

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT

-Rezumatul tezei de doctorat-

CONTRIBUȚII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE PROCESARE A IMAGINILOR ÎN CONTROLUL ȘI ANALIZA BIOPROCESELOR

Doctorand,

Ing. Laurențiu Marius BAICU

Conducător științific,

Prof. dr. ing. Sergiu CARAMAN

Seria I8: Ingineria sistemelor Nr. 3

GALAȚI

2018

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Științe Fundamentale și Inginerești



TEZĂ DE DOCTORAT

-Rezumatul tezei de doctorat-

CONTRIBUȚII PRIVIND UTILIZAREA TEHNICILOR DE PROCESARE A IMAGINILOR ÎN CONTROLUL ȘI ANALIZA BIOPROCESELOR

Doctorand,

Ing. Laurențiu Marius BAICU

Presedinte:

Prof. dr. ing. Gabriela BHRIM

Conducător științific,

Prof. dr. ing. Sergiu CARAMAN

Referenți științifici

Prof. dr. ing. Corneliu LAZĂR

Prof. dr. ing. Dan POPESCU

Prof. dr. ing. Laurențiu FRANGU

Seria I8: Ingineria sistemelor Nr. 3

GALAȚI

2018

Seriile tezelor de doctorat sustinute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunt:

Domeniul **ȘTIINȚE INGINEREȘTI**

Seria I 1: **Biotehnologii**

Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**

Seria I 3: **Inginerie electrică**

Seria I 4: **Inginerie industrială**

Seria I 5: **Ingineria materialelor**

Seria I 6: **Inginerie mecanică**

Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**

Seria I 8: **Ingineria sistemelor**

Domeniul **ȘTIINȚE ECONOMICE**

Seria E 1: **Economie**

Seria E 2: **Management**

Domeniul **ȘTIINȚE UMANISTE**

Seria U 1: **Filologie- Engleză**

Seria U 2: **Filologie- Română**

Seria U 3: **Istorie**

Seria U 4: **Filologie - Franceză**

Domeniul **MATEMATICĂ ȘI ȘTIINȚE ALE NATURII**

Seria C: **Chimie**

Cuprins teză

Introducere

Introduction

Lista figurilor	1
Lista tabelelor	8

1. Stadiul actual al cunoașterii privind procesarea imaginilor în monitorizarea, conducerea și diagnoza bioproceselor

1.1 Generalități privind procesele biotehnologice	9
1.2 Probleme privind măsurarea mărimilor de interes din bioprocese	10
1.3 Utilizarea observerelor de stare și parametri în bioprocese	11
1.3.1 Observer Luenberger extins pentru estimarea stării proceselor biotehnologice	13
1.3.2 Estimarea parametrilor modelelor proceselor biotehnologice pe baza unui observer de stare	13
1.3.3 Studii de caz	14
1.3.4 Estimarea mărimilor de stare și a parametrilor cu filtrul Kalman	17
1.3.5 Studiu de caz	19
1.4 Tehnici de prelucrare a imaginilor cu aplicații în măsurarea concentrațiilor și analiza bioproceselor (diagnoza bioproceselor)	22
1.4.1 Tehnici de microscopie utilizate în prelucrare a imaginilor	24
1.4.2 Generarea și evaluarea imaginii	28
1.4.3 Metode prelucrare imagine	29
1.4.4 Aplicații privind utilizarea tehnicilor de prelucrare a imaginilor în automatizarea și diagnoza proceselor biotehnologice	30
1.5 Concluzii	39

2. Contribuții privind măsurarea automată a concentrației de biomasă dintr-un bioproces

2.1 Introducere	41
2.2 Fundamente privind tehnici de procesare numerică a imaginilor	42
2.2.1 Generalități privind prelucrări uzuale ale imaginilor	42
2.2.2 Filtrarea	43
2.2.3 Modificarea scării de gri (contrastul, lumananța medie)	44
2.2.4 Transformarea cosinus discretă	45
2.2.5 Segmentarea imaginii	46
2.2.6 Detectarea conturilor (Edge detection)	49
2.2.7 Metode bazate pe histograme	49
2.3 Principii generale de măsurare automată a concentrației de biomasă	50
2.4 Algoritm de măsurare a concentrației de biomasă prin procesare de imagini	53
2.5 Implementarea algoritmului de măsurare a concentrației de biomasă	59
2.6 Validarea algoritmului de măsurare a concentrației de biomasă	60
2.7 Concluzii	64

3. Contribuții privind realizarea unui sistem automat de reglare a concentrației de biomasă folosind tehnici de prelucrare a imaginilor

3.1 Introducere	65
-----------------	----

3.2 Sistemul de reglare a concentrației de biomasă folosind tehnici de procesare de imagini	66
3.2.1. Elemente constructive	67
3.2.2. Senzorul pentru măsurarea concentrației de biomasă bazat pe tehnici de procesare a imaginilor	69
3.3 Celula de curgere și observare	69
3.4 Implementarea software-ului de timp real a sistemului de control a bioreactorului	73
3.5 Analiza dinamicii traductorului	76
3.6 Validarea utilizării traductorului de măsurare a concentrației de biomasă bazat pe tehnici de prelucrare a imaginilor în cadrul sistemului de creștere a drojdiilor	82
3.7 Proiectarea regulatorului aferent buclei de reglare a concentrației de biomasă și validarea experimentală a acestuia	89
3.8 Concluzii	94
4. Clasificarea stării fiziologice a celulelor utilizând tehnici de procesare a imaginilor	95
4.1 Introducere	95
4.2 Elemente privind diagnoza bioproceselor. Analiza evoluției bioproceselor pe baza stării fiziologice a culturii de celule folosind tehnici de prelucrare a imaginilor alb-negru	96
4.2.1 Materiale și metode	96
4.2.2 Algoritmul de prelucrare a imaginii	98
4.2.3 Rezultate experimentale ale algoritmului de recunoaștere a celulelor (experimentul nr. 5)	100
4.2.4 Studiul erorilor de identificare	104
4.2.5 Validarea rezultatelor	106
4.2.6 Prezentarea setului de imagini prelucrate	107
4.3 Algoritm de evaluare a stadiului de dezvoltare și clasificare a celulelor pe baza informațiilor obținute din analiza imaginilor color	113
4.3.1 Materiale și metode	113
4.3.2 Algoritm de prelucrare a imaginii	116
4.3.3 Rezultate experimentale	119
4.3.4 Rezultate obținute cu algoritmul de prelucrare a imaginilor	138
4.3.5 Studiul erorilor algoritmului	141
4.4 Concluzii	145
Concluzii finale	146
Contribuții originale ale tezei de doctorat	147
Direcții viitoare de cercetare	148
Diseminarea rezultatelor	148
Anexa1	150
Anexa2	162
Bibliografie	164

Cuprins rezumat

Introducere

1. Stadiul actual al cunoașterii privind procesarea imaginilor în monitorizarea, conducerea și diagnoza bioprocесelor	1
1.1 Generalități privind procesele biotehnologice	1
1.2 Probleme privind măsurarea mărimilor de interes din bioprocесe	2
2. Contribuții privind măsurarea automată a concentrației de biomasă dintr-un bioprocес	4
2.1 Introducere	4
2.3 Principii generale de măsurare automată a concentrației de biomasă	4
2.4 Algoritm de măsurare a concentrației de biomasă prin procesare de imagini	5
2.5 Implementarea algoritmului de măsurare a concentrației de biomasă	6
2.6 Validarea algoritmului de măsurare a concentrației de biomasă	6
3. Contribuții privind realizarea unui sistem automat de reglare a concentrației de biomasă folosind tehnici de prelucrare a imaginilor	8
3.1 Introducere	8
3.2 Sistemul de reglare a concentrației de biomasă folosind tehnici de procesare de imagini	8
3.2.2. Senzorul pentru măsurarea concentrației de biomasă bazat pe tehnici de procesare a imaginilor	9
3.3 Celula de curgere și observare	9
3.4 Implementarea software-ului de timp real a sistemului de control a bioreactorului	10
3.5 Analiza dinamicii traductorului	10
3.6 Validarea utilizării traductorului de măsurare a concentrației de biomasă bazat pe tehnici de prelucrare a imaginilor în cadrul sistemului de creștere a drojdiilor	11
3.7 Proiectarea regulatorului aferent buclei de reglare a concentrației de biomasă și validarea experimentală a acestuia	15
4. Clasificarea stării fiziologice a celulelor utilizând tehnici de procesare a imaginilor	18
4.1 Introducere	18
4.2 Elemente privind diagnoza bioprocесelor. Analiza evoluției bioprocесelor pe baza stării fiziologice a culturii de celule folosind tehnici de prelucrare a imaginilor alb-negru	18
4.2.1 Materiale și metode	19
4.2.2 Algoritm de prelucrare a imaginii	20
4.2.3 Rezultate experimentale ale algoritmului de recunoaștere a celulelor (experimentul nr. 5)	20
4.2.4 Studiul erorilor de identificare	22
4.2.5 Validarea rezultatelor	23
4.2.6 Prezentarea setului de imagini prelucrate	24
4.3 Algoritm de evaluare a stadiului de dezvoltare și clasificare a celulelor pe baza informațiilor obținute din analiza imaginilor color	26

4.3.1 Materiale și metode	26
4.3.2 Algoritm de prelucrare a imaginii	28
4.3.3 Rezultate experimentale	30
4.3.4 Rezultate obținute cu algoritmul de prelucrare a imaginilor	33
Concluzii finale	35
Contribuții originale ale tezei de doctorat	36
Direcții viitoare de cercetare	37
Diseminarea rezultatelor	37
Bibliografie	39

Introducere

Bioprocese

Bioingineria este o știință care implică procese biologice, procese în care se dezvoltă culturi de microorganisme. Acestea sunt numite procese biotehnologice sau bioprocese. Dintre procesele biotehnologice pot fi enumerate procese de biosinteză (biodegradare) cum sunt cele pentru producerea enzimelor, medicamentelor (antibiotice, vitamine etc.), acizilor organici, biocarburaților, pigmentilor etc. Trebuie amintite și procesele de obținere a biomasei (de ex. creșterea ciupercilor) și, nu mai puțin importante, procesele de tratare biologică a apelor uzate. Specific bioproceselor este faptul că acestea presupun dezvoltarea de organisme vii care produc, pe cale naturală diferite produse de interes pentru comunitățile umane. Evident că dezvoltarea culturilor de microorganisme presupune asigurarea unor condiții specifice de mediu în care acestea să crească și să aibă o productivitate înaltă și un randament crescut. De aici a izvorât necesitatea abordării proceselor biotehnologice într-o manieră interdisciplinară, înțelegând că, pe lângă biotehnologii, la creșterea în bune condiții a microorganismelor, contribuie în mod semnificativ și alte științe precum automatica (modelarea și controlul bioproceselor) informatica (programarea sistemelor de calcul pentru implementarea algoritmilor de conducere automată), chimie, fizica, matematica etc.

În general, bioprocesele se desfășoară în instalații specializate, numite bioreactoare. Acestea sunt prevăzute cu echipamentele necesare dezvoltării culturilor de celule, incluzând și elementele de automatizare (diferite traductoare și elemente de execuție specifice). Structural, un bioproces implică două tipuri de subsisteme: subsistemul fizico-chimic și cel de cinetică moleculară, care, în ansamblu, concură la dezvoltarea culturilor de microorganisme. Dacă pentru parametrii subsistemelor fizico-chimice (pH, temperatură, turație de agitare etc.) nu se pune problema măsurării lor on-line în scopul dezvoltării și implementării unui algoritm de conducere (există traductoare specifice la un preț de cost acceptabil), în cazul subsistemelor de cinetică moleculară problema achiziției on-line a informațiilor este mult mai dificilă, în sensul că mărimile de interes (concentrații de biomasă, substrat, diverși metaboliți etc.) nu pot fi măsurate on-line. Motivul este legat de inexistența unor senzori suficient de preciși, fiabili și la un preț de cost acceptabil care să furnizeze în timp real informații despre aceste mărimi, informații utilizabile în algoritmii de conducere automată. O altă posibilitate de achiziție a datelor din proces este utilizarea de observare de stare și parametri (estimatori de stare și parametri). Este o abordare frecventă de către automatizști, cu rezultate, în general, bune, dar care are ca principal inconvenient necesitatea determinării unui model matematic cât mai precis pentru implementarea estimatorului și, nu în ultimul rând, faptul că procesele biotehnologice sunt neliniare, puternic afectate de incertitudini parametrice sau de model (dinamici ascunse) și de zgomote de măsură și de proces. Rezultă, deci, că o problemă foarte importantă a analizei și controlului cu performanțe bune a unui proces biotehnologic constă în măsurarea on-line a mărimilor de interes.

În cercetarea realizată în cadrul prezentei teze de doctorat s-au urmărit două obiective principale, concretizate în două direcții de cercetare: primul obiectiv este realizarea unui sistem de măsură a mărimilor de interes din bioprocese în scopul automatizării acestuia. Sunt vizați atât parametrii subsistemului fizico-chimic, cât și, în mod special, cei din subsistemul de cinetică moleculară. Cu alte cuvinte, se dorește închiderea buclilor de reglare automată aferente unui bioproces care se desfășoară într-un bioreactor cu ajutorul unor sisteme de măsură realizate pe baza tehnicilor de prelucrare a imaginilor. S-a ales, ca studiu de caz, procesul de creștere a celulelor de drojdie din specia *Sacharomices cerevisiae*. Ideea dezvoltată în lucrare este de a determina concentrația de celule din specia amintită (concentrația de biomasă) pentru a furniza mărimea măsurată necesară funcționării unui algoritm de control a bioprocesului, prin tehnici de prelucrare de imagini.

A doua direcție de cercetare a constatat în utilizarea tehnicilor de prelucrare a imaginilor în diagnoza proceselor biotehnologice. În acest scop, au fost capturate imagini la anumite intervale de timp, folosind o cameră de microscop, de către un operator uman, imagini care au fost apoi folosite în cadrul unor algoritmi de prelucrare de imagini pentru numărarea celulelor și apoi clasificarea acestora în clase, cum ar fi: celule tinere, celule în diviziune (capabile de a se înmulți), celule mature, celule bătrâne, celule moarte.

Cercetările din această lucrare au un caracter interdisciplinar fiind realizate în cadrul platformei de cercetare *Bioaliment* a Universității "Dunărea de Jos" din Galați, în colaborare cu personalul din laboratoarele platformei.

Teza este structurată după cum urmează: o introducere, patru capitole, concluzii și contribuții originale ale tezei de doctorat precum și două anexe.

Introducerea prezintă motivația alegerii temei de cercetare abordată în lucrarea de doctorat și structura acesteia.

În capitolul 1 este prezentat stadiul actual al cercetărilor privind aplicații ale procesării de imagini în conducerea bioproceselor. Capitolul cuprinde metodele utilizate în prezent în microscopie, prelucrarea de imagini, precum și sisteme folosite în cercetarea culturilor de celule. De asemenea, se prezintă o serie de tipuri de observare de stare și parametrii utilizate în măsurarea mărimilor de interes în bioprocese.

În capitolul 2 sunt prezentate contribuții privind aplicarea tehnicilor de prelucrare a imaginilor în controlul bioproceselor. A fost realizat un stand experimental compus dintr-un bioreactor și echipamentele aferente (mantaua de încălzire, agitatorul, senzori de temperatură, pH, turbiditate), sisteme auxiliare precum: pompele peristaltice, bypassul pentru preluarea de eșantioane din cultură, microscopul, controllerul de turbiditate, sistemul computerizat de măsură și control format dintr-un calculator dotat cu placă de achiziție, interfață de legătură între placa de achiziție și subsansamblele bioreactorului și, nu în ultimul rând, camera color pentru achiziția imaginilor în timp real. Ca să se poată realiza legătura dintre subsistemele bioreactorului și calculator a fost necesară realizarea unei interfețe specifice care să permită achiziționarea semnalelor de intrare provenite de la senzori, să le transmită plăcii de achiziție, precum și de a primi semnalele de ieșire de la placa de achiziție și de a le transmite elementelor de execuție.

Capturarea de imagini in-situ ale culturii de celule în timp real a necesitat proiectarea și realizarea unui nou element specific sensorului pentru determinarea concentrației de biomasă (celula de curgere și observare, numită și bypass). În acest scop, au fost realizate mai multe cercetări și testări pentru determinarea celei mai bune variante constructive care să răspundă la toate cerințele necesare. În final, s-a pus la punct o metodă de determinare a concentrației de biomasă, care poate fi folosită în cadrul unui algoritm de control automat. Astfel, a fost elaborată o metodă originală de determinare a concentrației de biomasă prin calcularea individuală a volumului fiecărei celule, însumarea volumelor celulelor și raportarea la volumul de observare (mărimea imaginii, grosimea canalului de curgere a bypassului).

În capitolul 3, s-a validat algoritmul de determinare a concentrației de biomasă prin tehnici de prelucrare a imaginilor. Pentru reglarea concentrației de biomasă, astfel încât sistemul să poată funcționa complet automatizat, a fost necesară elaborarea unui software original în mediul Matlab care să poată prelua datele de intrare de la placa de achiziție, să le prelucreze și să determine comenzi în timp real pe care să le transmită către elementele de execuție ale bioreactorului. Parametrii optimi ai acestui software au fost determinați pe baza mai multor testări și experimente. În mod practic, algoritmul de determinare a concentrației de biomasă prin tehnici de prelucrare a imaginilor a fost aplicat în cazul unui bioproces de creștere a celulelor de drojdie din specia *Sacharomices cerevisiae*. Algoritmul de determinare a concentrației de biomasă prin tehnici de prelucrare a imaginilor a fost inclus într-o buclă de reglare a concentrației de biomasă.

Capitolul 4 se referă la diagnoza bioproceselor (în sensul de a putea aprecia starea de dezvoltare a culturii de celule) folosind tehnici de prelucrare a imaginilor. Diagnoza constă în

analiza evoluției bioproceselor pe bază stării fiziologice a culturii de celule. În acest scop a fost introdus un nou concept care să caracterizeze starea fiziologică a microorganismelor, *gradul de viabilitate a celulelor*, care a fost determinat folosind imagini alb-negru fără a utiliza tehnicile clasice invazive (colorare cu albastru de metilen etc.). O contribuție originală o reprezintă elaborarea unui algoritm capabil să determine gradul de viabilitate al celulei (vie, moartă), numărul de celule, precum și concentrația de biomasă cu o precizie mai bună de 80%, pe baza analizei luminozității acestora. Validarea a fost realizată folosind un microscop Olympus BX41 cu contrast de fază.

De asemenea, a fost evaluat stadiul de dezvoltare precum și clasificarea celulelor pe baza informațiilor obținute din analiza imaginilor color. S-a efectuat un experiment pentru a determina diferite stadii de dezvoltare a culturii pe procesul de creștere a drojdiilor din specia *Saccharomyces cerevisiae* pe un mediu de cultură standardizat MEA (maț extract agar), din colecția de microorganisme a Platformei de Cercetare BIOALIMENT din Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați.

Au fost realizate două variante experimentale: una pe mediul YEG (Yeast Extract Glucose) cu un conținut optim de nutrienți necesari creșterii și multiplicării drojdiei, iar cea de a doua, pe un mediu auxotrof - G, fără sursă de azot, deci sărac în nutrienți. În urma acestui experiment, s-au identificat cele cinci stări ale celulelor, menționate anterior. S-au analizat parametri determinați de textura interioară a celulelor și s-a constatat că celulele neviabile/neproductive conțin în interior zone întunecate (numite incluziuni ergastice). Experimentul a avut o durată de cinci zile.

