

Αναλυτική έκθεση με δεδομένα σχετικά με τη μεθοδολογία και τους αλγορίθμους επεξεργασίας εικόνας από μικροσκόπιο για την καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε μικροβιακές κοινότητες (Π21-Δ5.1)

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

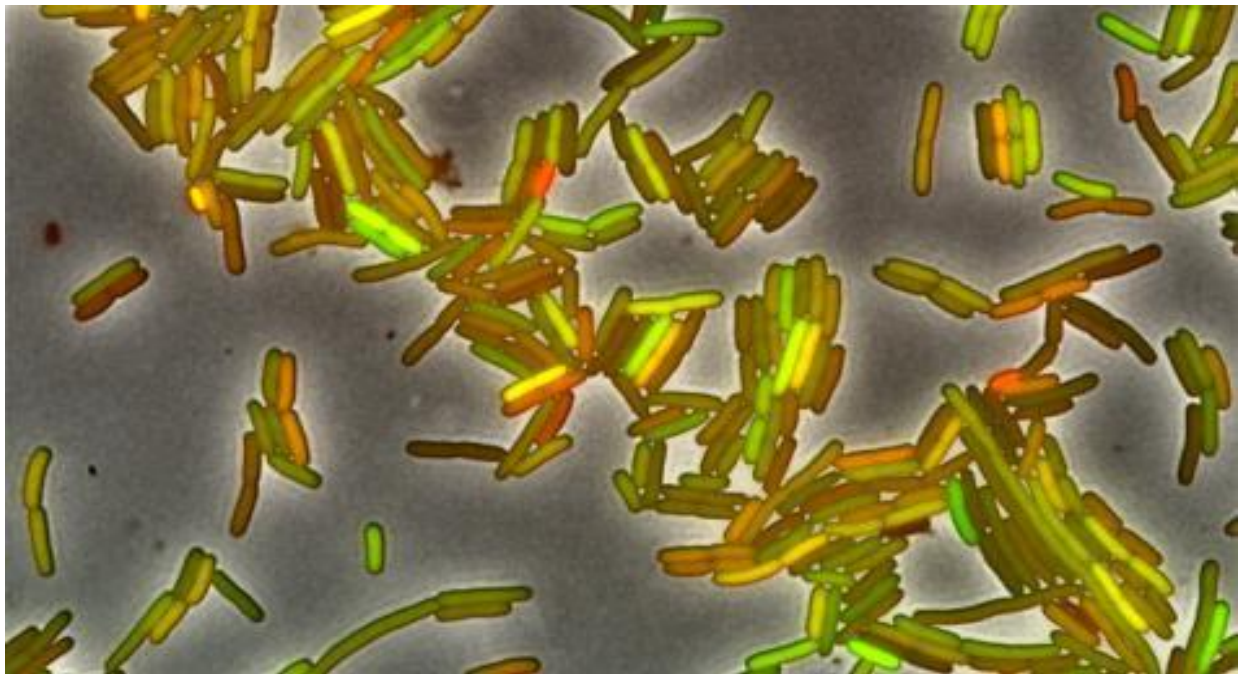
1. Εισαγωγή .....	2
1.1 Από τα μεμονωμένα κύτταρα (single cells) στις μικροαποικίες και τα βιοϋμένια .....	2
1.2 Αναγκαιότητα για την ανάπτυξη μεθοδολογίας.....	3
1.3 Δομή της αναφοράς.....	4
2. Υπάρχουσες Προσεγγίσεις (State of the art) .....	5
2.1 Ήδη υπάρχοντα λογισμικά.....	5
2.2 Μεθοδολογία που αναπτύχθηκε.....	6
3. Μέθοδοι .....	8
3.1 Προεπεξεργασία εικόνας.....	8
3.2 Κατάτμηση αποικιών .....	9
3.3 Αλγόριθμος κατάτμησης μεμονωμένων κυττάρων.....	10
3.3.1 Επεξεργασία συγγραμμικών (collinear) αντικειμένων .....	12
3.3.2 Μοντέλα μίξης γκαουσιανών κατανομών (Gaussian Mixture Models) .....	13
3.3.3 Επεξεργασία πολύπλοκων (complex) αντικειμένων.....	14
4. Κυτταρικές ταινίες και Μέθοδος Αξιολόγησης .....	20
4.1 Περιγραφή κυτταρικών ταινιών.....	20
4.2 Μέθοδος Αξιολόγησης.....	24
5. Αποτελέσματα και Συζήτηση .....	27
5.1 Σύγκριση των αποτελεσμάτων της προτεινόμενης μεθοδολογίας με το Ground Truth .....	27
5.2 Σύγκριση της προτεινόμενης μεθοδολογίας με τα υπάρχοντα λογισμικά .....	32
5.3 Ανάλυση υπολογιστικής πολυπλοκότητας.....	34
6. Συμπεράσματα.....	36
Αναφορές .....	37
Παράρτημα .....	41

## 1. Εισαγωγή

Σε αυτό το κεφάλαιο θα ορίσουμε το πρόβλημα της επεξεργασίας εικόνας βακτηρίων και θα αναλύσουμε τη σημασία του, για τις προσεγγίσεις της συστημικής μικροβιολογίας. Στην πρώτη ενότητα, ο αναγνώστης θα εισαχθεί στην έννοια του σχηματισμού μικροαποικίας. Στη δεύτερη ενότητα, θα περιγραφούν οι αρχές της μικροβιολογικής μικροσκοπίας. Τέλος, θα γίνει λόγος για την αναγκαιότητα ανάπτυξης μεθοδολογίας στην επεξεργασία εικόνας και στην αυτόματη καταμέτρηση βακτηρίων.

### 1.1 Από τα μεμονωμένα κύτταρα (single cells) στις μικροαποικίες και τα βιοϋμένια

Εδώ και αρκετά χρόνια η προρρητική μικροβιολογία (predictive microbiology) ασχολείται με την ανάπτυξη ντετερμινιστικών μοντέλων, τα οποία βασίζονται σε μελέτες μεγάλων μικροβιακών πληθυσμών. Τα παραδοσιακά μαθηματικά μοντέλα περιγράφουν την ανάπτυξη μικροβιακών πληθυσμών, ως ένα σύνολο, χωρίς να λαμβάνουν υπόψη τα μεμονωμένα κύτταρα. Ωστόσο, στην πραγματικότητα, η μόλυνση των τροφίμων από παθογόνα βακτήρια συνήθως συμβαίνει σε πολύ χαμηλό αριθμό κυττάρων και η πιθανότητα τα τρόφιμα να είναι επιβλαβή κατά την κατανάλωσή τους, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το αν και πόσο γρήγορα μπορούν να αναπτυχθούν τα μεμονωμένα κύτταρα. Τα στοχαστικά μοντέλα είναι σε θέση να προβλέψουν ρεαλιστικά τα αποτελέσματα από πραγματικά συμβάντα μόλυνσης (σε χαμηλό μικροβιακό πληθυσμό), για αυτό και χρησιμοποιούνται ως μέσα για τον έλεγχο της ασφάλειας των τροφίμων. Έτσι, οι μελέτες της προρρητικής μικροβιολογίας επικεντρώνονται όλο και περισσότερο στην παρακολούθηση της κινητικής ανάπτυξης σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου.



**Σχήμα 1:** Η γονιδιακή έκφραση είναι ένα στοχαστικό φαινόμενο (σχήμα προσαρμοσμένο από το [1]). Αυτά τα βακτήρια εκφράζουν δύο φθορίζουσες πρωτεΐνες, μια κόκκινη και μια πράσινη. Και τα δύο γονίδια ελέγχονται από τους ίδιους υποκινητές, επομένως αν η γονιδιακή έκφραση ήταν ντετερμινιστική, όλα τα βακτήρια θα είχαν ίση ποσότητα κόκκινου και πράσινου χρώματος ( άρα θα εμφανίζονταν κίτρινα). Η παρουσία των κυττάρων τα οποία είναι περισσότερο κόκκινα παρά πράσινα, ή το αντίστροφο, είναι αποτέλεσμα των στοχαστικών διακυμάνσεων («θόρυβος») στη γονιδιακή έκφραση.

Τα μεμονωμένα κύτταρα εντός πανομοιότυπων μικροβιακών πληθυσμών εμφανίζουν αξιοσημείωτη διασπορά στους φαινότυπους, η οποία οφείλεται κυρίως στην επιγενετική διακύμανση στο επίπεδο πληθυσμού και δεν συνεπάγεται πάντοτε αλλαγές στο γονιδίωμα των μεμονωμένων κυττάρων [1][2], βλ. Σχήμα 1. Για παράδειγμα, η ποσότητα παραγωγής μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε γενετικά πανομοιότυπα κύτταρα σε ταυτόσημο περιβάλλον, μπορεί να διαφέρει λόγω των στοχαστικών διακυμάνσεων («θόρυβος») κατά τη διάρκεια της μεταγραφής και της μετάφρασης. Αυτό που μπορεί να παρατηρηθεί από την παραπάνω διακύμανση είναι ο θόρυβος στη συμπεριφορά των μεμονωμένων κυττάρων σε συνάρτηση με το θόρυβο του χρόνου διαίρεσής τους.

Η ικανότητα των μικροβιακών κοινοτήτων να προσκολλώνται σε επιφάνειες ή διεπιφάνειες (π.χ. διεπιφάνεια αέρα-υγρού) και να σχηματίζουν βιοϋμένια έχει αποδειχθεί μια αποτελεσματική τεχνική για την επιβίωση (survival) και την ανθεκτικότητα (persistence) των βακτηρίων. Γενικά, η ζωή των βακτηρίων σε μορφή βιοϋμενίων αποτελεί μια στρατηγική η οποία τους επιτρέπει: (α) να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε συνθήκες και θεραπείες οι οποίες θα ήταν θανατηφόρες σε διαφορετική περίπτωση (πλαγκτονικά κύτταρα), (β) να αντιδρούν μαζικά σε συγκεκριμένα ερεθίσματα από το περιβάλλον [2][3], (γ) να αναπτύσσονται και να επιβιώνουν ευκολότερα μέσω μεταβολικής συνεργατικότητας (cooperativity) [4][5] και (δ) να αποκτούν νέα γενετικά χαρακτηριστικά μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων [6]. Η στρατηγική που ακολουθούν τα πλαγκτονικά βακτήρια για να αναπτύξουν τις προαναφερθείσες ικανότητες παρουσιάζει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, κυρίως λόγω της σοβαρότητας των προβλημάτων τα οποία σχετίζονται μόνο με τα βιοϋμένια και όχι με τους αντίστοιχους πλαγκτονικούς πληθυσμούς [7]. Τα μικρόβια υπό μορφή βιοϋμενίων, συναντώνται σε πολλά (αν όχι σε όλα) τα οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένων και των ευκαρυωτικών ιστών, των φυσικών αλλά και των τεχνητών επιφανειών [8]. Κατά συνέπεια, ο σχηματισμός βιοϋμενίων μπορεί να θεωρηθεί ως ένας σημαντικός κίνδυνος, κατά τη διαδικασία παραγωγής προϊόντων τροφίμων, καθώς τα βακτήρια που ανήκουν σε αυτά (προσκολλημένα κύτταρα) μπορούν ανά πάσα στιγμή να αποσπαστούν και να μολύνουν τα τελικά προϊόντα. Δεδομένου ότι η φυσιολογία των αποσπασμένων κυττάρων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τον προηγούμενο τρόπο ζωής τους, σε βιοϋμένια ή μικροαποικίες, η διερεύνηση της επίδρασης των συνθηκών στη φυσιολογία των κυττάρων κατά τη δημιουργία μικροαποικιών και μετέπειτα βιοϋμενίων είναι υψίστης σημασίας για την αξιολόγηση του κινδύνου ανάπτυξης των αποσπασμένων βακτηρίων.

Ο σχηματισμός βιοϋμενίων είναι μια σύνθετη διαδικασία, για αυτό κατά τη διάρκειά της ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων διαφόρων μηχανισμών ενεργοποιείται [9]. Μελέτες σχετικά με το σχηματισμό, την οργάνωση και την ανάπτυξη των βιοϋμενίων, μαζί με εκείνες που αφορούν στους μηχανισμούς επικοινωνίας κυττάρου-προς-κύτταρο σηματοδότηση σε τέτοιες κοινότητες, βασίζονται σήμερα στο γεγονός ότι τα κύτταρα βιοϋμενίων παρουσιάζουν διαφορετικούς ρυθμούς ανάπτυξης και διαφορετικά προφίλ γονιδιακής έκφρασης σε σύγκριση με πλαγκτονικά βακτήρια που ανήκουν στο ίδιο είδος μικροοργανισμού [10-12].

## 1.2 Αναγκαιότητα για την ανάπτυξη μεθοδολογίας

Οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την ανομοιογένεια στη συμπεριφορά ανάπτυξης μεμονωμένων κυττάρων περιορίζεται κυρίως λόγω των τεχνικών δυσκολιών στην παρακολούθηση

της ανάπτυξης των μεμονωμένων κυττάρων. Οι μελέτες σχετικά με τη μεταβλητότητα της ατομικής συμπεριφοράς των κυττάρων βασίζονται κυρίως σε μελέτες μικροσκοπίας time-lapse και απαιτούν δεδομένα από εκατοντάδες ή ακόμα και χιλιάδες κύτταρα [13-19]. Μία από τις δυσκολίες της προσέγγισης αυτής είναι η αποτελεσματική ανάλυση των εν λόγω πολυάριθμων δεδομένων. Πράγματι, η παρακολούθηση και ανάλυση του αριθμού, αλλά και των ιδιοτήτων των μεμονωμένων κυττάρων (π.χ. κυτταρικό μήκος, μέγεθος, χρόνος διαίρεσης κ.λπ.) σε μία αναπτυσσόμενη μικροαποικία είναι μεγάλη πρόκληση. Ακόμη και η εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων είναι σήμερα πολύ χρονοβόρα και εκτεθειμένη σε λάθη, καθώς ουσιαστικά πραγματοποιείται από ανθρώπους-χρήστες. Τα διαθέσιμα εργαλεία λογισμικού πολύ συχνά αποτυγχάνουν πλήρως, ή παρέχουν πολύ ανακριβείς καταμετρήσεις κυττάρων. Ο ακριβής υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων κατά την επεξεργασία ακολουθιών εικόνων μικροβιακών κοινοτήτων και η εκτίμηση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών με έναν πλήρως αυτοματοποιημένο τρόπο, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα, άλυτα προβλήματα της επεξεργασία εικόνας στην μικροβιολογία. Έτσι, καθίσταται σαφές το γεγονός ότι οι εξελίξεις στην επεξεργασία εικόνας θα επιτρέψουν την παρακολούθηση της μικροβιακής ανάπτυξης σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων και θα δημιουργήσουν νέα γνώση η οποία οργανωμένη σε βάσεις δεδομένων θα επιτρέψει στοχαστικές προσεγγίσεις μοντελοποίησης και μικροβιακή εκτίμηση κινδύνου [20]. Τέλος, η αντιμετώπιση αυτού του υπάρχοντος προβλήματος θα ωφελήσει τη συστημική μικροβιολογία, καθώς μια μέθοδος υψηλής ρυθμαπόδοσης είναι αδιαμφισβήτητα απαραίτητη για την μοντελοποίηση μικροβιακών κοινοτήτων.

### 1.3 Δομή της αναφοράς

Η υπόλοιπη αναφορά είναι οργανωμένη ως εξής: στο 2<sup>ο</sup> κεφάλαιο συζητώνται οι δυνατότητες άλλων πακέτων λογισμικού και εισάγεται η προτεινόμενη μεθοδολογία. Στο 3<sup>ο</sup> κεφάλαιο παρουσιάζεται και περιγράφεται η μεθοδολογία που έχει προηγουμένως αναπτυχθεί. Στη συνέχεια, στο 4<sup>ο</sup> κεφαλαίο παρουσιάζονται οι κυτταρικές ταινίες και τα στιγμιότυπα εικόνας που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της καταμέτρησης της εν λόγω μεθοδολογίας, όπως και η μέθοδος αξιολόγησης που ακολουθήθηκε. Στο 5<sup>ο</sup> κεφάλαιο σχολιάζονται διεξοδικά τα αποτελέσματα της αξιολόγησης, ενώ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα οπτικοποίησης κατάτμησης αλλά και οι επιπλέον δυνατότητες που παρέχονται από τη μεθοδολογία αυτή. Τέλος, στο 6<sup>ο</sup> κεφάλαιο αναφέρονται εν συντομία τα τελικά μας συμπεράσματα και υποδεικνύονται μελλοντικές εξελίξεις και ενδεχόμενες βελτιώσεις της μεθοδολογίας.

## 2. Υπάρχουσες Προσεγγίσεις (State of the art)

Στο κεφάλαιο αυτό θα παρουσιασθούν τα ήδη υπάρχοντα λογισμικά αυτόματης καταμέτρησης βακτηρίων. Στην πρώτη ενότητα, θα περιγραφούν αναλυτικά αυτά τα λογισμικά και θα συζητηθούν τα μειονεκτήματά τους. Στη δεύτερη ενότητα, θα αναφερθούν οι δυνατότητές τους και θα αναλυθεί η προτεινόμενη μεθοδολογία.

### 2.1 Ήδη υπάρχοντα λογισμικά

Υπάρχουν επί του παρόντος αρκετά λογισμικά επεξεργασίας εικόνων ικανά για την κατάτμηση κυττάρων (cell segmentation). Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι τα περισσότερα από αυτά λειτουργούν καλύτερα με στιγμιότυπα εικόνων, στα οποία αποτυπώνονται ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα βακτηριακά κύτταρα είναι συγκριτικά με τα ευκαρυωτικά κύτταρα μικρά σε μέγεθος, συχνά κοντά στο όριο της ανάλυσης (resolution) του οπτικού μικροσκοπίου, καθιστώντας δύσκολο το να χρησιμοποιηθούν οι διαδεδομένες τεχνικές εικονοστοιχείων ώστε να μπορούν να διαχωριστούν συστάδες κυττάρων με την απαιτούμενη ακρίβεια. Αρκετά εργαλεία ανάλυσης εικόνας έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατάτμηση βακτηριακών κυττάρων. Αυτά συνήθως ξεκινούν με τεχνικές καταφλίωσης εικόνας προκειμένου να σκιαγραφηθούν φωτεινά ή σκοτεινά κύτταρα έναντι ενός ομοιόμορφου φόντου, που παράγονται χρησιμοποιώντας είτε μικροσκοπία αντίθεσης φάσης είτε μικροσκοπία φθορισμού ομοιόμορφα σημασμένων κυττάρων [21][22]. Τα εργαλεία αυτά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες με βάση τις προσεγγίσεις που ακολουθούν. Η πρώτη προσέγγιση εστιάζει στη μεγιστοποίηση της ανάλυσης των περιγραμμάτων των κυττάρων με τη χρήση παρεμβολής (interpolation) μεταξύ των τιμών των εικονοστοιχείων [21]. Αυτή η προσέγγιση παράγει περιγράμματα κυττάρων υψηλής ακρίβειας σε καλά διαχωρισμένα κύτταρα, αλλά αποτυγχάνει να κατατμήσει κύτταρα που ακουμπούν το ένα το άλλο ή γενικότερα δύσκολα διαχωρίσιμα κύτταρα, εμποδίζοντας έτσι την ανάλυση των πυκνά οργανωμένων κυττάρων σε στιγμιότυπα εικόνας, καθώς και την παρακολούθηση των απογόνων που προκύπτουν από τη διαίρεση των κυττάρων σε time-lapse εικόνες. Η δεύτερη προσέγγιση εστιάζει στην κατάτμηση της εικόνας με στόχο να διαχωρίσει τα κύτταρα σε πυκνά οργανωμένα βακτήρια σε βάρος της ακρίβειας με τη χρήση τεχνικών που βασίζονται στα εικονοστοιχεία, όπως η ανίχνευση ακμών (edge detection), ο μετασχηματισμός Watershed, και οι μαθηματικοί μορφολογικοί τελεστές [22][23]. Ωστόσο, υπάρχει ισχυρή ζήτηση για τη δυνατότητα απόκτησης ακρίβειας υποεικονοστοιχείου ώστε να σκιαγραφούνται τα πυκνά οργανωμένα κύτταρα σε στιγμιότυπα εικόνας με θόρυβο, αυξάνοντας παράλληλα την αυτοματοποίηση της επεξεργασίας.

Αρκετά πακέτα λογισμικών είναι διαθέσιμα σήμερα. Τα πιο διαδεδομένα και αποτελεσματικά από αυτά είναι CellTracer [23], TLM-Tracker [24], MicrobeTracker [25] και Schnitzcells [26]. Οι δημιουργοί του CellTracer [23] ανέπτυξαν την έννοια της υβριδικής εικόνας, ασπρόμαυρης (grayscale) και δυαδικής (binary), και επιπλέον επέκτειναν τη λειτουργικότητα των υπαρχόντων φίλτρων εικόνας και μαθηματικών μορφολογικών τελεστών που έχουν δημιουργηθεί για ασπρόμαυρες εικόνες σε αυτές τις υβριδικές εικόνες. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την κατάτμηση κυττάρων από μια εικόνα, επαναληπτικά προκειμένου να μετατρέψει σταδιακά την ασπρόμαυρη εικόνα σε δυαδική μάσκα κατατετημένων κυττάρων, χωρίς να απαιτεί αρχικοποίηση ή αρχική εκτίμηση των κυττάρων. Το TLM-Tracker [24] διαθέτει αρκετές τεχνικές για την κατάτμηση βακτηρίων από στιγμιότυπα εικόνας, όπως τεχνικές καταφλίωσης, το μετασχηματισμό Watershed και τεχνικές που βασίζονται στα ισοσταθμικά σύνολα (level sets). Το MicrobeTracker [25]

εκμεταλλεύεται για το βήμα της κατάτμησης, διάφορους αλγορίθμους που έχουν αναπτυχθεί για τη κατάτμηση ιατρικής εικόνας και γενικότερα για την υπολογιστική όραση, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται η ομαδοποίηση (clustering), η σύγκριση προτύπου (template matching), τα ενεργά μοντέλα περιγραμμάτων (active contour models), η τεχνική της αύξησης περιοχών (region growing), και η τεχνική ισοσταθμικού συνόλου (level set). Το Schnitzcells [26] μπορεί να κατατμήσει τα κύτταρα χρησιμοποιώντας είτε εικόνας φθορισμού είτε εικόνες αντίθεσης φάσης.

Όλα τα προαναφερθέντα πακέτα λογισμικού παρουσιάζουν αρκετούς περιορισμούς στην χρήση τους. Αυτό τα αποτρέπει από τα να λειτουργούν αποτελεσματικά και με πλήρως αυτοματοποιημένο τρόπο. Συγκεκριμένα, το CellTracer και το TLM-Tracker απαιτούν από το χρήστη να έχει γνώσεις επεξεργασίας εικόνας ώστε να επιλέξει τη καταλληλότερη από τις προσφερόμενες μεθοδολογίες για την επεξεργασία των στιγμιότυπων μιας κυτταρικής ταινίας. Το MicrobeTracker αποδεικνύεται μη φιλικό προς το χρήστη λόγω της πολύπλοκης παραμετροποίησής του. Συγκεκριμένα, το λογισμικό είναι παραμετροποιημένο με κάποιες προεπιλεγμένες ρυθμίσεις που εξαρτώνται από τον τύπο εικόνας και τα είδος του μικροοργανισμού, αλλά λόγω της ευαισθησίας της μεθοδολογίας που απαιτείται να χρησιμοποιηθεί, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση από το χρήστη. Επιπλέον, ένα πολύ σημαντικό μειονέκτημα όλων των σύγχρονων λογισμικών είναι η έλλειψη γενικότητας (overfit), δηλαδή το γεγονός ότι δεν είναι σε θέση να λειτουργούν εύρωστα σε διάφορα είδη εικόνας (ανεξάρτητα από τον τύπο μικροσκοπίου και του τύπος απεικόνισης). Όλοι οι παραπάνω περιορισμοί (Πίνακας 1) δηλώνουν σαφώς σε πρώτο επίπεδο, ότι η επεξεργασία βακτηριακών εικόνων εξακολουθεί να θεωρείται εμπόδιο για την ανάλυση υψηλής ρυθμαπόδοσης και εν συνεχεία ότι η ανάγκη για δημιουργία αποτελεσματικών και αυτοματοποιημένων εργαλείων (υψηλή ρυθμαπόδοσης) είναι εμφανής.

