

Ilya Balmages

LĀZERA ĪPAŠĪBĀS BALSTĪTA ATTĒLU APSTRĀDES SISTĒMA LIELA LAUKUMA SUBMIKRONU AKTIVITĀTES ANALĪZEI

Promocijas darba kopsavilkums



RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Datorzinātnes, informācijas tehnoloģijas un enerģētikas fakultāte
Lietišķo datorsistēmu institūts

Ilya Balmages

Studiju programmas “Datorsistēmas” doktorants

LĀZERA ĪPAŠĪBĀS BALSTĪTA ATTĒLU APSTRĀDES SISTĒMA LIELA LAUKUMA SUBMIKRONU AKTIVITĀTES ANALĪZEI

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskais vadītājs
asociētais profesors *Dr. sc. ing.*
DMITRIJS BLIZŅUKS

RTU Izdevniecība
Rīga 2025

Balmages, I. Lāzera īpašībās balstīta attēlu apstrādes sistēma liela laukuma submikronu aktivitātes analīzei. Promocijas darba kopsavilkums. – Rīga: RTU Izdevniecība, 2025. – 63 lpp.

Publicēts saskaņā ar promocijas padomes “P-07” 2025. gada 9. maija lēmumu Nr. 04030-9.7/3.

Vāka attēls – *www.shutterstock.com*.

<https://doi.org/10.7250/9789934371974>
ISBN 978-9934-37-197-4 (pdf)

PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2025. gada 22. septembrī plkst. 14.30 Rīgas Tehniskās universitātes Datorzinātnes, informācijas tehnoloģijas un enerģētikas fakultātē, Zunda krastmalā 10, 104. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Profesors *Dr. sc. ing.* Agris Nikitenko,
Rīgas Tehniskā universitāte

Ph. D. Viktor Dremín,
College of Engineering and Physical Sciences, Aston University, UK

Ph. D. Mihails Birjukovs,
Latvijas Universitāte, Latvija

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājis šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Ilya Balmages..... (paraksts)

Datums:

Promocijas darbs ir uzrakstīts angļu valodā. Tajā ir ievads, sešas nodaļas, secinājumi, 65 attēli, trīs tabulas, kopā 121 lappuse. Literatūras sarakstā ir 150 nosaukumi.

Anotācija

Jaunu tehnoloģiju un datu apstrādes algoritmu attīstība piesaista arvien lielāku uzmanību ļoti zemas frekvences signālu apstrādes jomā. Vispazīstamākie lietojumi ir paredzēti “globāla mēroga” procesu novērošanai, piemēram, vulkānu izvirdumu, ar kalniem saistītu viļņu, zemestrīču un minerālu izpētes novērošanai, un tiem ir nepieciešams sarežģīts aprīkojums. Tomēr ir arī citas nozares, kurās jāapstrādā ļoti zemas frekvences signāli. Viena no tām ir mikroorganismu augšanas un inhibīcijas izmaiņu uzraudzība. Šim nolūkam tiek piedāvāta optiskā bezkontakta tehnoloģija (lāzera speklu paraugu analīze). Tehnoloģiskā priekšrocība ir kompaktā aprīkojuma nelielais izmērs un granulveida struktūra, kas ir jutīga pret izmaiņām.

Jutīgais korelācijas apakšpikseļu algoritms ļauj pārveidot speklu attēlu sekvenci par laika signālu masīvu un spēj izcelt slēptos efektus. Svarīga šīs pieejas priekšrocība ir tā, ka iegūto signālu masīvam var piemērot jebkādos turpmākos signālu apstrādes algoritmus, piemēram, filtrēšanu, darbības laika, frekvences vai laika-frekvences apgabālā, kā arī izmantot telpiskās signālu apstrādes algoritmus, analizējot uzvedību un izmaiņas laika-telpas apgabālā.

Mākslīgo neironu tīklu izmantošana ar papildu pēcapstrādi, kas balstīta signālu īpašību izpratnē, ir devusi augstus sasniegumus augošu (aktīvu) un neaktīvu zonu klasifikācijā.

Pētījumu rezultāti tika izmantoti ERAF un LZP projektos.

SATURS

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS	7
Ievads	7
Promocijas darba aktualitāte.....	9
Promocijas darba uzdevumi un hipotēzes	10
Pētniecības metodes	10
Promocijas darba zinātniskā novitāte.....	11
Promocijas darba praktiskā nozīme	11
Zinātniskā aprobācija	12
Promocijas darba struktūra un saturs	14
1. LITERATŪRAS PĀRSKATS PAR BEZKONTAKTA OPTISKO MĒRĪJUMU METODĒM, KAS BALSTĪTAS LĀZERA SPEKLU METODĒ	16
1.1. Īss pārskats par spekla fenomena atklāšanu un izpēti.....	16
1.2. Speklu paraugu matemātika un simulācijas	16
1.3. Speklu izmēri.....	19
1.4. Spektrālais kontrasta parametrs.....	19
1.5. Dekorelācijas laika analīze.....	19
1.6. Nodaļas secinājumi.....	20
2. PĀRSKATS PAR LĀZERA SPEKLU ATTĒLU KORELĀCIJAS ANALĪZES ATTĪSTĪBU UN TĀS IZMANTOŠANAS PAMATOJUMU SUBMIKRONU AKTIVITĀTES NOVĒRTĒŠANAI	21
2.1. Nodaļas ievads.....	21
2.2. Speklu pārvietojuma mērījumi	21
2.3. Signāla rekonstrukcija, izmantojot nulles vidējo normalizēto krustenisko korelāciju starp attēliem	22
2.4. Mikroorganismu aktivitātes lāzera speklu attēlu secība, kas pārveidota laika signālos	22
2.5. Mērījumu precizitāte un algoritma ieviešanas laiks	23
2.6. Nodaļas secinājumi.....	25
3. LĀZERA SPEKLU ATTĒLU KORELĀCIJAS SUBPIKSEĻU ANALĪZE, LAI UZRAUDZĪTU MIKROORGANISMU KOLONIJAS AUGŠANAS DINAMIKU UN ATKLĀTU AKTIVITĀTES ZONU MIGRĀCIJU KOLONIJAS IEKŠIENĒ.....	27
3.1. Lāzera speklu attēlveidošanas sistēma.....	27
3.2. Baktēriju koloniju agrīnas atklāšanas un augšanas dinamikas uzraudzības uzdevums	27
3.3. Uzdevumi saistībā ar mikrobu aktivitātes atšķirību vizualizāciju laika gaitā dažādās kolonijas daļās	28
3.4. Secīgo speklu attēlu kadru pārveidošana laika signālā.....	28

3.5. Darbība trokšņainā vidē	30
3.6. Mikrobu kolonijas veidojošo vienību agrīna noteikšana	31
3.7. Korelācijas apakšpiķseļu analīze, lai noteiktu telpiski temporālos aktivitātes paraugus kolonijas augšanas laikā.....	33
3.8. Nodaļas secinājumi.....	35
4. LĀZERA SPEKLU ATTĒLVEIDOŠANAS IZMANTOŠANA ANTIBAKTERIĀLĀS JUTĪBAS AGRĪNAI NOTEIKŠANAI DISKU DIFŪZIJAS TESTOS.....	37
4.1. Nodaļas ievads.....	37
4.2. Rezultātu salīdzinājums, kas iegūti, izmantojot lāzera speklu metodi bez algoritma un ar to	37
4.3. Agrīna inhibīcijas zonas veidošanās noteikšana	38
4.4. Inhibīcijas zonas izmaiņu telpiski temporālā analīze	39
4.5. Inhibīcijas zonas izmēra izmaiņu matemātiskais modelis	40
4.6. Nodaļas secinājumi.....	41
5. MĀKSLĪGĀ NEIRONU TĪKLA IZMANTOŠANA, LAI ANALIZĒTU SPEKLU DATUS AUGOŠU UN NEAUGOŠU BAKTĒRIJU KOLONIJU UN ZONU KLASIFICĒŠANAI.....	43
5.1. Nodaļas ievads.....	43
5.2. Rīki augošu/neaugošu baktēriju koloniju klasificēšanai.....	43
5.3. Inhibīcijas un aktīvo baktēriju augšanas zonu ap antibiotikas diskiem klasificēšana, izmantojot neironu tīklu	46
5.4. Nodaļas secinājumi.....	51
6. PIEDĀVĀTĀS METODES SALĪDZINĀJUMS AR CITĀM METODEM, KAS BALSTĀS LĀZERA SPEKLU PAŅĒMIENĀ	52
6.1. Literatūrā piedāvātie mikroorganismu uzvedības analīzes algoritmi	52
6.2. Algoritmu salīdzinājums	53
6.3. Nodaļas secinājumi.....	56
REZULTĀTI UN SECINĀJUMI	58
LITERATŪRAS SARAKSTS	60

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Ievads

Ļoti zemas frekvences signāli. Ļoti zemas frekvences signāli (mHz (milliHertz)) ir analizēti un apstrādāti ar vairākām dažādām tehnoloģijām.

Visbiežāk sastopamās tehnoloģijas

1) Infraskaņa. Infraskaņas viļņi ir zemaskaņas akustiskie viļņi, kas parasti ir $0,01 < f < 10$ Hz frekvenču diapazonā un var rasties daudzu dabisku parādību un cilvēka izraisītu darbību rezultātā. Zināms piemērs ir starptautiskais infraskaņas monitoringa tīkls, kas spēj atklāt un pārbaudīt kodolspīdzenus. Infraskaņas viļņus var radīt arī ar kalniem saistīti viļņi, vulkāni, mikrobaromi, gravitācijas viļņi utt. Infraskaņa spēj sasniegt lielus attālumus – 100–500 km.

Zemas frekvences infraskaņu (vienas svārstības dažu sekunžu laikā) nevar fiziski ierakstīt ar mikrofoniem. Kopumā infraskaņas sensoru stacijas ietver sensoru masīvu, kas mēra spiediena svārstības gaisā un sastāv no daudziem lieliem komponentiem.

2) Gravitācijas gradiometrija – Zemes gravitācijas lauka svārstību vai anomāliju izpētes joma, izmantojot gravitācijas paātrinājuma telpiskā gradienta mērījumus. Izprotot zemūdens anomālijas, var precīzāk noteikt naftas, gāzes un minerālu atradnes. Liela interese ir par pēdējās desmitgades sasniegumiem gaisa gravitācijas gradiometru jomā, kas paredzēti gravitācijas lauka mērījumiem ar uzlabotu signāla un trokšņa attiecību un izšķirtspēju joslas platumā no 0,001 Hz līdz 1 Hz.

3) Seismiskā tomogrāfija jeb seismoloģija. Seismisko viļņu frekvence diapazonā no Hz daļām (mHz) līdz dažiem simtiem Hz. Zemes normālie režīmi jeb brīvās svārstības ir ļoti ilga perioda (ļoti zemas frekvences – mHz) stāvoši virsmas viļņi.

4) Magnetotellurika – elektromagnētiskā ģeofizikālā metode, ar kuras palīdzību var noteikt Zemes dziļu elektrovadītspēju. Zemes elektriskais un magnētiskais lauks tiek mērīts frekvenču diapazonā no 0,1 mHz līdz 10 kHz. Augstāko frekvenču diapazons sniedz informāciju par seklām Zemes virsmām, savukārt dziļāku informāciju sniedz zemo frekvenču diapazons.

Ļoti zemas frekvences signāli telpiskās mikroaktivitātes analīzei. Visām iepriekš aprakstītajām metodēm ir nepieciešamas sarežģītas iekārtas, un tajās tiek novēroti “globāla mēroga” procesi. Tomēr ir arī citas nozares, kurās jāapstrādā ļoti zemas frekvences signāli. Piemēram, mikroorganismu augšanas un inhibīcijas izmaiņu uzraudzība. Mikroorganismu augšana telpā izskatās pēc vienvirziena progresējoša procesa. Tomēr mikroorganismi rada daudz dažādu daudzvirzienu nejaušu kustību uz aizņemtās virsmas. Aplūkojot šos procesus laika apgabalā, tiek novērotas svārstības, kas raksturo mainīgos procesus, kas noris laika gaitā. Attiecīgi laika-frekvenču apgabalā var novērot frekvences, kas atbilst šīm svārstībām (kas atrodas ļoti zemo frekvenču apgabalā). Spektrogrammu analīze sniedz papildu ieskatu, jo ļauj vienlaikus novērot izmaiņas laikā un frekvencē. Tādējādi arī mikroorganismu darbības radītie īslaicīgi signāli ir ļoti zemas frekvences signāli. Promocijas darbā ir ierosināta optiska bezkontakta tehnoloģija (lāzera speklu paraugu analīze), tostarp signālu apstrādes algoritmi šādu parādību uzraudzībai.

Tehnoloģiskā priekšrocība ir kompakta aprīkojuma nelielais izmērs, granulārā struktūra, kas ir jutīga pret izmaiņām, un attēlu un signālu apstrādes metožu kopums, lai iegūtu noderīgu informāciju. Literatūrā ir demonstrēta lāzera speklu paraugu analīzes izmantošana akustisko un seismisko signālu mērīšanai (augstāko frekvenču apgabalā). Līdz ar to šo metodi potenciāli var

izmantot akustikā, seismikā un citos lietojumos, kur nepieciešama ļoti zemas frekvences signālu apstrāde.

Lāzera speķlu paraugu metode. Pirmā lāzera darbība 1960. gadā parādīja, ka objekti, kas tiek apskatīti lāzera gaismā, iegūst haotisku granulāru struktūru ar neregulāru rakstu, kam nav acīmredzamas saistības ar izgaismotā objekta makroskopiskajām īpašībām. Iemesls ir tāds, ka vairums materiālu virsmas ir ārkārtīgi raupjas optiskā viļņa garuma mērogā. Kad no šādas virsmas tiek atstarota monohromatiska gaisma, optiskais vilnis, kas rodas jebkurā attālā punktā, sastāv no daudzām koherentām komponentēm, no kurām katra rodas no atšķirīga virsmas mikroskopiskā elementa, un to interferences rezultātā veidojas intensitātes granulārs raksts, ko sauc par lāzera speķlu.

Ir vērts atzīmēt svarīgu faktu, ka speķls var rasties ne tikai no izplatīšanās brīvajā telpā, bet arī attēlveidošanas sistēmā.

Sākotnēji lāzera speķlu efekts tika uzskatīts par galveno trūkumu, izmantojot koherentus gaismas avotus. Tomēr vēlāk tika konstatēts, ka speķls var sniegt arī noderīgu informāciju. Patlaban lāzera speķlu metodes tiek izmantotas dažādos optiskās metroloģijas lietojumos, tostarp pārvietojuma, deformāciju un sprieguma mērījumos, virsmas raupjuma novērtēšanā, ātruma mērījumos utt. Daudzi no šiem lietojumiem tiek izmantoti biomedicīnas jomā, jo īpaši mikrobioloģijā, lai novērotu mikroorganismu attīstību.

Submikronu darbības analīze. Saskaņā ar pieejamo literatūru neviena no lāzera speķlu metodēm nav izmantota: 1) mikrobu augšanas (koloniju veidojošo vienību (*CFU*) veidošanās) uzraudzība agrīnā posmā; 2) mikrobu aktivitātes atšķirību noteikšanai un uzraudzībai dažādās kolonijas daļās; 3) augošu (aktīvu)/neaugošu (neaktīvu) baktēriju koloniju vai zonu klasifikācijai; 4) mikroorganismu aktivitātes dinamikas un izmaiņu noteikšanai inhibīcijas zonā (ap antibiotikas disku).

Šo parādību novērošanai papildus lāzera speķlu metodei tiek plaši izmantoti datu apstrādes algoritmi. Tika salīdzināti pazīstamākie algoritmi speķlu paraugu apstrādei, pamatojoties uz kuriem tika konstatētas korelācijas analīzes priekšrocības. Tika analizēta korelācijas analīzes algoritmu piemērošana un izstrāde, un, pamatojoties uz datu īpašībām, tika ierosināta pieeja, ņemot vērā laika un frekvences raksturlielumus. Ierosinātais jutīgo korelācijas apakšpiķeļu algoritms ļauj pārveidot speķlu attēlu sekvenci par laika signālu masīvu. Svarīga šīs pieejas priekšrocība ir tā, ka iegūto signālu masīvam var piemērot jebkādas turpmākos signālu apstrādes algoritmus, piemēram, filtrēšanu, darbības laika, frekvences vai laika-frekvences apgabalā, kā arī izmantot telpiskās signālu apstrādes algoritmus, analizējot uzvedību un izmaiņas laika-telpas apgabalā.

Mākslīgo neironu tīklu izmantošana ar papildu pēcapstrādi, kas balstīta signālu īpašību izpratnē, ir devusi augstus sasniegumus augošu (aktīvu) un neaktīvu zonu klasifikācijā.

Promocijas darbā algoritmu izstrādē un datu analīzē tiek izmantotas gan matemātiskās simulācijas, gan reāli eksperimenti.

Pētījuma **mērķis** ir izstrādāt jaunu pieeju submikronu aktivitātes un submikronu objektu augšanas bezkontakta noteikšanai un novērtēšanai lielā apgabalā, kā arī spēju klasificēt un novērtēt konkrētus submikronu objektus un notikumus.

Lai sasniegtu mērķi, tika pētītas šādas tēmas:

- 1) lāzera speķlu attēlu korelācijas analīzes izstrāde un pielāgošana submikronu aktivitātes novērtēšanai;

- 2) ierosinātās korelācijas apakšpiķseļu metodes salīdzinājums ar citām metodēm, kas balstītas lāzera speklu metožu izmantošanā;
- 3) mikroorganismu kolonijas augšanas dinamikas monitoringa rīku izstrāde, atklājot aktivitātes zonu migrāciju kolonijā un salīdzinot ar modeļiem;
- 4) antibakteriālās jutības agrīnas noteikšanas iespēju izstrāde un demonstrēšana disku difūzijas testos, izmantojot ierosināto korelācijas apakšpiķseļu metodi, un salīdzinājums ar modeļiem;
- 5) aktīvu (augošu) un neaugošu koloniju vai zonu klasifikācija.

Ierosinātā metode parādīja spēju darboties trokšņainā vidē un atklāt slēptos efektus (ko neatklāja citas literatūrā aprakstītās pieejas). Mākslīgo neironu tīklu piemērošana signāliem, kas iegūti ar ierosināto algoritmu no attēlu sekvences ar papildu pēcapstrādi, ir devusi augstus sasniegumus augošu (aktīvu) un neaktīvu zonu klasifikācijā, ko nevarēja panākt, izmantojot neapstrādātus speklu datus.

Promocijas darba aktualitāte

Submikronu aktivitātes novērošana ar parastām ierīcēm, piemēram, mikroskopiem, nevar vienlaikus aptvert lielu novērošanas laukumu un pārbaudīt to ar augstu izšķirtspēju. Tomēr tas var būt svarīgs daudzos lietojumos, piemēram, analizējot baktēriju vai sēnīšu aktivitāti Petri trauciņā. Tāpēc ir nepieciešams skenēt visu teritoriju, pirms tam sadalot to nelielās daļās. Gadījumos, kad teritorija ir relatīvi liela un aktivitātes izmaiņas notiek ātri un tikai noteiktās vietās, t. i., pāreja no vienas lauka stadijas uz citu ilgst ilgāk par skenēšanas periodu, šīs izmaiņas var tikt nepamanītas. Šādā gadījumā kā alternatīvu var piedāvāt kameras ar atbilstošu redzamības lauku. To var izmantot liela lauka pārklājumam, taču tām ir ierobežota optiskā izšķirtspēja, kas nenodrošina submikronu izšķirtspēju platībām, kas pārsniedz kvadrātcentimetru.

Tādēļ ir jāizmanto citas pieejas. Pēdējā laikā arvien biežāk rodas nepieciešamība veikt meklēto objektu vai notikumu analīzi, datu apstrādi, atrašanu un klasifikāciju bezkontakta veidā, ātri, augstā izšķirtspējā un kvalitātē. Tas ir īpaši svarīgi, ja tieša piekļuve objektiem ir apgrūtināta; objekti ir mazi, nemanāmi (piemēram, submikronu aktivitāte) un atrodas nezināmās vietās.

Ierosinātā bezkontakta optiskā metode ir balstīta lāzera speklu apstrādes algoritmos ar augstu jutību, kas ļauj: 1) vienlaikus apskatīt nepieciešamo novērošanas laukumu bez skenēšanas; 2) tehnoloģija ir jutīga pret submikronu kustībām un izmaiņām, kas notiek novērošanas laukā. Metode ir balstīta lāzera speklu (specifiskas granulāras struktūras) spējā mainīt katra spekla (granulas) intensitāti, kad notiek fiziskas kustības līdz pusei no lāzera viļņa garuma (piemēram, 0,4 mikrometri). No otras puses, spekla izmērs var būt daži desmiti mikronu, kas ļauj to uzņemt ar parastu kameru.

Izstrādātie un pielāgotie signālu apstrādes algoritmi dos lielāku ieguldījumu objektu aktivitātes analīzē, ja kustības ir minimālas (piemēram, baktēriju dalīšanās) vai ir jāizvērtē tikai konkrēta rakstura kustības.

Tādējādi, pat izmantojot zemas izšķirtspējas kameru, ir iespējams noteikt submikronu aktivitāti un veikt tās parametru un īpašību papildu analīzi ievērojami agrāk, nekā to ļauj esošās metodes.

Promocijas darba uzdevumi un hipotēzes

Tika definēti septiņi promocijas darba **uzdevumi**.

1. Veikt pārskatu par esošajām speķu paraugu apstrādes metodēm. Pierādīt, ka promocijas darbā ierosinātā metode ir efektīvāka.
2. Veikt korelācijas analīzes metožu izpēti attiecībā uz speķu paraugiem. Salīdzināt dažādus algoritmus, pārbaudīt to izpildes laiku un precizitāti. Izstrādāt priekšlikumus un pielāgot piemērošanai zemas frekvences signāliem, kas raksturo mikroorganismu aktivitāti.
3. Izpētīt, vai, izmantojot ierosināto metodi, ir iespējams veikt ātru un bezkontakta submikronu aktivitātes vai submikronu objektu augšanas noteikšanu un novērtēšanu.
4. Veikt submikronu objektu vai notikumu izplatīšanās ātruma mērīšanu telpā. Veikt salīdzinājumu ar matemātiskajiem modeļiem.
5. Izpētīt, vai, izmantojot ierosināto metodi, ir iespējams veikt noteiktu veidu submikronu objektu specifisku slēpto parādību un efektu noteikšanu. Veikt salīdzinājumu ar matemātiskajiem modeļiem.
6. Demonstrēt spēju klasificēt un novērtēt konkrētus submikronu objektus vai notikumus.
7. Publicēt secinājumus zinātniskajās publikācijās un iekļaut tos promocijas darbā.

Veicot pētījumus un izstrādājot lāzera speķu attēlu apstrādes algoritmus submikronu aktivitātes novērtēšanai, tika noteiktas promocijas darba **hipotēzes**.

1. Korelācijas apakšpiķeļu algoritms ir jutīgs pret nelielām izmaiņām, ko izraisa aktivitāte (jo īpaši mikroorganismu submikronu aktivitāte), un spēj to pamanīt/atklāt agrāk nekā citas plaši izmantotās metodes.
2. Korelācijas apakšpiķeļu algoritms konkrētam signālu veidam (mikroorganismu submikronu aktivitāte) ir jutīgāks un sniedz vairāk informācijas nekā citi plaši izmantotie algoritmi, ko izmanto lāzera speķu metodē, piemēram, kontrasta analīze, speķu izmēru analīze, dekorelācijas laika analīze.
3. Korelācijas apakšpiķeļu algoritms spēj novērot/atklāt darbību pat tad, ja tā nav tieši redzama. Piemēram, mikroorganismu koloniju veidošanos trokšņainā vidē (ja mikroorganismu kolonijas nosedz troksnis).
4. Korelācijas apakšpiķeļu algoritms ļauj "uzsvērt"/atšķirt aktivitātes raksturu datus, tādējādi sniedzot iespēju īstenot tajā balstītu klasifikāciju.

Pētniecības metodes

Promocijas darba mērķi ir sasniegti, veicot analītiskos un eksperimentālos pētījumus, kas publicēti šīs nodaļas turpinājumā minētajos zinātniskās pētniecības darbos. Promocijas darbā tiek izmantotas eksperimentālās, matemātiskās un statistiskās datu analīzes un mašīnmācīšanās pētniecības metodes. Lai pārskatītu zinātnisko literatūru un esošās un jaunās metodes, tika izmantotas kvalitatīvās un kvantitatīvās pētniecības metodes. Šajā pētījumā galvenais pētījuma objekts ir bezkontakta optiskās pieejas izstrāde, kas balstīta lāzera speķu apstrādes algoritmos

ar augstu jutību submikronu aktivitātes novērošanai. Tika pētītas arī metodes tās ieviešanai, lai uzlabotu veiktspēju un funkcionalitātes rezultātus.

Promocijas darba zinātniskā novitāte

Promocijas darba **zinātniskā novitāte** balstās sistēmas, metožu un algoritmu izstrādē un priekšlikumos, kas ir vērsti uz praktisku uzdevumu risināšanu saistībā ar ātru un efektīvu submikronu aktivitātes noteikšanu un spēj nodrošināt:

- 1) ātru un bezkontakta submikronu aktivitātes vai submikronu objektu augšanas novērtēšanu;
- 2) spēju klasificēt un novērtēt konkrētus submikronu objektus vai notikumus;
- 3) submikronu objektu vai notikumu izplatīšanās ātruma mērījumu telpā;
- 4) noteiktu submikronu objektu veidu specifisku parādību un ietekmes noteikšanu.

Promocijas darba praktiskā nozīme

Praktiskā nozīme ir aplūkoto metožu programmatūras ieviešanai, eksperimentālai validācijai un novērtēšanai. Pilns praktisko sasniegumu saraksts ir sniegts tālāk tekstā.

