

**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ**

Autoreferát dizertační práce
v oboru

FYZIKÁLNÍ CHEMIE

**Studium vlastností biologického materiálu pomocí metod
obrazové analýzy**

BRNO 2010

Ing. Petra Jeřábková

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.

OBSAH

1	ÚVOD	2
1.1	Kvasinky.....	2
1.2	Obrazová analýza s využitím integrálních transformací	3
1.2.1	Vlnkové transformace	4
1.2.2	Diskrétní vlnkové transformace	4
1.2.3	Haarova transformace.....	4
1.3	Fraktální analýza	5
1.3.1	Fraktální analýza s využitím vlnkové transformace.....	9
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	11
2.1	Stanovení počtu a poloměru buněk kvasinek	11
2.1.1	Měřicí aparatura	11
2.1.2	Příprava preparátu a popis experimentu	12
2.1.3	Metoda maximální hodnoty počtu ve výsledcích.....	12
2.1.4	Metoda prahové distribuce ve výsledcích	14
2.1.5	Závěr.....	21
2.2	Sledování rozmnožování kvasinek	22
2.2.1	Měřicí aparatura	22
2.2.2	Příprava preparátu a popis experimentu	22
2.2.3	Výsledky a diskuze.....	23
2.2.4	Závěr.....	27
3	LITERATURA	29
4	PŘEHLED PUBLIKACÍ A AKTIVIT.....	30
5	ŽIVOTOPIS.....	31

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. 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. 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.

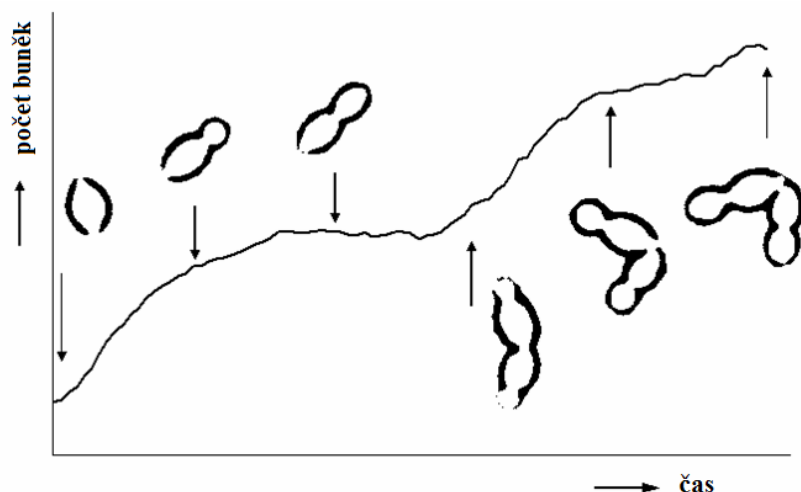
Mezi metody obrazové analýzy patří také fraktální analýza, kterou lze nejběžněji realizovat metodou box counting (metodou počítání čtverců). Výpočty fraktálních parametrů lze optimalizovat využitím periodických a vlnkových transformací. Studium fraktálních objektů je poměrně mladou disciplínou, jejíž 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.

1.1 Kvasinky

Kvasinky jsou *heterotrofní eukaryotní mikroorganizmy*, náležící mezi houby (*Fungi*). 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 [1]. Za základní tvar buněk se považuje rotační elipsoid.

Růstem buněk kvasinek se rozumí zvětšování obsahu buňky (objemu, velikosti); růstem kultury se rozumí zvětšování počtu buněk, tedy celkové zvětšování živé hmoty kvasinek (biomasy). Pro většinu kvasinek je charakteristické vegetativní rozmnožování. Vegetativně se mohou kvasinky rozmnožovat *příčným dělením* nebo *pučením*. U většiny rodů kvasinek však převládá pučení. Buněčný cyklus kvasinek je charakteristický všemi fázemi buněčného cyklu eukaryotní buňky.

Grafickým vyjádřením průběhu růstu kultury mikroorganismů začínajíc od zaočkování je *růstová křivka*. Získává se vynesemím logaritmu celkového počtu buněk (nebo počtu živých buněk) v jednotce objemu (tedy koncentrace buněk) na osu y a na osu x čas v hodinách. Při pozorování kontinuálních procesů jako je rozmnožování mikroorganismů lze využít také fraktální analýzu obrazu (obr. 1). Je možné sledovat změnu fraktální dimenze nebo míry v čase pro zvolenou buňku.



Obr. 1 Růstová křivka buňky *Kloeckera apiculata* získaná pomocí fraktální analýzy obrazů této buňky

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 [2]. 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.

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. Ke zjišťování počtu buněk lze také využít fraktální analýzu obrazu.

Nepřímou lze počet buněk mikroorganismů stanovit nejčastěji pomocí kultivace, kdy předpokládáme, že z jedné životaschopné buňky vyroste jedna kolonie.

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.

1.2 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 zvyrazňují určité vlastnosti (definované bázi) 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.

1.2.1 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 – mateřské vlnky. Tyto transformace se objevily až roku 1980 v práci A. Grossmanna a J. Morleta jako alternativa ke klasickým typům transformací [3]. Princip vyjádření složitějšího signálu jako lineární kombinace jednodušších bazových 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 analýzu 1D signálů [4]. 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 [5].

1.2.2 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 $a = 2^j$, $b = a k = 2^j k$ pro j, k celé číslo, $j \geq 1$. Pak bazovou funkci, což je konkrétní vlnka lze vyjádřit jako

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

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 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 ortonormalitě pak takto zvolená vlnka umožňuje neredundantní dekompozici signálu, tzv. analýzu s mnoha rozlišeními neboli víceúrovňovou analýzu (*multiresolution analysis* – MRA; *decomposition*).

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 [4].

$$S_{DWT}(j, k) = \sum_{n=0}^{N-1} s_n(t) \psi_{j,k}(t), \quad (2)$$

kde $s_n = s(nT)$ jsou vzorky signálu, $\left(1/\sqrt{2^j}\right)\psi(t/2^j - 2^j k)$ 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 $N/2^{j+1}$.

1.2.3 Haarova transformace

Haarova transformace je nejjednodušší dyadická diskrétní 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) báze 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.

Báze funkce vlnky jsou [6]:

$$\psi_{j,k}(t) = \frac{1}{\sqrt{2^j}} \psi\left(\frac{t}{2^j} - 2^j k\right), \quad (3)$$

kde

$$\psi(t) = \begin{cases} 1 & 0 \leq t < 1/2 \\ -1 & \text{pro } 1/2 < t < 1 \\ 0 & \text{jinak} \end{cases} \quad (4)$$

Haarova transformace využívá nesymetrické Haarovy matice, jejíž prvky jsou 1, -1 násobené mocninami $\sqrt{2}$ nebo 0. Jádro této transformace je pro $N = 1, 2, 4$ [7]:

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

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 [4]. 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.

1.3 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, narozdíl od fraktálních útvarů, které mohou mít necelou dimenzi.

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 $\text{top}(X)$:

$$\dim(X) > \text{top}(X). \quad (5)$$

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 [8]:

$$X = \bigcup_{i=1}^n \phi_i(X) \quad (6)$$

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).

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:

$$D = \frac{\log N}{\log \frac{1}{s}}, \quad (7)$$

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

Hausdorffova míra může být definována následovně [9]:
Nechť M je metrický prostor. Pro $d \geq 0$, $\varepsilon > 0$ a $X \subset M$ položíme

$$H_\varepsilon^d(X) = \inf \left\{ \sum_{i=0}^{\infty} |U_i|^d : X \subseteq \bigcup_{i=0}^{\infty} U_i, |U_i| \leq \varepsilon \right\}. \quad (8)$$

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

$$H^d(X) = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} H_\varepsilon^d(X), \quad (9)$$

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 $H^d = 0$.

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 [8]:

$$\dim(X) = \inf \{d \geq 0 : H^d(X) = 0\} = \sup \{d \geq 0 : H^d(X) = \infty\}. \quad (10)$$

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 $N(\varepsilon)$ samozřejmě 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

$$M_\varepsilon^d \approx \sum_{i=1}^{N(\varepsilon)} \varepsilon^d = N(\varepsilon) \cdot \varepsilon^d \rightarrow \begin{cases} \infty, & d < D \\ 0, & d > D \end{cases} \quad (11)$$

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.

$$D = -\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\ln N(\varepsilon)}{\ln \varepsilon}. \quad (12)$$

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 [10]. 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 obrazů fraktální analýza zastoupená metodou box counting, která byla modifikována zavedením vlnkové transformace (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. Pro jeden obrázek lze získat různé fraktální dimenze a fraktální míry [11].

