



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STUDIUM VLASTNOSTÍ BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU POMOCÍ METOD OBRAZOVÉ ANALÝZY

STUDY OF BIOLOGICAL MATERIAL ATTRIBUTES BY USING IMAGE ANALYSIS METHODS

DOKTORSKÁ PRÁCE
DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. PETRA JEŘÁBKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. Ing. OLDŘICH ZMEŠKAL, CSc.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	FCH-DIZ0022/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Ing. Petra Jeřábková	
Studijní program:	Fyzikální chemie (P1404)	
Studijní obor:	Fyzikální chemie (1404V001)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Oldřich Zmeškal, CSc.	
Konzultanti:		

Název dizertační práce:

Studium vlastností biologického materiálu pomocí metod obrazové analýzy

Zadání dizertační práce:

Cílem práce je využít metody obrazové analýzy

- ke studiu kinetiky růstu a dělení buněk kvasinek,
- ke studiu životaschopnosti buněk kvasinek v agresivním prostředí

Termín odevzdání dizertační práce: 31.8.2010

Dizertační práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu dizertační práce. Toto zadání je přílohou dizertační práce.

Ing. Petra Jeřábková
Student(ka)

prof. Ing. Oldřich Zmeškal, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2003

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V rámci disertační práce „*Studium vlastností biologického materiálu pomocí metod obrazové analýzy*“ je pozornost zaměřena na sledování uplatnění metod obrazové analýzy, převážně fraktální analýzy, při studiu vlastností různých druhů kvasinek. Součástí práce je stanovení počtu buněk kvasinek a sledování růstu i vegetativního rozmnožování kvasinek pomocí fraktálních parametrů – fraktální míry K a fraktální dimenze D . Pozornost je také zaměřena nejen na využití stávajících metod obrazové analýzy, ale také na jejich renovaci. K vyhodnocení získaných obrazů byla použita metoda box counting, která byla zpřesněna implementací vlnkové transformace.

K delšímu pozorování buněk kvasinek bylo nejprve nutné připravit vhodný mikroskopický preparát. K odlišení živých a mrtvých buněk kvasinek byla použita fluorescenční barviva akridinová oranž, fluorescein diacetát, FUN-1 a Calcofluor White M2R. Obrazy kvasinek byly zaznamenány pomocí fotoaparátu nebo CCD kamery a mikroskopu. Z pořízených digitálních fotografií byly získány stejně velké výřezy a zpracovány programem HarFA, který je vyvíjen na Fakultě chemické, VUT Brno. Z výsledků lze sledovat změnu fraktální dimenze v závislosti na čase, tj. na změně struktury pučící buňky nebo stanovit počet a poloměr buněk kvasinek za předpokladu předem definovaných podmínek.

ABSTRACT

Within the dissertation thesis “*Study of Biological Material Attributes by Using Image Analysis Methods*”, attention is focused on monitoring of the application of image analysis methods, mostly a fractal analysis, in studying the properties of various yeast species. The thesis includes determining the number of yeast cells and vegetative propagation of yeast using fractal parameters – fractal measure D and fractal dimension K . Attention is also paid not only to the application of the existing image analysis methods, but also to their renovation. The obtained images were evaluated using the box counting method specified by implementation of wavelet transformation.

To monitor yeast cells for a longer time, it was first necessary to prepare a suitable microscopic preparation. To distinguish live and dead cells, the following fluorescent dyes were used: acridine orange, fluorescein diacetate, FUN-1, and Calcofluor White M2R. The images of yeast cells were recorded using a still camera or a CCD camera and microscope. Clips of the same size were obtained from the acquired digital photographs and processed by the HarFA program developed at the Faculty of Chemistry, Brno University of Technology. On the results it is possible to see a change in the fractal dimension depending on time, i.e. on the change of a budding cell structure, or to determine the number and radius of yeast cells upon predefined conditions.

KLÍČOVÁ SLOVA

Rozmnožování kvasinek, fluorescence kvasinek, buňky kvasinek, obrazová analýza, vlnková transformace

KEYWORDS

Yeast propagation, yeast fluorescence, yeast cells, image analysis, wavelet transformation

JEŘÁBKOVÁ, P. *Studium vlastností biologického materiálu pomocí metod obrazové analýzy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 140 s. Vedoucí disertační práce prof. Ing. Oldřich Zmeškal, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Disertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího disertační práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu své disertační práce prof. Ing. Oldřichu Zmeškalovi, CSc. za jeho odborné konzultace a cenné připomínky při zpracování experimentálních dat a paní RNDr. Márii Veselé, Ph.D. za vstřícnou spolupráci při praktické části práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Kvasinky	8
2.1.1	Růst a rozmnožování kvasinek	10
2.1.2	Měření rozměrů buněk	16
2.1.3	Stanovení počtu buněk	16
2.2	Světelná mikroskopie	19
2.2.1	Fázově kontrastní mikroskopie	19
2.2.2	Fluorescenční mikroskopie	20
2.3	Fluorescenční barviva	23
2.3.1	Fluorescenční barviva pro testování vitality buněk	24
2.4	Obrazová analýza	29
2.4.1	Obraz a jeho reprezentace	30
2.4.2	Reprezentace barev v počítači	31
2.5	Obrazová analýza s využitím integrálních transformací	41
2.5.1	Periodické transformace	42
2.5.2	Vlnkové transformace	43
2.5.3	Spojité vlnkové transformace	46
2.5.4	Diskrétní vlnkové transformace	47
2.5.5	Realizace vlnkových transformací bankami filtrů	49
2.5.6	Haarova transformace	51
2.5.7	Vícerozměrné signály	54
2.6	Fraktální analýza	56
2.6.1	Fraktální analýza s využitím vlnkové transformace	60
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	66
3.1	Použité druhy kvasinek	67
3.2	Stanovení počtu a poloměru buněk kvasinek	70
3.2.1	Měřicí aparatura	70
3.2.2	Příprava preparátu a popis experimentu	72
3.2.3	Metoda maximální hodnoty počtu ve výsledcích	74
3.2.4	Metoda prahové distribuce ve výsledcích	76
3.2.5	Závěr	90
3.3	Sledování rozmnožování kvasinek	91
3.3.1	Měřicí aparatura	91
3.3.2	Příprava preparátu a popis experimentu	93
3.3.3	Výsledky a diskuze	98

3.3.4	Závěr.....	113
4	LITERATURA	115
5	PŘÍLOHY	120
5.1	Příloha 1: Stanovení počtu buněk kvasinek – grafy	120
5.2	Příloha 2: Sledování rozmnožování kvasinek – grafy	128
6	PŘEHLED PUBLIKACÍ A AKTIVIT.....	139
7	ŽIVOTOPIS.....	140

1 ÚVOD

Počítačová analýza obrazu je moderní analytická metoda, která nachází v posledních letech široké uplatnění v mnoha oblastech lidské činnosti. Mezi hlavní přednosti počítačové analýzy obrazu patří rychlost, kvalita, objektivita, spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků a je téměř jisté, že analýza obrazů bude získávat stále širší uplatnění v praxi. Již dnes je nepostradatelnou metodou v mnoha odvětvích od vesmírného výzkumu přes aplikace v medicíně, chemickém průmyslu, kriminalistice až po uplatnění v potravinářských vědách. Jako příklady použití lze uvést například kvalitativní a kvantitativní analýzu DNA, počítání mikrobiologických kolonií, analýzu chromatinu v rakovinných buňkách, analýzu otisku prstu, kontrolu bankovek, detekce, sledování a rozpoznávání pohybujících se objektů, předpověď počasí atd. Obrazová analýza umožňuje získat výsledky jiným způsobem nedostupné.

Světelná a fluorescenční mikroskopie jsou nepostradatelné metody při zkoumání živých mikroskopických struktur. Fluorescenční mikroskopie nabízí navíc vynikající kontrast zobrazení a s tím souvisí také vysoká citlivost, která je jinými metodami optické mikroskopie nepřekonatelná. S rozvojem mikroskopie rostla potřeba pozorované obrazy zaznamenat například pomocí zařízení určených k digitalizaci (CCD kamery, digitální fotoaparáty), převést do počítače, archivovat, zpracovat a analyzovat pomocí specializovaných programů. Spojení mikroskopie s obrazovou analýzou umožňuje získat informace o zkoumaném obraze například identifikaci a počítání objektů v zorném poli (buněk, bakterií), měření jejich velikosti či zařazování do vybraných tříd podle předem definovaných podmínek, hodnocení intenzity barevné reakce nebo fluorescenčního signálu při kvantitativním hodnocení průběhu metabolických reakcí nebo pozorování kontinuálních procesů jako je rozmnožování mikroorganismů.

Z hlediska potřeb obrazové analýzy je třeba co nejvěrněji zaznamenat obraz v co nejvyšší kvalitě, protože chybně zaznamenaný obraz lze již velmi obtížně analyzovat. Velkou pozornost je třeba věnovat nastavení parametrů optické soustavy (optické filtry, jas, kontrast), parametrům záznamového prvku (plošné rozlišovací schopnosti, rychlosti záznamu a formátu ukládaných dat). Pro obrazovou analýzu je nejvhodnější ukládat data v komprimované podobě s bezztrátovou kompresí (TIFF, AVI) a pro menší objemy dat v nekomprimované podobě (BMP).

Mezi metody obrazové analýzy patří také fraktální analýza, kterou lze nejběžněji realizovat metodou box counting (metodou počítání čtverců). Výpočty fraktálních parametrů lze optimalizovat využitím periodických a vlnkových transformací. Studium fraktálních objektů je poměrně mladou disciplínou, jejíž rozvoj s množstvím aplikací nastal teprve před dvaceti lety. Bohatá aplikace v nejrůznějších oblastech je svědectvím potřeby popisovat vlastnosti okolního světa věrněji a přirozeněji, než pomocí euklidovské geometrie.

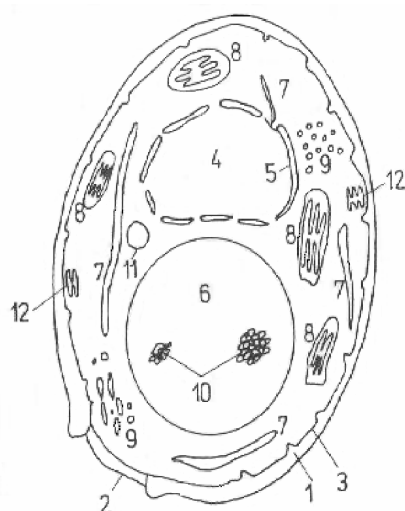
Postupy obrazové analýzy v dnešní době nabízí řada programů, od nejjednodušších, které umožňují úpravu obrázku a jejich barvení (Adobe Photoshop), až po velmi složité (Lucia Net), které umožňují řadu měření nebo jsou speciálně upravené pro získání určitých informací z obrázku.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou *heterotrofní eukaryotní mikroorganismy*, náležící mezi houby (*Fungi*). Český název dostaly pro schopnost většiny druhů zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy, případně i trisacharidy na ethanol a oxid uhličitý [1]. Velice lehce a ekonomicky se pěstují, poskytují tak bohatou biomasu a tím jsou vhodné pro celou řadu výzkumných oborů. Velikost většiny buněk kvasinek se pohybuje v rozmezí 3–15 μm [2]. Soustavu kvasinek (disperzní podíl) v živném roztoku (disperzní prostředí) lze zařadit mezi heterogenní, polydisperzní hrubé disperze a podle tvaru částic mezi globulárně disperzní systémy. Tato soustava je vhodná pro zkoumání pomocí metod obrazové analýzy ve spojení s optickou mikroskopií.

Vegetativní kvasinková buňka se skládá ze silné a pevné buněčné stěny, jemné cytoplazmatické membrány, jež obsahuje řadu membránových struktur a jádra, které je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou (obr. 1). Více lze nalézt např. v [3–6].



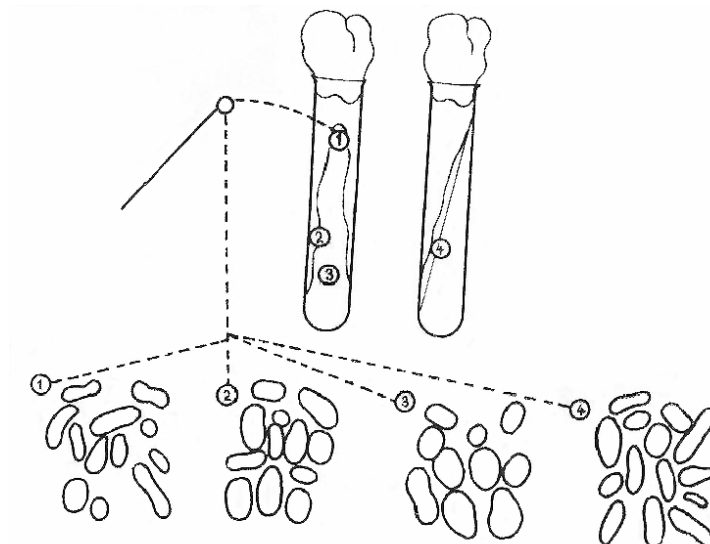
Obr. 1 Schéma průřezu buňkou kvasinek [1]

- 1 – buněčná stěna
- 2 – jizva zrodu
- 3 – cytoplazmatická membrána
- 4 – jádro
- 5 – jaderná membrána
- 6 – vakuola
- 7 – endoplazmatické retikulum
- 8 – mitochondrie
- 9 – glykogen
- 10 – polymetafosfát (volutin)
- 11 – lipidy
- 12 – Golgiho aparát

Za základní tvar buněk se považuje rotační elipsoid (obr. 2). Některé kvasinky tvoří buňky kulové (rod *Rhodotorula*), válcové (rod *Schizosaccharomyces*) nebo trojúhelníkové (rod *Trigonopsis*). Přeměna tvarů buněk nastává pod vlivem vnějších podmínek (složení živného média) a úzce souvisí s vlastní funkcí buňky. Odchytky ve tvarech jsou dvojího druhu: změna na kulaté tvary a změna na polodlouhé až vláknité tvary [4]. Pokud má kultura dostatečný styk se vzduchem, ale nedostatečnou výživu, začnou se její buňky prodlužovat a omezí se jejich rozmnožování. Avšak i při stejných podmínkách kultivace existuje určitá variabilita tvaru a velikosti buněk v rámci druhů a ještě větší v rámci rodů. Tvar buňky také do značné míry souvisí se způsobem jejího vegetativního rozmnožování.



Obr. 2 Různé tvary buněk kvasinek: a – kulaté, b – oválné, elipsoidní, c – citronovité, d – ogivální, e – lahvovité, f – podlouhlé, g – vláknité [7]



Obr. 3 Tvar a tvarová rozmanitost vzorků odebraných z různých míst nátěru [4]

Buňka přenesená do nového živného média si musí nejprve zvyknout na nové podmínky a musí načerpat látky, aby si udělala zásobu energie pro své budoucí rozmnožování. Odehrávají se v ní složité biochemické pochody, které se nijak navenek zjevně neprojevují. Přitom buňka zvětšuje svoje rozměry, a to nejprve délku. Na konci tohoto stádia vývoje bývá nejprodlouženější. Když nastane bujné pučení, buňky nestačí dorůst ani do původní velikosti a oddělují se od mateřské buňky ještě dříve, než dozrály. Přitom se většinou zmenšují a zakulacují. Rozmnožování kvasinek v kapalném živném prostředí se nejprve projeví *zákalem*. Při bouřlivém rozmnožování je vidět zákal nejlépe, protože buňky bývají menší a lehčí. Když bouřlivé rozmnožování začne ustávat, buňky dozrávají a vyrovnávají se tvarem a velikostí původním buňkám a stávají se těžšími.

Stárnutím se buňky začínají shlukovat a společně tak zvyšují několikanásobně svou hmotnost. Čím je shluk buněk těžší, tím rychleji klesá ke dnu nádoby a současně strhává sebou koloidní částice živné tekutiny (kaly). Tekutina se vyčiřuje a na dně nádoby vzniká usazenina (sediment). Buňky, které klesají ke dnu první, strhávají sebou nejvíce kalů. Kaly usazené na povrchu buněk jim znemožňují přijímat látky z prostředí, tedy výživu, a proto většina těchto buněk odumírá a získává hnědé až tmavohnědé zbarvení. Na této vrstvě se usadí další vrstva živých a zdravých buněk, které se mohou dále rozmnožovat. Nakonec se usazují hrubé disperze ze živných půd. Tekutina, ve které kvasinky žily, intenzivně se rozmnožovaly a nakonec se usadily na dno, má světlejší barvu než původní tekutina [8].

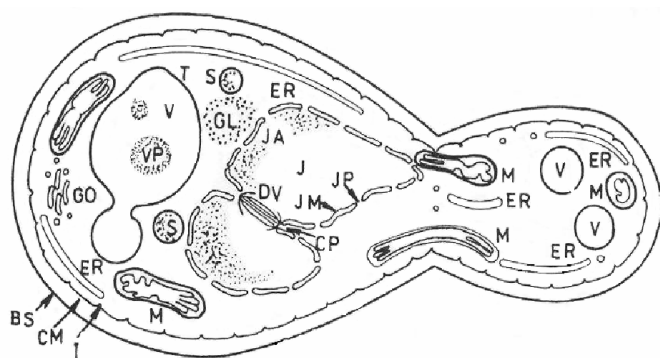
2.1.1 Růst a rozmnožování kvasinek

Růstem buněk kvasinek se rozumí zvětšování obsahu buňky (objemu, velikosti); růstem kultury se rozumí zvětšování počtu buněk, tedy celkové zvětšování živé hmoty kvasinek (biomasy).

Rozmnožování kvasinek se dá lehce ovlivnit. Podmínky, které usměrňují kvašení a růst k největší výtěžnosti se nazývají optimální podmínky, např. optimální teplota, optimální množství inokula, optimální koncentrace sacharidu, optimální složení živného prostředí, optimální pH apod. Jsou však i takové podmínky, které mohou mimořádně zvýšit výtěžek nebo urychlit růst a rozmnožování a nazývají se dráždivé, stimulační [1].

Pro většinu kvasinek je charakteristické vegetativní rozmnožování. Vegetativně se mohou kvasinky rozmnožovat *příčným dělením* nebo *pučením*. U většiny rodů kvasinek však převládá pučení.

Před počátkem pučení dochází ke splývání membrán endoplazmatického retikula (ER) a k jeho následnému dělení. Dále se opakovaně dělí vakuoly a mitochondrie se protahují (obr. 4). Při pučení je vznikající malá dceřiná buňka (pupen) spojena úzkým kanálkem s mateřskou buňkou. V místě tvoření pupenu se začínají hromadit sekreční měchýřky, které jsou zodpovědné za transport látek pro syntézu buněčné stěny. Po počátku tvorby pupenu do něho vstupují drobné vakuoly a mitochondrie. Současně začne mitotické dělení jádra a jeho migrace k pupenu [1]. S jádrem přecházejí do pupenu také další složky cytoplazmy (ER, drobné vakuoly a mitochondrie) a spolu s nimi i samotná cytoplazma. Cytoplazmatickou membránou (plazmalemou) se poté uzavře kanálek a v pupenu se intenzivně syntetizuje ER. Drobné vakuoly se spojí v jednu větší vakuolu. Po vytvoření buněčné stěny a vzrůstu pupenu je pučení ukončeno. Většinou se nově vytvořená buňka od mateřské oddělí. Celý cyklus dělení trvá kolem dvou hodin, a to za optimálních růstových podmínek, v závislosti na druhu kvasinky.



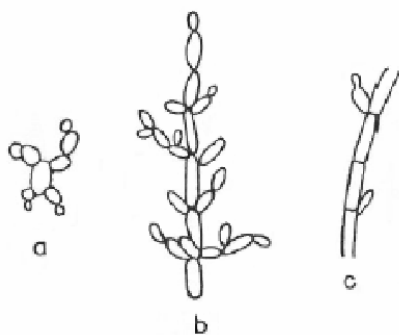
Obr. 4 Schématické znázornění struktury pučící buňky:

J – jádro, JP – jaderný pór, JM – jaderná membrána, DV – vřeténko, CP – plaky, ER – Endoplazmatické retikulum, V – vakuola, VP – pinocytóza, T – tonoplast, GO – Golgiho aparát, M – mitochondrie, BS – buněčná stěna, GL – globuly, CM – plazmalema, I – invaginace [4]

Podle místa, kde pupen na povrchu buňky vzniká, se rozlišuje pučení *monopolární*, *bipolární* a *multipolární*. Při monopolárním pučení pupen vzniká na jednom, vždy stejném pólu protáhlé buňky. Bipolárně pučící kvasinky vytvářejí pupen střídavě na obou pólech buňky. U multipolárně pučících kvasinek (rod *Saccharomyces*) může pupen vznikat na kterémkoliv místě buňky, nevytváří se však nikdy na tomtéž místě. Některé buňky mohou vytvářet jenom jeden pupen (rod *Saccharomyces*), jiné i několik pupenů najednou (pučení *multilaterální*). Pokud nedojde při pučení po vytvoření přepážky mezi mateřskou buňkou a pupenem k úplnému oddělení dceřiné buňky, zůstávají obě buňky spojeny, dále pučí, čímž vznikají různě rozvětvené *svazky buněk* (obr. 5a). Některé rody nebo kmeny kvasinek

vytvářejí protáhlé buňky, které pučí pouze na pólech a zůstávají na pólech spojeny v dlouhá zaškrcovaná vlákna – tzv. *pseudomycelium* (obr. 5b). Pseudomycelium se dělí na chumáčovité, přeslenovité a nepravidelně větvené pseudomycelium. Na koncích řetízků pseudomycelia vznikají svazky kratších elipsoidních buněk – *blastospor*, které se mohou oddělovat a dále se množit pučením. Koncová buňka pseudomycelia je menší než ostatní buňky (jde o rostoucí pupen), kdežto táž buňka v myceliu je největší (jde o rostoucí buňku před dělením). Mezi koncovými buňkami mycelia bývají dosud neuzavřené přepážky s póry, kdežto buňky pseudomycelia mají buněčné přepážky kompletní. Pseudomycelium může být tvořeno pouze několika spojenými buňkami, nebo dobře vyvinuté vytvářející větvenou strukturu. Tvorba pseudomycelia bývá obvykle indukována za podmínek nedostatku živin. Kvasinka tvoří bohatší pseudomycelium tam, kde se stýká se vzduchem, tedy na povrchu agarů, nebo kapaliny. Pseudomycelium, které se tvoří v aerobních podmínkách, má úplně jiný vzhled, než to které trpí nedostatkem kyslíku a tím nedostatečnou oxidační přeměnou látek. V kapalném prostředí pučí pseudomycelium na obou dvou koncích a nejmladší buňka bývá kulatá. Na šikmém agaru se pseudomycelium šíří jen jedním směrem, aby se dostalo co nejdál od vyčerpaného prostředí. Nejmladší buňka je na konci a často má dlouhý protáhlý tvar. Bylo by nesprávné domnívat se, že vliv prostředí je jediný faktor regulující tvorbu pseudomycelia. Schopnost tvořit pseudomycelium a jeho určité formy jsou geneticky kontrolované vlastnosti. Je známo, že polyploidní kultury (*S. carlsbergensis*) netvoří pseudomycelia v žádných podmínkách. Kultura, která se stala po čase diploidní, měla schopnost vytvářet pseudomycelium.

U některých rodů nebo kmenů kvasinek se vytváří tzv. *pravé mycelium* (obr. 5c), tj. vlákno vznikající příčným dělením protáhlých buněk. Při dělení se zde tvoří z cytoplazmatické membrány prstencovitá vychlípenina, která prorůstá směrem do středu buňky, až dojde k rozdělení cytoplazmy a oddělení dvou jader. Na pravém myceliu vznikají podobné svazky blastospor jako na pseudomyceliu [1, 4–6, 8].



Obr. 5 Růst kvasinek: a – ve svazcích buněk, b – v pseudomyceliu, c – v pravém myceliu [1]

Přechodným typem vegetativního rozmnožování mezi pučením a příčným dělením je *pučení na široké základně*. V tomto případě je pupen s mateřskou buňkou spojen širokým krčkem, který je před skončením pučení uzavřen přepážkou [6].

Zřídka se u kvasinek pozoruje příčné dělení. Mateřská buňka se nejprve prodlouží růstem na nejoblejších částech těla (pólech) a po dosažení dvojnásobné délky se vytvoří přepážka a dá tak vznik dvěma identickým buňkám. Růst je uskutečňován obvykle na pólu proti zárodečné jizvě. Buňka se dvěma jizvami na pólech narůstá tak, že k původnímu stěnovému

prstenci přirůstá na jednom nebo na obou pólech „nová“ stěna. Nově vytvořená stěna se vždy syntetizuje z jizevního klínu. Jizvy, které vznikají po dělení kvasinek, jsou trvalými strukturami na buněčné stěně [4, 6]. Vzhledem k tomu, že se jizvy překrývají, není možné na základě počtu jizev stanovit počet dělení.

Vedle vegetativního rozmnožování bylo u kvasinek na rozdíl od bakterií pozorováno i pravé pohlavní rozmnožování, tj. splynutí dvou buněk za vzniku zygoty, z níž vznikají nové buňky. Toho se využívá při křížení kvasinek, s cílem získat nové kmeny s průmyslově vhodnými vlastnostmi [9].

Buněčný cyklus kvasinek je charakteristický všemi fázemi buněčného cyklu eukaryotní buňky. V průběhu pučení si mateřská buňka zachovává původní velikost, zatímco dceřiná buňka (pupen) se v průběhu cyklu zvětšuje. Jednotlivé fáze buněčného cyklu jsou doprovázeny významnými morfologickými změnami, které je možno sledovat i ve světelném mikroskopu (cytokinéza). Cyklus u druhu *Saccharomyces cerevisiae* začíná tvorbou *satelitního polárního tělíska* (jaderný plak) vřeténka (stádium b, obr. 6A), pak následuje vznik malého pupenu (stádium c, obr. 6A), separace obou polárních tělísek, takže tvoří protilehlé póly jádra a s mikrotubuly vytvoří *vřeténko* (stádium d, obr. 6A). Současně probíhá syntéza DNA chromozómů, z nichž každý se zdvojuje ve dvě chromatidy spojené centromerou. Po skončení syntézy DNA začíná migrace jádra a jeho mitotické dělení (stádium e a f, obr. 6A): vřeténko se protáhne, chromozómy se rozdělí podél centromery a mikrotubuly vřeténka táhnou sesterské chromatidy k opačným pólům vřeténka. Pak se vřeténko přetrhne a polární tělíska dají vznik dvěma samostatným jádrům, z nichž každé má jedno polární tělísko s mikrotubuly a stejný počet chromozómů jako mělo původní jádro. Přechod protáhlého jádra s protáhlým vřeténkem ve dvě kulovitá jádra je výsledkem elasticity obalové jaderné membrány. Mezi tím již pupen doroste téměř do velikosti mateřské buňky (stádium g, obr. 6A) a následuje oddělení obou buněk. Během cytokinézy se buňky oddělují plazmatickou membránou a primárním a sekundárním septem. Tím se celý cyklus uzavře. Časově cytokinézy přechází až do G1-fáze následujícího buněčného dělení. Z hlediska obsahu genetického materiálu v jádře můžeme celý cyklus buněčného dělení kvasinek rozdělit do **čtyř period**:

1. **G1-fáze**, kdy je v haploidní buňce každý gen jenom jednou, chromozóm je tvořen jednotkovou chromatidou.

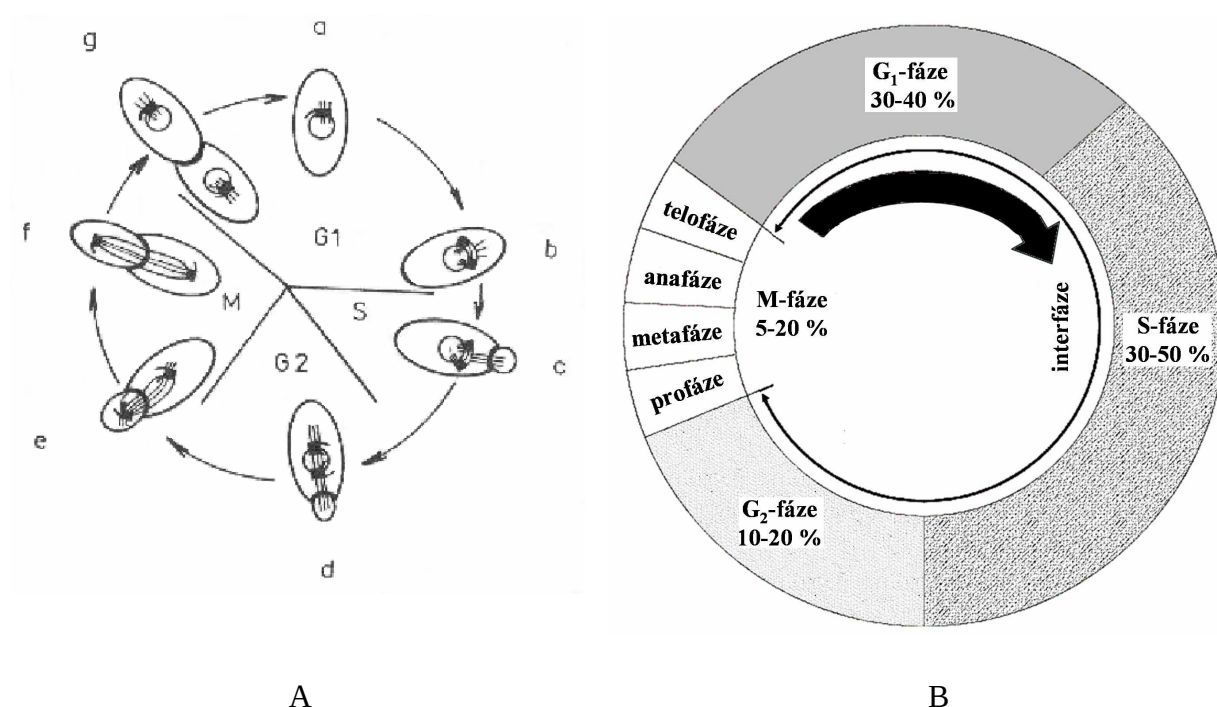
2. **S-fáze**, tj. fáze syntézy chromozomální DNA a vytvoření dvou chromatid z jednoho chromozómu. Princip replikace při zdvojení DNA chromozómů je v tom, že se dvojšroubovice DNA rozpojí a v místech, kde se uvolnily vazby mezi bázemi, připojují se komplementární báze tak, že vzniká opět kompletní dvoušroubovice (dvě sesterské chromatidy). Sesterské chromatidy jsou spojeny centromerou obsahující DNA, která se replikuje až později. S-fáze spadá do doby, kdy se vytváří pupen.

3. **G2-fáze**, kdy je již replikace chromozomální DNA ukončena.

4. **M-fáze**, kdy probíhá mitóza. Při mitóze se neporušuje integrita jaderné membrány. Časová hranice mezi fázemi G2 a M je určována prvními morfologickými znaky dělení jádra (jádro se protahuje), strukturálními změnami chromozómů (jejich kondenzací) a chováním dělicího aparátu [1, 10, 11].

V podmínkách vyváženého růstu jsou G1-, S-, G2- a M-fáze buněčného cyklu přibližně stejně velké. Mezi dokončením jaderného dělení a rozdělením buňky (tj. tvorbou septa mezi mateřskou a dceřinou buňkou) je interval dlouhý asi 1/4 cyklu. Značné posuny S-fáze v průběhu cyklu *Saccharomyces cerevisiae* nastává při změnách trvání G1-fáze.

Při změnách růstové rychlosti zůstává sice trvání S-fáze konstantní (20 minut), délka G1-fáze se však může měnit v rozmezí od 40 min do 6,5 h a délka G2-fáze od 20 min do 45 min [11].



Obr. 6 A) Schéma cyklu buněčného dělení u *Saccharomyces cerevisiae*: S – syntéza DNA, M – mitóza, G1 – v buňce je základní genetický materiál, tj. jeden genom (soubor genů na chromozómech buněčného jádra), G2 – buňka obsahuje zdvojený genom, a – klidová buňka, b – zdvojení polárního tělíska, c – syntéza DNA, vznik malého pupenu, d – separace polárních tělísek a vznik vřeténka, e, f – migrace jádra do pupenu a dělení jádra (mitóza), g – vznik dvou samostatných jader, oddělení obou buněk (vznik dvou buněk schopné samostatné existence, i když spolu zůstanou spojeny) [1], B) Klasické schéma buněčného cyklu eukaryotní buňky

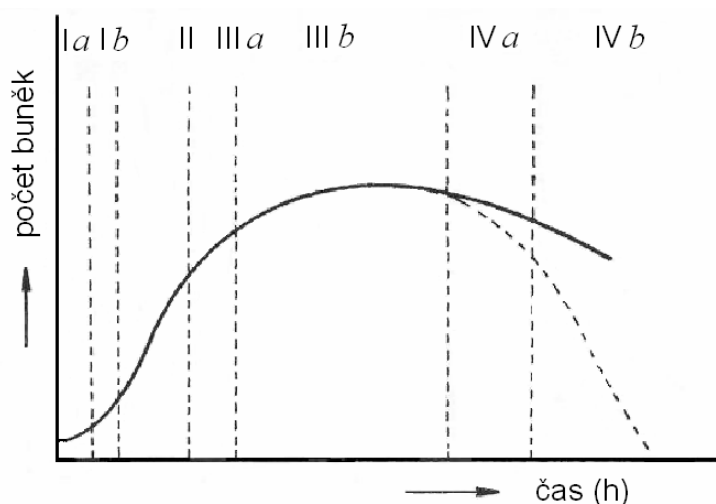
Celý cyklus buněčného dělení je u *S. cerevisiae* pod kontrolou zhruba sedmdesáti genů, z nichž některé mají regulační funkci. Tyto geny jsou označovány CDC (z angl. cell division cycle) a jejich produkty tepelně senzitivní mutanty umožnily studium kontroly tohoto cyklu a jeho regulace. Z hlediska regulace buněčného cyklu je důležitý tzv. *start*, který se nachází v druhé polovině G1-fáze. V tomto bodě se rozhoduje, zda buňka nastoupí buněčné dělení. K zahájení dalšího pučení a replikace DNA je nutné, aby buňka měla určitou velikost po průchodu tzv. *startem*. Většinou je dceřiná buňka menší než buňka mateřská, dělení je proto označováno jako nerovnocenné. To způsobuje, že další buněčný cyklus dceřiné buňky je delší než buněčný cyklus mateřské buňky, neboť dceřiná buňka musí nejprve dorůst do velikosti mateřské buňky a má proto obvykle delší G1-fázi. Dojde-li k nastoupení buněčného dělení, pak při vhodné teplotě doběhne celý cyklus až do konce. Při nedostatku dusíkatých a uhlíkatých živin začíná u diploidních buněk v tomto bodě funkce genů ovládajících meiózu a sporulaci (proces vedoucí ke tvorbě spory). Tento bod je také výchozím bodem pro konjugaci dvou haploidních buněk opačného párovacího typu [10].

Morfologické projevy cyklu u *Saccharomyces* byly efektivně využity jako diagnostické znaky, které lze sledovat i optickým mikroskopem [1, 9, 11, 12].

Mikroorganismy se za optimálních podmínek rozmnožují obrovskou rychlostí. Maximální dosažitelná koncentrace živých buněk v 1 ml růstového prostředí je u bakterií řádu 10^9 , u kvasinek 10^8 [1].

Růst a rozmnožování mikroorganismů se měří běžně v laboratorních podmínkách ve statických kulturách tj. v uzavřeném systému, kde koncentrace jednotlivých složek se mění s časem. Postupným vyčerpáváním živin a hromaděním zplodin metabolismu, které inhibují rozmnožování, se postupně růst zpomaluje, až se úplně zastaví. Rychlost pučení se posuzuje podle množství buněk nebo podle hmotnosti biomasy ve vzorcích se standardním objemem kultivačního prostředí odebraných v pravidelných časových intervalech. Výtěžek kvasinek se může určovat i podle množství nějaké látky, např. podle celkového obsahu dusíku, fosforu, podle množství bílkoviny apod. Výtěžek lze zjišťovat i nepřímo, např. podle viskozity, zvýšením absorpce světelného záření apod. [6, 8].

Grafickým vyjádřením průběhu růstu kultury mikroorganismů začínajíc od zaočkování je *růstová křivka* (obr. 7). Získává se vynesením logaritmu celkového počtu buněk (nebo počtu živých buněk) v jednotce objemu (tedy koncentrace buněk) na osu y a na osu x čas v hodinách. Výhoda semilogaritmického výnosu spočívá v tom, že fáze exponenciálního růstu je vyjádřena přímkou, jejíž směrnice odpovídá rychlosti dělení buněk. Protože všechny buňky nepučí najednou ani stejně intenzívně, není kultura synchronizovaná, ale je asynchronní.



Obr. 7 Růstová křivka [4]

I a – lag-fáze; I b – fáze začínajícího růstu; II – logaritmická fáze; III a – fáze zpomaleného růstu; III b – stacionární fáze; IV a – fáze zrychleného odumírání; IV b – odumírání

Růstová křivka je charakteristická určitými úseky, růstovými fázemi [1, 4, 6, 8, 13].

Lag-fáze (fáze zdržení růstu)

Zaočkované buňky se v této fázi nerozmnožují, ale přizpůsobují se novému živnému prostředí. Zvětšuje se jejich objem a aktivuje se jejich enzymový systém. Nejkratší je tehdy, bere-li se inokulum ze stejné půdy a pochází-li toto inokulum z *log-fáze*.

Fáze začínajícího růstu (zrychleného růstu; akcelerační)

Buňky načerpávají energii a připravují se na rozmnožování, zvětšují postupně svůj objem a zpravidla se prodlužují. Na konci této fáze buňky dosáhnou maximální velikost a množství buněk s malými pupeny je největší.

Logaritmická fáze (exponenciální fáze, log-fáze)

Charakteristická je nejbujnějším růstem, tedy buňky se rozmnožují maximální rychlostí. Přírůstky jsou přímo úměrné času. Procento pupenů, které dosáhlo maximum ve fázi zrychleného růstu a v první polovině logaritmické fáze, v druhé polovině logaritmické fáze se snižuje a na konci se už blíží nule. Po dobu exponenciální fáze jsou téměř všechny buňky živé.

Fáze zpomaleného růstu

Dochází k snižování intenzity metabolismu a množení buněk v důsledku vyčerpání živin a hromadění toxických konečných produktů, např. ethanolu při ethanolovém kvašení. V této fázi narůstá počet odumírajících buněk. Buňky zvětšují svoji velikost, aby se ve stacionární fázi vyrovnaly s původními buňkami. Stacionární fáze v počátečním stádiu je vhodná na posouzení rozměrů buněk a odchylek způsobenými nepříznivými podmínkami.

Stacionární fáze

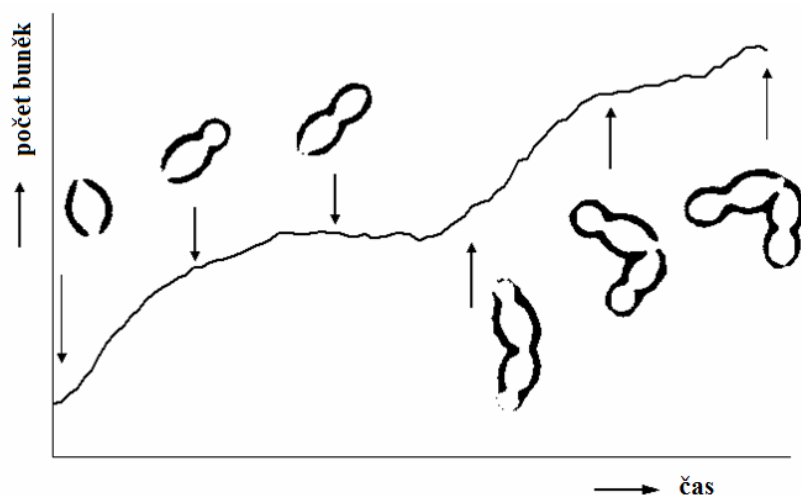
Dochází k vyrovnání počtu odumírajících buněk a jejich přírůstků. V této fázi je většina živin již vyčerpána a maximální délka této fáze je dána citlivostí buněk k hladovění. Ve stacionární fázi jsou také vytvářeny endospory.

Fáze zrychleného odumírání a logaritmická fáze odumírání

Vzrůst buněk se zpomaluje a zastavuje. Počet odumírajících buněk převyšuje počet nově vzniklých buněk, až nastává smrt a zánik kultury. V logaritmické fázi odumírání buňky odumírají přibližně konstantní rychlostí.

Fyziologické vlastnosti buněk různých fází růstové křivky jsou značně odlišné. Buňky pozdní *lag-fáze* a *růstových fází* jsou mnohem citlivější k nepříznivým podmínkám (tj. zvýšené teplotě, vysokému osmotickému tlaku a antimikrobiálním látkám) než buňky *stacionární fáze* a na počátku *lag-fáze*.

Při pozorování kontinuálních procesů jako je rozmnožování mikroorganismů lze využít také fraktální analýzu obrazu (obr. 8). Je možné sledovat změnu fraktální dimenze nebo míry v čase pro zvolenou buňku (viz kap. 3.3).



Obr. 8 Růstová křivka buňky *Kloeckera apiculata* získaná pomocí fraktální analýzy obrazů této buňky

2.1.2 Měření rozměrů buněk

Velikost buněk se zjišťuje přímým měřením délky a šířky okulárovým mikrometrem (destička, která má ve středu vyrytou stupnici). Protože se považují za rotační elipsoidy, třetí rozměr (výška) se neměří. Při produkčních, pivovarnických, nebo vinných kvasinkách stačí 100 měření. U ostatních kvasinek se provádí až 1000 měření. Při vyšším počtu měření kvasinek se zmenšuje střední chyba průměru [4]. Buňky se proměřují a zaznamenají se délky okulárového mikrometru, který je třeba pro dané zvětšení ocejchovat objektivovým mikrometrem. Když je zaznamenán dostatečný počet měření, délky se přepočítají na délkové rozměry a vypočítá se aritmetický průměr a jeho střední chyba. Jednotlivé stovky měření se mohou mezi sebou vyhodnocovat metodou t-testu, nebo se z naměřených hodnot sestaví diagram. V diagramu se na osu x vynáší množství měřených buněk a na osu y střední chyba. Až se křivka začne schylovat k ose x a je s ní přibližně paralelní, je počet měření dostačující, a rozměry buněk se již nebudou odchylovat od mezí použité pravděpodobnosti.

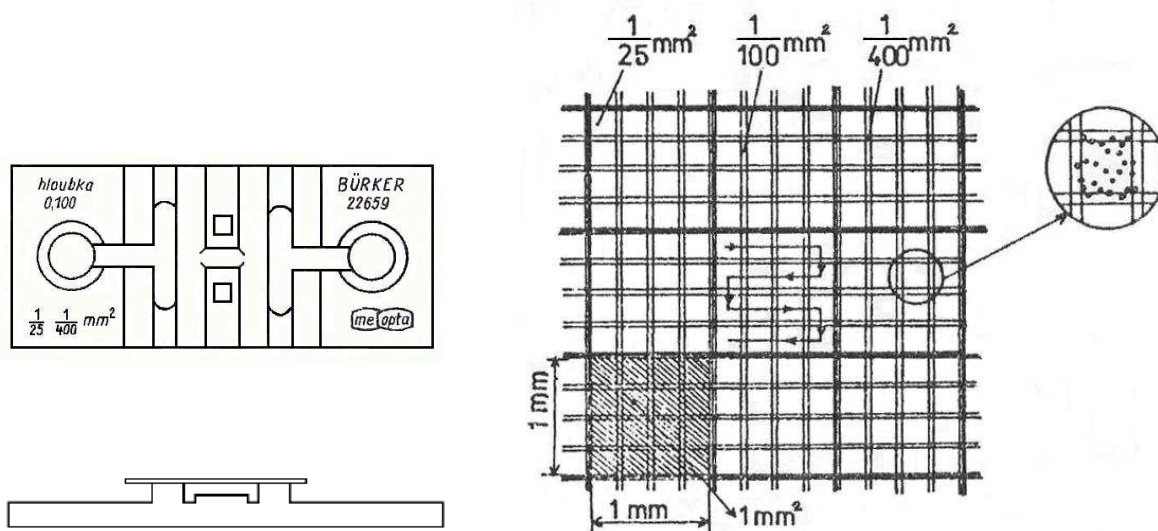
Měření buněk se může provádět i nepřímě tak, že se několik preparátů buněk vyfotografuje i se stupnicí objektivového mikrometru. Fotografie buněk a stupnice, které jsou stejně zvětšené, se zkopírují. Stupnice se potom použije i na měření ostatních buněk na fotografii, kde 1 dílek odpovídá $10\ \mu\text{m}$ [14].

Dále se velikost mikroobjektů dá zjistit pomocí digitální techniky. Získaná fotografie se zpracuje v některém z programů pro obrazovou analýzu a zjistí se, kolik mm má jeden pixel. Ze zvětšení měřicí aparatury lze poté jednoduše vypočítat, jakou velikost mají jednotlivé zkoumané buňky. Ke zjištění rozměrů buněk na digitální fotografii lze využít také fraktální analýzu (viz kap. 2.6.1).

2.1.3 Stanovení počtu buněk

V mikrobiologickém výzkumu se často setkáváme s nezbytností stanovit počet mikroorganismů ve vzorku. V základním výzkumu slouží stanovení počtu buněk k posouzení kinetiky růstu a ke stanovení specifické rychlosti růstu a množení v různých fázích jejich vývoje. V kontrolních laboratořích se využívá ke kontrole mikrobiálního znečištění surovin a výrobků či nás přesvědčuje o účinnosti sterilizace [7]. Důležitým faktorem při posuzování stavu mikrobiálních populací je také zastoupení živých a mrtvých jedinců, které lze rozlišit pomocí fluorescenčního barvení či pomocí speciálních barvicích postupů (methylenové modře aj.).

K *přímému* stanovení počtu buněk se běžně používá přímé mikroskopické počítání v počítacích komůrkách (Thomově, Bürkerově, Neubaerově). Stanovuje se celkový počet buněk v jednotce objemu. Bürkerova komůrka má tvar masivního podložního sklíčka, které je rozdělené dvěma rýhami na tři části (obr. 9). Ve střední části, která je nižší o $1/10\ \text{mm}$ než obě postranní části jsou vyryté dvě mřížky, po překrytí krycím sklíčkem tvoří komůrku o přesné hloubce. Krycí sklíčko se přichytává pomocí dvou pružin. Celá mřížka je rozdělena na 25 menších čtverečků, které jsou dále děleny na 16 čtverečků. Rozměry jednotlivých čtverečků jsou $1/25\ \text{mm}^2$, $1/100\ \text{mm}^2$ a $1/400\ \text{mm}^2$. Při hloubce komůrky $0,1\ \text{mm}$ je objem nad každým čtverečkem $1/250\ \text{mm}^3$, $1/1\ 000\ \text{mm}^3$ a $1/4\ 000\ \text{mm}^3$. Po obou stranách vybroušených políček jsou kanálky, kam odtéká přebytečná kapalina. Pučící buňky se počítají jako jedna buňka, nese-li dceřiná buňka další pupen, ale ještě se neoddělila od buňky mateřské, počítají se jako dvě buňky [7]. Buňky se počítají vždy ve více políčkách, obvykle v 80.



Obr. 9 Bürkerova komůrka a počítací síť komůrky; šipky naznačují směr počítání [7]

V současné době jsou k dispozici i speciální programy instalované např. na osobních počítačích, které jsou vhodné zvláště k počítání větších buněk (prvoci, řasy, kvasinky); méně vhodné jsou k počítání bakterií [13]. Ke zjišťování počtu buněk lze také využít fraktální analýzu obrazu (viz. kap. 2.6.1)

Nepřímo lze počet buněk mikroorganismů stanovit nejčastěji pomocí kultivace, kdy předpokládáme, že z jedné životaschopné buňky vyroste jedna kolonie. Jednotlivé kolonie vyrostlé na agarových plotnách spočítáme, násobíme ředěním suspenze (desítkové ředění) a přepočítáme na jeho naočkované množství, čímž dostaneme počet živých buněk obsažených v určitém známém objemu zkoumané suspenze.

Zaočkování inokula do agarového média je možné provádět dvěma způsoby. Inokulum očkujeme na předsušené agarové plotny a rozetřeme sterilní hokejkou nebo přelijeme známý objem vhodně zředěného inokula (nejčastěji 1 ml) vytemperovaným agarem na teplotu 45 °C.

Metodě roztěrem se dává přednost, protože umožňuje lepší rozptýlení buněk a lepší reprodukovatelnost výsledků než přelivem a nehrozí nebezpečí usmrcení buněk horkým agarem. Je vhodná pro kvasinky. Nevýhodou těchto metod je delší čas potřebný k získání výsledků (minimálně 24 hodin) a v případě směsí různých mikroorganismů skutečnost, že dostáváme většinou nižší počty. Jednou z příčin je, že nemůžeme zaručit vhodné kultivační podmínky všem přítomným mikroorganismům. Dalším důvodem je, že vyrostlé kolonie nemusí být z jedné buňky. Rovněž příprava materiálu pro tuto metodu je značně časově náročná (např. příprava půd, sterilizace) [7].

Kultivační stanovení počtu kvasinek pomocí membránových filtrů se používá při mikrobiologické analýze tekutin nízkého mikrobiálního znečištění (pitná voda). Při použití této metody je třeba zpracovat větší množství vzorku, aby se dosáhlo směrodatných výsledků. Princip metody spočívá ve filtraci vzorku sterilním membránovým filtrem, který zachytí mikroorganismy, a jeho přenesení na desku živné půdy.

Kultivační stanovení počtu kvasinek mikrobitemem (stripem). Bactostripy jsou proužky filtračního papíru napojené obecnou nebo selektivní živnou půdou s přísadkou indikátoru, který změnou barvy upozorní na narůstající kolonie. Velikost proužku je volena tak, aby nasál

definovaný objem zkoumané kapaliny. Bactostripy se kupují hotové, zabalené v igelitových obalech, ve kterých se opět po zaočkování inkubují. Jejich výhodou je úspora času, kultivačních pūd, nádobí i prostoru. Nevýhodou je menší přesnost stanovení, vysoká cena a omezená skladovatelnost. Metoda je vhodná pro orientační kontrolu v závodech [14].

Mezi nepřímé metody můžeme zařadit i metody *nefelometrické*. Nefelometrické stanovení počtu buněk je založeno na měření intenzity světla rozptýleného od jednotlivých buněk, které jsou suspendované v kapalině. Rozptyl světla závisí na vlnové délce, optických vlastnostech kapaliny, vlastnostech rozptýlených částic (jejich velikosti, tvaru). Intenzita procházejícího světla se zmenšuje v závislosti na koncentraci suspendovaných částic. Metoda je velmi rychlá a citlivá. Umožňuje zjištění počtu buněk počínaje koncentrací 10^5 bakterií/ml do koncentrace 10^7 bakterií/ml. Nejvhodnější je pro krátké tyčinky nebo koky, při delších tyčinkách nebo řetězcích může dojít k nepravdivosti. Metodu lze použít pouze v kombinaci s mikroskopickou nebo kultivační metodou stanovení počtu buněk v určitém koncentračním rozmezí suspendovaných částí. Touto metodou se zjišťuje celkový počet buněk na základě kalibrační křivky zhotovené např. pomocí přímého mikroskopického počítání buněk [15].

Kvantifikace počtu buněk je možná také pomocí metody *průtoková cytometrie*, která je rychlá a přesná. Průtoková cytometrie je mikrobiology stále oblíbenější a častěji využívaná metoda, jejímž jediným limitujícím faktorem pro praktické použití v biotechnologických výrobcích je její cena. Ve spojení s vhodným fluorescenčním barvením je schopna velice dobře popsat okamžitý stav populace stejně jako přesně zachytit jakékoli její změny. Tato metoda umožňuje simultánní měření a analýzu fyzikálně-chemických vlastností velkého množství buněk nebo jiných biologických částic během jejich průchodu laserovým paprskem. Ve chvíli, kdy buňka tento paprsek kříží dochází k lomu a rozptylu světla, který podle směru a úhlu lomu bývá označován jako přímý rozptyl – forward scatter (FSC; $2-13^\circ$) a boční rozptyl – side scatter (SSC; 90°). FSC je úměrný velikosti buňky SSC podává informaci o buněčné morfologii (struktura membránového povrchu a cytoplazmy buněk). Kromě parametrů lomu a rozptylu světla je detekována rovněž fluorescence procházejících buněk nebo částic. Důležitou vlastností cytometrické analýzy je skutečnost, že je prováděno měření každé částice nebo buňky a nejde jen o průměrné hodnoty měřené suspenze. Speciální aplikací průtokové cytometrie je buněčné třídění (cell sorting). Jedná se o kombinaci analytických postupů průtokové cytometrie se schopností třídít buňky na základě předem známých parametrů. Během procesu třídění jsou buňky emitující žádaný fluorescenční signál elektricky nabity ve vysokonapětovém elektrickém poli mezi speciálními tzv. vychylovacími destičkami a poté tříděny do sběrných zkumavek.

Další možností stanovení buněk je elektronicky. Toto stanovení je založeno na nasávání přesně definovaného objemu elektrolytu, v němž jsou buňky suspendovány, do elektricky nevodivé trubice velmi malým otvorem. Při průchodu buněk otvorem dochází ke změně vodivosti, kterou přístroj registruje jako impuls. Počet impulsů lze odečíst na displeji. Metoda je omezená na počítání buněk, které netvoří shluky nebo řetězky, protože i mnohobuněčný organizmus je přístrojem registrován jako jedna částice. U některých přístrojů lze zapojením diskriminátoru zjistit četnost jednotlivých velikostních skupin.

2.2 Světelná mikroskopie

Různé mikroskopické metody dosáhly obrovských možností při pozorování nejen biologických objektů. Pokud je potřeba pozorovat živé biologické objekty v jejich růstu, zániku, nebo při dlouhodobém pozorování je nejvhodnější světelná mikroskopie a její případné modifikace. Světelné mikroskopii je přibližně vyhrazena oblast od 10 μm do 0,2 μm . Využívá hlavně světlo o vlnové délce 400–700 nm.

2.2.1 Fázově kontrastní mikroskopie

Je nenahraditelnou metodou pro studium kvasinkové buňky, neboť umožňuje studium jader, vakuol, mitochondrií a buněčných inkluzí bez obarvení a navíc posuzování celkového stavu buněk v průběhu růstu a množení.

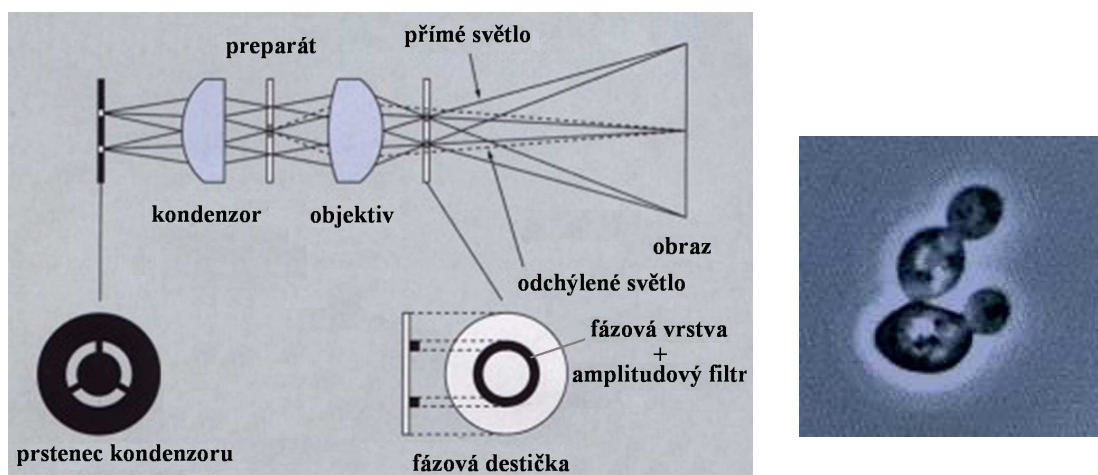
Jelikož nelze pozorovat přímo fázový kontrast, je nutné převést fázový kontrast na rozdíl v intenzitě světla nebo na rozdíl v barvě. Fázový kontrast odděluje ohýbající se paprsky procházející objektem, které při průchodu vzorkem mění nejen svou fázi, ale i směr šíření od *přímých* paprsků procházející okolním prostředím. Mezi oběma skupinami paprsků vzniká fázový posun. Při tvorbě obrazu v objektivu oba typy paprsků interferují, což podstatně zvýší kontrast pozorovaného objektu. Při fázovém kontrastu je do přední ohniskové roviny kondenzoru vložena apertura ve tvaru úzkého mezikruží. Ta je následnou optickou soustavou kondenzoru a objektivu zobrazena do jeho zadní roviny. V objektivu je vložena další apertura tj. skleněná podložka s nanesenou fázovou maskou rovněž ve tvaru mezikruží. Obě apertury (tj. v rovině kondenzoru a objektivu) se seřizují do zákrytu.

Při fázovém kontrastu se často používá kvazimonochromatického osvětlení žlutozelené barvy (na takové světlo je lidské oko nejcitlivější, cca 540 nm) a fázová destička měnící fázi *přímého* záření o čtvrtinu vlnové délky [16]. Intenzita přímého světla z pozadí je redukována pomocí neutrálního materiálu ve fázovém kroužku objektivu. Tím se zvyšuje kontrastní efekt a lze pozorovat i ty nejméně odlišné detaily preparátů. Fázové objekty pak vidíme jako tmavé na světlém pozadí, tím tmavší, čím je objekt silnější (pozitivní fázový kontrast). To umožňuje rozlišování buněčných struktur s malým indexem lomu. Fázovou masku je však možno zhotovit i tak, že pozorované fázové objekty se jeví jako světlé na tmavším pozadí (negativní fázový kontrast pozadí; má podobný účinek jako pozorování v temném poli.). Pokud osvětlíme vzorek bílým světlem, bude jeho obraz zbarvený, neboť fázové poměry mezi interferujícím difraktovaným a nedifraktovaným zářením závisí ze zřejmých důvodů na vlnové délce. Běžně konstruovaný fázový mikroskop umožňuje rozeznat fázové rozdíly menší než 10^{-2} . Rozlišovací schopnost se blíží hodnotě 0,1 μm .

Závažným nedostatkem fázového kontrastu je existence *halo efektu*, což je jasně zářící rozhraní mezi objektem a okolním prostředím, které vzniká v důsledku lomu světla na stěnách mikroskopických objektů, zejména když jsou z materiálu o vysokém indexu lomu např. kvasinky ve vodném prostředí (obr. 10). Ztrácí se tak hranice objektů. V klasickém fázovém kontrastu vzniká halace tam, kde je fázový rozdíl tak veliký, že dojde k pozitivní interferenci mezi světlem z pozadí a světlem ze vzorku. V takovém případě vzniká nežádoucí jasné světlo, protože odchýlené světlo má větší amplitudu, než světlo přímé. Index lomu (n) živých buněk, je obvykle 1,36 až 1,37. Budeme-li předpokládat kulové objekty, bude s rostoucí tloušťkou pozorovaných objektů růst fázový rozdíl a úhel difrakce bude menší [12, 17, 18].

Pokud se chceme vyhnout tomuto nepříjemnému efektu, musíme použít Hoffmanův modulační kontrast nebo Nomarského techniku. Pro další zdokonalení obrazu vyvinula také

společnost Nikon jedinečnou řadu objektivů využívající metody nazývané "apodizovaný" fázový kontrast. Tyto objektivy minimalizují světelný kruh, který nastává ve fázových objektech a obraz se tak stává dokonale kontrastní a má mnohem širší tónový rozsah [18].



Obr. 10 Optické schéma fázového kontrastu [16], halo efekt

2.2.2 Fluorescenční mikroskopie

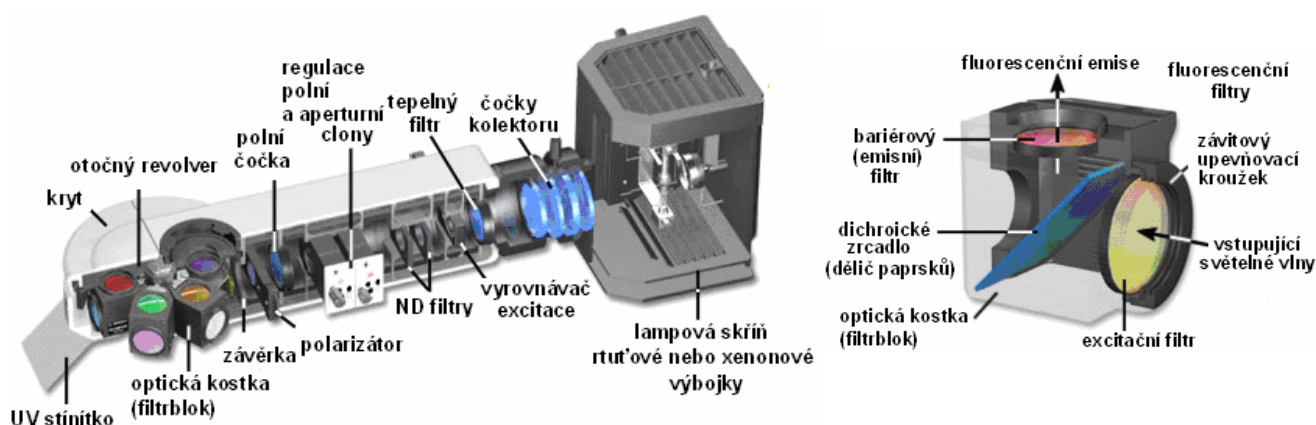
Fluorescence je vlastnost některých atomů a molekul absorbovat světlo určité vlnové délky (obvykle v rozsahu od UV do VIS oblasti elektromagnetického spektra; 250–700 nm) a následně emitovat světlo delší vlnové délky (viditelné světlo) po krátkém intervalu, nazývaném fluorescenční doba života. Delší vlnová délka odpovídá menší energii světla, což znamená, že energie fluorescence je menší než energie absorbovaného záření. Fluorescenční světlo je emitováno všemi směry nezávisle na směru excitačního světla a postupně mizí. Ztráta přebytečné energie elektronově excitovaných stavů molekul se může uskutečnit zářivými nebo nezářivými přechody (vibrační relaxace, vnitřní konverze, mezisystémový přechod). Nezářivé přechody, které mohou být intramolekulární nebo intermolekulární, dramaticky snižují emisi, případně ji naprosto odstraňují. V praxi biologické mikroskopie se rozeznává *primární fluorescence* (autofluorescence), kdy je fluoreskující látka přítomna v objektu jako jeho přirozená složka, a *sekundární fluorescence*, kdy aplikujeme fluoreskující látku (fluoreskující barvivo, fluorochrom), která se specificky absorbuje nebo váže na určité struktury buňky. Fluorochromy mají charakteristická spektra pro absorpci a emisi [19]. Excitační a emisní spektra mohou být považovány za pravděpodobnostní rozdělovací funkce, které dané kvantum energie fotonu bude absorbováno a nakonec umožní molekule emitovat sekundární foton ve formě fluorescenčního záření. Většina fluoroforů může opakovat cyklus excitace a emise stokrát až tisíckrát před tím než je vysoce reaktivní excitovaná molekula fotovybělena (zánik fluorescence) díky kovalentní modifikaci.

Fluorescenční mikroskopie se dělí na dvě metody: pozorování v odraženém světle (*epifluorescence*) a pozorování v procházejícím světle (*diafluorescence*). Fluorescenční pozorování v procházejícím světle se v současné době téměř nepoužívá.

Fluorescenční mikroskopy jsou vybaveny intenzivním světelným zdrojem, obvykle se používají vysokotlaké rtuťové (50–200 W) nebo xenonové (75–150 W) výbojky. Obloukové lampy se zažehávají vysokonapěťovými pulsy a jsou umístěny ve skříňce, která je spojena s nástavcem pro osvětlení dopadajícím světlem. Obvykle před excitačním filtrem je umístěna

závěrka za účelem kompletního zastavení excitačního světla, pokud není vzorek pozorován nebo snímán detektorem. Jsou zde také umístěny ND filtry, které umožňují snížit intenzitu excitačního osvětlení. Důležitou součástí fluorescenční výbavy je systém filtrů, který je u episkopické metody tvořen excitačním filtrem, dichroickým zrcadlem a bariérovým filtrem [20, 21]. Filtry lze umístit do specializované kostky (filtrblok). Moderní fluorescenční mikroskopy jsou schopny pojmout 4 až 6 fluorescenčních kostek na otočném revolveru nebo v posuvných šoupátkách, což umožňuje jejich jednoduchou výměnu pro potřebnou aplikaci (obr. 11). Výrobci nabízejí množství různých filtrů, některé z nich jsou i vícepásmové (Omega Optical, Inc., Chroma Technology Corp.).

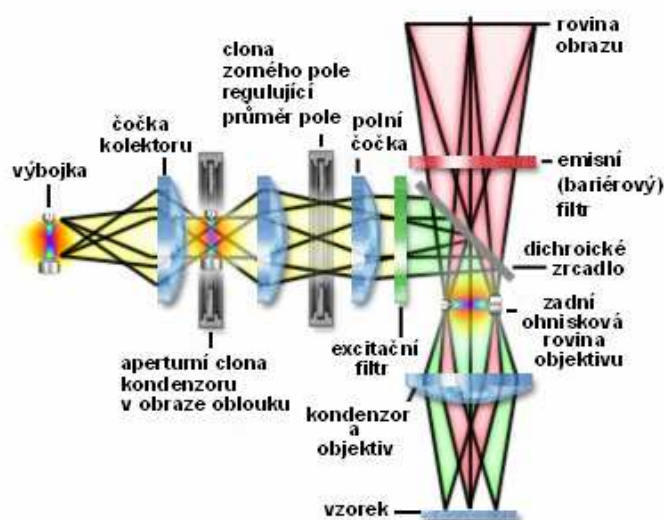
Epifluorescence spočívá ve vertikálním osvětlení excitačním světlem o požadované vlnové délce a objekt je pozorován přes objektiv. Světlo emitované rtuťovou výbojkou prochází excitačním filtrem, čímž se ze spektra světelného zdroje oddělí požadované excitační světlo a ostatní světlo je pohlceno. Pak je světlo odraženo na dichroickém zrcadle ve směru 90° do objektivu (v takovém případě slouží objektiv jako kondenzor). Dichroické zrcadlo je umístěno do optické dráhy světla v úhlu 45°. Odráží excitační světlo o určité vlnové délce směrem do vzorku a propouští ostatní vlnové délky. Nakonec toto excitační světlo dopadá na vzorek. Dichroické zrcadlo také odráží osamocené paprsky excitačního světla zpět ve směru zdroje. Část fluorescenčního světla, které je emitováno do všech směrů, prochází také objektivem. Bariérový filtr pak zachytí zbytky excitačního světla, které nebylo použito k excitaci a propouští pouze fluorescenční světlo, čímž poskytuje černé pozadí k fluorescenčnímu obrazu. Zdálo by se, že oddělení excitačního a fluorescenčního světla je dokonalé i bez bariérového filtru. V reálných systémech je bariérový filtr nutný, protože část excitačního světla se odráží od čoček a povrchu vzorku. Velká část excitačního světla je sice odražena směrem ke zdroji, ale dichroickým zrcadlem projde část světla, které má vlnovou délku, pro kterou je dichroické zrcadlo propustné a tato část je absorbována bariérovým filtrem.



Obr. 11 Epifluorescenční iluminátor; schéma optické kostky [21]

U episkopických fluorescenčních mikroskopů se používá Köhlerovo osvětlení (obr. 12). Osvětlené zorné pole lze regulovat pomocí aperturní clony kondenzoru a clony zorného pole. Clona zorného pole zmenšuje průměr svazku paprsků světla, který vstupuje do objektivu a používá se tedy k omezení osvětlené oblasti (viditelné oblasti), čímž zvyšuje kontrast obrazu. Tato clona brání průchodu nežádoucího světla, které vznikne rozptylem na vzorku nebo na povrchu čoček, obraz není přesvětlen a je kontrastní. Vhodné nastavení této clony je obzvlášť důležité při mikrofotografování. Aby nedocházelo při epifluorescenčním

mikroskopování a při mikrofotografování k nežádoucímu vyhasnutí části obrazu vzorku, necháme odcloněnou pouze nezbytnou část clony zorného pole. Aperturní clona je připevněna k čočce kondenzoru a používá se k řízení rozlišení, kontrastu a hloubky ostrosti. Aperturní clona pomáhá nastavit jas a zlepšit kontrast pozorovaného objektu. Tyto parametry však nelze nastavit nezávisle. Obecně lze říci, že optimální nastavení aperturní clony kondenzoru je 70–80 % numerické apertury objektivu. Pokud je tato clona zacloněná více než na 70 %, pak dochází ke snížení jasu. Současně se však zvětšuje kontrast a hloubka ostrosti se zvětší dvakrát.



Obr. 12 Fluorescenční mikroskopie v odraženém světle (epiluminiscence) s Köhlerovým osvětlením [21]

U preparátů, které rychle ztrácejí barvy, je velmi výhodné kombinovat fluorescenční pozorování s fázovým kontrastem, Hoffmanovým modulačním kontrastem nebo Nomarského diferenciálním interferenčním kontrastem. Lze pak lépe najít oblast nebo strukturu ve vzorku, která emituje fluorescenční světlo.

Pomocí konfokálního mikroskopu se lze zbavit neostrotí v důsledku překrývání se zaostřeného obrazu s rozmazanými obrazy struktur, které se nacházejí mimo zaostřenou rovinu, což je obzvláště rušivý jev při fluorescenční mikroskopii. K hlavní přednosti konfokální mikroskopie patří možnost vést tenké optické řezy i tlustším vzorkem a zaznamenávat série digitalizovaných řezů vzorkem, které představují vhodná vstupní data pro studium trojrozměrné struktury objektů například měření objemu a povrchu buněk. Při fluorescenční konfokální mikroskopii bývá maximální intenzita budícího záření omezena nežádoucím zvyšováním rychlosti fotochemických reakcí fluoreskujících molekul, po nichž mizí fluorescence. To znamená, že při fluorescenční konfokální mikroskopii slabě zářících objektů nelze z principiálních důvodů dosáhnout zároveň vysokého prostorového i časového rozlišení. Dvoufotonová konfokální mikroskopie ve srovnání s klasickou konfokální mikroskopií má větší hloubku prostření (až do 400 μm), a to i vzorků, jejichž povrchové vrstvy silně fluoreskují, dále kontrastnější zobrazení, zejména v hlubších vrstvách vzorku. Dvoufotonová excitace navíc výrazně redukuje problémy spojené s fotodegradací fluoreskujících molekul, neboť mimo ohnisko, kde není intenzita laserového záření dostatečně vysoká, nebývají fluorochromy excitovány a tím ani vysvíceny. Speciální varianta fluorescenční konfokální mikroskopie STED (*Stimulated Emission Depletion*) mikroskopie

dosahuje molekulárního rozlišení [22]. Bezkontaktní 3D zobrazení povrchu biologických vzorků s nanometrovým rozlišením v reálném čase umožňuje digitální holografická mikroskopie, díky nízkým intenzitám použitého záření a možnosti použití transmisního režimu [23].

