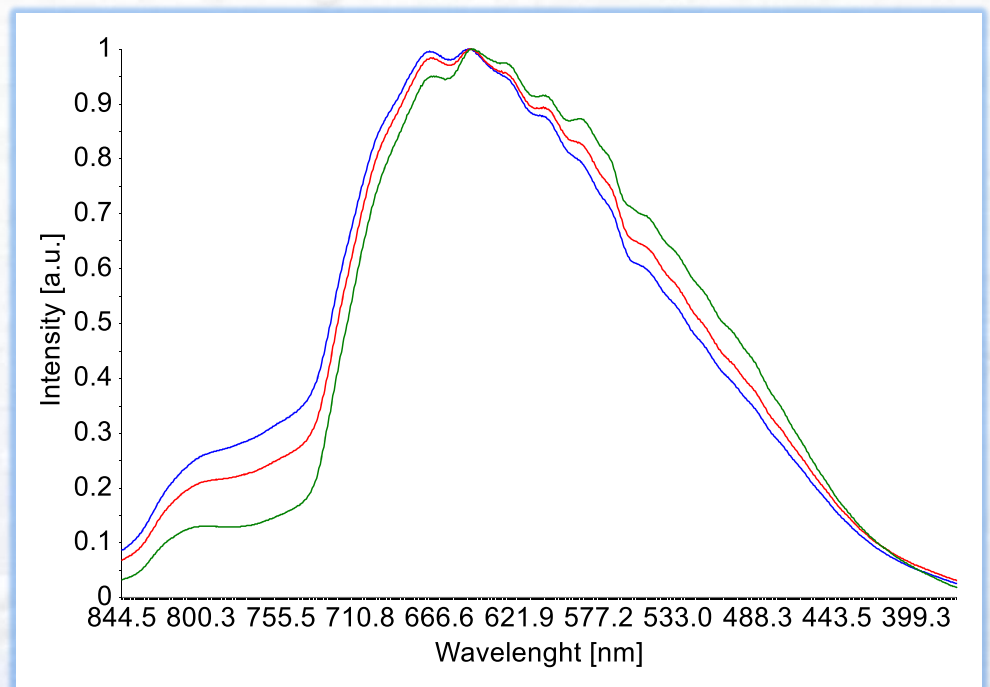


## Klassifisering og telling av lakselus

Automatisk klassifisering og telling av lakselus med undervanns hyperspektral avbildning: Videreføring



**This page is intentionally left blank**

**Akvaplan-niva AS**

Rådgivning og forskning innen miljø og akvakultur

Org.nr: NO 937 375 158 MVA

Pirsenteret

7010 Trondheim

Tlf: +47, Fax: +47

www.akvaplan.niva.no/trondheim

**Rapporttittel / Report title**

Klassifisering og telling av lakselus, Automatisk klassifisering og telling av lakselus med undervanns hyperspektral avbildning: Videreføring

**Forfatter(e) / Author(s)**

Lars Martin Sandvik Aas

Bartek Gawel

Jørgen Tegdan

Kristin Sæther

**Akvaplan-niva rapport nr / report no**

8051 - 1

**Dato / Date**

18.04.2016

**Antall sider / No. of pages**

17 + 0

**Distribusjon / Distribution**

Offentlig

**Oppdragsgiver / Client**

FHF

**Oppdragsg. referanse / Client's reference**

Prosjekt nr 901212

© 2016 Akvaplan-niva AS. Rapporten kan kun kopieres i sin helhet. Kopiering av deler av rapporten (tekstutsnitt, figurer, tabeller, konklusjoner, osv.) eller gjengivelse på annen måte, er kun tillatt etter skriftlig samtykke fra Akvaplan-niva AS.



## **INNHOLDSFORTEGNELSE**

1 INNLEDNING .....	2
2 MATERIALE OG METODE.....	3
2.1 Innsamling av lakselus .....	3
2.2 Forsendelse .....	3
2.3 UHI.....	3
3 RESULTATER.....	9
4 KONKLUSJON.....	13

# 1 Innledning

---

Denne rapporten inngår som del av rapporteringen i prosjektet «Klassifisering og telling av lakselus», FHF-prosjekt nr. 901212. Prosjektet er et samarbeid mellom Ecotone og Akvaplan-niva og en videreføring av forprosjektet "Klassifisering og telling av lakselus" (FHF-prosjekt nr. 901093).

Rapporten omhandler arbeid og resultat i arbeidspakke 1, Klassifisere lakselus i ulike stadier under vann med bruk av UHI.

I forprosjektet ble det dokumentert at UHI kan brukes til å klassifisere lakselus i kategorier av utviklingsstadier på en nøytral bakgrunn i luft. Målet for AP1 i dette prosjektet er å dokumentere et tilsvarende resultat, men for målinger gjort under vann.

På grunn av praktiske begrensinger med å få fastsittende lakselus over på en nøytral bakgrunn i vann uten å skade lusa, samt å få den til å sitte stille, ble det bestemt at man i denne arbeidspakken skal begrense omfanget til å studere ulike kategorier av bevegelige lus. Fastsittende lus blir inkludert i arbeidspakke 2.

## 2 Materiale og metode

---

### 2.1 Innsamling av lakselus

Innsamling av lakselus ble gjort i h.h.t. prosedyre som er beskrevet for innhenting av lakselus til bioassay/ følsomhetsundersøkelser.

Glassflasker ble fylt med 1 l filtrert sjøvann (filtrert gjennom planktonduk eller filtervatt) før oppstart av lusesankingen. Det nødvendige antall fisk ble anestesert og lakselus ble plukket forsiktig med pinsett og direkte overført til flaskene. Maksimalt antall lus per flaske ble satt til 50 stykk. Ideelt antall lus per flaske ble satt til 30 lus.

