



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Hodnocení změn vybarvení okrasných ryb

J. Urban, M. Sergejevová, I. Slepíčková, A. Kouba, D. Štys, J. Masojídek



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ





FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Hodnocení změn vybarvení okrasných ryb

J. Urban, M. Sergejevová, I. Šlepičková, A. Kouba, D. Štys, J. Masojídek

**VYDÁNÍ PUBLIKACE BYLO USKUTEČNĚNO
ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU:**

Inovace prezenčního studia bakalářského studijního oboru Rybářství

(CZ.1.07/2.2.00/15.0076)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

OBSAHOVÁ ČÁST METODIKY JE VÝSLEDKEM ŘEŠENÍ PROJEKTŮ:

CENAKVA – Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz (OPVaVpl,

CZ.1.05/2.1.00/01.0024), 47%

Postdok JU

(CZ.1.07/2.3.00/30.0006), 28%

ALGATECH – Centrum řasových biotechnologií Třeboň,

(OPVaVpl CZ.1.05/2.1.00/03.0110), 25%



ISBN 978-80-87437-55-1

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| 1. CÍL METODIKY | 6 |
| 2. VLASTNÍ POPIS METODIKY | 6 |
| 2.1. Vybarvení okrasných ryb | 6 |
| 2.1.1. Chromatofory a pigmentace rybí kůže | 7 |
| 2.1.2. Význam doplňkového krmiva pro vybarvení ryb | 9 |
| 2.2. Digitální reprezentace obrazu | 11 |
| 2.2.1. Vnímání barev člověkem | 11 |
| 2.2.2. Vnímání světla fotoaparátem | 12 |
| 2.2.3. Barevná reprezentace | 15 |
| 2.2.4. Šedotónová reprezentace | 17 |
| 2.2.5. Kalibrace chromatičnosti | 18 |
| 2.3. Vyhodnocení změn vybarvení | 21 |
| 2.3.1. Postup akvizice dat | 21 |
| 2.3.2. Typické chyby měření | 23 |
| 2.3.3. Zpracování a analýza obrazu | 25 |
| 2.3.4. Předzpracování | 26 |
| 2.3.4.1. Morfologická rekonstrukce | 26 |
| 2.3.4.2. Chromatické barvy | 27 |
| 2.3.5. Zpracování | 28 |
| 2.3.6. Analýza | 30 |
| 2.3.6.1. Barevné prostory CIE | 32 |
| 2.3.6.2. Dominantní vlnová délka | 33 |
| 2.4. Příkladová studie | 34 |
| 3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“ | 39 |
| 4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY | 40 |
| 5. EKONOMICKÉ ASPEKTY | 40 |
| 6. PODĚKOVÁNÍ | 41 |
| 7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY | 41 |
| 8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE | 44 |

1. CÍL METODIKY

Vybarvení okrasných ryb je jedním z kvalitativních parametrů určujících jejich fyziologický stav i maloobchodní cenu. Cílem metodiky je představit snadno proveditelný pracovní postup pro objektivní vyhodnocení změn odstínu a sytosti vybarvení ryb pomocí analýzy jejich digitálních fotografií, bez potřeby externích pozorovatelů (hodnotitelů). V případě hodnocení dalších parametrů, např. tělesné proporce, zdravotního stavu a celkové subjektivní kompozice barev, však zůstává subjektivní význam hodnotitelů nezpochybně.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

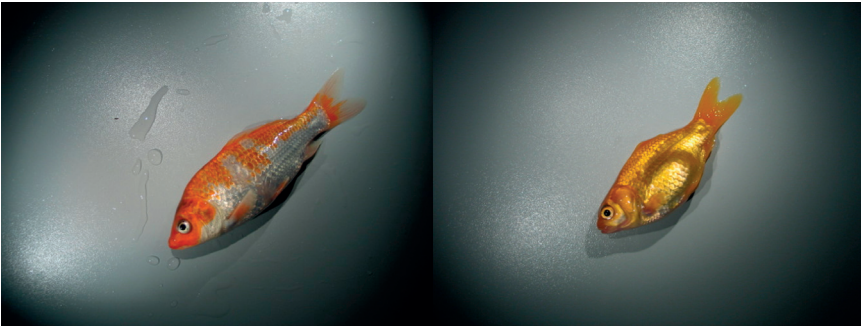
Metodika zahrnuje jak pořízení digitálních fotografií ryb v definovaných podmínkách, tak pořadí technik pro zpracování a analýzu obrazu, kterými jsou především segmentace, transformace barevných prostorů a morfologické operace. Nabízí neinvazní způsob objektivního hodnocení změn vybarvení i s ohledem na omezení plynoucí z technických možností digitální fotografie.

2.1. VYBARVENÍ OKRASNÝCH RYB

Na naší planetě žije okolo 30 000 druhů ryb, které reprezentují více než polovinu všech známých žijících obratlovců. Většina, asi 57% těchto druhů, je vázána výhradně na slanou vodu, ostatní pak na sladkovodní prostředí. Jen omezený počet druhů mezi těmito prostředími migruje. Tato obrovská druhová diverzita nabývá široké palety velikostí a barev, přičemž obývá nejrozmanitější habitaty (Nelson, 2006). Ryby představují obrovské bohatství a jsou významnou složkou lidské výživy, přičemž tento význam se v posledních letech stále zvyšuje. Maso ryb je pro lidskou populaci nepostradatelným zdrojem bílkovin, ale i dalších zdravích prospěšných látek (polynenasycených mastných kyselin, vitamínů, minerálů aj.). Specializované organizace, jako je např. FAO (Food and Agriculture Organization, Organizace pro výživu a zemědělství), očekávají v nadcházejících letech výrazný nárůst poptávky po rybách.

Významnou skupinou v oblasti rybníkářství jsou také okrasné (ornamentální) druhy ryb. Díky využívání ornamentálních ryb pro dekorativní účely v kašnách, zahradních jezírkách, rybníčcích i akváriích došlo v našich končinách v posledních cca dvaceti letech k nárůstu poptávky po těchto druzích. Do světa (zejména do Evropy a Severní Ameriky) se okrasné formy karasa dostaly z Asie s rozvojem dopravy už ve 2. polovině 19. století, kapři koi z Japonska už ve 30. letech 20. století a pak od 60. let 20. stol. Většina produkce okrasných ryb je zaměřena na sladkovodní druhy, které jsou nejčastěji cho-

vány v uzavřených nádržích nebo rybnících (Dawes, 1998). Mezi sladkovodní okrasné ryby patří jak „studenovodní“ jeseterovití, barevné mutace lososovitých, kaprovitých aj., tak i „teplovodní“ akvarijní druhy, které představují samostatnou prosperující komoditu. V případě našeho rybářství jsou nejnámějšími ornamentálními druhy kapr obecný (*Cyprinus carpio*), resp. jeho jedno- a vícebarevné okrasné mutace známé pod japonským názvem Koi (Nishikigoi), a karas zlatý (*Carassius auratus*) různobarevných, nejčastěji však červených a oranžových forem (obr. 1). Existuje ale i mnoho dalších druhů, které mohou být pro tento účel využívány. Mohou jimi být např. albinotičtí jedinci sumce velkého (*Silurus glanis*), různé barevné formy lína obecného (*Tinca tinca*), jelce jesena (*Leuciscus idus*), pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a zlatá forma perlína ostrobřichého (*Scardinius erythrophthalmus*), stejně jako jeseter malý (*Acipenser ruthenus*) včetně jeho albinotické formy a jeseter ruský (*A. gueldenstaedtii*). Jedním z rozhodujících kritérií pro stanovení tržní ceny je vedle velikosti a tvaru těla i ploutví také vybarvení ryb. Na základě vybarvení okrasných ryb můžeme posuzovat také vitalitu ryby, a tudíž i kvalitu krmení a vhodné podmínky během chovu v akvakultuře (Pavlidis a kol., 2006; Masojídek a kol., 2011; Sergejevová a Masojídek, 2011).



Obr. 1. Pravděpodobně jedny z nejnámějších okrasných druhů ryb. Vlevo kapr obecný *Cyprinus carpio* varieta koi (jeden z typů), vpravo karas zlatý *Carassius auratus*.

2.1.1. Chromatofory a pigmentace rybí kůže

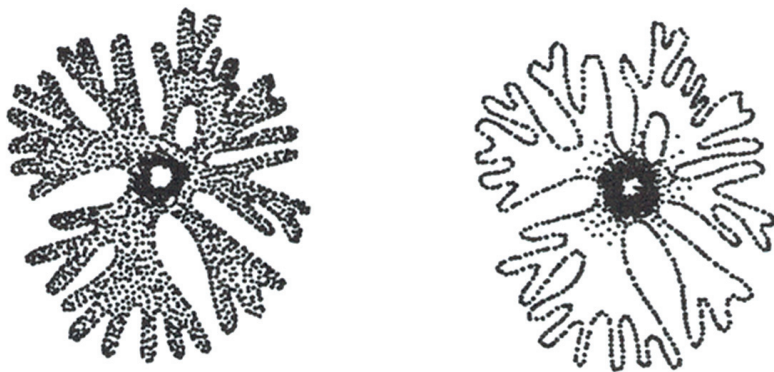
Vybarvení okrasných ryb je komplexní záležitost. Je způsobováno překrýváním a vrstvením různých typů pigmentových buněk ve škáře (ve vrstvě kůže mezi pokožkou a podkožní tkání; Oshima a kol., 2001; Kelsh, 2004), a především překrýváním subepidermálně uložených pigmentových buněk – chromatoforů. Ty jsou spojené s nervovou soustavou. Dle podnětů se pigmentová zrníčka v buňce stáhnou nebo roztáhnou (obr. 2) – pak je zbarvení intenzivnější. Ryby tímto způsobem mohou „měnit barvu“ např. při stresu, v tmavém prostředí tmavnou, ve světlém světlají. Tímto se snaží sply-

nout s prostředím. Schopnost ochranného zbarvení, tzv. mimikry, je u ryb velmi dobře vyvinuta (Baruš a kol., 1995; Dubský a kol., 2003).

Nejčastější pigmentové buňky jsou následující:

- 1) Melanofory s melaninem¹, které způsobují „černé“ (černé, hnědé, černomodré) zbarvení.
- 2) Xantofory obsahují tukové, v alkoholu rozpustné pigmenty-lipochromy mající žlutý nebo červený odstín. Tyto buňky jsou u ryb hojné a jejich velikost je v porovnání s melanofory menší.
- 3) Erytrofory obsahují červené lipochromy. Tyto buňky jsou méně časté a jejich výskyt je obvykle omezen jen na některé partie těla. V porovnání s ostatními chromatofory se jejich pigment pohybuje velmi rychle.
- 4) Iridocity (leukofory nebo též guanofory) jsou buňky bez výběžků, oválného tvaru s jedním jádrem. Obsahují krystalky guaninu² v podobě 2–20 μm dlouhých krystalků, které silně lámou světlo. Tím způsobují stříbrně bělavé zbarvení, které je obvykle patrné na bocích a břišní partii.

Finální barva kůže vzniká vzájemným působením a intenzitou (superpozicí) těchto chromatoforů (závisí nejen na hloubce uložení, ale i na roztažení pigmentu), které v kombinaci s nervovým řízením a odchovnými podmínkami prostředí (např. již zmíněná intenzita světla) určují finální vybarvení (Baruš a kol., 1995; Dubský a kol., 2003).



Obr. 2. Pigmentová buňka-chromatofor (v tomto případě melanofor) s roztaženým (vlevo) a staženým (vpravo) pigmentem-melaninem. Podle Széky, 1987; upraveno.

¹ Melanin vzniká oxidací a polymerací z aminokyseliny tyrosinu za působení enzymu tyrozinázy.

² Guanin je heterocyklická purinová báze vznikající jako odpadní produkt nukleoproteinů. Z části je v rybím těle zadržován, čímž se spolupodílí na jeho vybarvení.

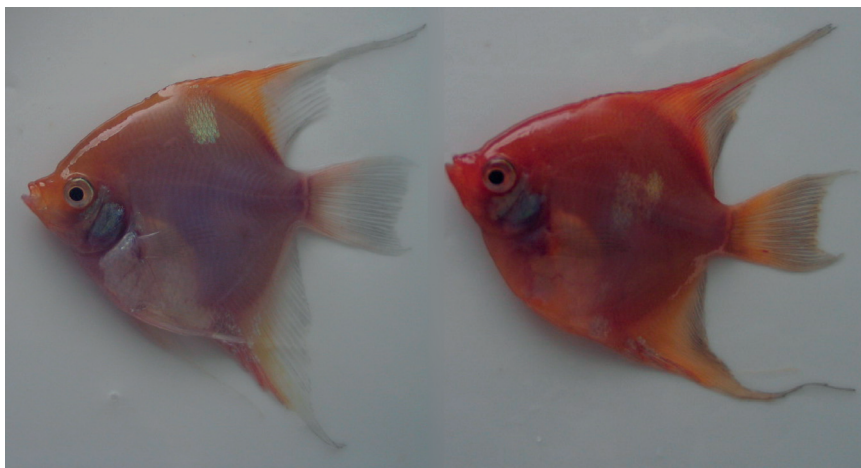
2.1.2. Význam doplňkového krmiva pro vybarvení ryb

Vybarvení ryb je také značně závislé na pigmentech přítomných ve svalové, tukové a kožní tkáni. Významnou roli v tomto hrají lipofilní organické pigmenty ze skupiny tetraterpenů – karotenoidy. Ryby, stejně jako ostatní zvířata, nejsou schopny biosyntézy karotenoidů *de novo* (Goodwin, 1984; Bernhard, 1990), proto ji musí přijímat z potravy – buď přímo z fytoplanktonu, nebo nepřímo přes navazující potravní řetězce. V akvakulturních chovech je nutné přidávat karotenoidy spolu s krmivem, kde jsou často obsaženy v syntetické formě. Vhodnou a zajímavou variantou je dodávání karotenoidů formou cíleně kultivovaných mikrořas (eukaryotických řas a prokaryotických sinic) míchaných do krmiva (obr. 3).



Obr. 3. Plůdek kapra obecného *Cyprinus carpio* plemene Jihočeský kapr šupinatý C73 po šestidenním odkrmu experimentálními extrudovanými krmivými s obsahem 0, 1, 2, 5 a 10 % řasy *Chlorelly* (zleva shora).