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* [12]. 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. Získáme fraktální dimenzi obrazu v celé oblasti maskovacích podmínek.

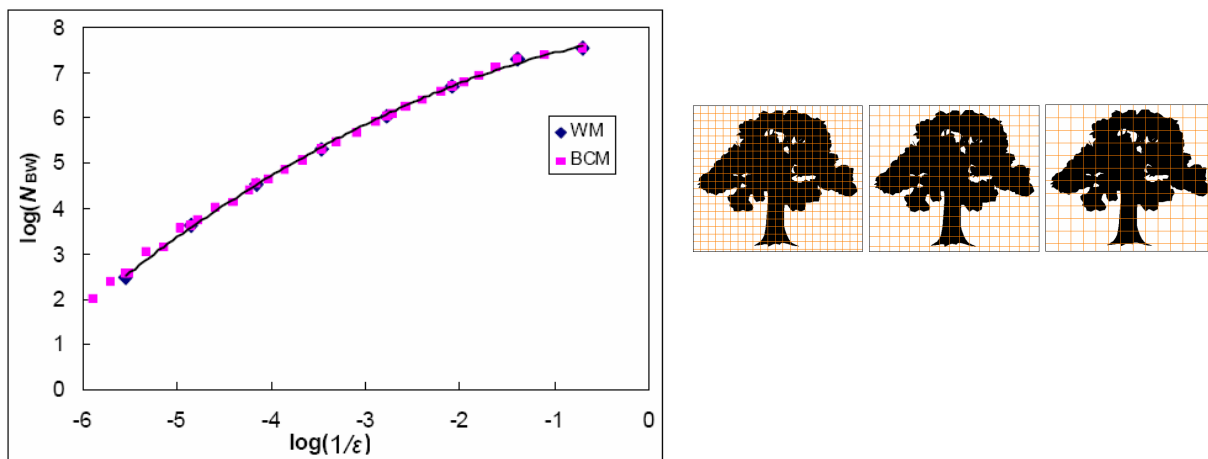
Box counting metodou v programu HarFA mohou být získány fraktální dimenze D_{BW} , D_{BBW} , D_{WBW} . Pro výpočet dimenzí D_{BBW} a D_{WBW} lze použít součet černých $N_{BBW} = N_B + N_{BW}$ (resp. bílých $N_{WBW} = N_W + N_{BW}$) a černobílých čtverců. Největší význam má fraktální dimenze D_{BW} ,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

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

odkud

$$\ln N_{BW}(1/\varepsilon) = \ln K_{BW} + D_{BW} \ln(1/\varepsilon), \quad (13)$$

kde K_{BW} je fraktální míra rozhraní a D_{BW} je fraktální dimenze. Takto získaná fraktální dimenze se v programu HarFA určuje pomocí lineární regrese analýzy [12].



Obr. 2 Určení fraktální dimenze – metoda box counting. V grafu lze také vidět porovnání stanovení fraktální dimenze s wavelet metodou

Na obrázku 2 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.

1.3.1 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 obraz 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

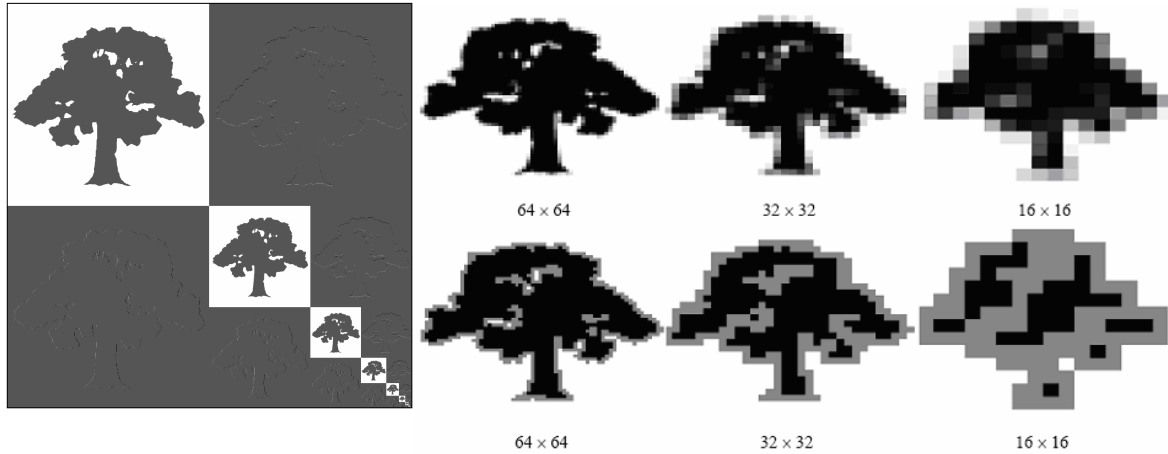
$$F(k, l) = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} f(m, n) h_{m,k} h_{n,l}, \quad (14)$$

kde $h_{m,k}$ a $h_{n,l}$ jsou koeficienty Haarovy matice $\mathbf{H}_N$, které jsou uvedeny v kap. 1.2.3. Haarova matice je 2^n dimenzionální matice. Metoda tedy vyžaduje čtvercovou matici dat danou mocninou čísla 2 [13]. 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 obraz 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 pokládané sítě různé velikosti při box counting metodě za předpokladu, že je analyzovaná čtvercová oblast.

Na obrázku 3 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 obrazu. Po první kroku obdržíme obraz o velikosti $2^{n-1} \times 2^{n-1}$ pixelů s hodnotami od 0 do 4,

po druhém kroku bude mít obraz velikost $2^{n-2} \times 2^{n-2}$ pixelů s hodnotami od 0 do 16, atd. Počet černých čtverců v obrazu je pak dán hodnotou 0, počet bílých čtverců hodnotou maximální 1, 4, 16, ... a počet černobílých čtverců je dán zbývajícimi hodnotami, kterým lze přiřadit stejná hodnota pomocí prahování.



Obr. 3 Stanovení fraktální dimenze a fraktální míry použitím vlnkové transformace

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

$$S_B = \frac{K_{BBW} - K_{BW}}{K_{BBW} + K_{WBW} - K_{BW}}, \quad S_W = \frac{K_{WBW} - K_{BW}}{K_{BBW} + K_{WBW} - K_{BW}} \quad (15)$$

a pro stanovení délky hraniční čáry objektu L v naprahaném obrazu

$$L \approx S_{BW} = \frac{K_{BW}}{K_{BBW} + K_{WBW} - K_{BW}}. \quad (16)$$

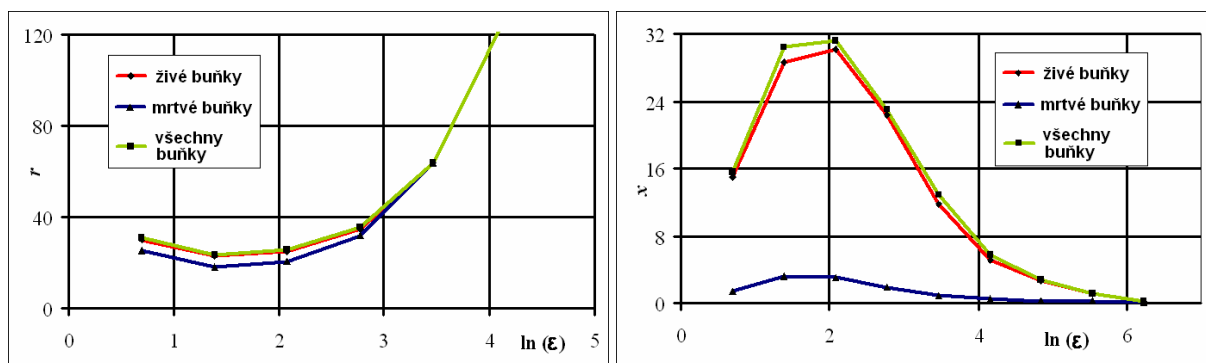
Výsledky jsou získány v relativních jednotkách (vynásobením 100 pak v procentech). Vynásobením velikosti obrázku ($K_{\max}$) lze získat výsledky v pixelech.

