

**УКРАЇНА****(19) UA****(11) 99008****(13) C2****(51) МПК****G01N 33/483** (2006.01)**G01N 1/30** (2006.01)**G01N 21/01** (2006.01)**G01N 21/27** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2010 12023**
(22) Дата подання заявки: **11.10.2010**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.07.2012**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.04.2012, Бюл.№ 8**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.07.2012, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):
**Муханов Володимир Сергійович (UA),
Литвинюк Дар'я Анатоліївна (UA)**

(73) Власник(и):
**ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ПІВДЕННИХ МОРІВ ІМ. О.О.
КОВАЛЕВСЬКОГО НАН УКРАЇНИ,
пр.Нахимова, 2, м.Севастополь, 99011 (UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Кастальская-Карзинкина М.А. Методика определения живых и отмерших компонентов планктона на фиксированном материале // Труды лимнологической станции в Косине. - 1935. - № 19. - С. 91 - 103.
Губарева Е.С., Светличный Л.С., Ишинибилиз М, Бельмонте Г. Распределение живого и мёртвого мезозoopланктона в прибофторских районах Чёрного и Мраморного морей: солёностная толерантность *Acartia clausi* и *A. tonsa* II Морской экологический журнал. - 2008. - Т. 7, № 4. - С. 27 - 39.
Dressel D.M., Heinle D.R., Grote M.C. Vital starting to sort dead and live copepods // Chesapeake Sci. - 1972. -V. 13. -P. 156 - 159.
Дубовская О.П. «Оценка количества мертвых особей рачкового зоопланктона в водоеме с помощью окрашивания проб анилиновым голубым: методические аспекты применения», Journal of Siberian Federal University, Biology 2 (2008 1) 145-161. [Знайдено 24.04.2012] Знайдено в інтернет :<URL: <http://elib.sfu-kras.ru>>
Литвинюк Д.А., Аганесова Л.О., Муханов В.С. «Определение доли живых организмов в культуре копеподы *Calanipeda Aequae Dulcis* после окраски нейтральным красным и диацетатом флуоресцеина», Экология моря, 2009, Вып. 78, с. 65-68. [Знайдено 24.04.2012]. Знайдено в інтернет :<URL: <http://repository.ibss.org.ua/dspace/bitstream/99011/2346/1/litvinyuk.pdf>>
Сокова Г.Г. «Целостность восприятия изображения ткани в компьютерной фотометрии», Тезисы докладов Всероссийской научно-технической конференции «Современные технологии и оборудование текстильной промышленности», Москва, 24-25 ноября, 1998: Текстиль-98. М.:Изд-во МГТА. 1998, с. 91. [Знайдено 24.04.2012]. Знайдено в інтернет в БД ВИНТИ РАН.
Пузаченко А.Ю и др.: «Изменчивость раковин видов семейства Unionidae из бассейна реки Белая (Южноуральский регион), зоол. ж., 2007, 86, N 9, с. 1077-1038. Реферат. [Знайдено 24.04.2012]. Знайдено в інтернет в БД ВИНТИ РАН.

(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЖИВИХ І МЕРТВИХ ОРГАНІЗМІВ МЕЗОЗООПЛАНКТОНА В МОРСЬКИХ ПРОБАХ

(57) Реферат:

UA 99008 C2

Винахід належить до способу ідентифікації живих і мертвих організмів мезозоопланктону в морських пробах, що включає відбір проби, фарбування організмів відповідними барвниками, візуальну оцінку інтенсивності фарбування особин під мікроскопом, яку виконують одночасно з мікрофотозйомкою організмів, використовуючи налаштування фотокамери в ручному режимі, зберігаючи ці налаштування незмінними протягом фотозйомки принаймні однієї проби, після чого в отриманих зображеннях, застосовуючи редактор растрової графіки, наприклад програмний пакет Adobe Photoshop, вимірюють середні для кожної особини колірні і яскравісні характеристики й відносять особини до класу живих або мертвих, здійснюючи дискримінантний аналіз вимірюваних цифрових величин.

Винахід належить до гідробіології й може бути використаний для диференційованого обліку живих і мертвих організмів у морських пробах.

