканирования проб на основе сканера профессиональной серии Epson Perfection и программного обеспечения на основе ImageJ (Abramoff et al., 2004). Проект получил свое последующее развитие (например, Gorsky et al., 2010; Vandromme et al., 2012) как аналитическая платформа PIQv (<https://sites.google.com/view/piqv/home>, обращение 03.12.2020), являясь частью Imaging platforms EMBRC-France (<https://www.embrc-france.fr/en/nos-services/plate-formes-technologiques/imagery>, обращение 03.12.2020). Аналитическая плат-

форма включает такие компоненты, как программное обеспечение ZooProcess для обработки первичного цифрового материала (инструментов ZooScan, FlowCam и UVP) и ECOTAXA для таксономической классификации. В основном платформа используется для анализа морского планктона.

Для анализа озерных проб зоопланктона мы также применяли связку планшетного сканера Epson Perfection V 850 Pro с программой imageJ/Fiji, добавив возможности ilastik (Berg et al., 2019). Цель работы – оценить потенциал методики обработки проб с использованием сканера и доступного программного обеспечения для решения различных задач, в частности для определения численно-размерной структуры популяций зоопланктеров, для цветовой дифференциации живых и мертвых особей после соответствующей окраски проб прижизненным красителем, для таксономической идентификации организмов по видимым признакам. Реализация этой цели состояла в нахождении определенной последовательности фильтров, преобразований и настройки параметров приложения, оптимальных для сегментации и распознавания организмов зоопланктона по сканированным изображениям. При этом часть рутинных процедур автоматизировалась с помощью минимального программного кода в imageJ/Fiji. Итогом стали представляемые здесь методические рекомендации для анализа природных проб зоопланктона, в которых помимо самих зоопланктеров присутствует множество объектов сопоставимого размера – крупные водоросли и детрит. Мы старались избегать инструкций, усложняющих либо избыточно детерминирующих процесс обработки изображений. Все это сохраняет свободу модификаций алгоритма и позволяет не зависеть от версий используемых программ.

Материалы и методы, методические рекомендации

Весь процесс обработки проб зоопланктона методом БИА можно разделить на три этапа. На первом этапе производится подготовка проб для сканирования с заданными параметрами. На втором этапе осуществляется первичная обработка изображений и создается коллекция объектов для распознавания и измерения. На третьем этапе проводится обучение алгоритмам, классифицирующим интересующие нас объекты. Результатом БИА является итоговая таблица с количественными характеристиками каждого объекта.

Каждый из этапов имеет «узкие» места, где неудача способна существенно понизить качество или даже сделать невозможным обработку сканированных проб методом БИА. Прежде всего, необходимо получить качественные изображения организмов зоопланктона, что служит основой дальнейшей обработки. Последующая обработка (постобработка) изображений не сможет существенным образом исправить дефекты первого этапа, если таковые будут присутствовать. Во-вторых, необходимо максимально упростить задачу распознавания объектов для программы. Не стоит надеяться на сверхвозможности имеющихся в настоящее время алгоритмов обучения и распознавания объектов. Разнообразие объектов должно быть как можно ниже для отдельно обрабатываемого изображения. Добиться этого можно двумя способами: 1) предварительное фракционирование проб с помощью сит разного размера и 2) компьютерная очистка уже полученных изображений и создание выборочной коллекции интересующих нас объектов. Далее приводятся методические рекомендации, позволяющие повысить качество анализа сканированных проб зоопланктона для каждого этапа.

1. Подготовка материала и сканирование

Сканирование проб зоопланктона осуществляли с помощью планшетного сканера Epson Perfection V 850 Pro. Для работы с пробами использована специально изготовленная камера, состоящая из рамки размером 9x14 см, напечатанной на 3D-принтере, с приклеенным к ней прозрачным дном из РРТЕ пластика 0.5 мм. Рамка вставлялась в держатель, идущий в комплекте со сканером. Верхние выступающие края рамки позволяли зафиксировать камеру в держателе таким образом, чтобы дно располагалось в 2 мм от стекла. Такое положение камеры обеспечивает правильную фокусировку сканера на образце при высоких разрешениях.

Разделение пробы на размерные фракции проводили с помощью полиамидных сит с размером ячеек 120 и 400 мкм. Через мелкое сито промывали пробы от фиксатора (формалина либо спирта). Эта процедура также способствовала удалению мелких мусорных частиц <120 мкм, накапливающихся в хранящихся пробах. С помощью крупного сита промытую пробу делили на две размерные фракции (менее 400 мкм и более 400 мкм) для последующего сканирования.

Заполнение камеры и отделение организмов друг от друга проводили по методике для работы с ZooScan (Picheral, Elineau, 2020). Чтобы избежать появления пузырьков в камере, проба разбавлялась кипяченой водой, остуженной до 60 °С. Разделение скоплений организмов и отделение их от границ камеры проводили с помощью мягкой препаровальной иглы, не экономя время, поскольку от тщательности разделения особей и их расположения зависит качество обработки изображений.

Настройки параметров сканера были следующие: сканирование с верхним освещением, прозрачный образец с держателем,

цветное изображение с разрешением 6400 DPI. Область сканирования задавали для всей камеры с незначительным (1–2 мм) захватом границ рамки.

2. Постобработка первичных изображений

Постобработка полученных первичных изображений сканированных проб зоопланктона была выполнена в программах IrfanView-64 и ImageJ/Fiji-64. Постобработка заключалась в уменьшении исходного размера сканов, сглаживании шумов и вычитании фона. Работа с первичными изображениями показала, что сканирование с разрешением более 6400 DPI почти не улучшает качество БИА, но критическим образом увеличивает время обработки изображений и повышает требования к памяти и вычислительным мощностям компьютера. Для обработки изображений методом БИА желательно использовать производительные компьютеры с объемом памяти 16 Гб и процессором уровня Intel core-i7. Тем не менее первичное сканирование проб все же важно проводить при 6400 и более DPI. Позднее при необходимости можно понизить разрешение на стадии постобработки, что даст более качественное изображение объектов, чем сканирование с низким DPI. Более того, изображения с высоким разрешением могут быть обработаны повторно на более мощных ПК.

Постобработку первичных изображений проводили с использованием программы IrfanView. В ней проводили уменьшение исходного размера скана в два раза и удаление темных полей рамки вокруг открытого поля камеры. Однако если производительность компьютера позволяет, то все операции можно осуществлять только в ImageJ/Fiji. В программе ImageJ/Fiji проводили понижение уровня шума путем применения фильтра Median с параметром Radius = 1 пиксель. Этот

фильтр позволяет уменьшить шум, сохраняя резкость контуров, что важно для применения процедуры сегментирования на более поздних этапах обработки. После этого убрали серый фон изображения простым вычитанием порогового значения. Ниже дана подробная инструкция постобработки изображений.

2.1. Запускаем программу «IrfanView».

2.2. Открываем изображение из программы «IrfanView».

2.3. Выделяем область, которую необходимо обрезать, затем: Edit > Crop selection.

2.4. Уменьшаем изображение в два раза: Image > Resize/Resample > Half (рис. 1a).

2.5. Сохраняем файл.

2.6. Открываем файл в программе ImageJ/Fiji.

2.7. Инвертируем изображение: Edit > Invert.

2.8. Убираем шум: Process > Filters > Median; в новом окне ставим 1 (рис. 1b).

2.9. Далее находим нужный нам объект и проводим линию инструментом «Straight Line», чтобы она пересекала его (рис. 1c).

2.10. Analyze > Plot Profile показывает следующую картину (рис. 1d). Пик, который мы видим, – это наш объект, все остальное, от нуля и примерно до 10 по шкале «Gray Value», – это шум, от которого необходимо избавиться следующим образом.

2.11. Process > Math > Subtract (рис. 2a): в новом окне ставим цифру 10, верхний порог шума.

2.12. Сохраняем данное изображение под новым именем – оно понадобится позже для построения коллекции объектов.

Следующим шагом обработки было создание грубой маски объектов в виде 8-битного изображения в ImageJ/Fiji. Маску создавали, переводя изображение в градации серого, после чего применялась функция Threshold

из меню Image > Adjust. Лучшие результаты показывали алгоритмы Otsu и RenyiEntropy. Пороговое значение подбирали таким образом, чтобы маска полностью охватывала изображение зоопланктеров с небольшой частью фона (over-segmentation). При необходимости применяли функцию Process > Binary > Fill Holes. Более точную настройку сегментации выполняли позже в ilastik. На основе полученной маски находили контуры объектов и сохраняли их в ROI-менеджере. На этом же шаге проводили отсеивание ненужных объектов, устанавливая минимальные и максимальные значения параметров площади и скругленности объектов, используя параметры функции Analyze Particles и из вкладки меню Analyze. Ниже дана пошаговая инструкция создания грубой маски объектов.

2.13. Полученное в результате предыдущих операций изображение переводим из цветного в 8-битное: Image > Type > 8-bit.

2.14. Image > Adjust > Threshold: в открывшемся окне в параметрах выбираем наиболее подходящий способ сегментации, выставляем опцию Dark background и форму выдачи «B&W» (рис. 2b).

2.15. После данной команды в видимых параметрах изображения может появиться дополнительная надпись «Inverting LUT». Избавляемся от нее: Image > Lookup Tables > Invert LUT.

2.16. Следующий шаг – добавляем все объекты в ROI Manager: Analyze > Analyze Particles (рис. 2c).

2.17. На изображении все объекты будут обведены цветным контуром. Выделив мышкой отдельный объект, получим соответствующее выделение строки в ROI Manager (рис. 3a).

