

**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ**

**POJEDNÁNÍ K DISERTAČNÍ PRÁCI
STUDIUM VLASTNOSTÍ BIOLOGICKÉHO
MATERIÁLU POMOCÍ METOD OBRAZOVÉ
ANALÝZY**

BRNO 2006

Ing. Petra Jeřábková

OBSAH

1. ÚVOD	3
2. TEORETICKÁ ČÁST	4
2.1 KVASINKY	4
2.1.1 <i>Růst a rozmnožování kvasinek</i>	5
2.1.2 <i>Měření rozměrů buněk</i>	11
2.1.3 <i>Stanovení počtu buněk</i>	12
2.2 SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE	14
2.2.1 <i>Fázově kontrastní mikroskopie</i>	14
2.2.2 <i>Fluorescenční mikroskopie</i>	15
2.3 FLUORESCENČNÍ BARVIVA	17
2.3.1 <i>Fluorescenční barviva pro testování vitality buněk</i>	18
2.4 OBRAZOVÁ ANALÝZA	23
2.4.1 <i>Obraz a jeho reprezentace</i>	24
2.5 OBRAZOVÁ ANALÝZA S VYUŽITÍM INTEGRÁLNÍCH TRANSFORMACÍ	25
2.5.1 <i>Periodické transformace</i>	26
2.5.2 <i>Vlnkové transformace</i>	27
2.5.3 <i>Spojité vlnkové transformace</i>	29
2.5.4 <i>Diskrétní vlnkové transformace</i>	30
2.5.5 <i>Realizace vlnkových transformací bankami filtrů</i>	32
2.5.6 <i>Haarova transformace</i>	34
2.5.7 <i>Vícerozměrné signály</i>	37
2.6 FRAKTÁLNÍ ANALÝZA	39
2.6.1 <i>Fraktální analýza s využitím vlnkové transformace</i>	43
3. CÍL PRÁCE A DÍLČÍ VÝSLEDKY	48
4. LITERATURA	51
5. PŘEHLED PUBLIKACÍ A AKTIVIT	55

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 např. 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.

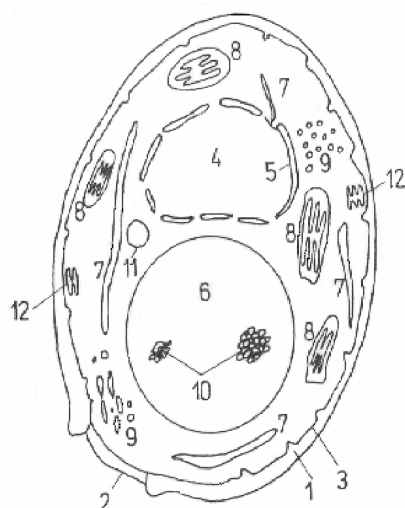
Postupy obrazové analýzy v dnešní době nabízí řada programů, od nejjednodušších, které umožňují úpravu obrázku a jejich barvení (Adobe Photoshop), až po velmi složité (Lucia Net), které umožňují řadu měření nebo jsou speciálně upravené pro získání určitých informací z obrázku.

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].



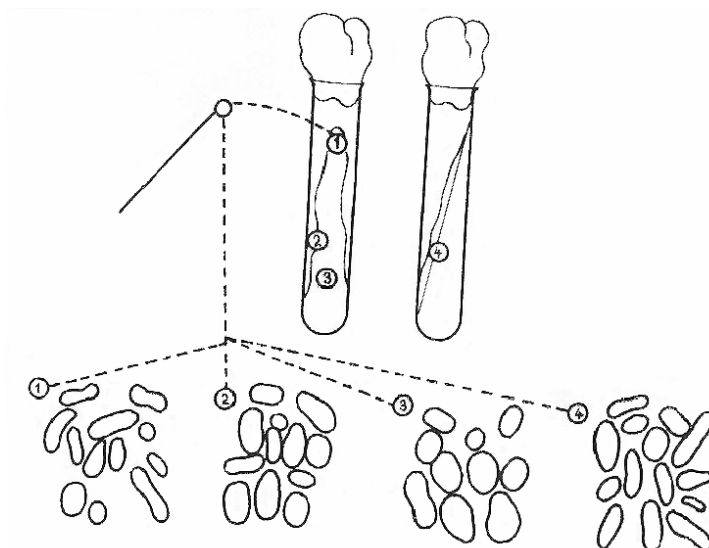
Obr. 1 Schéma průřezu buňkou kvasinek [1]

- 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 Rozličné 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 [7]

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 dřív 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].

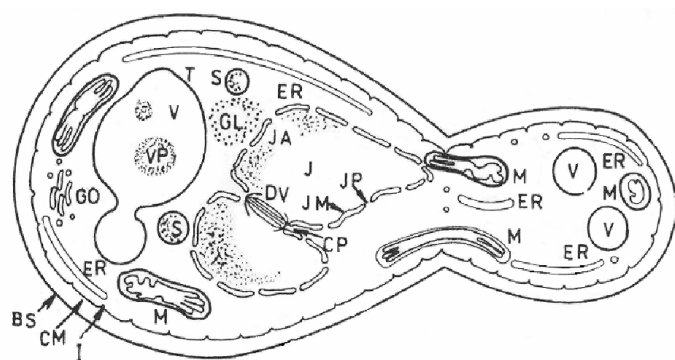
2.1.1 Růst a rozmnožování kvasinek

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.

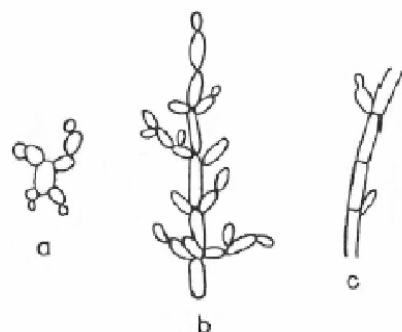


Obr. 4 Schématické znázornění struktury pučící buňky: J – jádro, JP – jaderný pór, JM – jaderná membrána, DV – vřeténko, CP – plaky, ER – Endoplazmatické retikulum, V – vakuola, VP – pinocytóza, T – tonoplast, GO – Golgiho aparát, M – mitochondrie, BS – buněčná stěna, GL – globuly, CM – plazmolema, I – 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 agaru, 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 [1, 4]. 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*

tělíška (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 tělíška dají vznik dvěma samostatným jádrům, z nichž každé má jedno polární tělíško 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.

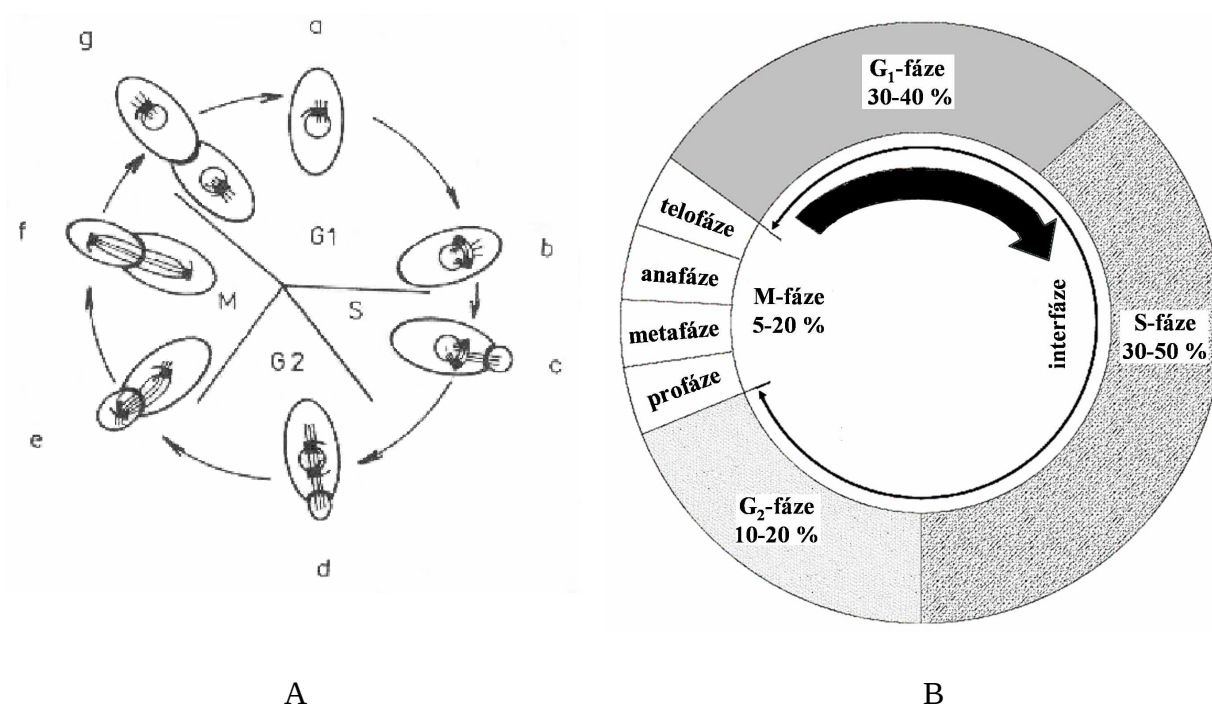
3. **G2-fáze**, kdy je již replikace chromozomální DNA ukončena.

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), strukturními 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].

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].



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 jader do pupenu a dělení jader (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.

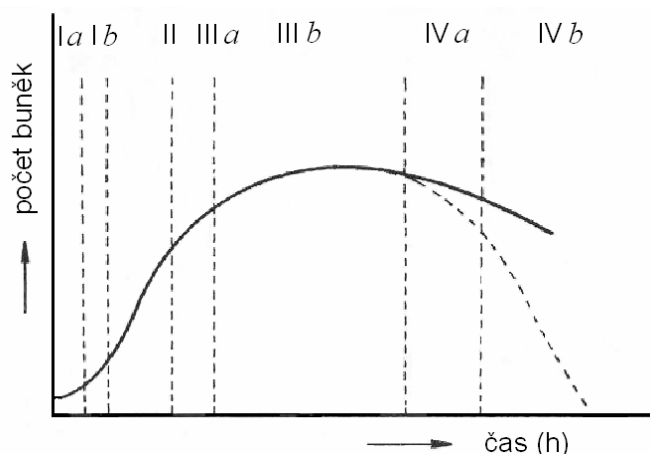
Morfologické projevy cyklu u *Saccharomyces* byly efektivně využity jako diagnostické znaky, které lze sledovat i optickým mikroskopem [1, 9, 11, 12].

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

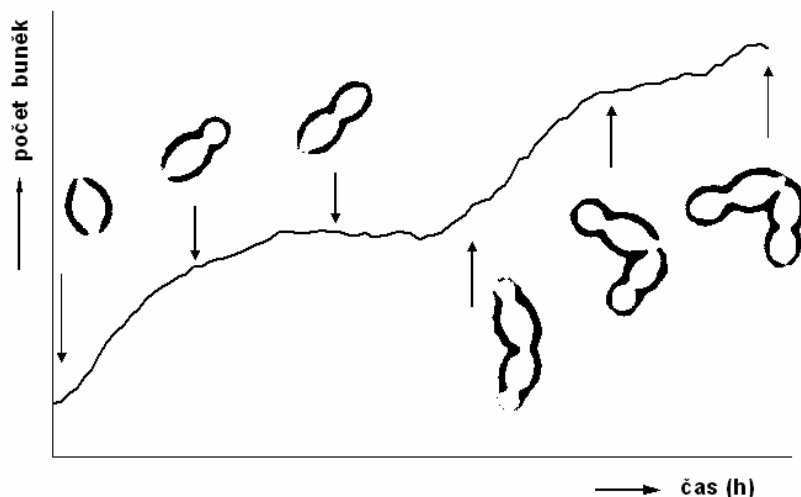
Dochází k vyrovnání počtu odumírajících buněk a jejich přírůstků. V této fázi je většina živin již vyčerpána a maximální délka této fáze je dána citlivostí buněk k hladovění. Ve stacionární fázi jsou také vytvářeny endospory.