**Πίνακας 1. Σύνοψη ιδιοτήτων των διαθέσιμων λογισμικών με την προτεινόμενη μεθοδολογία**

Λογισμικά	Παρακολούθηση και κατάτμηση σε πολλαπλές αποικίες	Εύρωστο ανεξάρτητα από την ποιότητα	Παραμετροποίηση	Οπτικό/ Συνεστιακό Μικροσκόπιο	Πολλαπλά είδη Μικροσκοπίας (αντίθεσης φάσης, φωτεινού πεδίου, φθορισμού, κα)
CellTracer [23]	όχι	όχι	πολύπλοκη	οπτικό	όχι
MicrobeTracker [24]	όχι	όχι	πολύπλοκη	και τα δύο	όχι
TLM-Tracker [25]	όχι	όχι	πολύπλοκη	οπτικό	όχι
Schnitzcells [26]	όχι	ναι	απλή	και τα δύο	όχι
<b>Προτεινόμενη Μεθοδολογία</b>	<b>ναι</b>	<b>ναι</b>	<b>απλή</b>	<b>και τα δύο</b>	<b>ναι</b>

## 2.2 Μεθοδολογία που αναπτύχθηκε

Στο σημείο αυτό παρουσιάζεται μία νέα μεθοδολογία ανάλυσης βακτηριακών κυτταρικών ταινιών. Η μεθοδολογία αυτή βασίζεται σε τεχνικές επεξεργασίας εικόνας και μεθόδους μηχανικής μάθησης ενώ εκμεταλλεύεται τόσο το γεγονός ότι το σχήμα των βακτηριακών κυττάρων είναι καθορισμένο,

όσο και τις πληροφορίες για το είδος της κυτταρικής ταινίας, όταν αυτές είναι διαθέσιμες, προκειμένου να επιτευχθεί η κατάτμηση των κυττάρων με υψηλή ακρίβεια, ακόμα και σε εικόνες με θόρυβο που περιέχουν συνωστισμένες αποικίες βακτηρίων. Η προτεινόμενη μεθοδολογία επιτρέπει την αυτοματοποιημένη κατάτμηση των κυττάρων και επακόλουθα την ποσοτικοποίηση τους σε μεμονωμένα στιγμιότυπα αλλά και σε time-lapse εικόνες. Επίσης, η μεθοδολογία μας διέπεται από την υπολογιστική αρχή «διαίρει και βασίλευε» συνδυάζοντας διάφορες τεχνικές (από την επεξεργασία εικόνας μέχρι και τη μηχανική μάθηση), ανάλογα με το επίπεδο της επεξεργασίας και την ποιότητα της εικόνας. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία λοιπόν βασίζεται στη διαίρεση του προβλήματος σε μικρότερα υποπροβλήματα.

Έτσι, ξεκινώντας από το επίπεδο της εικόνας, καταλήγουμε στο επίπεδο των αποικιών. Αυτό, μας επιτρέπει να αναλύουμε εικόνες ανεξάρτητα από τον αριθμό των μικροαποικιών που περιέχουν. Εισάγεται με τον τρόπο αυτό ένα νέο, πολύ σημαντικό, χαρακτηριστικό το οποίο οι προηγούμενες προσεγγίσεις δεν προσέφεραν. Έτσι, ο χρήστης μπορεί να παρακολουθεί διάφορες μικροαποικίες παράλληλα και να εξάγει μεμονωμένα τα χαρακτηριστικά τους, χωρίς την ανάγκη επέμβασης στις αρχικές εικόνες. Με αυτόν τον τρόπο δύναται κανείς να εξοικονομήσει χρόνο (π.χ. εξοικονόμηση πειραματικού χρόνου προς το χρόνο για τη συλλογή δεδομένων) και χρήματα, καθώς αρκετές κυτταρικές ταινίες μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα χωρίς να είναι απαραίτητη η ανθρώπινη παρέμβαση.

Στο επίπεδο των αποικιών, διαιρούμε και πάλι το πρόβλημα, ώστε να καταλήξουμε διαδοχικά σε μεμονωμένα κύτταρα. Η προσέγγιση αυτή μας δίνει τη δυνατότητα επεξεργασίας των αποικιών, ανεξάρτητα από τον πληθυσμό τους, δηλαδή την επεξεργασία συνωστισμένων αποικιών. Μια ενδιαφέρουσα ιδιότητα της μεθοδολογίας που προτείνουμε είναι ότι έχοντας φτάσει στο επίπεδο των αποικιών, ανεξάρτητα από το είδος της εικόνας, λειτουργεί με τον ίδιο αλγοριθμικό τρόπο. Επίσης, η μοναδική αυτή ιδιότητα παρέχει τη γενικότητα της προσέγγισής μας. Η μεθοδολογία μας είναι πλήρως αυτοματοποιημένη, υψηλής ρυθμαπόδοσης και δεν απαιτεί ανθρώπινη παρέμβαση, ακόμη και για διαφορετικούς τύπους κυτταρικών ταινιών-εισόδου. Τέλος, η ευρωστία της κατάτμησης της προτεινόμενης μεθοδολογίας, εκτός από την καταμέτρηση βακτηρίων, επιτρέπει και την εξαγωγή πολύτιμων κυτταρικών χαρακτηριστικών από την κυτταρική ταινία, τα οποία μπορεί να οπτικοποιήσει σύμφωνα με τις ανάγκες του χρήστη.

### 3. Μέθοδοι

Σε αυτό το κεφάλαιο επιδιώκεται η αναλυτική παρουσίαση της προτεινόμενης μεθοδολογίας, η οποία αποτελείται από τέσσερα (4) διαδοχικά στάδια, την προεπεξεργασία εικόνας, την κατάτμηση των αποικιών, την κατάτμηση των βακτηρίων σε κάθε αποικία, και την καταμέτρηση και την εξαγωγή χαρακτηριστικών των βακτηρίων. Η μεθοδολογία ξεκινά από μια εικόνα, προχωράει στην κατάτμηση των αποικιών, εντοπίζει τα αντικείμενα με ένα ή / και περισσότερα κύτταρα και τελικά φτάνει στο επιθυμητό αποτέλεσμα, στην κατάτμηση μεμονωμένων κυττάρων. Στη συνέχεια θα ακολουθήσει λεπτομερής περιγραφή της προσέγγισης η οποία αναπτύχθηκε. Τα στάδια της προτεινόμενης μεθοδολογίας συνοψίζονται στο Σχήμα 2.

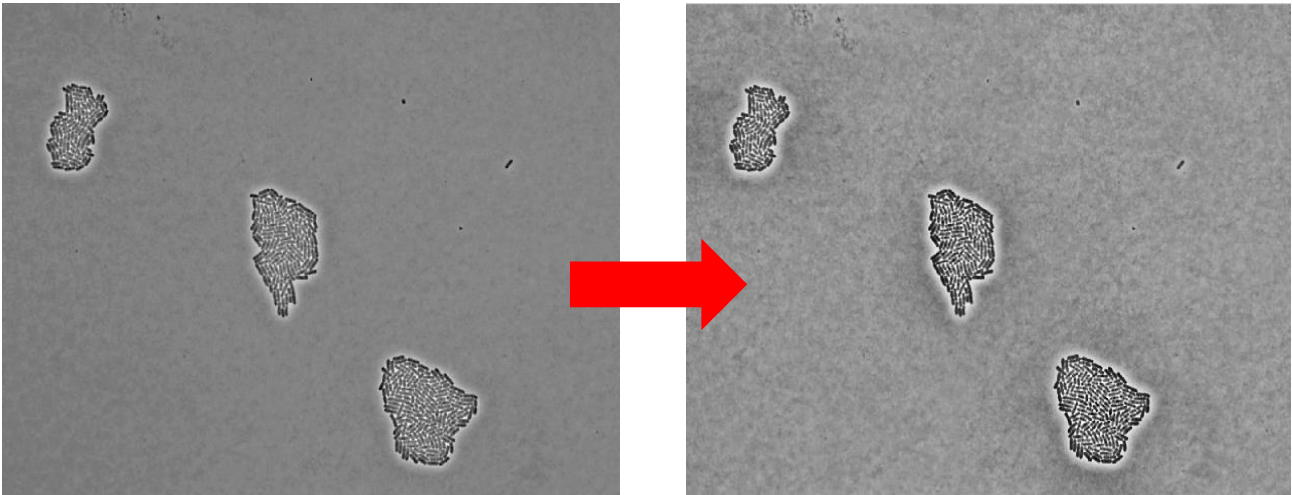


Σχήμα 2: Στάδια της προτεινόμενης μεθοδολογίας.

#### 3.1 Προεπεξεργασία εικόνας

Η σωλήνωση (pipeline) των αλγορίθμων μας ξεκινάει με την προεπεξεργασία εικόνας, μια συνηθισμένη αλλά και αναγκαία διαδικασία που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του θορύβου και της ανομοιομορφίας στο φόντο της εικόνας. Πιο αναλυτικά, εφαρμόζονται μέθοδοι αποθορυβοποίησης οι οποίες βασίζονται σε τεχνικές μετασχηματισμού Contourlet, που περιγράφονται στα [27-30], προκειμένου να κατασταλεί ο εγγενής θόρυβος της εικόνας. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται η περιορισμένη κατά αντίθεση προσαρμοστική ισοστάθμιση ιστογράμματος (CLAHE), όπως περιγράφεται στο [31], ούτως ώστε να δοθεί έμφαση μόνο στην επιφάνεια κάθε βακτηρίου, και όχι στο θορυβώδες και φωτεινό φόντο που βρίσκεται τοπικά πίσω από κάθε αποικία. Τα αποτελέσματα αυτής της επεξεργασίας απεικονίζονται στο Σχήμα 3. Η μέθοδος CLAHE λειτουργεί σε επιμέρους μικρές περιοχές στην εικόνα και όχι σε ολόκληρη την εικόνα. Έτσι ενισχύεται η αντίθεση (contrast) μόνο σε αυτές τις μικρές περιοχές, προκειμένου το ιστόγραμμα της κάθε περιοχής να μετατρέπεται σε ιστόγραμμα το οποίο αντιστοιχεί σε αυτό που ορίζεται από την ομοιόμορφη κατανομή. Οι γειτονικές περιοχές, στη συνέχεια, σε συνδυασμό με τη χρήση διγραμμικής παρεμβολής εξαλείφουν τα όρια που δημιουργήθηκαν τεχνητά. Η αντίθεση, ειδικά σε ομοιογενείς περιοχές μπορούν να περιορίζονται για να αποφευχθεί οποιαδήποτε ενίσχυση θορύβου που μπορεί να είναι παρούσα στην εικόνα. Κατά συνέπεια, ο θόρυβος της αρχικής εικόνας εξαλείφεται και τα εικονοστοιχεία των κυτταρικών επιφανειών διαχωρίζονται από το φόντο της αποικίας.



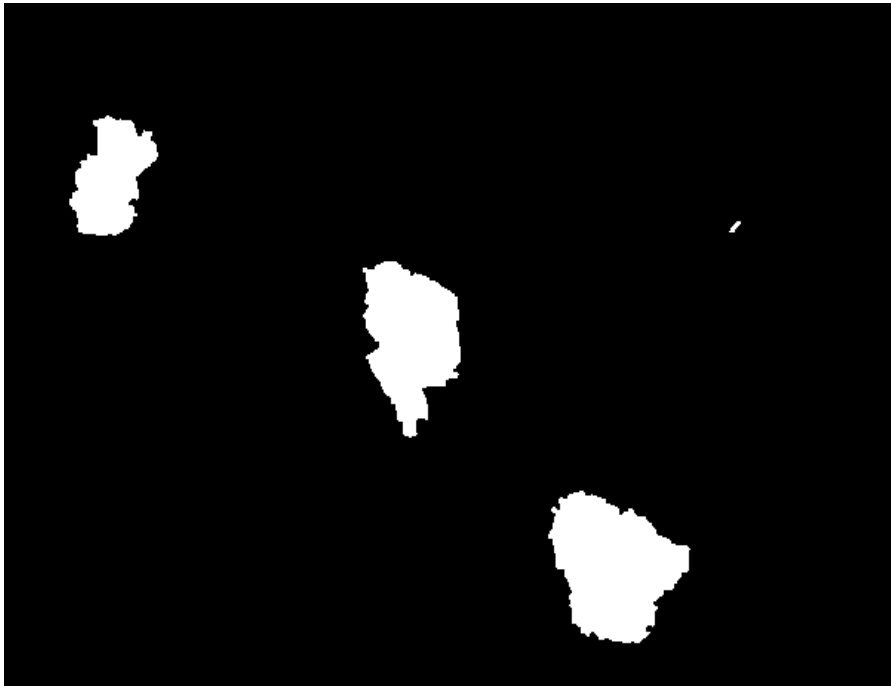


Σχήμα 3: Αρχική εικόνα (αριστερά). Αποτέλεσμα μετά το στάδιο της προεπεξεργασίας (δεξιά).

### 3.2 Κατάτμηση αποικιών

Μετά από το στάδιο της προεπεξεργασίας, προχωράμε στην κατάτμηση αποικιών από την εικόνα. Έτσι, παρουσιάστηκε η ανάγκη ανάπτυξης μιας μεθόδου κατάτμησης αποικιών, η οποία να δημιουργεί μια δυαδική μάσκα κατάτμησης των βακτηριακών αποικιών από το φόντο της εικόνας. Σε αυτό το στάδιο, χρησιμοποιούνται αρχικά μαθηματικοί μορφολογικοί τελεστές [32] και στη συνέχεια εφαρμόζεται η μέθοδος καθολικής καταφλίσωσης του Otsu [33], έτσι ώστε να δημιουργηθεί η δυαδική εικόνα, ενώ περιγράφεται όσο το δυνατόν ακριβέστερα η περιοχή της κάθε αποικίας. Ωστόσο, η δυαδική εικόνα που προκύπτει περιέχει αντικείμενα σφάλματος (artifacts), λόγω του θορυβώδους φόντου της εικόνας, εκτός από τις ολόκληρες αποικίες. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, χρησιμοποιήθηκε ένας αλγόριθμος ανίχνευσης ακμών, ο αλγόριθμος του Canny [34]. Η έξοδος του αλγορίθμου αυτού παράγει μια δυαδική εικόνα που περιέχει μόνο τις πλευρές τις κάθε αποικίας. Στη συνέχεια, με την εφαρμογή μορφολογικής διαστολής (dilation) στην εικόνα με τις πλευρές που έχουν ανιχνευθεί, κατασκευάζεται μία δυαδική εικόνα η οποία αποτυπώνει κάθε αποικία χονδροειδώς και είναι απαλλαγμένη από αντικείμενα σφάλματος. Τέλος, χρησιμοποιώντας μια απλή πράξη πολλαπλασιασμού της μάσκας που δημιουργήθηκε από την καθολική καταφλίσωση και της μάσκας που δημιουργήθηκε με ανίχνευση ακμών, λαμβάνεται μια μάσκα που αποτυπώνει λεπτομερώς τα όρια κάθε αποικίας (βλ. Σχήμα 4 για λεπτομέρειες).

Έτσι, μπορούμε να καταλήξουμε σε μια εικόνα όπου κάθε αποικία (ανεξάρτητα από το μέγεθός της) είναι κατατετημημένη και με ακρίβεια αποτυπωμένη. Όπως αναφέρθηκε, και όπως θα γίνει περισσότερο εμφανές στις επόμενες ενότητες, η προτεινόμενη μέθοδος βασίζεται στην αρχή «διαίρει και βασίλευε». Έτσι, από αυτό το στάδιο και εν συνεχεία, κάθε αποικία θα υποβάλλεται σε ξεχωριστή επεξεργασία και η αποθήκευση των ιδιοτήτων της θα γίνεται ξεχωριστά, δηλαδή κάθε αποικία μιας κυτταρικής ταινίας θα παρακολουθείται ξεχωριστά. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι πολύ σημαντικό, δεδομένου ότι είναι πολύ συνηθισμένο για μια αποικία (σε ένα πείραμα με πολλαπλές αποικίες): 1) να συγχωνευθεί με μια γειτονική αποικία, 2) να μετακινηθεί έξω από το οπτικό πεδίο του μικροσκοπίου, ή 3) να συνεχίσει να αναπτύσσεται μεμονωμένα. Έτσι, η παρακολούθηση των αποικιών είναι ζωτικής σημασίας για την ξεχωριστή αρχειοθέτηση των ιδιοτήτων τους (αριθμός των βακτηρίων, κλπ) στο χρόνο.

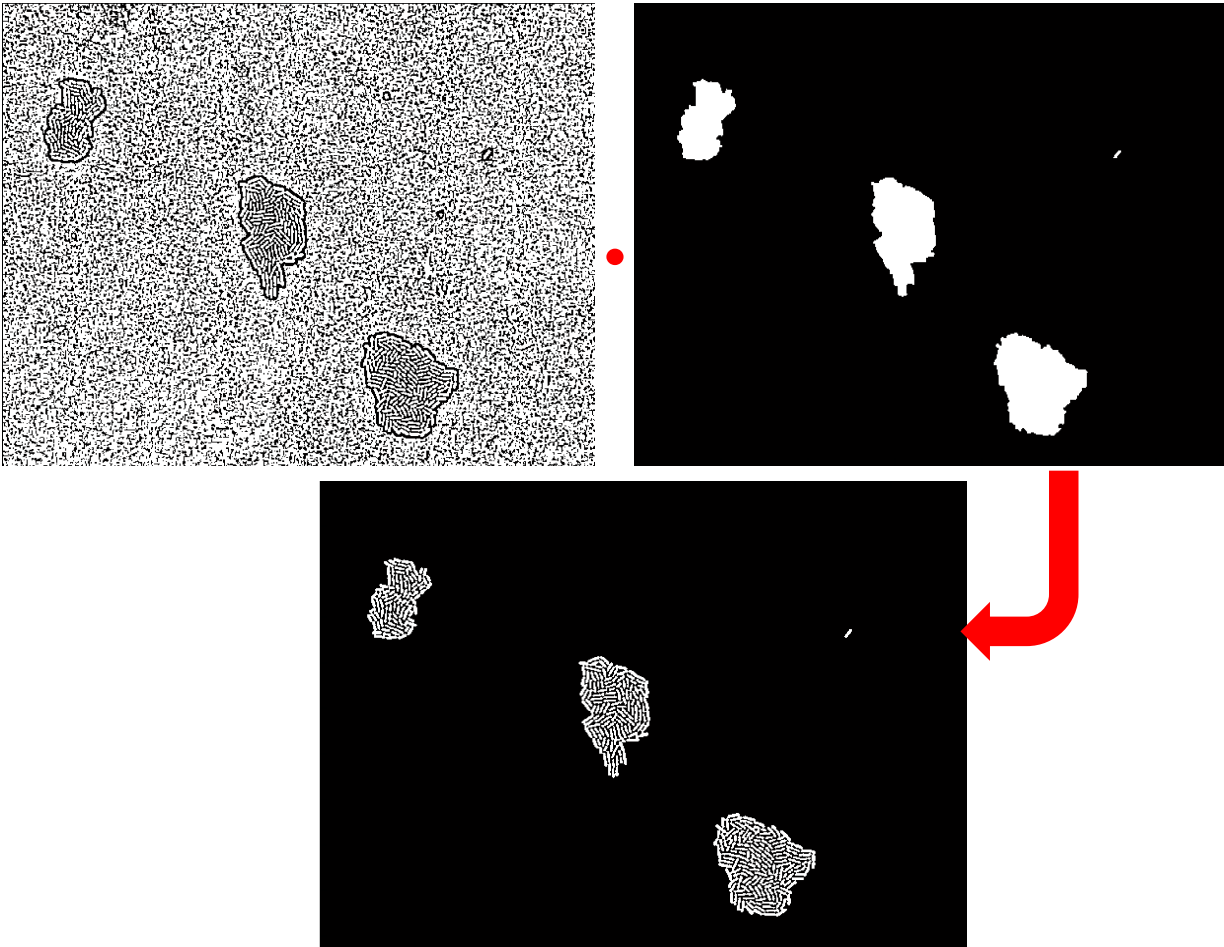


Σχήμα 4: Εικόνα (μάσκα) με τις κατατετημημένες αποικίες.

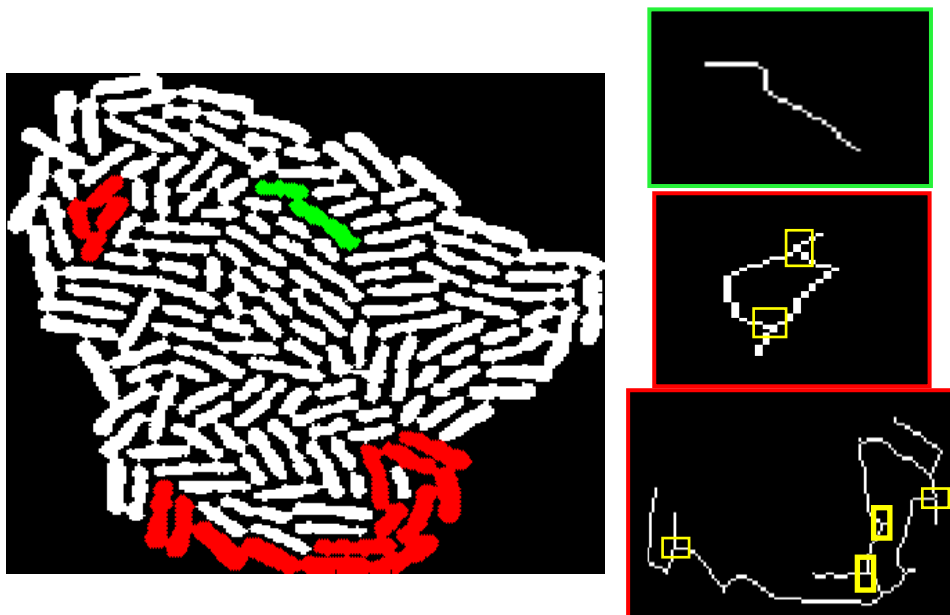
### 3.3 Αλγόριθμος κατάτμησης μεμονωμένων κυττάρων

Σε αυτή την ενότητα θα εξετάσουμε τον βασικό σημείο της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε, της οποίας το τελικό αποτέλεσμα είναι η κατάτμηση των μεμονωμένων κυττάρων. Έχοντας ήδη προσδιορίσει τις επιφάνειες των αποικιών όσο το δυνατόν ακριβέστερα, θα πρέπει να εστιάσουμε και στον εντοπισμό των μεμονωμένων κυττάρων με έναν αποτελεσματικό τρόπο.

Λόγω των μεγάλων διακυμάνσεων στο φωτισμό των εικόνων (τοπικά και καθολικά), οι περιοχές που είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί αποικίες, δεν περιλαμβάνουν μόνο τις κυτταρικές επιφάνειες, αλλά και ένα κυμαινόμενο βαθμό θορύβου στο τοπικό φόντο. Έτσι εφαρμόζεται ένας αλγόριθμος προσαρμοστικής καταφλίωσης (adaptive threshold algorithm) [32] στην αρχική εικόνα. Έτσι, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του προσκηνίου (foreground), δηλαδή των βακτηρίων από το μη-ομοιόμορφα φωτισμένο φόντο (ανατρέξτε στο Σχήμα. 5 επάνω αριστερά), δημιουργώντας όμως παράλληλα αντικείμενα σφάλματος στο φόντο της αρχικής εικόνας. Αυτά τα αντικείμενα αποβάλλονται με τον πολλαπλασιασμό αυτής την εικόνας με τη μάσκα που δημιουργήσαμε στο προηγούμενο βήμα (βλ. Σχήμα. 5). Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτός ο τύπος τοπικού φόντου, πίσω από τις αποικίες, είναι πολύ συχνό σε εικόνες που δημιουργήθηκαν από οπτικά μικροσκόπια (είτε με φωτεινό οπτικό πεδίο είτε με αντίθεσης φάσης), ενώ είναι πιο περιορισμένο σε εικόνες που δημιουργήθηκαν από συνεστιακά μικροσκόπια. Επιπλέον, ο αλγόριθμος προσαρμοστικής καταφλίωσης που χρησιμοποιήθηκε, δεν έχει καμία αρνητική επίδραση στις εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου, δηλαδή λειτουργεί εξίσου καλά σε αμφοτέρους τους τύπους της εικόνας. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στο κάτω μέρος του Σχήματος 5, ενώ το τοπικό φόντο έχει αφαιρεθεί, το αποτέλεσμα δεν είναι ιδανικό, δηλαδή κάθε κατατετημημένο αντικείμενο δεν αντιστοιχεί σε ένα μεμονωμένο βακτήριο. Για το λόγο αυτό, έχουμε αναπτύξει μια καινοτόμο μέθοδο, η οποία αντιμετωπίζει την κατάτμηση κάθε αντικειμένου ξεχωριστά.