2.18. После нажатия кнопки Measure можно узнать некоторые морфологические параметры выделенной фигуры. Список рас-

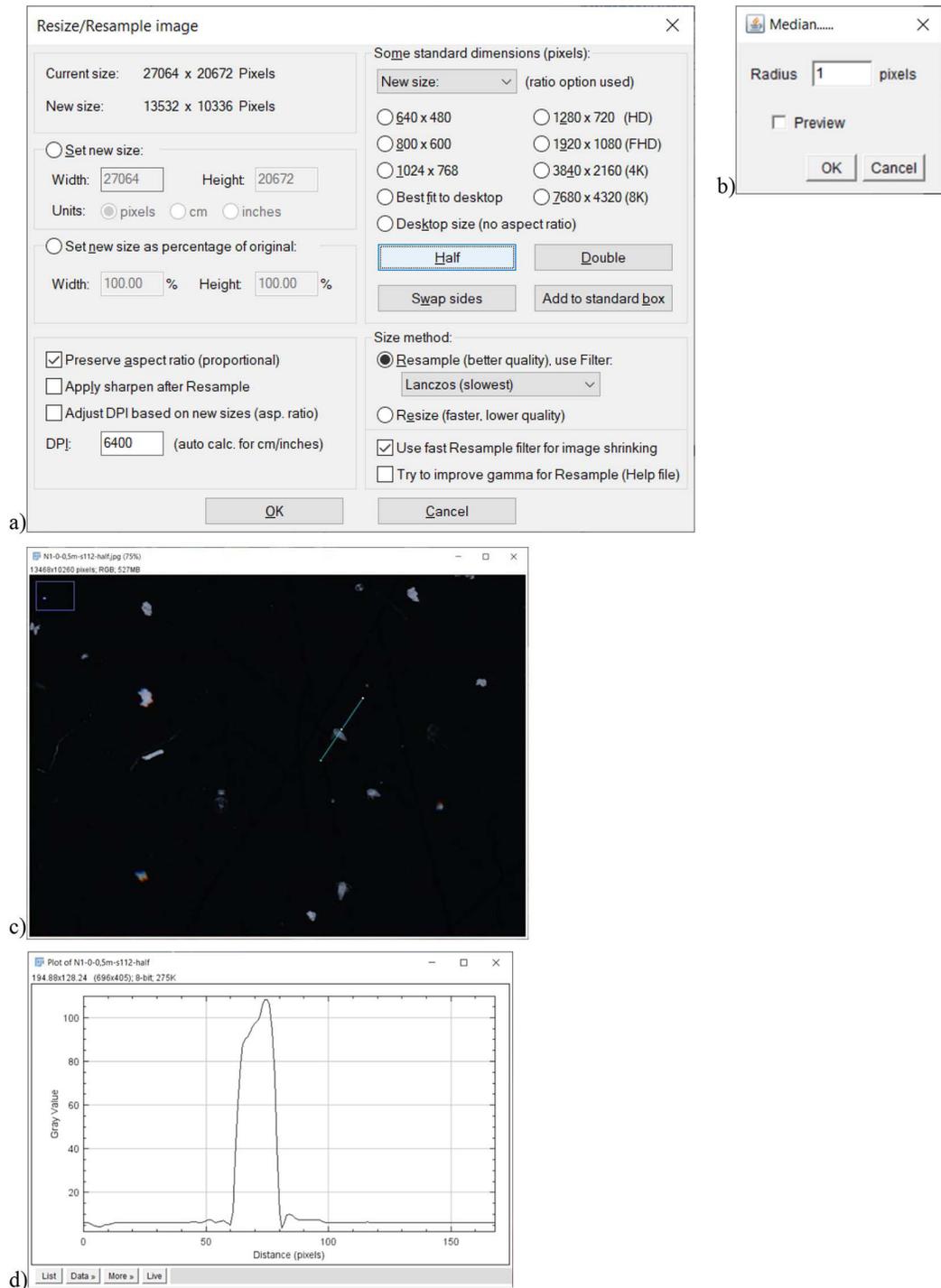


Рис. 1. Иллюстрация пунктов 2.4 (а), 2.8 (b), 2.9 (c), 2.10 (d)

Fig. 1. Illustration for items 2.4 (a), 2.8 (b), 2.9 (c), 2.10 (d)

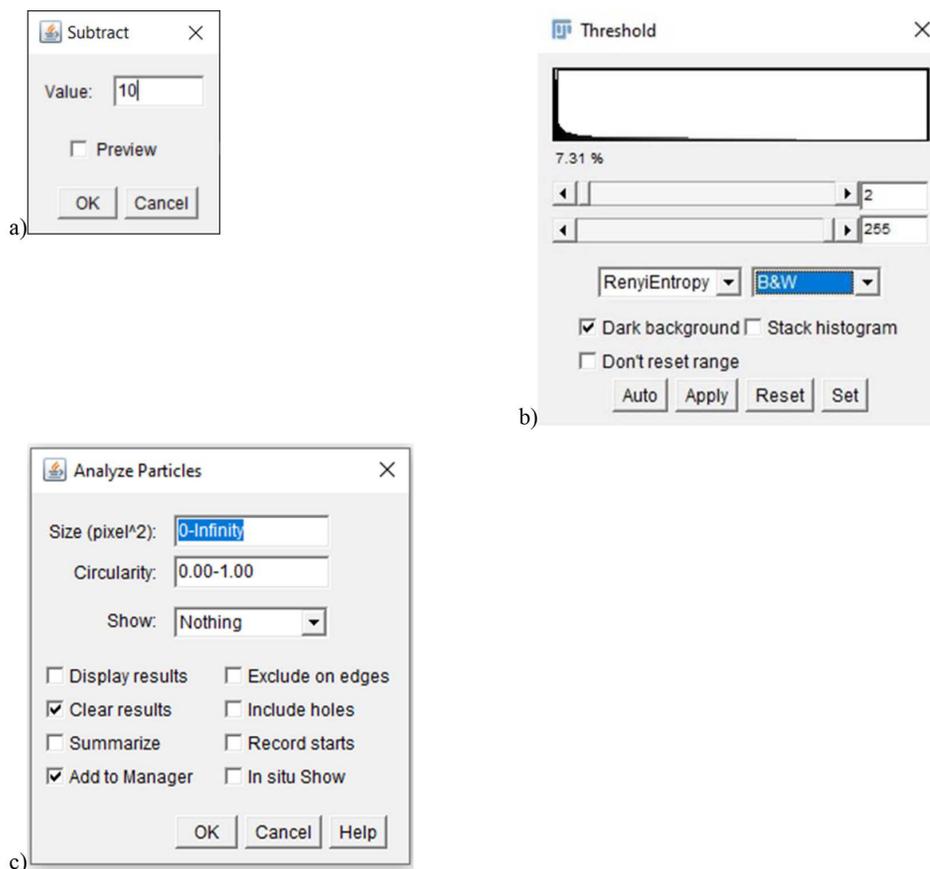


Рис. 2 Иллюстрация пунктов 2.11 (a), 2.14 (b), 2.16 (c)

Fig. 2. Illustration for items 2.11 (a), 2.14 (b), 2.16 (c)

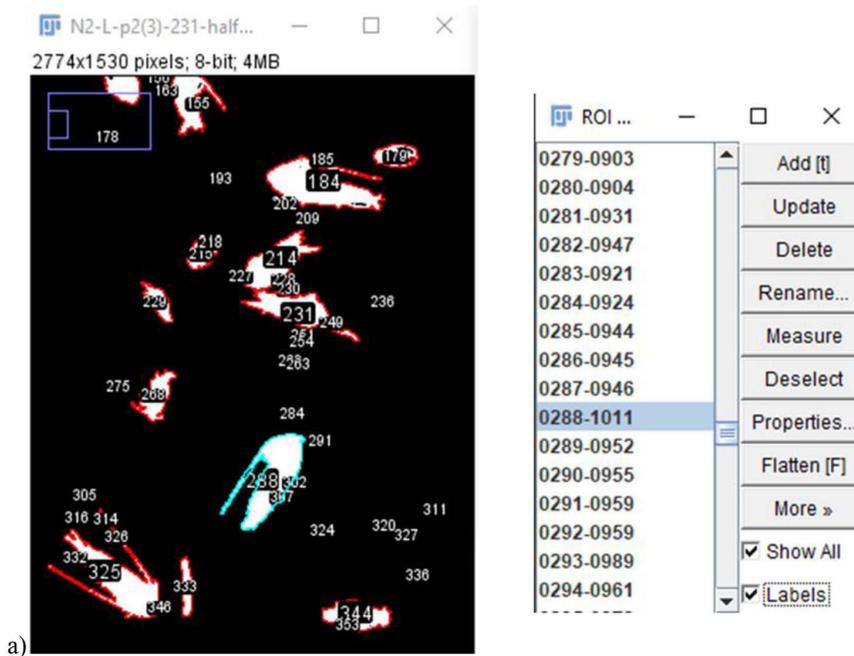
считываемых параметров задается на вкладке Analyze > Set Measurements...

2.19. Далее необходимо провести первичное удаление ненужных объектов из ROI Manager – мелких частиц, царапины и т. д. Для этого повторяем команду Analyze > Analyze Particles, установив интервал границ площади (Size) и скругленности (Circularity) интересующих нас объектов. Чтобы определиться с интервалами, смотрим площадь и скругленность объектов, следуя пунктам 2.17 и 2.18 инструкции. Если разделение объектов в пробе не удалось на этапе сканирования, то рекомендуется создать отдельную коллекцию для скоплений объектов, задав для них размерный порог немного выше

самого крупного единичного объекта. Такую коллекцию можно обработать в ручном режиме с помощью ImageJ/Fiji. К сожалению, эффективные алгоритмы автоматического разделения скоплений зоопланктеров авторам статьи на сегодняшний день не известны.

2.20. ROI Manager оставляем открытым, а черно-белое изображение закрываем – оно больше не понадобится. Открываем ранее сохраненное цветное инвертированное изображение и отображаем на нем контуры всех объектов из ROI Manager.