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).



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 oceňovat 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 odchýlovat od mezí použité pravděpodobnosti.

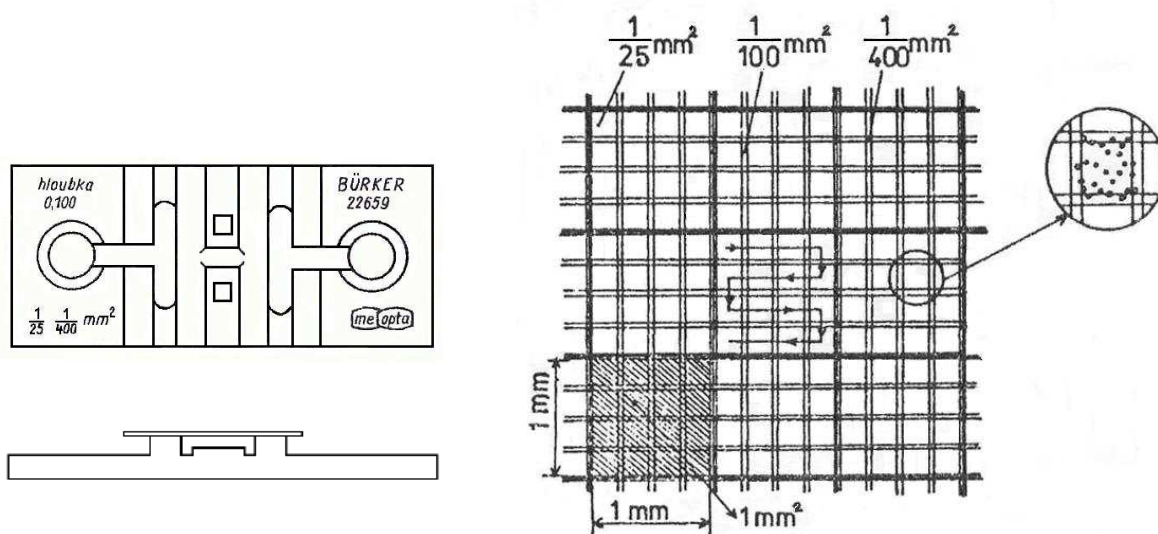
Měření buněk se může provádět i nepřímo tak, že se několik preparátů buněk vyfotografuje i se stupnicí objektivového mikrometru. Fotografie buněk a stupnice, které jsou stejně zvětšené se zkopírují. Stupnice se potom použije i na měření ostatních buněk na fotografii, kde 1 dílek odpovídá 10 μm [14].

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, Neubaerova). 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 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 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 neoddelila od buňky mateřské, počítají se je jako dvě buňky. 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).

Nepřímou lze počet buněk mikroorganismů stanovit nejčastěji pomocí kultivace, kdy předpokládáme, že z jedné životaschopné buňky vyrostle 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 mikrobitem (stripem). Bactostripy jsou proužky filtračního papíru napojené obecnou nebo selektivní živnou půdou s přídavkem 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 půd, 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). 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 nepravdivostem. Metodu lze použít pouze v kombinaci s mikroskopickou nebo kultivační metodou stanovení počtu buněk v určitém koncentračním rozmezí suspendovaných částí. Při příliš vysokých koncentracích buněk v suspenzi je světlo absorbováno okolní kapalinou, takže hodnoty neodpovídají skutečnosti. 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 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°) 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 třídit buňky na základě předem známých parametrů. Během procesu třídění jsou buňky emitující žádaný fluorescenční signál elektricky nabity ve vysokonapěťovém 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 řetízky, protože i mnohobuněčný organismus 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 od 400 do 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.

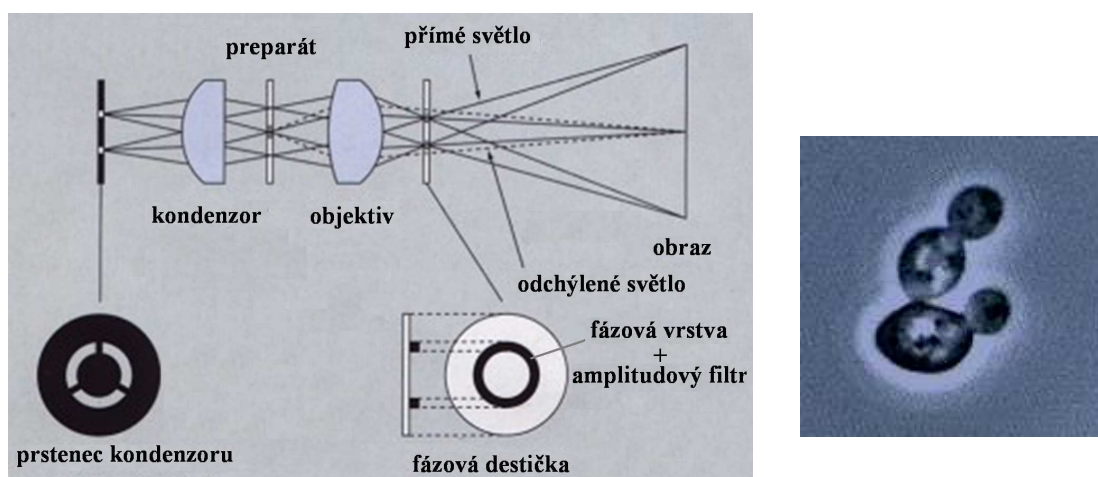
Jelikož nelze pozorovat přímo fázový kontrast, je nutné převést fázový kontrast na rozdíl v intenzitě světla nebo na rozdíl v barvě. Fázový kontrast odděluje ohýbající se paprsky procházející objektem, které při průchodu vzorkem mění nejen svou fázi, ale i směr šíření od *přímých* paprsků procházející 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, čím 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 $0,1\ \mu\text{m}$.

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

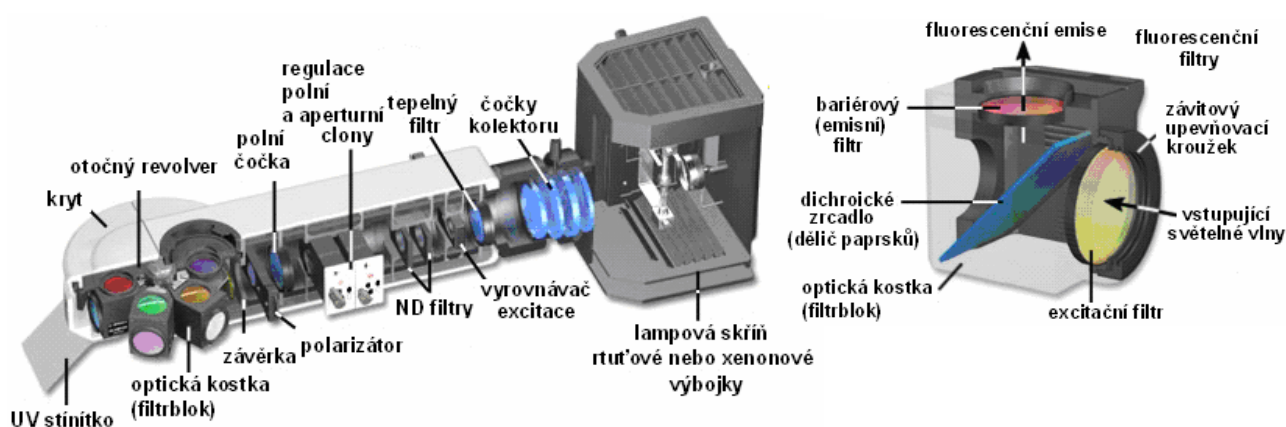
2.2.2 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence je vlastnost některých atomů a molekul absorbovat světlo určité vlnové délky (obvykle v rozsahu od UV do VIS oblasti elektromagnetického spektra; $250\text{--}700\ \text{nm}$) 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 (50–200W) nebo xenonové (75–150W) výbojky. Obloukové lampy se zažehávají vysokonapětovými pulsy a jsou umístěny ve skřínce, 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).

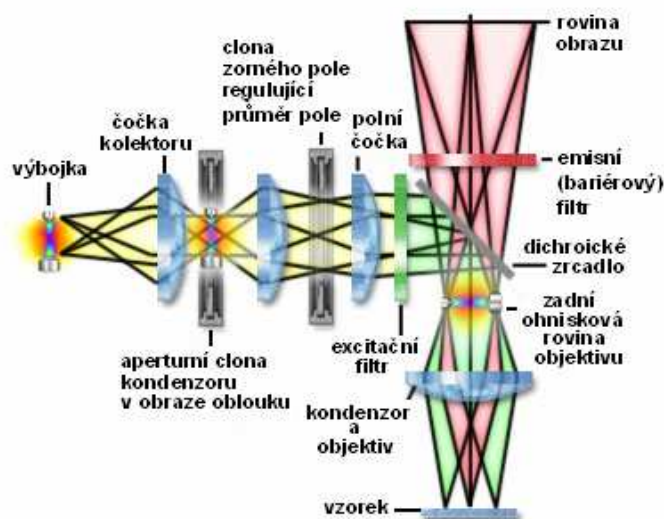


Obr. 11 Epifluorescenční iluminátor; schéma optické kostky [21]

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.

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 zcloněná 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]

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 specifickým barvením. Mnohé z barvicích postupů 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 vážali 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 [22]:

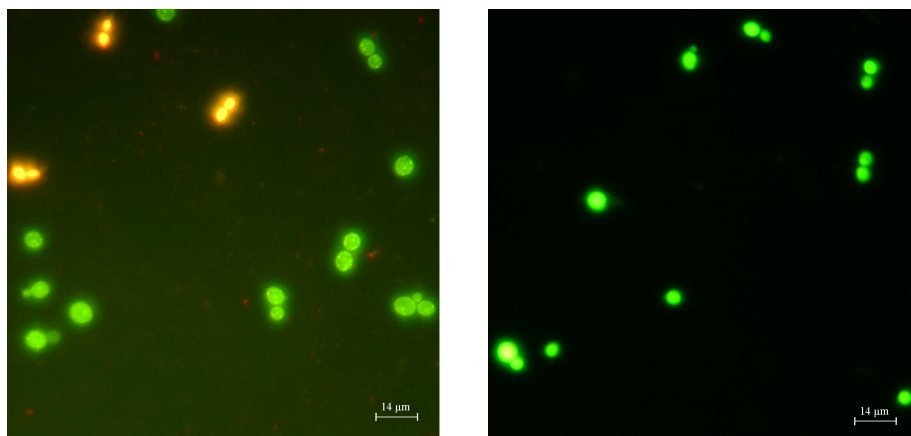
1. Fluorogenní substráty esteráz, které mohou pasivně pronikat do buněk a měří jednak zachování enzymatické aktivity buněčných esteráz, které je převádí na fluoreskující produkt, jednak membránovou integritu, která zajišťuje nitrobuněčnou retenci jejich fluoreskujících

produktů. Jednou z prvních sond pro toto použití byl fluorescein diacetát (FDA). Mezi nejlepší indikátory vitality buněk patří calcein AM (díky vysokému zachytu 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, SYTOX Green, cyaninová barviva, jako TOTO, 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)

