



Çevresel Mikroorganizmaların İmaj Analizi ile Tespiti

Alper Alver¹, Emine Baştürk¹, Mustafa Işık^{1*}

¹ Aksaray Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Aksaray, Türkiye.

E-Posta: alperalver@aksaray.edu.tr, ebasturk@aksaray.edu.tr, mustafaisik55@hotmail.com

Gönderim 16 Haziran 2019; Kabul 30 Aralık 2019

Özet: Çevresel mikroorganizmalar, doğal (göller, akarsular, denizler, hava, toprak vs) ve yapay (askıda ve bağlı büyümeli biyolojik reaktörler, oksidasyon havuzları, yapay sulak alanlar vs), ortamlarda bulunan, çevresel açıdan önemli, çıplak gözle görülemeyen mikroskobik canlılardır. Çevresel mikroorganizmaların sınıflandırılması çevresel kalitenin izlenmesi ve biyolojik reaktörlerin işletilmesinde çok önemli olmaktadır. Ancak, mevcut manuel yöntemlerle mikrobiyolojik analizler oldukça zaman alıcı, zahmetli ve pahalı olmaktadır. Son yıllarda optik ve yazılım teknolojisindeki hızlı gelişmeler bakteri ve protozoa gibi küçük canlıların (0,1-100 µm) mikroskoplar yardımıyla hızlı olarak tanısına ve sayılmasına kavramsal olarak imkân tanımıştır. Dijital imaj prosesleme olarak bilinen bu yeni sınıflandırma teknolojisinde öncelikle olarak mikroorganizmaların olarak tercih edilmiş uygun bir boyar madde ile boyanması yapılarak mikroskop ile görüntüsü çekilir, Daha sonra bu görüntü morfolojik olarak işlenerek bilgisayarın hafızasına alınır. Mevcut olan işlenmiş görüntülerle karşılaştırma yapılarak mikroorganizmanın tanısı gerçekleştirilir. Bu çalışmada çok uzun süreler alan zahmetli klasik yöntemler ve pahalı olan moleküler mikroorganizma tayin yöntemlerine kıyasla avantajlı görülen imaj prosesleme yöntemi kavramsal olarak anlatılmış ve yapılan sınırlı çalışmalar hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Çevresel mikroorganizmalar, Tanı, İmaj, Mikroskopi, Prosesleme

Determination of Environmental Microorganisms by Image Analysis

Received June 16, 2019; Accepted December 19, 2019

Abstract: Environmental microorganisms are microscopic organisms found in natural (lake, river, sea, air, soil, etc) and artificial (suspended and attached biological reactor, oxidation ponds, constructed wetlands etc) environments that cannot be seen with the naked eye. The classification of environmental microorganisms is very important in monitoring environmental quality and operating biological reactors. However, microbiological analyzes are quite time consuming, laborious and expensive by conventional methods. In recent years, rapid advances in optical and software technology have allowed conceptualization and rapid recognition of small organisms such as bacteria and protozoa (0.1-100 µm) by means of microscopes. In this new classification technology, which is known as digital image processing, the microorganisms are preferably stained with a suitable dyestuff with taking the images by microscope, after this image is processed morphologically and then taken into the computer's memory. Identification of the microorganism is performed by comparing with the processed images. In this study, the method of image processing which is very advantageous compared to the laborious classical methods and the expensive molecular microorganism determination methods, are explained conceptually and information about the limited studies are given.

Key Words: Environmental microorganisms, Identification, Image, Microscopy, Processing

GİRİŞ

Elektromanyetik spektrumun gözümüzle ayırt edemediğimiz kısmına optikal dendiği için gördüğümüz nesnelere optikal imaj olarak isimlendirilir. İnsanoğlunun görüşü mucizevi bir olay olmak birlikte, niteliksel ve sübjektiftir, yani görünen objelerin sayısı ve özellikleri kişiye göre değişmektedir. Günümüzde gelişen bilgisayar teknolojisi ile imajın niceliksel özellikleri insan gözünden daha iyi analiz edilebilir, dolayısıyla imajın sübjektifliği azaltılabilir. Nesnelere alınan fotoğraflar, bilgisayarlara işlenebilen ve analiz edildikten sonra objektif morfolojik nicel bilgilere ulaşma imkân veren çok sayıda küçük noktalar (piksel) oluşmaktadır. Bilgisayarla veri işleme teknolojisindeki gelişmeler, rekabet ve buna bağlı olarak fiyatların düşmesi çevre bilimi ve biyoteknolojisi alanında bu alanda keşfedilmeye açık yeni metodolojilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Günümüzde kısaca nesnelere elde edilen fotoğrafların analizden bilgi elde edilmesi olan imaj analizi ile mikroorganizmaların tanısı ve sayımı ile ilgili ciddi mesafeler alınmıştır ^[1].

*İlgili E-posta/Corresponding E-mail: mustafaisik55@hotmail.com

Bu çalışma ISESER 2019'da sözlü bildiri olarak sunulmuştur. (25-27 Mayıs 2019, Konya)

Çevresel mikroorganizmalar, doğal (göller, akarsular, denizler, hava, toprak vs) ve yapay (askıda ve bağlı büyümeli biyolojik reaktörler, oksidasyon havuzları, yapay sulak alanlar vs), ortamlarda bulunan, çevresel açıdan önemli, çıplak gözle görülemeyen mikroskobik canlılardır. 0,1-100 µm arasında değişen bakteri ve protozoa gibi mikroskobik canlılar sadece mikroskoplar ile görülebilir [2]. Çevresel mikroorganizmaların sınıflandırılması hem biyolojik arıtma proseslerinin hem de çevresel kalitenin izlenmesi açısından önemli bir indikatördür. Çevre ortamında bulunan mikroorganizmalar ortamın fiziksel kimyasal ve biyolojik özelliklerine hassas olduklarından sayıları ve türlerinin ne olduğu çevresel kalite veya biyolojik arıtmanın performansı hakkında değerli bilgiler sunmaktadır.