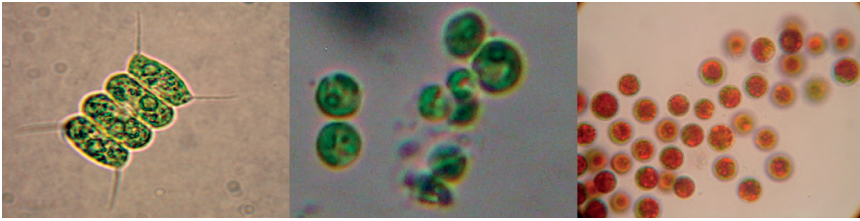
Změny vybarvení ryb, jakožto odpověď na dietu obohacenou karotenoidy z mikrořas s jejich zvýšeným obsahem, se projeví především změnou v xantoforech (např. astaxantin) a částečně i v erytroforech (např. lutein). To jsou barvy, na které se lidský pozorovatel soustředí a které hodnotí. Jsou pro něj přirozeně atraktivní (viz např. obr. 4). Tmavší hřbet, stříbřité boky a břicho, respektive vliv melanoforů a iridocitů, jsou pro lidské oko vcelku nedůležité skutečnosti. Význam melanoforů a iridocitů je tudíž při hodnocení vybarvení ryb nižší.



Obr. 4. Vlevo skalára amazonská *Pterophyllum scalare* krmená kontrolní dietou bez přídavku řasové biomasy, vpravo ryba krmená dietou obsahující 2% řasy *Haematococcus pluvialis* po 28 dnech odchovu.

Mikrořasy pěstované v akvakulturách (např. obr. 5) mají díky svým vysokým nutričním hodnotám potenciál stát se významným doplňkem tradičních krmných přípravků. Vzhledem k obsahu probiotických, antioxidačních látek a pigmentů mohou pozitivně ovlivnit nejen barvu, ale i zdraví ryb (Gouveia a kol., 2002, 2003; Becker, 2004; Muller-Feuga, 2004; Zmora a Richmond, 2004). Mezi nejvýznamnější karotenoidy obsažené v mikrořasách patří: astaxanthin, lutein, beta-karoten, canthaxanthin, zeaxanthin, violaxanthin a neoxanthin. Stejně jako u vyšších rostlin jsou mikrořasové karotenoidy převážně asociovány s proteiny přítomnými v chloroplastech.

Vliv mikrořas (vliv jejich přídavku do krmiva) na vybarvení a vitalitu ryb byl potvrzen několika experimenty. Vybarvení ryb se zlepšilo již po několika týdnech krmění s vyšším obsahem karotenoidů (Sommer a kol., 1992; Choubert a Heinrich, 1993; Gouveia a kol., 1997, 2002, 2003; Gomes a kol., 2002; Hancz a kol., 2003). Vybrané mikrořasy lze rybám předkládat buď přímo přimícháním do krmiva, nebo nepřímo přes potravní řetězec. V těchto případech slouží mikrořasy jako krmivo vířníkům, larvám hmyzu, zooplanktonu, kteří jsou následně předkládáni rybám. Další možností je použití vysušených mikrořas buď ve formě prášku, nebo pelet.



Obr. 5. Ilustrativní mikroskopické snímky některých mikrořas používaných jako doplňkové krmivo. Zleva doprava *Scenedesmus (Coenobium)*, *Chlorella*, a *Haematococcus*.

Nejvýznamějším a nejúčinnějším karotenoidem je bezesporu astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione), a to především kvůli rychlejšímu, výraznějšímu a déle trvajícimu vybarvení (Foss a kol., 1984; Choubert a Storebakken, 1989; Storebakken a Choubert, 1991). Vedle astaxanthinu jsou do rybiho krmiva běžně přidávány další karotenoidy, např. canthaxanthin (β , β -carotene-4,4'-dione), lutein, beta-karoten, popř. jejich kombinace (Torrissen, 1985, 1986), přičemž přídavek čistého astaxanthinu se vždy projevil nevýraznější změnou barvy (Choubert, 2010).

Většina používaných komerčně vyráběných krmiv je obohacena syntetickými karotenoidy, tzn. karotenoidy připravenými uměle chemickou cestou. Použití karotenoidů ve formě mikrořas má ale vedle vybarvovacího účinku velké množství dalších výhod. Buňky mikrořas obsahují mnoho nutričně důležitých látek, které mají kladný vliv na fyziologii a zdravotní stav ryb. Velice významný je právě obsah antioxidantů v mikrořasách, jejichž vlivem dochází ke snížení vlivu volných radikálů (Prior a Wu, 2006). Zvyšuje se tak odolnost ryb vůči nepříznivým kultivačním podmínkám, ale také působení desinfekčních a léčivých roztoků, v neposlední řadě je tato skutečnost důležitá při ochraně vysoce ceněných polynenasycených mastných kyselin proti oxidaci a hydrolýze u ryb určených ke konzumaci (Resfgaard a kol., 1998).

2.2. DIGITÁLNÍ REPREZENTACE OBRAZU

2.2.1. Vnímání barev člověkem

Světlo je viditelná úzká část spektra elektromagnetického vlnění vymezená vlnovou délkou 380–810 nanometrů (obr. 6). V dolní části rozmezí se nachází fialová barva, v horní červená. Horní i dolní hranice vnímání viditelného spektra může být u různých jedinců posunuta směrem k zúžení této oblasti.

Člověk vnímá barvy jako kombinaci základních barev – červené, zelené a modré. K tomu nám slouží zhruba 3 miliony čípků rozmístěných v sítnici oka. Rozeznáváme

čípky trojího typu. Každý z nich je v závislosti na vlnové délce citlivý na jednu ze základních barev (modrou, zelenou a červenou). Při různě intenzivním dráždění různých druhů čípků vznikají vjemy odlišných barevných odstínů. Jejich kombinací vznikají vjemy všech barev, které jsme schopni vidět. Lidské oko je schopno rozpoznat okolo deseti miliónů barevných odstínů. Současným a stejně intenzivním drážděním všech tří druhů čípků vzniká vjem bílého světla. Nejvíce čípků (cca 60 %) je citlivých na světlo zelené až žlutozelené. Tato skutečnost je důsledkem evoluce. Před vznikem civilizace byla dominantní barvou v našem přirozeném prostředí barva zelená. Napak nejmenší množství čípků je citlivých na barvu modrou (cca 10 %). Sítnice dále obsahuje 120 milionů dalších fotoreceptorů – tyčinek. Ty jsou schopny zaznamenat pouze intenzitu dopadajícího světla. Jejich pomocí se uskutečňuje vidění za šera a v noci. Nejcitlivější jsou na vlnovou délku světla okolo 500 nm (Novotný a kol., 1995; Žára, 2004).

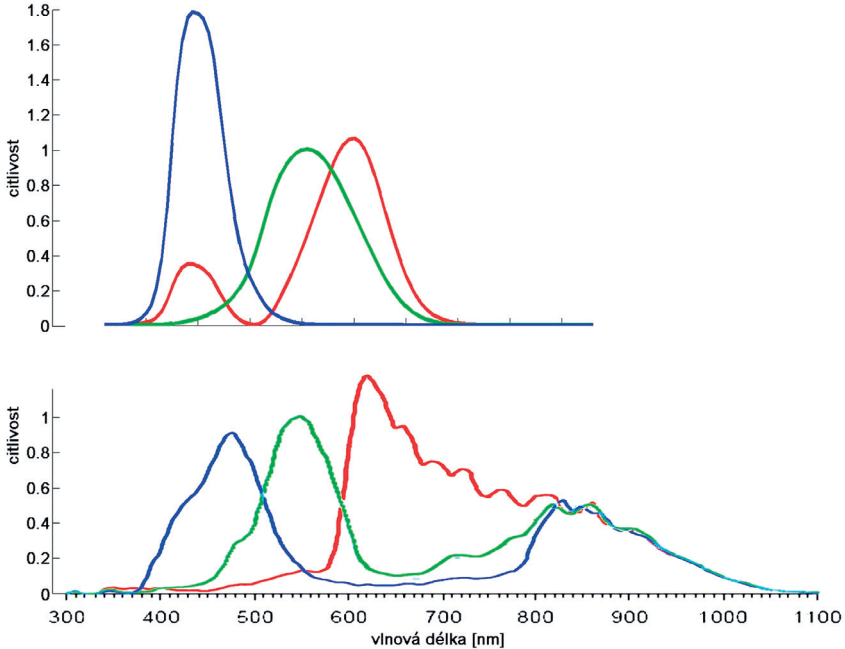
Vzhledem k tomu, že u každého člověka je nepatrně odlišné konkrétní rozložení, poměr a spektrální citlivost jednotlivých typů čípků, je hodnocení barvy člověkem vysoce subjektivní záležitostí. Odchytky i mezi lidmi s „normálním“ viděním se vyskytují především v červené a modré oblasti. Vlivem těchto faktorů se proto může různým pozorovatelům jevit tatáž barva rozdílně. Z těchto důvodů je nutné používat pro hodnocení barvy přístupy založené na objektivnějším hodnocení barevné informace.

2.2.2. Vnímání světla fotoaparátem

Princip digitálního fotoaparátu vychází z konstrukce klasického fotoaparátu, nicméně jádrem přístroje je světlocitlivá plocha snímače CCD (Charge coupled device – zařízení shromažďující náboj) nebo CMOS (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor – doplňující se kov-oxid-polovodič). Zatímco CCD čipy jsou náročnější na výrobu, CMOS čipy mají výrazně nižší energetické nároky a jsou rovněž fyzicky větší při srovnatelném počtu pixelů s CCD (při menší fyzické velikosti pixelu CMOS čipů by značně narůstal šum, u čipu CMOS je plocha určená pro sběr světla menší než u čipu CCD, a proto je obraz při srovnatelné velikosti celého čipu méně kvalitní). Obecně se však předpokládá slibnější budoucnost CMOS čipům.

Přes systém optických čoček v objektivu se na plochu čipu promítá obraz snímaného objektu. Světelná energie, která přichází ze snímaného prostoru (scény), je v jednotlivých pixelech převáděna na elektrický signál a je uložena v podobě náboje. Náboj vzniká postupně během expozice čipu, kdy je otevřena uzávěrka fotoaparátu a světlo může dopadat na čip. Princip vzniku elektrického náboje je založen na fotoelektrickém jevu (Einstein, 1905) s tím rozdílem, že náboje neodtékají okamžitě, ale jsou izolovány ve struktuře čipu. Čip je složen z miliónů navzájem oddělených světlocitlivých buněk

(křemíkových fotodiod). Konkrétní počet buněk je udáván tzv. rozlišením³. Po uzavření uzávěrky jsou náboje jednotlivých pixelů postupně odváděny a měřeny speciálním zesilovačem. Takto získaný signál je navzorkován analogově-digitálním převodníkem na binární číslo.



Obr. 6. Spektrální citlivost lidského oka (nahore) definovaná Mezinárodní komisí pro osvětlování (CIE) a spektrální citlivost CCD čipu digitálního fotoaparátu (dole). Barvami křivky jsou míněny jednotlivé typy čípků, respektive kanálů. Citlivost je dle konvence normalizována na hodnotu jedna pro maximum v zelené. Člověk je schopen vnímat světlo i o vlnové délce 720–810 nm, nicméně citlivost je v této oblasti spektra o cca 5 řádů nižší. V důsledku rozdílné odezvy lidského oka a čipu snímacího zařízení tedy subjektivní dojem z přímého pozorování objektu není shodný se subjektivním dojmem z pozorování fotografie. Graf připraven pomocí Spectral and XYZ Color Functions (Mather, 2005).

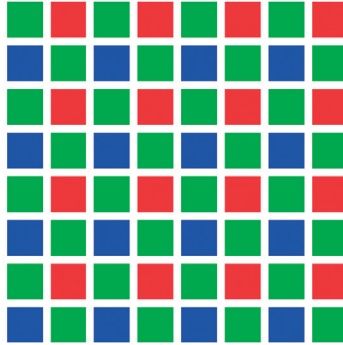
³ Ve skutečnosti jde pouze o množství pixelů (diskriminabilních bodů) na čipu, mezinárodní standardy tudíž nedoporučují používání termínu rozlišení v tomto kontextu (Ansi, 2004; Čipa, 2005).



Obr. 7. Digitální fotoaparát snímá i v oblasti blízké infračervené (viz graf spektrální citlivosti CCD čipu na obr. 6 dole), což se většinou (nedostatečně) řeší pomocí filtrů na optické cestě. Situaci lze snadno demonstrovat – pomocí webové kamery je možné „vidět“ např. signál dálkového ovladače k datovému projektoru (vlevo bez signálu, vpravo se signálem).

Plocha fotodiod bývá někdy přirovnávána k mozaice z kamínků (Tancer, 2007). Jako taková se měří pouze intenzita dopadajícího světla, nikoliv však přímo barva. Vzniklý digitální otisk reálného obrazu je tedy dále interpolován a je provedena korekce vyvážením bílé (více v podkapitole 2.2.5. Kalibrace chromatičnosti). Přes jednotlivé čipy je nasazena tzv. Bayerova maska (Bayer, 1976, obr. 8), což je filtr jednotlivých barev RGB (odpovídající R-red, červené, G-green, zelené, a B-blue modré barvě). Každý pixel tak obsahuje informaci pouze o jedné dopadající barvě, zbylé dvě barevné složky je nutné interpolovat ze sousedních „kamínků mozaiky“. Ačkoliv je Bayerova interpolace nej-používanější, používají se i jiné návrhy a patenty filtrů (polopropustný Foveon X3, dichroická zrcadla, rozdílné vzory mozaiky – CMYW, RGBW, EXR a X-Trans). Existují rovněž čipy, jejichž buňky nemají charakter čtvercový, ale hexagonální. Případně se používají tři samostatné čipy bez masky, tedy pro každou barvu jeden.

Následuje ořez obrazu, konverze barevné hloubky (zatímco většina čipů je schopna produkovat obraz ve dvanácti- až šestnáctibitové hloubce, běžně se fotografie ukládají v osmibitové hloubce), odstranění šumu CCD čipu a další úpravy podle konkrétního nastavení fotoaparátů, souhrnně nazývané jako parametrizace. Posledním krokem je komprese již upravených obrazových dat do výstupního formátového souboru (JPEG, TIFF, PNG a další) a uložení na paměťové médium.



Obr. 8. Bayerova maska na čipu digitálního fotoaparátu. Dvojnásobný počet zelených prvků je používán z důvodu přizpůsobení vzniklého obrazu vlastnostem lidského oka (viz předchozí podkapitola).