2.21. В ROI Manager выделяем все объекты (Ctrl + A) и создаем из них комбинированное выделение с помощью ROI Manager > More > OR (Combine). Затем выполняем Edit



a)

```

code_ijm
1 // Первая часть кода
2
3
4 setBatchMode(true); // переводит процесс обработки изображений в фоновый режим
5 mainTitle = getTitle(); // записывает название открытого файла в переменную mainTitle
6
7 //print(roiManager("count"))
8
9 //run("Invert");
10 selectWindow(mainTitle);
11
12 for (u = 0; u < roiManager("count"); ++u) {
13     run("Duplicate...", "title = crop"); //создание копии исходного открытого изображения
14     roiManager("Select", u); //выделение объекта
15     run("Crop"); // изображение обрезается по размеру выделенного объекта
16     // E:\projects\scan-paper\output
17     saveAs("Tiff", "E:/projects/scan-paper/output/" + "The_Particle_"+(u+1)+".tif"); //сохраняем
18     close(); // закрываем текущее изображение объекта
19     //Next round!
20     selectWindow(mainTitle); // вновь делаем активным окно с исходным изображением
21 }
22
23 run("Close All");
24
25
26
27
    
```

b)

Рис. 3. Иллюстрация пунктов 2.17 (a), 3.1 (b)

Fig. 3. Illustration for items 2.17 (a), 3.1 (b)

> Clear Outside – эта процедура очистит фон рабочего изображения.

2.22. Сохраняем очищенное рабочее изображение (цветное инвертированное) и сохраняем объекты в ROI Manager: More > Save...

3. Создание коллекции объектов

Создание коллекции завершает этап подготовки изображений для распознавания, классификации и получения итоговых характеристик организмов зоопланктона в пробах

(морфометрические параметры, оптическая плотность тканей, цвет и т. д.). Коллекция представляет из себя компактное размещение объектов в отдельном графическом файле в виде сетки. Коллекция упрощает дальнейший процесс обработки изображений тем, что, во-первых, уменьшает количество объектов на входе программы распознавания (часть объектов отфильтровывается на основании параметров площади и скругленности), а во-вторых, дает сжатое и упорядоченное расположение объектов, способствующее их быстрой классификации оператором на стадии обучения программы. При необходимости файл коллекции, если он занимает большой объем, может быть разделен на коллекции меньших размеров без потери объектов на линиях разреза. Создание коллекции происходит в два этапа. Суть первого этапа состоит в том, что каждый объект вырезается из исходного сканированного изображения и сохраняется как отдельный файл во временную директорию. Данная процедура реализуется с помощью кода, создаваемого с помощью встроенного редактора в ImageJ/Fiji (File > New > Script...). Нами представлен 3.1 – скриншот окна редактора (рис. 3b) и некоторые пояснения к коду.

SetBatchMode(true) – переводит процесс обработки изображений в фоновый режим, чтобы не выводить на экран все действия и минимизировать нагрузку на систему;

run(«Duplicate...», «title = crop») – создание копии исходного изображения;

roiManager(«Select», u) – выделение очередного объекта в цикле;

run(«Crop») – изображение обрезается по размеру выделенного объекта;

saveAs(«Tiff»,»E:/projects/scan-paper/output/» + «The_Particle_» + (u+1) + «.tif») – сохранение объекта в указанную директорию;

close() – закрытие текущего изображения объекта.

Суть второй части состоит в том, чтобы компактно разместить все вырезанные объекты на одном изображении. Ниже представлен 3.2 – код второго этапа создания коллекции (рис. 4a) и пояснения к нему.

List = getFileList(«E:/projects/scan-paper/output/») – создание списка файлов в указанной директории;

open(«E:/projects/scan-paper/output/» + list[i]) – открытие изображения;

run(«Images to Stack», «method=[Copy (center)] name=Stack title=[] use»);

run(«Make Montage...») – сборка всех изображений в одно;

run(«Invert») – инвертирование изображения.

Также выделяем необходимую часть, выполняем 3.3: Run > Run selected code и получаем коллекцию объектов (рис. 4b). Сохраняем и приступаем к дальнейшей обработке.

4. Классификация объектов в приложении ilastik

Важнейшей частью компьютерной обработки изображений является сегментация объектов, т. е. отделение их от фона. От правильного определения границ объектов зависит точность снимаемых морфометрических характеристик и качество работы будущего классификатора. Первичная сегментация зоопланктеров была выполнена в ImageJ/Fiji на предыдущем этапе. Дальнейшая работа выполняется в программе ilastik. На текущем этапе мы уточняем границы объектов относительно фона, используя модуль Pixel Classification, и производим разделение объектов на классы в модуле Object Classification. Работа с каждым модулем осуществляется независимо. Однако сохраненные результаты обработки изображений, полученные в Pixel Classification, становятся входящими параметрами для Object Classification и должны

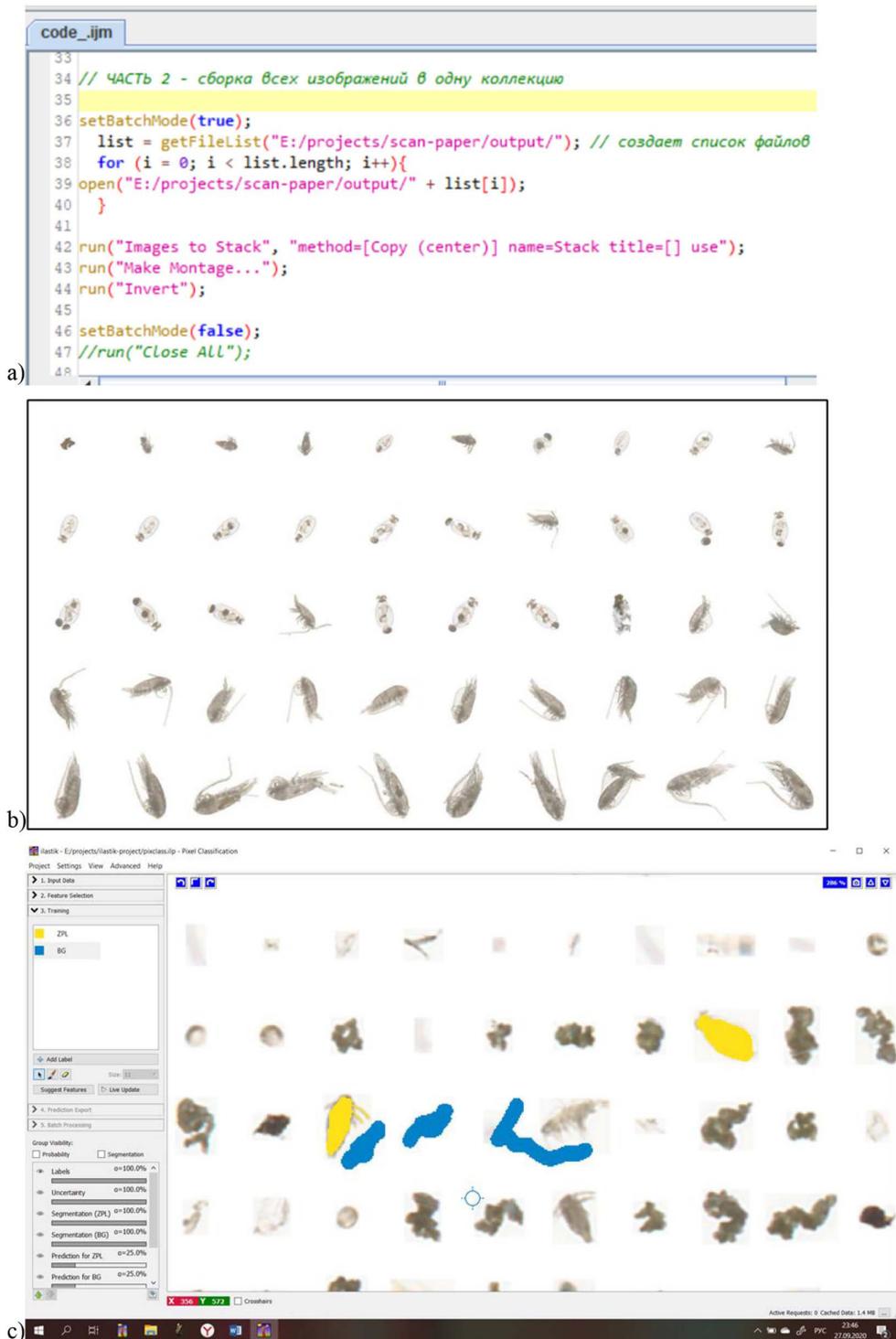


Рис. 4. Иллюстрация пунктов 3.2 (a), 3.3 (b), 4.3 (c)

Fig. 4. Illustration for items 3.2 (a), 3.3 (b), 4.3 (c)

быть импортированы в начале работы. Внутри модулей процесс обработки изображений организован в виде пошаговых действий. Настройки каждой процедуры собраны в апплеты, которые становятся доступными по мере выполнения анализа.

Модуль *Pixel Classification* позволяет создавать карту прогнозирования (prediction map), в которой каждому пикселю присваивается вероятность его принадлежности к определенному классу элементов изображения. На данном шаге мы рекомендуем создавать только два класса: первый класс будет включать все объекты коллекции, а ко второму классу будет относиться фон. Разделение пикселей на классы происходит путем обучения нейросети модуля. Данный процесс реализован в виде «раскраски» участков объектов и фона с помощью инструмента кисть. Карта прогнозирования создается в интерактивном режиме и сразу отображается в окне вывода, что позволяет контролировать процесс и корректировать результаты при необходимости. Создание карты – многоступенчатый процесс, требующий настройки и подбора параметров фильтров (Feature Selection) для анализа. Однако шаблон карты может быть в дальнейшем перенесен на другие изображения сходных объектов. Выполняя классификацию пикселей, необходимо обращать внимание только на результаты обработки интересующих видов зоопланктеров, поскольку качество сегментации других объектов не важно для дальнейшего анализа. Карта прогнозирования сохраняется в формате.h5.

Подробные инструкции по работе с *Pixel Classification* и другими модулями можно найти в разделе помощи сайта *ilastik* (<https://www.ilastik.org/documentation/pixelClassification/pixelClassification>) и некоторых мастер-классов, доступных на YouTube (Kreshuk, Kutra, 2020). Ниже дана последо-

вательность действий при работе с модулем *Pixel Classification*.