A fost elaborat un algoritm original pentru clasificarea celulelor în cinci categorii: tânără, matură, în diviziune, bătrână, moartă, utilizând tehnici de prelucrare a imaginilor cum este tehnica *k-means clustering* pentru identificarea nucleotidelor din interiorul fiecărei celule. Validarea a fost efectuată prin mai multe analize de laborator, precum: măsurarea densității optice (DO600) folosind spectrofotometrul Hach Lange DR3900, numărarea celulelor în vase Petri cu mediu agar (SPC - Standard Plate Count), măsurarea concentrației azotului, glucozei etc. Acest algoritm poate fi adaptat și la alte tipuri de celule asemănătoare ca geometrie.

Ultimul capitol este dedicat concluziilor, contribuțiilor originale și direcțiilor viitoare de cercetare. Cele două anexe completează lucrarea de doctorat cu o serie de elemente privind echipamentele utilizate în cercetările experimentale din cadrul tezei și cu programele proiectate și implementate în cadrul acesteia.

Capitolul 1

Stadiul actual privind procesarea imaginilor în monitorizarea, conducerea și diagnoza bioproceselor

1.1 Generalități privind procesele biotehnologice

Procesele biotehnologice sunt procese în care se cultivă microorganisme (populații de celule) în scopul de a obține diverse produse pe cale biologică. Ele au evoluat ca metode de obținere a diverse produse alimentare, produse și compuși farmaceutici, pigmenți, enzime, biocarburanți, biopolimeri etc., dar și pentru regenerarea și protecția mediului, folosind în acest scop celule vii. Este vorba de procese de tratare a apelor uzate (aerobe sau anaerobe) care folosesc așa numitele nămoluri active pentru tratarea reziduurilor din ape în scopul deversării acestora în receptorii naturali din mediul înconjurător. Bioprocesele aduc o serie de avantaje datorită vitezei relativ mari de înmulțire a microorganismelor, avantajele fiind de natură economică la scară industrială și, nu în ultimul rând, prin faptul că produsele sunt obținute pe cale biologică (naturală).

Un proces biotehnologic cuprinde un set reacții chimice și biochimice care au loc în echipamente specific numite bioreactoare. Bioreactorul este un echipament care trebuie să asigure condiții propice pentru dezvoltarea culturii de microorganisme, adică trebuie să garanteze un transfer nelimitativ de nutrienți din mediul de cultură către celule, indiferent de modul cum au fost proiectate aceste echipamente. S-a dezvoltat, astfel, o știință, numită ingineria bioproceselor, care se ocupă, în mod special, de studiul și operarea bioproceselor. Ulterior, s-a simțit nevoia găsirii unor metode pentru eficientizarea proceselor biotehnologice și, în acest sens, au intervenit specialiști din automatică, informatică, matematică, domeniul devenind interdisciplinar. Se poate afirma că metodele de modelare matematică și control automat au revoluționat domeniul biotehnologiilor fiind dezvoltat în continuare de echipe mixte de specialiști. De altfel, domeniul biotehnologiilor a devenit o adevărată provocare pentru specialiștii din automatică, provocările constând în proiectarea și aplicarea unor algoritmi din ce în ce mai evoluți pentru bioprocese, acestea fiind caracterizate de neliniarități, incertitudini și zgomote de proces și de măsură.

În literatura de specialitate se găsesc mai multe criterii de clasificare a proceselor biotehnologice, în continuare fiind date două dintre acestea:

- după prezența sau absența oxigenului în mediul de cultură [1], [2]:
 - procese aerobe - în care microorganismele consumă oxigen, acesta facilitând transferul de electroni;
 - procese facultativ anaerobe - în care transferul de electroni poate fi realizat atât prin intermediul oxigenului, cât și prin transformări intermoleculare;
 - procese strict anaerobe – în care oxigenul lipsește din mediul de cultură, iar transferul de electroni se realizează prin intermediul compușilor anorganici.
- după modul de desfășurare a bioprocesului:
 - procese discontinue (de tip șarjă sau lot – batch);
 - procese semicontinue (sau fed-batch) – procesul începe în modul batch, după care trece în modul continuu de alimentare;
 - procese continue.

În cadrul acestei lucrări a fost abordat procesul de creștere a drojdiilor din specia *S. Cerevisae* în modul batch și apoi, în modurile semicontinue și continuu. La început, procesul a fost dezvoltat în modul discontinuu prin introducerea unei culturi de drojdie într-un mediu steril, conținând toți nutrienții necesari fiind urmărită evoluția ei până în faza de declin a

populației de celule. Modul batch este caracterizat de mai multe faze intermediare de dezvoltare după cum urmează:

- faza de lag: în care are loc adaptarea culturii de celule la condițiile de mediu, creșterea populației fiind practic zero;
- faza intermediară (de început a creșterii): în care dimensiunea celulelor crește și începe multiplicarea (înmulțirea) lor;
- faza de multiplicare exponențială în care numărul de celule crește în progresie geometrică, astfel că populația se dublează la intervale regulate de timp. Acest interval se numește timp de dublare al biomasei;
- faza de încetinire a multiplicării în care, pe măsura epuizării nutrienților și formării de compuși inhibitori, viteza de înmulțire scade;
- faza staționară, în care se atinge un maxim al culturii de celule;
- faza de declin, în care moartea celulelor determină scăderea populației până la extincție.

În figura 1.1 se prezintă succesiunea fazelor unei culturi de microorganisme, în modul batch de dezvoltare. Trebuie menționat faptul că aceste faze se găsesc și la celelalte tipuri de bioprocese.

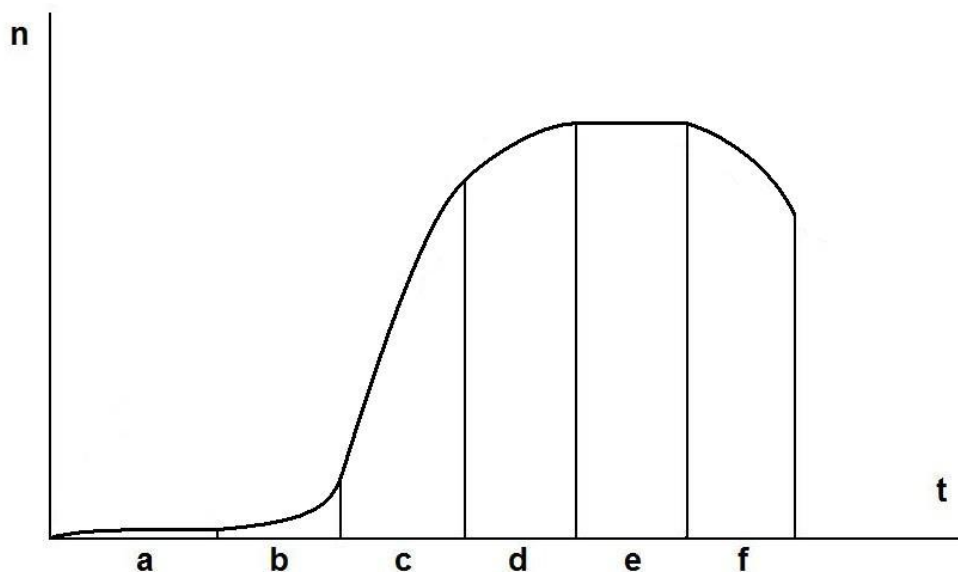


Fig. 1.1 - Reprezentarea numărului de celule în funcție de fazele tipice de evoluție a culturii în sisteme discontinue

Procesele semicontinue au fost realizate prin introducerea într-un bioreactor a unei culturi de drojii într-un mediu conținând nutrient. În timpul evoluției, sistemul automat menține concentrația nutrienților la valoarea prestabilită prin intermediul unui sistem de pompare exterior precum și nivelul pH-ului și al concentrației de oxigen și azot la valori prestabilite. Procesele continue pot menține cultura de celule într-o anumită fază de dezvoltare pe un timp nedefinit atât timp cât cultura este alimentată cu mediu cu nutrienți și se elimină, în același timp, o cantitate echivalentă de mediu uzat. În același timp, se mențin constante condițiile de mediu (temperatură, pH, concentrație oxigen, azot etc.).

1.2 Probleme privind măsurarea mărimilor de interes din bioprocese

Bioprocesele implică dezvoltarea culturilor celulare în scopuri de producție. Este bine cunoscut faptul că metabolismul celular, care depinde de starea lor intracelulară și de interacțiunile cu mediul, influențează direct productivitatea bioprocесelor. În funcționarea acestor procese se urmărește o productivitate înaltă, fiind foarte importantă utilizarea

eficientă a materialelor și a resurselor energetice, ceea ce face ca tehnicile de automată (modelare și de control) să fie foarte utile și, în același timp, foarte necesare.

Așa cum s-a amintit, din cauza complexității acestor procese, a neliniarităților puternice, incertitudinilor parametrice sau de model care afectează aceste procese, precum și a zgomotului de măsură sau de proces care însoțește variabilele de interes, problemele de modelare și de control reprezintă o adevărată provocare pentru specialiști. Este suficient să se amintească că o ușoară modificare a condițiilor de cultură celulară sau contaminarea culturii poate determina modificări ale metabolismului și, prin urmare, un eșec al bioprocesului cu consecințe nedorite în pierderea de importante resurse energetice și materiale [3], [4].

O problemă importantă a bioproceselor este dată de dificultatea măsurării on-line a variabilelor de interes din cauza lipsei de senzori specifici dedicați, suficient de fiabili și la un preț de cost acceptabil, ceea ce face de multe ori imposibilă punerea în aplicare a algoritmilor de control pentru creșterea eficienței bioproceselor [5]. Utilizarea senzorilor software (de stare și parametrii, de exemplu pentru măsurarea concentrațiilor de substrat și de biomasă, a vitezei specifice de creștere a biomasei etc.), este o soluție realistă în acest caz, aceștia fiind utilizați în mod frecvent în aplicațiile de control ale bioproceselor [6]. Principala dificultate care poate apărea în acest caz este lipsa unui model matematic suficient de precis al procesului biotehnologic.

O altă problemă care poate fi menționată în cazul bioproceselor este diagnoza procesului, în vederea stabilirii potențialului productiv al culturii celulelor. Este foarte important ca operatorul să aprecieze în fiecare moment starea fiziologică a culturii și modul în care va evolua acesta în ceea ce privește productivitatea și eficiența. De exemplu, ar fi extrem de utilă informația cu privire la contaminarea culturii (în cele din urmă, de detectare în stadiu incipient a gradului de contaminare) și a stării fiziologice a culturii (în cazul în care cultura are un potențial ridicat de creștere sau regresează) etc.

În cazul bioproceselor, analiza on-line a celulelor și obținerea unor date despre cinetica biomasei au ca rezultat o mai bună înțelegere și, evident, o mai bună funcționare a bioprocesului. În laborator, viteza convențională de creștere a biomasei este evaluată prin determinarea masei uscate din cultură sau prin determinarea densității celulare acestea fiind metode de măsurare off-line, consumatoare de timp și efort, necesitând prelevarea de probe, filtrare sau centrifugare, uscare și cântărire până la masă constantă. În timp ce determinarea masei uscate este relativ simplă, testarea densității celulare necesită un microscop cu cameră de numărare și un ochi antrenat pentru a identifica celulele din câmpul de vizualizare al microscopului. Aceste determinări nu pot fi făcute on-line, limitând astfel posibilitățile de automatizare a procesului. Ca alternative la aceste metode pot fi menționate determinarea optică a densității (utilizarea unui spectrofotometru de masă) și determinarea turbidității. Cu toate acestea, determinarea densității celulare este unica metodă care poate face diferența între celule și materialul non-biologic, în timp ce celelalte metode nu sunt în măsură să discrimineze între ele [2].

Capitolul 2

Contribuții privind măsurarea automată a concentrației de biomasă dintr-un bioproces

2.1 Introducere

Utilizarea proceselor biotehnologice pentru producerea de alimente, pigmenți, enzime, produse farmaceutice etc. este o practică binecunoscută, ingineria acestei categorii de procese presupune mai multe seturi de cunoștințe, din sfera biologică, tehnologică (chimică, electrică, știința materialelor, hidraulică și electronică) precum și de automată și informatică.

Scopul acestui capitol este de a prezenta o metodă de măsurare a concentrației de biomasă, care reduce timpul de măsurare, reduce incertitudinea indusă de corpii străini (contaminarea culturilor) și furnizează rezultatul fără intervenția operatorului, deci eliminând subiectivismul acestuia. Validarea metodei și a algoritmului de calcul a concentrației a fost efectuată prin comparare cu metodele clasice.

Pentru măsurarea concentrației de biomasă, metodele clasice folosite curent se grupează în:

- numărarea celulelor în camera Thoma;
- determinarea masei substanței uscate (cântărire);
- utilizarea senzorilor de turbiditate;
- măsurarea densității optice.

Primele două categorii necesită intervenția unui operator și sunt puternic afectate de subiectivismul său. Mai mult decât atât, durata măsurării este mare, uneori comparabilă cu constantele de timp ale procesului condus, deci este costisitoare și nepotrivită pentru conducerea automată. Ultimele două categorii se pot aplica on-line, deci reduc influența omului și sunt mai rapide, deci sunt mai potrivite unui proces automatizat.

Din păcate, ele nu pot face diferența între celule ale populației crescute în bioreactor și corpi străini, cum ar fi: alte celule invadatoare, impurități organice sau anorganice, materiale depuse pe peretele bioreactorului, substanțele introduse în timpul procesului în mod automat sau de către operator. Ca urmare, gradul lor de certitudine depinde de procesul condus și se poate altera fără ca operatorul să fie avertizat. În continuare, se prezintă, mai detaliat, metodele clasice, întrucât una dintre ele va fi folosită pentru validarea algoritmului de măsurare.

Din cele de mai sus, se poate trage concluzia că este nevoie de o metodă de măsurare care să poată fi aplicată on-line, cu un preț rezonabil, dar care să poată face diferența dintre celulele culturii de interes din bioreactor și alte celule (eventuale impurități). Metoda propusă în acest capitol se bazează pe analiza imaginilor celulelor, recunoașterea și numărarea lor făcându-se asemănător cu felul în care ar proceda un operator uman. Ulterior, pe baza acestei metode se va proiecta și construi un traductor de concentrație de biomasă, adecvat conducerii proceselor biotehnologice (capitolul 3). Examinarea imaginilor preluate de la microscop are avantajul că mai permite analiza stării biologice a celulelor și detectarea elementelor străine, așa cum se poate vedea în capitolul 4.

2.3 Principii generale de măsurare automată a concentrației de biomasă

Așa cum s-a anticipat, metoda propusă constă în:

- extragerea automată a unui eșantion din conținutul bioreactorului și expunerea suspensiei lichide la microscop;
- achiziția imaginii, sub forma unei variabile cu format impus;

- analiza imaginii, prin detectarea celulelor populației, separarea imaginilor celulelor de alte obiecte și măsurarea dimensiunilor lor geometrice;
- calculul concentrației pe baza dimensiunilor geometrice și transmiterea valorii acesteia către alte subprograme.

Partea esențială a metodei de măsurare propuse constă în analiza imaginii, similar cu felul în care ar face-o un operator uman, cu mențiunea că este evitat subiectivismul acestuia. În cadrul analizei imaginii au loc următoarele etape:

- captura unei imagini a eșantionului;
- aducerea parametrilor acestei imagini la valori care dau cele mai bune rezultate în urma prelucrării;
- separarea sub-imaginilor celulelor populației urmărite din imaginea capturată de cameră, neglijând (rejectând) totodată obiectele care nu prezintă interes (impurități etc.);
- măsurarea ariilor celulelor, prin analiza automată a imaginilor;
- calculul volumelor celulelor (acesta depinde de forma celulei);
- calculul concentrației biomasei, folosind volumul însumat al celulelor, volumul în care a fost prelevată imaginea (volumul observat) și densitatea cunoscută a speciei celulelor.

2.4 Algoritmul de măsurare a concentrației de biomasă prin procesare de imagini

Pentru a aplica metoda de măsurare a concentrației, prezentată în subcapitolul precedent, este necesar un algoritm de prelucrare a imaginilor. În cele ce urmează, este prezentat algoritmul dezvoltat pentru clasa de populații de celule menționată anterior. Acest algoritm a fost publicat în lucrarea [72].

Exemplificarea aplicării algoritmului se face tot pe specia *Saccharomyces cerevisiae*, care se încadrează în această clasă de populații. Se presupune că a fost deja achiziționată o imagine de la microscop și că rezoluția oferită de cameră este rezonabilă (arii de ordinul a o mie de pixeli, pentru o celulă). Așa cum a fost prezentat în cadrul metodei de măsurare, se pune problema de a separa imaginile celulelor de alte impurități, de a măsura ariile lor, apoi de a determina volumul celulelor și concentrația. Organigrama algoritmului este prezentată în Fig. 2.9.

În prima etapă, după achiziția imaginii, are loc o modificare a parametrilor globali ai imaginii (luminozitate, contrast) astfel încât valorile acestor parametri să fie cât mai apropiate pentru întreg setul de imagini. Această modificare este necesară deoarece caracteristicile globale ale imaginii pot varia destul de mult, în funcție de conținut, focalizare etc., astfel încât rezultatele prelucrării să devină imprecise și să influențeze negativ detecția celulelor.

În esență, au loc următoarele transformări de scară:

- luminația este modificată astfel încât media globală a luminației să fie apropiată de o valoare impusă;
- contrastul global este adus la o valoare care permite discernerea celulelor (părțile luminoase din celulă se apropie de alb, membrana și organele întunecate din celulă se apropie de negru, iar mediul are o luminație intermediară).

Operațiile de prelucrare diferă între varianta monocromă și cea color. În cazul imaginilor monocrome, a fost concepută o metodă specifică de eliminare a zgomotului din imagine, precum și a reflexiilor nedorite și a impurităților. În cazul imaginilor color, a fost concepută o metodă diferită, având în vedere problemele care apar la aceste imagini: o variație pronunțată de luminozitate de la centru către periferia imaginilor și de focalizare a conturilor celulelor. Aceste metode reprezintă o contribuție personală importantă și sunt prezentate detaliat mai departe, în capitolul 4.