Кількісне співвідношення живих і мертвих організмів у пробах мезозoopланктону - один з базових показників смертності угруповання, що може бути використаний при вивченні закономірностей функціонування морських екосистем, їх біопродуктивності й круговороту речовин, а також для оцінки екологічного стану акваторій.

Відомі два основних методичних підходи для ідентифікації живих і мертвих організмів зоопланктону: візуальна оцінка й фарбування. При візуальному аналізі оцінюють зовнішній і внутрішній стан організму на фіксованому матеріалі, інакше кажучи, виявляють наявність або відсутність ознак розкладання. Цей підхід почали застосовувати ще в 30-х роках ХХ в. і продовжують використовувати в цей час [1,2], однак він не позбавлений серйозних недоліків: по-перше, дослідникові необхідний великий досвід роботи із зоопланктоном; по-друге, достовірне виявлення ознак розкладання можливо лише через 2-3 години після загибелі організму (у деяких випадках і пізніше), що неминуче приводить до недооцінки частки мертвих особин у пробі.

Відомий спосіб, що одержав свій розвиток в 70-і роки минулого століття, заснований на фарбуванні планктону різними барвниками [3]. Головний недолік цього підходу полягає в тім, що ступінь фарбування організмів у природних пробах може сильно варіювати. Отже, висновок дослідника про приналежність організму з «сумнівним» фарбуванням до тієї або іншої категорії носить суб'єктивний характер. Якщо ж чисельність таких організмів у пробі велика, достовірні й відтворені результати одержати неможливо.

В основу винаходу «Спосіб ідентифікації живих і мертвих організмів мезозoopланктону в морських пробах» поставлена задача одержання достовірних, об'єктивних і відтворених результатів шляхом класифікації організмів по ступеню фарбування.

Поставлена задача вирішується тим, що в спосіб, здійснюючи під мікроскопом візуальну оцінку інтенсивності фарбування особин, одночасно роблять їхню мікрофото зйомку з настроюваннями фотокамери в ручному режимі, зберігаючи ці настроювання незмінними протягом фотозйомки принаймні однієї проби, після чого для отриманих зображень виконують вимірювання середніх для кожної особини кольорних і яскравісних характеристик, застосовуючи редактор растрової графіки, наприклад програмний пакет Adobe Photoshop, і класифікують отримані значення, застосовуючи дискримінантний аналіз.

Між перерахованими істотними ознаками й очікуваним технічним результатом присутній наступний причинно-наслідковий зв'язок. Незалежно від того, який барвник використовується для маркування живих/мертвих організмів, основним є наявність або відсутність кольору й/або яскравості. Колірні (тонові) і яскравісні характеристики кожної з аналізованих особин, представлені в цифровому виді, дозволяють застосувати дискримінантний аналіз для об'єктивного й достовірного поділу всієї досліджуваної популяції на два класи - живих і мертвих особин.

Винахід пояснюється ілюстраціями. На Фіг. 1 представлені Цифрові зображення копепод, пофарбованих флуоресцентним діацетатом - FDA (А, Б) і нейтральним червоним - НЧ (В, Г). А й В - живі особини, Б і Г - мертві особини. Пунктиром виділена область найбільш інтенсивного фарбування - цефалоторакс; Фіг. 2 - Вимірювання осереднених кольорних характеристик особини копеподи, пофарбованої НЧ, із застосуванням кольорової палітри редактора Adobe Photoshop CS2. Фіг. 3 - Виявлення кластерів живих і мертвих організмів після їхнього фарбування FDA (А) і НЧ (Б). Дані отримані для живої і вбитої температурним шоком культури копепод (*Calanipeda aquae dulcis*). Фіг. 4 - Формат даних у пакеті Statistica 5.0; Фіг. 5 - Основні результати аналізу; Фіг. 6 - Кластери точок, що відповідають класам організмів L (живі, □), D (мертві, V) і Q (сумнівні, +), на 2-параметричних діаграмах з різними незалежними перемінними: А - зелений (Green) і синій (Blue); Б - зелений і відтінок (Нис); В - зелений і червоний (Red). На діаграмі В представлені результати класифікації особин класу Q за допомогою дискримінантного аналізу: - віднесені до живого; Т - віднесені до мертвого. Стрілкою зазначений єдиний «викид» класу D; пунктирна пряма - умовна границя між класами L і D; Фіг. 7 - Фрагмент таблиці апостеріорних імовірностей приналежності особин до того або іншого класу.