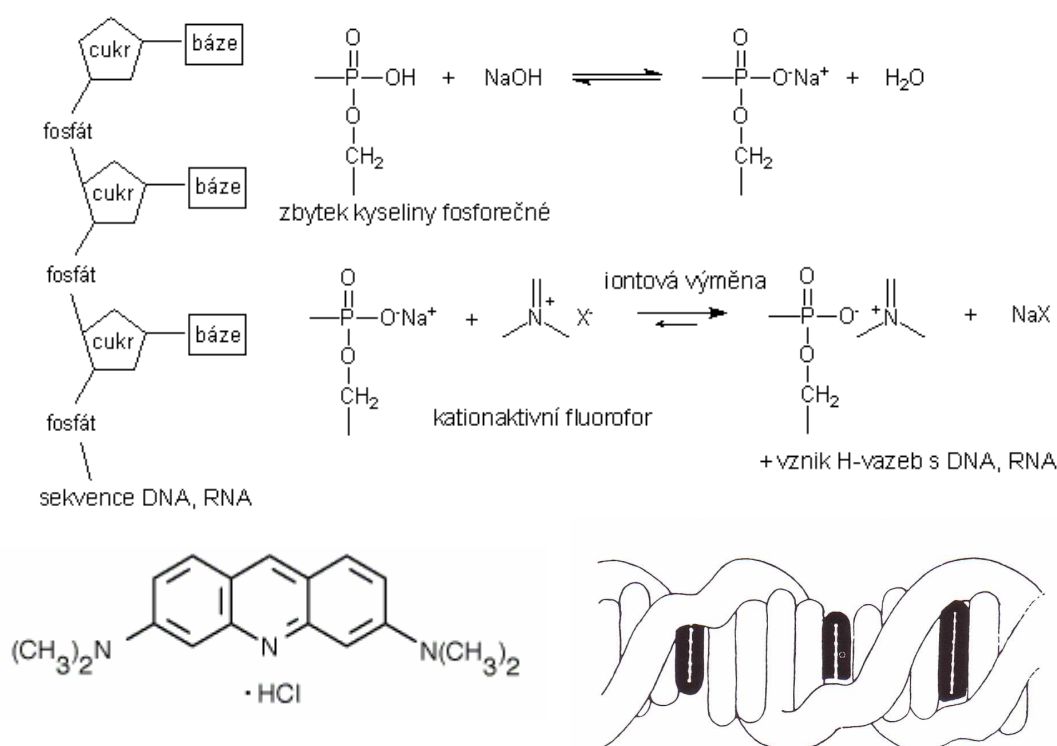


Obr. 13 Buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* FV1. Vlevo jsou buňky obarvené akridinovou oranží (180 μM AO; pH 6) a vpravo fluorescein diacetátem (6 mM FDA; pH 7,2). Kultivace buněk: 24 hod. v glukoso-peptonovém kvasničním extraktu za aerobních podmínek. Použitá filtrační kostka B-2A a objektiv 40 $\times$.

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 Waalsové 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.

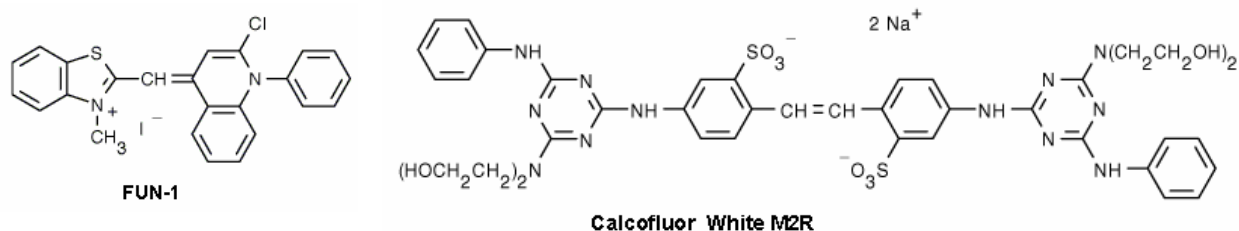
Fluorescenční charakteristiky jsou dány monomerem AO tj. zelená emise. Pokud je AO vázána na jednořetězcové náhodné klubko (denaturované DNA, RNA), je vázána na téměř každou nukleotidovou jednotku fosfátové skupiny. Řetězec náhodného klubka pak dovoluje sousedícím molekulám barviva se přiblížit dostatečně 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, 23]. 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.

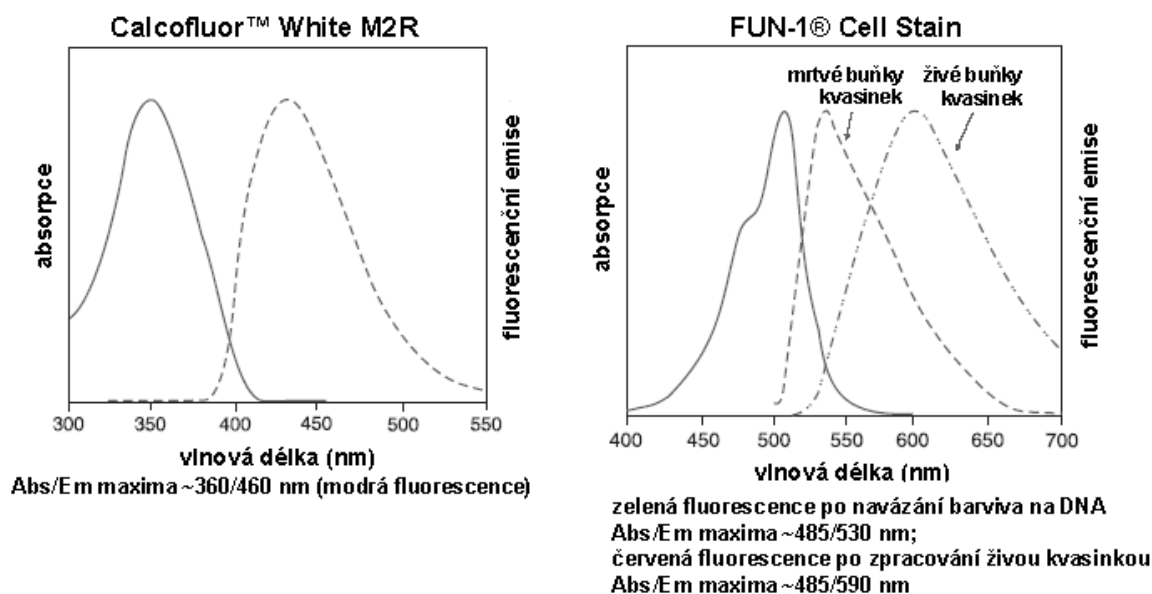


Obr. 14 Vazba fluoroforu k nukleové kyselině; strukturní vzorec akridinové oranži (AO); struktura komplexů DNA–AO [23]

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 [24–26]. Tato souprava obsahuje dvoubarevně fluorescenční barvivo FUN-1, které má nízkou vlastní fluorescenci, průměrnou afinitu k nukleovým kyselinám a mimořádnou membránovou propustnost [27]. Sada také zahrnuje UV excitovatelné barvivo Calcofluor White M2R pro buněčnou stěnu kvasinek a hub, které fluoreskuje modře bez ohledu na buněčný metabolický stav.

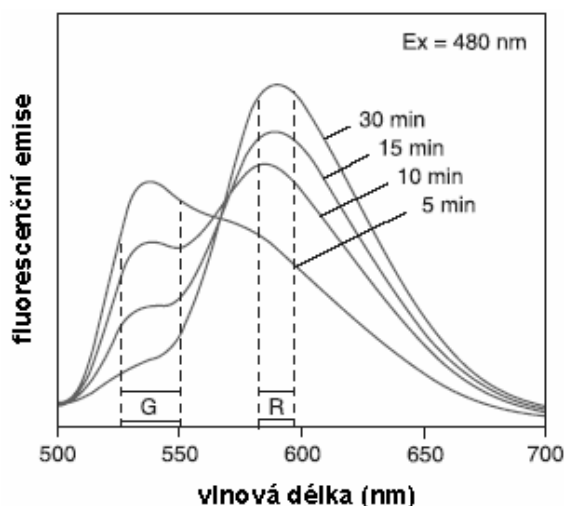


Obr. 15 Strukturální vzorce FUN-1, Calcofluor White M2R (fluorescent brightener 28; Tinopal LPW)



Obr. 16 Spektrální charakteristiky barviv [24]

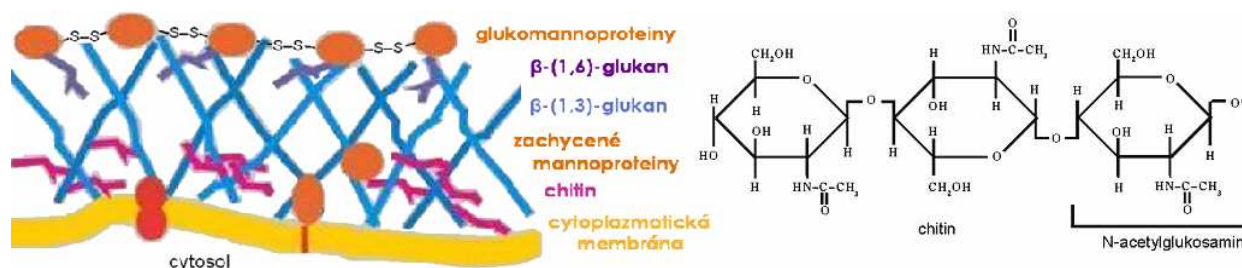
FUN-1 je nesymetrická cyaninová sloučenina s jedním kladným nábojem (obr. 15). Volné barvivo FUN-1 ve vodném roztoku nefluoreskuje, avšak pokud se spojí s DNA nebo RNA fluoreskuje po excitaci při 530 nm (obr. 16). FUN-1 barvivo vykazuje neobvyklé spektrální vlastnosti, když je použito na barvení metabolicky 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 [28–30]. 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.



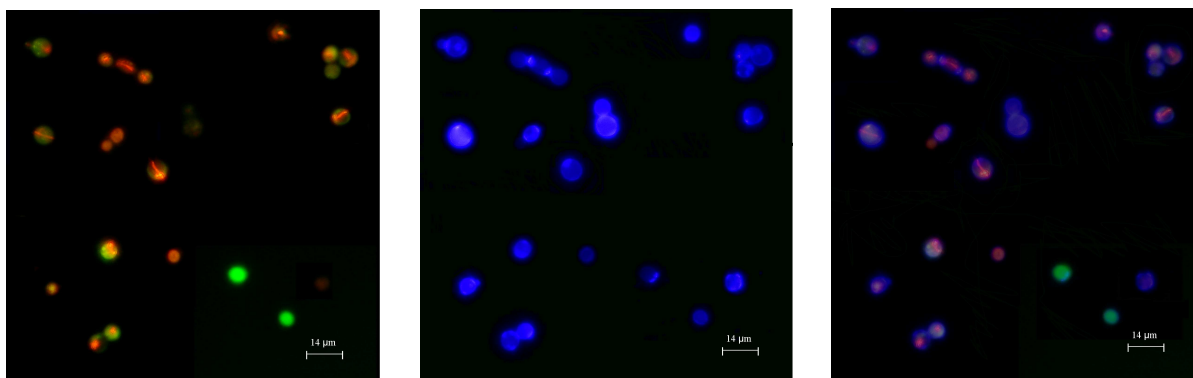
Obr. 17 Fluorescenční emisní spektra suspenze kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, která byla obarvena barvivem FUN-1 z LIVE/DEAD Yeast Viability Kitu. Po přidání FUN-1 do média, fluorescenční emisní spektrum (excitace při 480 nm) bylo zaznaménáno spektrofotometrem při různých časech během 30 minutové inkubační periody. Posun zelené (G) fluorescence k červené (R) je způsoben zpracováním FUN-1 barviva metabolicky aktivními buňkami kvasinek [28]

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 [31, 32].

