



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΚΑΙ
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ»
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Διπλωματική Εργασία

ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΑΠΛΩΣΗΣ
ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΜΕ ΛΗΨΗ ΣΤΙΓΜΙΟΤΥΠΩΝ
(TIME LAPSE VIDEO)

Μπασάνου Ιφυγένεια

Επιβλέπων
Δελημπασης Κωσταντίνος
Επ. Καθηγητής

Λαμία, 2018



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF SCIENCE
INFORMATICS AND
COMPUTATIONAL
BIOMEDICINE**

Master thesis

**RECORDING AND MODELING OF MICROBIAL GROWTH
USING TIMELAPSE VIDEO**

Basanou Ifigenia

Supervisor: Delibasis Konstantinos

Lamia 2018

«Υπεύθυνη Δήλωση μη λογοκλοπής και ανάληψης προσωπικής ευθύνης»

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, και γνωρίζοντας τις συνέπειες της λογοκλοπής, δηλώνω υπεύθυνα και ενυπογράφως ότι η παρούσα εργασία με τίτλο «ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΑΠΛΩΣΗΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΜΕ ΛΗΨΗ ΣΤΙΓΜΙΟΤΥΠΩΝ (TIMELAPSE VIDEO)» αποτελεί προϊόν αυστηρά προσωπικής εργασίας και όλες οι πηγές από τις οποίες χρησιμοποίησα δεδομένα, ιδέες, φράσεις, προτάσεις ή λέξεις, είτε επακριβώς (όπως υπάρχουν στο πρωτότυπο ή μεταφρασμένες) είτε με παράφραση, έχουν δηλωθεί κατάλληλα και ευδιάκριτα στο κείμενο με την κατάλληλη παραπομπή και η σχετική αναφορά περιλαμβάνεται στο τμήμα των βιβλιογραφικών αναφορών με πλήρη περιγραφή. Αναλαμβάνω πλήρως, ατομικά και προσωπικά, όλες τις νομικές και διοικητικές συνέπειες που δύναται να προκύψουν στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής.

Ο/Η ΔΗΛΩΝ/-ΟΥΣΑ

Ημερομηνία

Υπογραφή

**ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΑΠΛΩΣΗΣ
ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΜΕ ΛΗΨΗ ΣΤΙΓΜΙΟΤΥΠΩΝ
(TIMELAPSE VIDEO)**

ΜΠΑΣΑΝΟΥ ΙΦΙΓΕΝΕΙΑ

Τριμελής Επιτροπή:

Κωνσταντίνος Δελήμπασης, Επίκουρος Καθηγητής (επιβλέπων)

Δημήτρης Ιακωβίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ιωάννης Τριανταφύλλου, Επίκουρος Καθηγητής

Επιστημονικός Σύμβουλος:

Κωνσταντίνος Δελήμπασης, Επίκουρος Καθηγητής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κατασκευή time lapse βίντεο αναπτυσσόμενων αποικιών μικροβίων, τα τελευταία χρόνια προσελκύει ολοένα και περισσότερο το επιστημονικό ενδιαφέρον, γεγονός που οφείλεται στην ευκολία καταγραφής στιγμιotypων με χρήση χαμηλού κόστους υλικού και λογισμικού.

Με χρήση κατάλληλων υπολογιστικών αλγορίθμων είναι δυνατή η άντληση πληροφοριών για την μοντελοποίηση της μικροβιακής ανάπτυξης. Οι μύκητες προκαλούν ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων, ορισμένες από τις οποίες απασχολούν τα υγιή άτομα, ενώ άλλες προσβάλλουν συνήθως ηλικιωμένους, νοσηλευόμενους ή ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς όπως εκείνους που έχουν προσβληθεί από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) ή νεογνά ειδικά εκείνα που λαμβάνουν παρατεταμένη αντιβιοτική θεραπεία.

Στην παρούσα εργασία, σχεδιάσαμε μια διάταξη συλλογής στιγμιotypων της εξέλιξης ενός μύκητα του γένους *Candida SPP*, αναπτύξαμε υπολογιστικό αλγόριθμο εξαγωγής καμπυλών επιβίωσης και χρησιμοποιήσαμε κατάλληλες μαθηματικές συναρτήσεις για την μοντελοποίηση τους.

Ο μύκητας που επιλέξαμε ήταν αποτέλεσμα καλλιέργειας κοιλιακού επιχρίσματος που προμηθευτήκαμε από ένα ιδιωτικό εργαστήριο. Ακολούθησε ανακαλλιέργεια του μύκητα σε ένα νέο αποστειρωμένο, αιματούχο τρυβλίο. Στη συνέχεια το τρυβλίο τοποθετήθηκε μέσα σε ένα επωαστικό κλίβανο που υπήρχε μια φωτεινή πηγή και μια web κάμερα. Η κάμερα συνδέθηκε μέσω λογισμικού με ένα φορητό υπολογιστή για να γίνει η λήψη των στιγμιotypων.

Το πείραμα αυτό έλαβε χώρα στο εργαστήριο Βιολογίας του τμήματος Πληροφορικής με εφαρμογές στη Βιοϊατρική, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με έδρα τη Λαμία. Ακολούθησε προεπεξεργασία των εικόνων, ώστε να εξαιρεθούν οι περιοχές εκτός του τρυβλίου, καθώς και τα όρια αυτού και επεξεργασία των εικόνων στο χρωματικό σύστημα RGB με σκοπό να ποσοτικοποιηθεί το πλήθος των μικροβίων σε κάθε pixel του τρυβλίου.

Καταρχάς ποσοτικοποιήσαμε το πλήθος των μικροβίων ανα pixel του τρυβλίου χρησιμοποιώντας έναν ευριστικό αλγόριθμο (heuristic) και παρατηρήσαμε ότι οι εξαγόμενες καμπύλες είναι συμβατές με τις θεωρητικά αναμενόμενες.

Στη συνέχεια έγινε διερεύνηση μαθηματικής μοντελοποίησης της χρονικής εξέλιξης του μύκητα για επιμέρους pixel του τρυβλίου με την λογιστική συνάρτηση με πολυώνυμο πρώτου και δευτέρου βαθμού. Η μοντελοποίηση έγινε με διαφορετικά μεγεθη περιοχής για τον υπολογισμό των παραμέτρων του μοντέλου και συμπεράναμε ότι όσο μεγαλώνει το μέγεθος της περιοχής η καμπύλη γίνεται πιο ομαλή και ο προσδιορισμός των παραμέτρων του μοντέλου πιο ακριβής. Επιπλέον, εφαρμόσαμε την έννοια της παραμετρικής εικόνας απεικονίζοντας μια ποσότητα ανάλογη του ρυθμού ανάπτυξης του μικροβιακού πληθυσμού.

Για το υπολογιστικό μέρος της εργασίας χρησιμοποιήθηκε το περιβάλλον ανάπτυξης MATLAB.

ABSTRACT

The development of time lapse videos for the study of growing microbial colonies has gained increasing scientific interest in recent years, due to the ease of photo acquisition using low-cost hardware and software.

By using appropriate computational algorithms it is possible to derive information about the modeling of microbial growth. Fungi cause a wide range of infections, some of which affect healthy individuals, while others usually affect elderly, hospitalized or immunosuppressed patients (such as those infected with human immunodeficiency virus -HIV), or infants, especially those who receive prolonged antibiotic therapy.

In the present study, we designed an experimental setup for periodic snapshot recording of the evolution of a fungus of the genus *Candida* SPP, thus creating a time-lapse video. We also developed a computational algorithm for the extraction of experimental survival curves, and we used appropriate mathematical functions to model them.

The fungus we chose was the result of cultivation of vaginal smear supplied by a private laboratory. After reculturing the fungus into a new, sterile, blooded plate, the plate was placed in an incubator, where a light source and a web camera had already been installed for the purposes of the experiment. The camera was connected via software to a laptop in order to create a time-lapse video. This experiment took place at the Biology Laboratory of the Department of Informatics with applications in Biomedicine, University of Thessaly, based in Lamia.

After completion of image acquisition, the images were pre-processed to exclude the areas outside the plate, as well as its boundaries. The images were processed in the RGB color system to quantify the number of microbes in each pixel of the plate. First we quantified the number of microbes per pixel of the plate using a heuristic logarithm and we noticed that the extracted curves are compatible with the theoretically expected.

A mathematical model of the time evolution of the fungus for individual pixel of the plate was investigated with logistic function which, although often used for this purpose, did not give satisfactory results for some pixels of the plate in this experiment. Instead, the use of a square exponent to this function has yielded satisfactory results as it can model and curve populations that eventually become decreasing. We experimented with different area sizes (number of pixels in the neighborhood) to calculate the model parameters and concluded that as the size of the area increases, the curve becomes smoother and the estimation of model parameters more accurate. In addition, we applied the concept of parametric image by depicting an amount proportional to the growth rate of the microbial population.

For the computational part of the work, the MATLAB development environment was used.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	8
1.2 Σκοπός της διπλωματικής	9
2.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
2.1. Γενικά περί μυκήτων.....	10
2.2. Μυκητες του γενους Candida.....	11
2.3. Λοιμώξεις από Candida.....	12
2.4 Η τεχνική του Time-lapse video	13
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	14
3.1 Πειραματική διαδικασία.....	14
3.2 Συλλογή εικόνων.....	17
3.3 Εκτίμηση πληθυσμού μικροοργανισμών από τις ληφθείσες εικόνες και εξαγωγή πειραματικών καμπυλών πληθυσμού.....	18
3.4 Εξομάλυνση της πειραματικής καμπύλης πληθυσμού.....	23
3.5 Μοντέλα ανάπτυξης πληθυσμών	24
3.5.1 Εκθετικό μοντέλο	24
3.5.2 Λογιστική Συνάρτηση (Logistic Function)	25
3.5.3 Λογιστική εξίσωση με Πολυώνυμο δευτέρου βαθμού ως εκθέτη	29
3.6 Παραμετρική Εικόνα.....	31
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
4.1 Εξαγωγή και μοντελοποίηση καμπυλών πληθυσμού από το σύνολο του τρυβλίου	32
4.2 Εξαγωγή και μοντελοποίηση καμπυλών πληθυσμού από περιοχή του τρυβλίου	33
4.3 Η επίδραση του μεγέθους της περιοχής στην εξαγόμενη καμπύλη.....	35
4.4 Παραμετρική εικόνα	39
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	46
6.ΑΝΑΦΟΡΕΣ	47

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Οι μυκητιακές λοιμώξεις στα ανοσοκατεσταλμένα άτομα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της αύξησης της συχνότητά τους, αλλά και της μεταβολής του φάσματος των παθογόνων μυκήτων που τις προκαλούν.

Η λοίμωξη από *Candida* είναι μια πολύ κοινή νοσοκομειακή λοίμωξη όπως αναφέρθηκε στην εργασία [Morrell, M., Fraser, V. J., & Kollef, M. H. (2005)]. Σύμφωνα με αυτήν οι λοιμώξεις από μυκητιασικές μολύνσεις, κυρίως εκείνες που προκαλούνται από είδη *Candida*, αποτελούν πλέον την τέταρτη συχνότερη λοίμωξη στην κυκλοφορία του αίματος στις Ηνωμένες Πολιτείες.

Τα τελευταία χρόνια η κατασκευή time lapse βίντεο αναπτυσσόμενων μικροβιακών αποικιών προσελκύει ολοένα και περισσότερο το επιστημονικό ενδιαφέρον γεγονός που οφείλεται στην σπουδαιότητα της άντλησης πληροφοριών για την μοντελοποίηση της μικροβιακής ανάπτυξης.

Το 1995 οι D.S. Gonzales, J.C. Pinheiro, B.D. Bavister στην εργασία τους προσπάθησαν να προβλέψουν τον ακριβή χρόνο της ανάπτυξης εμβρύων *in vitro*. Χρησιμοποίησαν φωτογραφική μηχανή (Nikon) και έκαναν καταγραφή με τη χρήση βιντεοκάμερας. Συνέλεξαν οκτώ ψηφιακές εικόνες από έναν προσωπικό υπολογιστή (486 /33 MHZ Gateway 2000) σε σταθερά διαστήματα (5, 10 ή 20 λεπτά). Η λογιστική παλινδρόμηση (Agresti, 1990) χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της πιθανότητας σχηματισμού βλαστοκυττάρων εμβρύων. Το 1994 είχε αποδειχθεί από τους McKiernan και Bavister η αντίληψη ότι ο ρυθμός ανάπτυξης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης βιωσιμότητας. Στην μελέτη τους επιβεβαίωσαν ότι έμβρυα ενός κυττάρου *in vitro* που αναπτύσσονται ταχύτερα *in vitro*, είναι πιο βιώσιμα από ότι τα πιο αργά αναπτυσσόμενα έμβρυα. Επιπλέον, απέδειξαν ότι η καταγραφή του ακριβούς χρόνου της ανάπτυξης του εμβρύου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της πιθανής ανάπτυξης *in vitro* με ακρίβεια έως και 92%.

Στην μελέτη [Lihui Zhao, Yuhuan Chen, & Donald W. Schaffner (2001)] χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από την έρευνα τους, αλλά και από τη βιβλιογραφία και τα μοντελοποιήθηκαν με την γραμμική παλινδρόμηση και τη λογιστική παλινδρόμηση. Χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικές προσεγγίσεις για να συγκριθεί η εφαρμογή των δύο μοντέλων.

Η λογιστική εξίσωση εφαρμόστηκε για την μοντελοποίηση πληθυσμών του εντόμου *Iantrasthen* μελέτη [Schenk, D., & Bacher, S. (2002)], κατά την οποία πραγματοποιήθηκε βιντεοσκόπηση σε εξωτερικό χώρο με χρήση 8 καμερών, κάθε μια εκ των οποίων λάμβανε ένα στιγμιότυπο ανά 28 δευτερόλεπτα.

Επίσης εξαιρετικό ενδιαφέρον είχε η μελέτη [Mark Robin Holmes Hurst, Chikako van Koten, Trevor Anthony Jackson (2014)] στην οποία εξέτασαν την παθολογία του βακτηρίου *Yersinia entomophaga*, κατά την μόλυνση του εντόμου *Costelytra*

zealandica, χρησιμοποιώντας την τεχνική time-lapse. Τροφοδότησαν τα έντομα με κύβους καρότου, μολυσμένους από το βακτήριο *Yersinia entomophaga*, σε διαφορετικές δόσεις κάθε φορά. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε η συμπεριφορά των εντόμων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18 ° C) λαμβάνοντας φωτογραφίες ανά 10 λεπτά με φωτογραφική κάμερα Nikon d700 για 48 ώρες. Οι εικόνες χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή ενός time-lapse video με χρήση του λογισμικού Adobe Premiere Pro CS4 σε αρχείο AVI. Το βίντεο αυτό επεξεργάστηκε για να παρατηρήσουν την συμπεριφορά των εντόμων από τη στιγμή της κατάποσης μέχρι το θάνατό τους, με τη βοήθεια φθορίζουσων χρωστικών.

Τον περασμένο χρόνο στην εργασία [Maria Peñil Cobo¹, Silvia Libro, Nils Marechal, David D'Entremont, David Peñil Cobo & Mehmet Berkmen (2017)] καταγράφηκε και μελετήθηκε η μορφολογία διάφορων αποικιών μικροβίων. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποίησαν είναι *Streptomyces* (coelicolor, viridochromogenes, albus), , *Bacillus subtilis* E42, *Serratia marcescens*, *Arthrobacter agilis* και *Nestekonia* SP. Δημιούργησαν έναν ειδικό θάλαμο με ελεγχόμενη υγρασία (MOCHA -Microbial Chamber), για την ανάπτυξη των βακτηριακών αποικιών σε δυο τρυβλία Petri, τα οποία διατηρούνταν μέχρι 40 ημέρες. Οι εικόνες της μικροβιακής ανάπτυξης συλλέχθηκαν ανά 10 λεπτά χρησιμοποιώντας την κάμερα Nikon D3200.

1.2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής ήταν τετραπλός. Αρχικά να διερευνηθεί η δυνατότητα για εύκολη και χωρίς κόστος λήψη πολλών στιγμιότυπων από ένα τρυβλίο ανάπτυξης μικροοργανισμών, ώστε να αποτυπώνεται χρονικά η εξέλιξη του με χρήσιμης φτηνής web camera. Δεύτερον να διερευνηθεί η ποσοτικοποίηση του πλήθους των μικροβίων σε κάθε pixel του τρυβλίου με χρήση τεχνικών επεξεργασίας εικόνας. Τρίτον σε συνέχεια των προηγούμενων, να γίνει διερεύνηση της μαθηματικής μοντελοποίησης της χρονικής εξέλιξης του μικροοργανισμού για κάθε σημείο του τρυβλίου. Τέλος εφαρμόστηκε η έννοια της παραμετρικής εικόνας με διαφορετικά μεγεθη περιοχής με σκοπό την εξαγωγή πειραματικής καμπύλης πληθυσμού σε κάθε pixel του frame και τον υπολογισμό των τιμών των παραμέτρων του μοντέλου.

Τα δεδομένα που χρησιμοποιήσαμε παρήχθησαν στο πλαίσιο της εργασίας, από πείραμα που πραγματοποιήσαμε στο εργαστήριο Βιολογίας του τμήματος Πληροφορικής με εφαρμογές στη Βιοϊατρική, του Πανεπιστημίου της Θεσσαλίας με έδρα τη Λαμία. Για το πείραμα αυτό σχεδιάσαμε μια διάταξη συλλογής στιγμιότυπων της εξέλιξης ενός μύκητα του γένους *Candida* SPP σε ένα τρυβλίο, με χρήση μίας φτηνής usb web camera και του προγράμματος video-velocity free (basic edition). Έτσι παρήχθη ένα βίντεο time-lapse με 1 στιγμιότυπο ανά 15 δευτερόλεπτα, το οποίο περιλαμβάνει συνολικά 12.099 εικόνες. Οι πρώτες 413 εξαιρέθηκαν από την εργασία λόγω σφάλματος που προκύπτει στην επεξεργασία τους αργότερα. Οι εικόνες επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Matlab.