Спосіб реалізується так:

1. Відбір проби мезозoopланктону і її фарбування для ідентифікації живих/мертвих організмів - здійснюються відповідно до методів, передбаченими для цих цілей.

2. Дослідження репрезентативної вибірки організмів під мікроскопом:

а) віднесення кожної з особин до одному із трьох класів по візуальних ознаках (інтенсивності фарбування):

- «Живі» (L);

- «Мертві» (D);
- «Сумнівні» (Q).

Візуальна оцінка інтенсивності фарбування особин здійснюється в полі зору мікроскопа відповідно до методики застосування барвника. Кожну особину відносять до одному із двох класів - «Живі» (L) або «Мертві» (D). Якщо це важко або неможливо, особину відносять до класу «Сумнівні» (Q).

б) одержання цифрових зображень кожної з особин за допомогою мікрофотографування.

Мікрофотозйомка пофарбованих організмів виконується цифровою фотокамерою в кольоровому режимі. Автоматичний режим камери (автоматичний вибір експозиції) не рекомендується використовувати, тому що якщо в полі зору попадають тільки яскраві (наприклад, живі організми, пофарбовані FDA) або тільки темні об'єкти (наприклад, близькі по яскравості до темного тла мертві організми), то автокорекція зображень, вироблена фотокамерою, буде спотворювати колірні і яскравісні (контраст об'єкта із тлом) характеристики об'єктів, і, як наслідок цього, зіставлення таких зображень буде неможливим. Рекомендується вибрати налаштування фотокамери в ручному режимі таким чином, щоб уникнути, по-перше, пересвіт на найбільш яскравих об'єктах (тобто втрати інформації про яскравість і колір) і, по-друге, зливання об'єктів із тлом (наприклад, незабарвлені об'єкти на темному полі люмінесцентного мікроскопа), і зберігати ці налаштування незмінними протягом фотозйомки принаймні однієї проби. Це гарантія того, що зображення як живих, так і мертвих організмів однієї й тієї ж проби отримані в однакових умовах і, отже, можуть бути використані для подальшого аналізу. Ніж рідше доводиться змінювати налаштування фотокамери, адаптуючи їх до кожного конкретного барвника, виду організмів або серії проб, тим вище вірогідність одержуваних результатів. Разом з тим, індивідуальні особливості фотокамер, якими користуються різні дослідники (відмінності в рівні шуму, зсув у балансі білого й ін.), не можуть відбитися на якості одержуваних результатів. Це означає, що аналіз однієї й тієї ж проби зоопланктону, проведений на різному устаткуванні, але відповідно до пропонованого способу, дасть близькі результати оцінки співвідношення живих і мертвих організмів у пробі.

3. Вимір середніх для кожної особини колірних і яскравісних характеристик (колірні моделі HSB, RGB, CMYK, LAB) у графічному редакторі.

Для подальшої роботи із зображеннями як програмне забезпечення застосовують будь-який редактор растрової графіки, що дозволяє визначати основні колірні і яскравісні характеристики кожного з пікселів зображення відповідно до трьох колірних моделей: HSB (Я - колірний тон, S - насиченість, B - яскравість), RGB (R - червоний, G - зелений, B - синій) і CMYK (C - ціановий, M - пурпурний, Y - жовтий, K - чорний). Для цих цілей можна використовувати, наприклад, програмний пакет Adobe Photoshop або ряд безкоштовних графічних редакторів, які вільно поширюються в Інтернеті, наприклад, Eyedropper 4.0 beta, Pixel Pick 1.5, SI ColorPicker 1.0 і ін.

Для кожної аналізованої особини одержують один набір значень характеристик HSB, тому важливе значення мають локалізація й спосіб відбору проби кольору в межах границь зображення організму. Відбір повинен вироблятися в зонах з найбільшою інтенсивністю фарбування (наприклад, у копепод, пофарбованих FDA або нейтральним червоним, це цефалоторакс; виділено на Фіг. 1, А і В). У незабарвлених організмів використовується та ж зона (Фіг. 1, Б і Г). Якщо зображення області, що цікавить дослідника, неоднорідне по кольору і яскравості, має плями й/або зернистість (як, наприклад, це часто буває в копепод, Фіг. 1, В), рекомендується спочатку виділяти всю пофарбовану область (інструмент «ласо», Lasso Tool, в Adobe Photoshop) і осереднювати її яскравісні й колірні характеристики, а потім уже робити їх вимірювання.