1. Veikts literatūrā aprakstīto metožu pārskats un salīdzinājums, kā arī pierādītas ierosinātās metodes priekšrocības.

2. Iegūti rezultāti, ko nevarēja novērot, izmantojot parasto mikroskopu vai citas neinvazīvas tehnoloģijas, piemēram, mikroorganismu koloniju aktivitātes pārvietošanās no centra uz malām; klasifikācija – aktīva vai neaktīva kolonija; agrīna inhibīcijas zonas veidošanās noteikšana, pilnībā ar troksni pārklātu mikroorganismu koloniju noteikšana utt.

3. Ierosinātā metode praksē ļauj agrāk atklāt submikronu objektus vai notikumus (ievērojami ātrāk nekā parastās metodes).

4. Iespējamais ierosinātās metodes lietojums praksē var būt vērsts uz vairākiem ieguvumiem.

4.1. Liels potenciāls rentablu risinājumu izstrādei, lai ātri novērtētu baktēriju aktivitāti cietā vidē.

4.2. Reāllaika izsekošanas potenciāls varētu revolucionizēt bakteriofāgu un baktēriju mijiedarbības izpēti, nodrošinot empīriskus datus, kas varētu papildināt pašreizējos eksperimentālos datus un uzlabot matemātiskos modeļus.

4.3. Ātrāki antimikrobiālās jutības rezultāti un līdz ar to, ja nepieciešams, ātrāka empīriskās antimikrobiālās terapijas aizstāšana ar patogēnu mērķterapiju, kam ir lielāks potenciāls samazināt ārstēšanas ilgumu un izmaksas, kā arī samazināt mirstību.

5. Šo pieeju, ņemot vērā parametru pielāgošanu, var izmantot dažādos uzdevumos ar līdzīgām iezīmēm, piemēram, 1) krāsas žūšanas procesa novērošana; 2) mikrovibrāciju novērošana; 3) mikroplaisu noteikšana transportlīdzekļa vai lidaparāta korpusā un dažādu mehānisku bojājumu identificēšana; 4) neinvazīva ādas slimību diagnostika; 5) asins plūsmas dinamikas novērtēšana; 6) objektu, kas pārklāti ar plānu kāda materiāla kārtiņu, kas traucē tiešam skatam, noteikšana un daudzi citi lietojumi, no kuriem dažos vēl netiek izmantota speķu metode, bet dažos jau tā tiek izmantota, bet ar citiem (mazāk jutīgiem) algoritmiem.

6. Programmatūras īstenošana veikta programmēšanas platformā *Matlab*.

Zinātniskā aprobācija

Pētījuma rezultāti tika prezentēti astoņās starptautiskās konferencēs.

1. SPIE Conference 13196, Artificial Intelligence and Image and Signal Processing for Remote Sensing XXX, Edinburga, Lielbritānija, 2024. gada 16.–19. septembris.
2. SPIE Conference 13006, Biomedical Spectroscopy, Microscopy, and Imaging III, Strasbūra, Francija, 2024. gada 7.–11. aprīlis.
3. SPIE Conference 12628, Diffuse Optical Spectroscopy and Imaging IX, Minhene, Vācija, 2023. gada 25.–29. jūnijs.
4. 19th Nordic-Baltic Conference (NBC) on Biomedical Engineering and Medical Physics, Liepāja, Latvija, 2023. gada 12.–13. jūnijs.
5. SPIE Conference 12572, Optical Sensors, Prāga, Čehija, 2023. gada 24.–26. aprīlis.
6. 3rd Baltic Biophysics Conference, Viļņa, Lietuva, 2022. gada 6.–7. oktobris.
7. SPIE Conference 12144, Biomedical Spectroscopy, Microscopy, and Imaging II, Strasbūra, Francija, 2022. gada 7.–11. aprīlis.
8. SPIE Conference 11920, Diffuse Optical Spectroscopy and Imaging VIII, Minhene, Vācija, 2021. gada 20.–25. jūnijs.
9. SPIE Conference 11359, Biomedical Spectroscopy, Microscopy, and Imaging, Strasbūra, Francija, 2020. gada 6.–10. aprīlis.

Pētījumu rezultāti, kas veido promocijas darba pamatu, publicēti tālāk norādītajos zinātniskajos darbos.

Raksti *Q1* žurnālos

1. I. Balmages, J. Liepins, S. Zolins, D. Bliznuks, R. Broks, I. Lihacova, A. Lihachev, “Tools for classification of growing/non growing bacterial colonies using laser speckle imaging”. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1279667, DOI :10.3389/fmicb.2023.1279667 (**autora ieguldījums 80 %**).
2. I. Balmages, A. Reinis, S. Kistkins, D. Bliznuks, E. V. Plorina, A. Lihachev, and I. Lihacova, “Laser speckle imaging for visualization of hidden effects for early detection of antibacterial susceptibility in disc diffusion tests”, *Frontiers in Microbiology*, 14, 1221134, (2023), DOI: 10.3389/fmicb.2023.1221134 (**autora ieguldījums 80 %**).
3. I. Balmages, J. Liepins, E. T. Auzins, D. Bliznuks, E. Baranovics, I. Lihacova, and A. Lihachev, “Use of the speckle imaging sub-pixel correlation analysis in revealing a mechanism of microbial colony growth”, *Sci. Rep.* 13(1), 2613, (2023), DOI: 10.1038/s41598-023-29809-0 (**autora ieguldījums 80 %**).
4. I. Balmages, J. Liepins, S. Zolins, D. Bliznuks, I. Lihacova and A. Lihachev, “Laser speckle imaging for early detection of microbial colony forming units”, *Biomed. Opt. Express*, 12 (3), 1609.–1620. lpp. (2021), DOI: 10.1364/BOE.416456 (**autora ieguldījums 80 %**).

Zinātniskie raksti, kas iekļauti konferenču rakstu krājumos

1. I. Balmages, A. Reinis, S. Kistkins, D. Bliznuks, A. Lihachev, I. Lihacova, “Comparison of algorithms for monitoring the behavior of microorganisms based on remote laser speckle method”, *Proc. SPIE 13196, Artificial Intelligence and Image and Signal*

Processing for Remote Sensing XXX,1319611 (2024); <https://doi.org/10.1117/12.3032500> (**autora ieguldījums 50 %**).

2. I. Balmages, A. Reinis, S. Kistkins, J. Liepins, M. Pogorielov, V. Korniienko, K. Diedkova, D. Bliznuks, A. Lihachev, I. Lihacova, “Determination of operating parameters of fungal growth signals analyzed by laser speckle contrast imaging”, Proc. SPIE 13006, Biomedical Spectroscopy, Microscopy, and Imaging III, (2024); DOI: 10.1117/12.3016906 (**autora ieguldījums 50 %**).
3. I. Balmages, D. Bliznuks, A. Reinis, S. Kistkins, E. V. Plorina, A. Lihachev, and I. Lihacova, “Laser speckle imaging-assisted disk diffusion test for early estimation of sterile zone radius”, Proc. SPIE 12628, Diffuse Optical Spectroscopy and Imaging IX, 126281Y, (2023); DOI: 10.1117/12.2670618 (**autora ieguldījums 50 %**).
4. I. Lihacova, I. Balmages, A. Reinis, S. Kistkins, D. Bliznuks, E. V. Plorina, A. Lihachev, “Dynamic laser speckle imaging for fast evaluation of the antibacterial susceptibility by the disc diffusion method”, 19th Nordic-Baltic Conference (NBC) on Biomedical Engineering and Medical Physics (2023); DOI: 10.1007/978-3-031-37132-5_39 (**autora ieguldījums 20 %**).
5. A. Lihachev, I. Balmages, J. Liepins, I. Lihacova, D. Bliznuks, “Dynamic laser speckle imaging for estimation of microbial colony growth in a noisy environment”, Proc. SPIE 12572, Optical Sensors 2023; 1257220, (2023); DOI: 10.1117/12.2675953 (**autora ieguldījums 20 %**).
6. I. Balmages, J. Liepins, E. T. Auzins, A. Zile, D. Bliznuks, I. Lihacova, A. Lihachev, “Evaluation of microbial colony growth parameters by laser speckle imaging”, Proc. SPIE 12144, Biomedical Spectroscopy, Microscopy, and Imaging II, 121440B (2022); DOI: 10.1117/12.2621152 (**autora ieguldījums 50 %**).
7. I. Balmages, J. Liepins, D. Bliznuks, S. Zolins, I. Lihacova, A. Lihachev, “Laser speckle imaging reveals bacterial activity within colony”, Proc. SPIE 11920, Diffuse Optical Spectroscopy and Imaging VIII; 1192024 (2021); DOI: 10.1117/12.2615444 (**autora ieguldījums 50 %**).
8. I. Balmages, D. Bliznuks, J. Liepins, S. Zolins, and A. Lihachev, “Laser speckle time-series correlation analysis for bacteria activity detection”, Proc. SPIE 11359, Biomedical Spectroscopy, Microscopy, and Imaging, 113591D, (2020); DOI: 10.1117/12.2541663 (**autora ieguldījums 50 %**).

Projekti, kuros izmantoti promocijas darba pētījumu rezultāti

1. LZP projekts “*Fast and non-contact optical estimation of microorganisms activity*” (līgums nr. lzp-2018/2-0051), 12.2018.–12.2020. (nodarbināts kopš 2019. g. augusta).
2. ERAF projekts “*Fast and cost-effective machine learning based system for microorganism growth analysis*” (līgums nr. 1.1.1.1/19/A/147) (07.2020.–06.2023.).
3. ERAF projekts “*Rapid assessment system of antibacterial resistance for patients with secondary bacterial infections*” (nr. 1.1.1.1/21/A/034), (01.2021.–11.2023.).
4. LZP projekts “*Dynamic laser speckle imaging for evaluation of fungal growth activity*” (līgums nr. lzp-2022/1-0247), (01.2023.–12.2025.).

Promocijas darba struktūra un saturs

Promocijas darbā ir ievads, sešas galvenās nodaļas, rezultātu analīze un secinājumi. Pilnais promocijas darba teksts ir publikāciju kopa ar izvērstiem skaidrojumiem.

Promocijas darba struktūra

Ievadā tiek apstiprināta veikto pētījumu aktualitāte un formulēts pētījuma objekts, mērķis un uzdevumi. Tajā aprakstīta darba zinātniskā novitāte, kā arī praktiskā nozīme.

1. nodaļā sniegts literatūras apskats par bezkontakta optisko mērījumu metodēm, kuru pamatā ir lāzera speķlu metode.

2. nodaļā analizēta lāzera speķlu korelācijas metodes izstrāde un tās izmantošanas pamatojums submikronu aktivitātes novērtēšanai.

3. nodaļā aprakstīta algoritma spēja analizēt baktēriju kolonijas, galveno uzmanību pievēršot: 1) agrīnai baktēriju koloniju atklāšanai un augšanas dinamikas uzraudzībai; 2) mikrobu aktivitātes atšķirību vizualizācijai laika gaitā dažādās kolonijas daļās.

4. nodaļā aprakstīta algoritma spēja agrīni noteikt antibakteriālo jutību disku difūzijas testos.

5. nodaļā aprakstīta iespēja klasificēt aktīvās un neaktīvās kolonijas (vai zonas).

6. nodaļā salīdzināti ierosinātās metodes rezultāti ar citām lāzera speķlu metodēm.

Rezultātu un secinājumu nodaļā apkopoti šī pētījuma galvenie ieguvumi un definēti secinājumi, apskatītas promocijas darba zinātniskās un praktiskās novitātes, kā arī apskatīti turpmāko pētījumu virzieni.

Uzdevumu, tēmu un publikāciju saistība

1. uzdevums. Veikt pārskatu par esošajām speķlu paraugu apstrādes metodēm. Pierādīt, ka promocijas darbā ierosinātā metode ir efektīvāka; 1. konferences referāts; 1. un 6. nodaļa.

2. uzdevums. Veikt korelācijas analīzes metožu izpēti attiecībā uz speķlu paraugiem. Salīdzināt dažādus algoritmus, pārbaudīt to izpildes laiku un precizitāti. Izstrādāt priekšlikumus un pielāgot piemērošanai zemas frekvences signāliem, kas raksturo mikroorganismu aktivitāti; zinātniskais raksts "Lāzera speķlu attēlu korelācijas analīzes metodes un to izmantošanas pamatojums sēnīšu un baktēriju augšanas un uzvedības novērtēšanai" publicēšanai žurnālā (sagatavošanas procesā); 2. nodaļa.

3. uzdevums. Izpētīt ierosinātās metodes iespēju veikt ātru un bezkontakta submikronu aktivitātes vai submikronu objektu augšanas noteikšanu un novērtēšanu; 4. zinātniskais raksts, kas publicēts žurnālā; 2., 5., 6. un 8. zinātniskais raksts, kas publicēts konferenču rakstu krājumos; 3. nodaļa.

4. uzdevums. Veikt submikronu objektu vai notikumu izplatīšanās ātruma mērīšanu telpā. Veikt salīdzinājumu ar matemātiskajiem modeļiem; 2. un 4. zinātniskais raksts, kas publicēts žurnālos; 3. un 4. zinātniskais raksts, kas publicēts konferenču rakstu krājumos; 3. un 4. nodaļa.

5. uzdevums. Izpētīt ierosinātās metodes iespēju veikt noteiktu veidu submikronu objektu specifisku slēpto parādību un efektu noteikšanu. Veikt salīdzinājumu ar matemātiskajiem modeļiem; 3. zinātniskais raksts, kas publicēts žurnālā; 7. zinātniskais raksts, kas publicēts konferenču rakstu krājumā; 3. nodaļa.

6. uzdevums. Demonstrēt spēju klasificēt un novērtēt konkrētus submikronu objektus vai notikumus; 1. zinātniskais raksts, kas publicēts žurnālos, un zinātniskais raksts "Lāzera

speklu metode inhibīcijas un aktīvo baktēriju augšanas zonu klasificēšanai ap antibiotiku diskiem, izmantojot neironu tīklu” (sagatavošanas procesā); 5. nodaļa.

1. LITERATŪRAS PĀRSKATS PAR BEZKONTAKTA OPTISKO MĒRĪJUMU METODĒM, KAS BALSTĪTAS LĀZERA SPEKLU METODĒ

Šajā promocijas darba kopsavilkuma nodaļā sniegts pārskats par bezkontakta optiskās mērīšanas metodēm, kuru pamatā ir lāzera speklu metode. Nodaļā aplūkotas populārākās metodes, kas īpaši paredzētas bioloģisko parādību mērīšanai.

1.1. Īss pārskats par spekla fenomena atklāšanu un izpēti

Pirmā lāzera darbība 1960. gadā parādīja interesantu parādību – objekti, kas tiek skatīti lāzera gaismā, iegūst granulāru struktūru. Šai granularitātei nav acīmredzamas saistības ar izgaismotā objekta makroskopiskajām īpašībām. Kā izrādījās, vairuma materiālu virsmu ir ārkārtīgi raupjas optiskā viļņa garuma mērogā (aptuveni $\lambda = 500(\text{nm})$) [1], [2]. Kad no šādas virsmas tiek atstarota monohromatiska gaisma, optiskais vilnis, kas rodas jebkurā attālā punktā, sastāv no daudzām koherentām komponentēm, no kurām katru veido cits virsmas mikroskopiskais elements. Spekls var parādīties ne tikai no izplatīšanās brīvā telpā, bet arī attēlveidošanas sistēmās.

Lāzera speklu efekts tika uzskatīts par galveno trūkumu koherentās gaismas avotu izmantošanā. Optiskais spekls ierobežo telpisko izšķirtspēju un samazina signāla un trokšņa attiecību (*SNR*). Tomēr vēlāk tika konstatēts, ka spekls var sniegt noderīgu informāciju. Piemēram, to izmanto, lai mērītu virsmas raksturlielumus [3], [4], noteiktu dinamiskās izmaiņas uz virsmas [5] u. c. Tas nozīmē, ka virsmas aktivitātes mērīšanai var izmantot telpiskā spekla parauga izmaiņas laika gaitā.

Tūlītējas divdimensiju ātruma vai plūsmas dinamikas divdimensiju kartes iegūšana reāllaikā ir speklu metodes priekšrocība, salīdzinot ar Doplera metodi [6]. Baktēriju aktivitātes raksturošanai šķidrā un cietā vidē tiek izmantotas dažādas metodes, piemēram, infrasarkanā termogrāfija, [7] mikrokālorimetrija, [8] plūsmas citometrija [9] un optiskā koherences tomogrāfija [10]. Visām šīm metodēm ir nepieciešams dārgs aprīkojums, kā arī labi apmācīts personāls, lai veiktu eksperimentālo darbu. Dinamiskā speklu metode ir vienkārša un praktiska, un tās principos balstīta analīze prasa minimālus resursus. Tāpēc šai metodei ir daudz priekšrocību, salīdzinot ar citām.

Šajā nodaļā ir aplūkotas speklu paraugu simulācijas un populārākās lāzera speklu mērījumu metodes.

1.2. Speklu paraugu matemātika un simulācijas

Speklu paraugu simulācija ļauj atsevišķi aplūkot dažādus novērojamo parādību procesus – fiziku, optisko sistēmu, datu apstrādi – un veikt atbilstošas izmaiņas.

Spekļa parādība rodas no nejauši fāzētu elementāru komponentu superpozīcijas, un to var simulēt, ieviešot skaitlisko modeli, kas summē šīs komponentes novērošanas plaknē [11]. Šo modeli var aprakstīt, izmantojot 1.1. vienādojumu.

$$U(x, y) = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_{k=1}^N |a_k| \times e^{j\varphi_k}, \quad (1.1)$$

kur $\frac{a_k}{\sqrt{N}}$ un φ_k attiecīgi k -tā statistiski neatkarīgā vektora amplitūda un fāze; U – lauka vektora amplitūda. Taču novērojamais lielums ir pikseļa intensitāte speķlu paraugā, kas iegūts ar kameru:

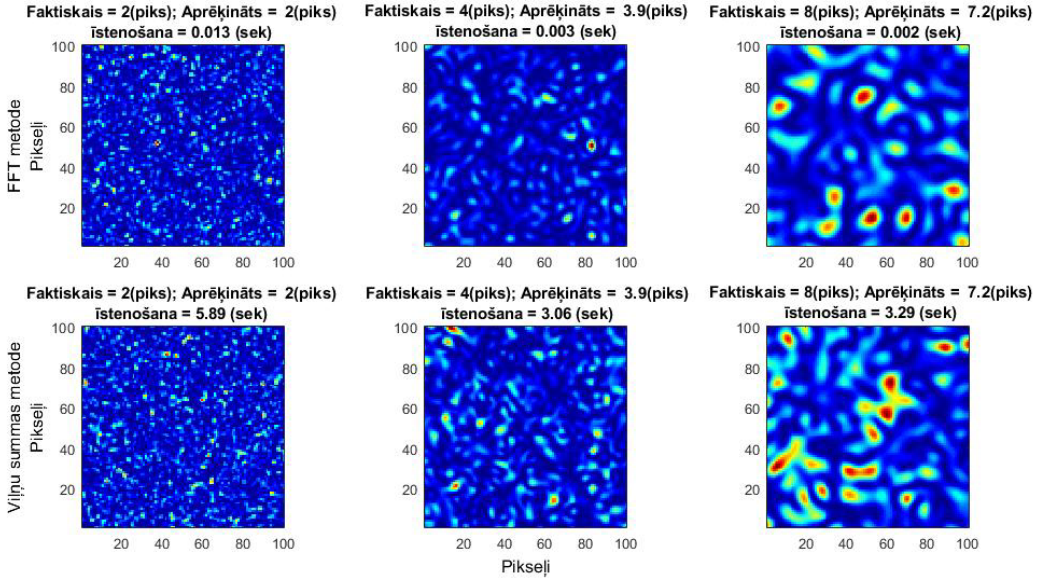
$$I(x, y) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} |U(x, y; t)|^2 dt \propto U(x, y) U^*(x, y). \quad (1.2)$$

Ar 1.1. vienādojumu aprakstītais modelis ļauj izveidot statistisku speķlu paraugu. Vēl viens veids, kā izveidot speķlu paraugus, ir šāds: izkļiedes intensitāti attēla plaknē var aprēķināt no Furjē transformācijas, reizinot gaismas lauku no objekta ar optisko zīlītes funkciju (zemfrekvences filtru) [12] (1.3. vienādojums)

$$I(x, y) = \left| FT^{-1} \left(H \times FT(e^{j\varphi(x, y)}) \right) \right|^2, \quad (1.3)$$

kur H – kameras objektīva apļveida apertūra; FT un FT^{-1} – attiecīgi tiešā un apgrieztā Furjē transformācija.

Abas simulācijas metodes nodrošina līdzīgus paraugus (1.1. attēls). Ir acīmredzams, ka, izmantojot 1. metodi, īstenošanas laiks ir ievērojami ilgāks.



1.1 attēls. Speķlu attēlu statistiskā simulācija. Augšējā rindā, izmantojot Furjē transformāciju. Apakšējā rinda, izmantojot viļņu summu. Speķlu izmēri palielinās no kreisās uz labo pusi: 2, 4, 8 (piks).

Dinamiskais speķls ir parādība, kas rodas, kad lāzera gaismu izkļiedē objekti, kam piemīt kāda veida aktivitāte. Modelī ņemts vērā, ka darbība notiek uz raupjas virsmas, kas maina mikrostruktūru, bet tās atstarošanas spēja saglabājas nemainīga. Fāzei tiek pievienotas mikrotopogrāfijas izmaiņas [13]. Pētījumā [14] aprakstīts process, kā izveidot nepārtrauktas fāzes trajektorijas starp divām noteiktām robežām, lai arī speķlu parauga attīstība būtu nepārtraukta.

Lai īstenotu šo procesu, tiek izveidotas divas statistiski neatkarīgu nejaušo skaitļu kopas ar vienmērīgu sadalījumu. Ar Boksa-Mullera (*Box-Muller*) transformāciju no šīm divām kopām

tiek izveidotas divas jaunas nejaušo mainīgo kopas, kas arī ir statistiski neatkarīgas, bet ar Gausa sadalījumu:

$$\begin{aligned} Y_1 &= \mu + \sigma \times \sqrt{-2 \ln(X_1)} \times \cos(2\pi \times X_2); \\ Y_2 &= \mu + \sigma \times \sqrt{-2 \ln(X_1)} \times \sin(2\pi \times X_2). \end{aligned} \quad (1.4)$$

μ, σ vērtības var noteikt: $\mu = 0, \sigma = 1$, un šāda procedūras realizācija:

$$\begin{bmatrix} Z_1 \\ Z_2 \end{bmatrix} = \frac{1}{\sqrt{2}} \cdot \begin{bmatrix} 1 & -1 \\ 1 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \sqrt{1+r} & 0 \\ 0 & \sqrt{1-r} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \end{bmatrix}. \quad (1.5)$$

Tiek iegūtas divas nejaušo skaitļu kopas – divfaktoru normālā ar korelācijas koeficientu r . Nākamajā solī tiek izmantota procentiļu transformācija:

$$T_1 = F_z(Z_1), T_2 = F_z(Z_2), \quad (1.6)$$

kur normālā kumulatīvā sadalījuma funkcija ir pierakstīta kā F_z .

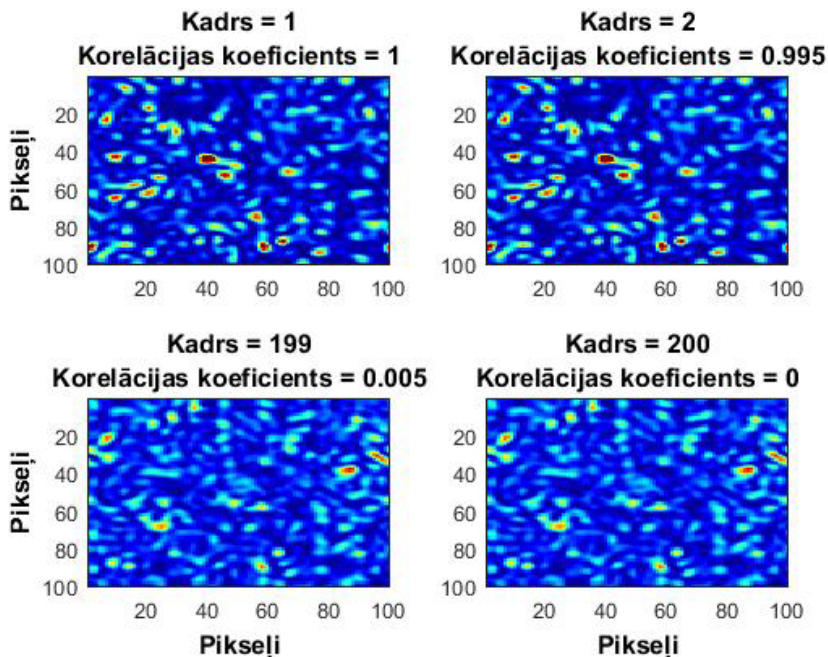
Iegūti divi nejaušo skaitļu komplekti ar vienmērīgu sadalījumu vienības intervālā. Jaunās kopas vairs nav statistiski neatkarīgas. Kopas T_1 and T_2 tiek ievadīti fāzē:

$$\varphi_n(x, y) = 2\pi T_n. \quad (1.7)$$

Pēc tam, izmantojot formulu (1.5), tiek izveidoti divi speķu paraugi. Lai iegūtu speķu paraugus ar patvaļīgu polarizācijas pakāpi, abus iegūtos speķu paraugus izlīdzina [15]:

$$I(x, y) = \frac{I_1(x, y) \times (1 + p) + I_2(x, y) \times (1 - p)}{2}, \quad (1.8)$$

kur $0 < p < 1$ ir polarizācijas pakāpe. Jaunā varbūtības blīvuma funkcija kļūst par Reilija (*Rayleigh*) sadalījumu. Šī uzvedība atbilst reālam fizikālam procesam [16]. Ar šo metodi [14] ģenerētie speķu attēli vienmērīgi mainās no kadra uz kadru (1.2. attēls).