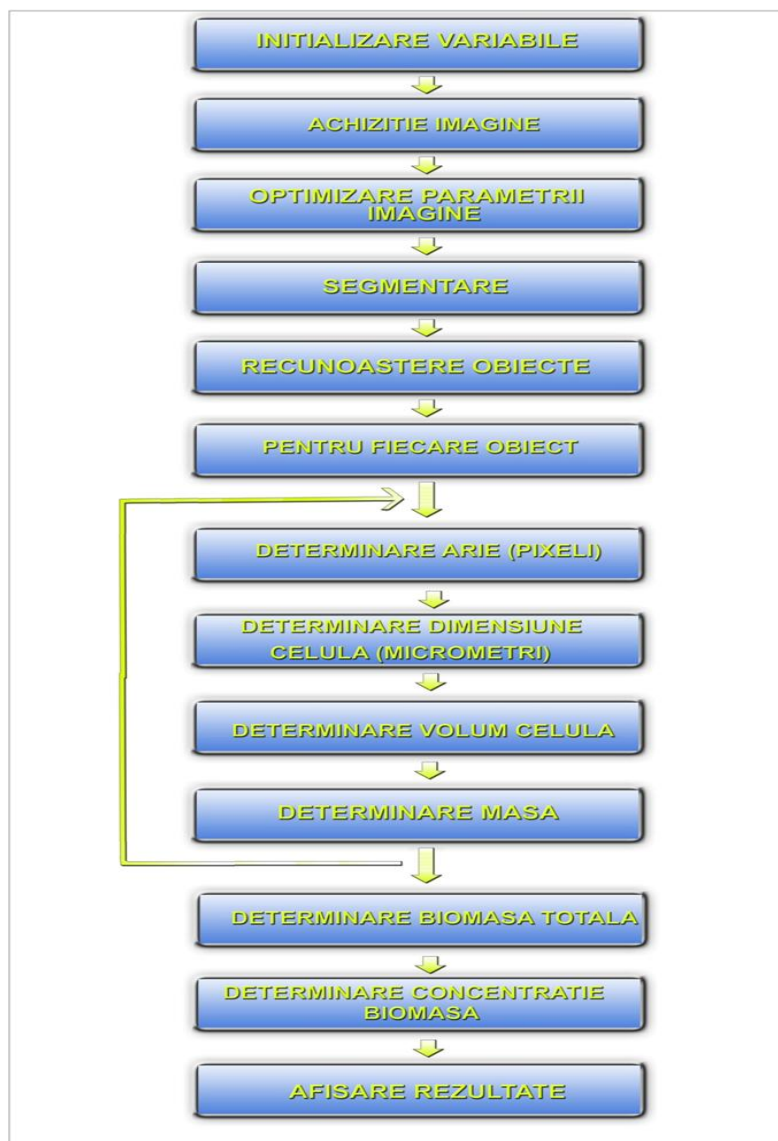


Fig. 2.9 - Organigrama algoritmului pentru măsurarea concentrației de biomasă

- Pasul 1:** Inițializare variabile
Pasul 2: Achiziția imaginii
Pasul 3: Determinarea valorilor parametrilor de imagine (contrast, luminanță)
Pasul 4: Segmentarea imaginii
Pasul 5: Recunoașterea obiectelor, etichetarea și afișarea celulelor detectate
Pasul 6: Pentru fiecare celulă detectată se vor aplica pașii 7-10
Pasul 7: Determinarea ariei în pixeli
Pasul 8: Determinarea dimensiunii celulei (în micrometri)
Pasul 9: Determinarea volumului celulei
Pasul 10: Determinarea masei celulei
Pasul 11: Determinarea biomasei totale
Pasul 12: Determinarea concentrației
Pasul 13: Afișarea rezultatelor

2.5 Implementarea algoritmului de măsurare a concentrației de biomasă

Partea din algoritm care se desfășoară în calculator poate fi programată în orice limbaj de nivel înalt, dar s-a preferat utilizarea mediului Matlab, care are tot setul de operatori pentru lucrul cu scalari și matrici, plus funcții deja implementate.

2.6 Validarea algoritmului de măsurare a concentrației de biomasă

În Figurile 2.16 - 2.17 și în tabelul 2.2 este prezentat un exemplu de calcul al concentrației de biomasă folosind algoritmul prezentat anterior. Fig. 2.16 reprezintă imaginea capturată de camera color de 1,3 mpx. Fig. 2.17 reprezintă imaginea prelucrată de algoritm în care sunt identificate și numerotate celulele. În tabelul 2.2 sunt prezentate mărimile de interes calculate de algoritm pentru fiecare celulă în parte, precum și concentrația de biomasă totală, umedă și uscată.

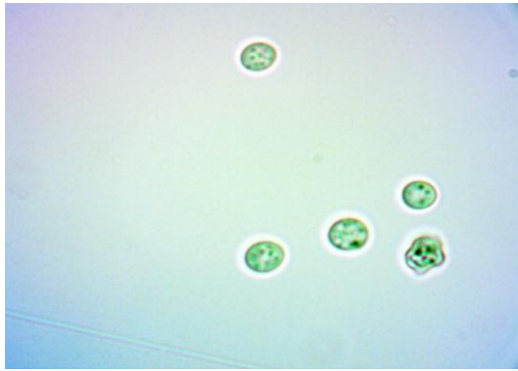


Fig. 2.16 - Imaginea originală capturată

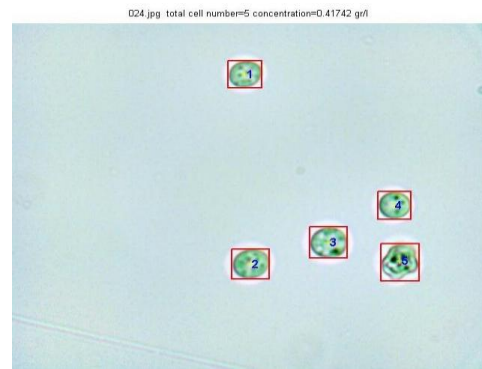


Fig. 2.17 - Imaginea prelucrată cu identificarea celulelor

Tabelul 2.2 Mărimile de interes calculate cu ajutorul algoritmului

Nr. celulă	1	2	3	4	5
Aria [pixeli]	4951	6321	5996	4666	6875
Aria [micron ²]	17.824	22.756	21.586	16.798	24.750
Diametrul [microni]	4.764	5.383	5.242	4.6246	5.614
Volumul [micron ³]	56.605	81.657	75.441	51.789	92.625
Volumul total al celulelor [micron cubi]			358.1176		
Concentrația biomasei [gr/l]			0.4174		
Concentrația biomasei uscate [gr/l]			0.0379		

Capitolul 3

Contribuții privind realizarea unui sistem automat de reglare a concentrației de biomasă folosind tehnici de prelucrare a imaginilor

3.1 Introducere

Aplicarea acestor tehnici s-a realizat pentru determinarea concentrației de biomasă, dar, cu o serie de modificări ale algoritmilor proiectați în lucrare, se pot aplica și pentru alte mărimi (concentrații de substrat, concentrații ale unor metaboliți etc. Din categoria metodelor de măsurare on-line se pot enumera:

- determinarea substanței uscate, care este o operație consumatoare de timp și efort, această metodă necesitând achiziția de eșantioane, filtrarea sau centrifugarea acestora, uscarea și cântărirea până la masă constantă;
- determinarea densității celulare, care necesită un microscop dotat cu camera de numărare și un ochi bine antrenat (al unui specialist) pentru a identifica celulele din câmpul de vizualizare al microscopului.

Practic, s-a dezvoltat o tehnică bazată pe un microscop convențional cu câmp luminos și metode de prelucrare de imagini pentru determinarea concentrației de biomasă și a altor parametrii din cadrul proceselor biotehnologice. Această tehnică servește la implementarea unui sistem automat în timp real care poate fi utilizat pentru reglarea automată a unor mărimi de interes dintr-un bioproces.

3.2 Sistemul de reglare a concentrației de biomasă folosind tehnici de procesare de imagini

Au fost evidențiate cele două subsisteme care alcătuiesc sistemul de dezvoltare a drojdiilor:

1. subsistemul aferent cineticii microorganismelor și
2. subsistemul aferent parametrilor fizico-chimici ai culturii de drojdie.

Pe baza acestei descompunerii, sistemul de reglare cuprinde trei bucle reglare, după cum urmează: bucla principală este pentru reglarea concentrației de biomasă, 2 bucle secundare, prima pentru reglarea temperaturii și a doua, pentru reglarea pH-ului culturii de drojdie. Pentru agitare s-a considerat comanda directă a turbinei. Cele trei bucle de reglare sunt considerate independente, buclele de temperatură și pH având rolul de a asigura un punct de funcționare adecvat (un mediu propice) pentru dezvoltarea culturii de drojdie din specia *Saccharomyces cerevisiae*. Fig. 3.2 prezintă sistemul de reglare, în care s-a utilizat un traductor bazat pe tehnici de prelucrare a imaginilor prelevate de la un microscop, prin intermediul unei camere fotodigitale color de microscop și prelucrate cu un calculator PC cu performanțe medii, echipat cu o placă de achiziție.

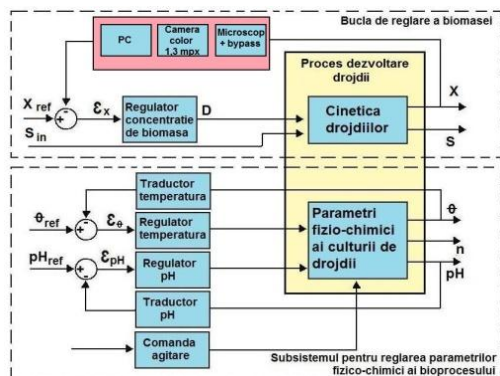


Fig. 3.2 - Sistem de reglare a conc.

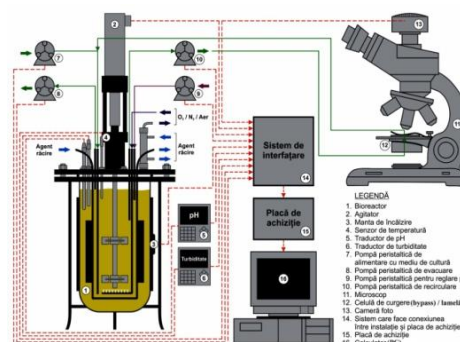


Fig. 3.3 - Schema bioreactorului automatizat

3.2.2. Senzorul pentru măsurarea concentrației de biomasă bazat pe tehnici de procesare a imaginilor

Senzorul pentru măsurarea concentrației de biomasă este alcătuit din următoarele elemente: un microscop cu un obiectiv de 60x, o cameră color foto-digitală pentru microscop de 1,3 mpx, un sistem de bypass (o celulă de curgere și observare) și o pompă peristaltică care realizează recircularea mediului de cultură prin celula de curgere și observare.

1. **Microscopul:** are rolul de a facilita achiziția de imagini ale suspensiei din mediul de cultură cu un grad de mărire adecvat pentru a putea identifica celulele în mod individual. Microscopul folosit este un unul standard cu două oculare și iluminare folosind un bec cu halogen. Obiectivul folosit a fost unul de 60x.
2. **Camera foto-digitală:** a fost utilizată o cameră foto-digitală color pentru microscop de 1,3 mpx. Camera preia imagini cu periodicitate de aproximativ 10 minute (a se vedea secțiunea 3.5). Caracteristicile camerei foto-digitale sunt prezentate în Anexa 1 (Figurile A1.17- A1.18, Anexa 1). Factorul de mărire al camerei este echivalent cu cel al unui ocular de 10x și, deci, luând în calcul și obiectivul de 60x al microscopului, rezultă că imaginile au fost capturate cu un factor de mărire de 600x.
3. **Celula de observare:** permite recircularea periodică a suspensiei aflată în vasul bioreactorului în vederea achiziției de imagini. Aceasta este prezentată detaliat în secțiunea 3.3).
4. **Pompa peristaltică:** este destinată recirculării mediului de cultură prin celula de observare. Este o pompă de tip SR25S300, prezentată în secțiunea 3.2.1.

În Figurile A1.19 - A1.22 (Anexa 1) se poate observa sistemul de tip bioreactor cu plăcile de interfațare între placa de achiziție și restul de subansamble.

3.3 Celula de curgere și observare

Celula de curgere este special proiectată pentru a se putea achiziționa imagini în timp real, prelevate din mediul de cultură, imagini având o calitate suficient de bună pentru o interpretare corectă a imaginii. Celula de curgere și observare, împreună cu camera color foto-digitală, furnizează informații sistemului de calcul pe care rulează algoritmul care analizează imaginile provenite de la microscop și care, în final, determină valoarea concentrației de biomasă. Pe acest sistem de calcul este implementat și regulatorul din bucla de reglare a concentrației de biomasă. Mărimea de comandă furnizată de regulator este rata de diluție, mărime care depinde de debitul pompei dozatoare de substrat cu care se alimentează bioreactorul.

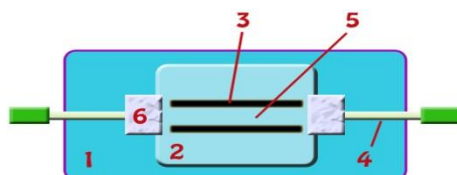


Fig. 3.4 - Schema de principiu a celulei de curgere (bypass): 1 - lamelă inferioară, 2 - lamelă superioară, 3 - pereți despărțitori ai canalului de curgere, 4 - tuburi intrare/ieșire, 5 - canal curgere, 6 - elemente de legătură canal de curgere – tuburi

Întregul traseu de curgere este complet etanș, pentru a elimina posibilitatea unei contaminări a mediului de cultură. Camera de curgere și observare se amplasează pe masa microscopului și se poate fixa similar cu o lamelă normală de microscop. În locul unuia dintre oculare se montează camera color și se conectează tuburile flexibile necesare traseului de recirculare a suspensiei.

În cadrul algoritmului de reglare a concentrației de biomasă, calculatorul comandă pompa pentru recircularea suspensiei din vasul bioreactorului la un anumit interval de timp prestabilit, apoi va captura imagini cu ajutorul camerei foto-digitale color montată pe

microscop, le va analiza, și, în funcție de evoluția culturii, va genera comenzile necesare reglării concentrației de biomasa.

3.4 Implementarea software-ului de timp real aferent sistemului de control a bioreactorului

Aceasta s-a realizat în mediul Matlab (Toolbox-ul RealTimeControl - RTC) și utilizează drivere pentru comunicația cu placa de interfață Advantech. Întreaga structură software lucrează cu o perioadă de eșantionare de 1 secundă, fiind prevăzută cu o fereastră grafică de vizualizare a evoluției parametrilor principali, precum și salvarea automată sub forma unui fișier a tuturor parametrilor de intrare și ieșire în vederea unor prelucrări ulterioare.

Dacă se tastează comanda de oprire, întreg procesul de achiziție de date și prelucrare de imagini se oprește și se resetează toate comenzile de ieșire ale elementelor de execuție ale bioreactorului, astfel că acesta intră într-o stare de așteptare. Practic nu există o valoare limită maximă a duratei experimentului, acesta fiind limitat numai de capacitatea rezervorului de substrat care alimentează bioreactorul cu nutrieți.

3.5 Analiza dinamicii traductorului

Pentru evaluarea întârzierilor de pe lanțul elementelor care compun traductorul, au fost realizate următoarele determinări experimentale:

1. timpul necesar suspensiei de celule să ajungă din bioreactor în celula de curgere (determinat experimental folosind un agent colorant);
2. timpul de sedimentare a celulelor în bypass pentru capturarea imaginii (determinat experimental folosind imagini succesive);
3. timpul de calcul al concentrației de biomasă.

O operație preliminară, necesară analizei dinamicii traductorului de concentrație de biomasă utilizând tehnici de prelucrare a imaginilor, a fost determinarea caracteristicii reale a pompei peristaltice de recirculare a mediului de cultură din bioreactor și calibrarea acesteia.

1. Determinarea timpului necesar suspensiei de celule ca să ajungă din bioreactor în celula de curgere la pornirea automată a pompei.

Experiment nr. 1:

Pentru început a fost amorsată pompa peristaltică care recirculă suspensia prin bypass folosind apă, pompa a fost oprită iar în recipientul cu apă s-a turnat un colorant alimentar pentru a măsura intervalul de timp în care colorantul ajunge din recipient în bypass (Fig. 3.10), acesta fiind de aproximativ 1.5 minute pentru o tensiune de comandă a pompei de 2V, corespunzătoare debitului de 7ml/min, și s-a ales o valoare acoperitoare, de aproximativ 2 minute.

2. Determinarea timpului de sedimentare a celulelor în bypass pentru capturarea imaginilor

Experiment nr. 2:

A fost activată timp de două minute pompa peristaltică de recirculare a biomasei prin bypass, după care au fost prelevate imagini la intervale de 25 sec. În urma analizei acestor imagini, s-a constatat că sedimentarea biomasei se termină după un interval de aproximativ 7 minute. În ultima imagine realizată prin urmărirea în timp real a fluxului suspensiei, celulele aflate în câmpul de focalizare se opresc din mișcare și rămân staționare.

3. Determinarea timpului de calcul al concentrației de biomasă

Acest timp depinde direct de sistemul de calcul utilizat în cadrul aplicației de conducere a procesului și se poate afirma, chiar și în cazul unui sistem de putere medie, că timpul este nesemnificativ în comparație cu celelalte două întârzieri menționate la punctele 1 și 2. Practic, 2 minute au fost alocate pentru "spălarea" circuitului de bypass și pătrunderea în acesta a unor noi celule provenite din recipientul bioreactorului și 8 minute pentru oprirea

circulației celulelor și decantarea acestora, în total rezultând o perioadă de eșantionare de 10 minute pentru prelevarea eșantioanelor în vederea capturii de imagini.

3.6 Validarea utilizării traductorului de măsurare a concentrației de biomasă bazat pe tehnici de prelucrare a imaginilor în cadrul sistemului de creștere a drojdiilor

Aceasta s-a realizat în cadrul unui sistem de reglare, unde traductorul “clasic” (în cazul bioproceselor acesta poate fi un turbidimetru) a fost înlocuit cu sistemul de bypass prezentat în secțiunea anterioară, împreună cu algoritmul de procesare a imaginilor. Accentul a fost pus, în mod special, pe performanțele obținute prin înlocuirea unui traductor clasic sau a unui observer cu un traductor bazat pe tehnici de prelucrare a imaginilor, cu avantajele și dezavantajele folosirii acestuia într-o buclă de reglare automată (adică pe **principiul de măsurare inclus în bucla de reglare**), și nu pe metoda de reglare în sine. Proiectarea regulatorului PI s-a realizat experimental. **Scopul proiectării nu a fost realizarea celui mai bun regulator posibil, ci a unuia suficient de performant pentru un sistem de reglare automată, în scopul validării metodei de reglare folosind traductorul propus în această lucrare de doctorat, bazat pe tehnici de procesare de imagini.** În prima fază, s-a realizat identificarea procesului de creștere a drojdiilor pe baza răspunsului indiceal al procesului.

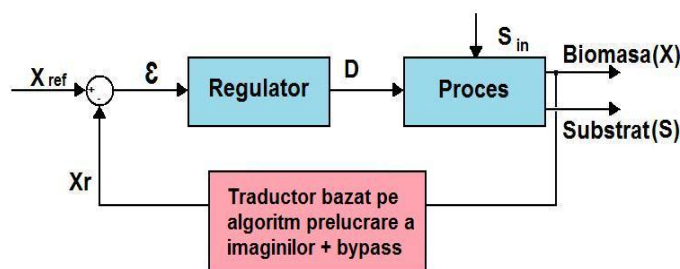


Fig. 3.33 - Schema bloc a buclei de reglare a concentrației de biomasă

Experimentul nr. 3:

Experimentul a fost realizat în regim continuu. S-a inoculat bioreactorul cu 0,074 gr/l drojdie din specia *S. Cerevisiae*. S-a alimentat bioreactorul cu un debit de substrat de 1ml/minut, ceea ce corespunde unei tensiuni alimentare a pompei de substrat de 1V, substratul având o concentrație de 25 gr/l (zahăr, azot și potasiu), la o temperatură constantă de 27-28°C, timp de aproximativ 4 ore. La momentul $t = 250$ minute s-a aplicat o treaptă pe tensiunea de alimentare a pompei cu substrat de 0.4V (de la 1V la 1.4V), ceea ce corespunde la o variație a debitului de intrare de la 1ml/minut la 5ml/minut (Fig. 3.34 – graficul trasat cu culoare verde), în condițiile folosirii unui tub de 4 x 3,5 mm.