Pro pozorování fluorescence jednotlivých molekul v povrchové vrstvě na rozhraní dvou prostředí je vhodná TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*) mikroskopie používaná v buněčné a molekulární biologii. Metoda TIRF zviditelňuje buněčné povrchy a vylučuje rušivý vliv fluorescence z hlubších oblastí cytoplazmy. Technika FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) je často používána v kombinaci s totálním vnitřním odrazem k získání dodatečných informací. Přenos excitační energie představuje vhodný nástroj k detekci mezimolekulárních interakcí v buňkách a dovoluje sledovat přibližování mezi dvěma molekulami v rozsahu několika nanometrů. Alternativní metoda pro měření fluorescenčního resonančního přenosu energie je stanovení dob dohasínání fluorescence metodou FLIM (*Fluorescence Lifetime Imaging*) se uplatňuje všude tam, kde měříme intenzitu fluorescence jako odezvu na změny interakcí sondy s jejím okolím. Užitečná metoda pro pozorování difuze a pohybu biologickým makromolekul je metoda FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*). Metoda je založena na fotovybělení definované oblasti vzorku krátkým intenzivním pulzem laserového paprsku, který je zaostřen do definované oblasti. Následuje difuze nevysvícených molekul z okolí, která se projeví obnovenou fluorescencí v místě, do něž byl intenzivní pulz zaměřen. Vhodná technika pro pozorování molekulární pohyblivosti a dynamiky v živých buňkách je FLIP (*Fluorescence Loss Induced by Photobleaching*). Technika je využívána pro sledování snížení fluorescence v definované oblasti, ležící vedle oblasti fotovybělení.

2.3 Fluorescenční barviva

Samotné buňky a jejich vnitřní struktury jsou průhledné a až na výjimky (pigmentové buňky, erytrocyty, chloroplasty, spory plísní) bezbarvé. Při běžném pozorování v procházejícím světle je nevidíme s dostatečným kontrastem, neboť téměř neabsorbují procházející světlo. Tradičně se tento problém řeší nejrůznějšími specifickými barvením. Mnohé barvicí postupy jsou založeny na chemických reakcích barviv s látkami uvnitř buněčných struktur.

Kategorie molekul, které jsou schopné podstoupit elektronový přechod vedoucí nakonec k fluorescenci jsou známy jako fluorescenční barviva (fluorochromy). Mnoho fluorescenčních barviv jsou aromatické organické sloučeniny navrženy tak, aby se vázaly k biologickým makromolekulám. Fluorochromy, které jsou konjugované s většími makromolekulami (nukleové kyseliny, lipid, enzym, protein) díky adsorpci nebo kovalentním vazbám, se nazývají fluorofory. Fluorofory se dělí do dvou obecných tříd a to na *vnitřní* (vlastní; *intrinsic*), které se vyskytují ve vzorku přirozeně a na *vnější* (nevlastní; *extrinsic*), které jsou přidávány ke vzorkům, které nemají vhodné fluorescenční vlastnosti. Kromě požadavku na specifickou vazbu nevlastního fluoroforu k buněčným složkám a citlivosti emise fluoroforu na změny v okolí, je důležité, aby zavedením fluoroforu do bílkovin, nukleových kyselin, membrán apod. nedošlo k narušení funkce těchto biologických systémů.

Vnější, neboli nevlastní fluorofory se používají mnohem více než vnitřní. Přidávají se ke studovanému vzorku, a pokud se na něj váží kovalentně, nazývají se *fluorescenční značky*, pokud se váží nekovalentně jedná se *fluorescenční sondy*.

Fluorescenční značky se nejčastěji používají k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se kovalentně vážou na jejich aminové, sulfhydrylové nebo histidinové boční řetězce, thiolové, aldehydové skupiny atd. Iontové fluorofory, jejichž kvantový výtěžek fluorescence a někdy i spektrální vlastnosti se mění po navázání na bílkoviny, membrány nebo nukleové kyseliny se používají pro studium změn konformace bílkovin, tloušťky membrán, membránového potenciálu, viskozity prostředí apod. Vliv okolního prostředí na emisní vlastnosti takových fluoroforů je dán velkým zvýšením jejich dipólového momentu v excitovaném stavu; během doby života excitovaného stavu potom dochází k reorientaci obklopujících molekul a tím k posuvu fluorescenčního spektra. Velikost molekuly fluoroforu a počet kladných nábojů, které si nese je velmi podstatný z hlediska stability vzniklé molekuly (např. nukleová kyselina-fluorofor). Velikost molekuly fluoroforu a také přítomnost či nepřítomnost náboje je také důležitá z hlediska možnosti prostupnosti barviva skrz buněčnou membránu a je vlastností, která se také udává u příslušného fluoroforu (angl. *permeant*, *impermeant*).

Fluorescenční indikátory (chemické sondy) jsou označovány fluorofory jejichž spektrální vlastnosti jsou citlivé na určitou látku. V současné době jsou dostupné fluorescenční indikátory pro řadu látek, včetně vápníku, hořčíku, sodíku, chlóru, kyslíku, fosfátu, aminů a pro pH. Obvykle tyto indikátory vykazují spektrální posuv v závislosti na přítomnosti dané látky, jejíž koncentrace se potom určuje z poměru intenzit při různých vlnových délkách excitace nebo emise nebo se jedná o indikátory, které vykazují zvýšení intenzity fluorescence v přítomnosti dané látky, aniž by docházelo ke spektrálnímu posuvu.

Pro studium živých buněk jsou užitečné acetoxymetylové (AM) a acetátové estery fluorescenčních indikátorů, protože zatímco původní indikátor neprochází buněčnou membránou, jeho AM nebo acetátový ester tak snadno činí (nenabitá molekula). Uvnitř buňky vzniká působením nespecifických esteráz původní indikátor. Příkladem je fluorescein diacetát, Fura-2 AM a další.

2.3.1 Fluorescenční barviva pro testování vitality buněk

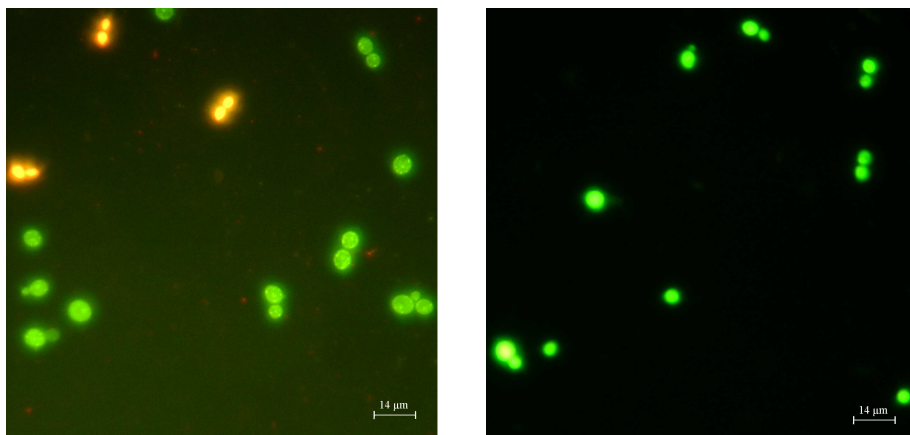
Testování vitality (životaschopnosti) je založeno na měření podílu živých a mrtvých buněk v populaci. Jako sondy životnosti buněk slouží [24]:

1. Fluorogenní substráty esteráz, které mohou pasivně pronikat do buněk a měří jednak zachování enzymatické aktivity buněčných esteráz, které je převádí na fluoreskující produkt, jednak membránovou integritu, která zajišťuje nitrobuněčnou retenci jejich fluoreskujících produktů. Jednou z prvních sond pro toto použití byl fluorescein diacetát (FDA). Mezi nejlepší indikátory vitality buněk patří calcein AM (díky vysokému záchytu v živých buňkách a silné fluorescenci). Dalšími vhodnými indikátory vitality jsou např. 2',7'-bis-(2-karboxyetyl)-5-(a 6)-karboxyfluorescein, acetoxymetyl ester (BCECF, AM), karboxyfluorescein diacetát, karboxyeosin diacetát, a další.

2. Barviva pro nukleové kyseliny, která neprostupují membrány živých buněk a lze je proto použít pro detekci mrtvých buněk. Mezi takové indikátory patří např. ethidium bromid, ethidium homodimer-1, propidium jodid, cyaninová barviva, jako TOTO, SYTOX Green a další. Používají se často v kombinaci s nitrobuněčnými substráty esteráz, membránově propustnými barvivy nukleových kyselin, sondami citlivými na membránový potenciál, sondami pro organely nebo indikátory propustnosti membrán.

3. Sondy, které jsou aktivními buňkami oxidovány nebo redukovány a umožňují tak měřit redox potenciál buněk jako znak jejich vitality; např. resazurin, tetrazoliové soli.

4. Sondy citlivé na transmembránový potenciál, pH nebo Ca^{2+} (Rhodamine 123, Fura-1, Indo-1, Fluo-3).

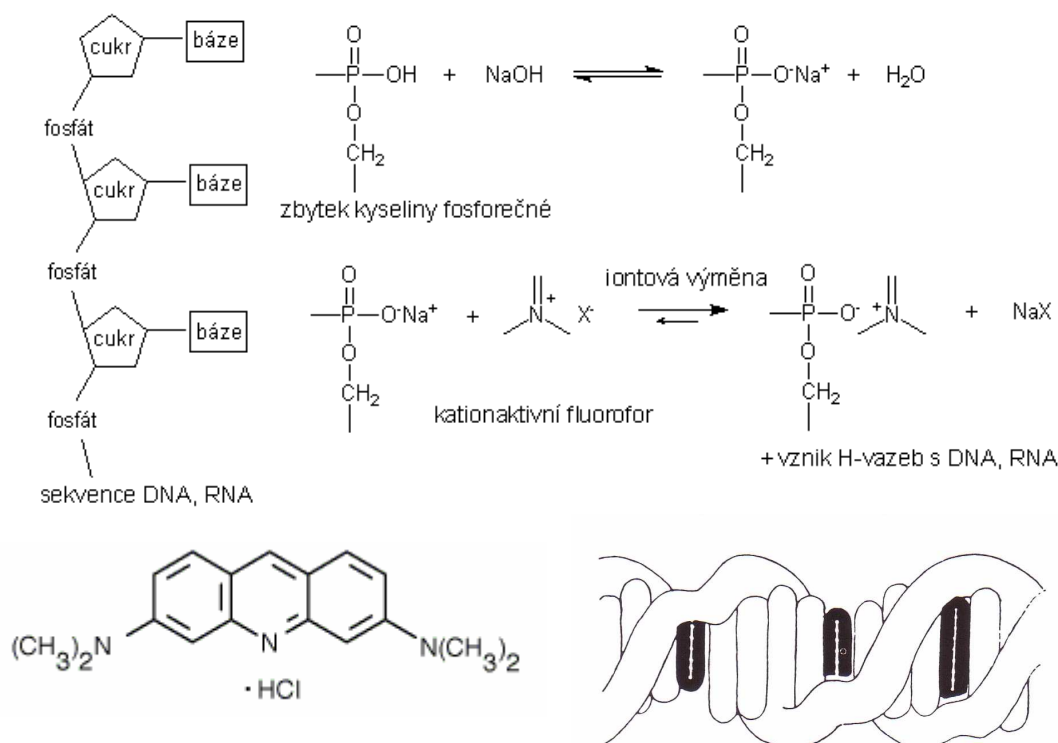


Obr. 13 Buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1. Vlevo jsou buňky obarvené akridinovou oranží (180 μM AO; pH 6) a vpravo fluorescein diacetátem (6 mM FDA; pH 7,2). Kultivace buněk: 24 hod. v glukoso-peptonovém kvasinkovém extraktu za aerobních podmínek. Použitá filtrační kostka B-2A

Pro rozlišení živých a mrtvých buněk se často používá fluorescenční barvivo akridinová oranž (AO). Živé buňky poskytují zelenou fluorescenci, poškozené buňky žlutou fluorescenci a mrtvé buňky červenou (obr. 13). AO se váže na DNA (zelená fluorescence), RNA, denaturovanou DNA, kyselé polysacharidy (červená fluorescence). AO snadno difunduje přes buněčné membrány při neutrálním pH, ale stane se membránově neprůchodná při kyselém pH a shromažďuje se v lyzozomech. AO vytváří dimer nebo polymer pokud jsou sousední molekuly barviva velmi blízko sebe. Excitační a emisní spektra dimeru a polymeru AO jsou nepatrně různá vzhledem k monomeru a z tohoto důvodu barva fluorescence AO vázané na RNA je obvykle červená nebo oranžová, v kontrastu k zelené fluorescenci monomeru vázaného na DNA. Mezi pozitivně nabitou molekulou AO (dimethylamino skupiny) a negativně nabitými fosfátovými skupinami se uplatňují elektrostatické interakce a poté co je molekula dostatečně blízko řetězci uplatňují se také van der Waalsovské síly a vodíkové vazby s purinovým a pyrimidinovým kruhem. Kationy AO jsou umístěny přibližně na každé třetí párové bázi dvoušroubovicového helixu DNA. Za těchto okolností je vzdálenost mezi molekulami barviva dostatečně velká, aby nedošlo k interakci mezi dvěma molekulami barviva. Fluorescenční charakteristiky jsou dány monomerem AO tj. zelená emise. Pokud je AO vázána na jednořetězcové náhodné klubko (denaturované DNA, RNA), je vázána na téměř každou nukleotidovou jednotku fosfátové skupiny. Řetězec náhodného klubka pak dovoluje sousedícím molekulám barviva se přiblížit dostatečně blízko pro interakci mezi molekulami barviva za vzniku polymeru, což vede k červené fluorescenci. Podobný mechanismus se vyskytuje i při barvení cytoplazmatické RNA. Fluorescence je tedy závislá na sekundární struktuře molekuly nukleové kyseliny (dostupnost fosfátových skupin), neboť má silný vliv na vázání AO [19, 25]. Molekuly AO jsou umístěny na molekulách nukleové kyseliny tak, že nemohou vytvořit dimer (obr. 14).

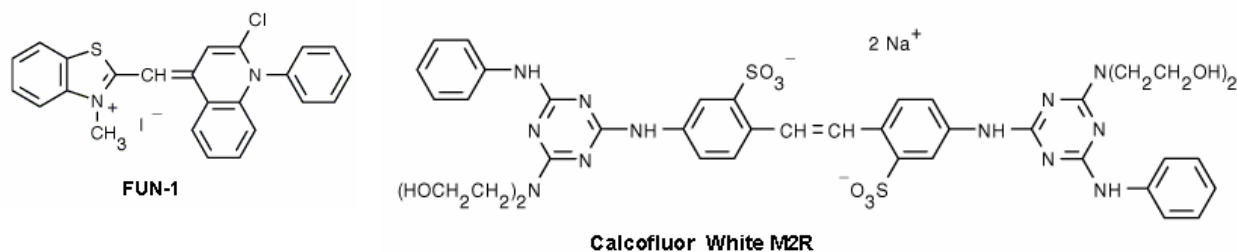
Při pH 5,7–8 živé buňky fluoreskují zeleně a mrtvé červeně. Nad pH 4,7 AO produkuje červenou fluorescenci cytoplazmy. Jádro je červené při nižším pH a posunuje se na

žlutozelené při pH 6,8. Ačkoliv je AO poměrně netoxická, je mutagenní. Bylo také zjištěno, že AO zpomaluje nádorový růst.

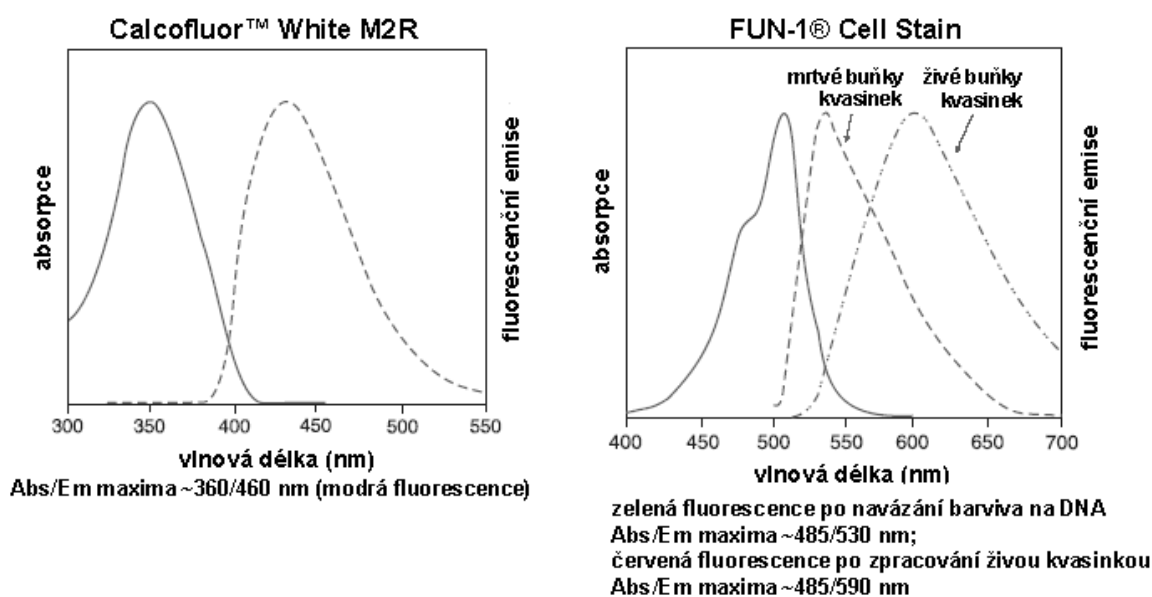


Obr. 14 Vazba fluoroforu k nukleové kyselině; strukturní vzorec akridinové oranži (AO); struktura komplexů DNA-AO [25]

Existují také sady pro testování cytotoxicity a vitality. Jednou z nich je např. LIVE/DEAD Yeast Viability Kit, která poskytuje neobyčejně jednoduchý a sensitivní kvantitativní rozbor pro rozlišení životaschopných kvasinek a hub v směsných nebo čistých kulturách [26–28]. Tato souprava obsahuje dvoubarevně fluorescenční barvivo FUN-1, které má nízkou vlastní fluorescenci, průměrnou afinitu k nukleovým kyselinám a mimořádnou membránovou propustnost [29]. Sada také zahrnuje UV excitovatelné barvivo Calcofluor White M2R pro buněčnou stěnu kvasinek a hub, které fluoreskuje modře bez ohledu na buněčný metabolický stav.



Obr. 15 Strukturní vzorce FUN-1, Calcofluor White M2R (fluorescent brightener 28; Tinopal LPW)

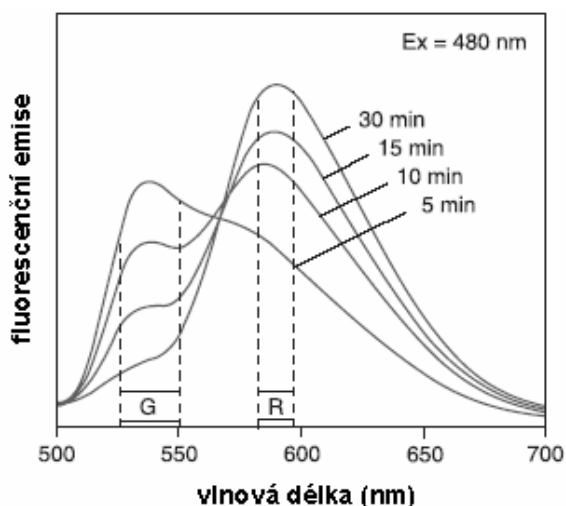


Obr. 16 Spektrální charakteristiky barviv [26]

FUN-1 je nesymetrická cyaninová sloučenina s jedním kladným nábojem (obr. 15). Volné barvivo FUN-1 ve vodném roztoku nefluoreskuje, avšak pokud se spojí s DNA nebo RNA fluoreskuje po excitaci při 530 nm (obr. 16). FUN-1 barvivo vykazuje neobvyklé spektrální vlastnosti, když je použito na barvení metabolicky aktivních kvasinek a buněk hub. FUN-1 barvivo pasivně difunduje do různých buněčných druhů a nejprve barví cytoplazmu difúzně distribuovanou zelenou nebo žlutozelenou fluorescencí. Avšak, u několika běžných druhů kvasinek a hub, další zpracování barviva živými buňkami vede k vytvoření jasných oválných intravakuálních struktur, které vykazují nápadnou červenou nebo červenooranžovou fluorescenci, doprovázenou redukcí zelené fluorescence cytoplazmy (obr. 17 a 19). Vytvoření červeně fluoreskujících intravakuálních struktur vyžaduje jak neporušenou plazmatickou membránu, tak metabolickou schopnost [30–32]. Pro vytvoření oválných intravakuálních struktur je potřebný adenosintrifosfát vytvořený oxidativní fosforylací nebo glykolýzou. Při pH 8 probíhá spontánně reakce mezi FUN-1 barvivem a redukováným glutathionem vedoucí k červené fluorescenci s maximem při 610 nm. Mrtvé buňky fluoreskují jasně žlutozeleně s nerozpoznatelnými červenými strukturami (obr. 20).

LIVE/DEAD Yeast Viability Kit byl prozatím testován na několika druzích hub, včetně *Candida albicans*, *Candida pseudotropicalis* a bylo provedeno několik barvení *Saccharomyces cerevisiae* za různých experimentálních podmínek. Vytvoření červeně fluoreskujících struktur bylo pozorováno nejen v log fázi růstu, ale také u nekultivovaných buněk se zbytkovou metabolickou aktivitou. LIVE/DEAD Yeast Viability Kit by měl být vhodný pro detekci velmi nízkého množství živých nebo mrtvých buněk hub, i ve směsích.

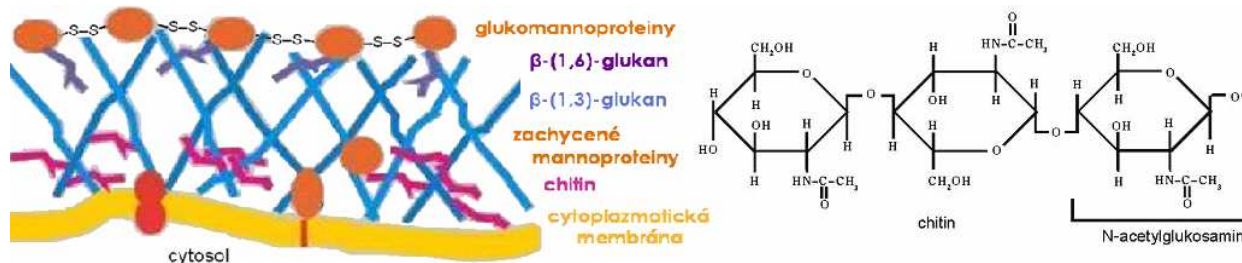
Z dosavadních studií se můžeme setkat s hypotézou že FUN-1 barvivo je transportováno neznámým proteinem, který cirkuluje z Golgiho aparátu do části prevakuol. Barvivo FUN-1 může být akumulováno v transportních vezikulách, což lze pozorovat jako malé červené bodové struktury v buňce. Pro některé mutanty kvasinek není barvivo FUN-1 vhodné jako indikátor životaschopnosti, neboť se nevytváří oválné intravakuální struktury díky překážce v cestě třídění proteinů vakuol [33].



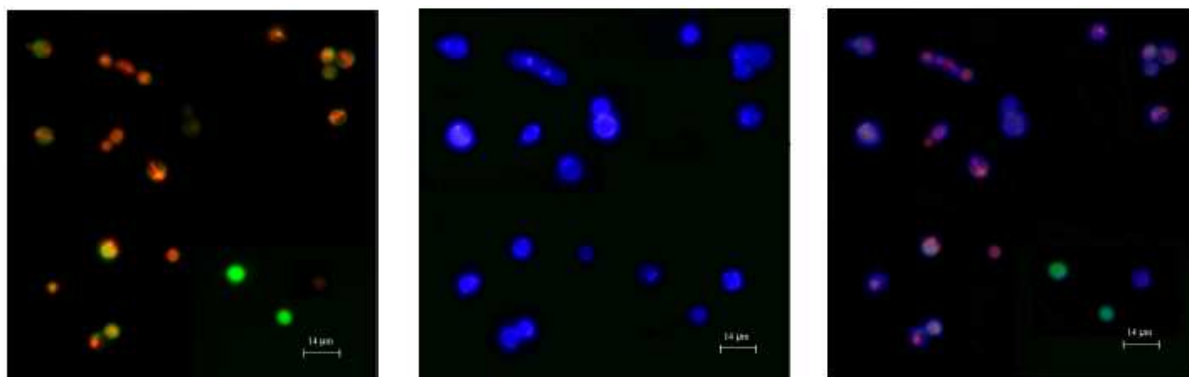
Obr. 17 Fluorescenční emisní spektra suspenze kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, která byla obarvena barvivem FUN-1 z LIVE/DEAD Yeast Viability Kitu. Po přidání FUN-1 do média, fluorescenční emisní spektrum (excitace při 480 nm) bylo zaznamenáno spektrofotometrem při různých časech během 30 minutové inkubační periody. Posun zelené (G) fluorescence k červené (R) je způsoben zpracováním FUN-1 barviva metabolicky aktivními buňkami kvasinek [30]

Calcofluor White M2R je fluorescenční aniontové barvivo schopné vytvářet vodíkové vazby s β -(1 $\rightarrow$ 4) a β -(1 $\rightarrow$ 3) polysacharidy. Tento fluorofor vykazuje vysokou afinitu k chitinu, celulóze, a sukcinoglykanu, vytvářející vodíkové vazby s volnými hydroxylovými skupinami [34, 35].

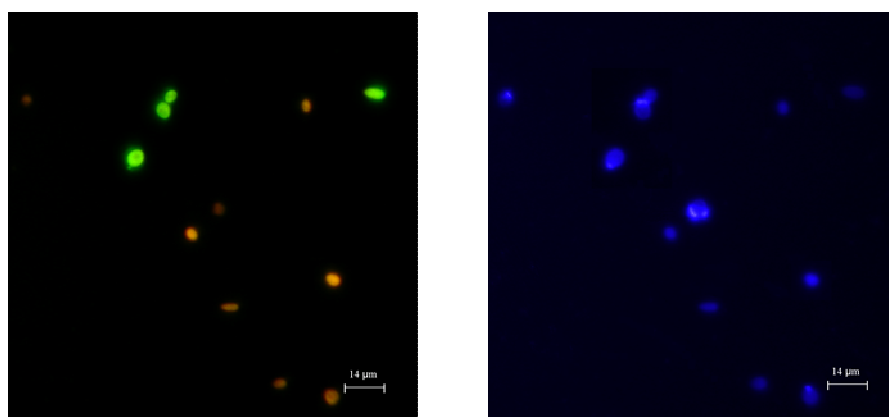
Vnitřní vrstva buněčné stěny kvasinek se skládá hlavně z β -1,3-glukanové sítě a chitinu, a reprezentuje přibližně 50–60 % suché hmotnosti stěny (obr. 18). Chitin se vyskytuje ve formě lineárních řetězců okolo krčku pupenů, v okolí zárodečné jizvy i v primárním septu. Přibližně 10 % z celkového množství je rovnoměrně rozptýlené po celém obvodu stěny buňky. Vnější vrstva buněčné stěny kvasinek obsahuje mannoproteiny s malým množstvím lipidů, které vyčnívají z povrchu buňky. Vnější proteinová vrstva zabírá okolo 1/3 ze suché hmotnosti buněčné stěny. Proteiny buněčné stěny mohou být navzájem vázány disulfidovými můstky nebo některé jsou zadržovány v buněčné stěně iontovými a neiontovými interakcemi [36].



Obr. 18 Struktura buněčné stěny kvasinek, strukturní vzorec chitinu



Obr. 19 Buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené pomocí sady LIVE/DEAD Yeast Viability Kit (4,52 µM FUN 1 a 25,25 µM Calcofluor White M2R; pH 7,2). Nalevo lze vidět vytváření jasných oválných intravakuálních struktur, které vykazují nápadnou červenou nebo červenooranžovou fluorescence, doprovázenou redukcí zelené fluorescence cytoplazmy. Uprostřed lze vidět obarvenou buněčnou stěnu Calcofluorem White M2R, přičemž intenzita fluorescence je vyšší v oblasti výskytu chitinu, který je lokalizován zejména v oblasti jizev. Na obrázku vpravo lze vidět současnou fluorescence obou komponent sady. Kultivace buněk: 2 měsíce v glukoso-peptonovém kvasinkovém extraktu za aerobních podmínek. Použitá filtrační kostka UV-2EC(DAPI) (uprostřed) a B-2A (vlevo) a objektiv 40×. Doba působení barviv: 4 hodiny



Obr. 20 Buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené pomocí sady LIVE/DEAD Yeast Viability Kit (2,26 µM FUN 1 a 25,25 µM Calcofluor White M2R; pH 7,2). Nalevo lze vidět vytvoření jasných oválných intravakuálních struktur s červenou nebo červenooranžovou fluorescence bez zbytkové zelené fluorescence cytoplazmy. Doba působení barviv: 12 hodin

2.4 Obrazová analýza

Náš zrakový orgán – oko – pozoruje prostředí kolem nás a přitom rozlišuje detaily podle kontrastu, velikosti, barvy (chromatičnosti a jasu), tvaru, vzdálenosti atd. Z tohoto pozorování potom vznikne celkový zrakový vjem – obraz. Velkou roli přitom hraje paměť a zkušenost pozorovatele, zrakem však neumíme hodnotit detaily kvantitativně. Hodnocení je jen subjektivní a může být i časově proměnné (psychofyzilogický proces). Přestože člověk dobře rozlišuje barvy, pro rozlišení různých odstínů šedi není dostatečně vybaven. U černobílých obrazů je pro pozorovatele často nemožné detekovat v pozorovaném vzorku jemné odstíny neboť lidské oko nerozliší více než cca 80 úrovní jasu. Moderní digitální fotoaparáty, kamery ve srovnání s lidským okem vytvářejí kontrastnější obrazy

a zaznamenávají mnohem menší intenzity světla. Obraz snímáný digitálním fotoaparátem či kamerou má elektronickou podobu, což umožňuje úpravu jeho kvality a automatizované vyhodnocování metodami obrazové analýzy.

Obrazová analýza (*Image Analysis*) byla vyvinuta pro kvantitativní (objektivní) hodnocení vlastností obrazu. Její podstatou je digitalizace obrazu a zpracování vzniklého souboru dat v počítači. Do obrazové analýzy lze zahrnout všechny postupy, které umožňují kvantitativně vyhodnotit obrazovou informaci z hlediska geometrických rozměrů, morfologických znaků, optické hustoty, barvy a počtu zkoumaných objektů a popřípadě ji porovnávat s jinými soubory dat a určovat míru shody. Relevantní objekty přitom lze popsat buď prostřednictvím parametrů jejich hranice (pokud nás zajímají tvarové charakteristiky) nebo prostřednictvím obrazových bodů objekty tvořících (pokud nás zajímá jejich barva, optická hustota či textura).

Počítačová analýza obrazu většinou začíná definováním standardních podmínek pro dané měření. Tyto podmínky musí zůstat zachovány po celou dobu měření, aby bylo dosaženo opakovatelných výsledků. Mezi základní podmínky reprodukovatelného měření patří výběr osvětlení (úhel osvětlení, monochromatické světlo, bílé světlo o definované teplotě chromatičnosti, absence okolního světla, atd.). Další nezbytnou operací před samotným snímáním je výběr vhodné optické soustavy (objektiv, mezikroužky, ...) kamery či fotoaparátu, mikroskopu a kalibrace systému. Ke kalibraci systému patří definování standardu pro bílou barvu, vhodné nastavení kamery, fotoaparátu, mikroskopu (clona, zaostření) a poté délková kalibrace. Kalibrace systému je nutnou podmínkou objektivizace a reprodukovatelnosti měření. Poté začíná samotné snímání. Obraz je při snímání transformován na matici o definovaném počtu řádku a sloupců. Každý bod této matice obsahuje informace o své poloze a o hodnotě svých barevných složek.

Před vlastní obrazovou analýzou se data zpravidla upravují do podoby vhodné k dalšímu zpracování. Zpracování obrazu (*Image Processing*) zahrnuje tedy kvalitativní úpravu obrazu pro vyniknutí určité informace. Patří sem různé techniky minimalizace zkreslení a šumu, zvýraznění gradientů intenzity, hran, úprava strmosti a průběhu kontrastních charakteristik, tzv. prahování (*Thresholding*) podle stupně šedi i ve třech RGB komponentách, barevné separace do různých barevných prostorů, atd. Z matematického hlediska se jedná o geometrické transformace, transformace jasu, diskrétní lineární transformace, filtrové operace či operace matematické morfologie.

K metodám obrazové analýzy dat patří základní analýza obrázku, která spočívá v měření délek a ploch studovaných objektů na obrázku a určování histogramů v jednotlivých barvových prostorech. Výběr detailů je možné provádět ručně např. označením nebo ohraničením pomocí myši.

Další metodou obrazové analýzy dat je komplexní analýza dat. Výhoda této analýzy spočívá především v tom, že nepracuje s jednotlivými pixely obrázku, ale s celým obrázkem najednou. Hodnotí obrázek jako celek z pohledu opakujících se motivů, jejich zmenšených, příp. pootočených kopií [37].

2.4.1 Obraz a jeho reprezentace

Interpretace obrazových dat je jádrem porozumění obrazu. Porozumění reprezentace obrazových dat je složité. Důvodem je zobrazení původně trojrozměrné scény do dvojrozměrné obrazové roviny, komplikovaný a nejednoznačný vztah mezi jasnem, který měří kamera či jiný obrazový senzor, a tvarem povrchu 3D objektů ve scéně, šum, atd.

Statický obraz lze popsat spojitou obrazovou funkcí dvou prostorových souřadnic v rovině $f(x, y)$. Obrazová funkce tří proměnných se použije, když se obrazy mění v čase t , tj. $f(x, y, t)$ nebo v případě objemových obrazů $f(x, y, z)$, např. tomografu. Hodnoty obrazové funkce jsou určeny příslušnou aplikací, například odpovídají některé měřené fyzikální veličině (jasu u obrazu z černobílé TV kamery, teplotě termovizní kamery nebo schopnosti pohlcovat záření v daném místě objemu u rentgenového tomografu). Abychom mohli obrazovou funkci zpracovat v počítači, musíme ji digitalizovat. Digitalizace spočívá ve vzorkování obrazu v matici $M \times N$ bodů a v kvantování spojitě jasové úrovně každého vzorku do k intervalů. Díky kvantování nabývá jasová funkce v digitalizovaných obrazech celočíselných hodnot. Většina systémů pro digitální zpracování obrazu používá kvantování do k stejných intervalů. Jestliže je pro reprezentaci informace o obrazovém elementu použito i bitů, je počet úrovní jasu $k = 2^i$. Čím jemnější je vzorkování (čím větší je M, N) a kvantování, tím lépe je aproximován původní spojitý signál. Výsledkem je dvojrozměrná matice f celých čísel s rozměry $M \times N$ popisující obraz [38]:

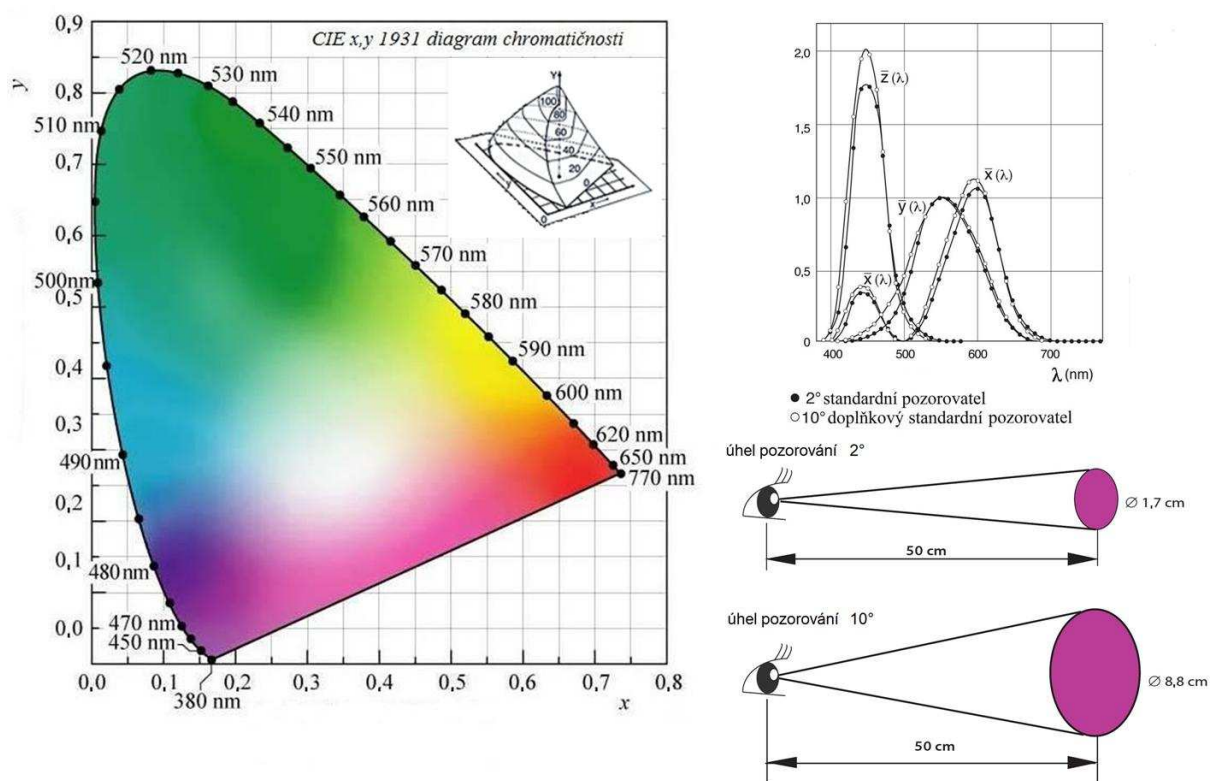
$$f = \begin{bmatrix} f(0,0) & f(0,1) & \dots & f(0,N-1) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ f(M-1,0) & f(M-1,1) & \dots & f(M-1,N-1) \end{bmatrix} \quad (1)$$

Prvky matice jsou obrazové elementy (pixely), jejíž hodnota je úměrná množství světelné energie.

V trojrozměrném prostoru se pro objemový prvek používá pojem voxel (*volume pixel*) a ve trojrozměrném zpracování dvojrozměrných obrazů se pracuje se spicely (*space intensity cell*). Z hlediska zpracování digitalizovaného obrazu je obrazový element dále nedělitelná nejmenší jednotka. Binární obrazy reprezentují informaci o obrazovém bodě jediným bitem.

2.4.2 Reprezentace barev v počítači

Dnešní metody měření barvy se zakládají na systémech a standardech, které vypracovala Mezinárodní komise pro osvětlení – Commission Internationale de l'Eclairage – CIE. Roku 1931 standardizovala nejdůležitější prvky systému měření barvy. Byly definovány barvové prostory, standardní zdroje osvětlení, podmínky osvětlení vzorku a detekce odraženého světla, byly zavedeny funkce standardního pozorovatele. Funkce standardního pozorovatele představují spektrální citlivost průměrného normálního lidského oka na tři základní barvy – červenou, zelenou a modrou. Tyto funkce se nazývají CIE trichromatické členitelé $\bar{x}$, $\bar{y}$, $\bar{z}$ [39]. Označují se také jako 2° standardní pozorovatel CIE 1931. Roku 1964 CIE definovala CIE 1964 doplňkové trichromatické členitele $\bar{x}_{10}$, $\bar{y}_{10}$, $\bar{z}_{10}$ pro 10° standardního pozorovatele. Rozeznáváme tedy dva typy pozorovatelů, rozlišené podle úhlu vstupu paprsků do oka a tím i plochy sítnice, kterou barvu vnímá. 10° standardní pozorovatel vnímá barvu celou sítnicí, 2° standardní pozorovatel vnímá barvu nejcitlivější částí oka, tzv. žlutou skvrnou. Přednost se dává měřením za podmínek 2° pozorovatele (obr. 21).



Obr. 21 Kolorimetrický trojúhelník CIE x, y 1931. Funkce trichromatických členitelů CIE 1931 a doplňkových trichromatických členitelů CIE 1964 [40]

Trichromatické členitelé definují, jak se barevný signál, který vznikl odrazem osvětlení od povrchu barevné plochy, v procesu měření barvy transformuje na tři čísla nazývané trichromatické složky X , Y , Z .

$$\begin{aligned} X &= k \int_{380}^{780} S(\lambda) R(\lambda) \bar{x}(\lambda) d\lambda \\ Y &= k \int_{380}^{780} S(\lambda) R(\lambda) \bar{y}(\lambda) d\lambda \\ Z &= k \int_{380}^{780} S(\lambda) R(\lambda) \bar{z}(\lambda) d\lambda \end{aligned} \quad , \quad k = \frac{100}{\int_{380}^{780} S(\lambda) \bar{y} d\lambda} \quad (2)$$

kde $S(\lambda)$ je spektrální rozložení intenzity světelného zdroje, $R(\lambda)$ je spektrální odrazivost vzorku, $\bar{x}$, $\bar{y}$, $\bar{z}$ jsou funkce 2° standardního pozorovatele. Konstanta k se volí pro absolutně bílé těleso na hodnotu 100. Trichromatické složky jednoznačně identifikují barvu ve smyslu barevného vjemu.

Trichromatické souřadnice se získají normováním trichromatických složek.

$$x = \frac{X}{X + Y + Z}, \quad y = \frac{Y}{X + Y + Z}, \quad z = \frac{Z}{X + Y + Z}, \quad x + y + z = 1 \quad (3)$$

Rovnice představují transformaci 3D barvového prostoru CIE XYZ do 2D CIE xyY . Na definování barvy stačí znát dvě trichromatické souřadnice x a y , které s trichromatickou

složkou Y definující světlost, určují polohu v barvovém prostoru CIE xyY . Rovina, kterou definují trichromatické souřadnice x, y se nazývá chromatickou rovinou a soubor souřadnic x a y všech barev vytváří v chromatické rovině kolorimetrický trojúhelník – diagram chromatičnosti CIE x, y (obr. 21). Obvod kolorimetrického trojúhelníku náleží barvovým tónům sytých barev. Směrem do středu k centrální neutrální oblasti sytost barvy klesá.

Pokud máme dány hodnoty souřadnic barvy x, y a trichromatickou složku Y prostoru CIE xyY získáme zpět CIE XYZ trichromatické složky takto:

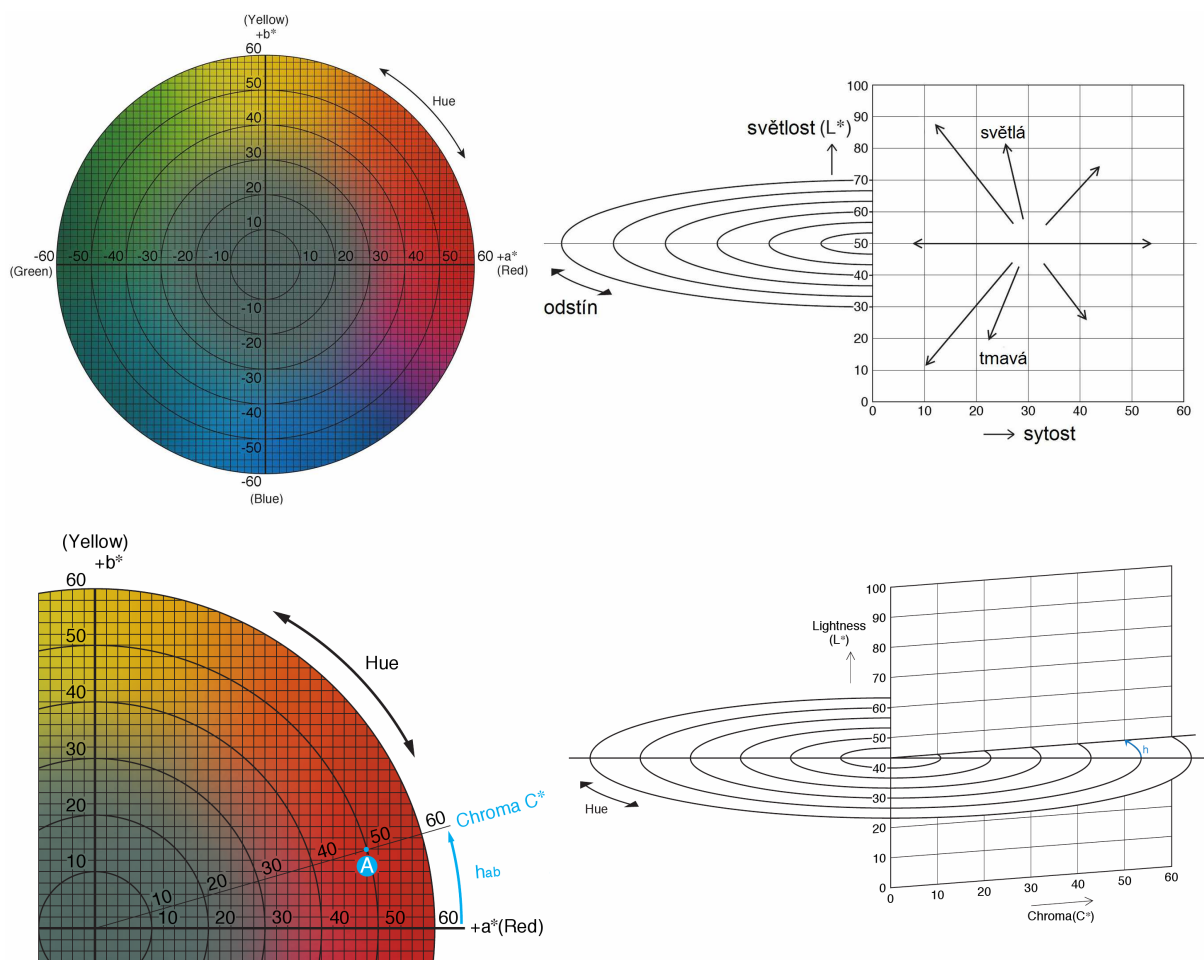
$$X = x \frac{Y}{y}, \quad Z = (1 - x - y) \frac{Y}{y}. \quad (4)$$

Tento první standardní systém hodnocení barvy a barevných rozdílů nebyl uniformní, tj. barevné rozdílly odpovídající stejným rozdílům barevného vjemu, se v chromatické rovině zobrazují nestejnými úsečkami, jejichž délka závisí na poloze pozorovaných barev v kolorimetrickém trojúhelníku. Model se dobře transformuje na modely CIE $L^*a^*b^*$ a CIE $L^*u^*v^*$ a další z nich vycházející.

Roku 1976 CIE navrhla používat dva alternativní barvové prostory a to CIE $L^*u^*v^*$ a CIE $L^*a^*b^*$ pro názorné a matematicky snadné určování barev. Tyto prostory jsou pravoúhlé s nepestrými barvami ve vertikální ose, která reprezentuje světlost (*Lightness*, L^*) v rozsahu od 0 do 100. Nula znamená černý bod a sto bílý bod. Chromatické osy a^* a b^* resp. u^* a v^* vytváří chromatickou rovinu. Složka barvy a^* popisuje barvu bodu ve směru od zeleno-modré (záporné hodnoty) po červeno-purpurovou (kladné hodnoty). Složka barvy b^* , která popisuje barvu bodu ve směru od modro-purpurové (záporné hodnoty) po zeleno-žluto-červenou (kladné hodnoty). Ve středu kruhového diagramu je neutrální oblast, v prostorovém tvaru pak středem tělesa, popisujícího $L^*a^*b^*$ prostor, procházejí neutrální barvy (černá, stupně šedé a bílá; obr. 22). Pro popis odstínu a sytosti byly definovány dvě veličiny měrný úhel barevného tónu h_{ab} , h_{uv} a měrná čistota chroma C_{ab}^* , C_{uv}^* . Měrný úhel barevného tónu červené barvy je 0° , žluté barvy 90° , zelené barvy 180° a modré barvy 270° . Syté barvy jsou vzdálenější od počátku souřadnicové soustavy a mají hodnotu měrné čistoty větší než méně syté. Poloha barvy v barvovém prostoru je potom dána souřadnicemi L^* , C_{ab}^* a h_{ab} resp. L^* , C_{uv}^* a h_{uv} (obr. 22).

Barvový model CIE 1976 $L^*a^*b^*$, byl navržen tak, aby byl zcela nezávislý na zařízení. To ho umožňuje používat jako barvový model referenční. Velkou výhodou modelu $L^*a^*b^*$ je vedle jeho nezávislosti na zařízení i skutečnost, že jeho gamut je největší (má tedy nejširší rozsah zaznamenanatelných barev) a dále naprosté oddělení jasové složky L^* od barvových složek a^*, b^* .

Gamut neboli barvový prostor zařízení je trojúhelníková plocha umístěná do diagramu všech možných barev, jehož vrcholy jsou tvořeny základními RGB světly a tento trojúhelník označuje realizovatelné barvy pro konkrétní zařízení. Vrcholy trojúhelníka jsou dány použitými světly (fosfory) a barvy mimo tento trojúhelník jsou daným zařízením nerealizovatelné (jsou mimo gamut). Např. zelená mimo tento trojúhelník se zobrazí jako nejbližší zelená na obvodu trojúhelníka. Obvykle se graficky vyjadřuje jako podmnožina CIE chromatického diagramu 1931, což je množina všech barev rozlišitelných lidským okem. Tento diagram se nezabývá jasnem, ale pouze barvou a její sytostí. A díky tomu je přehledně zobrazen v rovině a je to vlastně gamut lidského vidění.



Obr. 22 Barvový prostor CIE 1976 $L^*a^*b^*$ a souřadnice h_{ab} a C_{ab}^* [41]

Souřadnice barvy se počítá pomocí trichromatických složek vzorku pro 2° či 10° standardního pozorovatele, jestliže platí $X/X_n, Y/Y_n, Z/Z_n > 0,008856$ pomocí následujících vztahů

$$\begin{aligned}
 L^* &= 116 \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - 16, \\
 a^* &= 500 \left[\left(\frac{X}{X_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} \right], \\
 b^* &= 200 \left[\left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} \right],
 \end{aligned} \tag{5}$$

kde X_n, Y_n, Z_n jsou trichromatické složky normalizovaného světla.

Následující případ charakterizuje nelinearitu oka při nízkém jasu a je možno ho při snímání kamerou, která nemá obvykle takovou citlivost pro nízké úrovně jasu, zanedbat. Jestliže $X/X_n, Y/Y_n, Z/Z_n < 0,008856$, pak

$$\begin{aligned} \left(\frac{X}{X_n}\right)^{1/3} &\rightarrow 7,787\left(\frac{X}{X_n}\right) + \frac{16}{116}, \dots \\ L^* &= 903,3\left(\frac{Y}{Y_n}\right)^{1/3}, \\ a^* &= 3893,5\left[\frac{X}{X_n} - \frac{Y}{Y_n}\right], \\ b^* &= 1557,4\left[\frac{Y}{Y_n} - \frac{Z}{Z_n}\right]. \end{aligned} \quad (6)$$

Hodnoty X_n, Y_n, Z_n pro světelné zdroje jsou uvedeny v tabulce 1. K popisu barvy používáme tedy barvové prostory, kde je každá barva popsána jedinečnými barvovými souřadnicemi. Obraz v digitální podobě je dvojrozměrné pole bodů – pixelů, z nichž každý má nějakou barvu. Ta je zaznamenána v číselné podobě pomocí hodnot souřadnic této barvy v daném barevném prostoru.

Tabulka 1

Hodnoty trichromatických složek pro standardní světelné zdroje dané normou ASTM E308 (Metoda pro výpočet barev předmětů pomocí systému CIE)

Zdroj světla	2° standardní pozorovatel CIE 1931			10° standardní pozorovatel CIE 1964		
	X_n	Y_n	Z_n	X_n	Y_n	Z_n
A	109,850	100	35,585	111,144	100	35,200
C	98,074	100	118,232	97,285	100	116,145
D50	96,422	100	82,521	96,720	100	81,427
D55	95,682	100	92,149	95,799	100	90,926
D65	95,047	100	108,883	94,811	100	107,304
D75	94,972	100	122,638	94,416	100	120,641
F02	99,186	100	67,393	103,279	100	69,027
F07	95,041	100	108,747	95,792	100	107,686
F11	100,962	100	64,350	103,863	100	65,607

Z chromatických souřadnic a^* a b^* prostoru CIE $L^*a^*b^*$ lze vypočítat měrnou čistotu chromu C_{ab}^* a měrný úhel barevného tónu h_{ab}^*

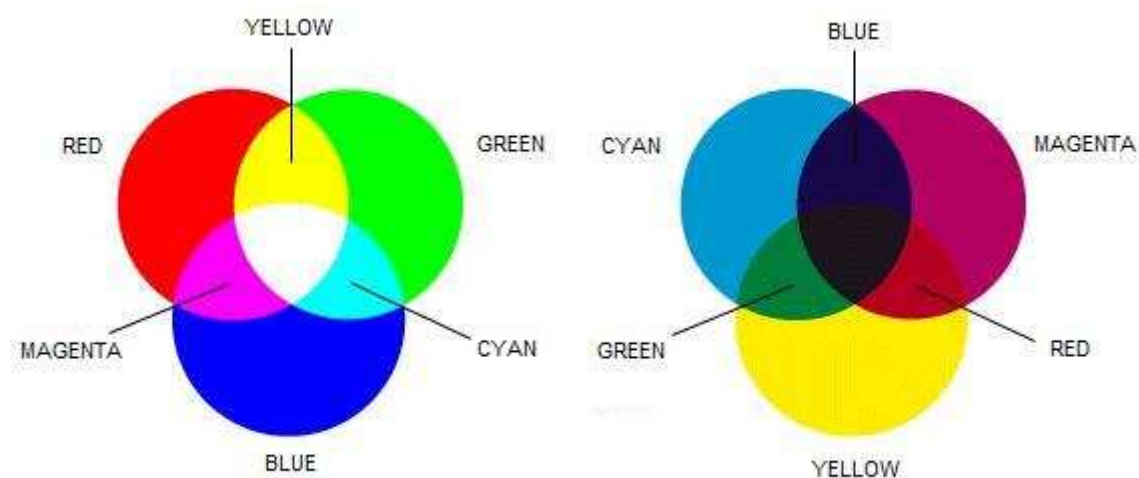
$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}, \quad h_{ab}^* = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right). \quad (7)$$

Mezi dva nejznámější barvové modely patří RGB model (Red – červená, Green – zelená, Blue – modrá) a CMYK (Cyan – azurová, Magenta – purpurová, Yellow – žlutá, black – černá) určený zejména pro tisky. Digitální fotoaparáty pracují v barvovém prostoru RGB a většina fotografií je v tomto modelu také uložena.

RGB model je aditivní model, založený na přidávání RGB světél na tmavou nesvítící podložku (klasický monitor či televize). Aditivní míchání barev demonstroval roku 1961 Maxwell. Přidáním všech světél naplno se vytvoří bílá (obr. 23). Sada tří čísel *RGB* určuje jak barvu, tak i intenzitu světla. Po doplnění minimální hodnoty (v počítačích nejčastěji 0), které budou odpovídat nulovému dráždění receptoru (barva nesvítí), a maximální hodnoty, nad které je již senzor zcela oslepen a dále nevidí (maximální svit barvy). Tato horní hodnota se v digitální fotografii používá obvykle 255, někdy také 4 095. Dále je třeba se shodnout na přesných barvách jednotlivých RGB složek, případně na definici bílého bodu či hodnotě gamma. Gamma charakterizuje křivku reprodukce tónů. Pokud máme například 6 megapixelový fotoaparát, tak pro každý bod obrazu (pixel) je jeho barva zaznamenána jako tři čísla: *R*, *G*, *B*. Každá barva je vyjádřena kombinací čísel *R*, *G* a *B*, kde každé číslo může dosáhnout 256 hodnot (0 až 255). Je tak k dispozici celkem 256 diskretních úrovní každé barvy. Každá barva je tedy vyjádřena 8 bity a popis barvy jednoho bodu vyžaduje 24 bitů. Fotoaparát umí zaznamenat celkem 16 777 216 barev.

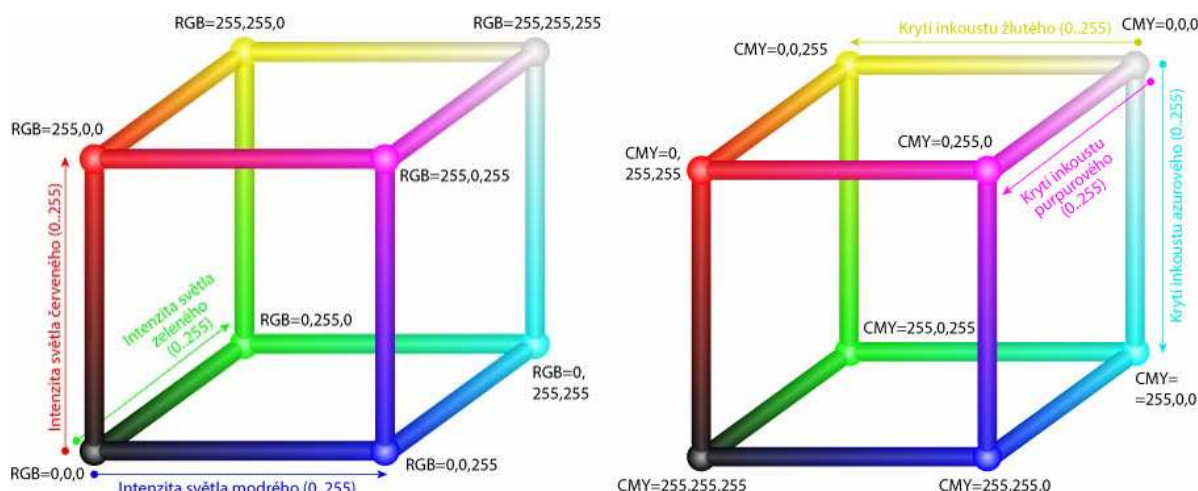
Model RGB nemá žádnou přesnou specifikaci svých základních barev červené, zelené a modré a tak vzniklo více RGB modelů. Nejznámější a nejrozšířenější je varianta sRGB, která je standardem Windows. Barevný prostor sRGB má definovány tři základní RGB barvy, bílý bod D65 a gamma křivku. Barevný model sRGB je praktický zejména proto, že odpovídá reálným možnostem zobrazení většiny monitorů, a používá se proto masově i na Internetu.

Barevný prostor sRGB navrhla firma Hewlett Packard ve spolupráci s Microsoftem. Vychází z charakteristik běžného monitoru v slabě osvětlené místnosti. Předpokládaný typ osvětlení je standardní CIE iluminant D50 (model pro denní světlo o barevné teplotě 5000 K), úroveň osvětlení místnosti 64 luxů. Okolí obrazovky má uvažovanou odrazivost 20 %, obrazovka sama pak má svítivost 80 cd/m², závoj (flare) 1 % a chromatičnost bílého bodu je nastavená na hodnotu CIE iluminantu D65 (6500 K, trichromatické souřadnice $x = 0,3127$, $y = 0,3290$). Chromatičnost fosforů obrazovky odpovídá standardu ITU-R BT.709/2: R ($x = 0,6400$ a $y = 0,3300$), G ($x = 0,300$ a $y = 0,6000$), B ($x = 0,1500$ a $y = 0,0600$).



Obr. 23 Aditivní a subtraktivní míchání barev

Model RGB si lze zobrazit jako krychli, v jejichž vrcholech jsou černá, bílá, červená, zelená, modrá, azurová, purpurová, žlutá.



Obr. 24 Barvový prostor RGB a CMY

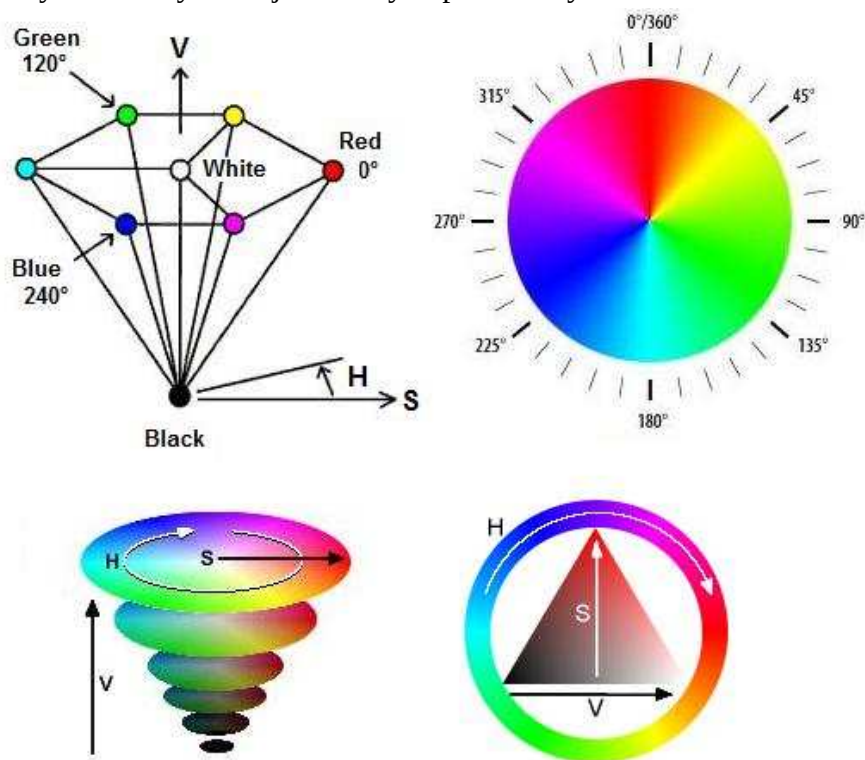
CMYK model je subtraktivní model, založený na odčítání RGB barev při odrazu bílého světla od inkoustů. Přidáním všech inkoustů naplno se vytvoří černá barva, neboli všechno světlo je pohlceno. CMY model je teoreticky inverzní k modelu RGB. Lze ho tedy popsat stejnou krychlí, ale s výchozím bodem v bílé barvě a s inkousty doplňkovými k barvám RGB, tedy CMY (obr. 24). Všechny možné barvy je třeba dosáhnout jinak, a sice krytím bílého papíru inkousty – tedy subtraktivní (odčítací) metodou. Použitím inkoustů s barvami azurová, purpurová a žlutá se podobného efektu dá dosáhnout. V praxi reálné inkousty mají jinou barvu než přesné doplňkové barvy k RGB. Černá barva se přidává pro snazší realizaci tmavých barev. Teoreticky není vůbec nutná, prakticky je ale obtížné vytvořit tak ideální inkousty, aby jejich smícháním vznikla opravdu černá nehledě na ekonomické hledisko.

Pro některé situace, zejména při editaci fotografií případně při grafických návrzích je výhodný barvový model HSB (*Hue, Saturation, Brightness*) orientovaný zejména na uživatele, který vytvořil v roce 1978 Alvy Ray Smith (obr. 25). V literatuře se tento model často označuje jako HSV (*Hue, Saturation, Value*). Jeho přínos je v tom, že odpovídá lidskému vnímání (popisu) barev. Zatímco RGB či CMYK jsou modely založené na míchání barev, HSV model definuje barvy přirozeným způsobem pro člověka a odpovídá na přirozené otázky: Jaká je to barva? Jak je sytá? Jak je světlá či jak je tmavá? Je tedy velmi intuitivní a pro některé případy velmi názorný. Barvový model HSB používá podobně jako model RGB také 3 veličiny pro popis barvy, dává jim ale jiný význam. Odstín, tón barvy (*Hue, H*) popisuje vlastní čistou převládající spektrální barvu (tedy např. červená, zelená, modrá). Pro popis barvy se používá úhel na barevném kole v rozsahu 0–360°. Dohodou se za úhel 0° považuje červená, 120° odpovídá zelené a 240° modré a 360° opět červené. Obecně se odstín označuje názvem barvy, jako je červená, oranžová nebo zelená. Sytost (*Saturation, S*), někdy nazývaná chroma popisuje, jak moc je barva "čistá" tedy bez přimíchání bílé (šedé). Na standardním barevném kole vzrůstá sytost od středu k okrajům kola. Např. červená s 50% sytostí bude růžová. Sytost popisuje vlastnosti barvy ve smyslu přechodu od neutrální šedé k čistému odstínu při stálé hodnotě jasu. Někdy se hovoří i o přechodu od slabého

odstínu k odstínu živému. Čím více má v sobě barva bílé (šedé), tím více čistota tedy sytost barvy klesá. Udává se v procentech, přičemž sytost 100 % znamená jen čistou barvu, sytost 50 % znamená poloviční příměs bílé (šedé) a sytost 0 % potom znamená jen odstín šedé (od bílé po černou), tedy již zcela bez barvy. Jas (*Brightness B*, někdy též *Value V*) popisuje množství bílého světla v rozsahu 0–100 %. Jas je relativní světlost nebo tmavost barvy. Jas vyjadřuje, kolik světla barva odráží, dalo by se také říct přidávání černé do základní barvy.

Prostorový model HSB je odvozen od modelu RGB. Tento model má tvar šestibokého jehlanu, jehož vrchol má černou barvu (K). Hexagon barev neboli podstava tohoto jehlanu vnika promítnutím barev RGB a CMY na rovinu kolmou k úhlopříčce spojující černou a bílou barvu v krychli RGB (obr. 26). Jasová hodnota roste směrem k podstavě, střed podstavy tvoří bílá barva. Sytost je dána vzdáleností bodu od osy jehlanu. Dominantní barvy leží na plášti jehlanu, čisté barvy ($S = 100\%$, $V = 100\%$) jsou u obvodu podstavy. Při pohybu po obvodu ve stejné výši od základny se postupně mění barevný tón, sytost a jas zůstávají nezměněny.

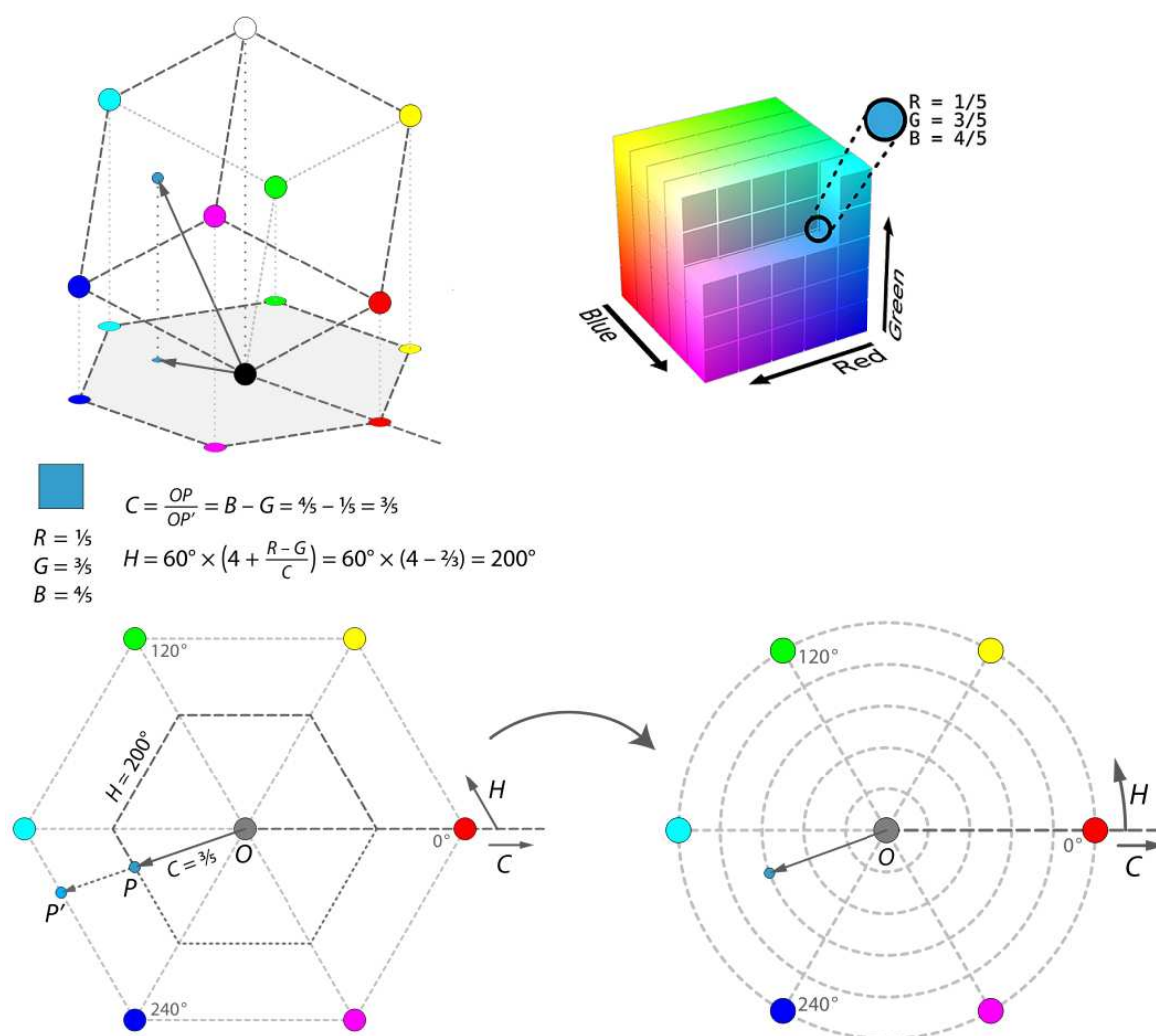
Prostor HSV má určité nedostatky, které mohou ztěžovat práci při přesném určení barvy. K těmto nedostatkům patří jehlovitý tvar modelu (při změně hodnoty H se ve vodorovném řezu pohybujeme po šestiúhelníku, nikoliv po jednodušší kružnici) a nesymetrie prostoru z hlediska jasu. Nesymetrii prostoru HSV z hlediska jasu odstraňuje prostor HSL (*Lightness* – světlost). Prostor HSL je v podstatě obdobou prostoru HSV. Jehlan je v něm nahrazen dvojicí kuželů, což plně odpovídá skutečnosti, že nejvíce různých barev vnímáme při průměrném osvětlení (oblast podstav). Schopnost rozlišit barvy klesá při velkém ztmavení či přesvětlení. V praxi z důvodů jednodušších výpočtů se jehlanový model nahrazuje kuželovým. V této prezentaci je odstín líčen jako trojrozměrné konické tvoření barevného kola. Saturace je reprezentována vzdáleností od centra kruhového průřezu kuželem a hodnota L je vzdálenost od špičatého konce kužele. Prostorové zobrazení modelu HSB je vhodné pro zobrazení celého HSB prostoru v jediném objektu, ale kvůli jeho trojrozměrnému prostředí není vhodný k výběru barvy v dvojrozměrných počítačových rozhraních.