2.2.3. Barevná reprezentace

Stroje (digitální záznamová zařízení, displeje, tiskárny) vytváří, resp. zobrazují barvu několika základními způsoby. Obecně uznávaným standardem je model RGB. Každý pixel může být reprezentován třídimenčním vektorem (R, G, B), přičemž hodnota každé složky udává hodnotu její intenzity. Všechny složky nulové představují černou barvu, maximální hodnota představuje bílou. Pokud je jedna ze složek rovna 255 a všechny ostatní jsou nulové, dostaneme přímo barvu odpovídající názvu složky. Často používaným je rozmezí 256 hodnot (8 bitů, tab. 1) pro každou barevnou složku (Šonka a kol., 1999; Quan, 2002).

Tab. 1. Hodnoty R (Red-červený kanál, první sloupec), G (Green-zelený kanál, druhý sloupec), B (Blue-modrý kanál, třetí sloupec) na rozsahu 256 hodnot a odpovídající barva (čtvrtý sloupec).

| R | G | B | Barva |
|-----|-----|-----|-------------|
| 0 | 0 | 0 | Černá |
| 255 | 0 | 0 | Červená |
| 0 | 255 | 0 | Zelená |
| 0 | 0 | 255 | Modrá |
| 0 | 255 | 255 | Čistě modrá |
| 255 | 0 | 255 | Fialová |
| 255 | 255 | 0 | Žlutá |
| 255 | 255 | 255 | Bílá |

Dalším způsobem reprezentace barev je model CMY, kde C je *cyan*-azurová, M *magenta*-purpurová a Y *yellow*-žlutá. Jde o model odvozený z RGB a je vůči němu komplementární. Používá se především při barevném tisku, s doplněním na model CMYK – rozšířením o černou barvu (ve skutečnosti stupně šedi, bývají při tisku nejpoužívanější, a tudíž nemá smysl je míchat z ostatních, dražších barev).

Zatímco u RGB modelu jde o tzv. aditivní (doplňkové) míchání barev (jednotlivé složky se sčítají a zvyšují intenzitu celkového světla), u CMY jde o tzv. subtraktivní míchání barev, barvy od sebe „odčítáme“ (omezujeme spektrum odráženého světla). Z tohoto důvodu vypadají barvy na displeji (monitoru) opět odlišně než na vytištěném papíře (fotografii), jelikož barvy vznikají naprosto odlišným způsobem. Shodná reprezentace pro zobrazení i tisk není v současné době technologicky možná.

Zobrazíme-li tedy obrázek na displeji, bývá reprezentován v RGB modelu, naopak, chceme-li jej vytisknout, musí se převést do CMY nebo CMYK modelu, se kterým pracuje barevná tiskárna. Naštěstí jde o jednoduchou a běžnou konverzi, takže se o ni uživatel (většinou) nemusí starat. Obrázek 9 ilustruje rozdíly mezi RGB a CMYK modelem. Horní řada ukazuje, co zobrazují jednotlivé barevné kanály digitálního zařízení v RGB modelu, aby reprezentovaly obrázek v prostřední řadě. Vidíme, že pravička je světlé pouze v zeleném kanálu a v ostatních je tmavé, protože pro jeho zobrazení je třeba především zelená složka. Naopak rybí tělo (karas zlatý, vybarvení ovlivněné dietou bohatou na řasové karotenoidy) je tmavé v modrém kanálu, světlé v červeném a kdesi mezi v zeleném kanálu (oranžová barva vzniká v RGB modelu mísením červené a zelené složky). Spodní řada ukazuje, co musí tisknout jednotlivé barvy tiskárny, aby reprezentovaly stejný obrázek. Zelená barva pravička vzniká v CMY modelu mísením žluté a azurové. Červenooranžová barva rybího těla vzniká mísením žluté a purpurové. Pozadí je šedé, tudíž se tiskne pouze v K kanálu (i s lehkým nádechem v žlutém kanálu).



Obr. 9. Rozdíl mezi kanály barevného prostoru RGB (R-red – červený kanál, G-green – zelený kanál, B-blue – modrý kanál, nahoře) a CMYK (C-cyan – azurová, M-magenta – purpurová, Y-yellow – žlutá, CMY kanály dole, K kanál uprostřed vpravo – šedotónový obrázek). Jde o stále stejný prostor, reprezentující stejnou fotografii (uprostřed vlevo), pouze se záměnou souřadných vektorů (Intel, 2007).

2.2.4. Šedotónová reprezentace

Jde o obrázek v odstínech šedi, často též nesprávně nazývaný černobílý. Můžeme jej snadno získat výpočtem z hodnot modelu RGB. Jelikož člověk vnímá rozdílně jednotlivé barevné složky (viz podkapitola 2.2.1. Vnímání barev člověkem), využívá se nejčastěji převodu, který každé složce dává různou váhu: $Y = 0,299 R + 0,587 G + 0,114 B$ (Žára, 2004).

Tento způsob převodu je pro vnímání člověkem nejpříjemnější, nicméně pro zpracování šedotónového obrázku počítačem není vhodný, právě z důvodu nerovnoměrného zastoupení jednotlivých složek (obr. 10). Z tohoto důvodu se doporučuje (Carpenter a kol., 2006) používat vzájemnou relativní váhu jednotlivých barevných kanálů: $Y = (R^2 + G^2 + B^2) / (R + G + B)$.

Převodem do stupňů šedi se informace o barvě ztratí a nelze ji již z šedotónového obrázku získat zpět (Šonka a kol., 1999; Urban, 2012).



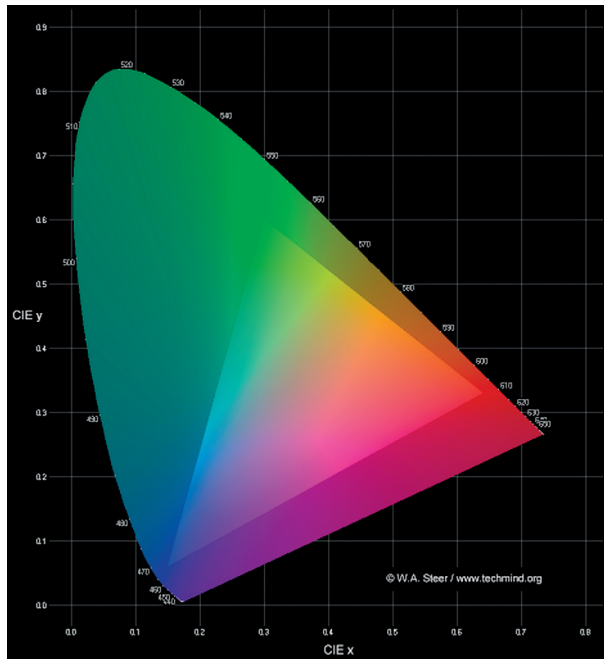
Obr. 10. RGB a šedotónové reprezentace, uprostřed nevhodnější váhy pro člověka, vpravo pro zpracování počítačem. Všimněte si, že ani jedna šedotónová reprezentace neodpovídá K kanálu z modelu CMYK (na obr. 9).

2.2.5. Kalibrace chromatičnosti

Fotografie pořizované běžným digitálním fotoaparátem nejsou primárně určeny k porovnávání barevnosti mezi obrázky pořízenými různými fotoaparáty a při různých experimentech. Hlavním důvodem pro toto tvrzení je skutečnost, že ani různé čipy fotoaparátů nereprezentují během snímání barvu naprosto shodným způsobem. Pro názornou ilustraci slouží tzv. barevný gamut (obr. 11), jenž byl definován Mezinárodní komisí pro osvětlování (CIE). Jde vlastně o graf viditelného spektra, který se udává v různých souřadnicích (xy , ab , uv a mnoho dalších⁴), lišících se především v míře uniformnosti barevného prostoru. Pro zobrazení odpovídá lidskému vnímání více použití souřadného systému xy , pro výpočet dominantní vlnové délky je vhodnější systém uv , pro kolorimetrii se nejčastěji využívá systém ab . Systémy se drobně liší pouze ve výpočtu jednotlivých složek (Tancer, 2007). Na obvodu grafu jsou hodnoty odpovídající přímo vlnové délce viditelného světla, s výjimkou základny, kde barvy odpovídají různému poměru modrého a červeného světla.

Oblasti uvnitř plochy grafu představují barevný odstín, který vzniká již kombinací různých barev. Přibližně uprostřed grafu se nachází tzv. bílý bod, který znamená stejnou intenzitu všech barevných odstínů (černá barva je stejná – nulová intenzita všech barev, bílá barva je stejná – maximální intenzita všech barev, stupně šedi opět odpovídají stejné intenzitě všech barev, přičemž tato hodnota je mezi nulovou a maximální hodnotou intenzity).

⁴ Pro názornost zjednodušíme vynecháním hvězdičkové notace a osy světlovosti (často také světelnost či světlost) v popisu.



Obr. 11. Barevný gamut podle CIE (Mezinárodní komise pro osvětlování). Graf použit z <http://www.techmind.org/colour>, se svolením W.A. Steera.

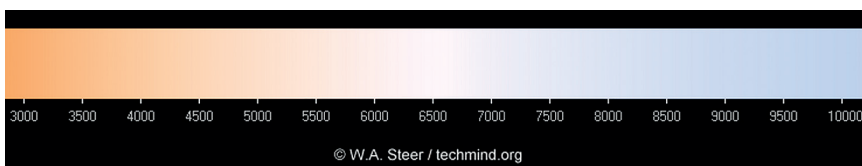
V současné době není technologicky možné zobrazit/vytisknout všechny barvy viditelného spektra. Každý displej, fotoaparát či tiskárna mají svůj vlastní gamut – oblast barev, kterou lze na daném zařízení reprezentovat. Tato oblast představuje pouze trojúhelníkovou výseč uvnitř gamutu definovaného CIE (z tohoto důvodu jsou zobrazené barvy mimo trojúhelník vlastně falešnými barvami, neboť není technologicky možné reprezentovat skutečné barvy gamutu mimo trojúhelníkovou oblast). Pro každé zařízení je tedy trojúhelníkový gamut mírně odlišný, reprezentované barvy si navzájem přesně neodpovídají.

S tím přímo souvisí i problém použitého osvětlení scény. Řešením situace je kalibrace chromatičnosti, jinými slovy umístění skutečného bílého bodu na správné místo v systému souřadnic. Z hlediska teorie měření nejde o nic jiného než o odhad a korekci přenosové funkce zařízení a minimalizaci biasu⁵ mezi gamutem fotoaparátu (výstupní kvantitou) a vlnovými délkami měřeného světla (vstupní kvantitou). Hlavní příčinou biasu je chromatická teplota světla osvětlujícího snímanou scénu (žárovka, slunce, LED; Spagnolo a kol., 2012). Vliv teploty chromatičnosti osvětlení na zobrazení bílé barvy je zobrazen na obr. 12.

⁵ Zkreslení výsledků, které vzniklo v důsledku chyby při plánování nebo provedení experimentu.

Správné vyhodnocení přesnosti barevné reprezentace je netriviální⁶ úloha, jelikož přenosová funkce je vždy nelineární. Ve skutečnosti je ovšem přesnost barevné kalibrace často přeceňována. Vysoká přesnost barevné reprezentace je důležitá pro komparativní studie, kde je nutné porovnávat výsledky různých měřících zařízení a rozdílných světelných podmínek. Pro tyto účely je však vhodnější používat přímo spektrofotometrická zařízení, která jsou schopná pořídit celý spektrální profil. Pro vědecké účely mají CCD a CMOS čipy celou řadu limitujících faktorů, k nimž patří například slabý poměr signálu k šumu, deformace obrazu na optické dráze zařízení, pomalá odezva, ztrátová transformace dat při ukládání (konverzí do běžných obrázkových souborových formátů je ztracena třetina až polovina zaznamatelné informace), nízký dynamický rozsah, rozdílná spektrální citlivost ve srovnání s lidským okem a jiné.

Jednoduchým způsobem řešení biasu chromatičnosti je funkce implementovaná dnes již v takřka každém digitálním fotoaparátu pod názvem „vyvážení na bílou“. Jak již bylo řečeno, tato funkce bere v úvahu teplotu chromatičnosti a umístí bílý bod gamutu na správnou pozici v souřadném systému (rotaci systému souřadnic není třeba uvažovat, ta může nastat pouze posunutým umístěním Bayerovy masky na čip a tyto vadné výrobky neprojdou výstupní kontrolou výrobce). V praxi vypadá kalibrace chromatičnosti velice jednoduše, stačí zaměřit fotoaparát na bílý objekt a aktivovat funkci vyvážení na bílou. Nastavení zůstane zachováno až do doby, než je fotoaparát znovu vypnut. Při sérii experimentů je vhodné používat stále stejný objekt k vyvážení. I kdyby totiž nebyl objekt naprosto bílý, a tím pádem pozice bílého bodu stále biasovaná, bude zaručena stejná hodnota biasu pro všechny experimenty, a bude tedy možné srovnávat naměřené hodnoty barev v rámci všech experimentů s daným vyvážením.



Obr. 12. Bílá barva při rozdílných teplotách chromatičnosti (podle vyzařování černého tělesa v Kelvinech). Světlo halogenové žárovky odpovídá teplotě 3 200 K, sluneční světlo v závislosti na počasí 5 000–6 500 K, značně rozptýlené světlo až 10 000 K. Lidské oko samočinně přizpůsobuje barevné vnímání v závislosti na osvětlení, fotoaparát ovšem vyžaduje manuální nastavení či tzv. vyvážení na bílou⁷. Výřez z obrázku z <http://www.techmind.org/colour/coltemp.html>, použito se svolením W.A. Steera.

⁶ Tj. nelze jednoduše odvodit ze souboru základních řešení.

⁷ Pro běžné fotografování zvládá většina digitálních fotoaparátů automatické vyvážení za slunečního světla, manuální režim je nutné použít až při umělém osvětlení. Pro profesionální a vědecké účely je však rozumnější používat manuální nastavení vždy, např. z důvodu konstantního (ideálně nulového) biasu.