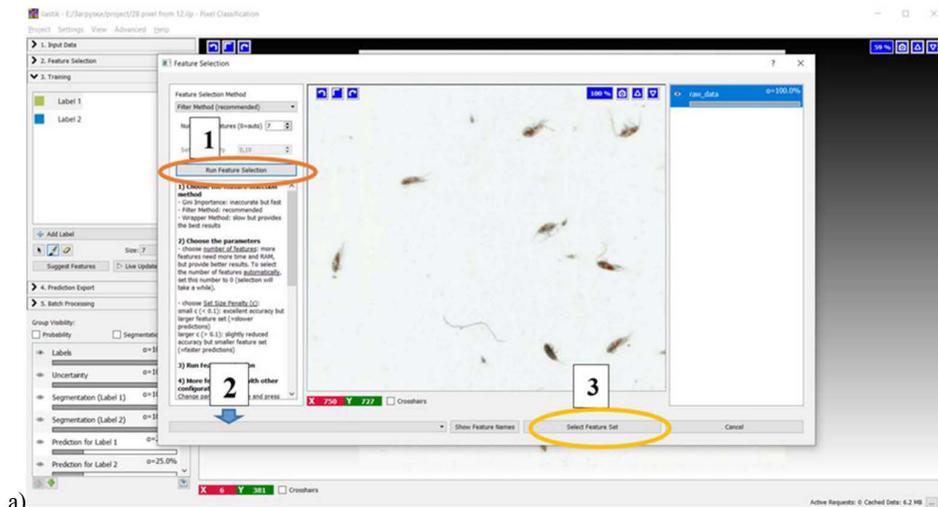
4.1. Запускаем *ilastik* и добавляем изображение (созданную коллекцию) для анализа: *Pixel Classification* > *Raw data* > *Add new...*

4.2. Выбираем фильтры: *Feature selection* > *Select Features*. Фильтры могут подбираться индивидуально в зависимости от типа объектов. Мы использовали $\sigma_0=0.3$ до $\sigma_1=0.7$.

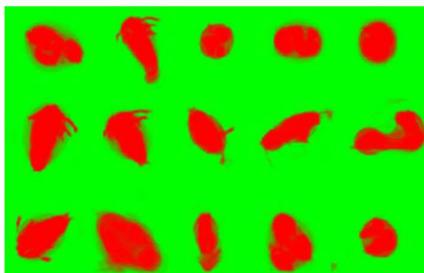
4.3. Открываем графу «*Training*». Здесь необходимо «обучить» программу распознавать фон и объекты, примерно как показано на рис. 4с. Заданные по умолчанию классы объектов находятся слева под названиями «*Label 1*» и «*Label 2*» (можно присвоить им другие имена). Выбираем первый класс и с помощью инструмента «кисть» отмечаем на рисунке некоторое количество объектов, которые собираемся считать (коловратки, копеоды, кладоцеры). Выбираем второй класс и отмечаем участки, являющиеся фоном: непосредственно белый фон и ореол серых пикселей вокруг объектов, если он присутствует. Кнопка «*Live Update*» позволяет увидеть промежуточный результат прогнозирования, и если программа обозначила нужный объект как фон, то на данном этапе можно это исправить, воспользовавшись инструментом «ластик».

4.4. Переходим к следующей вкладке и запускаем *Suggest Features* > *Run Feature Selection*. Данный процесс займёт некоторое время, так как из множества комбинаций применения фильтров программа подбирает наиболее подходящие. Затем следует выбрать из появившегося списка тот набор фильтров, который лучше всего подходит для сегментации, и нажать на кнопку «*Select Feature set*». Последовательность действий обозначена на рис. 5а цифрами 1, 2 и 3.

4.5. Сохраняем: *Prediction Export* > *Source: Probabilities* > *Export All*. Сохраняем сам про-



a)



b)



c)

Рис. 5. Иллюстрация пунктов 4.4 (a), 4.7 (b), 4.8 (c)

Fig. 5. Illustration for items 4.4 (a), 4.7 (b), 4.8 (c)

ект, чтобы в дальнейшем была возможность им воспользоваться: Project > Save Project.

4.6. Существует возможность применения карты прогнозирования на несколько изображений: Batch Processing > Raw data > Select Raw Data Files, затем нажать кнопку Process all files. Таким образом, мы получим «prediction map» для каждого изображения.

С помощью модуля *Object Classification* производится построение классификатора и разделение объектов на классы на основе морфологических характеристик и статистических параметров интенсивности пикселей. Вначале карта прогнозирования, созданная

в модуле *Pixel Classification*, преобразуется в обычную бинарную маску путем выбора порогового значения. На основе бинарной маски происходит сегментация объектов исходного изображения. Обучение классификатора осуществляется путем клика мышкой на объекты одного класса, которые окрашиваются в одинаковый цвет. Затем нужно выбрать следующий класс объектов, задать для него цвет и снова отметить несколько соответствующих объектов на скане. Программа сразу пытается предсказать принадлежность каждого объекта коллекции тому или иному классу, закрашивая их разными цветами. Наглядная

визуализация процесса позволяет достаточно быстро настроить классификатор. Результаты классификации могут быть экспортированы как в виде графических изображений, так и в табличных форматах, включая.csv, для последующего анализа. Таблица экспорта формируется пользователем и может содержать все измеренные параметры объектов. Модуль Object Classification имеет множество апплетов для различных преобразований изображений, настройки фильтров и вывода промежуточных результатов обработки. Он также имеет инструменты для работы с большими файлами и позволяет осуществлять анализ в пакетном режиме. Подробное описание процесса обучения классификатора в модуле Object Classification изложено далее.

4.7. Запускаем ilastik. Из предоставленного списка выбираем модуль «Object Classification». Вначале загружаем исходное изображение: Raw data > Add new. Затем загружаем карту прогнозирования этого изображения, которую мы получили на предыдущем этапе: Prediction Maps > Add new. Результат наложения карты прогнозирования на изображение можно увидеть на рис. 5*b*, где красным цветом обозначены объекты.

4.8. Открываем второй раздел «Threshold and Size Filter». Здесь необходимо задать порог сегментирования, после применения которого все объекты раскраются различными цветами. Порог подбирается таким образом, чтобы конур объектов был максимально точно подогнан к их реальной границе. Здесь также можно задать интервал размеров объектов для последующего анализа. Объекты, не попадающие в заданный диапазон, не окрашиваются и не участвуют в дальнейшей обработке. После изменения параметров необходимо нажать кнопку «Apply» чтобы отобразить полученный результат, примерно такой, как на рис. 5*c*.

4.9. Далее выбираем фильтры для классификации: Object Feature Selection > Select Features > All excl. Location. Затем также можно убрать галочки со всех пунктов «neighborhood», как показано на рис. 6*a*, поскольку нет необходимости выбирать фильтры, связанные с окружающими объектами. Объекты уже были отдалены друг от друга в процессе создания коллекции.

4.10. Следующий этап – построение классификатора. Открываем раздел «Object Classification», в апплете с названием «Label Classes» создаем необходимое количество классов с помощью кнопки «Add Label» и даем классам свои названия. Названия классов будут присвоены каждому объекту в итоговой таблице. Далее, с помощью кисти выделяем несколько объектов в каждом классе. Кнопка «Live Update» показывает промежуточные результаты прогнозирования, за которыми необходимо следить и исправлять возможные ошибки идентификации объектов. В нашем примере, представленном на рис. 6*b*, синим цветом выделены скопления зеленой водоросли *Botryococcus*, желтым – науплиусы и копеподитные стадии *Arctodiaptomus salinus*, а розовым – коловратки *Brachionus plicatilis*.

4.11. Когда результаты классификации покажутся удовлетворительными, выполняем их сохранение: Object Information Export > Configure Feature Export. В окне с параметрами сохранения меняем формат с HDF (.h5) на CSV (.csv), чтобы таблицу результатов можно было открыть в каком-либо табличном редакторе, например в Excel. Выбираем все параметры: Features > All > Export All.

4.12. Итоговую таблицу импортируем в Excel (или в другое приложение для работы с таблицами), указывая запятую как разделитель столбцов. Используя полученные данные, можно проводить дальнейшие расчеты и статистический анализ.

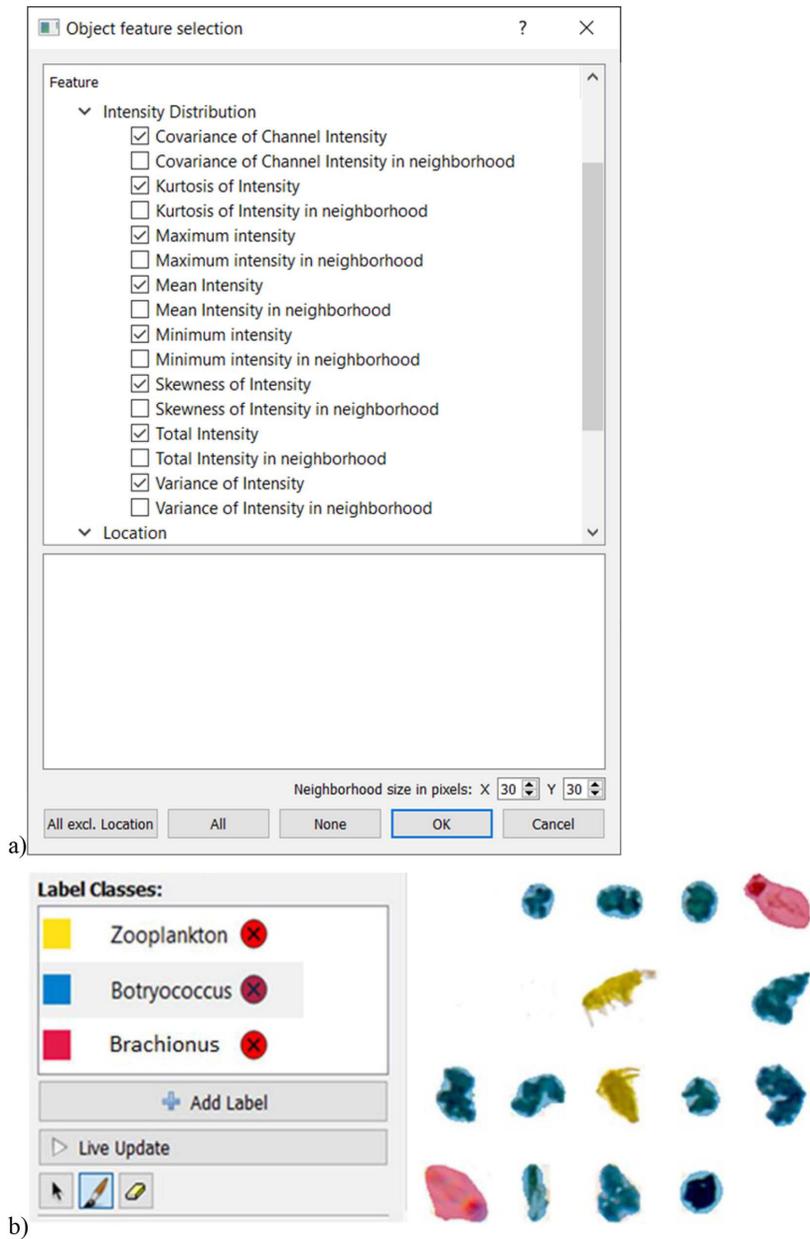


Рис. 6. Иллюстрация пунктов 4.9 (a), 4.10 (b)