Flaskene ble plassert i kjøleboks umiddelbart etter plukking. Temperaturen i kjøleboksen var 10-12 °C. Lufting av flaskene ved hjelp av en lang kanyle ble utført ved ankomst på kontoret.

### 2.2 Forsendelse

Lusene ble plukket dagen før avbildningen ble utført og oppbevart under stabile miljøforhold i perioden fra sanking til forsendelse. Lus ble sendt med kjøleelement rundt beholderne i en tetthet på maksimalt 50 lus per liter vann.

Lus ble sendt med buss, slik at den ankom Trondheim 5 timer etter forsendelse

Sanket lus ble sortert etter stadier av fiskehelsepersonell og sendt i tre forskjellige beholdere. Lusa ble sortert i følgende stadier: bevegelige – kjønnsmodne hannlus – kjønnsmodne hunnlus. Lusa ble tatt imot av Ecotone og direkte overført til avbildning i Ecotones våtlab.

### 2.3 UHI

Et vanlig kamera måler bare hvor mye rødt, grønt og blått (RGB) lys som kommer tilbake fra objektet man ser på, altså tre farger. Et hyperspektralt kamera deler opp fargespekteret og kan måle opp mot flere hundre forskjellige farger av lys som reflekteres fra objektet.

Til avbildning av lus har vi brukt Ecotones siste versjon av undervanns hyperspektral avbilder (UHI3). Dette kameraet kan måle lys med bølgelengde mellom 370 nm og 844 nm fordelt på 960 fargekanaler, altså ca. 0.5 nm spektral oppløsning. Den faktiske båndbredden begrenses her, som i de fleste tilfeller, av kombinasjonen mellom båndbredden til lampen som blir brukt og vannets absorpsjonsegenskaper. Kameraet måler en piksel-rad om gangen, og kjøres langs en skinne i en avstand over objektene for å lage ett to-dimensjonalt romlig bilde.

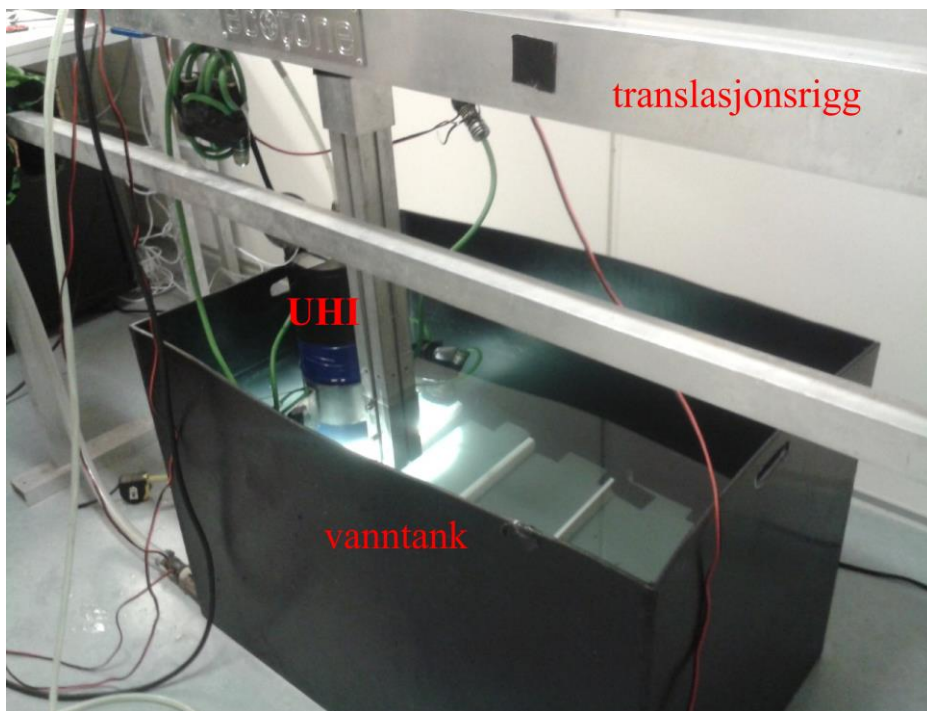
For å undersøke om den spektrale informasjonen kan brukes til å bestemme lusas utviklingsstadium også under vann ble avbildning gjennomført av forhåndskategorisert lus. Prøver av lus i ulike stadier ble senket ned i vannet ved hjelp av en metallsil, i et forsøk på å holde lusene lokalisert adskilt. Det ble også satt opp ca. 7 cm høye skillevegger i karet. Lusene svømte såpass mye rundt slik at det ikke var mulig å ha alle lusene oppi karet på en gang. Avbildningen ble derfor gjennomført i to runder. Bevegelige og kjønnsmodne hannlus er de to

typene som er vanskeligst å skille via formen. Kjønnsmodne hunnlus og kjønnsmodne hannlus ble avbildet først. Deretter ble karet tømt for hannlus, og bevegelige ble senket ned og avbildet.

Som nøytral bakgrunn ble det brukt en grå PVC plate. Med denne plata er det mulig å kompensere for variasjon i belysning og optisk veilengde. Siden vann absorberer lys, vil det komme mer lys tilbake fra lus som ligger rett under kameraet enn fra de som ligger litt ut til siden fordi veien lyset må gå gjennom vann blir kortere.

Avbildning ble gjort i med avstandene 15 cm, 20 cm, og 30 cm. Det ble gjort tester med hvitt-lys LED lamper og halogen. Som en følge av at lysspekteret til halogen-lampene dekker det spektrale måleområde bedre ble de brukt under forsøkene. Mens målingene pågikk var rommet mørklagt. Varierende avstand til objektet en utfordring for UHI når de spektrale forskjellene på objektene som skal skilles er liten. Dette er tilfelle når man ønsker å skille lus av ulik type. Årsaken er at vannet absorberer forskjellige deler av spekteret med ulik styrke, som betyr at den observerte fargen på et objekt vil endre seg når lengden på vannsøyla endrer seg. Den beste måten å kompensere for denne forskjellen er å ha et lite område med kjent fargespekter i samme avstand som lusa. I WP1 har vi brukt en kjent grå PVC plate som bakgrunn for målingene.