Obr. 25 Barvový model HSB resp. HSV

Chceme-li z nějakého důvodu použít jiný prostor, je nutné obrazová data zkonvertovat tj. patřičným způsobem změnit čísla, která digitální obrázek tvoří. V principu není žádný problém převést obrázek uložený např. v modelu RGB na stejný obrázek uložený v jiném modelu (např. $L^*a^*b^*$). Jedná se o matematický přepočet nejčastěji 3 čísel, které definují barvu každého bodu. Jinými slovy - místo 3 čísel typu RGB u každého bodu (pixelu) budou v novém modelu opět 3 čísla, ale s významem $L^*a^*b^*$. Při praktickém převodu vždy nastane malá ztráta kvality. Jednak různé modely mají obvykle různé gamuty a jednak nutnost zaokrouhlování na celá čísla v reálné 8 bitové reprezentaci provede malé posuny. Posuny způsobené zaokrouhlováním jsou ale prakticky nepostřehnutelné.

Poněkud složitější je situace při převodu RGB či $L^*a^*b^*$ do CMYK. Využití čtvrté barvy (black) dělá převod nejednoznačný a lze tedy převést RGB na CMYK mnoha různými způsoby. V praxi se potom volí způsob, který nejlépe vyhovuje konkrétnímu tiskovému zařízení.



Obr. 26 Projekce odstínu a sytosti barvy z RGB krychle do chromatické roviny tvaru šestiúhelníku. Bílý a černý roh krychle vytváří vertikální osu k šestiúhelníkové rovině, ostatní rohy krychle červený, žlutý, zelený, azurový, modrý, purpurový jsou projektovány do vrcholů roviny šestiúhelníku [42]

Transformace barvy z RGB do HSV prostoru definované hodnotami (*RGB*), kde *R*, *G* a *B* jsou v rozsahu od 0 do 1, hodnota nula je minimální a hodnota jedna je maximální. Ekvivalent dané barvy v prostoru HSV je definovaný následujícími rovnicemi. Pokud *MAX* je rovno maximálním hodnotám *RGB* a *MIN* pak minimálním hodnotám *RGB*, pak [43]

$$H = \begin{cases} \text{nedefinováno,} & \text{pokud } MAX = MIN \\ 60^\circ \times \frac{G - B}{MAX - MIN} + 0^\circ, & \text{pokud } MAX = R, G \geq B \\ 60^\circ \times \frac{G - B}{MAX - MIN} + 360^\circ, & \text{pokud } MAX = R, G < B \\ 60^\circ \times \frac{B - R}{MAX - MIN} + 120^\circ, & \text{pokud } MAX = G \\ 60^\circ \times \frac{R - G}{MAX - MIN} + 240^\circ, & \text{pokud } MAX = B \end{cases}, \quad (8)$$

$$S = \begin{cases} 0, & \text{pokud } MAX = 0 \\ 1 - \frac{MIN}{MAX}, & \text{jinde} \end{cases}, \quad (9)$$

$$V = MAX. \quad (10)$$

Výsledná barva je dána hodnotami (*HSV*), kde *H* je v rozsahu od 0° do 360° a *S*, *V* v rozsahu od 0 do 1. Pokud je hodnota *H* mimo interval např. 480°, pak odečteme 360°, což odpovídá 120° nebo pro -30° je to 330°.

Pokud *MAX* = *MIN* tedy *S* = 0, pak *H* není definované. Barva nemá odstín, jde o šedou. Jestliže *MAX* = 0 tedy *V* = 0, pak *S* je nedefinovaná, neboť barva je čistě černá, tak proto nemá žádný odstín a sytost.

Zpětná transformace do RGB lze provést následujícími vztahy [43]:

$$\begin{aligned} H_i &= [H / 60] \bmod 6 \\ f &= (H / 60) - H_i \\ p &= V(1 - S) \\ q &= V(1 - fS) \\ t &= V(1 - (1 - f)S) \end{aligned} \quad (11)$$

Podle hodnoty *H_i* stanovíme hodnoty RGB takto:

$$\begin{aligned} \text{pokud } H_i = 0 &\rightarrow R = V, G = t, B = p \\ \text{pokud } H_i = 1 &\rightarrow R = q, G = V, B = p \\ \text{pokud } H_i = 2 &\rightarrow R = p, G = V, B = t \\ \text{pokud } H_i = 3 &\rightarrow R = p, G = q, B = V \\ \text{pokud } H_i = 4 &\rightarrow R = t, G = p, B = V \\ \text{pokud } H_i = 5 &\rightarrow R = V, G = p, B = q \end{aligned} \quad (12)$$

Příklad: H = 180°, *S* = 1, *V* = 1

$$H_i = [180 / 60] \bmod 6 = 3$$

$$f = (H / 60) - H_i = 180 / 60 - 3 = 0$$

$$p = V(1 - S) = 1(1 - 1) = 0$$

$$q = V(1 - fS) = 1(1 - 0 \cdot 1) = 1$$

$$t = V(1 - (1 - f)S) = 1(1 - (1 - 0)1) = 0$$

$$(RGB) = (pqV) = (0, 1, 1)$$

Různá zařízení nepopisují barvu a nemanipulují s ní stejným způsobem. Skenery, digitální kamery a počítačové obrazovky definují barvu pomocí složek RGB modelu a tiskové zařízení pomocí složek CMYK modelu. Barvové prostory RGB a CMYK jsou přístrojově závislé. Různá zařízení jsou schopné technicky zobrazit různou barvovou škálu neboli gamut. Systém správy barev (Color Management System – CMS) kompenzuje barevné deformace na jednotlivých zařízeních a řídí proces toku a zpracování digitálních obrazových dat. Roku 1993 vzniklo Mezinárodní konsorcium pro barvu, International Color Consortium, ICC a definovalo základní prvky systému správy barev a požadavky na zařízení, které s tímto systémem pracují. Profil ICC popisuje vlastnosti každého zařízení a dodá ho výrobce nebo si ho uživatel vytvoří sám [39]. Profil ICC obsahuje všechny informace, které systém správy barev potřebuje při zpracování, transformacích a konverzích digitálního barevného obrazu.

Konverze barvových hodnot mezi jednotlivými zařízeními se uskutečňuje ve dvou krocích. Prvním krokem je transformace přístrojově závislých hodnot jednoho zařízení do přístrojově nezávislého barvového prostoru (tzv. Profile Connection Space, PCS). Prostorem PCS je standardní kolorimetrický prostor CIE XYZ nebo CIE $L^*a^*b^*$. V druhém kroku se potom hodnoty standardního barvového prostoru transformují na hodnoty přístrojově závislé zařízení druhého.

ICC standard pro CIE XYZ a CIE $L^*a^*b^*$ coby PCS předpokládá, že hodnoty odpovídají barvám, jak bychom je viděli na předloze odrážející světlo (čili na papírovém obrázku), nasvícené pod úhlem 45° a pozorované ve směru kolmém k předloze při osvětlení o síle 500 luxů standardním iluminantem D50. Tento světelný zdroj modeluje denní světlo o barevné teplotě 5000 K a je běžným standardem při posuzování barev reflexních předloh. Jiné barevné prostory mohou uvažovat odlišné pozorovací podmínky. Mnohé např. předpokládají, že zrak je adaptovaný namísto iluminantu D50 na iluminant D65, modelující denní světlo o barevné teplotě 6500 K (speciálně třeba některé „monitorové“ RGB prostory, protože monitor s bílým bodem nastaveným na 6500 K je jasnější a uživatelé tomuto nastavení často dávají přednost). V takovém případě je potřeba při konverzi z/do CIE XYZ nebo CIE $L^*a^*b^*$ hodnoty současně ještě transformovat tak, aby odpovídaly uvažovaným pozorovacím podmínkám.

2.5 Obrazová analýza s využitím integrálních transformací

Význačnou roli hrají v komplexní analýze obrazu diskrétní integrální transformace, které se dělí na *periodické* (např. Fourierova transformace, sinová, kosinová nebo Walsh-Hadamardova transformace) a *vlnkové* (např. Haarova transformace využívaná při fraktální analýze metodou box counting). Využití obrazových transformací je obecně založeno na tom, že obraz může být vhodnou transformací převeden na tvar, který je pro dané zpracování podstatně výhodnější. Při lineárních (integrálních) transformacích se datům obrazu přiřazují pomocí definované báze jiná data (tzv. spektrum). V těchto spektrech jednotlivé pixely zvýrazňují určité vlastnosti (definované bází) celého původního obrazu. Bitovými operacemi takto získaného spektra lze pak např. odfiltrovat šum (vysoké frekvence) nebo naopak základní motiv obrazu (nízké frekvence), čímž lze snížit množství dat popisujících daný obraz. Na tomto principu jsou založeny ztrátové komprese dat. Pokud je transformace ortogonální¹, lze pomocí inverzní báze dat získat lineární (integrální) transformací původní

¹ Ortogonální báze – báze v euklidovském prostoru, jejíž každé dva vektory jsou na sebe kolmé.

data. Ortogonální transformace je zvláštním případem unitární transformace, kdy prvky transformační matice jsou reálná čísla.

O použití a volbě jistého druhu transformace mohou rozhodovat následující důvody [44]:

- obraz lze ve spektrální (frekvenční) oblasti jednodušeji vyhodnotit,
- ve spektrální oblasti lze provést některé operace (např. filtraci) snadněji než v originální oblasti,
- ze spektrální oblasti lze snadněji vyloučit redundantní složky,
- spektrální reprezentace obrazů může být odolnější při přenosu, než reprezentace originální.

2.5.1 Periodické transformace

Při obrazové analýze se nejčastěji používá diskrétní Fourierova transformace, kosinová transformace a Walsh-Hadamardova transformace. U periodických transformací může být báze tvořena harmonickými ($\sin$, $\cos$), nebo obdélníkovými (sign) funkcemi.

Diskrétní Fourierova transformace (DFT) je lineární ortogonální transformace, pomocí které se transformuje obraz $f(m, n)$, kde $m = 0, 1, 2, \dots, M-1$, $n = 0, 1, 2, \dots, N-1$ jsou souřadnice obrazu o velikosti $M \times N$, na diskrétní spektrum představované komplexní funkcí $F(k, l)$, kde $k = 0, 1, 2, \dots, M-1$, $l = 0, 1, 2, \dots, N-1$.

$$F(k, l) = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} f(m, n) e^{-2\pi j (mk/M + nl/N)}, \quad (13)$$

kde $j = \sqrt{-1}$ je imaginární jednotka. K výpočtu spekter obrazů se často používají algoritmy *rychlé Fourierovy transformace (FFT)* vyžadující počet dat $N = M = 2^i$, kde i je celé číslo. Je-li transformace aplikována na reálná obrazová data, je reálná složka obrazu funkcí sudou, imaginární funkcí lichou. K hodnocení se pak užívá tzv. *modulační přenosová funkce (MTF)*, která je osově symetrická [44]:

$$\text{MTF} = \text{Re}[F(k, l)] + \text{Im}[F(k, l)] \quad (14)$$

Fourierova transformace zachovává symetrii, tedy transformace liché (resp. sudé) funkce je opět lichou (resp. sudou funkcí). Tato skutečnost vyplývá přímo z vlastností báze, které lze rozložit do sudé reálné (kosinová funkce) a liché imaginární (sinové funkce) části [45].

Fourierova transformace se často používá při řešení diferenciálních rovnic na oboustranně neohraničené přímce, kde nezávisle proměnná má význam souřadnice na přímce, běžně se používá ve zpracování signálu, představuje ve své dvojrozměrné verzi důležitý pomocný prostředek i při digitálním zpracování obrazové informace. Pomocí FFT lze posuzovat kvalitu ze srovnání tzv. modulačních přenosových funkcí.

Významná nesinusová ortogonální transformace je *Walsh-Hadamardova transformace* (WHT), její bázi tvoří funkce signum (obdélníková funkce). Walshovy báze funkce jsou uspořádány podle počtu průchodů nulovou úrovní, podobně jako jsou harmonické funkce u Fourierovy transformace seřazeny podle frekvence [38]. Je založena na systému Hadamardových matic s prvky nabývajících pouze hodnot +1 nebo -1 a jejichž příslušné řádky a sloupce jsou navzájem ortogonální. Transformuje reálný obraz $f(m, n)$ na diskrétní spektrum představované reálnou funkcí $F(k, l)$

$$F(k, l) = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} f(m, n) h_{m,k} h_{n,l}, \quad (15)$$

kde $h_{m,k}$ a $h_{n,l}$ jsou koeficienty tzv. Hadamardovy matice $\mathbf{H}_{N(M)}$. Obecná konstrukce symetrické čtvercové ortogonální Hadamardovy matice $\mathbf{H}_2^k$, kde $k = 0, 1, 2, \dots$ lze provést následovně:

$$\mathbf{H}_1 = [1], \quad \mathbf{H}_2 = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 1 & -1 \end{bmatrix}, \quad \mathbf{H}_4 = \begin{bmatrix} \mathbf{H}_2 & \mathbf{H}_2 \\ \mathbf{H}_2 & -\mathbf{H}_2 \end{bmatrix}, \dots \quad \mathbf{H}_{2^k} = \begin{bmatrix} \mathbf{H}_{2^{k-1}} & \mathbf{H}_{2^{k-1}} \\ \mathbf{H}_{2^{k-1}} & -\mathbf{H}_{2^{k-1}} \end{bmatrix}. \quad (16)$$

Existují i Hadamardovy matice jiných řádů než 2^k , ale v digitálním zpracování obrazů se nepoužívají. Pro Hadamardovu matici n -tého řádu platí $\mathbf{H}'_n \cdot \mathbf{H}_n = n \cdot \mathbf{I}$, kde $\mathbf{H}'_n$ je transponovaná matice k $\mathbf{H}_n$, $\mathbf{I}$ je diagonální jednotková matice [44].

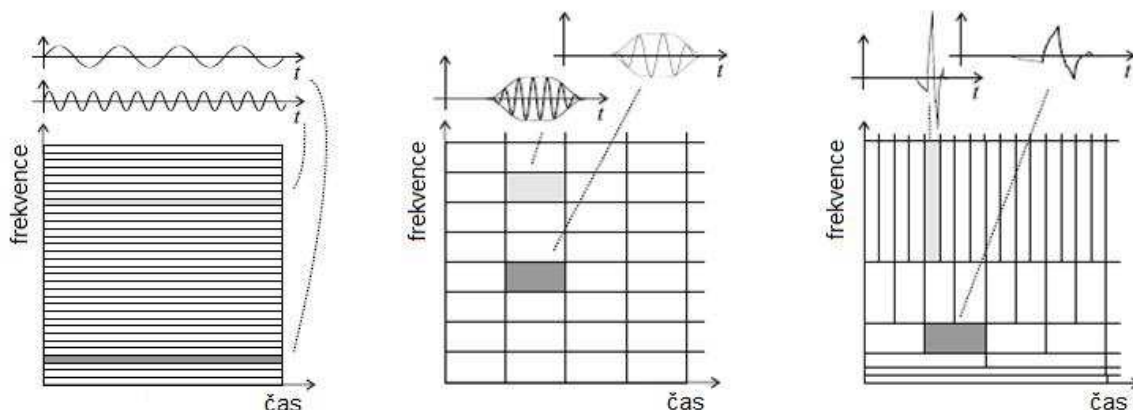
2.5.2 Vlnkové transformace

Vlnková transformace (původně francouzsky *ondulatte transformation*, přeloženo do angličtiny jako *wavelet transform* – WT) není vlastně jedinou transformací; jde o jistý typ transformací se společnými rysy, vzájemně se lišících podle tvaru zvolené báze funkce – mateřské vlnky. Tyto transformace se objevily až roku 1980 v práci A. Grossmanna a J. Morleta jako alternativa ke klasickým typům transformací [46]. Princip vyjádření složitějšího signálu jako lineární kombinace jednodušších báze funkcí, které tvoří ortogonální bázi, zůstává nezměněn, ale tato báze je obecně zvolena tak, aby umožňovala časovou lokalizaci událostí i v získaném spektru. Vlnkové transformace tak umožňují tzv. časově-frekvenční analýzu² 1D signálů [47]. U 2D signálů umožňuje lokalizovat frekvence a jejich výskyt v rovině. Vlnkovou analýzu lze chápat jako „matematický mikroskop“, který umožňuje zkoumat pozorovaná data lokálně (místo od místa) při různém zvětšení optikou mateřské vlnky, kterou si lze zvolit [48].

Vlnkové transformace jsou od všech klasických transformací odlišeny tím, že každá báze funkce je lokalizovaná. To znamená, že je podporována (tj. má nenulové hodnoty) pouze na konečném „relativně malém“ časovém intervalu a její hodnoty mimo tento interval jsou zanedbatelně malé. Vlnka je tedy časově omezený signál, který se objeví, zakmitá a zase zmizí. Tato základní vlastnost vlnkové transformace je fundamentálním rozdílem od ostatních transformací, kde se používají nekonečné harmonické signály (sinusovky apod.) např. Fourierově transformaci s jejími harmonickými báze funkcemi, jež jsou nenulové na celé časové ose, takže každá spektrální hodnota je ovlivněna úplným průběhem signálu teoreticky oboustranně neomezeného trvání. Jestliže se v nějakém místě signálu $f(t)$ objeví

² Nezávisle proměnnou samozřejmě nemusí být čas, ale i v různých aplikacích jde např. o polohu, dráhu atd.

lokální oscilace představující zvláštní znak signálu, přispěje tato oscilace k vypočtené Fourierově transformaci, ale její pozice na časové ose bude ztracena. Fourierova transformace je tedy vhodná pro popis stacionárních signálů. Vlnkové báze funkce pokrývají po částech celý časový rozsah analyzovaného signálu, takže úplná informace je zachována.



Obr. 27 Porovnání Fourierovy, krátkodobé Fourierovy a vlnkové analýzy; pokrytí časově frekvenční plochy [49]

Pokud jde o schopnost časové lokalizace událostí ve spektru, vlnkové transformace představují alternativu ke krátkodobé verzi Fourierovy transformace (*short time Fourier transform* – STFT) s posouváním časovým oknem – Gabor-Fourierově transformaci, v diskrétní podobě známé pod označením spektrogram [47]. Při této transformaci je použito okno, které v čase ohraničí krátký úsek signálu a umožní z něj určovat spektrum v daném časovém intervalu. Z obdoby Heisenbergova principu neurčitosti vyplývá, že nelze současně přesně určit frekvenci a polohu jejího výskytu v čase. Proto má uvedené řešení pro časově konstantně široké okno pro všechny kmitočty velkou rozlišitelnost ve frekvenci a malou v čase a naopak pro časově úzké okno velkou rozlišitelnost v čase a malou ve frekvenci. Ideou vlnkové transformace je vhodnou změnou šířky okna v čase a jeho tvarem dosáhnout optimálního poměru rozlišitelnosti v čase a frekvenci. Pro nízké frekvence je okno širší, pro vysoké užší, a proto nižší frekvence jsou lépe rozlišeny frekvenčně a vyšší časově (obr. 27). Vlnková transformace navíc odstraňuje další nevýhodu všech metod časově frekvenční analýzy založených na Fourierově transformaci, které používají harmonických časově neomezených báze funkcí. Tou je potřeba velkého počtu harmonických složek pro vyjádření strmých přechodů v čase. Signály často obsahují ostré hrany, impulsy nebo nespojitosti a k jejich vyjádření ve Fourierově spektru (nebo jiných klasických spektrech) je třeba mnoha spektrálních koeficientů. Naproti tomu, vlnky jsou generované časovou dilatací z jediného vzorku, takže současně s prodlužováním jejich délky klesá frekvence vnitřních oscilací. Vyjádření krátkodobých složek signálu časově omezenými báze funkcemi je snazší a vede k menšímu počtu aktivních složek ve spektru než v případě harmonických báze funkcí.

Vlnková transformace používá korelaci vstupního signálu s různě roztaženými verzemi mateřské vlnky a detekuje podobnost vstupního signálu s různě roztaženými verzemi mateřské vlnky. Základem vlnkové transformace je tedy umístění vlnky na část nebo celý průběh signálu. K tomu je potřeba změnit měřítko ve vodorovné ose (frekvence), ve svislé ose (amplituda) a posunout vlnku ve vodorovné ose (poloha). Takto vzniknou koeficienty, které signál určují. Tyto parametry se označují jako měřítková funkce $\phi(t)$ (*scaling fiction*,

father wavelet). Vlnková transformace tedy zpracovává signál pomocí translací a dilatací jisté základní funkce. Podle použitých koeficientů lze tyto translace a dilatace hierarchicky uspořádat do stromové struktury, kde vynikne schopnost vlnkové transformace analyzovat signál na různých úrovních rozlišení. Tato struktura umožňuje velmi rychle provádět přímé i inverzní vlnkové transformace. Původně se používala jedna vlnka pro celý proces analýzy, dnes se ale provádí testování více různých vlnek, takže přibyla ještě informace o druhu vlnky. Tvar vlnky je popsán tzv. vlnkovou báзовou funkcí $\psi(t)$.

Bázové funkce nejsou u vlnkové transformace přesně předepsány. Změnou průběhu báзовých funkcí můžeme měnit vlastnosti transformace podle požadavků, které jsou v řešení aplikace kladeny. Výběr tvaru vlnek sice skýtá velký stupeň volnosti, přesto však musí vlnky tvořící transformační bázi splňovat jisté poměrně přísné požadavky. Na vlnku jsou kladeny tři základní požadavky: hladkost, rychlý pokles v nekonečno a co možná nejvyšší počet nulových momentů. Vlnkou může být každá funkce s nulovou střední hodnotou, díky které má průběh, který vyjadřuje pomalejší nebo rychlejší změnu. Teorie návrhu vlnek je založena na dosti náročné matematické teorii, existuje však řada standardních typů vlnek (Haarovy, Daubechiesové, biortogonální, tzv. coiflety nebo symlety apod.), jejichž vlastnosti jsou podrobně popsány a které pokryjí většinu běžných potřeb analýzy a zpracování signálů [47]. Některé vlnkové báze mají fraktální strukturu (např. Daubechies skupina) a poskytují velmi přirozený způsob analyzování fraktálů [50]. Vlnky Daubechies mají také konečný počet nenulových prvků, což odpovídá filtrům typu FIR (*finite impulse response*). Impulsní odezvy těchto filtrů udávají frekvenční charakteristiky horní a dolní propusti, které jsou použity při transformaci pomocí banky filtrů. Všeobecně je dáována přednost biortogonálním vlnkám, tj. bankám rozkladových a rekonstrukčních filtrů se symetrickými impulsními charakteristikami. Impulsní odezvou je myšlena výstupní posloupnost hodnot, která vznikla jako reakce filtru na vstup jediné jednotkové hodnoty ve vstupní posloupnosti. Biortogonální báze jsou takové, z nichž jedna je lineárním zobrazením druhé a které vzájemným vynásobením tvoří jednotkovou matici. Skupina těchto vlnek umožňuje odvodit důležité vlastnosti, které potřebujeme pro rekonstrukci signálu či obrazu. Místo jednoduché vlnky se používají dvě vlnky, jedna pro rozklad a druhá pro rekonstrukci.

Vlnková transformace našla za poslední desetiletí široké uplatnění v řadě oblastí, např. filtraci signálů (potlačování šumu) a obrazů, jejich analýze (popis obrysů objektů) či kompresi. Podle aplikace se používají různé modifikace vlnkové transformace. Při filtraci se nejčastěji využívá dyadická vlnková transformace (DWT) s reálnými vlnkami (ortogonální či biortogonální) a to jak s podvzorkováním, tak i bez podvzorkování. Varianta DWT do jedné úrovně bez podvzorkování je vhodnější pro filtraci, ovšem za cenu větší výpočetní náročnosti, protože se jedná o redundantní transformaci. Vlnková transformace se dá využít nejen ke kompresi, ale i na zrychlený přenos kvalitních obrazů v pomalejších sítích, jako je v dnešní době Internet. Princip takového přenosu spočívá v první fázi v přenosu jen velice malého počtu vlnkových koeficientů obrazu, ze kterých se rekonstruuje jeho rozmazaná, přibližná verze. S postupem času postupně přibývají koeficienty, pomocí kterých se doplňují detaily v tomto rozmazaném obraze.

2.5.3 Spojité vlnkové transformace

Spojitá vlnková transformace (*continuous wavelet transform* – CWT) je definovaná jako

$$S_{CWT}(a, b) = \int_{-\infty}^{\infty} s(t) \psi_{a,b}(t) dt \quad (17)$$

$$\psi_{a,b}(t) = \frac{1}{\sqrt{a}} \psi\left(\frac{t}{a} - b\right), \quad a > 0, b \in \mathbb{R}. \quad (18)$$

Pro $\psi(t)$ musí platit

$$\int_{-\infty}^{\infty} \psi(t) dt = 0.$$

Hodnoty spektra (koeficienty) dvojrozměrné funkce $S_{CWT}(a, b)$ dvou reálných proměnných a a b , jež představují polohy b a šířky a vlnkových impulzů, jsou dány korelačním integrálem mezi analyzovaným signálem $s(t)$ jedné reálné proměnné a vlnkovou bázovou funkcí $(1/\sqrt{a})\psi(t/a - b)$, již je konkrétní vlnka vygenerovaná ze základní mateřské vlnky ψ . Množina funkcí $\psi_{a,b}(t)$ tvoří ortogonální bázi a $\psi_{a,b}(t)$ se nazývají dceřiné vlnky. Aplikací CWT tedy získáme řadu koeficientů vyjadřujících podobnost signálu a vlnky. Charakteristickou vlastností všech vlnových transformací je, že základní předpis vlnky tzv. základní mateřská vlnka ψ , je stejný pro všechny vektory (a, b) . Parametr a , označovaný jako měřítko vlnky, mění šířku vlnky, a tedy ovládá časovou dilataci funkce; podělení činitelem $\sqrt{a}$ zajišťuje zachování energie vlnky. Volbou měřítka a lze, také řídit rozsah frekvencí, pokrývaný ve spektru konkrétní vlnkou. Malá hodnota měřítka a odpovídá rychle se měnícím detailům a tedy vyšším frekvencím, a naopak velká hodnota nízkým frekvencím. Parametr b ovlivňuje časový posun funkce podél časové osy, mění polohu na časové ose (translace) dceřiné vlnky vůči mateřské vlnce. Změna tohoto parametru umožňuje postupně pokrýt vlnkami určitého konečného trvání celý časový rozsah signálu. Identifikace časového umístění spektrálních hodnot je ovšem možná s přesností, odpovídající délce konkrétního signálu. Translací a dilatací mateřské vlnky, která odpovídá konkrétní bázi lze vytvořit skupinu základních funkcí mající analogický tvar. Další detaily o CWT lze nalézt v [51–54].

Algoritmus CWT je následující:

1. Zvolená vlnka se umístí na počátek signálu a vypočte se koeficient CWT.
2. Vlnka se posune o předem určený krok doprava a spočítá se koeficient.
3. Tento postup se opakuje až do dosažení konce signálu.
4. Změníme měřítko vlnky (roztáhneme nebo smršτίme) a opakujeme kroky 1 až 3.
5. Krok 4 opakujeme pro všechna zvolená měřítka.

Pokud má být transformace invertibilní, bázové funkce musí být vzájemně ortogonální a musí mít nulovou střední hodnotu.

2.5.4 Diskrétní vlnkové transformace

Pro získání diskrétní spektrální reprezentace (*discrete wavelet transform* – DWT) je nutné dvojdimenzionální spojitou transformaci vzorkovat. K tomuto účelu se používá dyadické vzorkování, při němž uzlové hodnoty parametrů jsou dány jako

$$a = 2^j, b = a k = 2^j k \quad \text{pro } j, k \text{ celé číslo, } j \geq 1$$

pak

$$\psi_{j,k}(t) = \frac{1}{\sqrt{2^j}} \psi\left(\frac{t}{2^j} - 2^j k\right), \quad (19)$$

kde j určuje měřítko, k polohu. Měřítko a je tedy vzorkováno v dyadické posloupnosti, zatímco časová osa b je dělena rovnoměrně. Vzorky spektra nesou v takto stanovených bodech (obr. 28) úplnou informaci o originálním signálu, který tedy může být dokonale rekonstruován na základě těchto diskrétních koeficientů spektra. Hustota vzorkování spektrálních hodnot v čase se zmenšuje se vzrůstajícím měřítkem a . Díky ortonormalitě³ pak takto zvolená vlnka umožňuje neredundantní dekompozici signálu, tzv. analýzu s mnoha rozlišeními neboli víceúrovňovou analýzu (*multiresolution analysis* – MRA; *decomposition*). Tato analýza je vhodná pokud signál obsahuje krátkodobě vysoké frekvence a dlouhodobě nízké frekvence. Vlnková funkce ψ má charakter pásmové propusti a určuje detaily signálu. Měřítkové funkce ϕ (*scaling fiction, father wavelet*) představuje komplementární dolnofrekvenční propust, a pomocí ní se získává aproximace signálu.

Podobně jako u vlnky musí měřítková funkce ϕ splňovat podmínku přípustnosti

$$\int_{-\infty}^{\infty} \phi(t) dt = 1 \quad (20)$$

Další krok při vývoji dyadické diskrétní vlnkové transformace (DWT) je vzorkování analyzovaného signálu konečného trvání se vzorkovací periodou T , které lze interpretovat jako důsledek použití vzorkovaných vlnek namísto spojitých. Definiční integrál je tak ovšem nahrazen součtem. Obvykle se pak pracuje s proměnnými indexy j, k , náležejícími k dyadickému schématu [47].

$$S_{DWT}(j, k) = \sum_{n=0}^{N-1} s_n(t) \psi_{j,k}(t), \quad (21)$$

kde $s_n = s(nT)$ jsou vzorky signálu, $(1/\sqrt{2^j})\psi(t/2^j - 2^j k)$ je bazová funkce diskrétní vlnky, jež je v měřítku 2^j , N je počet vzorků signálu. Diskrétní spektrum má celkem N hodnot, včetně střední hodnoty signálu a počet spektrálních koeficientů na určité úrovni je $N/2^{j+1}$.

Důležitou roli představují tzv. nulové momenty. Vlnka $\psi(t)$ má k nulových momentů jestliže

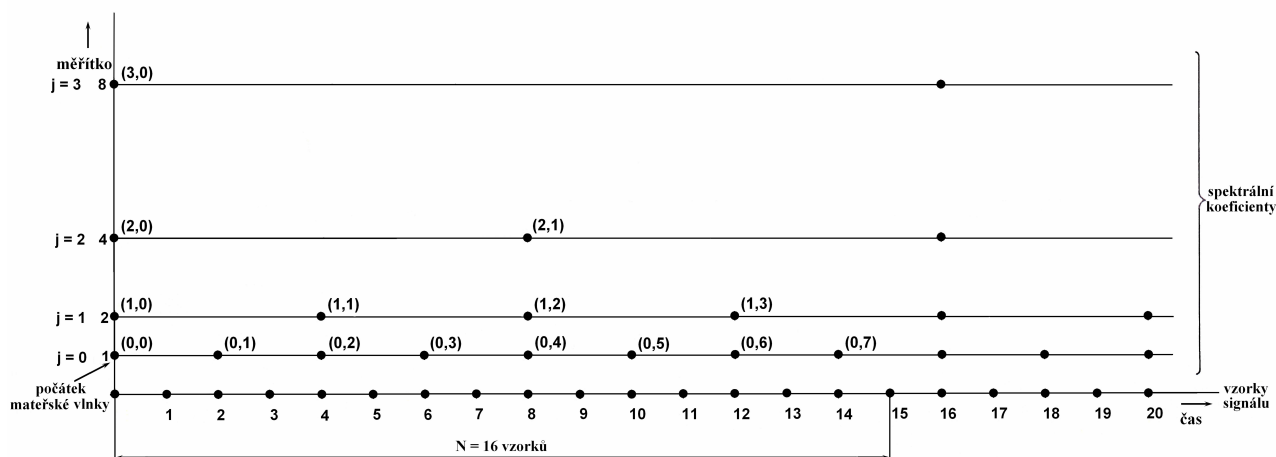
$$\int_{-\infty}^{\infty} \psi(t) t^i dt = 0 \quad (22)$$

pro $i = 0, 1, \dots, k-1$. Každá přípustná vlnka má alespoň jeden nulový moment. Má-li vlnka $\psi(t)$ k nulových momentů, pak všechny polynomy až do řádu $k-1$ lze vyjádřit jako lineární kombinace posunutí měřítkových funkcí $\phi(t-k)$, kde k je celé číslo. Znamená to, že

³ Ortonormální báze – báze v euklidovském prostoru, jejíž každé dva vektory jsou na sebe kolmé a každý vektor je jednotkový.

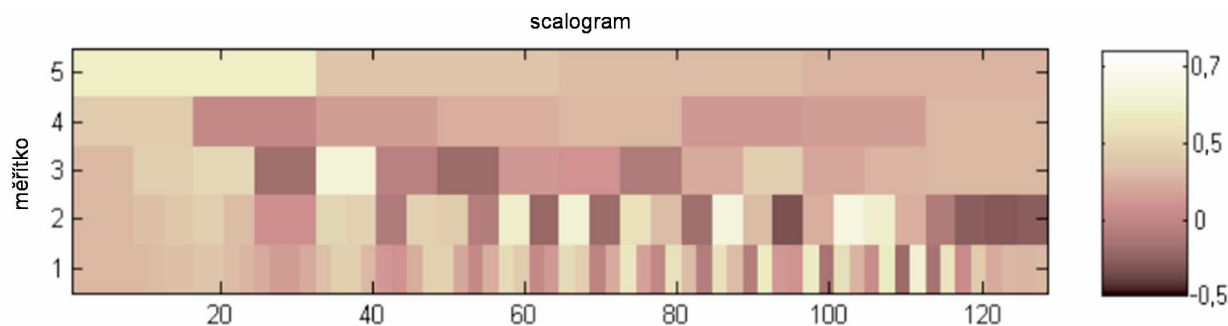
pokud podrobíme analýze s mnoha rozlišeními polynom $p(t)$ řádu nejvýše $k-1$, všechny vlnkové koeficienty $c_{j,k} = \langle p, \psi_{j,k} \rangle$ budou nulové pro $j \geq 0$. Pokud by se v signálu hladkého charakteru vyskytla „singularita“, odrazila by se tato skutečnost v analýze s vícenásobným rozlišením tím, že pouze v místě příslušné této singularity by koeficienty $c_{j,k}$ pro $j \geq 0$ byly nenulové.

S počtem nulových momentů je úzce spjatá tzv. hladkost vlnky. Hladkost udává číslo, kolikrát může být funkce diferencovatelná. Čím větší je počet nulových momentů, tím větší hladkost vlnka disponuje.



Obr. 28 Dyadické vzorkování v prostoru měřítko – čas [47]

Grafické vyjádření vlnkových koeficientů v rovině (b, a) se nazývá scalogram nebo vlnková mapa (*wavelet map*, obr. 29). Scalogram sděluje časově-frekvenční lokalizaci vlastností DWT. Frekvenční osa je obvykle označena jako měřítko. Souvislost mezi měřítkem a frekvencí detekovaných složek se musí stanovovat pro každou vlnku zvlášť. Doporučeným postupem je nalezení měřítka, při kterém nastává maximum vlnkových koeficientů při transformaci sinusovky referenční frekvence. U některých vlnek je souvislost přímá (Mexican hat, Morlet), u jiných (Daubechies) je vztah diskutabilní [55].



Obr. 29 Zobrazení vlnkových koeficientů po dekompozici do páté úrovně. Dlouhá okénka v 5. úrovni poskytují nejlepší frekvenční rozlišení. Úzká okénka v 1. úrovni mají nízké frekvenční rozlišení, ale dobré rozlišení časové. V grafu je každý vlnkový koeficient rozkladu zobrazen jako barevný obdélník, jehož barva odpovídá frekvenci koeficientu [56]

2.5.5 Realizace vlnkových transformací bankami filtrů

Dyadické DWT a IDWT jsou častěji formulovány v podobě rychlých algoritmů, realizovaných jistým typem bank filtrů. Tato realizace umožňuje prakticky užitečnou interpretaci spektrálních hodnot jako hierarchické dekompozice signálu a současně umožňuje také zavedení částečných (neúplných) transformací. Z hlediska číslicového zpracování signálu je možné počáteční vlnkovou funkci ψ považovat za dolnoproustný filtr s mezní frekvencí v polovině normalizovaného frekvenčního rozsahu, která je závislá na měřítku mocninou dvou [57]. S rostoucím měřítkem roste šířka pásma tohoto filtru. Dekompozici signálu lze pak provádět dvojicí zrcadlově kvadraturních filtrů (QMF), z nichž jeden je typu dolní propust h (*scaling filter; otcovský wavelet*), druhý horní propust g (*wavelet filter*). Pár kvadraturních filtrů, které mají komplementární propustná pásma lze chápat jako ortonormální jádro transformace. Podle výchozí formulace vlnky jsou určeny filtry h a g . Nejčastěji je z měřítkové funkce ϕ odvozen měřítkový filtr, který má charakter dolní propusti. Po normalizaci podělením normou poskytne koeficienty dolnoproustního filtru h . K němu se vypočítá horní propust g jako komplement (kvadraturní zrcadlový filtr). Impulsní charakteristiku odpovídající dolní propusti lze vytvořit jako

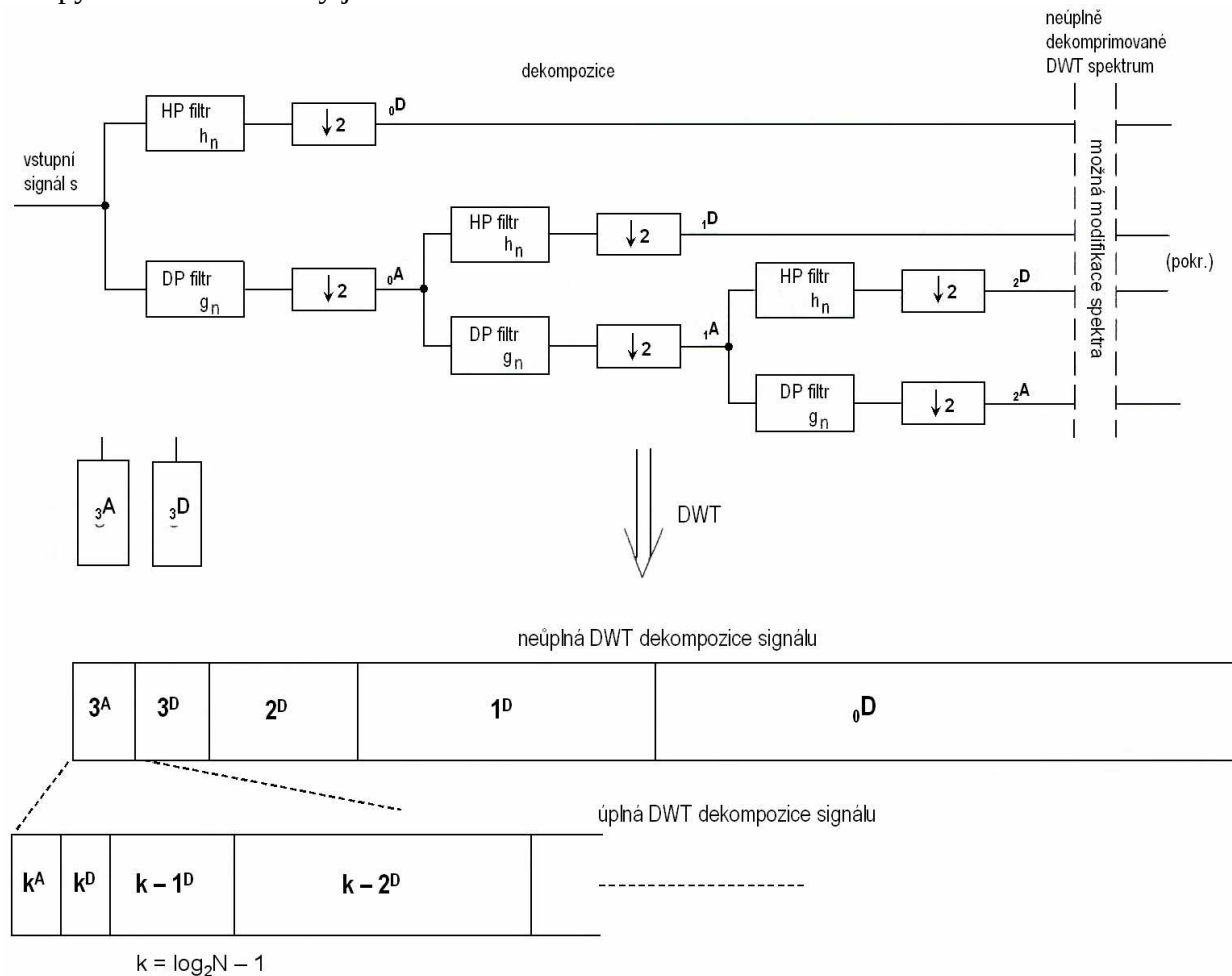
$$g_0(n) = (-1)^n h_0(M_0 - 1 - n), \quad (23)$$

, kde index nula znamená nulová úroveň a M_0 je skutečná délka filtru na úrovni nula. Filtry s konečnou impulsní charakteristikou (tj. typu *finite impulse response* – FIR) jsou přesně definovány N hodnotami této charakteristiky, které tvoří současně vektor systémových konstant $\mathbf{h} = [h_n]$, kde $n \in \langle 0, N-1 \rangle$.

V praxi však nikdy nelze dosáhnout toho, abychom získali kvadraturní zrcadlové filtry ideálního průběhu. Různým vlnkám odpovídají rozdílné délky impulsních odezev $h(n)$ a $g(n)$. Některé mají dokonce nekonečně mnoho koeficientů, jiné, např. vlnky Daubechies mají konečný počet prvků, což odpovídá filtrům typu FIR. Impulsní odezvy těchto filtrů udávají frekvenční charakteristiky horní a dolní propusti. U vlnek vyššího řádu (větší délky impulsní charakteristiky neboli většího počtu koeficientů filtru) dochází k menšímu vzájemnému překrytí spekter a tím i k menšímu aliasingu. Lze tedy poznamenat, že s rostoucím řádem vlnky dochází ke zvýšení strmosti modulových kmitočtových charakteristik a tím i k lepšímu oddělení pásem dolní a horní propusti. Filtr dolní propusti přenesse nízké frekvence a potlačí vysoké frekvence (detaily, šum), ale nezmění počet vzorků v signálu. Horní propust je filtr odstraňující z obrazu složky nízkých prostorových kmitočtů a původní stejnosměrnou složku.

Dolní propust poskytuje vzorky označované jako aproximační koeficienty (cA) a horní propust detailní koeficienty (cD) na úrovni nula. Získáme tak však dvojnásobný počet dat. To je dvakrát více než potřebujeme pro reprezentaci signálu. Výstupy obou filtrů jsou podvzorkovány na polovinu vstupních vzorků. To lze učinit proto, že filtrovaný signál obsahuje vždy polovinu frekvenčního spektra originálu. Při operaci podvzorkování (decimace; označení „ $\downarrow 2$ “) se zachovávají pouze sudé vzorky a vypustí se liché. Díky decimaci je celkový počet koeficientů po jednom kroku filtrace roven původnímu počtu vzorků signálu N . Koeficienty aproximace lze dále analyzovat shodným rozkladem filtry a obdržet tak další soubor koeficientů aproximace a detailů vyšších řádů. Na každé další úrovni je počet výstupních vzorků poloviční ve srovnání s předchozí úrovní. Při každém dalším řádu této operace se zdvojnásobuje měřítko (při prvním řádu máme měřítko 2^1 při n -tém řádu 2^n). Tak lze pokračovat až do vyčerpání vstupní sekvence. V žádné filtrační úrovni se neztrácí informace, je možné zastavit proces dekompozice v kterékoli vhodné úrovni. V aplikacích je

časté, že aproximaci na určité úrovni není třeba dále analyzovat, nebo dokonce, že tato aproximace je právě tím, co potřebujeme jako vhodný popis signálu. Výhodou realizace DWT pomocí popsané banky filtrů je, že umožňuje neúplnou diskrétní vlnkovou transformaci. Reprezentace signálu, který je popsán svým aproximačním vektorem a vektory detailu je označována jako hierarchická dekompozice signálu. Na konci pyramidového algoritmu získáme vlnkový rozkladový strom (*wavelet decomposition tree*). Postup filtrace pomocí tzv. pyramidové struktury je znázorněn na obr. 30.



Obr. 30 Dyadická DWT-dekompozice signálu [47]

Jednotlivé konvoluce s decimací lze formulovat následujícími vzorci [57]:

$$cA_{p+1}(k) = \sum_{m=1}^N h(m-2k)cA_p(m)$$

$$cD_{p+1}(k) = \sum_{m=1}^N g(m-2k)cA_p(m),$$
(24)

kde cA_p , cD_p jsou koeficienty aproximace resp. detailů měřítka $p \in \langle 0, P \rangle$ a N je délka vstupní sekvence cA_p , $cA_0 = f(n)$.

Při vlnkové svazkové transformaci (*wavelet packet transform*; WPT), která je zobecněním vlnkové transformace, je do vyšších řádů rozkládána aproximace i detail.

Pokud analyzujeme signál s počtem vzorků N , dostáváme podle algoritmu popsaného výše N koeficientů. Protože nedochází ke ztrátě informace, je popis neredundantní. Protože je popis úplný lze stanovit i inverzní transformaci. Operace podvzorkování se nahradí operací převzorkování (za každý vzorek se dá nula či interpolační hodnota mezi dvěma následujícími vzorky a umístí se mezi původní vzorky tak, aby se nacházely na lichých pozicích) a místo původních filtrů se použijí rekonstrukční filtry.

2.5.6 Haarova transformace

Haarova transformace je nejjednodušší dyadická diskretní vlnková transformace ze třídy vlnkových transformací. V roce 1909 našel A. Haar ortonormální systém a poprvé použil základní myšlenku vlnkové teorie: popisovat prostory funkcí pomocí celočíselných translací a dyadických dilatací jedné jediné funkce. Dyadickou dilatací funkce se rozumí násobení argumentu této funkce nějakou mocninou čísla 2. Haarova transformace je podobná Hadamardově transformaci v tom, že má pravoúhlé (po částech konstantní) bázové funkce. Haarova vlnka představuje velmi jednoduchou vlnku, která ale neumožňuje hladkou rekonstrukci signálu. Bývá často nazývána Daubechies řádu 1. Haarova vlnka je nespojitá a její průběh připomíná skokovou funkci, dále je symetrická, má kompaktní nosič a je ortogonální.

Bázové funkce vlnky jsou [58]:

$$\psi_{j,k}(t) = \frac{1}{\sqrt{2^j}} \psi\left(\frac{t}{2^j} - 2^j k\right) \quad (25)$$

kde

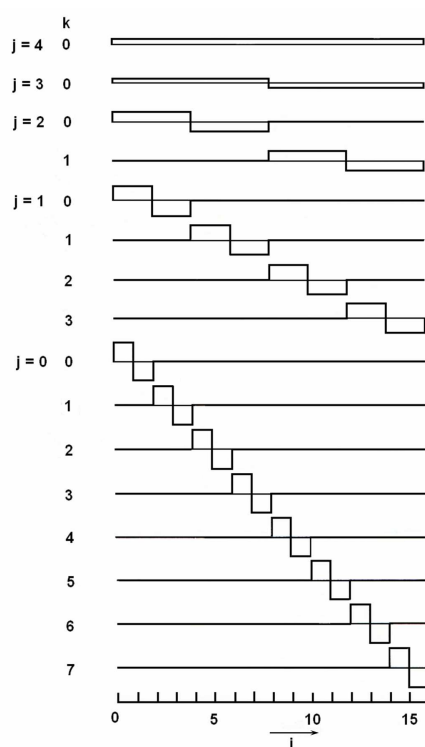
$$\psi(t) = \begin{cases} 1 & 0 \leq t < 1/2 \\ -1 & \text{pro } 1/2 < t < 1 \\ 0 & \text{jinak} \end{cases} \quad (26)$$

Haarova transformace využívá nesymetrické Haarovy matice, jejíž prvky jsou 1, -1 násobené mocninami $\sqrt{2}$ nebo 0. Jádro této transformace je pro $N = 1, 2, 4, 8$ [59]:

$$\mathbf{H}_1 = 1, \mathbf{H}_2 = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 1 & -1 \end{bmatrix}, \mathbf{H}_4 = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 \\ \sqrt{2} & -\sqrt{2} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \sqrt{2} & -\sqrt{2} \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{H}_8 = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & -1 \\ \sqrt{2} & \sqrt{2} & -\sqrt{2} & -\sqrt{2} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \sqrt{2} & \sqrt{2} & -\sqrt{2} & -\sqrt{2} \\ 2 & -2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 2 & -2 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & -2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & -2 \end{bmatrix}, \dots$$

Jednotlivé řádky reprezentují tzv. báze funkce, na něž se rozkládá transformovaný signál. První řádek matice definuje střední hodnotu signálu a ostatní báze funkce udávají váhové a časově různě rozsáhlé a různě posunuté rozdíly průměrů vzorků. Jsou to: ve druhém řádku rozdíl mezi levou a pravou polovinou signálu, ve třetím resp. čtvrtém řádku rozdíl mezi první a druhou čtvrtinou, resp. mezi třetí a čtvrtou čtvrtinou signálu atd. Posledních $N/2$ řádků poskytuje rozdíly mezi dvěma po sobě jdoucími vzorky ve všech $N/2$ možných posunutých pozicích. Výsledné hodnoty transformace (tzv. koeficienty transformace) tak mohou být interpretovány jako časově posunuté difference s různým časovým měřítkem [47]. Haarovy báze funkce mohou být také interpretovány jako soubor ortonormálních vlnek s různým časovým měřítkem (funkci, jejichž různé formy získáme roztažením nebo stlačením podle časové osy). Vlnkové koeficienty v matici jsou uspořádány tak, že liché sloupce obsahují uspořádání vlnkových koeficientů tak, že se chovají jako vyhlazující filtr, a řádky obsahují uspořádání vlnkových koeficientů s různým znaménkem, které slouží k odkrytí datových detailů.



Obr. 31 Báze funkce Haarovy transformace [59]

Na obrázku 31 lze vidět skupinu Haarových vlnek, umožňující analýzu konečného úseku signálu. Posledních osm řádků reprezentuje vlnky pro $a = 1$ s časovým posunem b , který se zvětšuje od 0 do 7 v krocích po 1, vyšší čtyři řádky jsou vlnky pro $a = 2$ a $b = 0, 2, 4, 6$, atd. První řádek složí k výpočtu střední hodnoty signálu jako prvního spektrálního koeficientu, je v jistém smyslu doplňkem maximálně dilatované vlnky s $a = 8, b = 0$ na druhém řádku [47].

Jednodimenzionální Haarova transformace

Mějme danou posloupnost $\{s_n\}_{n=1}^N = \{s_1, s_2, \dots, s_N\}$. Pak při každé úrovni rozkladu zadané posloupnosti pomocí Haarovy funkce lze získat $N/2$ koeficientů v obou větvích dekompozičního rozkladu. První větev slouží k detekci rychle proměnných složek signálu a příslušné vlnkové koeficienty se určují ze vztahu:

$$d_n = \frac{s_n - s_{n+1}}{2}, \quad n = 1, 2, \dots, N. \quad (27)$$

Rovnice - vlnková funkce odpovídá vysokofrekvenčnímu filtru (*HP-filter*) a lze z ní vypočítat vlnkové koeficienty d_n (rozdíly). Detailní data jsou většinou malá čísla.

Druhá větev slouží k detekci pomalu proměnných složek signálu a příslušné koeficienty („*scaling coefficients*“) se určují pomocí vztahu:

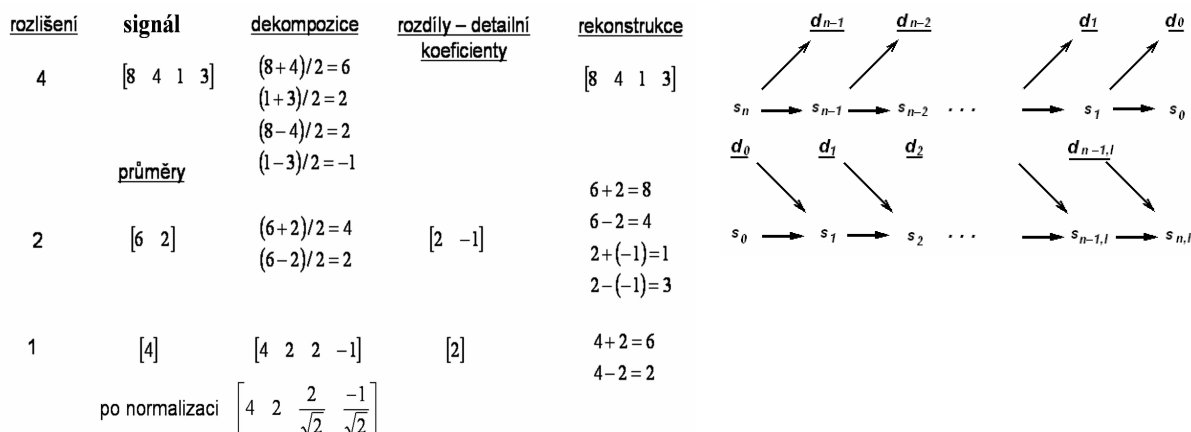
$$a_n = \frac{s_n + s_{n+1}}{2}, \quad n = 1, 2, \dots, N. \quad (28)$$

Rovnice – měřítková funkce odpovídá nízkofrekvenčnímu filtru (*LP-filter*) a lze z ní vypočítat koeficienty a_n (průměry). Průměry dávají reprezentaci signálu s hrubším rozlišením a rozdíly informaci potřebnou k vrácení hrubé reprezentace zpět na originální signál. Pokud originální signál má nějakou místní souvislost, například pokud prvky mají hodnoty hladce se měnící funkce, pak hrubá reprezentace bude téměř podobná originálnímu signálu a detail je velmi malý a tak může být vhodně reprezentován. Nejhrubší hladina signálu obsahuje jen jeden prvek, který je průměrem všech prvků originálního signálu, například nulová frekvence signálu.

Získané koeficienty a_n se stávají vstupem do dalšího kroku vlnkové transformace. V případě, že $N = 2^L$ je tedy možný rozklad do L úrovní. Původní posloupnost N prvků je nahrazena vypočítanou řadou koeficientů v tomto pořadí: poslední vektor a_L , následován řadou koeficientů, jejichž velikost vektorů je vzrůstající mocninou dvou ($2^0, 2^1, 2^2, \dots, N/2$).

Pro následnou rekonstrukci po dekompozici do první úrovně lze z těchto rovnic získat původní signál pomocí vztahů:

$$\begin{aligned} s_n &= a_n + d_n \\ s_{n+1} &= a_n - d_n \end{aligned} \quad (29)$$



Obr. 32 Příklad dekompozice 1D signálu

2.5.7 Vícerozměrné signály

Běžně se používají transformace signálů jednorozměrných. Při transformaci obrázku, který je signálem dvourozměrným, je nutné transformaci přizpůsobit. Lze postupovat dvěma způsoby. Buď nadefinujeme dvourozměrnou transformaci, nebo aplikujeme jednorozměrnou transformaci nejprve na řádky, resp. sloupce matice dvourozměrného signálu a následně na sloupce, resp. řádky matice dvourozměrného signálu.

Maticové vyjádření přímé dvojrozměrné diskrétní lineární transformace obrazu, který je reprezentován maticí celých čísel $\mathbf{f}$ a má rozměry $M \times N$ je součin matic [38]

$$\mathbf{F} = \mathbf{P} \mathbf{f} \mathbf{Q}, \quad (30)$$

kde $\mathbf{P}$ a $\mathbf{Q}$ rozměru $M \times M$, resp. $N \times N$ jsou transformační matice.

Pomocí součtů lze vztah vyjádřit jako

$$F(u, v) = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} P(u, m) f(m, n) Q(n, v), \quad (31)$$

kde $u = 0, 1, \dots, M-1$; $v = 0, 1, \dots, N-1$ jsou diskretizované prostorové frekvence.

Pro regulární (tj. mají nenulové determinanty) matice $\mathbf{P}$ a $\mathbf{Q}$ lze zapsat inverzní transformaci

$$\mathbf{f} = \mathbf{P}^{-1} \mathbf{F} \mathbf{Q}^{-1}. \quad (32)$$

Rychlou vlnkovou transformaci matice dat $\mathbf{F} \in \mathbb{R}^{M,N}$ ve dvou dimenzích s hloubkou λ_M v první dimenzi a s hloubkou λ_N v druhé dimenzi lze definovat [60]

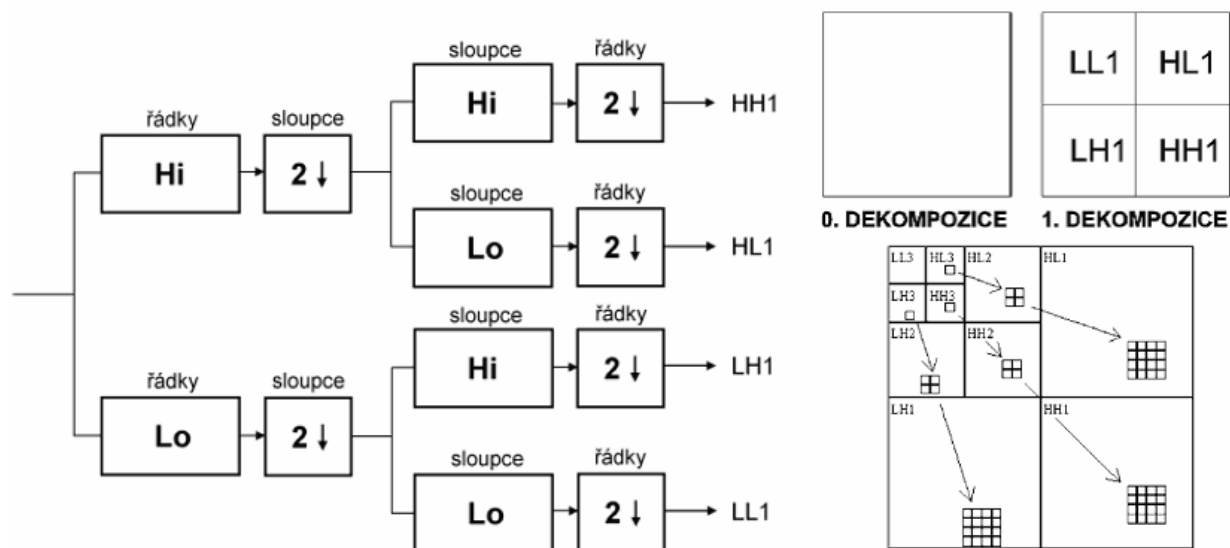
$$\mathbf{Y} = \mathbf{W}^{\lambda_M} \mathbf{F} (\mathbf{W}^{\lambda_N})^T, \quad \mathbf{Y} = \mathbf{W}^{\lambda_M} (\mathbf{W}^{\lambda_N} \mathbf{F}^T)^T. \quad (33)$$

2D vlnková transformace se skládá z M 1D vlnkových transformací matice $\mathbf{F}$ a pak je provedeno N 1D vlnkových transformací sloupců matice $\mathbf{F} (\mathbf{W}^{\lambda_N})^T$.

Vynikajícím prostředkem pro zpracování obrazů se ukazuje být skupina 2D vlnkových transformací. Základními výhodami je jednak lokalizovaný charakter báзовých funkcí, který umožňuje úsporné vyjadřování lokálních vlastností obrazu, zejména hran obrazu a dále s tím související schopnost simultánního zpracování celých obrazů. Kontury a hrany objektu v obraze jsou velmi důležité pro člověka z hlediska porozumění obsahu obrazu. Na základě kontur rozeznáváme tvary a jednotlivé prvky obrazu, jejich barva nebo textura je obvykle druhořadá. Tyto kontury a hrany jsou reprezentované v obrazech významnou změnou barvy nebo jasu a tyto změny jsou dobře detekovatelné právě WT. WT dává vysoké hodnoty signálu v místech výrazných hran a nulové hodnoty v plochách s konstantní intenzitou nebo barvou. Zachování jen těchto vysokých hodnot odpovídajících hranám v obraze a odstranění všech ostatních umožňuje výraznou redukci objemu dat a přitom zachová základní strukturu obrazu, která je tak důležitá z hlediska porozumění jeho obsahu.

Pokud máme vstupní obraz velikosti 8×8 , který lze vyjádřit maticí 8×8 , kde každý prvek matice představuje hodnotu jednoho obrazového bodu (pixelu). Tato matice představuje zpracovávaný obraz a na ní se aplikuje 1D DWT nejdříve v rámci řádků a pak sloupců. To znamená, že obraz je rozložen na posloupnost po sobě jdoucích řádků a pak sloupců (*standardní dekompozice*) [58]. Výsledkem jsou hodnoty všech detailních koeficientů a jediný koeficient celkového průměru. Pokud máme obraz o velikosti čtvercové matice $2^n \times 2^n$ pixelů lze použít *nestandardní dekompozici* obrazu, což je alternativa mezi operacemi na řádky

a sloupce (obr. 33). To znamená, že se vstupní signál nechá projít řadou filtrů typu horní propust k analýze vyšších frekvencí a řadou filtrů typu dolní propust k analýze nižších frekvencí. Při prvním kroku jsou získány průměry a rozdíly dvojic v každém řádku obrazu. Pokud máme $2n$ hodnot získáme n průměrů a n detailů. Výsledkem DWT aplikované na řádky je matice 8×8 , avšak její levá polovina představuje aproximaci „původního“ obrazu a pravá polovina detailní informace (detail), což jsou odstraněné vyšší frekvence z „původního“ obrazu. Potom následuje podvzorkování (downsampling). Podvzorkováním se odstraní část vzorků v signálu. Na tuto matici se dále aplikuje DWT po sloupcích a jsou získány vertikální průměry a rozdíly pro každý sloupec. Lze tedy získat m detailů a m průměrů pro $2m$ hodnot v každém sloupci. Separabilním rozkladem obrazu pomocí DWT do jedné úrovně dostaneme výslednou matici, která v sobě ukrývá čtyři menší stejně velké významné oblasti, které se nazývají obrazy horizontálních (LH), vertikálních (HL) a diagonálních (HH) detailních koeficientů, které slouží k rekonstrukci obrazu a dále obraz obsahující tzv. aproximační koeficienty (LL), který je možné dále interaktivně rozkládat [61, 62]. Zkratka LH (LowHigh) představuje DWT koeficienty detailu získané při sloupcové DWT aplikované na DWT koeficienty aproximace získané při řádkové DWT. První písmeno tedy představuje DWT koeficienty u řádkové aplikace DWT a druhé představuje DWT koeficienty u sloupcové aplikace DWT [63]. LL označuje nižší rozlišení „původního“ obrazu a HL, LH, HH detailní informace, které vypadají jako vystupující hrany ze šedého listu. Tímto výkladem byl popsán jeden stupeň dekompozice obrazu [53]. Pro úplnou dekompozici je tento proces postupně znovu aplikován na každou čtvrtinu obsahující průměry v obou směrech. Dyadickou dekompozicí signálu lze tedy vytvořit $3n + 1$ podpásem z originálního obrazu, kde n je stupeň dekompozice (obr. 33).



Obr. 33 Dyadická dekompozice 2D signálu. Hi resp. Lo představuje impulsní odezvu filtru typu horní propust resp. dolní propust a blok s označením $2\downarrow$ provádí podvzorkování číslem 2 [61, 62]

2.6 Fraktální analýza

Fraktální analýzou se rozumí stanovení fraktální (Hausdorffovy) dimenze a fraktální míry. Za objevitele fraktální geometrie a pojmu fraktál je považován Benoit B. Mandelbrot. Po objevení fraktální geometrie, bylo zjištěno, že eukleidovská geometrie je limitním případem fraktální geometrie a dimenze nemusí být jen celočíselná. Název fraktál je odvozen z latinského přídavného jména *fractus*, odvozeného od slovesa *frangere*, což znamená „zlomit“. Fraktál je *nekonečně členitý útvar*, který je jistým způsobem pravým opakem *geometricky hladkého útvaru*. Geometricky hladkým útvarům (např. úsečka, kružnice, krychle, ...) je možno přiřadit jisté celé číslo, které se nazývá topologická dimenze, na rozdíl od fraktálních útvarů, které mohou mít necelou dimenzi. Pod pojmem topologická dimenze si lze představit počet informací (např. souřadnic) potřebných k jednoznačnému určení stavu (např. polohy) nějakého objektu. Křivky mají dimenzi rovnou jedna, neboť stačí popisovat vzdálenost od nějakého pevného bodu. To, že má křivka dimenzi rovnou jedna, neznamená, že je zobrazena v jednorozměrném prostoru. Pro určení polohy bodu na ploše je třeba dvou souřadnic, proto je dimenze plochy rovna dvěma. Krychle, koule, jehlan nebo celý běžný prostor okolo nás má dimenzi rovnou tři, protože poloha bodu v nich je jednoznačně určena třemi parametry. Trochu specifickým případem je bod, který má dimenzi rovnou nula, protože polohu v něm samém není potřeba určovat pomocí nějakého parametru. Pro geometricky hladké útvary platí, že jejich parametry mohou být zadány v libovolné jednotce, aniž by se změnily jejich vlastnosti (délka, povrch, objem). To znamená, že nezáleží na měřítku, se kterým se na útvar díváme.

Hodnota fraktální dimenze udává, s jakou rychlostí délka (či odpovídající veličina při větším počtu rozměrů) těchto útvarů roste do nekonečna. Liší-li se fraktální dimenze od dimenze topologické málo, pak je daný objekt málo členitý. Bude-li fraktální dimenze o hodně větší než dimenze topologická, potom bude daný objekt velmi členitý. Fraktální dimenze kvantifikuje stupeň zaplnění eukleidovského prostoru fraktálním objektem.

Mandelbrotova definice fraktálu zní: fraktál je množina X , jejíž Hausdorffova dimenze $\dim(X)$ je ostře větší než její topologická dimenze $\text{top}(X)$:

$$\dim(X) > \text{top}(X). \quad (34)$$

Tato definice ovšem není zcela obecná, neboť nezahrnuje všechny typy fraktálních objektů. Obecná definice není dosud k dispozici. Mandelbrotova definice vyhovuje zejména tzv. „soběpodobným“ fraktálním útvarům. Soběpodobnost (matematicky se tato vlastnost nazývá *invariance vůči změně měřítka*) je hlavním znakem fraktálních útvarů. Soběpodobný objekt vypadá stejně, ať se na něj díváme v jakémkoli zvětšení (kterýkoliv výsek je přesnou kopií původního útvaru). Soběpodobná množina vzniká opakováním sebe sama (téhož motivu) při určité transformaci (změna měřítka, rotace, posunutí, zkosení). Matematicky je soběpodobná množina definována takto: Soběpodobná množina X n -dimenzionálního eukleidovského prostoru E_n je taková množina, pro niž existuje konečně mnoho kontrahujících zobrazení $\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_n$ takových, že X vznikne jako [64]:

$$X = \bigcup_{i=1}^n \phi_i(X) \quad (35)$$

Uměle konstruované deterministické fraktály vykazují vždy přesnou soběpodobnost. V přírodě taková situace nenastává. Zvětšujeme-li přírodní objekt, nikdy nedostaneme přesně soběpodobný úsek, tedy zvětšený pohled celku jedné části nebude reprezentovat celý objekt,

ale bude mít stejný kvalitativní vzhled (např. mraky, lesy, vodní hladina, členitost dýchacích cest, povrch planety). Části objektu nejsou identické, ale mírně odlišné (soběpříbuzné).

V přírodě obecně platí princip úspornosti. Obrovská je např. plocha plic či lidského mozku při relativně malém objemu.

Pouze malá skupina fraktálů má pouze jednu určitou fraktální dimenzi, která je neměnná se stupněm zmenšení nebo zvětšení. Tyto fraktály jsou *monofraktální*. V přírodě se často setkáváme s takovými objekty, jejichž tvarovou charakteristiku není možné přesně popsat pomocí jedné hodnoty fraktální dimenze. Jsou složeny z mnoha fraktálů s různou fraktální dimenzí. Takové objekty se nazývají *multifraktální*. Multifraktální charakter lze zjistit měřením fraktální dimenze při různém zvětšení struktury. Pokud je naměřena různá hodnota dimenze při různé velikosti měřítka je možné předpokládat, že daný objekt je multifraktálem. K charakteristice množiny multifraktálů (například množina různých pobřežních čar) nezjistíme všechny jejich fraktální dimenze, ale je dostatečné vyhodnocení jejich fraktální dimenze při stejném měřítku. Multifraktální chování přírodních struktur je možné přičíst vlivu dvou a více procesů vedoucích k formování dané struktury. Každý z procesů může ovlivnit tvarovou charakteristiku struktury svým vlastním způsobem.

Fraktální objekty lze také rozdělit na povrchové a objemové. Povrchový fraktál je těleso uvnitř kompaktní, ale na povrchu fraktálně členěné. Je vytvořen jako reliéf z rovinného útvaru. Objemový fraktál je příkladem tělesa s pórovitou strukturou. Charakteristickým rysem objemového fraktálu, na rozdíl od povrchového, je nerozlišitelný vnitřní a vnější povrch. Jde vlastně o plochu fraktálně „deformovanou“ v prostoru. Je jasné, že oba typy fraktálů se nevyskytují v přírodě v deterministických, pravidelných podobách, ale v podobách neuspořádaných, chaotických. Přírodním povrchovým fraktálem může být např. fraktálně členité pohoří. Přírodním fraktálem objemovým jsou objemy mnohých pórovitých látek např. agregáty formované z koloidních či hrubých disperzí [66].