În tabelul 3.2 sunt prezentate valorile numerice ale concentrației de biomasă și ale tensiunii de alimentare a pompei de substrat cu o periodicitate de 10 minute, așa cum s-a arătat în secțiunea 3.5 a acestui capitol. Imaginile au fost capturate folosind camera foto-digitală color de 1.3 mpx, montată pe microscop. Acestea au fost procesate cu algoritmul de identificare a celulelor de drojdie și determinare a concentrației de biomasă prezentat în secțiunea 2.3 - capitolul 2.

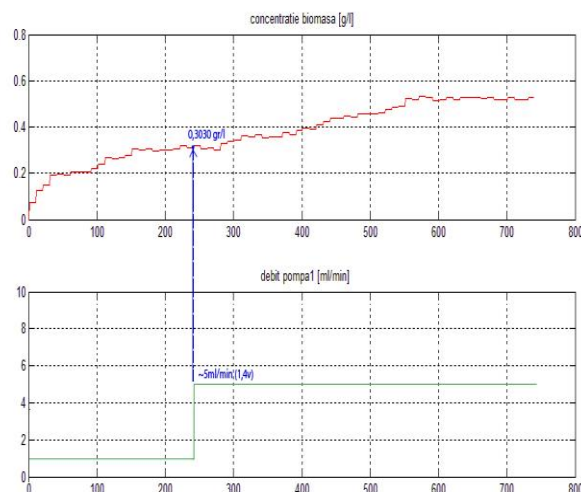


Fig. 3.34 - Evoluția concentrației de biomasă (gr/l)

În tabelul menționat sunt marcate cu culoare galbenă cele două regimuri staționare: primul între momentele 150 și 250 minute, după care s-a aplicat treapta de tensiune pompei peristaltice de alimentare cu substrat și cel de-al doilea regim staționar obținut după aplicarea treptei de tensiune, între momentele 550 și 730 minute. Din tabel se observă că valoarea de regim staționar a concentrației de biomasă este 0.5233 gr/l.

Tabel 3.2: Valoarea concentrației de biomasă determinată pentru fiecare imagine
1v=~2ml/min și 1.4v=~5ml/min

Nr. Im.	Val. Conc. [gr/l]	Cm d. p. [ml/min]	Nr. Im.	Val. Conc. [gr/l]	Cm d. p. [ml/min]	Nr. Im.	Val. Conc. [gr/l]	Cm d. p. [ml/min]
1	0.0747	2	26	0.3030	5	51	0.4591	5
2	0.1235	2	27	0.3120	5	52	0.4613	5
3	0.1476	2	28	0.2991	5	53	0.4767	5
4	0.1932	2	29	0.3283	5	54	0.4870	5
5	0.1943	2	30	0.3379	5	55	0.4919	5
6	0.1926	2	31	0.3455	5	56	0.5220	5
7	0.2037	2	32	0.3617	5	57	0.5164	5
8	0.2078	2	33	0.3578	5	58	0.5307	5
9	0.2077	2	34	0.3649	5	59	0.5292	5
10	0.2212	2	35	0.3527	5	60	0.5142	5
11	0.2400	2	36	0.3587	5	61	0.5203	5
12	0.2661	2	37	0.3552	5	62	0.5258	5
13	0.2637	2	38	0.3764	5	63	0.5178	5
14	0.2671	2	39	0.3676	5	64	0.5268	5
15	0.2783	2	40	0.3843	5	65	0.5292	5
16	0.3064	2	41	0.3937	5	66	0.5260	5
17	0.3013	2	42	0.3924	5	67	0.5234	5
18	0.3073	2	43	0.4088	5	68	0.5270	5
19	0.2971	2	44	0.4255	5	69	0.5175	5
20	0.3000	2	45	0.4390	5	70	0.5189	5
21	0.3016	2	46	0.4368	5	71	0.5290	5
22	0.3069	2	47	0.4471	5	72	0.5184	5
23	0.3195	2	48	0.4431	5	73	0.5194	5
24	0.3103	2	49	0.4591	5	74	0.5298	5
25	0.3206	2	50	0.4575	5	75		

Pe baza datelor din Tabelul 3.2 și a Figurii 3.34, s-a reprezentat în Fig. 3.41 evoluția biomasei, considerând ca origine a axelor de coordonate punctul: $t_0 = 260$ min, $x_0 = 0.3030$ g/l. Răspunsul la semnal treaptă al procesului, astfel reprezentat, conduce la următoarele constatări:

1. efectul zgomotului de măsură este important, fapt care nu este surprinzător, având în vedere tehnica utilizată de evaluare a biomasei. În general, nivelul zgomotului care afectează măsurarea biomasei în procesele biotehnologice este ridicat;
2. creșterea concentrației de biomasă este aproximativ liniară, ceea ce contravine - într-o oarecare măsură - considerentelor tehnologice menționate de literatura de specialitate. În mod uzual, dacă experimentul evoluează normal, evoluția în timp a concentrației are un punct de inflexiune, corespunzător dezvoltării exponențiale a celulelor;
3. după epuizarea regimului de variație aproximativ liniară a concentrației, intrarea în faza staționară are loc destul de brusc, cu o ușoară urmă de suprareglare, ceea ce nu este uzual și poate fi o urmare a efectului zgomotului de măsurare.

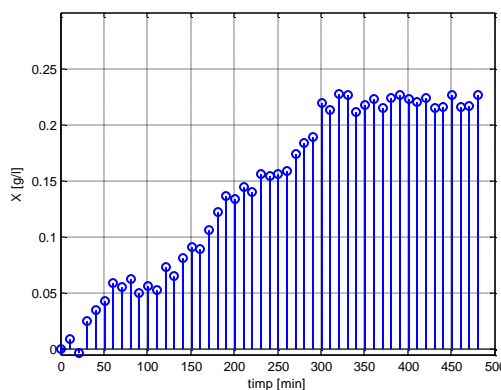


Fig. 3.41 - Evoluția biomasei în raport cu originea $t_0 = 260$ min, $x_0 = 0.3030$ g/l

Utilizând datele experimentale disponibile, procedurile clasice de identificare, adică: metoda celor mai mici pătrate (funcția matlab *arx*) și metoda variabilelor instrumentale (funcția matlab *iv4*) nu permit obținerea de rezultate satisfăcătoare. În aceste condiții, au fost testate două soluții euristice, în scopul obținerii unui model liniar al cărui răspuns la semnal treaptă să aproximeze satisfăcător răspunsul obținut experimental (Anexa 2- Programul 2.1).

Prima soluție urmărește obținerea unui model liniar care realizează aproximarea răspunsului la semnal treaptă din Fig. 3.41, fără a impune cerința ca acest model să fie în concordanță cu procesele uzuale relevate în modelarea bioproceselor. Un asemenea model are funcția de transfer

$$H_1(s) = \frac{K_1}{s} \left(1 - e^{-\tau s}\right) \frac{K_2}{T_1 s + 1} \quad (3.1)$$

în care $K_1 = 0.2/30$; $K_2 = 1.1$; $\tau = 5$ [h]; $T_1 = 30$ [min] – (Anexa 2 – programul 2.2). În Fig. 3.42 este ilustrată calitatea aproximării răspunsului experimental cu cel al modelului (3.1). Chiar dacă se obține o calitate bună a aproximării, funcția de transfer (3.1) nu are un suport în domeniul modelării bioproceselor.

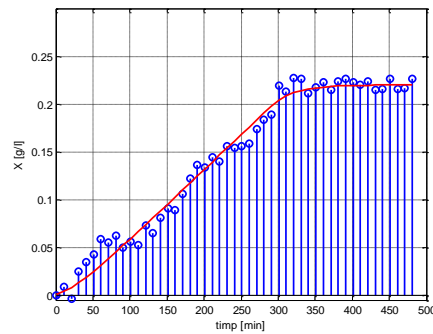


Fig. 3.42 - Răspunsul modelului (3.1), cu roșu, și răspunsul experimental din Fig. 3.41

În consecință, este de preferat să se caute un model care reflectă fazele uzuale din dinamica bioproceselor, chiar și în condițiile când zgomotul poate masca – într-o oarecare măsură – aceste faze.

Un răspuns tipic este cel cu punct de inflexiune, care corespunde fazei exponențiale. Partea specifică reflectată de datele experimentale constă în existența unei zone cu extindere largă, care corespunde vecinătății punctului de inflexiune. Un model care poate oferi o zonă de variație apropiată de cea liniară în apropierea punctului de inflexiune din răspunsul la semnal treaptă este cel cu un pol multiplu, utilizat frecvent în metoda Strejc de identificare a proceselor [76].

Dacă s-ar utiliza funcția de transfer

$$H_2(s) = \frac{0.3}{(100s + 1)^2} \quad (3.2)$$

pentru modelarea procesului, atunci răspunsul acestui sistem, $y_2(t)$, împreună cu răspunsul experimental, $y_p(t)$, au formele din Fig. 3.43. În zona mediană a răspunsului $y_2(t)$ variația este apropiată de cea liniară, însă stabilizarea are loc la o valoare superioară regimului staționar experimental.

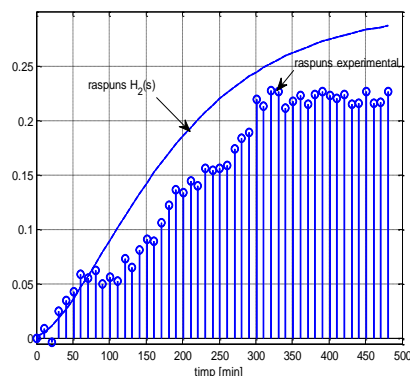


Fig. 3.43 - Răspunsul experimental și al sistemului $H_2(s)$

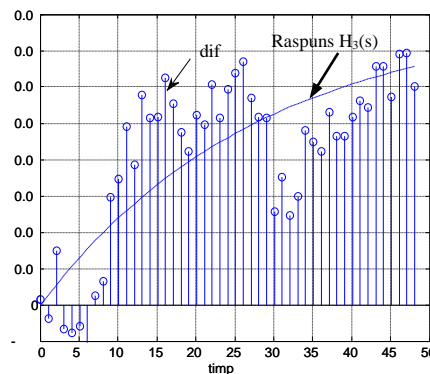


Fig. 3.44 - Diferența *dif* și răspunsul sistemului $H_3(s)$

Evoluția în timp a diferenței (Anexa 2 – programul 2.3)

$$dif(t) = y_2(t) - y_p(t) \quad (3.3)$$

afișată în Fig. 3.44 prin instrucțiunea Matlab *stem*, este aproximată prin răspunsul la semnal treaptă al elementului aperiodic:

$$H_3(s) = \frac{0.08}{280s + 1} \quad (3.4)$$

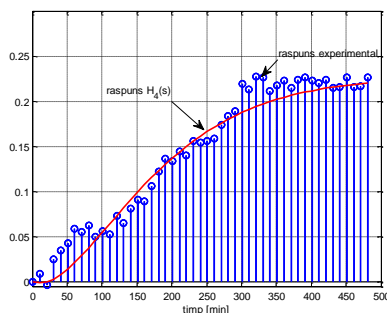


Fig. 3.45 - Răspunsul experimental și al sistemului $H_4(s)$

În aceste condiții, aproximarea $\hat{y}_p(t)$ a răspunsului experimental este dată de relația

$$\hat{y}_p(t) = y_2(t) - y_3(t) \quad (3.5)$$

unde $y_3(t)$ este răspunsul elementului cu funcția de transfer $H_3(s)$. În consecință, funcția de transfer care aproximează dinamica procesului (la scara timpului în minute) este

$$H_4(s) = \frac{0.3}{(100s+1)^2} - \frac{0.08}{280s+1} = \frac{-800s^2 + 68s + 0.22}{2.8e6s^3 + 66000s^2 + 480s + 1} \quad (3.6)$$

Din Fig. 3.45 se constată că această funcție de transfer aproximează satisfăcător dinamica bioprocesului și conduce la o evoluție a concentrației de biomasă cu punct de inflexiune (Anexa 2 – programul 2.3).

3.7 Proiectarea regulatorului aferent buclei de reglare a concentrației de biomasă și validarea experimentală a acestuia

Proiectarea regulatorului s-a realizat prin proceduri frecvențiale. Caracteristicile Nyquist ale procesului, la utilizarea modelelor (3.1) și (3.6), sunt reprezentate în Fig. 3.46 cu culorile negru, respectiv albastru. Dacă pentru aceste modele ale procesului se utilizează același regulator PI, cu funcția de transfer

$$H_R(s) = K_R \left(1 + \frac{1}{T_{iR}s} \right) \quad (3.7)$$

în care $K_R = 1.8$ și $T_{iR} = 50$ [min], caracteristicile Nyquist ale buclelor în circuit deschis sunt date în Fig. 3.47. Marginile de amplificare și de fază sunt $m_{dB} = 2.44$, $\gamma = 38^\circ$, la utilizarea modelului (3.1), respectiv $m_{dB} = 6.1$, $\gamma = 40.7^\circ$, la utilizarea modelului (3.6).

În Fig. 3.48 se prezintă răspunsul sistemului în buclă închisă cu regulatorul PI având valorile parametrilor menționate anterior și funcția de transfer a procesului $H_4(s)$ – relația (3.6), obținut cu schema simulink din Anexa 2 – Fig. A2.1.

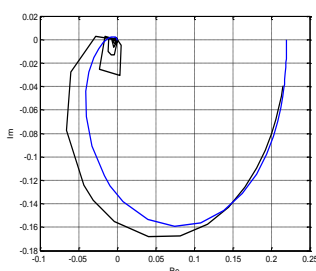


Fig. 3.46 - Caracteristicile Nyquist ale procesului modelat cu funcțiile de transfer (3.1) (negru) și (3.6) (albastru)

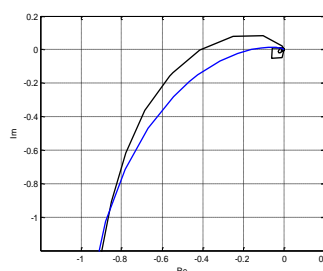


Fig. 3.47 - Caracteristicile Nyquist ale buclelor în circuit deschis la utilizarea modelelor (3.1) (negru) și (3.6) (albastru)

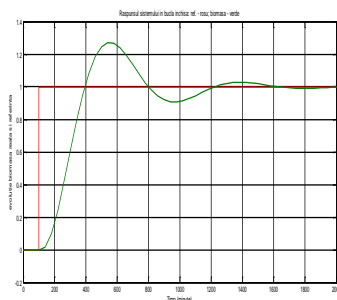


Fig. 3.48 – Răspunsul sistemului în buclă închisă

Din punct de vedere informatic, implementarea sistemului de reglare automată a procesului de creștere a drojdiilor folosește două funcții: prima funcție realizează achiziția imaginilor și calculează concentrația de biomasă (practic implementează traductorul de concentrație de biomasă), iar a doua funcție implementează regulatorul PI.

Cele două funcții comunică între ele prin intermediul unui fișier de tip *txt*. Trebuie menționat faptul că au fost rezolvate problemele de sincronizare dintre cele două funcții astfel încât algoritmul de reglare să funcționeze corect.

De asemenea, s-a realizat citirea referinței dintr-un fișier *txt* pentru a putea fi modificată în timp real pe parcursul unui experiment. Ținând cont de o serie de experimente realizate anterior s-a observat un detaliu important, și anume că direcția de evoluție a biomasei (de creștere sau scădere) depinde foarte mult de volumul inițial de la care se începe experimentul.

- Dacă se utilizează un volum mic (0.5 litri) al bioreactorului, și debitul de substrat care intră în bioreactor este mare, atunci biomasa tinde să scadă datorită faptului că influxul tinde să dilueze biomasa din bioreactor. Aici intervin însă foarte mulți factori care duc la apariția unor cazuri de excepție, în care biomasa, având la dispoziție o cantitate mare de hrană și având restul parametrilor la valori "optime", poate crește
- Dacă se utilizează un bioreactor cu volum relativ mare (ex. 5 litri), în cazul în care debitul de substrat care intră în bioreactor este mare, atunci concentrația de biomasă tinde să crească deoarece aceasta va avea multă hrană iar debitul de lichid de la intrare în bioreactor va fi mic comparativ cu volumul inițial de biomasă, ceea ce îl face aproape neglijabil. Atunci când debitul de intrare este unul mic tendința este tot una de creștere, dar într-un timp foarte îndelungat, mai degrabă o stabilizare la o anumită valoare deoarece cantitatea de hrana este mica în raport cu numărul celulelor care o consumă, iar debitul lichidului care intră împreună cu substratul este neglijabil.

Experimentul nr. 4:

Validarea sistemului de reglare automată a procesului de creștere a drojdiilor din specia *S. Cerevisiae*, s-a realizat în cadrul experimentului nr. 4. Acesta a fost realizat în buclă închisă, parametrii K_R și T_{IR} , fiind cei determinați la începutul acestei secțiuni. S-a pornit inițial cu un volum de 5 litri, și o concentrație de biomasă de 0.5 gr/l, după care au fost aplicate două trepte pe referință, de 0.4 și, respectiv, 0.6 gr/l (curba reprezentată cu culoare verde în Fig. 3.49a). În tabelul 3.3 sunt prezentate valorile concentrației de biomasă [gr/l] și ale comenzii pompei de alimentare cu substrat [V], substratul având concentrația de 125 gr/l, determinată pentru fiecare imagine, valori obținute în cursul experimentului.

Nr. Im.	Val. Conc. [g/l]	Cmd. pompă [ml/min]	Nr. Im.	Val. Conc. [g/l]	Cmd. pompă [ml/min]	Nr. Im.	Val. Conc. [g/l]	Cmd. pompă [ml/min]
1	0.5038	0	26	0.3854	0	51	0.5231	2.720
2	0.4953	0	27	0.4060	0	52	0.5368	2.774
3	0.5063	2.024	28	0.3837	0	53	0.5283	2.732
4	0.4930	0	29	0.3821	0	54	0.5374	2.792
5	0.5091	2.03	30	0.4117	0	55	0.5434	2.768
6	0.5097	0	31	0.3863	0	56	0.5518	2.762
7	0,5012	0	32	0.3938	0	57	0.5429	2.738
8	0,4901	0	33	0.4154	0	58	0.5567	2.798
9	0,5023	2.042	34	0.4208	2.612	59	0.5489	2.744
10	0,5064	0	35	0.4244	2.642	60	0.5527	2.798
11	0,4890	0	36	0.4470	2.684	61	0.5672	2.792
12	0,4851	0	37	0.4484	2.624	62	0.5528	2.738
13	0,4904	0	38	0.4570	2.666	63	0.5682	2.822
14	0,4815	0	39	0.4621	2.672	64	0.5794	2.756
15	0.4771	0	40	0.4667	2.690	65	0.5859	2.708
16	0.4692	0	41	0.4765	2.708	66	0.5930	2.684
17	0.4716	0	42	0.4632	2.702	67	0.6067	2.648
18	0.4615	0	43	0.4759	2.810	68	0.6139	2.582
19	0.4581	0	44	0.4879	2.792	69	0.5991	2.546
20	0.4498	0	45	0.5058	2.768	70	0.6033	2.612
21	0.4521	0	46	0.5189	2.714	71	0.5970	2.594
22	0.4350	0	47	0.5240	2.672	72	0.6030	2.624
23	0.4246	0	48	0.5180	2.672	73	0.5972	2.594
24	0.4174	0	49	0.5237	2.732	74	0.6032	2.624
25	0.4018	0	50	0.5301	2.726			

Tabelul 3.3: Valorile concentrației de biomasă [gr/l] și ale comenzii de iesire catre pompa de alimentare cu substrat [ml/min] determinată pentru fiecare imagine

În Fig. 3.49a se observă că sistemul urmărește referința, ceea ce înseamnă că atât traductorul de concentrație de biomasă realizat pe baza prelucrării de imagini, cât și regulatorul funcționează corect. În Fig. 3.49b se poate observa variația comenzii în unități de debit.