1.2. attēls. Pirmie divi kadri (augšā) un pēdējie divi kadri (apakšā) speķu attēlu secībā ar korelācijas koeficientu, kas vienmērīgi mainās no 1 līdz 0.

Pievienojot submikronu aktivitātes uzvedības bioloģisko modeļu ieguldījumu, tiks nodrošināta pilnīga pētāmo parādību simulācija.

1.3. Speklu izmēri

Speklu izmēri sniedz informāciju par izkliedes vidi. Piemēram, to var izmantot, lai izmērītu virsmas raupjumu [17]. Attēlveidošanas sistēmu ar lēcu vidējais speklu izmērs ir izteikts ar 1.9. formulu [18]:

$$S \approx 1.2\lambda(1+M)\frac{f}{\alpha}, \quad (1.9)$$

kur M – palielinājums un $\frac{f}{\alpha}$ objektīva F numurs (fokusa attālums attiecībā pret apertūru).

Vidējo speklu izmēru aprēķina kā novērojuma plaknē iegūtā intensitātes speklu parauga autokovariances normēto funkciju [19]. Izmantojot Vīnera-Hinčina teorēmu [20], ir iespējams iegūt ātrāku formulu, kas darbojas frekvenču apgabalā:

$$c_I(x, y) = \frac{FT^{-1} \left[\left| FT[I((x, y))] \right|^2 \right] - \langle I(x, y) \rangle^2}{\langle I(x, y)^2 \rangle - \langle I(x, y) \rangle^2}, \quad (1.10)$$

kur $I(x, y)$ – intensitātes novērojumu plaknē (x, y) , FT, FT^{-1} – tiešā un apgrieztā Furjē transformācija un $\langle \rangle$ atbilst telpiskajam vidējam.

Vidējo speklu izmēru var novērtēt pēc autokovariances funkcijas pilnā platuma pusmaksimumā ($FWHM$). Tādējādi, ja speklu lielums nav zināms, to var aprēķināt no speklu attēla.

1.4. Spektrālais kontrasta parametrs

Vēl viens svarīgs parametrs speklu mērījumos ir kontrasts K [21].

$$K = \frac{\sigma}{\langle I \rangle} = \frac{\sqrt{\langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2}}{\langle I \rangle}, \quad (1.11)$$

kur $\langle I \rangle$ – vidējā telpiskā intensitāte; σ – telpiskā intensitātes standartnovirze. Zemākas K vērtības atbilst intensīvākām dinamiskām izmaiņām novērotajā vidē. Šī speklu interferences īpašība ir noderīga, lai to izmantotu biomedicīnas jomā [22].

1.5. Dekorelācijas laika analīze

Pilnajā promocijas darba tekstā ir parādīta attiecība starp kontrastu, ekspozīcijas laiku un de Korelācijas laiku. Pētījums [16] parāda, ka, ņemot vērā galīgo izmantojamo paraugu skaitu, tika iegūta šāda korelācijas formula:

$$C_t(k \times \delta t, x, y) = \frac{\langle I(t, x, y)I(t+k \times \delta t) \rangle - \langle I(t, x, y) \rangle \langle I(t+k \times \delta t) \rangle}{\sqrt{[\langle I^2(t, x, y) \rangle - \langle I(t, x, y) \rangle^2][\langle I^2(t+k \times \delta t, x, y) \rangle - \langle I(t+k \times \delta t, x, y) \rangle^2]}}, \quad (1.12)$$

kur (x, y) – pikseļu pozīcijas; k – kadra numurs; δt – laika intervāls starp diviem blakus esošiem kadriem.

1.12. formula tiek izmantota dekorelācijas laika vai ātruma analīzei [23], [24]. Dekorelācijas laiks ir tad, kad korelācija starp sākotnējo attēlu un vēlāk iegūtajiem attēliem ir samazināta līdz 50 %. Bioloģiskajiem paraugiem pētījumā [16] ierosināts izmantot ($1/e = 0,368$). Viens no iemesliem, kāpēc rodas dekorelācijas, ir tas, ka gaisma izkliedējas no daudziem atsevišķiem kustīgiem izkliedētājiem, piemēram, daļiņām vidē. Novērojot dinamiskus notikumus, laika korelācija samazinās.

1.6. Nodaļas secinājumi

Šajā nodaļā tika aplūkotas speķu paraugu simulācijas un speķu paraugu parametri dinamisko notikumu analīzei (piemēroti arī medicīnas/bioloģijas jomā). Starp visiem šiem faktoriem pastāv saistība ar korelācijas analīzi. Tādējādi kļūst skaidrs, ka korelācijas analīze ir svarīgs, spēcīgs un daudzsoļš rīks, lai analizētu speķu paraugus (arī medicīnas/bioloģijas jomā). Nākamajā nodaļā tiks aplūkota lāzera speķu attēlu korelācijas analīzes attīstība un tās izmantošanas pamatojums submikronu aktivitātes novērtēšanai.

2. PĀRSKATS PAR LĀZERA SPEKLU ATTĒLU KORELĀCIJAS ANALĪZES ATTĪSTĪBU UN TĀS IZMANTOŠANAS PAMATOJUMU SUBMIKRONU AKTIVITĀTES NOVĒRTĒŠANAI

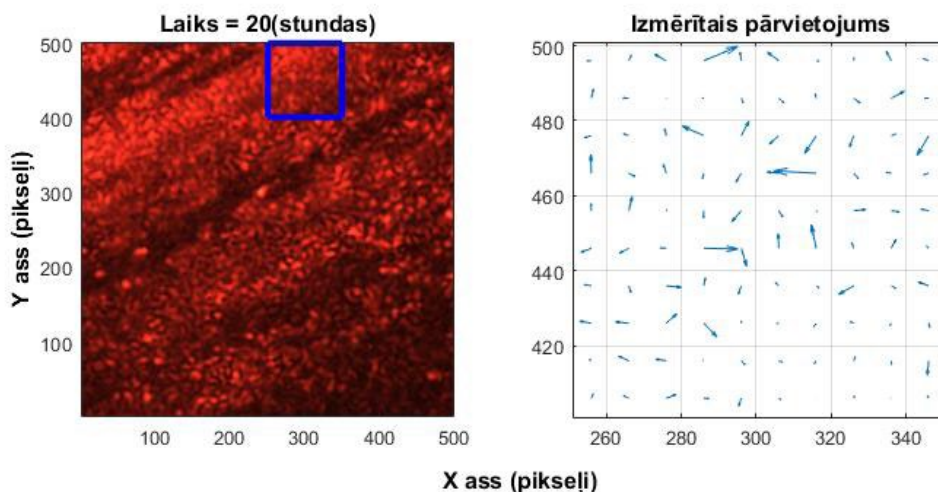
Pamatojoties uz definēto mērķi un uzdevumiem, promocijas darba kopsavilkuma otrajā nodaļā ir sniegts pārskats par lāzera speklu attēlu korelācijas analīzes (signālu apstrādes algoritmu ar augstu jutību) izstrādi un tās izmantošanas pamatojumu mikrobioloģisko datu un submikronu aktivitātes novērtēšanai kā pētniecības objektam.

2.1. Nodaļas ievads

Korelācijas analīze var sniegt precīzāku informāciju par pārvietojumiem nekā kontrasta analīze, ļaujot jutīgāk uzraudzīt kustīgus dinamiskus notikumus vai objektus [25]. Korelācijas algoritmi tiek plaši izmantoti mehānikā, akustikā, daudz mazākā mērā – arī mikrobioloģijā. Šajā nodaļā aplūkota lāzera speklu attēlu korelācijas analīzes metožu evolūcija un to izmantošanas pamatojums sēnīšu un baktēriju augšanas un uzvedības novērtēšanai.

2.2. Speklu pārvietojuma mērījumi

Pirmā datorizētā digitālā attēlu speklu korelācijas sistēma tika prezentēta pagājušā gadsimta 80. gadu sākumā, lai analizētu mehāniskās deformācijas [26], [27]. Speklu korelācijas metode ļauj noteikt nelielas deformācijas pat tad, ja tiek pārklātas liela cieta objekta kustības.



2.1. attēls. Eksperiments ar sēnīti *Candida albicans*. Labajā pusē – speklu attēls 20 stundu laikā no eksperimenta sākuma. Kvadrāts ar izmēriem 100 pikseli $\times$ 100 pikseli ir izcelts zilā krāsā. Kreisajā pusē – pārvietojuma lauks starp diviem kadriem (1 sekunde). 100pikseli $\times$ 100 pikseli speklu attēls ir sadalīts blokos 10 pikseli $\times$ 10 pikseli (100 bloki).

Krusteniskās korelācijas algoritms salīdzina apakšattēlus (no atskaites un nobīdītajiem attēliem) un nosaka pārvietojumu (2.1. vienādojums).

$$CC(u, v) = \sum_x \sum_y \left((a(x, y)) \times (b(x - u, y - v)) \right), \quad (2.1)$$

kur $a(x, y)$ un $b(x, y)$ – divi kadri (pirms un pēc deformācijas); u un v – telpiskais pārvietojums starp diviem kadriem attiecīgi x un y virzienā.

Pilnajā promocijas darba tekstā ir demonstrēta mehāniskās nobīdes simulācija (visas objekta daļas ir nobīdītas vienā virzienā). Līdzīga analīze tika veikta ar *Candida albicans* sēnītēm, lai salīdzinātu, kā vienkārša nobīde atšķiras no sēnīšu uzvedības (2.1. attēls).

2.3. Signāla rekonstrukcija, izmantojot nulles vidējo normalizēto krustenisko korelāciju starp attēliem

Lāzera speķu apstrādātajos audio signālos starp kadriem notiek tikai speķu kustība plaknē (xy), bet forma nemainās [28]. Pirmajā (atsauces) attēlā tiek atlasīts šablons ($N \times N$ pikseļi). Izmantojot nulles vidējo normalizēto savstarpējo korelāciju (2.2. vienādojums), nākamajā attēlā pēc laika (“deformētajā”) tiek skenēts lielāks apgabals, lai noteiktu šablona atrašanās vietu un noteiktu pārvietojumu.

$$ZNCC(u, v) = \frac{\sum_x \sum_y ((a(x, y) - \bar{a}) \times (b(x - u, y - v) - \bar{b}))}{\sqrt{\sum_x \sum_y (a(x, y) - \bar{a})^2 \times \sum_x \sum_y (b(x - u, y - v) - \bar{b})^2}}, \quad (2.2)$$

kur $a(x, y)$ – daļa no pirmā (šablona) kadra un $b(x, y)$ sekvences nākamā kadru daļa; $\bar{a}$ un $\bar{b}$ – šo kadru daļu vidējās vērtības. Šī procedūra tiek veikta ar katru speķu attēlu līdz eksperimenta beigām [29], [30]. Pilnajā promocijas darba tekstā ir parādīta akustiskā signāla rekonstrukcijas simulācija.

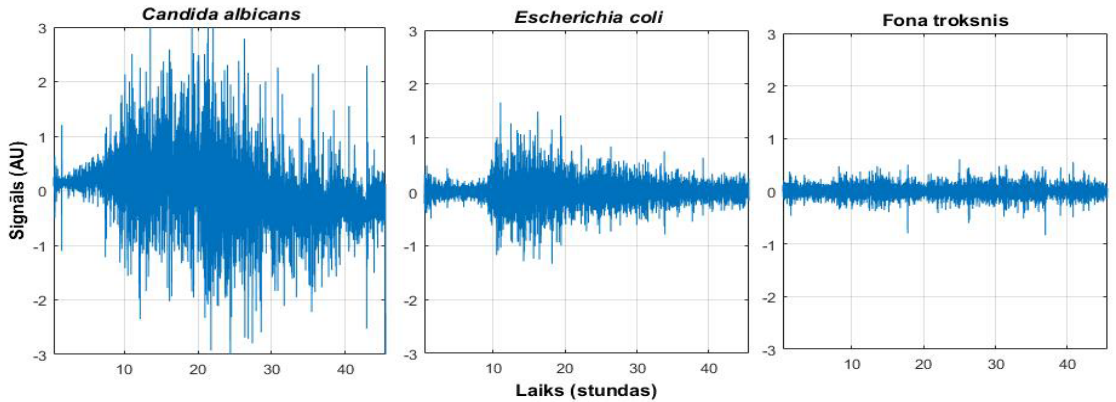
2.4. Mikroorganismu aktivitātes lāzera speķu attēlu secība, kas pārveidota laika signālos

Sēnīšu vai baktēriju gadījumā mikroorganismu aktivitātes dēļ speķu paraugs ne tikai pārvietojas telpā, bet arī mainās laika gaitā no kadra uz kadru (2.1. attēls). Šī iemesla dēļ ir nepieciešams veikt korelāciju ar katru secīgu attēlu pāri – 1. ar 2., 2. ar 3. utt. (2.2. vienādojumā $a(x, y)$ un $b(x, y)$ ir divi blakus esošie kadri secībā). Lai to ņemtu vērā, rekonstruējot signālu, tiek uzkrāti iepriekšējie pārvietojumi (2.3. vienādojums).

$$sig[n] = \sum_{i=1}^n \delta[i], \quad (2.3)$$

kur δ – visi iepriekšējie pārvietojumi.

Otrkārt, baktērijas rada vājas mikrovibrācijas, kas īsā laika intervālā nevar mainīt attēlu par vairākiem pikseļiem. Tāpēc ir nepieciešams koncentrēties uz vienu un to pašu pozīciju bez skenēšanas. Lai iegūtu signālus visā laukā, tas ir jāsadala $N \times N$ pikseļos, un katrā no šīm sekcijām tiks veikta $ZNCC$ (un interpolācija) starp secīgiem kadriem. 2.2. attēlā ir salīdzināts rekonstruētais signāls baktēriju un sēnīšu kolonijā un ārpus tās.



2.2. attēls. Ar algoritmu iegūtais signāls. Kreisajā pusē – *Candida albicans* (sēnītes) kolonijas signāls; centrā – *E. coli* (baktērijas) kolonijas signāls; labajā pusē – signāls ārpus kolonijas.

2.5. Mērījumu precizitāte un algoritma ieviešanas laiks

Šajā apakšnodaļā ir aplūkoti vairāki veidi, kā īstenot savstarpējās korelācijas algoritmu tā, lai, no vienas puses, tas nodrošinātu augstu precizitāti, bet, no otras puses, būtu arī ātrs. Normalizētās savstarpējās korelācijas galvenā priekšrocība, salīdzinot ar nenormalizēto, ir tā, ka tā ir mazāk jutīga pret abu salīdzināmo signālu amplitūdu lineārām izmaiņām [31]. No otras puses, nenormalizēta savstarpējā korelācija ir ātrāka.

Papildus *ZNCC* tika izmantota normalizētā savstarpējā korelācija (*NCC*) – līdzīgi kā *ZNCC*, bet bez attēlu vidējo vērtību atņemšanas [32] (2.4. vienādojums). Vietējā vidējā atņemšanas dēļ *ZNCC* nodrošina labāku noturību nekā *NCC*, jo tā pieļauj arī vienmērīgas spilgtuma svārstības.

Vairāki īstenošanas varianti apsvēršanai un to salīdzināšanai: vispirms un vissvarīgāk – precizitātes ziņā (2.3. attēls), pēc tam – apstrādes laika ziņā (1.–2. tabula).

1) Normalizētā savstarpējā korelācija (*NCC*).

$$NCC(u, v) = \frac{\sum_x \sum_y (a(x, y) \times (b(x - u, y - v)))}{\sqrt{\sum_x \sum_y (a(x, y))^2 \times \sum_x \sum_y (b(x - u, y - v))^2}}. \quad (2.4)$$

2) *ZNCC* īstenošana notiek saskaņā ar 2.2. vienādojumu.

3) Lai samazinātu aprēķinu laiku, algoritmu ir vērts īstenot frekvenču apgabalā. Viena no pieejām ir īstenot fāžu korelāciju, kas ir normalizēta [33] (2.5. vienādojums). Šī metode darbosies daudz ātrāk, bet rezultāts atšķirsies no nulles vidējās normalizētās savstarpējās korelācijas (2.2. vienādojums).

$$PC(u, v) = FT^{-1} \left(\frac{|FT[a((x, y))] \times FT[b((x, y))]^*|}{|FT[a((x, y))] \times FT[b((x, y))]|} \right), \quad (2.5)$$

kur FT^{-1} un FT – apgrieztā un tiešā Furjē transformācija; $()^*$ – kompleksais konjugāts.

4) Dž.P. Lūisa (*J. P. Lewis*) pētījumā [34] ir piedāvāts algoritms, kas pēc zināmas ātras nenormalizētas savstarpējās korelācijas atrašanās frekvenču apgabalā ļauj to pārvērst normalizētā. Precizitāte ir tāda pati kā *ZNCC*. Šī metode acīmredzot tika izstrādāta darbam ar salīdzinoši lielām matricām, kuru īstenošana ir diezgan ātra, tomēr mazām matricām,

piemēram, 10 pikseli × 10 pikseli, normalizācijas process ir lēns, un šī metode būs ātrāka nekā ZNCC, bet daudz lēnāka nekā fāžu korelācija.

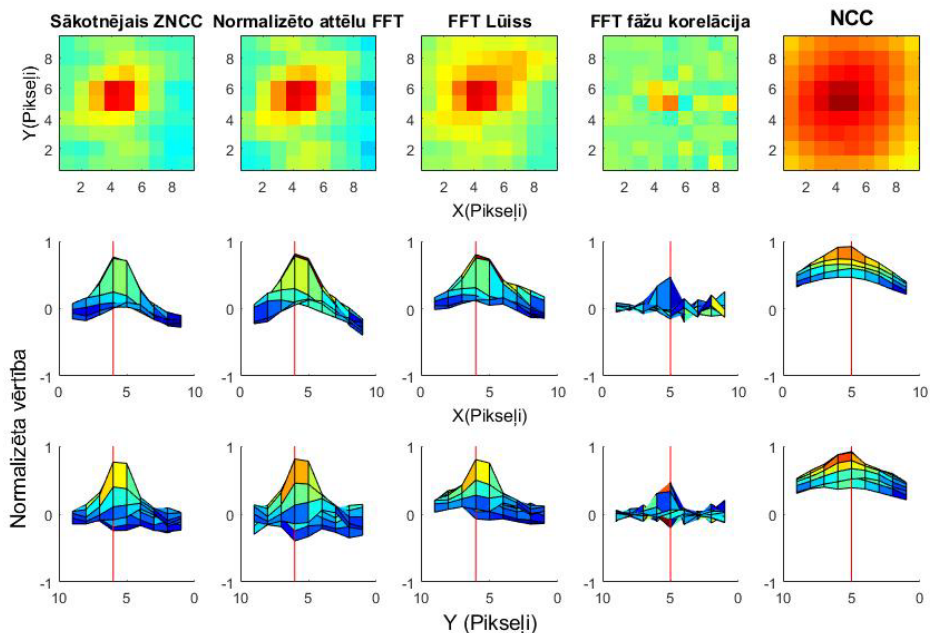
5) Cits promocijas darbā ierosinātais īstenošanas variants: no speklu attēliem tiek atņemts vidējais lielums, pēc tam attēli tiek normalizēti. Pēc tam, izmantojot divus normalizētus attēlus, veikta frekvences apgabala korelācija (saskaņā ar formulu nenormalizētai frekvences apgabala savstarpējai korelācijai) (2.6. vienādojums). Precizitāte ir tāda pati kā ZNCC vai iepriekšējā (Dž.P. Lūisa) metodē. Apstrādes laiks ir salīdzināms (nedaudz lēnāks) ar fāžu korelāciju.

$$An(x, y) = \frac{a(x, y) - \bar{a}}{\sqrt{\sum_x \sum_y (a(x, y) - \bar{a})^2}} ; Bn(x, y) = \frac{b(x, y) - \bar{b}}{\sqrt{\sum_x \sum_y (b(x, y) - \bar{b})^2}} ; \quad (2.6)$$

$$ZNCC(u, v) = FT^{-1}([FT[An((x, y))] \times FT[Bn((x, y))]^*]).$$

6) Ja speklu attēli ir liela izmēra, nevis 10 pikseli × 10 pikseli, bet, piemēram, 100 pikseli × 100 pikseli vai vairāk, tad ZNCC aprēķināšanai var izmantot formulu laika apgabalā (2.2. vienādojums). Tomēr, neizmantojot visas nobīdes, bet tikai pāris centrālajā daļā (lai iegūtu tikai korelācijas maksimumu), kurai tiek veikta interpolācija. Ja attēli ir liela izmēra, tad šī metode būs ātrāka nekā frekvenču apgabalā. Maziem izmēriem frekvenču apgabalā tas ir nedaudz ātrāks.

2.3. attēlā redzami dažādu korelācijas funkciju rezultāti (korelācija starp diviem kadriem, kur savstarpējā nobīde ir mazāka par vienu pikseli (0,5 pikseli) pa katru asi).



2.3. attēls. Dažādu korelācijas funkciju salīdzinājums. Rezultāti, korelēnot kadru ar kadru, kas nobīdīts par 0,5 pikseliem. Ir redzamas novirzes no standarta metodes. Fāžu korelācijas veikspēja pasliktinājas.

Šādā gadījumā rezultāts vai nu netiks nobīdīts, vai arī tiks nobīdīts par 1 pikseli, un precīzāku vērtību var iegūt tikai ar apakšpikseļu interpolāciju. Visu algoritmu rezultāti tika salīdzināti ar sākotnējo implementāciju (ZNCC). Var redzēt, ka jau šajā gadījumā ar nelielu

pārvietojumu fāžu korelācija un *NCC* uzrāda atšķirības no sākotnējā, savukārt implementācijas frekvenču apgabalā saskaņā ar Lūisa metodi un promocijas darba autora ierosināto metodi uzrāda tuvību sākotnējam.

Tādējādi, ja attēli tiek nobīdīti vai deformēti, samazinās fāžu korelācijas veikspēja (gan precizitāte, gan maksimālā vērtība), bet gan laika, gan frekvenču apgabalā *ZNCC* veikspēja saglabājas augsta.

Tālāk ir dotas tabulas, kurās aprakstīts dažādu algoritmu apstrādes laiks. Rezultāti ir iegūti statistiski.

1. tabulā parādītas šo dažādo algoritmu apstrādes laika atšķirības. Speklu attēla izmērs ir 10 pikseļi $\times$ 10 pikseļi.

1. tabula

Speklu attēla sadaļas izmērs = 10 pikseļi $\times$ 10 pikseļi	<i>NCC</i> (2.4. vienādojums)	Sākotnējais <i>ZNCC</i> (2.2. vienādojums)	<i>ZNCC</i> izmanto tikai trīs nobīdes ap maksimumu	Lūisa metode	Fāžu korelācija (2.5. vienādojums)	Normalizēto attēlu frekvenču apgabala korelācija (2.6. vienādojums)
Vidējais (μ s)	515,9	550,0	93,9	545,5	48,0	81,8
Standarta novirze (μ s)	117,3	150,4	82,7	78,5	34,7	64,9

2. tabulā parādītas šo dažādo algoritmu apstrādes laika atšķirības. Spekla attēlu izmērs ir 100 pikseļi $\times$ 100 pikseļi.

2. tabula

Speklu attēla sadaļas izmērs = 100 pikseļi $\times$ 100 pikseļi	<i>NCC</i> (2.4. vienādojums)	Sākotnējais <i>ZNCC</i> (2.2. vienādojums)	<i>ZNCC</i> izmanto tikai trīs nobīdes ap maksimumu	Lūisa metode	Fāžu korelācija (2.5. vienādojums)	Normalizēto attēlu frekvenču apgabala korelācija (2.6. vienādojums)
Vidējais (ms)	473,8	476,8	0,9	13,0	1,3	1,1
Standarta novirze (ms)	30,5	27,4	0,1	1,4	1,5	0,2

2.6. Nodaļas secinājumi

Mehānisko vibrāciju noteikšanas metode un audiosignālu rekonstrukcijas metode bija motivācija izmantot šajā nodaļā aprakstīto metodi. Sēnīšu un baktēriju kustība ir haotiska, kas izraisa ne tikai attēlu nobīdes, bet arī pašu attēlu izmaiņas. Šā iemesla dēļ mikroorganismu gadījumā salīdzinājumi notiek starp katru secīgo kadru pāri (nevis ar šablonu). Iegūtās nobīdes tiek uzkrātas, lai nodrošinātu signāla nepārtrauktību.

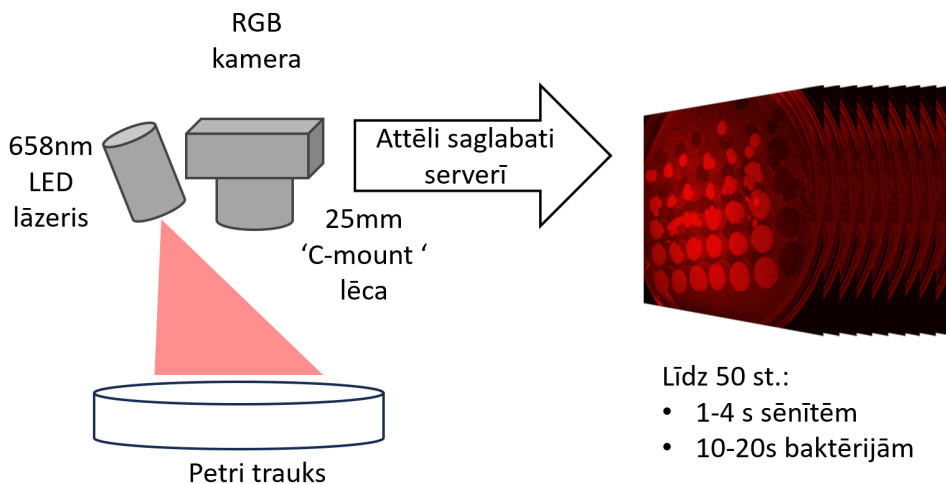
Tika apsvērtas dažādas metodes normalizētās savstarpējās korelācijas ieviešanai. Tika analizēta precizitāte un veikspējas laiks, un, pamatojoties uz to, tika izvēlēta optimālā metode.