For å konstruere bildet ble UHI og lys montert på en translasjonsrigg som translaterer i en jevn fart over objektene. Se Figur 1 for et foto av oppsettet.

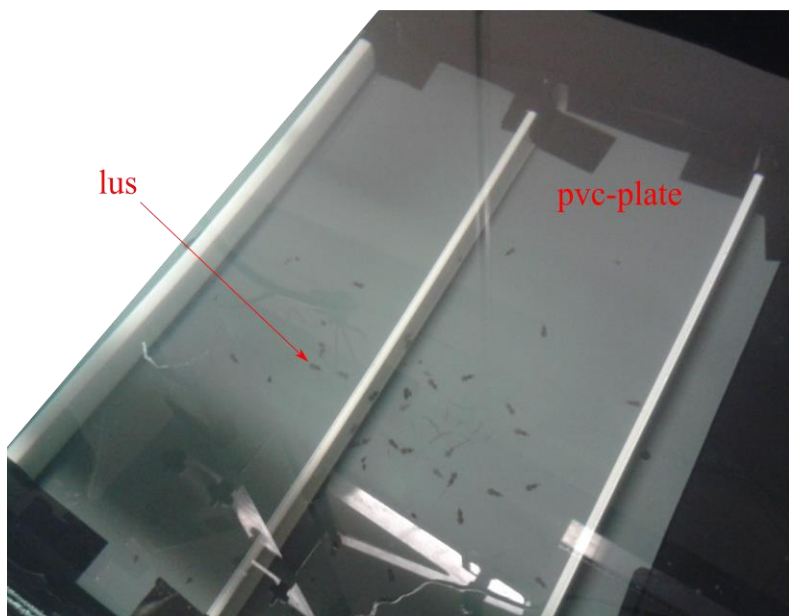


*Figur 1. Fotografi av oppsettet klar for måling av lus i vann. Lusene ble senket ned under vann og plassert i et avgrenset område ved hjelp av ei metallsil.*

Tilsammen ble det avbildet 30 bevegelige lus, 13 kjønnsmodne hannlus og 32 kjønnsmodne hunnlus.



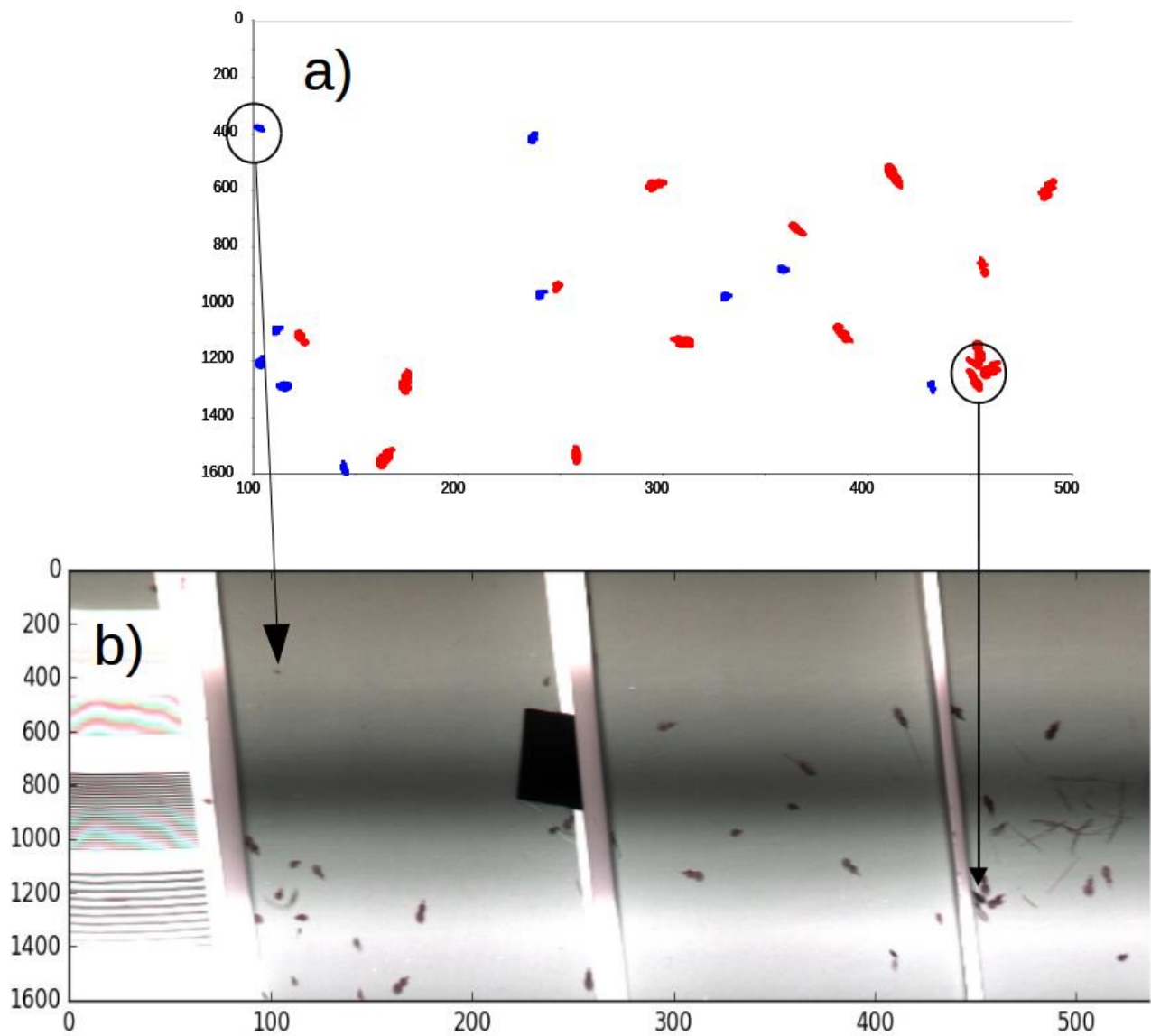
Etter avbildning ble UHI bildene overført Ecotones databehandlingssoftware, hvor pikslene som tilhører ulike lus ble gruppert og kategorisert. De målte spektrene ble deretter eksportert til multivariat analyseprogrammet Unscrambler.