Fig. 6. Illustration for items 4.9 (a), 4.10 (b)

5. Пробы озерного зоопланктона, использованные в биоимидж-анализе

Для проверки эффективности нахождения по вышеописанной методике размерно-количественных характеристик популяций зоопланктона использовали пробы зоопланктона из оз. Ши́ра. Пробы были собраны

с целью изучения пространственного распределения популяции доминирующего вида копепод *Arctodiaptomus salinus*. Зоопланктон ловили однократно замыкающей сетью Джеди (диаметр входного отверстия 20 см, ячея капронового сита 82 мкм) с горизонтов 0–1, 1–3, 3–5 и 5–12 м на 6 равноудаленных

станциях вдоль центральной трансекты последовательно от юго-западного (навстречного) к северо-восточному (подветренному) берегу озера. В анализе использовалась фракция копепод размером > 400 мкм, поскольку согласно ранее проведенным исследованиям (Zadereev et al., 2012) в основном крупные особи участвуют в вертикальных миграциях и могут формировать сложную пространственную структуру.

Возможности метода БИА для дифференциации живых и мертвых особей на основе применения прижизненных красителей также оценены на копеподах *A. salinus* озера Шира. Сетные пробы зоопланктона сразу после отбора окрашивали анилиновым голубым (Gladyshev et al., 2003; Дубовская, 2008), затем фиксировали формалином до окончательной концентрации 10 % и хранили до сканирования в холодильнике.

Для оценки возможностей применения вышеизложенного подхода к таксономической идентификации зоопланктона было проведено сканирование и осуществлен биоимидж анализ проб зоопланктона из озер, расположенных на территории Республики Хакасия. Это большие и малые озера в пределах Чебаково-Балахтинской впадины: Джиримское, Сухое, Красенькие (3), Белё (Большое и Малое), Тус, Слабительное, Киприно, Фыркал, Шира, Иткуль, Утичьи (Первое и Третье), Власьево, Шунет, Матарак, Чаласколь и Учум. Карту озер и их характеристику можно найти в работе (Zadereev et al., 2021). Эти озера существенно различаются по солености, морфометрии, гидрологии, уровню трофности и, соответственно, видовому составу зоопланктона. Весь столб воды или эпи- и метагиполимнион в центральной части озер облавливали вышеописанной сетью Джели. Все пробы фиксировались формалином в финальной концентрации 4 %.

б. Определение размерной структуры и таксономической принадлежности зоопланктона

Размеры тела зоопланктеров на сканированных изображениях определяли на основе значений, полученных в процессе проведения БИА. Все морфологические характеристики объектов экспортируются в виде таблицы результатов, доступной для дальнейшего анализа. В качестве размера тела зоопланктеров можно использовать выдаваемый программой диаметр объектов (Diameter), однако он не всегда может напрямую отражать общепринятую величину. Во-первых, за длину тела ракообразных принимается расстояние между определенными точками экзоскелета, которые не обязательно соответствуют внешним контурам объекта. Более того, может существовать несколько способов измерений. Например, у копепод некоторые исследователи измеряют длину просомы (например, Jansen, 2008; Rahlff et al., 2018) или же измеряется общая длина просомы и уросомы – от вершины цефалоторокса до нижней границы каудальных ветвей, без каудальных щетинок (обзор измерений зоопланктеров дан, например, О.Н. Кононовой и Е.Б. Фефиловой (2018). У кладоцер каудальный шип также не включается в длину тела (Bledzki, Rybak, 2016). Во-вторых, на сканированных изображениях тонкие анатомические структуры зоопланктеров могут быть размыты и частично теряться в процессе сегментации. Следовательно, корректное определение длины тела очень зависит от выбранных настроек процедуры отделения образов зоопланктеров от фона. Поэтому важно не менять порог сегментации между изображениями в одной серии проб, а для определения длины тела желательно использовать соответствующую калибровку между измеряемой вручную длиной тела (по сканированному изображению в ImageJ/

Fiji с помощью инструмента «линия») и наиболее подходящим морфологическим параметром из таблицы результатов (например, диаметром объекта). В настоящей работе для определения размера *A. salinus* калибровку получали в виде линейной регрессии на основе промера 200 копепод старших возрастных стадий. Диаметр и длина тела считалась в пикселях, которые затем переводили в мм, используя коэффициент 25.4/DPI, где DPI – разрешение сканированного изображения.

Определения таксонов зоопланктона по сканированным изображениям методом БИА сравнивали с результатами традиционного микрофотографирования особей из одних и тех же проб. Использовали световые микроскопы PZO (Warszawa, Poland) и Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия) с объективами до x40, окулярами x10.

Результаты и их обсуждение

Калибровка размеров тела

и анализ пространственного распределения размерной структуры *Arctodiaptomus salinus* в оз. Шира, дифференциация живых и мертвых особей

Размерную структуру копепод определяли на основе линейной регрессионной модели, связывающей длину тела и диаметр соответствующего объекта из итоговой таблицы результатов программы ilastik. Границы измерений, уравнение регрессии и R^2 приведены на рис. 7а. Сравнительно большой разброс точек ($R^2 = 0.64$) данного примера обусловлен не слишком высоким качеством исходных сканированных изображений, которые были получены еще на стадии отработки методики сканирования. С другой стороны, увеличение числа измерений до нескольких сотен или

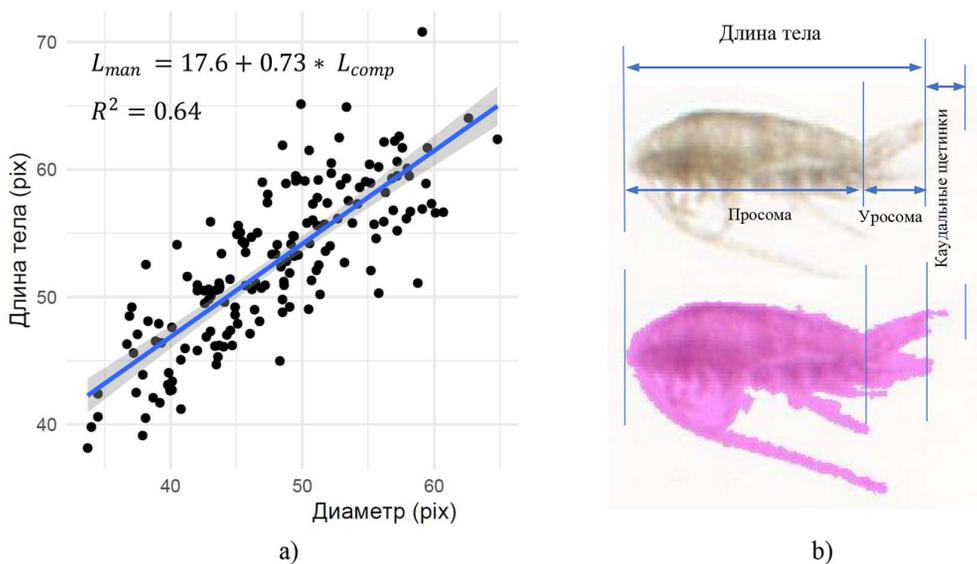


Рис. 7. Линейная регрессия, связывающая размеры тела копепод, измеренные вручную на сканированных изображениях (L_{man}) и размеры этих же рачков (L_{comp}), полученные с помощью компьютерной программы ilastik (диаметр) (а). Пример рачка, показывающий изменение размера уросомы после применения процедуры сегментирования за счет частичного захвата каудальных щетинок (б)

Fig. 7. A linear regression for manual measurements of copepod body size on scanned images (L_{man}) and computer measurements (L_{comp}) of the same copepods obtained using ilastik (diameter) (a). An example of a copepod demonstrating a change in the urosoma size due to partial capture of the caudal setae after applying the segmentation procedure (b)

тысяч объектов позволяет добиться репрезентативности данных для каждой размерной группы. Видно, что длина тела одного из рачков, измеренных вручную, отличается в большую сторону приблизительно на 10 %. Это связано с тем, что установить точную границу сегментирования между уросомой и каудальными щетинками (caudal ramus) невозможно и, следовательно, тонкие структуры могут появляться или исчезать в результате

сегментирования (рис. 7b), что искусственно меняет длину тела. Вместе с тем, построение калибровочного графика решает данную проблему.