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

$$x = \frac{N_{BW}^2}{4\pi N_{BBW}}, \quad r = \sqrt{\frac{N_{BBW} \varepsilon^2}{\pi x}}, \quad (17)$$

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. 4). Maximální hodnota je zvolena, protože fraktální struktura je nejvhodněji ohraničena při dané velikosti sítě [14]. 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. 4 Stanovení poloměru buněk r a jejich množství x

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

$$N \approx \frac{(\sqrt{S_{WBW}/\pi} - \sqrt{S_W/\pi})}{2} \sqrt{\frac{\sqrt{S_{WBW}/\pi} + \sqrt{S_W/\pi}}{2\pi}} = \sqrt{S_{WBW} - S_W} \sqrt{\frac{\sqrt{S_{WBW}} - \sqrt{S_W}}{8\pi^2 \sqrt{\pi}}} \quad (18)$$

$$\text{resp.} \quad N \approx \sqrt{S_{BBW} - S_B} \sqrt{\frac{\sqrt{S_{BBW}} - \sqrt{S_B}}{8\pi^2 \sqrt{\pi}}} \quad (19)$$

Plochy černé – S_B resp. bílé – S_W naprahaného obrázku lze získat ze vztahů (15) a plochy černobílé ze vztahu (16). Daný vztah vybereme podle barvy, na kterou je analyzovaný objekt naprahan. Tuto metodu lze označit jako *metoda prahové distribuce*.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Stanovení počtu a poloměru buněk kvasinek

Byl stanoven počet a poloměr kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* FV1 (sbírka FCHPT STU Bratislava), *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae* CCY 21-4-102, *Kloeckera apiculata* CCY 25-6-22, *Hansenula anomala* CCY 38-1-30 (CCY – Zbierka kultúr kvasiniek, Chemický ústav AV SR, Bratislava). Tyto kvasinky byly vybrány, protože nevytváří příliš rozsáhlé rozvětvené svazky buněk a díky vhodnému tvaru a velikosti buněk.

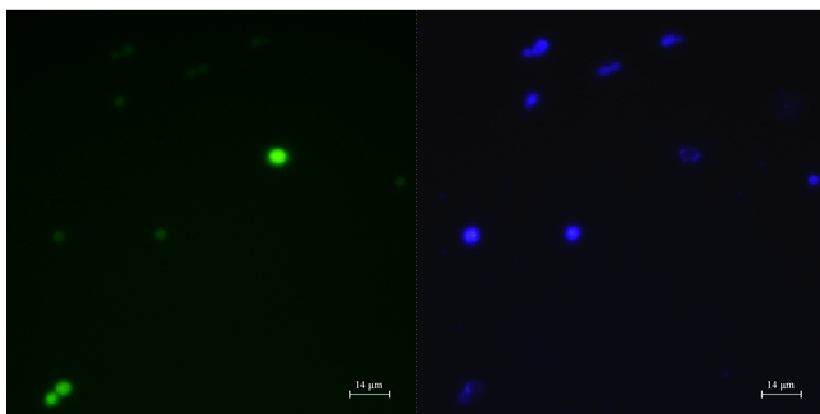
2.1.1 Měřicí aparatura

Pro záznam obrazů bylo využito spojení světelného mikroskopu s epifluorescenčním nástavcem Nikon Eclipse E200 a digitálního fotoaparátu Nikon Coolpix5400, přičemž k záznamu obrazů byl použit program Lucia Net 1.16.6., který byl upravený pro fotoaparát. Sledovaný živý obraz byl kontinuálně pozorován na monitoru 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. Mikroskopováno bylo objektivem 40×. Získané obrazy ve formátu TIF byly analyzovány pomocí programu HarFA.

2.1.2 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. 5). 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 (zelenká fluorescence). 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.

Pomocí fluorescenčního barvení lze na jednom obrázku napravit buď mrtvé, nebo živé buňky na černou barvu. Obrazy buněk byly prahovány dle intenzity či dle složek RGB prostoru.



Obr. 5 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)

2.1.3 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 (tabulka 1, 2, 4). Tato chyba je způsobena nestejnou velikostí buněk a tvaru, rozdíly v barevnosti jednotlivých buněk a kvalitou zaznamenaného obrázku. Pokud jsou buňky usmrčeny 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 3, jsou v rozsahu 2,61–4,12 μm .

Poloměry rozměrově spadají do hodnot uváděných v literatuře, případně jsou o něco větší [15].

Tabulka 1

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</i> FV1	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 2

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 3

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 4

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 5

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

Vyšší přesnost je dosažitelná optimální volbou velikosti buněk v obraze (ta může být jednoduše modifikována 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 [16]. Počet buněk v analyzovaném obrázku, který lze stanovit, aniž by se projevil chybným vyhodnocením, je limitován skutečností, že se buňky nesmí vzájemně překrývat.

2.1.4 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

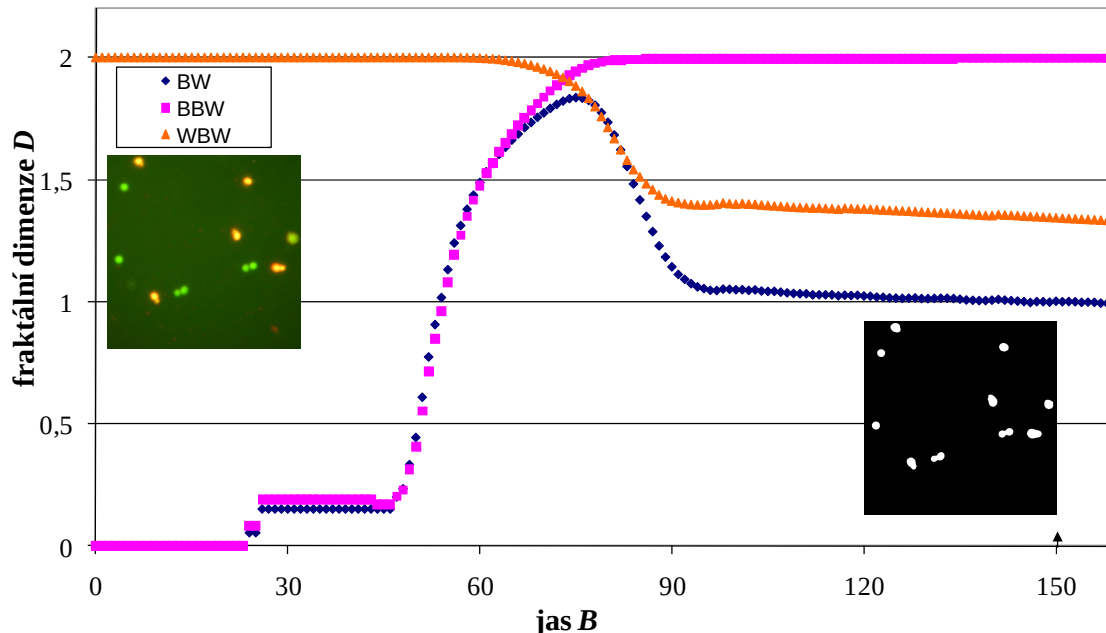
pořízených fotografií kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byla obarvena také Calcofluorem White M2R. Pro každou sérii fotografií byly zjištěny možnosti analýzy v různých barvových prostorech (tab. 6). Pro zjištění těchto možností byla získána fraktální spektra z vybrané fotografie každé série podle barevných složek *R*, *G*, *B*, *H*, *B* a intenzity. Fraktální spektrum vybraného obrazu č. 5 kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 podle jasu v barvovém prostoru HSB lze vidět na obr. 6. Z tabulky 6 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 zjištěného počtu.