Çevresel mikroorganizmaların sayılması ve türlerin birbirinden ayırt edilmesi çevresel mikroorganizmaların çok sayıda olması ve gözle görülemeyecek kadar küçük olması nedeniyle oldukça zordur. Çevresel bakterilerin tanısı için çoğu biyokimyasal, moleküler ve kütle spektrum gibi farklı tanı tekniklerine dayanan yöntemler mevcut olmasına rağmen bunlar zor, zaman alıcı, oldukça uzman kişiler gerektiren ve pahalı yöntemlerdir. Bilgisayar, görüntü ve mikroskopi teknolojisindeki son yıllardaki hızlı gelişimle birlikte, bu yöntemler yerini dijital teknolojiye dayanan otomatik ve yarı otomatik kantitatif imaj analiz tekniklerine bırakmaya başlamaktadır.

Bu derleme çalışmasında özellikle çevresel mikroorganizmaların tanısında kullanılan tekniklerden kısaca bahsedilerek, son yıllarda gelişen dijital imaj işleme ile mikroorganizmaların belirlenmesi teknolojisinin geldiği düzey değerlendirilmiştir.

MİKROORGANİZMALARIN TANISINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Mevcut Yöntemler

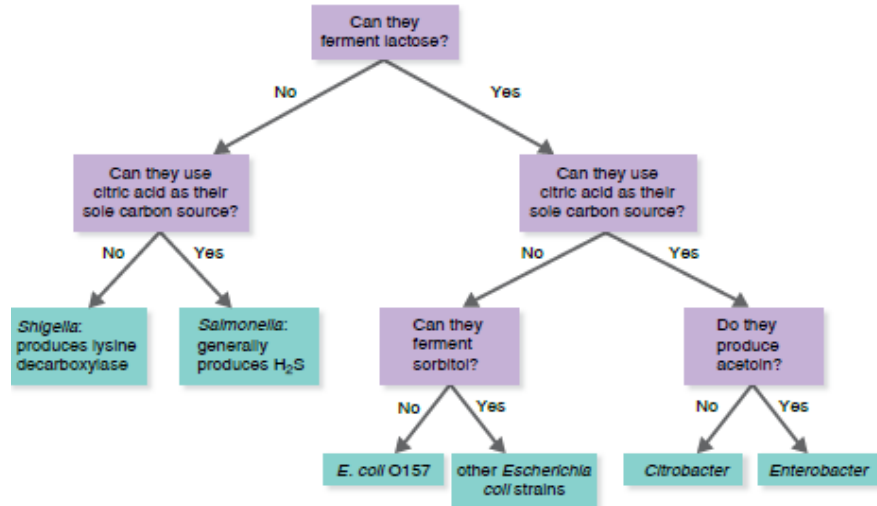
Çevre ortamındaki mikrobiyal kirlenmeyi tespit etmek, arıtma tesislerinin performansını değerlendirmek, epidemiyologların hastalığın kaynağını bulması ve klinik tedavi için patojenlerin tanısında değişik teknik ve metotlar kullanılmaktadır. Çevresel mikroorganizmaların tanısında bu zaman kadar kullanılan yöntemler genel olarak biyokimyasal, moleküler ve kütle spektrometrik yöntemlerdir. Bunlardan bazıları aşağıdaki gibidir.

Diferansiyel boyama

Bakterilerin tanımlanmasındaki ilk adımlardan biri, diferansiyel boyamadır. Bakterilerin çoğu gram pozitif veya gram negatiftir. Aside dayanıklı boyalar gibi diğer diferansiyel boyamalar daha sınırlı bir mikroorganizma grubu için kullanışlı olabilir. Bu boyaların hücre duvarlarının kimyasal bileşimine dayandığını ve bu nedenle duvarsız bakterileri veya sıradışı duvarlara sahip olan arkeları belirlemede kullanılamamaktadır [3].

Biyokimyasal testler

Enzimatik aktiviteler bakterileri ayırt etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Birbirine benzeyen bakteriler bile biyokimyasal testlere tabi tutularak genellikle farklı türlere ayrılabilir. Laborantlar patojenleri hızlı bir şekilde tanımlayabilmeleri için bir takım testler geliştirilmiştir. Enterobacteriaceae familyasının tüm üyeleri oksidaz negatiftir. Enterik bakteriler arasında Escherichia, Enterobacter, Shigella, Citrobacter ve Salmonella cinslerinin üyeleri bulunur. Laktozu fermente ederek asit ve gaz üreten Escherichia, Enterobacter ve Citrobacter, asit ve gaz üretmeyen Salmonella ve Shigella'dan ayrılabilir. Şekil 1'de gösterildiği gibi daha ileri biyokimyasal testler cinsler birbirinden ayrılabilir.



Şekil 1. Seçilmiş enterik bakteri türünü tanımlamak için metabolik özelliklerin kullanılması

Bakterileri belirlemek için ihtiyaç duyulan süre seçici ve farklı besi ortamlarının kullanılması ve hızlı teşhis yöntemleri ile azaltılabilir. Seçici ortam, rakip organizmaların büyümesini baskılayan ve arzu edilenlerin büyümesini teşvik eden bileşenler içerir. Diferansiyel ortam, istenen organizmanın bir şekilde ayırt edici olan bir koloni oluşturmasını sağlar. Bu işlemlerin daha hızlı yapılabilmesi için hızlı test sistemleri ticari olarak özellikle insan sağlığı söz konusu olduğu için geliştirilmiştir. Bu yöntemler özellikle enterik mikroorganizmalar gibi medikal mikroorganizmalar için geliştirilmiştir. Bu hızlı testler genellikle birçok biyokimyasal testi eş zamanlı 4-24 saat içerisinde gerçekleştirebilmek için tasarlanmıştır. Pek çok testte test sonuçları testlerin göreceli güvenilirliği ve önemine göre 1-4 arasında derecelendirilir, elde edilen toplam skor veri tabanındaki bilinen mikroorganizmaların skorları ile karşılaştırılır. Şekil 2'de bilinmeyen bir enterik bakterinin teşhisi için 15 farklı biyokimyasal testi içeren bir tüpde yapılan test sonuçları şematik olarak gösterilmektedir. Test sonucunda veri tabanında bulunan uyumlu kod *Citrobacter freundii* olarak tespit edilmiştir.