Результат обработки проб при изучении гетерогенности пространственного распределения популяции *Arctodiaptomus salinus* в оз. Шира представлен на рис. 8. Мы видим, что в 17–19 ч 21.06.2019 происходило значительное увеличение численности рачков в по-

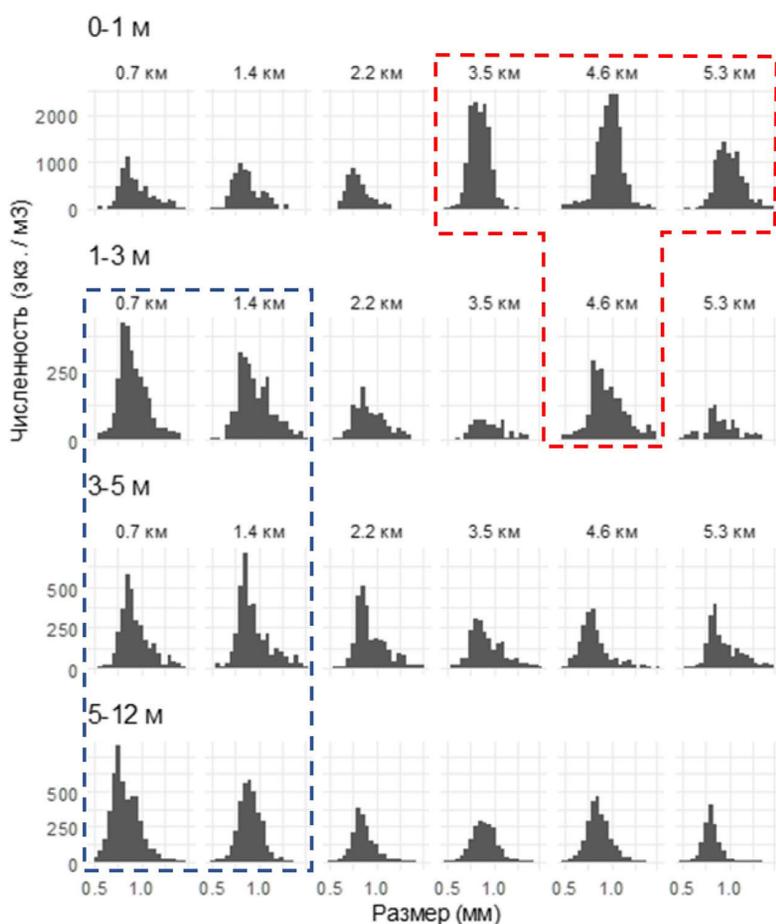


Рис. 8. Гетерогенность пространственной структуры численности и размера старших копеподитных стадий и половозрелых *Arctodiaptomus salinus* в оз. Шира вдоль трансекты от подветренного (северо-восточного) к наветренному (юго-западному) берегу во второй половине дня 21.06.2019. Пунктирными блоками показано горизонтальное разделение максимумов численности копепод в поверхностном слое 0–1, 1–3 м (частично) и более глубоких слоях от 1–3 до 5–12 м

Fig. 8. Heterogeneity of the spatial structure of abundance and size of older copepodite stages and mature *Arctodiaptomus salinus* in Lake Shira along the transect from the leeward (northeastern) to the windward (southwestern) coast on the afternoon of 21.06.2019. Dotted blocks show the horizontal division of maximum copepod abundance in the surface layer 0–1, 1–3 m (partially) and deeper layers from 1–3 to 5–12 m

верхностном слое (0–1 м) у северо-восточного (подветренного) берега до 10.0–15.5 тыс. экз/м³ против 4.7–6.5 тыс. экз/м³ у юго-западного (наветренного) берега. По размерной структуре (полученной в результате обработки всей пробы, а не только квоты до 100 особей доминирующих видов) можно также заметить, что у северо-восточного берега в слое 0–1 м наблюдалось скопление более крупных рачков размером 0.8–1.3 мм, чем у юго-восточного берега – 0.5–1.0 мм. Полагаем, такое разделение было вызвано суточной миграционной активностью крупных особей, которые в вечернее время (после 18 ч) поднимались к поверхности и за счет ветровых течений были

отнесены к северо-восточному берегу. Случаи подобных вечерних подъемов зоопланктов известны (например, Гладышев, 1990; Armgol, Miracle, 2000).

Метод БИА оказался перспективным также для задач, связанных с применением красителей, например для дифференцирования зоопланктов на живых и мертвых особей. Живые и мертвые (окрашенные синим цветом) не вызывают трудностей для распознавания с помощью модуля Object Classification (рис. 9). Что касается частично окрашенных особей, то при определении их статуса следует руководствоваться рекомендациями (Дубовская, 2008): особей, у которых окрашено

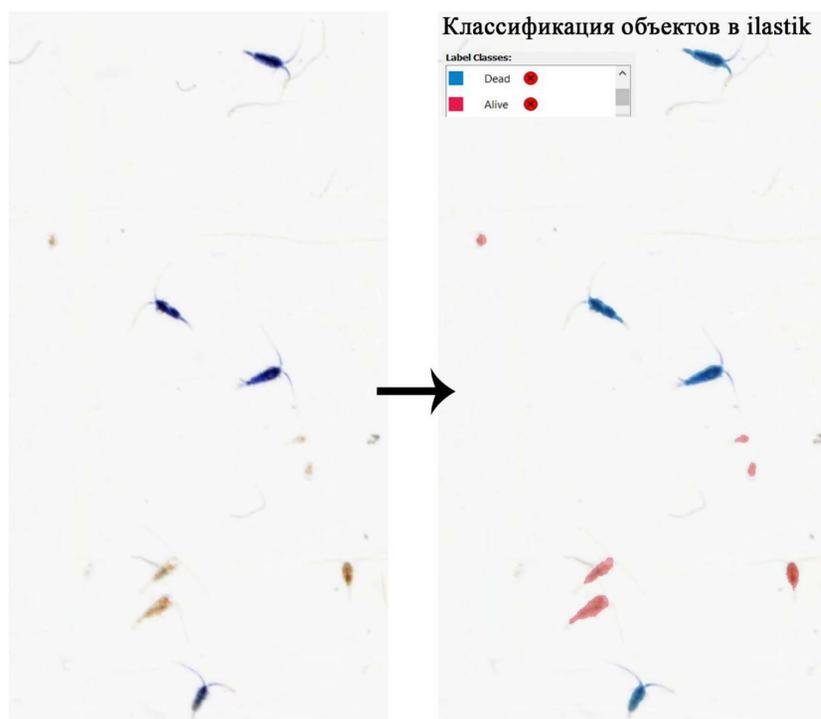


Рис. 9. Дифференциация живых и мертвых особей *A. salinus* с помощью окраски анилиновым голубым по (Gladyshev et al., 2003; Дубовская, 2008). Левая панель – первичное сканированное изображение, правая – распознавание живых и мертвых особей с помощью построенного классификатора в ilastik, классы объектов выделены голубым (мертвые) и розовым (живые) цветом

Fig. 9. Differentiation of living and dead individuals of *A. salinus* using aniline blue staining according to (Gladyshev et al., 2003; Dubovskaya, 2008). The left panel is a primary scanned image; the right panel is a recognition of living and dead individuals using the constructed classifier in ilastik; object classes are colored blue (dead) and pink (live)

$\geq 2/3$ тела, следует относить к мертвым, менее $2/3$ – к живым.

Возможности изучения таксономической структуры зоопланктона в рамках метода биологического имидж-анализа

Определение видовой принадлежности организмов является неотъемлемой частью обработки зоопланктонных проб. Однако в рамках метода БИА, очевидно, невозможно идентифицировать организмы формально до вида, поскольку некоторые таксономические признаки нельзя увидеть на сканированных пробах из-за недостаточного разрешения сканера. Например, виды могут идентифицироваться по вооружению грудной конечности первой пары – *Moina mongolica*, или по расположению латеральной головной поры – *Bosmina longirostris* (Определитель..., 2010). Чтобы изучить данные морфологические признаки, необходимо провести микроскопирование с разрешением 200–400х. Более того, положение тела зоопланктера, при котором идет сканирование, не всегда позволяет увидеть необходимые признаки или же какая-то часть тела может находиться вне фокуса. Тем не менее названные ограничения не отменяют целиком возможность таксономического анализа. Во-первых, видовой состав зоопланктона может быть заранее известен, например, для модельных водоемов с многолетней историей наблюдений, либо известна встречаемость видов в определенном регионе, т. е. таксономический состав будет потенциально ограничен. Следовательно, отдельные виды зоопланктеров могут быть «узнаваемы» без процедуры дополнительного микроскопирования. Например, доминирующий вид копепод *Arctodiaptomus salinus* в таких хорошо изученных озерах, как Шира и Шунет, не требует ежегодной видовой идентификации, поскольку крайне маловероятно, что данный вид

внезапно сменится каким-то другим видом копепод, также обитающим в солоноватой воде. Во-вторых, некоторые особи могут быть определены до вида по БИА, например вид *Daphnia magna*, благодаря крупному размеру, форме постабдомена и головы. На уровне семейств и часто родов кладоцеры легко разделяются при разрешении сканера 6400 DPI. Основные признаки для идентификации приведены на рис. 10. До рода и иногда даже вида определяются с помощью БИА коловратки. В-третьих, таксономический состав пресноводного зоопланктона по сравнению с морским в принципе ограничен всего лишь тремя крупными таксонами – копеподы, кладоцеры и коловратки. Например, в оз. Матарак таксономический список зоопланктона по анализу сканированных проб включал кладоцер *Bosmina* sp., *Ceriodaphnia* sp., *Daphnia* гр. *longispina*, *Diaphanasoma* sp., копепод *Calanoida*, *Cyclopoida*, других *Copepoda*, науплий *Copepoda* и коловраток *Asplanchna* sp., *Bipalpus hudsoni* (Imhof), *Keratella* sp., других *Rotifera*. В оз. Учум результатом БИА был список: 1) науплии, копеподиты и половозрелые *Diaptomidae*, 2) *Moina* sp., 3) *Brachionus* sp. Микроскопирование позволило уточнить: 1) *Arctodiaptomus salinus*, 2) *Moina mongolica*, 3) *Brachionus plicatilis*. Таблица с полным списком видов из 20 озер дана в приложении к статье на сайте журнала. Суммарное время обработки пробы от подготовки к сканированию до получения итоговой таблицы с видами занимало 1,2–1,5 ч.