Fraktální dimenze umožňuje popsat stupeň složitosti objektu podle toho, jak roste jeho délka, obsah či objem v závislosti na velikosti měřítka.

Existuje několik forem této dimenze:

- soběpodobnostní dimenze (*self-similarity dimension*)
- Hausdorffova dimenze (*Hausdorff dimension*)
- mřížková dimenze (*box counting dimension*)

Soběpodobnostní dimenze lze aplikovat na struktury, které jsou přesně soběpodobné. Lze ji určit analyticky pomocí vztahu:

$$D = \frac{\log N}{\log \frac{1}{s}}, \quad (36)$$

kde N je počet zmenšených útvarů a s je měřítko zmenšení.

Hausdorffova míra může být definována následovně [65]:

Nechť M je metrický prostor. Pro $d \geq 0$, $\varepsilon > 0$ a $X \subset M$ položíme

$$H_\varepsilon^d(X) = \inf \left\{ \sum_{i=0}^{\infty} |U_i|^d : X \subseteq \bigcup_{i=0}^{\infty} U_i, |U_i| \leq \varepsilon \right\}. \quad (37)$$

Se snižujícím se ε se množina možných pokrytí zužuje, a proto se infimum zvyšuje. Má tedy smysl definovat

$$H^d(X) = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} H_\varepsilon^d(X), \quad (38)$$

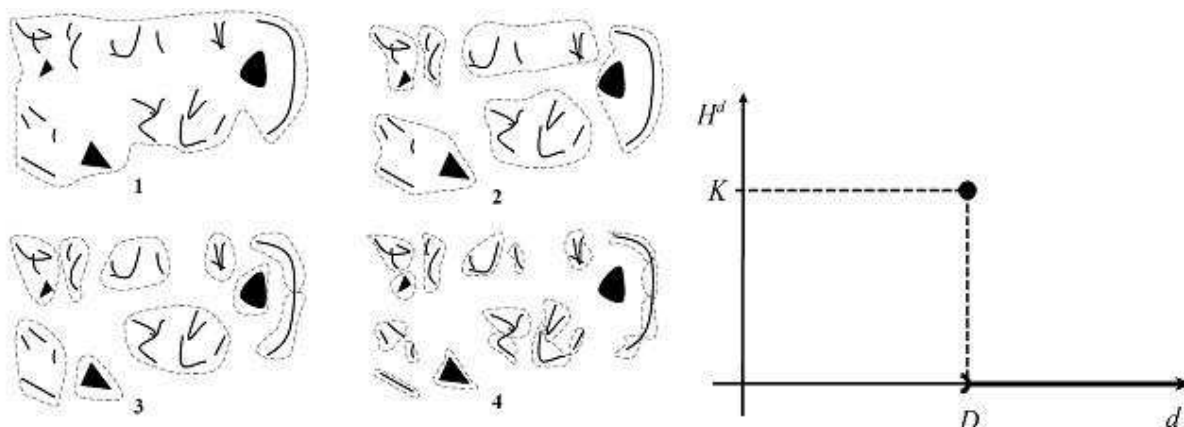
kde H^d je Hausdorffova d -dimenzionální míra.

Lze vidět, že Hausdorffova míra H^d je definována přes všechna společná pokrytí U , jejichž průměr $|U|$ je roven nejvýše ε . Ukazuje se, že pro většinu hodnot d je Hausdorffova míra buď 0, nebo ∞ . Je-li např. $d < D$, kde D je jistá kritická hodnota, pak $H^d = \infty$. Je-li $d > D$, pak $H^d = 0$ (obr. 34).

Hausdorffova dimenze $\dim(X)$ je rovna kritické hodnotě D , přesněji řečeno je infimem všech $d \geq 0$, pro která $H^d(X) = 0$, resp. supremem všech $d \geq 0$, pro která $H^d(X) = \infty$. Hausdorffova dimenze je dobře definovatelným reálným číslem $0 \leq \dim(X) \leq \infty$ jakéhokoliv metrického prostoru M .

Hausdorffova dimenze množiny $X \subseteq M$ může být tedy definována takto [65, 67]:

$$\dim(X) = \inf\{d \geq 0 : H^d(X) = 0\} = \sup\{d \geq 0 : H^d(X) = \infty\}. \quad (39)$$



Obr. 34 Různé pokrytí množiny pro zmenšující se ε [67], H^d Hausdorffova d -dimenzionální míra, D a K fraktální dimenze a míra

Definice Hausdorffovy dimenze je natolik obecná, že se podle ní dají počítat dimenze jen u těch nejjednodušších fraktálů. Nejrozšířenější metoda výpočtu fraktální dimenze je metoda box counting (metoda počítání čtverců). Na rozdíl od dimenze soběpodobnostní, která je definována pouze pro ryze soběpodobné útvary, lze box counting dimenzi aplikovat na libovolný útvar.

V rámci této metody se fraktální objekt pokryje pomyslnou pravidelnou mříží, jejíž elementární buňky mají velikost hrany ε a zjišťuje se počet buněk $N(\varepsilon)$ nutných k pokrytí objektu. Počet buněk $N(\varepsilon)$ závisí na ε . Postup se opakuje pro různé velikosti čtverce pokládáné sítě a počítá se $N(\varepsilon)$. Z praktického hlediska je vhodné volit mřížku dvakrát hustší než v předcházejícím kroku. Tomuto způsobu pokrytí odpovídá míra M_ε^d a dimenze D

$$M_\varepsilon^d \approx \sum_{i=1}^{N(\varepsilon)} \varepsilon^d = N(\varepsilon) \cdot \varepsilon^d \rightarrow \begin{cases} \infty, & d < D \\ 0, & d > D \end{cases} \quad (40)$$

Z této symbolické definice lze vidět, že pro $\varepsilon \rightarrow 0$ platí

$$N(\varepsilon) \approx \varepsilon^{-D},$$

a dimenzi D lze proto nalézt jako směrnici logaritmické funkce závislosti množství buněk N k pokrytí fraktálu (y -osa) na velikosti políčka ε (x -osa) tj.

$$D = -\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\ln N(\varepsilon)}{\ln \varepsilon}. \quad (41)$$

Úsek na ose y je pak roven fraktální míře. Box counting dimenze se někdy nazývá mřížková dimenze, protože pro matematické zjednodušení jsou čtverce obvykle součástí mřížky.

V této disertační práci lze k vyhodnocování obrazů objektů použít počítačový program HarFA – *Harmonic and Fractal Image Analyser*, který byl vyvinutý na Fakultě chemické VUT v Brně [68]. Tento program je určen primárně ke studiu fraktálního charakteru různých struktur pomocí metody box counting s využitím harmonické a vlnkové transformace. Program umožňuje provádět také modifikace obrazových dat před jejich vlastním zpracováním. Modifikace dat může spočívat například v provádění korekcí obrazu (odstranění teplotního šumu, nehomogenity osvětlení), aplikování derivačních, integračních, integračně derivačních a hranových filtrů na obrazové struktury a vytváření barevných separací obrazu (RGB, HSB, HLS). V této práci byla použita k vyhodnocování obrázků fraktální analýza zastoupená metodou box counting a její modifikací využívající vlnkovou transformaci (wavelet metoda). Pomocí metody box counting lze zkoumat fraktální struktury, které vznikly procesem nazvaným prahování (*thresholding*). Thresholding transformuje barevné objekty obrazu na černobílé. V takto upraveném obrazu lze již mnohem snadněji provádět měření velikosti, plochy, orientace, obvodu nebo počtu daných objektů, protože jsou přesně definovány jejich hranice. Pomocí maskovacích kritérií, které mohou být měněny, je možné získat mnoho fraktálních struktur z původního obrázku (např. změněním minimální hodnoty odstínu, která má být prahována jako černá a všechny ostatní pixely se stanou bílé). Pro jeden obrázek lze získat různé fraktální dimenze a fraktální míry [69].

Pokud je hodnocen fraktál, u kterého není známo, která část barevného spektra má být hodnocena, je možné použít v programu HarFA nástroj *Fractal Analysis – Range* [70]. Fraktální dimenze je automaticky stanovena pro všechny možné vytvořené fraktály vybraného kanálu barevné informace (Red, Green, Blue, Hue, Saturation, Brightness, Intensity). Výsledkem je fraktální spektrum, kde je fraktální dimenze funkcí maskovací hodnoty barevné informace (například fraktální dimenze je funkcí maskovací hodnoty intenzity – odstínů šedé). Získáme fraktální dimenzi obrazu v celé oblasti maskovacích podmínek.

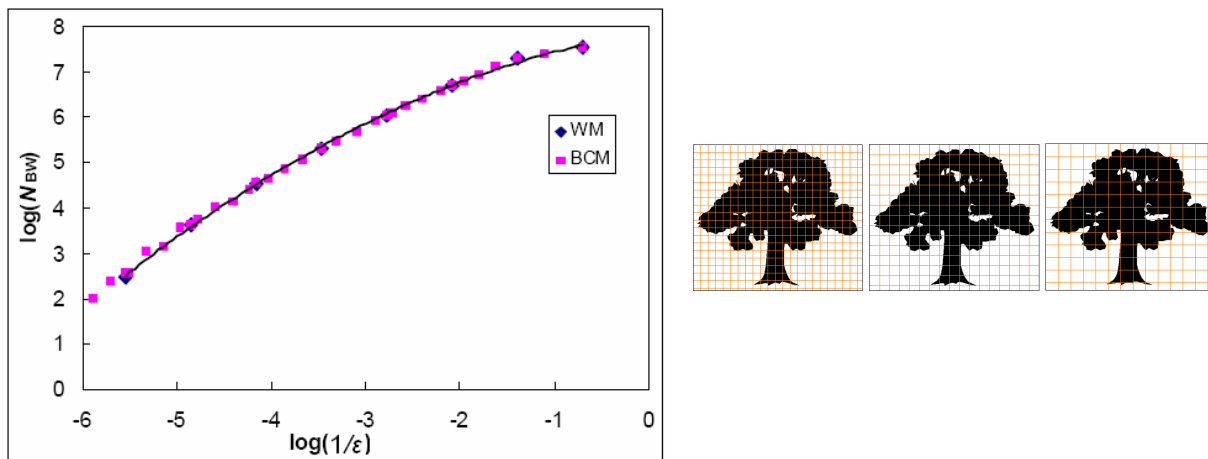
Box counting metodou v programu HarFA mohou být získány fraktální dimenze D_{BW} , D_{BBW} , D_{WBW} . Pro výpočet dimenzí D_{BBW} a D_{WBW} lze použít součet černých $N_{BBW} = N_B + N_{BW}$ (resp. bílých $N_{WBW} = N_W + N_{BW}$) a černobílých čtverců. Největší význam má fraktální dimenze D_{BW} , která charakterizuje vlastnosti rozhraní a její změny

$$N_{BW}(\varepsilon) = K_{BW} \varepsilon^{-D_{BW}}$$

odkud

$$\ln N_{BW}(1/\varepsilon) = \ln K_{BW} + D_{BW} \ln(1/\varepsilon), \quad (42)$$

kde K_{BW} je fraktální míra rozhraní a D_{BW} je fraktální dimenze. Takto získaná fraktální dimenze se v programu HarFA určuje pomocí lineární regresní analýzy [70].



Obr. 35 Určení fraktální dimenze – metoda box counting. V grafu lze také vidět porovnání stanovení fraktální dimenze s wavelet metodou

Na obrázku 35 lze vidět zřetelnou chybu pro malé velikosti čtverců sítě, která vyplývá z interpolace hodnot a také chybu pro velké hodnoty velikosti čtverců vyplývající ze saturace počtu pixelů.

Z analýzy vyplývá, že hodnoty fraktální dimenze obrazových struktur mohou nabývat hodnot $D \in \langle 0, 2 \rangle$, hodnota $D \rightarrow 0$ bude zjištěna tehdy, když analyzovaná struktura tvoří jen malou část obrazu, hodnota $D \rightarrow 2$ nastane, když analyzovaná struktura vyplňuje obraz téměř celý.

Obdobně i fraktální míra může nabývat hodnot $K \in \langle 0, K_{\max} \rangle$, kde $K_{\max}$ je počet pixelů obrazu. Z této veličiny lze určit procentuální krytí obrazu fraktální strukturou (černou, bílou barvou nebo rozhraním). Pro rozhraní s fraktální dimenzí $D_{BW} = 2$ (např. Peanova křivka), bude fraktální míra rovna celkovému počtu pixelů obrazu respektive $K_{BW}/K_{\max} = 1$ tj. 100% pokrytí. Fraktální míra tedy určuje, jak mnoho je obraz pokryt fraktální strukturou.

2.6.1 Fraktální analýza s využitím vlnkové transformace

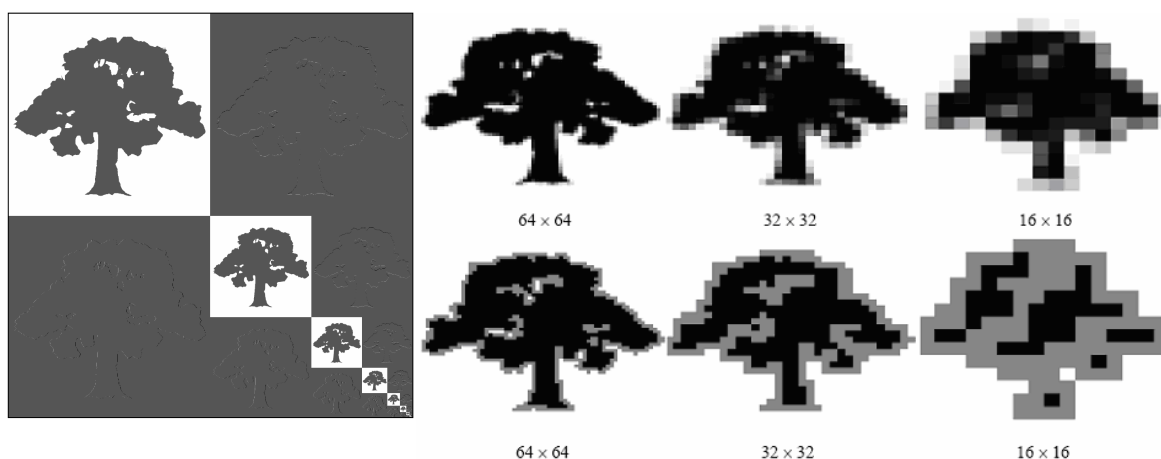
Z popisu box counting metody vyplývá, že je variací integrální metody. S využitím této znalosti lze nalézt vhodnou integrální transformaci, kterou lze použít k získání fraktálních parametrů (fraktální dimenze a míry) obrazových struktur při metodě box counting. Pomocí integrální transformace lze zjednodušit algoritmus pro získání fraktálních parametrů a rozšířit oblast možné interpretace výsledků. Metoda může být použita pro stanovení fraktálních parametrů barevných obrázků (např. šedoškálových nebo plnobarevných), povrchů a objemů 3D struktur. Použitím velmi jednoduché vlnkové transformace – Haarovy transformace lze získat identické výsledky hodnot fraktálních parametrů pro naprahovaný obrázek jako u klasické metody box counting. Předností výpočtu fraktálních parametrů pomocí Haarovy transformace je vzájemná nezávislost dat, ze kterých jsou fraktální parametry určeny.

Haarova transformace transformuje reálný obraz $f(m, n)$ na diskrétní spektrum představované reálnou funkcí $F(k, l)$ podle vztahu (15), kde $h_{m,k}$ a $h_{n,l}$ jsou koeficienty Haarovy matice $\mathbf{H}_N$, které jsou uvedeny v kap. 2.5.6. Haarova matice je 2^n dimenzionální matice. Metoda tedy vyžaduje čtvercovou matici dat danou mocninou čísla 2 [71]. Hlavní nevýhoda této metody může spočívat v menší skupině dat použitých pro regresní analýzu než u box counting metody. Při stanovení fraktální dimenze a míry pro obrázek o velikosti

1024×1024 pixelů lze získat pouze 10 nezávislých hodnot. Avšak tato nevýhoda může být změněna na výhodu, neboť se odstraní nadbytečné použití chybně stanovených hodnot pixelů, což minimalizuje chybu stanovení. Haarova transformace tedy zefektivňuje počítání čtverců pokládáné sítě různé velikosti při box counting metodě za předpokladu, že je analyzovaná čtvercová oblast.

Na obrázku 36 lze vidět úplný rozklad obrazu o velikosti 1024×1024 pomocí Haarovy matice o stejné velikosti. Vpravo lze vidět výřezy levého horního rohu z matic (2×2 , 4×4 , 8×8 , atd.), které představují nižší rozlišení původního obrazu. Informaci o množství černých pixelů v každé čtvrtině obrazu může být získána z $(n-1)$ inverzních matic (mají vždy poloviční velikost předešlé) obdržené pomocí inverzní Haarovy transformace, které byly předtím filtrovány pomocí filtru typu dolní propust o velikosti $(n-1) \times (n-1)$, $(n-2) \times (n-2)$, ... pixelů. Odstíny šedé pak reprezentují množství černobílých pixelů v dané čtvrtině.

Tento algoritmus však může být nahrazen jednoduchým sčítáním čtveřic sousedních pixelů, které mají hodnotu 0 (černé pixely) a 1 (bílé pixely) v originálním naprahovaném obrázku. Po prvním kroku obdržíme obrázek o velikosti $2^{n-1} \times 2^{n-1}$ pixelů s hodnotami od 0 do 4, po druhém kroku bude mít obrázek velikost $2^{n-2} \times 2^{n-2}$ pixelů s hodnotami od 0 do 16, atd. Počet černých čtverců v obrázku je pak dán hodnotou 0, počet bílých čtverců hodnotou maximální 1, 4, 16, ... a počet černobílých čtverců je dán zbývajících hodnotami, kterým lze přiřadit stejná hodnota pomocí prahování.



Obr. 36 Stanovení fraktální dimenze a fraktální míry použitím vlnkové transformace

Plocha vyplněná vyšetřovanými pixely může být vyjádřena jako

$$S(n) = \frac{N(n)}{n^2} = K \cdot n^{D-2} \quad (43)$$

a délka čar v obrázku jako

$$L(n) = \frac{N(n)}{n} = K \cdot n^{D-1} \quad (44)$$

kde n je měřítko ($n = 1/\varepsilon$) a ε je velikost čtverce.

Získané hodnoty fraktálních mír K_{BBW} , K_{WBW} , K_{BW} mohou být použity pro stanovení černé – S_B resp. bílé plochy – S_W naprahaného obrázku

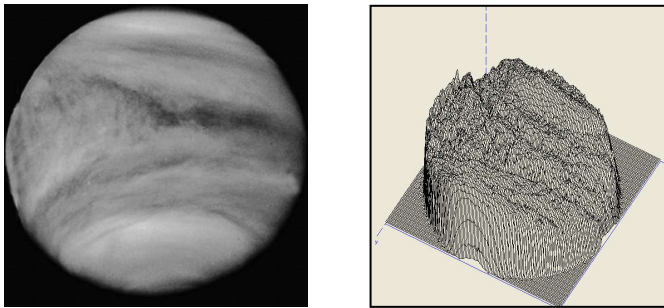
$$S_B = \frac{K_{BBW} - K_{BW}}{K_{BBW} + K_{WBW} - K_{BW}}, S_W = \frac{K_{WBW} - K_{BW}}{K_{BBW} + K_{WBW} - K_{BW}} \quad (45)$$

a pro stanovení délky hraniční čáry objektu L v naprahaném obrázku

$$L \approx S_{BW} = \frac{K_{BW}}{K_{BBW} + K_{WBW} - K_{BW}}. \quad (46)$$

Výsledky jsou získány v relativních jednotkách (vynásobením 100 pak v procentech). Vynásobením velikosti obrázku (K_{max}) lze získat výsledky v pixelech.

V případě analýzy šedoškálového obrázku lze předpokládat, že odstín reprezentuje řez 3D objektu (obr. 37). V tomto případě mají konkrétní pixely hodnotu od 0 (černé pixely) do 255 (bílé pixely). Sčítáním hodnot čtveřic pixelů v obrázku pak dostaneme obrázek o velikosti $2^{n-1} \times 2^{n-1}$ pixelů s hodnotami pixelů od 0 do 1020. Po druhé iteraci pak dostaneme obrázek o velikosti $2^{n-2} \times 2^{n-2}$ pixelů s hodnotami pixelů od 0 do 4080 atd. Počet černých čtverců v obrázku je pak dán hodnotou 0, počet bílých čtverců hodnotou maximální 1020, 4080, ... $255 \cdot 2^n$ a počet černobílých čtverců je dán zbývajícími hodnotami [71].



Obr. 37 Stanovení fraktálních parametrů 3D objektu použitím wavelet metody

Objem vyplněný zkoumanými pixely může být vyjádřen jako

$$V(n) = \frac{N(n)}{n^3} = K \cdot n^{D-3}. \quad (47)$$

Následujícími vztahy lze stanovit oblast pod (V_B) a nad (V_W) povrchem 3D objektu:

$$V_B = \frac{K_{BBW} - K_{BW}}{K_{BBW} + K_{WBW} - K_{BW}}, V_W = \frac{K_{WBW} - K_{BW}}{K_{BBW} + K_{WBW} - K_{BW}} \quad (48)$$

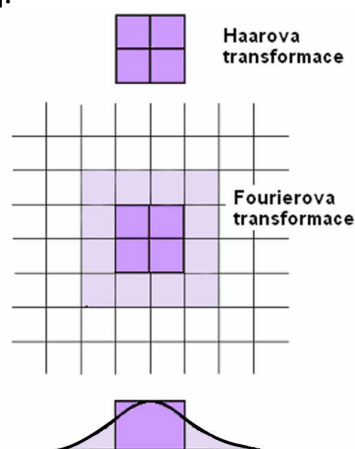
a velikost plochy S

$$S = \frac{K_{BW}}{K_{BBW} + K_{WBW} - K_{BW}} \quad (49)$$

v relativních jednotkách či v procentech. Objemy ve voxelech lze získat vynásobením výsledků maximálním objemem. Ten závisí na velikosti obrázku a na jeho barevné hloubce (např. pro 8 bitovou hloubku to znamená vynásobení číslem $2^8 - 1 = 255$).

Podobné hodnoty fraktálních dimenzí lze také získat pomocí dalších typů integrálních transformací. V případě např. Fourierovy transformace, na rozdíl od Haarovy transformace,

nelze použít zjednodušený postup sčítání čtverců, ale je třeba provést přímou i zpětnou transformaci, protože při této transformaci má na výsledné hodnoty vliv i vzdálené okolí odpovídajícího bodu (obr. 38). Váha vzdálenějších bodů se úměrně snižuje až k nule se vzrůstající vzdáleností [73].



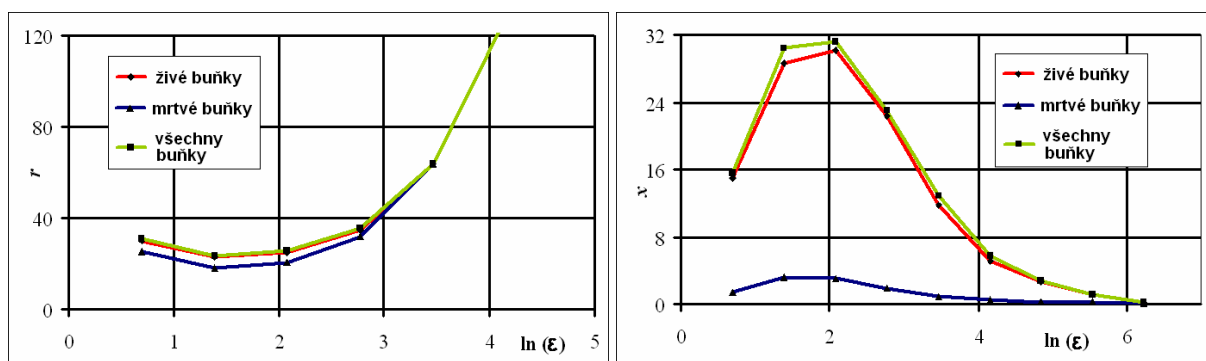
Obr. 38 Sčítání pixelů u Haarovy transformace a vliv okolních bodů při Fourierově transformaci:
- vliv okolních bodů, - vliv vlastních bodů

Fraktální parametry lze využít k hodnocení uspořádanosti obrázku, ale také např. ke zjišťování počtu či poloměru definovaných objektů bez toho aniž by je bylo nutno počítat.

Množství definovaných objektů (např. buněk) x a jejich poloměr r lze stanovit za předpokladu, že obrazy objektů jsou kruhového tvaru podobné velikosti a jsou rozlišitelné na pozadí podle vztahů

$$x = \frac{N_{BW}^2}{4\pi N_{BBW}}, \quad r = \sqrt{\frac{N_{BBW} \varepsilon^2}{\pi x}} \quad (50)$$

kde N_B je počet černých a N_{BW} počet černobílých čtverců o velikosti $\varepsilon \times \varepsilon$ pixelů. Výsledný počet definovaných objektů x je dán maximální hodnotou x z hodnot vypočítaných pro různé velikosti sítě (obr. 39). Maximální hodnota je zvolena, protože fraktální struktura je nejvhodněji ohraničena při dané velikosti sítě [73]. Při menší velikosti sítě by hranice obrázku tvořená pixely byla nespojitá a při vyšší velikosti sítě by hranice nebyla příliš hladká. Tuto metodu lze označit jako *metodu maximální hodnoty počtu*.



Obr. 39 Stanovení poloměru buněk r a jejich množství x

Pomocí fraktální analýzy lze také charakterizovat odchylky tvaru objektu od ideálního kruhového tvaru. Využívá se přitom sledování poměru r_L/r_S , kde r_L je poloměr objektu zjištěný z obvodu a r_S poloměr objektu zjištěný z plochy.

Pro obvod a obsah sledovaného obrazu objektu platí

$$L = N_{BW} \varepsilon \Rightarrow r_L = \frac{N_{BW} \varepsilon}{2\pi} \quad (51)$$

$$S = N_{BBW} \varepsilon^2 \Rightarrow r_S = \sqrt{\frac{N_{BBW} \varepsilon^2}{\pi}} \quad (52)$$

Shrnutím rovnic (51) a (52) lze získat poměr r_L/r_S :

$$\frac{r_L}{r_S} = \frac{N_{BW}}{2\sqrt{\pi N_{BBW}}} \quad (53)$$

Tento poměr je závislý na velikosti měřítka použité sítě. Je zřejmé, že u ideálního kruhu bude poměr r_L/r_S roven jedné, neboť poloměry budou stejné. Veškeré odchylky od této hodnoty vykazují informaci o struktuře analyzovaných obrazů objektů. U reálných objektů např. buněk kvasinek bude tento poměr větší než 1, neboť poloměr zjištěný z obvodu bude větší (obvod bude vždy větší než ideální). Obvod se mění (roste) více než obsah, což vypovídá o charakteru fraktální struktury, která je zkoumána. Bylo také prokázáno, že metodou fraktální analýzy lze charakterizovat změny excentricity (ovality) v průběhu růstu a dělení buněk [74].

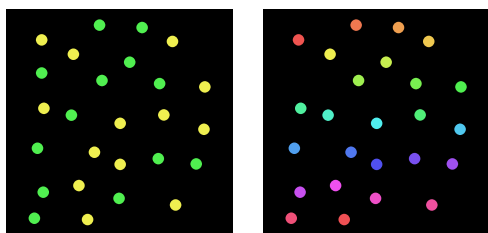
Počet definovaných objektů N lze stanovit za předpokladu, že obrazy objektů jsou kruhového tvaru podobné velikosti a jsou rozlišitelné na pozadí také podle empirického vztahu

$$N \approx \frac{(\sqrt{S_{WBW}/\pi} - \sqrt{S_W/\pi})}{2} \sqrt{\frac{\sqrt{S_{WBW}/\pi} + \sqrt{S_W/\pi}}{2\pi}} = \sqrt{S_{WBW} - S_W} \sqrt{\frac{\sqrt{S_{WBW}} - \sqrt{S_W}}{8\pi^2 \sqrt{\pi}}} \quad (54)$$

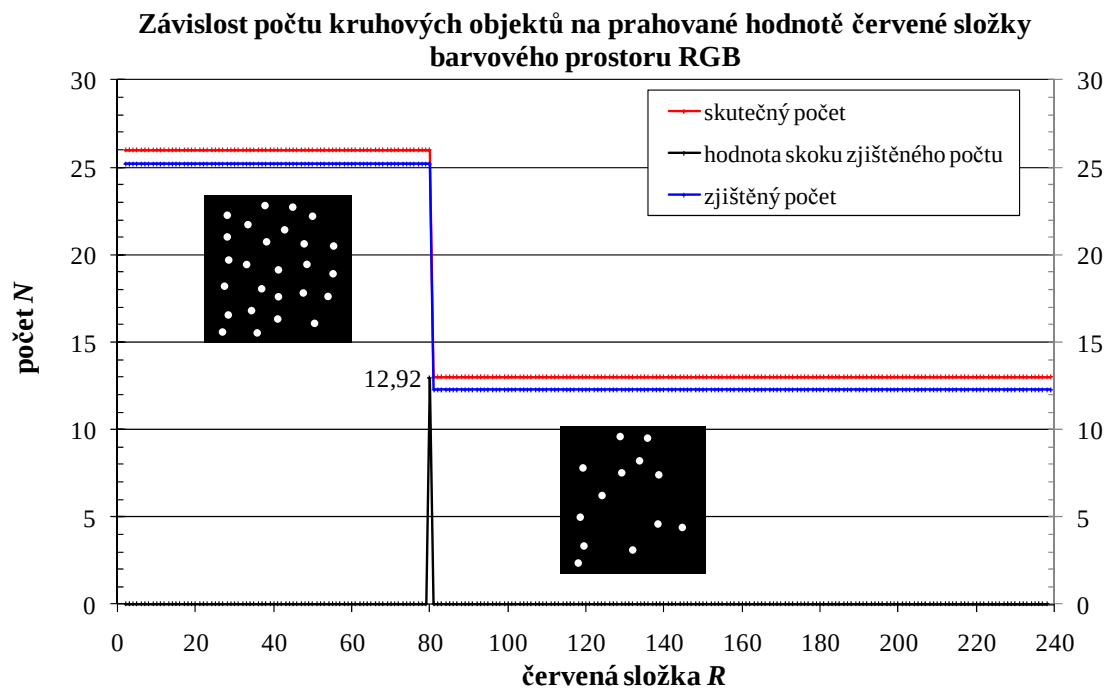
$$\text{resp.} \quad N \approx \sqrt{S_{BBW} - S_B} \sqrt{\frac{\sqrt{S_{BBW}} - \sqrt{S_B}}{8\pi^2 \sqrt{\pi}}} \quad (55)$$

Plochy černé – S_B resp. bílé – S_W naprahaného obrázku lze získat ze vztahů (45) a plochy černobílé ze vztahu (46). Daný vztah vybereme podle barvy, na kterou je analyzovaný objekt naprahan. Tuto metodu lze označit jako *metoda prahové distribuce*.

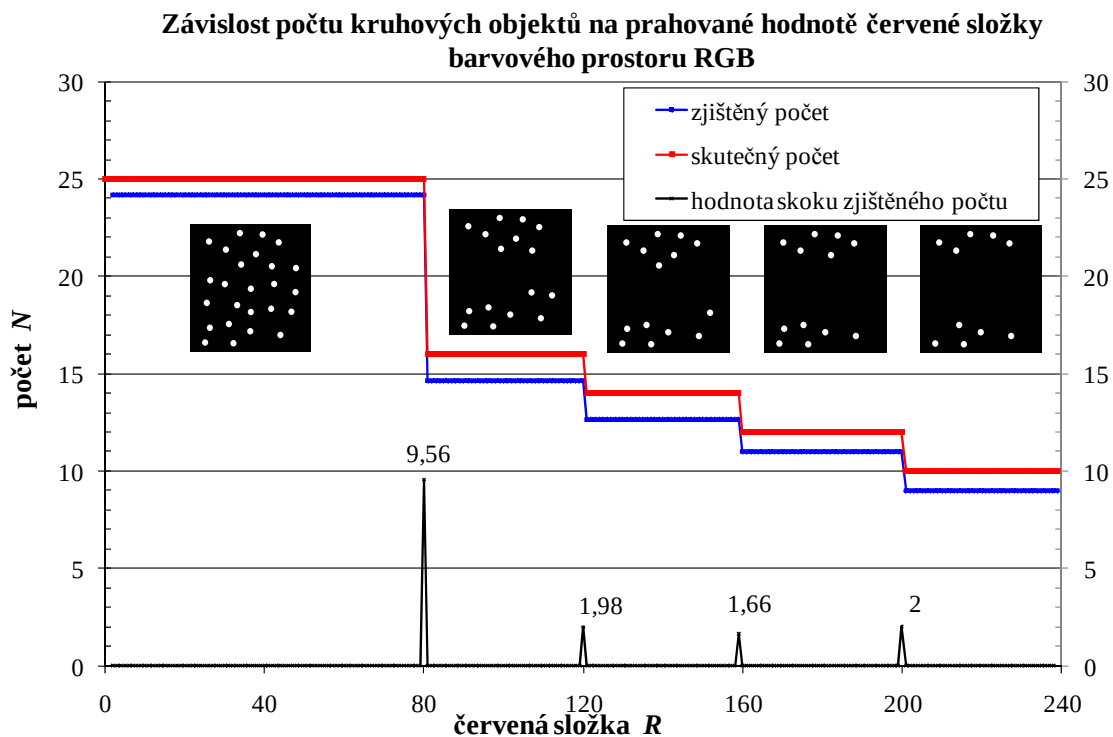
V grafech na obr. 41 a 42 lze vidět závislost zjištěného počtu naprahaných definovaných objektů podle vztahu (54) na měnící se hodnotě červené složky barvového prostoru RGB pro dva vytvořené modely. Modelové obrazy velikosti 1024×1024 s kruhovými strukturami o průměru 53 pixelů, které byly vytvořeny v programu Malování (obr. 40) v barvovém prostoru HSB. Obraz modelu č. 1 má 26 barevných kruhových objektů, kde hodnota odstínu $H = 60^\circ$, 120° , hodnota sytosti $S = 67\%$ a jasu $B = 94\%$. Obraz modelu č. 2 má 25 barevných kruhových objektů, kde hodnota odstínu $H = 0, 15, 30, 45, \dots, 360^\circ$, hodnota sytosti $S = 67\%$ a jasu $B = 94\%$.



Obr. 40 Model č. 1(vlevo), model č. 2 (vpravo)



Obr. 41 Model č. 1



Obr. 42 Model č. 2

Z výsledků modelových dat pro model č. 1 vyplývá rozdíl mezi skutečným počtem a zjištěným počtem barevných objektů a tento rozdíl je roven jedné modelové struktuře.

Z výsledků modelových dat pro model č. 2 opět vyplývá rozdíl mezi skutečným počtem a zjištěným počtem barevných objektů a tento rozdíl je roven jedné modelové struktuře. Rozdíl mezi následujícími obrazy s klesajícím počtem naprahovaných objektů podle měnící se červené složky R pak po zaokrouhlení odpovídá skutečnosti obdobně jako u modelu č. 1.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V posledních letech došlo k velkému rozvoji v oblasti světelné mikroskopie, což umožňuje mnoho praktických aplikací v mikrobiologickém výzkumu. Byla vyvinuta nová fluorescenční barviva, lepší kamery, fotoaparáty, nové techniky mikroskopie. Kombinace moderních snímacích kamer a počítačového zpracování obrazu umožňuje například identifikaci a počítání objektů v zorném poli, měření jejich velikosti či zařazování do vybraných tříd podle předem definovaných podmínek nebo pozorování kontinuálních procesů jako je rozmnožování mikroorganismů.

Při posuzování kvasinkových kmenů se vychází z jejich vlastností morfologických, fyziologických a biochemických. Určuje se velikost buněk, jejich tvar a jeho vyrovnanost. U kmenů kvasinek používaných pro výrobu piva či pekařského droždí se vyžaduje vyrovnanost tvaru, velikosti buněk a stabilita jejich technologických vlastností. Technologické kmeny jsou prakticky vyselektovány buňky s omezenou sporulační schopností, neboť pohlavní rozmnožování je největším zdrojem proměnlivosti kultur eukaryotních organismů.

Důležitým faktorem při posuzování stavu mikrobiálních populací je zastoupení živých a mrtvých jedinců, které lze rozlišit pomocí fluorescenčního barvení. K přímému stanovení počtu buněk se běžně používá přímé mikroskopické počítání v počítacích komůrkách (Thomově, Bürkerově). Nepřímo můžeme počet buněk mikroorganismů stanovit nejčastěji pomocí kultivace, kdy předpokládáme, že z jedné životaschopné buňky vyrostе jedna kolonie, které potom spočítáme. Ke zjištění definovaných objektů (např. kvasinek) bez toho aniž by je bylo nutno počítat lze také využít obrazovou analýzu.

Obrázky k analýze byly získány pomocí fluorescenční mikroskopie, protože tato metoda je rychlá a jednoduchá. Výsledky jsou získávány řádově v minutách, zatímco klasické kultivační metody vyžadují minimálně 24 hodin. Tradiční kultivační techniky jsou sice nenáročné, ale velmi zdlouhavé a proto v mnohých aplikacích již nedostatečné.

Byly sledovány vlastnosti různých druhů kvasinek, jako je poloměr buněk, dynamika růstu, kinetika rozmnožování a byl také stanoven počet buněk kvasinek v získaném obrazu.

3.1 Použité druhy kvasinek

Kvasinky ze sbírky CCY – Zbierka kultúr kvasiniek, Chemický ústav AV SR, Bratislava.

***Candida vini* CCY 29-39-3**

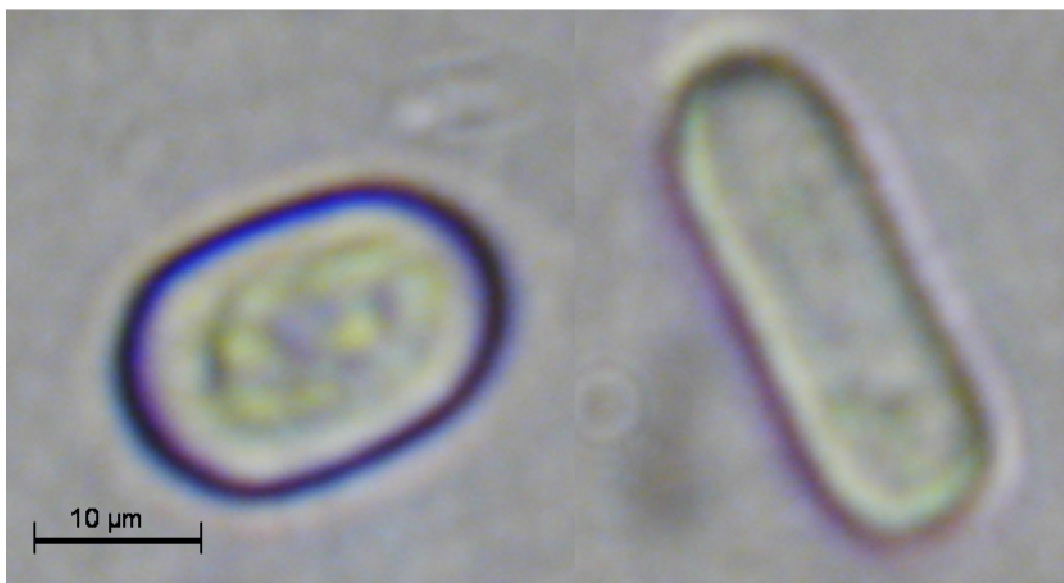
Buňky jsou elipsoidní až válcovité s rozměry (3–4,5) μm $\times$ (6–10) μm . Velikost a tvar těchto buněk ovlivňují vnější i vnitřní podmínky. Pseudomycelium je stromečkovité větvené z protáhnutých buněk, které pučí do krátkých elipsoidních blastokonidií. Optimální teplota růstu je 23 °C, ale roste i při 1 až 2 °C a 30 °C. Je nebezpečná v pivovarnickém průmyslu, protože zapříčiňuje zákaly piva a změnu chuti [75]. Nátěr je bílý až krémový, šťavnatý, rozprostřený, hladký. Kolonie rostou rychlostí 4,8 až 5,5 mm za 100 h.

***Dipodascus magnusii* CCY 25-6-22**

Arthrokonidie jsou válečkovité až protáhlé s rozměry (3,5–5) μm $\times$ (7–20) μm . Někdy jsou buňky dlouhé až 40 μm . Patří mezi netradiční kvasinkové druhy, tvoří obrovské mnohoaderné buňky a hrubostěnné chlamydospóry 10-14 μm široké. Na agarrech tvoří bílé až krémové nebo žluté, matné, chlupaté až sametové porosty. V kapalných půdách tvoří šplhající se kožky. Vegetativně se rozmnožují tvorbou arthrokonidií. Je to somatické dělení, při kterém organismus může ještě pučet a tvořit blastokonidie. Pohlavní rozmnožování u rodu *Endomyces* se děje tvorbou asků se čtyřmi spórami kloboukovitého nebo polokulovitého tvaru. Některé kultury rodu *Endomyces*, které dnes existují ve sbírkách, jsou jen v anamorfním stavu. Ty, které tvoří asky a elipsoidní askospory byly přearženy do rodu *Dipodascus*. Kvasinky produkují ovocný pach. Produkce esterů s ovocnou vůní je důsledkem metabolismu těchto organismů, který je sice hlavně oxidativní s produkcí organických kyselin (hlavně kyseliny octové), ale i slabě anaerobní s produkcí alkoholu [76].

***Geotrichum candidum* CCY 16-1-16**

Kvasinka se rozmnožuje pomocí arthrokonidií. Existují dva typy arthrokonidií: cylindrické 3,5 μm $\times$ 17 μm a elipsoidní 5 μm $\times$ 14 μm . Na agarových půdách tvoří jemné kožešinové porosty. Obrovská kolonie roste rychle, nejrychleji ze všech *Geotrich*. V kapalném mediu se tvoří jemná kožešinová kožka. Kvasinka se rozmnožuje vegetativně - vytváří se arthrokonidie, ve starší literatuře označované oidie. Pohlavní rozmnožování - sexuální proces není znám, je to konidiální stadium druhu *Dipodascus geotrichum*. Tato kvasinka provází člověka i zvířata v každé činnosti. Vyskytuje se v mléčných výrobcích, mléku, smetaně, tvarohu, sýru, na starším droždí, na zkysané kapustě a okurkách, ale i v půdě, ve vodě, v aktivovaných kalcích z odpadních vod, z odpadu po zpracování mořských ryb apod. Je to lipolytická kvasinka, vhodná například na využití odpadních produktů ze zpracování tučných ryb a tučných mléčných produktů, na neutralizaci zápar z rafinace olejů [76].



Obr. 43 Srovnání morfologie *Dipodascus magnesii* (vlevo) a *Geotrichum candidum*, zvětšeno 2400×

***Hansenula anomala* CCY 38-2-30**

Vyskytují se převážně jako kontaminanty v potravinářských závodech. V pivovarech způsobují zákaly piva. *Hansenula anomala* patří do nadříše Eukaryota, říše Fungi, oddělení Eumycota, třídy Ascomycetes a skupiny jednobuněčných pučících kvasinek. Vegetativní buňky jsou kulovité nebo elipsoidní s rozměry $(2-4) \mu\text{m} \times (2-6) \mu\text{m}$. Vytváří i bohatě větvené pseudomycelium, ne však pravé hyfy. Na povrchu kapalin tvoří kučeravé suché kožky. Nátěr na tuhých půdách je těstovitý, bílý, hladký a na povrchu moučnatý, okraj má cípovitý a kořínkovitý. Z přírody se zpravidla izolují v diploidním stavu, když se diploidní buňky přímo mění na asky s kloboučkovitými sporami po 1 až 4 v asku. Tento druh je heterotalický [75]. Patří mezi nejčastěji se vyskytující kvasinky, které na řídkých potravinách tvoří kožky. Je poměrně dost rozšířená ve vínech. Používá se pro kvasnou výrobu ethylesteru kyseliny octové.

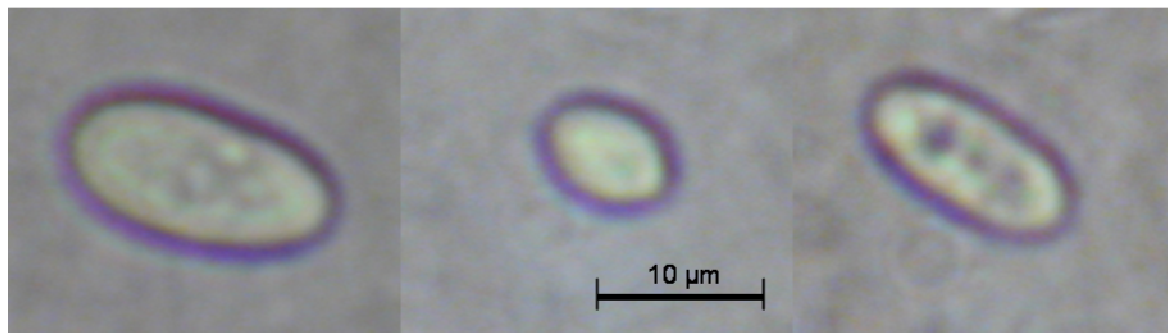
***Kloeckera apiculata* CCY 25-6-22**

Vegetativní buňky mají rozměry $(1,5-5) \mu\text{m} \times (2,5-11) \mu\text{m}$. Jsou citrónkovitého tvaru a pučí na nejužší části buňky. V kapalném prostředí kultura vytváří sediment a slabý prstenec. V nátěru je řídká, šedobílá a hladká. Tvoří stromčkovitě větvené pseudomycelium. Kvasinka inhibuje část bakterií např. *Lactobacillus plantarum* a *Bacillus megatherium*. *Kloeckera apiculata* produkuje smrtící toxin. Fermentuje glukózu a celobiózu. Nachází se např. v půdě, moštu, v solených okurkách nebo dokonce v mořské vodě [75].

***Saccharomyces fragilis* CCY 51-1-1**

Jedná se o elipsoidní až cylindrické vegetativní buňky s rozměry $(2-6) \mu\text{m} \times (3-10) \mu\text{m}$. Velikost buněk je rozdílná a souvisí s vnějšími a vnitřními vlivy působícími na buňku jako je např. věk, sporulace buňky a chemické složení prostředí. Vyskytují se ojediněle, v párech nebo v řetězcích. Pseudomycelium se tvoří dobře, pravé mycelium ne. Patří mezi teplomilné kvasinky, snáší teplotu až 47 °C. Může žít na teplotokrevných živočiších a zapříčiňovat jejich nemoci. Buňky se rozmnožují pučením. Kultivují se na sladinném agar, kde tvoří charakteristické kožovité kolonie.

Vyskytují se v kefíru a některých mléčných nápojích. V průmyslu jsou obávanou kontaminující kvasinkou, protože způsobují nadouvání sýrů a další problémy [75].



Obr. 44 Srovnání morfologie *Candida vini* (vlevo), *Kloeckera apiculata* a *Saccharomyces fragilis* (vpravo), zvětšeno 2400×

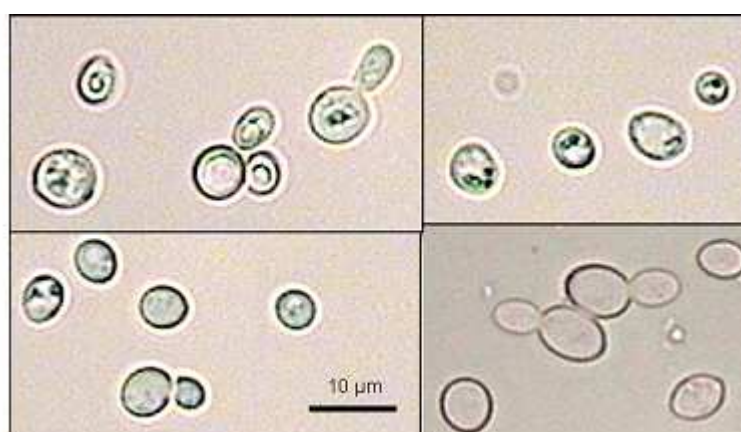
***Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-4-102, *Saccharomyces cerevisiae* FV1**

(sbírka FCHPT STU Bratislava)

Tvar buněk je elipsoidní i kulovitý s šířkou cca 2,6–6,4 μm a s délkou 3,7–9,7 μm [76]. Pro starší buňky je charakteristická ostře ohraničená vakuola. Velmi dobře se pěstují ve sladidě a rozmnožují se pučením [77].

***Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen CCM 8191**

Kvasinky z České sbírky mikroorganismů v Brně. Buňky těchto kvasinek mají tvar kulatý nebo krátce oválný. Bývají osamocené i v malých shlucích. Uvnitř bývá jedna vakuola a plazma je drobně zrnitá. Buňky těchto kvasinek se rozmnožují pučením. Kyslík velmi podporuje jejich množení a potlačuje kvašení. Nejlépe se kultivuje v sladidě, kde tvoří šedobílou usazeninu [11]. V buňkách jsou vidět jasné a zřetelné vakuoly. Plazma je homogenní nebo jen málo zrnitá. Optimální teplota pro kvašení je 22–25 °C.



Obr. 45 Srovnání morfologie *Saccharomyces cerevisiae* (vlevo nahoře), *Saccharomyces cerevisiae* FV1 (vpravo nahoře), *Hansenula anomala* (vlevo dole), *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen (vpravo dole), zvětšeno 640×

Byla použita dvě živná média, která se sterilizovala při 110 °C po dobu 10 minut (obr. 67)

Médium č. 1 – jedná se o sacharidové čiré živné médium žluté barvy

Glukóza – 4 g

Pepton – 0,5 g

Kvasinkový extrakt – 0,5 g

Destilovaná voda – 100 ml

Médium č. 2 – jedná se o sladinu obohacenou o vitamíny, barva hnědá

Sladina – 75 ml

Glukóza – 3 g

Kyselina nikotinová – 20 mg

Kyselina aminobenzoová – 20 mg

Pyridoxin – 20 mg

Tiamin – 10 mg

Destilovaná voda – 50 ml

Sladina byla použita z pivovaru Starobrno a.s. Byla zředěna vodou na 7 hmot. % extraktu, pH bylo upraveno na 6,5 nasyceným roztokem Na_2CO_3 . Obsah extraktu bylo měřeno sacharometrem.

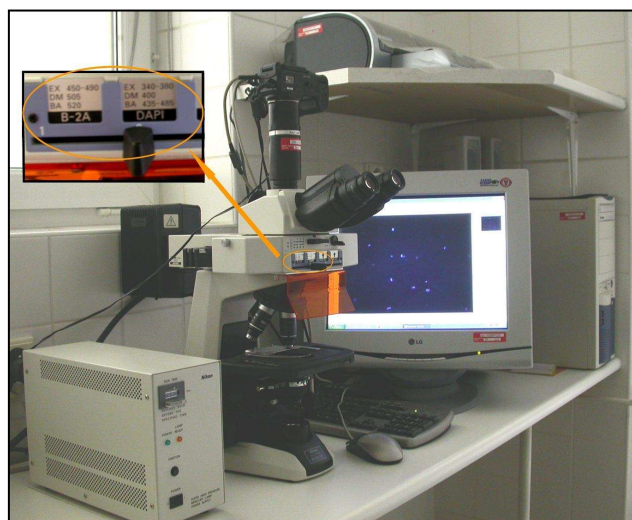
3.2 Stanovení počtu a poloměru buněk kvasinek

Byl stanoven počet a poloměr kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* FV1, *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae* CCY 21-4-102, *Kloeckera apiculata* CCY 25-6-22, *Hansenula anomala* CCY 38-1-30. Tyto kvasinky byly vybrány, protože nevytváří příliš rozsáhlé rozvětvené svazky buněk a díky vhodnému tvaru a velikosti buněk.

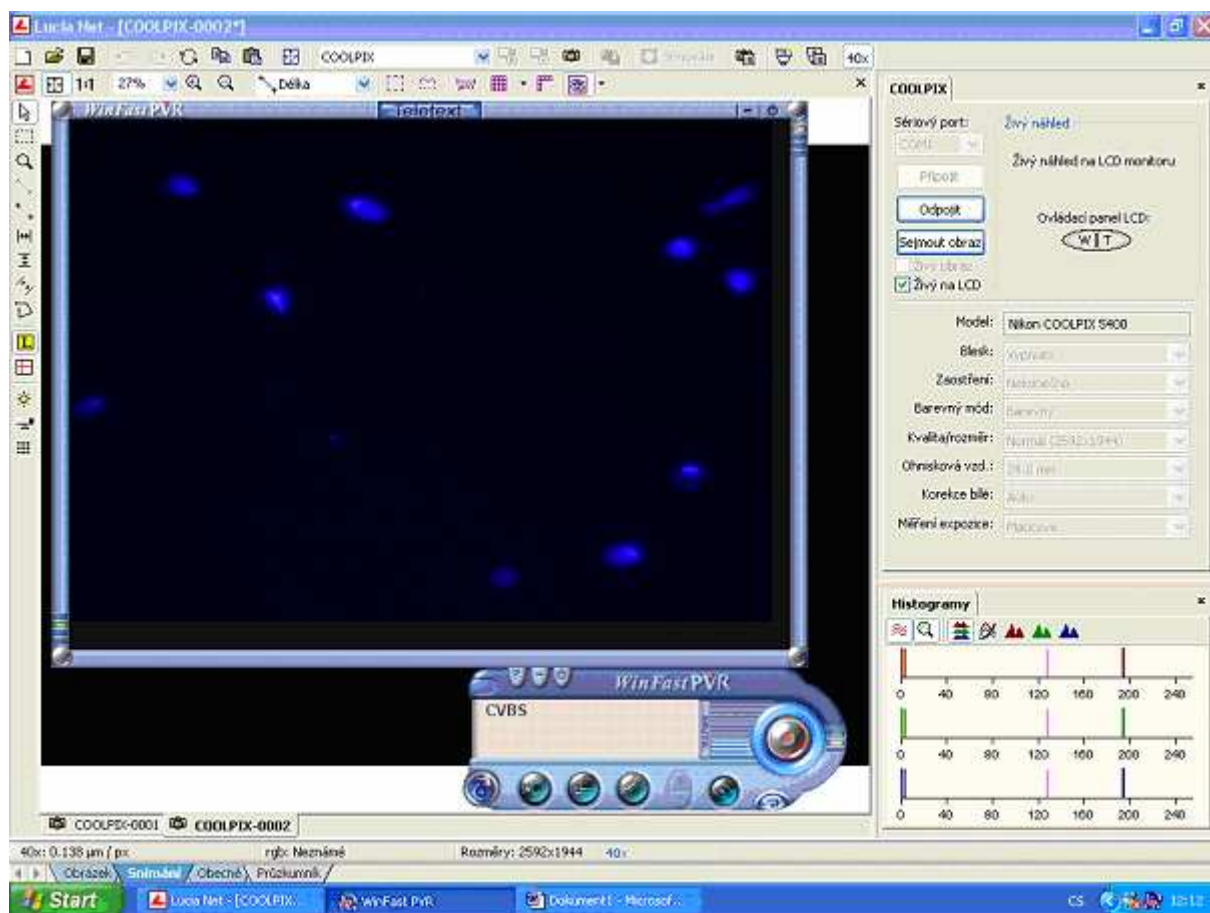
3.2.1 Měřící aparatura

Pro záznam obrazů bylo využito spojení světelného mikroskopu s epifluorescenčním nástavcem Nikon Eclipse E200 a digitálního fotoaparátu Nikon Coolpix5400 s rozlišením 2592×1944 , přičemž k záznamu obrazů byl použit program Lucia Net 1.16.6., který byl upravený pro fotoaparát. Fotoaparát byl nakalibrován pro objektiv zvětšující $40\times$ na $0,13698 \mu\text{m}/\text{px}$. Sledovaný živý obraz byl kontinuálně pozorován na monitoru v okně s rozlišením 640×480 pomocí TV karty WinFast TV2000 XP RM od firmy Leadtek s aplikací WinFast PVR. Místo fotoaparátu byla využita také pro některá měření videokamera PixelLink PL-A662 s rozlišením 1280×1024 , která byla nakalibrována pro objektiv zvětšující $40\times$ na $0,141 \mu\text{m}/\text{px}$, pro objektiv $20\times$ na $0,291 \mu\text{m}/\text{px}$ a pro objektiv $100\times$ na $0,0538 \mu\text{m}/\text{px}$.

Mikroskopováno bylo objektivem $40\times$. Mezi zdroj excitačního záření (rtuťová výbojka) a excitační filtr byl dle potřeby zařazen vhodný ND filtr (ND4, ND8, ND16) snižující intenzitu excitačního záření. Získané obrázky ve formátu TIF byly analyzovány pomocí programu HarFA.



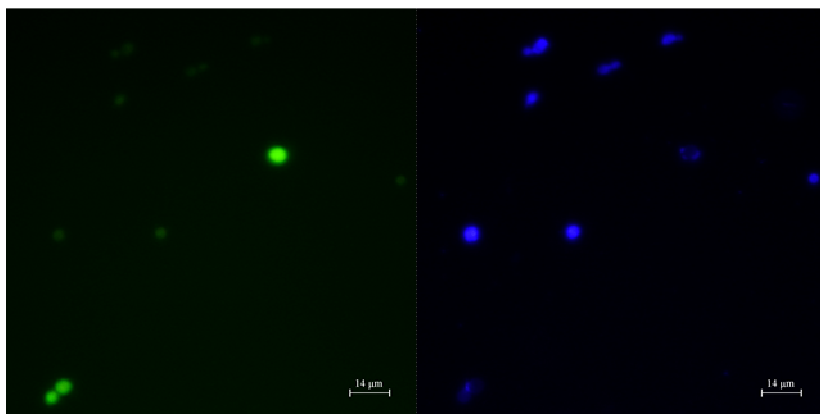
Obr. 46 Fotografie měřící aparatury. Mikroskop Nikon Elipse E200 s digitálním fotoaparátem Nikon Coolpix5400 či s CCD kamerou PixelLink PL-A662



Obr. 47 Použité softwarové vybavení pro záznam a sledování obrazu

3.2.2 Příprava preparátu a popis experimentu

Fraktální analýza byla použita na zjišťování počtu a poloměru obrazů živých a tepelně usmrčených či přirozeně mrtvých buněk kvasinek. Pro současné rozlišení živých a mrtvých buněk bylo použito fluorescenční barvivo akridinová oranž AO (mrtvé buňky vykazují červenou či oranžovou fluorescenci (agregátní forma barviva) a živé buňky žlutozelenou (monomerní forma) nebo LIVE/DEAD Yeast Viability Kit. Yeast Viability Kit je sada, která obsahuje dvě komponenty, dvoubarevně fluorescenční barvivo FAN-1® Cell Stain a CalcofluorTM White M2R. Barvivo FUN-1 difunduje do buňky a způsobuje, že mrtvé buňky fluoreskují jasně žlutozeleně s nerozpoznatelnými červenými strukturami (obr. 48). Druhá komponenta způsobuje modrou fluorescenci buněčné stěny bez ohledu na metabolické stádium buňky. Pro rozlišení jen živých buněk bylo použito známé fluorescenční barvivo pro testování vitality buněk fluorescein diacetát FDA (zelenkavá fluorescence; obr. 13). V živých buňkách způsobuje FDA zelenou fluorescenci, protože je schopen proniknout do cytoplazmy, kde je následně hydrolyzován esterázami na fluoreskující fluorescein, který již není schopen difundovat cytoplazmatickou membránou zpět.



Obr. 48 Buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 obarvené pomocí LIVE/DEAD Yeast Viability kitu (6,35 µM FUN 1 a 25,25 µM Calcofluor White M2R; pH 7,2). Kultivace buněk: 20hod. v glukoso-peptonovém kvasinkovém extraktu za aerobních podmínek. Použitá filtrační kostka UV-2EC(DAPI) (vpravo) a B-2A (vlevo)

Roztok akridinové oranži byl připraven rozpuštěním 10 mg AO v 50 ml vody a následně byl smíchán s fosfátovým pufrem o pH 6 v poměru 1:2. K přípravě fosfátového pufru bylo použito 13,2 ml 1M K₂HPO₄ a 86,8 ml 1M KH₂PO₄.

Roztok FDA byl připraven rozpuštěním 0,25 g v 10 ml acetonu. Dále byl smíchán s fosfátem pufrovaným fyziologickým roztokem s pH 7,2 v poměru 1:9.

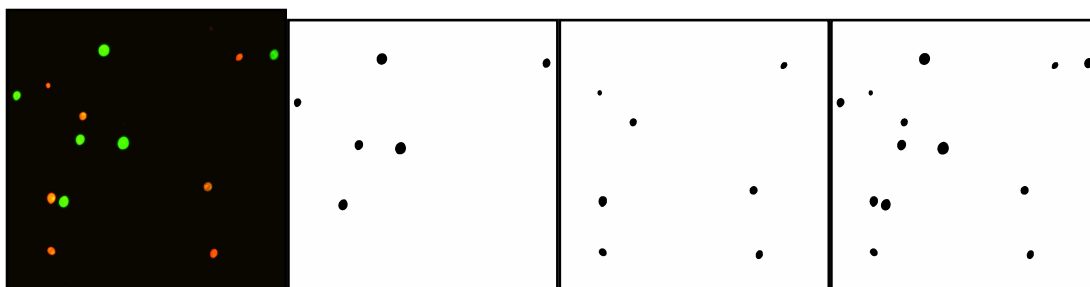
Zásobní roztok barviva FUN-1 o koncentraci 49,75 µM byl připraven ředěním 300 µl původního roztoku 10 mM FUN-1 v bezvodém dimethylsulfoxidu DMSO tak, že bylo odpipetováno 25 µl tohoto roztoku a přidáno 5 ml DMSO. Zásobní roztok Calcofluoru White M2R o koncentraci 50,5 µM byl připraven ředěním 500 µl původního roztoku 5 mM Calcofluoru White M2R ve vodě tak, že bylo odpipetováno 51 µl tohoto roztoku a přidáno 5 ml redestilované vody.

Následně bylo odebráno ze zaočkování živného média č. 1 (viz. kap. 3.1) 50 µl a přidáno do 1 ml pufrovaného fyziologického roztoku nebo pufrovaného média č. 1

v plastové zkumavce a odstředováno při $10\,000\text{ ot.min}^{-1}$ po dobu 5 minut. Supernatant byl odpipetován a kvasničný sediment byl opět zředěn roztokem o pH 7,2 a suspenze kvasinek byla promíchána na minitřepačce. Ředění se řídilo nárůstem kultury v kapalném živném médiu. K různému objemu suspenze buněk (82–100 μl) a různému objemu zásobního roztoku FUN-1 (28–10 μl) bylo přidáno vždy 110 μl barviva Calcofluor White M2R, který měl v celkovém objemu 220 μl koncentraci 25,25 μM a koncentrace FUN-1 se pohybovala v intervalu od 6,3 do 2,26 μM .

Kvasinky byly kultivovány na šikmém sladinném agaru při pokojové teplotě a poté byly sterilní kličkou naočkovány do 50 ml sterilního kapalného živného média č. 1 (glukoso-peptono-kvasinkový extrakt) v Erlenmeyerově baňce. Po promíchání kultury v živném médiu byly staticky kultivovány minimálně 24 hodin opět při pokojové teplotě za aerobních podmínek. Poté byl poloviční objem živného média s buňkami vystaven $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 3–6 hodin (dle druhu kvasinky). Před odběrem byla daná kultura promíchána, protože kvasinky sedimentují. Na podložní sklíčko byla nanесena kapka směsi živých a mrtvých buněk kvasinek a byla přidána kapka fluorescenčního barviva AO či FDA. Preparát byl pozorován ihned při barvení fluorescein diacetátem a po cca 30 minutách při barvení akridinovou oranží. Při barvení sadou LIVE/DEAD Yeast Viability Kit byl preparát pozorován po minimálně 2 hodinách. Vyhodnocován byl počet buněk v 35 vyfocených zorných polích, náhodně vybraných míst vzorku obarvených kvasinek a obrázky byly zpracovány pomocí programu HarFa.

Pomocí fluorescenčního barvení lze na jednom obrázku naprahovat buď mrtvé, nebo živé buňky na černou barvu (obr. 49). Obrazy buněk byly prahovány dle intenzity či dle složek RGB prostoru. Ke zjištění vhodného prahování lze použít fraktální spektrum tj. závislost fraktální dimenze na intenzitě či zvolené RGB složce, které je dostupné v programu HarFA jako nástroj *Fractal Analysis – Range*.



Obr. 49 Obrázky buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené akridinovou oranží s rozlišením 1280×1024 . Černobílé obrázky představují naprahované obrázky na celkový počet buněk dle intenzity ($I = 55\text{--}255$), na mrtvé buňky dle komponent RGB prostoru ($R = 100\text{--}255$, $G = 0\text{--}254$) a na živé buňky opět dle komponent RGB prostoru ($R = 0\text{--}254$, $G = 140\text{--}255$). Použitá filtrační kostka B-2A

Množství buněk x a jejich poloměr r byly stanoveny za předpokladu, že obrazy buněk jsou kruhového tvaru podobné velikosti a jsou rozlišitelné na pozadí podle vztahů (50) tzv. *metodou maximální hodnoty počtu* a podle vztahu (54) tzv. *metodou prahové distribuce*. Při analýze obrazů byla využita vlnková transformace při fraktální analýze obrazu tzv. *metodou počítáním čtverců sítě* (box counting method).

Při použití fotoaparátu Nikon Coolpix5400 byl použit manuální expoziční režim, kdy lze nastavit manuálně hodnotu času závěrky i clonu. Většinou vyhovovalo nastavení pro závěrku $1/8$ a pro clonu $F\ 4.6$. Samozřejmostí bylo nastavení kvality obrazu na nejvyšší HI s formátem

TIFF s velikostí fotografie 5M. Hodnota citlivosti fotoaparátu ke světlu byla nastavena na ISO 50 či byl použit automatický režim AUTO, aby se minimalizoval výskyt obrazového šumu. Blesk byl vypnut. Vyvážení bílé barvy bylo nastaveno na zářivkové světlo Fluorescent FL2. Pro nastavení kontrastu bylo použito více kontrastu, nastavení sytosti barev na normální. Měření expozice bylo nastaveno na optimální světelné vyvážení celého snímku. Zaostření na nekonečno.

V případě použití videokamery PixelLink PL-A662 si můžeme pomocí programu Lucia Net 1.16.6. nastavit také některé parametry jako je vyvážení bílé či černé barvy, sytost barvy, gama korekci.

3.2.3 Metoda maximální hodnoty počtu ve výsledcích

Při počítání živých a mrtvých buněk různých druhů kvasinek pomocí fraktální analýzy bylo zjištěno, že průměrná chyba stanovení počtu buněk z 35 obrázků pořízených fotoaparátem Nikon Coolpix5400 je menší než 10 % při počtu buněk v obrázku do 20 (tab. 2, 3, 5). Tato chyba je způsobena nestejnou velikostí buněk a tvaru, rozdíly v barevnosti jednotlivých buněk a kvalitou zaznamenaného obrázku. Pokud jsou buňky usmrceny teplem barví se také cytoplazma na zeleno, což komplikuje proces prahování u buněk obarvených AO. Stejně jako při přímém stanovení počtu buněk byly pučící buňky počítány jako jedna buňka, nesla-li dceřiná buňka další pupen, ale ještě se neoddělila od buňky mateřské, byly počítány jako dvě. Zjištěné poloměry obrazů buněk kvasinek za předpokladu, že mají kulatý tvar, jsou uvedeny v tabulce 4, jsou v rozsahu 2,61–4,12 μm . Poloměry rozměrově spadají do hodnot uváděných v literatuře, případně jsou o něco větší [75].

Tabulka 2

Průměrné počty buněk z 35 obrázků vzorku různých druhů kvasinek obarvené akridinovou oranží AO, které byly získány fraktální analýzou, mrtvé buňky byly tepelně usmrceny; Δ – průměrná chyba

Druh kvasinky	AO					
	Počet mrtvých buněk	Δ (%)	Počet živých buněk	Δ (%)	Celkový počet buněk	Δ (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5,42	8,05	6,60	8,66	11,97	6,10
<i>Saccharomyces cerevisiae FV1</i>	4,19	7,23	7,00	4,85	11,19	4,61
<i>Kloeckera apiculata</i>	4,94	6,61	10,34	6,94	14,90	5,66
<i>Hansenula anomala</i>	10,17	8,44	10,38	6,92	20,57	5,22

Tabulka 3

Průměrné počty buněk z 35 obrázků vzorku různých druhů kvasinek obarvené fluorescein diacetátem FDA, které byly získány fraktální analýzou, mrtvé buňky byly tepelně usmrceny; Δ – průměrná chyba

Druh kvasinky	FDA	
	Počet živých buněk	Δ (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11,40	4,02
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FV1	8,96	3,74
<i>Kloeckera apiculata</i>	10,53	5,93
<i>Hansenula anomala</i>	8,05	8,11

Tabulka 4

Průměrné poloměry buněk z 35 obrázků vzorku různých druhů kvasinek, které byly získány fraktální analýzou; mrtvé buňky byly tepelně usmrceny; AO – akridinová oranž, FDA – fluorescein diacetát

Druh kvasinky	AO			FDA
	Průměrný poloměr mrtvých buněk (μm)	Průměrný poloměr živých buněk (μm)	Průměrný poloměr všech buněk (μm)	Průměrný poloměr živých buněk (μm)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3,25	4,12	3,74	3,78
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FV1	3,47	3,70	3,55	3,75
<i>Kloeckera apiculata</i>	2,88	2,72	2,96	2,62
<i>Hansenula anomala</i>	2,61	2,65	2,72	3,17

Tabulka 5

Průměrné hodnoty počtu a poloměru buněk z 35 obrázků vzorku, které byly získány fraktální analýzou s množstvím přirozeně mrtvých buněk po dvouměsíční kultivaci v kapalném živném médiu

Druh kvasinky	LIVE/DEAD Yeast Viability Kit					
	Počet mrtvých buněk	Průměrná chyba (%)	Celkový počet buněk	Průměrná chyba (%)	Průměrný poloměr mrtvých buněk (μm)	Průměrný poloměr všech buněk (μm)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,90	8,64	9,65	7,96	3,61	4,10

Při pořízení 15 snímků vzorku kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* CCD kamerou, bylo zjištěno, že jsou obecně mrtvé buňky (průměrný poloměr $r = 20$ pixelů) menší než živé

(průměrný poloměr $r = 22$ pixelů), což platilo i u předchozího měření. Průměrný celkový počet buněk v obrázku byl 13 (chyba = 21 %), tepelně usmrcených buněk 8 (20 %) a živých buněk 4 (15 %). Z výsledků lze tedy vidět, že pokud je buňka reprezentována více pixely chyba stanovení počtu buněk klesá. Z výsledků lze vidět, že chyba stanovení počtu buněk v obrazech pořízených CCD kamerou s rozlišením 1280×1024 je vyšší.