3. LĀZERA SPEKLU ATTĒLU KORELĀCIJAS SUBPIKSEĻU ANALĪZE, LAI UZRAUDZĪTU MIKROORGANISMU KOLONIJAS AUGŠANAS DINAMIKU UN ATKLĀTU AKTIVITĀTES ZONU MIGRĀCIJU KOLONIJAS IEKŠIENĒ

Pamatojoties uz definētajiem mērķiem un uzdevumiem, promocijas darba kopsavilkuma trešajā nodaļā sīkāk aprakstīta ierosinātā analīzes metode un tās lietojums mikrobioloģisko datu un submikronu aktivitātes novērtēšanai kā pētniecības objektam. Nodaļā aprakstīti eksperimentāli apstiprinājumi submikronu aktivitātes agrīnas noteikšanas iespējām un submikronu līmeņa notikumu augšanas modeļu efektivitātei.

3.1. Lāzera speķu attēlveidošanas sistēma

Sistēma tika izveidota, lai uzņemtu makromēroga attēlus baltā gaismā un lāzera apgaismojumā. Sistēmas galvenās sastāvdaļas redzamas 3.1. attēlā. Eksperimentos ar dažādu ilgumu (10–110 stundas) ar CMOS kameru tika uzņemti speķu attēli ar 1–30 sekunžu intervālu (atkarībā no mikroorganismu veida). Saskaņā ar pieejamo literatūru šajā pētījumā izmantotie apgaismojuma apstākļi ir optimāli un neietekmē mikrobu augšanu [35]. Eksperimenti ar balto gaismu tika veikti atsevišķi no lāzera speķu attēlveidošanas, izmantojot to pašu iekārtu. Attēli tika uzņemti ik pēc 15 minūtēm. Pilnajā promocijas darba tekstā ir sniegts detalizētāks sistēmas apraksts.



3.1. attēls. Baktēriju augšanas procesa attēlu uzņemšanas shēma, izmantojot 658 nm lāzeri.

3.2. Baktēriju koloniju agrīnas atklāšanas un augšanas dinamikas uzraudzības uzdevums

Dzīvotspējīgo mikrobu šūnu noteikšana paraugā ir viens no galvenajiem epidemioloģijas uzdevumiem. Katra dzīvotspējīga šūna ierosina vienas kolonijas veidošanos uz agara plates

barotnes, ko sauc par koloniju veidojošām vienībām (*CFU*). Šīs metodes ierobežojums ir tas, ka ir jāgaida, līdz kolonijas sasniedz noteiktu izmēru, lai tās varētu atklāt. Patlaban mikroorganismu skaitīšana agrīnā koloniju veidošanās stadijā ir iespējama tikai ar mikroskopu, kas aprobežojas ar nelielu parauga laukumu. Automatizēta koloniju lieluma pieauguma dinamikas skaitīšana ir iespējama tikai ar parastām kamerām, kuru optiskā izšķirtspēja ir ierobežota, tāpēc tās var konstatēt mikrobu kolonijas pazīmes tikai pēc noteikta lieluma sliekšņa sasniegšanas. Lai kolonija sasniegtu 0,2 mm lielumu, kas ir fotokameras noteikšanas robeža, ir nepieciešamas 8–22 stundas. Izmantojot standarta metodes, pirms *CFU* “attīstās”, pirms to saskaitīšanas jāgaida 18–40 stundas [36].

Viena no iespējām, kā ātri un agrīni novērtēt mikroorganismu aktivitāti, ir bezkontakta optiskā metode, ko sauc par lāzera speklu paraugu analīzi. Baktēriju koloniju augšana uz virsmas izraisa izkliedes īpašību izmaiņas, līdz ar to mainās arī speklu paraugs un iegūtā attēla uzvedība [11]. Saskaņā ar pieejamo literatūru [37]–[44] neviena no lāzera speklu metodēm nav vērsta uz mikrobu augšanas (*CFU* veidošanās) uzraudzību agrīnā stadijā. Šajā nodaļā tiks pierādīts, ka dažādu mikrobu *CFU* noteikšanai cietās barotnēs var izmantot dinamiskās lāzera speklu attēlu analīzes metodes.

3.3. Uzdevumi saistībā ar mikrobu aktivitātes atšķirību vizualizāciju laika gaitā dažādās kolonijas daļās

Mikrobu augšana kolonijas malās ir aktīvāka nekā tās centrā, jo pastāvīgs barības vielu pieplūdums no apkārtējās barotnes vai arī šūnas pastāvīgi spiež uz sānu šūnām. Dažādu mikrobu aktivitāti kolonijās var izpētīt tikai ar invazīvām procedūrām – koloniju šķērs griezumu un dzīvotspējas iekrāsošanu [45].

Ierosinātā speklu analīzes sistēma spēj reģistrēt mikrobu kolonijas augšanu un vizualizēt mikrobu augšanas aktivitāti dažādās kolonijas daļās. Šī metode tika pārbaudīta ar trim dažādiem mikroorganismiem – *Vibrio natriegens*, *Escherichia coli* un *Staphylococcus aureus*, un tā apstiprina iepriekšējo koloniju augšanas modeļu precizitāti un nodrošina metodoloģiju mikrobu aktivitātes analīzei kolonijā.

3.4. Secīgo speklu attēlu kadru pārveidošana laika signālā

Šajā apakšnodaļā sīkāk aprakstīta lāzera speklu korelācijas analīze. 2. nodaļā aprakstīts, ka korelācijas metodi var izmantot, lai izmaiņas starp secīgiem kadriem pārvērstu laika signālā. Analizējot šo signālu, ir iespējams noteikt notikumus, ko izraisa mērāmās virsmas vibrācija vai darbība uz tās. Piemēram, baktēriju kolonijas dinamiska izplatīšanās.

Turpmāk ir aprakstīta metode, ar kuras palīdzību speklu attēls tiek pārveidots laika signālā.

1) Tiek veikta divdimensiju normalizēta korelācija starp diviem blakus esošiem kadriem secībā. Tas ļauj noteikt izmaiņas starp tiem dinamiskās darbības dēļ. (Kanoniskais 2.2. vienādojums vai ātrāks 2.6. vienādojums 2. nodaļā).

2) Izmaiņas, kas notiek starp secīgiem kadriem, raksturo maksimālās korelācijas vērtības nobīde (3.1. vienādojums).

$$(\hat{u}, \hat{v}) = \arg \max_{u, v} (Corr(u, v)), \quad (3.1)$$

kur u un v – telpiskais pārvietojums starp diviem blakus esošiem kadriem secībā attiecīgi x un y virzienā.

3) Nobīde starp secīgiem kadriem neatspoguļo veselu pikseļu skaitu. Šā iemesla dēļ interpolācija tika veikta korelācijas funkcijas maksimuma robežās [46]. Tā tika veikta atsevišķi x un y asij. 3.2. vienādojums parāda parabolisko interpolāciju x asij.

$$\hat{\delta}_x = -\frac{b_u}{2a_u} = \frac{Corr(\hat{u}-1, \hat{v}) - Corr(\hat{u}+1, \hat{v})}{2 \left(Corr(\hat{u}-1, \hat{v}) - 2Corr(\hat{u}, \hat{v}) + Corr(\hat{u}+1, \hat{v}) \right)}, \quad (3.2)$$

kur a_u un b_u – parabolas koeficienti.

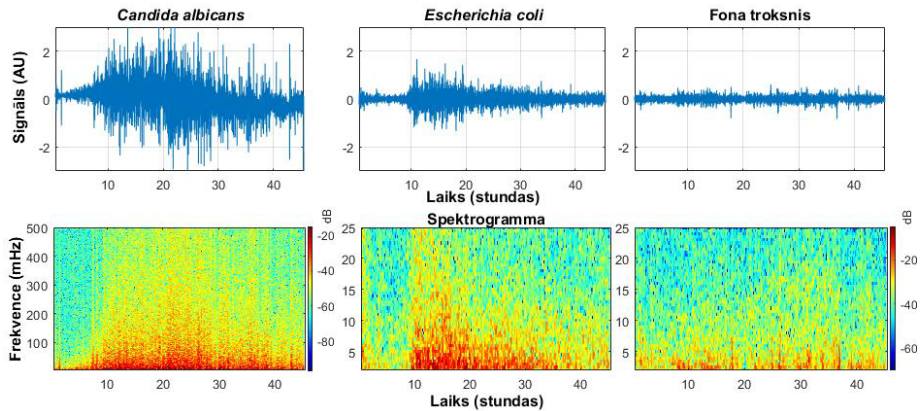
4) Lai ņemtu vērā iepriekšējās nobīdes (2.3. vienādojums 2. nodaļā), tika uzkrāti nobīdes attālumi, kas iegūti starp katru blakusesošo paraugu pāri (atsevišķi x un y asij).

Aprakstītā algoritma palaišana secīgiem $N \times N$ pikseļu attēliem visā secībā veido “laika signālu”. Lai izvairītos no lokālu pārejošu smaīļu ietekmes, ir lietderīgi signālu izlīdzināt [47] (iegūt signāla aploksni). Šim nolūkam var izmantot vidējās kvadrātiskās vērtības novirzes metodi:

$$Env[n] = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=n-N+1}^n sig[k]^2}, \quad (3.3)$$

kur N – loga garums; n – pašreizējais paraugs; k – indekss, kas atrodas logā. Baktēriju augšanas gadījumā būs vērojams signāla vērtību pieaugums.

3.2. attēlā var salīdzināt signālu (kolonijas iekšienē) un troksni (ārpus kolonijas). Signāls ir daudz augstāks par trokšņa līmeni. Apakšējā rindā ir spektrogrammas [48].



3.2. attēls. Augšējā rindā – signāls, kas iegūts, izmantojot algoritmu (signāls no kolonijas centra). Kreisajā slejā redzams *Candida albicans* sēnīšu signāls, līdzīgs speklu signāla paraugs tika novērots arī *Aspergillus niger* sēnītēm. Centrālajā slejā redzams signāls no *E. coli* baktēriju kolonijas; līdzīgs speklu signāla paraugs tika novērots arī *S. aureus* un *V. natriegens* baktērijām. Apakšējā rindā – spektrogramma ir signāla attēlojums laika un frekvences apgabalā, izmantojot īstermiņa Furjē transformāciju (*STFT*), kas ļauj vienlaikus novērot signāla un trokšņa uzvedību laikā un frekvencē. Labajā pusē – troksnis (ārpus kolonijas), kas iegūts, izmantojot algoritmu (augšā), un trokšņa spektrogramma (apakšā).

Baktēriju aktivitāti raksturojošais signāls atrodas zemo frekvenču diapazonā no 0 līdz 15–25 mHz. No praktiskā viedokļa tas nozīmē, ka saskaņā ar Naikvista–Šenona (*Nyquist–Shannon*) paraugu ņemšanas teorēmu [49], [50] paraugu ņemšanas frekvencei starp kadriem jābūt vismaz 50 mHz, t. i., kadram jābūt vismaz reizi 20 sekundēs (3.4. vienādojums):

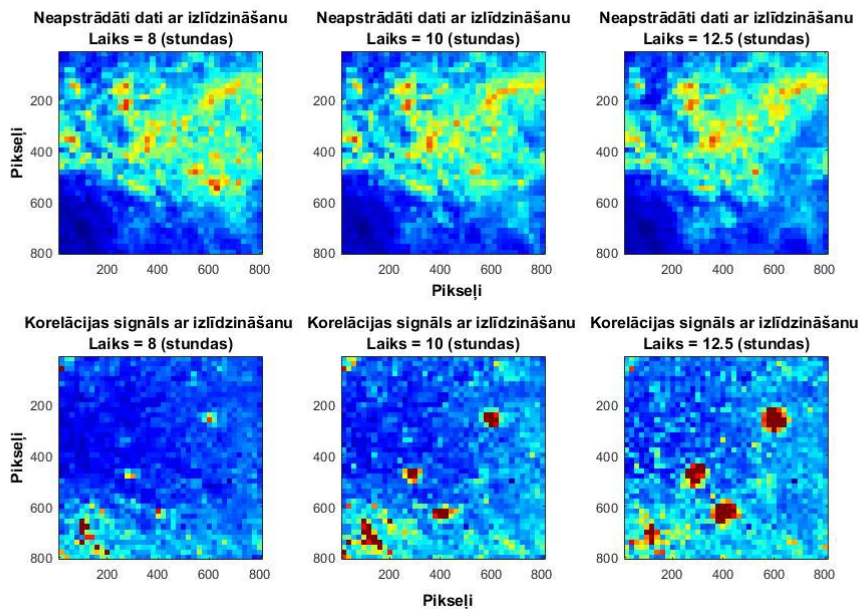
$$t_s = \frac{1}{f_s} \geq \frac{1}{(2 \times f_{\max})}, \quad (3.4)$$

kur t_s – laiks starp kadriem (sekundēs); attiecīgi f_s – paraugu ņemšanas frekvence; $f_{\max}$ – lietderīgā signāla maksimālā frekvence (Hz).

Eksperimenti, kas veikti ar sēnītēm *Aspergillus niger* un *Candida albicans*, parādīja, ka signāls ir frekvenču diapazonā no 0 līdz 150 mHz. Attiecīgi paraugu ņemšanas frekvencei starp kadriem jābūt vismaz 2×150 mHz, t. i., kadram jābūt vismaz reizi 3,33 sekundēs (3.2. attēls).

3.5. Darbība trokšņainā vidē

Reālajām sistēmām jādarbojas dažādās vidēs ar nezināmu trokšņu līmeni. Lai analizētu algoritma veikspēju trokšņainā vidē, tika veikts baktēriju koloniju noteikšanas eksperiments, izmantojot lāzera speķu metodi ar pievienotu troksni. Eksperimentālajā laukā tika iestatīts augsts trokšņa līmenis (3–4 reizes augstāks par parasto fona troksni). 3.3. attēlā redzams piemērs, kurā trokšņainā vidē attīstās trīs baktēriju kolonijas. Neapstrādātajos speķu attēlos (augšējā rindā) kolonijas vispār nav redzamas. Izmantojot apakšpikseļu korelācijas algoritmu (nobīdes noteikšana, izmantojot korelāciju, un precizēšana, izmantojot apakšpikseļu interpolāciju), tiek detektētas visas trīs kolonijas (apakšējā rinda), un var novērot to augšanu laika gaitā.



3.3. attēls. Neapstrādāts lāzera speķu attēls ar *V.natrigens* paraugu pēc 8 st., 10,5 st. un 12,5 st. izlīdzināšanu un korelācijas signāls ar izlīdzināšanu. Iegūts, izmantojot apakšpikseļu analīzi pēc 8 st., 10 st. un 12,5 st. (apakšējā rinda).

3.6. Mikrobu kolonijas veidojošo vienību agrīna noteikšana

3.6.1. Koloniju augšanas analīze, izmantojot balto apgaismojumu

Mikrobu augšana uz agara virsmas un koloniju veidošanās ir pašierobežojošs process, kas sākas ar maksimālo ātrumu, ko pakāpeniski kavē nepieciešamo barības vielu izsmelšanās, mikrobu vielmaiņas galaproduktu uzkrāšanās. Pastāv daudzi matemātiskie modeļi, kas apraksta mikrobu koloniju augšanu, un viens no izplatītākajiem ir Gomperta modelis [51], [52] (3.5. vienādojums).

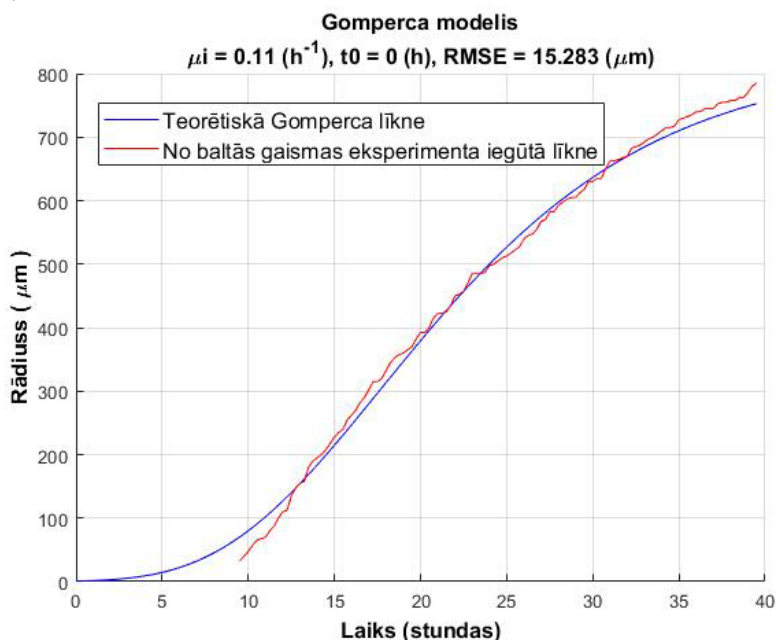
$$\mu(t) = \mu_0 \times e^{-\mu_i(t-t_0)}, \quad (3.5)$$

kur μ – specifiskais augšanas ātrums (h^{-1}); μ_0 – specifiskais augšanas ātrums kolonijas veidošanās sākumā (h^{-1}); μ_i – specifiskais inhibīcijas ātrums; t_0 – laiks kolonijas augšanas sākumā; t – faktiskais laiks (h).

Ar 3.6. vienādojumu aprakstīta kolonijas rādiusa palielināšanās kā laika funkcija.

$$r(t) = r_{\max} \times e^{-\left(\ln\left(\frac{r_{\max}}{r_0}\right) \cdot e^{-\mu_i \times (t-t_0)}\right)}. \quad (3.6)$$

3.6. vienādojums parāda kolonijas rādiusa pieaugumu, kur $r_{\max}$ – maksimālais rādiuss, ko kolonija var sasniegt konkrētajos vides apstākļos, r_0 – sākotnējais rādiuss pie t_0 , μ_i – specifiskais pieauguma ātrums apgabala līknes infleksijas punktā. Laika gaitā notiek pakāpeniska kolonijas augšanas kavēšanās, ko var aprakstīt ar μ_i . Lai izmantotu šos vienādojumus reālu CFU augšanas simulācijai, jāatrod μ_0 un μ_i . Par etalonu tika ņemti dati baltā apgaismojumā (baktērijas *Vibrio natrie*gens). Izmantojot 3.6. vienādojumu, tika aprēķināts μ_i *V. natrie*gens konkrētajā temperatūrā un barotnes apstākļos (3.4. attēls).



3.4. attēls. *V. natrie*gens kolonijas augšanas dinamika. Teorētiskā Gomperta līkne (zilā krāsā) un eksperimentālā līkne (sarkanā krāsā) *V. natrie*gens kolonijas rādiusa dinamika laika gaitā.

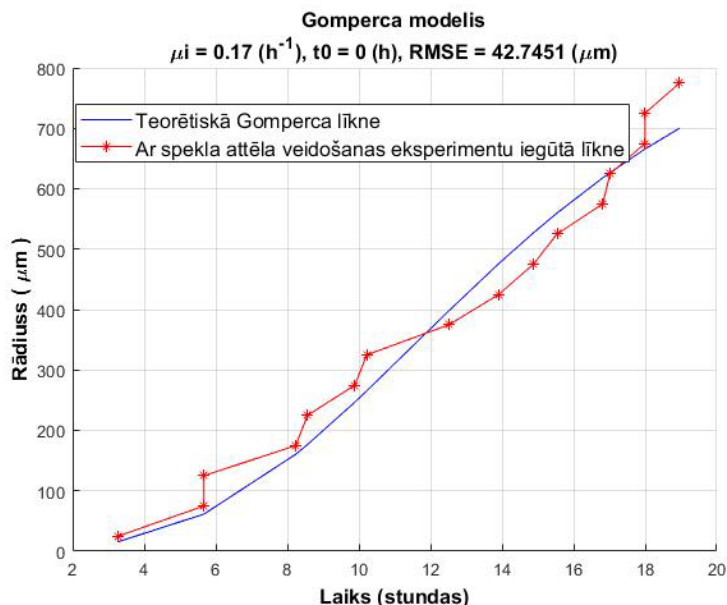
μ_i nav fiksēts skaitlis. Šis koeficients raksturo kolonijas augšanas ātruma samazināšanos laika gaitā. Parasti μ_i vienam un tam pašam organismam var atšķirties par 20–50 % [51]. Lai iegūtu parametrus no konkrētās eksperimentālo datu kopas, tika izmantota parametru skenēšana. Kā kritērijs tika izmantota vidējā kvadrātiskā kļūda (*RMSE*) līdz minimumam 3.7. vienādojumā, lai atrastu μ_i un t_0 .

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (R_{\text{Gompertz}}[i] - R_{\text{measured}}[i])^2}, \quad (3.7)$$

kur R_{Gompertz} – rādiuss, kas aprēķināts pēc Gomperta modeļa; R_{measured} – eksperimentāli noteiktais rādiuss; n – mērījumu punktu skaits.

3.6.2. Koloniju augšanas analīze, apstrādājot lāzera speķu attēlus

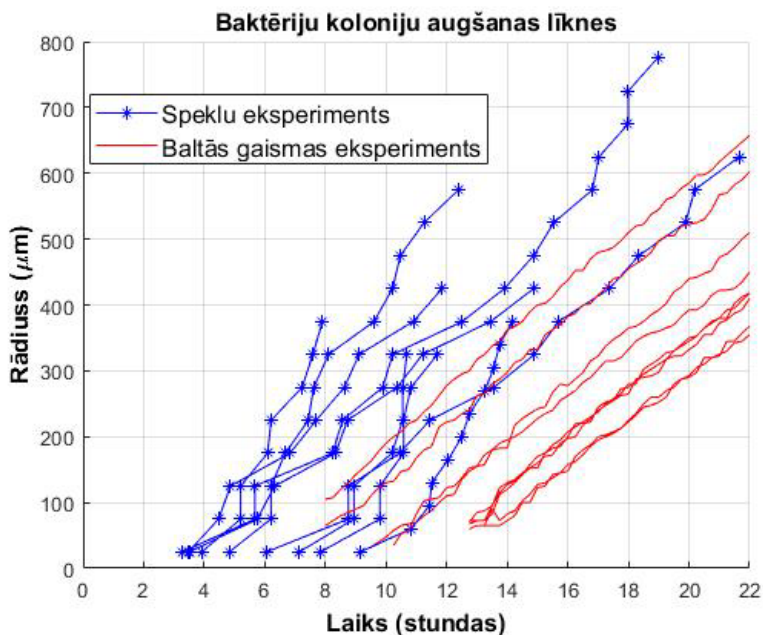
V. natriegens koloniju augšanas analīze tika veikta, izmantojot apakšpiķseļu korelācijas algoritmu. Izmantojot skenēšanas metodi vairākiem parametriem (augšanas ātrums, augšanas sākuma laiks, kolonijas maksimālais rādiuss), ir iespējams iegūt visoptimālāko piemēroto Gomperta līkni, kurā *RMSE* vērtība būs minimāla (3.5. attēls).



3.5. attēls. *Vibrio natriegens* koloniju rādiuss, kas iegūts ar speķa attēla veidošanas eksperimentu (sarkanā krāsā), teorētiskā Gomperta līkne (zilā krāsā). Interesanti, ka pirmos signālus virs sliekšņa līmeņa no speķa attēlveidošanas var iegūt jau pēc mazāk nekā trim stundām no kultivēšanas sākuma.

3.6.3. Koloniju augšanas mērījumu salīdzinājums baltajā gaismā un speķu attēlveidošanas eksperimentos

Salīdzinot abas šīs metodes, tika secināts, ka, izmantojot speķu attēlveidošanas metodi, mikrobu aktivitāti ir iespējams noteikt agrāk nekā tad, ja tiek izmantota baltās gaismas attēlveidošana (3.6. attēls).



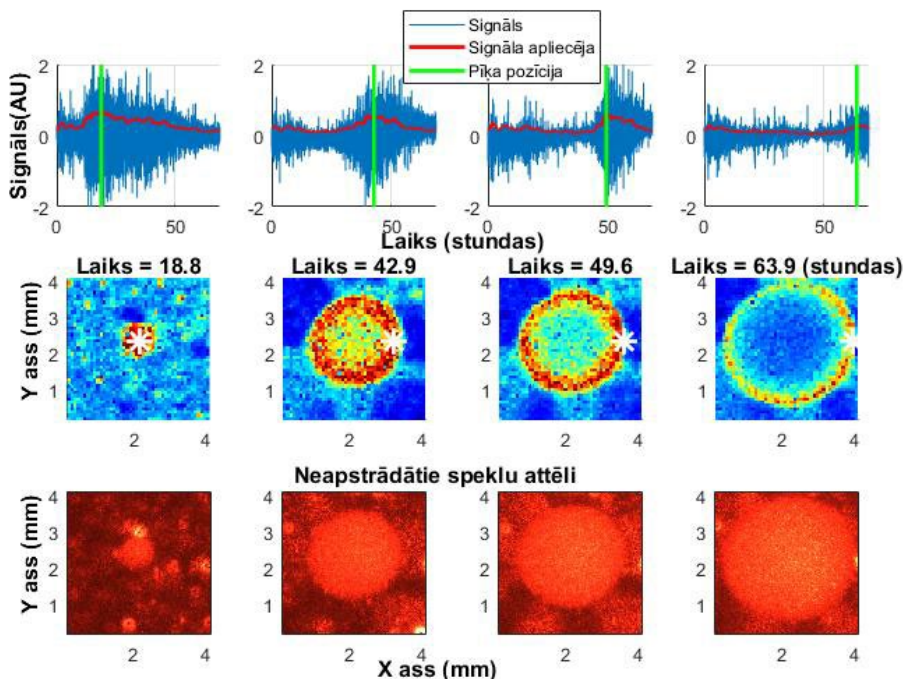
3.6. attēls. Baktēriju *Vibrio natrie gens* kolonijas augšanas līkņu salīdzinājums, kas izmērītas, analizējot lāzera speklu attēlveidošanu un vizuāli pārbaudot baltā gaismā.

