

เทคนิคใหม่สำหรับนับไข่ปลา : ด้วยโปรแกรม ImageJ

New Technique to Count Fish Eggs : Using ImageJ Software

ธนิต เบี้ยแก้ว^{1*} วราร์ เทพาหุดี¹ เจษฎา อิสหาะ² รุ่งพทธี จงเจริญสุข¹ ธนพล บัณฑิต¹

Thanit biakaew^{1*} Wara Taparhudee¹ Jesada Is-haak² Roongparit joongjaraunsuk¹ Tanapon pandee¹

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ต้องการที่จะพัฒนาวิธีการนับจำนวนไข่ปลาจากรูปภาพที่ถ่ายจากกล้องดิจิทัลด้วยโปรแกรม ImageJ ซึ่งเป็นโปรแกรมเปิดสำหรับการประมวลผลจากภาพถ่าย โดยทำการศึกษาไข่ปลา 3 ชนิด คือ ปลาจาด *Hypsibarbus malcolmi* (Smith, 1945) ปลาม้า *Boesemania microlepis* และปลาเสือตอ *Datnioides undecimradiatus* (Roberts & Kottelat, 1994) ผลการศึกษพบว่าการใช้เทคนิคนี้ในการนับ จำนวนไข่ปลา 1 ถึง 100 ฟองของปลาทั้ง 3 ชนิด มีความถูกต้องแม่นยำร้อยละ 100 และเมื่อทำการสุ่มไข่ปลาแต่ละชนิดมาจำนวน 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 และ 1 กรัม และทำการทดสอบด้วยเทคนิคเดิมพบว่าการนับไข่ปลาจาด ปลาม้า และปลาเสือตอ มีความถูกต้องแม่นยำเฉลี่ยเท่ากับ ร้อยละ 99.37 ± 1.10 , 98.77 ± 0.76 และ 99.33 ± 0.45 ตามลำดับ จากผลการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้เทคนิคนี้ในการนับไข่ปลาทั้งหมด และมีความถูกต้องแม่นยำสูง และอาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนไข่ของปลาชนิดอื่นได้

คำสำคัญ : เทคนิคใหม่, นับไข่ปลา, โปรแกรม ImageJ

Abstract

This present study wanted to develop a new protocol for counting total number of fish eggs from pictures taken from a digital camera using ImageJ, an open-source image processing software. Eggs from 3 species of fishes i.e. *Hypsibarbus malcolmi* (Smith, 1945), *Boesemania microlepis* and *Datnioides undecimradiatus* (Roberts & Kottelat, 1994) were determined. Results showed that numbers of fish eggs of 3 fish species between 1 to 100 eggs, accuracies of counting by this technique were 100%. When sampling fish eggs for 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 g from each species and using this technique, average accuracies of *Hypsibarbus malcolmi* (Smith, 1945) *Boesemania microlepis* and *Datnioides undecimradiatus* (Roberts & Kottelat, 1994) were 99.37 ± 1.10 , 98.77 ± 0.76 และ 99.33 ± 0.45%, respectively. These results indicate that this technique could be utilized for counting total number of fish eggs with high accuracy and may be applied for other fish eggs.

Keywords : New Technique, Count Fish Eggs, ImageJ Software

¹ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkhaen, Bangkok.

