



HET METEN VAN SPOREN MET PIXIMÈTRE

Johan Steketee

Jan Vethlaan 9, 3141 KJ Maassluis

Steketee, J. 2016. Measuring spores with Piximètre. *Coolia* 59(2): 91–94.

Piximètre is a program made by a mycologist, Alain Henriot and a statistician, Jean-Louis Cheype and is available from their website. With this program it is possible to measure spores in a photo and the result is directly summarized in a statistical form. Because the very detailed manual is only available in the French language, this article intends to provide sufficient explanation to use the program without reading that manual.

De software die bij microscoopcamera's wordt geleverd – bij voorbeeld MicrocamLab bij de Bresser en ImageFocus bij Euromex- maakt het mogelijk om in de gemaakte foto ook metingen te verrichten. Die afmetingen kunnen zelfs direct in micrometers worden weergegeven. Wel moet dan een ijkling plaatsvinden door ook éénmalig een foto te maken van een micrometer ijkplaatje.

Veel mensen maken tegenwoordig ook prachtige microscoopbeelden door gebruik te maken van hun digitale (compact)camera al dan niet voorzien van een adapter om de camera aan het oculair te koppelen. Zonder zo'n adapter is het ook mogelijk maar het vergt wel wat inspanning om met behulp van een statief de camera in de juiste positie op te stellen en dan via de timer (ook wel zelfontspanner genoemd) een foto te maken om trillingsonscherpte te voorkomen bij het afdrukken van de ontspanknop. Op Waarneming.nl zijn veel voorbeelden te vinden van fraaie foto's die op deze manier zijn gemaakt.

Wat men echter in deze foto's mist is de mogelijkheid om nauwkeurige metingen te verrichten. Alleen als de schaalverdeling in het oculair ook meegefotografeerd is, kan men soms een (ruwe) schatting maken van afmetingen.

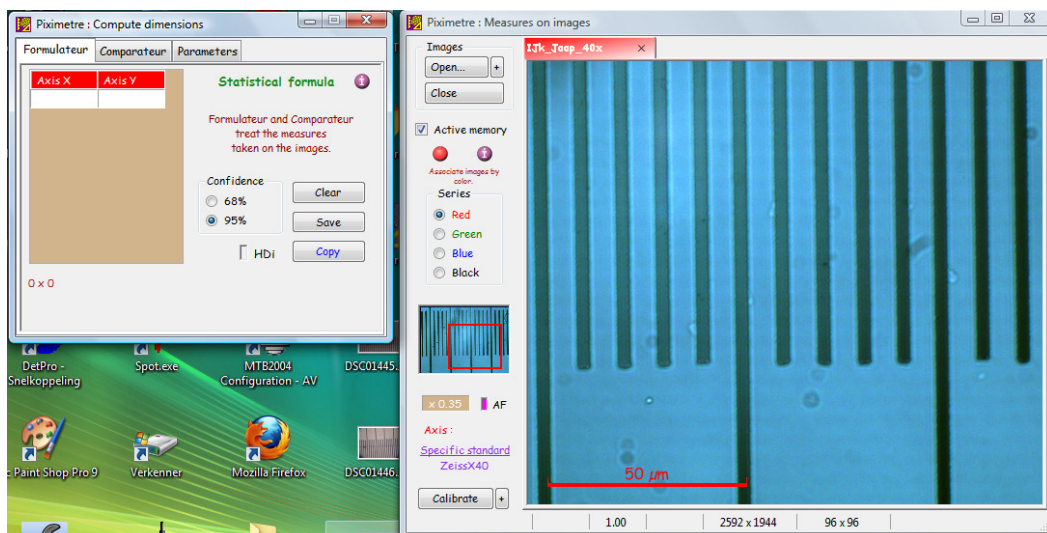
Tijdens de Binnenlandse Werkweek 2015 in Diffelen (Salland) liet Menno Boomsluiters een programma zien waarmee het mogelijk is om bijvoorbeeld aan een aantal sporen in een foto metingen te verrichten, die meteen statistisch worden verwerkt. Het programma heet Piximètre en is gemaakt door een mycoloog, Alain Henriot, met medewerking van een statisticus/amateurmycoloog, Jean-Louis Cheype. Zij stellen het programma vrij beschikbaar en het is te downloaden op ach.log.free.fr/Piximetre/ en daarna op de knop <Téléchargez Piximètre> te drukken. Het werkt zowel op 32- als op 64-bits Windows PC's. Ook Windows XP is geen enkel probleem. Wel moet minstens Framework NET 4.0 aanwezig zijn, maar als dat niet het geval is, kan dat eenvoudig worden gedownload van de Microsoft website.