Перспективы автоматической обработки проб

Несомненно, автоматизация обработки проб сообществ планктонных организмов позволила бы выйти на принципиально новый уровень понимания функционирования водных экосистем. Более подробная инфор-

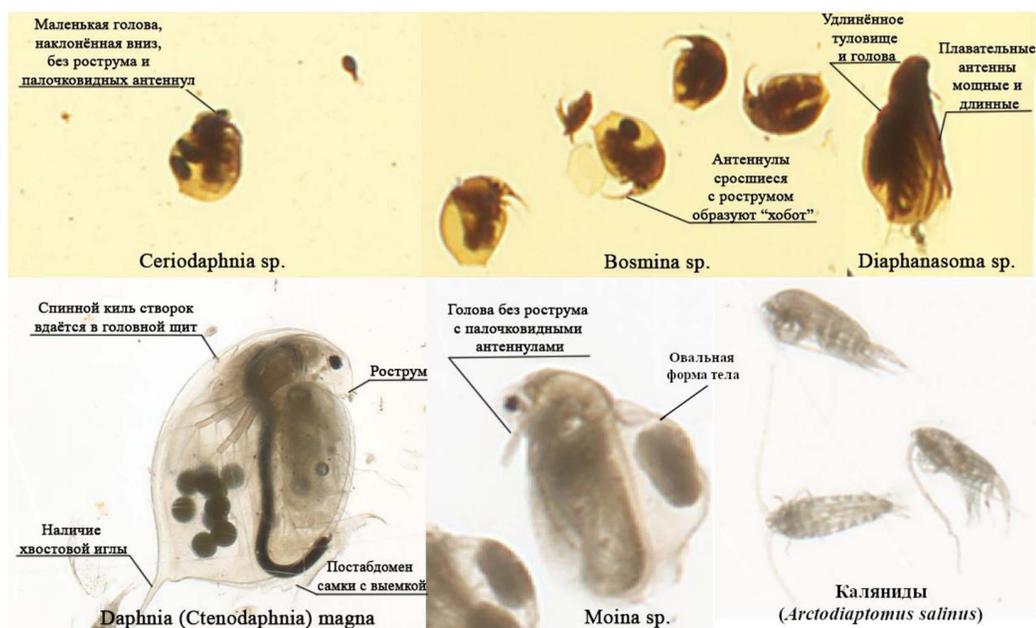


Рис. 10. Пример таксономической идентификации зоопланктона на уровне рода или вида (*Daphnia magna*) по признакам, различимым на сканированных изображениях

Fig. 10. An example of taxonomic identification of zooplankton at the genus or species level (*Daphnia magna*) based on characteristics distinguishable on the scanned images

мация о составе и численности биоты, ее распределении в пространстве и времени могла бы решить множество практических и теоретических проблем, где требуется обширный учет присутствующих в воде организмов: запас биологических ресурсов, встречаемость редких видов, сукцессия сообществ, вопросы фенологии, трофическая сеть, пространственное распределение и его динамика и т. д. Развитие цифровой фото- и видеотехники, развитие методов компьютерной обработки данных в конечном итоге приведут к желаемому уровню обработки планктона, однако в настоящий момент проблема еще далека от решения. Существующие инструменты уже позволяют дифференцировать организмы зоопланктона на основные таксономические группы (крупные таксоны) и даже семейства и рода и определять их размерный состав (например, Benedetti et al., 2019, настоящая работа). Однако дальнейший шаг,

который мог бы быть сделан, – это распознавание организмов на уровне отдельных видов. Очевидно, он потребует высококачественных 3D-изображений для последующего анализа. Позволяет ли достигнутый уровень технического прогресса на сегодняшний день построить такую систему счета и распознавания планктонных организмов? Скорее да, чем нет. По отдельности компоненты такого инструмента уже существуют – сканирующая микроскопия, проточная система (Detmer et al., 2019), алгоритмы распознавания объектов и даже есть проекты базы имиджей биологических видов (краткий обзор – Lombard et al., 2019). Основная проблема, очевидно, заключается в высокой стоимости такого инструмента при низкой коммерциализации. Тем не менее ряд экологических задач уже сейчас можно решать с применением недорогого оборудования и свободно распространяемого программного обеспечения.

Преимущество метода БИА по сравнению с обычной микроскопией проявляется при обработке большого количества собранных проб, в которых таксономический состав зоопланктеров уже известен либо не слишком важен. Такие задачи могут возникать при изучении пространственного распределения и временной динамики зоопланктона в водных экосистемах. Например, выявление суточной динамики (день, ночь) вертикального распределения каляниды *Arctodiatomus salinus* в оз. Шира в течение двух суток было основано на 25 количественных пробах зоопланктона (Dubovskaya et al., 2018). Для изучения макромасштабной гетерогенности зоопланктона в оз. Женева потребовалось 33 интегральных пробы зоопланктона, отобранных в течение трех суток протягиванием планктонной сети с глубины 50 м до поверхности (Pinel-Alloul et al., 1999). Традиционный метод обработки этих проб – счет и микроскопирование – достаточно трудоемок и времязатратен. Только стандартная обработка пробы счетным методом под биноклем обычно занимает 1,5–2 ч, определение видов (микроскопирование) и заполнение таблицы на ПК увеличивают полное время обработки до 3 и более часов. Однако в лаборатории отобранные стандартными методами пробы зоопланктона могут быть подвергнуты автоматической обработке пропуская их через систему FlowCAM (например, Detmer et al., 2019) или Zooscan – сканированием пробы на сканере, соединенном с компьютером (например, Romagnan et al., 2016, настоящая работа). Сканирование планктонных проб позволяет провести их автоматическую обработку для изучения не только морского зоопланктона и морского снега (например, Benedetti et al., 2019), но и частиц микропластика (Pedrotti et al., 2016). В нашем случае получен список видов/родов/более крупных таксонов зооплан-

ктона, их численность и биомасса в 20 озерах (см. приложение на сайте журнала). Такая оптимизация обработки проб позволяет за меньшее время обработать большее количество образцов по сравнению с традиционными методами (Romagnan et al., 2016; Detmer et al., 2019). По нашим оценкам время обработки пробы вышеописанным методом БИА (1,5 ч) на 25–50 % меньше, чем при классической обработке (2–3 ч), т. е. выигрыш во времени только одной пробы может составить 30 мин и более. Сканированные изображения не портятся со временем, и можно вернуться к ним повторно (Gorsky et al., 2010; Vandromme et al., 2012). Кроме того, обработку можно проводить дистанционно и распределять материал между несколькими исследователями.

Еще одна тенденция развития методов автоматизированного счета планктонных организмов – конструирование приборов, способных проводить измерения непосредственно в водной толще. Среди ранних подводных аппаратов для изучения планктона, очевидно, самым известным является непрерывный планктонный рекодер (The Continuous Plankton Recorder – CPR), используемый в различных морских программах мониторинга (Warner, Hays, 1994). Его конструкция не менялась с 1948 г. по сегодняшний день, что дает возможность сравнивать все сделанные наблюдения с помощью CPR между собой. Конечно, данное устройство не оснащено никакими камерами и просто собирает организмы планктона на движущуюся фильтрующую ленту, которая попадает в отсек с формалином. Дальнейший анализ собранного материала осуществляется под микроскопом, но также может быть заснят на цифровую камеру либо отсканирован. Позже идея подводного анализатора планктона воплотилась в виде множества устройств, имеющих в своем составе регистрирующие

фото- и видеоэлементы. Наиболее известными аппаратами счета планктонных организмов признаны лазерный оптический счетчик высокого разрешения HR-LOPC (например, Kydd et al., 2018), подводный видеопрофайлер UVP (Picheral et al., 2010) и *in situ* ихтиопланктонная видеосистема ISIS (Cowen, Guigand, 2008). В пресных водах также имеется положительный опыт применения видеорегистрации зоопланктона и частиц *in situ* (Zadereev et al., 2010; Simoncelli et al., 2019). Очевидно, рутинная обработка проб зоопланктона под микроскопом будет постепенно заменяться автоматизированными методами анализа, при этом качество и доступность последних будет постоянно расти.

Заключение

Проведенная работа показала перспективность обработки сканированных стандартных и окрашенных проб зоопланктона методом БИА с помощью свободно распространяемого программного обеспечения imageJ/Fiji и ilastik. Создание промежуточных коллекций объектов для распознавания и счета способствует более качественной обработке проб и уменьшает требования к мощности

компьютера. Для зоопланктона континентальных водоемов метод представляется особенно подходящим в связи с меньшим морфологическим разнообразием континентального зоопланктона по сравнению с морским, так как первый состоит в основном из трех таксономических групп (коловратки, кладоцеры, копеподы), а морской – из гораздо большего числа таксонов (включая личинки крабов и раков, эвфаузиды, аппендикулярии, хетогнаты, остракоды, птероподы и т. д.) и частиц морского снега разного размера и содержания. Существенным преимуществом БИА по сравнению со стандартным счетным методом является возможность обработки всей пробы, а не квоты, т. е. получение размерного распределения всех организмов исследуемого вида в пробе, а не всего лишь порядка 100 экземпляров, что практикуется для счетного метода. Так же могут быть просчитаны частицы искусственного происхождения, например микропластик. Это в совокупности с большим количеством отобранных проб дает наиболее достоверный результат для статистических оценок планктона в водоеме и экономит время по сравнению со стандартным счетным методом.