บทนำ

ปัจจุบันธุรกิจการเพาะขยายพันธุ์สัตว์น้ำได้เติบโตแพร่หลายเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสภาพแวดล้อมได้เสื่อมโทรมลง ทำให้จำนวนลูกพันธุ์สัตว์น้ำที่รวบรวมได้จากธรรมชาติลดน้อยลงจากในอดีตมาก (อุทัยรัตน์, 2531) ทำให้เกิดธุรกิจการเพาะขยายพันธุ์สัตว์น้ำเพิ่มมากขึ้นเพื่อให้ปริมาณลูกพันธุ์สัตว์น้ำเพียงพอต่อความต้องการ โดยเฉพาะลูกพันธุ์สัตว์น้ำเศรษฐกิจ ซึ่งในกระบวนการเพาะขยายพันธุ์สัตว์น้ำ ไข่ของสัตว์น้ำแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันทั้ง สี รูปร่าง ขนาด และความสามารถของการลอยน้ำ ทำให้เทคนิคในการประเมินไข่ปลาในอดีตมีความหลากหลายเพื่อปรับให้เหมาะสมกับชนิดของไข่ปลา เช่น ไข่ปลาที่มีขนาดใหญ่และจำนวนน้อยก็จะนับโดยตรง (actual count) ไข่ที่มีขนาดเล็กและจำนวนมากก็จะใช้วิธีการชั่ง (gravimetric method) โดยชั่งน้ำหนักไข่ทั้งหมดก่อนแล้วสุ่มไข่ น้ำหนักประมาณ 10% ของไข่ทั้งหมดมานับ เมื่อรู้จำนวนแล้วจึงคำนวณกลับเป็นจำนวนไข่ทั้งหมด (อุทัยรัตน์, 2525) ซึ่งการประเมินไข่โดยการชั่งน้ำหนักไข่อ่อนการพองน้ำ เช่น ไข่ปลาฉา 1 กรัม จะมีจำนวนไข่ประมาณ 700-750 ฟอง (PRFRI, 1980) ไข่ปลายี่สกเทศ 1 กรัม จะมีจำนวนไข่ประมาณ 747-1,528 ฟอง (สันทนาและทัศนีย์, 2525) และมีการใช้เทคนิควิธีการตวงไข่ที่พองน้ำเต็มที่แล้ว เช่น ไข่ปลาจีน 100 มิลลิลิตร จะมีจำนวนไข่ประมาณ 1,300 ฟอง (PRFRI, 1980) และวิธีการตวงโดยการแทนที่น้ำ หรือวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของฟองไข่ (อุทัยรัตน์, 2525) จะเห็นได้ว่าการนับไข่ปลาในอดีตยังมีความยุ่งยากและใช้เวลานานในการนับจำนวนไข่ปลา ปัจจุบันได้มีการพัฒนาโปรแกรมเพื่อประเมินค่าความหนาแน่นและปริมาณพิกเซล (pixel) เพื่อมาใช้งานในการวิเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์ โปรแกรมดังกล่าวมีชื่อว่า โปรแกรม ImageJ ซึ่งเป็นโปรแกรมในการวิเคราะห์ภาพถ่าย เป็นโปรแกรม freeware สามารถดาวน์โหลดได้ฟรี เป็นโปรแกรมที่ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Wayne Rasband และ The National Institute of Health (NIH) ประเทศสหรัฐอเมริกาและยังมีการเปิด source code ให้มีการพัฒนาอีกด้วย สกุลไฟล์ภาพที่โปรแกรมอ่านได้ ได้แก่ TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS และ Raw (<https://sites.google.com/site/thaiimagej/>) ปัจจุบันได้เริ่มมีการประยุกต์ใช้โปรแกรมดังกล่าวมาประเมินการเจริญเติบโต และนับจำนวนไข่ และตัวอ่อนของสิ่งมีชีวิตบางชนิด ดังเช่น เบญจมาศ และคณะ, (2555) ได้ใช้โปรแกรม ImageJ ในการพัฒนาเทคนิควัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย ช่อพริกไทย (*Caulerpa lentillifera*) โดยการวัดพื้นที่ภาพถ่าย Sincliar *et al.* (2009) ได้ใช้โปรแกรม ImageJ ในการประมวลผลภาพเอ็กซเรย์ที่ทำให้เข้าใจเกี่ยวกับการก่อตัวของน้ำแข็งที่แตกต่างกันของแมลงที่มีชีวิตกับแมลงที่เสียชีวิตระหว่างการถูกแช่แข็ง Main *et al.* (2008) ได้ใช้ โปรแกรม ImageJ เพื่อประเมินจำนวนของไข่ที่มีการฟักแล้วบนกระดาด ในขณะที่ Banugopan and Sammmie (2012) ได้ใช้โปรแกรม ImageJ มาเป็นเทคนิคสำหรับการนับจำนวนยุงตัวเต็มวัยเพื่อประเมินจำนวนของยุงตัวเต็มวัยในกับดักที่ใช้ล่อยุง จากตัวอย่างงานวิจัยที่ได้กล่าวมาจะเห็นได้ว่าโปรแกรม imageJ มีความสามารถที่หลากหลายและสามารถนับจำนวนสิ่งมีชีวิตต่างๆได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำโปรแกรม ImageJ มาประยุกต์ใช้ในการนับไข่ปลา โดยทำการศึกษากับไข่ปลา 3 ชนิด คือ ไข่ปลาจาด ไข่ปลาม้า และไข่ปลาเสือตอ ซึ่งเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และมีลักษณะจำเพาะที่ทำ