Σχήμα 5: Κατάτμηση βακτηρίων σε κάθε αποικία (κάτω), η οποία προκύπτει από πολλαπλασιασμό των δύο μασκών (πάνω).

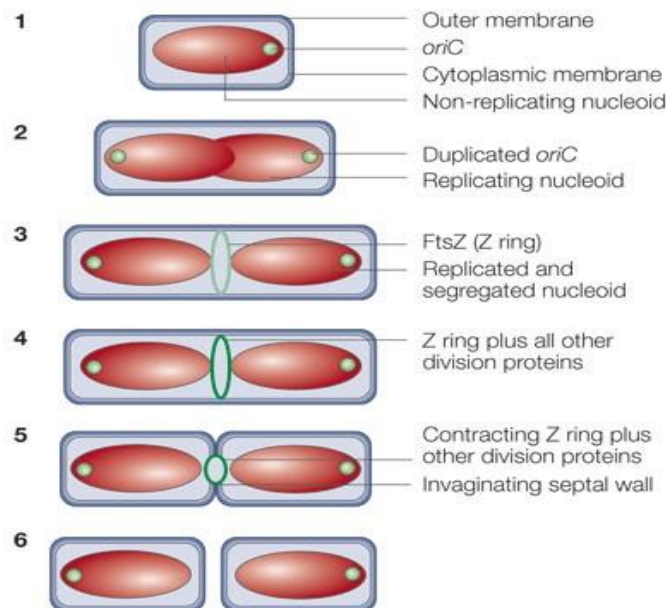


Σχήμα 6: Σκελετοποίηση τριών αντικειμένων. Το αντικείμενο στο επάνω δεξιά πλαίσιο (πράσινο) δεν έχει κανένα σημείο διασταύρωσης, δηλαδή είναι συγγραμμικό αντικείμενο, ενώ τα αντικείμενα στα υπόλοιπα πλαίσια (κόκκινα) έχουν τουλάχιστον ένα σημείο διασταύρωσης, δηλαδή είναι πολύπλοκα.

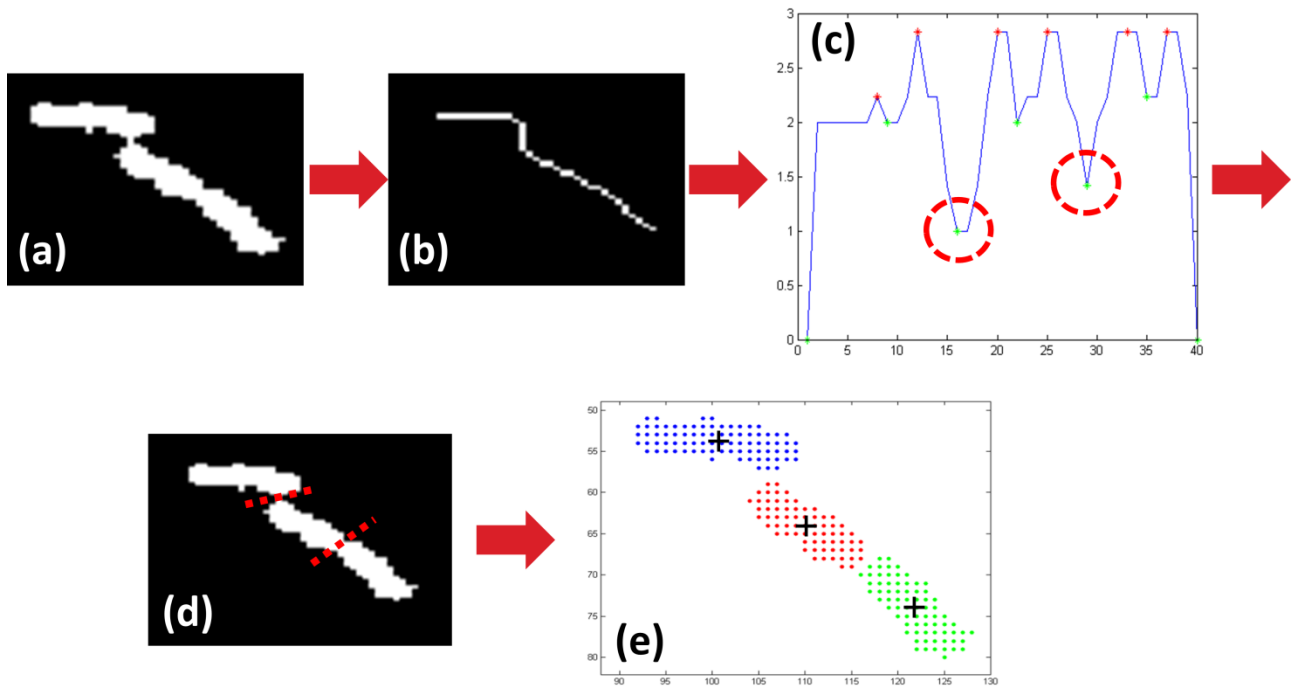
Αρχικά, υπολογίζεται ο σκελετός του κάθε αντικείμενου [32] (βλ. Σχήμα 6). Στη συνέχεια, αν ο σκελετός περιέχει σημεία διασταύρωσης (junction points), το αντικείμενο θεωρείται ως ένα σύνθετο (complex) αντικείμενο, δηλαδή μια συστάδα πολλών μεμονωμένων βακτηριακών κυττάρων. Θα περιγραφεί στη συνέχεια η διαδικασία επεξεργασίας όταν ανιχνεύεται ένα σύνθετο αντικείμενο. Σε περίπτωση που το αντικείμενο δεν περιέχει σημεία διασταύρωσης, δύναται να είναι είτε ένα μεμονωμένο βακτήριο ή δύο συγγραμμικά βακτήρια (συγγραμμικό αντικείμενο). Στην πρώτη περίπτωση, το αντικείμενο δεν πρέπει να διασπάται περαιτέρω (μεμονωμένο βακτήριο) και η μεθοδολογία κατάτμησης τερματίζεται, ενώ στη δεύτερη το αντικείμενο πρέπει να κατατμηθεί και συνεπώς, η μεθοδολογία συνεχίζει.

### 3.3.1 Επεξεργασία συγγραμμικών (collinear) αντικειμένων

Πρώτα, επιλέγουμε να εξετάσουμε την απλούστερη περίπτωση αντικειμένων που δεν φέρουν σημεία διασταύρωσης στο σκελετό τους. Για να ταξινομείται αυτόματα ένα αντικείμενο στις δύο προαναφερθείσες κατηγορίες αναπτύχθηκε ένα «έξυπνο» κριτήριο, που ονομάζεται κριτήριο «βαθιάς» κοιλάδας. Η λειτουργικότητά του βασίζεται στη διαφορά που παρουσιάζει το σχήμα ενός αντικείμενου που περιέχει βακτήρια κατά τη διάρκεια της διαίρεσης τους ή δυο βακτήρια ξεχωριστά τα οποία ακουμπούν το ένα το άλλο και, είναι παρόμοιο με ένα παπιγιόν [35] (ανατρέξτε στο Σχήμα. 7), σε σχέση με ένα αντικείμενο που περιέχει μόνο ένα μεμονωμένο κύτταρο.



**Σχήμα 7: Διχοτόμηση βακτηρίου (σχήμα προσαρμοσμένο από το [35]).** Στο στάδιο 5 το κύτταρο εισέρχεται στη φάση της διαίρεσης. Η μεθοδολογία μας ανιχνεύει τα αντικείμενα τα οποία έχουν το σχήμα ενός παπιγιόν (bowtie), όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στο στάδιο 5.



Σχήμα 8: Αλγόριθμος εύρεσης «παπιγιόν» στα συγγραμμικά αντικείμενα

Για να «ποσοτικοποιηθεί» το σχήμα ενός αντικειμένου ούτως ώστε να βρισκόμαστε σε θέση να το ταξινομήσουμε, υπολογίζεται η Ευκλείδεια απόσταση [36] του αντικειμένου κατά μήκος του κεντρικού άξονα μεταξύ των αντιδιαμετρικών εικονοστοιχείων της περιμέτρου του. Έπειτα αναζητούνται τοπικά ελάχιστα («βαθιά κοιλάδες») σε αυτή τη συνάρτηση, Σχήμα 8 (c). Εάν ένα τέτοιο τοπικό ελάχιστο υπάρχει και πληροί τους ακόλουθους περιορισμούς:

$$\frac{localMin}{leftLocalMax} \leq T \text{ και } \frac{localMin}{rightLocalMax} \leq T ,$$

τότε θεωρείται ότι είναι μια «βαθιά κοιλάδα». Το κατώφλι  $T$  των παραπάνω λόγων εξαρτάται από την ανάλυση (resolution) της εικόνας εισόδου, δηλαδή ο αριθμός των εικονοστοιχείων που σχηματίζουν ένα βακτήριο. Πρέπει να σημειωθεί ότι η τιμή του  $T$  ορίζεται αυτόματα από τη μεθοδολογία μας και είναι συνήθως της τάξης των  $[0.65, 0.85]$  κατά αντιστοιχία, από τη χαμηλότερη προς την υψηλότερη ανάλυση. Όταν το κριτήριο κατατάσσει το αντικείμενο με σχήμα παπιγιόν, το αντικείμενο χωρίζεται σε δύο διακριτά βακτήρια ακριβώς στο σημείο όπου βρίσκεται η «βαθιά κοιλάδα», βλ. Σχήμα 8(e) κόκκινοι διακεκομμένοι κύκλοι), διαφορετικά το αντικείμενο παραμένει ανέπαφο διότι ο αλγόριθμος το θεωρεί ως ένα μεμονωμένο βακτήριο.

### 3.3.2 Μοντέλα μίξης γκαουσιανών κατανομών (Gaussian Mixture Models)

Σε αυτή την ενότητα, γίνεται μία σύντομη παρουσίαση των μοντέλων μίξης γκαουσιανών κατανομών (Gaussian Mixture Models, GMMs), ένα ισχυρό εργαλείο αναγνώρισης προτύπων, το οποίο χρησιμοποιείται εκτενώς στα πλαίσια του αλγορίθμου Expectation-Maximization (EM) [37][38]. Τα μοντέλα μίξης παρέχουν την δυνατότητα χρήσης μοντέλων σε προσεγγίσεις ομαδοποίησης χωρίς επίβλεψη (unsupervised clustering). Πολύπλοκες πολυκόρυφες συναρτήσεις πυκνότητας πιθανότητας (probability density functions, PDFs) μπορούν να αναπαρασταθούν απλά, χρησιμοποιώντας μοντέλα μίξης γκαουσιανών. Για αυτό το λόγο, μπορούν επίσης να

χρησιμοποιηθούν ως μια μέθοδος λεπτομερούς εξέτασης συναρτήσεων δεσμευμένης πυκνότητας πιθανότητας (class-conditional probability density functions) για την αναπαράσταση σε σενάρια μάθησης υπό επίβλεψη (supervised learning). Στην περίπτωση αυτή, η εφαρμογή μοντελοποίησης μίξης αφορά στην εκτίμηση μίξης γκαουσιανών σε δισδιάστατες παρατηρήσεις χωρίς την πρότερη γνώση του βέλτιστου αριθμού των συνιστωσών που χρειάζονται για να περιγραφούν τα δεδομένα. Υποθέτουμε ότι η  $Y = [Y_1, \dots, Y_d]^T$  είναι μια τυχαία μεταβλητή διάστασης  $d$  και έστω  $y = [y_1, \dots, y_d]^T$  μια παρατήρηση αυτής. Τότε η  $Y$  έχει μία κατανομή πεπερασμένης μίξης (finite mixture models) και η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας γράφεται ως εξής:

$$f_Y(y|\Theta) = \sum_{m=1}^C \pi_m f_Y(y|\theta_m) \quad (1)$$

Όπου  $f_Y(y|\Theta)$  είναι η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας μιας συνιστώσας,  $C$  είναι ο αριθμός των συνιστωσών και  $\pi_m$  είναι οι πιθανότητες μίξης τους. Έχοντας μια συγκεκριμένη πυκνότητα πιθανότητας, κοινή για όλες τις συνιστώσες της μίξεως, προκύπτει ένα σύνολο παραμέτρων  $\Theta = \{\theta_1, \dots, \theta_c, \pi_1, \dots, \pi_{c-1}\}$  τέτοιο ώστε  $\pi_c = 1 - \sum_{m=1}^{c-1} \pi_m$ . Για την προτεινόμενη μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας της κανονικής κατανομής, δηλαδή  $f_Y(y|\theta_m) = N(y|\mu_m, \Sigma_m)$  με γενικό πίνακα συνδιασποράς  $\Sigma_m$  και μέση τιμή  $\mu_m$ . Επομένως, σε αυτήν την περίπτωση οι παράμετροι των συνιστωσών είναι  $\theta_m = (\mu_m, \Sigma_m)$ . Η εκτίμηση μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood, ML) των παραμέτρων  $\Theta$  της μίξεως, η οποία βασίζεται σε ένα σύνολο  $n$  ανεξάρτητων παρατηρήσεων  $y = \{y^{(1)}, \dots, y^{(n)}\}$ , είναι:

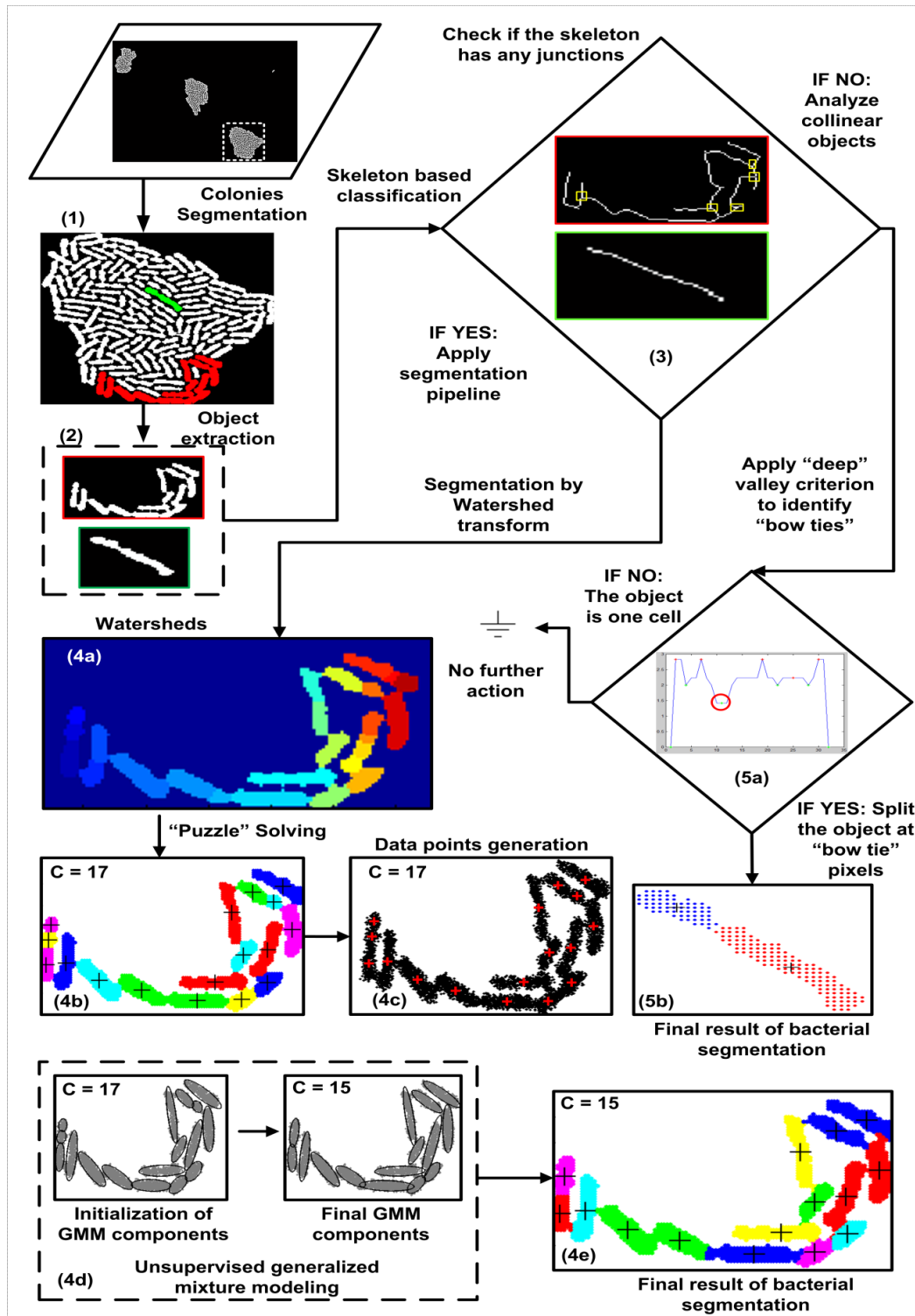
$$\hat{\Theta} = \arg \max_{\Theta} L(\Theta, y) \quad (2)$$

Όπου  $L(\Theta)$  είναι η πιθανοφάνεια του συνόλου δεδομένων για το συγκεκριμένο μοντέλο. Όπως είναι γνωστό, η εκτίμηση μέγιστης πιθανοφάνειας  $\hat{\Theta}$  δεν έχει γενικά μία κλειστή έκφραση και μπορεί να προσεγγιστεί επαναληπτικά από την εφαρμογή του αλγορίθμου EM.

### 3.3.3 Επεξεργασία πολύπλοκων (complex) αντικειμένων

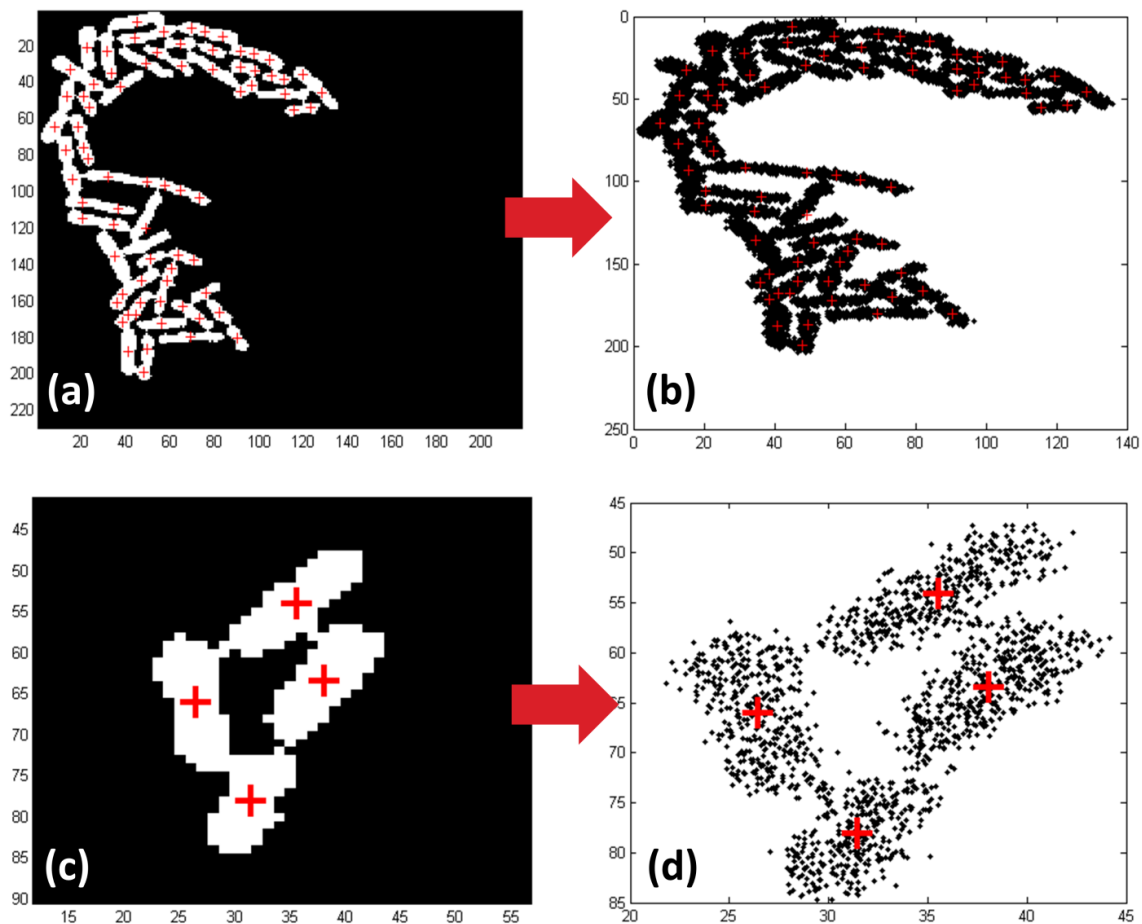
Είναι προφανές ότι η επεξεργασία ενός πολύπλοκου αντικειμένου είναι πολύ πιο περίπλοκη σε σχέση με την επεξεργασία συγγραμμικών αντικειμένων και για αυτό το λόγο αναπτύχθηκε μια νέα προσέγγιση. Σε αυτή την περίπτωση, αρχικά εκτιμάται ο αριθμός των υποψήφιων (πιθανών) βακτηριακών κυττάρων που βρίσκονται σε ένα αντικείμενο, με τη χρήση ενός συνδυασμού της μεθόδου του ενός κοντινότερου γείτονα (one nearest neighbor, 1-NN) [39] και του μετασχηματισμού Watershed [40]. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, λαμβάνουμε το μετασχηματισμό της απόστασης (distance transform) της δυαδικής εικόνας του αντικειμένου χρησιμοποιώντας την απόσταση σκακίρας (chessboard distance). Για κάθε εικονοστοιχείο του αντικειμένου, υπολογίζεται η απόσταση μεταξύ αυτού του εικονοστοιχείου και του πλησιέστερου εικονοστοιχείου της περιμέτρου της εικόνας. Στη συνέχεια, λαμβάνουμε τη συμπληρωματική εικόνα του αντικειμένου, θέτουμε τα εικονοστοιχεία που δεν ανήκουν στο αντικείμενο ίσα με  $-\infty$  και υπολογίζουμε το μετασχηματισμό Watershed σε αυτήν. Σε αυτό το στάδιο, μερικά εικονοστοιχεία επισημαίνονται ως 0. Αυτό συμβαίνει όταν τα εικονοστοιχεία δεν ανήκουν σε μια περιοχή Watershed και συνεπώς, τα ταξινομούμε σε μια από αυτές τις περιοχές σύμφωνα με τον κοντινότερο γείτονα κανόνα. Τέλος, προσδιορίζουμε το κέντρο βάρους κάθε περιοχής Watershed.

Τα κέντρα βάρους αντιπροσωπεύουν την αρχική εκτίμηση των κέντρων των κυττάρων εντός του σύνθετου αντικειμένου (Σχήμα 9 (4α)).



**Σχήμα 9: Σχηματική σύνοψη της προτεινόμενης μεθοδολογίας κατάτμησης.** (1) Κατάτμηση αποικιών, (2) Εξαγωγή αποικιών, (3) Κατηγοριοποίηση με βάση το σκελετό του αντικειμένου: (4) Κατάτμηση πολύπλοκου αντικειμένου: (a) Κατάτμηση μέσω του μετασχηματισμού Watershed, (b) Εφαρμογή αλγορίθμου «Επίλυσης πάζλ», (c) Δημιουργία συνόλου δεδομένων, (d) Εφαρμογή μοντέλο μίξης γκαουσιανών, (e) Τελικό αποτέλεσμα κατάτμησης πολύπλοκου αντικειμένου. (5) Κατάτμηση συγγραμμικού αντικειμένου: (a) Εφαρμογή του κριτηρίου «βαθιάς κοιλάδας» και ανίχνευση «παπιγιόν», (b) τελικό αποτέλεσμα κατάτμησης συγγραμμικού αντικειμένου. Στο βήμα (3), υπάρχει μια διακλάδωση που οδηγεί σε δύο διαφορετικά αλγοριθμικά μονοπάτια, ανάλογα με το είδος του αντικειμένου που πρόκειται να κατατμηθεί.