1 One tube containing media for 15 biochemical tests is inoculated with an unknown enteric bacterium.

2 After incubation, the tube is observed for results.

3 The value for each positive test is circled, and the numbers from each group of tests are added to give the code number.

4 Comparing the resultant code number with a computerized listing shows that the organism in the tube is *Citrobacter freundii*.

Code Number	Microorganism	Atypical Test Results
62342	<i>Citrobacter freundii</i>	Citrate
62343	<i>Citrobacter freundii</i>	None

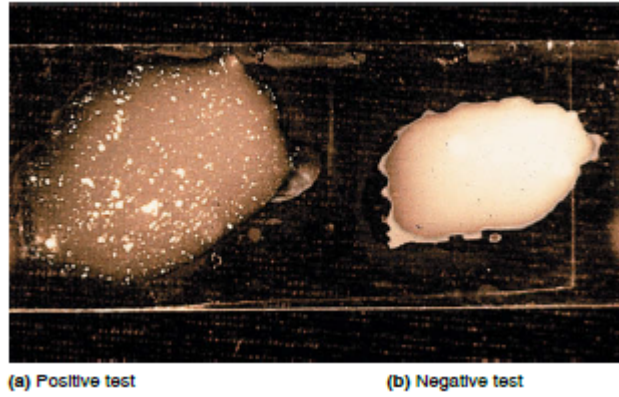
Şekil 2. Bakteriler için biyokimyasal testlere dayanan örnek bir ticari hızlı teşhis yöntemi: EnteroPluri Test

Otomatik hızlı teşhis şimdilerde medikal açıdan önemli bazı bakteri ve mayalar içinde *kütle spektrometrik* yöntemlerle de uygulanmaktadır. Tek bir koloninin hücreleri parçalanır ve proteinleri asetonitril içerisinde ekstrakte edilir. Ekstrat içerisindeki proteinler kütle spektrometresinde belirlenerek mikroorganizma teşhisi yapılır [4].

Serolojik Yöntemler

Mikroorganizmalar antijeniktir ve bağışıklık sistemi ile antikorlar üretirler. Antikorlar proteinlerden oluşur ve her biri bakteri için spesifik karakterdedir. Tıbbi olarak önemli birçok mikroorganizmanın tanımlanmasında kullanılan bu gibi antikorların çözeltileri antiserum olarak ticari olarak temin edilebilir; Bir hastadan izole edilen bakteri, bilinen antiserumlara karşı test edilebilir ve hızlı bir şekilde teşhis edilebilir.

Lam aglütinasyon testi olarak bir test prosedüründe bilinmeyen bakteri örnekleri her bir lam üzerindeki tuzlu su damlası içine yerleştirilir. Sonra bilinen antiserumlar her bir örneğe eklenir. Her eklene anti seruma özel gözlenen aglütinasyonlar (bakteri yığınları) testin bakteri tür ve suşları için pozitif olarak isimlendirilir (Şekil 3).



Şekil 3. Lam aglütinasyon testi

Eliza testi (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA) hızlı olduğu ve bir bilgisayar tarayıcısı tarafından okunabildiği için yaygın olarak kullanılan testlerden bir tanesidir. Bilinen antikorlar mikropalakalara konur ve üzerlerine bilinmeyen bakteriler ilave edilir. Bilinen antikorlar ile bilinmeyen bakteriler arasındaki reaksiyon bakterinin teşhisine imkan verir. AIDS'e neden olan HIV virüsüne karşı antikorların varlığını belirlemek için ELİZA testi yaygın olarak kullanılmaktadır [3].

Faj tipleme (Phage Typing)

Faj tipleme, bir bakterinin hangi fajlara duyarlı olduğunu belirlemek için yapılan bir testtir. Bakteriyofajlar genellikle enfekte ettikleri bakteri hücrelerinin parçalanmasına neden olan bakteri virüsleridir. Genellikle belirli bir türün üyelerini veya hatta bir tür içindeki belirli suşları enfekte ettiği için son derece spesifiktir. Gıda kaynaklı enfeksiyonların kaynakları faj tiplemesi ile izlenebilir. Enfekte olan bakterilerin görünümüne plaka ismi verilir [3].

Akış Sitometrisi (Flow Cytometry)

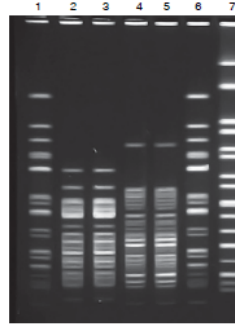
Akış sitometrisi, bakterileri kültürlemeden bir numunedeki bakterileri tanımlamak için kullanılabilir. Bir akış sitometresinde bakteri içeren hareketli bir sıvı küçük bir açıklıktan geçirilir. Yöntemde, hücreler ve çevresindeki ortam arasındaki elektrik iletkenliği farkını ölçerek bakteri varlığını tespit eder. Açıklıktan geçen sıvı bir lazerle aydınlatılıyorsa, ışığın saçılması bir bilgisayar tarafından analiz edilen hücre boyutu, şekli, yoğunluğu ve yüzeyi hakkında bilgi sağlar. Floresans, *Pseudomonas* gibi doğal olarak flüoresan hücreleri veya flüoresan boyaları ile etiketlenmiş hücreleri tespit etmek için kullanılabilir. Sütteki *Listeria* saptamak için akış sitometrisi yapılan test kültürleme gerektirmediği için zaman kazandırabilir. *Listeria*'ya karşı antikorlar, floresan bir boya ile etiketlenebilir ve test edilecek süte ilave edilebilir. Süt, antikor etiketli hücrelerin floresansını kaydeden akış sitometresinden geçirilir [3].