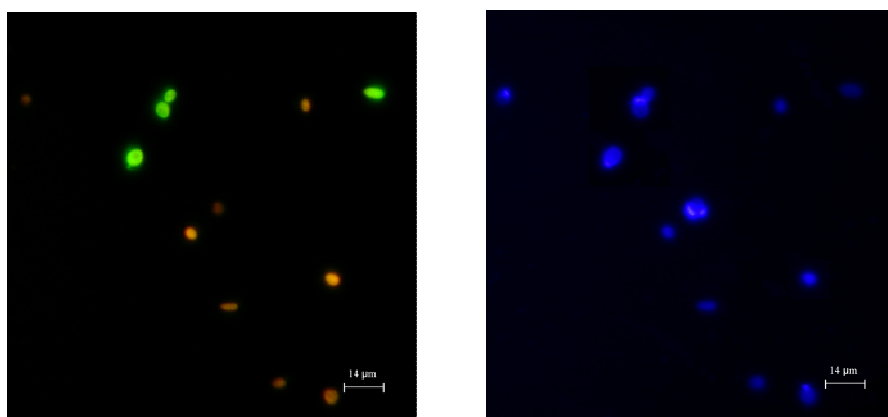
Vnitřní vrstva buněčné stěny kvasinek se skládá hlavně z β -1,3-glukanové sítě a chitinu, a reprezentuje přibližně 50–60 % suché hmotnosti stěny (obr. 18). Chitin se vyskytuje ve formě lineárních řetězců okolo krčku pupenů, v okolí zárodečné jizvy i v primárním septu. Přibližně 10 % z celkového množství 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 vázané disulfidovými můstky nebo některé jsou zadržovány v buněčné stěně iontovými a neiontovými interakcemi [33].



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 intravakuolárních 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 kvasničním extraktu za aerobních podmínek. Použitá filtrační kostka UV-2EC(DAPI) (uprostřed) a B-2A (vlevo) a objektiv 40 $\times$. 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 intravakuolárních 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, zrakově 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 řádků 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 jasů, 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 barevných 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 [34].

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 b bitů, je počet úrovní jasu $k = 2^b$. 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 [35]:

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

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

V trojrozměrném prostoru se pro objemový prvek používá pojem voxel 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.

2.5 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 bázi) celého původního obrazu. Bitovými operacemi takto získaného spektra lze pak např. odfiltrout 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 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 [36]:

- 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.

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

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 $m = 1, 2, \dots, M-1$, $n = 1, 2, \dots, N-1$ jsou souřadnice obrazu o velikosti $M \times N$, na diskrétní spektrum představované komplexní funkcí $F(k, l)$, kde $k = 1, 2, \dots, M-1$, $l = 1, 2, \dots, N-1$.

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

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 [36]:

$$MTF = \text{Re}[F(k, l)] + \text{Im}[F(k, l)] \quad (3)$$

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 [37].

Fourierova transformace se často používá při řešení diferenciálních rovnic na oboustranně neohrazené 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 [35]. 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 $F(k, l)$

$$F(k, l) = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} f(m, n) h_{m,k} h_{n,l}, \quad (4)$$

kde $h_{m,k}$ a $h_{n,l}$ jsou koeficienty tzv. Hadamardovy matice $\mathbf{H}_{N(M)}$

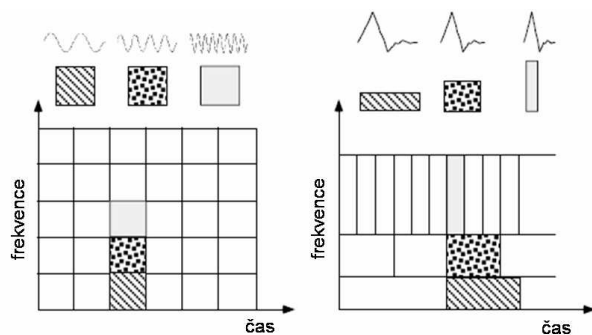
$$\mathbf{H}_1 = 1, \quad \mathbf{H}_2 = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 1 & -1 \end{bmatrix}, \dots, \quad \mathbf{H}_{n(m+1)} = \begin{bmatrix} \mathbf{H}_{n(m)} & \mathbf{H}_{n(m)} \\ \mathbf{H}_{n(m)} & -\mathbf{H}_{n(m)} \end{bmatrix}. \quad (5)$$

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 [36].

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 – vlnky. Tyto transformace se objevily až roku 1980 v práci A. Grossmanna a J. Morleta jako alternativa ke klasickým typům transformací [38]. Princip vyjádření složitějšího signálu jako lineární kombinace jednodušších bázevých 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 [39]. 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 [40].

Vlnkové transformace jsou od všech klasických transformací odlišeny tím, že každá bázeváž 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 bázevými 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 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 bázeváž funkce pokrývají po částech celý časový rozsah analyzovaného signálu, takže úplná informace je zachována.



Obr. 21 Porovnání Fourierovy a vlnkové analýzy založené na standardní vlnce Daubechiesové; pokrytí časově frekvenční plochy [38]

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 [39]. Při této transformaci je použito okno, které v čase ohraničí krátký úsek signálu a umožní z něj určit spektrum v daném časovém intervalu. Z obdoby Heisenbergova principu neurčitosti vyplývá, že nelze současně přesně určit

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

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. 21). Toto "okno" se nazývá mateřská vlnka ψ (*mother wavelet*). Pomocí parametru a , který se jmenuje měřítko, je možné měnit její šířku (dilatace), parametrem t zvaným poloha, se mění umístění vlnky na časové ose (translace). Translací a dilatací mateřské vlnky, která odpovídá konkrétní bázi lze vytvořit skupinu základních funkcí. Vlnková transformace navíc odstraňuje další nevýhodu všech metod časově frekvenční analýzy založených na Fourierově transformaci, které používají harmonických časově neomezených bazových funkcí. Tou je potřeba velkého počtu harmonických složek pro vyjádření strmých přechodů v čase. Signály často obsahují ostré hrany, impulsy nebo nespojitosti a 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 bazovými funkcemi je snazší a vede k menšímu počtu aktivních složek ve spektru než v případě harmonických bazových funkcí.

Vlnkový popis signálu je pro mnohé prakticky důležité typy signálu vhodnější, neboť poskytuje dostatečně přesný popis signálu s malým počtem spektrálních členů. Energie signálu je tedy efektivně komprimována do pouze malého počtu spektrálních koeficientů a to znamená vynikající schopnost kompaktní spektrální reprezentace, která je potřebná například ke kompresi dat. V této oblasti nyní nacházejí vlnkové transformace velmi důležité uplatnění.

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 function*). 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 funkcí $\psi(t)$. Lze také říci, že vlnková transformace je pouhou filtrací signálu, přičemž frekvenční vlastnosti filtru jsou dány tvarem vlnky.

Bázové funkce nejsou u vlnkové transformace přesně předepsány. Změnou průběhu bazových 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 typu vlnek (Haarovy,

Daubechiesové, biortogonální, tzv. coiflety nebo symlety apod.), jejichž vlastnosti jsou podrobně popsány a které pokryjí většinu běžných potřeb analýzy a zpracování signálů [39]. Některé vlnkové báze mají fraktální strukturu (např. Daubechies skupina) a poskytují velmi přirozený způsob analyzování fraktálů [41]. 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

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

$$S_{CWT}(a, b) = \int_{-\infty}^{\infty} s(t) \frac{1}{\sqrt{a}} \psi\left(\frac{t}{a} - b\right) dt, \quad a > 0, b \in \mathbb{R}. \quad (6)$$

Pro ψ 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 bázovou funkcí $(1/\sqrt{a})\psi(t/a - b)$, již je konkrétní vlnka. Aplikací CWT tedy získáme řadu koeficientů vyjadřujících podobnost signálu a vlnky. Charakteristickou vlastností všech vlnových transformací je, že základní předpis vlnky tzv. mateřská vlnka ψ , je stejný pro všechny vektory (a, b) . Parametr a , označovaný jako měřítko vlnky, ovládá časovou dilataci funkce; dělení 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

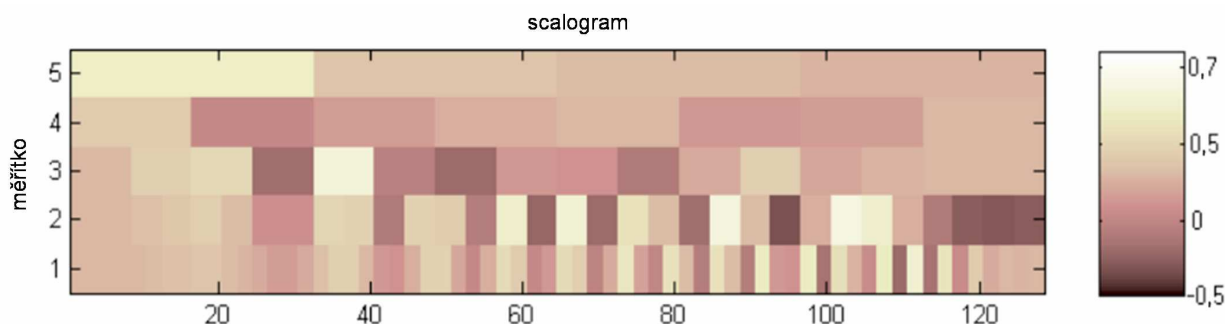
časový posun funkce podél časové osy. Změna tohoto parametru umožňuje postupně pokrýt vlnkami určitého konečného trvání celý časový rozsah signálu. Identifikace časového umístění spektrálních hodnot je ovšem možná s přesností, odpovídající délce konkrétního signálu. Další detaily o CWT lze nalézt v [42–45].

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 smrštíme) a opakujeme kroky 1 až 3.
5. Krok 4 opakujeme pro všechna zvolená měřítka.

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

Grafické vyjádření vlnkových koeficientů v rovině (b, a) se nazývá scalogram nebo vlnková mapa (*wavelet map*, obr. 22). Frekvenční osa u WT 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 [46].



Obr. 22 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 [47]

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 (oktávové) vzorkování, při němž uzlové hodnoty parametrů jsou dány jako

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

pak

$$\psi_{j,k}(t) = \frac{1}{\sqrt{2^j}} \psi\left(\frac{t}{2^j} - 2^j k\right), \quad (7)$$

kde j určuje měřítko, k polohu. Měřítka a je tedy vzorkováno v dyadické posloupnosti, zatímco časová osa b je dělena rovnoměrně. Vzorky spektra nesou v takto stanovených bodech (obr. 23) 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. Vlnka ψ je odvozena od měřítkové funkce ϕ (*scaling function*), která se chová jako dolní propust, a pomocí ní se získává aproximace signálu.

Podobně jako u vlnky musí měřítková funkce ϕ splňovat podmínku přípustnosti

$$\int_{-\infty}^{\infty} \phi(t) dt = 1. \quad (8)$$

Další krok při vývoji dyadické diskretní 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 [39]

$$S_{DWT}(j, k) = \sum_{n=0}^{N-1} s_n(t) \frac{1}{\sqrt{2^j}} \psi\left(\frac{t}{\sqrt{2^j}} - 2^j k\right), \quad (9)$$

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

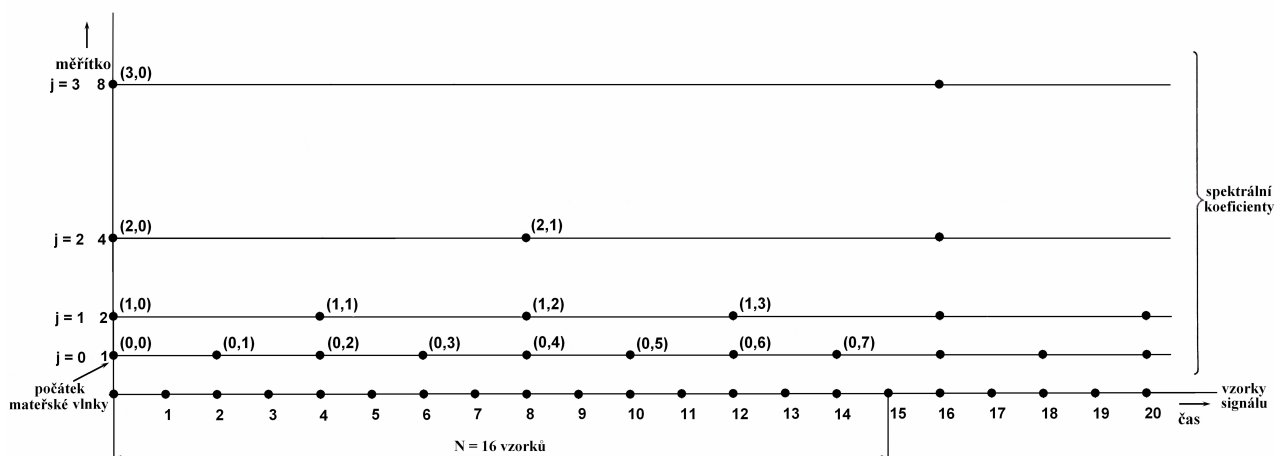
Důležitou roli představují tzv. nulové momenty. Vlnka $\psi(t)$ má k nulových momentů jestliže

$$\int_{-\infty}^{\infty} \psi(t) t^i dt = 0 \quad (10)$$

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 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 singularitě 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 hladkostí vlnka disponuje.