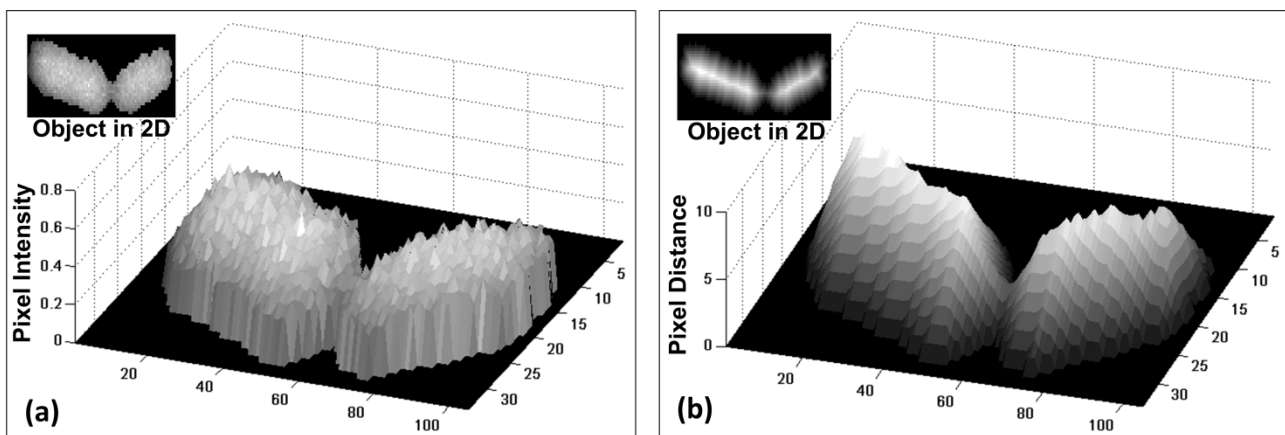
Ένα άλλο ζήτημα που χρειάστηκε να ξεπεραστεί είναι το εγγενές πρόβλημα του μετασχηματισμού Watershed, η υπερκατάτμηση (oversegmentation) των αντικειμένων. Για να το ξεπεραστεί το πρόβλημα αυτό, χρησιμοποιήθηκε η ιδέα του κριτηρίου «βαθιάς κοιλάδας» σε μία ελαφρώς τροποποιημένη μορφή. Σε αυτήν την περίπτωση ο αλγόριθμος επιχειρεί να συγχωνεύσει τα λανθασμένα κατατετημημένα τμήματα ακολουθώντας συγκεκριμένους γεωμετρικούς περιορισμούς. Όλα τα ζεύγη που προκύπτουν από το συνδυασμό ενός τμήματος με τα γύρω τμήματα εξετάζονται με βάση το κριτήριο αν θα πρέπει να συγχωνευθούν ή όχι. Δύο τμήματα που ακουμπούν το ένα το άλλο μπορούν να συγχωνευτούν μόνο αν ο αλγόριθμος δεν εντοπίσει τοπικό ελάχιστο ανάμεσά τους με βάση το κριτήριο. Εάν ένα τμήμα μπορεί να συγχωνευθεί με περισσότερα από ένα γειτονικά τμήματα, τότε επιλέγεται η συγχώνευση η οποία δίνει το αντικείμενο με τη μέγιστη στερεότητα (Solidity) (ως στερεότητα ορίζεται ως ο λόγος της επιφάνειας αντικειμένου προς την επιφάνεια του αντίστοιχου κυρτού αντικειμένου). Αξιοποιώντας την πρότερη γνώση του ελλειπτικού σχήματος των βακτηρίων, μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα αντικείμενα μεμονωμένων κυττάρων τείνουν να έχουν στερεότητα η οποία τείνει στο ένα. Έτσι, το νέο ενιαίο αντικείμενο (μετά από ενδεχόμενη συγχώνευση) εισάγεται επίσης σε μια ουρά για να εξεταστεί περαιτέρω αν θα πρέπει να συγχωνευθεί με άλλο τμήμα. Η μεθοδολογία αυτή μπορεί να θεωρηθεί ως ένα πρόβλημα «επίλυσης πάζλ» και όπως θα δείξουμε στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, είναι ισχυρή και αποτελεσματική (Σχήμα 9 (4b)).



**Σχήμα 10:** Παραδείγματα δημιουργίας συνόλων δεδομένων με βάση τα αρχικά αντικείμενα. Το μέγεθος κάθε συνόλου δεδομένων είναι ανάλογο με το μέγεθος του αντικειμένου.



Ως τελική βελτίωση του αποτελέσματος κατάτμησης των αντικειμένων μεμονωμένων κυττάρων και προκειμένου να αποτυπωθούν με απόλυτη ακρίβεια τα όρια κάθε κυττάρου χρησιμοποιήθηκε μια προσέγγιση μηχανικής μάθησης με βάση τη μίξη γκαουσιανών μοντέλων, όπως περιγράφεται στη [41]. Στη [41], οι συγγραφείς μετατρέπουν τις εντάσεις των εικονοστοιχείων σε σημεία δεδομένων στο επίπεδο για μοντελοποίηση με βάση τη μίξη γκαουσιανών. Στην περίπτωση μας, όπως μπορεί να παρατηρηθεί στο Σχήμα 11, οι εντάσεις των εικονοστοιχείων που ανήκουν στα κύτταρα δεν είναι αξιόπιστες, δεδομένου ότι δεν παρουσιάζουν ομοιόμορφη κατανομή, αλλά μάλλον τυχαία. Για να εφαρμοστεί μια παρόμοια τεχνική, χρησιμοποιούμε τον μετασχηματισμό της απόστασης του αντικειμένου ως αναφορά για τη γέννηση τυχαίων σημείων στο επίπεδο (Σχήμα 11 (4c) και Σχήμα 15) αντί των εντάσεων των εικονοστοιχείων. Συγκεκριμένα, θεωρούμε κάθε εικονοστοιχείο ως γεννήτρια δεδομένων στη γειτονιά τους. Ο συνολικός αριθμός των σημείων  $N$  τα οποία γεννιούνται για κάθε αντικείμενο της εικόνας είναι ανάλογη με τον αριθμό των κέντρων  $C$  που υπολογίστηκαν προηγουμένως. Αυτά τα  $N$  σημεία κατανέμονται μεταξύ των εικονοστοιχείων του αντικειμένου ανάλογα με τη σχετικές τους αποστάσεις (βάσει της θεώρησης ότι τα «πιο εσωτερικά» εικονοστοιχεία θα «γεννήσουν» περισσότερα σημεία). Η φυσική σημασία αυτού του μετασχηματισμού είναι ότι τα εικονοστοιχεία τα οποία βρίσκονται κοντά στον κεντρικό άξονα του αντικειμένου, είναι μέρος αυτού με μεγαλύτερη πιθανότητα σε σχέση με τα πιο απομακρυσμένα.

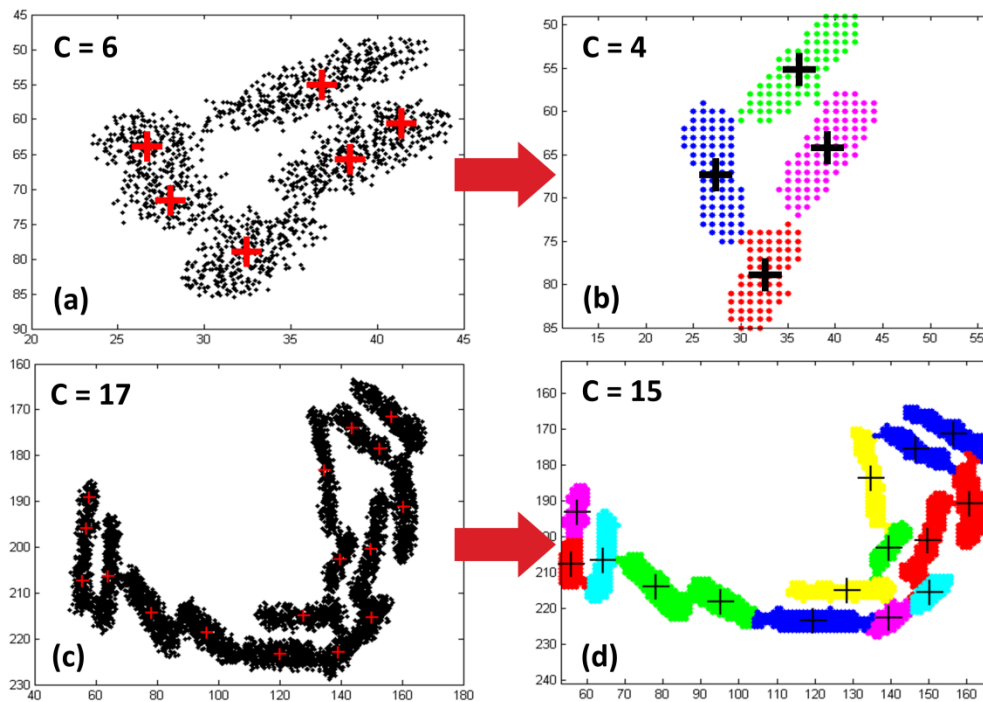


**Σχήμα 11. Αναπαράσταση ενός αντικειμένου στον τρισδιάστατο χώρο.** Οι συντεταγμένες  $x$  και  $y$  αντιπροσωπεύουν τις συντεταγμένες των εικονοστοιχείων του αντικειμένου, ενώ στον άξονα των  $z$  αναπαρίστανται (a) η ένταση των εικονοστοιχείων και (b) η κοντινότερη απόσταση κάθε εικονοστοιχείου από την περίμετρο του αντικειμένου. Είναι προφανές ότι στην δεύτερη περίπτωση, οι περιοχές των δύο βακτηρίων διαφέρουν αισθητά από την περιοχή που βρίσκεται ανάμεσά τους.

αυτή τη διαδικασία (η μετάβαση από αποστάσεις των εικονοστοιχείων σε κατανομές σημείων) μπορεί να θεωρηθεί ανάδρομη μελέτη συστήματος (reverse engineering) όπου τα σημεία που προκύπτουν αντιπροσωπεύουν το ελλειπτικό σχήμα των βακτηρίων. Συγκεκριμένα, ένα εικονοστοιχείο  $i$  με απόσταση  $d_i$  δρα ως μια δισδιάστατη γκαουσιανή γεννήτρια  $N(\mu, \Sigma)$  με  $\mu=(x_i, y_i)$ . Τελικά, όλα τα εικονοστοιχεία που ανήκουν σε ένα αντικείμενο αποτελούν ένα γκαουσιανό μοντέλο μίξης [37] που έχει τόσες συνιστώσες όσες ο αριθμός των εικονοστοιχείων  $M$ . Κάθε συνιστώσα θεωρούμε ότι έχει συντελεστή μίξης ανάλογο με την απόστασή του από την περίμετρο του αντικειμένου (ελάχιστη) και ίσο με:

$$\pi(i) = \frac{d_i}{\sum_{j=1}^M d_j}$$

Για κάθε εικονοστοιχείο  $i$ , γεννάμε  $N \cdot \pi(i)$  σημεία στο επίπεδο, από μια δισδιάστατη Γκαουσιανή κατανομή με κέντρο που βρίσκεται στις συντεταγμένες του εικονοστοιχείου και διαγώνιο πίνακα συνδιασποράς  $\Sigma$  ο οποίος έχει τιμή 0.3 στα μη μηδενικά στοιχεία του. Αυτή η τιμή (0.3) για τη διασπορά τέθηκε μικρότερη από 0.5 (μισή απόσταση μεταξύ γειτονικών εικονοστοιχείων) με σκοπό τη διαβεβαίωση ότι σημεία που γεννήθηκαν από το μοντέλο (και αποτυπώνουν την κυτταρική δομή) θα κατανεμηθούν με τρόπο τέτοιο ώστε να εξασφαλίζεται το ότι η αφθονία τους αντιπροσωπεύει την απόσταση, όπως παρουσιάζεται Σχήμα 11 (b). Έτσι, αποτρέπεται η γέννηση «λόφων» από σημεία στις τοποθεσίες ανάμεσα στα εικονοστοιχεία. Αυτή η τιμή της διασποράς επιλέχθηκε μετά από πειραματισμό και έχει διορθωθεί κατά τη διάρκεια ανάλυσης διάφορων κυτταρικών ταινιών.



Σχήμα 12: Εφαρμογή του αλγορίθμου EM με το κριτήριο MML για την επιλογή μοντέλου. Πάνω: Μείωση των κέντρων από 6 σε 4. Κάτω: Μείωση των κέντρων από 17 σε 15.

Όπως αναφέρθηκε, ο συνολικός αριθμός  $N$  των σημείων που έχουν παραχθεί είναι ανάλογος με τον αριθμό των κέντρων  $C$  που έχουν εκτιμηθεί αρχικά και όχι με τον αριθμό των εικονοστοιχείων στο αντικείμενο της εικόνας. Αυτό συμβαίνει διότι όπως έχει παρατηρηθεί, η επιφάνεια ενός αντικειμένου δεν καθορίζει την πολυπλοκότητα του αντικειμένου, δηλαδή το ποσό των διαφορετικών κυττάρων που βρίσκονται σε ένα αντικείμενο. Αντιθέτως, ο αριθμός των υποψήφιων κέντρων που είχαν εκτιμηθεί μπορεί να επιδεικνύει κάτι τέτοιο, εφόσον προσεγγίζεται ο αριθμός των κυττάρων που αναμένεται να βρίσκονται στην περιοχή του αντικειμένου της εικόνας. Συνεπώς, αν ένα αντικείμενο έχει πολλά υποψήφια κέντρα, μπορεί να «ξοδέψει» πολλά σημεία δικαιολογημένα για να αποτυπώσει επαρκώς την υποκείμενη κατανομή των διαφορετικών βακτηρίων που βρίσκονται σε αυτό. Το πρώτο βήμα για τη διαδικασία δισδιάστατης γκαουσιανής μοντελοποίησης μετά την παραγωγή των σημείων είναι η αρχικοποίηση του αλγορίθμου, δηλαδή η αρχική ανάθεση κλάσεων με βάση τον υπολογισμό της λογαριθμισμένης πιθανοφάνειας (log-likelihood) κάθε σημείου που ανήκει στο αρχικό μοντέλο μίξης:

$$\log p(\mathbf{y}^{(i)}|\boldsymbol{\theta}) = \log \sum_{m=1}^C w_m p(\mathbf{y}^{(i)}|\boldsymbol{\theta}_m) \quad (3)$$

όπου  $\boldsymbol{\theta} \equiv \{\theta_1, \dots, \theta_C, w_1, \dots, w_C\}$  το ολοκληρωμένο σύνολο παραμέτρων του μοντέλου μίξης και  $w_m$  είναι οι συντελεστές μίξης.

Το τελευταίο βήμα είναι η εφαρμογή των πεπερασμένων μοντέλων μίξης (Finite Mixtures Models, FMMs) [37] στις δύο διαστάσεις. Μέχρι στιγμής, έχουν εδραιωθεί α) μια καλή εκτίμηση το μεγίστου αναμενόμενου αριθμού συνιστώσων μίξης και τα κέντρα τους και β) μια αρχική εκτίμηση των πινάκων συνδιασποράς κάθε υποψήφιας συνιστώσας και τους συντελεστές μίξης του FMM. Έτσι, χρησιμοποιώντας αυτές τις πληροφορίες ως αρχική διαμόρφωση του FMM (βλ. Σχήμα 12), εφαρμόζεται μια παραλλαγή του αλγορίθμου EM [38], μαζί με το κριτήριο ελάχιστου μήκους μηνύματος (Minimum Message Length, MML) που παρουσιάστηκε στη [42] για επιλογή μοντέλου, ούτως ώστε να αναγνωριστεί το FMM που ταιριάζει στα σημεία με το βέλτιστο τρόπο. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο αλγόριθμος EM τείνει να ταιριάζει υπερβολικά (overfit) στα δεδομένα και ευνοεί τις λύσεις με περισσότερες συνιστώσες από τα πραγματικά κύτταρα στο αντικείμενο της εικόνας. Το κριτήριο MML ανταλλάζει την πολυπλοκότητα του μοντέλου με την καλή προσαρμογή στα δεδομένα και περιορίζει το υπερβολικό ταίριασμα σε αυτά. Όπως είναι γνωστό, η μετρική MML δε θα επιλέξει ένα πολύπλοκο μοντέλο, εκτός αν αυτό πληρώσει για τον εαυτό του. Επομένως, το βέλτιστο μοντέλο που επιλέγεται τελικά μπορεί να περιέχει λιγότερες από  $C$  συνιστώσες. Ο τροποποιημένος αυτός αλγόριθμος EM μπορεί να συγχωνεύσει δυο συνιστώσες σε μία, αν η μείωση του αριθμού των συνιστώσων δημιουργεί ένα FMM το οποίο θα εξηγεί καλύτερα τα σημεία που έχουν παραχθεί.

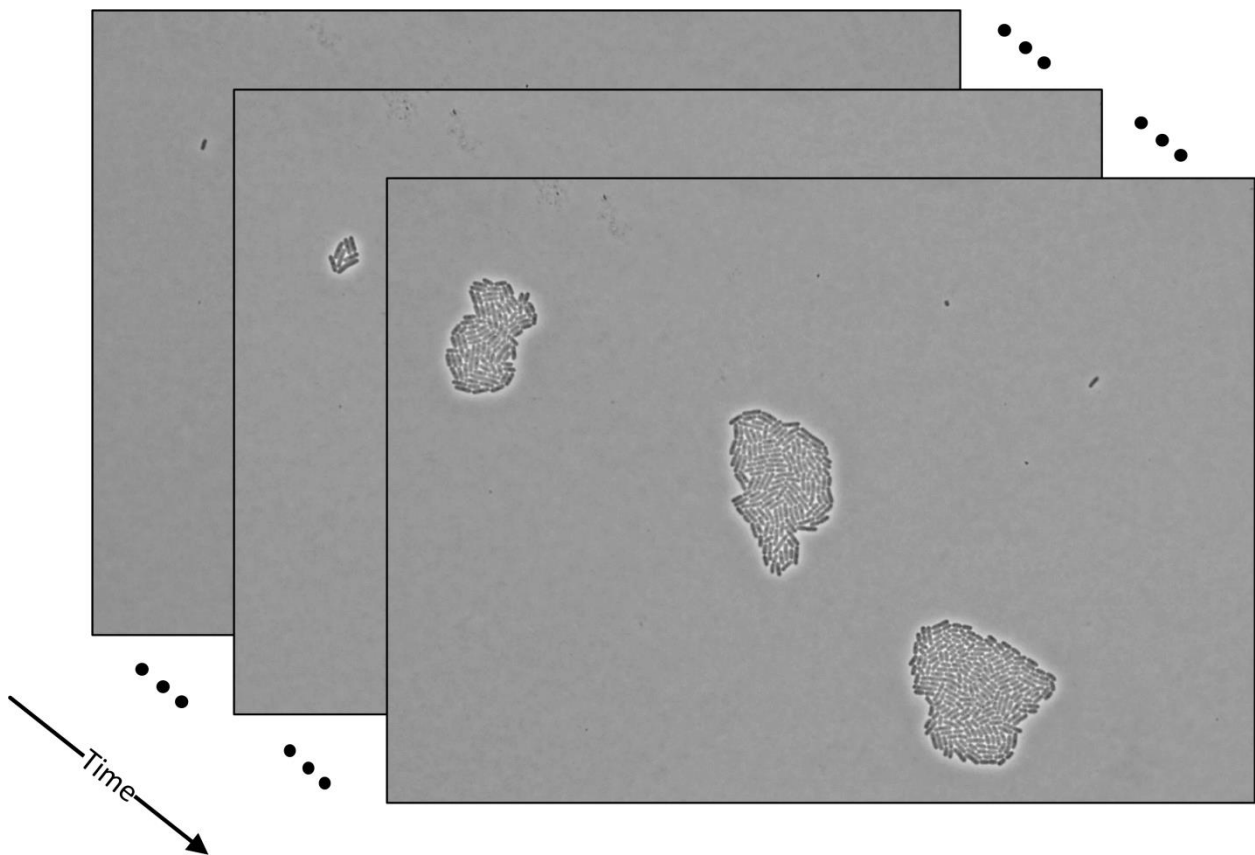
Ωστόσο, λόγω της χαμηλής ποιότητας κυτταρικών ταινιών, μερικά τμήματα αντικειμένων μπορεί να μη συγχωνευτούν όπως θα έπρεπε για να δημιουργήσουν με σωστό τρόπο αντικείμενο μεμονωμένου κυττάρου. Για να αποφευχθεί αυτό, συγχωνεύουμε όλα τμήματα των αντικειμένων, τα οποία έχουν κυκλικότητα (circularity) κάτω από ένα προκαθορισμένο κατώφλι. Κυκλικότητα ορίζεται ως ο λόγος του μήκους του πάχους του αντικείμενου προς μήκος του. Τα βακτήρια έχουν κυκλικότητα που τείνει στο μηδέν, ενώ τα τμήματα υπερκατάτμησης τείνουν να έχουν περισσότερο κυκλικό σχήμα και έτσι η κυκλικότητα τους τείνει στο ένα. Επιπλέον, απορρίπτουμε αντικείμενα που έχουν μέγεθος επιφάνειας (σε εικονοστοιχεία) κάτω από ένα προκαθορισμένο κατώφλι, το οποίο υπολογίζεται αυτόματα, σύμφωνα με την ανάλυση της εικόνας εισόδου. Ένα αντικείμενο που απορρίπτεται, τελικά συγχωνεύεται με ένα από τα γειτονικά του αντικείμενα και συγκεκριμένα, με αυτό που τελικά δίνει τη μέγιστη τη στερεότητα.

## 4. Κυτταρικές ταινίες και Μέθοδος Αξιολόγησης

Σε αυτό το κεφάλαιο, θα περιγράψουμε τις κυτταρικές ταινίες που χρησιμοποιήθηκαν με στόχο την αξιολόγηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας. Στη συνέχεια, θα αναλυθεί η μέθοδος αξιολόγησης που ακολουθήθηκε.

### 4.1 Περιγραφή κυτταρικών ταινιών

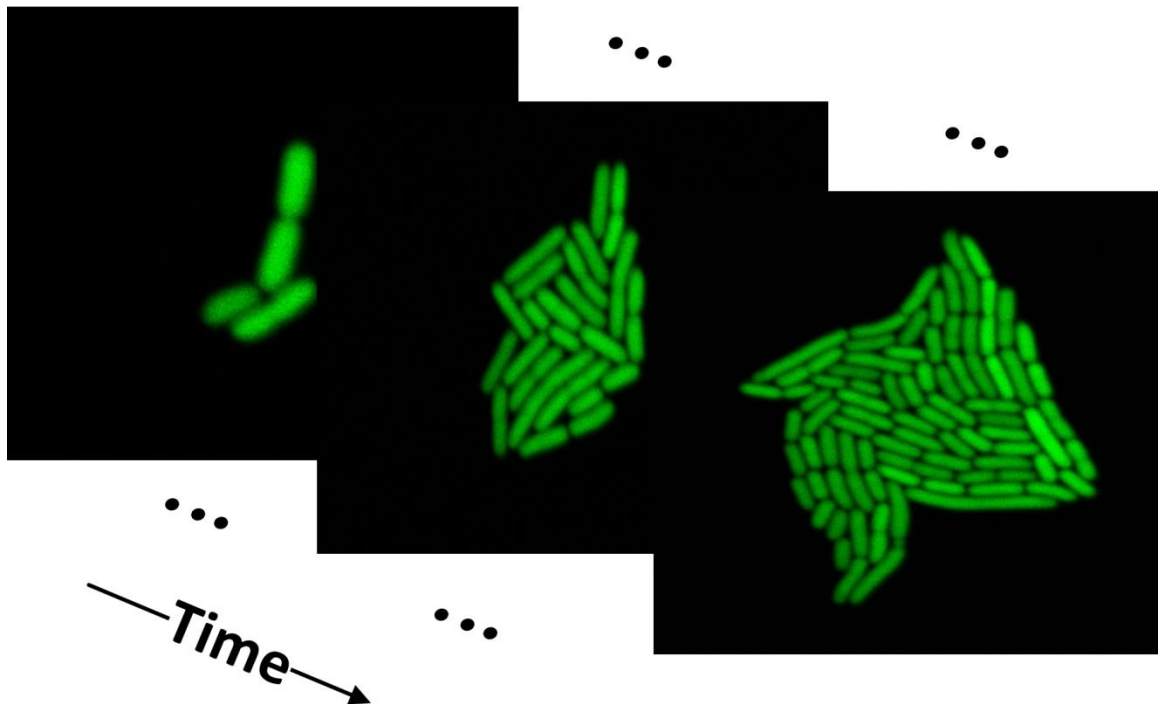
Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της αξιολόγησης της προτεινόμενης μεθοδολογίας, χρησιμοποιήθηκαν πολλά σύνολα δεδομένων από διαφορετικά εργαστήρια (διάφοροι τύποι κυτταρικής ταινίας), ώστε να διασφαλιστεί ότι είναι όσο το δυνατόν πιο γενικευμένη. Στο σημείο αυτό, θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της αξιολόγησης δύο κυτταρικών ταινιών που παρουσιάζουν στο έπακρο τις δυνατότητες και τα πλεονεκτήματα της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε σε σχέση με τα είδη υπάρχοντα λογισμικά. Η πρώτη time-lapse κυτταρική ταινία, στην οποία θα αναφερόμαστε από εδώ και στο εξής ως salPhase, ξεκινά με τέσσερα μεμονωμένα κύτταρα *S. Typhimurium* και καταλήγει σε τέσσερις διακριτές αποικίες (Σχήμα 13). Η salPhase παράχθηκε από οπτικό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης από την ομάδα του ΑΠΘ (Γ-ΕΟ) (βλ. παραπομπή [43] για λεπτομέρειες) και αποτελείται από 86 διαδοχικά στιγμιότυπα (που καταγράφονταν ανά 5 λεπτά).