2.3. VYHODNOCENÍ ZMĚN VYBARVENÍ

2.3.1. Postup akvizice dat

Fotografie se pořizují v temné místnosti či fotografické komůrce nad stabilní fotografickou podložkou či deskou, se stojanem pro fotoaparát (z důvodu standardizované vzdálenosti fotografovaného objektu od objektivu). Scénu nasvítíme definovaným osvětlením ze zdroje studeného světla pomocí světlovodů, ideálně použijeme mírně rozptýlené světlo⁸, vyvarujeme se odlesků zdroje světla přímo do fotoaparátu, případně použijeme polarizační filtr⁹. Světlovody či zdroje světla umístíme do standardizované vzdálenosti, kterou změříme, zaznamenáme a dodržujeme po celou dobu všech měření stejnou. Snímaná ryba na desce musí být rovnoměrně ozářena. Typ světla musí zůstat u všech pořizovaných snímků shodný, abychom minimalizovali možný zdroj biasu. Halogenové světlo posouvá bílý bod gamutu k modré, žárovkové světlo k žluto-oranžové, základní technika nasvícení scény využívá tzv. třibodového osvětlení:

- 1) Základní světlo – osvětluje objekt a umísťuje se za objektiv, přibližně v úhlu 45 stupňů.
- 2) Doplnkové světlo – zjemňuje ostré stíny základního světla, je rozptýlené či odražené. Umísťuje se rovněž za objektiv, opět v úhlu přibližně 45 stupňů, avšak v protisměru k základnímu světlu.
- 3) Zadní světlo – na objekt svítí z boku/zezadu. Úkolem je zvýraznit objekt oproti pozadí, světlo však nesmí svítit přímo do objektivu.

Fotoaparát přichytíme na stojanu desky do definované výšky od 15 do 24 cm (zvolíme vhodnou vzdálenost pro danou velikost ryby) a po celou dobu experimentu tuto výšku zachycení dodržujeme. Vzdálenost by teoreticky bylo možné řešit použitím referenčního etalonu, nicméně shodná vzdálenost není z hlediska automatického zpracování nezbytně nutná (díky průměrování), používá se spíše pro subjektivní hodnocení (uživatel snáze porovná dva obrazy ryb o stejné velikosti v jedné scéně). Fotografované ryby pak umísťujeme do středu fotografované scény¹⁰. Na fotoaparátu nastavíme profilový režim, makro, bez blesku, nejvyšší „rozlišení“ (diskriminabilitu). Přístroj zapojíme do elektrické sítě, abychom v průběhu měření nemuseli vyměňovat baterie a znovu nastavovat režim. Fotoaparát vyvážíme na bílou při použitím světla, jako referenční bílý objekt postačí běžný papír do tiskárny nebo střední šedá fotografická tabulka. Konkrétní postup vyvážení na bílou je závislý na ovládání a obsahu menu konkrétního fotoaparátu.

⁸ Přímé světlo vrhá ostré stíny a velké odlesky.

⁹ Ryba musí zůstat během snímání mokrá, aby nedošlo k zaschnutí ochranné vrstvy na kůži a následné infekci, bohužel se tím zvyšují odlesky.

¹⁰ Umístěný do doporučeného tzv. zlatého řezu se používá pro umělecké a reklamní fotografie.

Vzhledem k současným možnostem digitálních fotoaparátů (co se týče počtu snímatelných pixelů) není nutné stanovovat minimální potřebné rozlišení. Pro účely maximální věrohodnosti je vhodnější používat bezztrátové formáty obrazu, např. PNG, případně JPEG s minimální kompresí (JPEG 2000 povoluje bezztrátovou kompresi, standardní JPEG je optimalizován pro 75% kompresi).

Podmínky scény nastavíme tak stabilní a standardizované, jak je jen možné. Zvýšení přesnosti barevné reprezentace je vždy možné za pomoci dodatečných nákladů a komplikací, nicméně s ohledem na metodický cíl je současný postup dostačující.

V dalším kroku si připravíme anestetikum. Rybích anestetik je na trhu dostupných hned několik, z řady důvodů je však často doporučován tzv. hřebíčkový olej. Hřebíčkový olej¹¹ je látka přírodního původu získaná destilací z rostliny *Eugenia aromatica* nebo *E. caryophyllata*. Účinnou látkou je eugenol, který dle šarže tvoří 72 až 90%. Účinná koncentrace je druhově specifická, obvykle je ale v rozmezí 30–40 mg.l⁻¹ (= cca 0,03–0,04 ml.l⁻¹). Hřebíčkový olej je nezbytné nejprve dobře rozmíchat v menším množství vody (například intenzivním třepáním v PET lahvi) a teprve pak nalít do lázně. Jeho rozpustnost je totiž nízká. Používá se voda stejné kvality a teploty, v jaké jsou ryby drženy. Anestezie nastupuje během 5 až 10 minut (Kolářová a kol., 2012). V případě užití vyšších koncentrací je nástup účinku přirozeně rychlejší, tento postup je ale vůči rybám méně šetrný. Do lázně jsou ryby vkládány postupně tak, aby mohly být po nástupu anestezie co nejdříve vyfotografovány. Ryby je nutno odebírat v pořadí, ve kterém jsou do roztoku přidávány. Nasnímané ryby se umísťují do nádoby s čistou a kyslíkatou vodou, kde probíhá rekonvalescence (obr. 13). Ta je v případě hřebíčkového oleje sice delší, než je tomu u jiných anestetik, přesto se jedná o přípravek, který je celkově poměrně bezpečný (i při delších expozicích). Při déletrvajícím fotografování je nezbytné lázeň s anestetikem i čistou vodou obměňovat. Z pohledu pořizování fotografií je vhodné si připravit vybavení pro otírání fotografické podložky (savá tkanina, kyblík).

11 Pozor – hřebíčkový olej je stejně jako všechny ostatní rybí anestetika farmaceutická surovina, pro jejíž použití je nutný veterinární předpis tzv. „magistraliter“.



Obr. 13. Rekonvalescence karasů zlatých *Carassius auratus* v lázni s čistou vodou.

2.3.2. Typické chyby měření

Během akvizice dat je třeba vyvarovat se některých chyb, které mohou často nastat. Jednou z nejčastějších chyb je špatné zaostření fotoaparátu, naštěstí pro účely hodnocení změn vybarvení není tato nepřesnost rozhodující. Podstatná informace o barvě zůstává zachována, ztrácí se pouze detaily tzv. textury rybiho těla, tato informace však není pro hodnocení nutná. Naopak závažnou chybou je opomenutí vyvážení bílé, v tomto případě dojde ke zkreslení (biasu) barevné informace, fotografie se stávají dále nepoužitelnými.

Jiným možným zdrojem biasu je přítomnost dalších objektů ve fotografované scéně (obr. 14). Algoritmus předpokládá kompozičně jednoduchý obraz, tedy jen jeden jednobarevný objekt na jinak jednobarevném pozadí. Přítomnost dalších objektů může tedy vést k nesprávnému rozdělení scény (segmentaci) na dvojici objekt/pozadí. Hodnoty, ze kterých se určuje automatický práh pro segmentaci, jsou ovlivněny barevnými informacemi dalšího objektu ve scéně. Pro správnou segmentaci je důležité, aby pozadí nebylo pouze jednobarevné, ale aby tato barva byla odlišná od barev vyskytujících se na fotografovaném objektu (obr. 15). V opačném případě může opět dojít

k nesprávné segmentaci. Při segmentaci předpokládáme, že plocha pozadí zabírá větší část snímku než plocha těl okrasných ryb.



Obr. 14. Příklady chybných fotografií. Zcela vlevo nedostatečná ostrost obrazu, nedoostřeno, nezpůsobuje vážný problém při hodnocení. Uprostřed nevyváženo na bílou, všechny barvy jsou posunuty do žluté. Zcela vpravo přítomnost dalšího objektu ve scéně – ruky operátora, hrozí, že barevné hodnoty lidské kůže budou automaticky připočítány k hodnotám rybí kůže.

Rovněž důležité je dodržet vhodné nasvětlení, tedy rozmístění zdrojů světla, vyvarovat se zbytečných odlesků, případně použít polarizační filtr objektivu. Také nemá smysl snažit se o umělecký dojem fotografie, jako je například využití tzv. zlatého řezu, nezvyklých úhlů pohledu a aranžování scény. Účelům měření budou nejvíce vyhovovat objekty umístěné ve středu fotografie, zaplňující méně než polovinu celkového obrazu (z důvodu snazší segmentace).

Tyto (z hlediska lidského pozorovatele) drobné nepřesnosti mohou nepříznivě ovlivnit automatické zpracování a analýzu dat vyhodnocovacím softwarem, který s jejich přítomností nepočítá, v důsledku čehož je bude chybně interpretovat. Ne v každém případě zmíněné chyby výsledek ovlivní, ale je vhodnější se jim vyvarovat, a předejít tak jakékoli možnosti vzniku biasovaných dat.



Obr. 15. Další příklady chybných fotografií. Zcela vlevo nevhodně zvolené pozadí, zatímco rybí tělo má růžový odstín, pozadí je fialové. Obě barvy vznikají mísením modré a červené složky, takže k segmentaci obrazu vůbec nemusí dojít (v tomto případě byly naštěstí vzájemné poměry červené a modré složky dostatečně odlišné, obecně to však neplatí). Uprostřed kombinace nevhodně zvolené barvy pozadí a nedodržení homogenního pozadí (v dolním rohu je vidět část podlahy). Zcela vpravo není ryba zachycena celá, chybí konec ocasu. Tato chyba neovlivní hodnocení, ale lze ji napadnout jako záměrné snižování směrodatné odchylky souboru dat.

2.3.3. Zpracování a analýza obrazu

Zpracování a analýza obrazu sestává z celé řady metod a algoritmů, jejichž účelem je získat z digitalizovaného obrazu takové informace, jejichž kvantifikovaná interpretace platí i pro reálný objekt zachycený na obraze. Drtivá většina základních metod byla vyvinuta již před delší dobou pro binární obrazy. V posledních dvaceti letech dochází k masivnímu přizpůsobení těchto metod pro šedotónové (často nepřesně černobílé) obrazy. Zobecnění metod i pro barevné obrazy je stále nedostačující, nejčastěji se využívá zacházení s každým barevným kanálem jednotlivě jako s šedotónovým, jsou tudíž *a priori* ignorovány potenciaální emergentní¹² vlastnosti. Zpracování a analýza obrazu poskytují sadu modulově použitelných nástrojů, jejichž kombinací ve vhodném pořadí lze z pořízovaných snímků vytěžit informace, pro které platí:

- a) člověk je schopen subjektivně rozpoznat informační hodnotu v kvalitativní rovině, avšak kvantitativní vyjádření je časově náročné a nepřesné,
- b) pro velký počet zpracovávaných dat účinnost a důvěryhodnost subjektivního vyhodnocení externím pozorovatelem klesá, naopak roste časová náročnost a chybovost interpretace,
- c) část informace, resp. její přítomnost nelze subjektivně rozpoznat (viz podkapitoly 2.2.1. Vnímání barev člověkem a 2.2.2. Vnímání světla fotoaparátem).

Cílem obrazové analýzy je vývoj a tvorba takových softwarových prostředků, které usnadní a zautomatizují rutiny prováděné člověkem při vyhodnocování obrazu a navíc je rozšíří o matematické operace z umělé inteligence. Samozřejmostí je tedy možnost zpracovávání velkého počtu vstupních dat a také redukce časové náročnosti analýzy.

V zásadě lze každý proces směrem k interpretaci obrazu rozdělit na několik základních kroků:

- a) Předzpracování – sem patří především filtrace šumu, transformace snímané scény, rotace, translace, úprava měřítka, jasové a barevné normalizace.
- b) Zpracování – segmentace objektů v obraze od pozadí a segmentace objektů od sebe prahováním, detekcí hran či specifických objektů (tvar, velikost apod.).
- c) Analýza – kvantifikace vlastností objektů (pozice, barva, počet pixelů), porovnání objektů mezi obrazy, identifikace příznaků, shlukování objektů do skupin apod.

Pro každý z úkolů jednotlivých kroků byly již vytvořeny desítky až tisíce metod, lišící se přístupem, parametrizací, náročností výpočtu, ale hlavně specifickými předpoklady úlohy (Šonka a kol., 1999; Gonzales a kol., 1992). Celkové zpracování a analýza konkrétní problematiky je převážně iterativní proces, kde se jednotlivé kroky několikrát střídají. Většina problémů je tedy řešitelná vhodnou volbou dostupných metod a především **vhodně zvoleným pořadím metod** (Urban, 2012), které výrazně závisí na zkušenos-

¹² Doslova vynořivší se nová vlastnost, ze systémové teorie – celek je víc než pouhý součet jeho částí.

tech operátora. Značná část dostupných metod je silně podmíněna jedním či více vstupními parametry, kde volba hodnot parametrů je opět závislá na konkrétní úloze. Někdy i pouze nepatrná změna podmínek (osvětlení, úhel, prostředí) může vyžadovat naprosto odlišné metody a parametry, jindy i naprosto nesouvisející úlohy mohou být řešitelné stejným algoritmem.

Veškeré následně popsané metody zpracování a analýzy jsou prováděny automaticky, tedy bez zásahu uživatele, v softwarové aplikaci Expertomica FishGui, která je blíže popsána v kapitole 2.4. Příkladová studie.

2.3.4. Předzpracování

Standardní nevýhodou každého měření je přítomnost různých zdrojů šumu. Za příklad systemického šumu můžeme považovat nevyvážení na bílou. Náhodný šum vzniká především během odvodu náboje z jednotlivých buněk mozaiky čipu. Chyby citlivosti a vadné buňky mozaiky (obvykle pod 1% z celkového počtu diskriminabilních bodů) se v získaném digitálním obraze projevují jako izolované pixely s výjimečně vysokou nebo nízkou intenzitou. Zatímco lidské vnímání se přítomnosti šumu přizpůsobí relativně snadno, při zpracování a analýze počítačem může takovýto náhodný šum snižovat výkonnost segmentačních a dalších algoritmů. Jedním ze základních úkolů předzpracování obrazu je tedy redukce tohoto typu šumu.

2.3.4.1. Morfologická rekonstrukce

Morfologické operace jsou založeny na nelineárních operacích obrazu skrz tzv. strukturální element pomocí teorie množin. Strukturální element je malé, předem definované okolí zkoumaného pixelu, které se v průběhu předzpracování posunuje přes všechny pixely obrázku a opravuje původní hodnoty v závislosti na vztahu mezi souřadnicemi okolí a strukturálního elementu. Dvojicí základních operací jsou eroze¹³ (zúžení objektu o vrstvu předem dané délky) a dilatace¹⁴ (roztažení objektu o danou vrstvu a vyplňování drobných děr uvnitř objektu)¹⁵. Jejich následnými kombinacemi, různým pořadím a vybíráním minimálních, maximálních prvků, vznikají další morfologické operace jako otevření (eroze následovaná dilatací), uzavření (dilatace následovaná erozí) a rekonstrukce. Rekonstrukci lze definovat jako geodetickou dilataci, kde je iteračně vybírán minimální prvek z dilatovaného a původního obrazu (Vincent, 1993).