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



Obr. 23 Dyadické vzorkování v prostoru měřítko – čas [39]

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 [48]. S rostoucím měřítkem roste šířka pásma tohoto filtru. Dekompozici signálu lze pak provádět dvojicí zrcadlově kvadrurních filtrů (QMF), z nichž jeden je typu dolní propust h (*scaling filter*; *otcovský wavelet*), druhý horní propust g (*wavelet filter*). Pár kvadrurních 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 w , který má charakter dolní propusti. Po normalizaci podělením normou poskytne koeficienty dolnoproustního filtru h . K němu se vypočítá horní propust g jako komplement (kvadrurní zrcadlový filtr). Impulsní charakteristiku odpovídající dolní propusti lze vytvořit jako

$$g_0(n) = (-1)^n h_0(M_0 - 1 - n) \quad (11)$$

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 kvadrurní 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 propust přenese 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 vyšší 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. 24.

Jednotlivé konvoluce s decimací lze formulovat následujícími vzorci [48]:

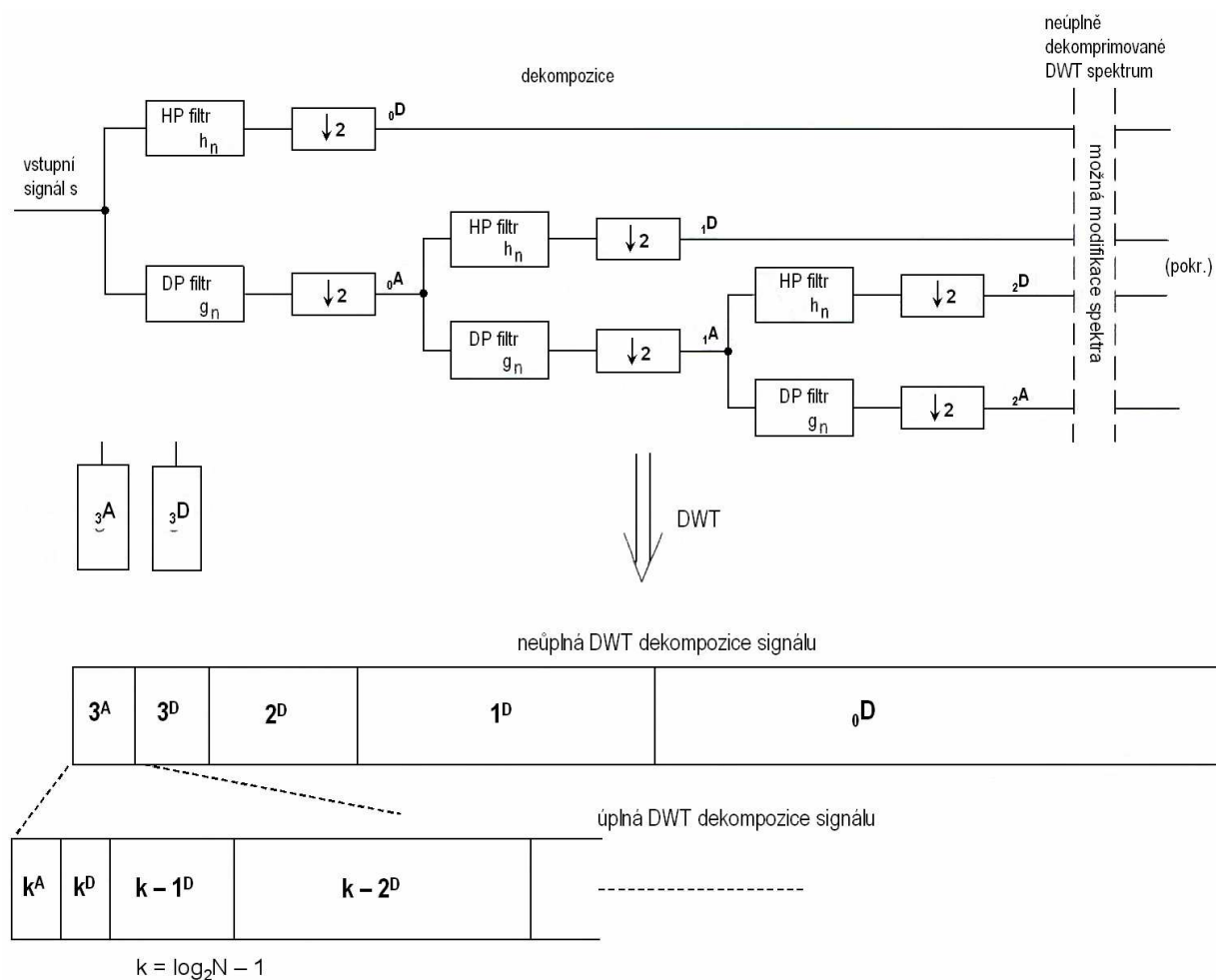
$$cA_{p+1}(k) = \sum_{m=1}^N h(m-2k)cA_p(m)$$

$$cD_{p+1}(k) = \sum_{m=1}^N g(m-2k)cA_p(m)$$
(12)

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 popsaném 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 nacházeli na lichých pozicích) a místo původních filtrů se použijí rekonstrukční filtry.



Obr. 24 Dyadická DWT-dekompozice signálu [39]

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) 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.

Bázové funkce vlnky jsou [49]:

$$\psi_{j,k}(t) = \frac{1}{\sqrt{2^j}} \psi\left(\frac{t}{2^j} - 2^j k\right), \quad (13)$$

kde

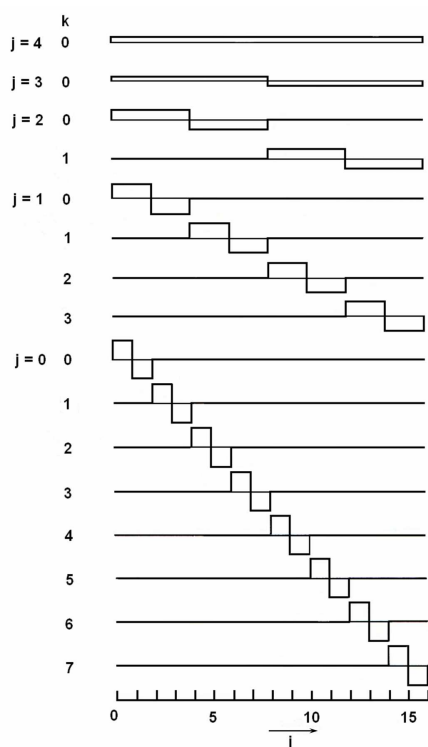
$$\psi(t) = \begin{cases} 1 & 0 \leq t < 1/2 \\ -1 & \text{pro } 1/2 < t < 1 \\ 0 & \text{jinak} \end{cases}. \quad (14)$$

Haarova transformace využívá nesymetrické Haarovy matice, jejíž prvky jsou 1, -1 násobené mocninami $\sqrt{2}$ nebo 0. Jádro této transformace je pro $N = 1, 2, 4, 8$ [50]:

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

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

Jednotlivé řádky reprezentují tzv. bázové funkce, na něž se rozkládá transformovaný signál. První řádek matice definuje střední hodnotu signálu a ostatní bázové 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 [39]. Haarovy bázové 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. 25 Bázové funkce spojité Haarovy transformace [50]

Na obrázku 25 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 [39].

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:

$$d_n = \frac{s_n - s_{n+1}}{2}, \quad n = 1, 2, \dots, N. \quad (15)$$

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:

$$a_n = \frac{s_n + s_{n+1}}{2}, \quad n = 1, 2, \dots, N. \quad (16)$$

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 rozdíl informací 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

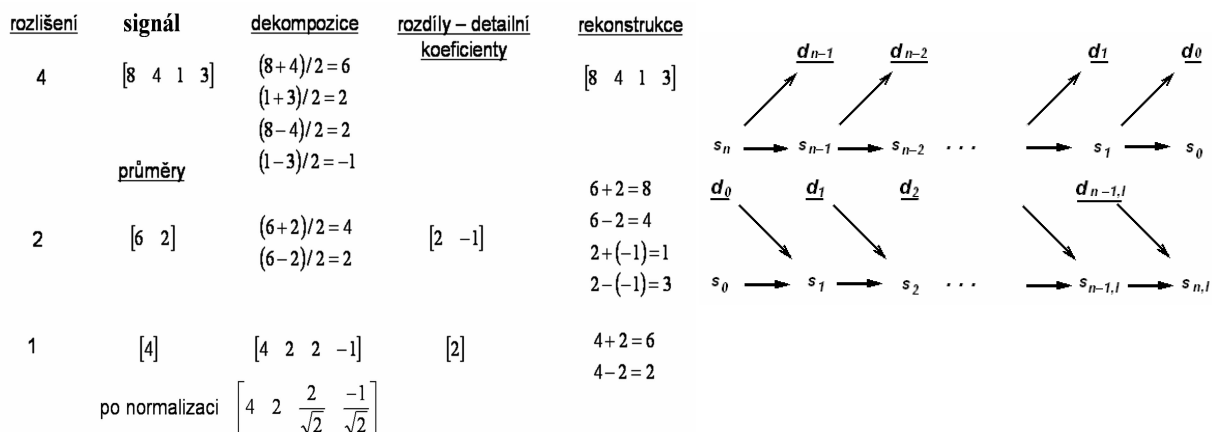
a tak může být vhodně reprezentován. Nejhrubší hladina signálu obsahuje jen jeden prvek, který je průměrem všech prvků originálního signálu, například nulová frekvence signálu.

Získané koeficienty a_n se stávají vstupem do dalšího kroku vlnkové transformace. V případě, že $N = 2L$ je tedy možný rozklad do L úrovní [47]. 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:

$$s_n = a_n + d_n$$

$$s_{n+1} = a_n - d_n$$



Obr. 26 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 separabilní dvojrozměrné diskrétní lineární transformace obrazu, který je reprezentován maticí celých čísel f a má rozměry $M \times N$ je součin matic [35]

$$F = P f Q, \quad (17)$$

kde P a Q rozměru $M \times M$, resp. $N \times N$ jsou řádkové resp. sloupcové transformační matice.