ให้การนับด้วยมือและตาเปล่ามีความยุ่งยาก เช่น ไข่ปลาจากเป็นไข่จมแบบติดกับวัตถุ มีลักษณะกลม สีเหลืองใส มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.05 มิลลิเมตร (อรรถนพ และคณะ, 2545) ไข่ปลาม้ามีรูปร่างกลม สีเหลือง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 มิลลิเมตร เป็นไข่อลอย (กิจจา และคณะ, 2534) ไข่ปลาเสือตอเป็นไข่อลอย ลักษณะกลม มีสีเหลืองใส มีหยดนํ้ามัน (Oil drop) ขนาดใหญ่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 มิลลิเมตร (ยงยุทธและบุญยืน, 2527) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงคาดหวังว่าการใช้ **เทคนิคใหม่สำหรับนับไข่ปลา : ด้วยโปรแกรม ImageJ** จะช่วยให้เกิดความแม่นยำ สร้างความสะดวก รวดเร็ว และลดเวลาในการนับไข่ปลาได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนไข่ของปลาชนิดอื่นได้

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

อุปกรณ์ที่ใช้ประกอบด้วย : กล้องดิจิทัลขนาดความละเอียด 10.0 เมกะพิกเซล, คอมพิวเตอร์, ภาชนะสำหรับใส่ไข่(เพลท), กล้องกำเนิดแสงไฟและ เครื่องชั่งน้ำหนัก โปรแกรมที่ใช้ในการทำงานคือ โปรแกรม imageJ การทดลองนี้ ได้ทำการทดลองที่ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขนและได้นำตัวอย่างไข่ปลา ทั้ง 3 ชนิดมาจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดชัยนาท ซึ่งได้แก่ ไข่ปลาจาก *Hypsibarbus malcolmi* (Smith, 1945) ไข่ปลาม้า *Boesemania microlepis* และไข่ปลาเสือตอ *Datnioides undecimradiatus* (Roberts & Kottelat, 1994)

ขั้นตอนการศึกษา ได้แบ่งการศึกษออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

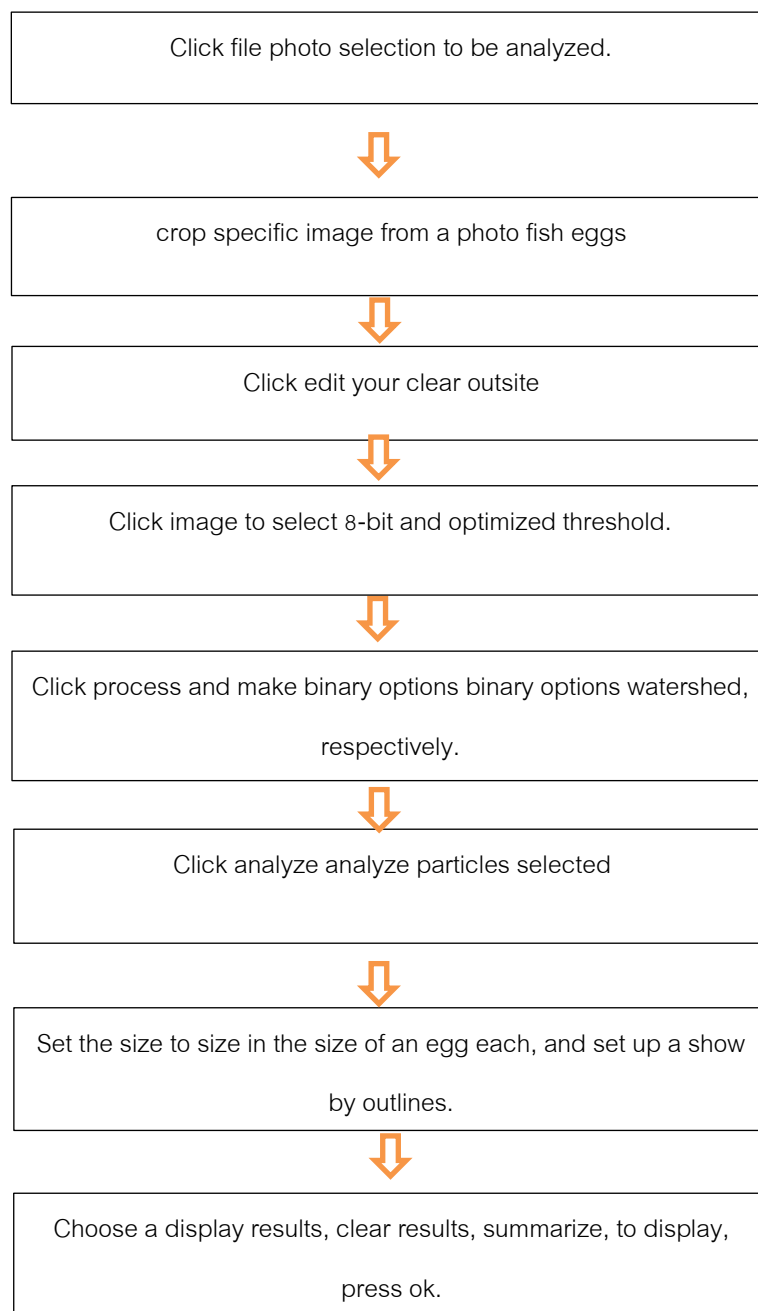
ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาหาความแม่นยำของโปรแกรม จากการกำหนดจำนวนไข่ที่ทราบจำนวนแน่นอน

โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้ คือ นำไข่ปลาทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ไข่ปลาม้า ไข่ปลาเสือตอ และไข่ปลาจาก มานับจำนวน 10, 30, 50, 70 และ 100 ฟอง มาใส่ลงในเพลทพร้อมทั้งแช่ไข่ปลาให้กระจายทั่วเพลท และใส่นํ้าเล็กน้อยเพื่อไม่ให้ไข่ติดกัน แล้วนำเพลทดังกล่าวไปวางบนกล้องกำเนิดแสงไฟพร้อมทั้งถ่ายภาพแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ในโปรแกรม imageJ ดังขั้นตอนในแผนผังที่ 1 เพื่อประเมินจำนวนไข่ในแต่ละเพลท และนำค่าที่ได้มาประเมินความแม่นยำของโปรแกรม

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาหาความแม่นยำของโปรแกรม จากการสุ่มไข่ปลา มาในปริมาณน้ำหนักต่าง ๆ กัน

โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้ คือ ทำการสุ่มไข่ปลาทั้ง 3 ชนิดมาชั่งน้ำหนักจำนวน 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 และ 1 กรัม แล้วใส่ลงในเพลท จากนั้นทำการนับจำนวนไข่ปลาทั้ง 3 ชนิดในแต่ละปริมาณน้ำหนัก พร้อมทั้งเขียนให้ทั่วเพลท พยายามอย่าให้ไข่ทับซ้อนกัน นำเพลทดังกล่าวไปวางบนกล่องกำเนิดแสงไฟพร้อมทั้งถ่ายภาพแล้วจึงนำไปวิเคราะห์ในโปรแกรม imageJ ดังขั้นตอนในแผนผังที่ 1 เพื่อประเมินจำนวนไข่ในแต่ละเพลท และนำค่าที่ได้มาประเมินความแม่นยำของโปรแกรมต่อไป

Pages map 1 shows analysis procedures by the imageJ.



ผลการศึกษาและอภิปรายผล

ผลการทดลองจากการเปรียบเทียบการใช้โปรแกรม imageJ นับจำนวนไข่ปลาทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ไข่ปลาม้า ไข่ปลาเสือตอ และ ไข่ปลาจาด จำนวน 10, 30, 50, 70 และ 100 ฟองกับจำนวนไข่ปลาที่นับไว้พบว่าจำนวนไข่ปลาแต่ละจำนวนของไข่ปลาทั้ง 3 ชนิดมีความแม่นยำในการนับจำนวนไข่ปลาจากการใช้โปรแกรม imageJ ร้อยละ 100 ดัง(ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความแม่นยำของจำนวนไข่ปลาไม่เกิน 100 ฟอง จากการนับโดยตรงกับการใช้โปรแกรม ImageJ นับ

Species of fish	Number of eggs (bubble)	Program counter (bubble)	Precision (%)
<i>Boesemania microlepis</i>	10	10	100
	30	30	100
	50	50	100
	70	70	100
	100	100	100
<i>Datnioides undecimradiatus</i>	10	10	100
	30	30	100
	50	50	100
	70	70	100
	100	100	100
<i>Hypsibarbus malcolmi</i>	10	10	100
	30	30	100
	50	50	100
	70	70	100
	100	100	100