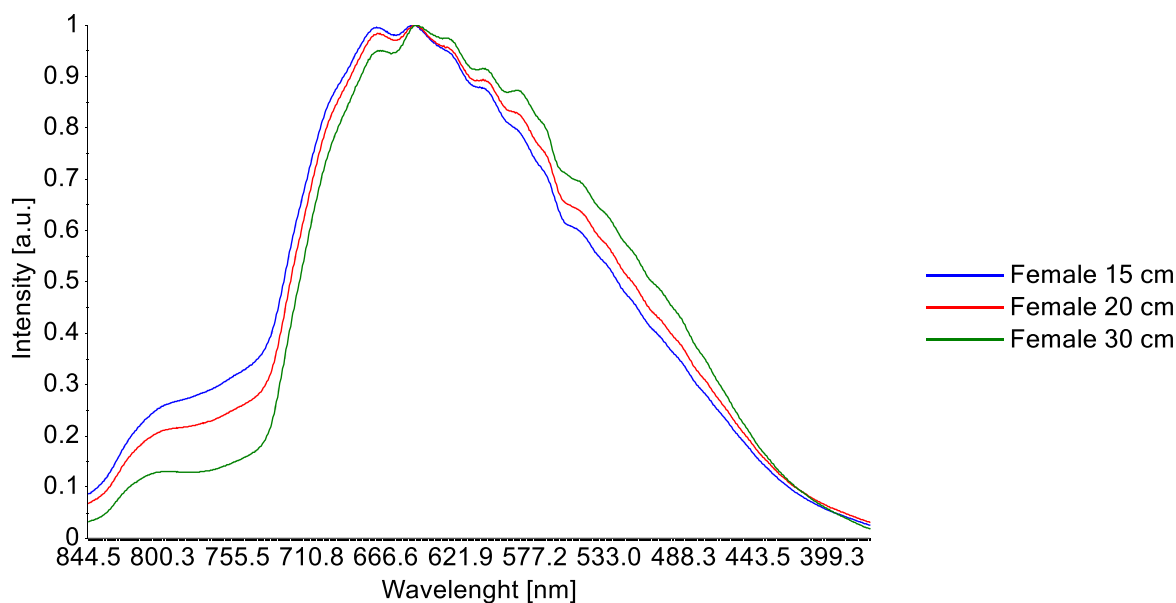
Figur 2. Fotografi av bunnen av avbildningskaret med nedsenkede lus.

I Unscrambler ble det først beregnet et gjennomsnittsspekter for hver lus. Deretter ble metodene «Partial least square» (PLS), «support vector machine» (SVM), «linear discriminant analysis» prøvd ut, og robustheten undersøkt. Dette er etablerte statistiske metoder for å gjenkjenne mønstre i datasett med mange variable (multivariat analyse). De har litt ulike egenskaper, og det er ikke på forhånd gitt hvilken metode som vil gi det beste resultatet når man skal klassifisere et ny type data slik det her er snakk om.

Figur 3a) viser et eksempel på piksler som er valgt ut som lus. Her er røde piksler kjønnsmodne hunnlus og de blå pikslene er kjønnsmodne hannlus. Det tilsvarende RGB bildet er vist i Figur 3b). Tilsvarende kategorisering som dette ble gjort for alle målingene i tre forskjellige avstander til lusa. De kategoriserte pikslene ble videre brukt til å undersøke om gode statistiske modeller kunne lages for å finne kjennetegnet.



Figur 3. Viser a) eksempel på forhåndsklassifisering av piksler b) Kontrastbilde som viser lus, og hvordan de ligger på den grå bakgrunnen.