2.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΜΥΚΗΤΩΝ

Υπάρχουν πάνω από 200.000 είδη μυκήτων στη φύση, από τους οποίους οι περισσότεροι είναι ωφέλιμοι για τον άνθρωπο. Οι μύκητες χρησιμεύουν στην αποικοδόμηση και ανακύκλωση της οργανικής ύλης. Πολλοί απ' αυτούς χρησιμεύουν στην παραγωγή τροφών, ποτών, αντιβιοτικών και ανοσοκατασταλτικά φάρμακων. Ωστόσο κάποια είδη μυκήτων προκαλούν νόσο στον άνθρωπο. Οι περισσότεροι παθογόνοι μύκητες βρίσκονται στο έδαφος, στο νερό και σε υπολείμματα οργανικής ύλης, ενώ ορισμένοι (*Candida*, δερματόφυτα) αποτελούν μέρος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας του σώματος. Όλοι οι μύκητες είναι ετερότροφοι ευκαριωτικοί οργανισμοί που διαθέτουν κυτταρόπλασμα με πολυάριθμους πυρήνες. Περιβάλλονται επίσης από κυτταρικό τοίχωμα το οποίο καθορίζει το σχήμα τους και αποτελείται από πολυσακχαρίτες, λιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες. Οι περισσότεροι μύκητες είναι υποχρεωτικά ή προαιρετικά αερόβιοι οργανισμοί. Οι μύκητες αναπτύσσονται με δύο βασικές μορφές: α) βλαστομύκητες (yeasts) και β) υφομύκητες (molds). Οι βλαστομύκητες έχουν σφαιρικό ή ελλειψοειδές σχήμα και πολλαπλασιάζονται με το σχηματισμό εκβλαστήσεων (budding). Οι υφομύκητες σχηματίζουν νηματοειδείς αποικίες που λέγονται υφές (hyphae). Ορισμένα είδη μυκήτων παρουσιάζουν διμορφισμό και μπορούν να αναπτύσσονται είτε ως βλαστομύκητες είτε ως υφομύκητες, ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος στις οποίες βρίσκονται. Ακόμη οι μύκητες σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες σχηματίζουν ενδοσπόρια, τα οποία είναι ανθεκτικά αφυδατωμένα κύτταρα με χαμηλούς μεταβολικούς ρυθμούς που μπορούν να βλαστάνουν, όταν οι συνθήκες ξαναγίνουν ευνοϊκές. Τα ενδοσπόρια παράγονται με δύο τρόπους : α) ασεξουαλικά, με μιτωτική αναπαραγωγή κυττάρων βλαστό- ή υφομυκήτων, β) σεξουαλικά, όταν τα κύτταρα από συμβατά στελέχη υφίστανται μείωση, συντήκονται και στη συνέχεια συνενώνουν το γενετικό τους υλικό.

2.2. ΜΥΚΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ CANDIDA

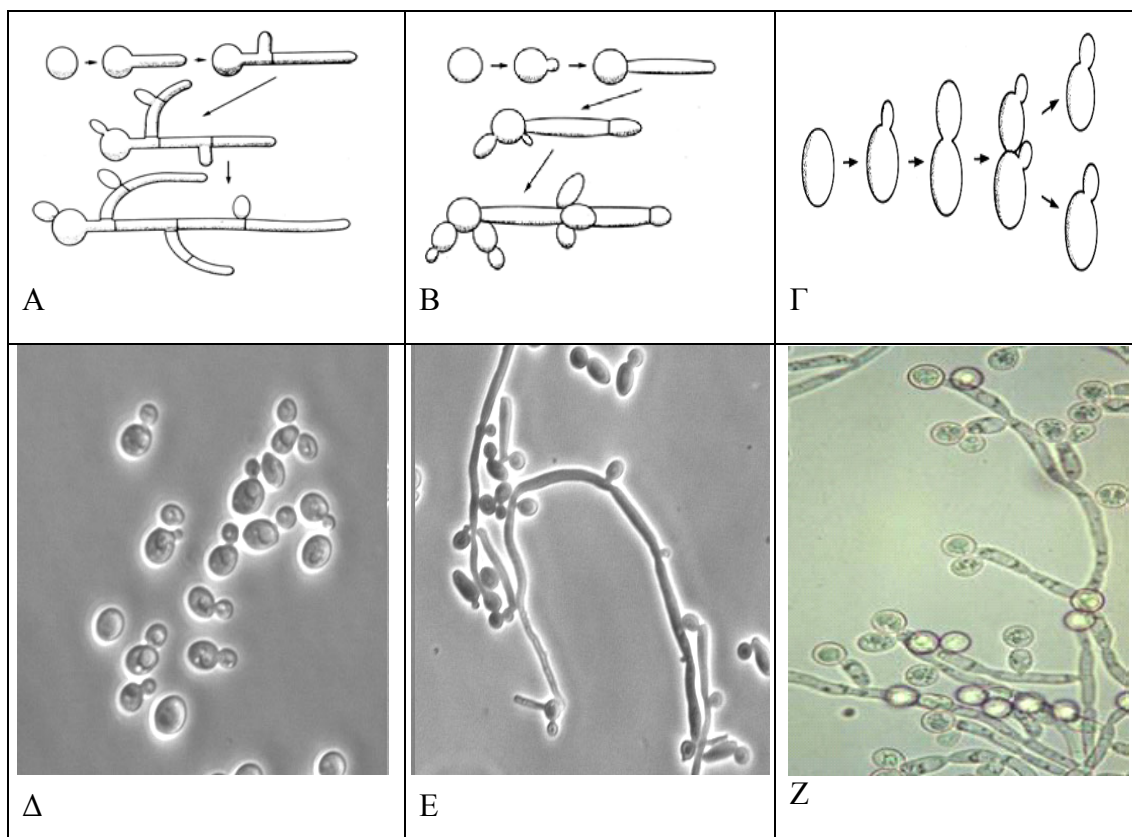
Το γένος *Candida* περιλαμβάνει περίπου 200 είδη, από τα οποία το 65% δεν είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Οι μύκητες του γένους *Candida* αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του σώματος και μπορούν να προκαλέσουν ευρύ φάσμα λοιμώξεων από τις οποίες οι σοβαρότερες αφορούν ειδικές κατηγορίες ασθενών, όπως οι ανοσοκατεσταλμένοι. Η *Candida*, είναι η πιο κοινή αιτία μυκητιασικών λοιμώξεων παγκοσμίως. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης των μυκήτων *Candida* SPP είναι 30-37 °C όμως αναπτύσσονται καλά σε αιματούχα στερεά θρεπτικά υλικά σε θερμοκρασία δωματίου. Η *Candida*, εμφανίζει λείες αποικίες στρογγυλές, λευκές οι οποίες εκπέμπουν ζυμώδη οσμή όπως βλέπουμε στην εικόνα 1. Ορισμένοι παράγοντες όπως η παρατεταμένη χρήση αντιβιοτικών, στεροειδών, η εγκυμοσύνη και η εμμηνόρροια μπορούν να συμβάλουν στην εμφάνιση μόλυνσης από ζυμομύκητα. Άτομα με καρκίνο, διαβήτη, AIDS ή εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, είναι πιο επιρρεπείς στις λοιμώξεις από *Candida*. Σε υγιή άτομα, οι μολύνσεις αυτές μπορούν να θεραπευτούν με αντιμυκητιασικά φάρμακα. Τα τελευταία χρόνια οι λοιμώξεις από στελέχη του γένους *Candida* παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω αύξησης της συχνότητας τους και της μεταβολής του φάσματος των παθογόνων μυκήτων που τις προκαλούν.



Εικόνα 1. Μακροσκοπική μορφολογία *Candida* SPP. Έπειτα από καλλιέργεια κλινικού δείγματος διακρίνονται οι λείες αποικίες σε συνθήκη καλλιεργητικά υλικά.

Οι μύκητες του γένους *Candida* αποτελούν μια ιδιαίτερα ετερογενή ομάδα οργανισμών που εμφανίζονται με διάφορες μορφές (είτε σε καλλιέργεια είτε στον ξενιστή). Κατά την άμεση μικροσκόπηση κλινικού υλικού, εμφανίζεται ως μονοκύτταρα βλαστοκύτταρα (yeasts) (εικόνα 1A, Δ). Υπό κατάλληλες συνθήκες, όπως στη θερμοκρασία των 37°C, βρίσκεται και ως πολυκύτταρος οργανισμός σχηματίζοντας επιμήκεις εκβλαστήσεις από τα βλαστοκύτταρα που σχηματίζουν ψευδοϋφές (εικόνα 1Γ). Όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος που αναπτύσσονται γίνουν δυσμενείς πάνω στις ψευδοϋφές παράγονται και ανθεκτικά σπόρια, που ονομάζονται χλαμυδοσπόρια (εικόνα 1Ζ). Ορισμένοι μύκητες σχηματίζουν πραγματικές υφές (hyphae) (εικόνα 1B και E) και θεωρούνται ως πολυμορφικοί μύκητες. Οι παράγοντες του περιβάλλοντος, που ευνοούν τη δημιουργία

εκβλαστήσεων, είναι θερμοκρασία >35°C και pH 6,5 με 7 ή ελαφρώς αλκαλικό. Χαμηλότερες θερμοκρασίες και όξινο pH ευνοούν το σχηματισμό βλαστοκυττάρων.



Εικόνα 2. Μορφές ανάπτυξης των μυκήτων του γένους *Candida*. Όλα τα είδη αναπτύσσονται με τη μορφή των βλαστοκυττάρων (Α και Δ) και τα περισσότερα παράγουν κάποια μορφή ψευδοϕύης (Γ). Οι πολυμορφικοί μύκητες που παράγουν και πραγματικές υφές (Β και Ε). Οι εκβλαστήσεις εμφανίζονται σε διάφορα σημεία της επιφάνειας του κυττάρου. Σε περιβάλλον με μειωμένη επιφανειακή τάση και όξινο pH σχηματίζονται ανθεκτικά χλαμυδοσπόρια πάνω στις ψευδοϕές (βέλη, Ζ) (<http://panacea.med.uoa.gr>)

2.3. ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΑΠΟ CANDIDA

Οι μύκητες προκαλούν ένα ευρύ φάσμα λοιμώξεων, ορισμένες από τις οποίες προσβάλλουν υγιή άτομα, ενώ άλλες προσβάλλουν ηλικιωμένους, ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς ή νεογνά. Η κοιλιακή μόλυνση από *Candida* είναι η πιο κοινή μορφή κοιλίτιδας αναφέρεται συχνά ως κοιλιακή *Candidiasis*. Ο όρος καντιντίαση αναφέρεται κυρίως σε λοιμώξεις που προκαλούνται από το κλασικό ευκαιριακό παθογόνο *Candida albicans* ή από άλλα είδη *Candida*. Ο μύκητας *Candida* SPP (*albicans* & *non albicans*) είναι η πιο συνηθισμένη αιτία μυκητιασικών λοιμώξεων και υφίστανται με τη μορφή βλαστομυκήτων ή ψευδοϕών. Υπάρχουν περισσότερα από 20 είδη *Candida*. Αυτοί οι μύκητες ζουν σε όλες τις επιφάνειες του σώματός μας. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να

προκαλέσουν λοιμώξεις, ιδιαίτερα σε θερμές και υγρές περιοχές. Οι λοιμώξεις αυτές εμφανίζονται:

- Σε υγιείς ξενιστές (Στοματική καντιντίαση, Αιδιοκολπίτιδα, Ονυχομυκητίαση)
- Σε πρόωρα νεογνά (μπορεί να προκαλέσει συστηματική λοίμωξη, εκδηλώσεις στο δέρμα, τους οφθαλμούς, τα οστά, το κυκλοφοριακό και το αναπνευστικό σύστημα)
- Σε (ανοσοκατεσταλμένους) ογκολογικούς και μεταμοσχευμένους ασθενείς που διατρέχουν ιδιαίτερα αυξημένο κίνδυνο προσβολής από συστηματική λοίμωξη από *Candida* με πολλά προσβεβλημένα όργανα (σπλήνας, ήπαρ, νεφροί, πνεύμονες).

Σπάνια, η μόλυνση από *Candida* μπορεί να εξαπλωθεί σε όλο το σώμα.

2.4 Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΟΥ TIME-LAPSE VIDEO

Ο αγγλικός όρος time-lapse αναφέρεται στα Συστήματα Φωτογραφικής Αποτύπωσης χρονικών μεταβολών μεγάλης διάρκειας. Time lapse είναι η λήψη εικόνας ανά τακτά χρονικά διαστήματα, τα οποία είναι πολύ μεγαλύτερα από την περίοδο λήψης στιγμιότυπων ενός τυπικού βίντεο. Πιο συγκεκριμένα, το time-lapse είναι ένα είδος βίντεο, του οποίου τα στιγμιότυπα έχουν καταγράψει συστηματικά την εξέλιξη ενός φαινομένου από την αρχή έως και τη λήξη του, με τη διαδικασία της φωτογράφισης. Η συχνότητα καταγραφής του ίδιου θέματος ποικίλει ανάλογα με τη διάρκεια του φαινομένου (π.χ. μία λήψη κάθε 30 δευτερόλεπτα). Η τεχνική έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί στον κινηματογράφο ως ειδικό εφέ, αλλά η χρήση του είναι πολύ σημαντική όταν έχει να κάνει με την καταγραφή μεγάλης διάρκειας φυσικών ή βιολογικών πειραμάτων. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια χάρη στην πρόοδο της τεχνολογίας των φωτογραφικών μηχανών, αλλά και των έξυπνων κινητών τηλεφώνων, το time lapse είναι μια τεχνική που με απλό εξοπλισμό και φαντασία γίνεται εφικτό εργαλείο στα χέρια όλων.

Στην παρούσα εργασία, αντί να εστιάσουμε στη χρήση πολύπλοκων εξαρτημάτων και υψηλών επιδόσεων φωτογραφικών μηχανών, θα ασχοληθούμε με τον απλούστερο τρόπο λήψης time-lapse βίντεο με τη χρήση μιας συνηθισμένης web camera, ενός φορητού υπολογιστή και ενός δωρεάν προγράμματος υπολογιστή για τον έλεγχο της web camera. Το εν λόγω λογισμικό είναι το video-velocity free (basic edition) [18], το οποίο διαθέτει αυτόματες ρυθμίσεις για τη συχνότητα λήψης των στιγμιότυπων. Στη συγκεκριμένη εφαρμογή θέσαμε τη συχνότητα λήψης ίση με ένα στιγμιότυπο ανα 15 δευτερόλεπτα, καθώς αυτή είναι αρκετή για να καταγράψει την εξέλιξη του φαινομένου, για αρκετές ώρες, χωρίς να δημιουργεί ιδιαίτερα μεγάλα αρχεία video τα οποία μπορεί να δυσχεράνουν την μετέπειτα επεξεργασία.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

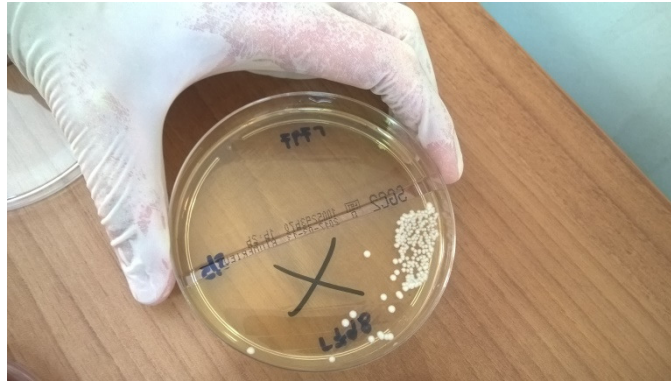
3.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας του τμήματος Πληροφορικής με εφαρμογές στη Βιοιατρική στη Λαμία. Χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική διάταξη μια κάμερα Logitec 920, ένας επωαστικός κλίβανος (εικόνα 6), μια φωτεινή πηγή (λάμπα λευκή LED 6 watt) και ένας φορητός υπολογιστής Samsung. Η κάμερα συνδέθηκε μέσω του προγράμματος video-velocity free (basic edition) [18] με τον υπολογιστή όπως φαίνεται στην εικόνα 7. Μέσα στον κλίβανο τοποθετήθηκε η κάμερα και η φωτεινή πηγή. Το καλώδιο της φωτεινής πηγής καθώς και ο φορητός υπολογιστής συνδέθηκαν με παροχή ρεύματος.

Στη συνέχεια ακολούθησε ο εμβολιασμός του τρυβλίου. Προμηθευτήκαμε από ιδιωτικό εργαστήριο της Λαμίας ένα λευκό μολυσμένο τρυβλίο Biomerieux διαμέτρου 8cm SGC2 Γ798 (εικόνα 3), που περιείχε στρόγγυλες λευκές λείες αποικίες *Candida SPP* από καλλιέργεια κοιλιακού επιχρίσματος. Από το μολυσμένο αυτό τρυβλίο με τη βοήθεια αποστειρωμένου κρίκου μιας χρήσεως (εικόνα 5) έγινε ανακαλλιέργεια σε νέο αποστειρωμένο τρυβλίο Biomerieux αιματούχο (cos) (εικόνα 4).

Η επιλογή του χρώματος του τρυβλίου δεν ήταν τυχαία καθώς το κόκκινο χρώμα του αιματούχου τρυβλίου στο οποίο έγινε ανακαλλιέργεια είναι ιδανικό για την μετέπειτα επεξεργασία εικόνας, αφού οι αποικίες θα είναι σαφώς πιο ευδιάκριτες. Κατά την επώαση των μικροβίων σε άγαρ, είναι απαραίτητο το τρυβλίο να σφραγιστεί προς αποφυγή της αφυδάτωσης και συμπίκνωσης του. Στο πείραμα αυτό, το τρυβλίο καλύφθηκε από αποστειρωμένη ζελατίνα και όχι με το καπάκι του τρυβλίου για τον περιορισμό της αντανάκλασης του φωτός στις εικόνες. Έπειτα τοποθετήθηκε το εμβολιασμένο αιματούχο τρυβλίο (cos) μέσα στον κλίβανο κάτω ακριβώς από την κάμερα (εικόνα 8). Η θέση της κάμερας ήταν τέτοια ώστε να λαμβάνουμε την καλύτερη δυνατή εικόνα. Η εστίαση της κάμερας ρυθμίστηκε χειροκίνητα. Ρυθμίστηκε την ανάλυση της εικόνας να είναι 360×640 pixels (η υψηλότερη διαθέσιμη στην δωρεάν έκδοση του λογισμικού ελέγχου της κάμερας που χρησιμοποιήσαμε). Απενεργοποιήθηκε η αυτόματη εστίαση της κάμερας (autofocus), καθώς και η ανίχνευση κίνησης (No motion), για να αποφύγουμε τις αυτόματες αλλαγές των ρυθμίσεων της κάμερας. Ασφαλίστηκε η πόρτα του κλιβάνου και ενεργοποιήθηκε το λογισμικό λήψης στιγμιότυπων. Η συχνότητα λήψης στιγμιότυπων ρυθμίστηκε σε 1 frame ανά 15 δευτερόλεπτα και η λήψη διήρκεσε 50 ώρες, 24 λεπτά και 36 δευτερόλεπτα.