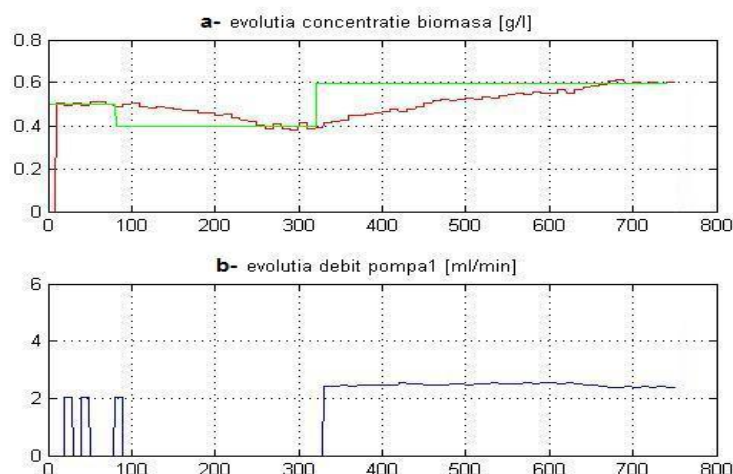


Fig. 3.49. Evoluția concentrației de biomasă (a) și evoluția comenzii (debitul pompei de alimentare cu substrat - b)

Capitolul 4

Clasificarea stării fiziologice a celulelor utilizând tehnici de procesare a imaginilor

4.1 Introducere

Echipamentele în care au loc reacțiile biologice sau transformări intense, cum sunt bioreactoarele, trebuie să garanteze un transfer nelimitativ de nutrienți din mediul de cultură către celule, precum și condiții favorabile pentru dezvoltarea acestora.

Lucrarea de față are ca obiectiv diagnoza bioproceselor, cu un studiu de caz dezvoltat pe culturi de drojdii din specia *S. Cerevisiae*, având ca și o contribuție personală importantă introducerea noțiunii de viabilitatea celulară sau gradul de viabilitate al celulelor.

Aceasta este o caracteristică fiziologică a culturii de celule care constituie o preocupare majoră atunci când se face referire la bioprocese, această caracteristică fiind asociată în mod direct cu productivitatea.. În mod frecvent, gradul de viabilitate al celulelor este evaluat la microscop prin amestecarea suspensiilor cu reactivi specifici care colorează întreaga celulă sau părți ale acesteia. Astfel, celulele moarte vor deveni colorate deoarece membrana este deteriorată și permite absorbția colorantului în interior, pe când cele vii vor rămâne necolorate, permițând discriminarea vizuală între celulele vii și moarte. De exemplu, pentru evaluarea integrității membranei celulare se utilizează coloranți, cum ar fi albastru de metilen, albastru evans, albastru tripan, propidium iodid, roșu neural, phenosafranine [79], [80], [81]. Altfel, o serie de coloranți specifici, cum ar fi fluoresceina, oxonolul, carboxifluoresceina diacetat etc., [82] și [83] au fost folosiți pentru a evalua activitatea metabolică a celulelor. Aceste metode sunt invazive și, uneori, numărul redus de celule din eșantion, este mai degrabă considerat nereprezentativ pentru întreaga populație.

Recent, determinarea viabilității celulelor prin tehnici non-invazive de prelucrare a imaginilor a fost posibilă cu ajutorul microscopelor "în situ" cu câmp întunecat (dark field microscopy). În [84] s-a folosit o mașină vectorială care utilizează tehnici de învățare pentru discriminarea celulelor vii de cele moarte. Pentru aceasta s-au utilizat două culturi de drojdii *Saccharomyces cerevisiae*, prima formată numai din celule vii, cealaltă numai din celule moarte.

În capitlul 4 al tezei de doctorat s-a realizat o primă analiză a bioproceselor folosind imaginile capturate cu o camera Olympus alb-negru de 1,3 mpx în cadrul unui experiment în care s-a urmărit un prim nivel de diagnoză care constă în identificarea și clasificarea celulelor în două categorii: vii și, respectiv, moarte. Validarea rezultatelor a fost realizată folosind un microscop cu contrast de fază (contrast phase microscopy). Cum acest prim nivel de diagnoză nu este suficient pentru a diagnostica evoluția populației de celule, s-a elaborat un algoritm de clasificare a celulelor de drojdie folosind imagini capturate cu o camera color de 1,3 mpx în cadrul unui al doilea experiment care a durat 6 zile. Deoarece cantitatea de informații cuprinsă în imaginile color este superioară imaginilor alb-negru, aceasta a permis o mai bună clasificare a stării fiziologice a celulelor (o rafinare a stării acestora), putând fi deosebite 5 categorii de celule: tânără, matură, în diviziune (celule în faza de înmulțire), bătrâne, moarte. Validarea rezultatelor experimentului a fost realizată prin numeroase analize de laborator efectuate concomitent cu prelevarea imaginilor.

4.2 Elemente privind diagnoza bioproceselor. Analiza evoluției bioproceselor pe baza stării fiziologice a culturii de celule folosind tehnici de prelucrare a imaginilor alb-negru

În această secțiune au fost testate posibilitățile de a determina concentrația de biomasă și viabilitatea celulelor în culturi de drojdii fără a folosi tehnicile clasice invazive. În aceasta etapă, a fost dezvoltat un algoritm cu următoarele capabilități:

- să evidențieze trăsăturile celulelor viabile în imaginile provenite de la un microscop convențional (bright-field microscopy). Acesta este utilizat pentru a asista operatorul atunci când clasifică imaginile celulelor viabile și neviabile.
- să numere celulele din imagine și să evalueze concentrația de biomasă.

4.2.1 Materiale și metode

Agentul biologic folosit pentru acest studiu a fost o tulpină de cultură de tip *Saccharomyces cerevisiae* MIUG D9 din colecția Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați. Celulele au fost cultivate pentru început pe extract de malț agar Scharlau (extract de malț - 30 gr/l, peptonă de soia - 3 gr/l, agar - 15 gr/l) și prelevate în soluție salină atunci când a fost necesar. Imaginile au fost achiziționate cu un microscop cu contrast de fază (phase contrast) Olympus BX41 prevăzut cu o camera monocrom Olympus TV1X-2 de 1,3 mpx. Achiziția imaginilor a fost realizată cu un obiectiv 40x și ocular 10x, folosind atât microscop cu contrast de fază cât și microscop cu câmp luminos (bright field). Intensitatea luminii între cele două tipuri de imagini a necesitat o ajustare: în timp ce în domeniul luminos un nivel de 2,5 (pe o scară de la 0 la 6) este suficient, imaginile cu contrast de fază necesită un nivel egal cu 4 pentru a fi vizibile. Imaginile au fost achiziționate în scară de gri și procesate pe un computer PC obișnuit.

Studiul conține mai multe seturi de imagini luate de pe diferite culturi din specia *Saccharomyces cerevisiae*. Primele imagini au fost luate pe culturi proaspete, hrănite în mod corespunzător cu nutrienți, urmată de studiul pe vechile culturi lăsate fără nutrienți pentru o anumită perioadă de timp. În toate cazurile, imaginile au fost luate în două variante: cu ajutorul filtrului cu contrast de fază al microscopului și fără a utiliza filtrul (microscopie în câmp luminos - bright field microscopy).

Fig. 4.1 prezintă imaginea marită 400x a unei celule vii și a unei celule moarte luate în varianta cu contrast de fază. Diferența dintre o celulă vie și una moartă poate fi ușor de observat. Celula vie are o membrană bine conturată și interiorul este luminos, în timp ce celula moartă este mai închisă la interior și este neclară/difuză. Unele dintre celulele moarte au, de asemenea, prezente fracturi în membrană și materia lor intracelulară este dispersată în suspensie. Celulele din Fig. 4.2 sunt aceleași cu cele din Fig. 4.1, singura diferență fiind lipsa filtrului cu contrast de fază. Cele două celule se pot distinge, dar diferențele sunt mult mai mici, comparativ cu situația în care filtrul cu contrast de fază a fost aplicat pe microscop. Aceasta nu este o sarcină simplă pentru un operator să discrimineze în imagini, cum ar fi cea din Fig. 4.2, între celulele viabile și cele moarte.

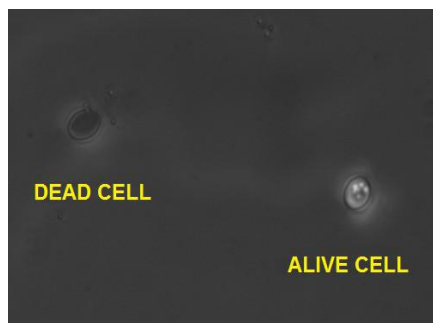


Fig. 4.1-Comparație între o celulă vie și una moartă în microscopie cu contrast de fază

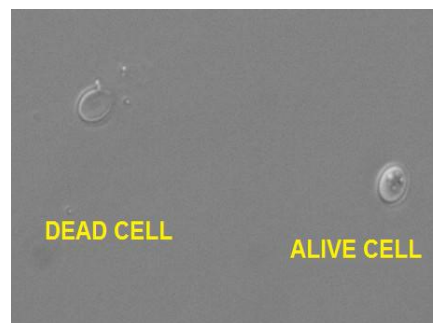


Fig. 4.2 - Comparație între o celulă vie și una moartă în microscopie cu câmp luminos

Algoritmul care îmbunătățește caracteristicile celulelor a fost dezvoltat pe imagini cu câmp microscopic luminos. Acest lucru extinde aplicabilitatea algoritmului în laboratoare care nu dețin un microscop cu contrast de fază și poate ajuta operatorul la evaluarea viabilității celulelor și evaluarea concentrației de biomasă. În scopul de a exploata

proprietățile imaginilor care conțin celule, îmbunătățirea metodei constă în următoarele operații: ajustarea contrastului imaginii, reducerea zgomotului, segmentarea imaginii, recunoașterea celulelor și etichetarea acestora, recunoașterea și numărarea celulelor vii, determinarea concentrației de biomasă.

4.2.2 Algoritm de prelucrare a imaginii

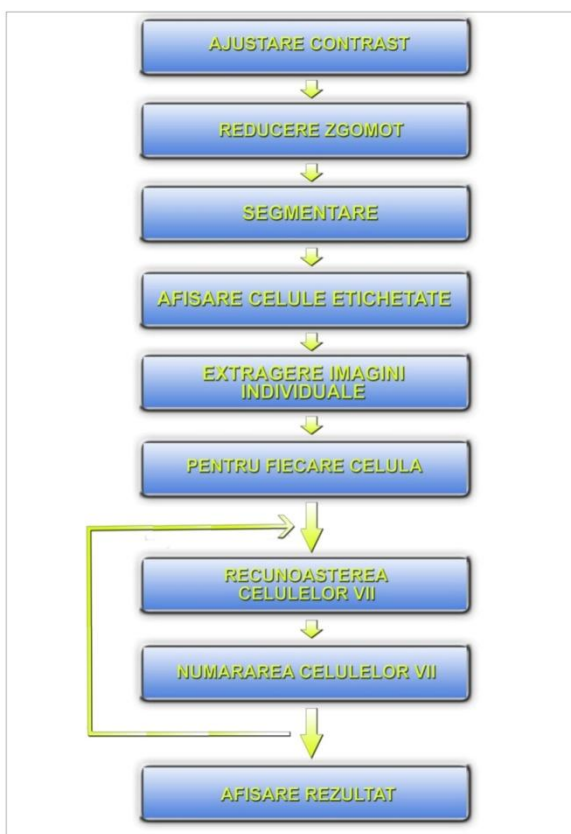


Fig. 4.3 - Schema bloc a algoritmului de prelucrare a imaginilor alb-negru

În funcție de rezultatul returnat de funcția de recunoaștere, algoritmul calculează și afișează numărul de celule considerate vii în fereastra de comandă Matlab.

În metoda clasică cu albastru de metilen, se adaugă acesta ca un colorant și apoi imaginea este analizată optic la microscop. Celulele viabile sănătoase vor rămâne necolorate în timp ce celulele moarte vor fi colorate în albastru datorită fracturilor de membrană. Din contră, față de metoda clasică, algoritmul propus îmbunătățește imaginile celulelor de drojdie viabile fără a folosi albastru de metilen. Acesta a fost dezvoltat folosind o serie de funcții de procesare a imaginii și se execută ca un program Matlab care efectuează următorii pași:

Pasul 1: Ajustarea contrastului imaginii

Pasul 2: Reducerea zgomotului

Pasul 3: Segmentarea imaginilor

Pasul 4: Afișarea celulelor etichetate

Pasul 5: Extragerea imaginilor individuale ale celulelor

Pasul 6: Recunoașterea celulelor vii

Pasul 7: Numărarea celulelor vii

4.2.3 Rezultate experimentale ale algoritmului de recunoaștere a celulelor (experimentul nr. 5)

Fig. 4.4 prezintă imaginea inițială care este afișată nemodificată. După rularea algoritmului a fost generat un set de imagini care ilustrează pașii algoritmului și rezultatele obținute.

În Fig. 4.5 se prezintă aceleași celule (din Fig. 4.4) în microscopia cu contrast de fază, pentru comparație. Următorul pas este ajustarea de contrast, care oferă o imagine cu un contrast mult mai bun (Fig. 4.6). Fig. 4.7 prezintă etapa de segmentare. Rezultatul este o imagine binarizată. În Fig. 4.8 celulele din imaginea în nuanțe de gri filtrată sunt încadrate în chenare roșii, așa cum sunt determinate pe imaginea segmentată la pasul 5. Concentrația biomasei (în procente) este, de asemenea, afișată. Din imaginea prezentată în Fig. 4.8 se poate observa că fiecare celulă este extrasă și salvată separat ca imagine de sine stătătoare, pentru o analiză suplimentară, în scopul de a determina dacă este vie sau moartă.

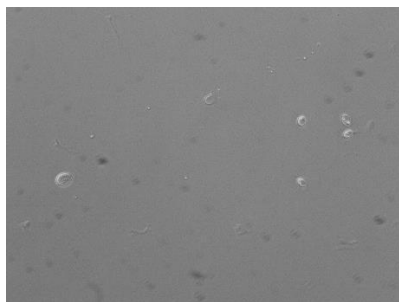


Fig. 4.4 - Imagine cu celule de drojdie în câmp luminos (bright field microscopy)

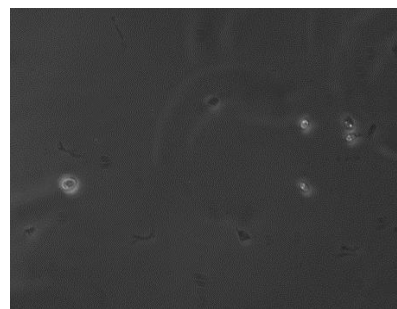


Fig. 4.5 - Imagine cu celule de drojdie în microscopie cu contrast de fază

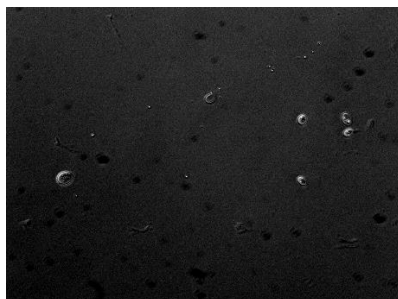


Fig. 4.6 - Imagine cu contrast ajustat

Analizând aceste imagini, fiecare celulă în parte poate fi comparată cu imaginea luată cu microscopul cu filtru cu contrast de fază și, astfel, acuratețea algoritmului este validată. Prin repetarea acestor experimente pe mai multe imagini, ambele cu și fără filtru de contrast de fază, poate fi estimată rata medie de eroare de identificare a viabilității celulelor.



Fig. 4.7 - Imagine segmentată

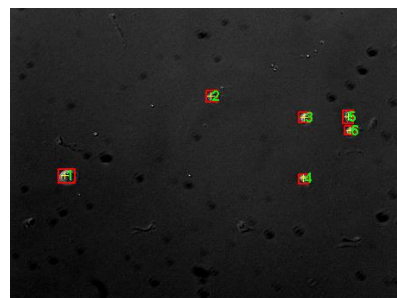


Fig. 4.8 - Celule identificate (numărul total de celule = 6, concentrație = 0.32%)

Fig. 4.9 conține celulele individuale marcate, care sunt clasificate ca viabile sau moarte. Algoritmul a găsit o celulă moartă (a doua) și, în comparație cu imaginea inițială cu filtrul cu contrast de fază, se poate concluziona că acest rezultat este corect. Algoritmul a rulat pe un set de imagini în tonuri de gri preluate cu un microscop Olympus. Ca o consecință a încercărilor, s-au obținut mai multe seturi de rezultate. Rezultatul pasului 7 al algoritmului a dat o eroare în jur de 20%. Validarea a fost realizată de către un operator uman, care a recunoscut celulele vii și celulele moarte, pe același set de imagini, dar folosind un filtru de contrast.

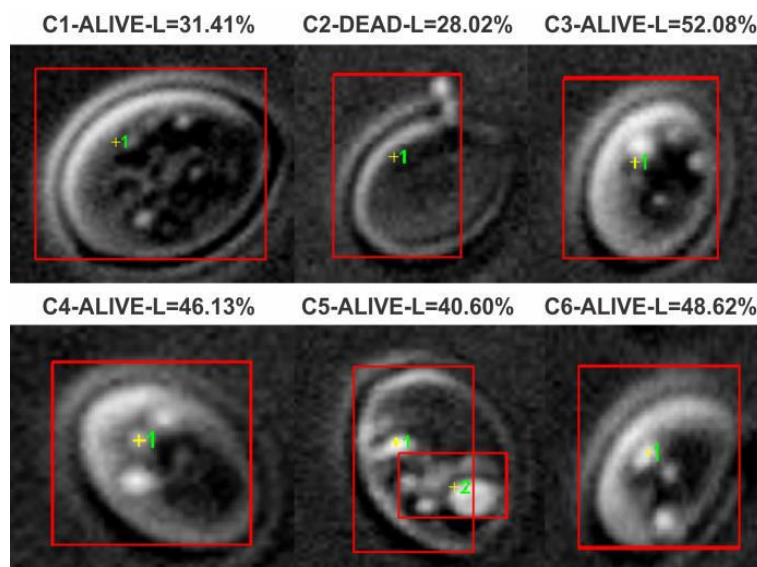


Fig. 4.9 - Celule individuale etichetate și clasificate

4.2.4 Studiul erorilor de identificare

Principalele cauze ale erorilor sunt diferențele mari de luminozitate și contrast al imaginilor luate la microscop. Aceste diferențe se datorează mai multor motive, cum ar fi densitatea suspensiei de pe lamelă, focalizarea microscopului, gradul de iluminare, caracteristicile lamelei (zone care permit trecerea unei cantități mai mari sau mai mici de lumină). În consecință, pasul 1 conține o corecție a luminozității/contrastului iar pragurile utilizate în pașii 3, 5 și 6 sunt determinate experimental, sub rezerva unor modificări pentru alte specii de microorganisme.