Tabulka 6

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>I</i>	65	80–160	80–230
Červená <i>R</i>	60	65–135	65–255
Zelená <i>G</i>	95	90–255	90–255
Odstín <i>H</i>	95	93	65–70
Jas <i>B</i>	90	90–255	95–255

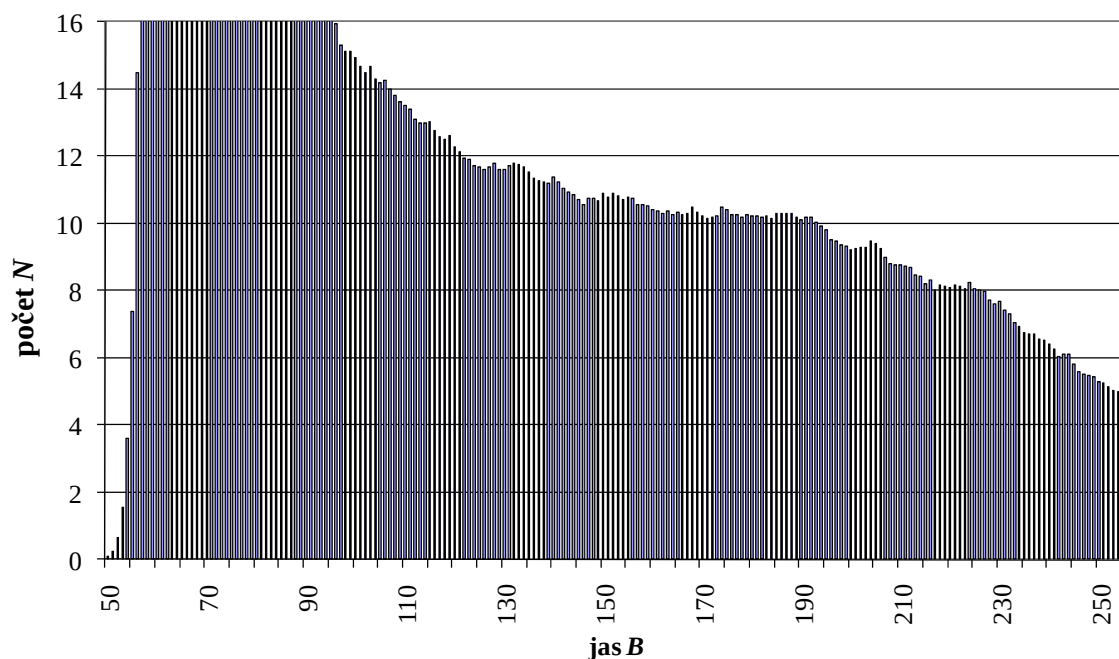
Fraktální spektrum kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1



Obr. 6 Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* FV1 – závislost fraktální dimenze na prahované hodnotě jasu v barvovém prostoru HSB, obraz č. 5

Pro každou hodnotu prahu například podle jasu lze vypočítat odpovídající počet právě naprahovaných objektů, což lze vidět v následujícím grafu.

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* FV1



Obr. 7 Závislost počtu buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 na hodnotě prahu jasu, obraz č. 5

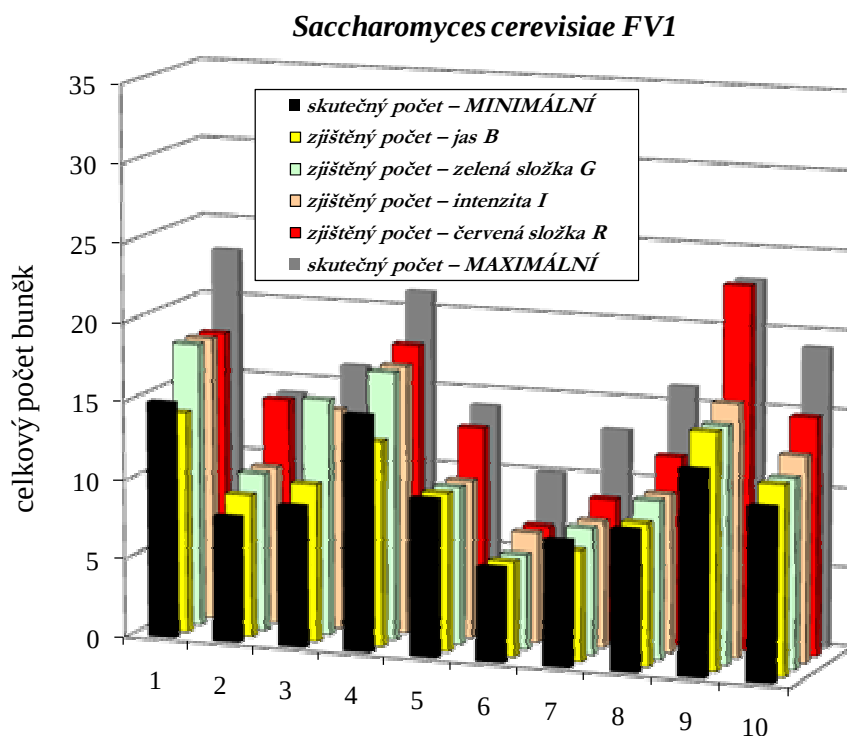
Tabulka 7

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 $B = 160-80$, zprůměrovaný rozsah hodnot intenzity $I = 100-120$, zprůměrovaný rozsah hodnot červené složky $R = 80-100$, zprůměrovaný rozsah hodnot zelené složky $G = 130-150$

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

V předcházející 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 osamocené buňky a maximální hodnota byla dána tak, že každý pupen byl počítán jako další buňka.

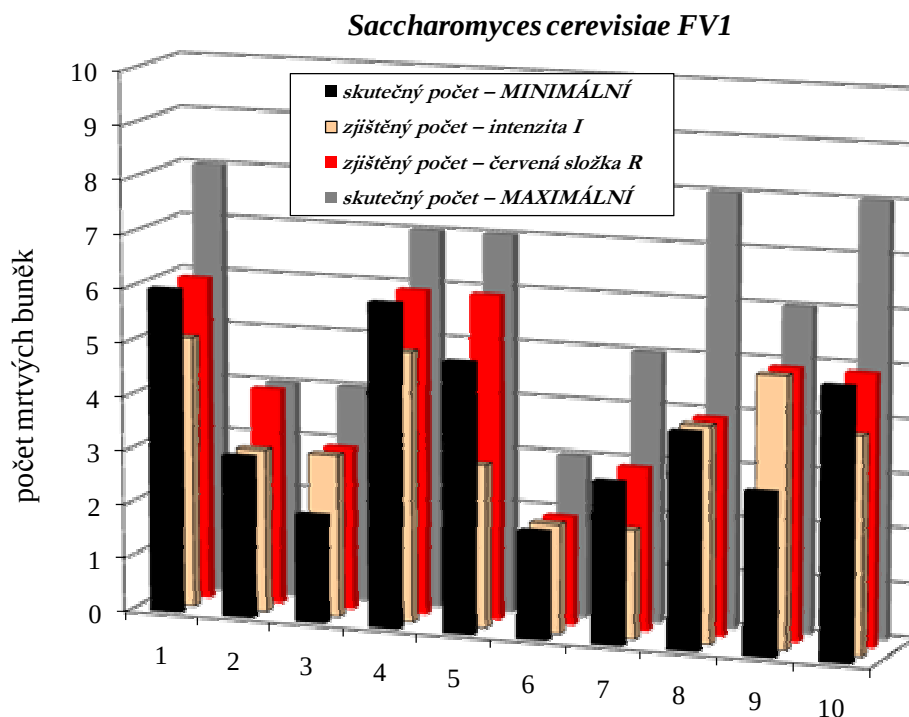


Obr. 8 Zjištěné počty buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 obarvené AO podle různých barvových složek získaného obrazu

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

Z předcházejících grafů lze vidět, že zjištěné počty kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 obarvené akridinovou oranží v obrazech většinou spadají do intervalu skutečného počtu buněk. Totéž platí i pro ostatní druhy analyzovaných kvasinek. 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 9 lze vidět, že počet živých buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 lze získat analýzou podle intenzity, jasu, červené a zelené složky.

Tabulka 9

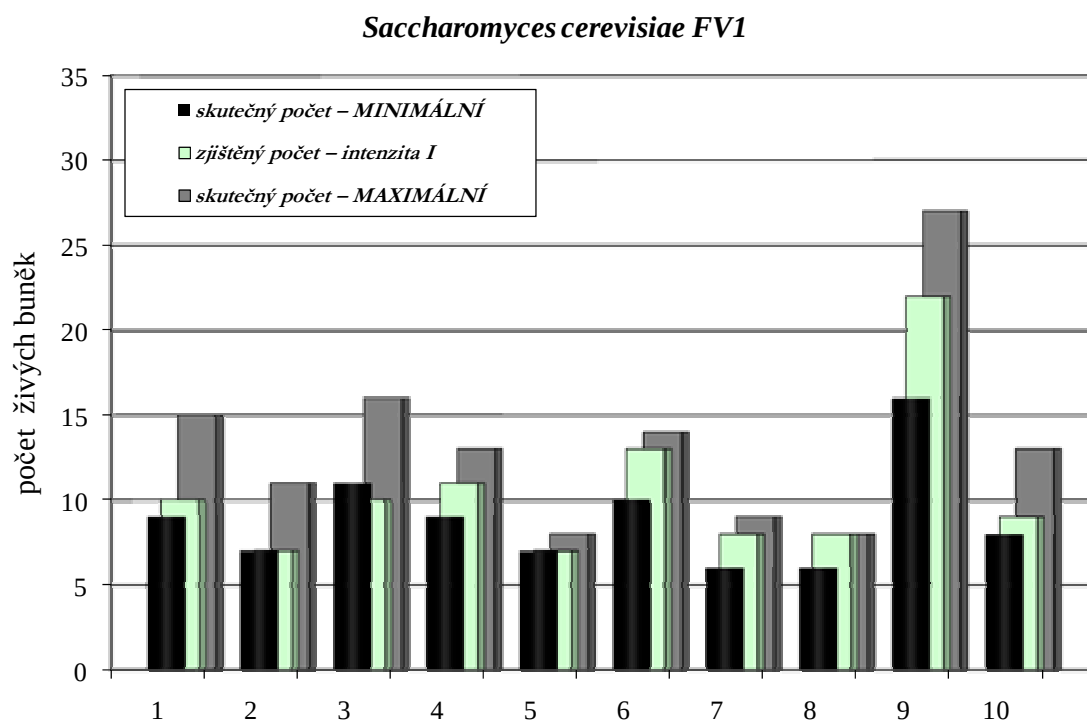
Hodnoty prahu pro živé buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 obarvené fluorescein diacetátem FDA a pozadí obrazu č. 8 podle složek barvového prostoru RGB, HSB a složky intenzity