Ανά 4 ώρες ελέγχαμε το πρόγραμμα αν καταγράφει ορθώς και αν το θρεπτικό υλικό του τρυβλίου έχει την κατάλληλη υγρασία.



Εικόνα 3. Μολυσμένο τρυβλίο SGC2 Γ798, το οποίο προμηθευτήκαμε από ιδιωτικό εργαστήριο και αφορά κολπικό επίχρισμα.



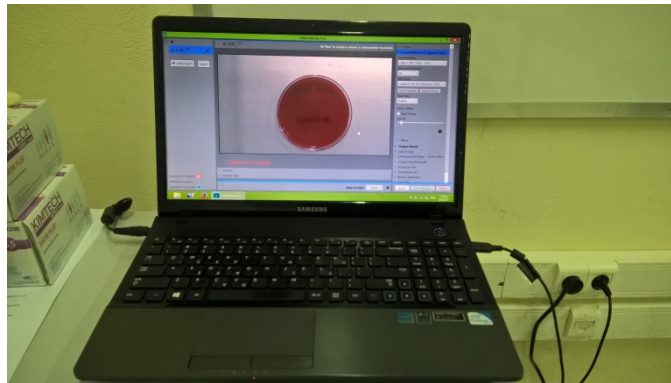
Εικόνα 4. Αποστειρωμένο αιματούχο τρυβλίο cos.



Εικόνα 5. Αποστειρωμένοι κρίκοι μιας χρήσεως που χρησιμεύουν στην ανακαλλιέργεια του *Candida* SPP.



Εικόνα 6. Επωαστικός κλίβανος εργαστηρίου Βιολογίας του τμήματος Πληροφορικής με εφαρμογές στη Βιοιατρική.



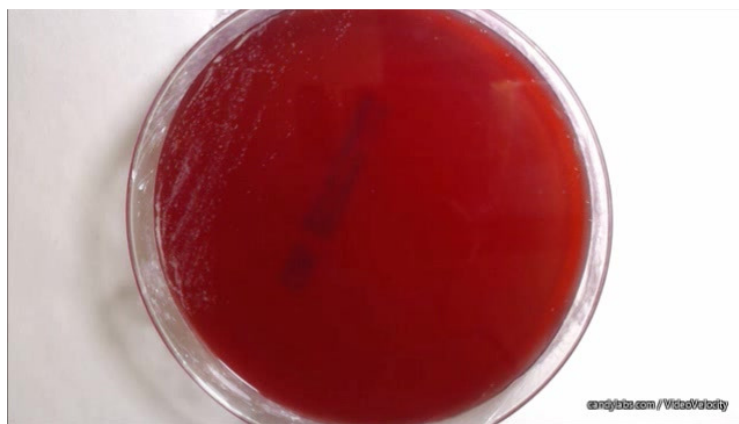
Εικόνα 7. Το αιματούχο τρυβλίο (cos), αμέσως μετά τον εμβολιασμό του από *Candida*, όπως αυτό φαίνεται στον φορητό υπολογιστή, μέσω του προγράμματος video-velocity free (basic edition).



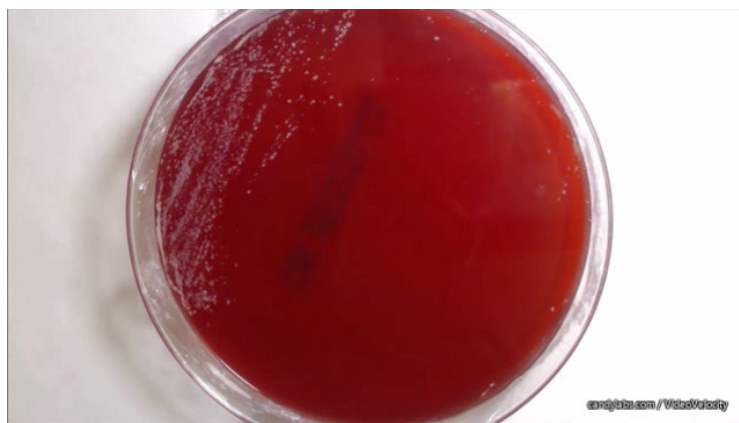
Εικόνα 8. Πειραματική διάταξη στο εσωτερικό του κλιβάνου (φωτεινή πηγή, εμβολιασμένο αιματούχο τρυβλίο (cos), κάμερα).

3.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΕΙΚΟΝΩΝ

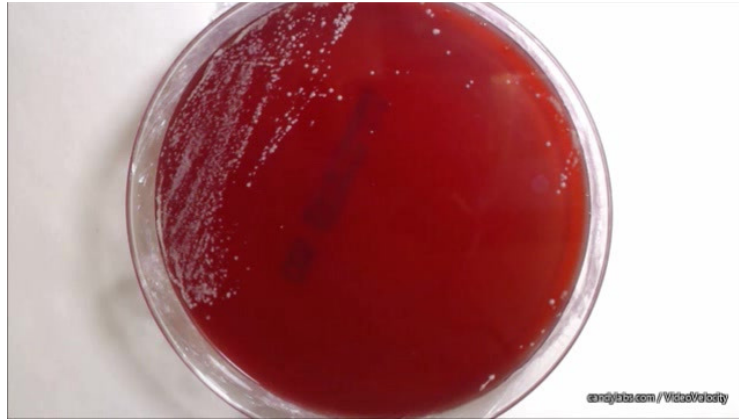
Κατασκευάσαμε ένα time-lapse βίντεο ανά 15 δευτερόλεπτα μέσω του λογισμικού video-velocity (free basic edition) [18] από το οποίο προέκυψαν συνολικά 12.099 έγχρωμες εικόνες που αφορούν το τρυβλίο στο οποίο αναπτύσσεται ένα είδος μύκητα με την πάροδο του χρόνου. Έπειτα από 50 ώρες, 24 λεπτά και 36 δευτερόλεπτα συνεχούς λήψης ο μύκητας αναπτύχθηκε επαρκώς και διακόπηκε η λήψη. Οι πρώτες 413 εικόνες εξαιρέθηκαν από την εργασία λόγω τυχαίας μετακίνησης και αλλαγής φωτεινότητας το οποίο δυσχεραίνει την μετέπειτα επεξεργασία τους. Κατά το χρονικό διάστημα αυτό ο μύκητας δεν είχε αναπτυχθεί, κατά συνέπεια δεν επηρεάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης. Παρακάτω φαίνονται τέσσερα στιγμιότυπα της ανάπτυξης του μύκητα *Candida* (εικόνα 9).



(α) Στιγμιότυπο, No 5094



(β) Στιγμιότυπο, No 7359



(γ) Στιγμιότυπο, Νο 9880

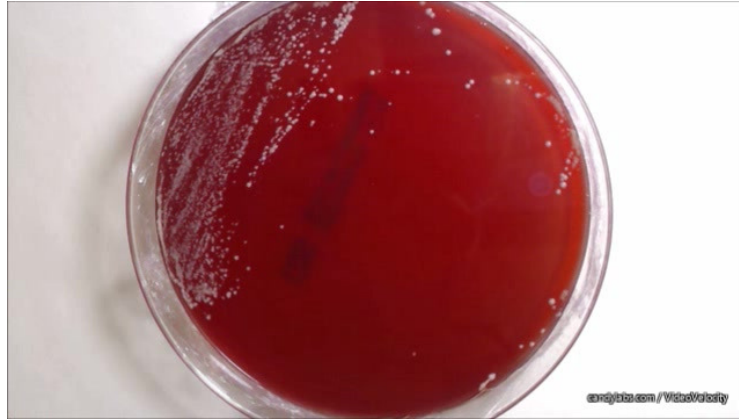


(δ) Τελευταίο στιγμιότυπο, Νο 12099

Εικόνα 9. Στιγμιότυπα του τρυβλίου σε τέσσερις τυχαίες χρονικές στιγμές

3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΛΗΦΘΕΙΣΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ ΚΑΙ ΕΞΑΓΩΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

Η επιλογή του χρώματος του τρυβλίου όπως ήδη αναφέραμε δεν ήταν τυχαία. Αφού επιλέξαμε αιματούχο τρυβλίο (cos), το θρεπτικό υλικό του τρυβλίου είχε χρωματική απόχρωση παραπλήσια του κόκκινου. Οι αποικίες των μυκήτων που αναπτύχθηκαν στη συνέχεια είχαν λευκό χρώμα, όπως φαίνεται στο σχήμα 10. Κατά συνέπεια κάνουμε τη βασική υπόθεση ότι το πλήθος των μικροοργανισμών μπορεί να προσεγγιστεί από την αλλαγή του χρώματος του τρυβλίου.

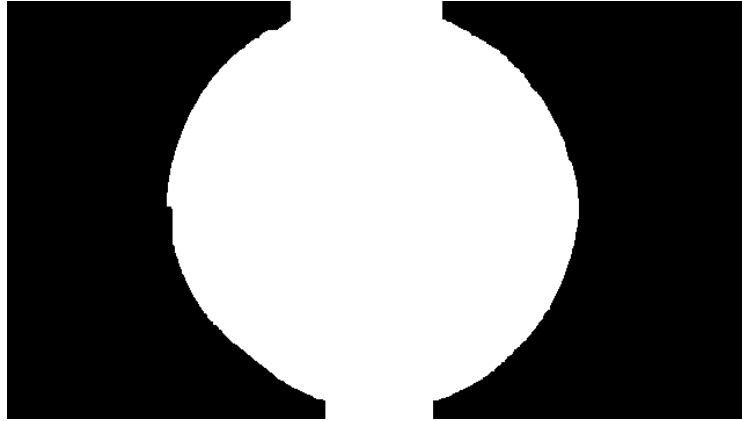


Σχήμα 10 . Στιγμιότυπο, Νο 12099

Έτσι είναι ασφαλές να υποθέσουμε ότι το πλήθος των μικροοργανισμών σε κάθε **pixel** (i, j) τη χρονική στιγμή t , μπορεί να εκτιμηθεί από τη διαφορά της τιμής του καναλιού του κόκκινου χρώματος $R_{i,j}^t$ από την αντίστοιχη τιμή στο αρχικό frame $R_{i,j}^0$. Ο συνολικός αριθμός των μικροοργανισμών θα υπολογιστεί αθροίζοντας το πλήθος των μικροοργανισμών σε κάθε pixel του τρέχοντος frame t . Από τα pixel αυτά θα εξαιρεθούν τα pixel που βρίσκονται εκτός τρυβλίου. Για το σκοπό αυτό ορίζουμε μια δυαδική μάσκα $M_{i,j}$ μεγέθους ίσου με αυτό του κάθε frame, η οποία έχει τιμή 1 στα pixel εντός τρυβλίου και τιμή 0 στα pixel εκτός τρυβλίου. Τα pixel (i, j) εντός τρυβλίου πληρούν την ακόλουθη συνθήκη στο αρχικό frame (i, j) (προ της ανάπτυξης των μυκήτων): η τιμή του κόκκινου καναλιού $R_{i,j}^0$ είναι δύο φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του πράσινου καναλιού $G_{i,j}^0$ και δύο φορές μεγαλύτερη από του μπλε καναλιού $B_{i,j}^0$.

$$M_{i,j} = 1 \Leftrightarrow (R_{i,j}^0 \geq 2G_{i,j}^0 \text{ και } R_{i,j}^0 \geq 2B_{i,j}^0) \quad (1)$$

Η μάσκα $M_{i,j}$ που προέκυψε, υπέστη τον μορφολογικό τελεστή της διαστολής (binary image dilation) με δομικό στοιχείο ένα τετράγωνο 3×3 , το οποίο προέκυψε κατόπιν πειραματισμού. Η μάσκα που κατασκευάστηκε τελικά φαίνεται στο σχήμα 11.



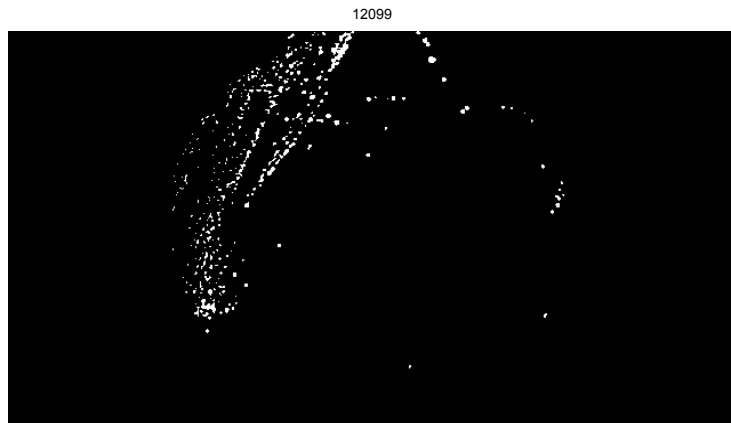
Σχήμα 11. Η δυαδική μάσκα $M_{i,j}$

Ο συνολικός αριθμός των μικροοργανισμών στο τρέχον frame δίνεται από την ακόλουθη σχέση

$$N_t = \sum_{i,j} \Delta_{i,j}^t M_{i,j} \quad (2)$$

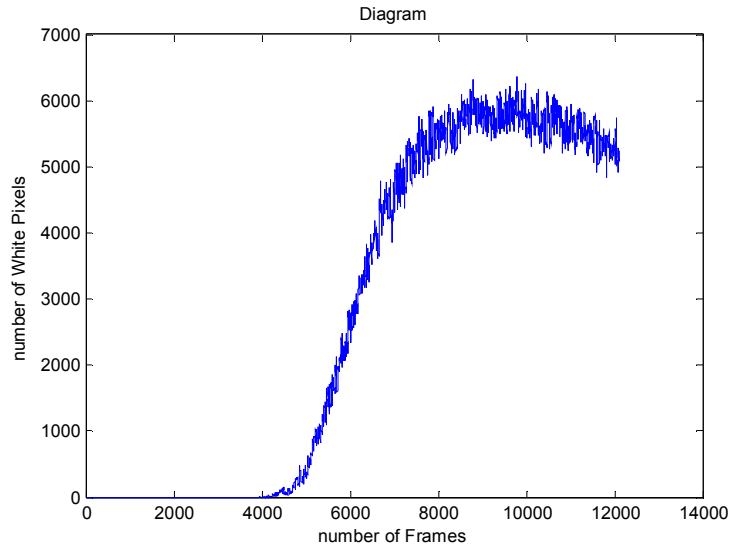
όπου η μάσκα M ορίστηκε προηγουμένως και η ποσότητα $\Delta_{i,j}^t$ ορίζεται ως ακολούθως

$$\Delta_{i,j}^t = \begin{cases} R_{i,j}^t - R_{i,j}^0, & |R_{i,j}^t - R_{i,j}^0| \geq 10 \\ 0, & |R_{i,j}^t - R_{i,j}^0| < 10 \end{cases} \quad (3)$$



Εικόνα 12. Το εκτιμώμενο πλήθος μικροοργανισμών, σύμφωνα με την εξίσωση (2), για κάθε pixel του στιγμιότυπου Νο 12099, χρωματικά κωδικοποιημένο με αποχρώσεις του γκριζου.

Ο συνολικός αριθμός των μικροοργανισμών για κάθε στιγμιότυπο, σε ολόκληρο το τρυβλίο, όπως υπολογίστηκε από τη σχέση (2), δίνεται στο ακόλουθο γράφημα.



Εικόνα 13. Γραφική απεικόνιση του πλήθους των μικροοργανισμών του τρυβλίου σε συνάρτηση με το χρόνο.

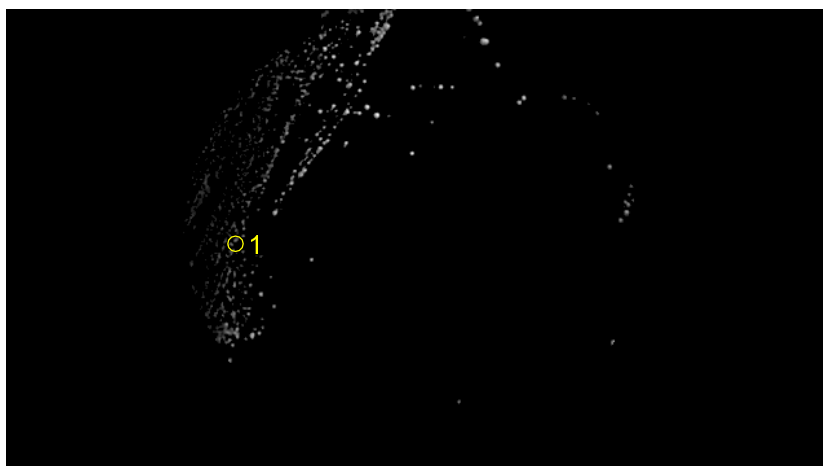
Η σχέση (2) μπορεί να τροποποιηθεί έτσι ώστε να υπολογίσει τον αριθμό των μικροοργανισμών σε μια περιοχή A του τρυβλίου

$$N_t \propto \sum_{(i,j) \in A} \Delta_{i,j} \quad (4)$$

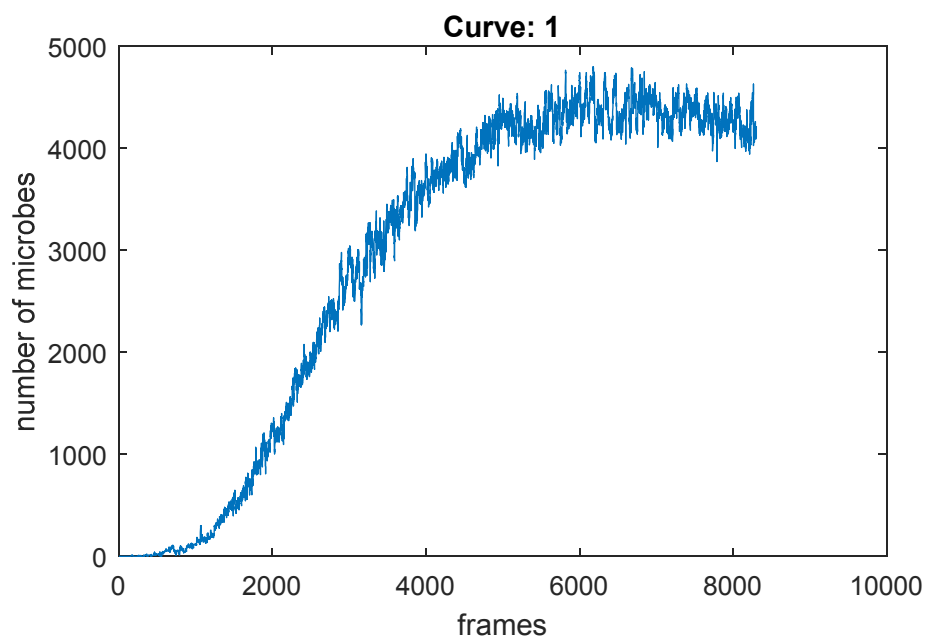
Η περιοχή A του τρυβλίου καθορίζεται από τον χρήστη, με έναν από τους ακόλουθους τρόπους:

- κυκλική περιοχή με κέντρο ένα σημείο της εικόνας που εισάγει ο χρήστης και ακτίνα της επιλογής του
- ορθογώνιο παραλληλόγραμμο, το οποίο ορίζεται από δύο διαγώνια σημεία του
- ακανόνιστο πολύγωνο

Ένα παράδειγμα πειραματικής καμπύλης πληθυσμού από την κυκλική περιοχή ακτίνας 5 pixel που φαίνεται στο σχήμα 14, δίνεται στο σχήμα 15.