V našem případě, jelikož úroveň náhodného šumu je díky dobře nastaveným světelným podmínkám relativně malá, postačí volba nejmenšího možného strukturálního

¹³ Minkowského odčítání.

¹⁴ Minkowského sčítání.

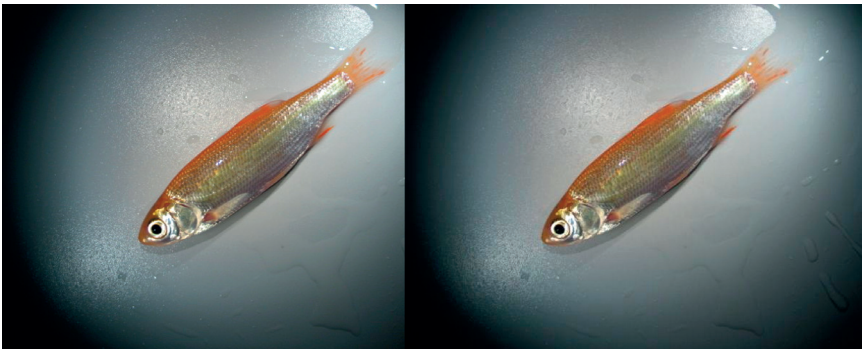
¹⁵ Eroze a dilatace nejsou vzájemně inverzními funkcemi, jsou však komplementární.

elementu, tedy kruhu o průměru tří pixelů¹⁶. Bez ohledu na tzv. rozlišení fotoaparátu takto zvolený minimální strukturální element odstraňuje chyby čipu o velikosti právě jednoho pixelu (obvykle pod 2 % celkové počtu pixelů na čipu).

Filtrace tedy probíhá v následujících krocích:

- 1) Eroze
- 2) Rekonstrukce
- 3) Dilatace
- 4) Negativ
- 5) Rekonstrukce negativu
- 6) Pozitiv (negativ zrekonstruovaného negativu)

Strukturální element je v každém případě stejný a každý jednotlivý barevný kanál (modelu RGB) se filtruje nezávisle. Předzpracování odstraňuje drobné vady a skvrny, bez vlivu na tvar objektů (obr. 16). Výsledky nejsou příliš důležité pro hodnocení lidským okem, nicméně značně usnadňují následné zpracování a analýzu (Urban, 2012).



Obr. 16. Příklad morfologické rekonstrukce na snímku jelce jesena *Leuciscus idus*. Vlevo původní nezpracovaný snímek, vpravo po předzpracování pomocí morfologické rekonstrukce. Především pozadí je po předzpracování výrazně hladší.

2.3.4.2. Chromatické barvy

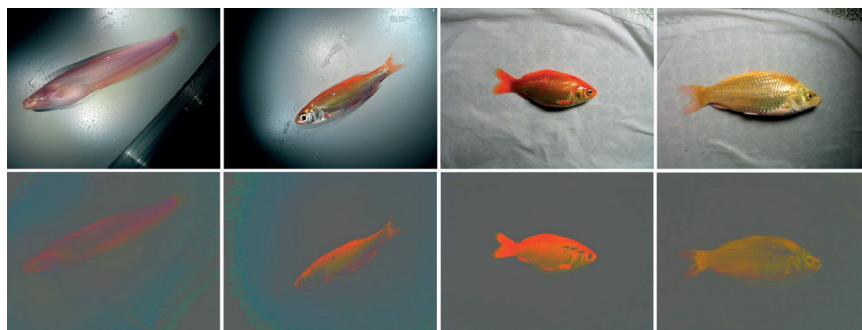
Reprezentace barev v prostoru RGB nereprezentuje pouze barvu, ale také jas. Pokud tedy pro dva pixely platí, že poměr jejich červených složek je roven poměru jejich zelených složek a současně roven i poměru modrých složek, pak mají stejnou barvu, ale liší se pouze jasnem. Ten lze odstranit jasovou normalizací do tzv. chromatických barev. Výpočet je velice jednoduchý, každý barevný kanál je vydělen součtem všech kanálů. Pro použití chromatických barev stačí spočítat pouze dvě ze složek, jelikož díky Grassmanovu zákonu je třetí chromatická barva redundantní a lze ji odvodit jako doplněk

¹⁶ U průměru tří pixelů jde fakticky o kříž, díky diskrétní reprezentaci.

do jednotky¹⁷. Tím jsme redukovali dimensionalitu problému, protože nyní nám pro segmentaci postačí pouze dva kanály chromatických barev místo původní trojice RGB kanálů. (Yang a kol. 1997, Chai a kol. 1999, Feris a kol. 2000).



Obr. 17. Příklad jasové odlišnosti. Všechny tři plochy mají stejnou barvu, liší se pouze jasnem.



Obr. 18. Příklad transformace z RGB prostoru (nahore) do chromatických barev (dole), pro odstranění rozdílu v jas. Zleva sumec velký *Silurus glanis*, jelec jesen *Leuciscus idus*, karas zlatý *Carassius auratus* a kapr obecný *Cyprinus carpio*. Vidíme, že v chromatických barvách je pozadí daleko homogennější než na původních snímcích.

2.3.5. Zpracování

Pro hodnocení změn vybarvení ryb nejprve potřebujeme lokalizovat tělo ryby v pořízených snímcích, tedy oddělit ji od pozadí. K tomu nám slouží tzv. segmentace, tedy rozdělení obrazu na dvě (obecně několik) částí, z nichž jedna (či více) odpovídající přesně objektům ve zpracovávaném obraze. Nejběžnějším způsobem segmentace je využití tzv. prahování, tj. určení prahových hodnot objektů v dané barevné reprezentaci. Velmi často se využívá inflexních bodů (lokálních minim a maxim) histogramu pro rozdělení obrazu na oblasti, které souvisejí s reálnými objekty. Prahování tedy vybírá ze zpracovávaného obrazu takové oblasti, které odpovídají podmínkám výběru. Zvýše-

¹⁷ Chromatické $r + g + b = 255$, pro hodnoty jednotlivých složek na rozsahu 8 bitů. Jednotkou je myšlena maximální možná hodnota rozsahu, v 8bitové reprezentaci čísel tedy 255.

ním počtu podmínek můžeme (avšak nemusíme) zlepšit výběr. Celková segmentace je možná jen u méně komplikovaných úloh, kde známe počet případně podíl zastoupení pozadí a objektů v obraze, a oblasti se navíc navzájem nepřekrývají.

Jelikož relevantní inflexní body nemusí být v histogramu snadno identifikovatelné (obvykle jich je několik), zavedl v roce 1979 Nobuyuki Otsu neparametrickou metodu automatického prahování šedotónových obrázků, která je po něm pojmenována (Otsu, 1979). Normalizovaný histogram reprezentuje apriorní odhad distribuce hodnot v obraze. Metoda automatického prahování se snaží rozdělit histogram na dvě souvislé třídy (podmnožiny)¹⁸ tak, aby minimalizovala varianci uvnitř třídy a zároveň maximalizovala varianci mezi třídami.

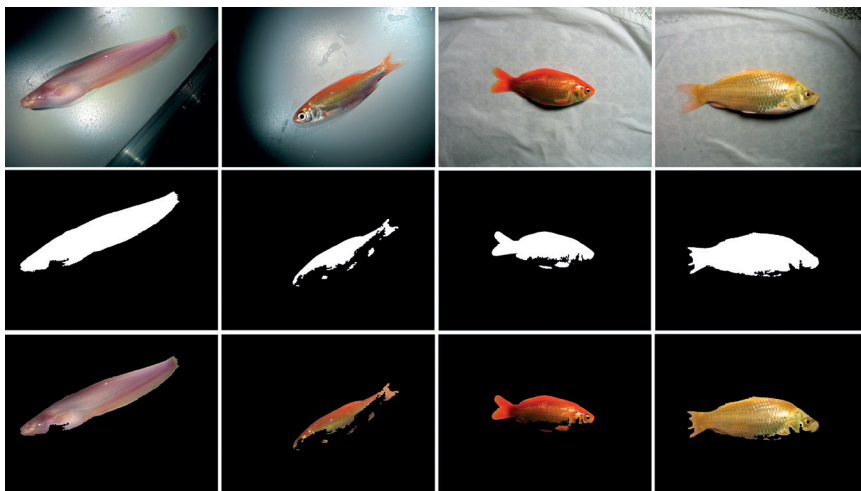
Hodnoty prahů jsou určeny pro dva chromatické kanály (chromatickou červenou a chromatickou modrou). Prahy potom umožní vznik binárního (černo-bílého, skutečně pouze černé a bílé barvy, nikoliv stupňů šedi) obrazu. Nabízejí se dvě možnosti – buď hodnoty nad prahem považovat za bílou a hodnoty pod prahem za černou, nebo naopak. Binární obrazy z jednotlivých kanálů jsou navzájem porovnány, při segmentaci je využít předpoklad, že rybí tělo zabírá menší část snímané scény, zatímco pozadí většinu. Předpoklad je součástí návrhu experimentu a je třeba jej během akvizice dat dodržovat.



Obr. 19. Příklad segmentace v chromatických barvách pomocí Otsu metody automatického prahování. Nahoře vlevo originální obrázek, nahoře vpravo binární obrázek jako výsledek prahování v chromatické červené. Dole vlevo binární obrázek jako výsledek prahování v chromatické modré. Dole vpravo binární obrázek vzniklý váženým průměrem binárních obrázků z jednotlivých chromatických kanálů. Jak vidíme, v tomto případě byla pro segmentaci dostačující informace z chromatického červeného kanálu.

¹⁸ Souvislá množina v sobě nemá díry, ani není poskládána z navzájem nepospojovaných částí.

Pro vizuální kontrolu úspěšné segmentace můžeme na binární obraz zkombinovaný z jednotlivých binárních kanálů namapovat originální snímek. Oblasti rybiho těla, které nejsou vybarvené, neprojdou prahováním, většinou proto, že mají podobnou barvu jako pozadí. Tyto oblasti ovšem nejsou pro hodnocení vybarvení relevantní, není je nutné při vyhodnocování uvažovat, neboť nejsou zbarvené.



Obr. 20. Příklad segmentace různých okrasných ryb. Zleva doprava sumec velký *Silurus glanis*, jelec *Leuciscus idus*, karas zlatý *Carassius auratus* a kapr obecný *Cyprinus carpio*. Nahoře původní snímky, uprostřed binární obrázky po prahování, dole namapovaný původní snímek na binární obraz. Práhováním neprošly ty oblasti rybiho těla, které nejsou vybarvené.

2.3.6. Analýza

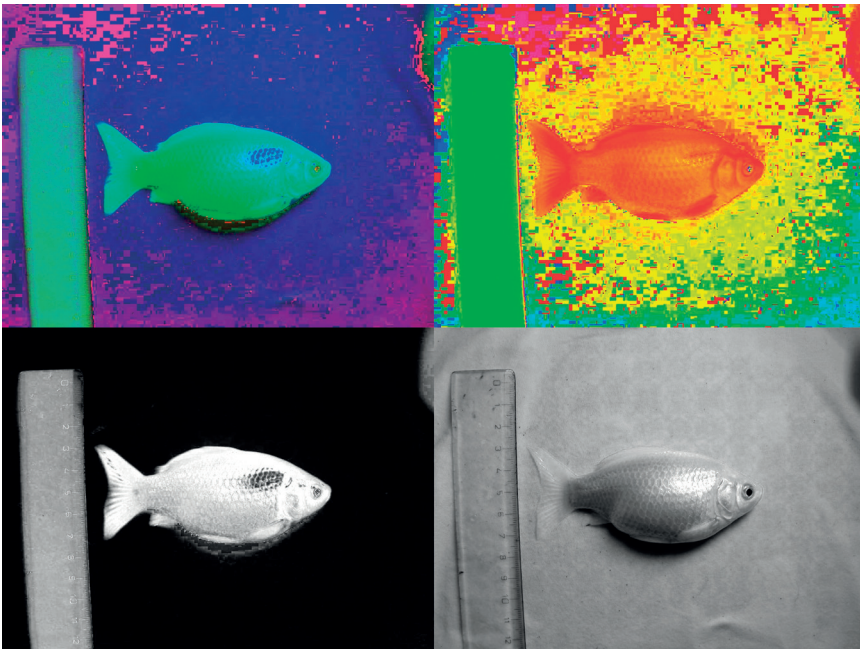
Jakmile provedeme prahování a získáme binární masku rybiho těla (případně pouze relevantní části rybiho těla), segmentovanou od pozadí, lze určit statistické parametry vybarvení. Nejprve musíme vybrat, které parametry obrazu nejlépe odpovídají sledovaným charakteristikám. Barevný prostor RGB není nejlepší možností, jelikož neodpovídá koncepci barev, jak je chápe člověk. Z tohoto hlediska je daleko vhodnějším model HSV¹⁹, kde hodnota H (hue-odstín) představuje parametr odpovídající barevnému spektru z fyzikálního hlediska, tedy vlnové délce. Hodnota S představuje saturaci, sytost, chromu, čistotu barvy, úbytek bílé barvy či poměr smíchání H se šedou barvou

¹⁹ Někdy se zaměňuje s HSI modelem, ovšem rozdíl je v tom, že hodnota V se určuje jako maximum z trojice hodnot RGB, a hodnota I (intenzita) se určuje jako třetina ze součtu trojice hodnot RGB. Pro naše účely není rozhodující, který z modelů (HSV či HSI) použijeme. Reprezentace HSV je však považována za více intuitivní.

stejně intenzity. V (value) je hodnota či intenzita, dána normalizovaným součtem hodnot RGB (odpovídající šedotónové reprezentaci), vyjadřuje relativní světlost (maximální hodnota) či tmavost (minimální hodnota) barvy. Tento model také nejvíce odpovídá lidskému (psycho-fyzikálnímu) způsobu vnímání barev (obr. 21).



Obr. 21. Kanál H (hue – odstín) a odpovídající hodnoty.