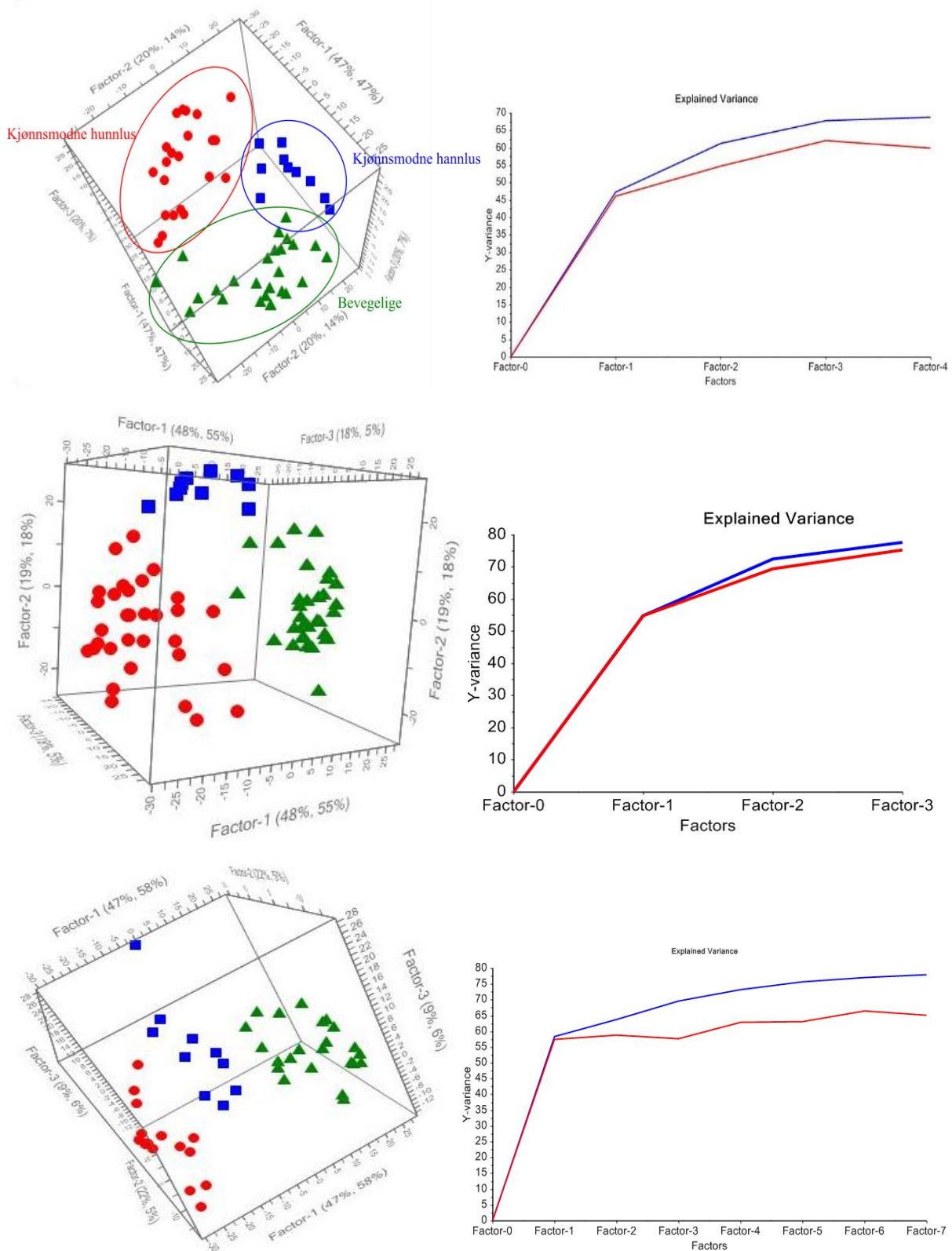
Figur 4 Målte gjennomsnittsspektre for hunnslus i avstanden 15, 20 og 30 cm. Forskjellen i spektrene viser den optiske veilengdens påvirkning på spektrene.

Vannets varierende absorpsjon som funksjon av bølglengden påvirker det målte spekteret av lus. Figur 4 illustrerer dette ved å vise det midlere målte gjennomsnittsspekteret for hunnslus målt på 15, 20 og 30 cm. På større avstand vil også total intensitet bli lavere, men spektrene er her normalisert for å illustrere den relative spektrale endringen.

På bakgrunn av dataene fra lusene ble det laget statistiske modeller som fanger opp og beskriver den spektrale forskjellen mellom lus i de tre ulike stadiene. Det har blitt prøvd brukt og testet flere typer multivariate metoder (Prinsipal Component Analysis (PCA), Linear Discriminant Analysis (LDA), Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) og Support Vector Machine (SVM)). Til slutt har vi valgt å presentere resultatene oppnådd med PLS-DA.

Først ble data fra hvert avstandsnivå analysert hver for seg, før robustheten til modellen ble vurdert ved å analysere data på modeller fra annen avstand.

Figur 5 viser resultatet fra konstruksjonen av PLS-DA modeller for avstandene 15 cm (øverst), 20 cm (midten) og 30 cm (nederst). I alle tre avstandene grupperer spektrene fra kjønnsmodne hunnslus (rødt), kjønnsmodne hannslus (blått) og bevegelige lus (grønt) i klart separerbare klynger. Grafen til høyre i figuren viser valideringen av modellen. Valideringen er en iterativ prosess hvor tilfeldige lus blir holdt utenfor når modellen bygges, men inkluderes først etterpå. I figuren kan man se at den blå (modell) og røde (validering) kurva følger hverandre og er begge økende etter flere faktorer. Det betyr at modellen godt fanger opp variasjonen i dataene, og kan brukes til å klassifisere lus av ukjent type.