4. Зведення отриманих даних у таблицю у форматі, придатному для дискримінантного аналізу.

По завершенні вимірів колірних характеристик всіх особин проби (див. Фіг. 2), отримані цифрові дані зводяться в таблицю, у якій кожний рядок відповідає одній особині, кількість рядків дорівнює кількості особин. Кожна особина віднесена до одному із класів, L, D або Q (категоріальна перемінна CLASS), характеризується колірними перемінними, максимальне число яких може становити 13 (RGB, HSB, CMYK, LAB). Оптимальний путь - обмежитися 6-ю перемінними моделей RGB і HSB. Для роботи з кожним конкретним барвником, як правило, потрібен невеликий набір перемінних. Наприклад, при фарбуванні зоопланктону барвником FDA, що має флуоресценцію зеленого кольору, досить виміряти насиченість і яскравість (відповідно, S і B з HSB). Зменшити розмірність даних (тобто кількість аналізованих перемінних) можна після того, як буде ясно, які саме перемінні дозволяють найбільше ефективно виявляти класи живих і мертвих організмів. На 2-параметричних діаграмах останні будуть виглядати як добре відмінні кластери точок (Фіг. 3, А). Якщо кластери L і D не можуть бути виявлені на жодній

з діаграм і, як наслідок цього, утруднений вибір перемінних, значення яких велике для класифікації організмів, зменшення розмірності даних виробляється за допомогою дискримінантного аналізу.

5. Застосування дискримінантного аналізу для:

- а) зменшення розмірності даних (покроковий аналіз із включенням перемінних);
- б) побудови класифікації об'єктів, використовуючи класи L і D як навчальну вибірку;
- в) віднесення кожного з організмів класу Q до класів L або D відповідно до дискримінантної моделі.

Класифікація організмів зі слабо вираженим фарбуванням. У природних пробах звичайно присутня велика кількість організмів, інтенсивність фарбування яких невелика (клас Q), і які важко віднести до живим або мертвим за допомогою візуального аналізу. На діаграмах вони утворюють хмару точок, що накладається на кластери L і D (див. нижче Приклад), що утрудняє вибір колірних перемінних, які б забезпечили об'єктивну й достовірну класифікацію. Для рішення обох проблем ми пропонуємо використовувати дискримінантний аналіз – ефективний метод побудови класифікації за допомогою навчальної вибірки. Остання повинна включати організми, які були без утруднень віднесені дослідником до класів L і D у ході мікроскопіювання проби. У зведеній таблиці даних інформація про приналежність організму до того або іншого класу втримується в категоріальній перемінній CLASS. У дискримінантному аналізі її використовують у якості групуючої залежної перемінної (grouping dependent variable), а колірні характеристики (Hue, Saturation, Brightness, Red, Green і ін.), виміряні в метричній шкалі, вважають незалежними перемінними (independent variables). Зменшення розмірності даних може вироблятися в покроковому аналізі дискримінантних функцій. На кожному кроці проглядаються всі незалежні перемінні, і визначається та з них, що вносить найбільший вклад у розходження між класами. Модель дискримінантного аналізу, що будується на основі навчальної вибірки, дозволяє встановити з певною вірогідністю приналежність організмів зі спірним фарбуванням (клас Q) до класів L або D. Ілюстрація застосування дискримінантного аналізу до рішення подібного роду завдання приводиться в Прикладі.

Приклад.