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

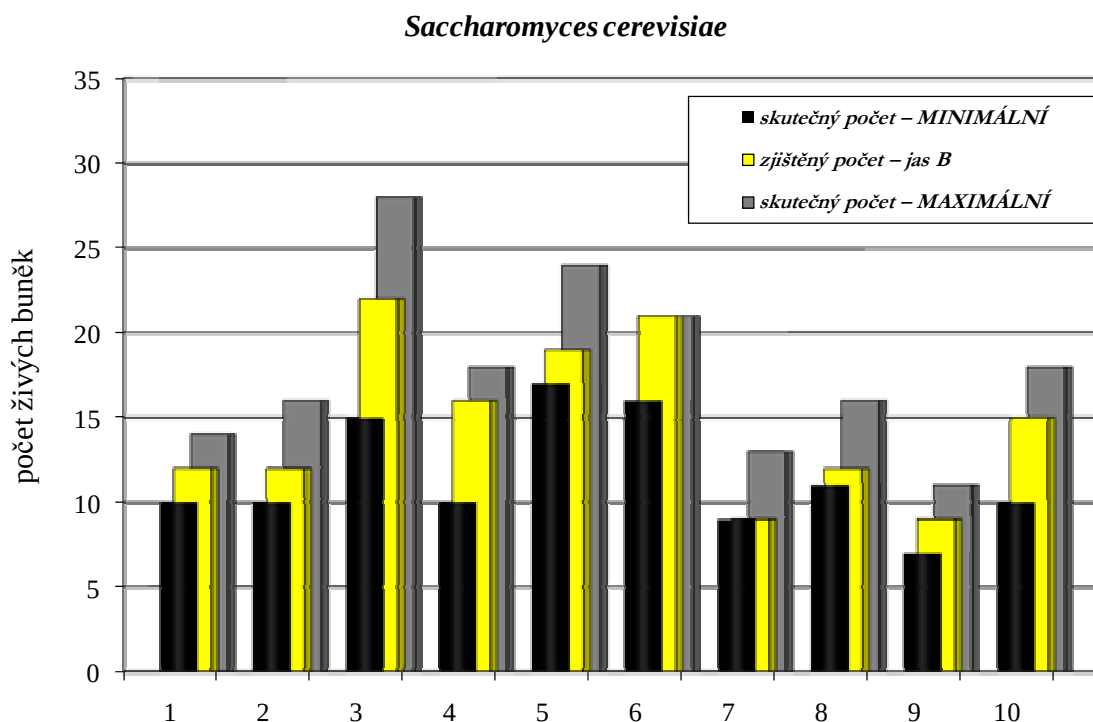
Tabulka 10

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 $I = 40\text{--}60$, zprůměrovaný rozsah hodnot jasu $B = 60\text{--}120$

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



Obr. 10 Zjištěný počet živých buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1 obarvené fluorescein diacetátem FDA podle intenzity I



Obr. 11 Zjištěný počet živých buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené fluorescein diacetátem FDA podle jasu *B* barvového prostoru HSB

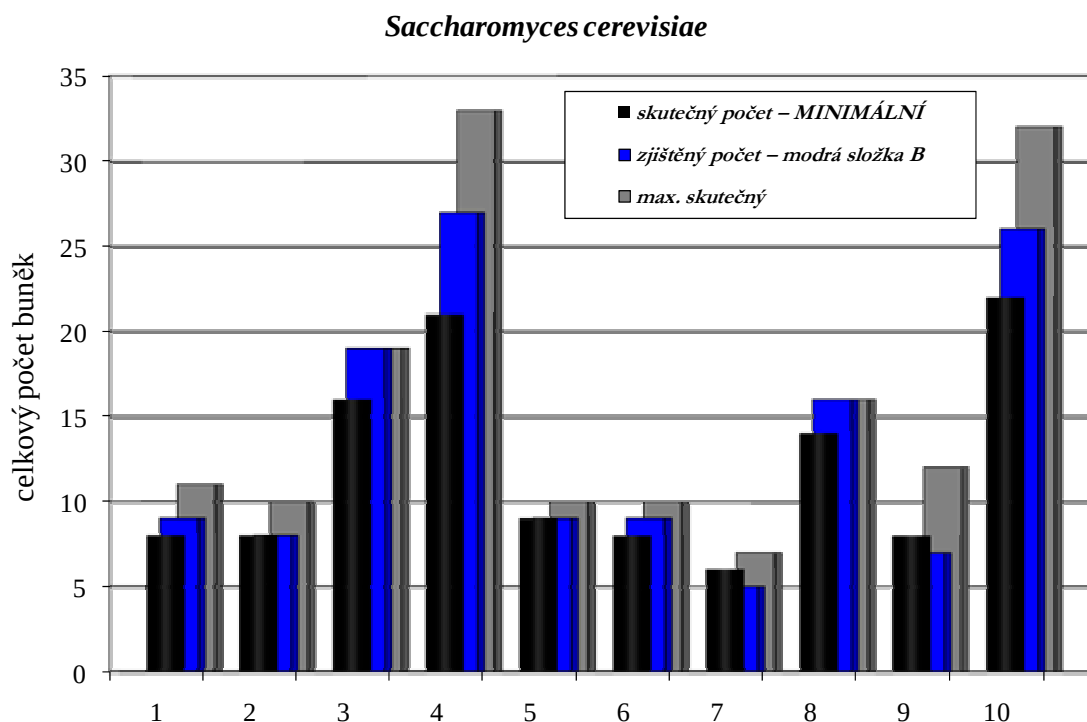
Jako nej přesnější se ukázala být analýza obrazů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obarvené fluorescein diacetátem FDA podle jasu *B* barvového prostoru HSB. Ostatní druhy kvasinek vykazují vždy jednu odchylku z intervalu skutečného počtu.

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 11

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. 12 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.

2.1.5 Závěr

Fluorescenční mikroskopie ve spojení s obrazovou analýzou se ukázala být vhodnou metodou pro počítání buněk kvasinek. Je to metoda rychlá, cenově dostupná 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. 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 obraze 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.

2.2 Sledování rozmnožování kvasinek

Fraktální analýza byla dále použita na sledování růstu a rozmnožování různých druhů kvasinek (*Saccharomyces fragilis* CCY 51-1-1, *Candida vini* CYY 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).

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

Médium č. 1 – jedná se o sacharidové čiré živné médium žluté barvy (glukóza – 4 g, pepton – 0,5 g, kvasinkový extrakt – 0,5 g).

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 .

2.2.1 Měřicí aparatura

Pro záznam obrazů bylo využito spojení světelného mikroskopu s epifluorescenčním nástavcem Nikon Eclipse E200 a digitálního fotoaparátu Nikon Coolpix990. 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. Při obou mikroskopech se používal planachromatický objektiv se zvětšením 40×, nasazený na trinokulární tubus s okulárem se zvětšením 20×. Získané obrázky ve formátu TIF byly analyzovány pomocí programu HarFA.

2.2.2 Příprava preparátu a popis experimentu

Vzorek kvasinek byl připraven očkováním šikmého agaru požadovanou kulturou, který byl kultivován při pokojové teplotě 17–24 hodin. Z této kultury bylo naočkováno kapalně 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.