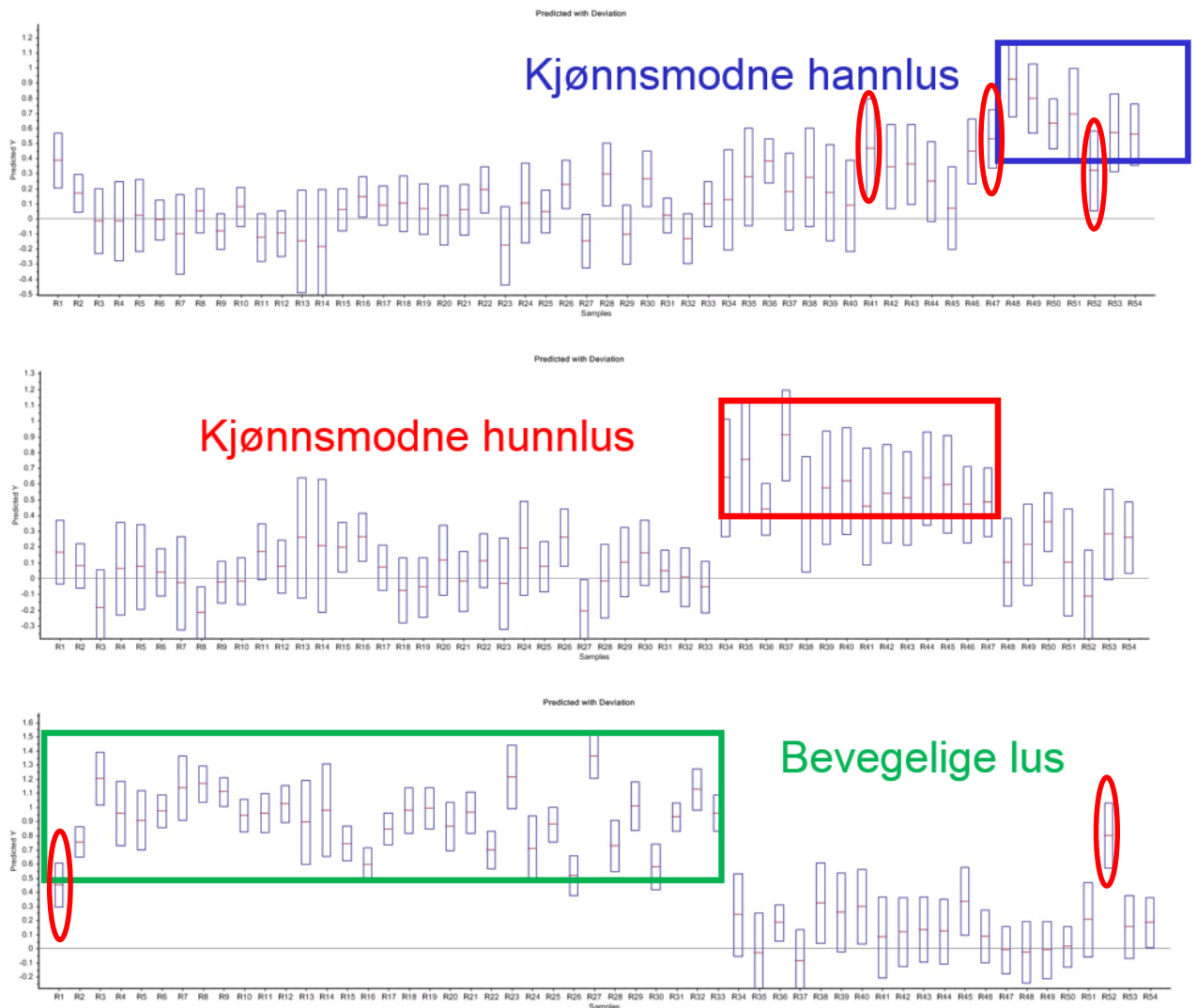


Figur 5. Resultater av prediksjonsberegning ved bruk av PLS-DA for 15cm (øverst), 20cm (midten) og 30cm (bunnen) avstand. 3D score plot til venstre og validering av modellen til høyre. Følgende farger er brukt: kjønnsmodne hunnlus – rødt, kjønnsmodne hannlus - blått og bevegelige lus - grønt.

### 3 Resultater

Det har blitt laget mange ulike modeller og kombinasjoner av disse for det målte datasettet.

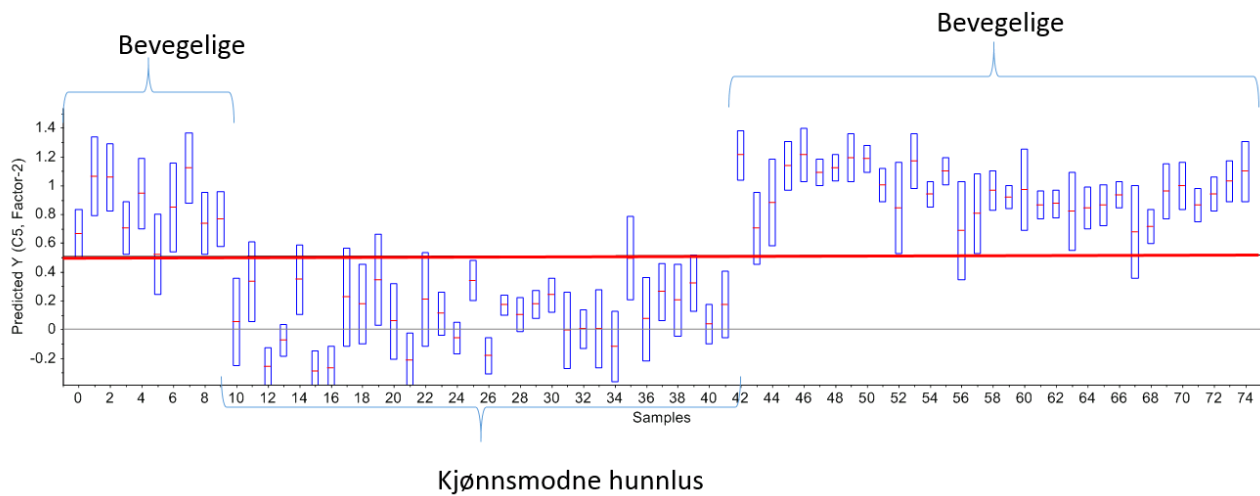
Figur 6 viser prediksjon av lus hvor både modellen og prediksjonen er gjort for 20 cm avstand. Hvert punkt på x-aksen tilsvarer en prøve (lus). De er organisert slik at lusene som er merket med blått er kjønnsmodne hannlus, rødt er kjønnsmodne hunnlus mens grønt er bevegelige lus. Resultatet er organisert slik at øverste linje er en prediksjon av kjønnsmodne hannlus, midterste linje er prediksjon av kjønnsmodne hunnlus og nederst er prediksjonen av bevegelige lus. Det er vanlig å sette prediksjongrensa på 0.5, det betyr at dersom verdien på y-aksen er over 0.5 blir lusa klassifisert som den lusetypen modellen er representere. Dersom verdien er under 0.5 blir den ikke klassifisert som denne typen. Modellen gir en meget god prediksjon, spesielt for bevegelige og kjønnsmodne hunnlus. Totalt blir 89 % prosent klassifisert korrekt.