Pomocí součtů lze vztah vyjádřit jako

$$F(u, v) = \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} P(u, m) f(m, n) Q(n, v), \quad (18)$$

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

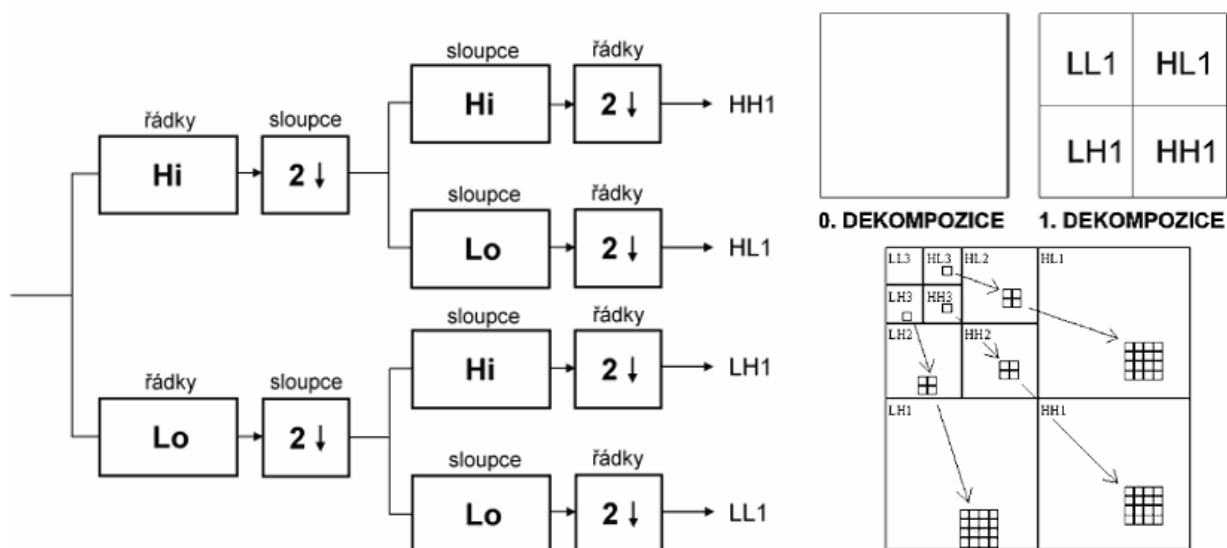
Pro regulární (tj. mají nenulové determinanty) matice P a Q lze zapsat inverzní transformaci

$$f = P^{-1} F Q^{-1}. \quad (19)$$

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*) [49]. 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. 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 [51, 52]. 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 [53]. 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 [44]. 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. 27).



Obr. 27 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 [51, 52]

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, narozdíl 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, jenž 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 $\text{top}(X)$:

$$\dim(X) > \text{top}(X). \quad (20)$$

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 níž existuje konečně mnoho kontrahujících zobrazení $\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_n$ takových, že X vznikne jako [54]:

$$X = \bigcup_{i=1}^n \phi_i(X). \quad (21)$$

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 [56].

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:

$$D = \frac{\log N}{\log \frac{1}{s}}, \quad (22)$$

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

Hausdorffova míra může být definována následovně [55]:

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

$$H_\varepsilon^d(X) = \inf \left\{ \sum_{i=0}^{\infty} |U_i|^d : X \subseteq \bigcup_{i=0}^{\infty} U_i, |U_i| \leq \varepsilon \right\}. \quad (23)$$

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

$$H^d(X) = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} H_\varepsilon^d(X) \quad (24)$$

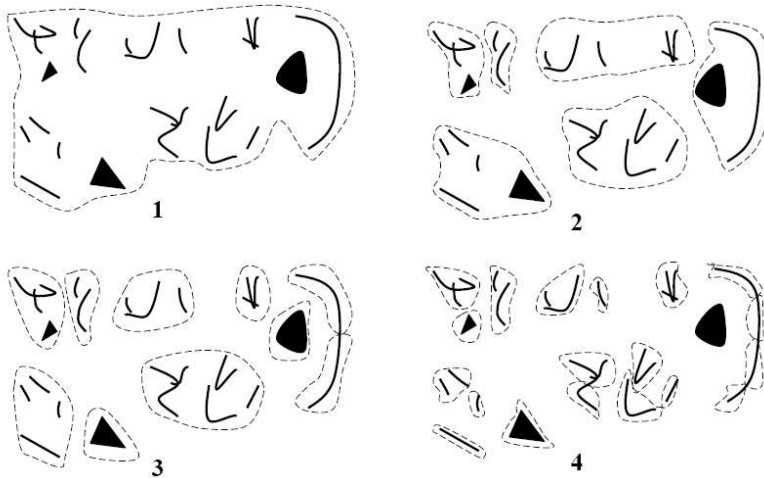
kde H^d je Hausdorffova d -dimenzionální míra.

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 [58, 59]:

$$\dim(X) = \inf \{d \geq 0 : H^d(X) = 0\} = \sup \{d \geq 0 : H^d(X) = \infty\}. \quad (25)$$



Obr. 28 Různá pokrytí množiny pro zmenšující se ε [58]

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 $N(\varepsilon)$ buněk nutných k pokrytí objektu. Počet buněk $N(\varepsilon)$ samozřejmě závisí na ε . Postup se opakuje pro různé velikosti čtverce pokládané 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

$$M_\varepsilon^d \approx \sum_{i=1}^{N(\varepsilon)} \varepsilon^d = N(\varepsilon) \cdot \varepsilon^d \rightarrow \begin{cases} \infty, & d < D \\ 0, & d > D \end{cases} \quad (26)$$

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.

$$D = -\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\ln N(\varepsilon)}{\ln \varepsilon}. \quad (27)$$

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 [59]. 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 [60].

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* [61]. 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 – odstínu šedé). Získáme fraktální dimenze obrazu v celé oblasti maskovacích podmínek.

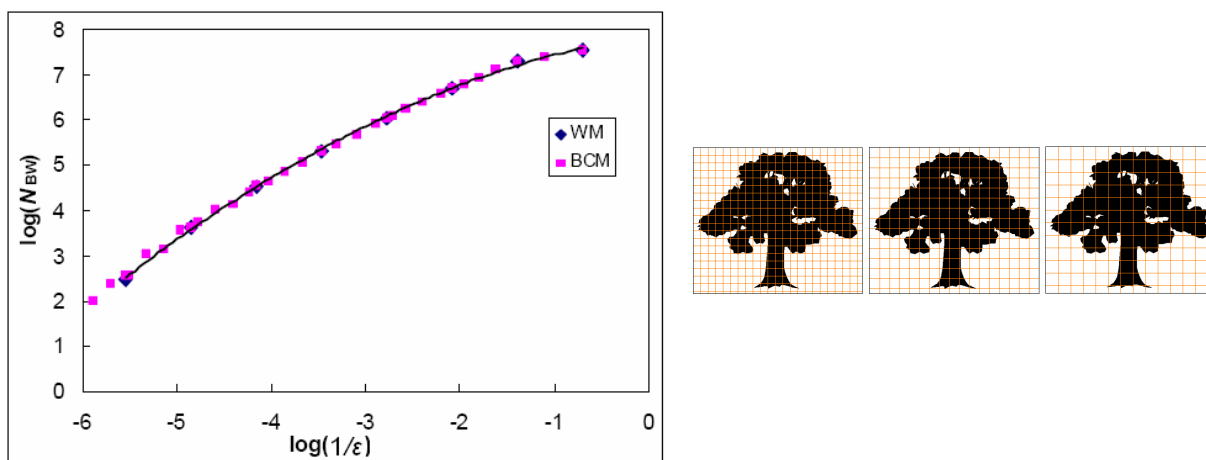
Box counting metodou v programu HarFA mohou být získány fraktální dimenze D_B , D_W , D_{BW} , D_{BBW} , D_{WBW} . D_B a D_W charakterizují fraktální vlastnosti černé a bílé plochy a jsou smysluplné pouze pro eukleidovské objekty (čára, kruh, čtverec). Pro výpočet dimenzí D_{BBW} a D_{WBW} lze použít 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

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

odkud

$$\ln N_{BW}(1/\varepsilon) = \ln K_{BW} + D_{BW} \ln(1/\varepsilon), \quad (28)$$

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 [61].



Obr. 29 Určení fraktální dimenze – metoda box counting. V grafu lze také vidět porovnání stanovení fraktální dimenze s wavelet metodou

Na obrázku 29 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

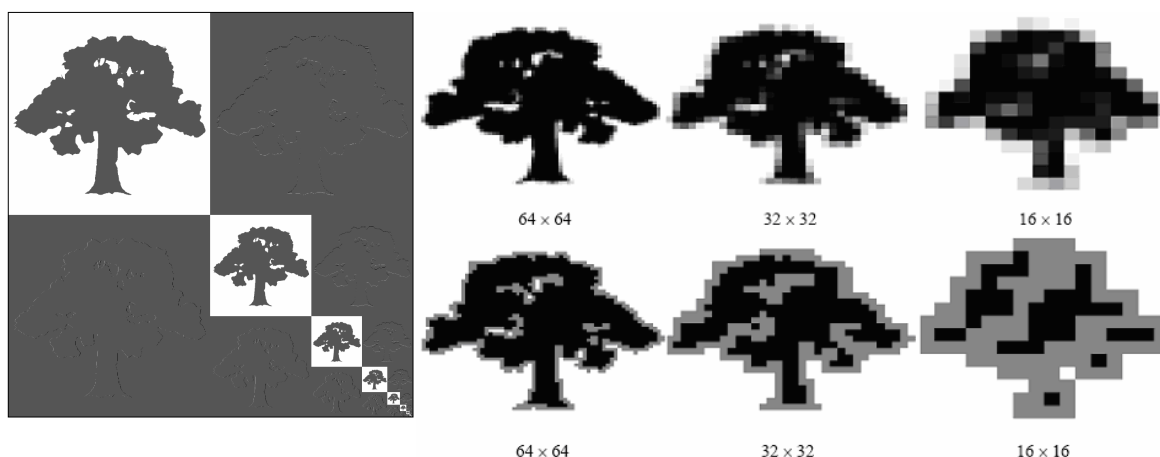
Z popisu box counting metody vyplývá, že je variací integrální metody. S využitím této znalosti lze nalézt vhodnou integrální transformaci, kterou lze použít k získání fraktálních parametrů (fraktální dimenze a míry) obrazových struktur při metodě box counting. Pomocí integrální transformace lze zjednodušit 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 diskretní spektrum představované reálnou funkcí $F(k, l)$ podle vztahu (4), 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 [62]. 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 30 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 čtverců sousedních pixelů, které mají hodnotu 0 (černé pixely) a 1 (bílé pixely) v originálním naprahovaném obrázku. Po první 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. 30 Stanovení fraktální dimenze a fraktální míry použitím vlnkové transformace

Plocha vyplněná vyšetřovanými pixely může být vyjádřena jako

$$S(n) = \frac{N(n)}{n^2} = K \cdot n^{D-2} \quad (29)$$

a délka čar v obrázku jako

$$L(n) = \frac{N(n)}{n} = K \cdot n^{D-1}, \quad (30)$$

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

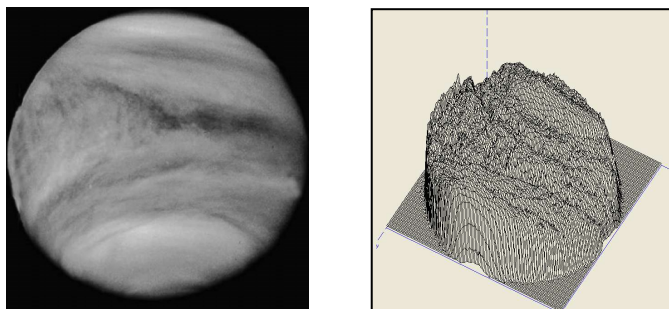
$$S_B = \frac{K_{BBW} - K_{BW}}{K_{BBW} + K_{WBW} - K_{BW}}, \quad S_W = \frac{K_{WBW} - K_{BW}}{K_{BBW} + K_{WBW} - K_{BW}} \quad (31)$$

a pro stanovení délky hraniční čáry objektu L v naprahaném obrázku

$$L = \frac{K_{BW}}{K_{BBW} + K_{WBW} - K_{BW}}. \quad (32)$$

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. 31). 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, ... $255 \cdot 2^{2n}$ a počet černobílých čtverců je dán zbývajících hodnotami [62].