O altă cauză a erorilor este reprezentată de impurități, cum ar fi: puncte de praf pe obiectiv, zgârieturi și alte impurități ale suspensiei sau posibile imperfecțiuni optice ale lamelei. Acestea pot genera erori în detectarea celulelor și diferențierea lor de fundal. Un exemplu este imaginea prezentată în Fig. 4.10 care conține 5 celule iar algoritmul detectează doar patru.

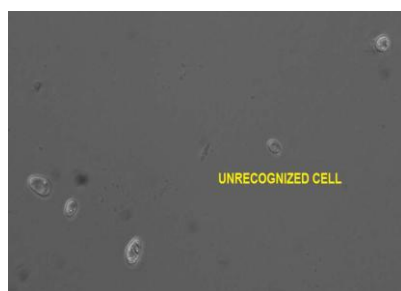


Fig. 4.10 - Imagine obținută în microscopia cu câmp luminos a unei culturi de drojdie

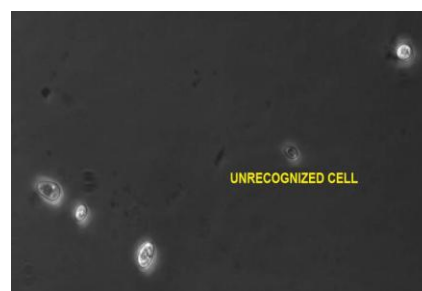


Fig. 4.11 - Imagine cu filtru cu contrast de fază a celulelor din Fig. 4.10

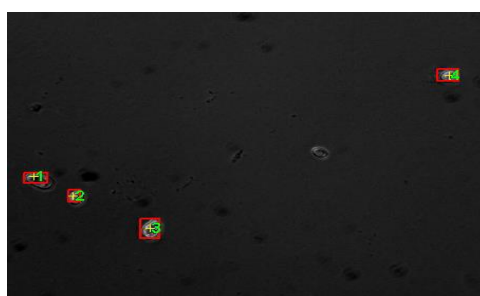


Fig. 4.12 - Rezultatul obținut în urma rulării algoritmului cu celule recunoscute și nerecunoscute

Dacă se consideră aceeași imagine, dar preluată folosind filtrul cu contrast de fază al microscopului (Fig. 4.11), pot fi văzute trei celule viabile, o celulă "mai puțin viabilă" și o celulă posibil moartă. Celula moartă nu a fost detectată de algoritm din cauza pragurilor de eliminare a impurităților din imagine. Aceste praguri sunt ghidate de mărimea impuritatilor și luminozitatea lor. Impuritățile din Fig. 4.10 au fost eliminate cu succes, dar cu costul unei celule rămasă nerecunoscută. Se poate, de asemenea, observa că, după filtrare, impuritățile existente în imagine sunt mai puțin vizibile decât în cea originală. În Fig. 4.12 se poate observa o imagine cu 5 celule. În medie, doar o singură celulă a fost etichetată greșit, prin urmare, rata de eroare este estimată la 20%. Algoritmul a rulat pe un set de opt imagini, care conțin un număr diferit de celule de drojdie și, de asemenea, au o altă luminozitate și un alt contrast.

4.2.5 Validarea rezultatelor

În realizarea acestui studiu s-au folosit tot celule de drojdie, din specia *Saccharomyces Cerevisiae*, din culturi crescute în laborator. Pentru realizarea seturilor de imagini s-au analizat diverse eșantioane, la anumite intervale de timp. Pentru validarea recunoașterii vizuale a caracteristicilor și deosebirilor dintre celulele vii și celulele moarte s-a utilizat o cultură de celule "îmbătrânite" (Fig. 4.14) în care s-au identificat atât celule vii, cât și celule moarte.



Fig. 4.14 - Celule de drojdie vii (încadrate în chenare) din cultura inițială

În aceasta figură, obținută prin metoda microscopiei cu contrast de fază, celulele vii au fost indicate prin chenare. Cultura din imaginea inițială (Fig. 4.14) a fost lăsată în aceeași poziție pe lamela microscopului timp de 5 minute. Datorită căldurii degajate de iluminarea microscopului (iluminare cu bec halogen) temperatura suspensiei a crescut generând condiții nefavorabile pentru cultură care, în acest răstimp, au provocat moartea și descompunerea unor celule. Ca urmare a fost prelevată o nouă imagine (Fig. 4.15) în care se pot observa caracteristicile aceluiași celule din imaginea inițială.

S-a constatat că o mare parte dintre celulele inițial vii au murit în acest interval de timp, prezentând aceleași caracteristici vizuale ca și cele care erau inițial moarte. Totodată, unele celule moarte au intrat în faza de descompunere, parte din conținutul lor intern (este vorba de nucleotide) împrăștiindu-se în exterior, împreună cu citoplasma, datorită ruperii membranei celulare. În figura inițială au fost identificate 8 celule vii, iar ulterior, după stresul termic, au fost identificate numai două celule vii, restul de 6 celule au murit, unele intrând și în fază de descompunere. Astfel, s-au validat caracteristicile vizuale specifice celulelor moarte (culoare, lipsa aurei exterioare de pe contur), precum și a celor trecute în fază de descompunere (împrăștierea conținutului celulei în exterior).



Fig. 4.15 - Celule de drojdie supuse stresului termic (în chenar roșu sunt celule inițial vii - acum moarte, în chenar galben sunt celule rămase vii în urma stresului termic)

4.2.6 Prezentarea setului de imagini prelucrate

- Prima imagine:

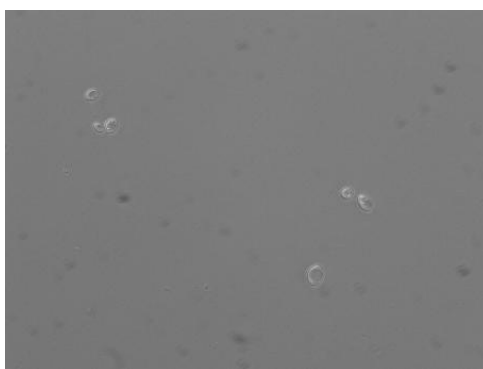


Fig. 4.16 - Imaginea inițială prelevată folosind tehnica *bright field microscopy*
Fig 4.16 reprezintă imaginea inițială prelevată folosind tehnica *bright field microscopy*.

Fig. 4.17 este folosită pentru validarea rezultatelor algoritmului. Se poate observa că toate celulele de drojdie din această imagine sunt vii datorită prezenței aurei albe în jurul marginilor celulelor și a interiorului bine definit al acestora.

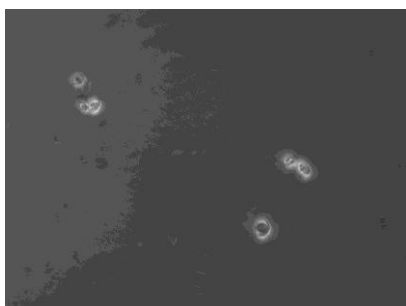


Fig. 4.17 - Imaginea inițială prelevată folosind tehnica *contrast phase microscopy*

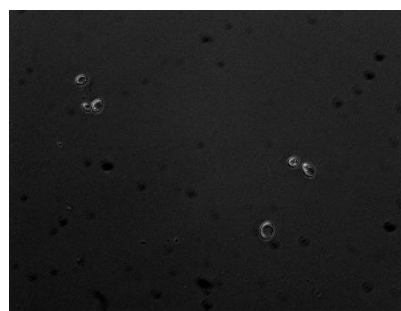


Fig. 4.18 - Imagine cu contrast ajustat

Fig. 4.18 este rezultată în urma primei etape de prelucrare a algoritmului pentru a ajuta în identificarea corectă a celulelor și pentru a deosebi fundalul și impuritățile de acestea.

Fig. 4.19 rezultă în urma segmentării cu prag.

Fig. 4.20 este rezultatul aplicării funcției *bwlabel* și prezintă celulele identificate și etichetate.

Fig. 4.21 prezintă o serie de celule identificate și clasificate din imaginea prelucrată precum și coeficienții de culoare calculați de algoritm.

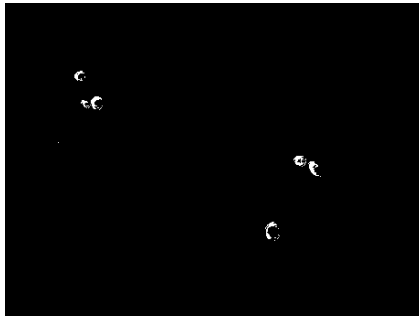


Fig. 4.19 - Imagine rezultată în urma segmentării

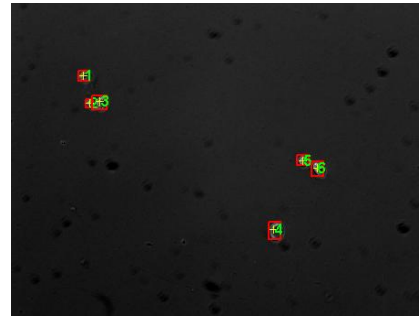


Fig. 4.20 - Celule identificate (numărul total de celule = 6, concentrație = 0.254%)

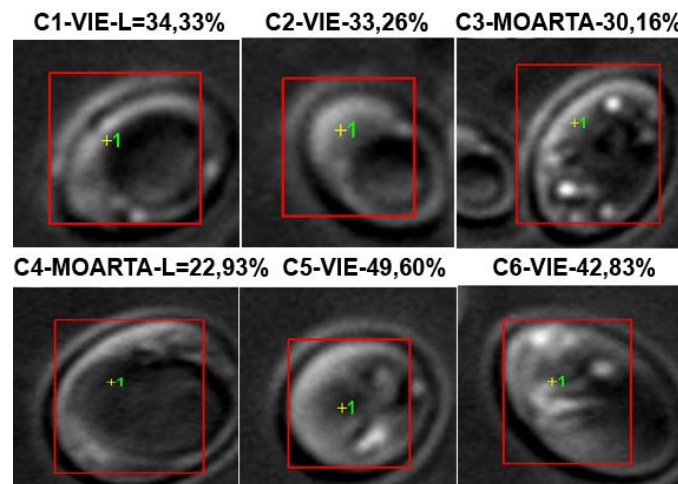


Fig. 4.21 - Celule individuale identificate și clasificate

Pentru calculul erorii se poate observa că, din 6 celule identificate, două sunt clasificate greșit ca fiind moarte, deci coeficientul de eroare este de 33%.

- A doua imagine:

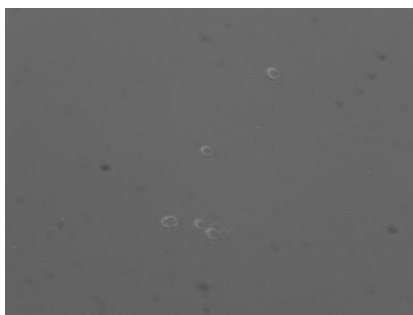


Fig. 4.22 - Imaginea inițială prelevată folosind tehnica *bright field microscopy*

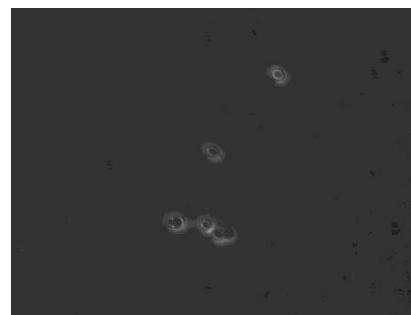


Fig. 4.23 - Imaginea inițială prelevată folosind tehnica *contrast phase microscopy*.

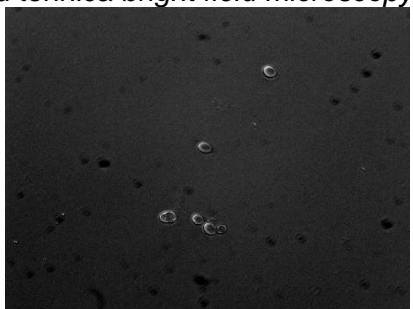
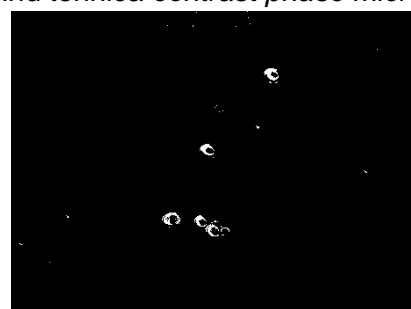


Fig. 4.24 - Imagine cu contrast ajustat



4.25 - Imagine rezultată în urma segmentării

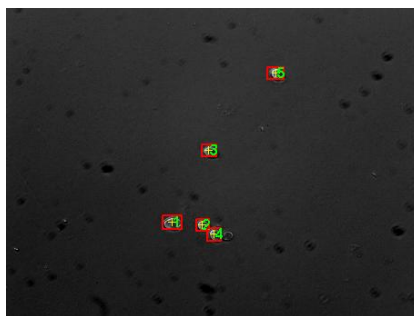


Fig. 4.26 - Celule identificate (numărul total de celule = 5, concentrație = 0.324%)

În acest caz este prezentă și o eroare de detectie. Se pot observa 6 celule de drojdie în imagine, iar algoritmul recunoaște doar 5 dintre acestea, cea de-a șasea fiind considerată impuritate și, deci, exclusă. Din 5 celule detectate doar 4 au fost clasificate corect.

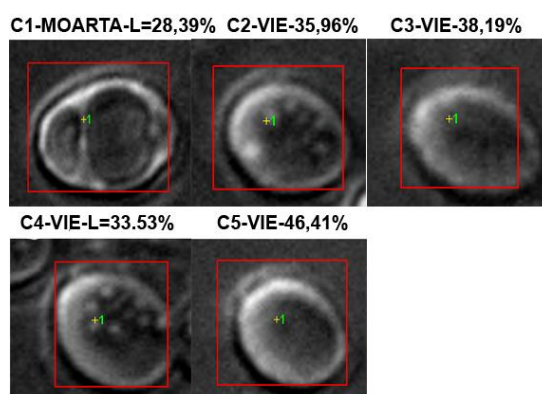


Fig. 4.27 - Celule individuale identificate și clasificate

4.3 Algoritm de evaluare a stadiului de dezvoltare și clasificare a celulelor pe baza informațiilor obținute din analiza imaginilor color

S-a efectuat un experiment (**experimentul nr. 5**) având scopul principal de a determina diferitele stadii de evoluție a culturii de drojdie analizând imaginile color. Pentru studiu s-au utilizat tot drojzii din specia *Saccharomyces Cerevisiae*, aflată în cultură pură pe mediul standardizat MEA (malț extract agar) din colecția de microorganisme a Platformei de Cercetare Bioaliment, Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați [90].

4.3.1 Materiale și metode

S-au realizat două variante experimentale: una pe mediul YEG (yeast extract glucose) cu un conținut favorabil de nutrienți necesari creșterii și multiplicării celulelor de drojdie, iar cea de-a doua pe un mediu auxotrof - G, fără sursă de azot (extractul de drojdie), având doar sursa glucidică (glucoză) necesară metabolismului energetic celular de bază. Pentru ambele medii a fost folosit un inocul de $1.76 \cdot 10^6$ ufc/ml (ufc – unități formatoare de colonii).

Au fost determinate cinci stări în care se pot găsi celulele: celule *tinere*, celule *mature*, celule *în diviziune*, celule *bătrâne* și celule *moarte*. Pentru descrierea acestor stări, au fost folosite două seturi de parametri: mărimea celulei (mică, mare, foarte mare - ce corespunde celulelor în diviziune). Al doilea set de parametri este determinat de textura interioară a celulelor. S-a constatat că celulele în interiorul cărora există zone întunecate (datorate unor elemente numite incluziuni ergastice) sunt celule supuse stresului sau, cu alte cuvinte, sunt celule neviabile, neproductive.

Criteriile de clasificare a celulelor au fost dezvoltate pe baza mai multor analize de laborator realizate, cum ar fi:

- măsurarea densității optice (DO600) folosind spectrofotometrul Hach Lange DR3900 (Fig. A1.23, Anexa 1);
- numărarea celulelor în vase Petri cu mediu agar (SPC - standard plate count);

- măsurarea concentrației azotului și a glucozei.

Toate analizele de laborator au fost efectuate zilnic, în același timp cu prelevarea imaginilor culturilor de celule.

Pentru reducerea erorilor statistice s-a folosit metoda inoculării în paralel a două plăci Petri din fiecare diluție zecimală și s-a calculat media aritmetică la perchea de plăci aparținând celei mai mari diluții în care, per placă, numărul coloniilor nu a depășit 300. Rezultatul, reprezentând numărul de celule viabile din specia *S. cerevisiae* (N), a fost exprimat în ufc/ml conform formulei:

$$N_{(ufc/ml)} = \frac{(n_1 + n_2)}{2 \cdot d} \quad (4.5)$$

unde n_1 și n_2 reprezintă numărul de colonii din cele două plăci în care s-a făcut numărarea, iar d este coeficientul de diluție.

Pentru achiziția de imagini a fost folosit un microscop echipat cu cameră digitală color cu rezoluția de 1,3 mpix. Imaginile au fost achiziționate folosind un obiectiv de 60X și o camera color care prezintă un factor de mărire echivalent cu al unui ocular de 10X. Intensitatea luminoasă a microscopului a fost setată la valoarea maximă și a rămas neschimbată pe timpul experimentului. Imaginile au fost achiziționate în modul RGB și procesate cu un calculator obișnuit. Imaginile au fost capturate folosind drojdia *Saccharomices Cerevisiae*.

Primul mediu a fost un mediu favorabil creșterii, conținând toți nutrienții necesari (YEG - yeast extract glucose). Cel de-al doilea a fost un mediu sărac în nutrienți (G - glucose medium) fără azot și conținând o concentrație mai mare de glucoză pentru a vedea cum reacționează drojdia într-un mediu nefavorabil. Ambele medii au fost inoculate în aceleași condiții sterile (inocularea standardizată a fost realizată folosind un citometru Thoma). Pentru cultivare a fost folosit un agitator Medline SI - 300R (Fig. A1.24, Anexa 1) cu o temperatură setată la 25°C și o turatie de 150 rpm. Experimentul a durat 6 zile, timp în care imaginile au fost prelevate zilnic utilizând cele două medii (Fig. A1.25, Anexa 1). Pe fiecare lamelă de microscop obiectivul a fost mutat în 30 până la 50 puncte pentru ca imaginile achiziționate să fie reprezentative pentru întreaga suprafață a lamelei.