Obr. 22. Příklad reprezentace barev v modelu (prostoru) HSV (H-hue-odstín, S-saturation-sytost, V-value-hodnota). Vlevo nahoře stejná ryba jako na obr. 9 a 10, tentokrát reprezentovaná v prostoru HSV²⁰. Vpravo nahoře je kanál odstínu (H), vidíme, že pravítko je jasně zelené, ryba jasně červená. Pozadí není úplně šedé, ale v rozličných barvách, jelikož však není dostatečně saturované, jeví se nám jako šedé. Povšimněme si, že u pozadí převládá žlutá, což bylo patrné již při CMYK reprezentaci. Čtverečkovost pozadí je dána kompresí souborového formátu JPEG. Vlevo dole je kanál sytosti (saturation S), zatímco pravítko a ryba jsou dostatečně syté, pozadí je tmavé – barvy nejsou syté, tudíž se nám budou jevit jako nevýrazné (šedé). Konečně vpravo dole vidíme kanál hodnoty (V). Všimněme si, že kanál V z prostoru HSV odpovídá kanálu K z prostoru CMYK.

²⁰ Úplně přesně jde o reprezentaci HSV zobrazenou pomocí RGB, tedy odstín je zobrazen červeně, saturace zeleně a hodnota modře.

Ze všech pixelů rybího těla, tedy z toho, co prošlo prahováním (jako na obr. 20), vypočteme hodnotu zprůměrovaného pixelu rybího těla v reprezentaci RGB. Tento zprůměrovaný pixel je dále transformován do prostoru HSV²¹. Oním důležitým parametrem pro hodnocení vybarvení okrasných ryb je právě saturace. Na základě této hodnoty může dojít k porovnávání, zda je jedna ryba (nebo celá skupina ryb) více či méně vybarvená než referenční ryba (skupina). Zajímavým efektem potravinových doplňků s vysokým obsahem karotenoidů je rovněž posun odstínu vybarvení k červeno-oranžové, bez ohledu na původní odstín okrasné ryby. Kvantitativní hodnocení této skutečnosti je však o něco složitější, neboť hodnoty odstínu nelze převádět na hodnoty vlnové délky přímo a jednoznačně, musí se využít transformací do dalších barevných prostorů.

2.3.6.1. Barevné prostory CIE

Abyste bylo možné měřit a vyjadřovat barvy bez ohledu na vnímání lidského oka, byl v roce 1931 vytvořen mezinárodní standard barev (Murch, 1987). Jeho součástí je i chromatický diagram gamut (Žára a kol., 2004), popsáný v podkapitole 2.2.5. Kalibrace chromatičnosti. Mezinárodní komise pro osvětlování (CIE) definovala standardního pozorovatele, který vzešel z měření citlivosti lidského oka velkého počtu dobrovolníků bez diagnostikované poruchy vnímání barev. Výsledkem byla citlivostní funkce lidského oka (obr. 6)²². Z ní lze vypočítat²³ tzv. trichromatické složky. Pomocí těchto složek můžeme definovat jakoukoliv barvu nezávisle na zařízení, které s barvou pracuje.

Prvním takovýmto barevným prostorem byl CIE xyY, kde souřadnice Y odpovídá jasů, souřadnice x, y vznikly relativním vážením jednotlivých složek, nelze je však zaměňovat za odstín a sytost. V tomto souřadném systému je zobrazen i barevný gamut na obrázku 11. Dalším souřadným systémem byl CIE Lab, kde složka b odpovídá ose modrá (záporná) až žlutá (kladná), složka a ose zelená (záporná) až červená (kladná), složka L ose černá (nula) až bílá (sto). Tento souřadný systém se využívá v kolorimetrii pro vyjádření povrchových barev z důvodů své jednoduchosti²⁴. Jde o v podstatě nejpoužívanější barevný prostor, ačkoliv není zcela uniformní²⁵ a část barevné charakteristiky není možné z modelu získat (Quan, 2002). Za zmínku stojí ještě souřadný systém CIE Luv, který se pouze mírně liší ve výpočtu jednotlivých složek od prostoru CIE Lab. Pro svou větší uniformnost je však vhodnější při výpočtu dominantní vlnové délky.

21 Výsledek by byl shodný i s obráceným postupem, tedy s napřed transformovaným obrázkem z RGB do HSV a následným zprůměrováním. Popsaná varianta je však výpočetně rychlejší.

22 Tyto citlivostní funkce jsou ve skutečnosti dvě, pro 2° a 10° pozorovací úhel, a dále jejich modifikace pro některé barevné reprezentace.

23 Vynásobením intenzity světla remisním faktorem a citlivostí lidského oka přes celé spektrum pro daný souřadný prostor.

24 Jde o kouli v karteziánském prostoru.

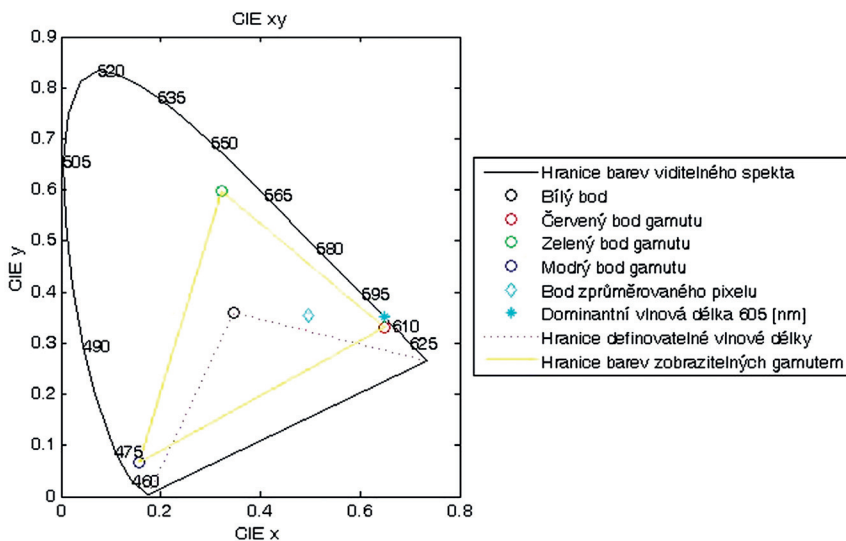
25 Stejná vzdálenost barev v souřadném systému odpovídá zdánlivému pozorovatelnému rozdílu v barvě (Quan, 2002).

Existují ještě další, avšak řidčeji používané způsoby reprezentace (YUV pro analogový televizní systém, různé verze YCC pro digitální video s korekcí gama, fotografický materiál a barevnou kompresi, další verze CIE prostorů a jiné). Jednotlivé typy je možné mezi sebou převádět – jde pouze o změnu souřadného systému prostoru reprezentace barev. Ne každá barva viditelného spektra je však v každém souřadném systému reprezentovatelná (viz podkapitola 2.2.5. Kalibrace chromatičnosti).

2.3.6.2. Dominantní vlnová délka

Správné vyhodnocení odstínu vybarvení rybího těla tedy probíhá transformací hodnot zprůměrovaného pixelu do prostorů CIE. Tento průměrný pixel můžeme např. v souřadném systému prostoru CIE xy (který opět představuje barevný gamut) reprezentovat jako bod. Uprostřed gamutu se nachází Bílý bod, kde jsou všechny složky rovnočné. Světlost se zde nehodnotí, tj. bílá, šedá i černá stále odpovídají bílému bodu. Dominantní vlnovou délku určíme tak, že provedeme spojnicí mezi bílým bodem a bodem představujícím náš zprůměrovaný bod. Spojnici protáhneme až k hranicím viditelného spektra. Dominantní vlnovou délku určíme jako bod, kde spojnice protne hranici. Samotný výpočet probíhá v prostoru CIE uv, z důvodu zachování uniformnosti pro všechny vlnové délky. Čím blíže je bod zprůměrovaného pixelu blíže k hranici gamutu, tím je vlnová délka čistší, neboli tím jsou příspěvky ostatních vlnových délek menší. Dominantní vlnová délka se vždy určuje tak, aby bod zprůměrovaného pixelu ležel mezi hranicemi gamutu a bílým bodem. Jinými slovy – za dominantní vlnovou délku je považována ta hranice, která leží blíže bodu zprůměrovaného pixelu²⁶. Pro odstíny růžové a fialové není možné určit dominantní vlnovou délku, neboť nemají pouze jednu, ale dvě. Tyto odstíny vznikají kombinací modrých a červených složek světla (Jerome a kol., 1994).

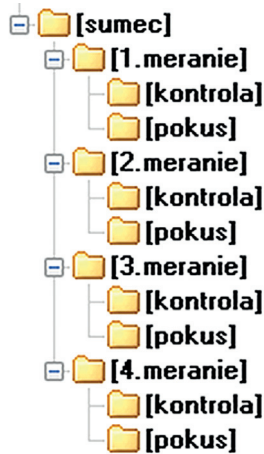
²⁶ Pokud bychom spojnicí protáhli na druhou stranu, průsečík s hranicí blíže k bílému bodu se nazývá doplňková vlnová délka.



Obr. 23. Příklad určení dominantní vlnové délky pro skaláru amazonskou *Pterophyllum scalare*. Protažením spojnice mezi bílým bodem gamutu (v grafu znázorněn černou kružnicí) a bodem zprůměrovaného pixelu rybiho těla (azurový kosočtverec) najdeme průsečík s hranicí barev viditelného spektra a odečteme hodnotu dominantní vlnové délky. Čím blíže je bod zprůměrovaného pixelu blíže k hranici gamutu, tím „dominantnější“ je vlnová délka.

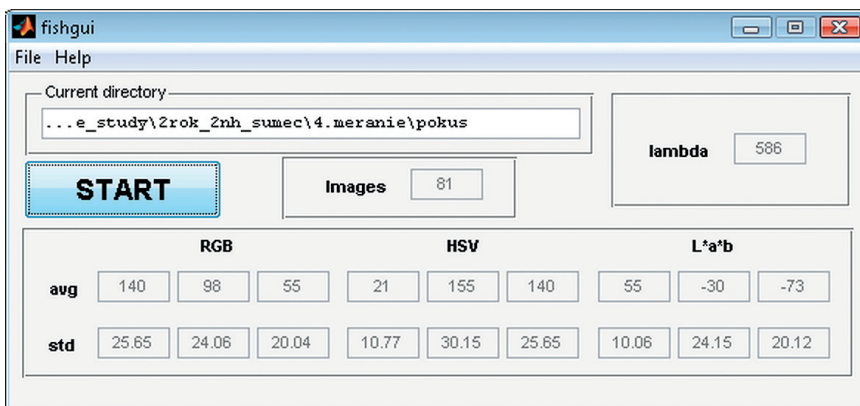
2.4. PŘÍKLADOVÁ STUDIE

Funkčnost metodiky a softwarového řešení si můžeme přiblížit na příkladu sumce velkého (*Silurus glanis*). Kontrolní (referenční) skupina byla přikrmována řasovou dietou ve formě pelet s přidavkem biomasy $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ *Chlorelly* a $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ *Haematococcus*. Pokusná skupina byla přikrmována řasovou dietou ve formě pelet s přidavkem biomasy $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ *Scenedesmus* a $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ *Haematococcus*. Experiment s přikrmováním trval dva měsíce, přičemž každých dvacet dní byly pořízeny snímky ryb podle kapitoly 2.3.1. Postup akvizice dat. Celkem tedy vznikly čtyři skupiny fotografií jak pro kontrolní, tak i pro pokusnou skupinu (na počátku experimentu, dvakrát v průběhu a na konci), které byly uloženy s logikou odpovídající experimentu, jak je naznačeno na adresářové struktuře na obr. 24. Softwarová aplikace FishGui (Urban a kol., 2012) vyžaduje pro hodnocení dodržování této logiky, tedy každou sadu snímků ve vlastním adresáři.

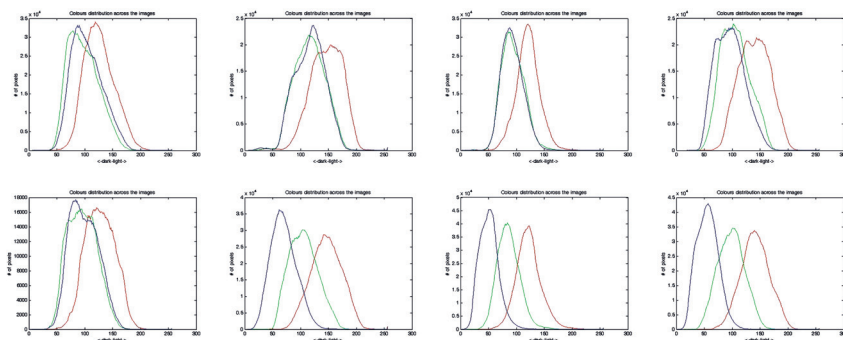


Obr. 24. Adresářová struktura se snímky sumce velkého (*Silurus glanis*) s logikou odpovídající experimentu, čtveřice měření pro pokusnou i kontrolní skupinu.

Pro správný běh aplikace je potřeba nainstalovat knihovny MATLAB Runtime Compiler verze 7.9 (<http://sourceforge.net/projects/expertomica-eda/files/>). Vlastní aplikace je k dispozici na webových stránkách ÚKS FROV JU v sekci *Software vyvinutý v rámci výzkumných projektů* (<http://www.frov.jcu.cz/cs/sks-frov-ju/skola-komplexnich-systemu>). Obsluha softwarové aplikace FishGui je velice jednoduchá. Po spuštění aplikace stačí v menu File/Open (klávesová zkratka ctrl+o) vybrat z adresářové struktury konkrétní adresář určený k vyhodnocení (např. 1. měření/kontrola). Snímky musí být v souborovém formátu JPEG, s koncovkou souboru ‚jpg‘ nebo ‚jpeg‘. Cesta k adresáři se zobrazí v okně ‚Current directory‘ a aplikace rovněž zobrazí počet nalezených snímků v daném adresáři. Poté již stačí jen klepnout na tlačítko ‚START‘, a software samočinně vyhodnotí vlastnosti obrázku v podadresáři. Po skončení výpočtů, jejichž postup je odhadován indikátorem průběhu (tzv. progress bar), se v jednotlivých polích objeví průměrné hodnoty a směrodatné odchytky sady snímků pro barevné prostory RGB, HSV a CIE LAB (více o těchto prostorech v podkapitolách 2.2.3. Barevná reprezentace a 2.3.6.1. Barevné prostory CIE). Dále je vypočtena dominantní vlnová délka. Hodnoty lze exportovat do textového souboru pomocí menu File/Save (klávesová zkratka ctrl+s). Součástí výstupu jsou dva grafy, Distribuce rozložení jednotlivých barev na osmibitové hloubce (obr. 26) a Graf gamutu s určením dominantní vlnové délky (obr. 23).