Během pozorování vybrané buňky kvasinky byl po určitých časových intervalech sejmut obraz a uložen ve formátu TIFF. Nejčastěji byl použit interval 2–4 minuty. Ze zaznamenaných snímků byly získány výřezy o určité velikosti programem HarFA. Výřezy byly prováděny tak, aby sledovaná kvasinka byla stále na jednom místě v obrazu.

Pomocí programu HarFA bylo provedeno prahování podle intenzity. Vzniklé černobílé obrazy byly poslední fází experimentu, které byly zpracovány programem HarFA a byly obdrženy konečné hodnoty – fraktální dimenze a fraktální míry zkoumaného objektu.

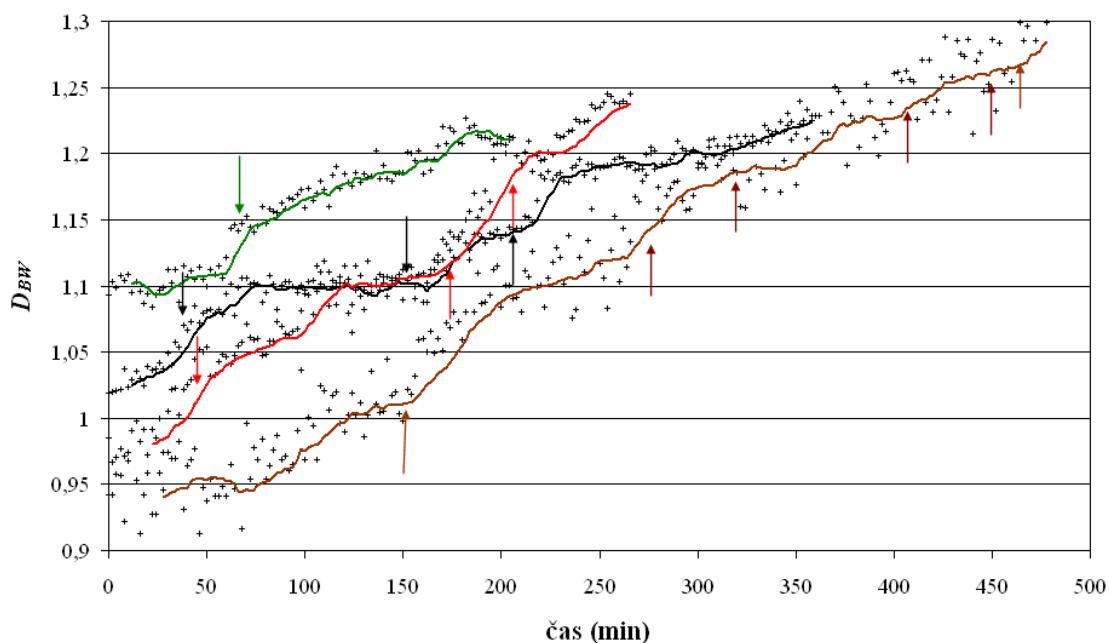
Na upravených snímcích byla dále provedena fraktální analýza s využitím vlnkové transformace.

2.2.3 Výsledky a diskuze

Candida vini CCY 29-39-3

Na obrázku lze vidět několikanásobné pučení kvasinky *Candida vini*. V grafu lze pozorovat, 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.

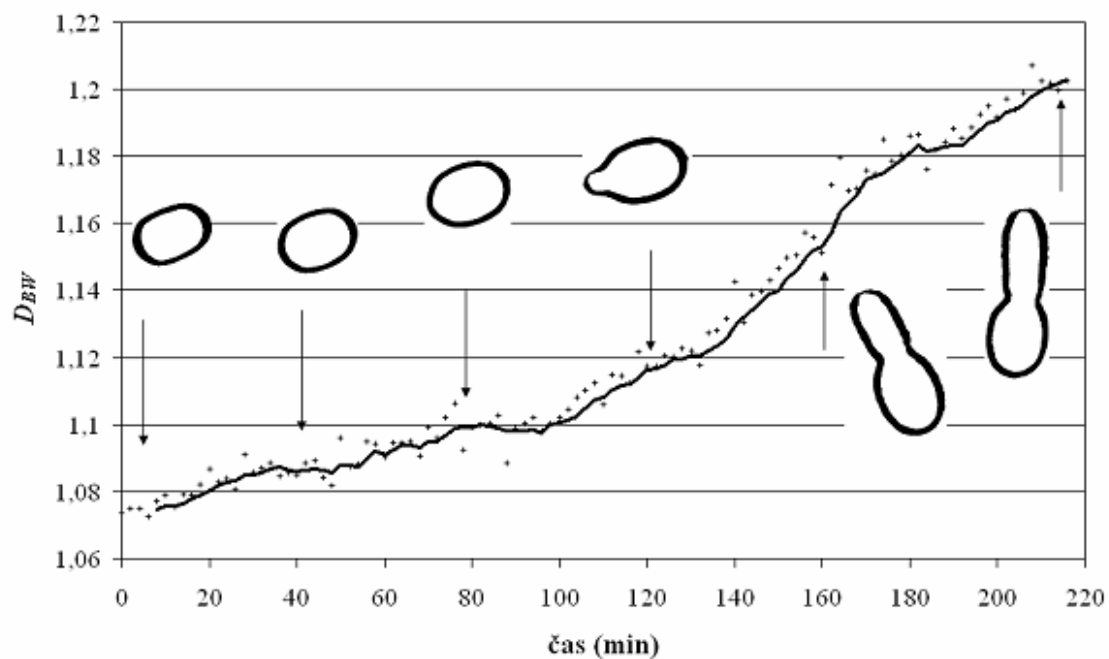
Šipky naznačují místo, kde daná kvasinka začala pučet. U některých kvasinek lze vidět, že pučely i několikrát. Vidíme, že vzrůstající tendence je zastoupena u všech čtyřech měření. *Candida vini* se tedy vyznačuje vzrůstajícím průběhem s fázemi odpočinku, nabírání energie a živin.



Obr. 13 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.

Dipodascus magnusii CCY 25-6-22

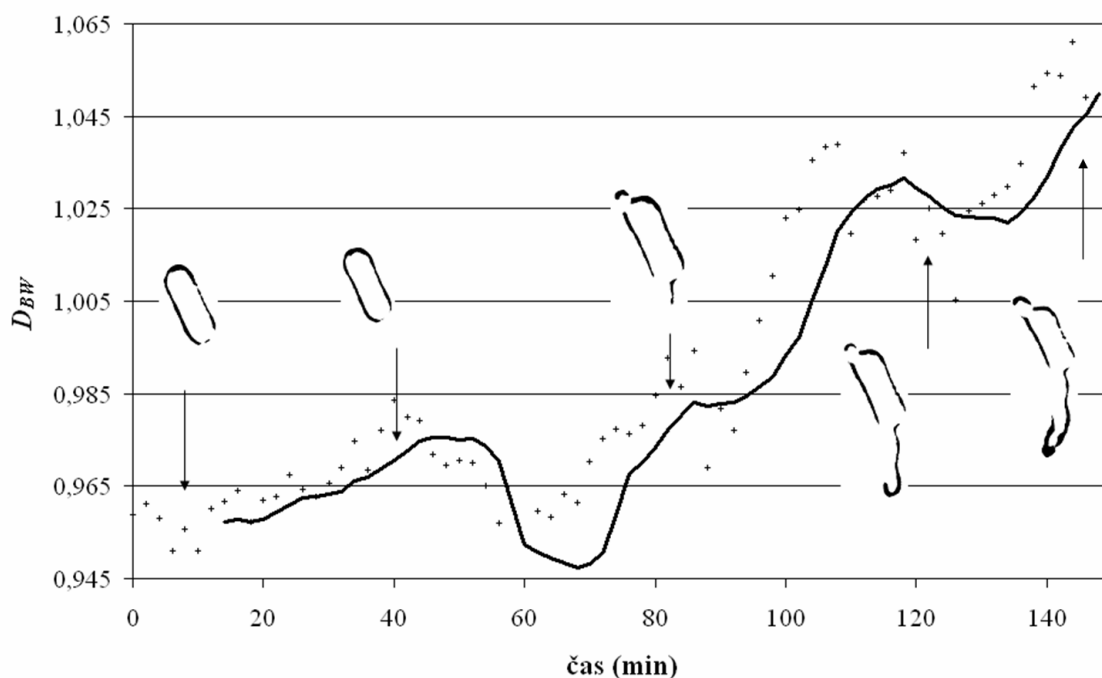
Rozmnožování probíhalo pomocí arthrokonidií. Jakmile začne kvasinka pučet, fraktální parametry se zvyšují rovnoměrně, trend je stoupající bez poklesů, nebo fáze relaxace.