Tabulka 6

Průměrné počty buněk z 15 obrázků vzorku kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené akridinovou oranží AO, které byly získány fraktální analýzou, mrtvé buňky byly tepelně usmrceny

Druh kvasinky	AO					
	Počet mrtvých buněk	Průměrná chyba (%)	Počet živých buněk	Průměrná chyba (%)	Celkový počet buněk	Průměrná chyba (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7,6	20,33	4,34	15,48	12,62	20,79

V předchozích pracích byla zjištěna chyba stanovení počtu buněk *Saccharomyces cerevisiae* pomocí klasické metody box counting v programu HarFa na 9,28 % při analýze 100 obrázků pořízených CCD kamerou s rozlišením 752×548 pixelů s počtem buněk v rozmezí řádově od desítek do stovky. Bylo zjištěno, že stanovení počtu buněk *Saccharomyces cerevisiae* je přesnější než ruční počítání, při snížení vlivu lidského faktoru [78].

Vyšší přesnost je dosažitelná optimální volbou velikosti buněk v obraze (ta může být jednoduše modifikovaná změnou optického zvětšení) a optimálním množstvím buněk v obraze (může být měněn ředěním buněčné kultury). Nejvhodnější parametry (velikost buněk, množství buněk v obraze) mohou být zavedeny do jejich vyhodnocení ve dvou ideálních případech:

1. Pro různé množství N buněk kulovitého tvaru se stejným poloměrem r .
2. Pro neměnné množství N buněk kulovitého tvaru s různým poloměrem r .

Bylo nalezeno, že optimální velikost buněk (tím se myslí poloměr r) pro obrazovou analýzu je 35 pixelů [79]. Počet buněk v analyzovaném obrázku, který lze stanovit, aniž by se projevil chybným vyhodnocením, je limitován skutečností, že se buňky nesmí vzájemně překrývat.

3.2.4 Metoda prahové distribuce ve výsledcích

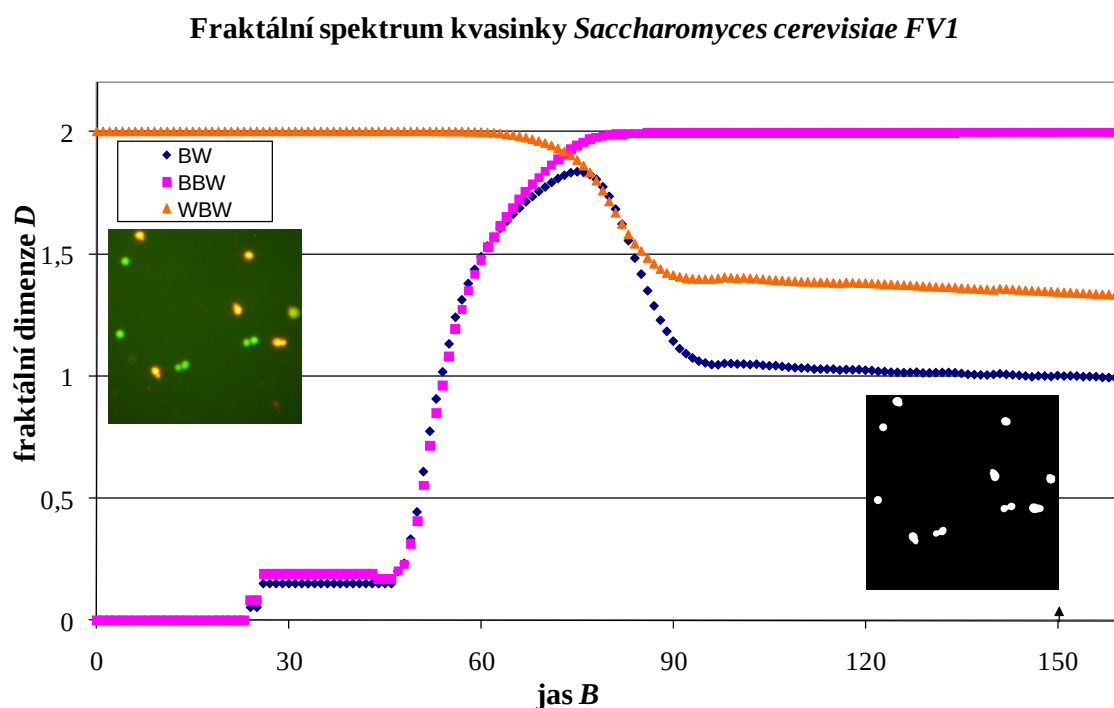
Bylo analyzováno vždy 10 pořízených fotografií kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata* a *Hansenula anomala* fotoaparátem Nikon Coolpix5400 obarvené akridinovou oranží a fluorescein diacetátem. Jedna série deseti pořízených fotografií kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byla obarvena také Calcofluorem White M2R. Pro každou sérii fotografií byly zjištěny možnosti analýzy v různých barvových prostorech (tab. 7). Pro zjištění těchto možností byla získána fraktální spektra z vybrané fotografie každé série podle barevných složek R , G , B , H , B a intenzity. Fraktální spektra vybraného obrazu č. 5 kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 prahovaného dle červené složky barvového prostoru RGB a dle jasu v barvovém prostoru HSB lze vidět na obr. 50, obr. 51. Z tabulky 7 lze vidět, že celkový počet buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 lze získat analýzou podle intenzity, jasu, zelené a červené složky a počet

mrtvých buněk analýzou podle intenzity a červené složky. Je vhodné volit pro analýzu takový barvový prostor, kde lze nalézt širokou téměř neměnnící se oblast hodnot získaného počtu.

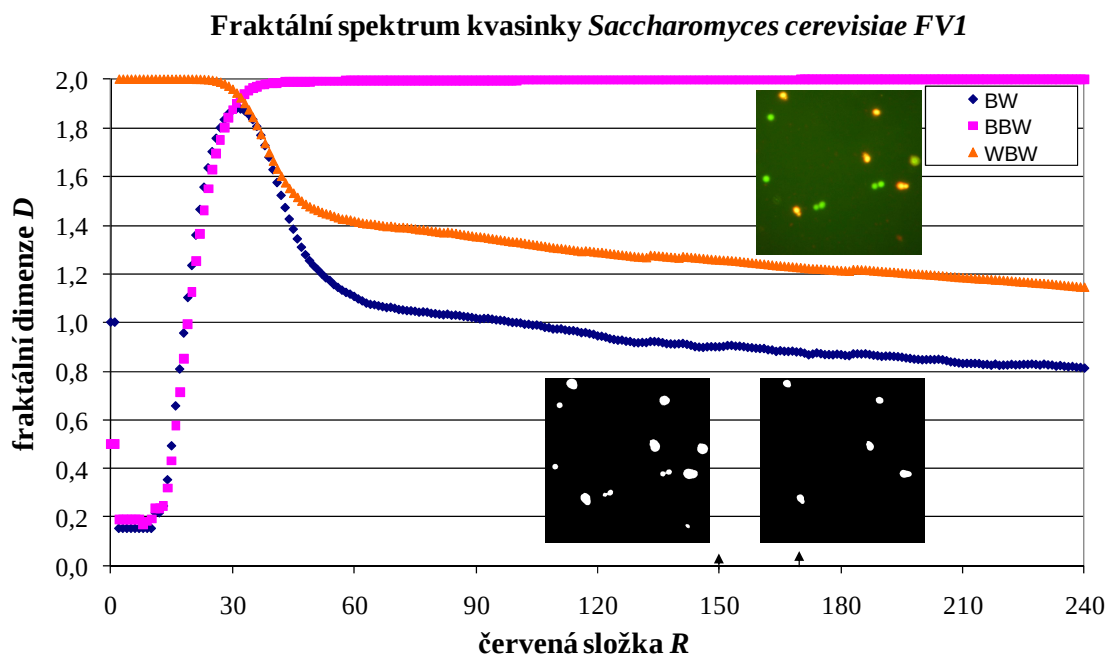
Tabulka 7

Hodnoty prahu pro mrtvé, živé buňky kvasinky *Saccharomace cerevisce* FV1 obarvené AO a pozadí obrazu č. 5 podle složek barvového prostoru RGB, HSB a složky intenzity

Složka barvy	Hodnota prahu pozadí	Rozsah hodnot prahu živé buňky	Rozsah hodnot prahu mrtvé buňky
Intenzita I	65	80–160	80–230
Červená R	60	65–135	65–255
Zelená G	95	90–255	90–255
Odstín H	95	93	65–70
Jas B	90	90–255	95–255

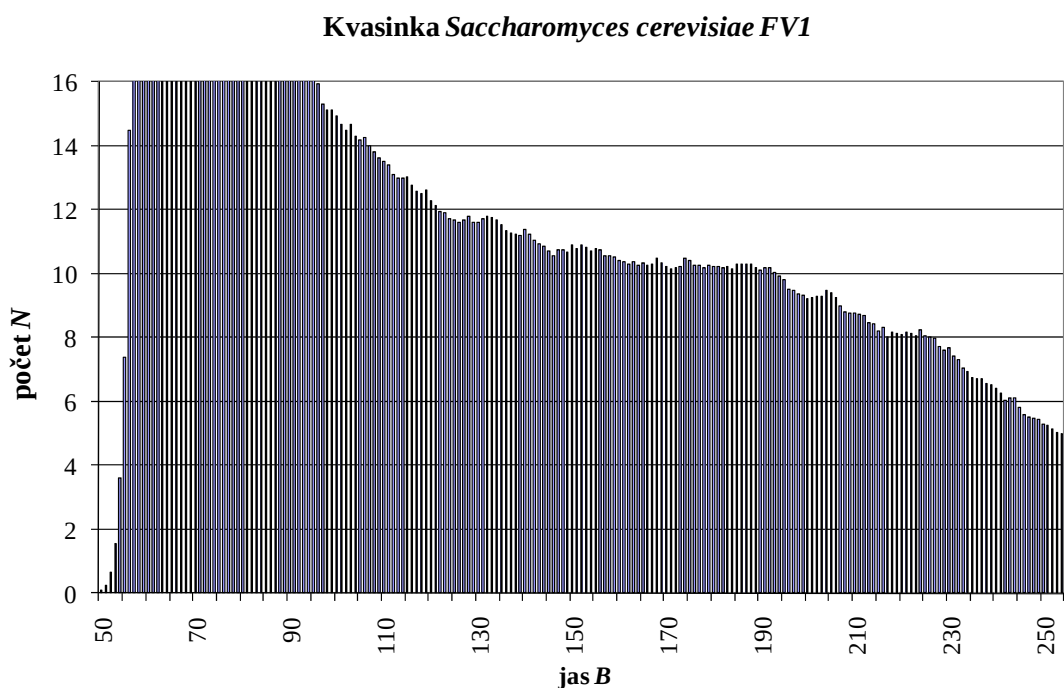


Obr. 50 Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* FV1 – závislost fraktální dimenze na prahované hodnotě jasu v barvovém prostoru HSB, obraz č. 5



Obr. 51 Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* FV1 – závislost fraktální dimenze na prahované hodnotě červené složky v barvovém prostoru RGB, obraz č. 5

Pro každou hodnotu prahu například podle jasu lze vypočítat odpovídající počet právě naprahovaných objektů, což lze vidět v následujícím grafu. V příloze 1 lze nalézt závislosti zjištěného počtu buněk na měnící se zvolené barvové složce pro všech 10 získaných fotografií v každé sérii obrazů pro daný druh kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata*, *Hansenula anomala* obarvený akridinovou oranží, fluorescein diacetátem či Calcofluorem White M2R.



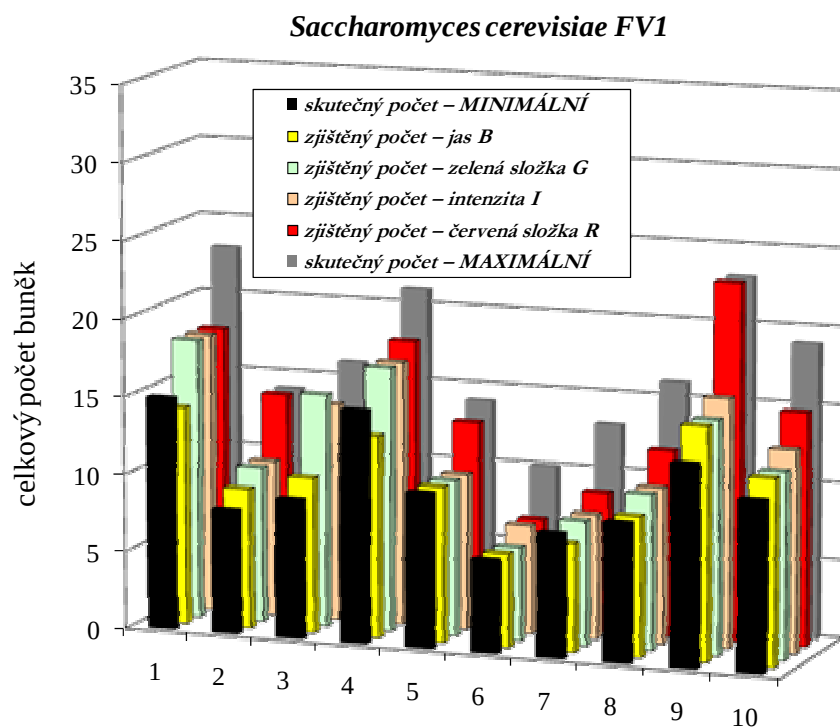
Obr. 52 Závislost počtu buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 na hodnotě prahu jasu, obraz č. 5

V následující tabulce jsou uvedeny zjištěné počty buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 analyzovaných obrazů. U každého obrazu všech sérií bylo zprůměrováno minimálně 21 hodnot z oblasti, kdy byl obraz buněk dobře naprahován. Minimální hodnota v intervalu skutečného počtu buněk byla počítána tak, že i pučící buňky byly počítány za jednu stejně jako osamoceně buňky a maximální hodnota byla dána tak, že každý pupen byl počítán jako další buňka.

Tabulka 8

Počty buněk obrazů vzorku kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 obarvené akridinovou oranží AO, které byly získány fraktální analýzou, mrtvé buňky byly tepelně usmrceny. Zprůměrovaný rozsah hodnot jasu $B = 160\text{--}180$, zprůměrovaný rozsah hodnot intenzity $I = 100\text{--}120$, zprůměrovaný rozsah hodnot červené složky $R = 80\text{--}100$, zprůměrovaný rozsah hodnot zelené složky $G = 130\text{--}150$

Obraz . č.	Skutečný celkový počet	Zjištěný celkový počet buněk podle jasu B	Zjištěný celkový počet buněk podle zelené složky G	Zjištěný celkový počet buněk podle intenzity I	Zjištěný celkový počet buněk podle červené složky R
1	15–23	14	18	18	18
2	8–14	9	10	10	14
3	9–16	10	15	14	13
4	15–21	13	17	17	18
5	10–14	10	10	10	13
6	6–10	6	6	7	7
7	8–13	7	8	8	9
8	9–16	9	10	10	12
9	13–23	15	15	16	23
10	11–19	12	12	13	15

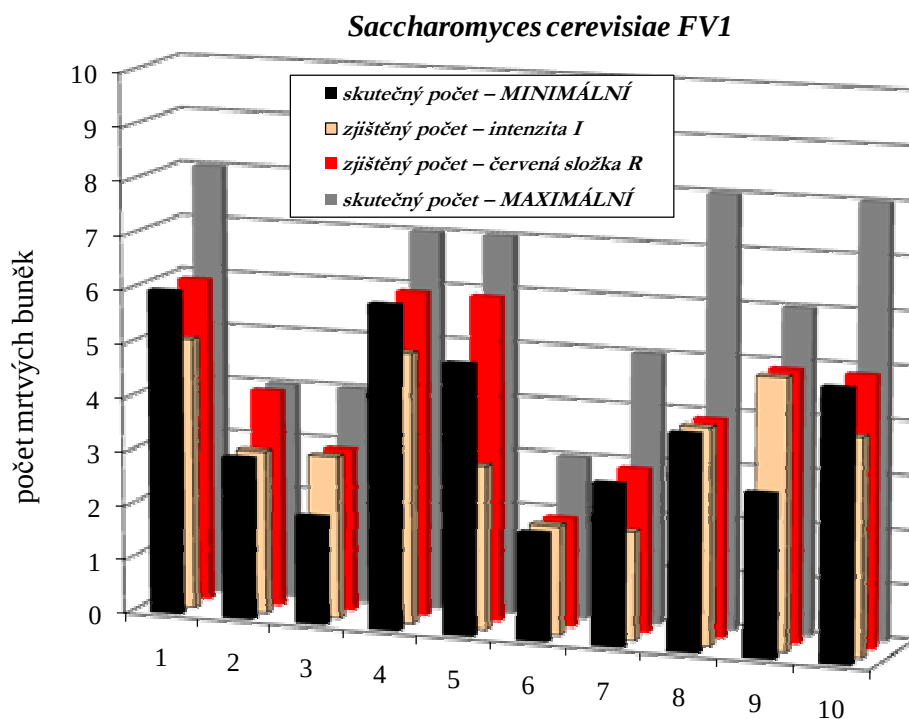


Obr. 53 Zjištěné počty buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 obarvené AO podle různých barvových složek získaného obrazu

Tabulka 9

Počty buněk obrazů vzorku kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 obarvené akridinovou oranží AO, které byly získány fraktální analýzou, mrtvé buňky byly tepelně usmrceny. Zprůměrovaný rozsah hodnot intenzity $I = 190\text{--}210$, zprůměrovaný rozsah hodnot červené složky $R = 150\text{--}170$

Obraz. č.	Skutečný počet mrtvých buněk	Zjištěný počet mrtvých buněk podle intenzity I	Zjištěný počet mrtvých buněk podle červené složky R
1	6–8	5	6
2	3–4	3	4
3	2–4	3	3
4	6–7	5	6
5	5–7	3	6
6	2–3	2	2
7	3–5	2	3
8	4–8	4	4
9	3–6	5	5
10	5–8	4	5

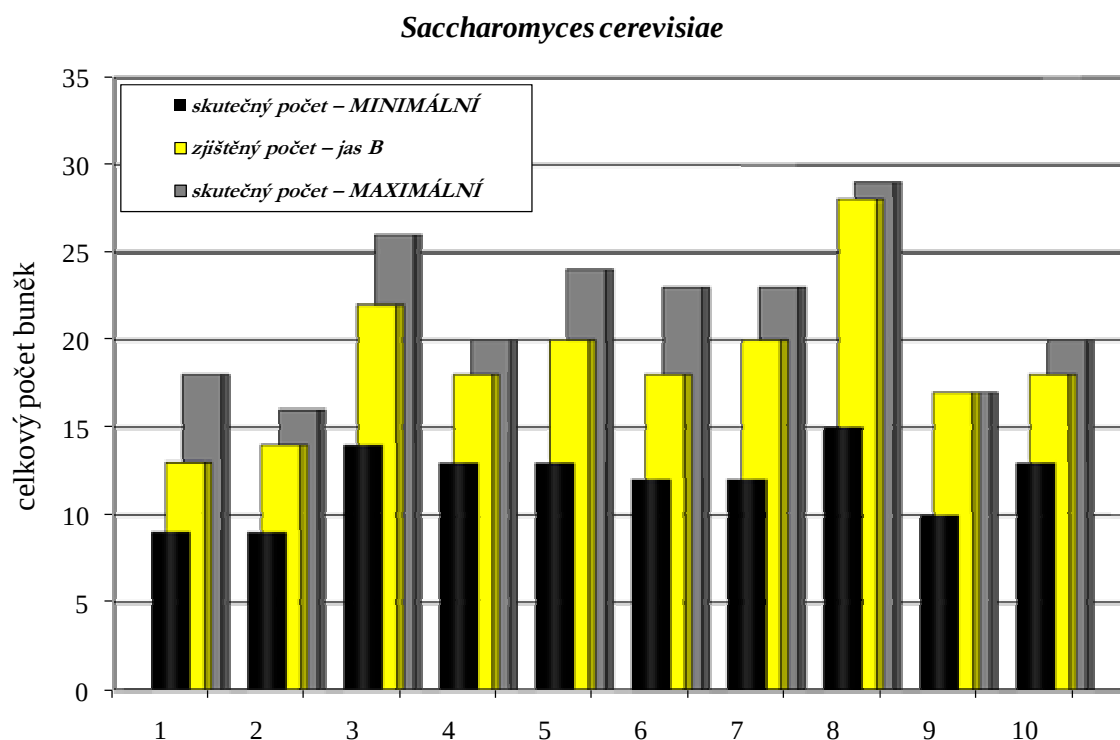


Obr. 54 Zjištěné počty mrtvých buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 obarvené AO podle různých barvových složek získaného obrazu

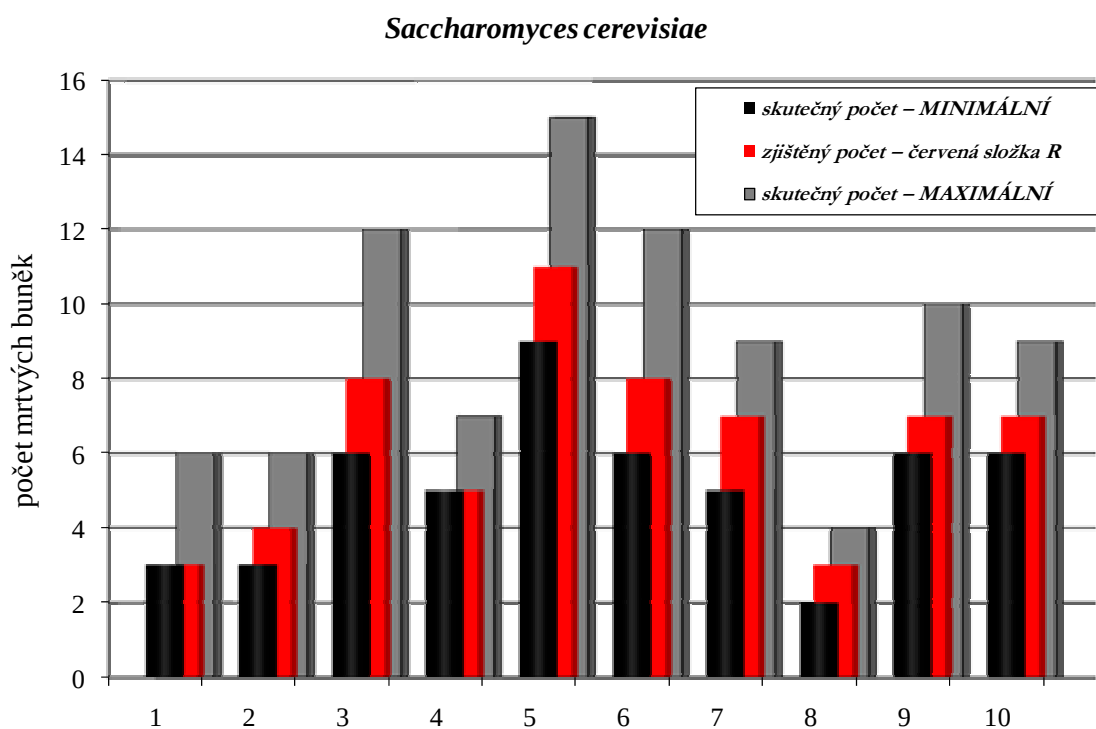
Tabulka 10

Počty buněk obrazů vzorku kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené akridinovou oranží AO, které byly získány fraktální analýzou, mrtvé buňky byly tepelně usmrceny. Zprůměrovaný rozsah hodnot jasu B = 50–80, zprůměrovaný rozsah hodnot červené složky R = 90–254

Obraz. č.	Skutečný celkový počet buněk	Zjištěný celkový počet buněk podle jasu B	Skutečný počet mrtvých buněk	Zjištěný počet mrtvých buněk podle červené složky R
1	9–18	13	3–6	3
2	9–16	14	3–6	4
3	14–26	22	6–12	8
4	13–20	18	5–7	5
5	13–24	20	9–15	11
6	12–23	18	6–12	8
7	12–23	20	5–9	7
8	15–29	28	2–4	3
9	10–17	17	6–10	7
10	13–20	18	6–9	7



Obr. 55 Zjištěný celkový počet buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené AO podle složky jasu B barvového prostoru HSB

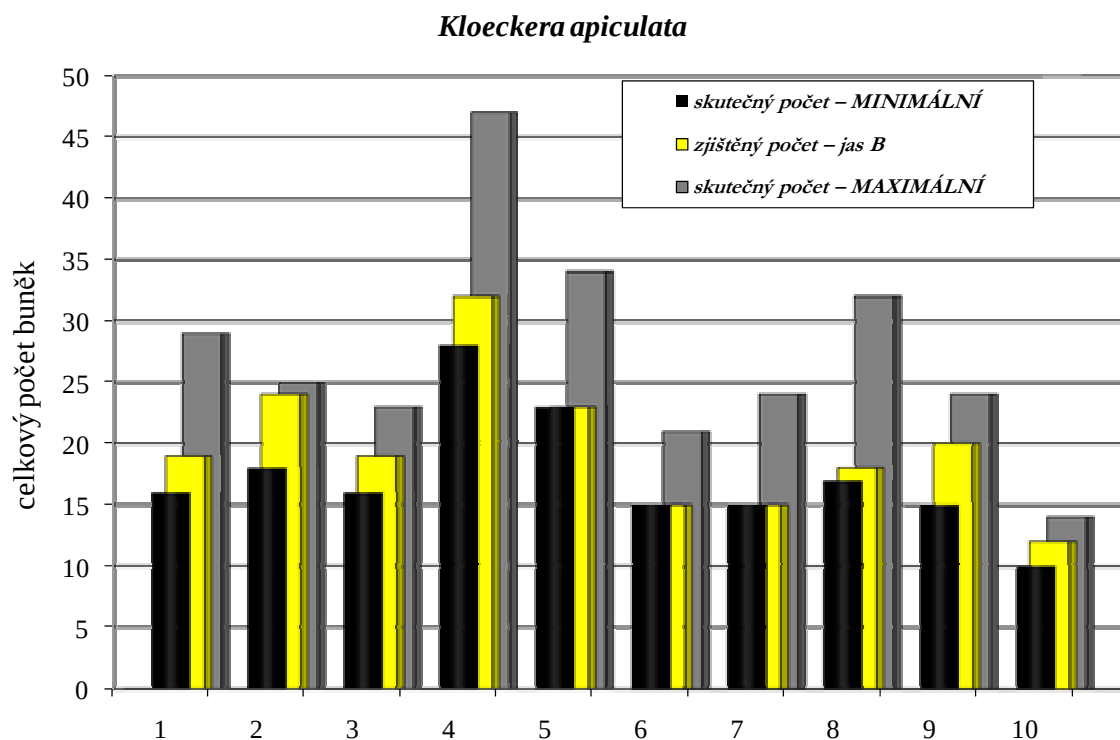


Obr. 56 Zjištěný počet mrtvých buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené AO podle červené složky R barvového prostoru RGB

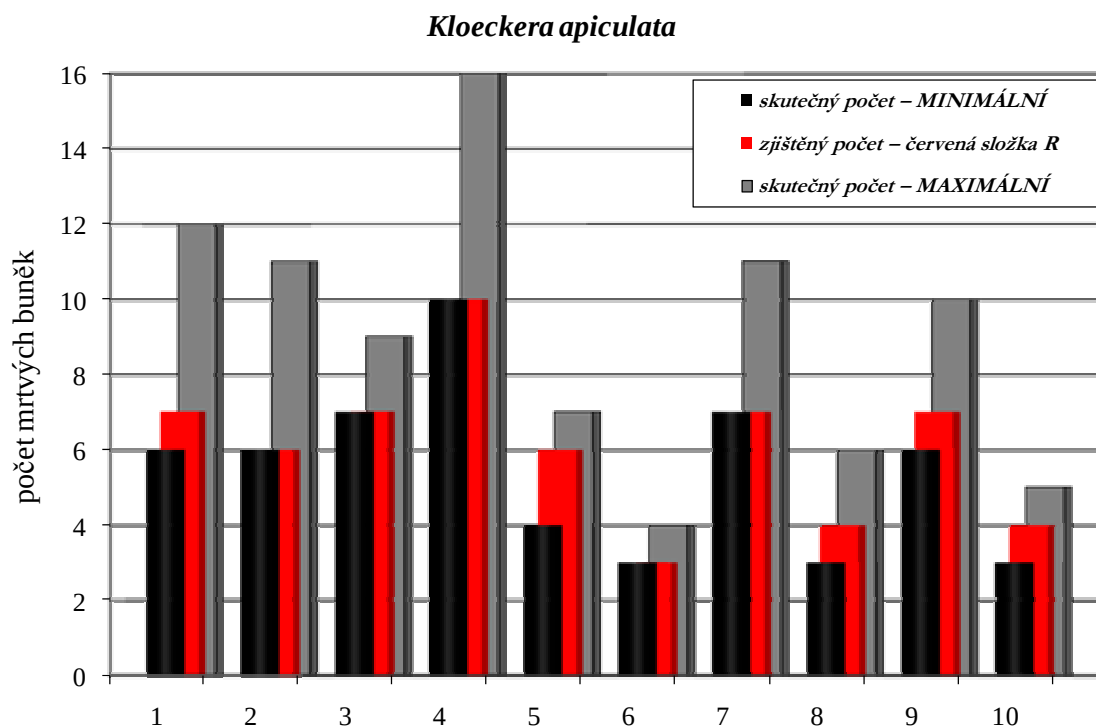
Tabulka 11

Počty buněk obrazů vzorku kvasinky *Kloeckera apiculata* obarvené akridinovou oranží AO, které byly získány fraktální analýzou, mrtvé buňky byly tepelně usmrceny. Zprůměrovaný rozsah hodnot jasu $B = 33\text{--}55$, zprůměrovaný rozsah hodnot červené složky pro obraz č. 2, 6–10 je $R = 80\text{--}100$ a pro obraz č. 1, 3–5 je $R = 90\text{--}110$

Obraz. č.	Skutečný celkový počet buněk	Zjištěný celkový počet buněk podle jasu B	Skutečný počet mrtvých buněk	Zjištěný počet mrtvých buněk podle červené složky R
1	16–29	19	6–12	7
2	18–25	24	6–11	6
3	16–23	19	7–9	7
4	28–47	32	10–16	10
5	23–34	23	4–7	6
6	15–21	15	3–4	3
7	15–24	15	7–11	7
8	17–32	18	3–6	4
9	15–24	20	6–10	7
10	10–14	12	3–5	4



Obr. 57 Zjištěný celkový počet buněk kvasinky *Kloeckera apiculata* obarvené AO podle jasu B barvového prostoru HSB



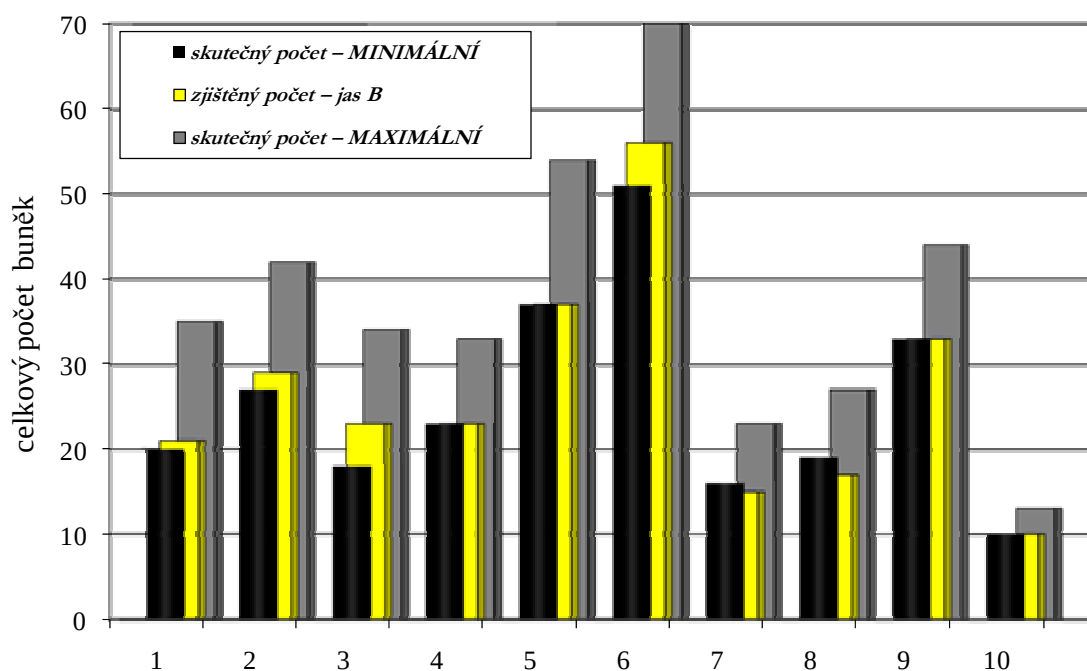
Obr. 58 Zjištěný počet mrtvých buněk kvasinky *Kloeckera apiculata* obarvené AO podle červené složky R barvového prostoru RGB

Tabulka 12

Počty buněk obrazů vzorku kvasinky *Hansenula anomala* obarvené akridinovou oranží AO, které byly získány fraktální analýzou, mrtvé buňky byly tepelně usmrceny. Zprůměrovaný rozsah hodnot jasu $B = 50\text{--}70$, zprůměrovaný rozsah hodnot červené složky $R = 45\text{--}75$

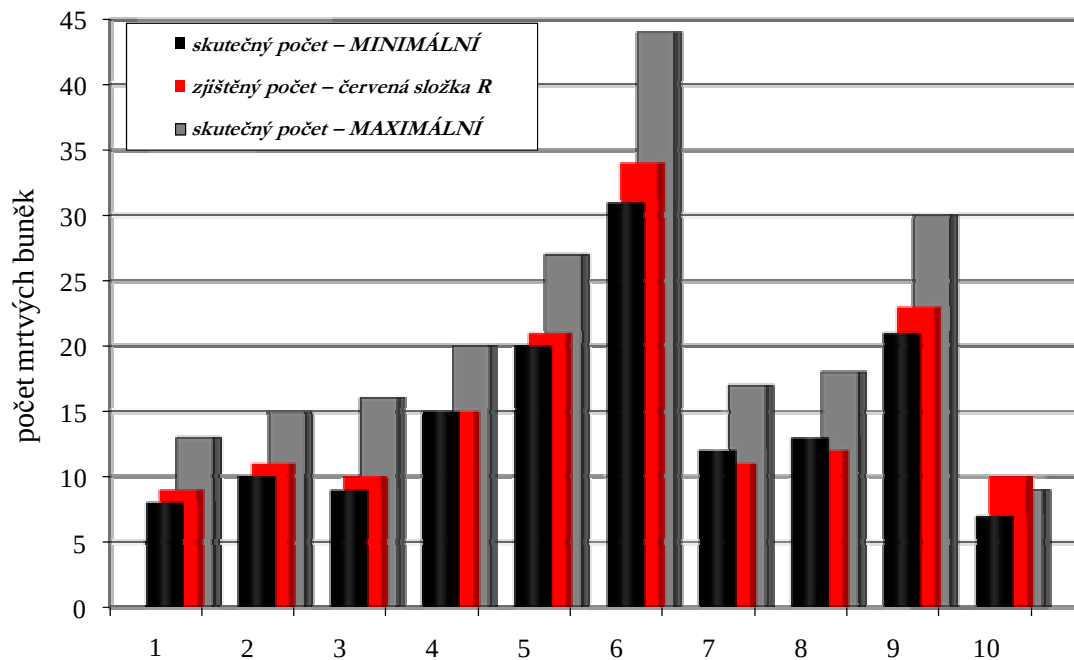
Obraz. č.	Skutečný celkový počet buněk	Zjištěný celkový počet buněk podle jasu B	Skutečný počet mrtvých buněk	Zjištěný počet mrtvých buněk podle červené složky R
1	20–35	21	8–13	9
2	27–42	29	10–15	11
3	18–34	23	9–16	10
4	23–33	23	15–20	15
5	37–54	37	20–27	21
6	51–70	56	31–44	34
7	16–23	15	12–17	11
8	19–27	17	13–18	12
9	33–44	33	21–30	23
10	10–13	10	7–9	10

Hansenula anomala



Obr. 59 Zjištěný celkový počet buněk kvasinky *Hansenula anomala* obarvené AO podle jasu B barvového prostoru HSB

Hansenula anomala



Obr. 60 Zjištěný počet mrtvých buněk kvasinky *Hansenula anomala* obarvené AO podle červené složky R barvového prostoru RGB

Z předcházejících grafů lze vidět, že zjištěné počty kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata*, *Hansenula anomala* obarvené akridinovou oranží většinou spadají do intervalu skutečného počtu buněk. Pro zjištění celkového počtu obarvených buněk je vhodná analýza podle jasu B v barvovém prostoru HSB

nebo podle intenzity I a pro zjištění mrtvých buněk je vhodná analýza podle červené složky R v barvovém prostoru RGB.

Dále byly analyzovány série deseti pořízených fotografií kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata* a *Hansenula anomala* obarvené fluorescein diacetátem FDA. Z tabulky 13 lze vidět, že počet živých buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 lze získat analýzou podle intenzity, jasu, červené a zelené složky.

Tabulka 13

Hodnoty prahu pro živé buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 obarvené fluorescein diacetátem FDA a pozadí obrazu č. 8 podle složek barvového prostoru RGB, HSB a složky intenzity

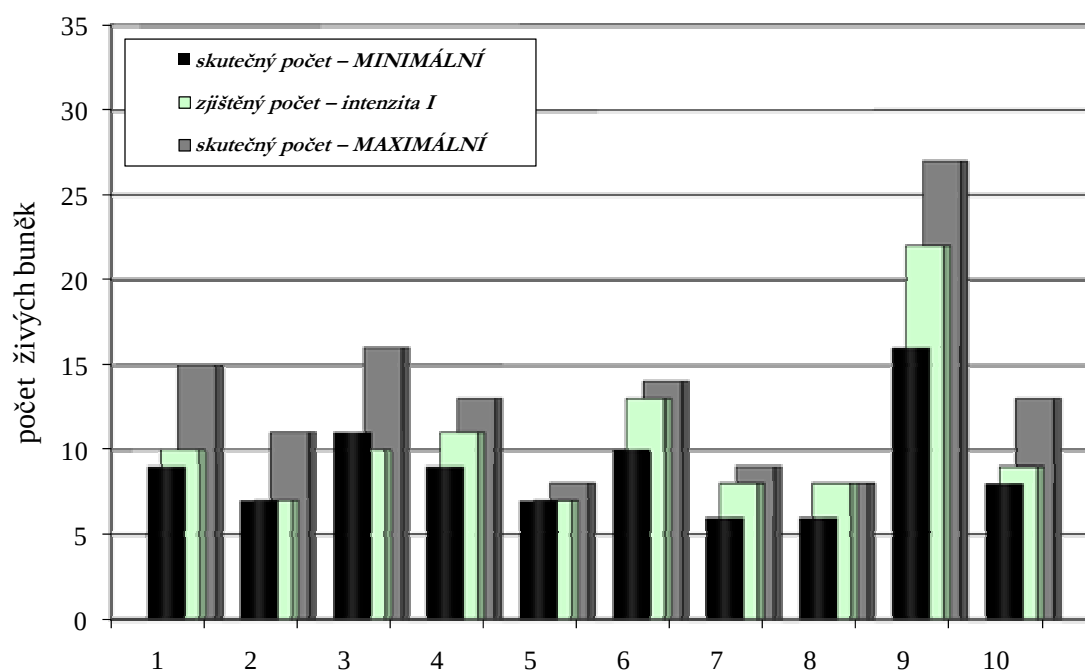
Složka barvy	Hodnota prahu pozadí	Rozsah hodnot prahu živé buňky
Intenzita I	15	30–225
Červená R	1	1–200
Zelená G	30	45–255
Odstín H	110	100–120
Jas B	30	45–255

Tabulka 14

Počty buněk obrazů vzorku kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1, *Saccharomyces cerevisiae* obarvené fluorescein diacetátem FDA, které byly získány fraktální analýzou, mrtvé buňky byly tepelně usmrceny. Zprůměrovaný rozsah hodnot intenzity $I = 40–60$, zprůměrovaný rozsah hodnot jasu $B = 60–120$

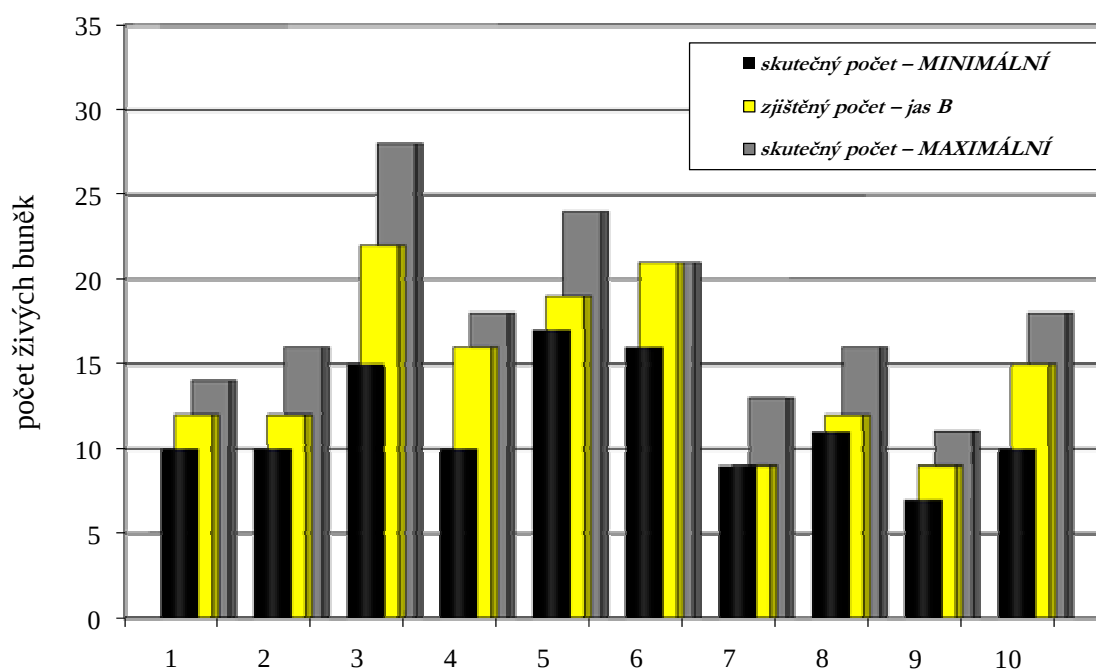
Obraz. č.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FV1		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	Skutečný počet živých buněk	Zjištěný počet živých buněk podle intenzity I	Skutečný počet živých buněk	Zjištěný počet živých buněk podle jasu B
1	9–15	10	10–14	12
2	7–11	7	10–16	12
3	11–16	10	15–28	22
4	9–13	11	10–18	16
5	7–8	7	17–24	19
6	10–14	13	16–21	21
7	6–9	8	9–13	9
8	6–8	8	11–16	12
9	16–27	22	7–11	9
10	8–13	9	10–18	15

Saccharomyces cerevisiae FV1



Obr. 61 Zjištěný počet živých buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 obarvené fluorescein diacetátem FDA podle intenzity I

Saccharomyces cerevisiae

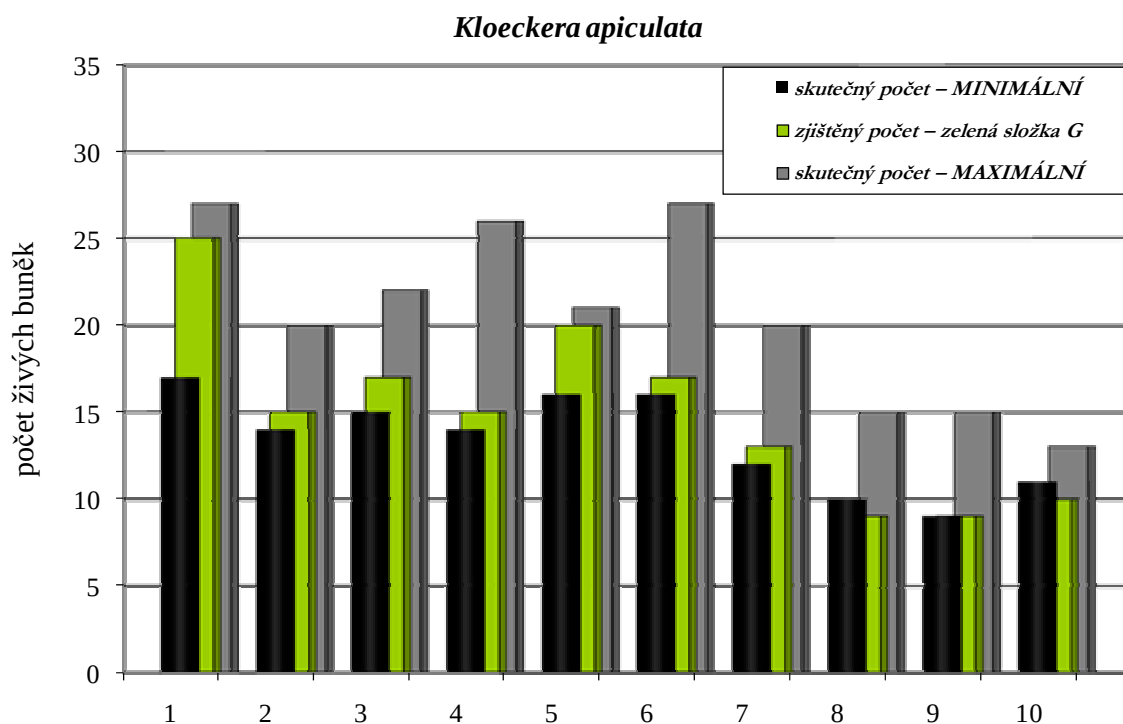


Obr. 62 Zjištěný počet živých buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené fluorescein diacetátem FDA podle jasu B barvového prostoru HSB

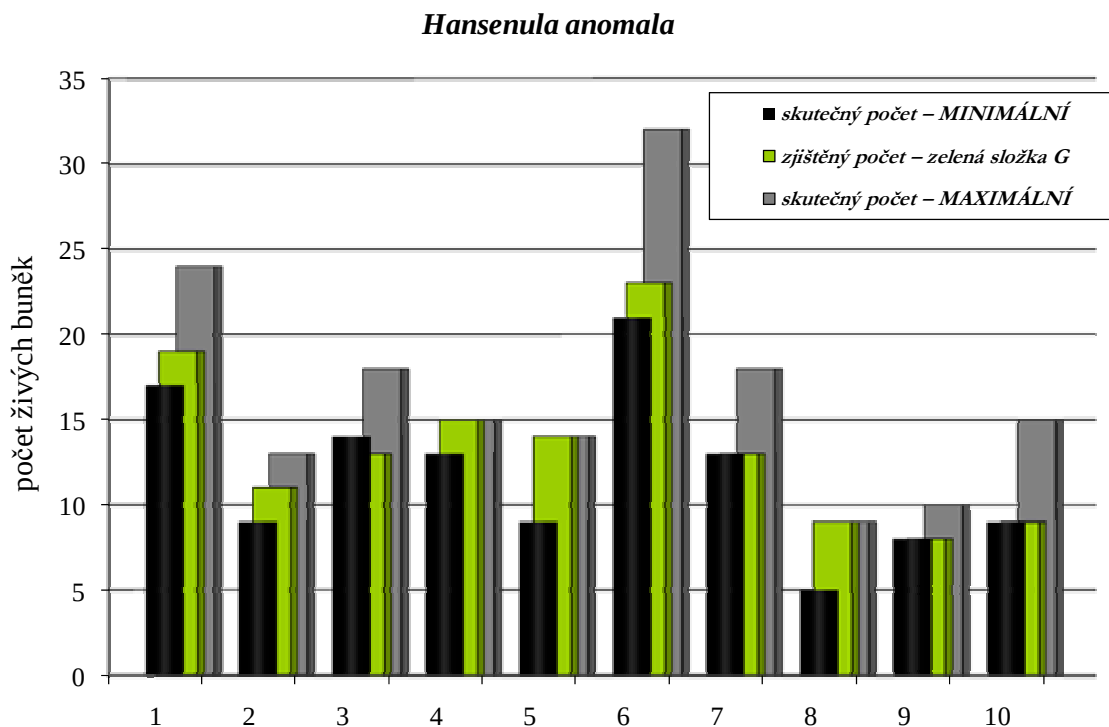
Tabulka 15

Počty buněk obrazů vzorku kvasinky *Kloeckera apiculata*, *Hansenula anomala* obarvené fluorescein diacetátem FDA, které byly získány fraktální analýzou, mrtvé buňky byly tepelně usmrceny. Zprůměrovaný rozsah hodnot zelené složky $G = 30\text{--}50$ pro kvasinku *Kloeckera apiculata*, zprůměrovaný rozsah hodnot zelené složky $G = 40\text{--}100$ pro kvasinku *Hansenula anomala*

Obraz. č.	<i>Kloeckera apiculata</i>		<i>Hansenula anomala</i>	
	Skutečný počet živých buněk	Zjištěný počet živých buněk podle zelené složky G	Skutečný počet živých buněk	Zjištěný počet živých buněk podle zelené složky G
1	17–27	25	17–24	19
2	14–20	15	9–13	11
3	15–22	17	14–18	13
4	14–26	15	13–15	15
5	16–21	20	9–14	14
6	16–27	17	21–32	23
7	12–20	13	13–18	13
8	10–15	9	5–9	9
9	9–15	9	8–10	8
10	11–13	10	9–15	9



Obr. 63 Zjištěný počet živých buněk kvasinky *Kloeckera apiculata* obarvené fluorescein diacetátem FDA podle zelené složky G barvového prostoru RGB



Obr. 64 Zjištěný počet živých buněk kvasinky *Hansenula anomala* obarvené fluorescein diacetátem FDA podle zelené složky G barvového prostoru RGB

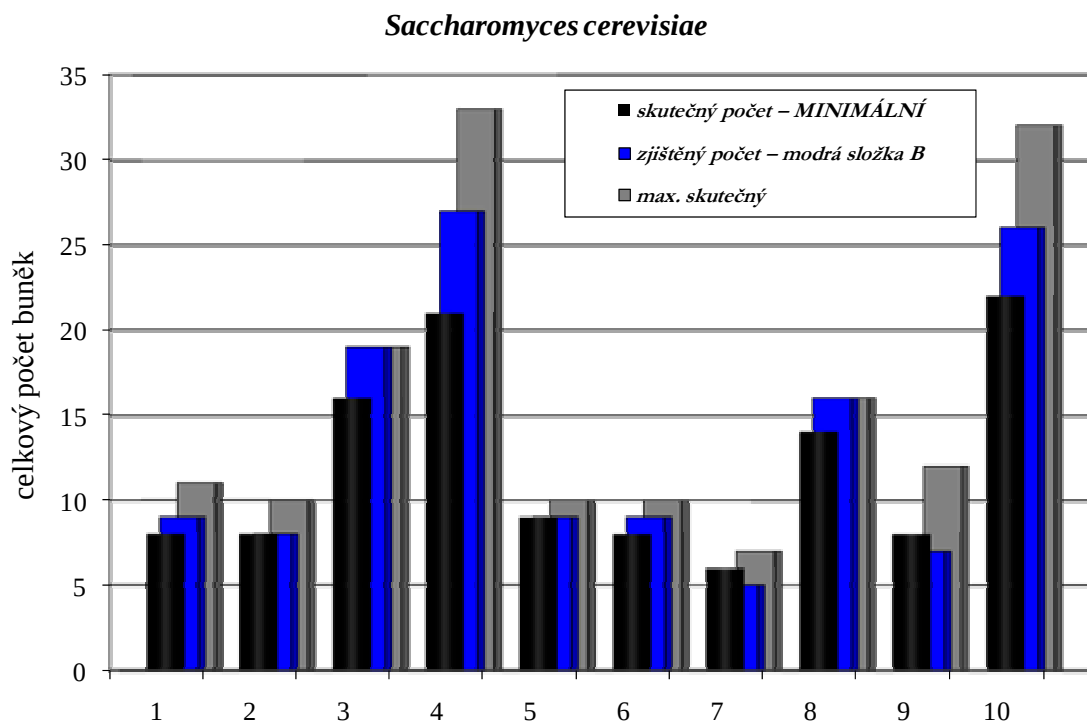
Jako nej přesnější se ukázala být analýza obrazů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené fluorescein diacetátem FDA podle jasu *B* barvového prostoru HSB. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 a *Hansenula anomala* vykazují jednu odchylku z intervalu skutečného počtu. Kvasinka *Kloeckera apiculata* vykazuje odchylky dvě. Tato odchylka je vždy o jednotku menší než spodní hranice intervalu skutečného počtu buněk kvasinek.

Nakonec byla analyzována série deseti fotografií kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené Calcofluorem White M2R podle modré složky *B* barvového prostoru RGB. Lze také použít pro analýzu například složku jasu *B* nebo intenzitu *I*.

Tabulka 16

Počty buněk obrazů vzorku kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené Calcofluorem White M2R, které byly získány fraktální analýzou, mrtvé buňky byly tepelně usmrceny. Zprůměrovaný rozsah hodnot modré složky *B* = 35–55

Obraz. č.	Skutečný počet živých buněk	Zjištěný celkový počet buněk podle modré složky <i>B</i>	Obraz. č.	Skutečný počet živých buněk	Zjištěný celkový počet buněk podle modré složky <i>B</i>
1	8–11	9	6	8–10	9
2	8–10	8	7	6–7	5
3	16–19	19	8	14–16	16
4	21–33	27	9	8–12	7
5	9–10	9	10	22–32	26



Obr. 65 Zjištěný počet živých buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené Calcofluorem White M2R podle modré složky B barvového prostoru RGB

Z předešlého grafu lze vidět, že stanovovaný počet buněk spadá do intervalu skutečného počtu nebo je o jednotku menší.

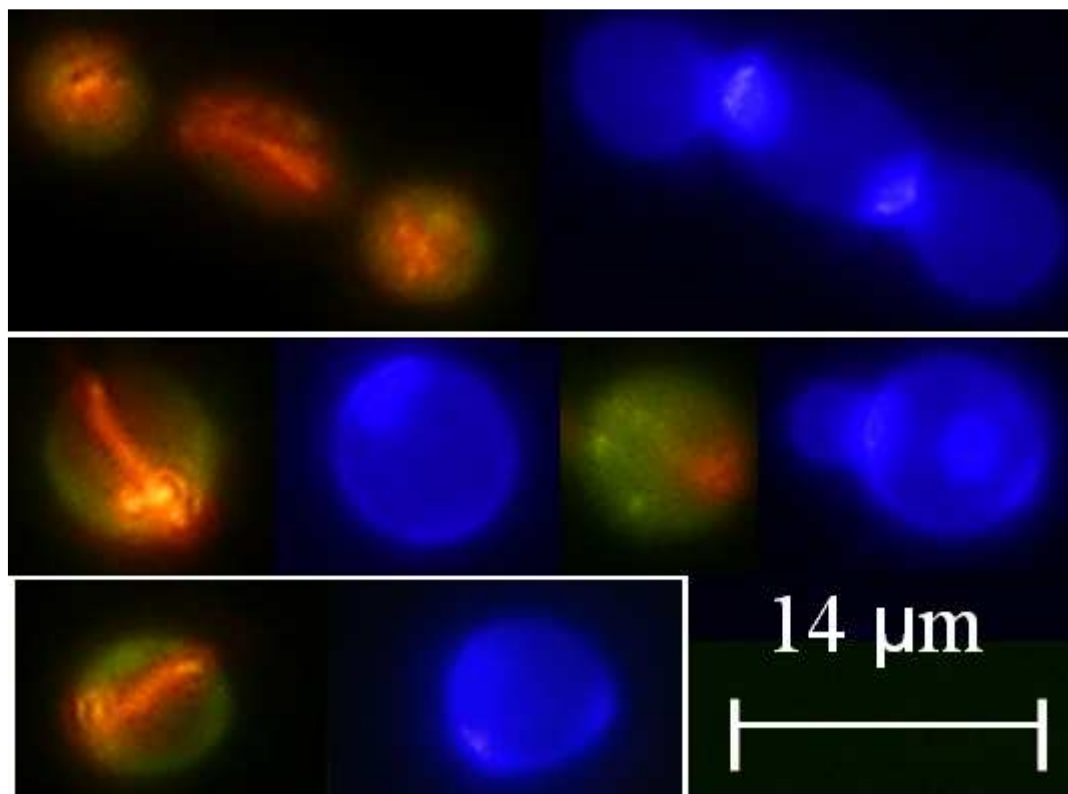
Metoda *prahové distribuce* vychází z počtu naprahovaných pixelů daných buněk v širším intervalu ve zvoleném barvovém prostoru a bere tedy v potaz plochu naprahovaných buněk. Lze tedy říci, že zjištěný počet spadající do intervalu skutečného počtu buněk záleží na skutečnosti, zda daná mateřská buňka nese malý či velký pupen. Pokud je pupen na mateřské buňce malý, hodnota počtu je blíže k minimální hodnotě v intervalu skutečného počtu a naopak.

3.2.5 Závěr

Fluorescenční mikroskopie ve spojení s obrazovou analýzou se ukázala být vhodnou, cenově dostupnou metodou pro počítání buněk kvasinek. Je to metoda rychlá a spolehlivější než klasické ruční počítání v Bürkerově komůrce. Pro barvení mrtvých a současně živých buněk je vhodnější barvivo akridinová oranž než použití LIVE/DEAD Yeast Viability Kitu. Barvivo FUN 1 vyžaduje minimálně 30 minutovou inkubaci ve tmě pro posun zelené fluorescence k červené metabolicky aktivními buňkami. Barvivo je však nutné nechat většinou působit déle a použít spíše nižší koncentrace (4,52–2,26 μM FUN 1), aby nebyla patrná zbytková fluorescence cytoplazmy u živých buněk, což komplikuje proces prahování mrtvých buněk. Další nevýhodou je, že při pozorování fluorescence komponent této sady je zapotřebí jiná filtrační kostka, pokud není k dispozici vhodný třípásmový filtr. Všechny tyto aspekty prodlužují čas zjištění počtu buněk. Calcofluor White M2R barví intenzivněji jizvy na buněčné stěně (obr. 66). Pro barvení živých buněk je vhodný fluorescein diacetát.

Metoda *maximální hodnoty počtu* je vhodná pro stanovení průměrného poloměru buněk v obraze a výsledky jsou shodné s údaji v literatuře. Pro stanovení počtu buněk v pořízeném

obrazu je vhodná metoda *prahové distribuce* neboť výpočet vychází z počtu naprahovaných pixelů daných buněk v širším intervalu ve zvoleném barvovém prostoru. Obě metody jsou založeny na principu box counting metody s implementací vlnkové transformace pro její zpřesnění.



Obr. 66 Buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené pomocí sady LIVE/DEAD Yeast Viability obsahující barvivo FUN-1 a Calcofluor White M2R

3.3 Sledování rozmnožování kvasinek

Fraktální analýza byla dále použita na sledování růstu a rozmnožování různých druhů kvasinek (*Saccharomyces fragilis* CCY 51-1-1, *Candida vini* CYV 29-39-3, *Kloeckera apiculata* CCY 25-6-22, *Geotrichum candidum* CCY 16-1-16, *Dipodascus magnusii* CCY 25-6-22) v jednorázové kultivaci za aerobních podmínek při laboratorní teplotě. Sledování bylo zaměřeno na různé druhy vegetativního rozmnožování (multipolární, bipolární pučení).

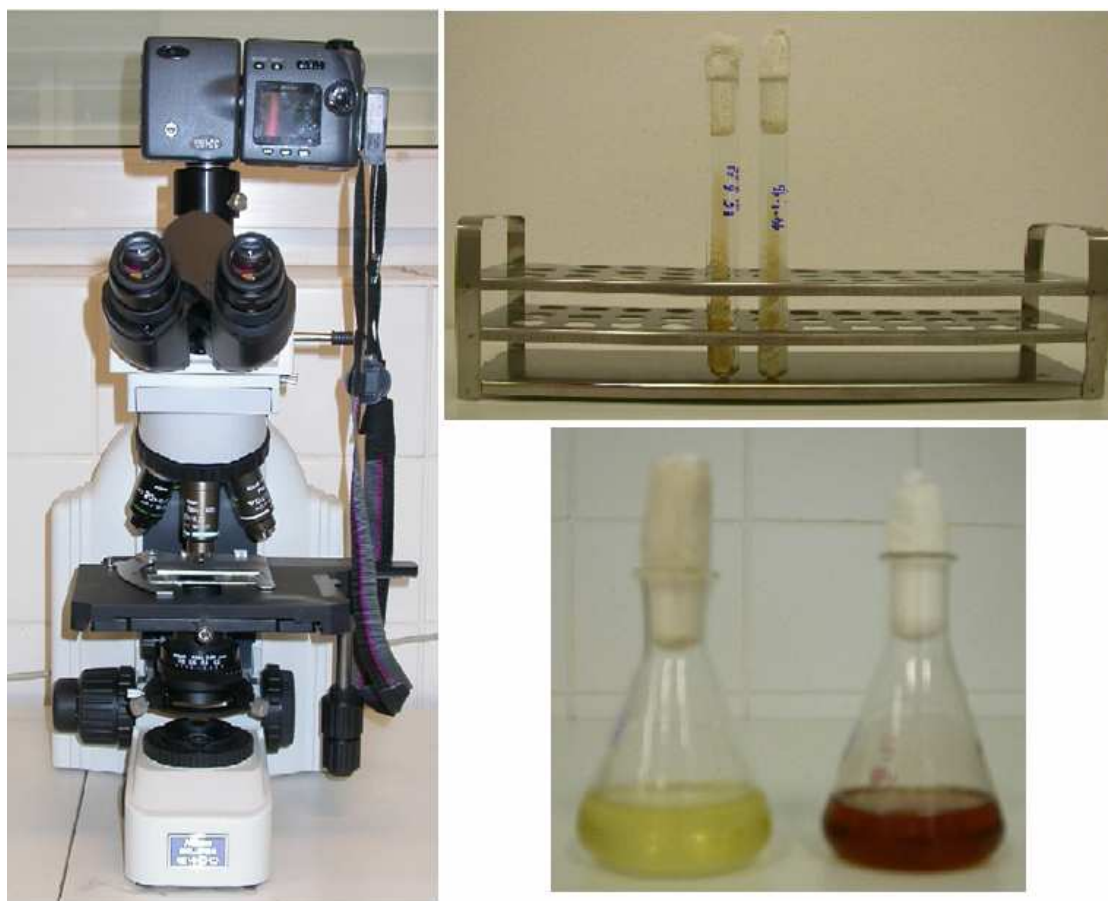
3.3.1 Měřicí aparatura

Pro záznam obrazů bylo využito spojení světelného mikroskopu s epifluorescenčním nástavcem Nikon Eclipse E200 a digitálního fotoaparátu Nikon Coolpix990 s rozlišením 2048×1536 . Mikroskop Nikon Eclipse E200 disponoval dvěma filtračními kostkami B-2A (EX 450–490, DM 505, BA 520) a UV-2EC (DAPI) (EX 340–380, DM 400, BA 435–485). Dělení buněk bylo také sledováno pod mikroskopem Nikon Eclipse E400 s fázovým kontrastem (obr. 67). U tohoto mikroskopu se uplatnil zelený interferenční filtr s vlnovou délkou 540 nm, který výrazně zvyšoval kvalitu sejmutého obrazu. Při obou mikroskopech se používal planachromatický objektiv se zvětšením $40\times$, nasazený na trinokulární tubus

s okulárem se zvětšením 20×. Získané obrázky ve formátu TIF byly analyzovány pomocí programu HarFA.

Podle velikosti nejmenšího čtverečku Bürkerovy komůrky (0,1 mm) bylo určeno celkové zvětšení obrazu, které je 2400×. Výpočet se provedl pomocí vyfotografované mřížky. Velikost 0,1 mm odpovídá 750 pixelům neboli 240 mm zvětšeného obrazu. Jeden pixel tak odpovídá 0,31 mm zvětšeného obrazu. Pokud tedy zjistíme kolik pixelů na zvětšeném obraze má určitá kvasinka lze pak lehce vypočítat její skutečná velikost. Tyto hodnoty jsou uvedeny u každého presentovaného vzorku, který je udáván jako typický průběh pro danou kvasinku. Hodnoty ovšem odpovídají pouze tomuto experimentu. Pokud by se snímky ukládaly v jiném formátu, počet pixelů by se změnil a tím i skutečná hodnota velikosti zkoumaného objektu. Proto jsou hodnoty zaokrouhleny a jejich smysl je jen orientační.

K zcela prvním pokusům byla také použita sestava skládající se ze světelného mikroskopu SM 6 od firmy Intraco Micro a CCD kamery od firmy SONY model SSD-DC50AP. Pro záznam, úpravu a archivaci obrazu byl použit program Lucia, Image Archiv Plus Version 4.2. s pracovní plochou o velikost 752 × 548 pixelů, což odpovídalo 146 × 106 μm. Mikroskopováno bylo objektivem 40×. Celkové zvětšení takto získaných obrazů bylo 640×. Získané obrázky ve formátu BMP byly analyzovány pomocí programu HarFA [80].



Obr. 67 Měřicí aparatura složená z mikroskopu Nikon Eclipse E400 s fázovým kontrastem a fotoaparátu Nikon Coolpix990, živné médium č. 1 a 2 (zleva), příklad kultury kvasinek kultivované na šikmém agaru

3.3.2 Příprava preparátu a popis experimentu

Při pozorování pučení kvasinek je důležité, aby preparát vydržel co nejdelší dobu. Na pozorování vývoje, růstu a pohybu mikroorganismů se používají vlhké komůrky, ve kterých pozorujeme mikroorganismy ve visuté kapce kapalného živného média. Nejčastěji se používá Kochova komůrka s vybroušenou jamkou v tlustém podložním sklíčku a Böttcherova komůrka se skleněným prstencem přilepeným na podložním sklíčku [81]. Nejprve byly pozorovány kvasinkové buňky v Böttcherově komůrce. Bylo zjištěno, že pozorování v Böttcherově komůrce je nevhodné, protože visící kapka rychle vysychá a pohyb kvasinek je v kapce příliš intenzivní a tím znemožňuje vhodné zaostření.

Dále byla vyzkoušena zploštělá kapilára, která opět neumožňuje vhodné zaostření. Nakonec bylo pozorování pučení kvasinek prováděno v Bürkerově komůrce, která se obvykle používá na stanovení počtu buněk. Pozorování v Bürkerově komůrce se ukázalo být jako nejvhodnější. Při hloubce komůrky 0,1 mm je pohyb kvasinek omezen oproti visuté kapce v Böttcherově komůrce a tím je zajištěno i vhodné ostření sledované kvasinky. Při použití Bürkerovy komůrky preparát vydrží dostatečně dlouho. Další výhodou byla doba udržitelnosti vzorku ve stavu schopném měření a to díky kanálkům, kde se udržovalo přebytké živné médium. Pod kondenzor mikroskopu se položila Petriho miska se studenou vodou, která byla během měření vyměňována, aby bylo oddáleno vysychání preparátu.

Vzorek kvasinek byl připraven očkováním šikmého agaru požadovanou kulturou, který byl kultivován při pokojové teplotě 17–24 hodin. Z této kultury se naočkovalo kapalné živné médium, kde se kvasinky nechaly staticky kultivovat minimálně jednu hodinu, aby se přizpůsobily novému živnému prostředí. Do středu Bürkerovy komůrky byla sterilní pipetou přenesena kapka suspenze buněk kvasinek a přikryta krycím sklíčkem tak, aby nevznikly vzduchové bubliny. V takto připraveném preparátu byla pod mikroskopem sledována buňka kvasinky.

Velmi důležité je pořídit na použité měřicí sestavě co nejkvalitnější záznam obrazu pro následující obrazovou analýzu. Rozhodujícím činitelem rozlišení pozorovaných buněk je kontrast a proto před vlastním snímáním obrazů byly nastaveny vhodné parametry vstupu digitalizační karty. V softwaru Image Archiv Plus je možné nastavit jas, kontrast, odstín a sytost v rozsahu hodnot od 0 do 127.

V případě fotoaparátu lze nastavit vhodné parametry pro získání co nejkvalitnější fotografie. Bylo nastaveno *osvětlení* – vyvážení na bílou, popř. fluorescenční (dle aktuálních světelných podmínek v laboratoři), *měření expozice* – bodové měření, *kontrast* – více kontrastu (more contrast), *doostřování* - vypnuto (off), *digitální zoom* – vypnuto (off), *zoom* – maximální, *režim* – manuální, krajina, *formát fotografie* – TIFF (high). Fotografie se snímaly pomocí dálkové spouště, která zabránila rozostření obrazu, oproti snímání na těle fotoaparátu.

Během celého měření bylo nutné zajistit konstantní neměnné homogenní osvětlení, které dopadalo na vzorek, a tím se neovlivňovala kvalita snímaného obrazu. Měnicí se denní světlo ovlivňuje hlavně odstín sejmutého obrazu a v menší míře i intenzitu jednotlivých částí v zaostřeném obrazu proto je vhodné upravit laboratoř, aby se osvětlení v průběhu dne neměnilo. Homogenní osvětlení lze docílit vyvážením na bílou, pomocí digitálního fotoaparátu nebo použitím jiného již přednastaveného osvětlení ve fotoaparátu.

Je vhodné najít v preparátu takovou buňku, která příliš *necestuje*, abychom ji nemuseli křížovým posuvem preparátu stále sledovat. Během dlouhého pozorování se sledovaná buňka v Bürkerově komůrce pohybuje (nahoru, dolů, rotace kolem své osy v živném médiu) a při pučení nemusí růst pupen ve stejné rovině jako je mateřská buňka proto je nutné během

měření buňku stále zaostřovat. V průběhu měření se buňka musí neustále doostřovat, protože médium vysychá a tloušťka kapaliny se mírně zmenšuje. Vliv proudění média může také ovlivnit polohu pupenu vzhledem k mateřské buňce. Pokud buňka začala pučet v jiné rovině, než byla rovina snímání, nebylo vhodné pokračovat v měření.