Figur 6 Prediksjon av lus målt på 20 cm med modell laget for 20 cm.

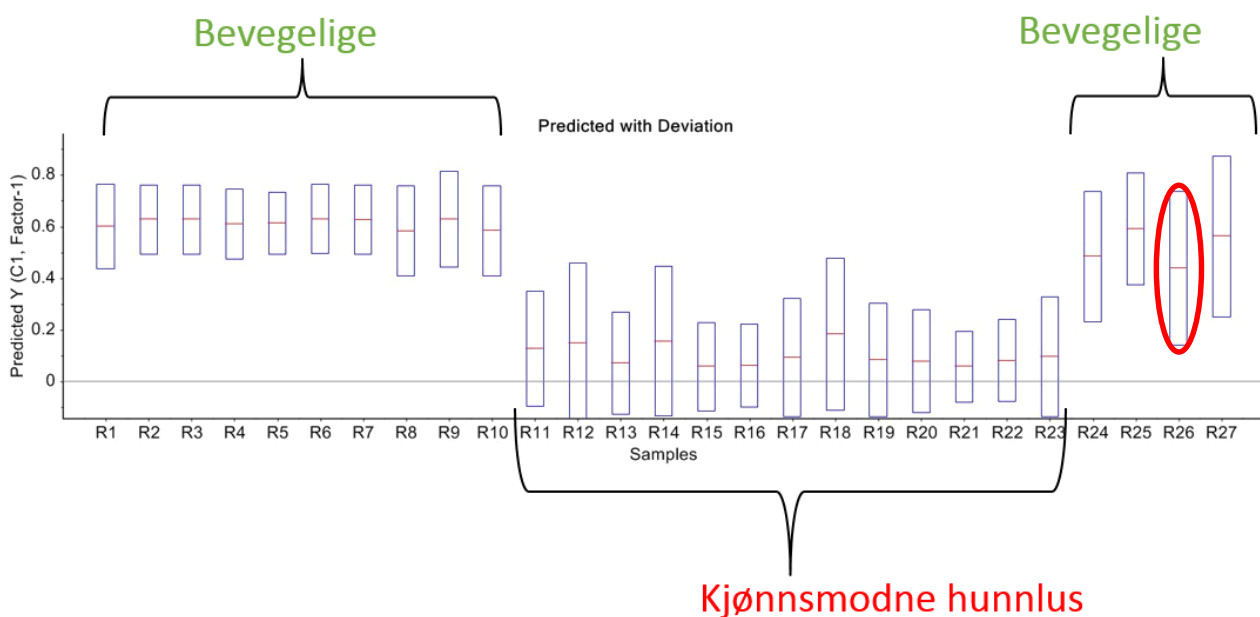
En sammenslåing av gruppene for voksne hannlus og andre bevegelige lus når man lager de statistiske modellene vil kunne gi en bedre presisjon. Figur 7 viser resultatet fra en slik modell

og prediksjon for data fra 20 cm avstand både i modell og test-data. I dette tilfellet oppnår man 100 % korrekt prediksjon.



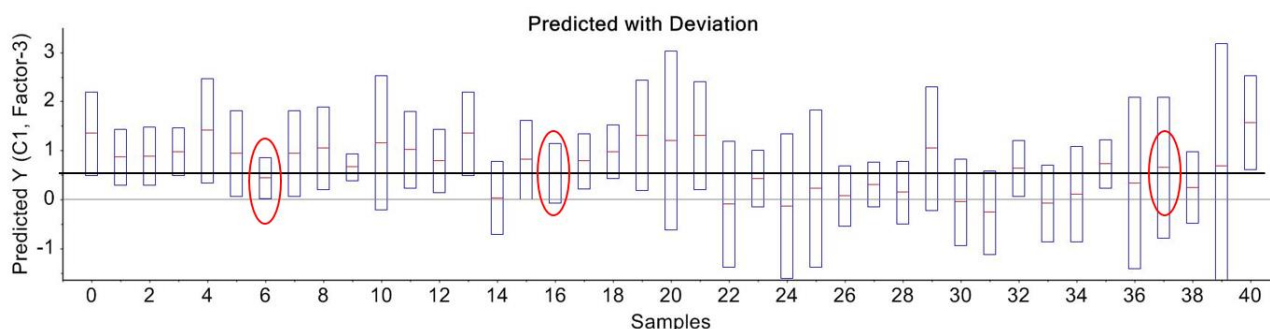
Figur 7 Kategorisering av lus målt på 20 cm med modell laget for 20 cm ved bruk av to klasser (bevegelige og kjønnsmodne hunn lus). Bevegelige lus har verdien  $> 0.5$  mens hunn lus har verdien  $< 0.5$ . Alle lusene ble korrekt klassifisert.

For å undersøke robustheten i modellen er det interessant å undersøke om modellen greier å kategorisere og klassifisere riktig dersom nye data målt på en annen avstand predikeres inn i modellen. Dette viser noe om hvor sensitive metoden er til den observerte endringen i relativ spektral intensitet som var illustrert i Figur 4. Et eksempel på et slikt resultat er vist i Figur 8. Modellen her er laget basert på data målt på 20 cm avstand, og dataene vist i figuren viser prediksjon for data målt på 15 cm. I modellen kategoriseres lusene inn i bevegelige og kjønnsmodne hunn lus. Av 27 lus er kun én klassifisert feil, dvs. en treffprosent på ca. 96%. Dersom man bruker tre kategorier (bevegelige, kjønnsmodne- hann og hunn lus) oppnår man en treffprosent på 85 %.