Σχήμα 13: Η κυτταρική ταινία SalPhase.

Η δεύτερη κυτταρική ταινία time-lapse, στην οποία θα αναφερόμαστε από εδώ και στο εξής ως conGFP, περιέχει μία συστάδα τεσσάρων *S. Typhimurium* και καταλήγει σε μία διακριτή αποικία (Σχήμα 14). Η conGFP παράχθηκε από συνεστιακό μικροσκόπιο αντίθεσης διαφορικής συμβολής

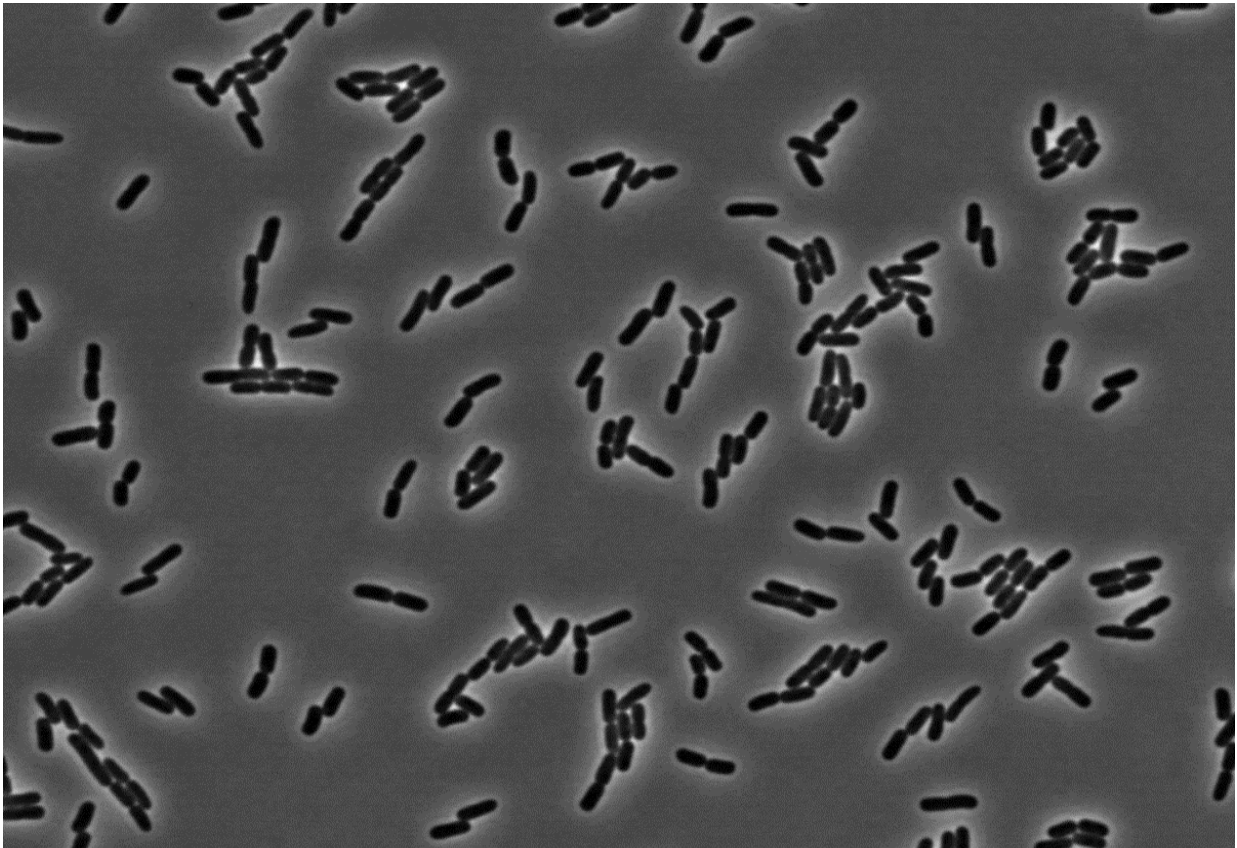
(Differential Interference Contrast, DIC) και φθορισμού από την ομάδα του ΑΠΘ (Γ-ΕΟ) και αποτελείται από 43 διαδοχικά στιγμιότυπα εικόνας (που καταγράφονταν ανά πέντε λεπτά).



Σχήμα 14: Η κυτταρική ταινία GFP confocal.

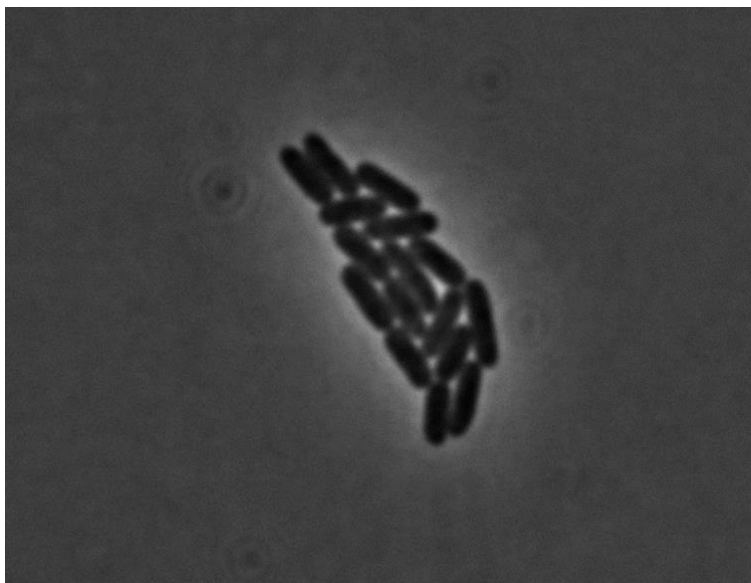
Τα βακτήρια *S. Typhimurium* της κυτταρικής ταινίας conGFP έχουν τροποποιηθεί γενετικά από την ομάδα του Γεωπονικού (Α-ΕΟ, Δρ. Ταμπακάκη) με στόχο να επάγουν πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein, GFP). Συγκεκριμένα, τα στελέχη ST474 *S. Typhimurium* και *E. Coli* αναπτύχθηκαν σε μέσο Luria-Bertani (LB) στους 37 °C. Το πλασμίδιο pDSK-GFPuv [44] παρείχε γενναιόδωρα ο Δρ. Κ Mysore (Samuel Roberts Noble Foundation, Inc.) και μεταφέρθηκε από *E. coli* σε *S. Typhimurium* ST474 με ηλεκτροδιάτρηση (GenePulser, Bio-Rad) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα μετασηματισμένα βακτήρια, που περιείχαν το πλασμίδιο, επιλέχθηκαν σε πλακίδια LB αгарόζης μαζί με καναμυκίνη σε συγκέντρωση 50 µg/ml.

Προκειμένου να υπάρξει μια αντικειμενική αξιολόγηση, δοκιμάστηκε επιπλέον η προτεινόμενη μεθοδολογία με στιγμιότυπα εικόνων από άλλα εργαστήρια που έχουν παραχθεί από διάφορους τύπους μικροσκοπίας. Συγκεκριμένα, η μεθοδολογία μας αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας μεμονωμένα στιγμιότυπα που έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την αξιολόγηση των ήδη υπαρχόντων πακέτων λογισμικού. Το πρώτο στιγμιότυπο εικόνας έχει χρησιμοποιηθεί από το MicrobeTracker. Η εικόνα έχει παραχθεί από συνεστιακό μικροσκόπιο αντίθεσης και περιέχει αραιά καταναμημένα βακτήρια και μικροαποικίες *E. Coli* στο οπτικό πεδίο (ανατρέξτε στο Σχήμα 15 για λεπτομέρειες).



Σχήμα 15: Στιγμιότυπο εικόνας (από συνεστιακό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης) με διάσπαρτες μικροαποικίες *E. Coli* στο οπτικό πεδίο (σχήμα προσαρμοσμένο από το [25]).

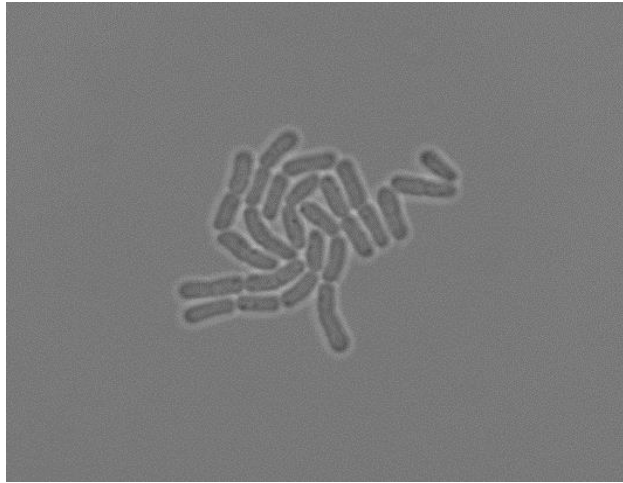
Το δεύτερο στιγμιότυπο εικόνας έχει χρησιμοποιηθεί από το CellTracer. Η εικόνα έχει παραχθεί από οπτικό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης και περιέχει μία αποικία με *E. Coli* στο οπτικό πεδίο (βλ. Σχήμα 16 για λεπτομέρειες) Η εικόνα αυτή προέρχεται από μία κυτταρική ταινία του εργαστηρίου *Elowitz* και *Rosenfeld* [15]. Η κυτταρική ταινία είναι διαθέσιμη στην ιστοσελίδα του CellTracer.



Σχήμα 16: Στιγμιότυπο εικόνας (από οπτικό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης) με μία μικροαποικία *E. Coli* στο οπτικό πεδίο (σχήμα προσαρμοσμένο από το [15]).

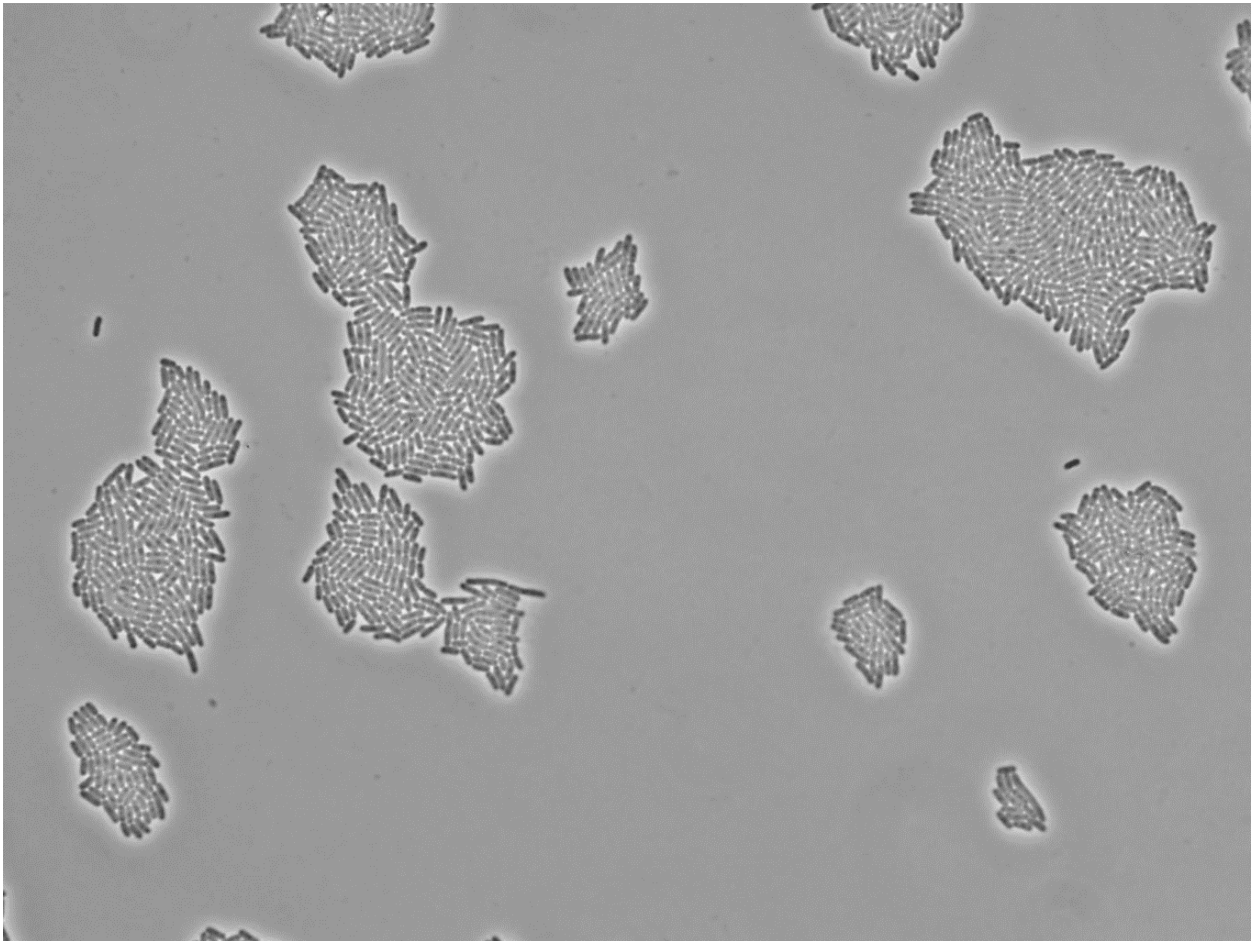
Το τρίτο στιγμιότυπο εικόνας έχει χρησιμοποιηθεί από το TLM-Tracker. Η εικόνα έχει παραχθεί από οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου και περιέχει μία αποικία με *B. Megaterium* στο οπτικό

πεδίο (βλ. Σχήμα 17 για λεπτομέρειες) ενώ προέρχεται από μία κυτταρική ταινία του εργαστηρίου *Stammen et al.* [14]. Η κυτταρική ταινία είναι διαθέσιμη στην ιστοσελίδα του TLM-Tracker.



**Σχήμα 17:** Στιγμιότυπο εικόνας (από οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου) με μία μικροαποικία *B. Megaterium* στο οπτικό πεδίο (σχήμα προσαρμοσμένο από το [13]).

Τέλος, προκειμένου να αποδειχθεί η ισχύς της προτεινόμενης μεθοδολογίας στην επεξεργασία συνωστισμένων αποικιών (πάνω από χίλια κύτταρα), χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά στιγμιότυπα εικόνας μιας κυτταρικής ταινίας, στην οποία θα αναφερόμαστε από δω και στο εξής ως multi-salPhase. Η ταινία αυτή περιέχει στο οπτικό πεδίο πολλαπλές αυξανόμενες αποικίες *S. Typhimurium* (βλ. Σχήμα 18) οι οποίες μάλιστα συγχωνεύονται και παράχθηκε από οπτικό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (βλ. παραπομπή [42] για λεπτομέρειες) από την ομάδα του ΑΠΘ (Γ-ΕΟ).



Σχήμα 18: Στιγμιότυπο εικόνας (από οπτικό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης) με διάσπαρτες αποικίες *S. Typhimurium* στο οπτικό πεδίο.

## 4.2 Μέθοδος Αξιολόγησης

Για την αξιολόγηση της προτεινόμενης μεθοδολογίας ακολουθήθηκαν δύο λογικές. Αρχικά, συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα καταμέτρησης της μεθοδολογίας μας με το *Ground Truth* (GT). Η αξιολόγηση με το GT, όπως θα αποκαλείται από δω και στο εξής, διεξήχθη με τις δύο κυτταρικές ταινίες, salPhase και conGFP και τα δύο στιγμιότυπα της ταινίας multi-salPhase. Το GT αυτών των κυτταρικών ταινιών δημιουργήθηκε χειροκίνητα από την ομάδα του ΑΠΘ (Γ-ΕΟ) (βλ. Σχήμα 19 για λεπτομέρειες). Έπειτα συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα καταμέτρησης της μεθόδου μας με τα αποτελέσματα καταμέτρησης των υπόλοιπων διαθέσιμων λογισμικών και με το GT, χρησιμοποιώντας τα μεμονωμένα στιγμιότυπα που περιγράφηκαν στην προηγούμενη υποενότητα. Και σε αυτήν την αξιολόγηση, το GT αυτών των στιγμιότυπων δημιουργήθηκε από την ομάδα του ΑΠΘ (Γ-ΕΟ).

Η αξιολόγηση της ακρίβειας της μεθόδου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαδομένων μετρικών, δηλαδή των *True Positives* (TP), τα οποία είναι τα πραγματικά βακτήρια που ταξινομούνται σωστά ως βακτήρια, των *False Positives* (FP) τα οποία είναι συνήθως αντικείμενα θορύβου (artifacts) που ταξινομούνται εσφαλμένα ως βακτήρια και των *False Negatives* (FN), τα οποία είναι πραγματικά βακτήρια που δεν έχουν ταξινομηθεί ως βακτήρια από τη μεθοδολογία. Επιπλέον, υπολογίστηκαν μετρικές που αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας: Το *True Positive Rate* (TPR), το οποίο αντιπροσωπεύει το ποσοστό των πραγματικών βακτηρίων σε μια εικόνα που καταμετρήθηκαν από τη μέθοδο και ορίζεται ως:



$$TPR = \frac{TP}{TP+FN}$$

και το *Positive Predictive Value (PPV)*, το οποίο αντιπροσωπεύει την πιθανότητα ένα καταμετρημένο βακτήριο να είναι σωστά καταμετρημένο. Το *PPV* ορίζεται ως εξής:

$$PPV = \frac{TP}{TP+FP}$$

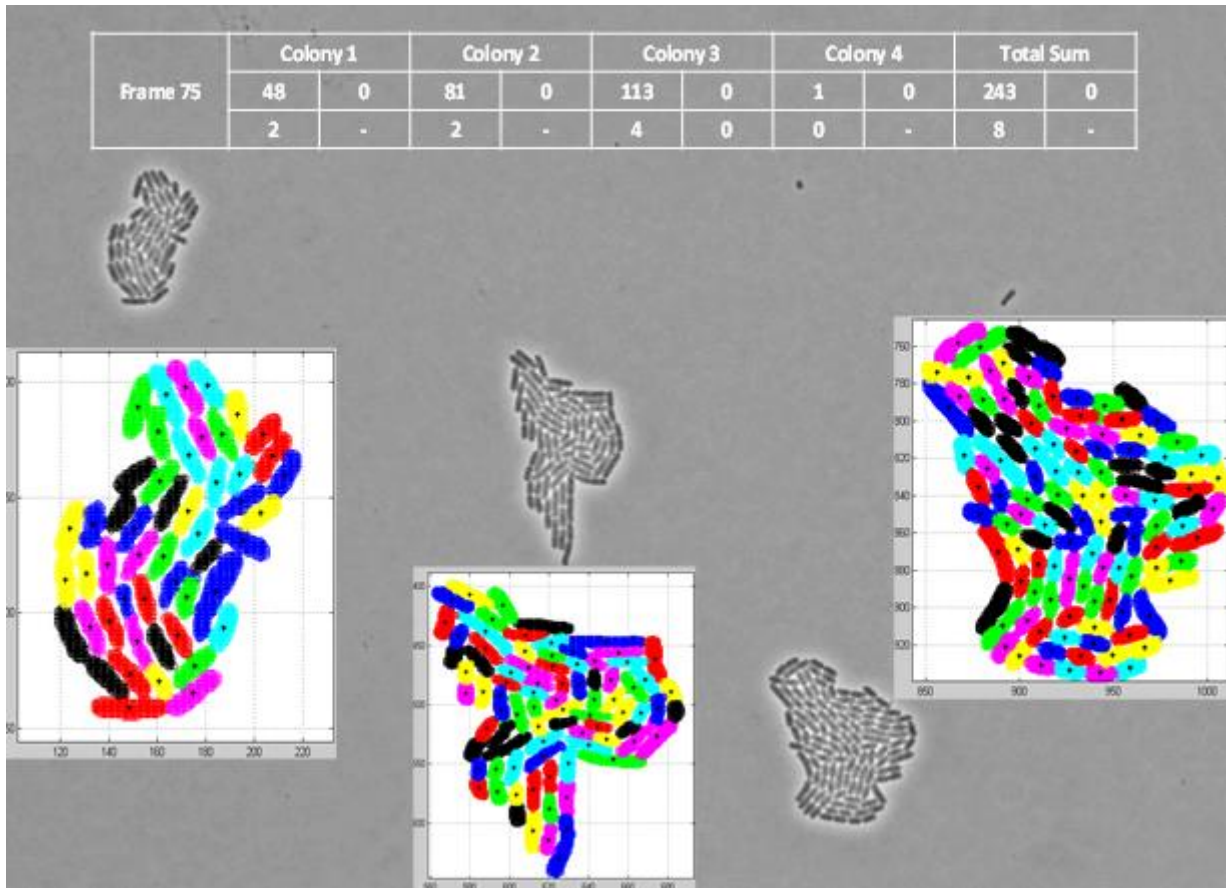
Το πρώτο χρησιμοποιείται για να αξιολογήσει την Ευαισθησία (Sensitivity/Recall) και το δεύτερο την Προσδιοριστικότητα (Specificity) της κάθε μεθόδου. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το *F-Measure (F<sub>1</sub>)* για να εκτιμηθεί η ισορροπία μεταξύ ευαισθησίας και προσδιοριστικότητας, το οποίο ορίζεται ως εξής:

$$F_1 = \frac{2 \cdot (TP \cdot PPV)}{(TP + PPV)}$$

Frame\Colony	1	2	3	4
1	1	1	1	1
2	1	1	1	1
3	1	1	1	1
4	1	1	1	1
5	1	1	1	1
6	1	1	1	1
7	1	1	1	1
⋮				
82	89	124	163	1
83	90	131	176	1

Σχήμα 19: Παράδειγμα πίνακα αλήθειας

Για να κατανοηθεί σε βάθος η μέθοδος της αξιολόγησης, παρουσιάζεται ένα παράδειγμα αξιολόγησης ενός μεμονωμένου στιγμιότυπου της ταινίας SalPhase, στο Σχήμα 20. Παράλληλα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κατάτμησης κάθε αποικίας.



Σχήμα 20: Παράδειγμα αξιολόγησης της καταμέτρησης και οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων κατάτμησης των βακτηρίων από ένα στιγμιότυπο της κυτταρικής ταινίας SalPhase που προέκυψαν από την προτεινόμενη μεθοδολογία. Ξεκινώντας από το επάνω αριστερά πλαίσιο και ακολουθώντας δεξιόστροφη πορεία προς τα επόμενα, παρουσιάζονται τα TP, τα FN και τα FP.

## 5. Αποτελέσματα και Συζήτηση

Σε αυτό το κεφάλαιο θα παρουσιαστούν τα πλεονεκτήματα της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε έναντι των ήδη υπαρχόντων πακέτων λογισμικού. Αρχικά αξιολογείται η μεθοδολογία μας και έπειτα παρουσιάζονται οι δυνατότητες της (καταμέτρηση των βακτηρίων, οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων κατάτμησης, εξαγωγή των χαρακτηριστικών των βακτηρίων, κα.).