Malá hloubka ostroty při použití objektivu se zvětšením 40× znemožňovala zaostřit celou buňku zároveň s jejím pupenem, pokud se jejich vzájemná poloha lišila. Ze zkušenosti bylo zjištěno, že nejvíce pohybu vykonávají buňky s malými rozměry (*Kloeckera apiculata*), zatímco buňky s velkými rozměry jsou v podstatě bez pohybu (*Geotrichum candidum*). Záleží také na viskozitě použitého živného média a v neposlední řadě také na životních podmínkách kvasinky a druhu kvasinky. Ideální snímání buněk bylo v případě, že kvasinka pučela do stejné roviny prostoru a byla bez pohybu.

Při použití fotoaparátu s vysokým rozlišením se zdálo vhodné ostření na vnější stěnu buňky z důvodu čistoty obrazu a linie stěny. Ostření na vnitřní stěnu buňky již nebylo tak vhodné, z důvodu velké viditelnosti organel a tím i ztížená úprava obrazu před konečným vyhodnocením. Nevýhoda ostření na vnější stranu buňky byla ve viditelnosti pupenu. Z počátku růstu pupenu v naprahovaném obrazu nebyl pupen zcela vidět a vznikla tím prodleva ve stěně, což po pár snímcích (jakmile se pupen zvětšil) odpadlo. Při použití např. kamery s nízkým rozlišením je vhodnější ostřit na vnitřní stranu buněčné stěny, neboť tak získáme více kontrastní obraz vhodný k dalšímu zpracování.

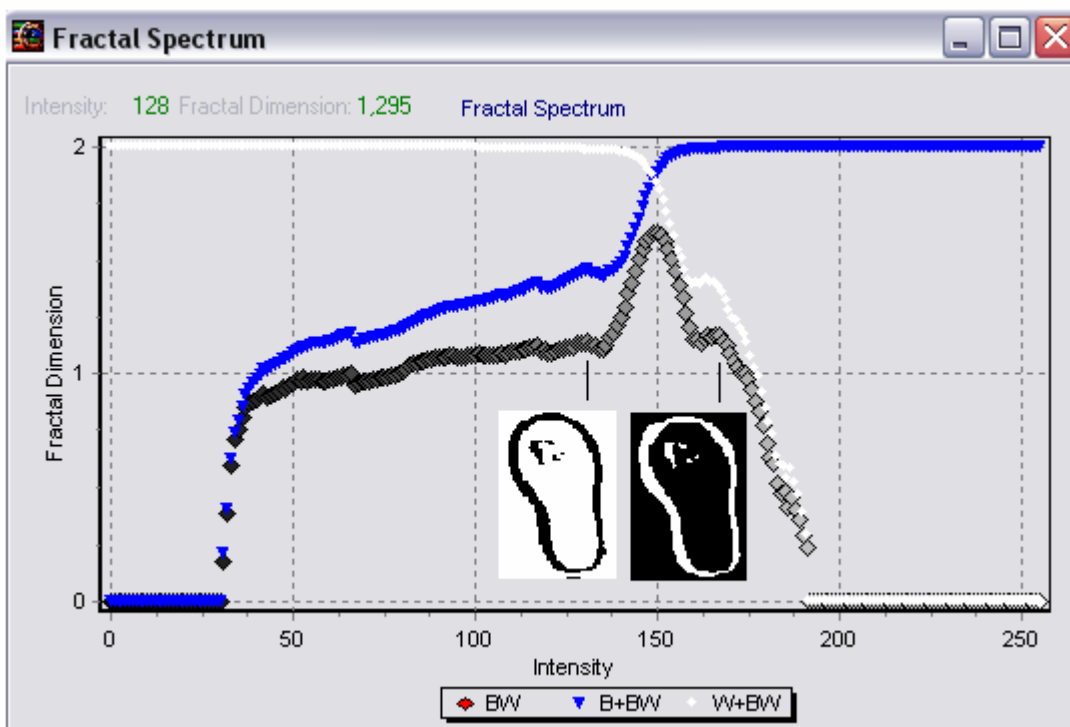
Předpokládalo se snímání jen jedné kvasinky po celou dobu měření. Lze však snímat více kvasinek najednou, ovšem pokud to dovolí rozměry zorného pole, tím i velikost buněk, jejich stacionárnost nebo stejná trajektorie pohybu a určitá vzdálenost kvasinek od sebe [45].

Během pozorování vybrané buňky kvasinky byl po určitých časových intervalech sejmut obraz a uložen ve formátu TIFF v případě fotoaparátu či ve formátu BMP v případě kamery. Nejčastěji byl použit interval 2–4 minuty. Ze zaznamenaných snímků byly získány výřezy o určité velikosti pomocí programů Phothoshop a v pozdější fázi měření jen programem HarFA, který byl obohacen o funkci úpravy obrazu a pořizování výřezů a ukládány ve formátu BMP. Výřezy byly prováděny tak, aby sledovaná kvasinka byla stále na jednom místě v obrazu. Takto upravené snímky lze převést například programem Bmp2avi na video ve formátu AVI.

Dále následovalo odfiltrování barevné složky výřezu a pomocí programu HarFA se provedlo prahování. Vzniklé černobílé obrazy byly poslední fází experimentu, které byly zpracovány programem HarFA a následně byly obdrženy konečné hodnoty – fraktální dimenze a fraktální míry zkoumaného objektu.

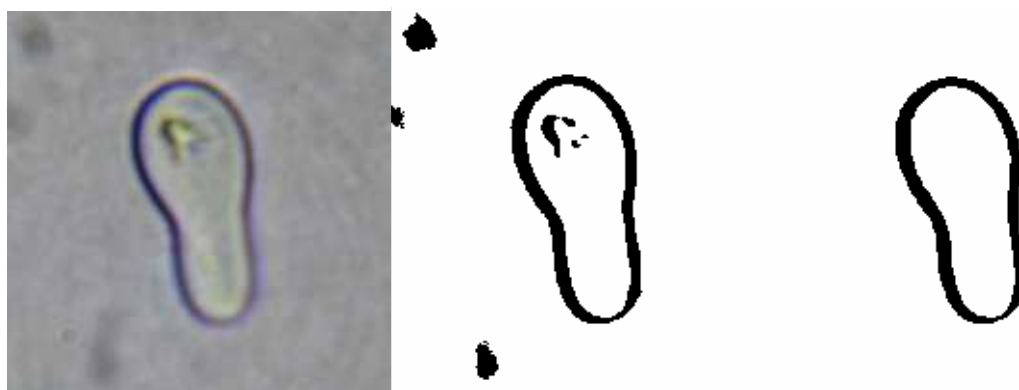
Obrázky jsou v souboru uloženy pomocí RGB složek. Při zpracování dat ve 24-bitové barevné hloubce lze tedy maskovat více než 16,7 miliónů barevných odstínů. K interpretaci výsledků však mnohdy postačuje menší počet údajů. Toho lze dosáhnout např. převodem barevných obrázků na šedou škálu (intenzity). Tento převod s ohledem na citlivost lidského oka (nejcitlivější je na zelenou) se provádí podle vztahu $I = 0,299R + 0,587G + 0,114B$. Tímto způsobem se sníží barevná hloubka na 8 bitů (ve všech třech barevných kanálech je stejný odstín barvy) a počet maskovaných barev bude 256 [82].

Sledovaná kvasinka na snímcích byla detekována prahováním podle intenzity. Pro zjištění, která část barevné informace má být maskována je třeba nejprve získat fraktální spektrum. Fraktální spektrum nám ukáže závislost fraktální dimenze na všech možných maskovacích podmínkách pro intenzitu (obr. 68). Hodnota, kde se křivky protnou nebo prudce změní svůj tvar je ideální intenzita pro prahování.



Obr. 68 Fraktální spektrum vytvořené programem HarFA metodou Range

Po zjištění vhodného intervalu intenzit pro naprahování byl proveden výřez obrazu a následně následuje samotné prahování výřezu. Velikost výřezu je vhodná, aby byla větší než 2^9 . Nejčastěji byl výřez 530×530 pixelů. Na následujících obrázcích lze vidět jednotlivé operace se získanými výřezy. Na posledním obrázku je odstraněna naprahovaná nečistota v živném médiu, která by dále ovlivňovala fraktální dimenzi sledované kvasinky.

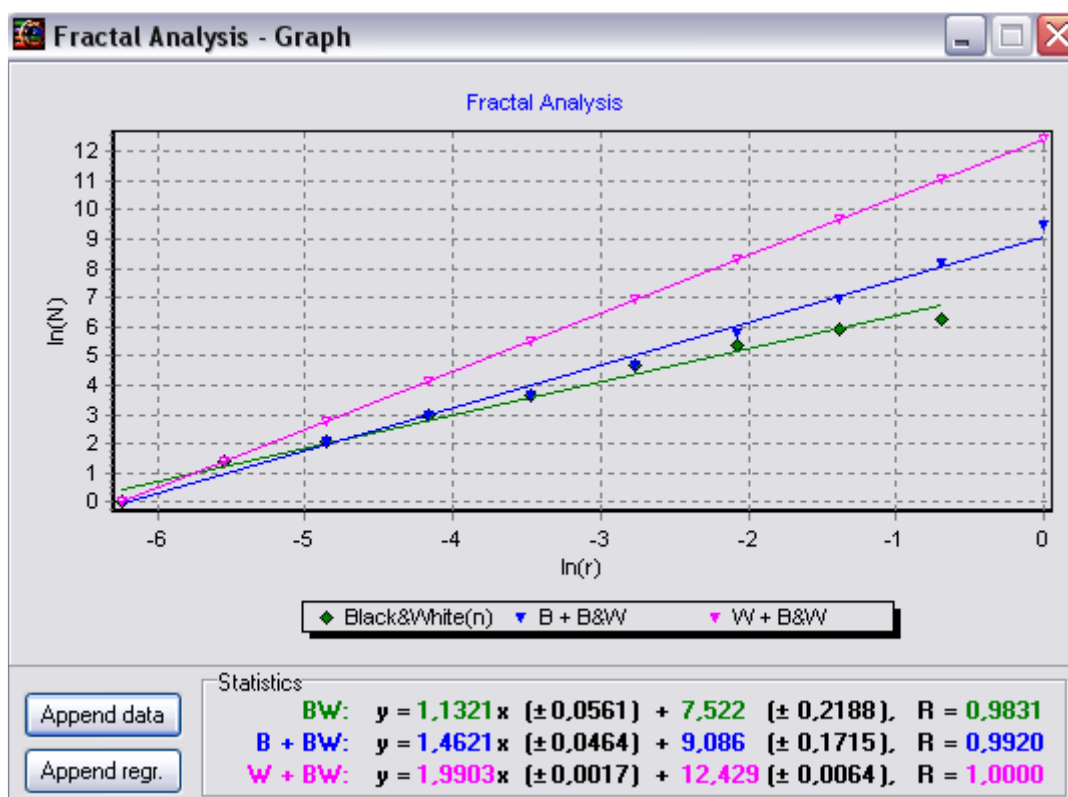


Obr. 69 Výřez pořízeného snímku kvasinky *Dipodascus magnusii* fotoaparátem Nikon Coolpix990 (vlevo), naprahovaný výřez dle maskovacích podmínek pro intenzitu: 0–135 a následně úpraven odstraněním nečistot (vpravo)[45]

Na upravených snímcích byla dále provedena fraktální analýza s využitím vlnkové transformace. V programu HarFA lze provést i klasickou fraktální analýzu pomocí metody box counting. Touto metodou je získána logaritmická funkce závislosti množství políček N

k pokrytí fraktálu (y-osa) na velikosti políčka r (x-osa) čtvercové sítě. Sklon lineární části funkce dává fraktální dimenzi.

Z každého obrazu bylo získáno pět hodnot (proto byl obraz vyřezáván na výřez 530×530 pixelů, aby se při posuvu čtverce velikosti 512×512 pixelů bylo získáno více hodnot, které následně byly zprůměrovány. Výsledky se tak jeví přesnější. Získala se tak průměrná hodnota fraktální dimenze D a fraktální míry K (obr. 70, tab. 17, 18). Fraktální dimenze dává informaci o členitosti sledované kvasinky. Pokud se fraktální dimenze od topologické liší málo, je objekt málo členitý. Z fraktální analýzy lze získat i fraktální míru, která vyjadřuje počet pixelů obrazu, které mají stejný odstín, a dává nám tedy informaci o zaplněnosti plochy sledovanou kvasinkou. Lze ji vyjádřit také v procentech vzhledem k celé ploše obrazu. Fraktální dimenze tedy charakterizuje vlastnosti povrchu sledovaného objektu (ploch, rozhraní; např. při stárnutí buněk), fraktální míra jejich velikost, resp. procentuální krytí obrazu fraktální strukturou.



Obr. 70 Fraktální analýza vybraného obrazu

Na předcházejícím obrázku je graf fraktální analýzy pro obraz kvasinky *Dipodascus magnusii* (obr. 69). V grafu jsou body závislosti počtu čtverců pokládáné sítě na jejich velikosti proloženy lineární regresní přímkou. Ze směrnice rovnice této přímky například pro rozhraní tj. pro pixely částečně zaplněné černou a bílou barvou je získána fraktální dimenze D_{BW} , která je rovna 1,1321 a při aproximaci pro $x = 0$ je získán úsek na ose y tj. logaritmus fraktální míry $\ln K_{BW}$, který je roven 7,522. Pokud je tato fraktální míra vyjádřena v procentech vzhledem k celé ploše obrazu o rozměru 512×512 dostaneme $(K_{BW} / K_{max}) \cdot 100 = (1848,26 / (512 \times 512)) \cdot 100 = 0,7051 \%$. V posledním sloupci je uveden koeficient regrese, který charakterizuje spolehlivost výsledku.

Fraktální dimenze jednotlivých snímků v dané sérii je následně vynesena na čas, kdy byl snímek archivován.

Pro srovnání jednotlivých experimentů u stejného nebo různého druhu kvasinky se zpracování obrazu lišilo jen hodnotou prahování, což byl nutný krok z důvodu jiné tloušťky buněčné stěny, různou intenzitou zaostření a nakonec různým osvětlením vzorku. Jinak byl experiment standardizován. Fraktální analýza byla prováděna v pěti částech obrazu a to: levá horní část, pravá horní část, pravá spodní část, levá spodní část a střed obrazu [45]. Stejně jako fraktální dimenze se stanovila fraktální míra.

Tabulka 17

Příklad výpočtu fraktální dimenze

Obr. č.	Čas (min)	D_{BW1}	D_{BW2}	D_{BW3}	D_{BW4}	D_{BW5}	Průměr D_{BW}
1	0	1,07794	1,07746	1,07753	1,07364	1,08997	1,079308
2	2	1,08088	1,07889	1,07737	1,08115	1,09054	1,081766
3	4	1,08955	1,09409	1,09228	1,09291	1,08331	1,090428
4	6	1,09242	1,09016	1,08652	1,09274	1,09482	1,091332

Tabulka 18

Příklad výpočtu fraktální míry

Obr. č.	Čas (min)	K_{BW1}	K_{BW2}	K_{BW3}	K_{BW4}	K_{BW5}	Průměr K_{BW}	K_{BW} (%)
1	0	1079	1094	1080	1063	1170	1097,2	1,674194
2	2	1116	1125	1120	1122	1170	1130,6	1,725159
3	4	1161	1195	1189	1168	1125	1167,6	1,781616
4	6	1172	1169	1172	1184	1200	1179,4	1,799622

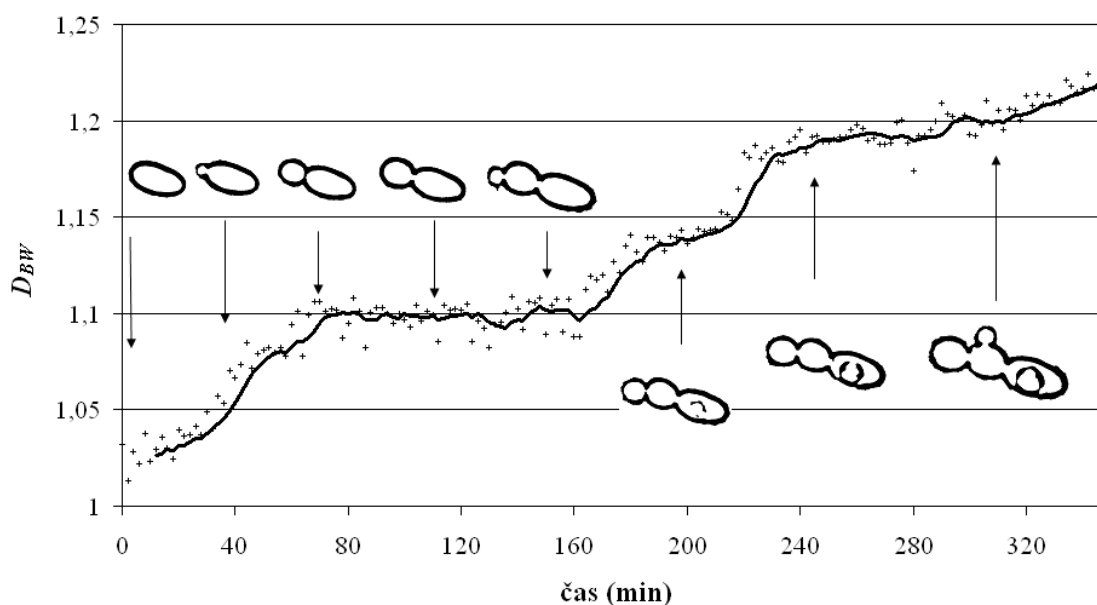
Všechny experimenty byly zaostřovány na vnější stranu buňky. Nebylo vhodné během experimentu měnit stupeň zaostření. Takové počínání mělo později vliv na fraktální parametry. Bylo prahováno na buněčnou stěnu a případné viditelné nečistoty nebo organely se korekcí odstranily. Pokud by se organely buňky zachovaly nebo se celá buňka začernila, fraktální dimenze (a tím i míra) by se zvýšila o konstantní hodnotu, ale průběh v závislosti na čase by byl stejný. Jedinou výjimkou byl vzorek, který se pozoroval mikroskopem s fázovým kontrastem. Zde se ostřílo na vnitřní část buňky. Výřezy byly prováděny o velikostech 270×270 (analýza 256) pixelů, 530×530 (analýza 512) pixelů a pouze jediný vzorek 1040×1040 (analýza 1024) pixelů.

3.3.3 Výsledky a diskuze

Candida vini CCY 29-39-3

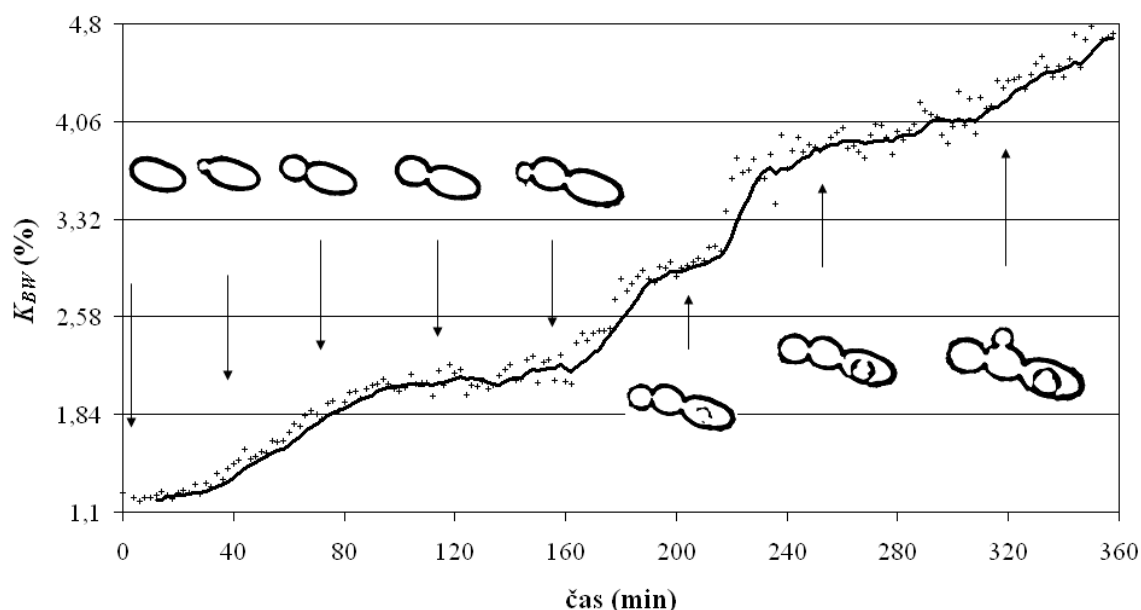
Očkováno bylo do živného média č. 2, snímáno při teplotě 24 °C, expozice byla prováděna na hodnotu 1/42 sekundy, clona $F = 4$. Objevení pupenu na mateřské buňce nastalo po 75 minutách po zaočkování do živného média. Další pupen se objevil po 190 minutách, další po 240 min. a poslední po 350 minutách. Prahování se provádělo na intenzitu 0–127. Výřez 530 × 530. Snímáno po 2 minutách. Body jsou proloženy klouzavým průměrem periody 7.

Na obrázku lze vidět několikanásobné pučení kvasinky *Candida vini*. V grafu pozorujeme, že při objevení pupenu fraktální dimenze roste, poté je fraktální dimenze přibližně konstantní, neboť kvasinka si vytváří zásobu živin na další růst a dělení. Po načerpání dostatku živin na budoucí rozmnožování začne kvasinka dále pučet a dimenze opět roste. *Candida vini* se vyznačuje pomalým růstem a pravidelným čerpáním živin. Pokles křivky je také kromě čerpání živin a zpomalením růstu způsoben růstem pupenu (nedokonalé zaostření) a tím i zmenšením fraktální dimenze. Vzorek je zajímavý tím, že poslední pupen rostl ve směru osy pozorování. Výjimečně se pupen povedlo zaostřit spolu s celým svazkem buněk. I když pupen neroste kolmo k ose pozorování, fraktální dimenze roste stejně jako kdyby tomu tak bylo.



Obr. 71 Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky *Candida vini* – typický průběh

Na dalším obrázku je zobrazen průběh růstu fraktální míry. Je zajímavé, že nárůst černé plochy není konstantní, ale rychle se zvyšuje až při objevení druhého pupenu. Nárůst tedy byl pozvolný, s určitými relaxačními fázemi, kdy se velikost kvasinky zvětšovala jen mírně. Velikost mateřské buňky při počátku snímání byla 23 μm × 13 μm. Na konci měření byla velikost vzrostlé kultury 48 μm × 19 μm.

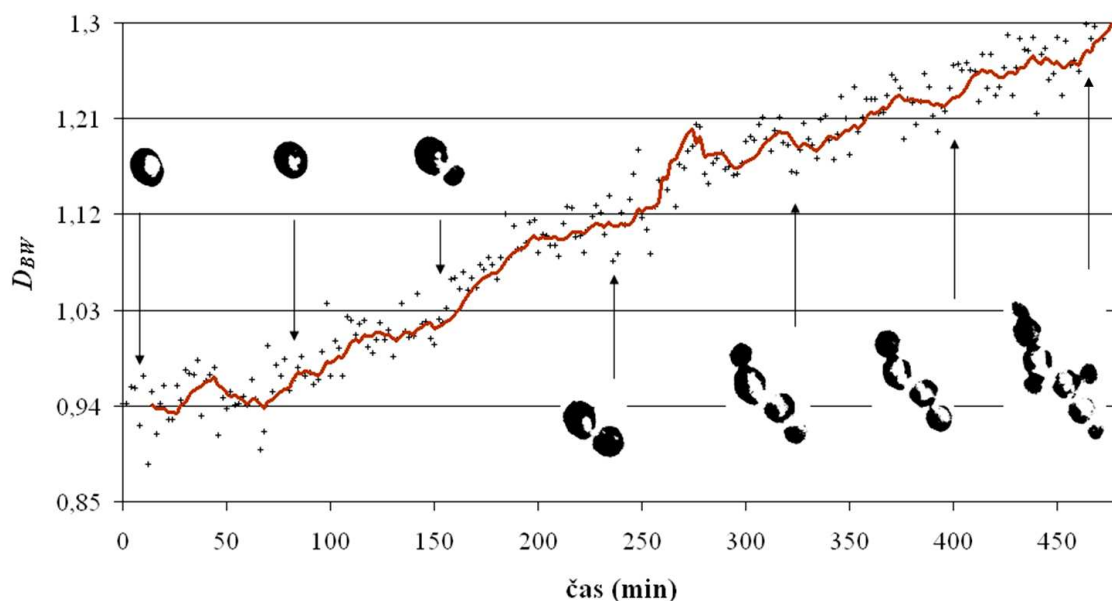


Obr. 72 Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky *Candida vini* v čase

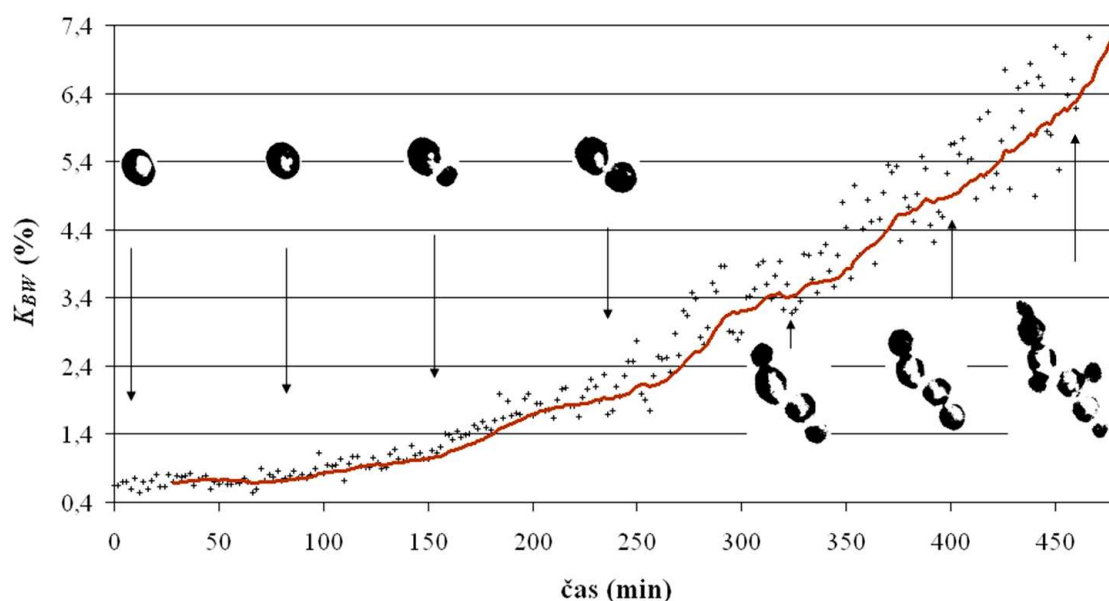
Na následujících grafech je *Candida vini*, pozorována mikroskopem Nikon Eclipse E400 (obr. 73 a obr. 74). Použitý byl zelený filtr o vlnové délce 540 nm. Kvasinka byla kultivována v živném médiu č. 2. Clona byla nastavena na hodnotu $F = 4$, expozice na 1/5 sekundy. Při mikroskopu E200 bylo nutné silně podexponovat, v tomto případě o -1,7 eV. Bez podexponování by fotoaparát nezaznamenal obraz, ale jen černou plochu. Měření bylo prováděno při 23 °C a fotografie byly snímány po dvou minutách. Prahování se provádělo na intenzitu 0–88. Nízká intenzita prahování byla dána menším kontrastem snímané kvasinky a okolím, což u mikroskopu s fázovým kontrastem je typické. Výřez byl prováděn na velikost 530×530 pixelů a fraktální parametry se určovaly z pěti hodnot. První pupen se objevil po 150 minutách od zaočkování do živného média. Další dva pupeny po 160 minutách od nárůstu prvního pupenu, dále po 300 min., další dva pupeny 315 minutách. Poslední pupen začal růst po 330 minutách.

Na obou grafech lze vidět, že fraktální dimenze i míra prudce stoupá. Míra poněkud pozvolněji. Kvasinka roste téměř bez relaxačních fází, načerpané živiny jí stačily až do nárůstu 7 dceřiných buněk. Rychlý vzrůst fraktální dimenze je způsoben také tím, že jakmile první dceřiná buňka dorostla 3/4 velikosti mateřské, začaly již obě buňky pučet naráz. Toto se opakovalo i při poslední periodě pučení, kdy všechny dospělé buňky začaly pučet opět zároveň s rozdílem několika málo minut.

Fraktální míra má spíše exponenciální vzrůst. Je to způsobeno mírnými časovými prodlevami v jednotlivých periodách pučení, které se lišily o 10–15 minut. Mírným problémem u snímání pomocí mikroskopu E400 bylo, že optická soustava se často samovolně rozostřovala. Tento aspekt bylo nutné vzít na vědomí a pečlivě doostřovat před každým sejmutím obrazu. Měření bylo ukončeno z důvodu vyschnutí vzorku na Bürkerově komůrce. A v neposlední řadě i nakláněním se vzrostlé kultury na dolní straně, což lze pozorovat i v zmenšených obrázcích v grafech. Nakloněná kultura se velmi špatně zaostřuje a hodnoty fraktální dimenze se tak mohou stát zkreslenými a průběh křivky značně jiný než by byl u rovnoběžně zaostřené kultury. Velikost mateřské buňky při počátku snímání byla $16 \mu\text{m} \times 14 \mu\text{m}$. Na konci měření byla kultura vzrostlá na $63 \mu\text{m} \times 32 \mu\text{m}$.



Obr. 73 Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky *Candida vini* sledováno pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem

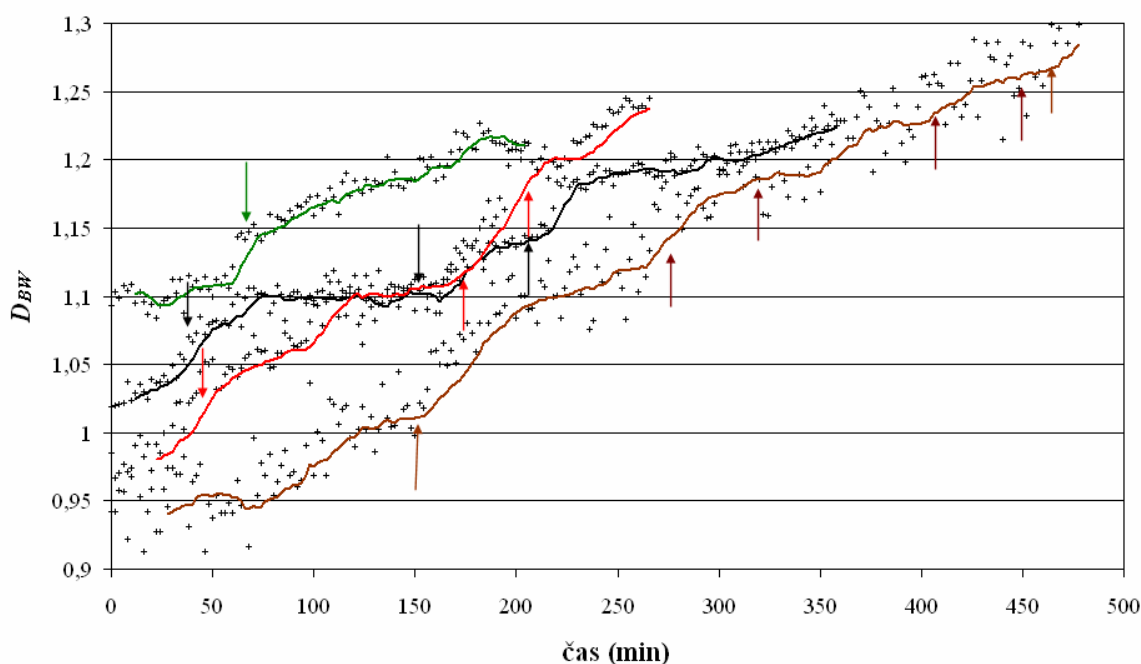


Obr. 74 Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky *Candida vini* sledováno pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem

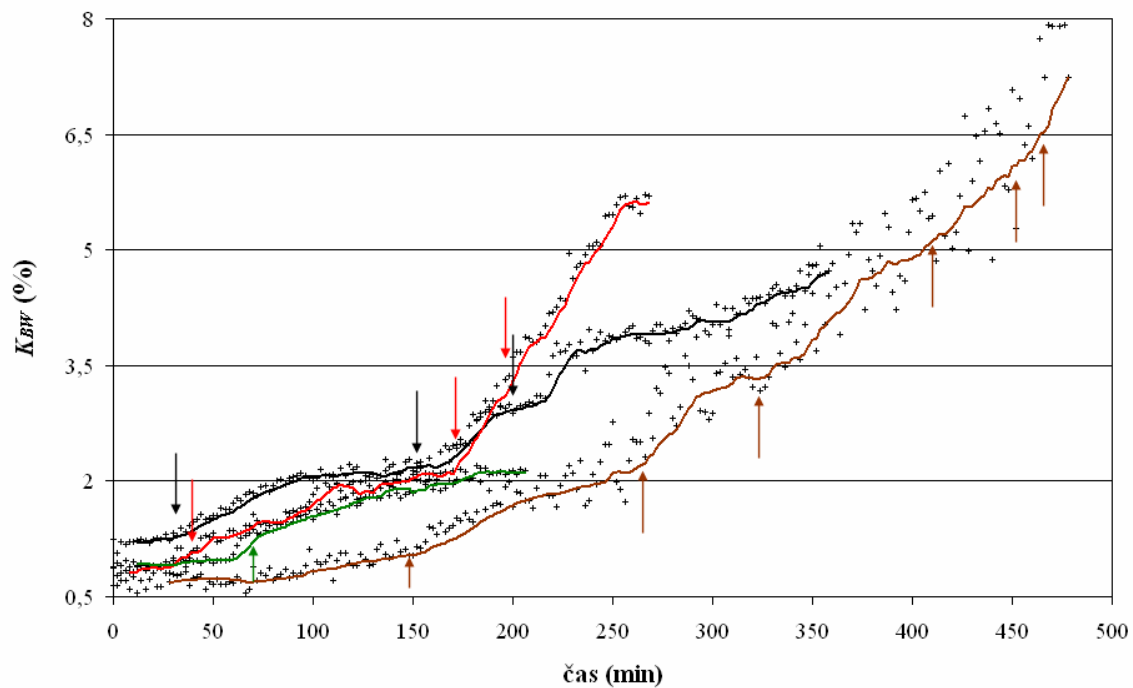
V posledních grafech pro kvasinku *Candida vini* je srovnání fraktálních dimenzí a měr zobrazených na obrázku 71, 72, 73, 74 s dalšími měřeními, které lze shlédnout také v příloze 2. Šipky naznačují místo, kde daná kvasinka začala pučet. U některých kvasinek vidíme, že pučely i několikrát. Dále vidíme, že každý vzorek byl snímán po jinou dobu. To bylo způsobeno vysycháním vzorků, nebo z důvodu nemožného zaostření kvasinek. Všechny vzorky jsou proloženy klouzavým průměrem periody 7 a prahované na hodnotu 0–127 (0–88 pro fázový kontrast). Vidíme, že vzrůstající tendence je zastoupena u všech čtyřech měření. Relaxační fáze je zastoupena také u všech měření jen u vzorku č. 2 méně. Tento průběh je

zdůvodněn u obrázků obr. 73 a obr. 74. *Candida vini* se tedy vyznačuje vzrůstajícím průběhem s fázemi odpočinku, nabírání energie a živin. Těsně před objevením nového pupenu růst fraktální dimenze stagnuje, a jakmile si buňka doplní živiny a pupen začne růst, fraktální dimenze začne stoupat. Velikost fraktální dimenze je také určena počáteční velikostí kvasinky a jejího povrchu, který je značně ovlivněn stupněm ostření.

Fraktální míry na obr. 76 vycházejí téměř ze stejného bodu, a podle velikostí kvasinek se mírně liší. U vzorku č. 3. vidíme, že nárůst míry je daleko větší, než u zbývajících měření. Ostatní měření mají nárůst pozvolný, a počet pixelů se zvyšuje pomaleji. Vidíme, že vzorek č. 3 má i nejvyšší nárůst fraktální dimenze. Jednoznačně lze tento vzorek označit jako kvasinku s nejvyšší zásobou energie. Naopak vzorek č. 1 měl nastřádané energie nejméně a jeho průběh je nejpozvolnější.



Obr. 75 Srovnání závislostí fraktálních dimenzí D_{BW} na změně struktury kvasinky *Candida vini* pro více měření. Vzorek č. 1: 24°C, živné médium č. 1, tři vzrostlé pupeny; vzorek č. 2 (fázový kontrast): 23°C, živné médium č. 2, sedm vzrostlých pupenů, vzorek č. 3: 24°C, živné médium č. 2, tři vzrostlé pupeny, vzorek č. 4: 23°C, živné médium č. 2, jeden vzrostlý pupen

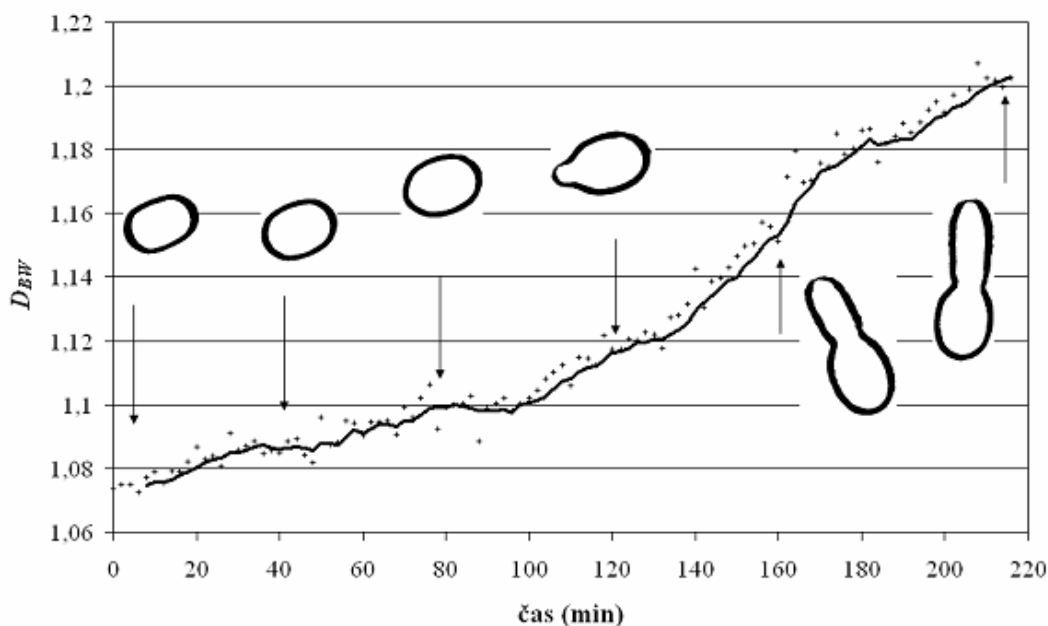


Obr. 76 Srovnání závislostí fraktálních měr K_{BW} na změně struktury kvasinky *Candida vini* pro více měření Vzorek č. 1: 24°C, živné médium č. 1, tři vzrostlé pupeny; vzorek č. 2 (fázový kontrast): 23°C, živné médium č. 2, sedm vzrostlých pupenů, vzorek č. 3: 24°C, živné médium č. 2, tři vzrostlé pupeny, vzorek č. 4: 23°C, živné médium č. 2, jeden vzrostlý pupen

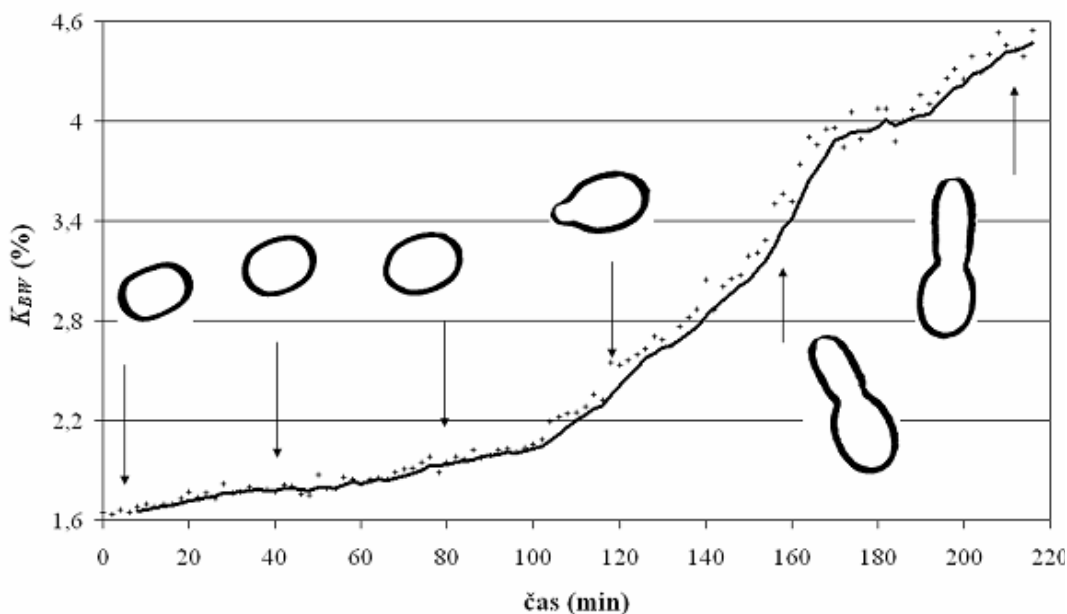
Dipodascus magnusii CCY 25-6-22

Měření probíhalo při 23 °C, v živném médiu č. 1. Výřezy 530 × 530 pixelů byly prahovány na 0–130 a snímány po 2 minutách. Nastavení závěrky na hodnotu 1/44 a clona $F = 4$. Sledovaná buňka začala pučet po 4 hodinách od zaočkování do kapalného média č. 2. Jedná se o tlustostěnnou kvasinku, která se velmi dobře prahovala. Rozmnožování probíhalo pomocí arthrokonidií. Trend je stoupající, jakmile začne kvasinka pučet fraktální parametry se zvyšují rovnoměrně, bez poklesů, nebo fáze relaxace.

Velikost mateřské buňky na počátku snímání byla 27 μm × 18 μm. Na konci měření byla kultura vzrostlá na 65 μm × 23 μm. Tloušťka stěny byla 3,2 μm.



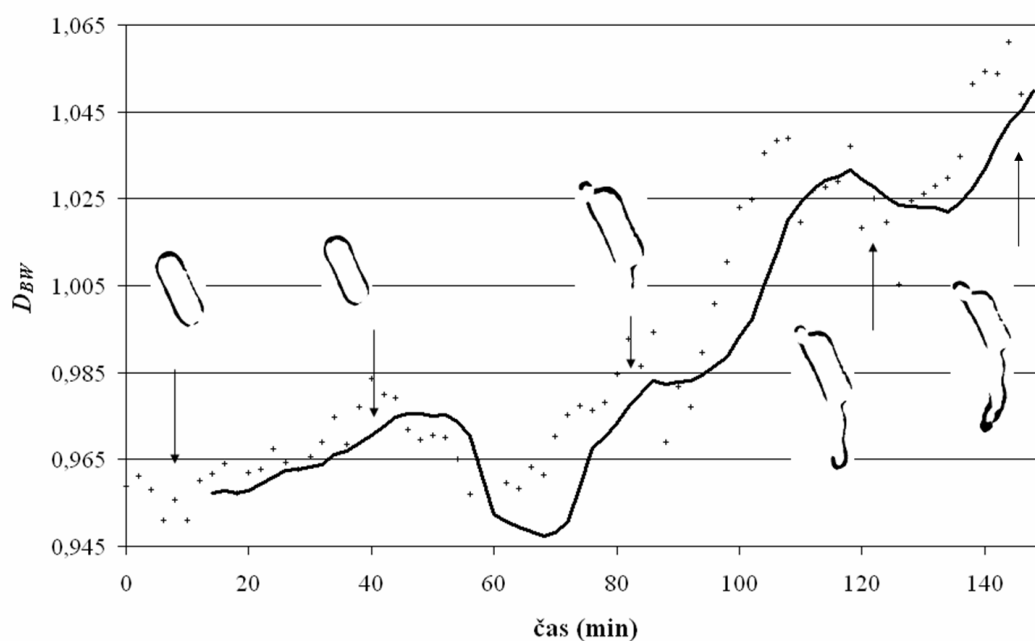
Obr. 77 Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky *Dipodascus magnusii*



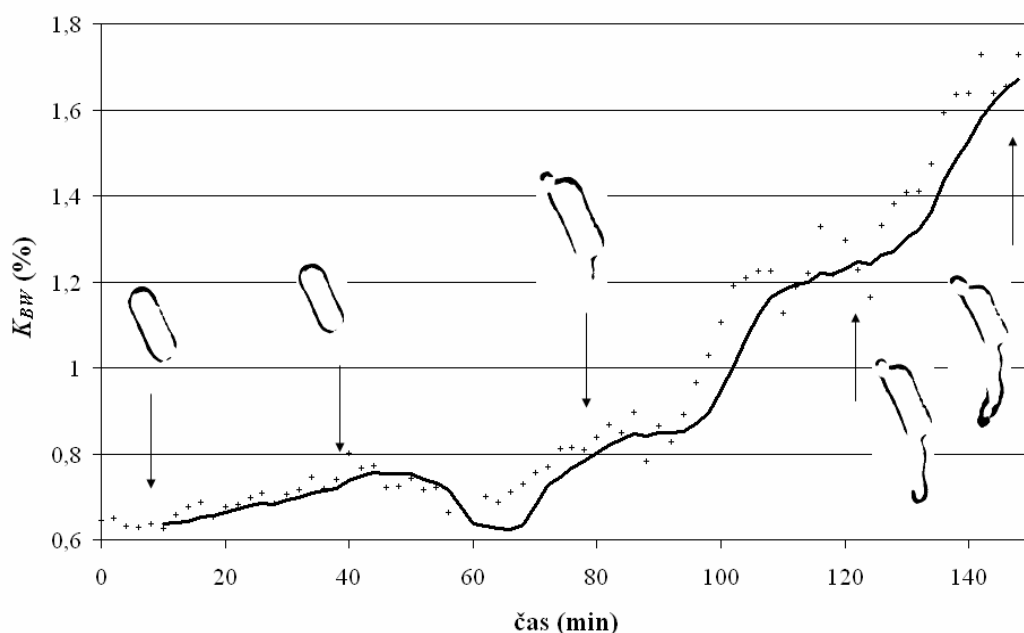
Obr. 78 Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky *Dipodascus magnusii*

***Geotrichum candidum* CCY 16-1-16**

Geotrichum candidum se rozmnožuje pomocí arthrokonidií. Clona byla nastavena na hodnotu 4 a expoziční čas na 1/42 sekundy. Kvasinka začala pučet po 195 minutách od naočkování do živného média č. 2 při teplotě 24 °C. Velikost výřezu byla 1040 × 1040 pixelů a intenzita prahování byla stanovena na 0–126. Nevýhodou těchto kvasinek byla jejich velikost a slabá stěna. Kvasinky se nedaly řádně zaostřit a při prahování byly snímky neúplné, jak lze vidět na obrázku. Tato skutečnost značně ovlivňovala fraktální dimenzi i míru. Výhodou tohoto druhu bylo, že kvasinka sestávala stacionárně na jednom místě pozorování. Velikost mateřské buňky na počátku snímání byla 34 μm × 11 μm. Na konci měření byla kultura vzrostlá na 85 μm × 13 μm.



Obr. 79 Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky *Geotrichum candidum*



Obr. 80 Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky *Geotrichum candidum*

Lze vidět, že tyto kvasinky mají strmější průběhy. Mírně jsou ovlivněny špatným doostřením, kde potom vznikají neočekávané poklesy. Fraktální míra má pomalý rovnoměrný nárůst hodnot. Na počátku měření byly buňky obdélníkového tvaru, nabíráním živin a dospíváním se zaoblovaly a začaly pučet. Rozdíl počátečních fraktálních dimenzí u jednotlivých vzorků je dán zaostřením a následným prahováním. Měření byla ukončena kvůli velikostem kvasinek, které zhoršovaly vyhodnocení dat.

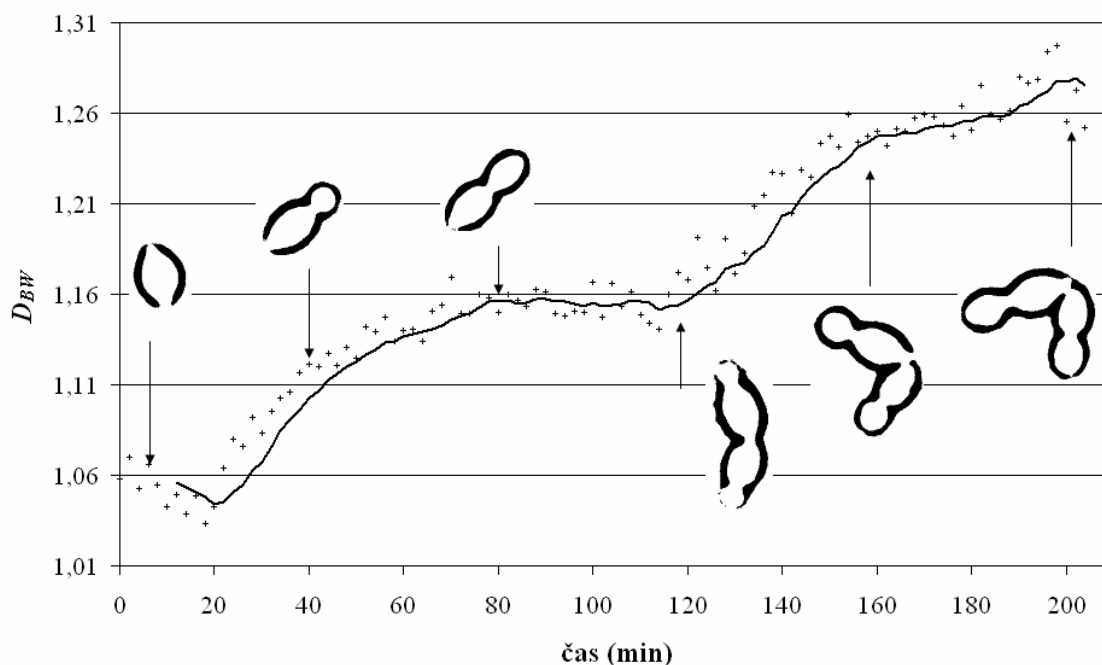
***Kloeckera apiculata* CCY 25-6-22**

Typické závislosti fraktálních parametrů na změně struktury při pučení jsou uvedeny na obr. 81, 82. První pupen se objevil po 30 minutách od zaočkování do živného média č. 1. Expozice byla určena na 1/37 s a clona 4. Měření probíhalo při 23 °C.

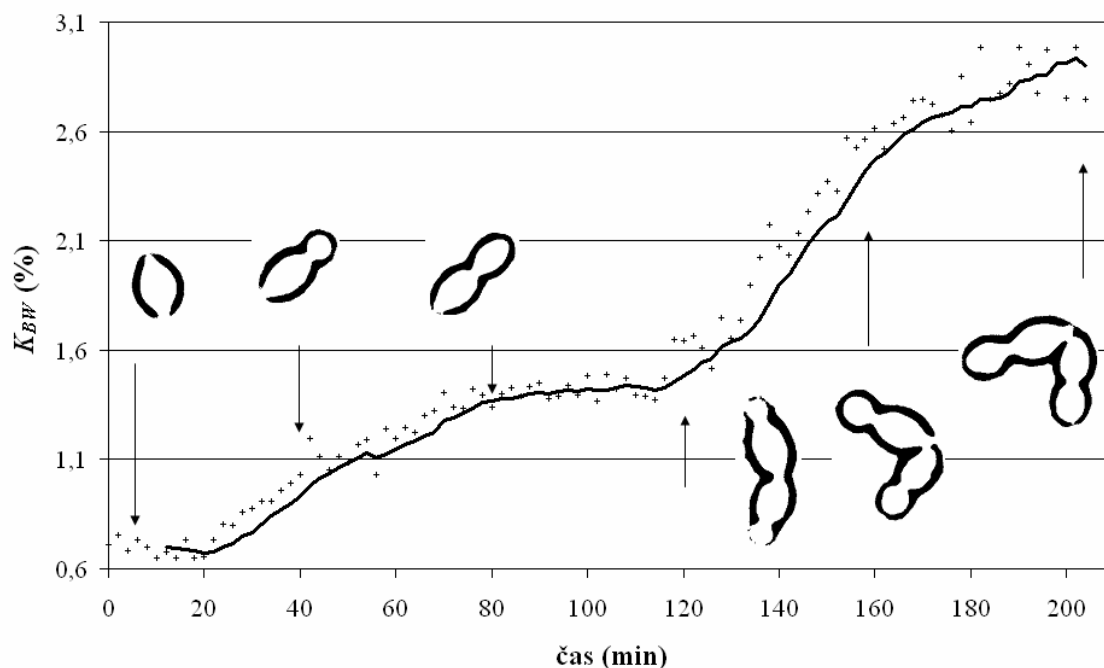
Další dva pupeny začaly růst za 90 minut. Prahování výřezu 270 × 270 pixelů bylo provedeno na intenzitu 0–130. Tento druh kvasinek se vyznačoval rychlým pučením, oddělováním jednotlivých buněk z řetízku od sebe. Lze také vidět, že na mateřské buňce se objevuje několik pupenů najednou, jde tedy o pučení multilaterální. Negativem tohoto druhu kvasinek bylo, že větší kolonie se převracela a zamotávala se do vertikálních spirál, což znemožnilo další zaostření obrazu. Pozorování tak bylo prováděno maximálně po dobu čtyř hodin. Tato skutečnost mohla být způsobena tím, že velikost kvasinky je nejmenší ze všech použitých druhů. Buňky byly velice „živé“ a náhle měnily svou polohu.

Kvasinka silně čerpá energii po skončení každé periody pučení. Jakmile jsou v kultuře buňky alespoň čtyři, často se od sebe oddělí nebo se zkroutí. Fraktální míra kopíruje trend fraktální dimenze. To znamená, že nárůst pixelů byl stejný jako růst fraktální dimenze.

Velikost mateřské buňky na počátku snímání byla 13 μm × 11 μm. Na konci měření byla kultura vzrostlá na 27 μm × 19 μm.

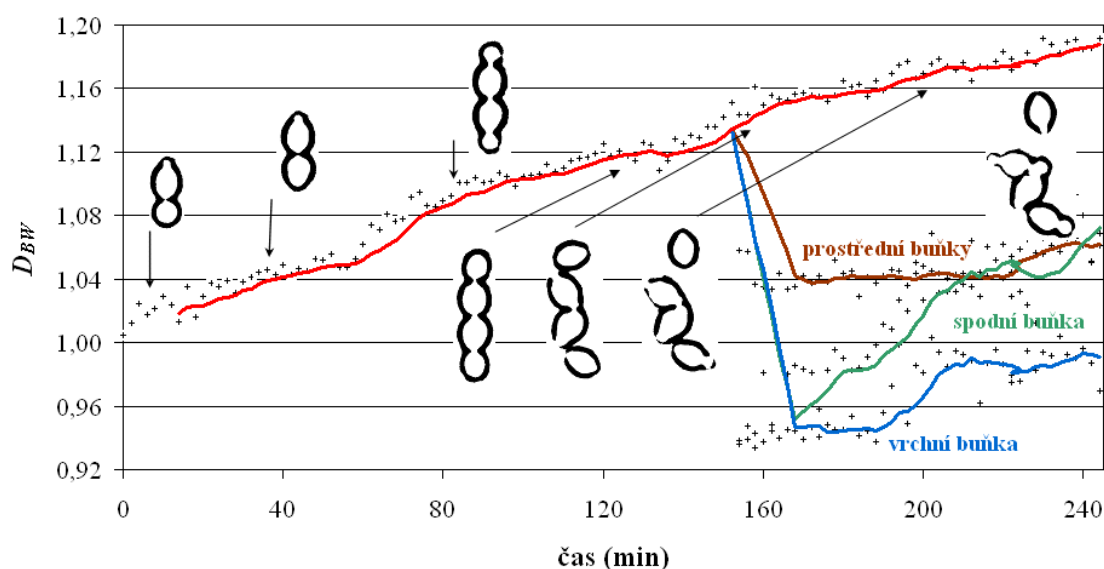


Obr. 81 Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky *Kloeckera apiculata*

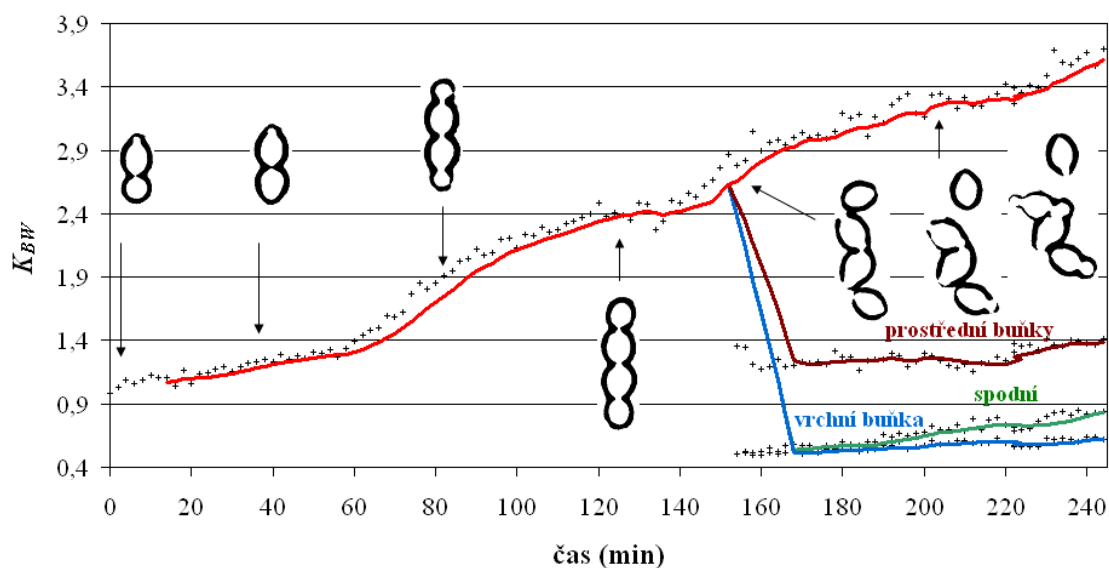


Obr. 82 Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky *Kloeckera apiculata*

Během pozorování dalšího vzorku lze vidět, jak se dceřiná buňka oddělila od mateřské a opět začala pučet. Snímáno bylo po 2 minutách při 24 °C v živném médiu č. 1. Expozice byla určena na 1/38 s a clona 4. Prahováno bylo na intenzitu 0–132. Kvasinka začala pučet po 570 minutách od zaočkování do živného média, buňky se oddělily po 685 minutách a po 10 minutách začaly opět pučet. Oddělení bylo způsobeno vytlačení původní buňky novým pupenem, který rostl na stejném místě. U této kvasinky lze tedy pěkně pozorovat bipolární pučení. Na obrázku 83 a 84 je naznačen trend změny fraktální dimenze a míry jak původní buňky, tak oddělených buněk. Po oddělení buňky začnou znovu pučet, což se projeví zvýšením dimenze i míry. Růst fraktální míry je pozvolnější než růst dimenze.

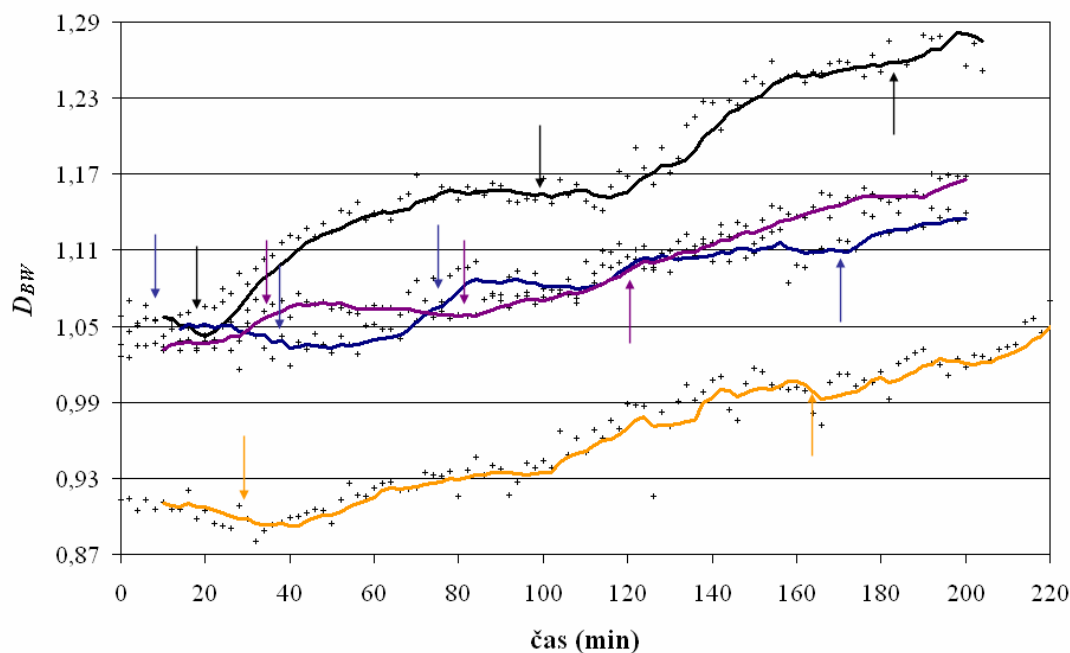


Obr. 83 Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky *Kloeckera apiculata*

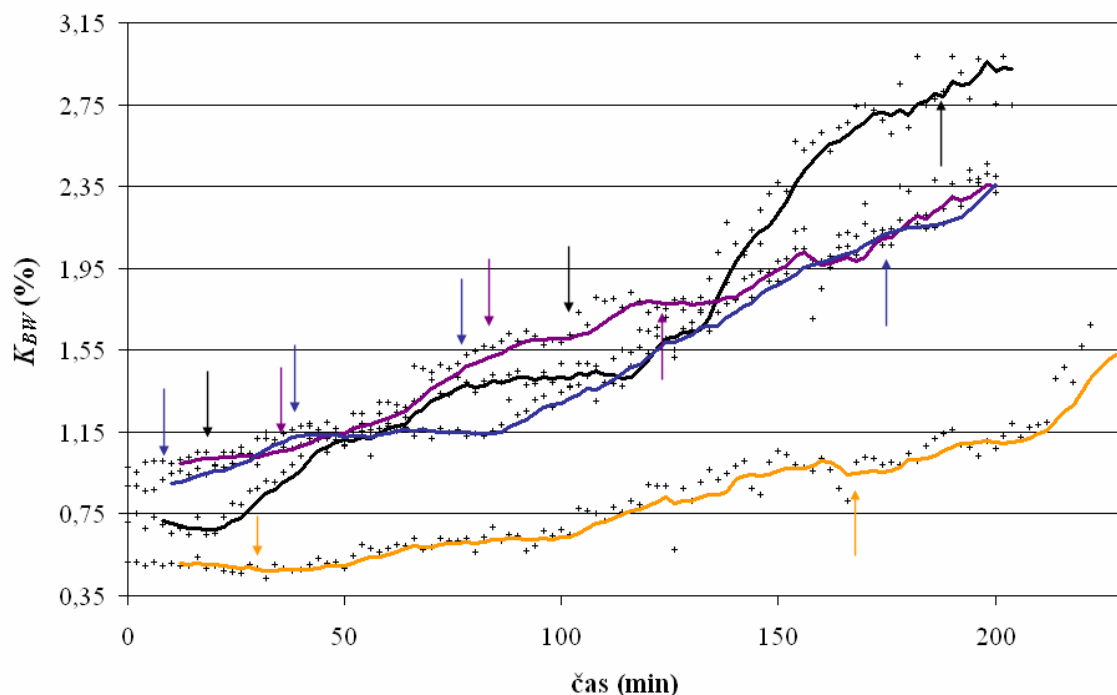


Obr. 84 Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky *Kloeckera apiculata*

Na obrázku obr. 85 a obr. 86 lze vidět srovnání více vzorků. Růst kultur je pozvolný, srovnatelný pro všechna měření. Fraktální parametry mírně klesají při objevení pupenu na mateřské buňce. Jakmile se objevil pupen na buňce a byl dobře zaostřen, fraktální dimenze i míra začaly stoupat. Téměř na konci všech měření, buňky změnilly vzhledem k sobě vzájemnou polohu nebo se oddělily. Díky těmto stavům se muselo měření ukončit. Rozdíl jednotlivých fraktálních parametrů je dán velikostí buňky. Z důvodu malé velikosti buněk se i hůře zaostřovalo, což se projevilo na rozdílech ve fraktální dimenzi jednotlivých vzorků. Tento druh kvasinek je význačný rychlým buněčným cyklem dělení a rychlým oddělením na jednotlivé buňky.



Obr. 85 Srovnání závislosti fraktální dimenze kvasinky *Kloeckera apiculata* na čase pro více vzorků mikroskopických preparátů. Vzorek č. 1: 23°C, živné médium č. 1, tři vzrostlé pupeny; vzorek č. 2: 24°C, živné médium č. 1, tři vzrostlé pupeny, vzorek č. 3: 24°C, živné médium č. 1, tři vzrostlé pupeny, vzorek č. 4: 25°C, živné médium č. 1, tři vzrostlé pupeny

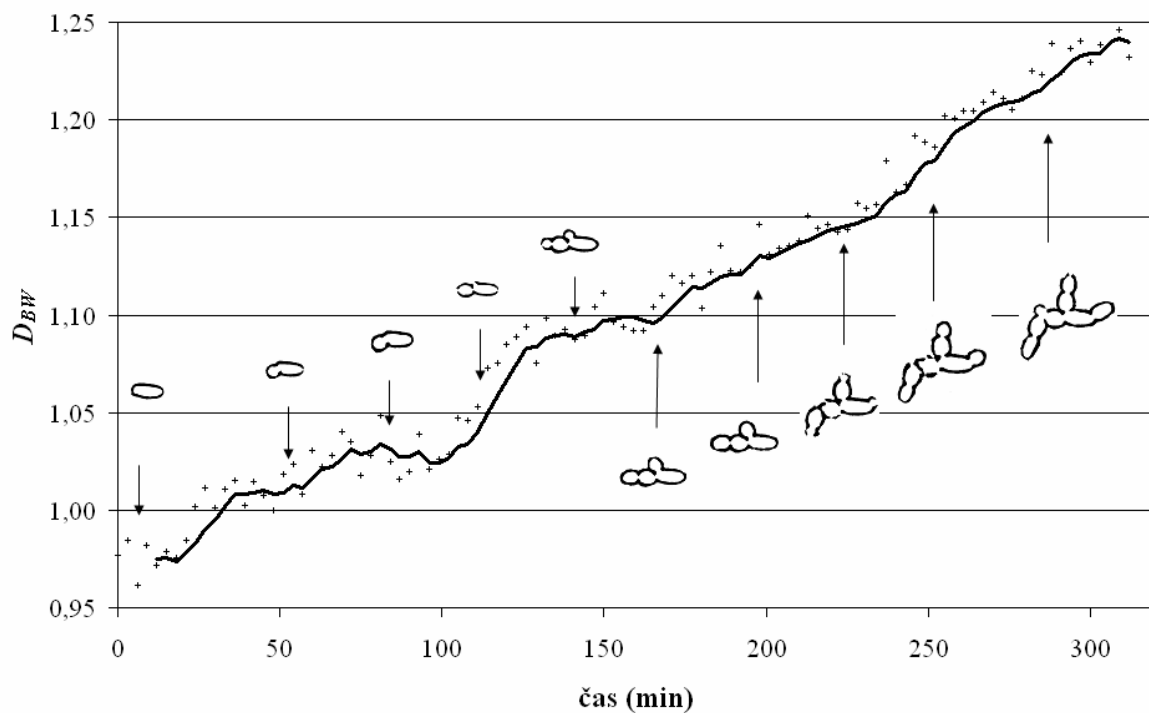


Obr. 86 Srovnání závislostí fraktální míry kvasinky *Kloeckera apiculata* na čase pro více vzorků mikroskopických preparátů. Vzorek č. 1: 23°C, živné médium č. 1, tři vzrostlé pupeny; vzorek č. 2: 24°C, živné médium č. 1, tři vzrostlé pupeny, vzorek č. 3: 24°C, živné médium č. 1, tři vzrostlé pupeny, vzorek č. 4: 25°C, živné médium č. 1, tři vzrostlé pupeny

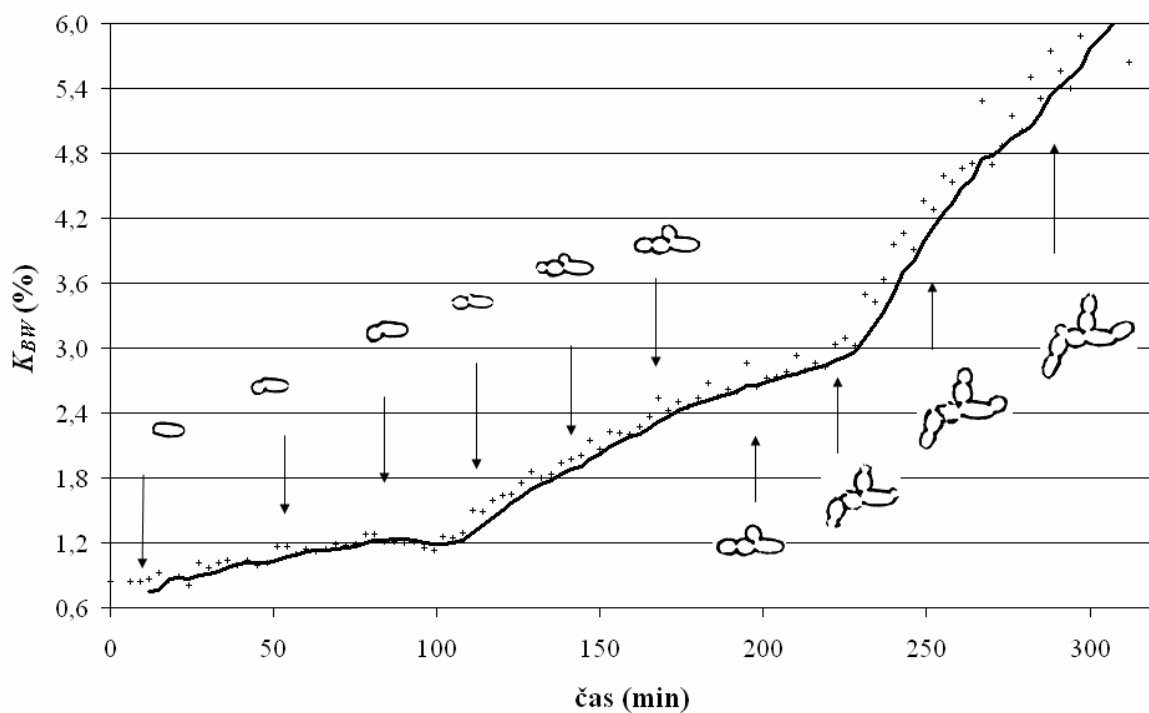
***Saccharomyces fragilis* CCY 51-1-1**

Další pozorovaná kvasinka byla *Saccharomyces fragilis*. Jako jediná ze všech zkoumaných druhů kvasinek se projevovала rychlým nástupem pučení a tedy rostoucí hodnotou fraktální dimenze a tento trend pokračoval dále téměř beze změny. Měření bylo provedeno při 24 °C v živném médiu č. 2. Výřezy 530 × 530 pixelů byly prahovány na 0–128 a snímány po 3 minutách. Nastavení závěrky bylo na 1/10 s a clona na F 7.8. První pupen vyrostl na mateřské buňce po 160 minutách od naočkování do živného média, další po 220 minutách a 300 minutách. Na dceřiných buňkách se objevily pupeny po 380 min a další tři po 450 min. Díky velkému přírůstku pupenů je závislost fraktální dimenze od druhé poloviny měření téměř plynule vzrůstající. Velký nárůst hodnot se projevil i ve fraktální míře na obr. 88. Obsahuje dva zlomy, které naznačují dvě periody pučení.