Van origine is het programma Franstalig, maar bij het downloaden wordt bij ons meteen een Engelstalige versie gekozen op grond van de Windows taalkeuze van onze PC's. Die Engelstalige versie houdt echter alleen maar in dat in de vensters Engelse teksten verschijnen, maar de zeer uitvoerige gebruiksaanwijzing is nog steeds Franstalig, omdat de auteur, zoals hij zelf schrijft, de Engelse taal niet voldoende machtig is om een Engelse versie te schrijven.

IJking

Na het downloaden en installeren van Piximètre staat er een icoontje op het bureaublad waarmee men het programma kan openen. Dan verschijnt een beeld zoals in Figuur 1, waarin men





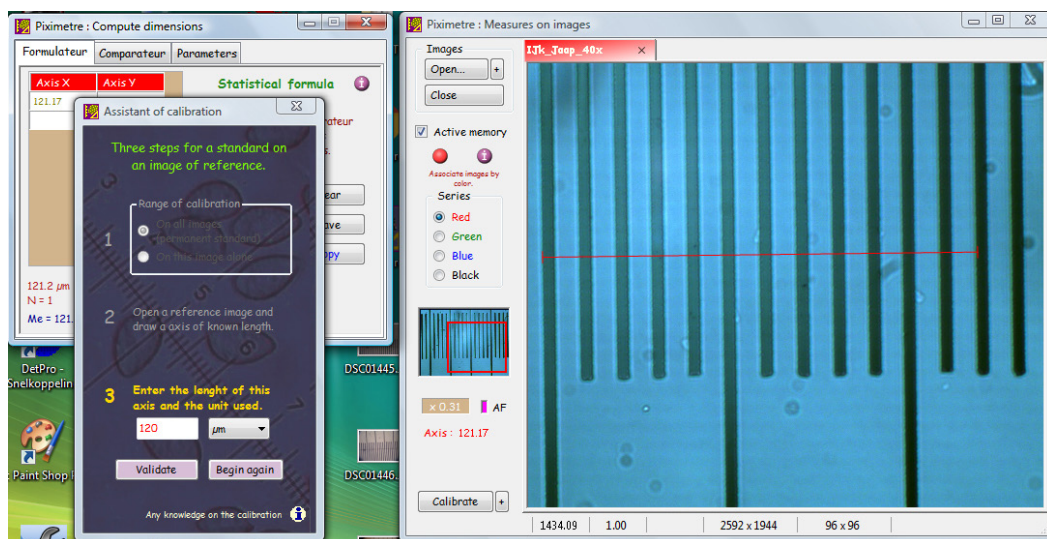
Figuur 1. Het openingsvenster van Piximètre met het beeld van een micrometer ijkplaatje.

via de knop 'Open' een beeld kan invoeren. In dit geval is een opname van een micrometer-ijkplaatje ingevoerd, omdat natuurlijk allereerst een ijking moet plaatsvinden wil men sporen kunnen meten. (Wie niet over een ijkplaatje beschikt, kan dat van mij lenen.)

De ijking zelf wordt heel duidelijk begeleid door het venster 'Assistant of calibration' dat verschijnt als men op 'Calibrate' drukt (Figuur 2). Het trekken van een ijklijn vergt enige oefening omdat we misschien gewend zijn om een lijn te trekken met een ingedrukte linker-muisknop. Hier moet men echter na het plaatsen van de cursor op het beginpunt de muisknop loslaten en dan de lijn trekken en pas bij het eindpunt de muisknop opnieuw indrukken. Zelf heb ik diverse foutieve lijnen moeten verwijderen, maar dat is heel eenvoudig door de cursor op zo'n lijn te zetten en de rechtermuisknop in te drukken. In het venster dat dan geopend wordt, kan 'Erase axis' worden gekozen, waarna de lijn verdwijnt.

De afstand tussen twee schaaldelen van de micrometer is 10 µm en de lijn omvat 12 schaaldelen (streepjes), dus we vullen 120 in en drukken op 'Validate' waarna we de ijking een naam

Figuur 2. Het kalibreren van Piximètre met een micrometer ijkplaatje.



geven, bij voorbeeld Olympus 40×10 omdat gebruik gemaakt werd van een 40× objectief in combinatie met een oculair 10×.