Fig. 4.29 prezintă o comparație între diferite stadii de evoluție ale aceleiași culturi. Imaginile au fost obținute în zile diferite și au fost capturate cu un factor de mărire de 600X. Diferențele între celule pot fi observate ușor. Se poate vedea că celulele aflate aproape de sfârșitul vieții sau supuse stresului, cum ar fi lipsa nutrienților, dezvoltă o structură întunecată în interior și, rareori, membrana devine neregulată, nefiind bine conturată.

Celulele aflate în această stare nu mai sunt productive, apropiindu-se de sfârșitul vieții, o parte dintre acestea fiind deja moarte, ceea ce se poate vedea în Fig. 4.29 și Fig. 4.30. Această stare de latență a fost confirmată de toate testele de laborator efectuate în același timp cu capturarea imaginilor.



Fig. 4.29. Comparație între diferite stadii de evoluție a celulelor de drojdie

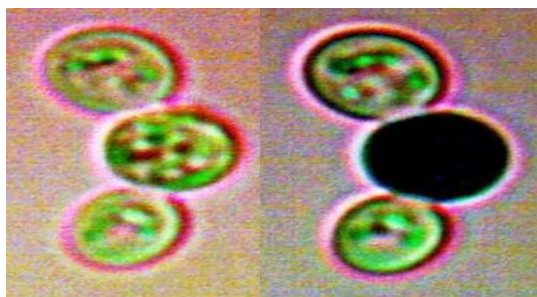


Fig. 4.30 - Celule bătrâne/moarte și aceleași celule colorate cu albastru de metil

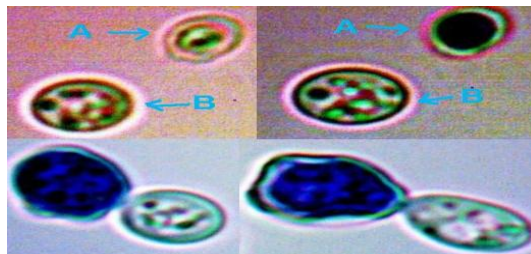


Fig. 4.31. A – Celulă moartă (normal + albastru de metil), B – Celulă bătrână (normal + albastru de metil). Două celule moarte colorate cu albastru de metil

În prima linie a Fig. 4.31 se găsesc două tipuri de celule: una (A) ce prezintă o membrană neregulată, care în acest caz s-a dovedit a fi moartă în urmă folosirii metodei cu albastru de metil și cealaltă, (B) - celulă bătrână care s-a dovedit a nu fi încă moartă. În cea de-a doua linie sunt două celule diferite având modificări ale structurii membranei de același tip cu celula (A) din prima linie, care s-au dovedit a fi moarte folosind metoda colorării cu albastru de metil.

Atât experimentele realizate, cât și algoritmul de prelucrare de imagini folosind imagini color, au fost expuse și în lucrarea [92], indexată ISI Proceedings și IEEE-Xplore.

4.3.2 Algoritm de prelucrare a imaginii

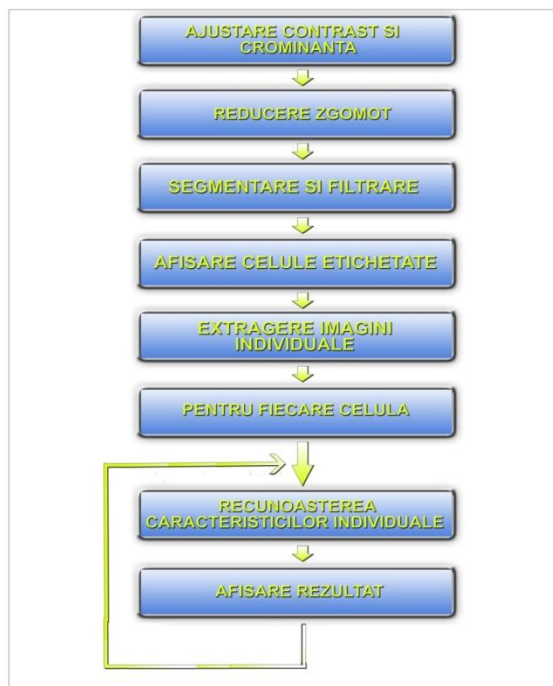
Algoritmul de clasificare este bazat pe cercetările noastre și utilizează imaginile obținute cu un microscop obișnuit și o cameră color. Scopul principal este de a putea recunoaște celulele viabile în comparație cu cele bătrâne (neproductive) și, secundar, de a putea clasifica fazele de evoluție ale celulelor, cum ar fi: tinere, în diviziune, mature, bătrâne, moarte. Pentru a realiza scopurile propuse, algoritmul are următoarele obiective:

- ajustarea luminanței și crominanței imaginii color;
- reducerea zgomotului;
- segmentarea imaginii;
- afișarea celulelor etichetate;
- extragerea imaginilor individuale ale celulelor;
- recunoașterea caracteristicilor fiecărei celule.

Obiectivele algoritmului propus sunt:

1. să analizeze o serie de imagini microscopice pentru a extrage imagini ale celulelor individuale;
2. îmbunătățirea proprietăților grafice relevante ale imaginilor celulelor, în scopul de a ajuta operatorul să recunoască starea fiecărei celule;
3. extragerea caracteristicilor celulelor, care sunt ulterior utile pentru clasificarea automată a viabilității celulare.

Acest algoritm a fost dezvoltat pornind de la versiunea prezentată anterior și utilizează noi metode de procesare a imaginii, în conformitate cu noile obiective finale. Acesta a fost testat folosind mediul Matlab și funcțiile sale corespunzătoare. Algoritmul este prezentat în Fig. 4.32.



Pasul 1: Ajustarea contrastului și crominanței imaginii

Pasul 2: Reducerea zgomotului

Pasul 3: Segmentarea și filtrarea imaginilor

Pasul 4: Afișarea celulelor etichetate

Pasul 5: Se extrag imagini individuale ale celulelor

Pasul 6: Recunoașterea caracteristicilor individuale ale celulelor

În cadrul acestei etape, celulele sunt clasificate. În acest scop, imaginile individuale ale celulelor salvate anterior sunt transformate în imagini în tonuri de gri. Folosind metoda *k-means clustering*, se obțin noi imagini ale celulelor individuale. Ele sunt supuse unei ajustări de contrast. Imaginile celulelor sunt mai întâi segmentate și se obțin noi imagini, din care se extrag conturul, aria și

Fig. 4.32 - Schema bloc a algoritmului de prelucrare a imaginilor color

luminozitatea. Pragul a fost stabilit experimental la valoarea 0,3 și suprafața minimă a 30000 de pixeli. Raportul dintre suprafața cumulată a nucleotidelor detectate și suprafața întregii celule reprezintă caracteristica finală, raportul numit *ratio*:

$$ratio = \frac{\sum patterns\ area}{cell\ area} \quad (4.14)$$

Această caracteristică este utilă pentru clasificarea celulelor ca *tinere*, *mature*, *bătrâne* și *moarte*. Condițiile de clasificare sunt următoarele: dacă suprafața celulară este mai mică de 8500 de pixeli, atunci celula este tânără, altfel este clasificată ca fiind ori celulă în diviziune (mai mult de 10000 de pixeli) sau matură (între cele 2 valori).

Experimental prin analiza vizuală a mai multor imagini de celule, s-a constatat că dacă raportul este mai mic de 5%, celula este moartă, în cazul în care acesta este mai mare de 15%, celula este bătrână, iar între 5% și 15%, poate fi tânără sau matură, în funcție de aria celulei.

Următoarele grafice prezintă analizele de laborator efectuate pe parcursul experimentului și anume: densitatea optică (Fig. 4.67) în cele două medii, numărarea coloniilor de celule în cele două medii (Fig. 4.68), concentrația glucozei în cele două medii și concentrația de azot. Se poate observa intrarea în starea staționară a celulelor din mediul YEG în a treia zi, respectiv a celor din mediul G în zilele 3 - 4, mai lent, datorită adaptării la mediul nefavorabil.

Se poate observa în Fig. 4.69 că în ziua 4 concentrația de glucoză crește în mediul YEG deoarece, după atingerea punctului maxim de creștere a biomasei în ziua 3, urmează o fază de descreștere a concentrației de biomasă (celulele mor și se descompun) eliberând înapoi în soluție o parte dintre nutrienți.

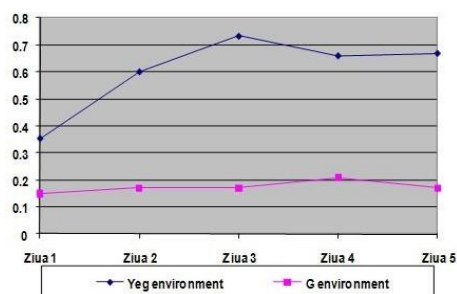


Fig. 4.67 - Evoluția în timp a densității optice

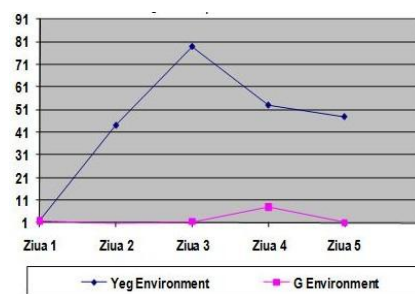


Fig. 4.68 - Evoluția în timp a numărării coloniilor de celule

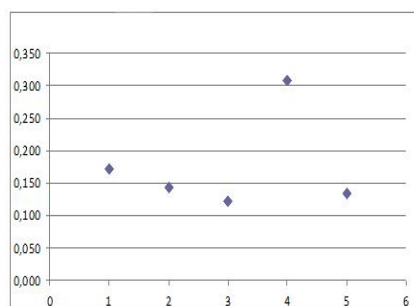


Fig. 4.69 – Conc. de glucoză [g/l] - mediu YEG

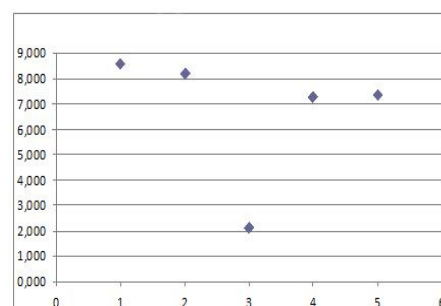


Fig. 4.70 - Conc de glucoză [g/l] - mediu G

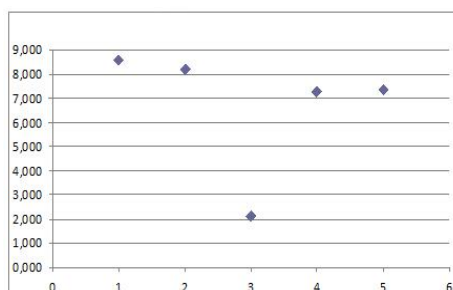


Fig. 4.71 - Concentrația de azot [mg/l] - mediu YEG

Se poate observa în Fig. 4.69 că în ziua 4 concentrația de glucoză crește în mediul YEG deoarece, după atingerea punctului maxim de creștere a biomasei în ziua 3, urmează o fază de descreștere a concentrației de biomasă (celele mor și se descompun) eliberând înapoi în soluție o parte dintre nutrienți.

În Fig. 4.70 se prezintă evoluția concentrației de glucoză din mediul G (sărac în nutrienți). Se observă o scădere a concentrației în ziua 3 datorită consumării glucozei de către populația aflată în creștere, urmând ca în ziua 4 să fie atins punctul maxim de creștere.

În Fig. 4.71 este prezentată evoluția concentrației de azot din mediul prielnic (YEG). Se remarcă faptul că celulele din acest mediu au consumat mai mult azot și mai puțină glucoză spre deosebire de celulele din mediul G care au consumat nutrientul cu concentrația cea mai mare, glucoza. Drept urmare, în ziua atingerii punctului maxim de creștere (ziua 3), se poate observa ca valoarea concentrației de azot scade la punctul minim, urmând apoi să crească datorită descompunerii celulelor.

4.3.3 Rezultate obținute cu algoritmul de prelucrare a imaginilor

După rularea algoritmului pe o imagine, pentru fiecare celulă individuală sunt afișați următorii parametri: aria celulei, numărul de zone întunecate, raportul între aria zonelor întunecate și aria celulei. În continuare, se prezintă un exemplu de detecție pentru fiecare tip de celulă (Figurile 4.72 – 4.76).



Fig. 4.72 - Recunoașterea unei celule tinere (patterns = 6, area = 8490, ratio= 5.23)

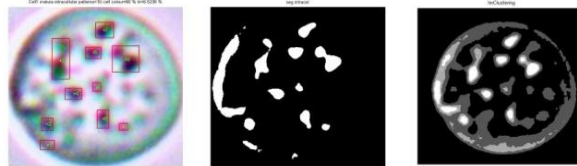


Fig 4.73 - Recunoașterea unei celule mature (patterns =10, area = 17181, ratio=6,52)

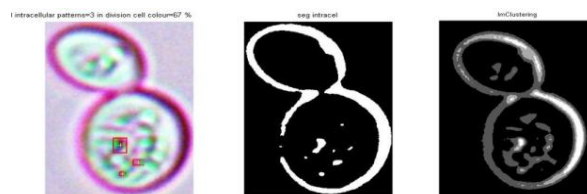


Fig. 4.74 - Recunoașterea unei celule aflată în diviziune (patterns = 3, area = 21941, ratio = 5,91)



Fig. 4.75 - Recunoașterea unei celule îmbătrânite (patterns = 57, area = 9135, ratio = 27,29)

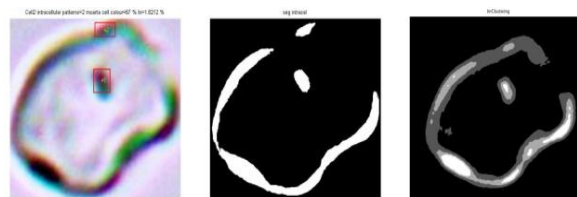


Fig. 4.76 - Recunoașterea unei celule moarte (patterns = 2, area = 12352, ratio = 1,82)

Prima coloană conține imaginile celulelor color cum sunt prezente și în imaginea inițială și având nucleotidele interne detectate, a doua prezintă imaginile rezultate în urmă segmentării și cea de-a treia prezintă imaginile rezultate după rularea metodei clustering și a detecției paternurilor interioare ale celulelor din algoritmul de prelucrare a imaginii. Studiind imaginile rezultate, se poate vedea că acestea favorizează recunoașterea de către operatorul uman, dar, în același timp, caracteristicile extrase de către algoritm sunt suficient de relevante într-o procedură de clasificare automatizată.



Fig. 4.77 - Imaginea originală preluată camera microscopului



Fig. 4.78 - Imaginea cea mai bună cu rezultată în urma prelucrării

Un exemplu de rulare a algoritmului pe o imagine prelevată de camera color în ziua a treia a experimentului, precum și imaginile rezultate în urmă prelucrării, sunt prezentate în cele ce urmează. În Fig. 4.77 se prezintă imaginea prelevată iar în Fig. 4.78 se găsește imaginea cu calitățile cele mai bune, rezultată în urma prelucrării (Pasul 1), segmentării și etichetării celulelor identificate (Pasul 2 - Pasul 4).

În Figurile 4.79 – 4.83 sunt prezentate cele cinci celule identificate în serii de câte trei imagini. În prima imagine din stânga se poate observa recunoașterea nucleotidelor interne ale celulei, imaginea din mijloc prezintă celula decupată din imagine pe baza căreia se calculează și aria iar în imaginea din dreapta se prezintă celula rezultată în urma aplicării metodei K-means Clustering. Au fost testate mai multe tehnici de detecție a conturului celulei:

- metoda canny;
- metoda hough;
- metoda entropiei;
- metoda watershed;
- metoda segmentarii cu prag (matlab);
- metoda K-means clustering.

În urma testelor efectuate pe numeroase imagini ale celulelor s-a constatat experimental că metoda K-means oferă cele mai bune rezultate în detecția conturilor celulelor individuale.

Se poate observa din Fig. 4.79 - 4.83 că au fost recunoscute o celulă moartă și patru celule mature determinate în funcție de parametri care sunt afișați pentru fiecare celulă în parte.

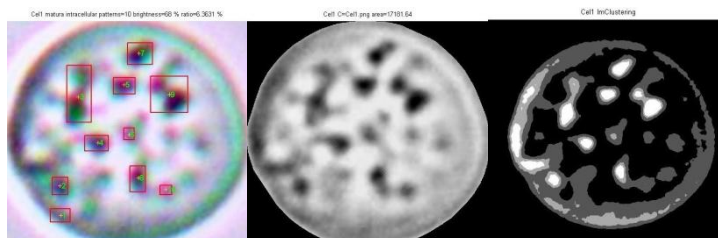


Fig. 4.79 - Celula 1 (matură, patterns = 10, area = 17181, ratio = 6,3%)

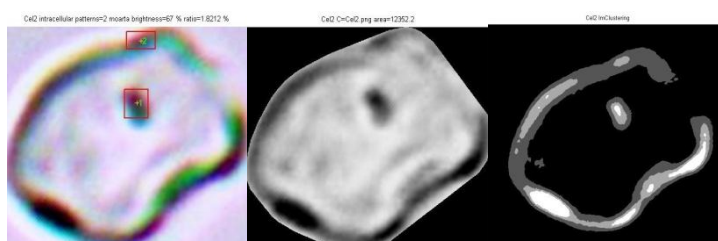


Fig. 4.80 - Celula 2 (moartă, patterns = 2, area = 12352, ratio = 1,8%)

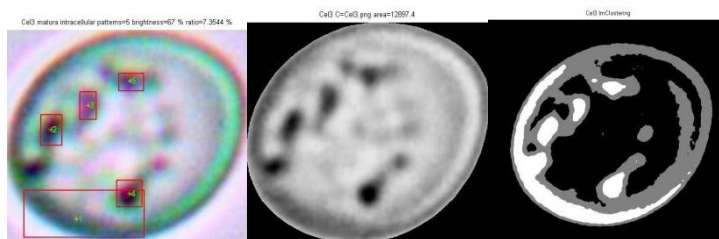


Fig. 4.81 - Celula 3 (matură, patterns = 5, area =12897, ratio = 7,3%)

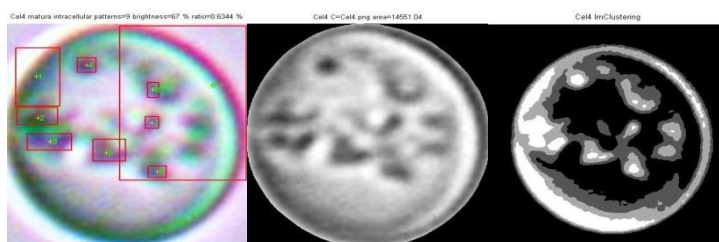


Fig. 4.82 - Celula 4 (matură, patterns = 9, area =14551, ratio = 8,6%)

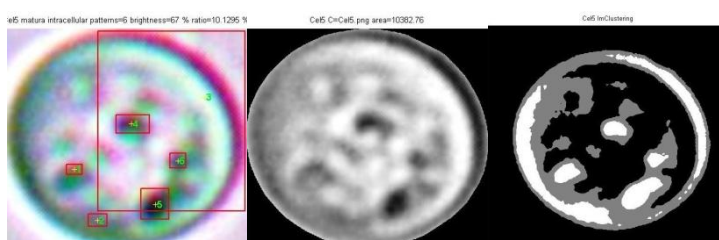


Fig. 4.83 - Celula 5 (matură, patterns =6, area =10382, ratio =10,1%)

4.3.4 Studiul erorilor algoritmului

Pe parcursul testării algoritmului au fost observate o serie de erori de identificare și clasificare. În Fig. 4.84 se poate observa ca și eroare de identificare faptul că puiul celulei nr. 2 nu este identificat datorită faptului că are o dimensiune foarte mică și este clasificat de algoritm ca și impuritate și de aceea este exclus.