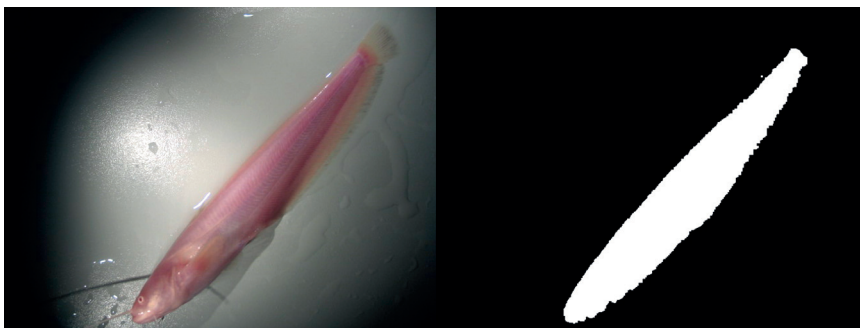


Obr. 25. Hlavní okno softwarové aplikace FishGui. Nahoře lišta s menu, pod níž okno s výpisem zpracovávaného adresáře (Current directory). Vlevo uprostřed tlačítko START pro spuštění výpočtu, vedle něj v políčku Images se zobrazuje počet snímků v adresáři. Dole příklad výstupu středních hodnot (avg) a směrodatných odchylek (std) pro barevné prostory RGB, HSV a CIE LAB (v osmibitové hloubce – rozsah 0 až 255). Vpravo nahoře odhad dominantní vlnové délky (v nanometrech).

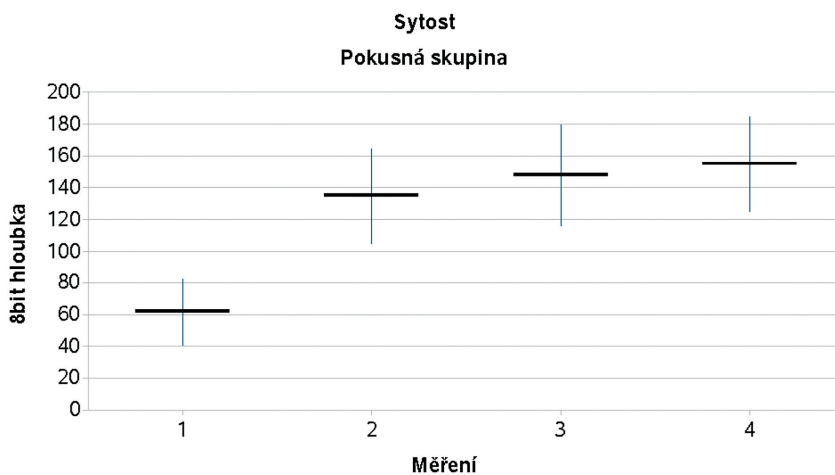


Obr. 26. Distribuce rozložení jednotlivých barev (počet pixelů různých intenzit v jednotlivých kanálech RGB). Zleva doprava grafy pro 1. až 4. měření. Nahoře kontrolní skupina, dole pokusná. U pokusné skupiny je jasně patrný posun modrého kanálu k nižším intenzitám (modré křivky blíže k počátku souřadnic), a naopak u červené a částečně i zelené složky k vyšším intenzitám, odpovídající i skutečně pozorovanému posunu odstínu od růžovořalové (modrá a červená složka) k oranžové (zelená a červená složka).

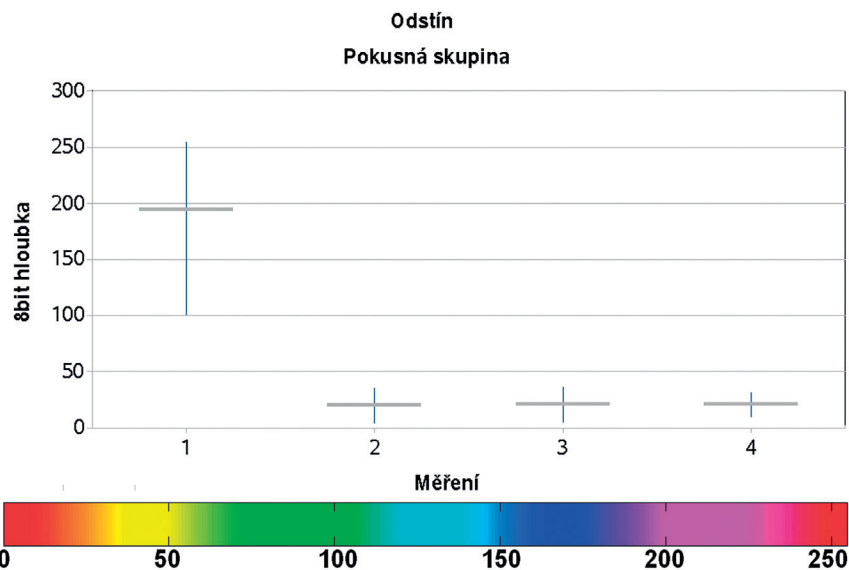
Pro kontrolu úspěšnosti segmentace ryby od pozadí je v každém zpracovávaném adresáři vytvořen podadresář s binárním obrazem segmentace (opět v souborovém formátu JPEG), s názvem shodným s originálním obrázkem, pouze s koncovkou _bw (obr. 28).



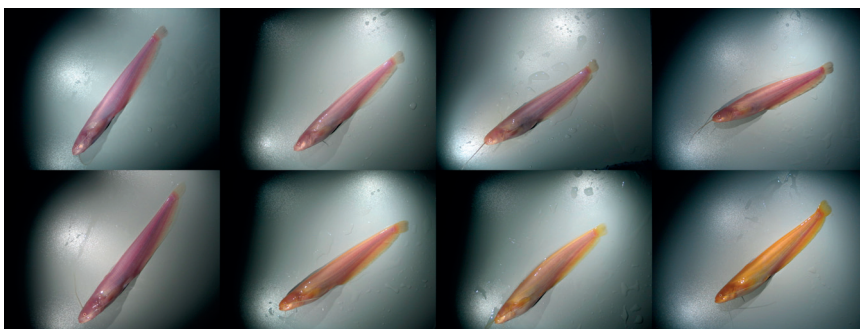
Obr. 27. Originální obrázek (3kSnímek 249.jpg) ke zpravování vlevo a jeho binární segmentace (3kSnímek 249_bw.jpg) vpravo.



Obr. 28. Graf změny sytosti vybarvení u pokusné skupiny v průběhu experimentu. Vodorovná osa kříže reprezentuje pozici průměrné hodnoty celé skupiny sumce velkého (*Silurus glanis*), svislá osa kříže reprezentuje velikost směrodatné odchylky ve skupině. Vliv přikrmování s obsahem karotenoidů na sytost (nárůst k vyšším hodnotám) je patrný již při druhém měření (20 dnů od začátku experimentu).



Obr. 29. Graf změny odstínu vybarvení u pokusné skupiny v průběhu experimentu. Vodorovná osa kříže reprezentuje pozici průměrné hodnoty celé skupiny sumce velkého (*Silurus glanis*), svislá osa kříže reprezentuje velikost směrodatné odchylky ve skupině. Vliv přikrmování s obsahem karotenoidů na odstín je opět patrný již při druhém měření. Dole přiložen proužek s bitovou hloubkou a odpovídajícím odstínem. Již při pouhém porovnání s grafem je zřejmé, že posun v odstínu se odehrál od růžovořialové k oranžové. Dalším výsledkem je snížení směrodatné odchylky – přikrmování s obsahem karotenoidu pokusnou skupinu odstínově homeogenizovalo.



Obr. 30. Náhodně vybrané snímky z experimentu, zleva doprava 1. až 4. měření (s odstupem 20 dní), nahoře kontrolní skupina, dole pokusná. Vidíme, že pomocí diety bohaté na karotenoidy došlo k výraznému posunu odstínu směrem od růžovořialové k červenooranžové. Změněný odstín vybarvení přetrvává i po 63 dnech po ukončení přikrmování.

Běžní chovatelé okrasných ryb zpravidla průběžně neprovádějí srovnávací experimenty, tudíž postrádají referenční vzorek kontrolní skupiny. Obecně lze tedy metodiku využít i k přímému hodnocení vybarvení okrasných ryb. Zatímco hodnotu parametru odstínu (Hue) lze porovnat buď barevnou škálou jako např. na obr. 21, nebo lze vycházet rovnou z hodnoty dominantní vlnové délky. Co se týče hodnoty sytosti (saturation), zde platí, že čím vyšší hodnota, tím je ryba více vybarvená. Zatímco u hodnot do 128 (na 8bitové hloubce) můžeme hovořit o spíše pastelových barvách (někdy popisovaných též jako sametové, vybledlé, nekонтрастní), vyšší hodnoty už jsou považovány za barvy syté (plné, živé). Přesnější rozlišení pastelovosti/sytosti barev lze určit z pozice průměrného pixelu v CIE xy grafu, kde pastelové barvy jsou ty blíže bílému bodu, zatímco barvy syté jsou blíže k hranicím trojúhelníku gamutu (obr. 23).

3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

V současné době, s rozvojem výkonu výpočetní techniky a rychlosti početních operací, je uživatelům dostupná celá řada softwarových aplikací pro analýzu a zpracování obrazu. Zřejmá nevýhoda je reprezentována jak komplexitou, tak specifictou dostupných řešení. Zcela běžně jsou uživatelé vzděláni v oblasti přípravy vzorků, měřicí techniky, a zejména v interpretaci naměřených dat. Na druhou stranu hluboké zaslíbení do matematických záležitostí za správně podmíněnou parametrizační techniku a metod zpracování obrazu nepatří mezi jejich primární cíle. Z tohoto důvodu **je pro specifické úlohy vyžadována metodika schopná tzv. sebezparametrizace**, neboli nesupervizovaná automatická analýza obrazu. Jinými slovy jedná se o jednotlačítkový systém, který nevyžaduje žádné dodatečné vstupní údaje a vlastní zpracování a analýza probíhá samočinně bez nutnosti, nebo jen s minimálním zásahem uživatele.

Metodika pro vyhodnocení změn vybarvení u okrasných ryb vychází z relevantních literárních zdrojů, které jsou doplněny řadou vlastních poznatků a zkušeností získaných v průběhu dlouholetého studia, ladění a vývoje sebezparametrizujících algoritmů pro zpracování, analýzu a klasifikaci digitalizovaného obrazu a dvourozměrného signálu obecně.

Ačkoliv jsou principy jednotlivých kroků vyhodnocení změn vybarvení okrasných ryb pomocí zpracování a analýzy obrazu známy, nebyly doposud pro daný účel objektivního hodnocení využívány v plném rozsahu. Jelikož se jedná o poměrně specifickou úlohu, dosavadní využívání obecných přístupů bylo silně podmíněno subjektivní parametrizační použitých metod. Realizace metodiky jako jednoúčelového softwarového řešení nabízí objektivní a uživatelsky jednoduché automatické vyhodnocení produktu (okrasných ryb) bez vlivu subjektivního lidského úsudku.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena široké paletě potenciálních uživatelů. Pravděpodobně v největší míře však najde své uplatnění u menších a středních rybářských podniků, popř. u živnostníků, kteří alespoň část své produkce realizují prostřednictvím okrasných ryb. Ty jsou nejčastěji určeny pro dnes tak populární chov v zahradních jezírkách aj. Tito producenti mají možnost vybarvení svých ryb ještě více zdůraznit například předkládáním krmiv se syntetickými barevnými pigmenty nebo dietami obohacenými přírodními komponenty, které mají vysoký obsah těchto barviv (např. biomasa řas). Pro skutečně objektivní zhodnocení změny vybarvení chovaných ryb však nelze užít jiné než objektivní metody. Tato metodika, zaručující porovnatelnost s vysokou vypovídající hodnotou, je důležitá rovněž pro vědecko-výzkumné instituce zabývající se dynamikou vybarvení ryb v rámci svých řešených problematik. Metodu je možné použít nejen při posuzování ryb, ale i při posouzení barevnosti dalších jednobarevných objektů, živých i neživých.

Zároveň lze tuto metodiku považovat za materiál, který může být vhodně využit také ke studijním účelům v oblasti digitální reprezentace barevného obrazu a neparametrické segmentace objektu od pozadí i pro laiky v oboru zpracování a analýzy obrazu.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Chovatelé se snaží více zdůraznit zákazníky ceněné intenzivní vybarvení okrasných ryb. Tohoto zdůraznění je obvykle dosahováno pomocí výše zmíněných syntetických pigmentů, popř. za využití komponent bohatých na tyto složky. Cena těchto krmiv je však v porovnání s konvenčním krmivem vyšší. V případě syntetických pigmentů to může být až o 20 % (Baker a kol., 2002) a ještě větší rozdíly lze pozorovat při užití přírodních komponent, například řasové biomasy. Zde je však dáván akcent na přirozenost tohoto zdroje pro ryby a na skutečnost, že nedochází ke znečištění životního prostředí (což bývá v případě výroby syntetických pigmentů zmiňováno; Sergejevová a Masojídek, 2011). Nalezení vhodného poměru mezi zvýšenými vstupními náklady za krmivo a lepšími prodejními cenami lépe vybarvených ryb pak dává možnost tíženého ekonomického profitu. Využití objektivních metod hodnotících vybarvení ryb může být také nezbytným předpokladem nejen pro exaktní ověření průběhu vybarvování, ale i pro případnou standardizaci produkce.

V případě využívání řasové biomasy má v našich podmínkách co do objemu produkce největší potenciál řasa *Chlorella spp.* (cf. *C. vulgaris Beijerinck*). Jako příklad lze uvést její využití při vybarvování jeseterů malých *Acipenser ruthenus*. Kontrolní dieta s přídatkem 2,5 % řasové biomasy vedla ke zjevnému vybarvení ryb, které dosáhlo svého maxima již okolo 40. dne odkrmu. Zvýšené náklady na tuto obohacenou dietu lze

odhadnout na 20–40 Kč/kg krmiva. Toto atraktivní vybarvení však může zvýšit prodejní cenu ryb o desítky procent (Sergejevová a Masojídek, 2011) a v případě vybarvených albinotických sumců *Silurus glanis* lze hovořit až o dvojnásobku.

6. PODĚKOVÁNÍ

Autoři děkují za spolupráci I. Zaťkové (ÚFB JU), T. Náhlíkovi (ÚKS FROV JU), V. Kotálovi (ÚKS FROV JU), Rybářství Nové Hradky, s.r.o. a Líhni Mydlovary, Rybářství Hluboká cz. s.r.o.