Het meten in Piximètre vindt plaats in het fotobestand, dus moeten alle foto's waarin we metingen willen uitvoeren, dezelfde resolutie hebben als de ijkfoto (bijv. 4000×3000 pixels). De resolutie van het gebruikte beeldscherm van laptop of PC is dus niet van invloed evenmin als de grootte van het beeld op het beeldscherm: men kan namelijk door de cursor in de foto te plaatsen met het muiswieltje het beeld vergroten of verkleinen, maar daarbij wordt de ijklijn eveneens vergroot of verkleind.

In het midden van Figuur 2 is een klein beeldvenstertje zichtbaar. Ook hierin kan men met het muiswieltje het beeld vergroten en verkleinen, maar ook de uitsnede verplaatsen met ingedrukte linkermuis, wat vooral handig is bij het opzoeken van de te meten sporen.

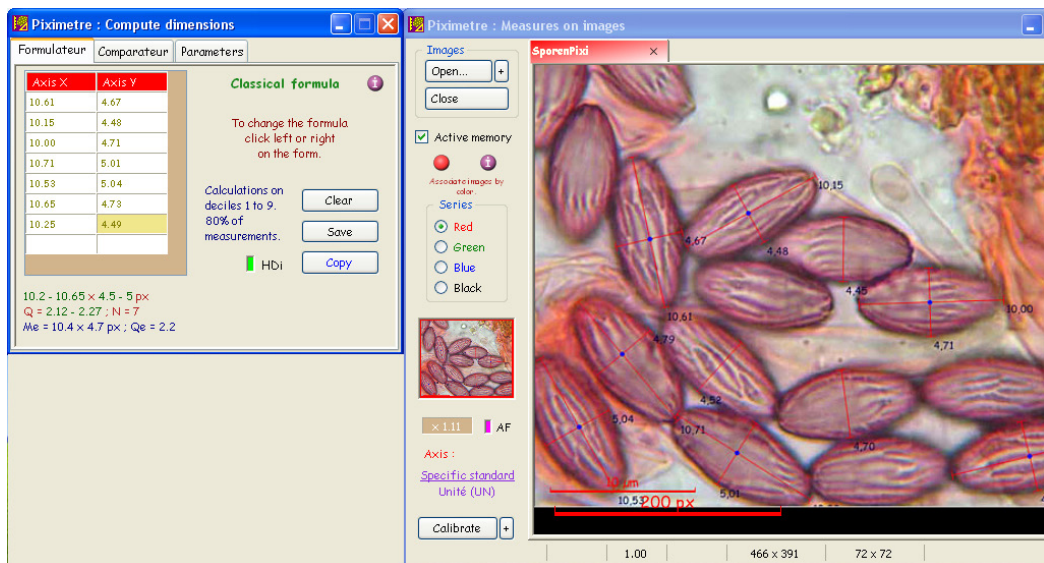
Metten van sporen

In Figuur 3 is een mooi voorbeeld gegeven van het meten van sporen. Zoals reeds eerder besproken moet de foto van de sporen precies dezelfde resolutie hebben als die van de ijking. Deze foto heeft betrekking op een andere ijking dan Figuur 2, wat te zien is links onder bij Specific Standard, waar de gebruikte ijking is vermeld: Unité UN. Door op Specific Standard te klikken kan men andere ijkingen kiezen, bijvoorbeeld onze Olympus 40×10.