Σχήμα 14 . Κυκλική περιοχή τρυβλίου με κέντρο το σημείο 1 και ακτίνα ($r=5$ pixel)

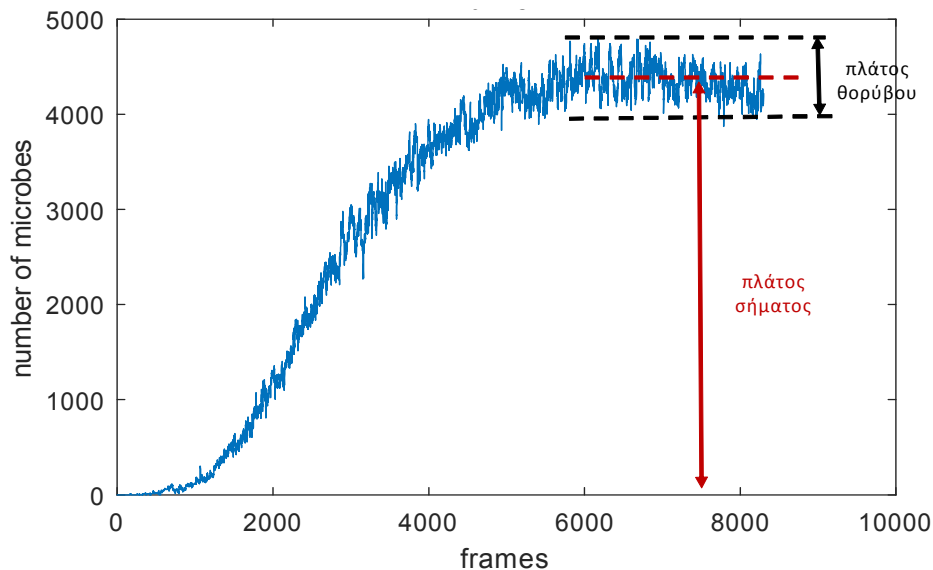


Σχήμα 15. Γραφική απεικόνιση του πλήθους των μικροοργανισμών του τρυβλίου της περιοχής 1 του Σχήματος 14 σε συνάρτηση με το χρόνο

3.4 ΕΞΟΜΑΛΥΝΣΗ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

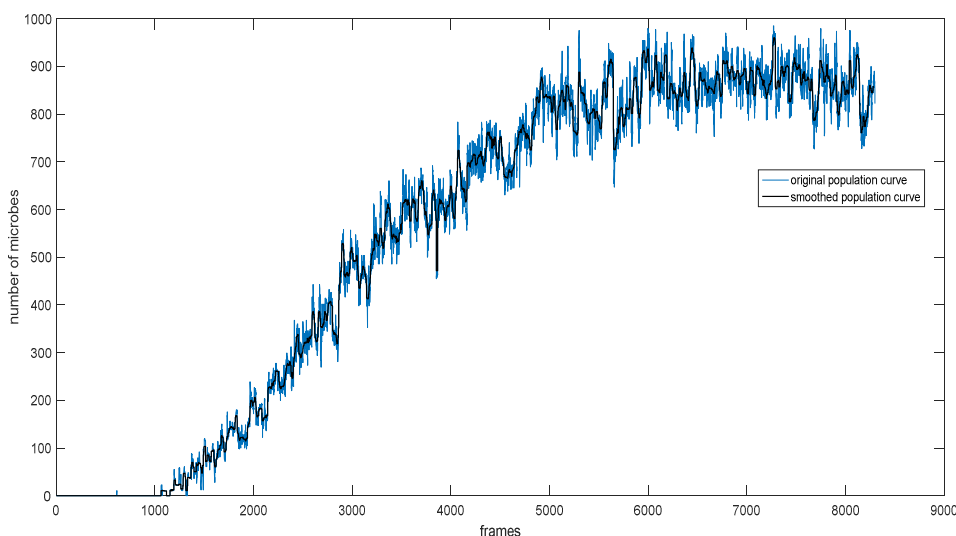
Οι τιμές των πειραματικών καμπύλων πλήθους παρουσιάζουν ισχυρές στατιστικές διακυμάνσεις που οφείλονται στο σφάλμα του τρόπου υπολογισμού του πληθυσμού και θεωρούνται ως θόρυβος. Στο σχήμα 16 φαίνονται γραφικά το πλάτος του σήματος και το πλάτος του θορύβου για μια τυπική πειραματική καμπύλη. Συνεπακόλουθα μπορούμε να ορίσουμε το σηματοθορυβικό λόγο (SNR) της καμπύλης.

$$\text{SNR} = (\text{πλάτος σήματος}) / (\text{πλάτος θορύβου}) \quad (5)$$



Σχήμα 16. Γραφική απεικόνιση του σηματοθορυβικού λόγου

Προκειμένου να είναι ακριβέστερος ο προσδιορισμός των παραμέτρων της λογιστικής συνάρτησης που μοντελοποιεί την καμπύλη προηγείται ένα βήμα εξομάλυνσης της καμπύλης. Για την εξομάλυνση αυτή των καμπυλών χρησιμοποιήσαμε φίλτρο ενδιάμεσης τιμής μεγέθους 27 στοιχείων (median filter). Ένα τυπικό παράδειγμα καμπύλης (μπλε καμπύλη) και του αποτελέσματος της εξομάλυνσης της (μαύρη καμπύλη) φαίνεται στο σχήμα 17.



Σχήμα 17. Τυπική καμπύλη και η εξομάλυνσή της σε ένα τυχαίο σημείο του τρυβλίου με χρήση median filter.

3.5 ΜΟΝΤΕΛΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

Ενας πληθυσμός μικροοργανισμών αποτελείται από μεγάλο αριθμό οργανισμών και η εξέλιξη του καθορίζεται από τον μέσο όρο των ποσοστών γεννήσεων και θανάτων. Αυτή τη συμπεριφορά προσπαθούμε να προσομοιώσουμε με διάφορα μαθηματικά μοντέλα, όπως το εκθετικό και το μοντέλο της λογιστικής συνάρτησης. Επίσης εξετάσαμε μια παραλλαγή του μοντέλου της λογιστικής συνάρτησης στο οποίο εισαγάγαμε πολυωνυμικού εκθέτη δεύτερου βαθμού ως προς το χρόνο.

3.5.1 ΕΚΘΕΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ

Το απλό εκθετικό μοντέλο ανάπτυξης πληθυσμού δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

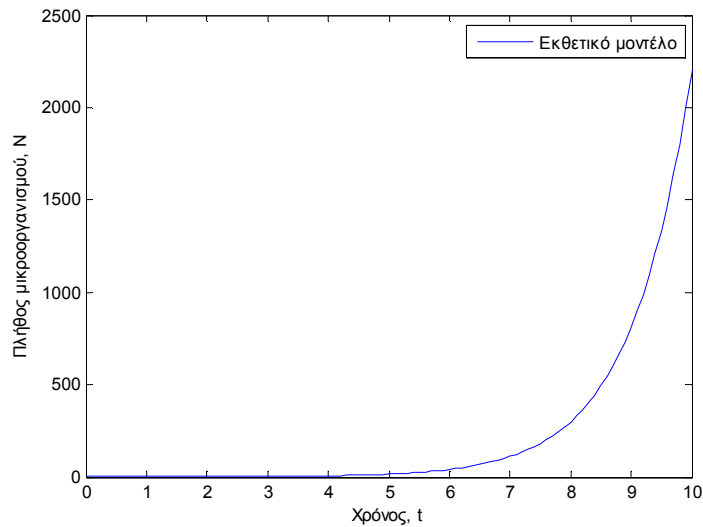
$$N(t) = N_0 e^{b_1 t} \quad (6)$$

όπου $N(t)$ ο τρέχων αριθμός των μικροοργανισμών, N_0 ο αρχικός αριθμός μικροοργανισμών στην καλλιέργεια, t ο χρόνος και b_1 θετική παράμετρος που εκφράζει το ρυθμό αύξησης του πληθυσμού. Η παράμετρος αυτή μπορεί να ερμηνευτεί ως μια διαφορά μεταξύ του ρυθμού γέννησης (αναπαραγωγής) και του ποσοστού θνησιμότητας.

Ο χρόνος διπλασιασμού είναι το χρονικό διάστημα το οποίο χρειάζεται ένας πληθυσμός, έτσι ώστε να διπλασιάσει το μέγεθός του.

Η εξίσωση (6) ισχύει όταν οι πόροι (διαθέσιμος χώρος και θρεπτικό υλικό) είναι απεριόριστοι. Το εκθετικό μοντέλο είναι αρκετά εύρωστο, αφού επιτυγχάνει ικανοποιητική ακρίβεια κατά την πρώιμη φάση της εξέλιξης του μικροοργανισμού, ακόμη και αν δεν πληρούνται αυτές οι προϋποθέσεις.

Η συμπεριφορά του εκθετικού μοντέλου απεικονίζεται στο σχήμα 18, για μία τυπική τιμή του b_1 . Παρατηρούμε ότι ο πληθυσμός των μικροοργανισμών αυξάνει εκθετικά, χωρίς να υπάρχει άνω όριο, το οποίο δεν είναι εφαρμόσιμο σε ρεαλιστικές συνθήκες.



Σχήμα 18. Πληθυσμός μικροοργανισμών, όπως μοντελοποιείται από το εκθετικό μοντέλο.

3.5.2 ΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ (LOGISTIC FUNCTION)

Η λογική εξίσωση είναι ένα μοντέλο αύξησης του πληθυσμού που δημοσιεύθηκε αρχικά από τον Pierre Verhulst (1845,1847). Στο μοντέλο της λογιστικής συνάρτησης αρχικά ο πληθυσμός αναπτύσσεται εκθετικά, καθώς στο υλικό της καλλιέργειας υπάρχουν άφθονα θρεπτικά συστατικά και οι συνθήκες της καλλιέργειας είναι άριστες (θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση O_2). Καθώς όμως η πυκνότητα του πληθυσμού αυξάνει η διαθεσιμότητα των πόρων μειώνεται με αποτέλεσμα να καταλήγουν σε μια αυξημένη θνησιμότητα ή σε μια ελαττωμένη γεννητικότητα ή σε αμφότερα τα προηγούμενα. Έτσι, ο ρυθμός αύξησης του πληθυσμού γίνεται πιο αργός, εξαιτίας διαφόρων παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν

- εξάντληση κάποιου θρεπτικού συστατικού,
- συσσώρευση τοξικών προϊόντων από το μεταβολισμό των μικροοργανισμών.

Τελικά η λογική εξίσωση προσεγγίζει ασυμπτωτικά μια σταθερή τιμή που αντιπροσωπεύει ένα θεωρητικό μέγιστο όριο στο μέγεθος του πληθυσμού κάτω από αυτές τις συνθήκες.

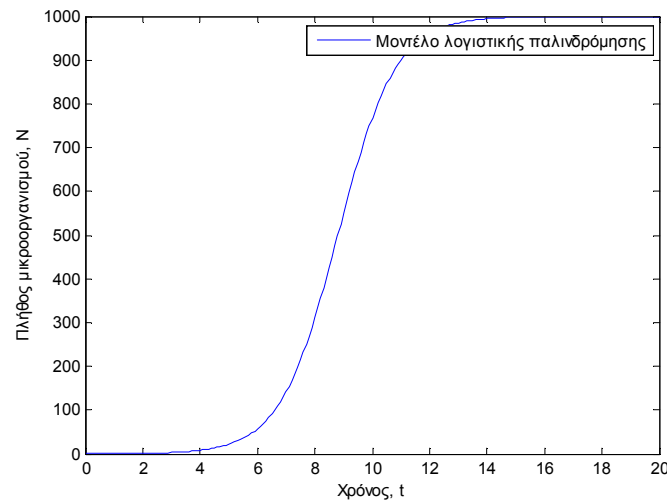
Έστω ότι συμβολίζουμε με $p(t)$ το ποσοστό του μέγιστου πληθυσμού που εμφανίζεται την χρονική στιγμή t . Το $p(t)$ με βάση την λογιστική εξίσωση δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$p(t) = \frac{1}{1 + e^{-(b_1 t + b_0)}} \quad (7)$$

Όπου b_0 και b_1 οι παράμετροι της εξίσωσης. Η (7) γράφεται ισοδύναμα

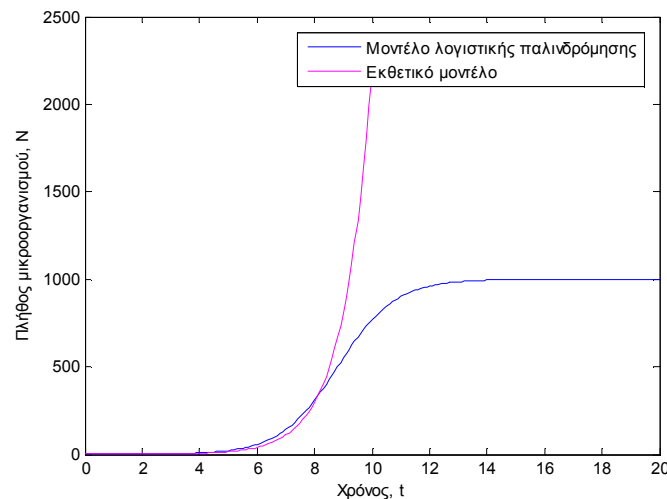
$$P = \frac{e^{(b_0+b_1 \cdot t)}}{1 + e^{(b_0+b_1 \cdot t)}} .$$
 Η γραφική παράσταση της λογιστικής συνάρτησης δίνεται στο σχήμα

19.



Σχήμα 19. Ο πληθυσμός των μικροοργανισμών, όπως μοντελοποιείται από το μοντέλο της λογιστικής εξίσωσης.

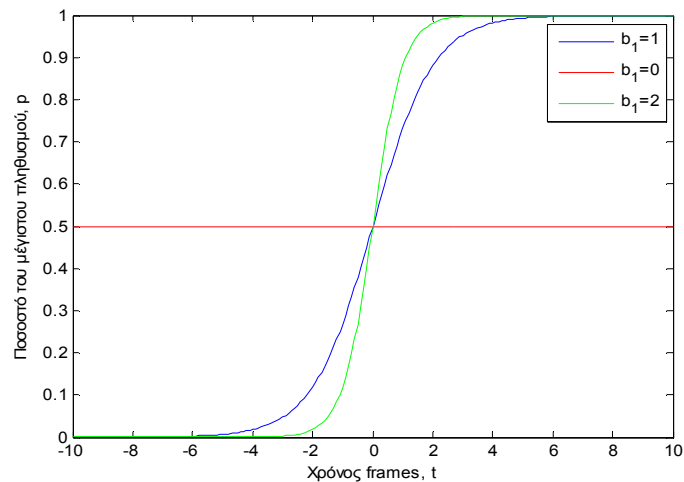
Η σύγκριση εκθετικού μοντέλου και μοντέλου με λογιστική εξίσωση φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα 20. Παρατηρούμε ότι η λογιστική εξίσωση έχει πιο ρεαλιστική μορφή από το εκθετικό μοντέλο, όσο αφορά την εξέλιξη του τελικού πληθυσμού.



(Σχήμα 20. Σύγκριση εκθετικού μοντέλου με μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης)

Η επίδραση της παραμέτρου b_1 φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα 21, το οποίο δείχνει την μορφή της εξίσωσης για σταθερή τιμή της παραμέτρου b_0 . Όπως παρατηρούμε

από το σχήμα, όσο αυξάνεται το b_1 μεγαλώνει η κλίση της καμπύλης άρα μεγαλώνει το ποσοστό του πληθυσμού των μικροοργανισμών.

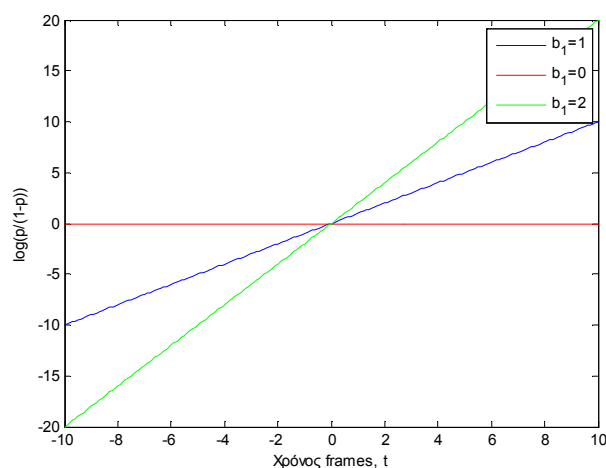


Σχήμα 21. Η επίδραση της παραμέτρου b_1 ($b_0 = 0$ και για τις τρεις καμπύλες) στο μοντέλο ανάπτυξης της εξίσωσης (1).

Λογαριθμίζοντας την (7) και κάνοντας αλγεβρικές πράξεις καταλήγουμε στην ακόλουθη γραμμική μορφή, η οποία όπως θα περιγραφεί παρακάτω διευκολύνει στον υπολογισμό των τιμών των παραμέτρων b_0 και b_1 .