DNA sekanslama (dizileme)

Taksonomistler, bir organizmanın DNA baz bileşimini, ilgili olma konusunda sonuç çıkarmak için kullanabilirler. Bu baz bileşimi genellikle guanin artı sitozin (G+C) yüzdesi olarak ifade edilir. Tek bir türün baz bileşimi teorik olarak sabit bir özelliktir; Bu nedenle, farklı türlerdeki G + C içeriğinin karşılaştırılması, türlerle ilgili dereceyi ortaya çıkarabilir. Son on yılda, DNA sekanslarının karşılaştırılması bilinen türlerin yeniden sınıflandırılmasında ve yeni türlerin tanımlanmasını sağlamıştır. Yüzlerce organizmanın genetik dizileri, NCBI Genome Database aracılığıyla çevrimiçi olarak kullanılabilen veritabanlarında derlenmektedir. 2016'da araştırmacılar, DNA sekanslamayı kullanarak yeni bir Lyme hastalığı patojeni olan *Borrelia mayonii*'yi keşfetmişlerdir^[3].

DNA parmak izi

Bir organizmanın DNA'sındaki bazların bütün dizisinin belirlenmesi çok zaman gerektirdiği için pratik değildir. Bununla birlikte, restriksiyon (kısıtlayıcı) enzimi kullanılması, araştırmacıların farklı organizmaların baz dizilerini karşılaştırmasını sağlar. Restriksiyon enzimleri, belirli bir baz diziliminin meydana geldiği her yerde bir DNA molekülünü keserek, kesilmiş parçalar üretir. Bu teknikle, iki mikroorganizmanın DNA'sı aynı restriksiyon enzimi ile muamele edilir ve üretilen kısıtlama parçaları elektroforez ile ayrılır ve bir DNA parmak izi üretilir. Aşağıdaki şekilde aynı sınırlayıcı enzim ile yedi farklı bakteriden elde edilen DNA'lar muamele edilip agaroz jel içine yerleştirilir. Büyüklük ve elektriksel yüküne göre parçaları ayırmak için jele elektriksel akım uygulanır. DNA, ultraviyole ışık altında floresan bir boya ile boyanarak görünür hale getirilmiştir. Şeritlerin karşılaştırılması ile şerit 2 ve 3, 4 ve 5; ve 1 ve 6 DNA örneklerinin (ve dolayısıyla bakterilerin) aynı olduğuna karar verilir (Şekil 4)^[3].



Şekil 4. DNA parmak izi

Nükleik asit hibridizasyonu

DNA'nın çift sarmallı bir molekülü ısıya maruz kalırsa, tamamlayıcı teller bazlar arasındaki hidrojen bağları koptuğu için birbirinden ayrılmaktadır. Tek iplikçikler daha sonra yavaşça soğutulursa, başlangıçtaki çift sarmallı bir molekül oluşturmak için tekrar birleşirler. Bu teknik iki farklı organizmadan ayrılmış DNA ipliklerine uygulandığında, iki organizmanın baz dizileri arasındaki benzerlik derecesini belirlemek mümkündür. % 70 veya daha fazla benzerlik iki mikroorganizmanın aynı türden olduğunu göstermektedir. Bu yöntem, nükleik asit hibridizasyonu olarak bilinir. Herhangi bir tek iplikli nükleik asit zinciri arasında benzer hibridizasyon reaksiyonları oluşabilir: DNA-DNA, RNA-RNA, DNA-RNA. Bir RNA transkripti, bir DNA-RNA hibrit molekülü oluşturmak için ayrılan şablon DNA ile hibritlenir^[3].

Mikroskopik Yöntemler

Mikroskoptan bağımsız olarak klasik mikroskopik tanı kullanıcının yorumuna büyük ölçüde dayanmaktadır. İnsan gözü iki nokta arasındaki 150 µm'yi ayırtabilir. Çözünürlük, mikroskop tarafından desteklenen veya desteklenmeyen gözle görülebilen iki nokta arasındaki en küçük mesafedir. Mikroskopunun amacı insan gözünün çözünürlüğünü arttırmaktır. Işık dalgı boyu ve kullanılan objektiflerin açıklığının bir fonksiyonu olan çözünürlük gücü iki noktayı ayrı olarak ayırt edebilme yeteneğidir. Bir çok ışık mikroskopu için bu 750 kat *büyültme* ile 0,2 µm'yi fark etmemizi sağlamaktadır. Belki de mikroskopinin en önemli yönü numunenin aydınlatılmasıdır. *Aydınlatma* olmadan, örnek görselleştirilememektedir. Işık mikroskopunda, iletilen ışık veya yansıtılan ışık

kullanılabilir. Aydınlatma kaynağı beyaz ışık veya ultraviyole ışık olabilir. Bununla birlikte, tüm mikroskopik teknikler, bir görüntünün çözünürlüğünü etkilemek için ışığın (veya elektron mikroskopisindeki elektronların) manipülasyonuna dayanmaktadır. *Kontrast*, bir nesneyi çevreleyen ortamdan ayırt etme becerisine karşılık gelir ve onsuz, hem çözünürlük hem de büyütme önemsiz hale gelir. Mikroskoptaki ilerlemelerin çoğu, yalnızca faz kontrast mikroskobu gibi kontrastın artırılması amacıyla olmuştur. Metilen mavisi ve safranin gibi boyalar ve lekeler de her tür mikroskopla kontrastı arttırmak için kullanılır [4].