Obr. 31 Stanovení fraktálních parametrů 3D objektu použitím wavelet metody

Objem vyplněný zkoumanými pixely může být vyjádřen jako

$$V(n) = \frac{N(n)}{n^3} = K \cdot n^{D-3}. \quad (33)$$

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

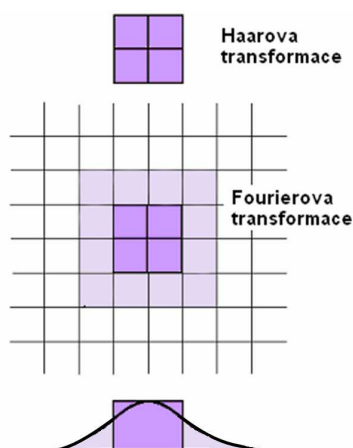
$$V_B = \frac{K_{BBW} - K_{BW}}{K_{BBW} + K_{WBW} - K_{BW}}, \quad V_W = \frac{K_{WBW} - K_{BW}}{K_{BBW} + K_{WBW} - K_{BW}} \quad (34)$$

a velikost plochy S

$$S = \frac{K_{BW}}{K_{BBW} + K_{BBW} - K_{BW}} \quad (35)$$

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. 32). Váha vzdálenějších bodů se úměrně snižuje až k nule se vzrůstající vzdáleností [64].



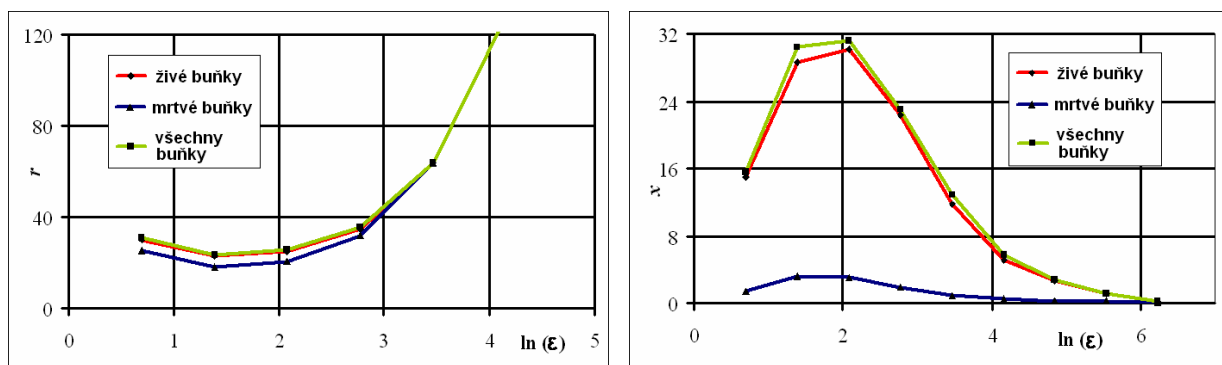
Obr. 32 Sčítání pixelů u Haarovy transformace a vliv okolních bodů při Fourierově transformaci: - vliv okolních bodů, - vliv vlastních bodů.

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

$$x = \frac{N_{BW}^2}{4\pi(N_B + N_{BW})}, \quad r = \sqrt{\frac{(N_B + N_{BW})\epsilon^2}{\pi x}}, \quad (36)$$

kde N_B je počet černých a N_{BW} počet černobílých čtverců o velikosti $\epsilon \times \epsilon$ pixelů. Výsledný počet definovaných objektů x je dán maximální hodnotou x z hodnot vypočítaných pro různé velikosti sítě (obr. 33). Maximální hodnota je zvolena, protože fraktální struktura je nejvhodněji ohraničena při dané velikosti sítě [64].



Obr. 33 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

$$L = N_{BW} \cdot \epsilon \Rightarrow r_L = \frac{N_{BW} \cdot \epsilon}{2\pi} \quad (37)$$

$$S = N_{BBW} \cdot \epsilon^2 \Rightarrow r_S = \sqrt{\frac{N_{BBW} \cdot \epsilon^2}{\pi}} \quad (38)$$

Shrnutím rovnic (37) a (38) lze získat poměr r_L/r_S :

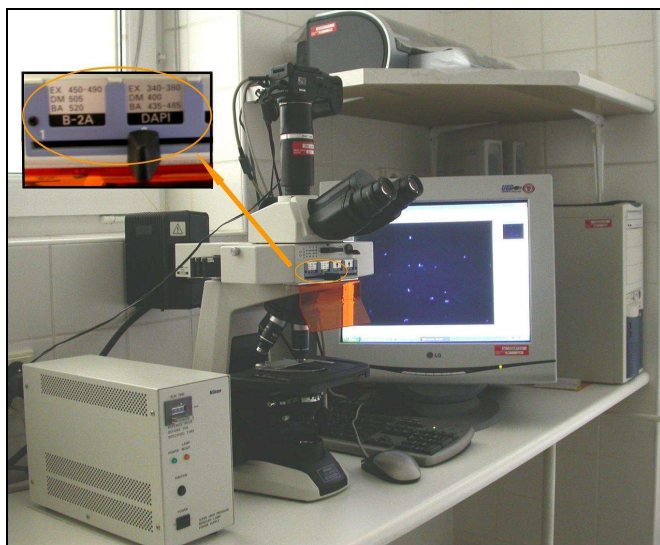
$$\frac{r_L}{r_S} = \frac{N_{BW}}{2\sqrt{\pi(N_B + N_{BW})}} \quad (39)$$

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 [65].

3. CÍL PRÁCE A DÍLČÍ VÝSLEDKY

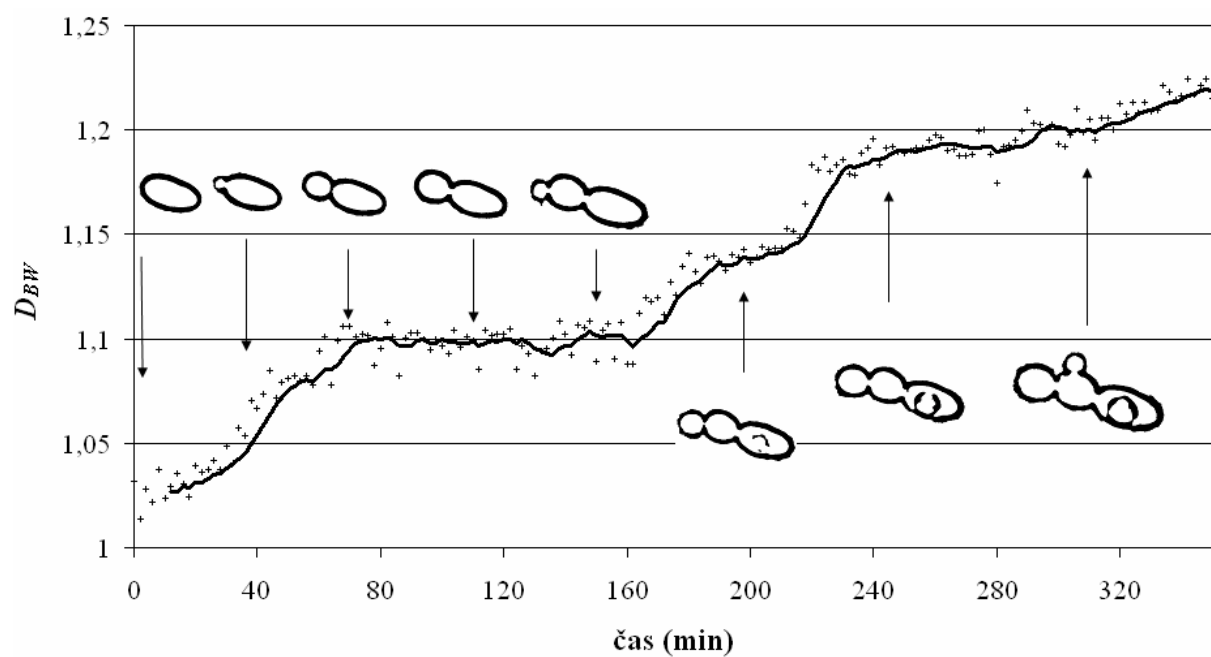
V rámci disertační práce „*Studium vlastností biologického materiálu pomocí metod obrazové analýzy*“ je pozornost zaměřena na sledování uplatnění metod obrazové analýzy, převážně fraktální analýzy, při studiu různých druhů kvasinek. Součástí práce je stanovení počtu buněk kvasinek a sledování růstu i dělení kvasinek pomocí fraktálních parametrů – fraktální míry D a fraktální dimenze K . Pozornost je také zaměřena nejen na využití stávajících metod obrazové analýzy, ale také na jejich renovaci (viz kap. 2.6.1).

Pro rychlé stanovení počtu buněk kvasinek se ukázala být vhodná metoda spojení fluorescenční mikroskopie s obrazovou analýzou. Pro rozlišení mrtvých a živých buněk bylo prozatím použito fluorescenční barvivo akridinová oranž, fluorescein diacetát, LIVE/DEAD Yeast Viability Kit. Při počítání živých a mrtvých buněk různých druhů kvasinek pomocí fraktální analýzy při daném experimentálním uspořádání (viz obr. 34) bylo zjištěno, že průměrná chyba stanovení počtu buněk je do 10 %. Tato chyba je způsobena nestejnou velikostí buněk a tvaru, rozdíly v barevnosti jednotlivých buněk a kvalitou zaznamenaného obrázku. Stejně jako při přímém stanovení počtu buněk byly pučící buňky počítány jako jedna buňka, nesla-li dceřinná buňka další pupen, ale ještě se neoddělila od buňky mateřské, byly počítány jako dvě. Zjištěné poloměry obrazů buněk kvasinek za předpokladu, že mají kulatý rozměrově spadají do hodnot uváděných v literatuře, případně jsou o něco větší. Při obrazové analýze je převážně využíván program HarFA, který byl vyvinut na Fakultě chemické VUT v Brně [59].