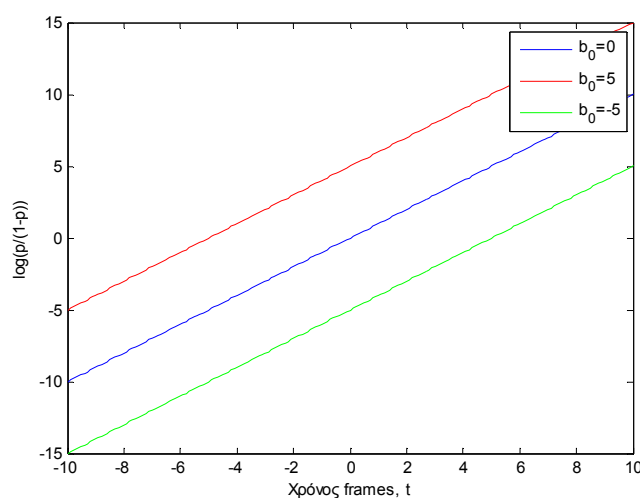
$$y = \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = b_1 t + b_0 \quad (8)$$

Όπως παρατηρούμε από το σχήμα 22, όσο αυξάνεται το b_1 μεγαλώνει η κλίση της καμπύλης $y(t)$ και μηδενίζεται όταν $b_1 = 0$.



(Σχήμα 22. Η επίδραση της παραμέτρου b_1 στην καμπύλη $y(t)$ της εξίσωσης (7) . Κάθε μια από τις καμπύλες του σχήματος έχουν παραχθεί για $b_0 = 0$

Η επίδραση της παραμέτρου b_0 στην καμπύλη $y(t)$ της εξίσωσης (7) φαίνεται στο σχήμα (23) για σταθερή τιμή της $b_1 = 1$.



Σχήμα 23. Η επίδραση της παραμέτρου b_0 ($b_1 = 1$ και για τις τρεις καμπύλες) στο μοντέλο ανάπτυξης της εξίσωσης (2).

Προσδιορισμός των παραμέτρων λογιστικής συνάρτησης

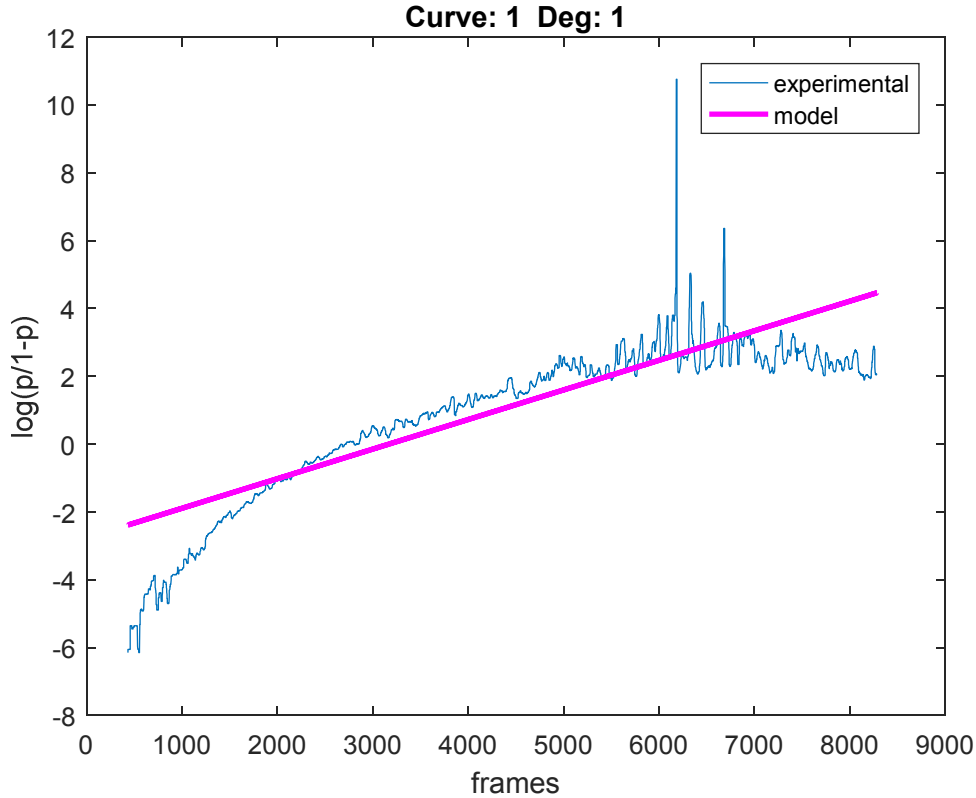
Ο υπολογισμός των τιμών των παραμέτρων b_0 και b_1 της λογιστικής εξίσωσης $1^{ου}$ βαθμού διευκολύνεται χρησιμοποιώντας την γραμμική μορφή της εξίσωσης (8). Δεδομένων των τιμών της μεταβλητής y για ένα σύνολο N τιμών του χρόνου $(t_i, y_i), i = 1, 2, \dots, N$, οι ζητούμενες τιμές των παραμέτρων είναι αυτές που ελαχιστοποιούν την ποσότητα:

$$\sum_{i=1}^N (y_i - b_1 t_i - b_0)^2 \quad (9)$$

Αποδεικνύεται ότι οι ζητούμενες παράμετροι δίνονται από τη λύση του ακόλουθου συστήματος γραμμικών εξισώσεων

$$\begin{pmatrix} t_1 & 1 \\ t_2 & 1 \\ \vdots & \vdots \\ t_N & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} b_1 \\ b_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_N \end{pmatrix} \quad (10)$$

Ακολουθεί ένα παράδειγμα προσδιορισμού των παραμέτρων του μοντέλου για την πειραματική καμπύλη πληθυσμού του σχήματος 19. Το λογαριθμικό πηλίκο $y(t)$ για την εν λόγω καμπύλη δίνεται στο σχήμα 24 (μπλε καμπύλη) ενώ το αποτέλεσμα της μοντελοποίησης με βάση τις εξαχθείσες τιμές των παραμέτρων φαίνεται στην καμπύλη με ροζ χρώμα.



Σχήμα 24. Η γραφική απεικόνιση του λογαριθμικού πηλίκου και η μοντελοποίηση του από την λογιστική εξίσωση πολυωνύμου πρώτου βαθμού

3.5.3 ΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΕΞΙΣΩΣΗ ΜΕ ΠΟΛΥΩΝΥΜΟ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΩΣ ΕΚΘΕΤΗ

Στην περίπτωση της λογιστικής εξίσωσης με εκθέτη 2^{00} βαθμού, η αντίστοιχη σχέση (7) γράφεται ως εξής:

$$p(t) = \frac{1}{1 + e^{-(b_2 t^2 + b_1 t + b_0)}} \quad (11)$$

Από την (11) λογαριθμίζοντας και κάνοντας αλγεβρικές πράξεις καταλήγουμε στην ακόλουθη γραμμική μορφή, η οποία όπως θα περιγραφεί παρακάτω διευκολύνει στον υπολογισμό των τιμών των παραμέτρων b_0 , b_1 και b_2 .

$$y = \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = b_2 t^2 + b_1 t + b_0 \quad (12)$$

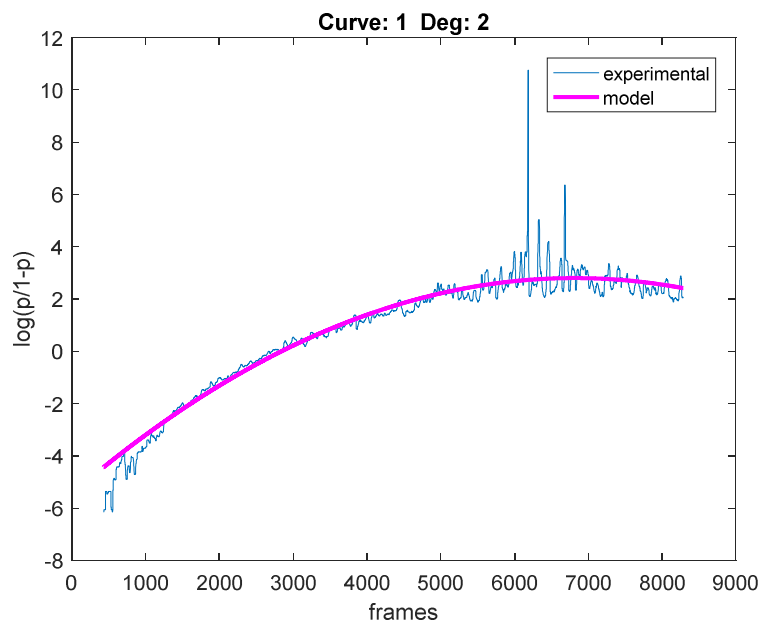
Δεδομένων των τιμών της μεταβλητής y για ένα σύνολο τιμών του χρόνου $(t_i, y_i), i = 1, 2, \dots, N$, οι ζητούμενες τιμές των παραμέτρων είναι αυτές που ελαχιστοποιούν την ποσότητα

$$\sum_{i=1}^N (y_i - b_2 t_i^2 - b_1 t_i - b_0)^2 \quad (13)$$

Αποδεικνύεται ότι οι ζητούμενες παράμετροι δίνονται από τη λύση του ακόλουθου συστήματος γραμμικών εξισώσεων

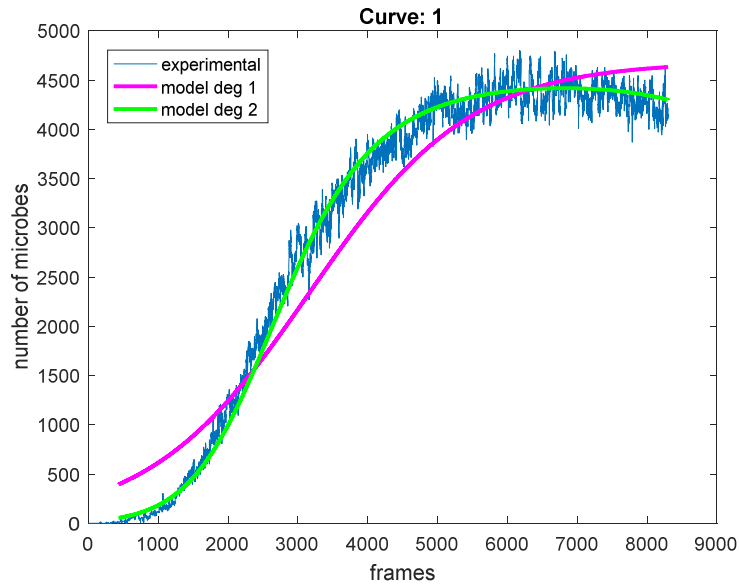
$$\begin{pmatrix} t_1^2 & t_1 & 1 \\ t_2^2 & t_2 & 1 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ t_N^2 & t_N & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} b_2 \\ b_1 \\ b_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_N \end{pmatrix} \quad (14)$$

Ακολουθεί ένα παράδειγμα προσδιορισμού των παραμέτρων του μοντέλου για την πειραματική καμπύλη πληθυσμού του σχήματος 19. Το λογαριθμικό πηλίκο $y(t)$ για την εν'λόγω καμπύλη δίνεται στο σχήμα 25 (μπλε καμπύλη). Το αποτέλεσμα της μοντελοποίησης με βάση τις εξαχθείσες τιμές των παραμέτρων φαίνεται στην καμπύλη με ροζ χρώμα.



Σχήμα 25. Παρατηρείται η γραφική απεικόνιση του λογαριθμικού πηλίκου και η μοντελοποίηση του από την λογιστική εξίσωση πολυωνύμου δευτέρου βαθμού

Η μοντελοποίηση της πειραματικής καμπύλης με χρήση της λογιστικής συνάρτησης (ροζ καμπύλη) και της λογιστικής εξίσωσης με εκθέτη δευτέρου βαθμού (πράσινη καμπύλη) παρουσιάζεται συγκριτικά στο ακόλουθο σχήμα 26. Παρατηρούμε ότι η λογιστική εξίσωση με εκθέτη δευτέρου βαθμού προσεγγίζει καλύτερα την πειραματική καμπύλη ιδιαίτερα και κατά την τελευταία φάση της μείωσης του πληθυσμού.

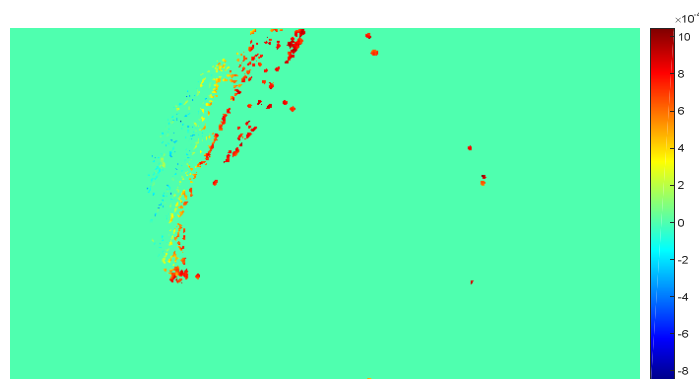


Σχήμα 26. Παρουσιάζεται η πειραματική καμπύλη πληθυσμού του συνόλου των λευκών pixels του τρυβλίου και η μοντελοποίηση της με τη λογιστική εξίσωση πολυωνύμου πρώτου βαθμού και δευτέρου βαθμού (ροζ και πράσινο αντίστοιχα).

3.6 ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Είναι δυνατόν να εφαρμόσουμε την εξαγωγή πειραματικής καμπύλης πληθυσμού και την παραμετροποίηση της σε κάθε pixel του frame, οπότε μπορούν να υπολογιστούν οι τιμές των παραμέτρων του μοντέλου ξεχωριστά για κάθε pixel. Αν απεικονίσουμε τις τιμές μίας παραμέτρου για κάθε μη μηδενικό pixel του τελικού frame τότε κατασκευάζεται μια παραμετρική εικόνα. Άρα η παραμετρική εικόνα δείχνει περιοχές του τρυβλίου με διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης πληθυσμού.

Στο σχήμα 27 δίνεται η τιμή του συντελεστή b_1 για το μοντέλο με τον γραμμικό εκθέτη. Η εξαγωγή των καμπυλών και η παραμετροποίηση τους έγινε θέτοντας την ακτίνα $r=2$. Οι τιμές του b_1 κωδικοποιούνται χρωματικά βάσει της χρωματικής κλίμακας του σχήματος 27. Όπως αναφέρθηκε, όσο μεγαλώνει η τιμή του b_1 αυξάνει η κλίση της καμπύλης πληθυσμού.



Σχήμα 27. Η παραμετρική εικόνα που προκύπτει από προσδιορισμό των τιμών του γραμμικού εκθέτη b_1 του πρώτου βαθμού πολυωνύμου, για κάθε μη μηδενικό pixel της εικόνας στο τελικό frame.

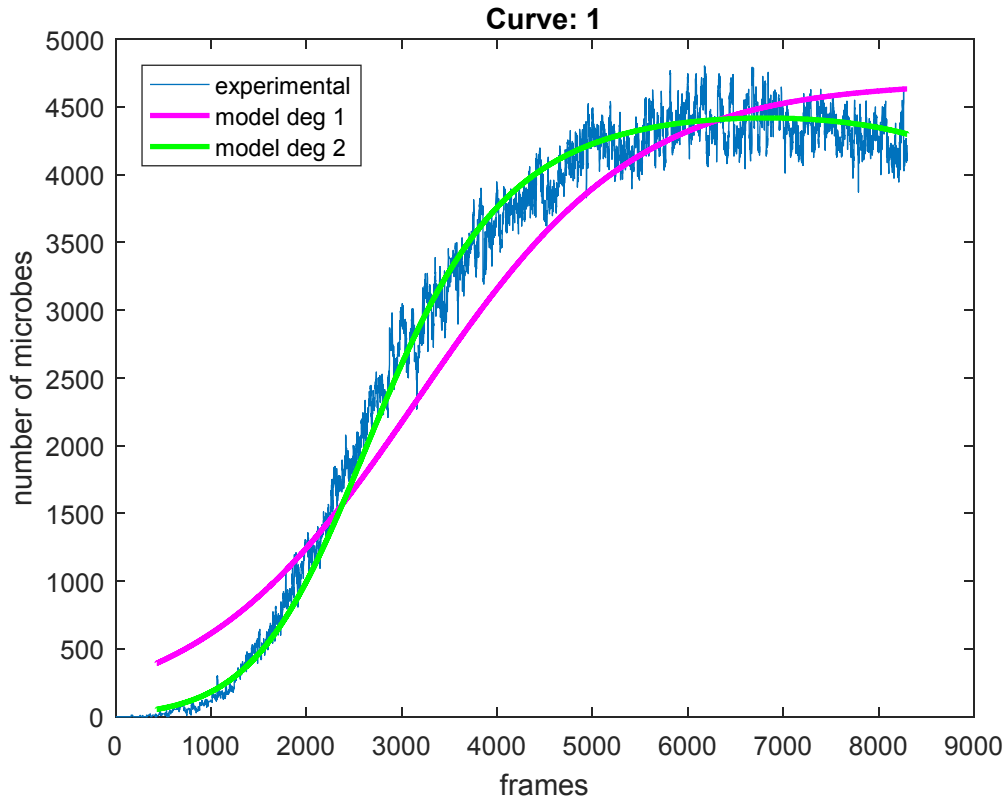
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΕΞΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΟΥ ΤΡΥΒΛΙΟΥ

Η ανάπτυξη του μύκητα σε όλο το τρυβλίο με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται στην πειραματική καμπύλη του σχήματος 28 με μπλε χρώμα. Οι τοπικές αυξομειώσεις που παρατηρούνται αποτελούν θόρυβο που πιθανόν οφείλεται στον τρόπο ορισμού του πλήθους των μυκήτων με βάση τις τεχνικές ανάλυσης της εικόνας που χρησιμοποιήσαμε. Αρχικά η κλίση της καμπύλης αυξάνεται, δηλαδή αυξάνεται η πυκνότητα της ανάπτυξης του πληθυσμού των μυκήτων εφόσον στο υλικό της καλλιέργειας υπάρχουν άφθονα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά και απουσία τοξικών ουσιών. Με την πάροδο του χρόνου η κλίση της καμπύλης γίνεται ολοένα και μικρότερη μέχρι που μηδενίζεται και η καμπύλη γίνεται σχεδόν οριζόντια, καθώς ο ρυθμός ανάπτυξης των μυκήτων είναι περίπου ίσος με τον ρυθμό θανάτου τους. Με την πάροδο αρκετού χρόνου είναι πιθανόν να εμφανίζεται πτωτική τάση στην καμπύλη όπως επιβεβαιώνεται από την καμπύλη του σχήματος 28. Η πτωτική αυτή τάση δημιουργείται λόγω της συνεχούς επιδείνωσης των συνθηκών, δηλαδή στη παρατεταμένη έλλειψη κάποιου θρεπτικού συστατικού ή και στη συσσώρευση των τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού σε πολύ υψηλά επίπεδα.