Obr. 14 Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky *Dipodascus magnesii*

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

Geotrichum candidum se rozmnožuje pomocí arthrokonidií. Nevýhodou těchto kvasinek byla jejich velikost a slabá stěna. Kvasinky se nedaly řádně zaostřit a při prahování byly snímky neúplné. Tento fakt značně ovlivňoval fraktální dimenzi i míru.

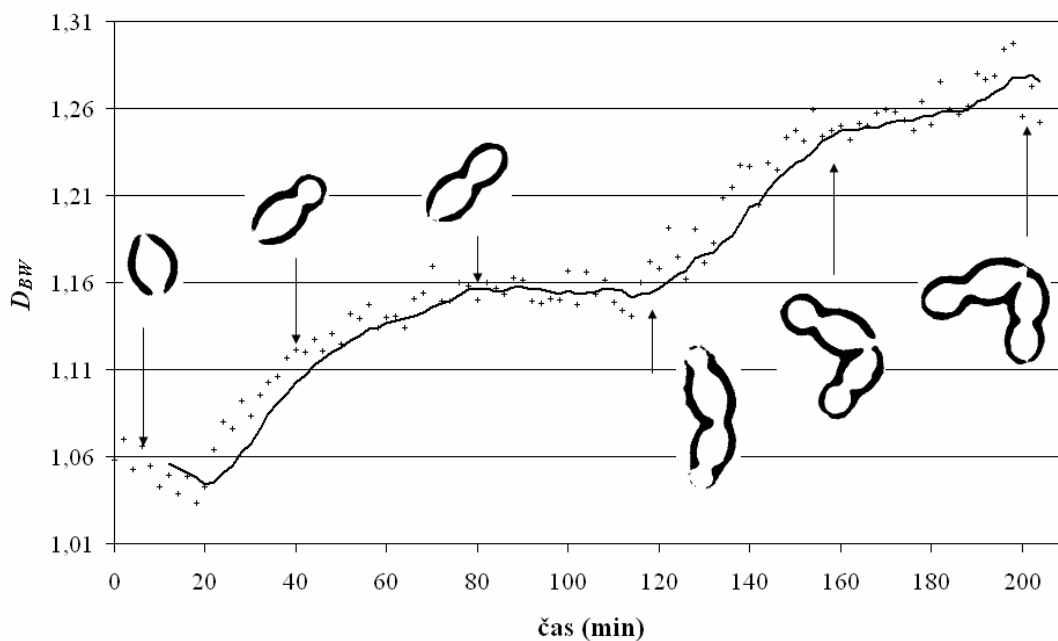


Obr. 15 Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky *Geotrichum candidum*

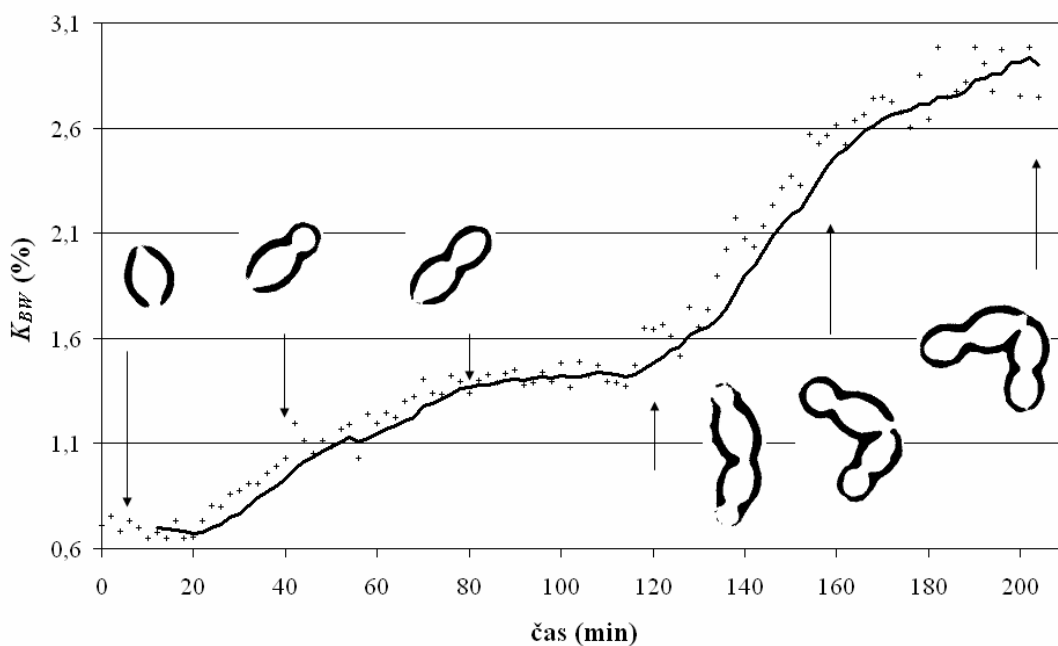
Na počátku měření byly buňky obdélníkového tvaru, nabíráním živin a dospíváním se zaoblovaly a začaly pučet.

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

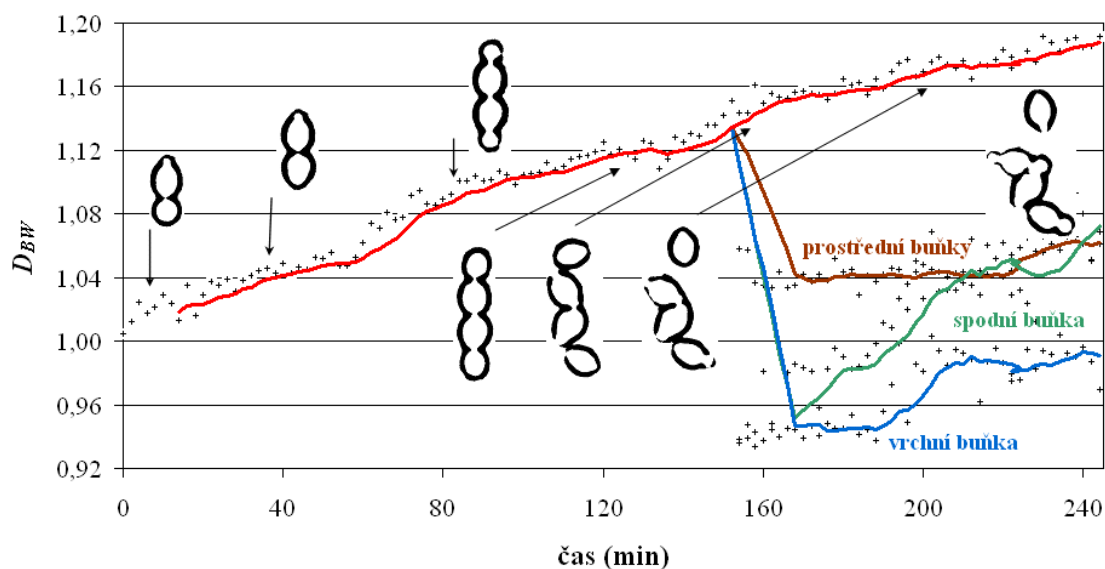
Typické závislosti fraktálních parametrů na změně struktury při pučení jsou uvedeny na obr. 16 a obr. 17. Tento druh kvasinek se vyznačoval rychlým pučením, oddělováním jednotlivých buněk z řetízku od sebe. Lze také vidět, že na mateřské buňce se objevuje několik pupenů najednou, jde tedy o pučení multilaterální. 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.