DİJİTAL İMAJ İŞLEME YÖNTEMİ

Ön İşlemler

Bazı bakteri türleri saydam olduklarından dolayı optik mikroskop altında görüntülenememektedir. Bu türlerin görünür olmasını sağlamak için DNA probu ya da boyama yöntemi ön işlem olarak tercih edilmektedir. Günümüzde bakterilerin sayımı için uygulanan klasik yöntemlerde de floresan boyalar ve epifloresan mikroskopi boyama amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA boyamasında en çok kullanılan boya türleri: Ethidium Bromide, Propidium Iodide, Crystal Violet, dUTP-conjugated Probes, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), 7-AAD (7-aminoactinomycin D), Hoechst 33258 (33342, 34580) ve YOYO-1/DiYO-1/TOTO-1/DiTO-1'dir [5].

DAPI ile boyanmış bakterilerin tespiti büyük ölçüde numuneye bağlıdır ve bu nedenle tespit yönteminin performansı, özellikle düşük floresans (ışıma) seviyesine sahip bakterileri analiz ederken önemlidir [6].

Donanımlar

Optik, epi-floresan ve taramalı elektron mikroskopları ile DGI yönteminin uygulanması mümkündür. Bunun dışında lens görüntüleme işlemleri de sıklıkla kullanılan donanımlardır. Lens görüntüleme sistemleri, tamamlayıcı metal-oksit yarı iletken (CMOS) imaj sensörü ve mavi LED lambalardan oluşmaktadır [7].

Yazılımlar

ImageJ (NIH) ve MATLAB (Mathworks) bilgisayarlı görüntü analizi için en çok kullanılan iki yazılımdır. ImageJ açık kaynak kodlu ve işlevselliklerinin çoğu kullanıcılar tarafından tasarlanmış eklentilerden oluşmaktadır. MATLAB ise bilgisayarla görüntü işleme için geniş işlevsellikli birçok optimize algoritma içeren araçlara sahiptir. Bazı faydalı ImageJ eklentileri ve MATLAB araç kutuları aşağıda listelenmiştir [7].

ImageJ

1. Otsu Eşiği (Otsu Thresholding)
2. Sınır Dönüşümü (Watershed Transformation)
3. Çoklu Eşik (Multi Thresholder)
4. Hücre Sayacı (Cell Counter)
5. Hough Çemberleri (Hough Circles)
6. Biyo-Biçimler (Bio-Formats)

MATLAB

1. Görüntü İşleme Araç Kutusu
2. Bilgisayarlı Görme Sistemi Araç Kutusu
3. Bulanık Mantık Araç Kutusu
4. Sinyal İşleme Araç Kutusu
5. Biyo-Biçimler Araç Kutusu

Metotlar

Temel Bilgisayar Programı Tasarımı

Temel bakteri görüntüsü analiz yazılımı için genel akış şeması Şekil 5'de gösterilmiştir. Yazılım, daha küçük ve daha spesifik modüllerden oluşan ana bölümlere ayrılmıştır.

Girdi	Ön İşlem	Görüntü Ayırma	Görüntü Analizi	Veri Analizi	Çıktı
<ul style="list-style-type: none"> • Ham görüntü • Hedef dizin 	<ul style="list-style-type: none"> • Bit derinliği ayarı • Fiziksel piksel boyutu • Arka plan gürültüsünün giderilmesi 	<ul style="list-style-type: none"> • Otsu • Canny 	<ul style="list-style-type: none"> • Alan analizi • Sinyal-gürültü ölçümü • Görüntü etiketleme 	<ul style="list-style-type: none"> • Veri işleme • Seçimin iyileştirilmesi • Bakteri sayımı 	<ul style="list-style-type: none"> • Grafikler • Tablolar • Ham veriler • Dokümanlar

Şekil 5. Temel bir bakteriyel görüntü analiz yazılımı için akış çizelgesi

İlk adım olan girdi, ham görüntünün yazılıma yüklenmesinden ve sonuçların depolanacağı dizinin tanımlanmasından ibarettir. Ön işleme adımı, görüntüden gürültünün temizlenmesi, arka plandaki parazitlerin azaltılması ve sonraki aşamalarda kullanılacak ham görüntünün önemli bilgilerinin (önceden belirlenen meta veriler) çıkartılarak bölümlerine ayrılması için kullanılır. Üçüncü adım olan görüntü ayırma, önceden işlenmiş görüntünün ikili maskeye dönüştürüldüğü yerdir. Bu bölümde görüntünün 1s ve 0s'den oluştuğu kabul edilir ve 1s'ler nesnelere yer aldığı bölgelere, 0s'ler ise arka plan olarak tanımlanan bölgelere atanarak görüntü maskelenir. Görüntü ayırma aşaması, görüntü analizinden iyi sonuçların elde edilmesi için görüntünün en iyi duruma getirilmesi gereken adımdır. Oluşturulan maske, görüntü analizi adımıyla bir filtre olarak işlev görür ve analiz, maske önceden işlenmiş görüntü üzerinde gerçekleştirilir. Bu durum yazılımla önceden analiz edilen alanların maskelenerek 0 ve 1'lerden oluşan bölgelere dönüştürüldüğü ve dönüşen alanların görüntüden ayrılabilmesi anlamına gelir. Şekil 1'de görüldüğü gibi aynı yazılımda farklı analiz modülleri mevcut olabilir ve her biri kendi veri çıktısını üretmektedir. Önceki adımda üretilen veriler daha sonra analiz edilir, yapılandırılır ve veri analizi adımıyla iyileştirilir. Veri analizine örnek olarak bulunan bakterileri saymak, $\mu\text{m}/\text{piksel}$ oranına dayanarak bakteri alanını hesaplamak ve bakteri dış çevresini hesaplamaktır. Yalnızca ilgili verilerin analiz edilmesi, farklı bakteri gruplarının ayrılması ve aykırı değerlerin tanımlanabilmesi için seçimin iyileştirilmesi önemlidir. Veri analizi adımının amacı, ilgili verileri anlaşılır ve kullanışlı bir hale getirmektir. Son adım olan çıktı, analiz sonuçlarını sunmak için seçilmiş verileri tablolara ve grafiklere dönüştürmeyi içerir. Çıktının bir diğer önemli işlevi de her adımdaki üretilen verileri yapılandırılmış bir sistemde saklamaktır. Çıktı aşaması verilerin ve her bir işlemin, işlemin tamamını yeniden başlatmak zorunda kalmadan yeniden incelenebilmesini sağlar. En önemlisi de program koduyla birlikte tam olarak ne yapıldığı ne zaman yapıldığı ve nasıl yapıldığı hakkında kayıtlar saklanmaktadır [7].