Στο ίδιο σχήμα πραγματοποιείται μοντελοποίηση της λογιστική εξίσωσης με γραμμικό και τετραγωνικό εκθέτη και φαίνεται με ροζ και πράσινο χρώμα αντίστοιχα.

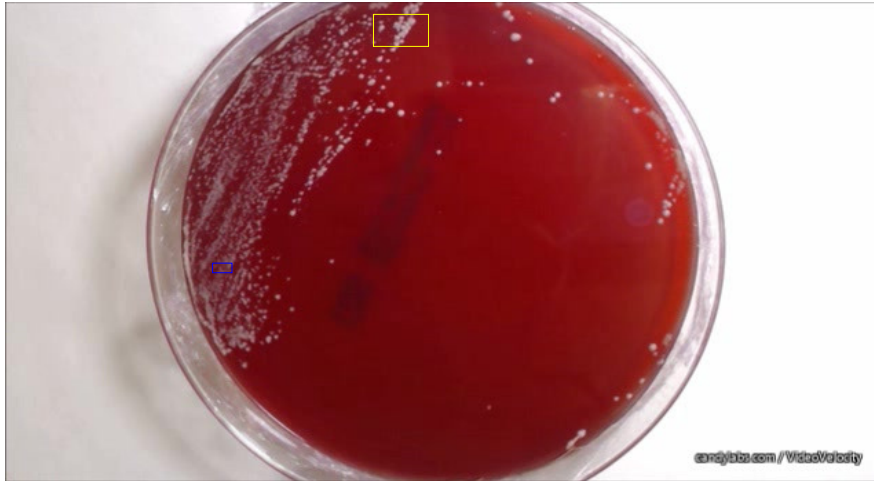
Είναι προφανές ότι η λογιστική εξίσωση με τετραγωνικό εκθέτη μοντελοποιεί καλύτερα την πειραματική καμπύλη γιατί είναι σε θέση να μοντελοποιήσει και την πτωτική τάση που πιθανόν αυτή να εμφανίσει σε αντίθεση με την καμπύλη της λογιστικής εξίσωσης με γραμμικό εκθέτη που η κλίση της δεν φαίνεται να μηδενίζεται ποτέ.



Σχήμα 28. Απεικονίζεται η πειραματική καμπύλη των μυκήτων με μπλε χρώμα και η μοντελοποίηση της λογιστικής εξίσωσης με γραμμικό και τετραγωνικό εκθέτη με ροζ και πράσινο χρώμα αντίστοιχα.

4.2 ΕΞΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΑΠΟ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΤΡΥΒΛΙΟΥ

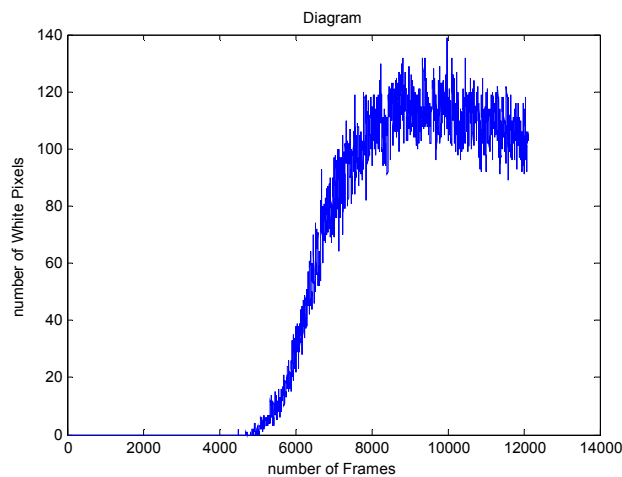
Όπως αναφέρθηκε στη μεθοδολογία, μπορούμε να επιλέξουμε οποιαδήποτε περιοχή του τρυβλίου και να εξάγουμε την αντίστοιχη πειραματική καμπύλη. Συγκεκριμένα στο σχήμα 29 έχουν επιλεγθεί επί του τελικού frame, δυο περιοχές του τρυβλίου που περιέχουν πολλές αποικίες. Κάθε περιοχή είναι το παραλληλόγραμμο που ορίζουν κάθε φορά δύο pixels (i, j) που επιλέγει ο χρήστης και δίνονται σε μεγέθυνση στο σχήμα 30. Οι εξαχθείσες καμπύλες δίνονται στα σχήματα 31 και 32. Παρατηρούμε ότι η καμπύλη της μπλε περιοχής παρουσιάζει πτωτική τάση η οποία θεωρήσαμε ότι οφείλεται στο γεγονός ότι περιέχει πυκνές αποικίες και μικρή ποσότητα διαθέσιμου θρεπτικού υλικού. Ομοίως η καμπύλη της κίτρινης περιοχής παρουσιάζει καθαρά αύξουσα τάση. Αυτό οφείλεται στις αραιές αποικίες που περιέχει και το μεγάλο απόθεμα θρεπτικού υλικού.



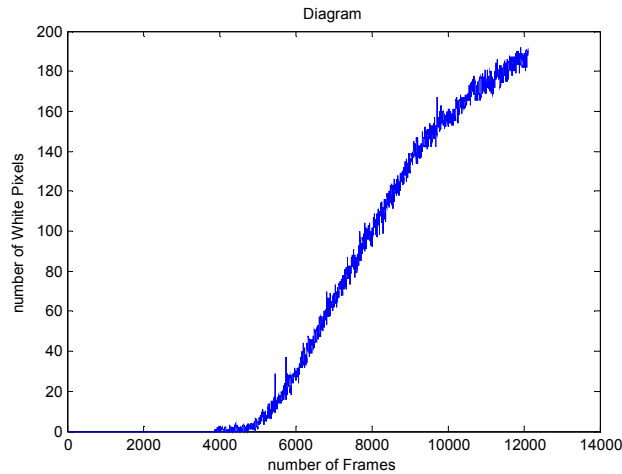
Σχήμα 29. Απεικονίζεται το τρυβλίο στο τελευταίο στιγμιότυπο καθώς και δύο επιλεγμένες περιοχές που περιέχουν πολλές αποικίες (απεικονίζονται με κίτρινο και μπλε χρώμα).



Σχήμα 30. Οι επιλεχθείσες περιοχές του τρυβλίου του προηγούμενου σχήματος σε μεγέθυνση που καθορίζονται από τα σημεία $(i_1, j_1) = (166, 197)$, $(i_2, j_2) = (152, 204)$ και $(i_3, j_3) = (10, 34)$, $(i_4, j_4) = (269, 309)$.



Σχήμα 31. Παρατηρείται η γραφική απεικόνιση των λευκών pixels του τρυβλίου της μπλε περιοχής.



Σχημα32. Παρατηρείται η γραφική απεικόνιση των λευκών pixels του τρυβλίου της κίτρινης περιοχής.

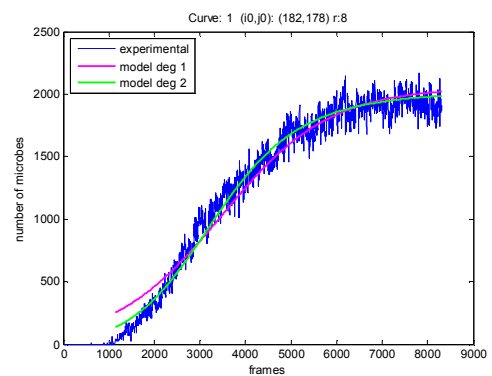
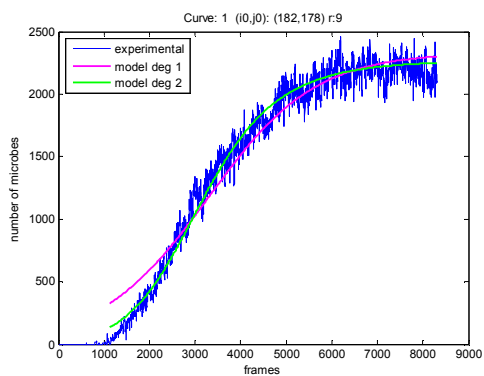
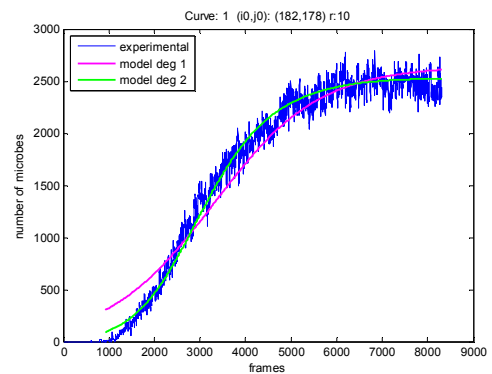
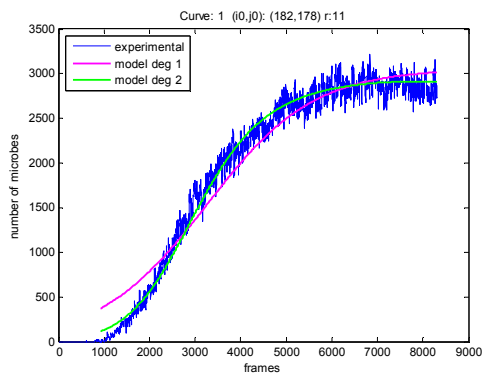
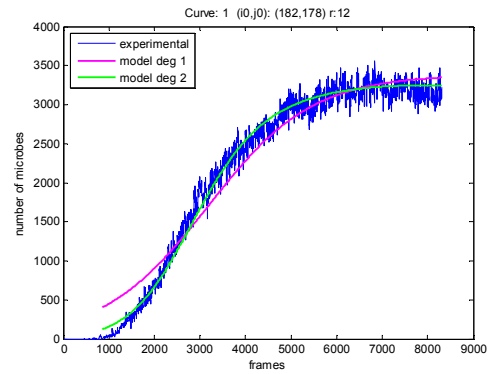
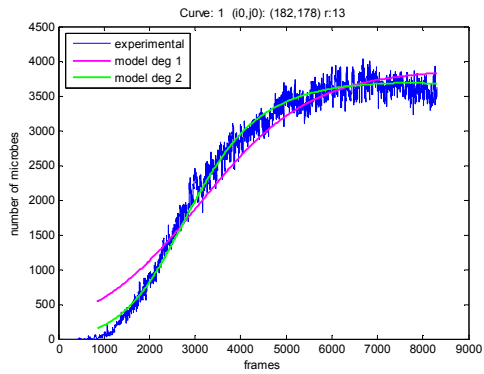
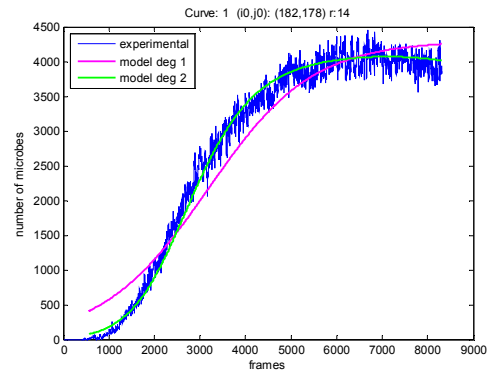
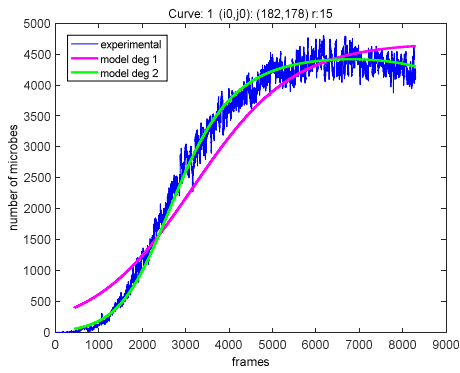
4.3 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΣΤΗΝ ΕΞΑΓΟΜΕΝΗ ΚΑΜΠΥΛΗ

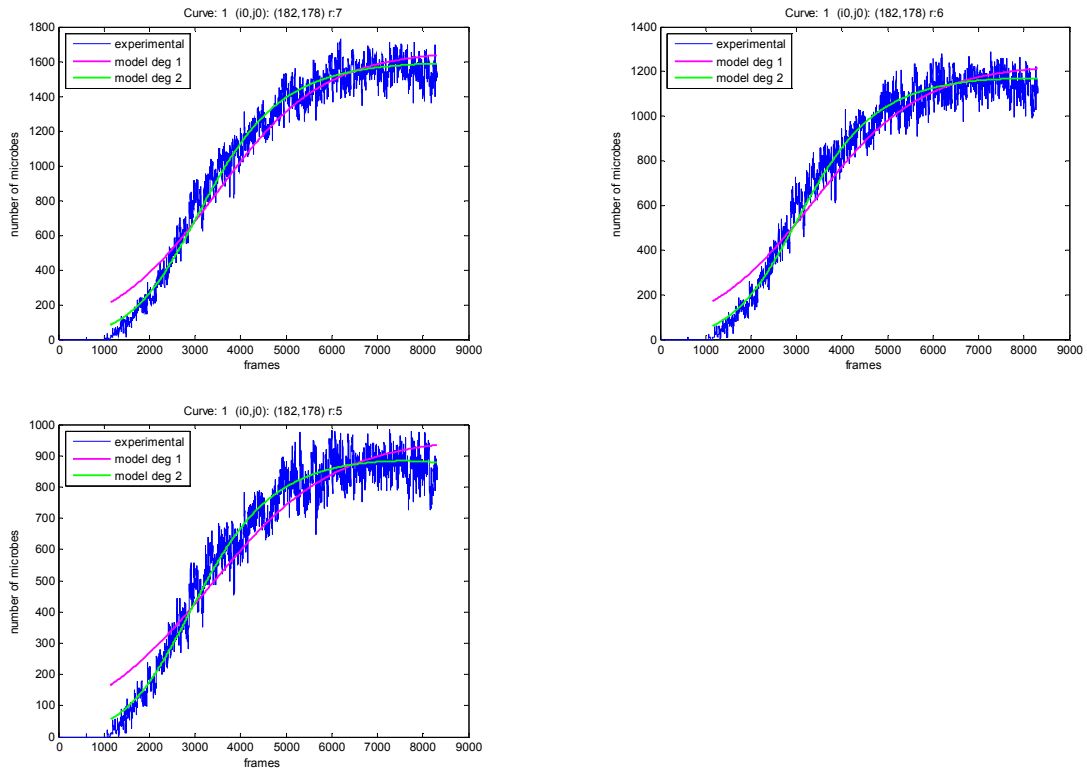
Στην παράγραφο αυτή μελετάμε την επίδραση του μεγέθους της περιοχής του τρυβλίου που χρησιμοποιούμε για την εξαγωγή των πειραματικών καμπυλών. Αρχικά επιλέγεται ένα pixel, συγκεκριμένα το $(i, j) = (178, 182)$ και εξάγεται η πειραματική καμπύλη του πλήθους των μικροοργανισμών, για διάφορα μεγέθη περιοχών. Πιο συγκεκριμένα, η περιοχή ορίζεται σαν ένα τετράγωνο $(2r+1) \times (2r+1)$ pixel, με κέντρο που συμπίπτει με το επιλεγθέν pixel, όπου r μικρός θετικός ακέραιος που καθορίζει το μέγεθος της περιοχής και στο συγκεκριμένο πείραμα πήρε τιμές από 5 έως 15.

Για κάθε μια πειραματική καμπύλη έγινε μοντελοποίηση με τη λογιστική εξίσωση με πολυωνυμικό εκθέτη πρώτου και δευτέρου βαθμού. Στο σχήμα 33 φαίνονται οι πειραματικές καμπύλες και οι μοντελοποιήσεις τους με πολυωνυμικού εκθέτη πρώτου και δευτέρου βαθμού (ροζ και πράσινο αντίστοιχα) για 11 τιμές του $r=5,6,\dots,15$. Αν αγνοήσουμε την κλίμακα στον άξονα Y , η οποία είναι αναμενόμενο να μεταβάλλεται, διαπιστώνουμε εποπτικά ότι η μορφή των πειραματικών καμπυλών δεν παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές για διαφορετικές τιμές της παραμέτρου r .

Επιπλέον παρατηρούμε ότι η αύξηση της ακτίνας της περιοχής προκαλεί αύξηση του σηματοθορυβικού λόγου όπως αυτό ορίστηκε στην παράγραφο 3.4.

Με βάση τις καμπύλες του σχήματος 33, το πολυώνυμο δευτέρου βαθμού φαίνεται να μοντελοποιεί ακριβέστερα την πειραματική μας καμπύλη απ' ό,τι το πολυώνυμο πρώτου βαθμού.





Σχήμα 33. Οι παραπάνω καμπύλες φανερώνουν την μοντελοποίηση των παραγόμενων πειραματικών καμπυλών με τα πολυώνυμα πρώτου και δευτέρου βαθμού της λογιστικής συνάρτησης για διαφορετικό μέγεθος περιοχής γύρω από το σημείο $(i, j) = (178, 182)$.