Obr. 16 Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky *Kloeckera apiculata*



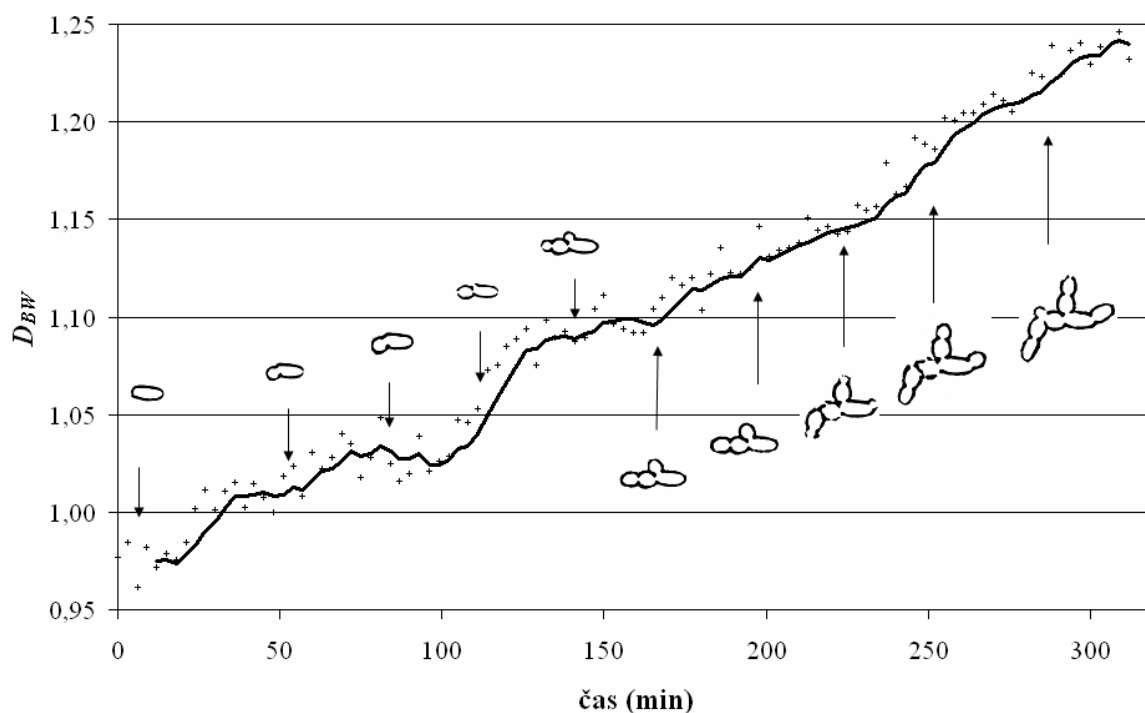
Obr. 17 Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky *Kloeckera apiculata*



Obr. 18 Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky *Kloeckera apiculata*

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

Další pozorovaná kvasinka byla *Saccharomyces fragilis*. Jako jediná ze všech zkoumaných druhů kvasinek se projevila rychlým nástupem pučení a tedy rostoucí hodnotou fraktální dimenze a tento trend pokračoval dále téměř beze změny.



Obr. 19 Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky *Saccharomyces fragilis*

2.2.4 Závěr

Sledování vegetativního rozmnožování kvasinek pučením bylo nejvhodnější v Bürkerově komůrce z ostatních vyzkoušených možností (Böttcherova komůrka, zploštělá kapilára). Po zaočkování do kapalného 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.

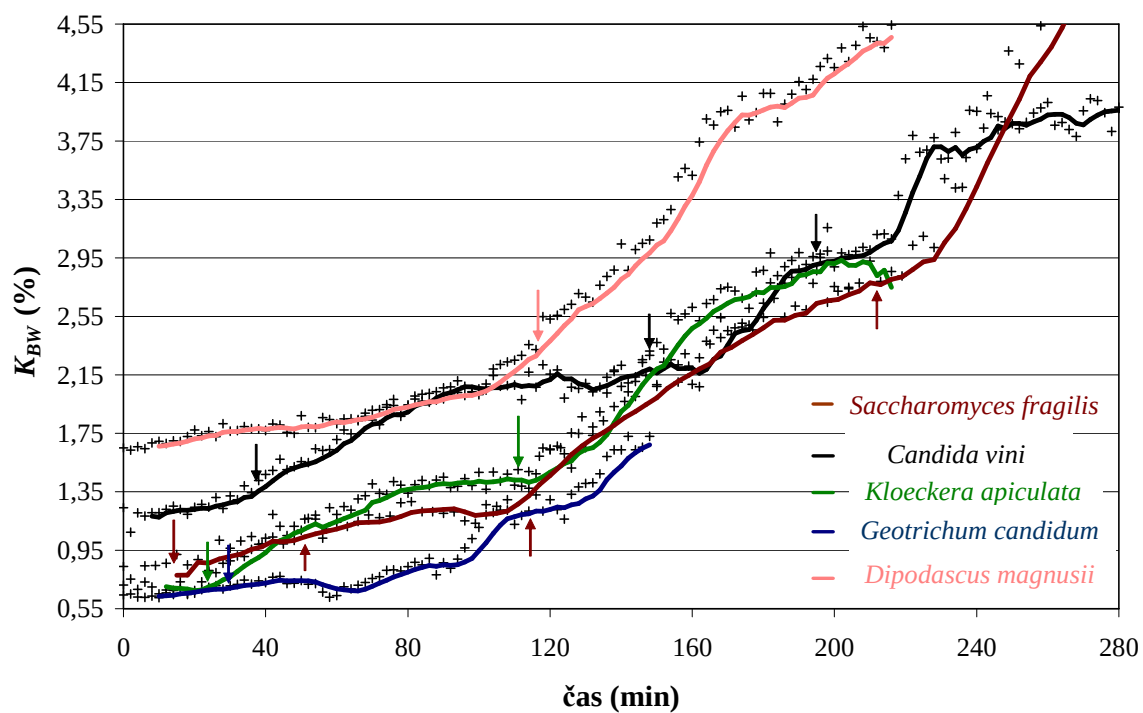
Pomocí vhodného nastavení parametrů optické soustavy (optické filtry, jas, kontrast) lze usnadnit vlastní obrazovou analýzu. Pozorování bylo vhodné pod klasickým světelným mikroskopem. Nevýhodou fázového kontrastu je tzv. halo efekt, který je způsoben lomem světla na strukturách s velkým rozdílem indexu 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).

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. Jako ideální pozorovací objekt pro obrazovou analýzu se jeví *Kloeckera apiculata* (pro svou rychlou reprodukci) a *Dipodascus magnusii* (pro tlustou stěnu). Sledování se týkalo různých způsobů množení, především multipolárního a bipolárního pučení. Bipolární pučení kvasinky *Kloeckera apiculata* umožňovalo pozorovat oddělení dceřiné buňky od mateřské. 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 20 ukazuje vzrůst počáteční hodnoty K_{BW} až do 4,55 % pokrytí plochy obrazu. Největší zvětšení fraktální míry bylo pozorováno u kvasinky *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. 20 Srovnání závislosti fraktální míry K_{BW} na čase pro pět druhů kvasinek

3 LITERATURA

- [1] Hudcová, D., Maltán, V.: *Mikrobiológia I*. Bratislava: STU, 2002. 68 s. ISBN 80-227-1663-4.
- [2] Veselá M., Drdák M.: *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. vyd. Brno: VUT Brno, Fakulta chemická, 1999.
- [3] Graps A.: *An Introduction to Wavelets*, Institute of Electrical and Electronics Engineers, 1999 [cit. 2006-5-28]. Dostupné z: <<http://www.amara.com/ftpstuff/IEEEwavelet.pdf>>.
- [4] Jan J.: *Číslicová filtrace, analýza a restaurace signálů*. 2.vyd. Brno: VUTUM, 2002. ISBN 80-214-2911-9.
- [5] Fiala, J.: Waveletová transformace. *Materials Structure in Chemistry, Biology, Physics and Technology*, 1999, vol. 6, no. 1, pp. 29-36. ISSN 1211-5894.
- [6] 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]. ISSN 0272-1716. Dostupné z: <<http://csdl.computer.org/dl/mags/cg/1995/03/g3076.pdf>>.
- [7] Jan J., Kozumplík J.: *Systémy, procesy a signály*. Studijní texty pro obor Výpočetní technika a informatika. 1. vyd. Brno: VUTUM, 2000. ISBN 80-214-1593-2.
- [8] 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>.
- [9] Ficker, T.: *Aplikace fraktální geometrie v přírodních a technických vědách*. Brno: VUTUM, 2005. ISSN 1213-418X.
- [10] 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>>.
- [11] Zmeškal, O., Komendová, B., Bžatek, T., Julínek, M.: Hodnocení kvality tiskových bodů metodami obrazové (waveletové) analýzy, *Polygrafia Academica 2004*, FCHPT STU Bratislava, 2004, p. 102 – 112. ISBN 80-227-2100-X.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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. 292 (3 s.). ISSN 0009-2770.
- [15] Kocková-Kratochvílová A. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1 vyd. Bratislava: Alfa 1990, ISBN 80-05-00644-6.
- [16] 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.

4 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. 9. 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.

5 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**