Temel Yöntemler

Segmentasyon (ayırma), görüntü analizinde ortak bir adımdır ve nesnelere görüntüdeki arka plandan ayrıldığı aşamadır. Bu aşama, piksel yoğunluğu gibi özelliklerin tanımlanmasına ve piksellerin örtüşmeyen bölgelere bölünmesi için kullanılmasına dayanır [8]. Segmentasyonun amacı, tipik olarak maske denilen ikili bir görüntü elde etmektir. Maske daha sonra yazılımın analiz etmesi gereken bölgeleri tanımlamak için kullanılır ve bu nedenle herhangi bir güvenilirlikle görüntü analizi yapmak için kritik öneme sahiptir. Burada incelenecek dört ana segmentasyon yöntemi; eşikleme, kenar algılama, aktif çevreleme ve sınır dönüşümüdür.

Eşik tabanlı segmentasyon, nesnelere arka plandan ayırmak için bir eşik değeri kullanır. İki seviyeli eşik, piksellerin iki sınıfa, nesneye ve arka plana bölünmesine neden olur. Birden fazla eşik kullanılması, birden fazla sınıfın veya piksel grubunun tanımlanmasına izin verir ve bu yöntem, çok düzeyli eşikleme adını alır [8].

Kenar algılama, pikseller arasındaki yoğunlukta süreksizliklere bağlı olarak kenarları tanımlar. Derinlik, aydınlatma veya yüzey yönündeki süreksizlikleri tespit edebilen genel bir varsayım ile yapılır. Kenarların birbirine tamamen bağlı olmaması ve bunun yerine çoklu parçalardan oluşması kenarların tespiti ile ilgili yaygın bir problemdir. İkinci önemli problem ise yanlış pozitiflerin eşdeğeri olarak düşünülebilecek olmayan kenarların varlığıdır.

Aktif çevreleme segmentasyonu, nesnelere dış hatlarını belirginleştirmek için istenildiği gibi şekillendirilebilen tümleşik eğriler kullanır. Bu eğriler nesnenin dış çevresini sarıp dış çevredeki hücreye benzer özellikler almak için algoritmalar kullanır. Aktif şekillendirmenin avantajlı yanları şunlardır: hareket halindeki nesnelere izleme kabiliyeti, her nesneye özel ve uyarlanabilir olması, Gauss yumuşatması ölçülenebilir olması ve eğrilerin konumlandırılmasının sezgisel olmasıdır. Bu yöntemin

bir dezavantajı, nesne dış çerperindeki ana özelliklerin eğrilerle eşleştirilmesinin küçük ayrıntıların eşleştirilmesine kıyasla daha düşük enerjiye neden olma riski taşıması ve bu nedenle bazı çizgilerin kaçırılabilmesidir. Bu yöntemle ilgili diğer bilinmesi gerekenler ise yöntemin doğruluğunun hesaplama süresiyle doğru orantılı olduğu ve küçük bölgelerin işlenmesine sıkışıp kalma eğiliminin olduğudur.

Sınır dönüşümü, piksel yoğunluğu vasıtasıyla nesne derinliğini tahmin etmenin en kolay yoludur. Pikselin yoğunluğu ne kadar fazlaysa o kadar derinde bulunduğu anlamına gelir. İlk adım, işaretçilerin nesnelere ve arka plana yerleştirilmesidir. İkinci ve son adım ise işaretleri sanki bir "su" kaynağı olarak kullanarak görüntüyü "su ile doldurmaktır". Böylece her işaretçinin ayrı bölgelerde yer aldığı parsellenmiş bir görüntü elde edilir. Bu yöntemle ilgili en büyük sorun parsel sayısının fazla olması riskidir. Sınır dönüşümü, birleştirilmiş bölgeleri birbirinden ayırmak ve daha iyi bir maske elde etmek için ikincil bir bölümlendirme yöntemi olarak daha kullanışlıdır.

Otsu metodu, eşik tabanlı segmentasyonun başka bir biçimidir. Algoritma, sınıf içi varyansı en aza indirerek ve piksel sınıfları arasındaki varyansı maksimize ederek eşik hesaplar. Bu sayede eşik değerini manuel olarak girme ihtiyacı ortadan kalkar ve bakteri ile arkaplanın ayrılabilirliğini en üst düzeye çıkaran "optimal eşik" olarak adlandırılan bir durum oluşur. Bunun yanısıra bu yöntemin hesaplanması piksel yoğunluğu dağılımının iki modlu bir histogramı takip etmesini gerektirir, bu nedenle çok pikseli görüntülerde güvenilir bir şekilde kullanılamaz. Otsu'nun metodu, çok pikseli görüntünün daha güvenilir olarak işlenebilmesi amacıyla görüntülerin segmentlere ayrılmasını sağlayan çoklu eşikleri hesaplayabilmesi için geliştirilmiştir. Bu gelişmiş yöntemin adı Çoklu-Otsu'dur fakat oldukça verimsiz ve zaman alıcıdır^[9].

Canny kenar tespiti, pikseller arasındaki yoğunluğa bağlı olarak kenarları tanımlayan ve yaygın olarak kullanılan başka bir segmentasyon yöntemidir. Beş adımında gerçekleştirilir; (1) arka plandaki gürültüyü kaybetmek için Gaussian (Bulanıklaştırma) filtresi uygulanır, (2) yoğunluk dereceleri belirlenir, (3) maksimum olmayanlar bastırılır, (4) yoğunluk dereceleri belirlenerek potansiyel kenarlar tespit edilir ve (5) histerez yoluyla zayıf kenarlar baskılanır. Canny'nin avantajlarından biri nesnenin kenarlarını tespit etmede çok hassas olduğudur fakat Otsu yöntemine göre nesne köşeleri daha az belirgindir. Özellikle nesne Gauss arkaplan gürültüsüne maruz kaldığında işlem yapabilmek için nesnenin bulunduğu alanı daha fazla bölümlere ayırma eğilimindedir.