Список литературы / References

- Гладышев М. И. (1990) Суточная динамика вертикального распределения массовых видов зоопланктона в Сыдинском заливе Красноярского водохранилища. *Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия биологических наук*, 3: 78–85 [Gladyshev M. I. (1990) Daily dynamics of vertical distributions of mass zooplankton species in the Sydinskiy Bay of the Krasnoyarsk reservoir. *Bulletin of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences. Biological Science Series* [Izvestiya Sibirskogo otdeleniya Akademii nauk SSSR. Seriya biologicheskikh nauk], 3: 78–85 (in Russian)]
- Дубовская О. П. (2008) Оценка количества мертвых особей рачкового зоопланктона в водоеме с помощью окрашивания проб анилиновым голубым: методические аспекты применения. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*, 1(2): 145–161 [Dubovskaya O. P. (2008) Evaluation of abundance of dead crustacean zooplankton in a water body using staining of the samples by aniline blue technique: methodological aspects. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 1(2): 145–161 (in Russian)]

Кононова О. Н., Фефилова Е. Б. (2018) *Методическое руководство по определению размерно-весовых характеристик и организмов зоопланктона европейского севера России*. Сыктывкар, Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, 152 с. [Kononova O. N., Fefilova E. B. (2018) *Methodological guideline for the determination of dimensional and weight characteristics of zooplankton organisms in the European North of Russia*. Syktyvkar, Institute of Biology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 152 p. (in Russian)]

Алексеев В. Р., Цалолыхин С. Я. (Ред.) (2010) *Определитель зоопланктона и зообентоса пресных вод Европейской России. Т. 1. Зоопланктон*. М., Товарищество научных изданий КМК, 495 с. [Alekseev V. R., Tsalolikhin S. Ya. (Eds.) (2010) *Key to identification of zooplankton and zoobenthos of fresh water of European Russia. Vol. 1. Zooplankton*. Moscow, KMK Scientific Press, 495 p. (in Russian)]

Abramoff M. D., Magalhaes P. J., Ram S. J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7): 36–41

Armengol X., Miracle M. R. (2000) Diel vertical movements of zooplankton in lake La Cruz (Cuenca, Spain). *Journal of Plankton Research*, 22(9): 1683–1703

Benedetti F., Jalabert L., Sourisseau M., Becker B., Cailliau C., Desnos C., Elineau A., Irisson J.-O., Lombard F., Picheral M., Stemmann L., Pouline P. (2019) The seasonal and inter-annual fluctuations of plankton abundance and community structure in a north atlantic marine protected area. *Frontiers in Marine Science*, 6: 214

Benfield M. C., Grosjean P., Culverhouse P. F., Irigoien X., Sieracki M. E., Lopez-Urrutia A., Dam H. G., Hu Q., Davis C. S., Hansen A., Pilskaln C. H., Riseman E. M., Schultz H., Utgoff P. E., Gorsky G. (2007) RAPID: research on automated plankton identification. *Oceanography*, 20(2): 172–187

Berg S., Kutra D., Kroeger T., Straehle C. N., Kausler B. X., Haubold C., Schiegg M., Ales J., Beier T., Rudy M., Eren K., Cervantes J. I., Xu B., Beuttenmueller F., Wolny A., Zhang C., Koethe U., Hamprecht F. A., Kreshuk A. (2019) ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nature Methods*, 16(12): 1226–1232

Bledzki L. A., Rybak J. I. (2016) *Freshwater crustacean zooplankton of Europe: Cladocera & Copepoda (Calanoida, Cyclopoida). Key to species identification, with notes on ecology, distribution, methods and introduction to data analysis*. Springer, 918 p.

Cowen R. K., Guigand C. M. (2008) In situ ichthyoplankton imaging system (ISIIS): system design and preliminary results. *Limnology and Oceanography-Methods*, 6: 126–132

Detmer T. M., Broadway K. J., Potter C. G., Collins S. F., Parkos III J. J., Wahl D. H. (2019) Comparison of microscopy to a semi-automated method (FlowCAM®) for characterization of individual-, population-, and community-level measurements of zooplankton. *Hydrobiologia*, 838(1): 99–110

Dubovskaya O. P., Tolomeev A. P., Kirillin G., Buseva Zh., Tang K. W., Gladyshev M. I. (2018) Effects of water column processes on the use of sediment traps to measure zooplankton non-predatory mortality: a mathematical and empirical assessment. *Journal of Plankton Research*, 40(1): 91–106

Gladyshev M. I., Dubovskaya O. P., Gubanov V. G., Makhutova O. N. (2003) Evaluation of non-predatory mortality of two *Daphnia* species in a Siberian reservoir. *Journal of Plankton Research*, 25(8): 999–1003

Gorsky G., Ohman M. D., Picheral M., Gasparini S., Stemmann L., Romagnan J.-B., Cawood A., Pesant S., Garcia-Comas C., Prejger F. (2010) Digital zooplankton image analysis using the ZooScan integrated system. *Journal of Plankton Research*, 32(3): 285–303

Grosjean P., Picheral M., Warembourg C., Gorsky G. (2004) Enumeration, measurement, and identification of net zooplankton samples the ZOOSCAN digital imaging system. *ICES Journal of Marine Science*, 61(4): 518–525

Jansen S. (2008) Copepods grazing on *Coscinodiscus wailesii*: a question of size? *Helgoland Marine Research*, 62(3): 251–255

Jouandet M.-P., Trull T. W., Guidi L., Picheral M., Ebersbach F., Stemmann L., Blain S. (2011) Optical imaging of mesopelagic particles indicates deep carbon flux beneath a natural iron-fertilized bloom in the Southern Ocean. *Limnology and Oceanography*, 56(3): 1130–1140

Kreshuk A., Kutra D. (2020) *ilastik beyond pixel Classification*. Webinar. URL: https://www.youtube.com/watch?v=_ValtSLeAr0 (Accessed 05.12.2020)

Kydd J., Rajakaruna H., Briski E., Bailey S. (2018) Examination of a high resolution laser optical plankton counter and FlowCAM for measuring plankton concentration and size. *Journal of Sea Research*, 133: 2–10

Lombard F., Boss E., Waite A. M., Vogt M., Uitz J., Stemmann L., Sosik H. M., Schulz J., Romagnan J.-B., Picheral M., Pearlman J., Ohman M. D., Niehoff B., Möller K. O., Miloslavich P., Lara-Lpez A., Kudela R., Lopes R. M., Kiko R., Karp-Boss L., Jaffe J. S., Iversen M. H., Irisson J.-O., Fennel K., Hauss H., Guidi L., Gorsky G., Giering S. L. C., Gaube P., Gallager S., Dubelaar G., Cowen R. K., Carlotti F., Briseño-Avena C., Berline L., Benoit-Bird K., Bax N., Batten S., Ayata S. D., Artigas L. F., Appeltans W. (2019) Globally consistent quantitative observations of planktonic ecosystems. *Frontiers in Marine Science*, 6: 196

Miura K., Sladoje N. (eds.) (2020) *Bioimage data analysis workflows*. Springer International Publishing, 170 p.

Rahlff J., Ribas-Ribas M., Brown S. M., Mustaffa N. I. H., Renz J., Peck M. A., Bird K., Cunliffe M., Melkonian K., Zappa C. J. (2018) Blue pigmentation of neustonic copepods benefits exploitation of a prey-rich niche at the air-sea boundary. *Scientific Reports*, 8: 11510

Pedrotti M. L., Petit S., Elineau A., Bruzard S., Crebassa J.-C., Dumontet B., Martí E., Gorsky G., Cózar A. (2016) Changes in the floating plastic pollution of the Mediterranean sea in relation to the distance to land. *PLoS ONE*, 11(8): e0161581

Picheral M., Elineau A. (2020) *Zooscan manual to scan and process samples*. Quantitative Imaging Platform of Villefranche sur Mer (PIQv). URL: https://drive.google.com/file/d/1jRjNkaD_b0U-qZYbye2pCrVA1_mhUzAP/view (Accessed 29.11.2020)

Picheral M., Guidi L., Stemmann L., Karl D. M., Iddaoud G., Gorsky G. (2010) The Underwater Vision Profiler 5: An advanced instrument for high spatial resolution studies of particle size spectra and zooplankton. *Limnology and Oceanography-Methods*, 8: 462–473

Pinel-Alloul B., Guay C., Angeli N., Legendre P., Dutilleul P., Balvay G., Gerdeaux D., Guillard J. (1999) Large-scale spatial heterogeneity of macrozooplankton in Lake of Geneva. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(8): 1437–1451

Rebollo E., Bosch M. (Eds.) (2019) *Computer optimized microscopy: methods and protocols*. Book series «Methods in molecular biology», Volume 2040. Humana Press, 467 p.

Romagnan J. B., Aldamman L., Gasparini S., Nival P., Aubert A., Jamet J. L., Stemmann L. (2016) High frequency mesozooplankton monitoring: Can imaging systems and automated sample analysis help us describe and interpret changes in zooplankton community composition and size structure – An example from a coastal site. *Journal of Marine Systems*, 162: 18–28

Simoncelli S., Kirillin G., Tolomeev A. P., Grossart H.-P. (2019) A low-cost underwater particle tracking velocimetry system for measuring in situ particle flux and sedimentation rate in low-turbulence environments. *Limnology and Oceanography-Methods*, 17(12): 665–681

Vandromme P., Stemmann L., Garcia-Comas C., Berline L., Sun X., Gorsky G. (2012) Assessing biases in computing size spectra of automatically classified zooplankton from imaging systems: A case study with the ZooScan integrated system. *Methods in Oceanography*, 1–2: 3–21

Warner A. J., Hays G. C. (1994) Sampling by the continuous plankton recorder survey. *Progress in Oceanography*, 34(2–3): 237–256

Zadereev E. S., Drobotov A. V., Tolomeev A. P., Anishchenko O. V., Yolgina O. E., Kolmakova A. A. (2021) The effect of salinity and nutrient load on the ecosystems of selected lakes in the south of Siberia. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 14(2): 133–153

Zadereev E. S., Tolomeyev A. P., Drobotov A. V., Emeliyanova A. Yu., Gubanov M. V. (2010) The vertical distribution and abundance of *Gammarus lacustris* in the pelagic zone of the meromictic lakes Shira and Shunet (Khakassia, Russia). *Aquatic Ecology*, 44(3): 531–539

Zadereev E. S., Tolomeev A. P., Drobotov A. V. (2012) Asynchronous vertical migrations of zooplankton in stratified lakes. *Contemporary Problems of Ecology*, 5(4): 443–449