7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- ANSI (ANSI/ISA IT10.7000-2004), 2004. Photography - Digital Still Cameras - Guidelines for Reporting Pixel-Related Specifications
- Baker, R.T.M., Pfeiffer, A.M., Schöner, F.-J., Smith-Lemmon, L., 2002. Pigmenting efficacy of astaxanthin and canthaxanthin in fresh-water reared Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Animal Feed Science and Technology* 99: 97–106.
- Baruš V. a kol., 1995. Mihulovci a ryby 2. Academia, Praha, 698 s.
- Bayer, B.E., 1976. Color imaging array, US Patent No. 3971065.
- Becker, W., 2004. The Nutritional Value of Microalgae for Aquaculture. In: Richmond, A. (Ed), *Handbook of Microalgal Cultures*, Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 380–391.
- Bernhard, K., 1990. Synthetic astaxanthin. The route of a carotenoid from research to commercialisation. In: Krinsky, N.I., Mathews-Roth, M.M., Taylor, R.F. (Eds), *Chemistry and Biology*, Plenum Press, New York, USA, pp. 337–363.
- Carpenter, A.E., Jones, T.R., Lamprecht, M.R., Clarke, C., Kang, I.H., Friman, O., Guertin, D.A., Chang, J.H., Lindquist, R.A., Moffat, J., Golland, P., Sabatini, D.M., 2006. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology* 7: R100.
- CIPA (CIPA DCG-001-Translation-2005), 2005. Guideline for Noting Digital Camera Specifications in Catalogs. 'The term 'Resolution' shall not be used for the number of recorded pixels.
- Dawes, J., 1998. International experience in ornamental marine species management. Part 1: perspectives. *Ornamental Fish International Journal* 26: 1–5.
- Dubský, K., Kouřil, J., Šrámek, V., 2003. *Obecné rybářství*. Informatorium, Praha, 308 s.
- Einstein, A., 1905. Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt. *Annalen der Physik* 17: 132–148.
- Feris, R.S., de Campos, T.E., Cesar, R.M. Jr., 2000. *Detection and Tracking of Facial Features in Video Sequences*, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

- Foss, P., Storebakken, T., Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., Austreng, E., Streiff, K., 1984. Carotenoids diets for salmonids: I. Pigmentation of rainbow trout with individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture* 4: 213–226.
- Gomes, E., Dias, J., Silva, P., Valente, L., Empis, J., Gouveia, L., Bowen, J., Young, W., 2002. Utilization of natural and synthetic sources of carotenoids in the skin colouring of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *European Food Research and Technology* 214: 283–293.
- Gonzales, R.C., Woods, R.E., 1992. *Digital image processing*, Addison-Wesley Publishing Company, MA, USA.
- Goodwin, T. W., 1984. *Biochemistry of the Carotenoids. vol II: Animals*. 2nd edn. Chapman & Hall, London, NY, pp. 64–96.
- Gouveia, L., Gomes, E., Empis, J., 1997. Use of *Chlorella vulgaris* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, diets to enhance muscle pigmentation. *Journal of Applied Aquaculture* 7: 61–70.
- Gouveia, L., Choubert, G., Gomes, E., Pereira, N., Santinha, J., Empis, J., 2002. Pigmentation of gilthead sea bream, *Sparus aurata* (L. 1875), using *Chlorella vulgaris* (*Chlorophyta*, *Volvocales*) microalga. *Aquaculture Research* 33: 987–993.
- Gouveia, L., Rema, P., Pereira, O., Empis, J., 2003. Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. *Aquaculture Nutrition* 9: 123–129.
- Hancz, C., Magyary, I., Molnár, T., Sato, S., Horn, P., Taniguchi, N., 2003. Evaluation of color intensity enhanced by paprika as feed additive in goldfish and koi carp using computer-assisted image analysis. *Fisheries Sciences* 69: 1158–1161.
- Chai, D., Ngan, K.N., 1999. Face segmentation using skin color map in videophone applications, *IEEE Transaction on Circuits and Systems for Video Technology* 9 (4).
- Choubert, G., Heinrich, O., 1993. Carotenoid pigments of the green algae *Haematococcus pluvialis*: assay on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, pigmentation in comparison with synthetic astaxanthin and canthaxanthin. *Aquaculture* 112: 217–226.
- Choubert, G., Storebakken, T., 1989. Dose response to astaxanthin and canthaxanthin pigmentation of rainbow trout fed various dietary carotenoid concentrations. *Aquaculture* 81: 69–77.
- Choubert, G., 2010. Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to varying dietary astaxanthin/canthaxanthin ratio: colour and carotenoid retention of the muscle. *Aquaculture* 16: 528–535.
- Intel IPP color conversion and image scaling, 2007, <http://software.intel.com/sites/products/documentation/hpc/ipp/>
- Jerome, J.H., Bukata, R.P., Whitfield, P.H., Bousseau, N., 1994. Colours of natural waters: 1. Factors controlling the dominant wavelength. *Northwest Science* 68: 43–52.
- Kelsh, R.N., 2004. Genetics and evolution of pigment patterns in fish. *Pigment Cell Research* 17: 326–336.

- Kolářová a kol., 2012. Anestetika pro ryby (druhé rozšířené vydání). Edice Metodik (technologická řada). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, č. 77, 25 s.
- Mather, J., 2005. Spectral and XYZ Color Functions: Label plots with spectra. Convert wavelengths to RGB. Functions for color matching and illuminants., <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/>
- Muller-Feuga, A., 2004. Microalgae for Aquaculture: the current global situation and future trends. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgal Cultures. Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 352–364.
- Murch, G. M., 1987. Color display and color science. Academic Press Orlando, USA.
- Nelson, J.S., 2006. Fishes of the World. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc., 4th edition.
- Novotný, I., Hruška, M., 1995. Biologie člověka. Fortuna, Praha.
- Oshima, N., Nakamaru, N., Araki, S., Sugimoto, M., 2001. Comparative analyses of the pigment-aggregating and dispersing actions of MCH on fish chromatophores. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 129: 75–84.
- Otsu, N., 1979. A threshold selection method from gray-level histogram. IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics SMC-9: 62–66.
- Pavlidis, M., Papandroulakis, N., Divanach, P., 2006. A method for the comparison of chromaticity parameters in fish skin: preliminary results for coloration pattern of red skin Sparidae. Aquaculture 258: 211–219.
- Prior, R.L., Wu, X. 2006. Antioxidant status in vivo: the case for regular consumption of antioxidant rich foods. Institute of Food Technology Annual Meeting, June 24–28, Orlando, Florida. Paper No. 020H-12.
- Quan, S., 2002. Evaluation and optimal design of spectral sensitivities for digital color imaging. Center for Imaging Science, Rochester Institute of Technology, NY, USA.
- Resfgaard, H.H.F., Brockhoff, B., Jensen, B., 1998. Biological variation of lipids constituent and distribution of tocopherols and astaxanthin in farmed atlantic salmon (*Salmo salar*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 808–812.
- Sommer, T., D'Sousa, F.D., Morrisy, N.M., 1992. Colouringation of adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using the green alga *Haematococcus pluvialis*. Aquaculture 106: 63–74.
- Spagnolo, G.S., Papalillo, D., Martocchia, A., 2012. LED Applications in railway signals: wavelength and intensity vs temperature variation. Journal of Transportation Technologies 2: 78–83.
- Steer, W.A., 2012. www.techmind.org
- Storebakken, T., Choubert, G., 1991. Flesh pigmentation of rainbow trout fed astaxanthin or canthaxanthin at different feeding rates in freshwater and saltwater. Aquaculture 95: 289–295.
- Szék, P., 1987. Halélettan. Mezogazdasági Kiadó, Budapest, Hungary, 224 pp.

- Šonka, M., Hlaváč, V., Boyle, R., 1999. Image processing, analysis and machine vision. Brooks/Cole Publishing Company, USA.
- Tancer, J., 2007. Vývoj softwaru a hardwaru pro externí a on-line sledování aktivit ve fotobioreaktorech. Diplomová práce, UFB JCU.
- Torrissen, O.J., 1985. Pigmentation of salmonids: Factors affecting carotenoid deposition in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture 46: 133–142.
- Torrissen, O.J., 1986. Pigmentation of salmonids – A comparison of astaxanthin and canthaxanthin as pigment sources for rainbow trout. Aquaculture 53: 271–278.
- Urban, J., 2012. Automatic image segmentation of HeLa cells in phase contrast microscopy. Lap LAMBERT Academic Publishing, Germany. ISBN-13: 978-3846585320.
- Urban, J., Štys, D., Sergejevová, M., Masojídek, J., 2013. Expertomica Fishgui: Comparison of fish skin colour. Journal of Applied Ichthyology 29: 172–180.
- Vincent, L., 1993. Morphological grayscale reconstruction in image analysis: applications and efficient algorithms. IEEE Transactions on Image Processing 2: 176–201.
- Yang, J., Lu, W., Waibel, A., 1997. Skin-color modelling and adaptation. Computer Vision – ACCV'98.
- Zmora, O., Richmond, A., 2004. Microalgae for aquaculture: microalgae production for aquaculture. In: Richmond, A. (Ed), Handbook of Microalgal Cultures. Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 365–379.
- Žára, J., Beneš, B., Sochor, J., Felkel, P., 2004. Moderní počítačová grafika; Computer Press, Brno.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Kouba, A., Sales, J., Sergejevová, M., Kozák, P., Masojídek, J., 2013. Colour intensity in angelfish (*Pterophyllum scalare*) as influenced by dietary microalgae addition. Journal of Applied Ichthyology 29: 193.
(GA ČR 521/09/0656; CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024; GAJU 047/2010/Z, ALGATECH CZ.1.05/2.1.00/03.0110)
- Masojídek, J., Sergejevová, M., Kouba A., Kozák, P., 2011. Carotenoid-rich microalgal biomass as feed supplement for freshwater ornamentals: sterlet and wels catfish. Aquaculture Europe 2011, Aug 17-23, 2011, Rhodos, Greece, 683.
(GA ČR 525/06/1090 a 521/09/0656; CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024; ALGATECH CZ.1.05/2.1.00/03.0110)
- Masojídek J., Sergejevová M., Kouba A., Kozák P., 2012. Microalgae biomass enriched with carotenoids as feed supplement for freshwater ornamentals, Aqua 2012, Sep 1-5, 2012, Prague, Czech Republic, 690.
(ALGATECH CZ.1.05/2.1.00/03.0110; CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024; GA ČR 521/09/0656; GA JU 047/2010/Z)

- Sergejevová, M., Masojídek, J., 2011. *Chlorella* biomass as feed supplement for freshwater fish: Sterlet, *Acipenser ruthenus*. Aquaculture Research. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.03011.x
(GA ČR 521/09/0656; MSM6007665808; ALGATECH CZ.1.05/2.1.00/03.0110)
- Urban, J., Sergejevová, M., Zatlková, I., Štys, D., 2008. Software Expertomica Fishgui, Link: <http://auc.cz/software/>
(GAČR 525/06/1090; MSM6007665808)
- Urban, J., Štys, D., Sergejevová, M., Masojídek, J., 2013. Expertomica Fishgui: Comparison of fish skin colour. Journal of Applied Ichthyology 29: 172–180.
(Aquaexcell 262336/FP7; CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024; GA JU 152/2010/Z; MSM 6007665808; GA ČR 521/09/0656)
- Urban, J., Zatlková, I., Vaněk, J., 2006, Comparison of the Fish Skin Colour, Technical Computing Prague, 100 pp., ISBN: 80-7080-616-8, Humusoft, Praha.
(bez dedikace)
- Zatlková, I., Sergejevová, M., Urban, J., Vachta, R., Štys, D., Masojídek, J., 2011. Carotenoid-enriched microalgal biomass as feed supplement for freshwater ornamentals: albinic form of wels catfish (*Silurus glanis*). Aquaculture Nutrition 17: 278–286.
(GA ČR 525/06/1090 a 521/09/0656; MSM 6007665808; AVOZ 50200510)

EXTERNÍ ODBORNÝ OPONENT**doc. Ing. Radovan Kopp, Ph.D.***Mendelova univerzita v Brně**Zemědělská 1, 613 00 Brno***INTERNÍ ODBORNÝ OPONENT****doc. Ing. Martin Flajšhans, Dr.rer.agr.***Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany***OPONENT ZA STÁTNÍ SPRÁVU****Ing. Vladimír Gall***MŽe Praha**Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství (16230)**Těšnov 17, 117 05 Praha 1***OSVĚDČENÍ O UPLATNĚNÉ CERTIFIKOVANÉ METODICE****Č. 131/2012 –16230/N_{met}, ze dne 21. 12. 2012***Vydalo: Ministerstvo zemědělství, úsek lesního hospodářství, Sekce lesního hospodářství,**Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 17, 117 05 Praha 1.***ADRESA AUTORSKÉHO KOLEKTIVU****Ing. Jan Urban, Ph.D., 35% (urbanj@frov.jcu.cz)***Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Škola komplexních systémů, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky, www.frov.jcu.cz***Ing. Magda Sergejevová, Ph.D., 16% (sergejevova@alga.cz)***Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i. ALGATECH – Sektor fototrofních mikroorganismů, Novohradská 237, 379 81,**Třebon II – Opatovický mlýn, www.alga.cz***Ilona Slepíčková 16% (slepickova@frov.jcu.cz)***Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Škola komplexních systémů, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky, www.frov.jcu.cz***Ing. Antonín Kouba, Ph.D., 11% (akouba@frov.jcu.cz)***Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany,**www.frov.jcu.cz*

prof. RNDr. Dalibor Štys, CSc., 11% (stys@frov.jcu.cz)

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a škola komplexních systémů, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky, www.frov.jcu.cz

doc. RNDr. Jiří Masojidek, CSc., 11% (masojidek@alga.cz)

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i. ALGATECH – Sektor fototrofních mikroorganismů, Novohradská 237, 379 81, Třebon II – Opatovický mlýn, www.alga.cz

Autorství fotografií a obrázků:

Není-li uvedeno jinak, autory obrázků a fotografií jsou členové autorského kolektivu.

Vedici Metodik (Technologická řada)

vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,

Redakce: Ing. Petr Císař, Ph.D., Zuzana Dvořáková

Náklad: 200 ks, vytištěno v roce 2012, 1. vydání

Grafický design a technická realizace: iDigitisk s. r. o.



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

VYDÁNÍ PUBLIKACE BYLO USKUTEČNĚNO
ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU:
INOVACE PREZENČNÍHO STUDIA BAKALÁŘSKÉHO STUDIJNÍHO OBORU RYBÁŘSTVÍ
(CZ.1.07/2.2.00/15.0076)



ISBN 978-80-87437-55-1