Citām baktērijām, ne tikai *Vibrio natrie gens*, kā arī *Escherichia coli* un *Staphylococcus aureus* baktērijām salīdzinājuma rezultāti bija līdzīgi.

3.7. Korelācijas apakšpikseļu analīze, lai noteiktu telpiski temporālos aktivitātes paraugus kolonijas augšanas laikā

3.7.1. Augstas mikrobu aktivitātes zonu noteikšana, izmantojot lāzera speklu attēlveidošanas sistēmu

Korelācijas apakšpikseļu signāls raksturo baktēriju aktivitāti kolonijā, kas pieaug, sasniedz maksimumu un pēc tam samazinās. Maksimālā aktivitāte sākotnēji tika novērota kolonijas centrā. Laika gaitā aktivitātes “vilnis” pārvietojās no centra uz kolonijas malām (3.7. attēls). Šāda signāla uzvedība tika novērota visās testētajās mikrobu kolonijās – *S. aureus*, *E. coli* un *V. natrie gens*.



3.7. attēls. Telpiski temporāls specklu attēlveidošanas signāla sadalījums visā *S. aureus* kolonijā. Augšējā rindā – signāla dinamika laikā dažādos kolonijas punktos (baltā zvaigzne vidējās rindas grafikos). Zaļā līnija iezīmē maksimālo aktivitāti, pēc kuras signāls samazinās. Vidējā rindā – aktivitātes izmaiņas kolonijas augšanas laikā. Apakšējā rindā – neapstrādātie specklu attēli.

3.7.2. Dažādu baktēriju koloniju aktivitātes zonu analīze laika-telpas apgabalā

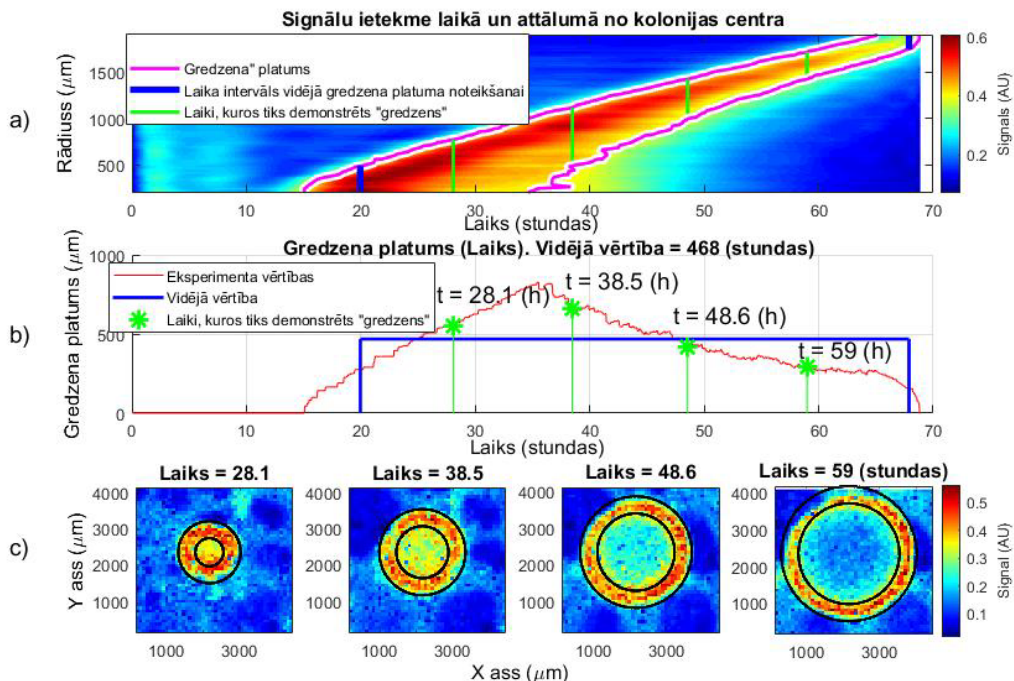
Baktēriju kolonijas augšanu ietekmē dažādi apstākļi, tāpēc signāli vienā “gredzenā” ir nedaudz atšķirīgi. Ir nepieciešams veikt visu signālu vidējo izlīdzināšanu konkrētam rādiusam, lai katrs rādiuss saņemtu vienu to raksturojošu signālu. Šādu vidējo vērtību iegūšana tika veikta, izmantojot noīsināto vidējo vērtību metodi [53], kur noīsināšana tika veikta nevis pēc amplitūdas, bet gan pēc aktivitātes maksimuma laika:

$$\overline{Env(D)} = \frac{1}{n-k_b-k_f} [Env(k_b + 1) + \dots + Env(L - k_f)], \quad (3.8)$$

kur L – signālu apliecēju skaits noteiktā attālumā; k_b un k_f – no katras puses saīsināto signālu apliecēju skaits. Iegūtie vidējie signāli tika attēloti kā attāluma no centra un laika funkcija (3.8. attēls).

3.7.3. Aktivitātes zonas telpiskais platums

Signāla platums atbilst samazinājumam no maksimālās vērtības līdz noteiktai vērtībai. Reālos apstākļos jābūt noteiktai robežvērtībai, kad signāls vēl ir atšķirams no trokšņa. Šo platumu ir iespējams atrast katram brīdim. Šis platums atbilst “gredzena” platumam attiecīgajā brīdī (3.8. attēls).



3.8. attēls. Aktivitātes "gredzena" platuma noteikšana *S. aureus* kolonijai: a) signāla vērtības un noteiktais aktivitātes gredzena platums (violetā līnija); b) iegūtais aktivitātes "gredzena" platums; c) iegūtā aktivitātes "gredzena" platuma salīdzinājums (melnās līnijas) vienai kolonijai dažādos laikos.

No 3.8. a un b attēla var secināt, ka, lai gan gredzena platuma izmaiņas ir nelielas, tās var uzskatīt par konstantām ar nelielām novirzēm. Aprakstītā uzvedība vienai izvēlētajai kolonijai tika novērota visiem šajā pētījumā aplūkotojām baktēriju tipiem. Katram baktēriju tipam "gredzena" platums ir atšķirīgs.

Pētījumā [54] ir sniegta formula aktīvās zonas jeb "gredzena" platuma aprēķināšanai:

$$r = \frac{\omega \alpha}{2} t + r_0, \quad (3.9)$$

kur ω – kolonijas aktīvās šūnu proliferācijas zonas platums; r – kolonijas rādus laikā t ; r_0 – rādus laikā $t = 0$; α – īpatnējais augšanas ātrums, kas pazīstams arī kā μ (h^{-1}) un ko var atrast Gomperta vienādojumā (3.6. vienādojums). Tādējādi, iegūstot eksperimentālos datus (kolonijas augšanas rādus, attiecīgais laiks un μ), ir iespējams aprēķināt aktīvās zonas platumu vai "gredzena" platumu, izmantojot 3.9. vienādojumu.

3.8. Nodaļas secinājumi

Mikrobu koloniju augšanu lāzera apgaismojums neietekmēja, un iegūtās augšanas līknes bija ļoti līdzīgas tām, kas iegūtas, kultivējot baltā gaismā. Ierosinātā metode, kas balstīta lāzera speklu attēla modeļu analīzē ar korelācijas apakšpiķeļu analīzi, nodrošina agrīnāku augošo

baktēriju reakciju, salīdzinot ar klasisko *CFU* augšanas noteikšanu baltā gaismā, tādēļ koloniju noteikšanas laiku ir iespējams samazināt divas vai vairāk reizes. Tādējādi speklu attēlveidošana piedāvā vēl nebijušas analītiskas iespējas *CFU* augšanas noteikšanai ievērojami agrāk nekā vizuālā pārbaude baltā gaismā.

Speklu attēlveidošanas metode ar sensitīvu korelācijas apakšpikselu analīzi atklāja, ka kolonijā pastāv atšķirīgas aktivitātes zonas, kas kolonijas augšanas laikā migrē no centra uz malām. Dažādām mikrobu sugām novēroja līdzīgu aktivitātes zonas (“gredzena”) migrācijas modeli kolonijās. “Gredzena” migrācijas ātrums dažādām mikrobu sugām atšķīrās, tādējādi atspoguļojot katrai no šīm sugām raksturīgo atšķirīgo augšanas ātrumu. Šī ir daudzsološa un jaudīga tehnoloģija, kas palīdz vizualizēt aktivitātes zonas mikrobu kolonijā. Iepriekš šo zonu klātbūtne tika matemātiski prognozēta.

Pilnajā promocijas darba tekstā ir parādīts, ka, lai gan baltā gaismā veiktā attēlveidošana skaidri parāda koloniju klātbūtni, apakšpikseļu korelācijas analīzes metode baltajā gaismā nedarbojās. Nedz koloniju augšanu, ne gredzenu efektu nevarēja noteikt, izmantojot apakšpikseļu korelācijas analīzi baltajā gaismā. Tās ir priekšrocības, ko sniedz darbs ar speklu attēla izmantošanu, salīdzinot ar balto gaismu.

4. LĀZERA SPEKLU ATTĒLVEIDOŠANAS IZMANTOŠANA ANTIBAKTERIĀLĀS JUTĪBAS AGRĪNAI NOTEIKŠANAI DISKU DIFŪZIJAS TESTOS

Pamatojoties uz definētajiem mērķiem un uzdevumiem, promocijas darba kopsavilkuma ceturtajā nodaļā kā pētniecības objekts ir aprakstīts piedāvātās analīzes metodes lietojums antibakteriālās jutības agrīnai noteikšanai disku difūzijas testos. Nodaļā ietverts eksperimentāls apstiprinājums agrīnas noteikšanas iespējām baktēriju reakcijai uz antibiotikām un analizēts inhibīcijas (jeb sterilās) zonas izmēra maiņas matemātiskais modelis.

4.1. Nodaļas ievads

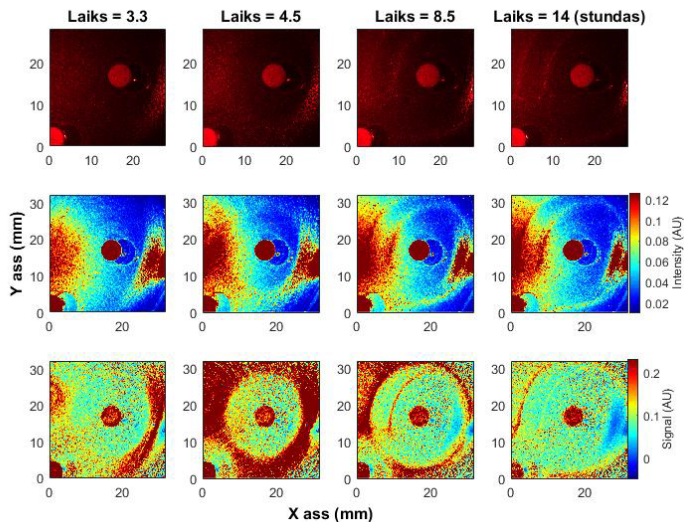
Ātra patogēna identifikācija un tā jutības pret antibiotikām noteikšana var nodrošināt mērķtiecīgu farmakoloģisku iejaukšanos agrīnā slimības stadijā, palielinot pacienta izdzīvošanas iespējas. *EUCAST* standartizētajiem fenotipiskās rezistences testiem, piemēram, diska difūzijas un E-testa testam, rezultātu iegūšanai nepieciešamas 16–24 stundas [55]. Tādēļ ir vajadzīgas jaunas metodes, lai ātrāk noteiktu mikroorganismu izmaiņas. Ierosinātā lāzera speklu attēlveidošanas metode ar korelācijas apakšpikseļu analīzi ļauj noteikt dinamiku un izmaiņas inhibīcijas zonā, ko nav iespējams novērot ar klasiskajām metodēm, un iegūt inhibīcijas zonas diametru agrāk nekā ar diska difūzijas metodi, ko iesaka Eiropas Antimikrobiālās uzņēmības testēšanas komiteja (*EUCAST*). Šie rezultāti varētu uzlabot inhibīcijas zonas diametra izmaiņu matemātiskos modeļus ap antimikrobiālo vielu saturošu disku.

4.2. Rezultātu salīdzinājums, kas iegūti, izmantojot lāzera speklu metodi bez algoritma un ar to

Šajā apakšnodaļā ir salīdzināta inhibīcijas zonas uzvedība neapstrādātiem speklu attēliem un speklu attēliem, kas apstrādāti, izmantojot apakšpikseļu korelācijas analīzi. Aplūkojiet baktērijas, kas ir jutīgas pret konkrēto antibiotiku (4.1. attēls)!

Korelācijas apakšpikseļu algoritms ļauj noteikt submikronu baktēriju notikumus (piemēram, inhibīcijas zonas veidošanos) ātrāk nekā bez algoritma (4.1. attēls). Var novērot, ka, izpildot algoritmu eksperimentā, inhibīcijas zonu var noteikt pēc 3,3 stundām, bet bez tā inhibīcijas zonu var noteikt ne agrāk kā pēc 4,5 vai vairāk stundām.

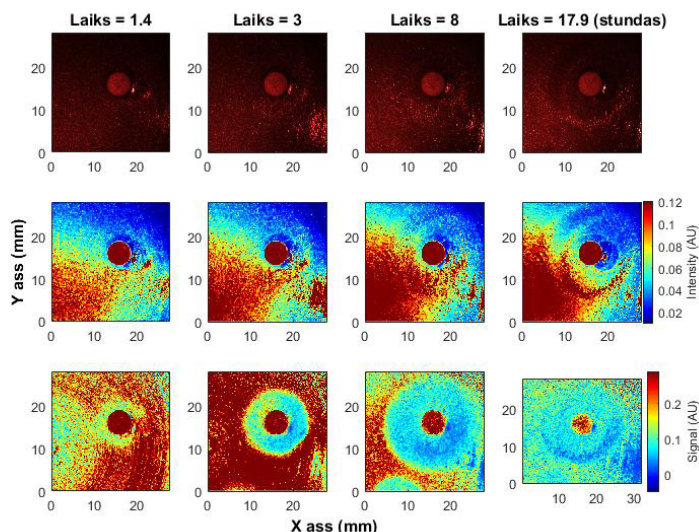
Interesantu rezultātu var novērot, kad baktērijas ir pilnīgi rezistentas pret antibiotiku, pamatojoties uz neapstrādātiem speklu attēliem, un inhibīcijas zona vispār nav novērojama, savukārt apakšpikseļu korelācijas analīze pierāda zonas veidošanos (demonstrēts promocijas darba pilnajā tekstā). Tas liecina, ka dažās situācijās inhibīcijas zona var veidoties pat tad, ja “ar neapbruņotu aci” tā vispār netiek konstatēta.



4.1. attēls. Inhibīcijas zonas izmaiņas laikā. Baktērijas: *E. coli*, antibiotika *CIP* 5 μg . Neapstrādāti lāzera speklu attēli laikā (augšējā rindā), attēli, kas apstrādāti ar izlīdzināšanas filtru, un kontrasta uzlabojumi (vidējā rindā) un iegūtie attēli pēc apakšpiķeļu korelācijas analīzes (apakšējā rindā).

4.3. Agrīna inhibīcijas zonas veidošanās noteikšana

Inhibīcijas zona parādās “pēkšņi” 3–4 stundas pēc eksperimenta sākuma, un tai uzreiz ir noteikts rādiuss. Lai labāk izprastu šos procesus, tika veikti jauni eksperimenti.



4.2. attēls. Antibiotikas ievada 4–4,5 stundas pēc baktēriju inokulēšanas. Inhibīcijas zonas izmaiņas atkarībā no laika. Baktērijas: *E. coli*, antibiotika *CIP* 5 μg . Neapstrādāti lāzera speklu attēli laikā (augšējā rindā), attēli, kas apstrādāti ar izlīdzināšanas filtru, un kontrasta uzlabojumi (vidējā rindā) un iegūtie attēli pēc apakšpiķeļu korelācijas analīzes (apakšējā rindā).

Antibiotiku diski tika novietoti uz virsmas 4–4,5 stundas pēc baktēriju inokulēšanas (nevis uzreiz). Baktēriju aktivitāti var noteikt 3–4 stundas pēc inokulācijas (3. nodaļa). Inhibīcijas zona ir pamanāma tikai pretstatā baktēriju aktivitātei; attiecīgi līdz šim brīdim tā arī nav redzama. Paredzams, ka antibiotiku disku uzklāšana 4–4,5 stundas pēc baktēriju inokulācijas uzreiz ļautu iegūt inhibīcijas zonas veidošanos.

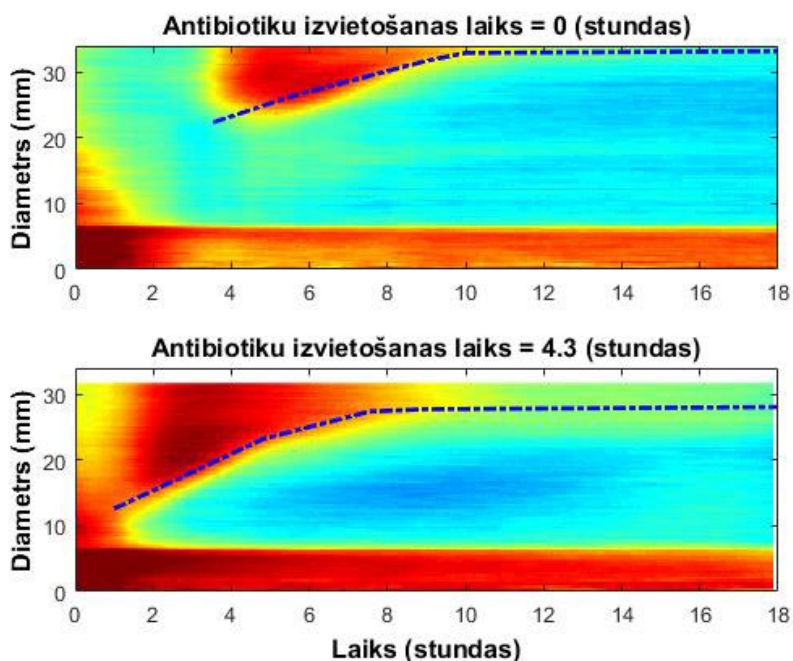
Šo efektu var novērot signālā, kas ir proporcionāls aktivitātei, t. i., pēc apakšpiķeļu korelācijas analīzes. Novērojot neapstrādātos spekla attēlus, šis efekts var nebūt pamanāms, jo tajos netiek novērota baktēriju aktivitāte, bet gan to klātbūtne (4.2. attēls).

4.4. Inhibīcijas zonas izmaiņu telpiski temporālā analīze

Inhibīcijas zonas veidošanos raksturo aktivitātes samazināšanās. Tas nozīmē, ka tiek meklēts kritums pēc signāla apvalka maksimumiem. Lai izvairītos no trokšņa ietekmes, ir lietderīgi izteikt vidējo signālu apliecēju katrā rādiusā, tam attālinoties no centra (no antibiotikas) (4.1. vienādojums).

$$\overline{Env}[r, n] = \left[\frac{1}{M_{R1}} \sum_{m_{R1}=1}^{M_{R1}} Env_{m_{R1}}[n], \dots, \frac{1}{M_{Rk}} \sum_{m_{Rk}=1}^{M_{Rk}} Env_{m_{Rk}}[n] \right], \quad (4.1)$$

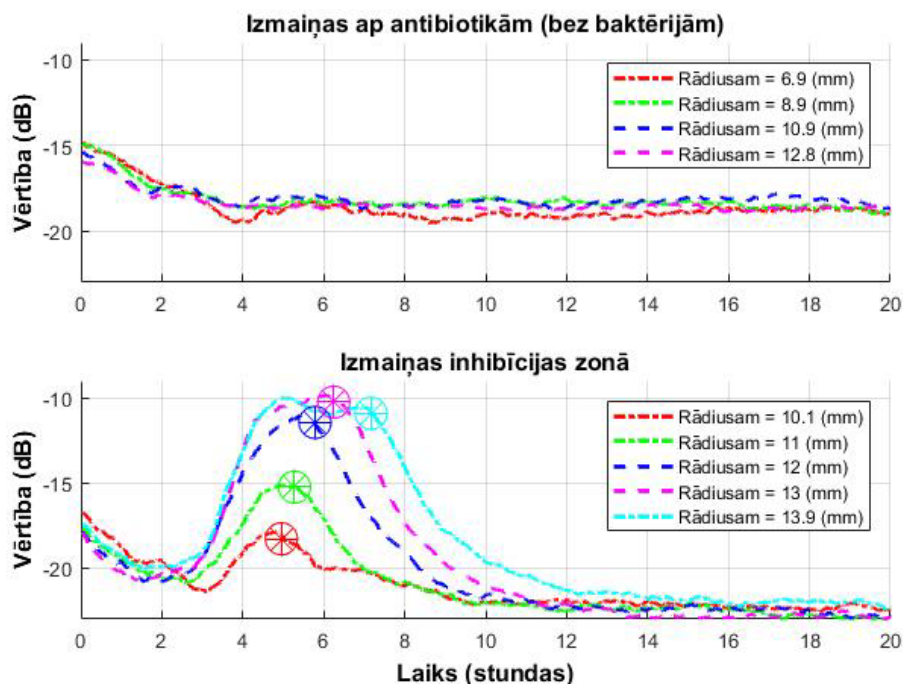
kur M_{Rk} – signālu apliecēju skaits noteiktā attālumā/rādiusā no centra.



4.3. attēls. *E. coli* augšana ap ciprofloksacīna disku (5 µg). Inhibīcijas zonas telpiski temporālās izmaiņas. 1) Antibiotika ir novietota uzreiz aiz baktērijām (augšpusē). 2) Antibiotika ir ievietota 4,3 stundas pēc baktēriju inokulācijas (apakšpusē).

Signāla krituma sākums varētu liecināt par inhibīcijas zonas parādīšanos šajā vietā. Situācijā, kad antibiotikas ir novietotas bez baktērijām, šāda uzvedība netika konstatēta (4.4. attēls).

Apvienojot visu rādīsu vidējās signālu apliecējas, var iegūt telpiski temporālo attēlu. 4.3. attēlā (augšpusē) redzams gadījums ar baktērijām, kas ir jutīgas pret antibiotikām. Antibiotika tika novietota uz Petri trauciņa uzreiz pēc baktēriju inokulēšanas. Var novērot, ka pirms 3,5–4 stundām nav novērojama nekāda reakcija laikā un telpā. Tas ir iepriekš aprakstītā iemesla dēļ – baktēriju aktivitāte nav pamanāma; attiecīgi nav redzama inhibīcijas zona. Aplūkojiet līdzīgus attēlus, kad antibiotika tika novietota uz Petri trauciņa 4–4,5 stundas pēc baktēriju inokulācijas (4.3. attēls (apakšpusē))! Tad šāda “pārtraukuma” nav, un telpiski temporālais attēls ir nepārtraukts.



4.4. attēls. Signālu apliecēju izmaiņas laika gaitā vairākiem dažādiem rādīsiem ap antibiotiku: bez baktērijām (augšējā rindā) un ar baktērijām (apakšējā rindā). Apakšējā grafikā redzams, ka, attālinoties no centra, kritums (kas nozīmē inhibīcijas zonas parādīšanos šajā vietā) notiek vēlāk (zvaigznītes aplī).

4.5. Inhibīcijas zonas izmēra izmaiņu matemātiskais modelis

Saskaņā ar pētījumu [56] inhibīcijas zonas rādiuss ir izteikts ar 4.2. vienādojumu.

$$r = \sqrt[2]{4D(\ln(c) - \ln(MIC)) \times t}, \quad (4.2)$$

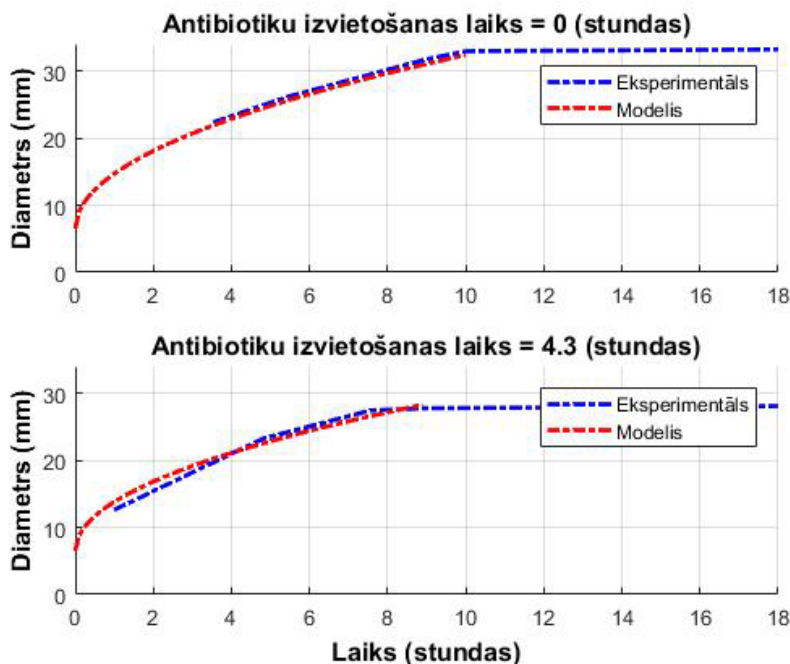
kur c – antibiotiku koncentrācija; MIC – minimālā inhibējošā koncentrācija; t – antibiotiku difūzijas laiks; D – difūzijas koeficients, ko iegūst no Fika otrā difūzijas likuma [57] (4.3. vienādojums).