Velikost mateřské buňky na počátku snímání byla 20 μm × 10 μm . Na konci měření byla kultura vzrostlá na 50 μm × 48 μm .



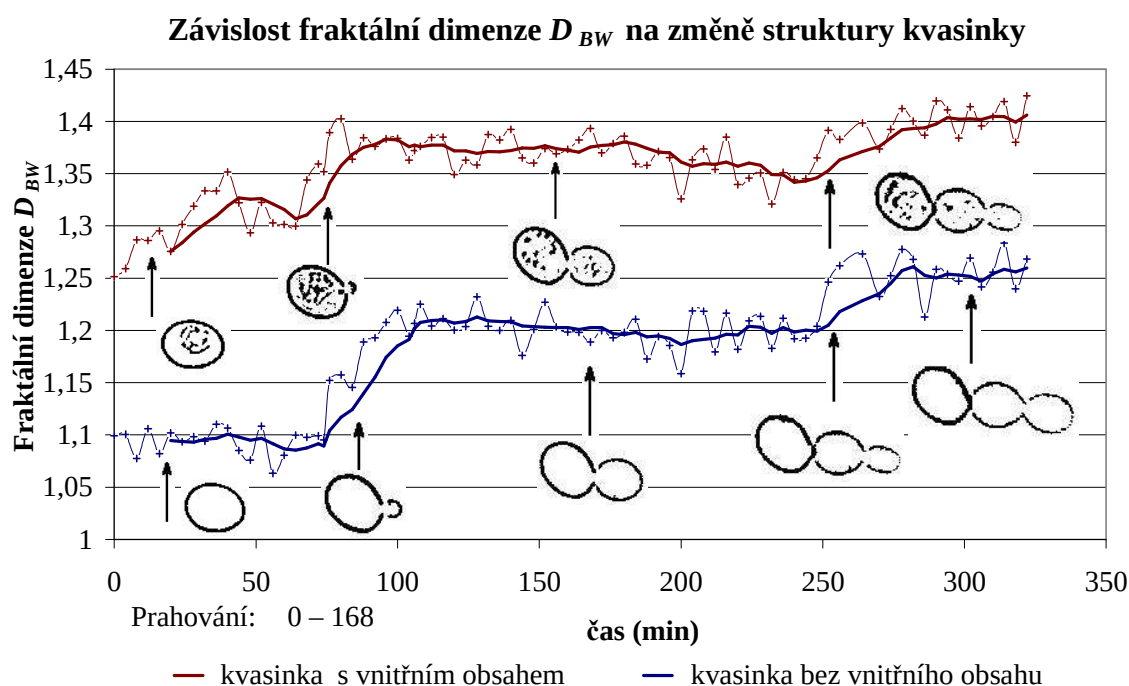
Obr. 87 Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky *Saccharomyces fragilis*



Obr. 88 Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky *Saccharomyces fragilis*

Saccharomyces cerevisiae Meyen ex E. C. Hansen CCM 8191

Rozmnožování tohoto druhu kvasinky bylo pozorováno na sestavě skládající se ze světelného mikroskopu SM 6 od firmy Intraco Micro a CCD kamery od firmy SONY model SSD-DC50AP s nízkým rozlišením 752×548 a proto během celého experimentu bylo zaostřováno na vnitřní část buněčné stěny k získání analyzovatelného obrazu. Na snímcích o velikosti 160×160 pixelů byla provedena klasická fraktální analýza metodou box counting v programu HarFa. Bylo snímáno po 4 minutách s expozicí 20 ms. Nastavení vstupů digitalizační karty: jas – 58, kontrast – 89, odstín – 118, sytost – 65. Některé snímky nebyly zpracovány, protože sledovaná kvasinka byla překryta nečistotou putující živným médiem nebo jinou buňkou kvasinky. Čas od objevení pupenu na mateřské buňce po objevení pupenu na dceřiné buňce byl 92 min. Sledovaná buňka kvasinky začala pučet (objevení pupenu) za cca 160 minut po naočkování. Bylo použito živné médium č. 1, laboratorní teplota byla 28°C . Zvětšení objektivu/numerická apertura: 40/0,65. Body jsou v grafech proloženy klouzavým průměrem, periody: 6.

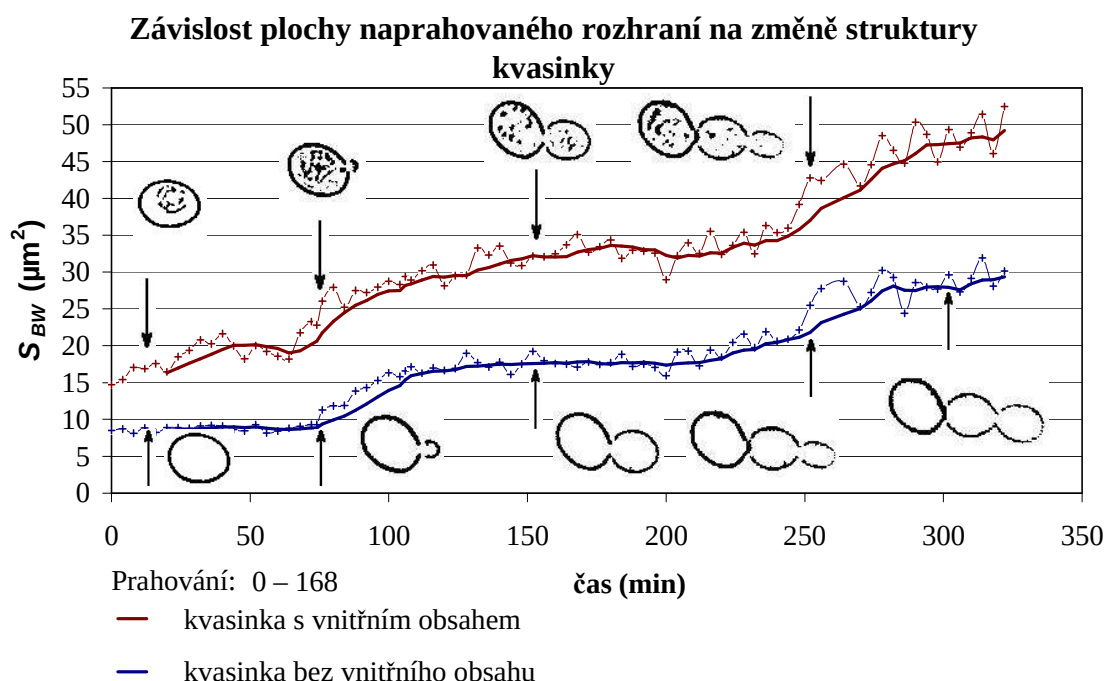


Obr. 89 Graf závislosti fraktální dimenze D_{BW} na čase pro vzorek kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen

Na obou křivkách lze vidět vzrůst fraktální dimenze rozhraní při objevení pupenu na mateřské buňce, pak následuje nevýrazná spíše konstantní část před opětovným vzrůstem fraktální dimenze při objevení pupenu na dceřiné buňce. Z grafu je evidentní, že naprahovaný vnitřní obsah buňky (buněčné organely, zásobní látky) ovlivňuje nejen průběh závislosti fraktální dimenze na čase, ale i její hodnotu. Z výřezů byly odstraněny pouze ty organely, které nesplývaly s naprahovanou stěnou kvasinky.

Buňka musí načerpat látky, aby si udělala zásobu energie před budoucím rozmnožováním. Před pučením dochází také ke zvětšení počtu vnitřních organel (např. vakuol). Tímto si lze vysvětlit počáteční vzrůst fraktální dimenze rozhraní na horní křivce. Fraktální dimenze rozhraní kvasinky s vnitřním obsahem není součtem fraktální dimenze její naprahované

buněčné stěny a jejího vnitřního obsahu. Buněčná stěna a vnitřní obsah kvasinky se navzájem ovlivňují (jsou blízko u sebe) a dávají dohromady menší fraktální dimenzi rozhraní, než je jejich součet [80].

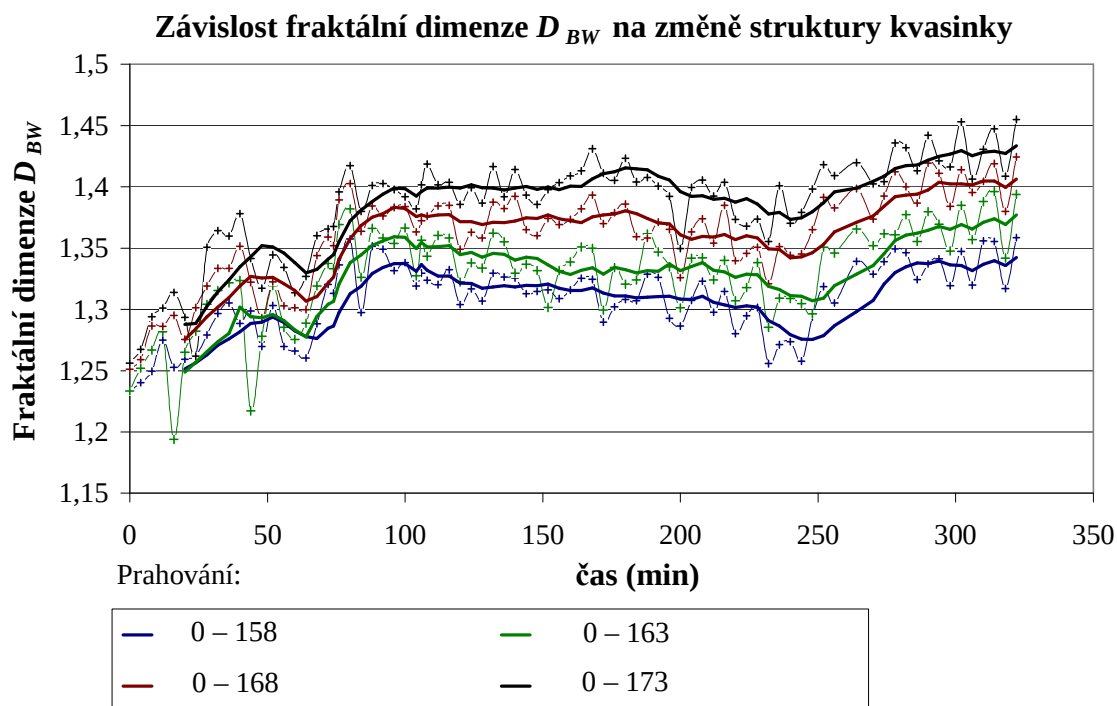


Obr. 90 Graf závislosti plochy S_{BW} na čase

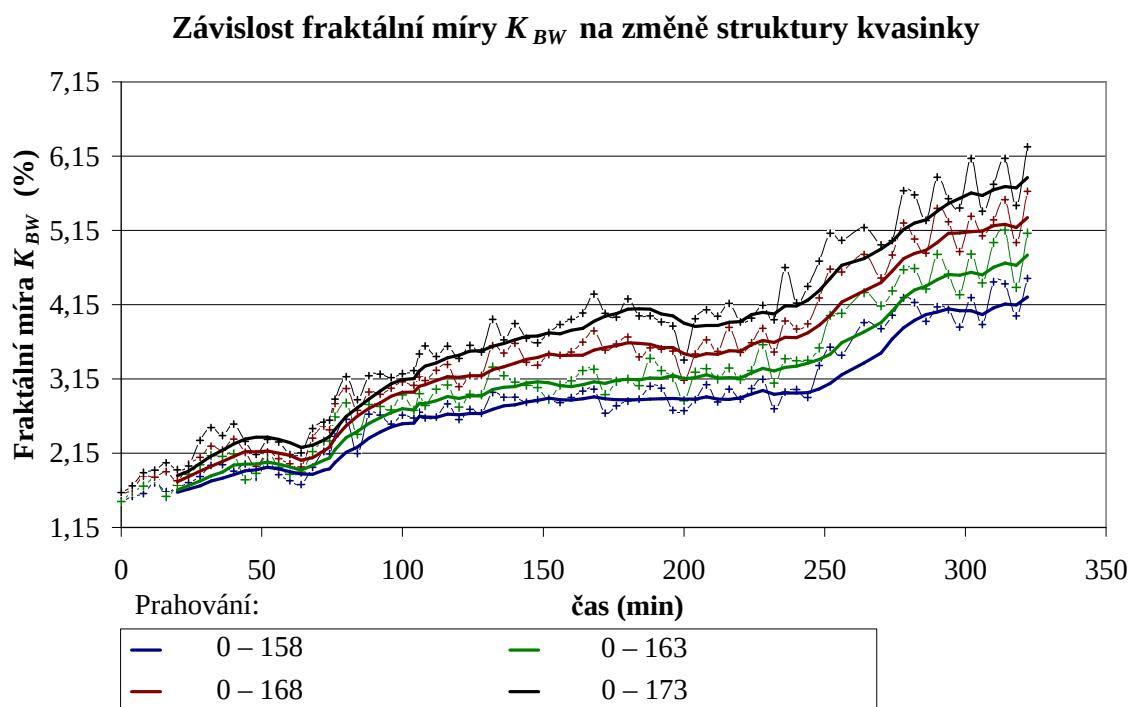
V předcházejícím grafu lze vidět vzrůst plochy naprahovaného rozhraní kvasinky při objevení pupenu na mateřské buňce a při objevení pupenu na dceřiné buňce. Mikroskopické zvětšení, rozlišení digitální kamery poskytuje spojení mezi velikostí obrazu a velikostí studovaného vzorku (1 pixel na 0,19 μm). Toto spojení bylo využito pro přepočet fraktální dimenze na plochu naprahovaného rozhraní.

Během celého snímání pučení kvasinky je vhodné zbytečně nepřeostršovat, pokud to není nutné. Různé zaostření má vliv na fraktální dimenzi i míru u naprahovaných snímků.

Na sekvenci obrázků lze vidět postupnou změnu tvaru vznikajícího pupenu (od protáhlého do kruhovitěho), přesun organel do pupenu a vytvoření přepážky mezi mateřskou a dceřinou buňkou. Experiment byl ukončen z důvodu přetočení dceřiné buňky pod tíhou jejího vznikajícího pupenu.



Obr. 91 Graf závislostí fraktální dimenze D_{BW} na čase pro různě naprahované výřezy



Obr. 92 Graf závislostí fraktální míry K_{BW} na čase pro výřezy naprahované dle různého rozsahu intenzit

Z grafu lze vidět, že naprahování snímků dle různého rozsahu intenzit ovlivňuje hodnotu fraktální dimenze rozhraní i míry. Avšak celkový trend změny fraktální dimenze a míry na čase je totožný.

3.3.4 Závěr

Sledování vegetativního rozmnožování kvasinek pučením bylo nejvhodnější v Bürkerově komůrce z ostatních vyzkoušených možností (Böttcherova komůrka, zploštělá kapilára). Po zaočkování do živného média je vhodné nechat kvasinky cca 2 hodiny staticky kultivovat pro přizpůsobení na nové prostředí před nanesením kapky jejich suspenze na Bürkerovu komůrku. Pro nastartování intenzivního rozmnožování po cca 2 hodinách se ukázalo být živné médium č. 1 vhodnější.

Pomocí vhodného nastavení parametrů optické soustavy (optické filtry, jas, kontrast) lze usnadnit vlastní obrazovou analýzu. Pozorování bylo vhodné pod klasickým světelným mikroskopem. Nevýhodou fázového kontrastu je tzv. halo efekt, který je způsoben lomem světla na strukturách s velkým rozdílem indexu lomu např. kvasinky ve vodném prostředí. Projevuje se jasně zářícím rozhraním mezi objektem a prostředím a tím se ztrácí hranice objektů.

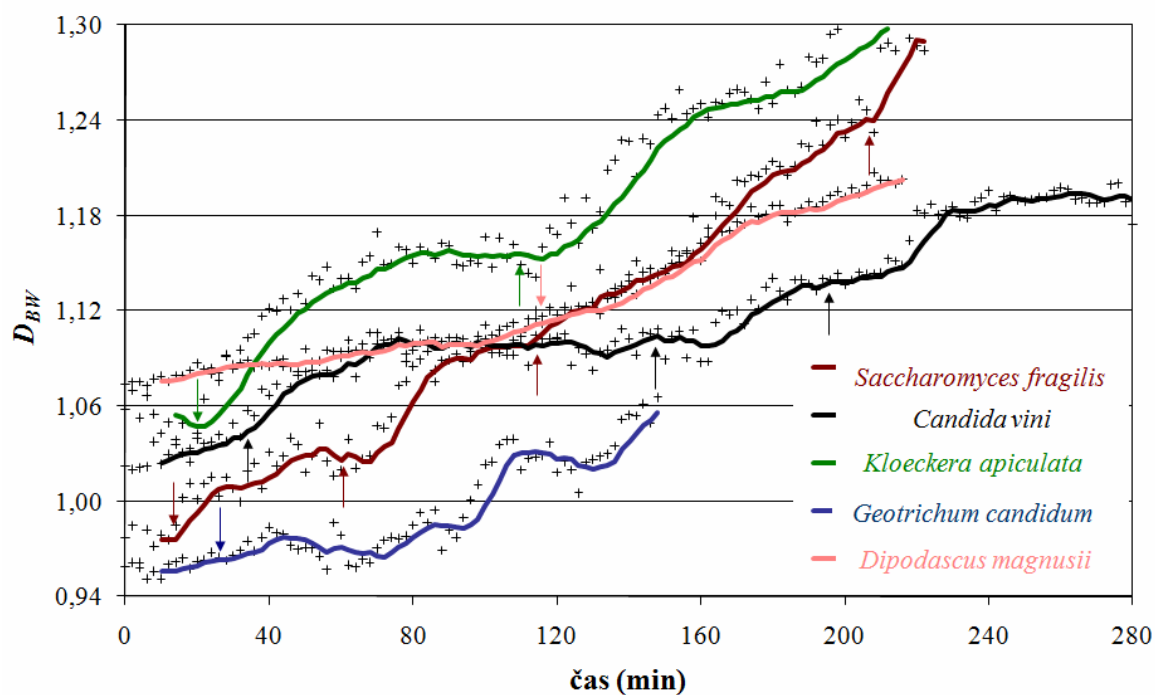
Při sledování růstu a rozmnožování bylo zjištěno, že po objevení pupenu dochází ke kontinuálnímu či skokovému vzrůstu fraktální dimenze, přičemž mezi jednotlivými skoky se nachází fáze relaxace, kdy se fraktální dimenze příliš nemění. Během fáze relaxace si buňka doplňuje látkovou a energetickou rezervu pro další dělení a může zvětšovat své rozměry. Tato fáze však není pozorována vždy, neboť není nezbytná. Strmost vzrůstu fraktální dimenze je také dána počtem současně se vyvíjejících pupenů na mateřské buňce. Fraktální dimenze dceřiné buňky prudce poklesne při oddělení od mateřské buňky. Bylo zaznamenáno také oddělení pupenu od mateřské buňky a následující dělení těchto dceřiných buněk. Trend vzrůstu fraktální dimenze při dalším dělení dceřiné buňky je opět obdobný jako u mateřské buňky. Při objevení pupenu dochází také ke vzrůstu fraktální míry (počet políček o stejné intenzitě). Sledování se týkalo různých způsobů množení, především multipolárního a bipolárního pučení. Bipolární pučení kvasinky *Kloeckera apiculata* umožňovalo pozorovat oddělení dceřiné buňky od mateřské.

Srovnání všech typických průběhů růstu a rozmnožování vybraných pěti druhů kvasinek lze vidět na obrázku 93 a 94. Jednotlivé vzorky se od sebe liší, ale základní principy stále zůstávají: trend je vrůstající, dva z pěti druhů kvasinek (*Saccharomyces fragilis* a *Dipodascus magnusii*) nepotřebují ke svému růstu relaxační fázi pro čerpání živin, zbylé tři druhy kvasinek (*Kloeckera apiculata*, *Candida vini*, *Geotrichum candidum*) tuto fázi růstu projevují a živiny v průběhu růstu kultury čerpají. Snížení fraktální dimenze je způsobeno objevením pupenu na mateřské buňce, který v počáteční fázi svého růstu nejde dobře zaostřit. Jako ideální pozorovací objekt pro obrazovou analýzu se jeví *Kloeckera apiculata* (pro svou rychlou reprodukci) a *Dipodascus magnusii* (pro tlustou stěnu).

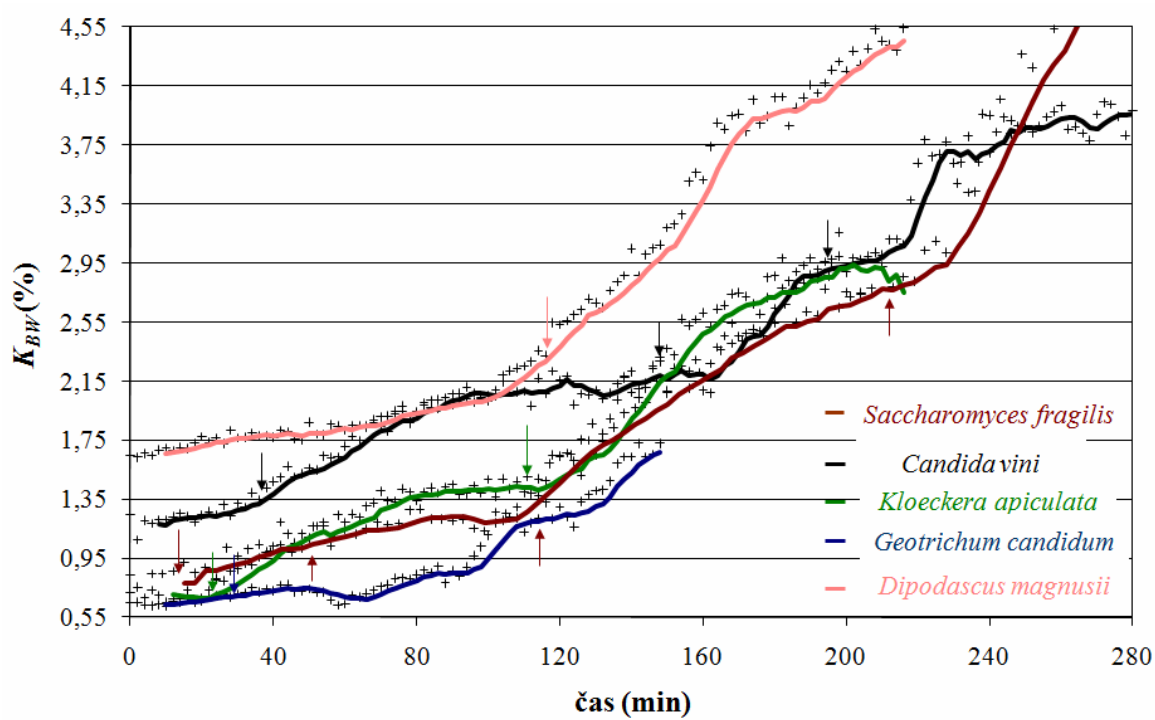
Z obrázku 93 lze vidět, že hodnota fraktální dimenze rozhraní jednoduché struktury buňky kvasinky se pohybuje kolem 1. V průběhu času dochází k vzrůstu fraktální dimenze v důsledku vzrůstu členitosti povrchu během pučení. Monitorování změny fraktální dimenze nám může poskytnout informaci o adaptaci buněk na různé životní podmínky.

Fraktální míra ukazuje, jak buněčná stěna roste s časem. Obrázek 94 ukazuje vzrůst počáteční hodnoty K_{BW} až do 4,55 % pokrytí plochy obrazu. Největší zvětšení fraktální míry bylo pozorováno pro *Saccharomyces fragilis*.

Z výsledků lze vidět, že je vhodné ke studiu dynamických vlastností kvasinek použít metody obrazové analýzy. Fraktální dimenze a fraktální míra byly použity k charakterizaci růstu a pučení vybraných druhů kvasinek. Změna těchto parametrů v čase poukazuje na trend a poskytuje kvantifikaci procesu dělení kvasinek.



Obr. 93 Srovnání závislosti fraktální dimenze D_{BW} na čase pro pět druhů kvasinek



Obr. 94 Srovnání závislosti fraktální míry K_{BW} na čase pro pět druhů kvasinek

4 LITERATURA

- [1] Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Victoria Publishing, 1995. 57 s. ISBN 80-85605-71-6.
- [2] Hudcová, D., Maltán, V.: *Mikrobiológia I*. Bratislava: STU, 2002. 68 s. ISBN 80-227-1663-4.
- [3] Hampel, B.: *Potravinářská mikrobiologie*. Praha: SNTL, 1968. 63 s.
- [4] Kocková-Kratochvílová, A.: *Kvasinky a kvasinkové mikroorganismy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982.
- [5] Janderová, B., Bendová, O.: *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999.
- [6] Němec, M., Horáková, D.: *Základy mikrobiologie*. 3.vyd. Brno: MU PřF, 1999. ISBN 80-210-2060-1.
- [7] Veselá M., Drdák M.: *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. vyd. Brno: VUT Brno, Fakulta chemická, 1999.
- [8] Kocková-Kratochvílová, A.: *Kvasinky*. 1. vyd. Bratislava: SNTL, 1957.
- [9] Vodrážka Z.: *Biochemie*. 2. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [10] Sládeček, F., Nedvídek, J.: *Dělení buňky*. 1.vyd. Praha: UK PřF, 1978.
- [11] Nečas, O., Streiblová, E., Vondrejs, V.: *Buněčný cyklus mikroorganismů*. 1. vyd. Praha: Academia, 1981.
- [12] Paleček, J.: *Biologie buňky – I. Základy mikroskopické cytologie*. Praha: Karolinum, 2000.
- [13] Tvrdoň, M., Báležová, B.: *Kvasná mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1986.
- [14] Vraná D.: *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. 1 vyd. Praha: Academia, 1986.
- [15] Demnerová K.: *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*, VŠCHT Praha, 2001.
- [16] Kolektiv oddělení Buněčné neurofyzologie Fyziologického Ústavu AVČR. *Vademecum add usum proprium dept. 331* [online], příručka základních a nepostradatelných znalostí pro každého elektrofyziologa, únor 2001 [cit. 2006-5-22]. Dostupné z: <http://www2.biomed.cas.cz/d331/vade/cele.html#h4_19>.
- [17] Navrátil L., Rosina J.: *Lékařská biofyzika*. 1 vyd. Praha: Manus, 2000. ISBN 80-902318-5-3.
- [18] Optoteam s.r.o. *Co znamená Nikon ADL – Apodizovaný fázový kontrast?* Dostupné z: <<http://www.optoteam.cz/produkty/adl.asp>>.
- [19] Rost F. W. D.: *Fluorescence microscopy*, 2 vol set. 1st vyd. Cambridge University Press 1995. ISBN 0 521 42277 9.
- [20] Nikon MicroscopyU; The Source for Microscopy Education. *Fluorescence Microscopy*. Dostupné z: <<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/index.html>>.
- [21] Molecular ExpressionsTM. *Fluorescence Microscopy* [online]. 1998, last modified: Dec 30, 2005 [cit. 2006-5-22]. Dostupné z: <<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>>.
- [22] Vaněk S. Za limity optické mikroskopie. *Vesmír*, 2008, 87. s. 309–310. ISSN 1214-4029.
- [23] RMI, s.r.o. *Digitální holografická mikroskopie. Digitální holografický mikroskop firmy Lyncée Tec*. [cit. 2010-04-10]. Dostupné z: <<http://www.rmi.cz/index.php?ref=7&id=138>>.

- [24] Fišar, Z.: *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách*. Praha: 1. lékařská fakulta UK, Psychiatrická klinika, 2003 [cit. 2006-7-4]. Dostupné z: <<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/fluorofory.pdf>>.
- [25] Mason, W. T.: *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity; A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis*. London: Academic Press, 1993. ISBN 0-12-477830-5.
- [26] Molecular Probes. *Fluorescence Microplate Assays*, seventh edition, 2002 [cit. 2005-11-2]. Dostupné z: <<http://www.probes.com>>.
- [27] Wenisch, Ch., Linnau, K. F., Parschalk, B., Zedtwitz-Liebenstein, K., Georgopoulos, A.: Rapid Susceptibility Testing of Fungi by Flow Cytometry Using Vital Staining. *Journal of Clinical Mikrobiology*, Jan. 1997, vol. 35, no. 1, pp. 5–10. ISSN 0095-1137.
- [28] Brul, S., Nussbaum, J., Dielbandhosing S. K.: Fluorescent probes for wall porosity and membrane integrity in filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods*, March 1997, vol. 28, no. 3, pp. 169–178, 1997. ISSN 0167-7012.
- [29] Miliard, P. J., Roth, B. L., Thi, H-P. T., Yue, S. T., Haugland, R. P.: Development of the FUN-1 Family of Fluorescent Probes for Vacuole Labeling and Viability Testing of Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, July 1997, vol. 63, no. 7, pp. 2897–2905. ISSN 0099-2240.
- [30] Produkt insert: *Probes for Yeast Viability, L-7009 LIVE/DEAD YEAST Viability Kit*. Revise: January 22, 2001, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. Dostupné z: <<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07009.pdf>>.
- [31] Henry-Stanley, M. J., Garni, R. M., Wells, C. L.: Adaptation of FUN-1 and Calcofluor white stains to assess the ability and nonviable yeast to adhere to and be internalized by cultured mammalian cells. *Journal of Microbiological Methods*, November 2004, vol. 59, no. 2, pp. 289–292. ISSN 0167-7012.
- [32] Henry-Stanley, M. J., Wells, C. L.: Viability and Versatility of the Yeast Cell. *Microscopy Today*, May 2004, vol. 12, no. 3. ISSN 1551-9295.
- [33] Essary Beandin D., Marshall Pamela A.: Assessment of FUN-1 vital dye staining: Yeast with a block in the vacuolar sorting pathway have impaired ability to form CIVS when stained with FUN-1 fluorescent dye. *Journal of Microbiological Methods*, 2009, vol. 78, no. 2, pp. 208–212. ISSN 0167-7012.
- [34] Albani, J. R., Skolen, A., Coddeville, B., Plancke, Y. D., Engelborghs, Y.: Dynamics of carbohydrate residues of α_1 -acid glycoprotein (orosomucoid) followed by red-edge excitation spectra and emission anisotropy studies of Calcofluor White. *Carbohydrate Research*, November 1999, vol. 322, no. 1, pp. 87–94. ISSN 0008-6215.
- [35] Albani, J. R., Plancke, Y. D.: Interaction between calcofluor white and carbohydrates of α_1 -acid glycoprotein. *Carbohydrate Research*, December 1998, vol. 314, no. 3, pp. 169–175. ISSN 0008-6215.
- [36] Mazán, M., Mazánová, K., Farka, V.: Bunková stena húb – výzva pre výskum nových antimykotík. *Chemické listy*, 2006, roč. 100, č. 6, s. 433–439. ISSN 0009-2770.
- [37] Zmeškal O., Sedlák O., Nežádal M.: Metody obrazové analýzy dat, *Digital Imaging in Biology and Medicine*, Czech Academy of Science České Budějovice: May 13., 2002, pp. 34–43, ISBN 80-901250-8-5.
- [38] Hlaváč V., Sedláček M.: *Zpracování signálů a obrazů*. 1. vyd. Praha: ČVUT, 2000.

- [39] Panák J., Čeppan M., Dvonka V., Karpinský L., Kordoš P., Mikula M., Jakucewicz S.: *Polygrafické minimum*. 2.vyd. Bratislava: TypoSet, 2000. ISBN 80-967811-3-8.
- [40] *Metrology Color Lab*. JDS Uniphase Corporation, 2007, 32 s. [cit. 2010-05-10]. Dostupné z: <http://www.jdsu.com/product-literature/metrology_br_co_ae.pdf>.
- [41] *Precise Color Communication*. Konica Minolta, 2007, 60 s. [cit. 2010-05-11]. 9242-4830-92. Dostupné z: <<http://www.konicaminolta.com/instruments/knowledge/color/>>.
- [42] *HSL and HSV* [online], last modified on 25 June 2010 [cit. 2010-05-10]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/HSL_and_HSV>.
- [43] Hudec R.: *Snimanie obrazu*. 1. Vyd. Žilina: Žilinská univerzita, 2008. ISBN 978-80-8070-880-1-9.
- [44] Zmeškal, O., Julínek, M., Bžatek, T.: *Obrazová analýza povrchu potiskovaných materiálů a potištěných ploch*. Conf. Pardubice, V. Polygraphic conf. University of Pardubice, September 12–13, 2003, ISBN 80-7194-372-X.
- [45] Tománková, K. *Studium vlastností hrubě disperzních soustav pomocí metod obrazové analýzy*. VUT v Brně. Fakulta chemická, 2004, 95 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Oldřich Zmeškal, CSc.
- [46] Graps A.: *An Introduction to Wavelets*, Institute of Electrical and Electronics Engineers, 1999 [cit. 2006-5-28]. Dostupné z: <<http://www.amara.com/ftpstuff/IEEE/wavelet.pdf>>.
- [47] Jan J.: *Číslicová filtrace, analýza a restaurace signálů*. 2.vyd. Brno: VUTUM, 2002. ISBN 80-214-2911-9.
- [48] Fiala, J.: Waveletová transformace. *Materials Structure in Chemistry, Biology, Physics and Technology*, 1999, vol. 6, no. 1, pp. 29–36. ISSN 1211-5894.
- [49] Vargic R.: *Wavelety a banky filtrů*. 1. vyd. Bratislava: Slovenská technická univerzita v Bratislavě, 2004. 136 s. ISBN 80-227-2093-3.
- [50] Wang A. L., Yang C. X., Yuan X. G.: Evaluation of the wavelet transform metod for machined surface topography 2 : fractal characteristic analysis. *Tribology Internationa*, 2003, vol. 36, pp. 527–535. ISSN 0301-679X.
- [51] Lee, D. T. L., Yamamoto A.: Wavelet Analysis: Theory and Applications. *Hewlett-Packard Journal* [online]. December 1994, vol. 45, no. 6, pp. 44–52. [cit. 2006-5-21]. Dostupné z: <<http://www.hpl.hp.com/hpjournal-/94dec/dec94a6.pdf>>.
- [52] Jin Y., Angelini E., Laine A.: *Wavelets in Medical Image Processing: De-noising, Segmentation and Registration*. New York, Columbia University, 2004 [cit. 2006-5-22]. Dostupné z: <<http://www.loni.ucla.edu/twiki/pub/CCB/CcbBiologicalProjects/91-pdf.pdf>>.
- [53] Semotán, J. *Demonstrace transformací*. ČVUT v Praze. Fakulta elektrotechnická. Katedra počítačů, 2001, 47 s. Vedoucí diplomové práce Doc. Ing. Miroslav Šnorek.
- [54] Eisensteinová G., Sedláček M.: *Využití MATLABU k potlačování aditivního šumu pomocí filtrace a pomocí vlnkové transformace*. In MATLAB 2001. VŠCHT Praha, 2001, [cit. 2006-5-21]. Dostupné z: <http://dsp.vscht.cz/konference_matlab/matlab01/eisenst.pdf>. ISBN 80-7080-446-7.
- [55] Šmíd R.: *Úvod do vlnkové transformace*. Praha: ČVUT FEL, srpen 2001 [cit. 2006-5-18]. Dostupné z: <<http://measure.feld.cvut.cz/usr/staff/smid/wavelets/Wavelet-intro8859.pdf>>.

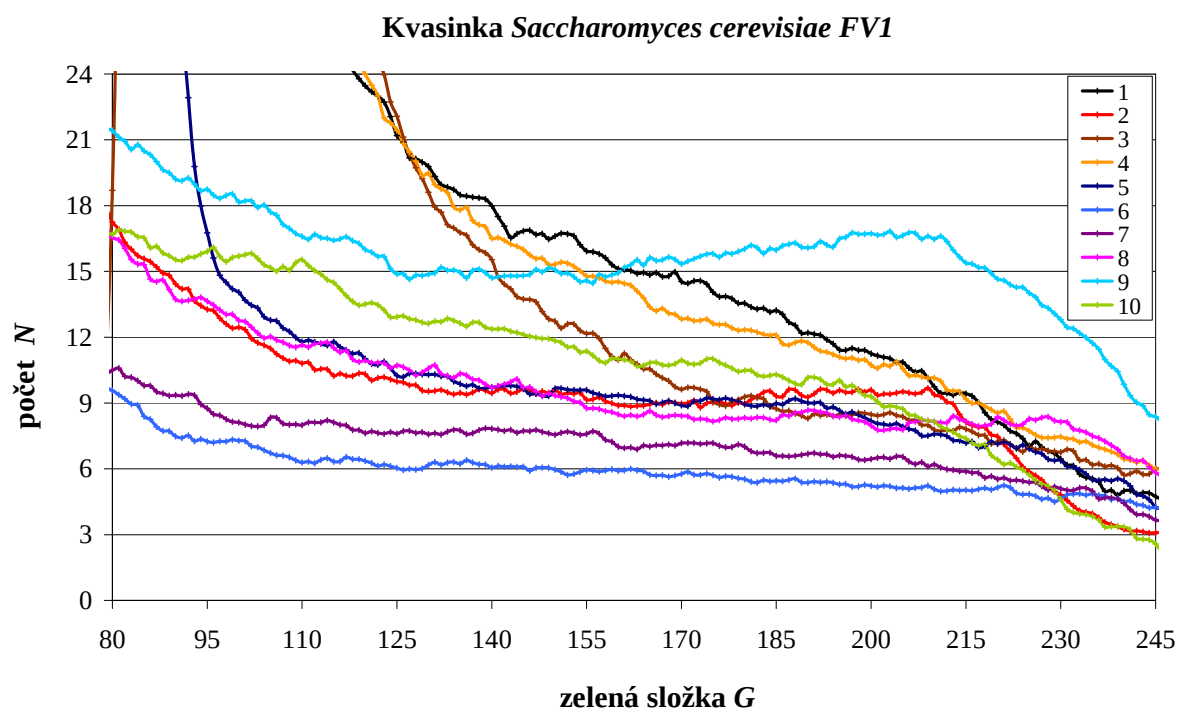
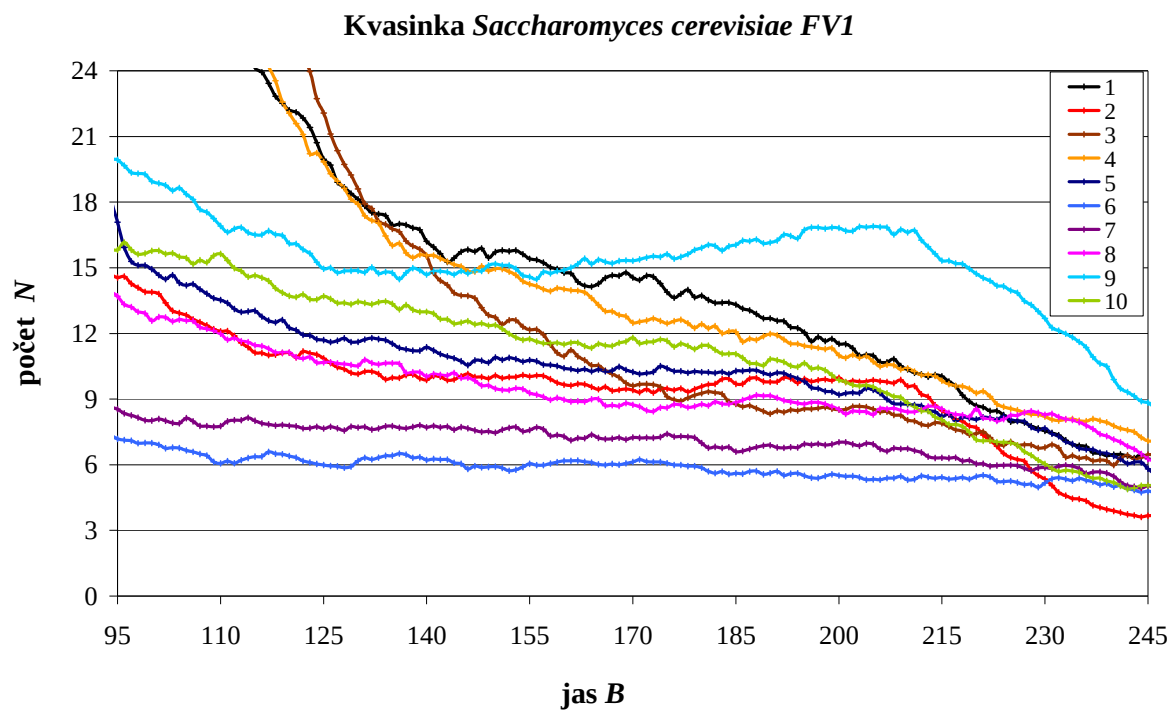
- [56] Gavlasová, A. *Wavelet transformace v analýze a číslicovém zpracování biomedicínských signálů a obrazů*. VŠCHT v Praze. Fakulta chemicko-inženýrská. Ústav počítačové a řídicí techniky, 2004, 71 s., [cit. 2006-5-23]. Vedoucí diplomové práce Prof. Ing. Aleš Procházka, CSc. Dostupné z: <http://dsp.vscht.cz/DP/DP2004_Gavlasova_Andrea.pdf>.
- [57] Klusal, M.: *Převod EEG do slyšitelné oblasti*. Plzeň: Západočeská univerzita v Plzni. Fakulta elektrotechnická. Katedra aplikované elektroniky a telekomunikací, 2004, 44 s., [cit. 2006-5-21]. Vedoucí práce ke státní doktorské zkoušce Doc. Ing. Milan Štork, CSc. Dostupné z: <<http://home.zcu.cz/~mklusal/postfinal.pdf>>.
- [58] Stollnitz E. J., DeRose T. D., Salesin D. H.: Wavelets for Computer Graphics: A Primer, Part 1. *Computer Graphics and Applications, IEEE*. May 1995, vol. 15, no. 3, pp. 76–84, [cit. 2006-5-18]. Dostupné z: <<http://csdl.computer.org/dl/mags/cg/1995/03/g3076.pdf>>. ISSN 0272-1716.
- [59] Jan J., Kozumplík J.: *Systémy, procesy a signály*. Studijní texty pro obor Výpočetní technika a informatika. 1. vyd. Brno: VUTIU, 2000. ISBN 80-214-1593-2.
- [60] Najzar K.: *Základy teorie waveletů*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0957-6.
- [61] Švihlík J.: Aplikace DWT pro potlačení šumu v obraze. ČVUT v Praze. Fakulta elektrotechnická. In *13th Annual Conference Proceedings of Technical Computing Prague 2005*, Praha: Humusoft, 2005 [cit. 2006-5-28]. Dostupné z: <http://dsp.vscht.cz/konference_matlab/MATLAB05/prispevky/svi-hlik/svihlik.pdf>. ISBN 80-7080-577-3.
- [62] Kurečka R., Kozumplík J.: Komprese medicínských obrazových dat s vyšší kvalitou ve vybraných oblastech. VUT v Brně. Fakulta elektrotechniky a informatiky. Ústav biomedicínckého inženýrství. In *Abstract Proceedings of Congress MEFA 2000*. BVV Brno, 2000, [cit. 2006-5-23]. Dostupné z: <http://dsp.vscht.cz/konference_matlab/matlab00/kurecka.pdf>.
- [63] Hwang Hae-Gil, Choi Hyun-Ju, Lee Byeong-II, Yoon Hye-Kyoung, Nam Sang-Hee, Choi Heung-Kook.: Multi-resolution wavelet-transformed image analysis of histological sections of breast carcinomas, *Cellular Oncology*, 2005, vol. 27, pp. 237–244. ISSN 1570-5870.
- [64] Pauš, P. *Počítačové generování fraktálních množin*. ČVUT v Praze, 2004 [cit. 2006-5-25], Dostupné z: <http://kmlinux.fjfi.cvut.cz/~pausp1/html/skola/resersni_prace/reserse.pdf>.
- [65] Ficker, T.: *Aplikace fraktální geometrie v přírodních a technických vědách*. Brno: VUTIU, 2005. ISSN 1213-418X.
- [66] Chakraborti, R. K., Gardner K. H., Atkinsin J. F., Van Benschoten J. E.: Changes in fractal dimension during aggregation. *Water Research*, 2003, vol. 37, no. 4, pp. 873–883. ISSN 0043-1354.
- [67] Pauš, P. *Počítačová analýza fraktálních množin*. ČVUT v Praze, 2005 [cit. 2006/5/25]. Dostupné z: <http://kmlinux.fjfi.cvut.cz/~pausp1/html/skola/vyzkumny_ukol/vyzkumak.pdf>.
- [68] Zmeškal O., Nežádal M., Bžatek T. *HarFA – Harmonic and Fractal Image Analyser*. Ver. 5.1. Brno, 2005. Dostupné z URL <<http://www.fch.vutbr.cz/lectures/imagesci>>.

- [69] Zmeškal, O., Komendová, B., Bžatek, T., Julínek, M.: Hodnocení kvality tiskových bodů metodami obrazové (waveletové) analýzy, *Polygrafia Academica 2004*, FCHPT STU Bratislava, 2004, s. 102–112. ISBN 80-227-2100-X.
- [70] Zmeškal O., Veselý M., Nežádal M., Buchníček M.: Fractal Analysis of Image Structures, *Digital Imaging in Biology and Medicine*, Czech Academy of Science České Budějovice: May 15, 2001, pp. 57–59. ISBN 80-901-2506-9.
- [71] Jeřábková, P., Zmeškal, O., Haderka, J.: Fractal Analysis of the Images Using Wavelet Transformation. In *Complexus Mundi; Emergent Patterns in Nature*. London: World Scientific, 2006, pp. 305–312. ISBN 981-256-666-X.
- [72] Tománková, K. *Studium vlastností hrubě disperzních soustav pomocí metod obrazové analýzy*. VUT v Brně. Fakulta chemická, 2004, 95 s. Vedoucí diplomové práce Doc. Ing. Oldřich Zmeškal, CSc.
- [73] Jeřábková P., Zmeškal O., Veselá M.: *Application of Image Analysis Methods in Yeast Cell Study*, conf. 3rd Meeting on Chemistry & Life, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, September 20–22, 2005, *Chemické listy S*, vol. 99, s. s292 (3 s.). ISSN 0009-2770.
- [74] Julínek, M.: *Analýza 2D- a 3D- obrazů mikrobiologických struktur*. Brno, 2004. 59 s. Bakalářská práce na Chemické fakultě VUT Brno. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Oldřich Zmeškal, CSc.
- [75] Kocková-Kratochvílová A. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1 vyd. Bratislava: Alfa 1990, ISBN 80-05-00644-6.
- [76] *Miniatlas mikroorganismů*. [databáze online]. Savická D., Chumchalová J., Němec M. a kol. FPBT VŠCHT Praha a PŘF MU Brno, [citováno 2009-10-24]. Dostupné z: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm>>.
- [77] Görner F., Valík L.: *Aplikovaná mikrobiológia poživatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 80-967064-9-7.
- [78] Čechová L.: *Využití obrazové analýzy při studiu buněk kvasinek*. Brno, 2003. 82 s. Diplomová práce na Chemické fakultě VUT Brno. Vedoucí diplomové práce RNDr. Marie Veselá, Ph.D.
- [79] Veselá M., Zmeškal O., Veselý M., Nežádal M.: *The fractal Analysis of Image tructures for Biologic Applications*, conf. Digital Imaging in Biology and Medicine, Czech Academy of Science České Budějovice, May 15, 2001, ISBN 80-901-2506-9, p. 53–54.
- [80] Jeřábková P. *Využití metod obrazové analýzy při studiu hrubě disperzních soustav*. Brno 2003, 80 s. Diplomová práce na Chemické fakultě Vysokého učení technického v Brně. Vedoucí diplomové práce Doc. Ing. O. Zmeškal, CSc.
- [81] Betina, V.: *Mikrobiologické laboratorně metody*, Bratislava: Alfa, 1987.
- [82] Weyda, F.: *Digitální zobrazování v biologii a medicíně 2002*, *Sborník přednášek a abstraktů konference konané v Českých Budějovicích 13. května 2002*. České Budějovice: Entomologický ústav AV ČR, 2002. ISBN 80-901250-8-5.

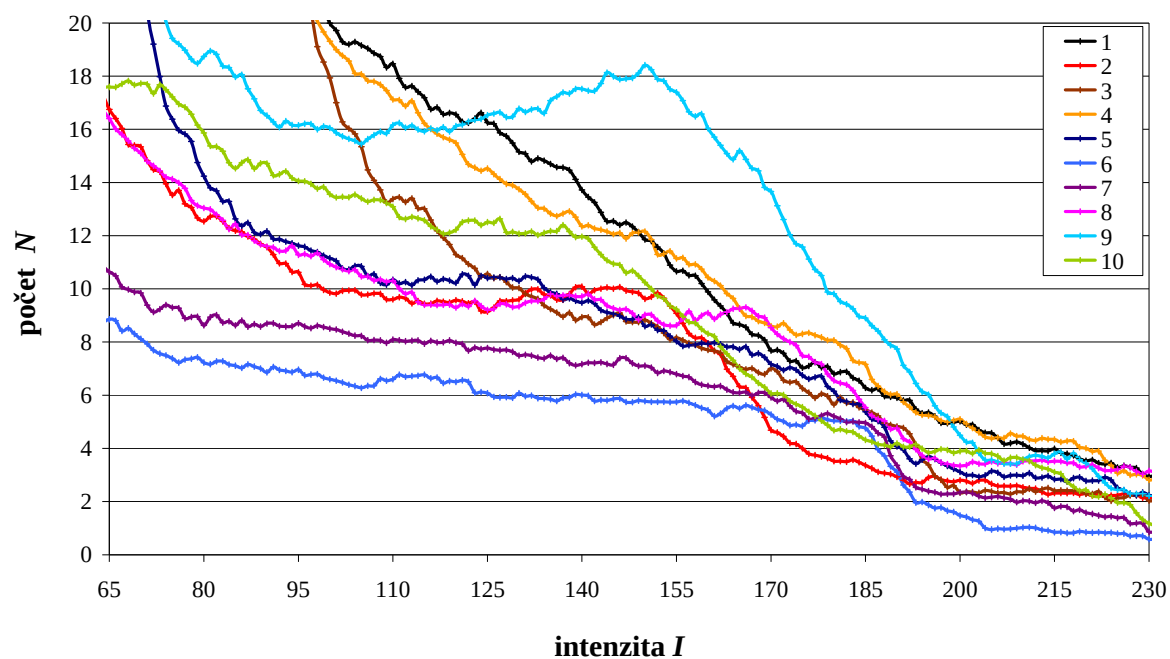
5 PŘÍLOHY

5.1 Příloha 1: Stanovení počtu buněk kvasinek – grafy

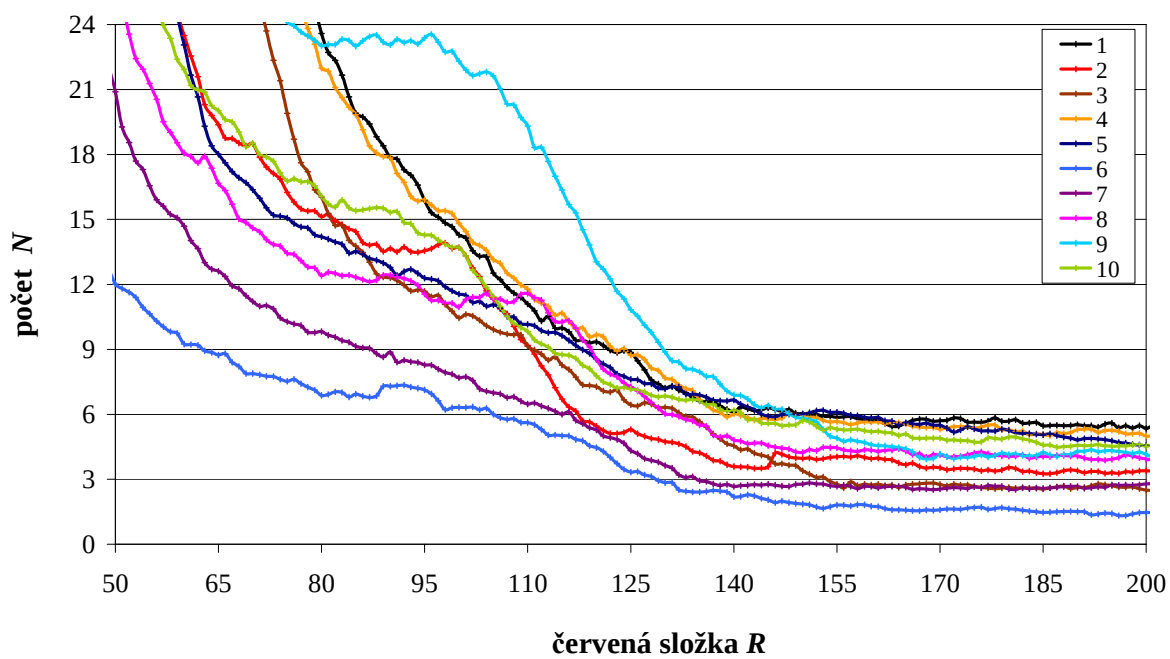
KVASINKY OBARVENÉ AKRIDINOVOU ORANŽÍ AO



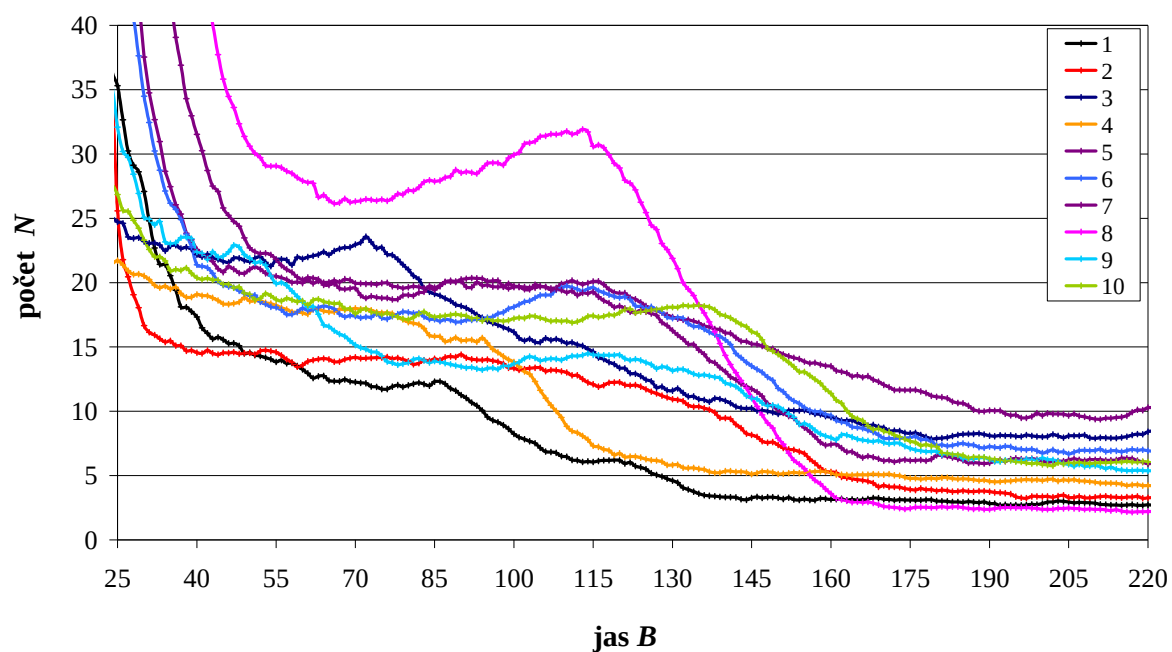
Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* FV1



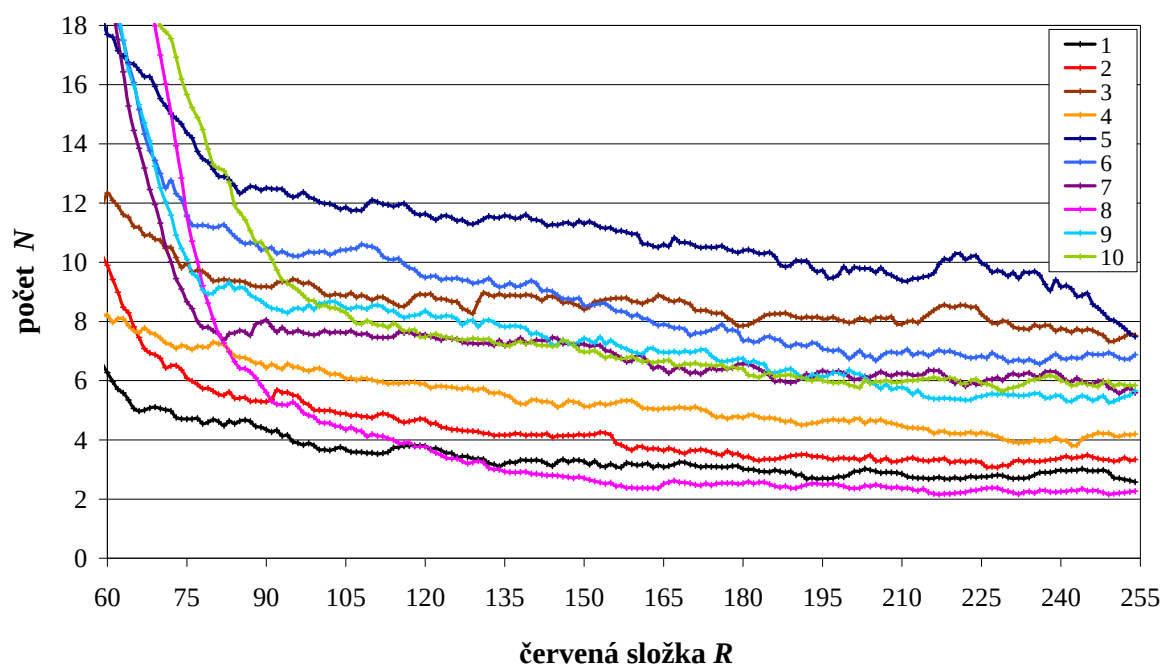
Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* FV1



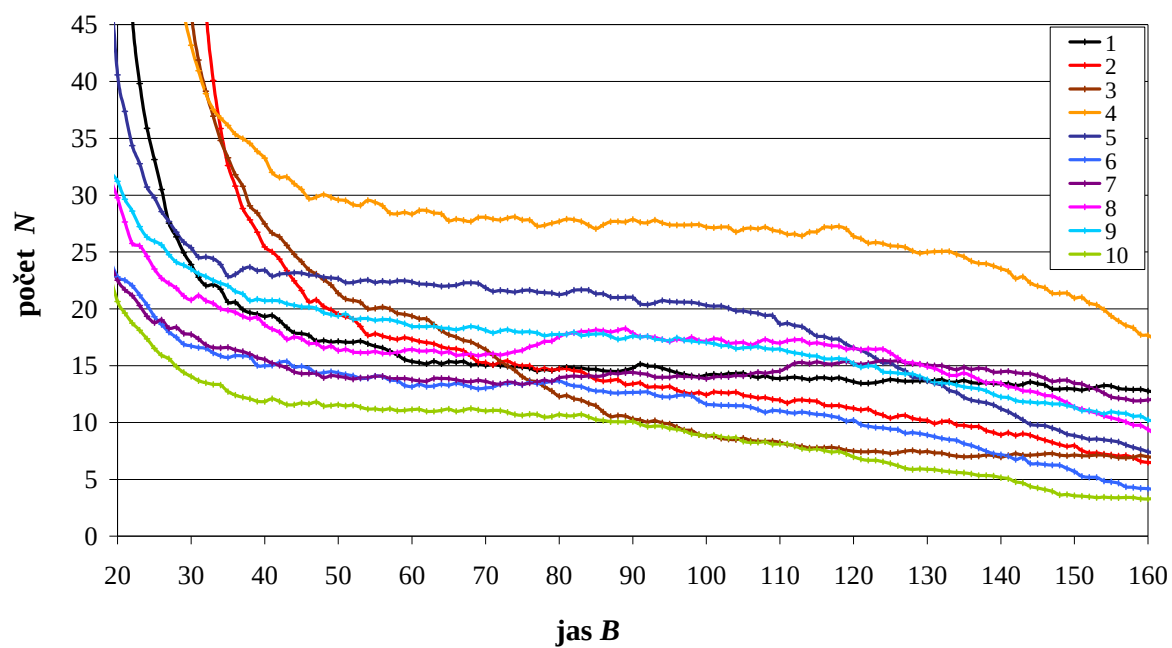
Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*



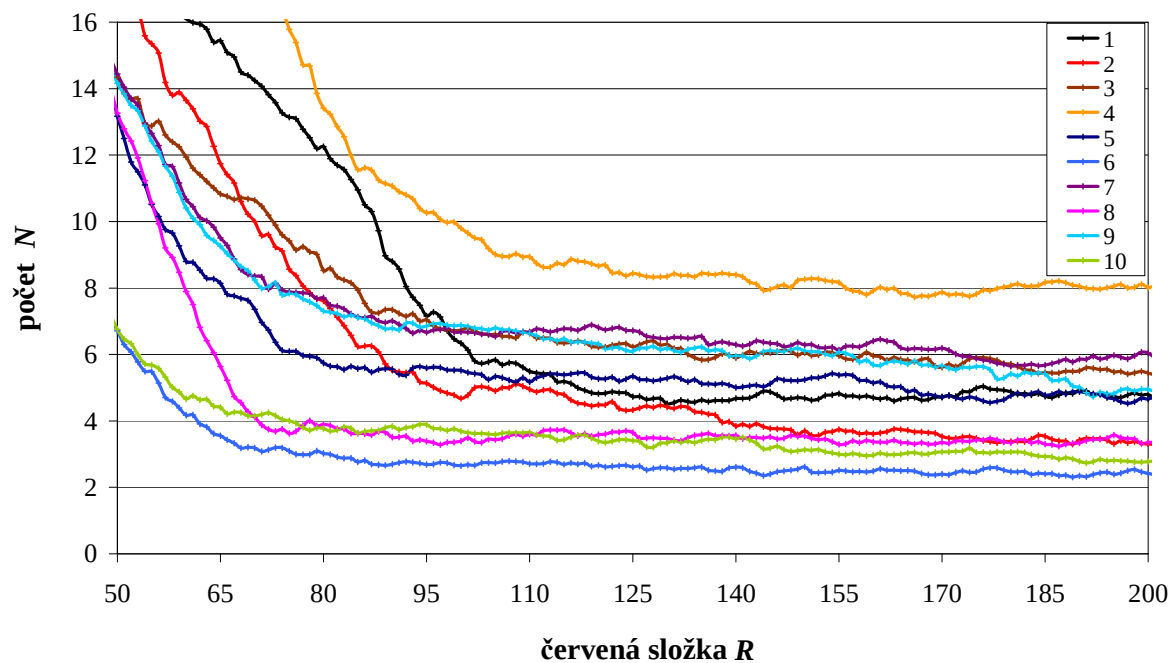
Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*