Otsu'nun optimal eşik, Canny'nin yüksek eşik değeri olarak kullanıldığında Canny kenar tespitinde segmentasyon sonuçlarını iyileştirmektedir^[5,10].

Bakteri Seçiminin Geliştirilmesi

Görüntü analizi, araştırma amacına göre analiz edilmesi gereken verileri uygun şekilde taramayı ve seçmeyi amaçlamaktadır. Yazılımın açık talimatlar olmadan gerekli ayrımı yapamamasından dolayı (örneğin yapay sinyalleri bakteri sinyalleri kadar önemli olarak ele aldığından bakteriyi ayırt edemez.) veri seçimini geliştirmek önemlidir. Veri geliştirme, Tablo 1'de ayrıntılı olarak açıklanan birçok parametreye bağlı olarak değişkenlik gösterebilir.

Tablo 1. MATLAB ile bakteri seçimlerini kolayca yapılabilen potansiyel uygulamalar

Ölçüm	Amacı
Sinyal Gürültü Oranı Signal-to-noise	Zayıf floresan bakterilerinin ve yapay dokuların ortadan kaldırılması. Görüntü ve segmentasyon kalitesini değerlendirme
Alan Area	Büyüklik olarak önemli ölçüde farklılıkları olan yapay dokuları ortadan kaldırmak Kümelenmiş bakterilerle çalışırken ortalama büyüklükteki bakterilerin sayısının hesaplanması
Dışmerkezlik Eccentricity	Farklı bakteri türlerinin ayrılması
Ortalama Yoğunluk Mean intensity	Zayıf floresan bakterilerini ve yapay dokuları ortadan kaldırmak
Geometrik Merkez Centroid	Bakterilerin etiketlenmesi ve tanımlanması
Ağırlıklı Geo. Merkez Weighted Centroid	Moleküler aktivitenin konumsal doğrulaması için vektör oluşturmak üzere geometrik merkez ile birleşim

STD/SEM Piksel Yoğunluğu STD/SEM pixel intensity	Homojen flüoresan bakterileri, heterojen flüoresan bakterilerden ayırmak
Çevre Uzunluğu Perimeter	Çubuk şeklindeki bakterilerin medial ekseninin uzunluğunu hesaplamak için bileşen
Renk Color	Farklı floresan belirteçlerine göre bakterileri ayırmak

Bir görüntü üzerinde farklı sinyallerin analiz edilmesine olanak sağlayan bu yöntemler farklı avantajlara sahiptir. Örneğin, bakteri türleri arasında önemli farklılıklar varsa iki farklı bakteri türü şekilleri karşılaştırarak ayırt edilebilir. Bunun aksine türler farklı olsa da alan bazında bir ayırım türlerin benzer büyüklükte olması durumunda iyi performans göstermemektedir. Farklı davranan bakterileri izole etmenin bir başka yolu da piksel yoğunluğunun standart sapmasını kullanmak ve floresanın ne kadar homojen görüldüğüne bağlı olarak popülasyonu gruplara ayırmaktır [7].

İlişkili Çalışmalar

Görüntü işleme ve görüntü tanıma teknikleri, çeşitli sınıflandırma araçları ile birleştirilerek laboratuvar örneklerinin tanınmasında etkili bir araç olarak kullanılır. Bu yöntemleri göz önünde bulundururken, bakteri türlerinin ve sınıflarının otomatik tanımlanması için birçok yöntem olduğunu söyleyebiliriz. Diğerlerinin yanı sıra, yapay sinir ağları veya diğer makine öğrenme sınıflandırıcıları gibi istatistiksel yöntemler de vardır.

Bir algoritma bakteri türlerini geometrik özelliklerine göre tanımlar: dairesellik, kompaktlık, eksantriklik, eğrilik ve uzunluk-genişlik oranı. Ayrıca basil (bacillus) şekli ayırt edici bir özellik olmadığından (farklı bakteri türlerinde aynı morfoloji nedeniyle) dolayı ayırt etmek için renkleri dikkate alınır.

Forero vd. (2006) tüberkülozun otomatik olarak tanınması için bir yöntemi açıklamışlardır. Bu yöntem yalnızca geometrik özelliklere değil, aynı zamanda görüntülerin rengine de dayanmaktadır. Araştırmalarında yazarlar, bakteriyel morfolojideki aldatıcı benzerlikler konusunu ele almışlardır. Mikroorganizmaların renginin tanılamada doğruluğu artırmanın kilit özellik olduğunu ortaya koymuşlardır [11].

Ahmed vd. (2013) koloni saçılma desenlerini kullanarak gıda kaynaklı patojenlerin tanımlanması ve sınıflandırılması için bir yöntem önermişlerdir. İlk adımda, özellikler belirlenir ve Fisher ölçütü boyutsallığın azaltılmasında kullanılır. Son adımda, Destek Vektör Makinesi (DVM) sınıflandırıcısı kullanılır. Benzer bir yaklaşım DVM yerine Rastgele Ormanlar ile de sunulmuştur [12].

Selinummi vd. (2005) otomatik görüntü analiz yazılımını (CellC) kullanarak, akışkan yatak reaktörden alınan bakteriyel hücrelerin dijital mikroskop görüntülerinden ölçülmesi için geliştirmişlerdir. CellC yazılımı ile, bakteri hücrelerinin otomatik numaralandırılmasını, toplam sayım (DAPI) ve spesifik sayım (FISH) görüntülerinin karşılaştırılmasını ve hücre morfolojisinin kantitatif tahminlerini araştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda manuel olarak yapılan sayım işlemi ile CellC yazılımı ile yapılan sayım işlemi arasındaki korelasyonu 0,98 olarak bulmuşlardır [6].