Проби морського зоопланктону відбирали в прибережних водах м. Севастополя (Чорне море) і офарблювали НЧ у відповідності зі стандартними методами. Живі організми пофарбовані НЧ, здобували червоний колір, у той час як мертві залишалися блідо жовтими. Фотозйомку організмів робили за допомогою мікроскопа Nikon Eclipse TS100-F, обладнаного камерою Ikegami ICD-848P, у світловому (світле й темне поле для НЧ) і люмінесцентному режимах (набір світлофільтрів для збуджування в синій області спектра для FDA). Усереднення й вимірювання колірних перемінних робили в графічному редакторі Adobe Photoshop CS2. Аналіз результатів був утруднений присутністю в пробі слабо пофарбованих організмів (19 з 108 досліджених особин копепод), тому було потрібно застосування дискримінантного аналізу (StatSoft STATISTIC A 5.0). Для побудови дискримінантної моделі використовували 5 незалежних перемінних (HSB, RGB), а класи «Живі» (L) і «Мертві» (D) - як навчальна вибірка. Перемінна Brightness була виключена з аналізу, як малозначима для класифікації (див. Фіг. 4). Отримана дискримінантна модель є статистично значимою ($p < 0,001$). Інформація про внесок кожної незалежної перемінної в розрізнення класів представлена на Фіг. 5. Тільки дві перемінні, Green і Red, виявилися статистично значимими ($p < 0,01$) і вносили вирішальний вклад у розрізнення класів. Це ілюструють 2-параметричні діаграми, у яких одна зі перемінних - зелений колір Green. Якщо друга перемінна - синій колір Blue (Фіг. 6, А), значення якого в дискримінантній моделі невелике ($p = 0,84$), то добре помітне перекривання кластерів L і D. Колірний відтінок Ние вносив більший внесок у класифікацію ($p = 0,26$) і, разом з Green, давав кращу відособленість кластерів (Фіг. 6, Б). Застосування обох статистично значимих перемінних, Green і Red, на діаграмі Фіг. 6, В, дозволило максимізувати дистанцію між кластерами L і D.

Модель класифікувала всі організми зі спірним фарбуванням, зарахував їх з деякою долею імовірності до одного із класів - L (13 особин) або D (6 особин). Графічне уявлення цієї класифікації - на Фіг. 6, В. Фрагмент таблиці апостеріорних вірогідностей приналежності організмів до класів показаний на Фіг. 7. Лише одна особина з навчальної вибірки була позначена в таблиці, як класифікована невірно (Фіг. 6, В, позначення стрілкою). Дискримінантна модель віднесла її до класу L, хоча по візуальних ознаках вона була визначена в клас D. У цьому випадку, копепода була добре пофарбована (що відображено в її колірних характеристиках), але віднесена дослідником до мертвих, оскільки мала візуальні ознаки розкладання. Дискримінантний аналіз виявив це протиріччя. Спосіб, що заявляється, має ряд переваг:

- спосіб дозволяє уникнути суб'єктивності в класифікації організмів по характеру їх забарвленості, тим самим збільшуючи точність і вірогідність результатів;
 - спосіб універсальний, оскільки він може бути застосований для рішення інших дослідницьких завдань, у яких потрібна об'єктивна класифікація організмів по ступені забарвленості.

Джерела інформації:

1. Кастальская-Карзинкина М.А. Методика определения живых и отмерших компонентов планктона на фиксированном материале // Труды лимнологической станции в Косине. - 1935. - № 19. - С. 91 - 103.

2. Губарева Е.С., Светличный Л.С., Ишинбилир М, Бельмонте Г. Распределение живого и мёртвого мезозoopланктона в приобсфорских районах Чёрного и Мраморного морей: солёностная толерантность *Acartia clausi* и *A. tonsa* // Морской экологический журнал. - 2008. - Т. 7, № 4. - С. 27 - 39.

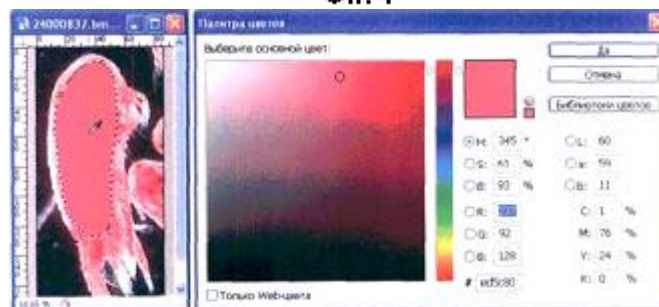
3. Dressel D.M., Heinle D.R., Grote M.C. Vital starting to sort dead and live copepods // Chesapeake Sci. - 1972. - V. 13. - P. 156 - 159.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