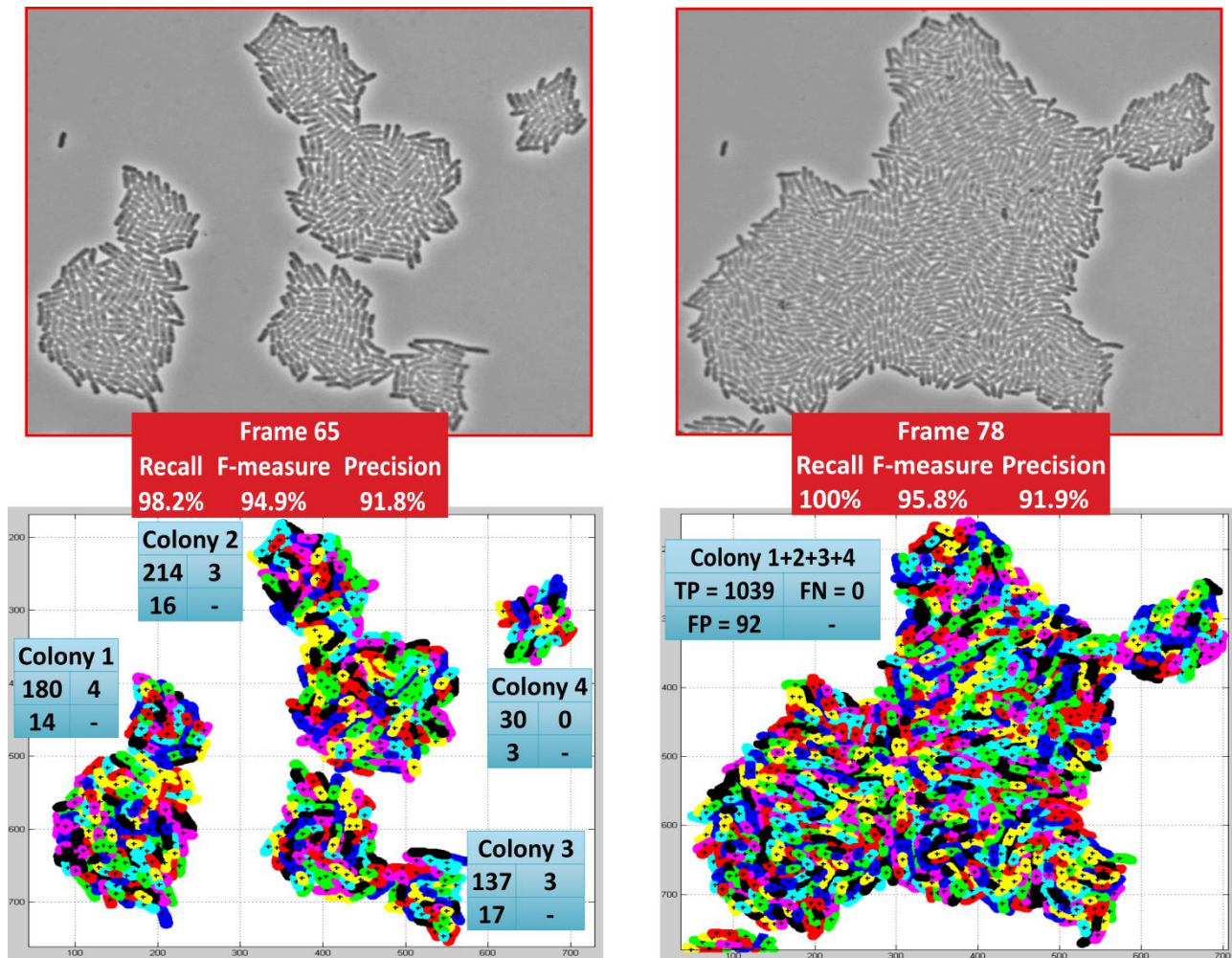
### 5.1 Σύγκριση των αποτελεσμάτων της προτεινόμενης μεθοδολογίας με το Ground Truth

Στην ενότητα αυτή, θα αξιολογηθεί ως προς την ευρωστία και την αποτελεσματικότητα της η μεθοδολογία μας στα διαφορετικά είδη κυτταρικών ταινιών. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, χρησιμοποιήθηκαν οι δύο κυτταρικές ταινίες salPhase και conGFP. Εν συνεχεία, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα καταμέτρησης της μεθόδου μας σε σύγκριση με το GT.

Το Σχήμα 21 παρουσιάζεται η σύνοψη των αποτελεσμάτων της αξιολόγησης σε σχέση με το GT. Μπορούμε να δούμε ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε επιτυγχάνει υψηλή ευαισθησία (πάνω από 99%) και υψηλή ακρίβεια (πάνω από 96%) είτε για τη μια είτε για την άλλη κυτταρική ταινία. Η σημασία αυτών των αποτελεσμάτων αυξάνεται αν δοθεί βάση στο γεγονός ότι τα δύο σύνολα δεδομένων που δημιουργούνται από διαφορετικούς τύπους μικροσκοπίων (οπτικό και συνεστιακό) και διαφορετικές μεθόδους απεικόνισης (αντίθεση φάσεως και διαφορικής παρεμβολής αντίθεσης). Προκειμένου να ενισχυθούν περαιτέρω τα παραπάνω ευρήματα, έχει επίσης υπολογισθεί το  $F_1$  το οποίο χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει την ισορροπία της ευαισθησίας έναντι της ακρίβειας του αλγορίθμου. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε επιτυγχάνει  $F_1$  περίπου 98% και για τα δύο σύνολα δεδομένων. Αυτό ενισχύει την άποψη ότι η μέθοδος μας είναι αποδοτική και εύρωστη σε διαφορετικές τεχνικές απεικόνισης. Είναι αξιοσημείωτο ότι η μεθοδολογία καταμετρά αυτόματα σωστά 6856 βακτήρια από τα 6895 που μετρήθηκαν από τους ειδικούς για το σύνολο δεδομένων salPhase ενώ υποπίπτει σε 263 σφάλματα (άθροισμα FP και FN). Για το σύνολο δεδομένων conGFP, η μέθοδος καταμετρά 968 βακτήρια από τα 969 που καταμετρήθηκαν από τους ειδικούς, ενώ υποπίπτει μόνο το 40 σφάλματα συνολικά.

Evaluation	SalPhase	GFP
TP	6856	968
FP	224	39
FN	39	1
Recall	99.43%	99.90%
Precision	96.84%	96.13%
F-measure	98.12%	97.98%

**Σχήμα 21: Αποτελέσματα αξιολόγησης της προτεινόμενης μεθοδολογίας με τις κυτταρικές ταινίες SalPhase και conGFP.** Η μέθοδος πετυχαίνει υψηλό F1 (πάνω από 97%). Αυτό αποδεικνύει ότι η μεθοδολογία μας είναι εύρωστη σε διαφορετικά μικροσκόπια (οπτικό και συνεστιακό) αλλά και σε διαφορετικά είδη μικροσκοπίας (φθορισμού και αντίθεσης φάσης).



**Σχήμα 22:** Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και οπτικοποίηση δύο στιγμιότυπων (65 και 78) από την κυτταρική ταινία multi-salPhase. Οι τέσσερις αποικίες συγχωνεύονται μεταξύ τους. Πάνω: Τα αρχικά στιγμιότυπα. Κάτω: Τα αποτελέσματα της κατάτμησης των δύο αποικιών. Τα κόκκινα και τα γαλάζια πλαίσια περιέχουν τις στατιστικές αξιολόγησης της προτεινόμενης μεθοδολογίας. Παρατηρούμε ότι και στις δύο περιπτώσεις το  $F_1$  διατηρείται σε υψηλό επίπεδο και μάλιστα πάνω από 94.9%.

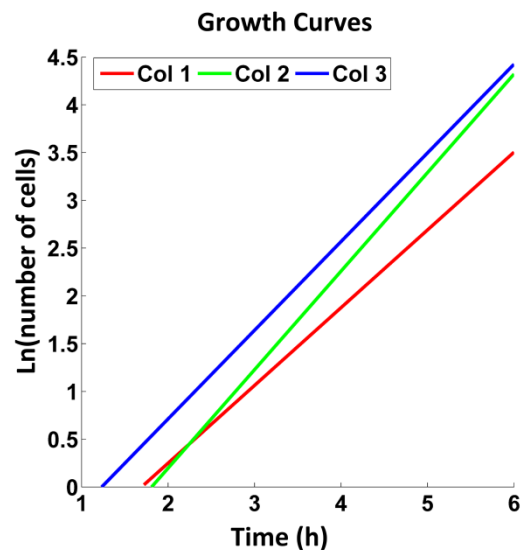
Θα αξιολογηθεί επίσης η δυνατότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας να αναλύει συνωστισμένες αποικίες. Όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 3.2, ο αλγόριθμος μπορεί να παρακολουθεί ξεχωριστά περισσότερες από μία αποικίες στο οπτικό πεδίο, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα πακέτα λογισμικού. Ωστόσο, η προτεινόμενη σωλήνωση αλγορίθμων είναι αποτελεσματική ακόμα και για την ανάλυση συνωστισμένων αποικιών, δηλαδή αποικιών που περιέχουν πάνω από χίλια βακτήρια. Είναι επίσης αξιοσημείωτο το ότι τις κυτταρικές ταινίες στις οποίες οι μικροαποικίες συγχωνεύονται μεταξύ τους, ο αλγόριθμος συνεχίζει να κάνει την κατάτμηση των βακτηριακών κυττάρων αποτελεσματικά. Στο Σχήμα 22 παρουσιάζονται οι δύο αυτές δυνατότητες του αλγορίθμου. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται δύο στιγμιότυπα από την κυτταρική ταινία multi-salPhase που αποτυπώνουν τη συγχώνευση τεσσάρων συνωστισμένων μικροαποικιών. Στο Σχήμα 22 παρέχονται επίσης τα αποτελέσματα της αξιολόγησης κάθε αποικίας ξεχωριστά για κάθε στιγμιότυπο. Μπορεί να παρατηρηθεί ότι οι μετρικές αξιολόγησης αυτών των στιγμιότυπων και οι μετρικές αξιολόγησης των κυτταρικών ταινιών είναι σχεδόν πανομοιότυπες και ιδιαίτερος υψηλές (αξιόπιστες) (ευαισθησία πάνω από 98%, ακρίβεια πάνω από 91% και F-μέτρο πάνω από 95%). Συμπερασματικά, η προτεινόμενη μεθοδολογία είναι αποτελεσματική και ισχυρή, ενώ είναι πλήρως αυτοματοποιημένη.

Η μεθοδολογία μας μπορεί να παρέχει ακριβή στοιχεία για την προρρητική μικροβιολογία (predictive microbiology). Για να αποδειχθεί αυτό, ταιριάζουμε στις καμπύλες ανάπτυξης της κάθε αποικίας, το μοντέλο των *Baranyi* και *Roberts* [45] με σκοπό την εκτίμηση της ανάπτυξης των κινητικών παραμέτρων, το χρόνο προσαρμογής (lag time,  $\lambda$ ) και το μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (maximum specific growth rate,  $\mu_{max}$ ). Για να περιγράψουμε την απότομη μετάβαση από την φάση προσαρμογής στην εκθετική φάση που χαρακτηρίζουν την ανάπτυξη που παρατηρείται, οι τιμές των παραμέτρων  $m$  και  $n$  του μοντέλου είναι συντονισμένες στο 0 και 20, αντίστοιχα, όπως διεξήχθη στη [43]. Στο Σχήμα 23 αριστερά, παρουσιάζονται οι εκτιμώμενες κινητικές παράμετροι των τριών μικροαποικιών (SalPhase ταινία) που προέρχονται από τη χειροκίνητη και την αυτόματη καταμέτρηση. Μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι οι κινητικές παράμετροι, που προκύπτουν από το GT είναι σχεδόν πανομοιότυπες με εκείνες που υπολογίστηκαν από το λογισμικό αυτόματης καταμέτρησης. Στο Σχήμα 23 δεξιά, απεικονίζονται οι καμπύλες ανάπτυξης που παράγονται από την προτεινόμενη μεθοδολογία. Παρατηρείται ότι παρόλο που τα τρία μεμονωμένα κύτταρα αναπτύσσονται στο ίδιο μικρο-περιβάλλον παρουσιάζουν διαφορετική δυναμική ανάπτυξη. Κατά συνέπεια, είναι προφανές ότι αγωγός μας μπορεί να είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τους μικροβιολόγους, με στόχο να επιταχυνθούν οι προσεγγίσεις προρρητικής μικροβιολογίας, όπως εκείνη που περιγράφεται λεπτομερώς στα??? [20][43].

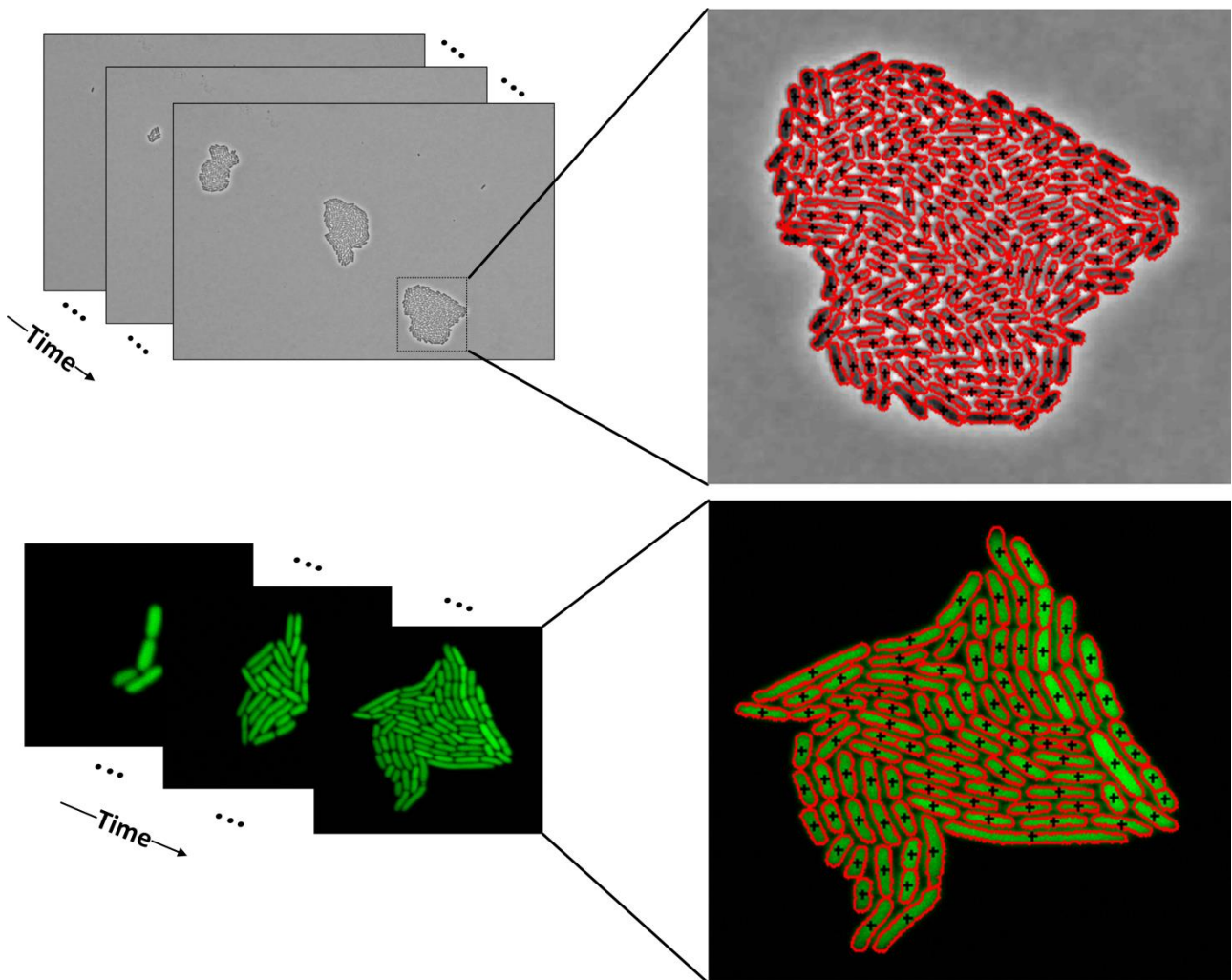
Manual Counting			
Col.	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	Lag (h)	R <sup>2</sup>
1	0.808	1.373	0.991
2	1.038	1.846	0.995
3	0.965	1.225	0.994

Automatic Counting			
Col.	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	Lag (h)	R <sup>2</sup>
1	0.813	1.377	0.992
2	1.031	1.865	0.995
3	0.928	1.143	0.994

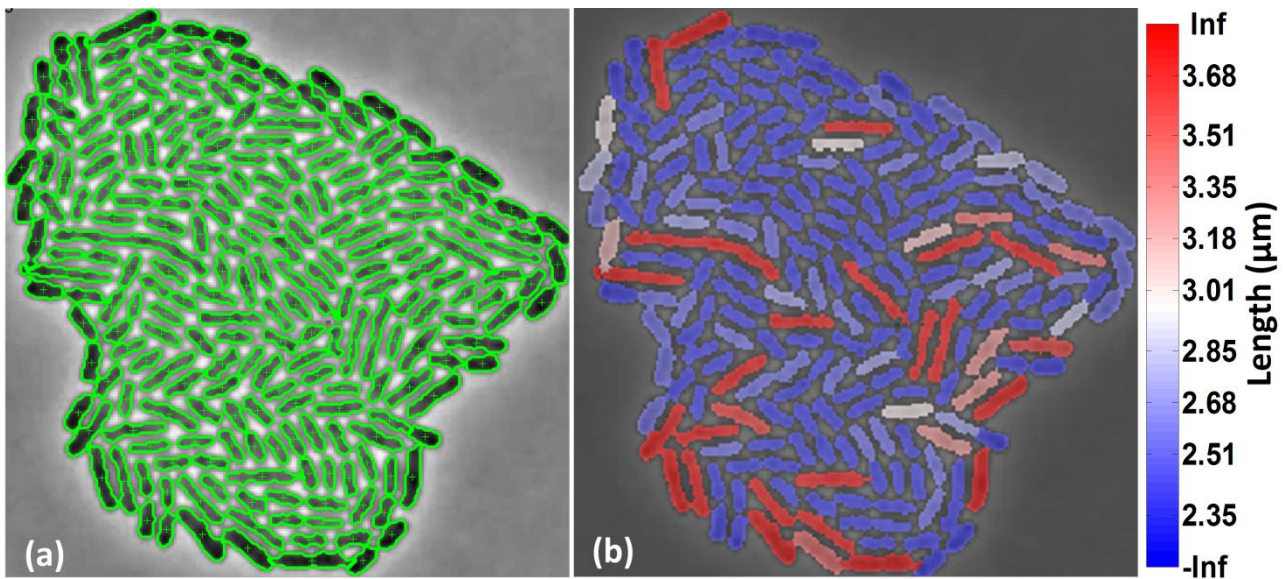


**Σχήμα 23: Επαλήθευση εκτίμησης παραμέτρων.** Αριστερά: Σύγκριση των εκτιμήσεων των παραμέτρων του μοντέλου *Baranyi* και *Roberts* [45] που προέκυψαν από την καταμέτρηση βακτηρίων από ειδικούς (πάνω) και από την προτεινόμενη μεθοδολογία (κάτω) για την κυτταρική ταινία SalPhase. Δεξιά: Καμπύλες ανάπτυξης των τριών αποικιών της κυτταρικής ταινίας SalPhase που δημιουργήθηκαν από την προτεινόμενη μεθοδολογία.

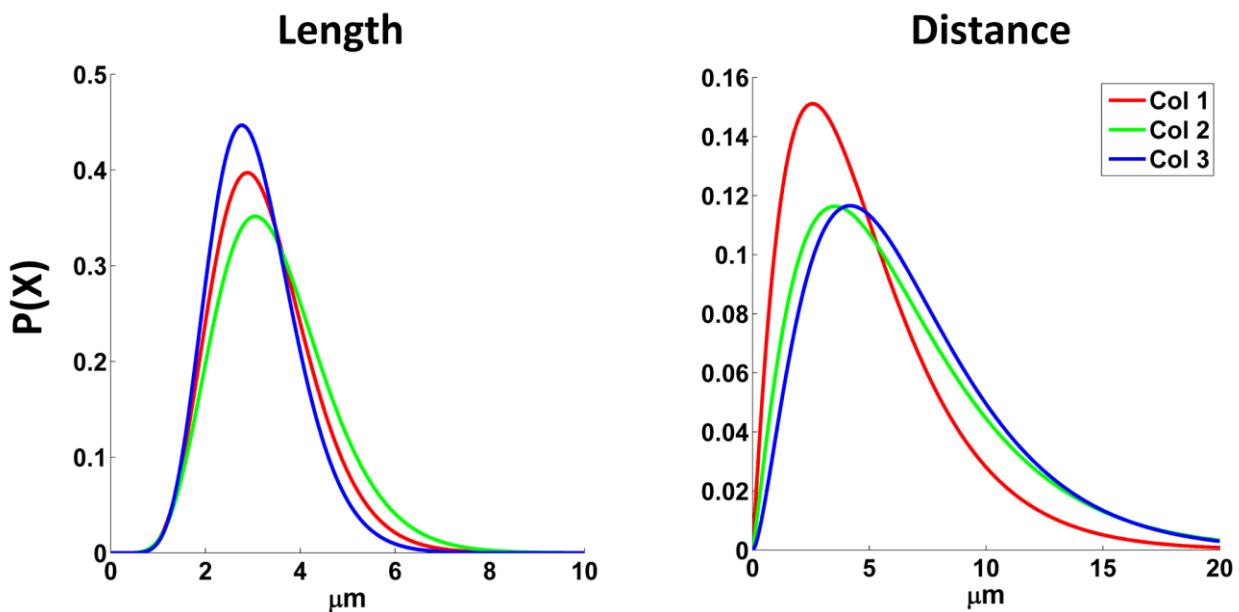


**Σχήμα 24:** Αποτελέσματα κατάτμησης της προτεινόμενης μεθοδολογίας για τις κυτταρικές ταινίες SalPhase (πάνω) και conGFP (κάτω).

Στη συνέχεια, θα προχωρήσουμε σε οπτική επιθεώρηση των αποτελεσμάτων κατάτμησης. Το Σχήμα 24 διαθέτει παραδείγματα κατάτμησης των salPhase (γραμμή 1) και conGFP (γραμμή 2) κυτταρικών ταινιών. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, η κατάτμηση είναι αρκετά ακριβής και οι υπερκείμενες κόκκινες καμπύλες περιγράφουν λεπτομερώς τη πραγματική περίμετρο του κάθε βακτηρίου. Είναι προφανές ότι εφόσον έχουμε μία τόσο ακριβή κατάτμηση, είμαστε σε θέση να έχουμε αξιόπιστη εξαγωγή χαρακτηριστικών των βακτηρίων και διάφορα είδη ανάλυσης (π.χ. στατιστική ανάλυση, εκτίμηση κινητικών ανάπτυξης βακτηριακών πληθυσμών). Στο Σχήμα 25 (b), επιδεικνύουμε πώς τα γνωρίσματα των κυττάρων (π.χ. μήκος κυττάρων) μπορούν να απεικονιστούν με χρήση της προτεινόμενης μεθόδου. Τα διαφορετικά χρώματα που επικαλύπτουν τα κύτταρα αντιπροσωπεύουν το μήκος των κυττάρων σε μικρόμετρα ( $\mu\text{m}$ ), στο εύρος που υποδεικνύεται από την παρακείμενη μπάρα χρώματος. Αυτή η απεικόνιση επιτρέπει στο χρήστη να διακρίνει και να επικεντρώνεται σε συγκεκριμένα βακτήρια σύμφωνα με το επιλεγμένο χαρακτηριστικό. Ένα άλλο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό είναι ότι η μεθοδολογία μπορεί επίσης να δημιουργήσει time-lapse ταινίες των κατατεμημένων αποικιών για την οπτικοποίηση ενός συγκεκριμένου κυτταρικού χαρακτηριστικού.



**Σχήμα 25:** a) Αποτελέσματα κατάτμησης των βακτηρίων μιας αποικίας της κυτταρικής ταινίας *SalPhase* (τα πράσινα περιγράμματα δείχνουν την περίμετρο των κατατετμημένων βακτηρίων), και b) οπτικοποίηση του μήκους των βακτηρίων της ίδιας αποικίας. Τα βαθμονομημένα χρώματα αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά μήκη των βακτηρίων από το μικρότερο (μπλε) προς το μεγαλύτερο (κόκκινο).



**Σχήμα 26:** Κατανομές του κυτταρικού μήκους και της απόστασης των βακτηρίων από το κέντρο της αποικίας για τις τρεις αποικίες της κυτταρικής ταινίας *salPhase*.