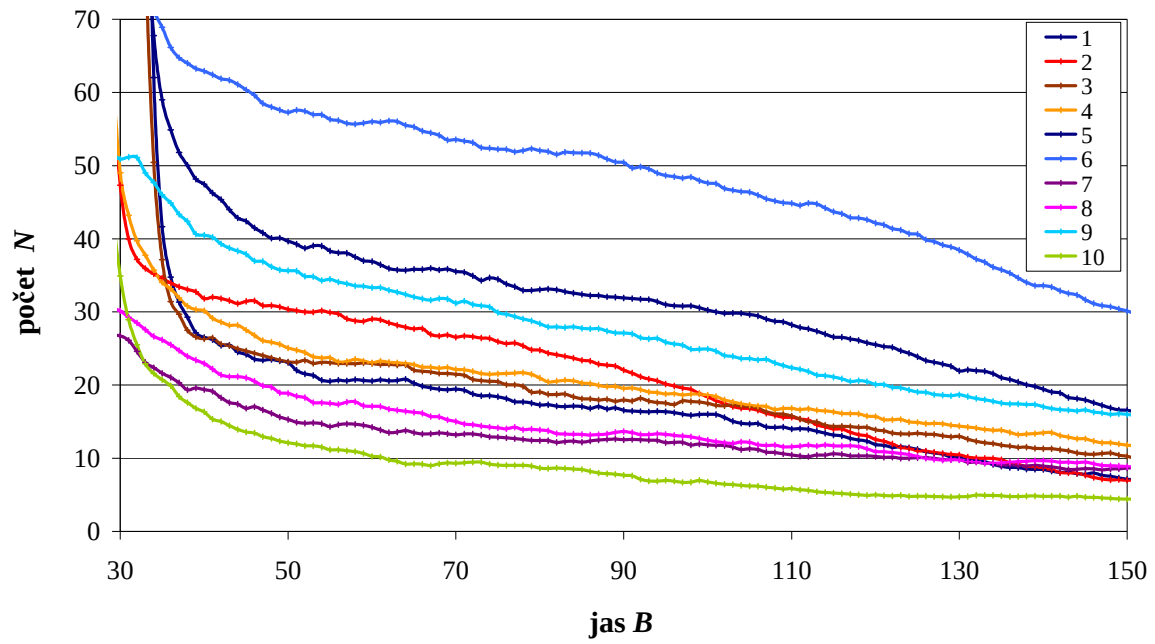
Kvasinka *Kloeckera apiculata*



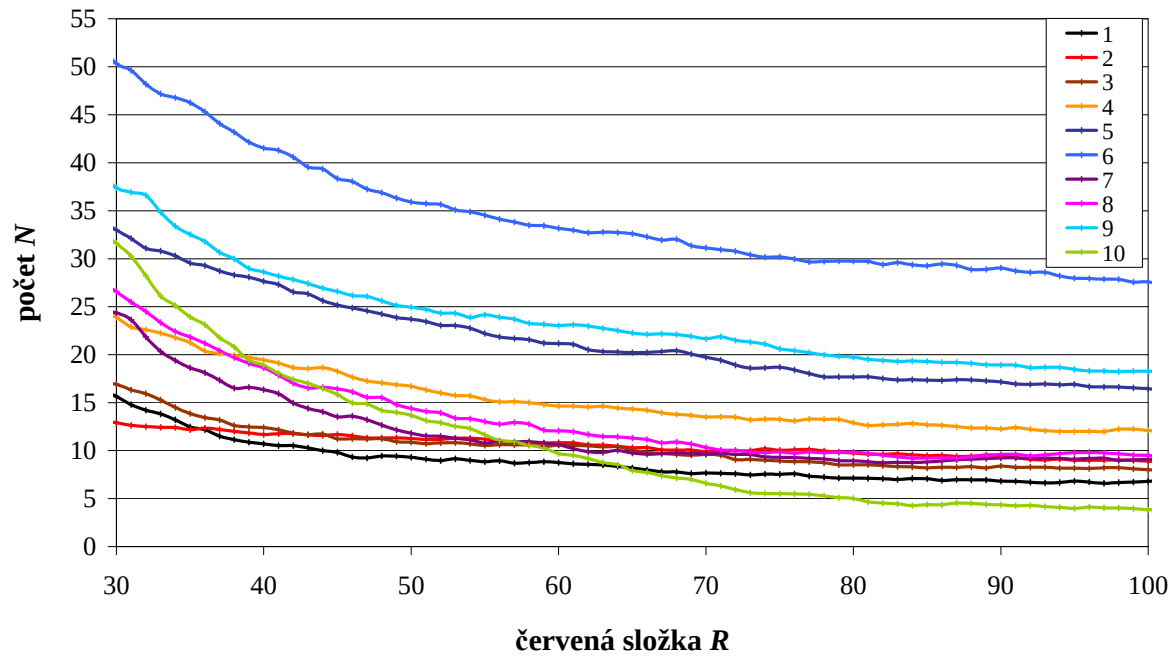
Kvasinka *Kloeckera apiculata*



Kvasinka *Hansenula anomala*

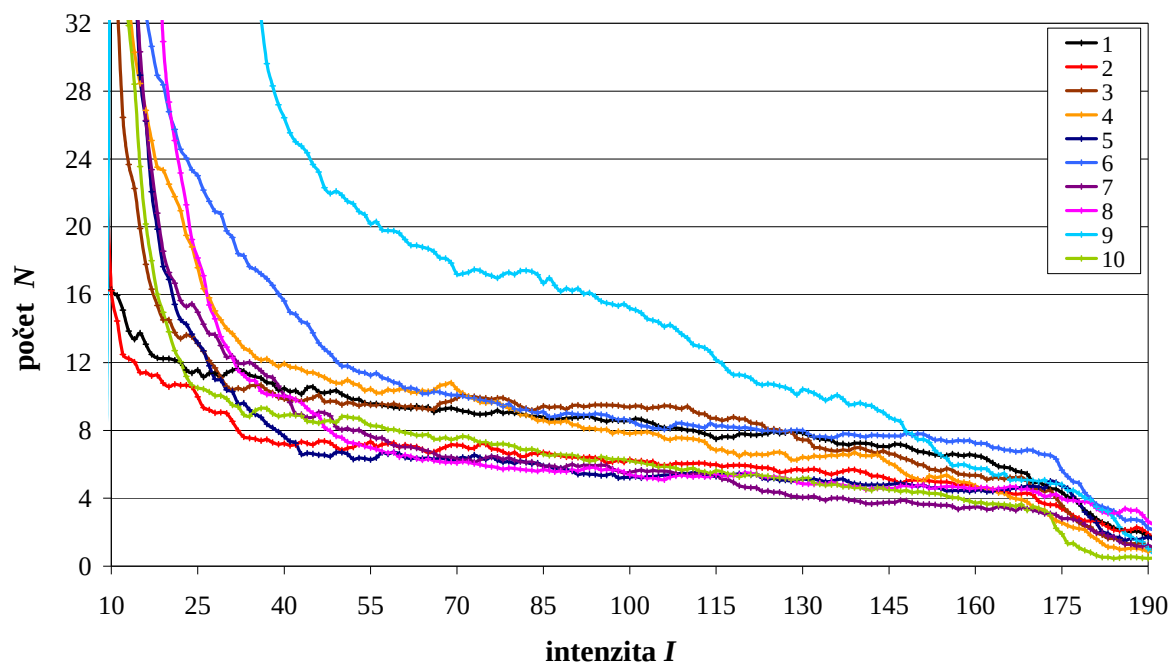


Kvasinka *Hansenula anomala*

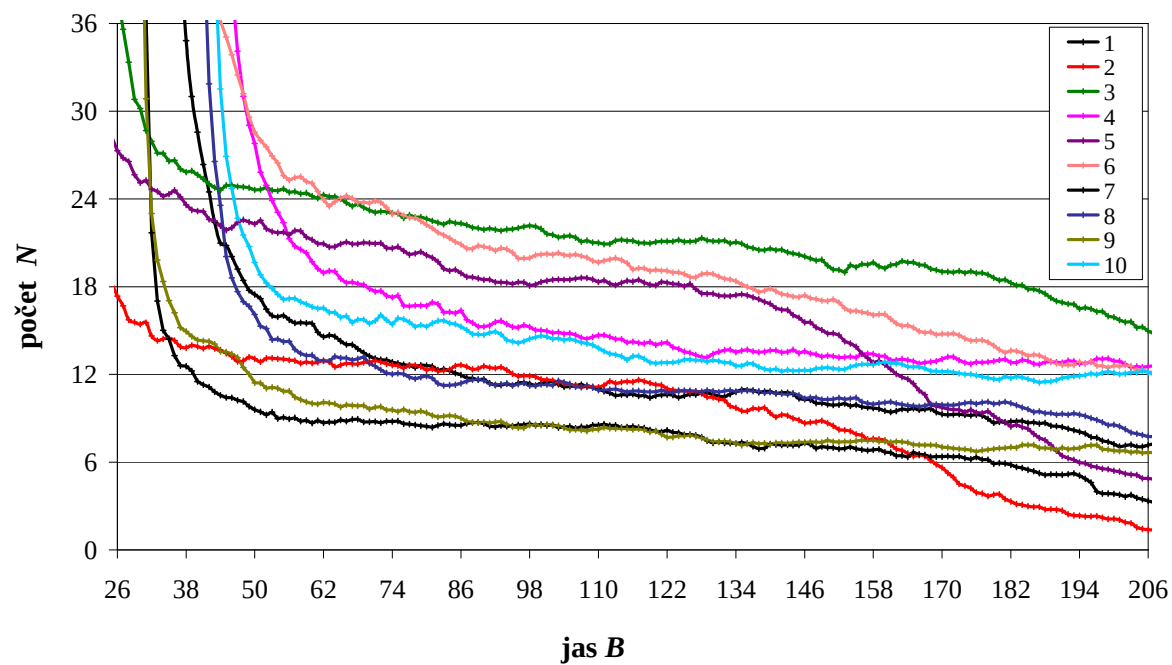


KVASINKY OBARVENÉ FLUORESCEIN DIACETÁTEM FDA

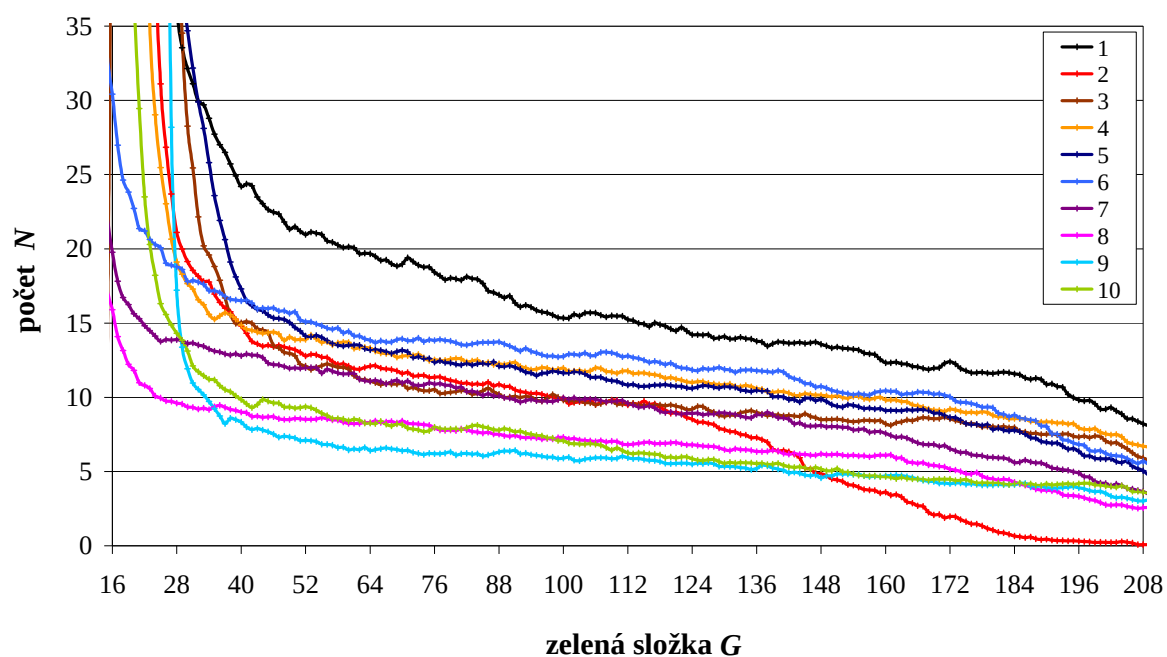
Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* FV1



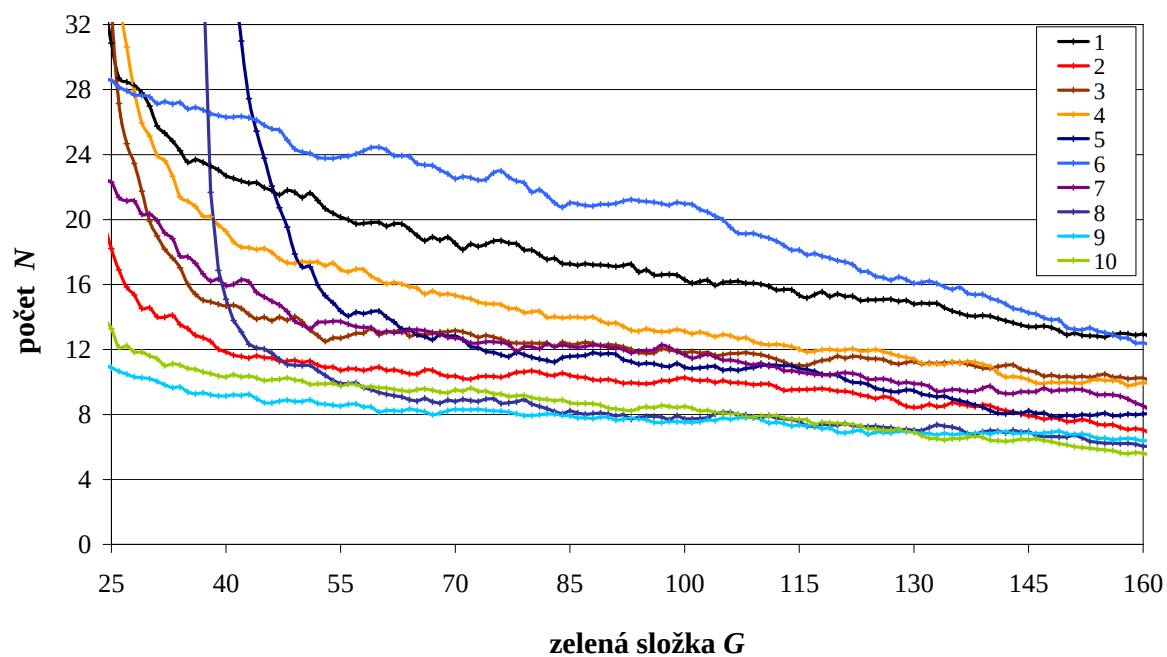
Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*



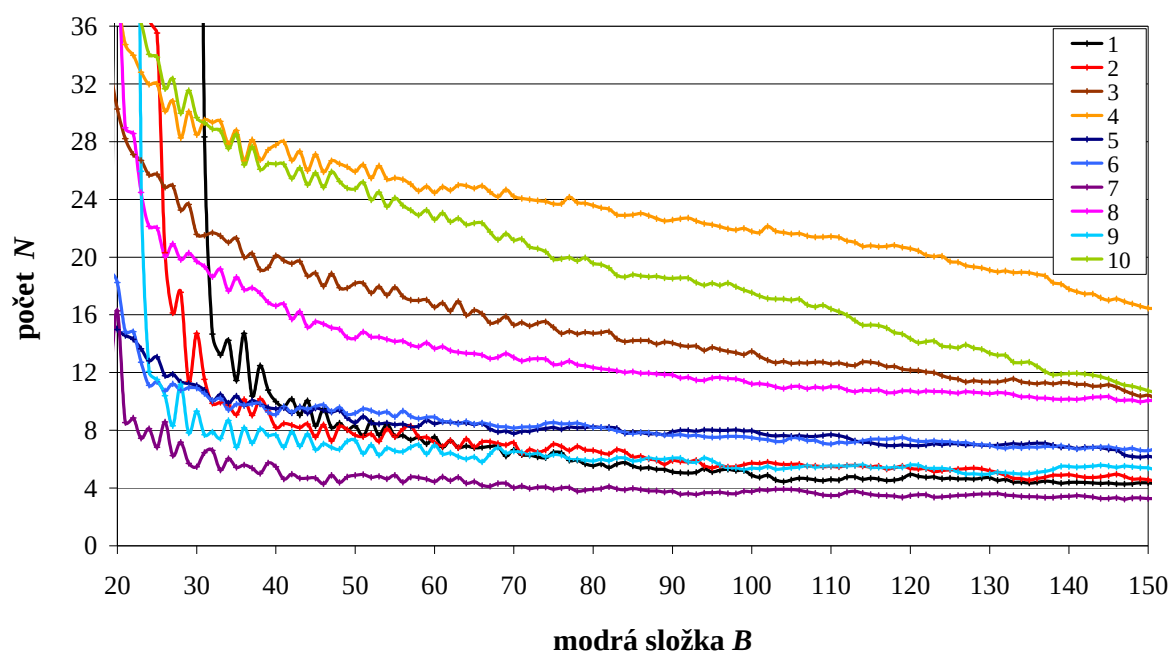
Kvasinka *Kloeckera apiculata*



Kvasinka *Hansenula anomala*



Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*

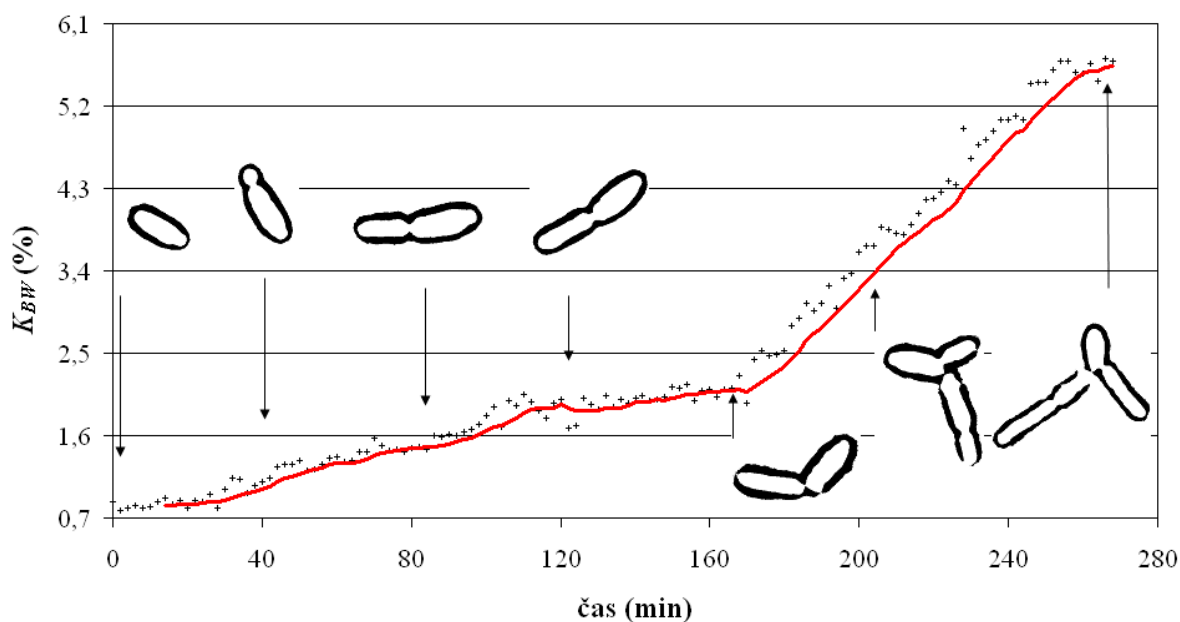


5.2 Příloha 2: Sledování rozmnožování kvasinek – grafy

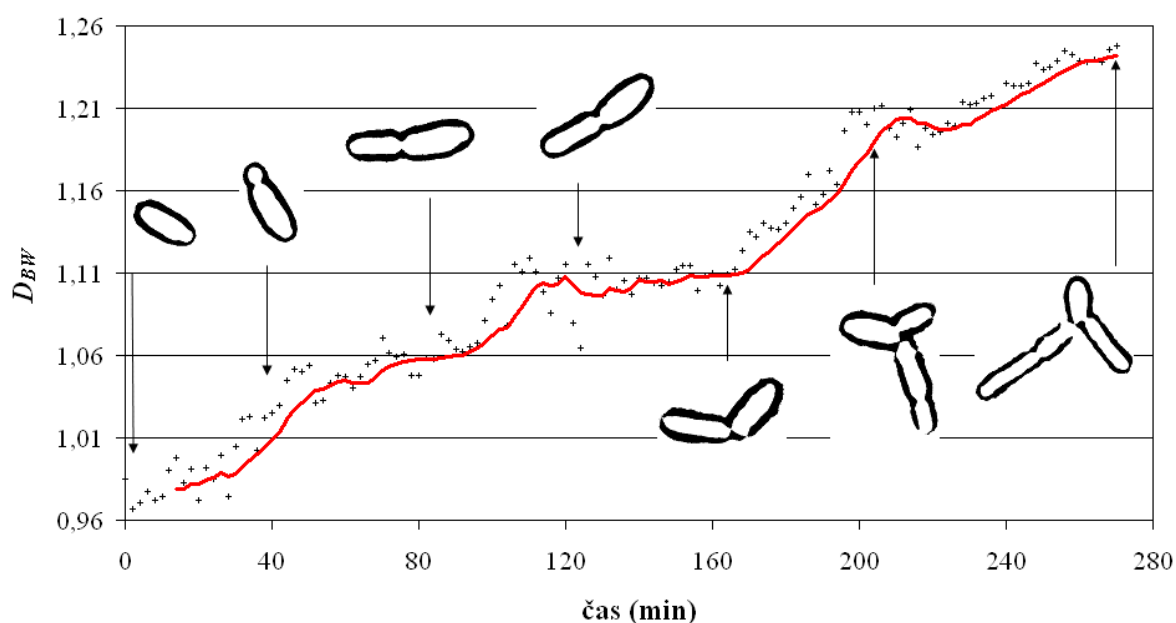
Vzorek č. 3

Popis experimentu: závěrka 1/43, clona *F* 4, prahování: 0–136, výřez 530 × 530, teplota 24 °C, živné médium č. 2, snímáno po 2 min., mateřská buňka začala pučet po 315 minutách po zaočkování do kapalného živného média, po 150 minutách začala pučet opět současně s dceřinou buňkou, tedy po 465 minutách po zaočkování.

Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky
Candida vini



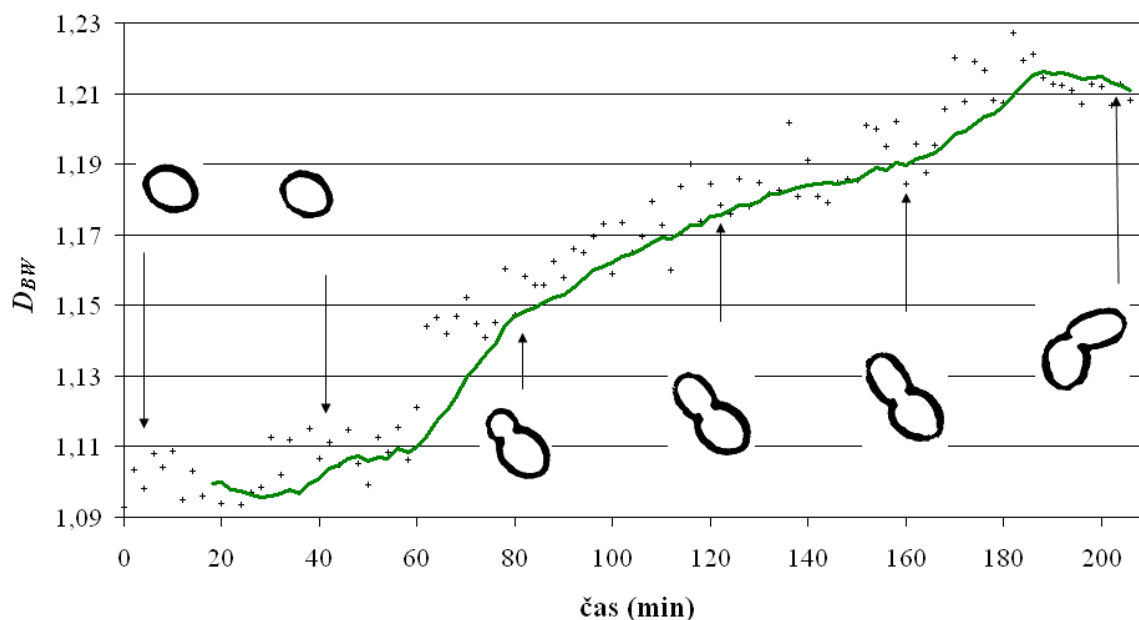
Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky
Candida vini



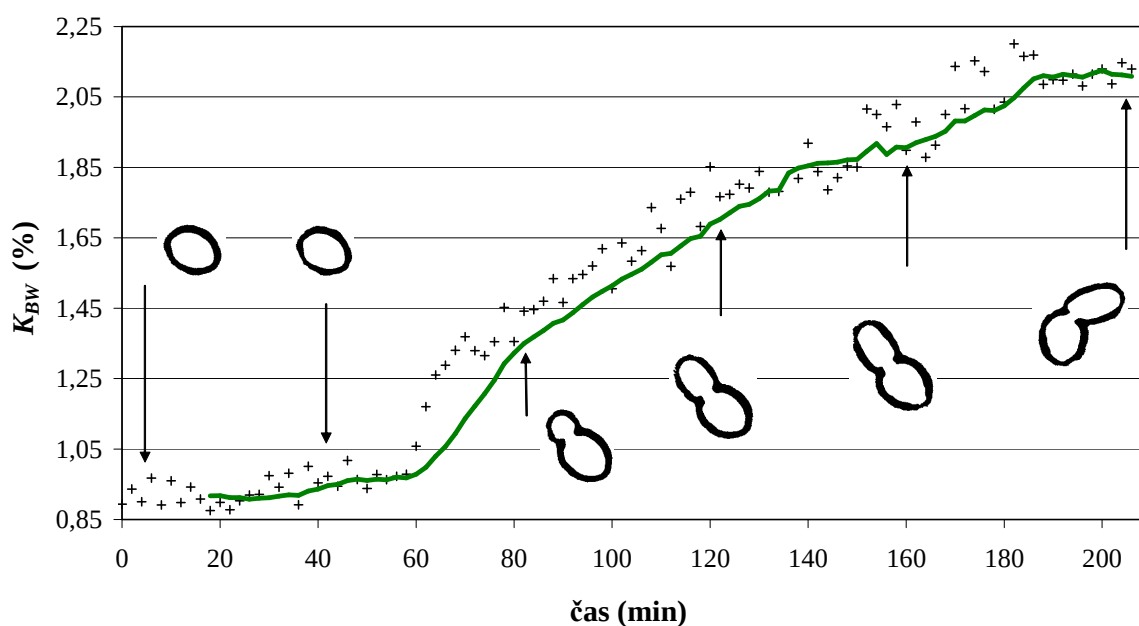
Vzorek č. 4

Popis experimentu: závěrka 1/39, clona *F* 4, prahování: 0–136, výřez 270×270 , teplota 24°C , živné médium č. 2, snímáno po 2 min., mateřská buňka začala pučet po 240 minutách po zaočkování do kapalného živného média.

Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky
Candida vini

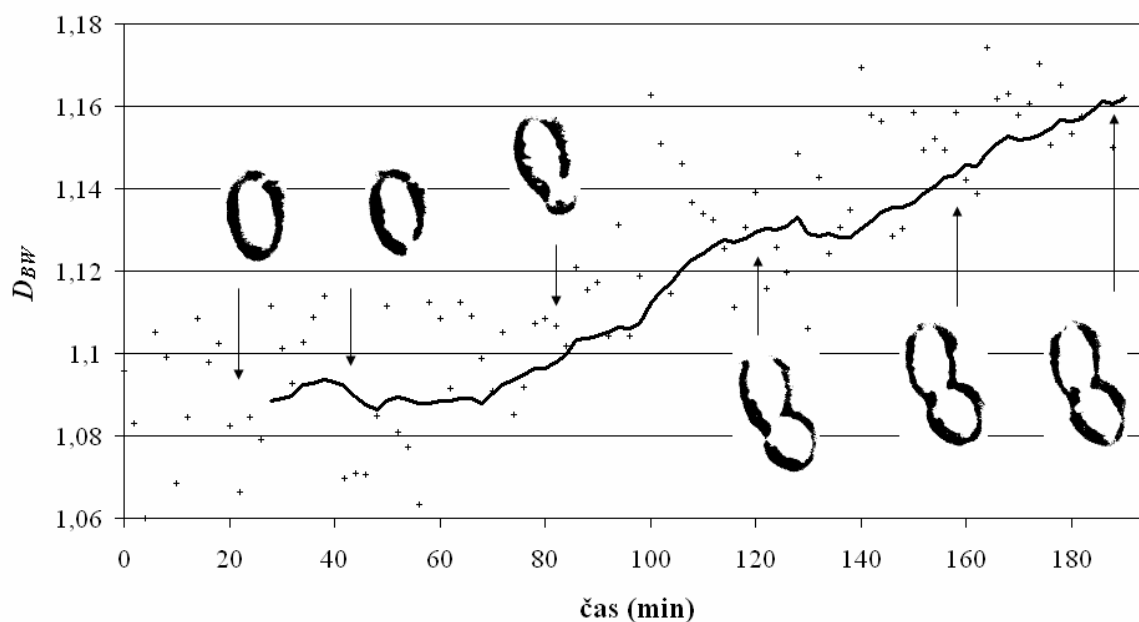


Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky
Candida vini

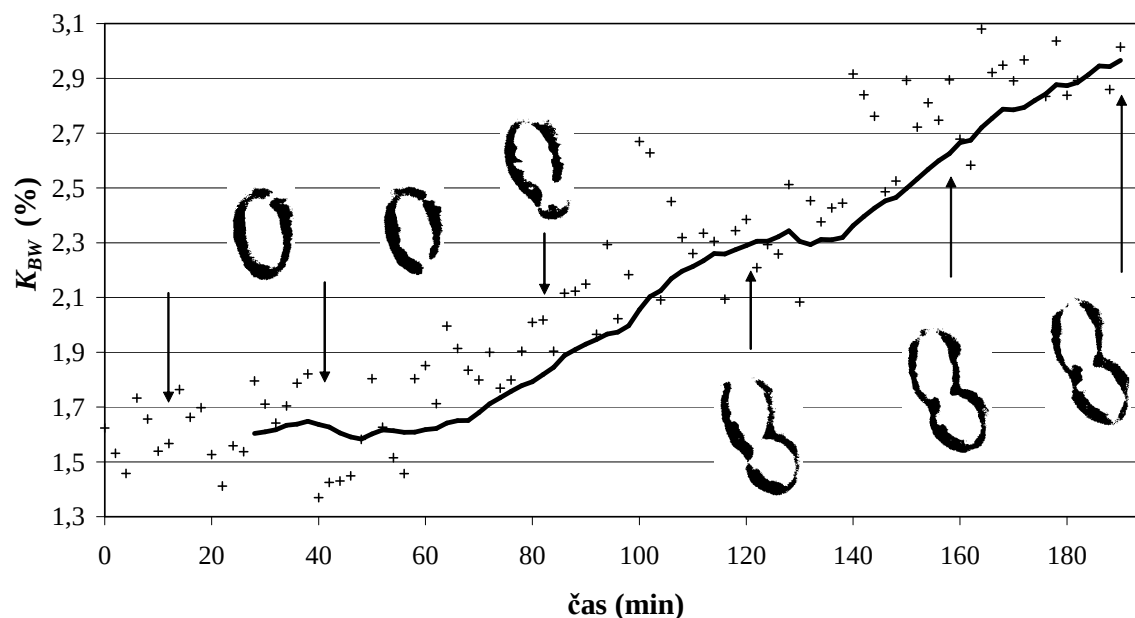


Popis experimentu: závěrka 1/1, clona *F 4*, prahování: 0–115, výřez 270×270 , teplota $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, živné médium č. 1, snímáno po 2 min., mateřská buňka začala pučet po 260 minutách po zaočkování do kapalného živného média.

Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky
Candida vini

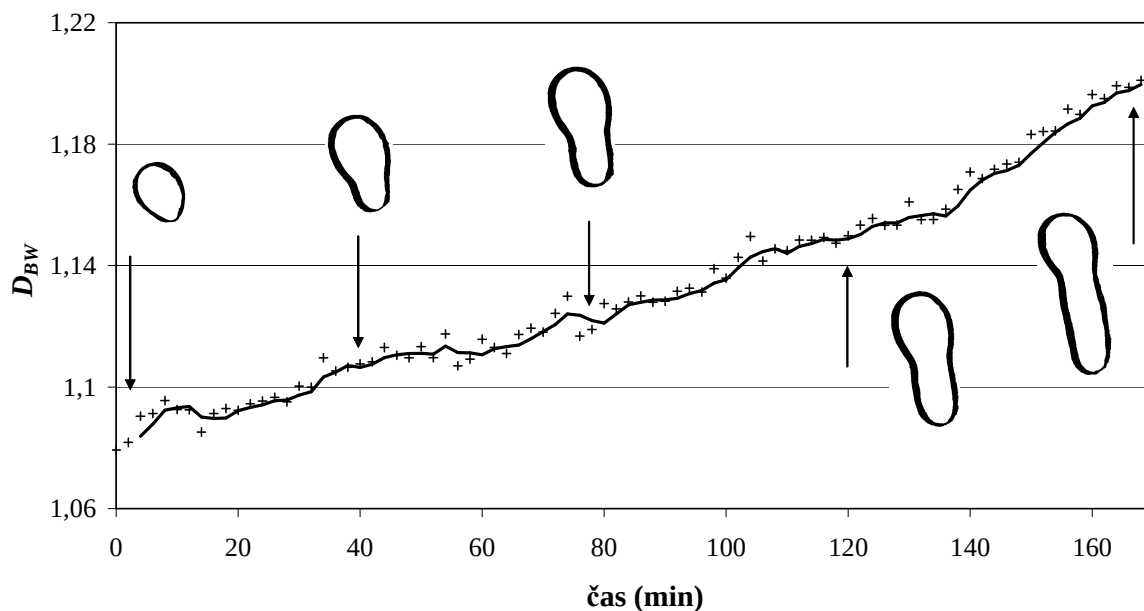


Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky
Candida vini

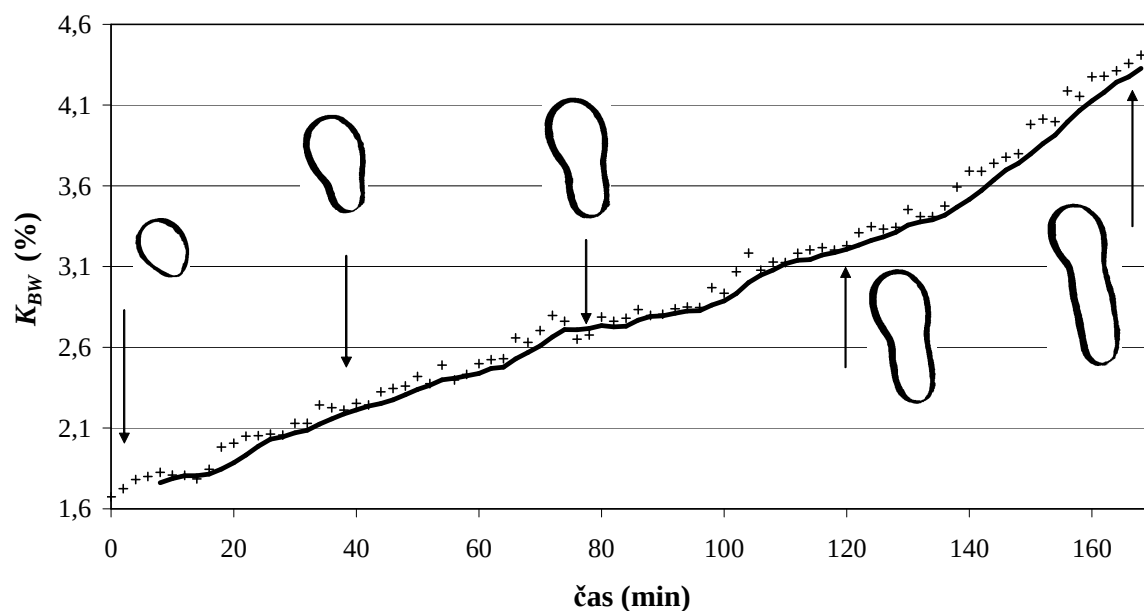


Popis experimentu: závěrka 1/44, clona *F* 4, prahování: 0–125, výřez 530 × 530, teplota 23 °C, živné médium č. 2, snímáno po 2 min., mateřská buňka začala pučet po 390 minutách po zaočkování do kapalného živného média.

Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky
Dipodascus magnusii

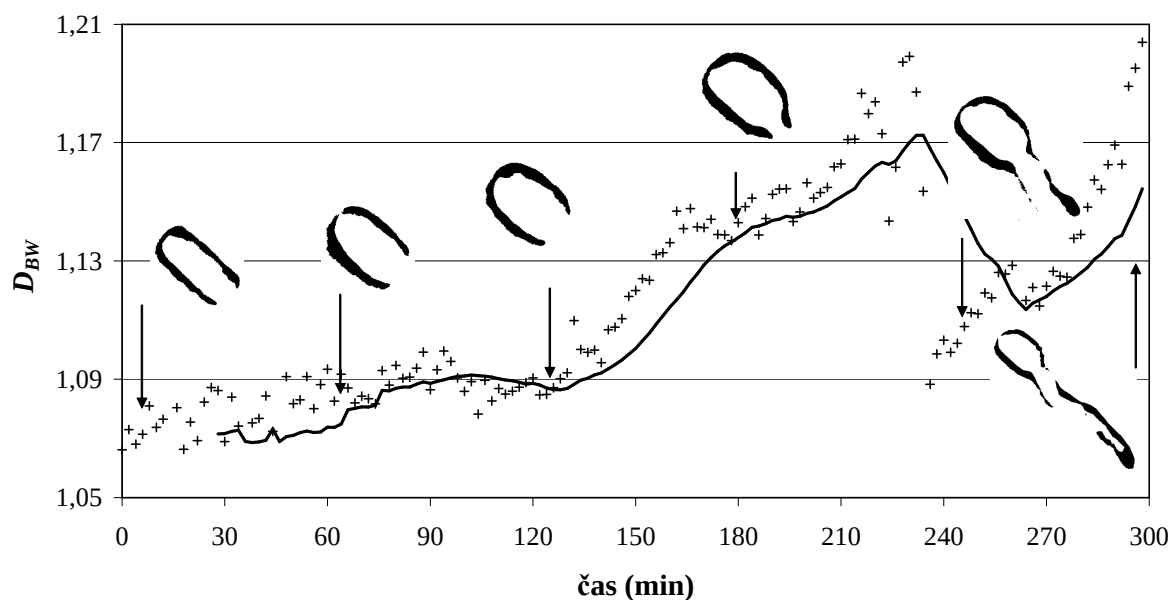


Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky
Dipodascus magnusii

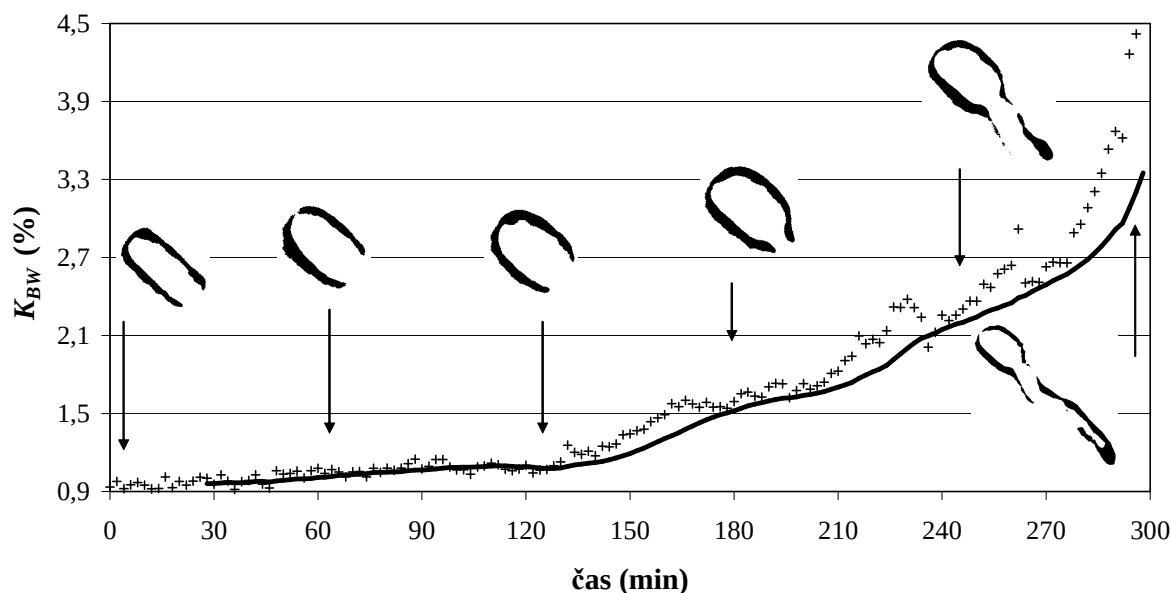


Popis experimentu: závěrka 1/42, clona *F* 4, prahování: 0–123, výřez 530 × 530, teplota 23 °C, živné médium č. 2, snímáno po 2 min., mateřská buňka začala pučet po 300 minutách po zaočkování do kapalného živného média.

Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky *Geotrichum candidum*

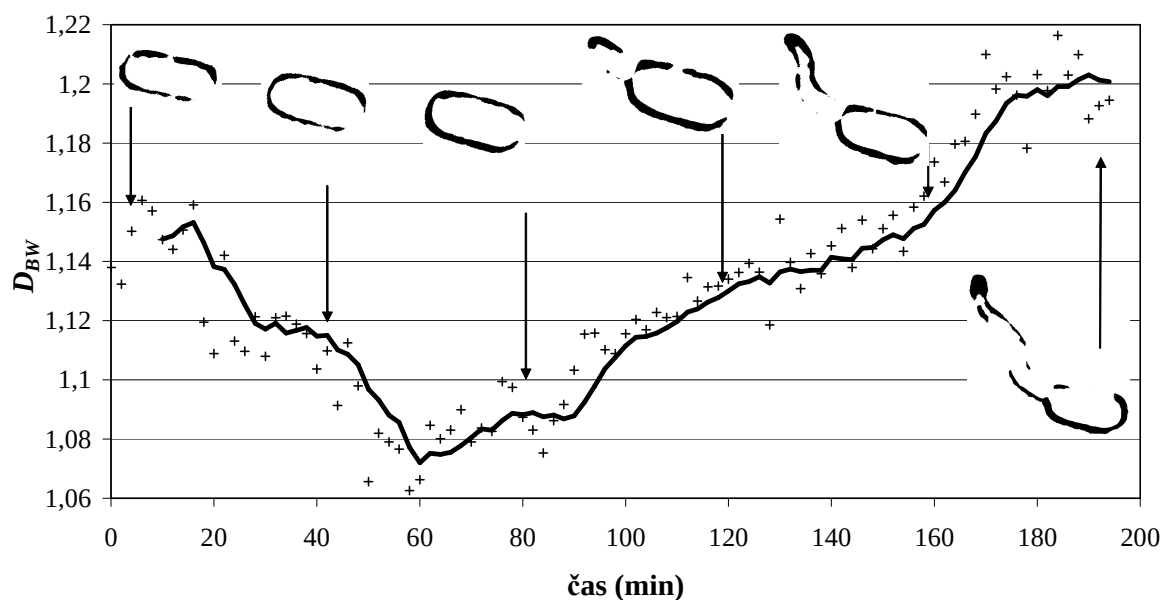


Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky *Geotrichum candidum*

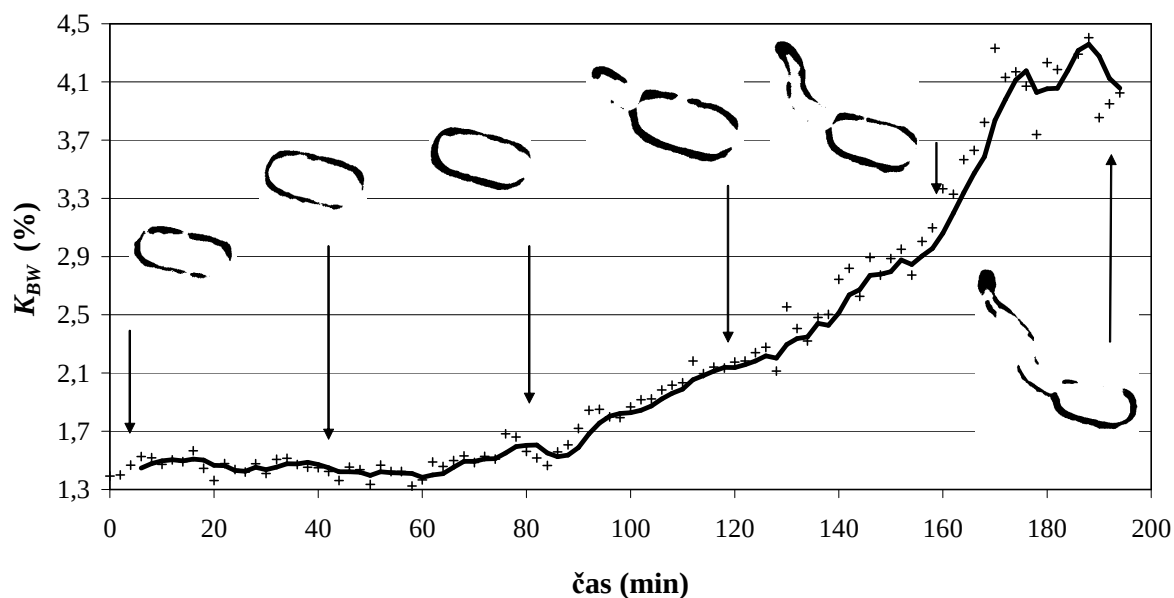


Popis experimentu: závěrka 1/42, clona *F* 4, prahování: 0–118, výřez 530 × 530, teplota 24 °C, živné médium č. 2, snímáno po 2 min., mateřská buňka začala pučet po 405 minutách po zaočkování do kapalného živného média.

Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky
Geotrichum candidum

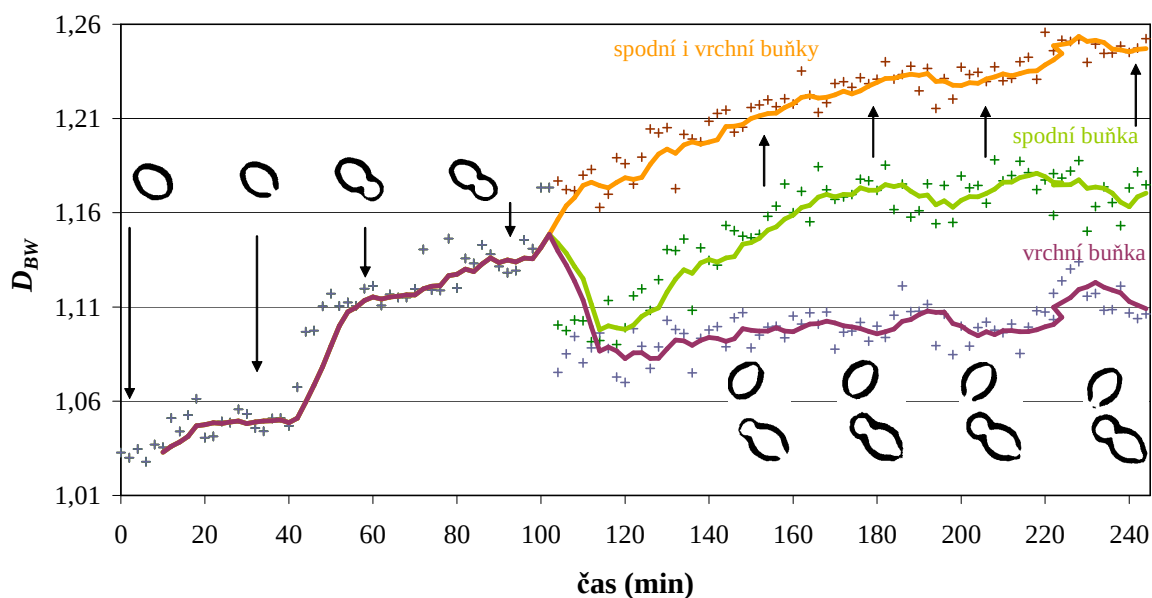


Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky
Geotrichum candidum

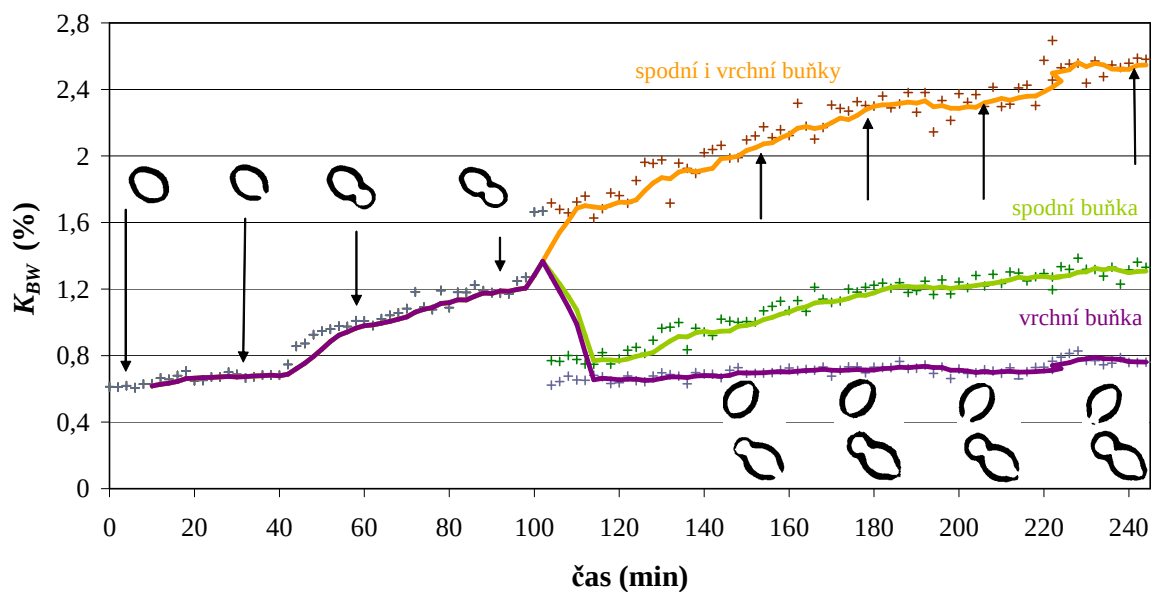


Popis experimentu: závěrka 1/38, clona *F* 4, prahování: 0–132, výřez 270 × 270, teplota 24 °C, živné médium č. 1, snímáno po 2 min., mateřská buňka začala pučet po 570 minutách po zaočkování do kapalného živného média. Za dalších 90 minut se buňky od sebe oddělily. Oddělení bylo způsobeno vytlačením původní buňky novým pupenem, který rostl na stejném místě.

Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky
Kloeckera apiculata



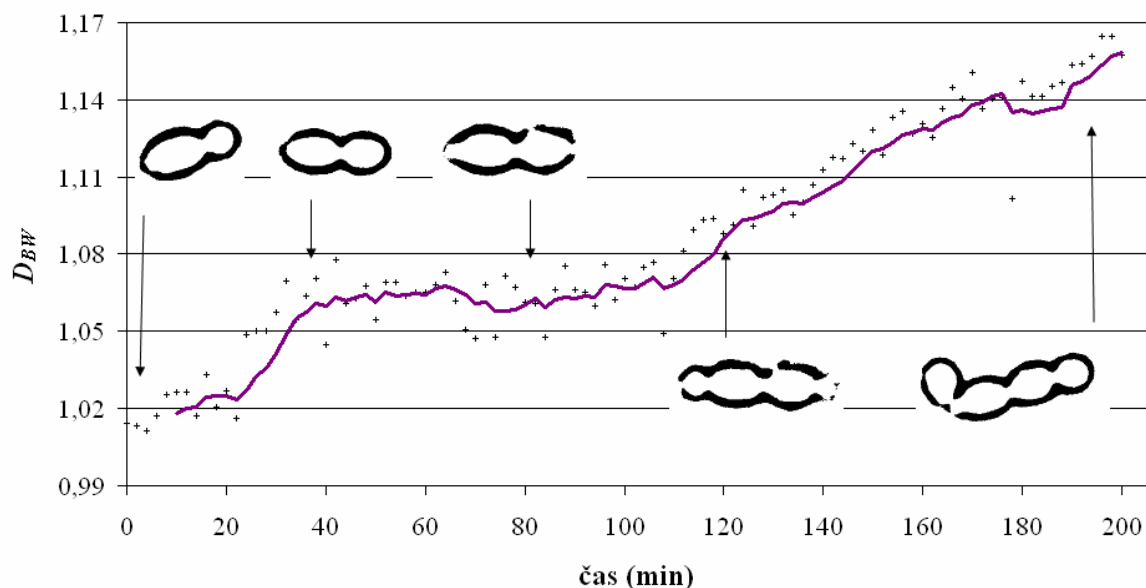
Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky
Kloeckera apiculata



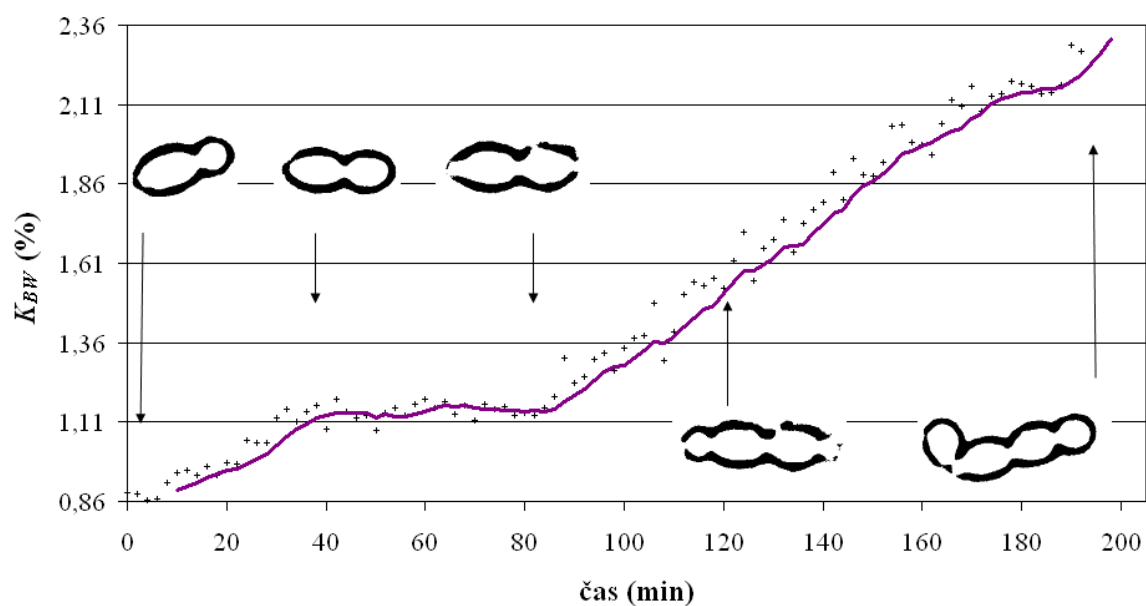
Vzorek č. 2

Popis experimentu: závěrka 1/39, clona F 4, prahování: 0–130, výřez 270×270 , teplota 24°C , živné médium č. 1, snímáno po 3 min., mateřské buňky začaly pučet po 240 minutách po zaočkování do kapalného živného média a dceřiné po 365 minutách.

Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky
Kloeckera apiculata



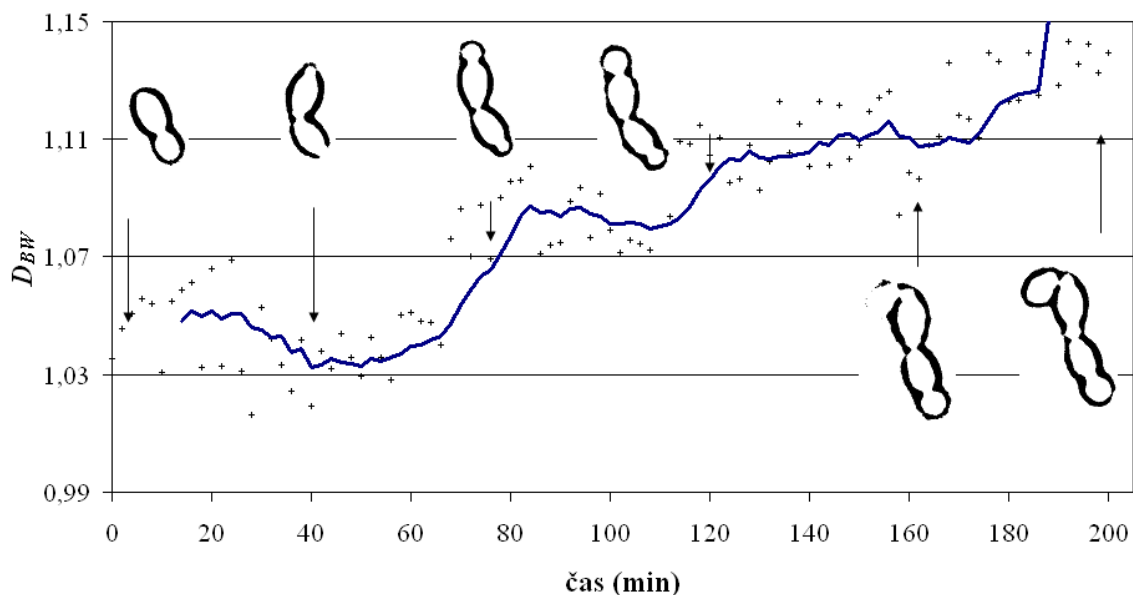
Závislost fraktální dimenze K_{BW} na změně struktury kvasinky
Kloeckera apiculata



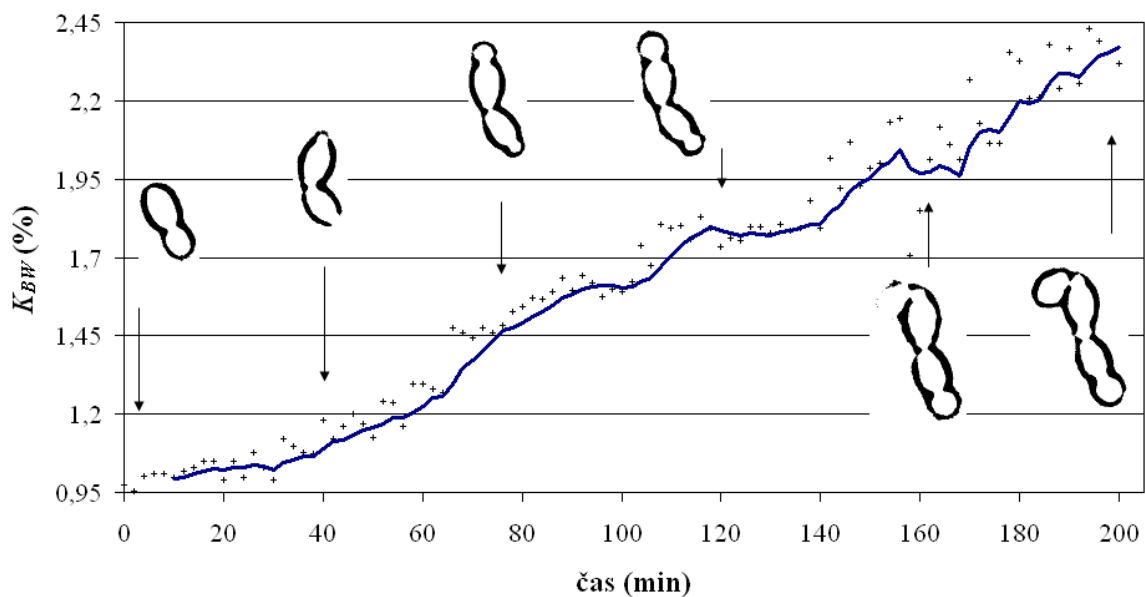
Vzorek č. 3

Popis experimentu: závěrka 1/39, clona *F* 4, prahování: 0–130, výřez 270 × 270, teplota 24 °C, živné médium č. 1, snímáno po 3 min., mateřské buňky začaly pučet po 240 minutách po zaočkování do kapalného živného média a dceřiné po 365 minutách.

Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky
Kloeckera apiculata



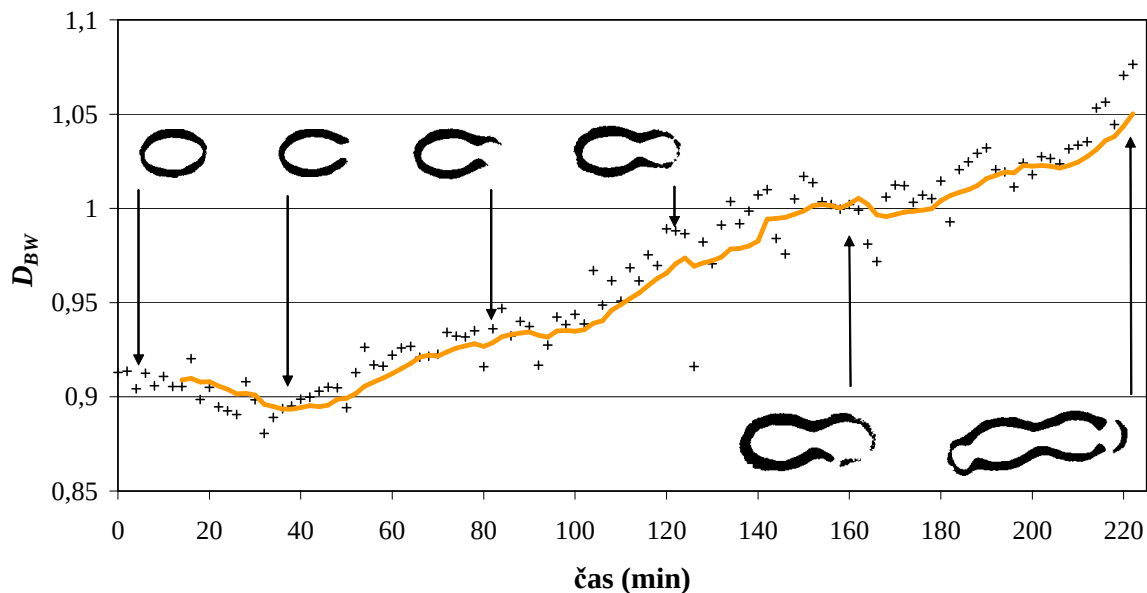
Závislost fraktální dimenze K_{BW} na změně struktury kvasinky
Kloeckera apiculata



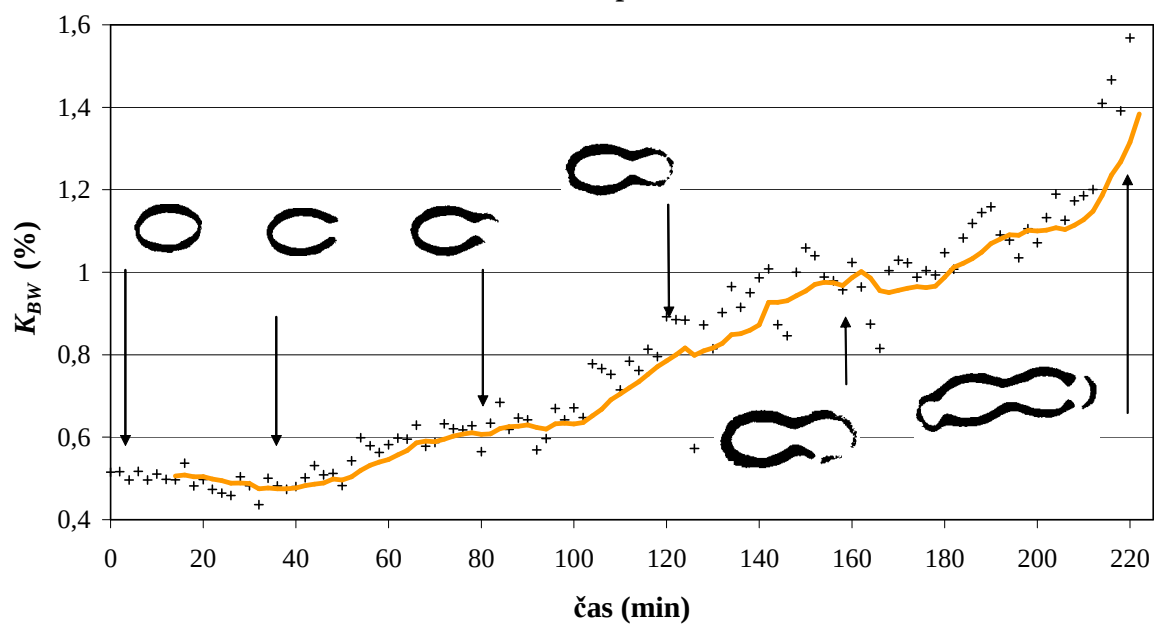
Vzorek č. 4

Popis experimentu: závěrka 1/43, clona *F* 4, prahování: 0–138, výřez 530×530 , teplota 25°C , živné médium č. 1, snímáno po 2 min., mateřská buňka začala pučet po 260 minutách po zaočkování do kapalného živného média a dceřině po 375 minutách.

Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky
Kloeckera apiculata

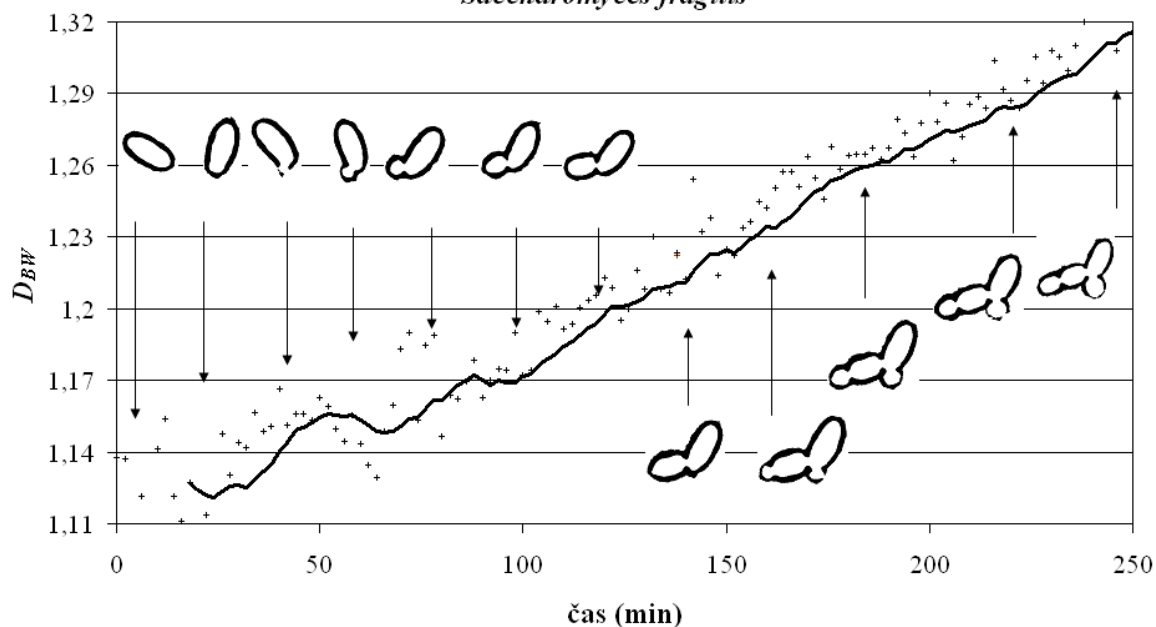


Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky
Kloeckera apiculata

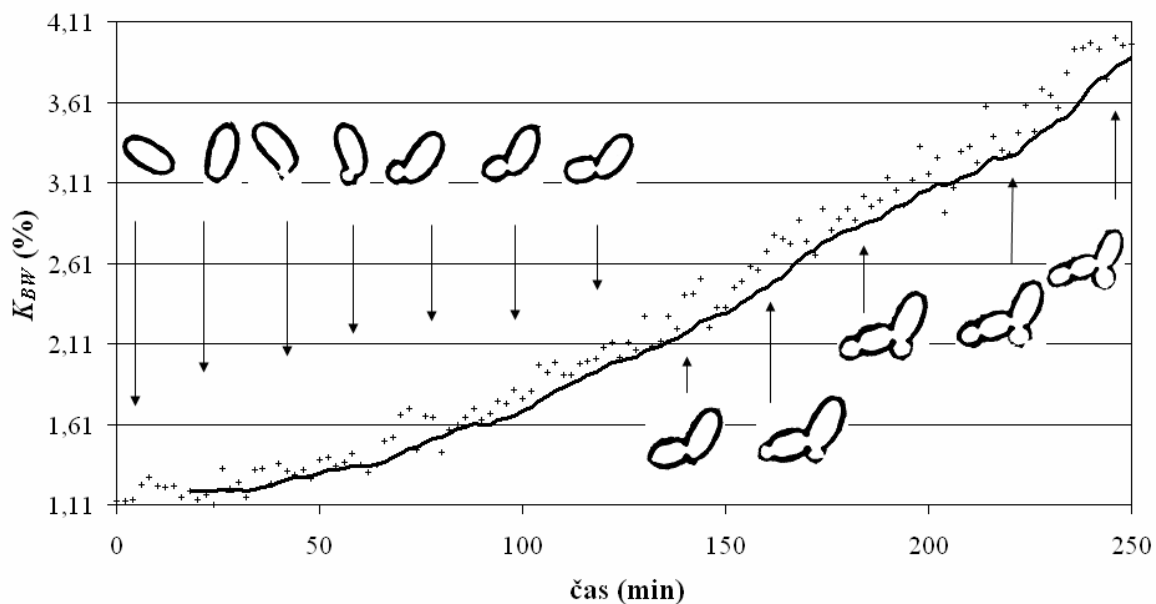


Popis experimentu: závěrka 1/12, clona *F* 4.4, prahování: 0–136, výřez 256×256 , teplota 24°C , živné médium č. 2, snímáno po 2 min., mateřská buňka začala pučet po 50 minutách po zaočkování do kapalného živného média a opět znovu s dceřinou po 190 minutách.

Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky
Saccharomyces fragilis



Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky
Saccharomyces fragilis



6 PŘEHLED PUBLIKACÍ A AKTIVIT

1. Jeřábková P., Tománková K., Zmeškal O., Veselá M. Studium vlastností kvasinek metodami obrazové analýzy. In *Chemické listy 8, sborník 56. sjezdu chemických společností, 6–9. září 2004, Ostrava, ročník 98*. Česká společnost chemická, 2004. s. 693. ISSN 0009-2770.
2. Jerabkova P., Zmeskal O., Vesela M.: Utilization of Image Analysis in Study of Fluorescence Labeled Microorganisms. In *MAF 9; 9th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes*. Lisbon – Portugal, 4–7 September, 2005. Lisbon: Sociedade Portuguesa de Química, 2005, p. 142. ISBN 972-99080-7-9.
3. Jeřábková P., Zmeškal O., Veselá M.: Application of Image Analysis Methods in Yeast Cell Study. In *3rd Meeting on Chemistry & Life, Chemické Listy*, vol. 99 (S), no. Symposia. Praha: Česká společnost chemická a VŠCHT Praha, 20–22. září 2005. p. 292. ISSN 0009-2770.
4. Jeřábková P. Determination of Yeast Viability by means of Fluorescence Microscopy and Image Analysis. *Sborník příspěvků soutěže Studentské tvůrčí činnosti „Student 2006“ a doktorské soutěže „O cenu děkana 2005 a 2006“* [CD-ROM]. FCH VUT v Brně, 2006. ISBN 80-214-3321-3.
5. Jeřábková, P., Zmeškal, O., Haderka, J.: Fractal Analysis of the Images Using Wavelet Transformation. *Fractal 2006; Complexus Mundi; Emergent Patterns in Nature*. London: World Scientific, 2006, pp. 305–312. ISBN 981-256-666-X.
6. Tomankova, T., Jerabkova, P., Zmeskal, O., Vesela, M., Haderka, J.: Use of Image Analysis to Study Growth and Division of Trast Cells. *The Journal of Imaging Science and Technology*, November/December 2006, vol. 50, no. 6, pp. 583–589.
7. Jeřábková P., Zmeškal O., Veselá M. Stanovení počtu buněk pomocí fraktální analýzy. In *Chemické listy 8, sborník 58. sjezdu chemických společností, 4–8. září 2006, Ústí nad Labem, ročník 100*. Česká společnost chemická, 2006. s. 726–727. ISSN 0009-2770.
8. Jeřábková P., Zmeškal O., Veselá M., Haderka J.: Využití waveletové transformace v mikrobiologii. *Digitální zobrazování v biologii a medicíně 2005*. České Budějovice: Entomologický ústav AV ČR, 2006, s. 30. ISBN 80-86668-03-7.
9. Vala, M.; Krčmová, M.; Weiter, M.; Stará, Z.; Jeřábková, P., Toman, P. Optical characterization and fluorescence quantum yields measurement of novel 1,4 - dioxo-3,6-diphenylpyrrolo-[3,4/C]-pyrrole derivatives. In *sborník příspěvků VII. pracovního setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. s. 125-126. ISBN: 978-80-210-4235-3.
10. Vala, M.; Weiter, M.; Krcmova, M.; Jeřábkova, P.; Vynuchal, J.; Toman, P. Novel diphenylpyrrolopyrroles for electroluminescence applications. In *MAF 10; 10th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes*. Salzburg, Austria, 9–12 September, 2007.

Grant FRVŠ 2901/2005/G4, řešitel: Studium vlastností mikroorganismů metodami obrazové analýzy.

7 ŽIVOTOPIS

Ing. Petra Jeřábková

Osobní údaje

Datum narození: 11. 2. 1979

Adresa trvalého bydliště: Brno

e-mail: p.jerabkova@seznam.cz

svobodná, 1dítě

Zaměstnání

- 2009 – dosud Slovenská akadémia vied Bratislava, Ústav anorganickej chemie
Pozice: **výzkumný pracovník**
(studium fázových přechodů fluoridových taveninových soustav)
- 2006 – 2007 Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Ústav fyzikální a spotřební chemie
Pozice: **technický pracovník pro optická měření**
(fluorescenční, UV-VIS spektroskopie, techniky optické mikroskopie)

Vzdělání

- 2008 Rašínova vysoká škola s.r.o.
vzdělávací program: Odborný pracovník personálního a ekonomického útvaru
ukončení studia: **Osvědčení**
- 2003 – dosud Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně
postgraduální studium, obor **Fyzikální chemie**
téma disertační práce:
Studium vlastností biologického materiálu pomocí metod obrazové analýzy
školitel: prof. Ing. Oldřich Zmeškal, CSc.
(fraktální, vlnková analýza),
ukončení studia: **Státní doktorská zkouška**
- 1998 – 2003 Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně
magisterské studium, obor **Fyzikální chemie**
téma diplomové práce:
Využití metod obrazové analýzy při studiu hrubě disperzních soustav
ukončení studia: **Státní závěrečná zkouška**, titul **Ing.**
- 1997 – 1998 Fakulta přírodovědecká, Masarykova univerzita v Brně
magisterské studium, obor **Odborná chemie**
- 1993 – 1997 Střeni průmyslová škola textilní v Brně
obor: Zušlechťování textilií
ukončení studia: **maturitní zkouška**