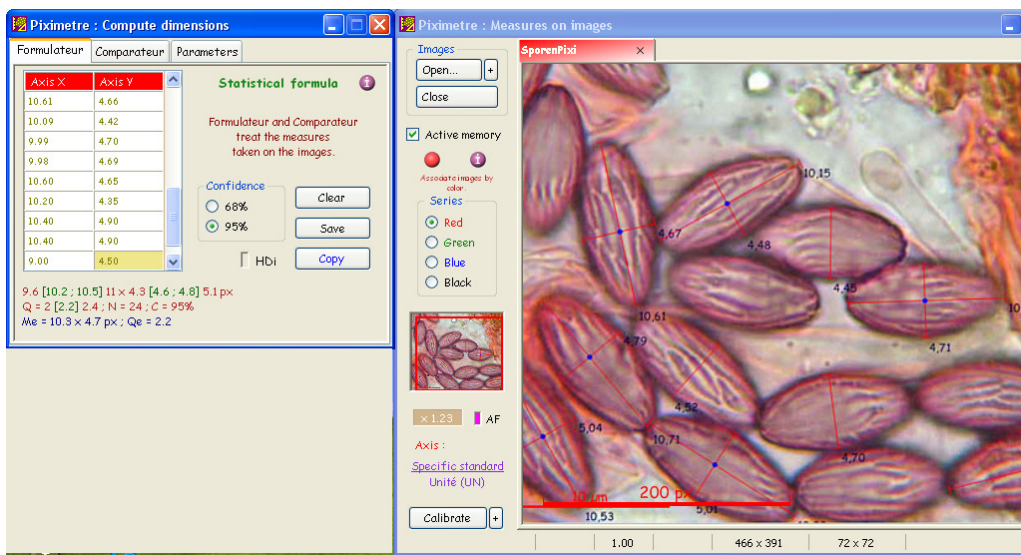
Op dezelfde wijze zoals besproken bij de ijking wordt de lengte gemeten en daarna meet men ook de breedte. De uitkomsten worden meteen in een tabel weergegeven: de lengte in de linker kolom, die X-as genoemd wordt en de breedte in de rechterkolom, Y-as genoemd. Bij het meten moet men zich dan ook strikt houden aan de juiste volgorde : eerst de lengte en dan de breedte van dezelfde spore. De waarnemingen worden meteen statistisch verwerkt en het resultaat samengevat in een formule, zoals die te zien is onderaan de tabel.

$$(9)10-10.65(10.7) \times 4.4-5(5.1)$$

De betekenis van deze formule is als volgt: de waarde 9 (tussen haakjes) is de kleinste gemeten waarde van de lengte en 10.7 de grootste, terwijl 80% van de gemeten waarden zich



Figuur 3. Een voorbeeld van het meten van sporen en de berekening volgens de klassieke formule.



Figuur 4. De berekening volgens de Statistische Formule.

in het interval 10–10.65 bevindt. Voor de breedte geldt hetzelfde. De auteurs noemen dat de Klassieke Formule, die volgens hen het meest gebruikt wordt in wetenschappelijke publicaties op het gebied van de mycologie. Verschillende mensen vertelden mij dat Kees Bas hen altijd leerde om 10 metingen van sporen te verrichten: de waarden tussen haakjes geven dan de kleinste en de grootste waarde en daartussen het 80% interval.

Door op die formule te klikken kan men ook een andere statistische bewerking kiezen: de bekende methode met een 95% betrouwbaarheidsinterval.

De uitkomst is dan: 9.6(10.2; 10.5)11 × 4.3(4.6; 4.8)5.1, waarbij 11 en 4.3 waarden aanduiden die weliswaar niet bij de gemeten waarden behoren, maar *statistisch gezien* nog wel net tot de mogelijkheden behoren.

De auteurs van Piximètre noemen dit de Statistische Formule. In beide formules wordt ook de Q waarde vermeld alsmede de gemiddelde waarden Me en Qe.

Door op de knop HDi te drukken komen de histogrammen te voorschijn van de meetwaarden. Zeker bij een gering aantal metingen geven de histogrammen vaak aan dat er geen sprake is van een normale verdeling, terwijl de 95%-methode wel daarop is gebaseerd.

Conclusie

Vooral voor mensen die microscoopfoto's maken met hun eigen (compact) camera is Piximètre een fijn programma om metingen in de foto's te kunnen uitvoeren. Die foto's moeten dan wel niet alleen dezelfde resolutie hebben als de ijkfoto, maar ook dezelfde zoomfactor. Meestal is zover mogelijk uitzoomen bij alle foto's de eenvoudigste optie, maar bij sommige camera's is die zoomfactor zo groot dat we maar een heel klein deel van het gezichtsveld in de microscoop kunnen zien. Als de zoomfactor afleesbaar is en ook steeds *exact dezelfde vergroting* van het beeld geeft, is dat dus gemakkelijk op te lossen. Zo niet, dan is misschien een oculair met een kleinere vergroting een oplossing. (Voor dat doel heb ik nog enkele foto-ocularen P 5× beschikbaar).

Het zou te ver voeren om de talloze mogelijkheden van Piximètre te beschrijven. Die worden uitvoerig in de (Franstalige) handleiding behandeld. Het doel van dit artikel is om een korte samenvatting beschikbaar te maken waarmee metingen van sporen in een foto kunnen worden gerealiseerd.