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(x,t)}{\partial x^2}. \quad (4.3)$$

Modelī ir trīs nezināmie – MIC , D , c , kurus kopā ar skaitli 4 var aizstāt ar vienu konstanti. Tādējādi tiek iegūta vienkārša sakarība starp inhibīcijas zonas rādiusu un laiku (4.4. vienādojums).

$$r = \sqrt[2]{\text{const} \times t} . \quad (4.4)$$

Pēc eksperimentālo līkņu iegūšanas ir iespējams izvēlēties šīs konstantes parametru, kas ir vistuvāk modelim. Aplūkojiet to pašu baktēriju – *E. coli* – un to pašu antibiotiku – ciprofloksacīnu, bet divos dažādos gadījumos: 1) antibiotikas ir novietota uzreiz pēc baktērijas; 2) antibiotika ir novietota 4,3 stundas pēc baktērijas (4.3. attēls)! Rezultāti parādīti 4.5. attēlā.



4.5. attēls. Eksperimentālo datu un *E. coli* modeļa telpiski temporālās līknes ap ciprofloksacīna disku (5 μ g).

Katrai jutīgai baktērijai ir jāatrod parametru kopums pret katru antibiotiku. Rezistentu baktēriju gadījumā šīs līknes var būt neprognozējamas, un tad aproksimācija šeit nedarbosies.

4.6. Nodaļas secinājumi

Šajā nodaļā tika novērtēta klīniski nozīmīga inhibīcijas zonas dinamika un izmaiņas, apstrādājot lāzera speklu attēlus ar korelācijas apakšpiķeļu analīzi. Inhibīcijas zonu var noteikt uz “signāla klātbūtnes” fona tikai tad, kad baktērijas jau ir redzamas (pēc 3–4 stundām). Tomēr, ja antibiotiku uz Petri trauciņa uzliek 4–4,5 stundas pēc baktēriju inokulēšanas, baktērijas ir pietiekamā koncentrācijā, lai tās būtu redzamas gandrīz uzreiz ar apakšpiķeļu korelācijas metodi. Novērojot neapstrādātos lāzera speklu attēlus, šajā gadījumā inhibīcijas zona nav

redzama uzreiz, bet gan pēc vairāku stundu kavēšanās (aptuveni piecu stundu kavēšanās). Tas liecina, ka izveidotā metode ļauj novērot nelielas aktivitātes izmaiņas, ko nav iespējams novērot neapstrādātajos datos.

Daudzas plaša spektra antibiotikas tiek lietotas ar 6 stundu līdz 8 stundu intervālu. Turpmākie identifikācijas un antibiotiku jutības testēšanas (*ID/AST*) metožu sasniegumi būtu jākoncentrē uz rezultātu sniegšanu šajā laika posmā, kas ļautu laikus koriģēt antibiotiku terapiju, lai optimizētu pacientu aprūpi [58].

Šajā nodaļā parādītā inhibīcijas zonas augšanas līkņu matemātiskā modeļa precizitāte ir pārbaudīta, salīdzinot ar eksperimentāli iegūtajām līknēm. Katrai jutīgai baktērijai, lai agrīni noteiktu inhibīcijas zonas rādiusu, šīs līknes būs atšķirīgas, un ir jāatrod parametru kopums katrai baktērijai pret katru antibiotiku. Tomēr šī aproksimācija nedarbosies attiecībā uz rezistentām baktērijām. Tāpēc ir vērts pievērst uzmanību citām prognozēšanas metodēm, piemēram, balstītām mākslīgajā intelektā.

5. MĀKSLĪGĀ NEIRONU TĪKLA IZMANTOŠANA, LAI ANALIZĒTU SPEKLU DATUS AUGOŠU UN NEAUGOŠU BAKTĒRIJU KOLONIJU UN ZONU KLASIFICĒŠANAI

Pamatojoties uz definētajiem mērķiem un uzdevumiem, promocijas darba kopsavilkuma piektajā nodaļā aprakstīta mākslīgā intelekta izmantošana, lai analizētu speklu attēla datus pirms un pēc korelācijas apakšpikseļu analīzes. Tas tiek darīts, lai klasificētu starp augošām (aktīvām) kolonijām un neaktīvām vai starp aktīvas augšanas un inhibīcijas zonām ap antibiotiku diskus. Nodaļā aplūkots iepriekš aprakstīto situāciju klasifikācijas iespēju eksperimentāls apstiprinājums.

5.1. Nodaļas ievads

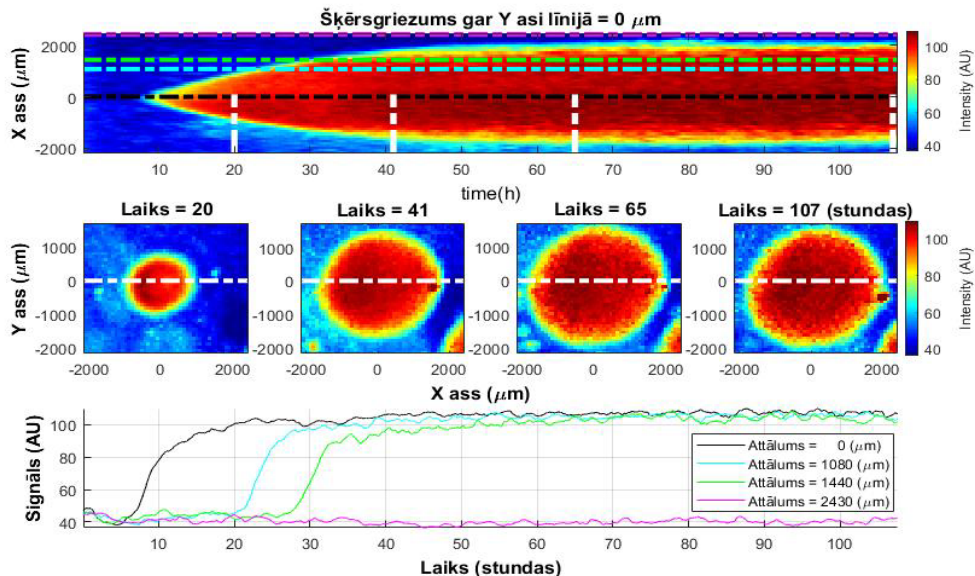
Šajā nodaļā ir pamatota lāzera spekla attēlveidošanas spēja klasificēt kolonijas (vai zonas ar mikroorganismiem) kā aktīvas vai neaktīvas, kas nav redzamas baltā gaismā. Šī analītiskā spēja ir noderīga, lai pētītu ķīmisko vielu, piemēram, antibiotiku, ietekmi uz baktēriju augšanas dinamiku. Tiek izmantoti divu veidu lāzera spekla attēla dati: 1) neizmantojot apakšpikseļu korelācijas metodi, kas kalpo baktēriju klātbūtnes identificēšanai; 2) ar jutīgu apakšpikseļu korelācijas algoritmu, kas nosaka baktēriju aktivitātes statusu – aug vai neaug. Klasifikācijai tika izmantoti mākslīgie neironu tīkli (*ANN*) [59].

5.2. Rīki augošu/neaugošu baktēriju koloniju klasificēšanai

5.2.1. Koloniju analīze ar lāzera speklu attēlveidošanas metodi gandrīz bez papildu apstrādes

Tālākā darba gaitā tika pārbaudīti baktēriju kolonijas mērījumi 100 stundu laikā saskaņā ar 1. datu tipu. Sākotnējās 45–50 stundās kolonija aktīvi aug. Pēc tam augšana apstājas, iespējams, barības vielu izsīkuma dēļ. Izpētot kolonijas šķērsriezuma diametru kā laika funkciju, atklājas zināma augšanas dinamika (5.1. attēls). Sasniedzot noteiktu diametru, kolonija pārstāj augt. Neskatoties uz baktēriju klātbūtni visā aizņemtajā diametrā, nav skaidrs, vai tās atrodas augšanas vai stagnācijas stāvoklī.

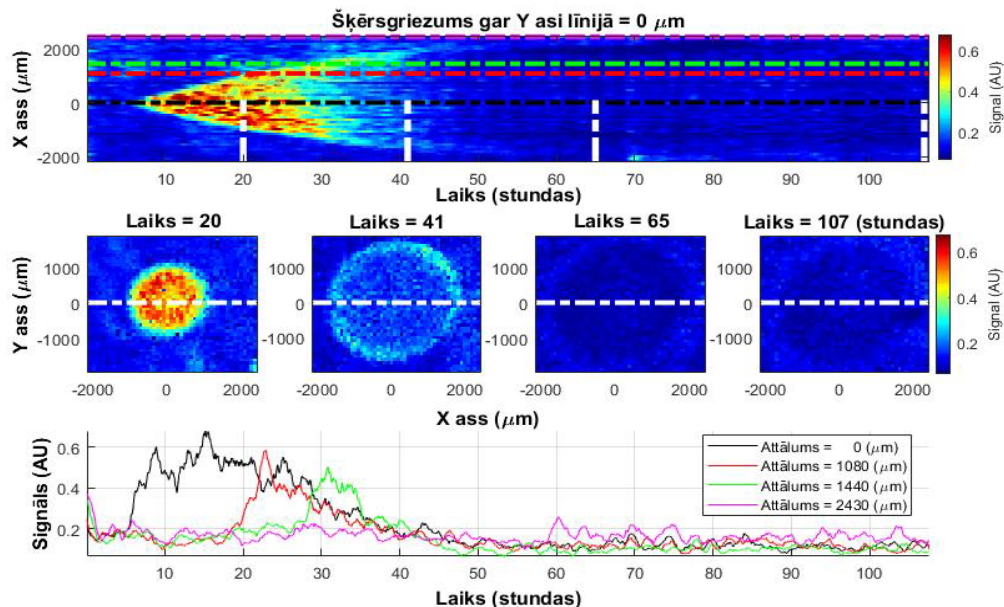
Intensitātes līmeņi dažādos attālumos no kolonijas centra (5.1. attēls, apakšējā rinda) parāda intensitātes pieaugumu dažādos laika intervālos atkarībā no attāluma no centra. Kad ir sasniegts konkrēts intensitātes līmenis, tas paliek relatīvi nemainīgs. Tomēr šī informācija nesniedz pietiekamus pierādījumus, lai secinātu par kolonijā notiekošajām bioloģiskajām darbībām.



5.1. attēls. Lāzera speklu attēlveidošanas atstarošanas intensitātes sadalījums *V. natriegens* kolonijā laikā un telpā. Kolonijas šķērsgriezuma intensitātes izmaiņas laika gaitā (augšpusē) un kolonijas izmērs konkrētos laika momentos (vidējā rindā). Baltās līnijas augšējā attēlā nosaka šķērsgriezuma demonstrēšanas laiku vidējās rindas attēlos. Dažādu krāsu līnijas augšējā un apakšējā attēlā norāda intensitātes līmeņa mērījumus kolonijas centrā un dažādos attālos no kolonijas centra (apakšpusē).

5.2.2. Lāzera speklu attēla metode ar apakšpikseļu korelācijas analīzi atklāj augšanas izmaiņas kolonijā

Baktēriju kolonijas augšanas dinamikas izmaiņas var konstatēt, izmantojot lāzera speklu attēlveidošanas metodes ar korelācijas apakšpikseļu analīzi (otrais algoritms). Novērojumi liecina, ka, sasniedzot noteiktu diametru, augšana apstājas. Signāls, kas liecina par baktēriju aktivitāti, sāk vājināties un izzūd (5.2. attēls, augšējā un vidējā rinda). Kļūst skaidrs, ka kolonijas augšana ir apstājusies.



5.2. attēls. Aktivitātes signāla sadalījums *V. natriegens* kolonijā laikā un telpā. Kolonijas šķersgriezuma aktivitātes signāla izmaiņas laika gaitā (augšpusē) un kolonijas aktivitātes signāls konkrētos laika brīžos (vidējā rindā). Baltās līnijas augšējā attēlā nosaka šķersgriezuma demonstrēšanas laiku vidējos attēlos. Dažādu krāsu līnijas augšējā un apakšējā attēlā norāda mērījumu signālus kolonijas centrā un dažādos attālumos no kolonijas centra (apakšpusē).

Aplūkojot signālu līknes gar laika asi dažādos attālumos no kolonijas centra (5.2. attēls, apakšējā daļa), var novērot, ka baktēriju augšana (kas izpaužas kā augstas signāla vērtības) migrē uz āru no centra. Sākotnēji spēcīgākais signāls ir novērojams centrā, un, palielinoties attālumam no centra, tas samazinās. Laika gaitā signāls samazinās un izzūd aptuveni 45–50 stundas pēc eksperimenta sākuma, kas atbilst baktēriju augšanas pārtraukšanai kolonijā.

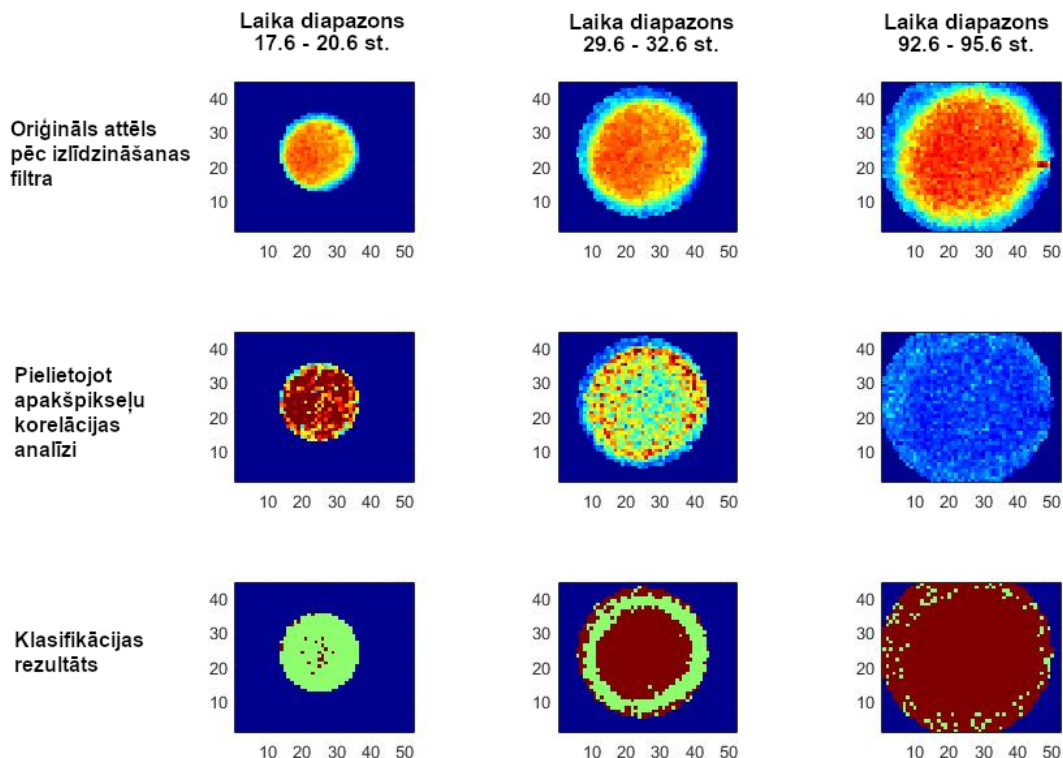
Novērotā uzvedība bija konsekventa dažādos eksperimentos un dažādām baktēriju sugām, piemēram, *E. coli* un *S. aureus*.

Lai noteiktu vispārējo tendenci un samazinātu trokšņa ietekmi, signālu apliecēju mediāna tiek aprēķināta katram rādiusam ap visu koloniju. Detalizēts apraksts ir pieejams promocijas darba pilnā versijā tekstā. Šī procedūra ļauj novērot “kopējā” signāla uzvedību kā laika un attāluma funkciju.

5.2.3. Automātiska klasificēšana starp augošām un neaugošām baktēriju kolonijām, izmantojot mākslīgo neironu tīklu

Šajā apakšnodaļā parādīta iespēja klasificēt aktīvas un neaktīvas baktēriju kolonijas saskaņā ar iepriekšējās nodaļas aprakstītajām pazīmēm (5.3. attēls). Mācību kopa sastāv no 10 dažādām kolonijām, kas aptver trīs baktēriju sugas. Šajos mācību eksperimentos augšanas ilgums ir 25–68 stundas. Testa kopa ir *V. natriegens* kolonijas ar ilgāku novērošanas laiku – 107 stundas. Signāli ir sadalīti trīs stundu sekcijās. Tika izmantoti divu veidu dati (skat. iepriekš). Apkopotie

dati ietver tūkstošiem signālu par katru koloniju gan mācību, gan testa kopā. Tika izmantots daudzslāņu perceptrons (*MLP*).



5.3. attēls. Klasifikatora veikspēja dažādos laikos. Attēli augšējā rindā ir neapstrādāti koloniju attēli pēc izlīdzināšanas filtra. Centrālie attēli – apakšpikseļu korelācijas analīze. Attēli apakšējā rindā – klasifikācijas rezultāts. Visos attēlos zilā krāsā apzīmē ārpus kolonijas esošo reģionu. Apakšējos attēlos (klasifikācijas rezultāts) neaugošu zonu rezultāts apzīmēts brūnā krāsā, augošu zonu rezultāts – zaļā krāsā.

Šo metodoloģiju varētu plašāk izmantot gan pētniecībā, gan praksē, piemēram, baktēriju rezistences pret antibiotikām uzraudzībai vai jaunu antimikrobiālo savienojumu efektivitātes novērtēšanai.

5.3. Inhibīcijas un aktīvo baktēriju augšanas zonu ap antibiotikas diskiem klasificēšana, izmantojot neironu tīklu

5.3.1. Signāla uzvedības tendence antibiotiku diskos, kas atrodas dažādos rādiusos no antibiotiku diska

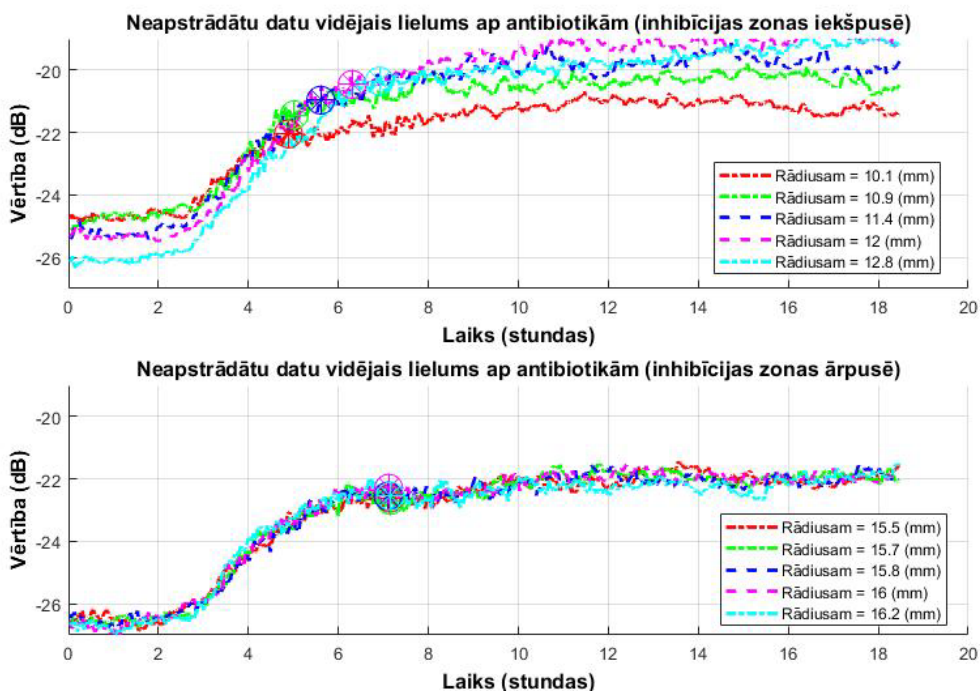
Kā jau aprakstīts 4. nodaļā, pēc antibiotiku ievietošanas barotnē ar baktērijām antibiotikas ap sevi sāk veidot inhibīcijas zonu, kurai ir gandrīz apla forma un kas laika gaitā palielinās.

Aplūkojiet pirmā veida datu uzvedību (5.4. attēls)! Inhibīcijas zonas veidošanos raksturo augšanas apstāšanās. Brīdī, kad antibiotiku iedarbība sasniedz izmērīto zonu, datu vērtība

pārstāj palielināties. Tādējādi, jo tuvāks ir attālums līdz antibiotikām, jo: 1) datu vērtību pieauguma pārtraukšana notiks agrāk; 2) sasniegtā vērtība būs zemāka nekā vērtības tālākā attālumā. Tas nozīmē, ka signālu formai vienādā rādiusā no antibiotikām jābūt līdzīgai. Ņemot vērā to, ka šīs vērtības ir zemākas par vērtībām ārpus inhibīcijas zonas un attiecīgi jutīgākas pret trokšņa ietekmi, ir vērts veikt datu mediānu katrā rādiusā, attālinoties no centra (no antibiotikas) [47], [53], [60], (5.1. vienādojums).

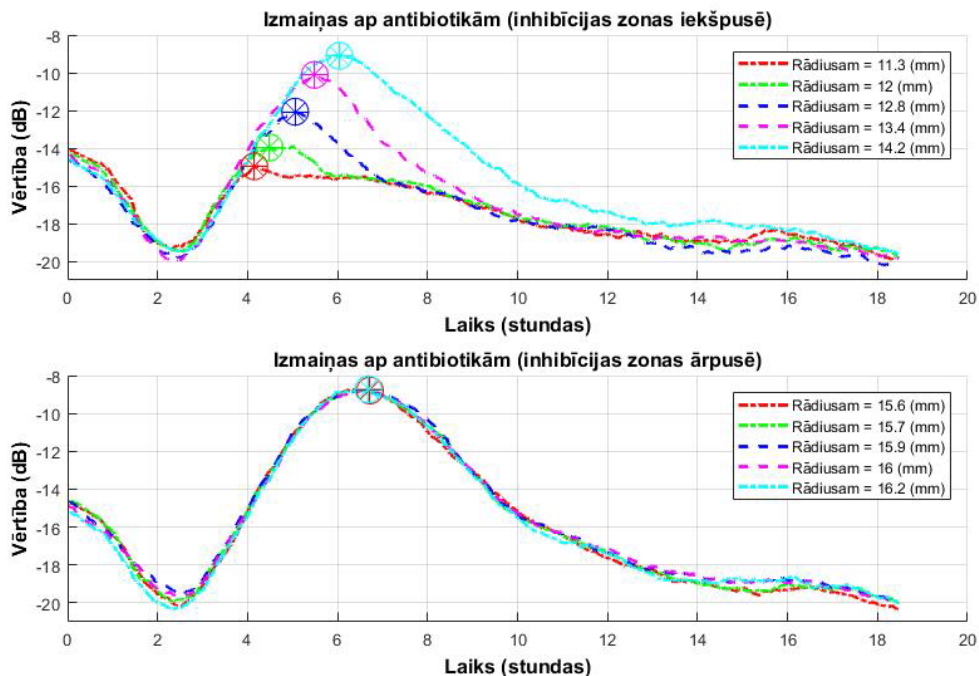
$$\overline{Env[r, n]} = [\text{median}_{\{over\ m_{r1}\}}(Env[m_{r1}, n]), \dots, \text{median}_{\{over\ m_{rk}\}}(Env[m_{rk}, n])], \quad (5.1)$$

kur m_{rk} – signālu apliecēju skaits noteiktā attālumā/rādiusā (k) no centra.



5.4. attēls. Pirmā tipa signāla (neizmantojot apakšpiķeļu korelācijas metodi) mediāna zonām, kas atrodas noteiktā attālumā no antibiotikas centra. Augšpusē – inhibīcijas zona. Apakšpusē – ārpus inhibīcijas zonas (ar aktīvām baktērijām). Augšējā grafikā redzams, ka, attālinoties no centra, datu vērtības pieauguma pārtraukšana (kas nozīmē inhibīcijas zonas parādīšanos šajā vietā) notiek vēlāk. Ārpus inhibīcijas zonas (apakšējais grafiks) vērtības pieauguma pārtraukšana notiek daudz vēlāk un dažādiem rādiusiem vienlaikus. Aplī norāda datu vērtību pieauguma pārtraukšanu.

Aplūkojot otro datu veidu, inhibīcijas zonu raksturo aktivitātes samazināšanās pēc signālu maksimālajām vērtībām. Lai parādītu signāla uzvedību, tāpat kā iepriekšējā gadījumā, ir jāveic ietversignālu mediāna katrā rādiusā (5.1. vienādojums). Attālinoties no antibiotikām, krituma laiks būs vēlāks. Signāli rādiusiem ārpus inhibīcijas zonas būs ļoti līdzīgi viens otram. Kritums notiks vēlāk un gandrīz vienlaikus, domājams, barības vielu izsīkuma dēļ (5.5. attēls).



5.5. attēls. Otrā tipa signāla (ar apakšpiķeļu korelācijas algoritmu) mediāna zonām, kas atrodas noteiktā attālumā no antibiotikas centra. Augšpusē – inhibīcijas zona. Apakšpusē – ārpus inhibīcijas zonas (ar aktīvām baktērijām). Augšējā grafikā redzams, ka, attālinoties no centra, kritums (kas nozīmē inhibīcijas zonas parādīšanos šajā vietā) notiek vēlāk. Ārpus inhibīcijas zonas (apakšējais grafiks) signāls krīt daudz vēlāk un dažādiem rādiusiem vienlaikus. Šajā gadījumā kritums nav saistīts ar antibiotikām, bet gan ar citiem iemesliem (piemēram, barības vielu izsīkšanu).