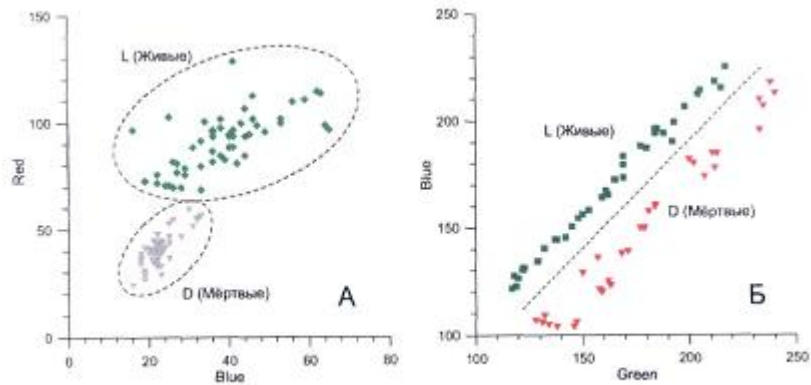
Спосіб ідентифікації живих і мертвих організмів мезозoopланктона в морських пробах, що включає відбір проби мезозoopланктона, фарбування організмів відповідними барвниками, візуальну оцінку інтенсивності фарбування особин під мікроскопом, який **відрізняється** тим, що візуальну оцінку інтенсивності фарбування особин виконують одночасно з мікрофотозйомкою організмів, використовуючи настроювання фотокамери в ручному режимі, зберігаючи ці настроювання незмінними протягом фотозйомки принаймні однієї проби, після чого в отриманих зображеннях, застосовуючи редактор растрової графіки, наприклад програмний пакет Adobe Photoshop, вимірюють середні для кожної особини колірні і яскравісні характеристики й відносять особини до класу живих або мертвих, здійснюючи дискримінантний аналіз вимірюваних цифрових величин.



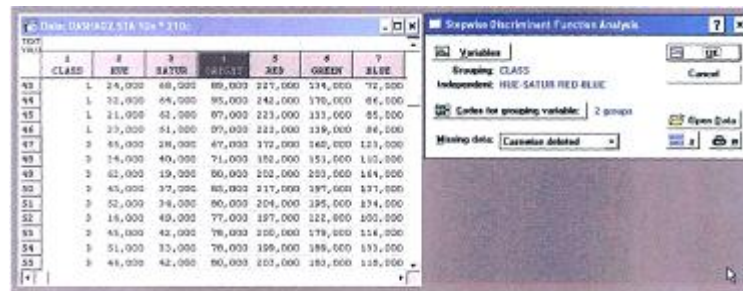
Фиг. 1



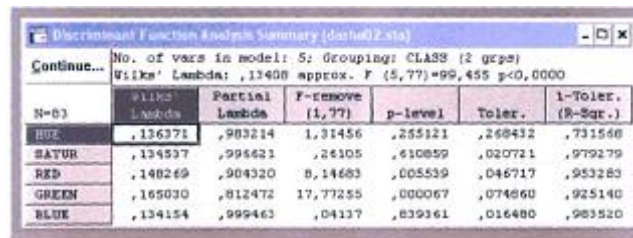
Фиг. 2



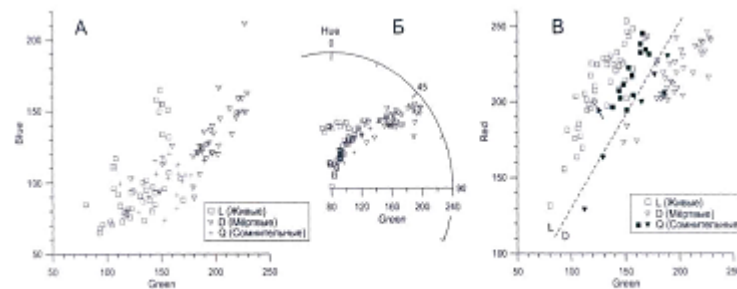
Фир. 3



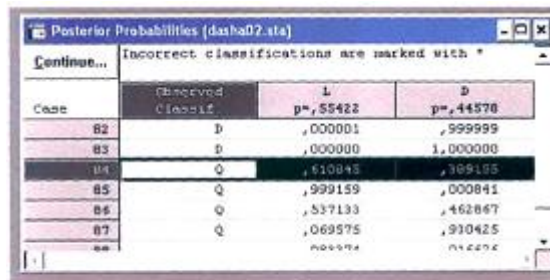
Фир. 4



Фир. 5



Фир. 6



Фир. 7

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601