ผลจากการเปรียบเทียบความแม่นยำของจำนวนไข่ปลาทั้ง 3 ชนิดได้แก่ ไข่ปลาม้า ไข่ปลาเสือตอ และไข่ปลาจาด ที่ประเมินน้ำหนักของไข่ในปริมาณต่างๆ จากการนับโดยตรงของไข่ปลากับการใช้โปรแกรม imageJ พบว่าไข่ปลาม้า ที่มีน้ำหนัก 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 และ 1 กรัม มีความแม่นยำในการใช้โปรแกรม imageJ นับไข่ปลาม้าดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 1 ร้อยละ 99.58, 99.59, 98.35, 98.04 และ 98.27 ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยความแม่นยำในการนับไข่ปลาม้าร้อยละ 98.77 ± 0.76 ไข่ปลาเสือตอที่มีน้ำหนัก 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 และ 1 กรัม มีความแม่นยำในการใช้โปรแกรม imageJ นับไข่ปลาเสือตอดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 2 ร้อยละ 100.00, 99.02, 99.28, 99.49 และ 98.85

ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยความแม่นยำในการนับไข่ปลาเฉลี่ยร้อยละ 99.33 ± 0.45 และไข่ปลาจากที่มีน้ำหนัก 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 และ 1 กรัม มีความแม่นยำในการใช้โปรแกรม imageJ นับไข่ปลาจากดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 3 ร้อยละ 100, 100, 99.72, 99.69 และ 97.42 ตามลำดับและมีค่าเฉลี่ยความแม่นยำในการนับไข่ปลาจากร้อยละ 99.37 ± 1.10

Table 2 compares the precision of the estimate of the weight of eggs in each egg. By direct counting on using the ImageJ program.

Species of fish	Egg weight (g)	Counted directly	Program counter	Precision (%)
		(bubble)	(bubble)	
<i>Boesemania microlepis</i>	0.1	472	474	99.58
	0.3	1229	1234	99.59
	0.5	2178	2142	98.35
	0.8	3314	3249	98.04
	1	5316	5224	98.27
				98.77 ± 0.76
<i>Datnioides undecimradiatus</i>	0.1	395	395	100.00
	0.3	1330	1317	99.02
	0.5	2373	2356	99.28
	0.8	3303	3286	99.49
	1	4010	3964	98.85
				99.33 ± 0.45
<i>Hypsibarbus malcolmi</i>	0.1	66	66	100
	0.3	239	239	100
	0.5	359	360	99.72
	0.8	635	637	99.69
	1	775	795	97.42
				99.37 ± 1.10

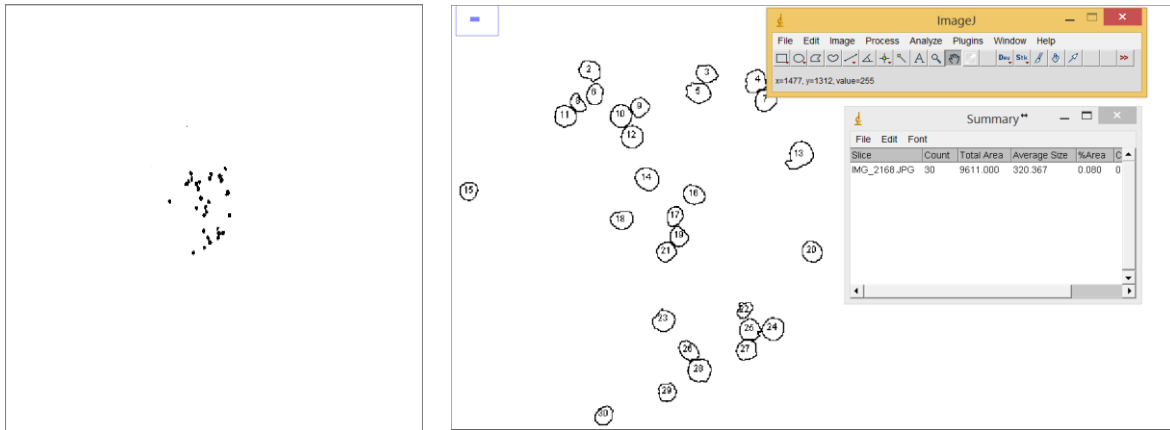


Figure 1 shows the number of eggs (*Boesemania microlepis*) of 30 eggs using imageJ.