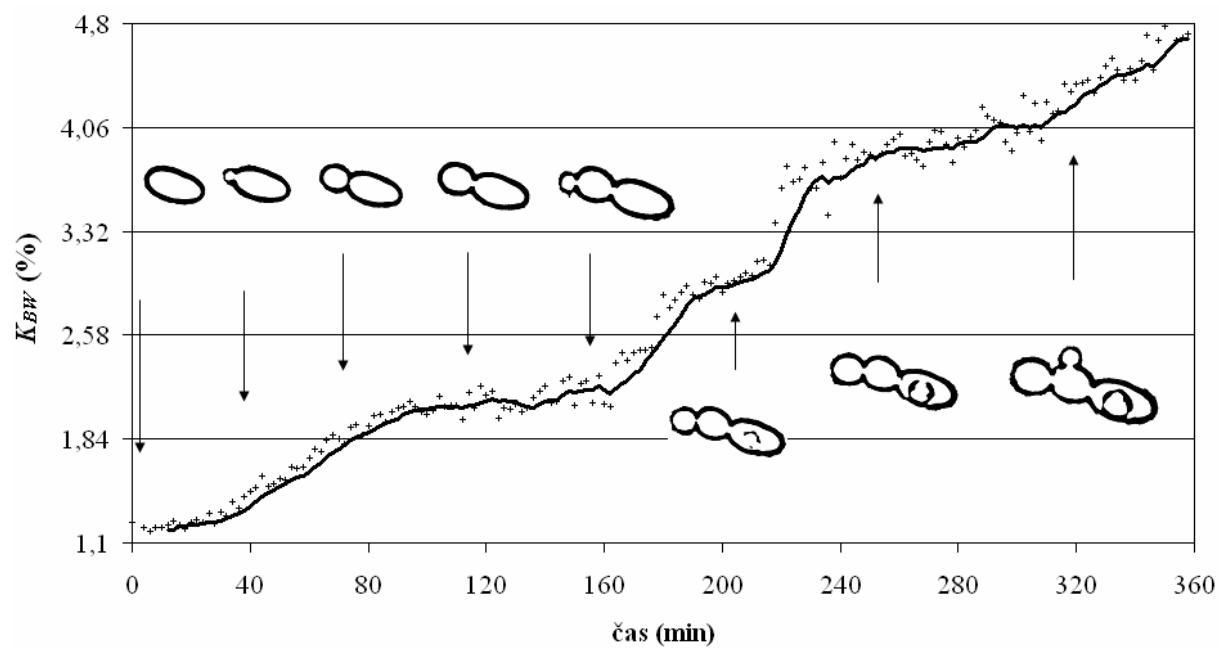


Obr. 34 Fotografie měřící aparatury

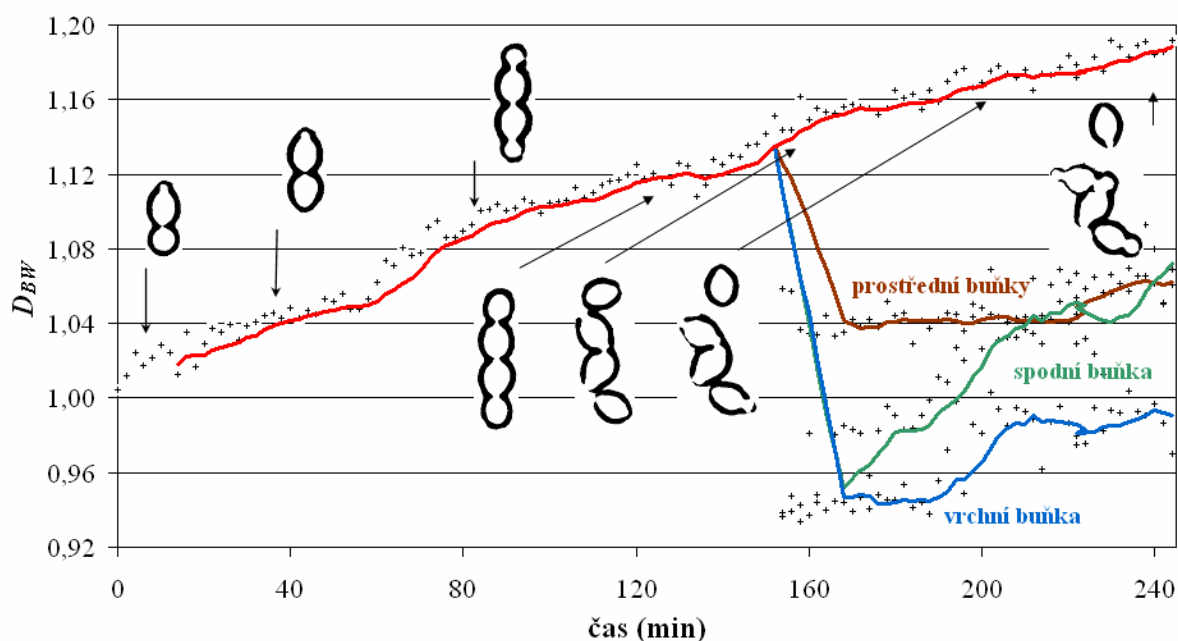
Při sledování růstu a rozmnožování bylo zjištěno, že po objevení pupenu dochází ke kontinuálnímu či skokovému vzrůstu fraktální dimenze, přičemž mezi jednotlivými skoky se nachází fáze relaxace, kdy se fraktální dimenze příliš nemění (obr. 35). Během fáze relaxace si buňka doplňuje látkovou a energetickou 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 dceřinné buňky prudce poklesne při oddělení od mateřské buňky. Trend vzrůstu fraktální dimenze při dalším dělení dceřinné buňky je opět obdobný jako u mateřské buňky (obr. 37). Při objevení pupenu dochází také ke vzrůstu fraktální míry (počet políček o stejné intenzitě).



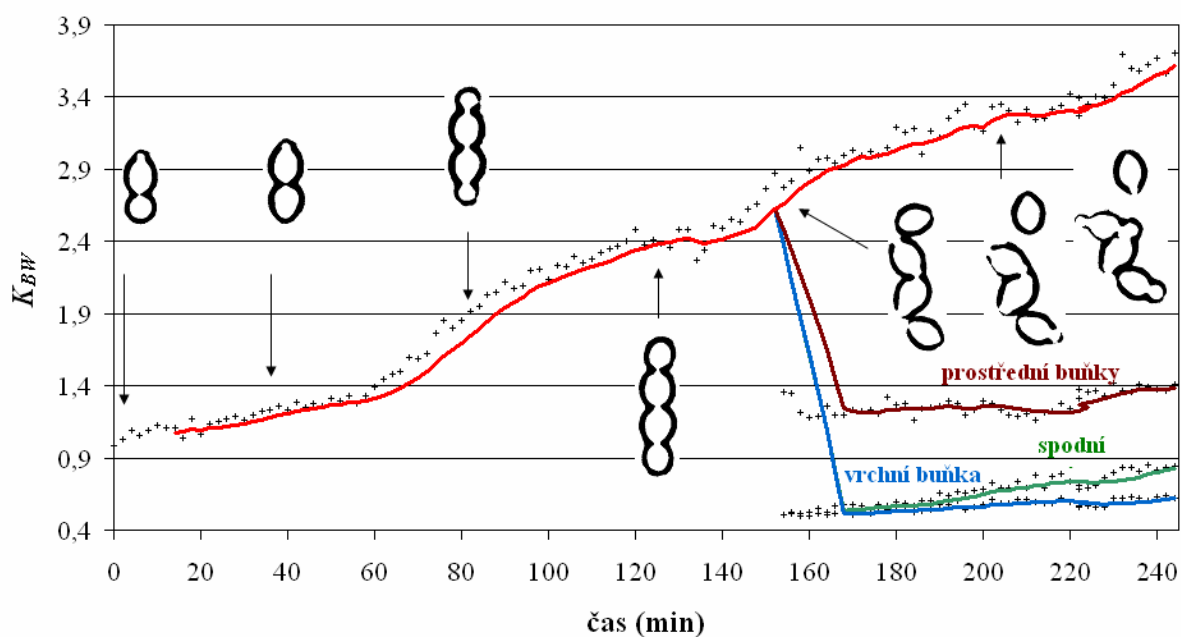
Obr. 35 Závislost fraktální dimenze D_{BW} na změně struktury kvasinky *Candida vini*. Zvětšení 2400×



Obr. 36 Závislost fraktální míry K_{BW} na změně struktury kvasinky *Candida vini*. Zvětšení 2400×



Obr. 37 Závislost fraktální dimenze D_{BW} kvasinky *Kloeckera apiculata* na čase. Zvětšení 2400 $\times$.



Obr. 38 Závislost fraktální míry K_{BW} kvasinky *Kloeckera apiculata* na čase. Zvětšení 2400 $\times$.

Dále bude pozornost směřována ke zjištění dalších parametrů a jejich změn během růstu a dělení buňky. K těmto parametrům patří např. zjišťování objemu a povrchu objektů k čemuž bude využita 3D fraktální analýza s vlnkovou transformací v programu HarFA.

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] Hampl, 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. *Vade-mecum 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] 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>>.

- [23] 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.
- [24] Molecular Probes. *Fluorescence Microplate Assay*, seventh edition, 2002 [2005-11-2]. Dostupné z: <<http://www.probes.com>>.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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>>.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] Mazáň, M., Mazáňová, K., Farka, V.: Bunková stena húb – výzva pre výskum nových antimykotík. *Chemické listy*, 2006, roč. 100, č. 6, s. 433-439. ISSN 0009-2770.
- [34] 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.
- [35] Hlaváč V., Sedláček M.: *Zpracování signálů a obrazů*. 1. vyd. Praha: ČVUT, 2000.
- [36] 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.
- [37] 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.

- [38] 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>>.
- [39] Jan J.: *Číslíková filtrace, analýza a restaurace signálů*. 2.vyd. Brno: VUTIUM, 2002. ISBN 80-214-2911-9.
- [40] Fiala, J.: Waveletová transformace. *Materials Structure in Chemistry, Biology, Physics and Technology*, 1999, vol. 6, no. 1, pp. 29-36. ISSN 1211-5894.
- [41] Wang A.L., Yang C.X., Yuan X.G.: Evaluation of the wavelet transform method for machined surface topography 2 : fractal characteristic analysis. *Tribology International*, 2003, vol. 36, pp. 527-535. ISSN 0301-679X.
- [42] Lee, D.T.L Yamamoto A.: *Wavelet Analysis: Theory and Applications*. Hewlett-Packard Journal, December 1994 [cit. 2006-5-21]. Dostupné z: <<http://www.hpl.hp.com/hpjournal-/94dec/dec94a6.pdf>>.
- [43] 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>>.
- [44] Semotán, J. *Demonstrace transformací*. ČVUT v Praze. Fakulta elektrotechnická. Katedra počítačů, 2001, 47 s. Vedoucí diplomové práce Doc. Ing. Miroslav Šnorek.
- [45] 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.
- [46] 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>>.
- [47] Gavlasová, A. *Wavelet transformace v analýze a číslíkovém 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>.
- [48] 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/~mklusar/postfinal.pdf>>.
- [49] 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.
- [50] Jan J., Kozumplík J.: *Systémy, procesy a signály*. Studijní texty pro obor Výpočetní technika a informatika. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1593-2.
- [51] 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.

- [52] Kurečka R., Kozumplík J.: Komprese medicínských obrazových dat s vyšší kvalitou ve vybraných oblastech. VUT v Brně. Fakulta elektrotechniky a informatiky. Ústav biomedicínského 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>.
- [53] 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.
- [54] 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>.
- [55] Ficker, T.: *Aplikace fraktální geometrie v přírodních a technických vědách*. Brno: VUTIUM, 2005. ISSN 1213-418X.
- [56] 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.
- [57] Ficker, T.: *Aplikace fraktální geometrie v přírodních a technických vědách*. Brno: VUTIUM, 2005. ISSN 1213-418X.
- [58] 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>.
- [59] 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>>.
- [60] 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.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] 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.

5. PŘEHLED PUBLIKACÍ A AKTIVIT

a) Prezentace publikací formou posterů na mezinárodních konferencích

Jeřábková, P., Tománková, K., Zmeškal, O., Veselá, M.: Studium vlastností kvasinek metodami obrazové analýzy. 56. sjezd chemických společností v Ostravě, *Chemické listy*, vol. 98, no. 8, 2004, s. 693. ISSN 0009-2770.

Jeřábková, P., Zmeškal, O., Veselá, M., Haderka J.: Využití waveletové transformace v mikrobiologii. *Digitální zobrazování v biologii a medicíně 2005* [CD-ROM], České Budějovice, 12.5. 2005.

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.

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.

Jeřábková, P., Zmeškal, O., Veselá, M.: Stanovení počtu buněk kvasinek pomocí fraktální analýzy. In *Chemické listy*, 58. sjezd chemických společností, 4–8. září, Ústí nad Labem, sborník. CHLSAC 100 (8) 561–776 (2006). ISSN 0009–2770.

b) Prezentace výsledků formou přednášky

Jeřábková, P.: Determination of Yeast Viability by means of Fluorescence Microscopy and Image Analysis, 8. ročník soutěže prací studentů doktorských studijních programů, FCH VUT Brno, 2005.

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.

c) Časopisecké a knižní publikace

Jeřábková, P., Tománková, K., Zmeškal, O., Veselá, M.: Studium vlastností kvasinek metodami obrazové analýzy. 56. sjezd chemických společností v Ostravě, *Chemické listy*, vol. 98, no. 8, 2004, s. 693. ISSN 0009-2770.

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.

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.

Jeřábková, P., Zmeškal, O., Veselá, M.: Stanovení počtu buněk kvasinek pomocí fraktální analýzy. In *Chemické listy*, 58. sjezd chemických společností, 4–8. září, Ústí nad Labem, sborník. CHLSAC 100 (8) 561–776 (2006). ISSN 0009–2770.

Tomankova, T., Jerabkova, P., Zmeskal, O., Vesela, M., Haderka, J.: The use of the Image Analysis to study the growth and the division of the yeast. *The Journal of Imaging Science and Technology* (accepted 8 June, 2006).