Το Σχήμα 26 παρουσιάζουμε τη δυνατότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας που προσφέρεται για περαιτέρω ανάλυση των κυτταρικών χαρακτηριστικών. Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται η κατανομή του βακτηριακού μήκους (σε μικρόμετρα) κάθε αποικίας και της απόστασης των βακτηρίων κάθε αποικίας από το κέντρο της. Από τις κατανομές μπορούμε να παρατηρήσουμε τη στοχαστικότητα ανάπτυξης μεμονωμένων κυττάρων, έχοντας παρατηρήσει ότι οι κατανομές διαφοροποιούνται για κάθε αποικία παρόλο που αποικίες αναπτύσσονται στο ίδιο μικροπεριβάλλον.

## 5.2 Σύγκριση της προτεινόμενης μεθοδολογίας με τα υπάρχοντα λογισμικά

Για να συγκριθεί η προτεινόμενη μεθοδολογία με τα υπάρχοντα λογισμικά, επιλέξαμε πακέτα λογισμικού (βλ.[23-26]) που έχουν χρησιμοποιηθεί σε εργαστήρια σε όλο τον κόσμο με στόχο να αναλύσουν κυτταρικές ταινίες και έχουν αναφερθεί σε διάφορες μελέτες [46-52].

Στο πλαίσιο αυτής της αξιολόγησης χρησιμοποιήθηκαν στιγμιότυπα εικόνας που παρέχονται από τα ήδη υπάρχοντα λογισμικά στις ιστοσελίδες τους. Με στόχο τη διατήρηση της αντικειμενικότητας και αμεροληψίας μας, επιδιώξαμε τη χρήση όλων των πακέτων κατά την επεξεργασία κάθε στιγμιότυπου. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να τονισθεί ότι τα υπάρχοντα πακέτα λογισμικού που χρησιμοποιούνται απαιτούν διαφορετική παραμετροποίηση για κάθε τύπο εικόνας. Έτσι, έπρεπε να εκτελεσθεί επιπλέον εκτενής πειραματισμός προκειμένου να βρεθούν οι ιδανικές παραμετροποιήσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν πρόκειται για μία τετριμμένη και απλή διαδικασία, δεδομένου ότι απαιτεί τη γνώση συγκεκριμένων εννοιών επεξεργασίας εικόνας (π.χ. επιλογή φίλτρων και ορισμό ιδιοτήτων, μεθόδους κατάτμησης εικόνας, κλπ). Στον αντίποδα, η παραμετροποίηση της μεθόδου μας είναι ανεξάρτητη από είδος και εξαρτάται μόνο από την ανάλυση της εικόνας. Όλες οι παράμετροι ρυθμίζονται αυτόματα από τη μεθοδολογία, όταν ο χρήστης εισάγει την κυτταρική ταινία και την απεικονιστική μέθοδο από τη οποία προέρχεται. Αυτό επιφέρει ένα από τα πιο σπουδαία χαρακτηριστικά της μεθοδολογίας μας, ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και από τους μη ειδικούς στην επεξεργασία εικόνας.

Το Σχήμα 27 συνοψίζει τα συγκριτικά αποτελέσματα της αξιολόγησης. Είναι σαφές ότι η μεθοδολογία που έχει αναπτυχθεί υπερτερεί από το MicrobeTracker σε όλες τις περιπτώσεις που ελέγχθηκαν. Προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν οι διαφορές στην απόδοση τους, παραθέτουμε την περίληψη της αξιολόγησης κάθε πακέτου λογισμικού για κάθε εικόνα που αναλύθηκε. Το MicrobeTracker και το Schnitzcells ήταν τα πιο ισχυρά από τα πακέτα λογισμικού που αξιολογήθηκαν. Τα πακέτα αυτά παρήγαγαν αποτελέσματα για όλες τις εικόνες που επιλέξαμε να αναλυθούν. Ωστόσο, το Schnitzcells δημιούργησε πάρα πολλά αντικείμενα σφάλματος (δηλαδή FP), και ως εκ τούτου αποκλείστηκε από την αξιολόγηση. Επιπλέον, μερικά από τα πακέτα δεν έδωσαν αποτελέσματα για ορισμένους τύπους εικόνας, ακόμη και αφού δοκιμάσαμε να τα «τρέξουμε» με διάφορες παραμετροποιήσεις.

Η προτεινόμενη μέθοδος παρουσιάζει ένα αξιοσημείωτο πλεονέκτημα στην  $F_1$  (πάνω από 96.97%) για όλες τις μορφές απεικόνισης. Το πιο σημαντικό εύρημα είναι ότι ο προτεινόμενος αγωγός ξεπερνά τα υπόλοιπα πακέτα λογισμικού, ακόμη και στις δικές τους εικόνες. Οι παύλες στους πίνακες δείχνουν ότι το λογισμικό δεν έδωσε αποτελέσματα για το υπό δοκιμή στιγμιότυπο εικόνας. Το CellTracer ανέλυσε αποτελεσματικά μόνο το στιγμιότυπο εικόνας που πήραμε από την κυτταρική ταινία του CellTracer, και έτσι ήταν το λιγότερο γενικευμένο όσο αφορά στην απεικονιστική μέθοδο εικόνας. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι μόνο η προτεινόμενη μεθοδολογία έδωσε ακριβές αποτέλεσμα στο στιγμιότυπο εικόνας από την κυτταρική ταινία SalPhase δηλαδή σε ταινίες που περιέχουν περισσότερες από μία και συνωστισμένες αποικίες στο οπτικό της πεδίο. Επιπλέον, το CellTracer και το TLM-Tracker δεν είναι σε θέση να αναλύσουν εικόνες με αραιά κατανεμημένα βακτήρια και αραιά κατανεμημένες μικροαποικίες, όπως το στιγμιότυπο του MicrobeTracker. Εν κατακλείδι, μπορούμε να δούμε ότι η προτεινόμενη σωλήνωση αλγορίθμων εντοπίζει περίπου κάθε κύτταρο (των εξεταζόμενων εικόνων), δηλαδή



παρουσιάζει υψηλό ποσοστό ευαισθησίας, πάνω από 98%, ενώ εντοπίζει ελάχιστα αντικείμενα σφάλματος, δηλαδή παρουσιάζει υψηλή ποσοστό ακρίβειας πάνω από το 94%.

Ένας ενδιαφερόμενος αναγνώστης δύναται να ανατρέξει στο παράρτημα, προκειμένου να συγκρίνει και τα αποτελέσματα κατάκτησης της προτεινόμενης μεθοδολογίας και του MicrobeTracker. Συμπερασματικά, η ανεπτυγμένη μεθοδολογία είναι ανώτερη από τα υπάρχοντα λογισμικά αλλά και πιο γενικευμένη, δεδομένου ότι μπορεί να επεξεργαστεί και να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα για διάφορους τύπους μικροσκοπίας και τεχνικών απεικόνισης.

Comparative Evaluation Summary								
Proposed Phase Contrast Image	Method	TP	FP	FN	Recall	Precision	F-measure	
	Proposed	128	6	1	99.22%	95.52%	97.34%	
	MicrobeTracker	41	0	88	31.78%	100.00%	48.24%	
	CellTracer						-	
	TLM-Tracker						-	
MicrobeTracker CSLM Image	Method	TP	FP	FN	Recall	Precision	F-measure	
	Proposed	246	0	3	98.80%	100.00%	99.39%	
	MicrobeTracker	243	0	6	97.59%	100.00%	98.78%	
	CellTracer						-	
	TLM-Tracker						-	
CellTracer Phase Contrast Image	Method	TP	FP	FN	Recall	Precision	F-measure	
	Proposed	16	1	0	100.00%	95.52%	96.97%	
	MicrobeTracker	11	0	5	68.75%	100.00%	81.48%	
	CellTracer	15	0	1	93.75%	100.00%	96.77%	
	TLM-Tracker	13	2	3	81.25%	86.67%	83.87%	
TLM-Tracker Bright-field Image	Method	TP	FP	FN	Recall	Precision	F-measure	
	Proposed	25	1	0	100.00%	96.15%	98.04%	
	MicrobeTracker	22	7	3	88.00%	75.86%	81.48%	
	CellTracer						-	
	TLM-Tracker	23	0	2	92.00%	100.00%	95.83%	

Σχήμα 27: Ο πίνακας περιέχει το ποσοστό επιτυχίας της κάθε μεθόδου στην καταμέτρηση των βακτηρίων για κάθε διαφορετικό είδος εικόνας. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από τη μετρική  $F_1$  ( $\geq 96.97\%$  για κάθε περίπτωση), η προτεινόμενη μεθοδολογία είναι εύρωστη για κάθε τύπο εικόνας (που προέρχεται είτε από οπτικό είτε από συνεσιακό μικροσκόπιο και είτε από μικροσκοπία αντίθεσης φάσης είτε από μικροσκοπία φωτεινού πεδίου). Το

CellTracer και το TLM Tracker δεν έδωσαν αποτελέσματα στους συγκεκριμένους τύπους εικόνας για αυτό και στους αντίστοιχους πίνακες η απόδοση τους συμβολίζεται με «-».

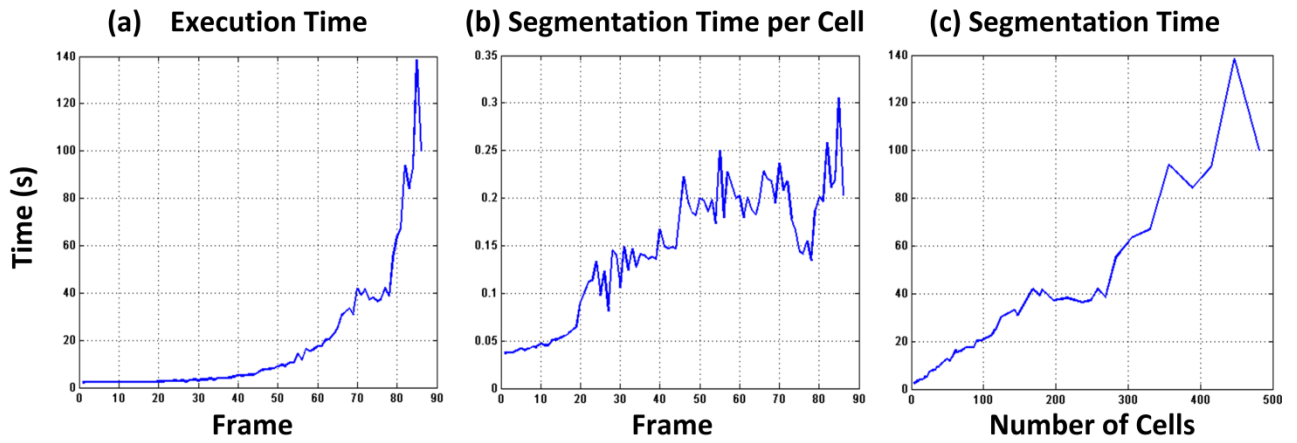
### 5.3 Ανάλυση υπολογιστικής πολυπλοκότητας

Στο σημείο αυτό, εξετάζεται η υπολογιστική πολυπλοκότητα της προτεινόμενης σωλήνωσης αλγορίθμων. Σε γενικές γραμμές, ο χρόνος εκτέλεσης της μεθόδου αυξάνεται τετραγωνικά σε συνάρτηση με τον αριθμό των κυττάρων, όπως φαίνεται στο Σχήμα 28 (a). Σε αυτό το γράφημα, ο χρόνος εκτέλεσης απεικονίζεται συναρτήσει του χρόνου (όπου ο χρόνος αντιπροσωπεύεται από τα σειρά των στιγμιότυπων εικόνας). τα τελευταία στιγμιότυπα της salPhase περιέχουν περισσότερα κύτταρα διότι γιατί δεν συμβαίνει κυτταρικός θάνατος κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης του πειράματος.

Προκειμένου να γίνει μια πιο λεπτομερής ανάλυση, εξετάστηκε ο χρόνος κατάτμησης σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων. Αρχικά αφαιρέθηκε ο χρόνος προεπεξεργασίας και ο χρόνος κατάτμησης της αποικιών από το συνολικό χρόνο εκτέλεσης, προκειμένου να υπολογιστεί ο λεγόμενος χρόνος κατάτμησης μεμονωμένου κυττάρου.

Δύναται να παρατηρηθεί από το Σχήμα 28 (c) ότι ο χρόνος κατάτμησης είναι  $O(n^2)$  όπου το  $n$  αντιπροσωπεύει τον αριθμό των βακτηρίων. Η καμπύλη παρουσιάζει διακυμάνσεις, επειδή ο χρόνος κατάτμησης επηρεάζεται από την ποιότητα εικόνας. Αν ένα συγκεκριμένο στιγμιότυπο είναι χαμηλότερης ποιότητας (π.χ. λόγω της ύπαρξης θορύβου), τότε αυξάνεται το πρόβλημα της υπερκατάτμησης, δηλαδή η αρχική κατάτμηση δεν είναι τόσο ακριβής, οπότε ο μετασχηματισμός Watershed σπάει τα πολύπλοκα αντικείμενα σε περισσότερα τμήματα, και απαιτείται περισσότερος χρόνος για τη διαδικασία «επίλυσης πάζλ». Συμπερασματικά, η πολυπλοκότητα του αλγορίθμου δεν είναι τετραγωνική ως προς τον αριθμό των βακτηρίων, αλλά ως προς τον αριθμό των τμημάτων στα οποία σπάει κάθε αντικείμενο. Αν υποθέσουμε ότι η ποιότητα μιας ταινίας είναι σταθερή, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο υπολογιστικός χρόνος αυξάνεται σε συνάρτηση με το μέγεθος της αποικίας.

Ο υπολογιστικός χρόνος του αλγορίθμου EM με MML είναι ψευδο-τετραγωνικός προς τον αριθμό των συστάδων (clusters) σε ένα πολύπλοκο αντικείμενο, αλλά και προς το μέγεθος του συνόλου δεδομένων που δημιουργείται, δηλαδή  $O(k \cdot m)$ , θέτοντας τις επαναλήψεις σύγκλισης του αλγορίθμου να είναι σταθερές. Έτσι, ο χρόνος που καταναλώνεται από τον αλγόριθμο EM εξαρτάται από το μέγεθος μιας αποικίας, δηλαδή ενώ αυξάνει το μέγεθος αποικίας, τα  $k$  και  $m$  αυξάνονται επίσης. Κατά συνέπεια, η πολυπλοκότητα του αλγορίθμου είναι τετραγωνική. Είναι αξιοσημείωτο ότι παρά το γεγονός ότι ο υπολογιστικός χρόνος αυξάνεται τετραγωνικά ο υπολογιστικός χρόνος ανά κύτταρο είναι γραμμικός, δηλαδή  $O(n)$  (βλ. Σχήμα 28 (b)).



Σχήμα 28.: Ανάλυση υπολογιστικού χρόνου για την προτεινόμενη μεθοδολογία. (a) Χρόνος εκτέλεσης για κάθε στιγμιότυπο εικόνας, (b) Μέσος χρόνος κατάτμησης βακτηρίου σε κάθε στιγμιότυπο εικόνας, και (c) Χρόνος κατάτμησης σε σχέση με τον αριθμό των βακτηρίων.

## 6. Συμπεράσματα

Στην εν λόγω αναφορά, παρουσιάστηκε μια πλήρως αυτοματοποιημένη σωλήνωση αλγορίθμων, η οποία επιτρέπει την υψηλή ανάλυση κυτταρικών ταινιών time-lapse μέχρι το επίπεδο των μεμονωμένων κυττάρων. Παρατέθηκαν επίσης παραδείγματα, τα οποία αποδεικνύουν την ευρωστία και την καθολικότητα της μεθοδολογίας μας.

Η προοπτική μας περιλαμβάνει τη βελτίωση της μεθοδολογίας σε συγκεκριμένα/καθορισμένα?? στάδια. Αρχικά, θα α βελτιωθεί η ακρίβεια του αλγορίθμου σκελετοποίησης, προκειμένου να ληφθούν όσο το δυνατόν πιο ακριβή αποτελέσματα κατά τον υπολογισμό του κριτηρίου «βαθιάς κοιλάδας». Επιπλέον, βασικός επόμενος στόχος μας είναι η βελτίωση του αλγορίθμου «επίλυσης πάζλ», προκειμένου να καταστεί η συγχώνευση τμημάτων των αντικειμένων πιο αποτελεσματική και ανεξάρτητη από σχήμα του βακτηρίου. Όσον αφορά στην κατασκευή γενεαλογίας των βακτηρίων, πρόκειται να δημιουργηθεί ένας αλγόριθμος, ευαίσθητος στην κινητικότητα και στην αλλαγή σχήματος των βακτηρίων μέσα σε μία αποικία.

Τέλος, στοχεύουμε στην ανάλυση διαφόρων ταινιών time-lapse από διάφορα μικροπεριβάλλοντα, π.χ. μικρορευστομηχανικές συσκευές (microfluidic devices) ή συνθετικούς ιστούς. Αυτό θα συνεισφέρει αδιαμφισβήτητα στην επίτευξη της βελτίωσης της μεθοδολογίας ανάλυσης βακτηριακής εικόνας.

## Αναφορές

- [1] M.B. Elowitz, A. J. Levine, E. D. Siggia, and P. S. Swain PS, “Stochastic Gene Expression in a Single Cell,” *Science*, vol. 297, no. 5584, pp. 1183-1186, Aug. 2002.
- [2] S. V. Avery, “Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 4, no. 8, pp. 577-587, Aug. 2006.
- [3] P. Gilbert, J. R. Das, M. V. Jones, and D. G. Allison., “Assessment of resistance towards biocides following the attachment of micro-organisms to, and growth on, surfaces,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 91, no. 2, pp. 248-255, Aug. 2001.
- [4] P. Gilbert, D. G. Allison, and A. J. McBain, “Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance?,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 92 Supp, pp. S98-S110.
- [5] B. B. Christensen, J. A. Haagenen, A. Heydorn, and S. Molin, “Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 5, pp. 2495-2502, May 2002.
- [6] S. Møller, C. Sternberg, J. B. Andersen, B. B. Christensen, J. L. Ramos, M. Givskov, and S. Molin “In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members,” *Appl Environ Microbiol.*, vol. 64, no. 2, pp. 721-732, Feb. 1998.
- [7] S. Molin, and T. Tolker-Nielsen, “Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilization of the biofilm structure,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 14, no. 3, pp. 255-261, Jun. 2003.
- [8] L. H. G. Morton, D. L. A. Greenway, C. C. Gaylarde, and S. B. Surman, “Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides,” *Int. Biodeter. Biodegr.*, vol. 41, pp. 247-259, 1998.
- [9] K. Sauer, “The genomics and proteomics of biofilm formation,” *Genome Biol.*, vol. 4, no. 6, pp. 219, May 2003.
- [10] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber, and G. James, “Biofilms, the customized microniche,” *J. Bacteriol.*, vol. 176, no. 8, pp. 2137-2142, Apr. 1994.
- [11] G. A. O’Toole, and R. Kolter, “Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis,” *Mol. Microbiol.*, vol. 28, no. 3, pp. 449-461, May 1998.
- [12] G. A. O’Toole, H. B. Kaplan, and R. Kolter, “Biofilm formation as microbial development,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 54, pp. 49-79, 2000.
- [13] P. T. Su, C. T. Liao, J. R. Roan, S. H. Wang, A. Chiou, and W. J. Syu, “Bacterial colony from two-dimensional division to three-dimensional development,” *PLoS One*, vol. 7, no. 11, Nov. 2012.
- [14] S. Stammen, et al., “High-yield intra- and extra- cellular protein production using *Bacillus Megaterium*,” *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 76, pp. 4037-4046, Jun. 2010.
- [15] N. Rosenfeld, J. W. Young, U. Alon, P. S. Swain, and M. B. Elowitz, “Gene regulation at the single-cell level,” *Science*, vol. 307, no. 5717, pp. 1962-1965, Mar. 2005.
- [16] J. C. Locke, J. W. Young, M. Fontes, M. J. Hernández Jiménez, and M. B. Elowitz, “Stochastic Pulse Regulation in Bacterial Stress Response,” *Science*, vol. 334, no. 6054, pp. 366-369, Oct. 2011.

- [17] A. Elfving, Y. LeMarc, J. Baranyi, and A. Ballagi, “Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by Image Analysis,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 2, pp. 675-678, Feb. 2004.
- [18] Y. Wakamoto, J. Ramsden, and K. Yasuda, “Single-cell growth and division dynamics showing epigenetic correlations,” *The Analyst*, vol. 130, no. 3, pp. 311-317, Mar. 2005.
- [19] D. Siegal-Gaskins and S. Crosson, “Tightly-regulated and heritable division control in single bacterial cells,” *Biophys. J.*, vol. 95, no. 4, pp. 2063-2072, Nov. 2008.
- [20] T. Ross and T. A. McMeekin, “Modeling microbial growth within food safety risk assessments,” *Risk Anal.*, vol. 23, no. 1, pp. 179-197, Feb. 2003.
- [21] J. M. Guberman, A. Fay, J. Dworkin, N. S. Wingreen, and Z. Gitai, “PSICIC: noise and asymmetry in bacterial division revealed by computational image analysis at subpixel resolution,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 4, no. 11, Nov. 2008.
- [22] J. C. Locke, and M. B. Elowitz, “Using movies to analyse gene circuit dynamics in single cells,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 5, pp. 383–392, May 2009.
- [23] Q. Wang, J. Niemi, C. M. Tan, L. You, and M. West, “Image segmentation and dynamic lineage analysis in single-cell fluorescence microscopy,” *Cytometry A.*, vol. 77, no. 1, pp. 101-110, Jan. 2010.
- [24] J. Klein, S. Leupold, I. Biegler, R. Biedendieck, R. Münch, and D. Jahn, “TLM-Tracker: software for cell segmentation, tracking and lineage analysis in time-lapse microscopy movies,” *Bioinformatics*, vol. 28, no. 17, pp. 2276-2277, Sep. 2012.
- [25] O. Sliusarenko, J. Heinritz, T. Emonet, and C. Jacobs-Wagner, “High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics,” *Mol. Microbiol.*, vol. 80, no. 3, pp. 612-627, May 2011.
- [26] J. W. Young, J. C. W. Locke, A. Altinok, N. Rosenfeld, T. Bacarian, P. S. Swain, E. Mjolsness, and M. B. Elowitz, “Measuring single-cell gene expression dynamics in bacteria using fluorescence time-lapse microscopy,” *Nature Protocols*, vol. 7, no. 1, pp. 80-88, Dec. 2011.
- [27] M. N. Do, and M. Vetterli, “The contourlet transform: an efficient directional multi resolution image representation,” *IEEE Trans. Image Process.*, vol. 14, no. 12, pp. 2091-2106, Dec. 2005.
- [28] M. N. Do, and M. Vetterli, “Contourlets,” in *Beyond Wavelets*, 1<sup>st</sup> ed., G. V. Welland Ed., New York: Academic Press, 2003, pp. 83-105.
- [29] M. N. Do, and M. Vetterli, “Contourlets: a directional multiresolution image representation,” in *IEEE International Conference on Image Processing Rochester*, 2002, pp. I-357 - I-360, vol.1.
- [30] Tsakanikas, P., Manolakos, E. S., Active contour based segmentation of 2DGE proteomics images, 16th European Signal Processing Conference (EUSIPCO-2008), Lausanne, Switzerland, August 25–29, 2008.
- [31] K. Zuiderveld, “Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization,” *Graphic Gems IV*, San Diego: Academic Press Professional, 1994, pp. 474-485.
- [32] R. Gonzales and R. Woods, “Digital Image Processing,” 3<sup>rd</sup> ed., Addison-Wesley Publishing Company, UK, 2007.
- [33] N. Otsu, “A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms,” *IEEE Trans. Syst., Man, Cybern., Syst.*, vol. 9, no. 1, pp. 62-66, Jan. 1979.
- [34] J. Canny, “A Computational Approach to Edge Detection,” *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. PAMI-8, no. 6, pp. 679-698, Nov. 1986.