Tādējādi abi datu veidi parāda beznosacījumu atšķirību starp signāliem inhibīcijas zonā un ārpus tās. Tomēr korelācijas apakšpiķeļu signāls labāk ļauj atšķirt zonas.

5.3.2. Neironu tīkls klasificēšanai

Galvenais neironu tīkla izmantošanas mērķis šajā nodaļā ir veikt klasifikāciju starp divām klasēm: 1) aktīvas baktēriju augšanas zonas; 2) inhibīcijas zonas.

Pilnajā promocijas darba tekstā aprakstīti apsvērumi neironu tīkla projektēšanai [61]–[63]. Pamatojoties uz šiem apsvērumiem, tīkla parametri ir šādi: tīkls ir daudzslāņu perceptrons [59]: 1) divi slēptie slāņi. Pirmajā slēptajā slānī ir 30 neironu. Otrais slēptais slānis ir 20 neironi, un izejas slānis ir 2 neironi, atkarībā no klašu skaita – baktērijas vai inhibīcijas zona; 2) mācīšanās koeficients = 0,03; 3) moments jeb kustības ātrums = 0,5; 4) *Epochs* = 200.

Lai apmācītu neironu tīklu, tika izmantoti astoņi eksperimenti ar *E. coli* baktērijām. Katrā no šiem eksperimentiem tika izmantots gandrīz vesels Petri trauciņš, kurā tika novietotas divas antibiotikas, ap kurām tika izveidotas inhibīcijas zonas. Katrā eksperimentā bija aptuveni 80–100 tūkstoši viena tipa signālu un tikpat daudz otra tipa signālu ar garumu T (15–18 (h)). Signāli tika sadalīti laika logos pa 1 stundai, lai šajā īsajā laika periodā iegūtu klasifikācijas rezultātu.

5.3.3. Rezultāti

Šajā apakšnodaļā ir aprakstītas divas metodes klasifikācijas rezultātu uzlabošanai, izmantojot zināšanas par antibiotiku atrašanās vietu un inhibīcijas zonas augšanas procesu, izmantojot signālu apstrādi.

5.3.3.1. Klasificēšanas rezultātu uzlabošana, izmantojot klases maiņas funkciju kā attālumu no antibiotikām

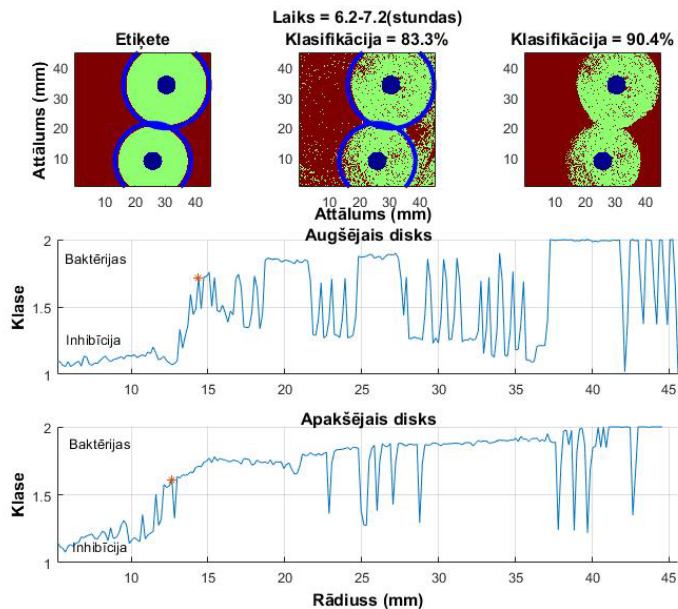
Ņemot vērā to, ka: 1) ap antibiotikām veidojas inhibīcijas zonas un ir zināma antibiotiku atrašanās vieta un lielums; 2) inhibīcijas zona aug formā, kas ir līdzīga aplim, klasifikācijas rezultātu var uzlabot. Šim nolūkam katrā 1 stundas ilgā laika logā tiek veikta katrā rādiusā iegūto klases vērtību mediāna, tai attālinoties no antibiotikām uz malām. Klasi, kas raksturo inhibīcijas zonu, var apzīmēt kā 1. klasi, bet klasi, kas raksturo zonu ar baktērijām, var apzīmēt kā 2. klasi. Rādiusā, kas atrodas tuvu antibiotikām, klases rezultāta mediāna būs tuvu 1 (jo tā ir inhibīcijas zona). Tālāk no antibiotikas esošajā rādiusā klases rezultāta mediāna būs tuvu 2 (jo tā ir zona ar aktīvām baktērijām). Attālums, kādā notiek pāreja no 1. klases uz 2. klasi, atbilst inhibīcijas zonas rādiusam katrā attiecīgajā laika logā (5.2. vienādojums).

$$(Class(r)) = [median(Class[m_{r1}]), \dots, median(Class[m_{rk}])], \quad (5.2)$$

kur m_{rk} – klases punktu skaits rādiusā k no centra.

5.6 attēlā (vidējā un apakšējā rindā) redzamas klases izmaiņas kā rādiusa funkcija ap diviem antibiotiku diskiem un klasificēšanas rezultātu uzlabošanas vienam izvēlētajam laika logam.

Šāds uzlabojums var sasniegt 5–20 %.

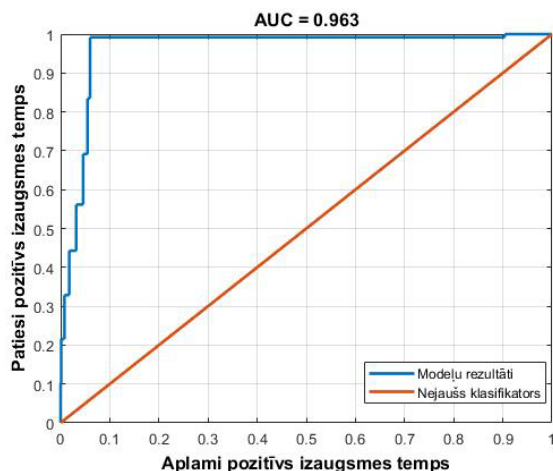


5.6. attēls. Klasificēšanas rezultātu uzlabošana. Laika logs 6,2–7,2 stundas. Augšējā rindā:

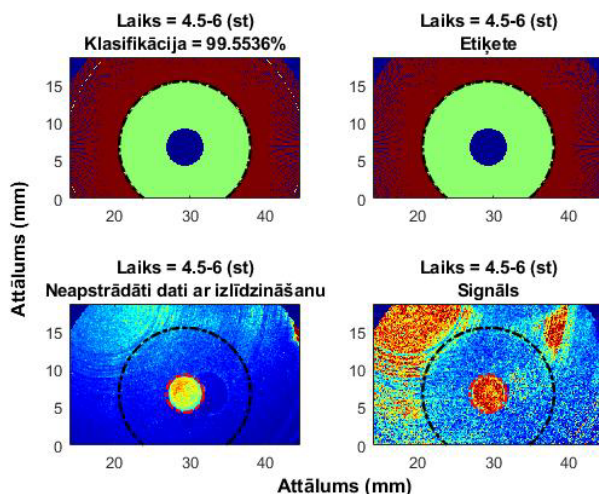
1) kreisā attēla marķēšana; 2) centrālā attēla klasificēšanas rezultāts; 3) labā attēla klasificēšanas rezultāts pēc klases novērtēšanas algoritma. Vidējā rindā – klases izmaiņas kā rādiusa funkcija (augšējais antibiotiku disks). Apakšējā rindā – klases izmaiņas kā rādiusa funkcija (apakšējais antibiotiku disks).

5.3.3.2. Klasificēšanas rezultātu uzlabošana, izmantojot rādus vidējos signālus

Cita pieeja klasificēšanas rezultātu uzlabošanai izmanto tos pašus divus faktorus (5.3.3.1. apakšnodaļa). Tādējādi ir iespējams izveidot signālu mediānu visā rādiusā ap antibiotikām. Daudzu signālu vietā katram rādiusam būs tikai viens mediānas signāls no korelācijas apakšpikseļu metodes un viens signāls no vidējā pēc $N \times N$ pikseļu loga. Mediānas signāls saglabā signālu tendenci, bet trokšnis tiek nomākts [47], [53], [60], kas uzlabos klasifikatora veikspēju. Arī daudzu signālu aizstāšana ar nelielu daudzumu mediānas signālu samazinās klasifikatora darbības laiku. Šāda pieeja ļauj sasniegt augstāku klasifikācijas veikspēju (5.7. attēls).



5.7. attēls. Klasificēšanas ROC līkne, izmantojot vidējo signālu.



5.8. attēls. Klasificēšanas rezultātu uzlabošana ar vienu vidējo signālu katrā rādus diapazonā, laika logs – 4,5–6 (stundas). Augšējā attēlā pa kreisi – klasifikācijas rezultāts; augšējā attēlā pa labi – etiķetes; apakšējā attēlā pa kreisi – vidējais rādītājs $N \times N$ pikseļu logā; apakšējā attēlā pa labi – korelācijas apakšpikseļu algoritms.

Tomēr, ja rodas klasificēšanas kļūda, nepareizs rezultāts tiks iegūts nevis vienā telpas punktā, bet gan visā noteiktā rādiusā (“gredzena” formā) (5.8. attēls). Ja “gredzens” atrodas dziļi citā klasē, tad to var viegli atklāt un noņemt, izmantojot papildu algoritmiskos rīkus. Ja tas atrodas pārejas vietā no vienas klases uz citu, tad kļūdu atklāt ir grūtāk.

5.4. Nodaļas secinājumi

Lāzera speklu attēlveidošana ar korelācijas apakšpiķseļu algoritmu ļauj noteikt nelielas izmaiņas novērojamajā objektā, efektīvi nošķirot kolonijas, kurās baktērijas joprojām vairojas, no neaktīvām vai mirušām kolonijām (vai zonām), ko nav iespējams panākt ar lāzera speklu attēlveidošanas metodi bez korelācijas apakšpiķseļu algoritma vai tikai baltās gaismas attēlveidošanu.

Inhibīcijas zonā signālu vērtības samazināšanās notika dinamiski (attālinoties no antibiotikām, tas notiek vēlāk), atspoguļojot inhibīcijas zonas rādiusu. Ārpus inhibīcijas zonas signāls samazinājās daudz vēlāk un dažādos rādiusos vienlaikus. Signāli abās zonās noteikti atšķīrās viens no otra. Izmantojot ierosinātās metodes: 1) atrodot rādiusu, pie kura beidzas inhibīcijas zona, pareizā klasifikācija palielinās par 5–20 %, sasniedzot 83–92,5 % (sk. promocijas darba tekstu). 2) Izmantojot mediāna tipa signālu katram rādiusam, klasifikācijas precizitāte palielinās vēl vairāk, sasniedzot vairāk nekā 96 % (līdz pat 99 %).

Tādējādi, izprotot signālu specifiskumu, izmantojot algoritmiski piemērotu bāzi, var panākt augstu klasifikācijas rezultātu.

Šī metode varētu būt noderīga dažādās pētniecības jomās, sākot no baktēriju augšanas dinamikas izpēti līdz antimikrobiālo vielu efektivitātes novērtēšanai.

6. PIEDĀVĀTĀS METODES SALĪDZINĀJUMS AR CITĀM METODĒM, KAS BALSTĀS LĀZERA SPEKLU PAŅĒMIENĀ

Pamatojoties uz definētajiem mērķiem un uzdevumiem, promocijas darba kopsavilkuma sestajā nodaļā veikts literatūrā piedāvāto mikroorganismu uzvedības monitoringa algoritmu salīdzinājums, par pētījuma objektu izmantojot šajā darbā aprakstīto korelācijas apakšpiķeļu algoritmu.

6.1. Literatūrā piedāvātie mikroorganismu uzvedības analīzes algoritmi

6.1.1. Telpiskā kontrasta analīze

Lai pierādītu, ka lāzera speklu attēlveidošanas metode ir uzticama mikrobu koncentrācijas monitoringam, literatūrā ir ierosināts analizēt tādus parametrus kā telpiskais kontrasts [64] (1. nodaļa (1.11. vienādojums)) un speklu graudainības lielums [19]. Tas ir tāpēc, ka, palielinoties izkliedētāju koncentrācijai paraugā, palielinās arī Brauna kustības dinamika. Līdz ar to samazinās telpiskais kontrasts. Speklu attēla telpiskais kontrasts var sniegt informāciju par vides raksturu, piemēram, tās viskozitāti [65] vai difuzoru skaitu [66]. Attēla kontrasts var noteikt arī dinamiku vidē, ko izraisa speklu attēla graudainības izmaiņas. Ja mikroorganismi pārvietojas uz novērojamās virsmas, speklu attēla raksts izplūst un speklu kontrasts samazinās. Tādējādi zemākas kontrasta vērtības atbilst intensīvākām dinamiskām izmaiņām novērotajā vidē.

6.1.2. Speklu graudainības lieluma analīze

Speklu graudainības lielums ir parametrs, ko ietekmē izkliedētāju skaits vai lielums vidē. Vidējo speklu graudainības lielumu var novērtēt pēc autokovariances funkcijas *FWHM* (1. nodaļa (1.10. vienādojums)). Tādējādi speklu graudainības lielumu var aprēķināt no speklu attēla, kas ir noderīgs virsmas nelīdzenuma mērīšanai. Pētījumā [23] šī analīze izmantota, lai analizētu baktēriju augšanu šķidrā barotnē. Tika konstatēts, ka līdz ar baktēriju augšanu samazinās speklu graudainības izmērs. Tomēr, ņemot vērā to, ka promocijas darba pētījums veikts uz virsmas un uz cietas (agars) barotnes, rezultāts var būt atšķirīgs, un tas ir jāpārbauda.

6.1.3. Dekorelācijas laika analīze

Vēl viena noderīga pieeja, izmantojot lāzera speklu attēlveidošanas metodi, lai noteiktu mikroorganisma aktivitāti, ir mērīt de Korelācijas laiku vai ātrumu [38] (1. nodaļa (1.12. vienādojums)). Laika korelācijas vērtības samazināšanās ir proporcionāla mikroorganisma koncentrācijai un aktivitātei.

6.1.4. Laika kontrasta analīze

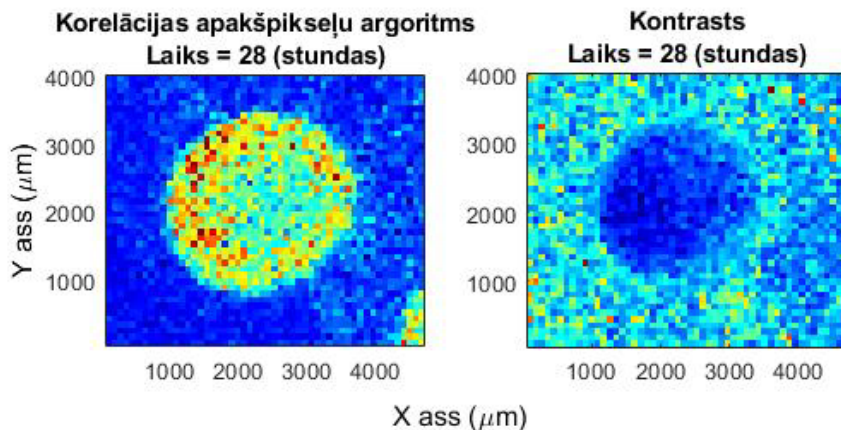
Līdztekus telpiskā kontrasta metodei vairākos pētījumos dinamiskā speklu attēlveidošanas raksturošanai ierosināts izmantot laika kontrasta metodi [6] vai citas metodes, kuru pamatā ir laika kadru starpība. Šīs metodes var sniegt zināmas priekšrocības, salīdzinot ar telpiskā

kontrasta analīzi, un izcelt tos slēptos efektus, kas atklāti šajā darbā, izmantojot korelācijas apakšpikseļu algoritmu. Laika kontrasta izmantošana telpiskā kontrasta vietā ļauj strādāt ar augstāku telpisko izšķirtspēju, tomēr uz laika izšķirtspējas rēķina. Ja laika paraugi ir statistiski neatkarīgi, tad laika kontrasta analīze nodrošina augstus rezultātus, ja to novērtē no 15 vai vairāk specklu kadriem [53].

6.2. Algoritmu salīdzinājums

6.2.1. Telpiskā kontrasta analīze

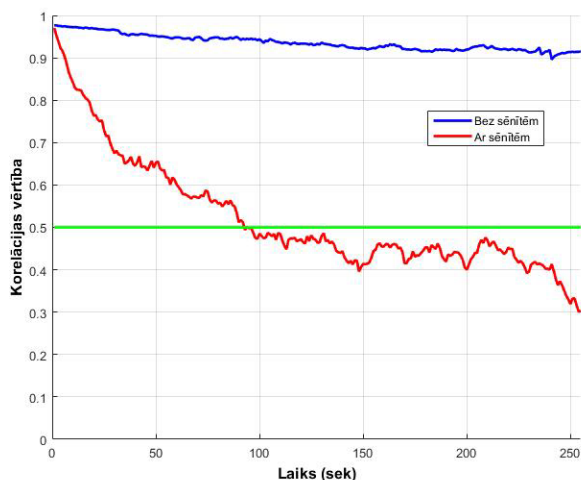
Telpiskā kontrasta aprēķināšana tika pārbaudīta eksperimentos ar baktērijām un sēnītēm uz cietas (agars) barotnes. Spēja iegūt “aktivitātes gredzena” efektu, kas raksturo kolonijas augšanu, tika pārbaudīta 3. nodaļā. 6.1. attēlā redzams algoritma salīdzināšanas rezultāts. Kontrasts parāda kolonijas klātbūtni, bet neatklāj “gredzena efektu”, kas ir pamanāms, izmantojot korelācijas apakšpikseļu (*subpixel*) algoritmu.



6.1. attēls. Korelācijas apakšpikseļu algoritma salīdzinājums ar telpiskā kontrasta analīzi. *Vibrio natriegens* baktēriju kolonija. Kontrasta analīze neatklāj “gredzena efektu”.

6.2.2. Dekorelācijas laika analīze

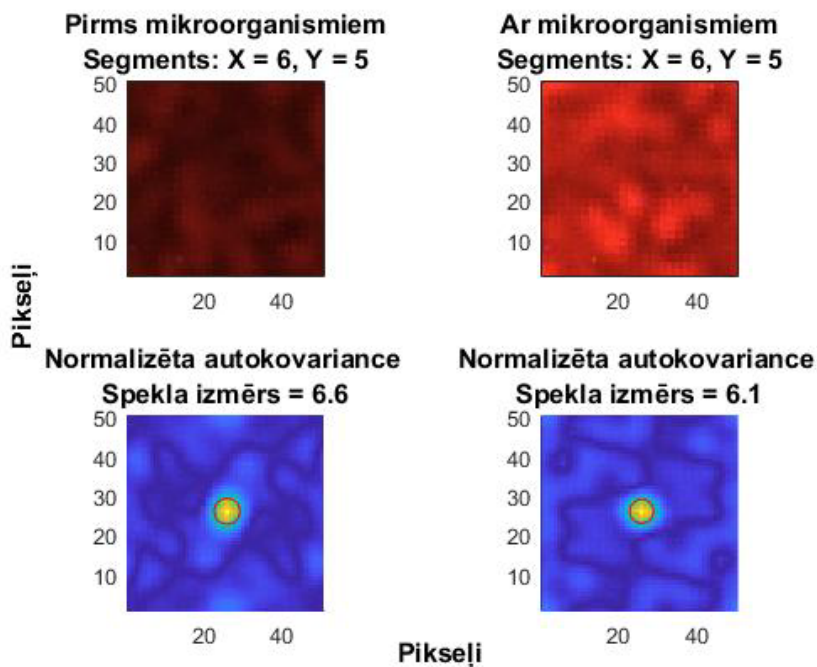
Lai analizētu dekodešanas metodi, tika izmantoti eksperimenti ar baktērijām un sēnēm. 6.2. attēlā redzamas normalizētās šķērskorelācijas vērtības izmaiņas laika gaitā starp 1. kadru un nākamajiem kadriem divos gadījumos – ar mikroorganismiem un bez tiem. Šī metode ļauj noteikt mikroorganismu klātbūtni, bet neatklāj slēpto ietekmi koloniju iekšienē.



6.2. attēls. Normalizētās savstarpējās korelācijas vērtības izmaiņas laika gaitā starp 1. kadru un nākamajiem kadriem divos gadījumos – bez mikroorganismiem (zilā krāsā) un ar mikroorganismiem (sarkanā krāsā).

6.2.3. Speklu graudainības lieluma analīze

Speklu graudainības lieluma mērījumi eksperimentos ar baktērijām un sēnītēm uz cietas (agars) barotnes pirms un pēc mikroorganismu parādīšanās novērojumu zonā tika veikti vairākas reizes un ar dažādām kultūrām.

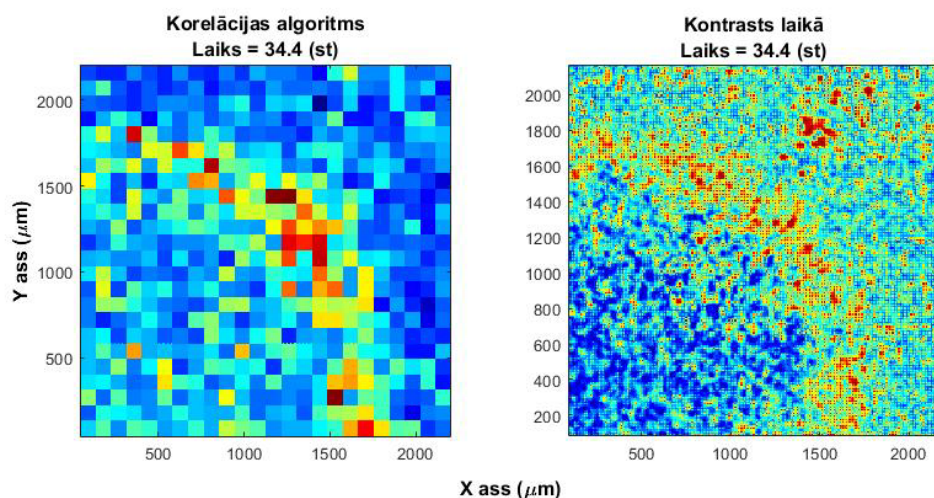


6.3. attēls. Mikroorganisma uzvedības analīze, izmantojot speklu lieluma aprēķinu, vienam telpiskajam logam.

Tas ir parādīts, izmantojot *Candida albicans* sēnītes piemēru. Eksperimenta lauks tika sadalīts $M \times M$ pikseļos, un katram šādam logam tika izmērīts speklu lielums (6.3. attēls). Pilnajā promocijas darba tekstā ir aprakstīta veiktā statistiskā analīze, lai apstiprinātu šo rezultātu visā aprēķinātajā laukā. Algoritms parādīja, ka speklu lielums paliek gandrīz nemainīgs (izmērītās izmaiņas var attiecināt uz statistiskajām kļūdām).

6.2.4. Laika kontrasta analīze

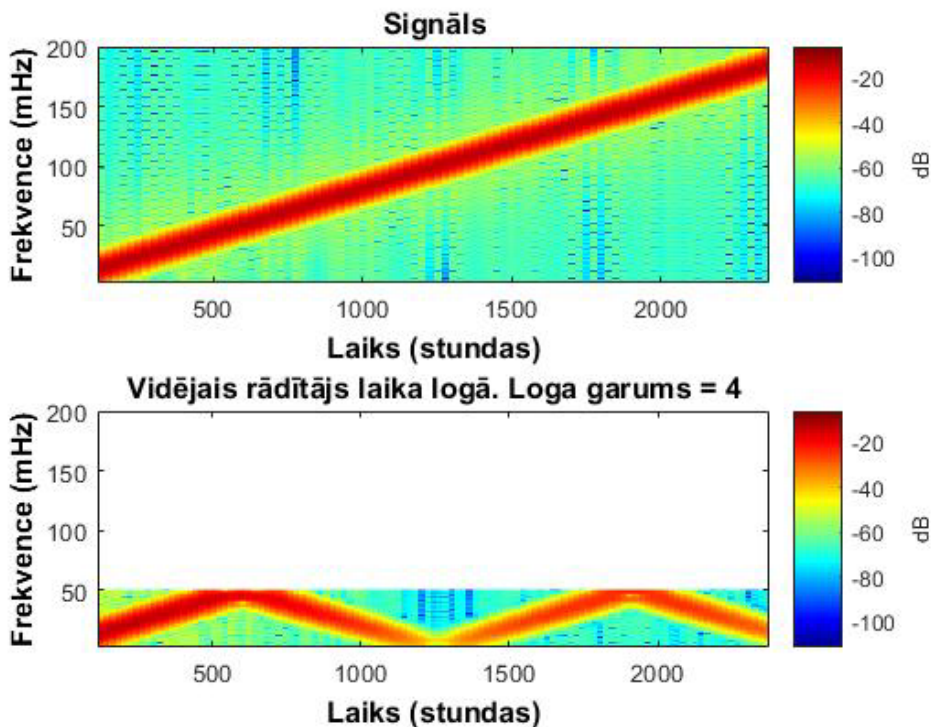
Paredzams, ka ar metodēm, kuru pamatā ir laika starpība, kā arī apakšpikseļu korelācijas algoritmu var atklāt arī slēpto ietekmi uz mikroorganismu augšanu, uzvedību un inhibīciju. 6.4. attēlā redzams *V. Natriegens* baktēriju kolonijas daļas, kas apstrādāta ar divām metodēm – apakšpikseļu korelācijas algoritmu un laika kontrasta metodi, salīdzinājums. Abos gadījumos ir redzams gredzena efekts. Kā aprakstīts 6.1.4. apakšnodaļā, laika kontrasta metodes telpiskā izšķirtspēja ir labāka nekā tad, ja tiek izmantots apakšpikseļu korelācijas algoritms.