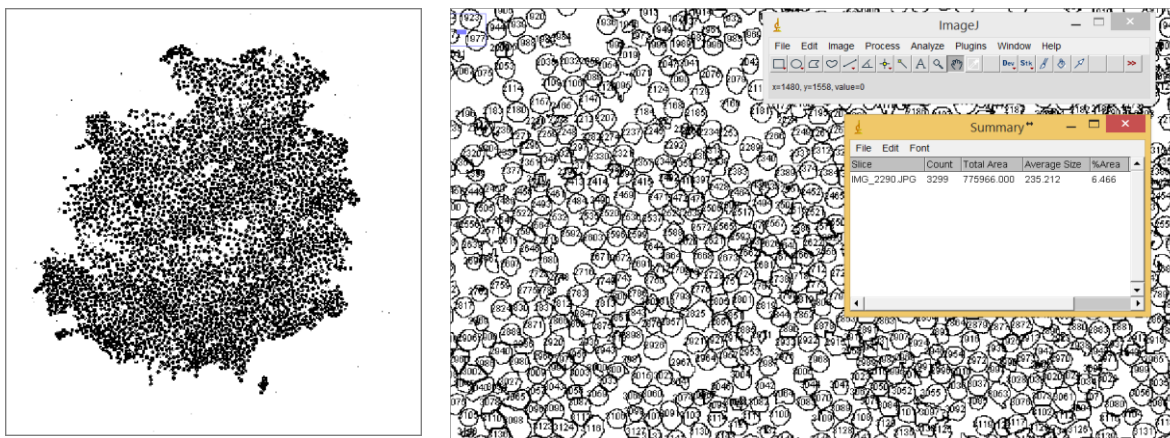


Figure 2 shows the number of eggs (*Datnioides undecimradiatus*), egg weight 0.8 grams using imageJ.

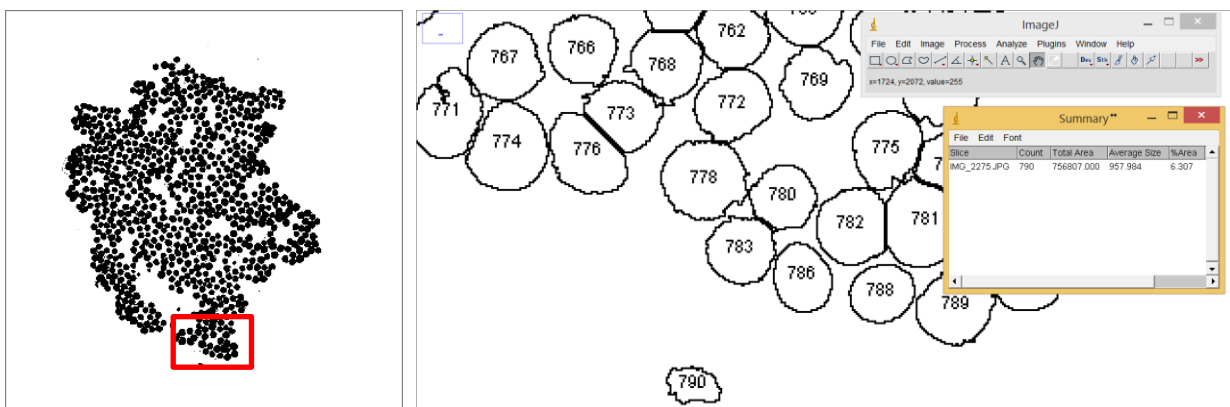


Figure 3 shows the number of eggs (*Hypsibarbus malcolmi*), egg weight of 1 gram using imageJ.

จากการทดลองใช้เทคนิคใหม่ในการนับไข่ปลาทั้ง 3 ชนิด โดยใช้โปรแกรม ImageJ พบว่าสามารถนับจำนวนไข่ปลาได้ถูกต้องแม่นยำสูง มีประสิทธิภาพสูง อีกทั้งยังเป็นการช่วยลดเวลาในการนับจำนวนไข่ปลาเมื่อเทียบกับวิธีการนับไข่ปลาด้วยมือได้มาก และการนับด้วยมืออาจนับผิดพลาดได้เนื่องจากขนาดไข่ปลาบางชนิดมีขนาดเล็กและมีปริมาณที่มาก ซึ่งสอดคล้องกับ Chatain (1996) ได้ทำการศึกษากการนับจำนวนลูกปลา *Dicentrarchus labrax* ด้วยวิธีการภาพถ่ายโดยเปรียบเทียบกับวิธีการชั่งน้ำหนักและการนับด้วยมือ พบว่ามีความถูกต้องและแม่นยำมากกว่าการชั่งน้ำหนักและการนับด้วยมือ จากผลการศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้เทคนิคนี้ในการนับจำนวนไข่ปลาทั้งหมดได้ และมีความถูกต้องแม่นยำสูง และอาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนไข่ของปลาชนิดอื่นได้