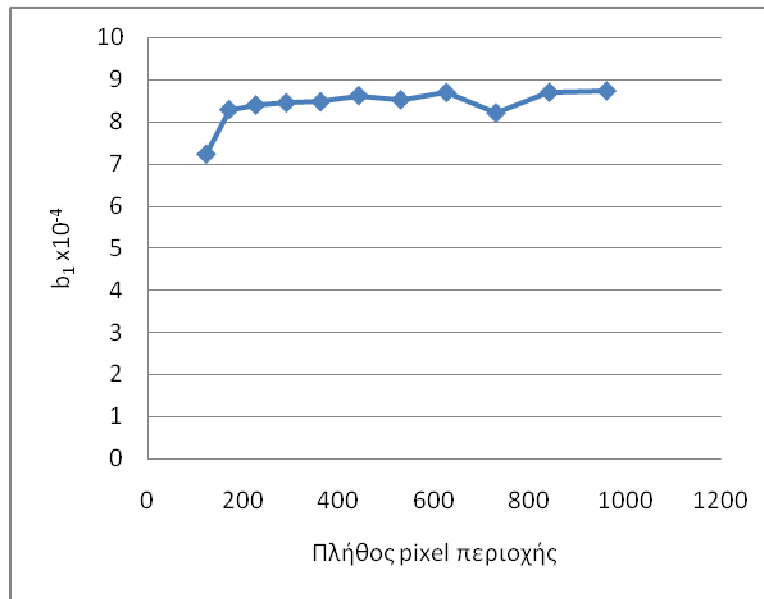
Για κάθε μία από τις τιμές της παραμέτρου r υπολογίζουμε τις τιμές των συντελεστών του εκθετικού πολυωνύμου στην περίπτωση του πρώτου και δευτέρου βαθμού όπως αυτές φαίνονται στους πίνακες 34 και 35 αντίστοιχα. Ο συντελεστής b_1 στην περίπτωση του πρωτοβάθμιου εκθέτη και οι συντελεστές b_2 και b_1 του δευτεροβάθμιου εκθέτη του πολυωνύμου υποδηλώνουν τον ρυθμό ανάπτυξης του πληθυσμού. Η γραφική παράσταση του συντελεστή b_1 του πρωτοβάθμιου εκθέτη συναρτήσει του πλήθους των pixel της περιοχής δίνεται στο σχήμα 36. Παρατηρούμε ότι ο συντελεστής έχει σχεδόν σταθερή τιμή, ανεξάρτητα του πλήθους των pixel. Στο συμπέρασμα αυτό καταλήγουμε και ποσοτικά παρατηρώντας τις τιμές των συντελεστών του εκθετικού πολυωνύμου στην περίπτωση του πρώτου και δευτέρου πολυωνύμου όπως αυτές φαίνονται στους πίνακες 34 και 35 αντίστοιχα. Η γραφική απεικόνιση της πρώτης παραγώγου του δευτεροβάθμιου εκθέτη $(2b_2 + b_1)$ συναρτήσει του μεγέθους της περιοχής υπολογισμού δίνεται στο σχήμα 37. Παρατηρούμε ότι η τιμή της πρώτης παραγώγου μπορεί να θεωρηθεί ανεξάρτητη του μεγέθους περιοχής υπολογισμού.

Πίνακας 34. Οι τιμές των συντελεστών του πρώτου βαθμού πολυωνύμου συναρτήσεως του πλήθους των pixel της περιοχής γύρω από το επιλεγμένο σημείο του τρυβλίου.

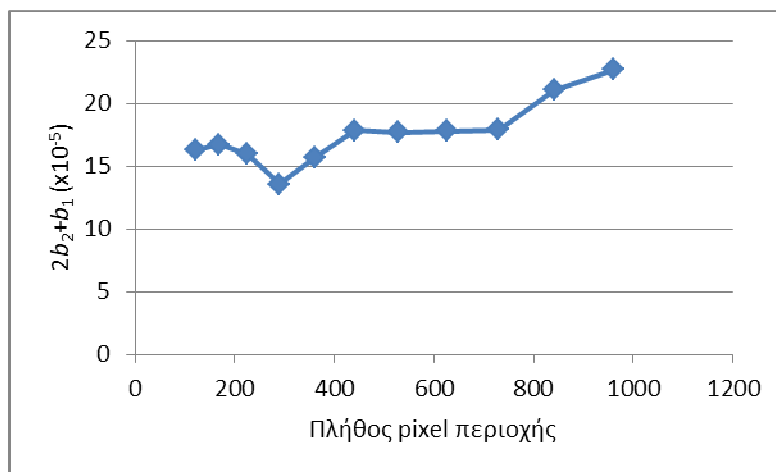
Μέγεθος περιοχής (r, pixel)	Πλήθος pixel περιοχής	$b_1(\times 10^{-4})$	b_0
5	121	7,23	-1,562
6	169	8,28	-1,838
7	225	8,39	-1,918
8	289	8,44	-1,962
9	361	8,46	-1,811
10	441	8,61	-2,040
11	529	8,51	-1,976
12	625	8,68	-2,004
13	729	8,20	-1,828
14	841	8,68	-2,263
15	961	8,72	-2,386

Πίνακας 35. Οι τιμές των συντελεστών του δευτέρου βαθμού πολυωνύμου συναρτήσεως της ποσότητας των pixel της κυκλικής περιοχής γύρω από το επιλεγμένο σημείο του τρυβλίου.

Μέγεθος περιοχής (r, pixel)	Πλήθος pixel περιοχής	$b_2(\times 10^{-7})$	$b_1(\times 10^{-3})$	b_0
5	121	-1,27	1,63	-2,768
6	169	-1,19	1,67	-2,975
7	225	-1,06	1,59	-2,934
8	289	-0,71	1,35	-2,647
9	361	-1,01	1,57	-2,786
10	441	-1,26	1,78	-3,316
11	529	-1,25	1,77	-3,246
12	625	-1,23	1,78	-3,273
13	729	-1,31	1,79	-3,182
14	841	-1,60	2,11	-4,052
15	961	-1,78	2,27	-4,431



Σχήμα 36. Η γραφική παράσταση του b_1 (γραμμικός εκθέτης) συναρτήσει του πλήθους των pixel της περιοχής.



Σχήμα 37. Η γραφική απεικόνιση της πρώτης παραγώγου ($2b_2 + b_1$) του δευτεροβάθμιου εκθέτη συναρτήσει του μεγέθους της περιοχής υπολογισμού.

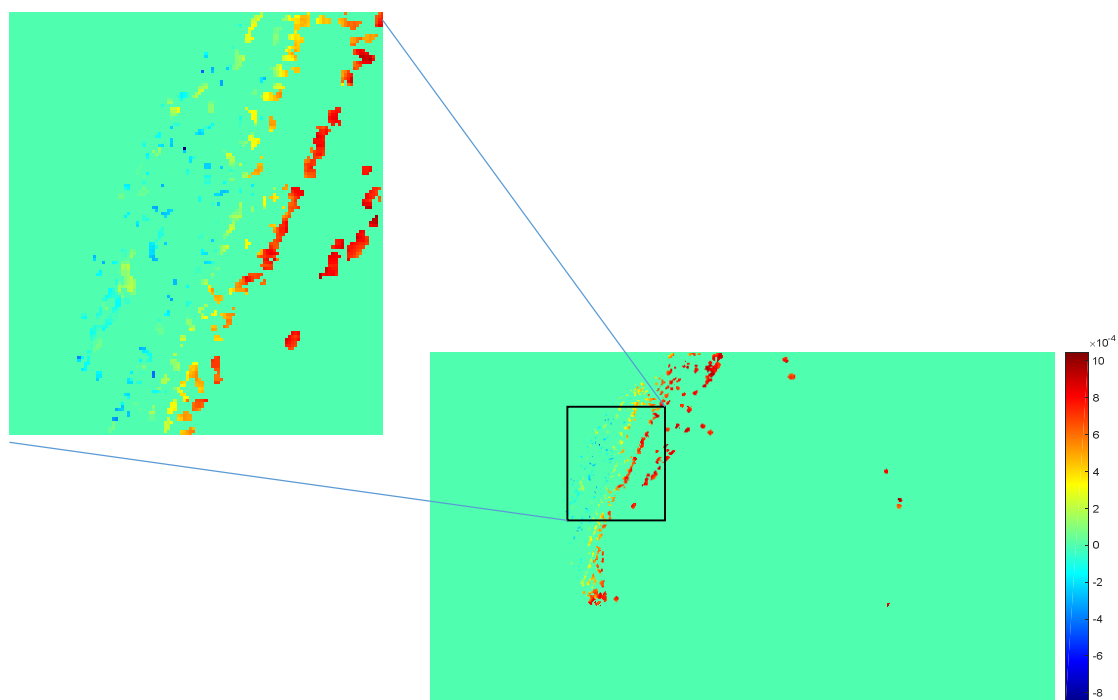
4.4 ΠΑΡΑΜΕΤΡΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Στο σχήμα 38 δίνεται η τιμή του συντελεστή b_1 για το μοντέλο με τον γραμμικό εκθέτη με ακτίνα $r=2$. Οι τιμές του b_1 κωδικοποιούνται χρωματικά βάσει της χρωματικής κλίμακας του σχήματος 38. Παρατηρούμε ότι ένας μικρός αριθμός pixel έχει αρνητικό εκθέτη b_1 . Αυτό είναι εσφαλμένο αποτέλεσμα γιατί υποδηλώνει ότι η μοντελοποίηση της καμπύλης του πληθυσμού είναι διαρκώς φθίνουσα, κάτι το οποίο δεν μπορεί να ισχύει. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στην αδυναμία της λογιστικής εξίσωσης με γραμμικό εκθέτη να περιγράψει την καμπύλη πληθυσμού.

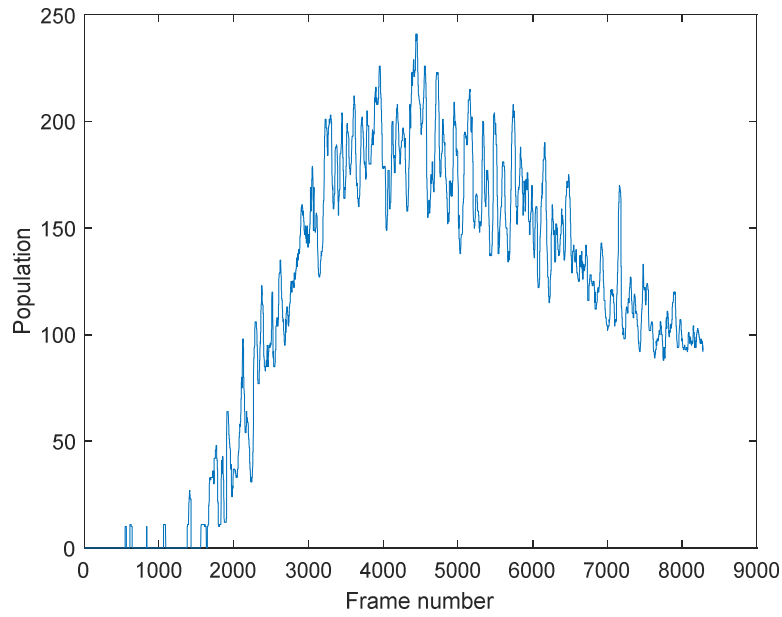
Για να διερευνήσουμε περαιτέρω την περίπτωση αυτή, παρουσιάζουμε την γραφική παράσταση της καμπύλης πληθυσμού ενός τυχαίου pixel με αρνητικό b_1 στο σχήμα

39 (α). Το λογαριθμικό πηλίκο και η μοντελοποίηση του από την λογιστική εξίσωση φαίνεται αντίστοιχα στο σχήμα 39 (β). Παρατηρούμε ότι η καμπύλη αυτή δεν μοντελοποιείται ικανοποιητικά από τον γραμμικό εκθέτη. Όπως θα δείξουμε αμέσως μετά, το πλήθος των Pixel με αρνητικό εκθέτη μειώνεται όσο αυξάνεται η ακτίνα της περιοχής για την εξαγωγή της καμπύλης πληθυσμού.

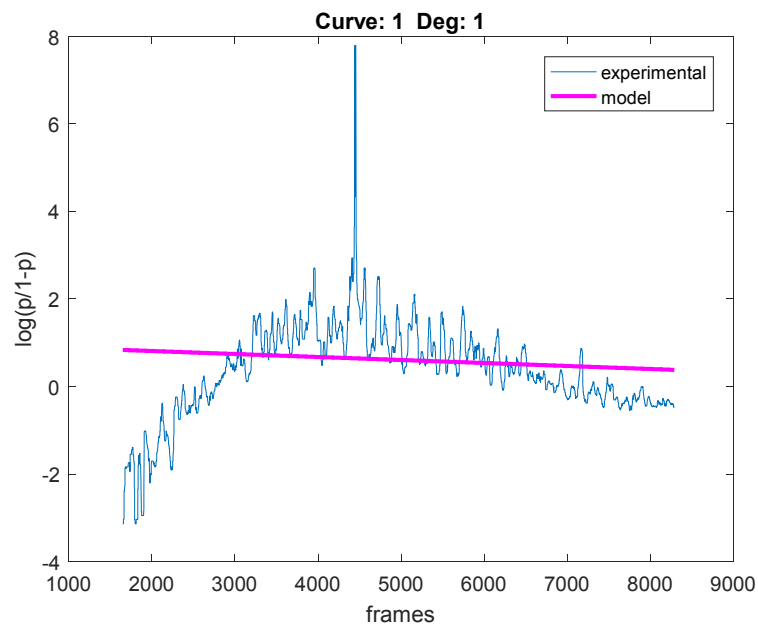
Παρατηρώντας την παραμετρική εικόνα του συντελεστή b_1 για κάθε pixel και λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση του συντελεστή b_1 στην καμπύλη πληθυσμού, συμπεραίνουμε ότι περιοχές με υψηλό b_1 (ισοδύναμα υψηλό ρυθμό ανάπτυξης πληθυσμού) εμφανίζουν χαμηλή πυκνότητα πληθυσμού. Ομοίως περιοχές με χαμηλό b_1 εμφανίζουν υψηλή πυκνότητα πληθυσμού.



Σχήμα 38. Η παραμετρική εικόνα που προκύπτει από προσδιορισμό των τιμών του γραμμικού εκθέτη b_1 του πρώτου βαθμού πολωνύμου, για κάθε μη μηδενικό pixel της εικόνας στο τελικό frame, με χρήση περιοχής με ακτίνα $r=2$ (pixel). Επιπλέον φαίνεται η μεγέθυνση της επισημασμένης περιοχής της παραπάνω εικόνας--.



(α)

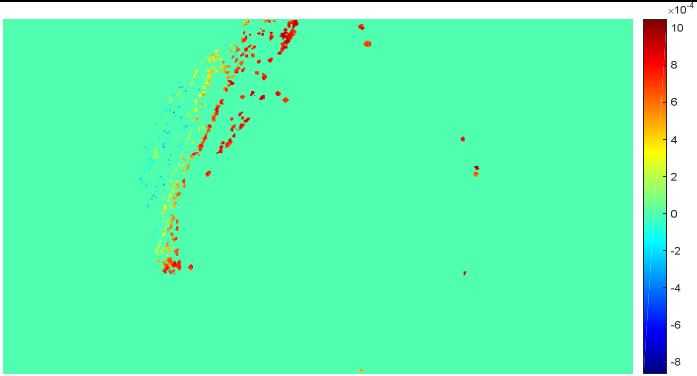
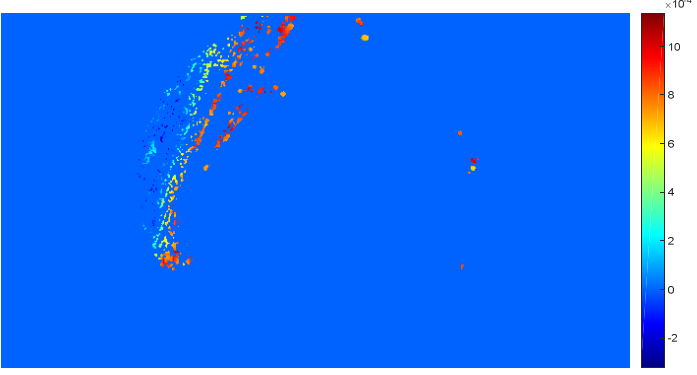
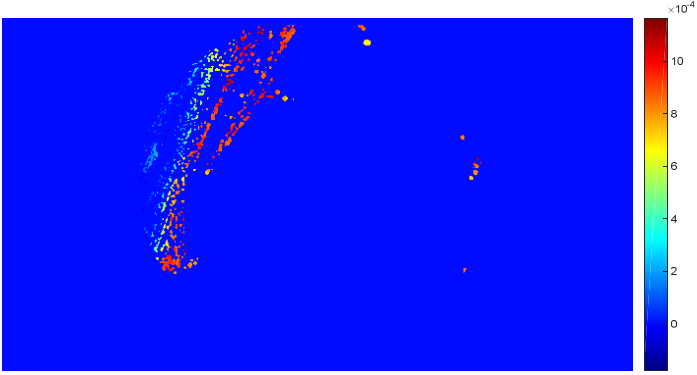


(β)

Σχήμα 39. Παράδειγμα καμπύλης πληθυσμού ενός Pixel με αρνητικό b_1 . (α) Η γραφική παράσταση της καμπύλης πληθυσμού ενός τυχαίου pixel και (β) το λογαριθμικό πηλίκο και η μοντελοποίηση του από την λογιστική εξίσωση.