6.4. attēls. Baktēriju kolonijas mala. Attēlā kreisajā pusē redzama korelācijas apakšpikseļu analīze. Labajā pusē – laika kontrasta analīze. Abas metodes nosaka 4. nodaļā aprakstīto “gredzena efektu”.

Tomēr tiks veikta arī laika analīze. Lai demonstrētu signāla uzvedību, ir vērts izmantot nevis mikroorganismu novērojumus, bet gan determinisku signālu ar skaidri zināmām izmaiņām laika un frekvences apgabalos. Šim nolūkam tika izvēlēta lineārās izplatīšanās (*linear sweep*) metode. Signāla parametri – lineārā izplatīšanās, frekvences palielināšanās no 5–185 mHz 2500 s laikā, $F_s = 400$ mHz. Tā kā laika kontrasta vai līdzīgu algoritmu aprēķināšanai tiek izmantots laika logs, tas tika ņemts vērā – signālā tika veikts kadru vidējais aprēķins ik pēc N paraugiem. Neskatoties uz to, ka 6.1.4. apakšnodaļā ir rakstīts, ka N ir lielāks par 15, lielākas grafiskās skaidrības labad ir izmantots mazāks skaitlis – $N = 4$. 6.5. attēlā redzams, ka šajā gadījumā laika frekvences, kas ir augstākas par F_s/N , “iekritušas” zemākā apgabalā. Tas

nozīmē, ka tiek novērots īslaicīgs signāla kroplošanas (*'aliasing'*) efekts. Pilnajā promocijas darba tekstā parādīts simulācijas rezultāts ar speķu attēliem, kas apstiprina šo problēmu.



6.5. attēls. Lineārās izplatīšanās (*linear sweep*) signāla spektrogramma. Augšējā attēlā – paraugu ņemšanas frekvence atbilst Nikvista kritērijam. Apakšējā attēlā – tas pats signāls, bet vidējais rādītājs laika logā $N = 4$. Šajā gadījumā ir novērojams signāla kroplošanas (*aliasing*) efekts.

6.3. Nodaļas secinājumi

Šajā nodaļā tika aplūkoti literatūrā plaši aprakstītie mikroorganismu uzvedības speķu datu analīzes algoritmi un salīdzināti ar ierosināto metodi – korelācijas apakšpiķeļu analīzi.

Telpiskā kontrasta analīze atklāj augošu baktēriju koloniju, bet nespēj noteikt aktivitātes migrāciju kolonijas iekšienē, kas tiek atklāta, izmantojot apakšpiķeļu korelācijas analīzi.

Dekorelācijas metode atklāj mikroorganismu klātbūtni, bet neatklāj slēpto ietekmi koloniju iekšienē (“gredzena efektu”).

Speķu lieluma mērījumi eksperimentos ar baktērijām un sēnītēm uz cietas (agars) barotnes neatklāja būtiskas šī parametra izmaiņas. Tāpēc šajos apstākļos ir vērts izmantot citas metodes.

Metodes, kuru pamatā ir laika kadru atšķirība, piemēram, laika kontrasta metode, spēj atklāt slēptos efektus. To var izdarīt ar augstu telpisko izšķirtspēju, taču nevēlama ietekme ir laika izšķirtspējas samazināšanās. Laika izšķirtspējas samazināšanai būs nepieciešams lielāks kadru ātrums. Ja šis aspekts netiks ņemts vērā, radīsies īslaicīgs signāla kroplošanas (*aliasing*) efekts. Signāla kroplošanas efekta problēma šādās metodēs ir tēma turpmākajiem pētījumiem. Atšķirībā no šajā nodaļā aprakstītajām metodēm ierosinātais korelācijas apakšpiķeļu algoritms

papildus telpiskajai analīzei pārveido speklu attēlu sekvenci par laika signālu masīvu. Svarīga šīs pieejas priekšrocība ir tā, ka iegūtajiem signāliem var piemērot signālu apstrādes algoritmus.

Šajā nodaļā iegūtie rezultāti parāda ierosinātās metodes – korelācijas apakšpikseļu analīzes – priekšrocības.

REZULTĀTI UN SECINĀJUMI

Promocijas darba mērķis bija izstrādāt jaunu pieeju submikronu aktivitātes vai submikronu objektu augšanas bezkontakta noteikšanai un novērtēšanai lielā teritorijā, kā arī iespēju klasificēt un novērtēt konkrētus submikronu objektus vai notikumus. Viens no izaicinājumiem bija pieeja darbam ar signāliem, kam tika īstenots korelācijas apakšpikseļu algoritms, kas videoattēlu secību pārvērš signālu masīvos. Attiecīgi vēl viens izaicinājums bija tas, ka mikroorganismu augšanas un inhibīcijas izmaiņas ir ļoti zemas frekvences signāli (mHz). Tehnoloģijas darbam ar ļoti zemas frekvences signāliem prasa ievērot globāla mēroga procesus un sarežģītu aprīkojumu. Attiecīgi bija nepieciešama maza izmēra kompakta iekārta, kas ļautu strādāt šajā frekvenču diapazonā ar šāda veida signāliem. Izstrādāto pieeju potenciāli var izmantot arī citos lietojumos, kur nepieciešama ļoti zemas frekvences signālu apstrāde, kas varētu būt stimuls šādiem pētījumiem. Ierosinātā metode ir izrādījusies jutīga pret slēptiem efektiem (ko citas pieejas neatklāja vai kuru atklāšanai bija nepieciešams ievērojami palielināt kadru skaitu) un spēj darboties trokšņainā vidē. Mākslīgo neironu tīklu piemērošana signāliem, kas iegūti no attēlu sekvences (ar ierosināto algoritmu), ar papildu pēcapstrādi, kas balstīta signālu īpašību izpratnē, ir devusi augstu sasniegumu augošu (aktīvu) un neaktīvu zonu klasifikācijā, ko nevarēja panākt, izmantojot neapstrādātus spekla datus.

Promocijas darba mērķis ir sasniegts, un var definēt vairākus rezultātus.

- Līdzīgu pētījumu un pētījumu analītiskā izpēte atklāja populārākās un precīzākās pieejas un metodes šajā jomā:
 - speklū kontrasta analīze,
 - speklū lieluma analīze,
 - speklū attēlu dekorelācijas laika vai ātruma analīze.
- Starp visām pētītajām pieejām pastāv saistība ar korelācijas analīzi. Tādējādi kļūst skaidrs, ka korelācijas analīze ir svarīgs, spēcīgs un daudzsološs rīks, lai analizētu speklū modeļus (arī medicīnas/bioloģijas jomā).
- Tika pētītas literatūrā aprakstītās speklū attēlu korelācijas analīzes metodes mehānisko vibrāciju noteikšanai un skaņas signālu rekonstrukcijai. Tika izmantoti iegūtie secinājumi. Tomēr, ņemot vērā mikroorganismu uzvedībai raksturīgās signālu īpatnības, algoritms tika pārveidots. Tika izskatītas metodes ātrai un vienlaikus precīzai algoritma īstenošanai, un tika ierosināta piemērotākā.
- Medicīnas un mikrobioloģijas vajadzībām mikroorganismu uzvedības analīzē tika izstrādāta pieeja, kas ļauj novērot submikronu notikumu dinamiku, izceļot slēptos efektus.

Visas izstrādātās metodes un algoritmi tika eksperimentāli analizēti, lai pārbaudītu šajā pētījumā definētās hipotēzes.

- Pirmā hipotēze tika pierādīta, veicot eksperimentus, kuros tika novērota koloniju augšana: 1) baltā gaismā; 2) izmantojot lāzera speklū metodi un analizējot iegūtos datus. Lāzera speklū attēla modeļu analīze ar korelācijas apakšpikseļu algoritmu nodrošina agrīnāku augošu baktēriju reakciju, salīdzinot ar klasisko CFU augšanas noteikšanu baltajā gaismā.

- Otrā hipotēze tika pierādīta, veicot eksperimentus, kuros tika novērota koloniju augšana: 1) ar lāzera speķu attēlveidošanas metodi bez papildu analīzes. 2) ar lāzera speķu attēlveidošanas metodi ar korelācijas apakšpiķseļu algoritmu; Ierosinātā korelācijas apakšpiķseļu analīze atklāja, ka kolonijā pastāv atšķirīga aktivitātes zona, kas kolonijas augšanas laikā pārvietojas no centra uz malām.
- Trešā hipotēze tika pierādīta, veicot un analizējot eksperimentus, kuros tika novērota koloniju augšana ļoti troķšņainā vidē: 1) ar lāzera speķu attēlveidošanas metodi bez papildu analīzes. 2) ar lāzera speķu attēlveidošanas metodi ar korelācijas apakšpiķseļu algoritmu, Ierosinātā korelācijas apakšpiķseļu metode atklāja koloniju klātbtūni, savukārt lāzera speķu attēlveidošanas metode bez papildu analīzes neatklāja koloniju klātbtūni.
- Ceturtā hipotēze tika pierādīta, analizējot eksperimentālos datus gan par baktēriju kolonijām, gan inhibīcijas zonām ap antibiotiku diskjiem. Tika veiktas divas analīzes: 1) ar lāzera speķu attēlveidošanas metodi bez papildu analīzes; 2) ar lāzera speķu attēlveidošanas metodi ar korelācijas apakšpiķseļu algoritmu. Lai gan lāzera speķu attēlveidošanas metode bez papildu analīzes ļauj saskatīt kolonijas un inhibīcijas zonas un var veicināt to noteikšanu, lāzera speķu attēlveidošanas metode ar korelācijas apakšpiķseļu algoritmu ir jutīga pret nelielām izmaiņām, kas ļauj ticami atšķirt dažādu veidu datus. Klasifikatora turpmāka izmantošana parādīja šo spēju.

Visi definētie teorētiskie jautājumi ir eksperimentāli pierādīti, izmantojot piedāvātās un izstrādātās pieejas un metodes. Rezultātā promocijas darba gaitā tika izstrādāta neinvazīva bezkontakta metode, kas nodrošina agrīnāku augošu baktēriju noteikšanu, salīdzinot ar klasisko *CFU* augšanas noteikšanu baltās gaismas apgaismojumā. Šī metode ļauj vizualizēt slēptās, neredzamās aktivitātes zonas mikrobu kolonijā, kā arī noteikt dinamiku inhibīcijas zonā ap antibiotiku disku, kas bez tās netiktu konstatēta. Attiecīgi klasifikatori, kas izveidoti, pamatojoties uz šo metodi, sniedz augstus rezultātus, klasificējot aktīvās un neaktīvās zonas. Turpmākie pētniecības virzieni var ietvert mikroorganismu koloniju un inhibīcijas zonu augšanas simulācijas modeļu un prognožu izveides izpēti.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- [1] Rigden, J. D., Gordon, E. I. "Granularity of scattered optical maser light", Proceedings of the Institute of Radio Engineers, 50 (11), 2367, (1962).
- [2] Oliver, B. M. "Sparkling spots and random diffraction", Proceedings of the IEEE, 51 (1), 220–221, (1963).
- [3] Fujii, H., and T. Asakura. "Effect of surface roughness on the statistical distribution of image speckle intensity". Optics communications 11.1, 35–38, (1974).
- [4] Hamed, A. M., and M. Saudy. "Computation of surface roughness using optical correlation". Pramana 68, 831–842, (2007).
- [5] Heikkinen, J., Schajer, G. S., "Remote surface motion measurements using defocused speckle imaging". Optics and Lasers in Engineering, 130, 106091, (2020).
- [6] Boas, D. A., Dunn, A. K. "Laser speckle contrast imaging in biomedical optics," J. Biomed. Opt., vol. 15, no. 1, p. 11109, (2010).
- [7] Hahn, F., Hernández, G., Echeverría, E., Romanchick, E. "Escherichia coli detection using thermal images," Canadian Biosystems Engineering, vol. 48 (4), 7–13, (2006).
- [8] Volpe, P. L. O. "Flow microcalorimetric measurements of the antibacterial activity of the homologous series m-alkoxyphenols and p-hydroxybenzoates on Escherichia coli," J. Braz. Chem. Soc., vol. 8, no.4 (1997).
- [9] Skarstad, K., Steen, H. B., Boye, E. "Cell cycle parameters of slowly growing Escherichia coli B/r studied by flow cytometry," J. Bacteriol. 154 (2), 656–62, (1983).
- [10] Tan, W., Oldenburg, A. L., Norman, J. J., Desai, T. A., Boppart, S. A. "Optical coherence tomography of cell dynamics in three dimensional tissue models," Opt. Exp. 14, 7159–7171, (2006).
- [11] Goodman, J. W. "Speckle Phenomena in Optics. Theory and Application", Chapter 8, Roberts and Company, Englewood, Colorado, (2007).
- [12] Goodman, J. W. "Introduction to Fourier Optics", 3rd ed., Roberts, (2005).
- [13] Federico, A., Kaufmann, G. H., Galizzi, G. E., Rabal, H., Trivi, M., Arizaga, R. "Simulation of dynamic speckle sequences and its application to the analysis of transient processes," Opt. Commun. 260, 493–499, (2006).
- [14] Duncan, D. D., Kirkpatrick, S. J. "The copula: a tool for simulating speckle dynamics", Journal of Optical Society of America A 25 (1), 231–237, (2008).
- [15] Duncan, D. D., Kirkpatrick, S. J. "Algorithms for simulation of speckle (laser and otherwise)," Biomedical Optics (Optical Society of America), V, 6855, p. 685505, (2008).
- [16] Oulamara, A., Tribillon, G., Duvernoy, J. "Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle", J. Mod. Opt. 36, 165–179, (1989).
- [17] Lehmann, P., "Surface-roughness measurement based on the intensity correlation function of scattered light under speckle-pattern illumination," Appl. Opt. 38, 1144–1152, (1999).
- [18] Ennos, A., "Speckle interferometry" in Laser Speckle and Related Phenomena, J. C. Dainty, ed. (Springer-Verlag, 1975).
- [19] Piederriere Y., Cariou J., Guern Y, Le Jeune B., Le Brun G., Lotrian J., Scattering through fluids: speckle size measurement and Monte Carlo simulations close to and into the multiple scattering, Optics Express 12, 176–188, (2004).
- [20] Goodman, J. W, Statistical Optics (Wiley, 1985).

- [21] Duncan, D. D., Kirkpatrick, S. J. "Can laser speckle flowmetry be made a quantitative tool?" *J. Opt. Soc. Am. A. Opt. Image Sci. Vis.*, vol. 25, no. 8, pp. 2088–2094, (2008).
- [22] Briers, J. D., Webster, S. "Laser speckle contrast analysis (LASCA): A nonscanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow," *J. Biomed. Opt.*, vol. 1, no. 2, 174–179, (1996).
- [23] Zdunek, A., Muravsky, L. I., Frankevych, L., Konstankiewicz, K., "New nondestructive method based on spatial-temporal speckle correlation technique for evaluation of apples quality during shelf-life", *International Agrophysics*, 21 (3), 305–310, (2007).
- [24] Nader, C. A., Pellen, F., Loutfi, H., Mansour, R., Jeune, B. L., Brun, G. L., Abboud, M., "Early diagnosis of teeth erosion using polarized laser speckle imaging", *Journal of biomedical optics*, 21 (7), 071103–071103, (2016).
- [25] Fercher, A. F., Briers, J. D., "Flow visualization by means of single-exposure speckle photography", *Opt. Commun.* 37, 326–330, (1981), [https://doi.org/10.1016/0030-4018\(81\)90428-4](https://doi.org/10.1016/0030-4018(81)90428-4).
- [26] Peters, W. H., Ranson, W. F. "Digital image techniques in experimental stress analysis," *Optical Engineering* 21, 427–431, (1982).
- [27] Sutton, M. A., Wolters, W. J., Peters, W. H., Ranson, W. F., McNeill, S. R. "Determination of displacement using an improved digital correlation method," *Image and Vision Computation* 1, 133–139, (1983).
- [28] Zalevsky, Z., Beiderman, Y., Margalit, I., Gingold, S., Teicher, M., Mico, V., Garcia, J. "Simultaneous remote extraction of multiple speech sources and heart beats from secondary speckles pattern", *Opt. Express*, 17, 21566–21580, (2009).
- [29] Li, L., Gubarev, F. A., Klenovskii, M. S., Bloshkina, A. I. "Vibration measurement by means of digital speckle correlation", In 2016 International Siberian Conference on Control and Communications (SIBCON) (pp. 1–5), IEEE, (2016).
- [30] Hao, X., Zhu, D., Wang, X., Yang, L., Zeng, H. "A Speech Enhancement Algorithm for Speech Reconstruction Based on Laser Speckle Images". *Sensors*, 23(1), 330, (2023).
- [31] Yoo, J. C., Han, T. H. "Fast normalized cross-correlation", *Circuits, systems and signal processing*, 28, 819–843, (2009).
- [32] Di Stefano, L., Mattoccia, S., Tombari, F. "ZNCC-based template matching using bounded partial correlation", *Pattern recognition letters*, 26(14), 2129–2134, (2005).
- [33] Kuglin, C. D., Hines, D. C. "The phase correlation image alignment method," in *Proc. IEEE 1975 Inf. Conf. Cybernet. Society*, New York, No. 4, 163–165, (1975).
- [34] Lewis, J. P. "Fast Template Matching", *Vision Interface*, 120–123, (1995).
- [35] Kim, S., Kim, J., Lim, W., Jeon, S., Kim, O., Koh, J. T., Kim, C., Choi, H., Kim, O. "In Vitro Bactericidal Effects of 625, 525, and 425 nm Wavelength (Red, Green, and Blue) Light-Emitting Diode Irradiation," *Photomed. Laser Surg.* 31(11), 554–562, (2013).
- [36] Sieuwerts, S., de Bok, F. A. M., Mols, E., de Vos, W. M., & van Hylckama Vlieg, J. E. T., "A simple and fast method for determining colony forming units", *Letters in Applied Microbiology*, 47 (4), 275–278, (2008).
- [37] Loutfi, H., Pellen, F., Le Jeune, B., Lteif, R., Kallassy, M., Le Brun, G., Abboud, M., "Real-time monitoring of bacterial growth kinetics in suspensions using laser speckle imaging". *Scientific reports*, 10 (1), 408, (2020).
- [38] Yoon J., Lee K., Park Y., "A simple and rapid method for detecting living microorganisms in food using laser speckle decorrelation", *arXiv:1603.07343*, (2016).

- [39] Murialdo, S. E., Sendra, G. H., Passoni, L. I., Arizaga, R., Gonzalez, J. F., Rabal, H., Trivi, M. "Analysis of bacterial chemotactic response using dynamic laser speckle," *J. Biomed. Opt.* 14(6), 064015, (2009).
- [40] Murialdo, S. E., Passoni, L. I., Guzman, M. N., Sendra, G. H., Rabal, H., Trivi, M., Gonzalez, J. F. "Discrimination of motile bacteria from filamentous fungi using dynamic speckle," *J. Biomed. Opt.* 17(5), 056011, (2012).
- [41] Kim, H., Singh, A. K., Bhunia, A. K., Bae, E. "Laser-induced speckle scatter patterns in *Bacillus* colonies," *Front. Microbiol.* 5, 537, (2014).
- [42] Grassi, H. C., García, L. C., Lobo-Sulbarán, M. L., Velásquez, A., Andrades-Grassi, F. A., Cabrera, H., Andrades-Grassi, J. E., Andrades, E. D. "Quantitative Laser Biospeckle Method for the Evaluation of the Activity of *Trypanosoma cruzi* Using VDRL Plates and Digital Analysis," *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10(12), e0005169, (2016).
- [43] Grassi, H. C., Velásquez, A., Belandria, O. M., Lobo-Sulbarán, M. L., Andrades-Grassi, J. E., Cabrera, H., Andrades, E. D. "Biospeckle laser digital image processing for quantitative and statistical evaluation of the activity of Ciprofloxacin on *Escherichia coli* K-12," *Laser Phys.* 29(7), p.075603, (2019).
- [44] Zhou, K., Zhou, C., Sapre, A., Pavlock, J. H., Weaver, A., Muralidharan, R., Noble, J., Kovac, J., Liu, Z., Ebrahimi, A. "Dynamic Laser Speckle Imaging meets Machine Learning to enable Rapid Antibacterial Susceptibility Testing (DyRAST)," *ACS Sens.* 5(10), 3140–3149, (2020).
- [45] Váchová, L., Cáp, M. & Palková, Z. Yeast colonies: a model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 601836, (2012).
- [46] X. Lai, H. Torp, "Interpolation methods for time-delay estimation using cross-correlation method for blood velocity measurement. Ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control", *IEEE Transactions* 46 (2), 277–290, (1999).
- [47] Tukey, J. W. Nonlinear (nonsuperimposable) methods for smoothing data. *Proc. Con. Rec. EASCON.* 673, (1974).
- [48] Jwo, D. J., Chang, W. Y., Wu, I. H., "Windowing techniques, the Welch method for improvement of power spectrum estimation", *Comput. Mater. Contin.* 67, 3983–4003, (2021).
- [49] Nyquist, H., "Certain Topics in Telegraph Transmission Theory. Transactions of the American Institute of Electrical Engineers", 47 (2), 617–644, (1928).
- [50] Shannon, C. E., "Communication in the presence of noise", *Proceedings of the Institute of Radio Engineers.* 37 (1), 10–21, (1949).
- [51] Rivas, E.-M., Gil de Prado, E., Wrent, P., de Silóniz, M.-I., Barreiro, P., Correa, E. C., Conejero, F., Murciano, A., and Peinado, J. M.: "A simple mathematical model that describes the growth of the area and the number of total and viable cells in yeast colonies", *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 594–603, (2014).
- [52] Hoff, J., Daniel, B., Stukenberg, D., Thuronyi, B. W., Waldminghaus, T., and Fritz, G.: "Vibrio natriegens: an ultrafast-growing marine bacterium as emerging synthetic biology chassis", *Environ Microbiol.*, (2020).
- [53] Lehmann, E. L. *Theory of Point Estimation* (Wiley, 1983).
- [54] Pirt, S. J. "A kinetic study of the mode of growth of surface colonies of bacteria and fungi", *J. Gen. Microbiol.* 47 (2), 181–197, (1967).
- [55] Tenover, F.C., *Antimicrobial Susceptibility Testing*, 4th ed., 166–175, (Academic Press, 2019).

- [56] Bonev, B., Hooper, J., Parisot, J., “Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method”, *J Antimicrob Chemother* 61, 1295–1301, (2008).
- [57] Fick, A., *Poggendorff's Annalen*. (1855) 94, 59–86. and (in English) *Phil. Mag. S. 4*, Vol. 10, 30–39, (1855).
- [58] Tjandra, K. C., Ram-Mohan, N., Abe, R., Hashemi, M. M., Lee, J.-H., Chin, S. M., Roshardt, M. A., Liao, J. C., Wong, P. K., Yang, S., “Diagnosis of Bloodstream Infections: An Evolution of Technologies towards Accurate and Rapid Identification and Antibiotic Susceptibility Testing”, *Antibiotics* 11, 511, (2022).
- [59] Haykin, S. “Neural Networks and Learning Machines”. Third Edition, Pearson Education, Inc., McMaster University, Hamilton, Chapter 1 and Chapter 4, (2009).
- [60] Sun, X. X., Qu, W., “Comparison between mean filter and median filter algorithm in image denoising field”, *Applied Mechanics and Materials*, 644, 4112–4116, (2014).
- [61] Ian, G., Yoshua, B., & Aaron, C., *Deep learning: Adaptive computation and machine learning*, Chapter 6, (2017).
- [62] Thomas, A. J., Petridis, M., Walters, S. D., Gheytaasi, S. M., Morgan, R. E., Two hidden layers are usually better than one. In *Engineering Applications of Neural Networks: 18th International Conference, EANN 2017, Athens, Greece, August 25–27, 2017, Proceedings* (pp. 279–290). Springer International Publishing, (2017).
- [63] Yotov, K., Hadzhikolev, E., Hadzhikoleva, S., Cheresarov, S., Finding the optimal topology of an approximating neural network. *Mathematics*, 11 (1), 217, (2023).
- [64] Briers, J. D., Richards, G. J., He, X. W. Capillary blood flow monitoring using laser speckle contrast analysis (LASCA). *J. Biomed. Opt.* 4, 164–176, (1999).
- [65] Abou Nader, C., Loutfi, H., Pellen, F., Le Jeune, B., Le Brun, G., Lteif, R., Abboud, M. Assessing white wine viscosity variation using polarized laser speckle: A promising alternative to wine sensory analysis. *Sensors*, 17 (10), 2340, (2017).
- [66] Abou Nader, C., Pellen, F., Roquefort, P., Aubry, T., Le Jeune, B., Le Brun, G., Abboud, M. Evaluation of low viscosity variations in fluids using temporal and spatial analysis of the speckle pattern. *Opt. Lett.* 41, 2521–2524, (2016).



Ilya Balmages dzimis 1978. gadā Kijivā (Ukraina). 2000. gadā *Sami Shamoon* Inženierzinātņu koledžā Beerševā (Izraēla) ieguvis bakalaura grādu elektrotehnikā un enerģētisko sistēmu inženierijā (2000), Negevas Ben-Guriona universitātē Beerševā – maģistra grādu elektrooptiskajā inženierijā (2006). No 2007. līdz 2018. gadam strādājis uzņēmumā "EORD", Haifā (Izraēla). Kopš 2019. gada strādā Rīgas Tehniskajā universitātē (RTU), ieņemot zinātniskā asistenta un pētnieka amatus. Patlaban ir RTU pētnieks.

Zinātniskās intereses saistītas ar neinvazīvām metodēm mikroorganismu aktivitātes noteikšanai un mikroorganismu uzvedības klasificēšanu, izmantojot attēlu un signālu apstrādes, kā arī mašīnmācīšanās metodes.