Dias vd. (2016) aktif çamur prosesinde bulunan filamentli bakterilerin görüntü işleme ile herhangi bir işlem yapmadan (boyama, seyreltme) belirlenmesini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada, 1392 X 1040 piksel çözünürlüğünde, saniyede 10 monokromatik imaj (8 bit) elde edilmiştir. Buna ilaveten, filamentli bakterilerin uzunluğu jeodezik (iki nokta arasındaki en kısa mesafe) uzaklık hesaplamasına bağlı olarak hesaplanması çalışılmıştır. Uzmanlar tarafından belirlenen filamentli bakteriler, yapılan bu çalışmada sunulan algoritmayla, filament piksellerinin %72'sinin doğru bir şekilde tanımlandığı belirtilmiştir [13].

Maeda vd. (2018) Staphylococcus bakteri türlerini koloni ayak izi denilen, bakteri mikrokolonilerinin görüntü işleme ile tespitini sağlamışlardır. Çalışma, bakteri türlerinin gelişimi, lens görüntüleme ve görüntü işleme metodlarından oluşmaktadır. Lysogeny broth (LB) kullanılarak bakteri türlerinin gelişimi sağlanmıştır. Lens görüntüleme sistemleri, tamamlayıcı metal-oksit yarı iletken (CMOS The Imaging Source Europe GmbH, Bremen, Almanya) imaj sensörü 2048 X 1536 piksel, piksel size: 3.2 µm, görüntüleme alanı: 6.55 X 4.92 mm²) ve mavi LED lambalar kullanılmıştır. Görüntü işleme Image J ve MATLAB programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir [14].

SONUÇLAR

Mikroskopi bakteri araştırmak için önemli bir araçtır, ancak günümüzde çoğunlukla zaman alıcı manuel analiz içeren kalitatif veya muhtemelen yarı kantitatif bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca bu yöntem, özellikle insan gözünün ayırt etmesi çok zor olan bakterilerin şekil, boyut veya sinyal yoğunluğu gibi özelliklerinde ince farklılıklar olduğu durumlarda değerlendirmeyi zorlaştırmaktadır. Bilgisayar tabanlı görüntü analizi ile bilgisayar algoritmalarının görüntü verilerini yorumlanabilmekte ve elde edilen görüntülerin otomatik ve nesnel bir şekilde tekrarlanabilmesini otomatik bir şekilde elde etmek mümkündür. İmaj analizi, görüntüleri analiz etmek için çok daha etkili ve tutarlı bir yol olmasının yanı sıra, geleneksel yöntemlerle elde edilmesi zor olan önemli bilgileri de ortaya çıkarabilmektedir. Bu derleme çalışmasında, bakteriyel araştırmalarda kullanılan klasik yöntemler ve bu araştırmalarda kullanım için nispeten kolay uygulanabilen otomatik görüntü işleme ve analiz ile ilgili temel kavramları sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Costa, J., Mesquita, D., Amaral, A., Alves, M., Ferreira, E.J.E.S., Research, P., 2013. Quantitative image analysis for the characterization of microbial aggregates in biological wastewater treatment: a review. 20, 5887-5912.
- [2] Li, C., Shirahama, K., Grzegorzec, M.J.B., Engineering, B., 2015. Application of content-based image analysis to environmental microorganism classification. 35, 10-21.
- [3] Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., Johnson, T.R., 2004. Microbiology: an introduction. Benjamin Cummings San Francisco, CA.
- [4] Maier, R.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2009. Environmental microbiology. Academic press.
- [5] Biomol, 2019. Biomol GmbH - Life Science Shop, Germany.
- [6] Selinummi, J., Seppälä, J., Yli-Harja, O., Puhakka, J.A.J.B., 2005. Software for quantification of labeled bacteria from digital microscope images by automated image analysis. 39, 859-863.
- [7] Danielsen, J., Nordenfelt, P., 2017. Computer Vision-Based Image Analysis of Bacteria, Bacterial Pathogenesis. Springer, pp. 161-172.
- [8] Mahmoudi, L., El Zaart, A., 2012. A survey of entropy image thresholding techniques, 2012 2nd international conference on advances in computational tools for engineering applications (ACTEA). IEEE, pp. 204-209.
- [9] Zhang, Y., Wu, L.J.E., 2011. Optimal multi-level thresholding based on maximum Tsallis entropy via an artificial bee colony approach. 13, 841-859.
- [10] Fang, M., Yue, G., Yu, Q., 2009. The study on an application of otsu method in canny operator, Proceedings. The 2009 International Symposium on Information Processing (ISIP 2009). Citeseer, p. 109.
- [11] Forero, M.G., Cristóbal, G., Desco, M.J.J.o.m., 2006. Automatic identification of Mycobacterium tuberculosis by Gaussian mixture models. 223, 120-132.
- [12] Ahmed, W.M., Bayraktar, B., Bhunia, A.K., Hirleman, E.D., Robinson, J.P., Rajwa, B.J.I.j.o.b., informatics, h., 2012. Classification of bacterial contamination using image processing and distributed computing. 17, 232-239.
- [13] Dias, P.A., Dunkel, T., Fajado, D.A., de León Gallegos, E., Denecke, M., Wiedemann, P., Schneider, F.K., Suhr, H.J.B.e.o., 2016. Image processing for identification and quantification of filamentous bacteria in in situ acquired images. 15, 64.
- [14] Maeda, Y., Sugiyama, Y., Kogiso, A., Lim, T.-K., Harada, M., Yoshino, T., Matsunaga, T., Tanaka, T.J.S., 2018. Colony Fingerprint-Based Discrimination of Staphylococcus species with Machine Learning Approaches. 18, 2789.