สรุป

ผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้เทคนิคใหม่ในการนับไข่ปลาทั้งหมดได้ และมีความถูกต้องแม่นยำสูง และอาจจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนไข่ของปลาชนิดอื่นได้

คำขอบคุณ

ทางคณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณท่านผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดชัยนาท นายองอาจ คำประเสริฐ อดีตผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดชัยนาท นายอรรณพ อิมศิริ และนักวิชาการประมงศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดชัยนาท กรมประมงที่ได้กรุณาช่วยเหลือสนับสนุนในการจัดเก็บตัวอย่างไข่ปลาทั้ง 3 ชนิดเพื่อใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมงมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่เพื่อใช้ในการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กิจจา ใจเย็น, สมปอง หิรัญวัฒน์, ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, สุจินต์ หนูขวัญ, กำชัย ลาวัญญุฒิ และ วีระ วัชรกรโยธิน.

2534. การศึกษาชีวประวัติและการเพาะปลามา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 119. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด
บางเขน กรุงเทพมหานคร กรมประมง. 21 หน้า

นิรนาม. 2011. โปรแกรม ImageJ. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อ <https://sites.google.com/site/thaiimagej/> (26
พฤษภาคม 2557).

เบญจมาศ จันทะภา ไพบูลย์กิจกุล เบญจพร อุทัยศรี และ ชลี ไพบูลย์กิจกุล. 2555. การพัฒนาเทคนิควัดการ

เจริญเติบโตของสาหร่ายช่อพริกไทย (*Caulerpa lentillifera*) โดยการวัดพื้นที่ภาพถ่าย. **วารสารวิทยาศาสตร์**

ลาดกระบัง 21 : 77-88 หน้า

ยงยุทธ ทักษิณ และ บุญยืน โชคศิริ. 2527. **ศัพทวิทยาและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของปลาเสือตอ**. รายงาน

ประจำปีสถานีวิจัยประมงจังหวัดนครสวรรค์. กองประมงน้ำจืด. กรมประมง. หน้า 17-27

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2525. **การเพาะพันธุ์ปลา**. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 130 หน้า.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2531. **การเพาะขยายพันธุ์ปลา**. บริษัท ศ. วงษ์ไพบูลย์, กรุงเทพฯ.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2538. **การเพาะขยายพันธุ์ปลา**. สำนักพิมพ์วิเชียร, กรุงเทพฯ.

อรรถพล อิมศิริป, วิทยา ตินนังวัฒนะ และ มาลัย อิมศิริป. 2545. **การเพาะพันธุ์ปลาจาก**. เอกสารวิชาการฉบับที่ 11/2545. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดเพชรบุรี กองประมงน้ำจืด กรมประมง. 31 หน้า

Banugopan Kesavaraju and Sammie Dickson. 2012. New Technique to Count Mosquito Adults: Using ImageJ Software to Estimate Number of Mosquito Adults in a Trap. **Journal of the American Mosquito Control Association**. 28(4): 330-333.

Chatain, B., L, Debas. and A, Bourdillon. 1996. A photographic larval fish counting technique: comparison with other methods, statistical appraisal of the procedure and practical use. **Aquaculture**, 141 : 83 –

Mains JW, Mercer DR, Dobson SL. 2008. Digital image analysis to estimate numbers of *Aedes* eggs oviposited in containers. **J Am Mosq Control Assoc** 24: 496–501.

Sinclair BJ, Gibbs AG, Lee W-K, Rajamohan A, Roberts SP. 2009. **Synchrotron X-ray visualisation of ice formation in insects during lethal and non-lethal freezing**. PLoS ONE 4: e8259. DOI: 10.1371/journal.pone.0008259

Pearl River Fisheries Research Institute. 1980. **Pond Fish Culture in China**. National Bureau of Aquatic products, Guangzhou, China. 136 p.