- [35] W. Margolin, “FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles,” *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, vol. 6, pp.862-871, Nov. 2005.
- [36] R. O. Duda, P. E. Hart, D. G. Stork, “Pattern Classification”, 2<sup>nd</sup> ed., J. Wiley Ed., New York: John Wiley & Sons, 2001.
- [37] G. J. McLachlan and D. Peel, “Finite Mixture Models,” 1<sup>st</sup> ed., J. Wiley Ed., New York: John Wiley & Sons, 2000.
- [38] G. J. McLachlan, T. Krishnan, “The EM Algorithm and Extensions,” 2<sup>nd</sup> ed., J. Wiley Ed., New York: John Wiley & Sons, 2008.
- [39] S. Theodoridis and K. Koutroumbas, “Pattern Recognition,” 4<sup>th</sup> ed., Elsevier, USA, 2008.
- [40] F. Meyer, “Topographic distance and watershed lines,” *Signal Processing*, vol. 38, no.1, pp. 113-125, Jul. 1994.
- [41] P. Tsakanikas, and E. S. Manolakos, “Protein spot detection and quantification in 2-DE gel images using machine-learning methods,” *Proteomics*, vol. 11, no. 10, pp. 2038-2050, Apr. 2011.
- [42] M. Figueiredo, A. K. Jain, “Unsupervised learning of finite mixture models,” *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. 24, no. 3, pp. 381-396, Mar. 2002.
- [43] K. P. Koutsoumanis and A. Lianou, “Stochasticity in colonial growth dynamics of individual bacterial cells,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 7, pp. 2294-2301, Apr. 2013.
- [44] K. Wang, L. Kang, A. Anand, G. Lazarovits, and K. S. Mysore, “Monitoring in plant a bacterial infection at both cellular and whole-plant levels using the green fluorescent protein variant GFPuv,” *New Phytol.*, vol. 174, no. 1, pp. 212-23, 2007.
- [45] J. Baranyi and T. A. Roberts, “A dynamic approach to predicting bacterial growth in food,” *Int. J. Food Microbiol*, vol. 23, no. 3-4, pp. 277-294, Nov. 1994.
- [46] J. Lu, D. A. Carter, L. Turnbull, D. Rosendale, D. Hedderley, et al., “The Effect of New Zealand Kanuka, Manuka and Clover Honeys on Bacterial Growth Dynamics and Cellular Morphology Varies According to the Species,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 2, Feb. 2013.
- [47] C.N. Takacs, J. Hocking, M.T. Cabeen, N.K. Bui, S. Poggio, et al., “Growth Medium-Dependent Glycine Incorporation into the Peptidoglycan of *Caulobacter crescentus*,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 2, Feb. 2013.
- [48] J.B. Fiche, D.I. Cattoni, N. Diekmann, J.M. Langerak, C. Clerte, et al., “Recruitment, Assembly, and Molecular Architecture of the SpoIIIE DNA Pump Revealed by Superresolution Microscopy,” *PLoS Biol.*, vol. 11, no. 5, May 2013.
- [49] D. Patzelt, H.Wang, I.Buchholz, M. Rohde, L. Gröbe, S. Pradella, A. Neumann, S. Schulz, S. Heyber, K. Münch, R. Münch, D. Jahn, I. Wagner-Döbler, and J. Tomasch, “You are what you talk: quorum sensing induces individual morphologies and cell division modes in *Dinoroseobactershibae*,” *The ISME Journal*, Jul. 2013.
- [50] M. LeRoux, J. A. De Leon, N. J. Kuwada, A. B. Russell, D. Pinto-Santini, R. D. Hood, D. M. Agnello, S. M. Robertson, P. A. Wiggins, and J. D. Mougous, “Quantitative single-cell characterization of bacterial interactions reveals type VI secretion is a double-edged sword,” *PNAS*, vol. 109, no. 48, pp. 19804-19809, Nov. 2012.
- [51] J. Lloyd-Price, A. Häkkinen, M. Kandhavelu, I. J. Marques, S. Chowdhury, E. Lihavainen, O. Yli-Harja, and A. S. Ribeiro, “Asymmetric disposal of individual protein aggregates in *Escherichia coli*, one aggregate at a time,” *J. Bacteriol.*, vol. 194, no.7, pp. 1747-1752, Apr. 2012.

- [52] M. Kandhavelu, H. Mannerström, A. Gupta, A. Häkkinen, J. Lloyd-Price, O. Yli-Harja, and A. S. Ribeiro, “In vivo kinetics of transcription initiation of the *lar* promoter in *Escherichia coli*. Evidence for a sequential mechanism with two rate-limiting steps,” *BMC Syst. Biol.*, vol. 5, no. 149, Sep. 2011.

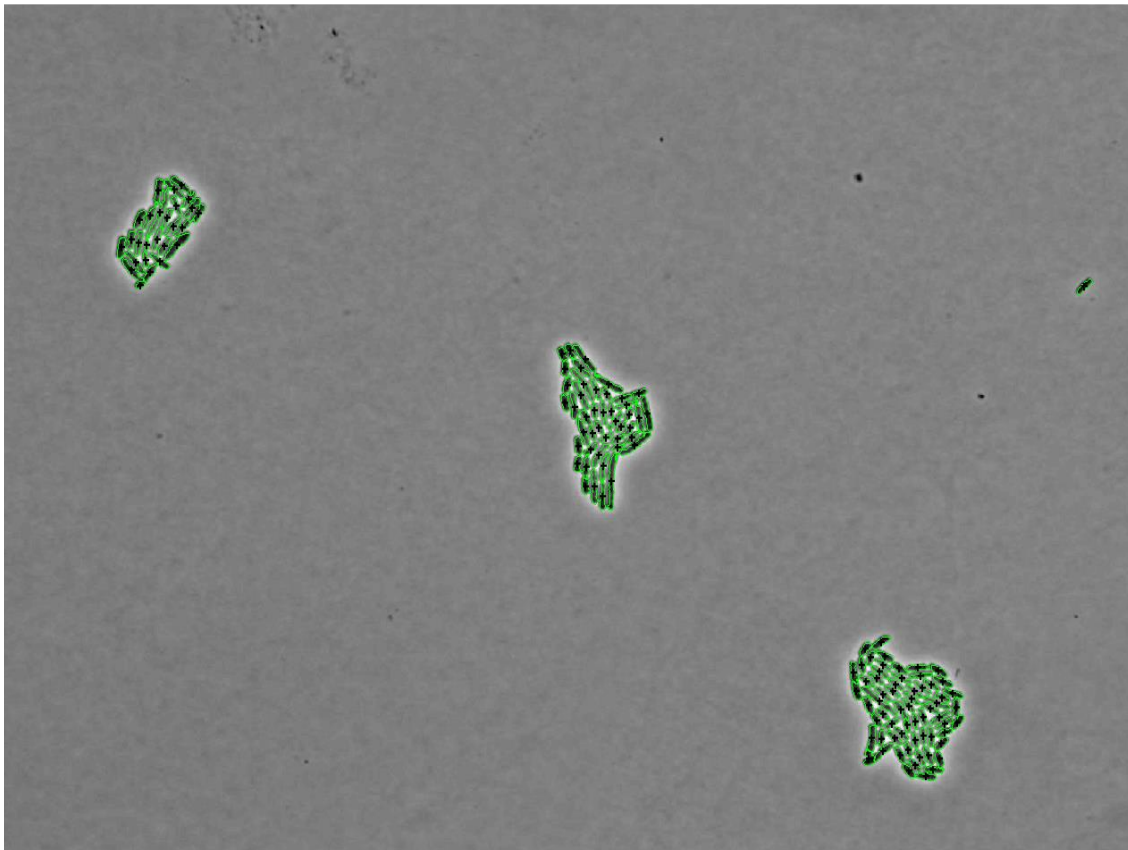


## Παράρτημα

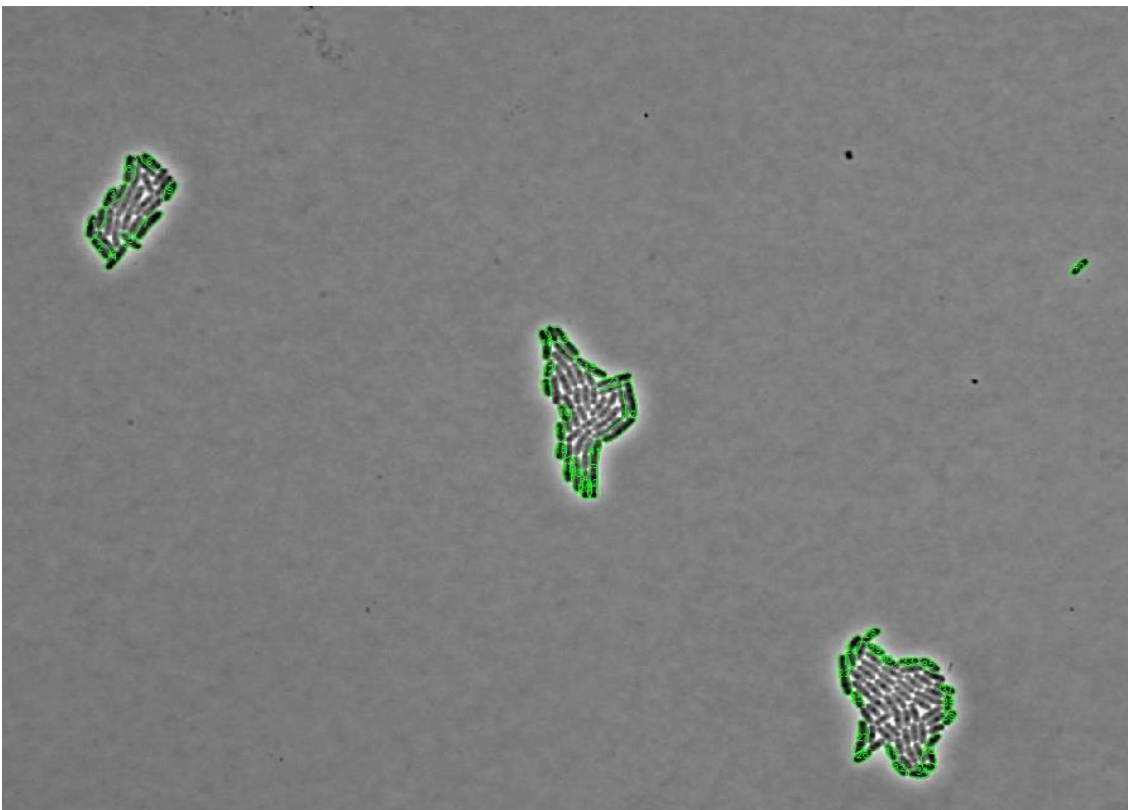
Εδώ, παρουσιάζουμε τα αποτελέσματα της κατάτμησης (τα εντοπισμένα κύτταρα περιγράφονται από πράσινες καμπύλες) της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε και του MicrobeTracker [25]. Δε θα παρουσιάσαμε τα αποτελέσματα κατάτμησης του CellTracer [23] και του TLM Tracker [24], δεδομένου ότι δεν μπορούν να δώσουν αποτελέσματα για όλες τις υπό εξέταση εικόνες. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε το MicrobeTracker δίνει εξαιρετικά ανακριβή αποτελέσματα στο στιγμιότυπο της κυτταρικής ταινίας salPhase. Θα μπορούσε κανείς να ισχυριστεί ότι το παράδειγμα αυτό δεν είναι δίκαιο δεδομένου ότι αυτή η εικόνα προέρχεται από την ταινία που χρησιμοποιήσαμε για τη αξιολόγηση του αλγορίθμου μας σε σχέση με το GT. Ωστόσο, αυτός ο ισχυρισμός μπορεί να απορριφθεί παρατηρώντας τα υπόλοιπα αποτελέσματα κατάτμησης.

Η προτεινόμενη μέθοδος είναι ισχυρή για τους διαφορετικούς τύπους απεικόνισης (από οπτικό ή συνεστιακό μικροσκόπιο και μικροσκοπία αντίθεσης φάσης ή φωτεινού πεδίου ή DIC) και για εικόνες που αποκτήθηκαν από διαφορετικά εργαστήρια. Επιπλέον, αν κάποιος ελέγχει διεξοδικά τις εικόνες με τα αποτελέσματα κατάτμησης, μπορεί να παρατηρήσει ότι τα περιγράμματα των κυττάρων είναι πολύ ακριβή, οδηγώντας σε μια πιο αποτελεσματική και ισχυρή εκτίμησης κυτταρικών χαρακτηριστικών και μέτρηση ποσότητας φθορίζουσας πρωτεΐνης (αν υπάρχει φθορίζουσα πρωτεΐνη στο κύτταρο).

### 1) Στιγμιότυπο εικόνας από την κυτταρική ταινία salPhase

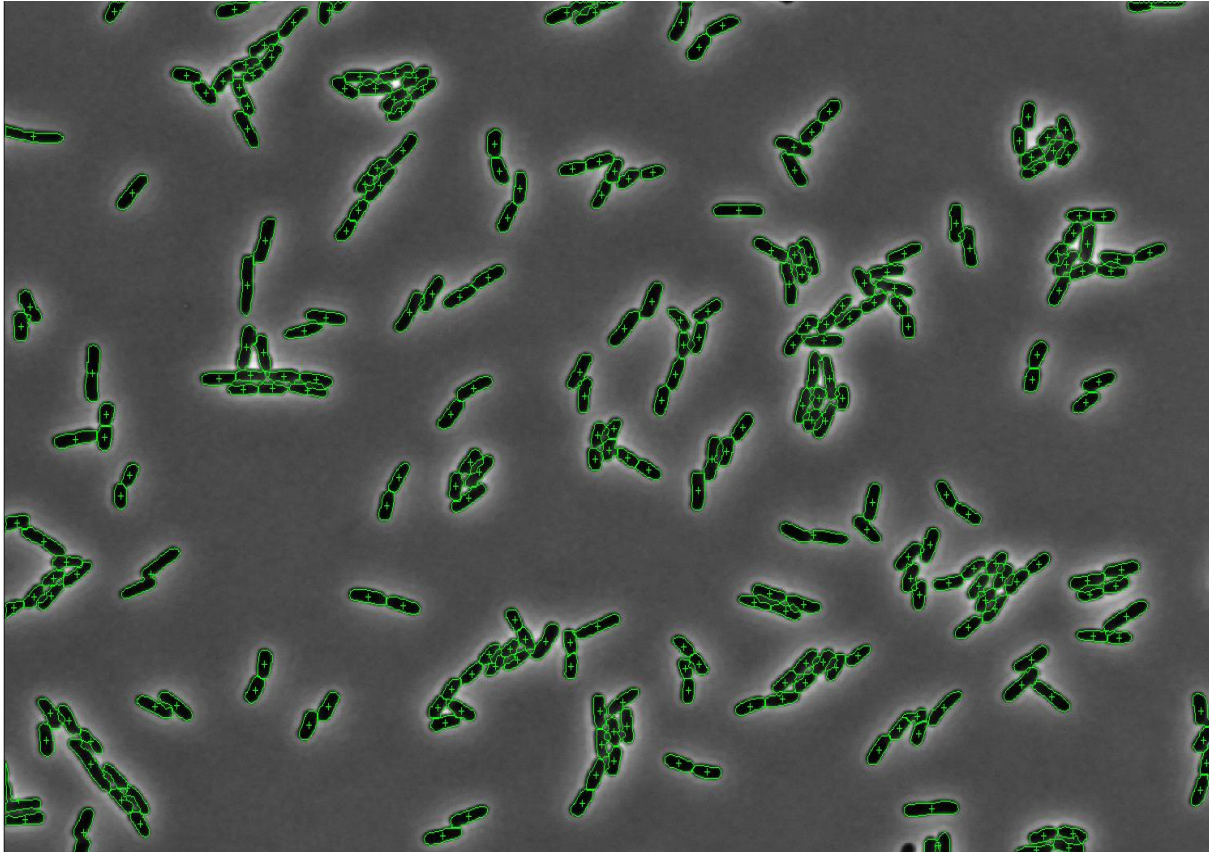


Σχήμα 29: Αποτελέσματα κατάτμησης από την προτεινόμενη μεθοδολογία.

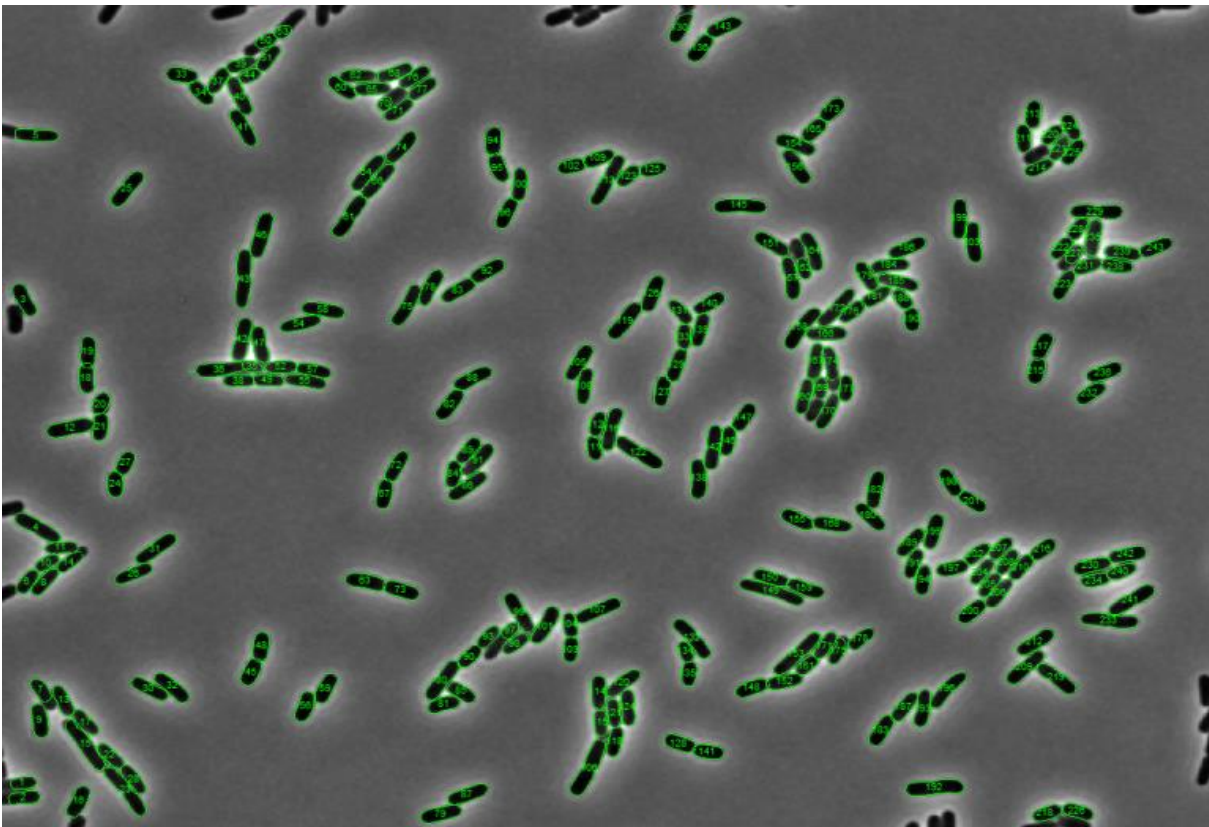


Σχήμα 30: Αποτελέσματα κατάτμησης από το MicrobeTracker.

2) Στιγμιότυπο εικόνας του MicrobeTracker

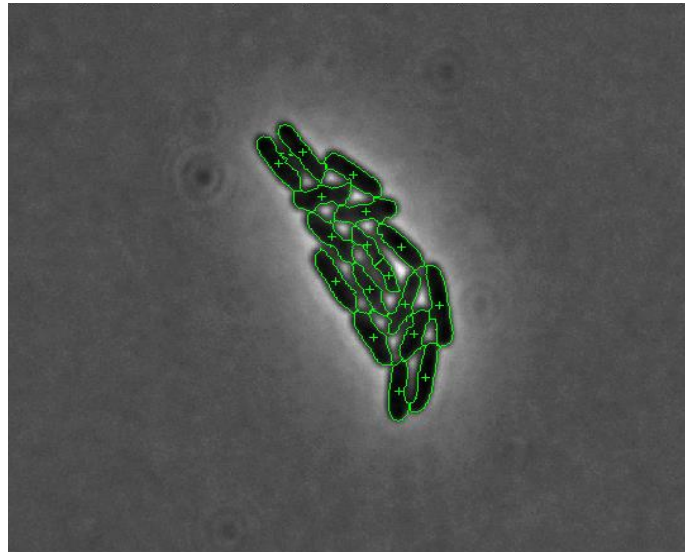


Σχήμα 31: Αποτελέσματα κατάτμησης από την προτεινόμενη μεθοδολογία.

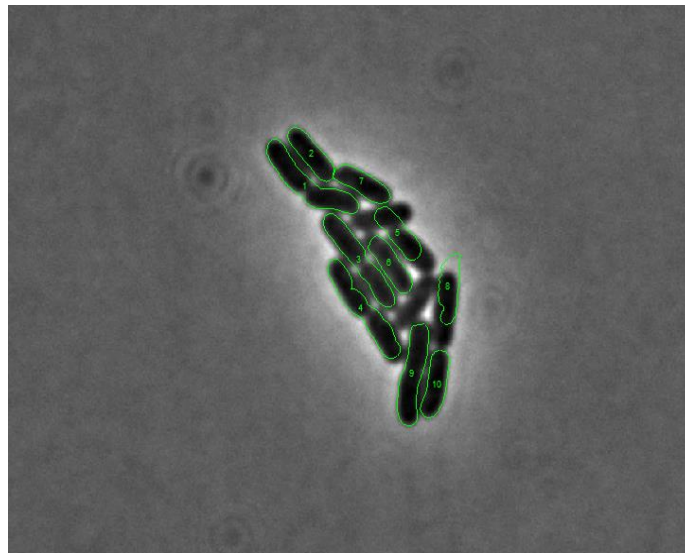


Σχήμα 32: Αποτελέσματα κατάτμησης από το MicrobeTracker.

### 3) Στιγμιότυπο εικόνας του CellTracer

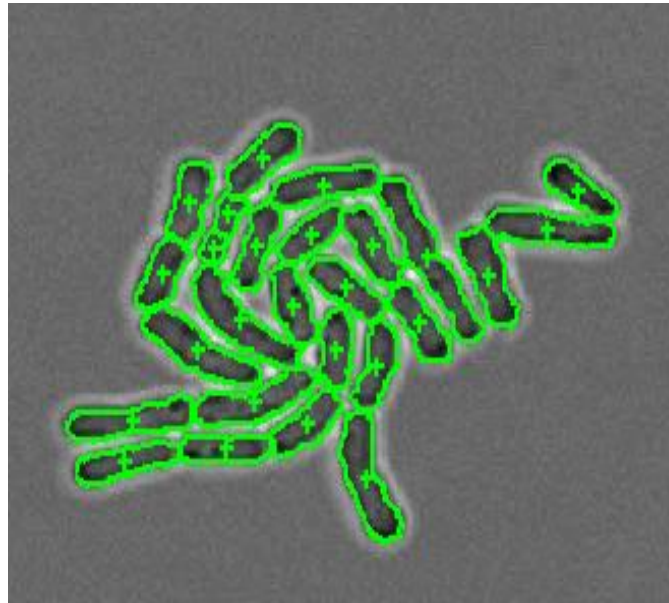


Σχήμα 33: Αποτελέσματα κατάτμησης από την προτεινόμενη μεθοδολογία.

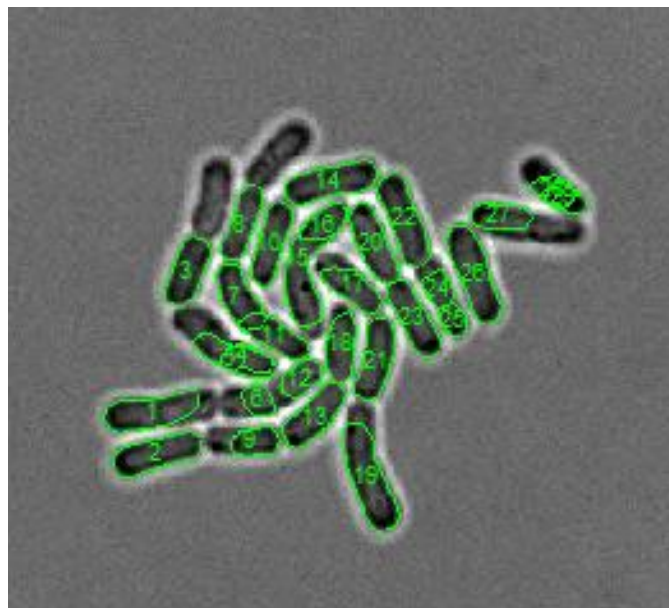


Σχήμα 34: Αποτελέσματα κατάτμησης από το MicrobeTracker.

#### 4) Στιγμιότυπο εικόνας του TLM Tracker



Σχήμα 35: Αποτελέσματα κατάτμησης από την προτεινόμενη μεθοδολογία.



Σχήμα 36: Αποτελέσματα κατάτμησης από το MicrobeTracker.