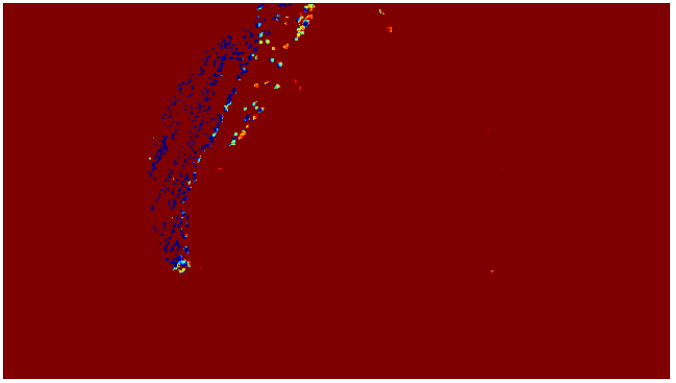
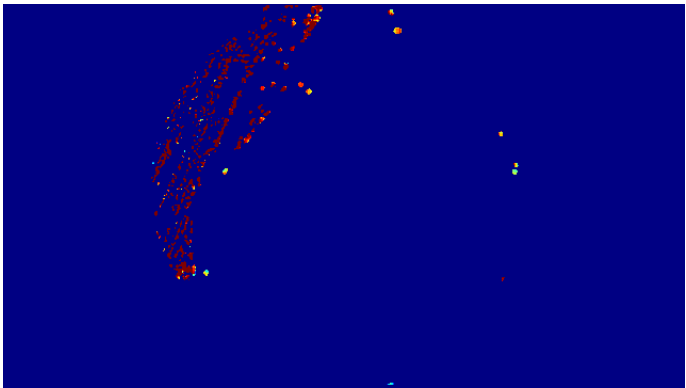
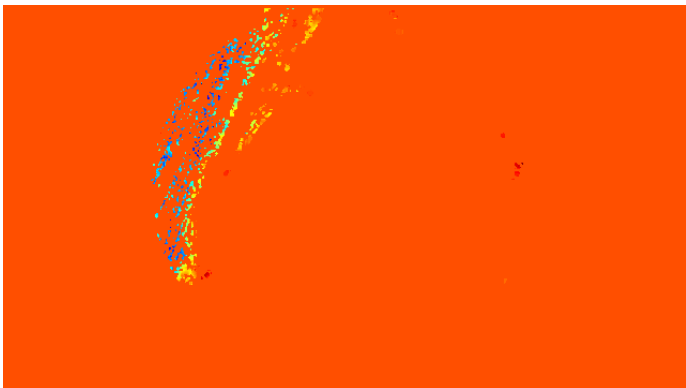
Στη συνέχεια στο σχήμα 40 παρουσιάζονται τρεις παραμετρικές εικόνες του πρώτου βαθμού πολωνύμου για τρεις διαφορετικές ακτίνες $r=2,4$ και 8 (pixel) αντίστοιχα. Οι εικόνες αυτές προέκυψαν από προσδιορισμό των τιμών του γραμμικού εκθέτη b_1 του πρώτου βαθμού πολωνύμου, για κάθε μη μηδενικό pixel της εικόνας στο τελικό frame. Δίπλα σε κάθε εικόνα υπάρχει η αντίστοιχη χρωματική κλίμακα βάσει της

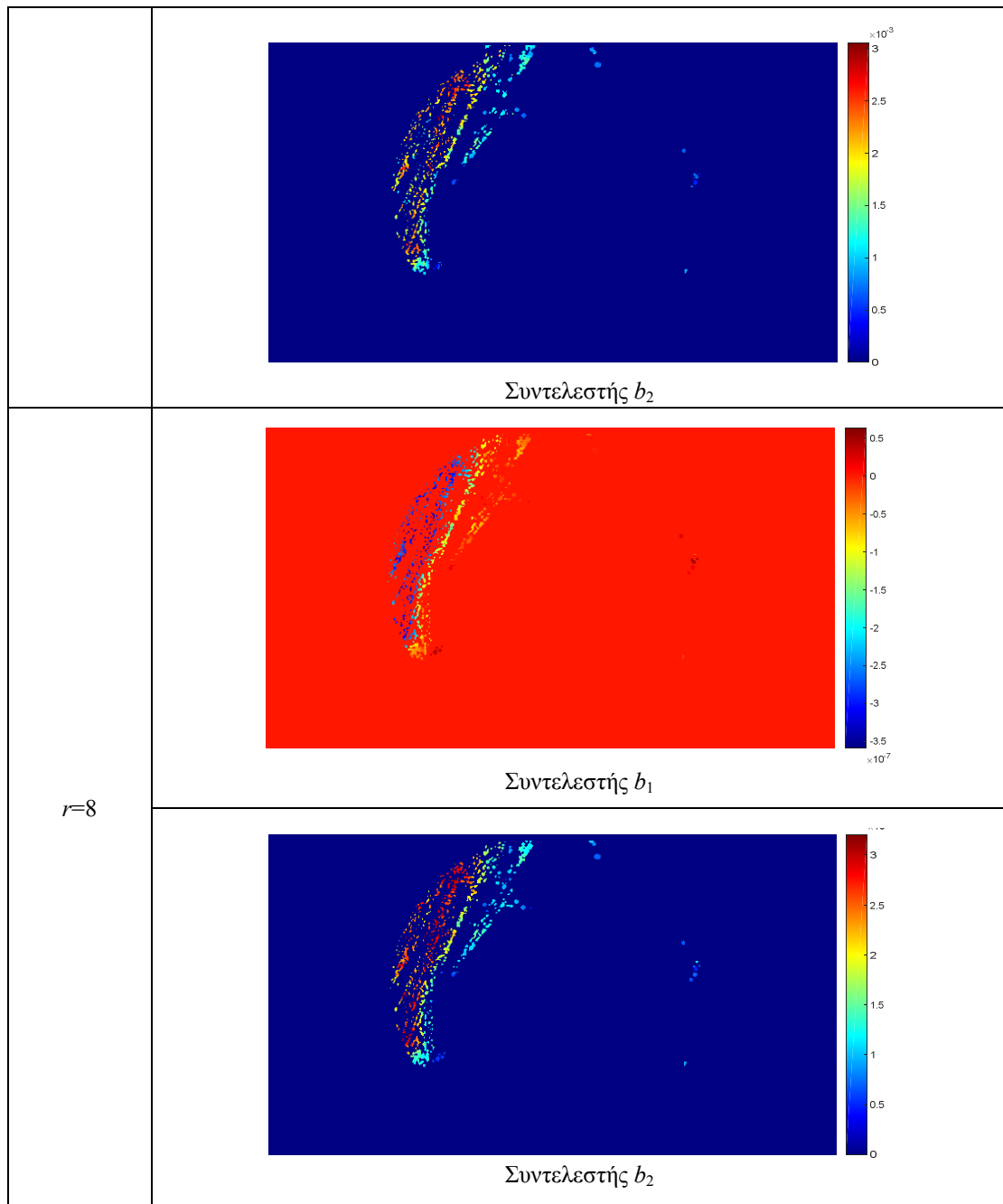
οποίας κωδικοποιούνται χρωματικά οι τιμές του b_1 . Επίσης έχει ποσοτικοποιηθεί ο αριθμός των αρνητικών pixel σε κάθε μια από αυτές τις εικόνες. Παρατηρούμε ότι ο αριθμός των pixel που έχουν αρνητικό εκθέτη b_1 μειώνεται όσο μεγαλώνει η ακτίνα της περιοχής.

Μέγεθος περιοχής τρυβλίου (r)	Αριθμός pixel με αρνητικό εκθέτη b_1	Παραμετρική εικόνα πρώτου βαθμού πολωνύμου
$r=2$	376	
$r=4$	229	
$r=8$	85	

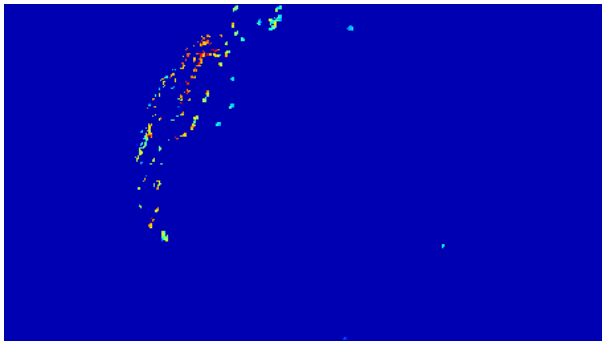
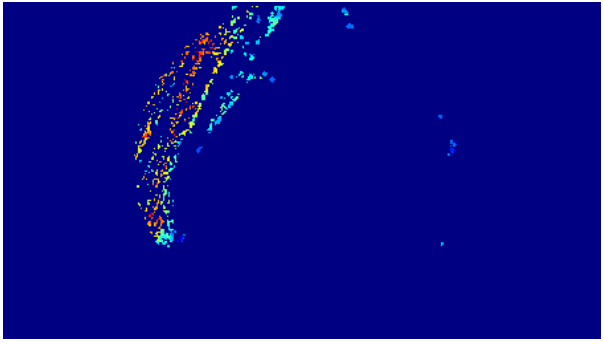
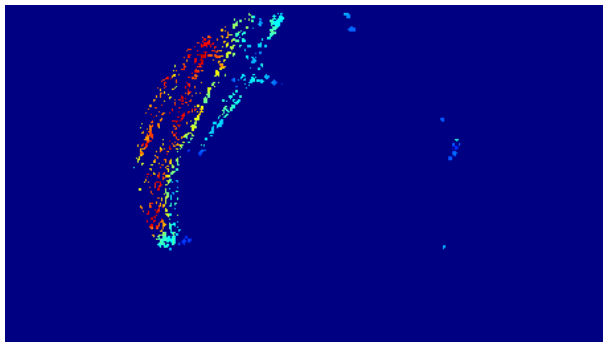
Σχήμα 40. Οι παραμετρικές εικόνες του πρώτου βαθμού πολωνύμου που προκύπτουν από προσδιορισμό των τιμών του γραμμικού εκθέτη b_1 του πρώτου βαθμού πολωνύμου, για κάθε μη μηδενικό pixel της εικόνας στο τελικό frame, με χρήση περιοχής με ακτίνα $r=2,4,8$ (pixel), καθώς και ο αριθμός των αρνητικών Pixel σε κάθε μια από αυτές.

Στην περίπτωση της λογιστικής εξίσωσης με δευτεροβάθμιο εκθέτη κατασκευάσαμε τις παραμετρικές εικόνες των συντελεστών b_2 και b_1 για τρεις διαφορετικές ακτίνες $r=2,4$ και 8 (pixel) της περιοχής υπολογισμού, για κάθε μη μηδενικό pixel της εικόνας στο τελικό frame αντίστοιχα, όπως φαίνεται στο σχήμα 41. Επιπλέον κατασκευάσαμε τις αντίστοιχες παραμετρικές εικόνες της πρώτης παραγώγου του δευτεροβάθμιου εκθέτη ($2b_2 + b_1$), οι οποίες δίνονται στο σχήμα 42.

Μέγεθος περιοχής τρυβλίου	Παραμετρική εικόνα του δευτέρου βαθμού πολυωνύμου
$r=2$	 <p data-bbox="791 1061 959 1093">Συντελεστής b_1</p>
	 <p data-bbox="791 1547 959 1579">Συντελεστής b_2</p>
$r=4$	 <p data-bbox="791 2018 959 2049">Συντελεστής b_1</p>



Σχήμα 41. Οι παραμετρικές εικόνες του δευτέρου βαθμού πολυωνύμου που προκύπτουν από προσδιορισμό των τιμών του συντελεστή b_1 και του τετραγωνικού εκθέτη b_2 για κάθε μη μηδενικό pixel της εικόνας στο τελικό frame, με χρήση περιοχής με ακτίνα $r=2,4,8$ (pixel).

Μέγεθος περιοχής τρυβλίου (r)	Παραμετρικές εικόνες της πρώτης παραγώγου του δευτεροβάθμιου εκθέτη ($2b_2 + b_1$)
$r=2$	 <p>A heatmap showing a curved, elongated structure. The color scale ranges from 0 (dark blue) to 5 (dark red) with a multiplier of $\times 10^{-3}$. The structure is most intense (red) in the center and fades to blue at the edges.</p>
$r=4$	 <p>A heatmap showing a curved, elongated structure. The color scale ranges from 0 (dark blue) to 6 (dark red) with a multiplier of $\times 10^{-3}$. The structure is more detailed than the $r=2$ case, with more distinct peaks and valleys.</p>
$r=8$	 <p>A heatmap showing a curved, elongated structure. The color scale ranges from 0 (dark blue) to 6 (dark red) with a multiplier of $\times 10^{-3}$. The structure is highly detailed, showing fine-scale variations in intensity.</p>

Σχήμα 42. Οι παραμετρικές εικόνες της πρώτης παραγώγου του δευτεροβάθμιου εκθέτη ($2b_2 + b_1$) για κάθε μη μηδενικό pixel της εικόνας στο τελικό frame, με χρήση περιοχής με ακτίνα $r=2,4,8$ (pixel).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία επιτεύχθηκε η καταγραφή της ανάπτυξης ενός μύκητα με χρήση μιας συνηθισμένης web camera, ενός φορητού υπολογιστή και ενός δωρεάν προγράμματος υπολογιστή .

Συμπεραίνουμε ότι η τεχνική του time lapse video για τη μελέτη της μικροβιακής ανάπτυξης είναι πολύ χρήσιμη και εύκολα υλοποιήσιμη, καθώς ένας επιστήμονας μπορεί να παρακολουθεί ταυτόχρονα αναπτύξεις διαφορετικών μικροβίων. Η ευριστική (heuristic) ποσοτικοποίηση του πλήθους των μικροβίων ανα pixel του τρυβλίου φαίνεται ορθή, καθώς οι εξαγόμενες καμπύλες είναι συμβατές με τις θεωρητικά αναμενόμενες.

Με την εφαρμογή απλών τεχνικών επεξεργασίας εικόνας και βίντεο μπορούν να εξαχθούν αυτόματα καμπύλες πληθυσμού από οποιοδήποτε σημείο του τρυβλίου, υπολογιζόμενες σε περιοχές διαφορετικών μεγεθών.

Η χρήση της λογιστικής συνάρτησης για την μοντελοποίηση των πειραματικών καμπυλών πληθυσμού, η οποία αν και χρησιμοποιείται συχνά για το σκοπό αυτό, στο συγκεκριμένο πείραμα δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα για κάποιες περιοχές του τρυβλίου. Αντίθετα, η χρήση τετραγωνικού εκθέτη στην εν'λόγω συνάρτηση έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, καθώς μπορεί να μοντελοποιήσει και καμπύλες πληθυσμού που τελικά καθίστανται φθίνουσες.

Επιπλέον, εφαρμόσαμε επιτυχώς την έννοια της παραμετρικής εικόνας απεικονίζοντας μια ποσότητα ανάλογη του ρυθμού ανάπτυξης του μικροβιακού πληθυσμού. Πειραματιστήκαμε με διαφορετικά μεγεθη περιοχής για τον υπολογισμό των παραμέτρων του μοντέλου και συμπεράναμε ότι όσο μεγαλώνει το μέγεθος της περιοχής η καμπύλη γίνεται πιο ομαλή και ο προσδιορισμός των παραμέτρων του μοντέλου πιο ακριβής.

Τα τελευταία χρόνια τα μαθηματικά μοντέλα παρουσιάζουν αυξανόμενο ενδιαφέρον για τον έλεγχο υποθέσεων σχετικά με τη δυναμική συμπεριφορά των βιολογικών συστημάτων. Η μεθοδολογία επεξεργασίας εικόνας, που αναπτύξαμε, είναι υπολογιστικά αποδοτική και κατάλληλη για υψηλής απόδοσης ανάλυση βακτηριακών κυτταρικών αποικιών με την χρήση μίας εξελεγμένης κάμερας. Έτσι, οι νέες εξελίξεις στην ανάλυση εικόνας της μικροβιακής ανάπτυξης σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων θα παρέχουν αποτελεσματικές βάσεις δεδομένων για προσεγγίσεις μοντελοποίησης και αξιολογήσεις μικροβιακής ανάπτυξης. Τέλος, η αξιολόγηση αυτού του ανοιχτού θέματος θα ωφελήσει τη κοινότητα που σχετίζεται με τη βιολογία του συστήματος, καθώς μια μέθοδος υψηλής απόδοσης είναι απαραίτητη για τη μοντελοποίηση της μικροβιακής ανάπτυξης. Έτσι, ένας επιστήμονας μπορεί να παρακολουθεί ταυτόχρονα αρκετές αναπτύξεις μικροβίων και να εξαγάγει αυτόματα καμπύλη από οποιοδήποτε σημείο του τρυβλίου. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί κάποιος να εξοικονομήσει χρόνο (πειραματικός χρόνος για τη συλλογή δεδομένων) και χρήμα (πολλές αναλύσεις μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα).

6.ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] http://www.iatrikionline.gr/deltio_50d/02.htm
- [2] Schenk, D., & Bacher, S. (2002). Functional response of a generalist insect predator to one of its prey species in the field. *Journal of Animal Ecology*, 71(3), 524-531.
- [3] Morrell, M., Fraser, V. J., & Kollef, M. H. (2005). Delaying the empiric treatment of Candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(9), 3640-3645.
- [4] Zhao, L., Chen, Y., & Schaffner, D. W. (2001). Comparison of logistic regression and linear regression in modeling percentage data. *Applied and environmental microbiology*, 67(5), 2129-2135.
- [5] Gonzales, D. S., Pinheiro, J. C., & Bavister, B. D. (1995). Prediction of the developmental potential of hamster embryos in vitro by precise timing of the third cell cycle. *Journal of reproduction and fertility*, 105(1), 1-8.
- [6] Sartor, M. A., Leikauf, G. D., & Medvedovic, M. (2008). LRpath: a logistic regression approach for identifying enriched biological groups in gene expression data. *Bioinformatics*, 25(2), 211-217.
- [7] Hurst, M. R. H., van Koten, C., & Jackson, T. A. (2014). Pathology of *Yersinia entomophaga* MH96 towards *Costelytra zealandica* (Coleoptera; Scarabaeidae) larvae. *Journal of invertebrate pathology*, 115, 102-107.
- [8] Cobo, M. P., Libro, S., Marechal, N., D'Entremont, D., Cobo, D. P., & Berkmen, M. (2017). Visualizing bacterial colony morphologies using time-lapse imaging chamber, MOCHA. *Journal of Bacteriology*, JB-00413.
- [9] https://en.wikipedia.org/wiki/Time-lapse_photography
- [10] <https://en.wikipedia.org/wiki/Fungus>
- [11] <https://www.britannica.com/science/fungus>
- [12] Delpretti, S., Luisier, F., Ramani, S., Blu, T., & Unser, M. (2008, May). Multiframe sure-let denoising of timelapse fluorescence microscopy images. In *Biomedical Imaging: From Nano to Macro, 2008. ISBI 2008. 5th IEEE International Symposium on* (pp. 149-152). IEEE.
- [13] Sargent, R., Bartley, C., Dille, P., Keller, J., Nourbakhsh, I., & LeGrand, R. (2010). Timelapse GigaPan: Capturing, sharing, and exploring timelapse gigapixel imagery, Proceedings of the Fine International Conference on Gigapixel Imaging for Science, November 11–13 2010.
- [14] Dresbøll, D. B., Thorup-Kristensen, K., McKenzie, B. M., Dupuy, L. X., & Bengough, A. G. (2013). Timelapse scanning reveals spatial variation in tomato

(*Solanum lycopersicum* L.) root elongation rates during partial waterlogging. *Plant and Soil*, 369(1-2), 467-477.

[15] Desai, N., Ploskonka, S., Goodman, L. R., Austin, C., Goldberg, J., & Falcone, T. (2014). Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 54.[

[16] Shapiro, J. A., & Hsu, C. (1989). *Escherichia coli* K-12 cell-cell interactions seen by time-lapse video. *Journal of bacteriology*, 171(11), 5963-5974.

[17] Hartwell, L. H., Culotti, J., & Reid, B. (1970). Genetic control of the cell-division cycle in yeast, I. Detection of mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 66(2), 352-359.

[18] <http://www.candylabs.com/videovelocity>

[19] Achkar, J. M., & Fries, B. C. (2010). *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clinical microbiology reviews*, 23(2), 253-273.

[20] Sauls, J. T., Li, D., & Jun, S. (2016). Adder and a coarse-grained approach to cell size homeostasis in bacteria. *Current opinion in cell biology*, 38, 38-44.

[21] Ahmad, A., and A. U. Khan. 2009. Prevalence of *Candida* species and potential risk factors for vulvovaginal candidiasis in Aligarh, India. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 144:68-71.

[22] Bailey, D. A., P. J. Feldmann, M. Bovey, N. A. Gow, and A. J. Brown. 1996. The *Candida albicans* HYR1 gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. *J. Bacteriol.* 178:5353-5360

[23] Bauters, T. G., M. A. Dhont, M. I. Temmerman, and H. J. Nelis. 2002. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*

[24] (<http://panacea.med.uoa.gr>)__