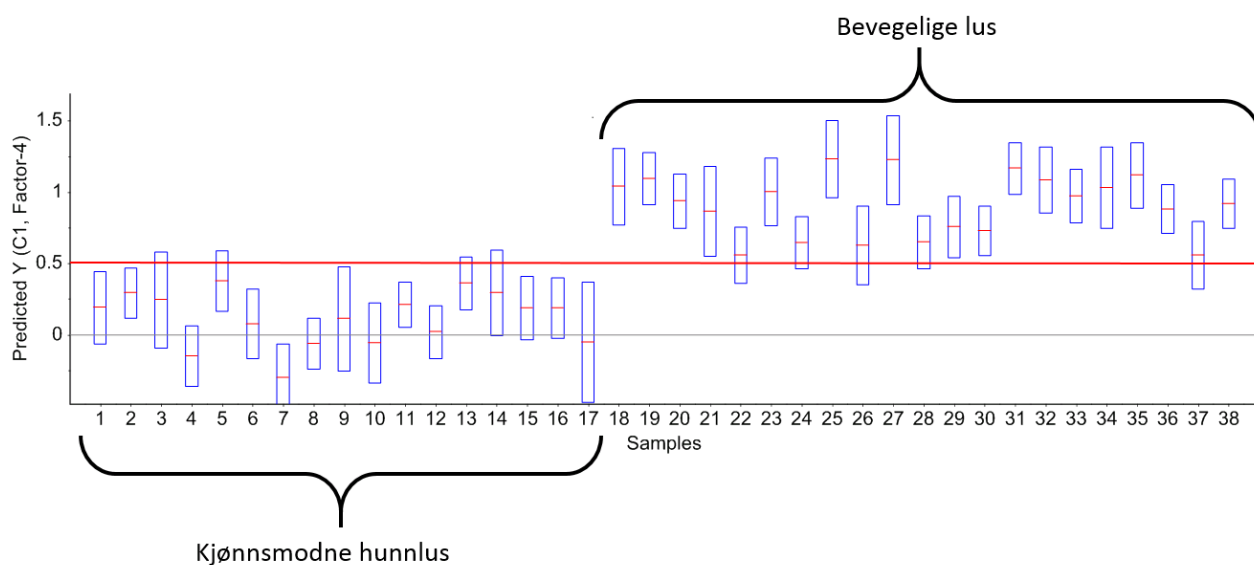
Figur8 Prediksjon av lus målt på 15 cm i en modell for 20 cm.

Figur 9 viser prediksjon av lus målt på 15 cm avstand i en modell basert på data fra 30 cm. Her oppnås en prediksjonsnøyaktighet på 92.5 %.



Figur 9 For prediksjon av lus målt på 15 cm avstand i en modell for 30 cm oppnås en prediksjonsnøyaktighet på 92.5 %

Figur 10 viser klassifisering av lus på 30 cm avstand for en modell laget på data fra 30 cm. Det gir 100% korrekt klassifisering når det klassifiseres i to grupper. For tre grupper gir det en treffprosent på 94%.



Figur 10 Prediksjon av lus målt på 30 cm for modell på 30 cm.

I Tabell 1 er resultatene presentert over oppsummert. De viser en treffsikkerhet på 80 til 100 % avhengig av hvilke data som legges til grunn for modellen og hvilke data som testes. Likevel viser det høy treffsikkerhet selv om avstanden ikke er korrekt. Det betyr at modellene er robuste nok til å håndtere unøyaktige kalibreringer for avstand. Likevel ser man at resultatene blir bedre dersom forskjellen mellom modell-avstand og test-avstand blir mindre (96 % og 85 % for 20cm/15cm, og 92.5 % og 80 % for 30cm/15cm).

Tabell 1. Oppsummering av resultatene i vist i Figur 6 til 10. Prediksjonstreffsikkerheten er fra 100% til 80% avhengig av forskjellen i avstanden fra modell data til test data.

Modell (avstand)	data Test (avstand)	data Treffprosent 2 grupper	Treffprosent 3 grupper
20 cm	20 cm	100%	89%
20 cm	15 cm	96%	85%
30 cm	30 cm	100%	94%
30 cm	15 cm	92.5%	80%

Det ble undersøkt om det var et mønster i hvilke lus som ble feilklassifisert, og viser seg at lus som er i nærheten av de hvite kantene som ble brukt som «innhegning» (se Figur 2 og Figur 3) ble oftere klassifisert feil. Dette kan skyldes lysrefleksjoner eller skygger som oppstod pga. disse.

Det jobbes kontinuerlig med å forbedre avstandskorreksjoner for UHI data. Dette vil forbedre resultatene for prediksjon når avstandsforskjellen i vannet er stor. Man vil også kunne kontinuerlig videreutvikle modellene basert på målte data.



## 4 Konklusjon

---

Resultatene viser at hyperspektral avbildning kan brukes til å klassifisere ulike stadier av lakselus også under vann. Selv om vannet absorberer store deler av lysspekteret med forskjellig styrke på ulike bølgelengdeområder kan man ved hjelp av statistiske modeller klassifisere lus målt på ulike avstander til en god prediksjon.

Det ble gjennomført målinger av kjønnsmodne hunnlus, kjønnsmodne hannlus og bevegelige lus i avstandene 15 cm, 20 cm og 30 cm. For klassifisering med kjønnsmodne hannlus og bevegelige lus i en gruppe oppnås en treffsikkerhet på 100 % dersom modellen brukes på data målt i samme avstand som modellen ble laget for. Dersom lusene er avbildet på en annen avstand enn lusene som ble brukt til å lage modellen vil treffsikkerheten synke ned til 92.5 % for den største forskjellen. For klassifisering i tre grupper (kjønnsmodne hunnlus, kjønnsmodne hannlus og bevegelige lus) synker treffsikkerheten til omkring 90 % for riktig avstand og til 80 % for den største avstanden. Videre utvikling av algoritmene som kompenserer for demping av lyset i vann og av klassifisering vil kunne forbedre dette resultatet ytterligere.