În Fig. 4.85 se poate deosebi aceeași eroare prezentă și în cazul anterior când o celulă aflată în diviziune nu este recunoscută datorită mărimii foarte mici a puiului.

Un alt tip de eroare prezentă se poate observa în imaginea din Fig. 4.86 unde celula nr. 2 nu este recunoscută ca și celulă aflată în diviziune, ci sunt recunoscute două celule diferite. Aceasta eroare este datorată focalizării microscopului și a camerei prin producerea unui blur de culoare albă între cele două celule. Acest blur este catalogat de algoritm ca și fundal și, ca urmare, deosebește două celule independente.

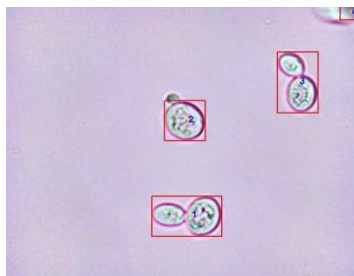


Fig. 4.84 Eroare de identificare a celulelor

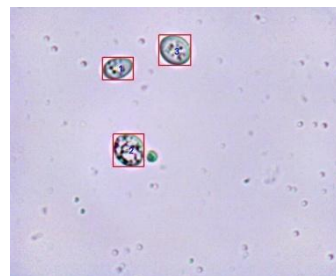


Fig. 4.85 - Eroare de identificare a celulelor

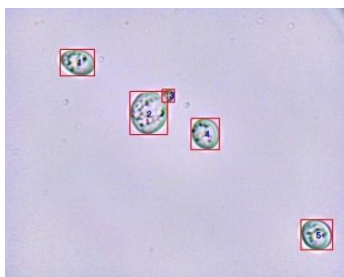


Fig. 4.86 - Eroare de identificare a celulelor

Fig. 4.87 - Imagine fără erori de identificare



În Fig. 4.87 nu s-au întâlnit erori de identificare a celulelor de drojdie, deci se poate spune că, pentru această imagine, eroarea este de 0%.

În următoarea figură, (Fig. 4.88) se poate întâlni o eroare de clasificare. Celula numărul 7 este o celulă moartă, lipsită de conținut intracelular, dar, datorită unei recunoașteri parțiale a acesteia, este clasificată ca și recunoaștere incompletă (fără membrana din stânga).

Un alt tip de eroare de clasificare îl reprezintă clasificarea unei celule ca fiind celulă bătrână când, de fapt, aceasta este matură. Acest tip de eroare apare în cazul imaginilor neclare/blurate unde interiorul celular nu este bine evidențiat. Algoritmul a fost rulat pe un set de zece imagini, care conțin un număr diferit de celule de drojdie aflate în diferite stadii de evoluție. Tabelul 4.1 și Fig. 4.89 prezintă rezultatele sintetice.

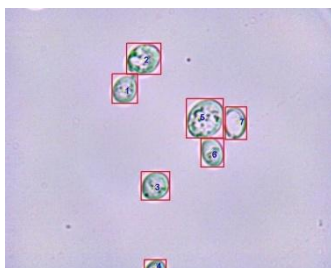


Fig. 4.88 - Imagine fără erori de identificare

În Fig. 4.87 - celula numărul 1, precum și în Figura 4.88 - celula numărul 4, se află la marginea câmpului de observare, astfel că sunt vizualizate parțial. În aceste cazuri, algoritmi compară aria acestor celule parțiale cu aria minimă (pragul de recunoaștere între o impuritate și o celulă), iar dacă aria este mai mare decât acest prag, obiectul este considerat celulă și folosită în următorii pași. Aria celulei este, de asemenea, luată în calcul la determinarea concentrației de biomasă.

Tabel 4.1 Eroarea medie introdusă de algoritmul de recunoaștere a celulelor

Nr. Imag.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Eroare	30%	30%	20%	0%	15%	7%	20%	0%	25%	15%

Concluzii finale

Bioprocesele sunt procese care implică dezvoltarea unor culturi de microorganisme în scopul producerii pe cale naturală a unor produse de interes pentru comunitățile umane, cum ar fi: medicamente, pigmenți, biocombustibili, enzime etc. Trebuie menționate și procesele de epurare a apelor reziduale, unde biotehnologiile constituie fundamentul acestor procese. Dacă la început biotehnologia s-a dezvoltat ca știință de sine stătătoare, cu rezultate mai mult sau mai puțin semnificative, după 1980 specialiștii biotehnologi s-au orientat cu precădere spre utilizarea tehnicilor de automatizare pentru eficientizarea acestor procese. Practic, putem vorbi de o interdisciplinaritate a domeniilor, biotehnologia și automatica, la care s-au adăugat informatica, matematica și alte științe (fizica, chimia etc.). Putem afirma ca domeniul proceselor biotehnologice a devenit o provocare pentru automatiști, care au găsit o "nișă tehnologică" pentru care să dezvolte și să aplice tehnici de modelare și algoritmi de control din ce în ce mai evoluți pentru eficientizarea bioprocесelor.

O problemă delicată în controlul bioprocесelor este cea legată de măsurarea principalelor mărimi de interes, pentru închiderea buclelor de control sau pentru diagnoza bioprocесelor. Sunt mărimi (de ex. concentrația de biomasă, de substrat, a produselor de metabolism etc.) care nu pot fi măsurate on-line pentru simplul motiv că nu există senzori suficient de preciși, fiabili și la un preț de cost acceptabil care să permită utilizarea lor directă în echipamentele de automatizare. Utilizarea estimatorilor de stare (observerelor de stare) poate fi o soluție pentru surmontarea acestei dificultăți, cu condiția să se dispună de un model matematic cât mai exact al bioprocесului.

În esență, prezenta teză de doctorat propune o metodă nouă pentru măsurarea mărimilor de interes din bioprocесe, în scopul implementării unor algoritmi de control sau pentru diagnoza acestora. Metoda se bazează pe tehnici de prelucrare a imaginilor, pentru aceasta fiind propusă o soluție tehnică de măsurare a unor mărimi din bioprocесe, aplicată în cadrul unui studiu de caz, creșterea drojdiilor din specia *S. Cerevisiae*. Astfel, folosind tehnica prelucrării imaginilor, s-a realizat o metodă de măsurare a concentrației de biomasă. Procedeu constă în numărarea automată a celulelor dintr-o imagine obținută cu ajutorul unui microscop clasic și a unei camere color de 1,3 mpx.

De asemenea, a fost dezvoltat un algoritm de măsurare a concentrației de biomasă, care analizează imagini color sau alb-negru, uniformizează mărimile fotometrice din imagine, identifică și separă celulele de fundal și impurități, apoi numără, măsoara celulele și calculează concentrația de biomasă. Validarea metodei a fost realizată prin comparație cu măsuratori efectuate folosind o metodă clasică, determinarea substanței uscate din cultură.

A fost proiectată și realizată o interfață de comunicare între echipamentul de automatizare al unui bioreactor clasic și o placă de achiziții conectată la un PC. Prin aceasta interfață, care cuprinde atât o parte hardware, cât și una software, s-a realizat automatizarea unui bioreactor clasic și s-a validat experimental funcționarea "traductorului" bazat pe tehnici de prelucrare a imaginilor. Cei doi algoritmi aferenți părții software, menționată anterior, sunt pentru controlul procesului creștere a drojdiilor din specia *S. Cerevisiae* și pentru analiza imaginilor. În acest scop, bioreactorul a fost prevăzut cu un senzor care permite prelevarea imaginilor în timp real, astfel realizându-se închiderea unei bucle de reglare a concentrației de biomasă. Senzorul proiectat este compus dintr-o celulă de curgere (bypass), microscop clasic dotat cu camera color de 1,3 mpx și un calculator PC, dotat cu software-ul adecvat, în cazul de față fiind folosit mediul Matlab. Circulația suspensiei din camera de curgere s-a realizat cu ajutorul unor pompe peristaltice, utilizate ca elemente de execuție. Așa cum s-a menționat anterior, sistemul automat dezvoltat în lucrarea de doctorat a fost conceput și validat în cazul creșterii culturilor de drojdie din specia *Saccharomyces cerevisiae*, dar el poate fi ușor adaptat și folosit și pentru alte culturi de celule, similare celulelor de drojdie.

Deoarece acest sistem automat nu necesită supraveghere sau control din partea factorului uman, el poate fi folosit pentru experimente de lungă durată.

Pe partea de diagnoză au fost realizați o serie de algoritmi de prelucrare a imaginilor pentru recunoașterea celulelor de drojdie și care pot fi folosiți de către un operator în vederea analizei culturilor de celule. Acest lucru este de un real folos operatorului biotehnolog care poate fi avertizat în legătură cu starea de viabilitate a culturii de microorganisme (dacă cultura a fost contaminată, dacă biomasa se dezvoltă în condiții bune, se poate aprecia calitativ vârsta medie a culturii etc.) pentru a decide continuarea sau oprirea procesului în ideea salvării de resurse materiale și energetice care ar fi consumate inutil dacă procesul ar evolua spre o stare de eșec. Primul algoritm este capabil să recunoască dacă o celulă de drojdie este vie sau moartă folosind un microscop obișnuit cu câmp luminos și o cameră alb-negru având o precizie de peste 80%.

Metoda de clasificare a celulelor a fost validată folosind un microscop cu contrast de fază. Al doilea algoritm permite recunoașterea caracteristicilor individuale intracelulare pe baza cărora celulele sunt clasificate în cinci categorii: tânără, matură, în diviziune, bătrână și moartă. Algoritmii folosesc imagini color și metoda *k-Means Clustering* pentru a determina constituția intracelulară a fiecărei celule detectate. Validarea metodei a fost realizată cu ajutorul unui experiment efectuat pe o cultură de drojdie având o durată de 6 zile. În cadrul experimentului au fost măsurate următoarele mărimi: concentrația de biomasă prin metoda clasică (numărarea celulelor în vase Petri – SPC), densitatea optică, măsurarea concentrației azotului și a glucozei. Pentru a putea compara rezultatele obținute cu algoritmi menționați, au fost efectuate zilnic analize de laborator în paralel cu realizarea capturii de imagini.

Contribuții originale ale tezei de doctorat

În sinteză, în cadrul tezei de doctorat trebuie menționate următoarele contribuții originale:

1. Dezvoltarea și implementarea unui traductor bazat pe tehnici de procesare de imagini pentru măsurarea mărimilor de interes din bioprocese cu cele două componente: hardware și software (în cazul prezentei teze de doctorat – concentrația de biomasă).
2. Validarea experimentală a funcționării traductorului pentru măsurarea concentrației de biomasă prin tehnici de procesare a imaginilor în cazul unui proces de creștere a drojdiilor din specia *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Realizarea unei celule de curgere și observare (bypass), componentă a traductorului menționat anterior, cu rolul de a prelua eșantioane de cultură pentru măsurare; trebuie menționat faptul că această celulă de curgere este una dintre contribuțiile cele mai importante ale tezei, fiind elementul esențial al traductorului, determinând precizia de măsurare a concentrației de biomasă. În cadrul tezei, celula de curgere a fost îmbunătățită prin versiuni succesive, până la atingerea performanțelor necesare funcționării în regim automat, precum și a caracteristicilor optice care influențează precizia de identificare și clasificare a celulelor.
4. Determinarea caracteristicilor dinamice ale traductorului pentru măsurarea concentrației de biomasă prin tehnici de procesare a imaginilor, în vederea stabilirii perioadei minime de eșantionare.
5. Realizarea unui algoritm de detecție a celulelor și de calcul a concentrației de biomasă în timp real prin tehnici de analiză a imaginilor.
6. Realizarea unui algoritm care uniformizează mărimile fotometrice din imagini și care se bazează pe transformarea cosinus discretă 2D. Deoarece luminanța și crominanța imaginilor depind de mai mulți factori cum ar fi: densitatea de suspensie, caracteristicile optice ale obiectivului, focalizarea camerei, luminozitatea lămpii și poziția obiectivului pe zona de expunere, acest algoritm realizează ajustarea automată a luminanței și crominanței imaginilor color astfel încât aceste diferențe să fie reduse și proprietățile imaginilor să fie uniformizate.

7. Realizarea unei metode de determinare automată a pragului de segmentare a unei imagini care obține cele mai mici erori pe un număr mare de imagini.
8. Identificarea procesului de creștere a drojdiilor din specia *Saccharomyces cerevisiae*, în două variante, cea de a doua variantă (bazată pe modele de tip Strejc) având corespondent tehnologic.
9. Proiectarea unui regulator liniar pentru reglarea concentrației de biomasă și, în felul acesta, s-a validat traductorul bazat pe tehnicile de prelucrare de imagini, dezvoltat în lucrarea de doctorat.
10. Dezvoltarea și implementarea unui sistem de reglare automată care include traductorul pentru măsurarea concentrației de biomasă prin tehnici de procesare a imaginilor.
11. Realizarea unei interfețe între echipamentul bioreactorului și un calculator PC de conducere unde sunt implementați atât algoritmi de procesare a imaginilor, cât și algoritmul de control automat al bioreactorului.
12. Validarea experimentală a sistemului automat, care include traductorul pentru măsurarea concentrației de biomasă prin tehnici de procesare a imaginilor, pe un bioproces de creștere a drojdiilor din specia *Saccharomyces cerevisiae*.
13. Studiul elementelor fiziologice caracteristice celulelor de drojdie (din perspectivă biotehnologică), în vederea extragerii trăsăturilor acestora, care ulterior au fost utilizate în clasificarea celulelor.
14. Realizarea unui algoritm de clasificare a stării celulelor dintr-o cultură în două clase (vii sau moarte) prin analiză de imagini alb-negru și validarea experimentală a algoritmului folosind microscopia cu contrasta de fază.
15. Realizarea unui algoritm de clasificare a celulelor în 5 categorii (tânără, matură, în diviziune, bătrână, moartă) în funcție de anumiți parametri determinați prin analiza constituției intracelulare, prin tehnici de analiză a imaginilor color, în vederea diagnozei bioprocesului.

Direcții viitoare de cercetare

Pornind de la rezultatele obținute în cadrul tezei de doctorat, cercetările realizate pot fi continuate pe următoarele direcții:

- Extinderea metodei de determinare a concentrației de biomasă și la alte specii de celule asemănătoare cu cele din specia *Saccharomyces Cerevisiae* (a caror formă este cvasisferică) prin modificarea unor parametri cum ar fi: dimensiunea celulelor, pragurile de detecție etc.
- În cazul algoritmului de clasificare a celulelor, acesta poate fi extins, de asemenea, și la alte specii care prezintă caracteristici intracelulare asemănătoare prin observarea transformărilor interne ale celulelor pe parcursul dezvoltării lor.
- Interfața propusă în această lucrare poate fi ușor adaptată pentru un alt echipament de câmp și control aferent unui bioreactor, având caracteristici diferite (volum, inerție termică, debite diferite ale pompelor peristaltice etc).
- Investigarea utilizării unei camere color având rezoluția senzorului mai mare de 1,3 mpx, aceasta ducând la o precizie de detecție mai mare și la erori mai mici.

Diseminarea rezultatelor

Rezultatele cercetărilor din cadrul studiilor doctorale au fost prezentate în următoarele articole publicate:

1. **Laurențiu Marius Baicu**, George Ifrim, Laurențiu Frangu, Sergiu Caraman, "Viability diagnosis in biotechnological cultures through image processing", 19th International

Conference on System Theory Control and Computing (ICSTCC), oct. 2015, Cheile Gradistei, Romania, pp 770-775 - **ISI Proceedings - IEEE**;

2. Ifrim, George, Titică, Mariana, **Baicu Laurențiu Marius**, Caraman, Sergiu, “*Dynamic Modeling of the pH in Lactic Acid Fermentation Processes*”, 19th International Conference on System Theory Control and Computing (ICSTCC), oct. 2015, Cheile Grădiștei, Romania, pp. 225-230 - **ISI Proceedings - IEEE**;
3. **Baicu Laurențiu Marius**, Caraman Sergiu, “*Estimating the viability of algae cells through image processing*”, Scientific Conference of Doctoral Schools from “*Dunărea de Jos*” University of Galați, Third Edition - Galați, 4-5 June 2015, poster;
4. **Baicu Laurențiu Marius**, Caraman Sergiu, “*Evolution analysis of yeast cells using advanced image processing methods*”, Scientific Conference of Doctoral Schools from “*Dunărea de Jos*” University of Galați, Fourth Edition - Galati, 2-3 June 2016, poster;
5. **Laurențiu Baicu**, George Ifrim, Vasilica Barbu, Laurențiu Frangu, Sergiu Caraman, “*Stage evaluation of cell growth in yeast culture through image processing*”, 20th International Conference on System Theory, Control and Computing (ICSTCC), October 2016, Sinaia, Romania, pp.704-709 - **ISI Proceedings - IEEE**;
6. **Laurențiu Baicu**, Laurențiu Frangu, George Ifrim, Sergiu Caraman, “*Control of the Yeast Growth Process Using an Image Processing-Based Transducer*”, 21st International Conference on System Theory, Control and Computing (ICSTCC), October 19 - 21, 2017, Sinaia, Romania - **ISI Proceedings - IEEE**;
7. **Laurențiu Baicu**, Sergiu Caraman, Laurențiu Frangu, Mihaela Miron, “*Measurement of the biomass concentration from a bioprocess by image processing techniques*”, The 5th International Symposium On Electrical And Electronics Engineering (ISEEE), 20 - 22 October, Galati Romania – **BDI – IEEE**.
8. Nicusor Nistor, **Laurențiu Baicu**, Nelu Cazacu, Gabriela Tudor, “*On microstrip parameter estimation*”, based on the design topology of the nonlinear transformation”, 23rd International Symposium for Design and Technology in Electronic Packaging (SIITME), Constanta – **ISI Proceedings- IEEE**

Trebuie menționat faptul că lucrările 1, 2, 5, 6, 8 sunt indexate ISI Proceedings și IEEE-Xplore.

Bibliografie

- [1] Marian Barbu, Sergiu Caraman, „Modelarea, Simularea si controlul bioproceselor”, Galati University Press, 2009, ISBN 978606-8008-41-7;
- [2] R.P. Jones, “Measures of yeast death and deactivation and their meaning: Part I,” Proc. Biochem.,vol. 8, pp. 118-128, 1987;
- [3] Rui D. Silva, Roberto Sotoca, Björn Johansson, Paula Ludovico, Filipe Sansonetty, Manuel T. Silva, José M. Peinado, Manuela Côrte-Real, "Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*", September 2005;
- [4] Peter Laun, Alena Pichova, Frank Madeo, Jörg Fuchs, Adolf Ellinger, Sepp Kohlwein, Ian Dawes, Kai-Uwe Fröhlich, Michael Breitenbach, "Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis", Molecular microbiology Journal, Volume 39, Issue 5 March 2001, Pages 1166–1173;
- [5] Ning Wei, Axel Saalbach, Thorsten Twellmann, Tim W. Nattkemper, Erwin Flashel, "Identification of Cell Viability by an In-situ Dark-field Microscopic Sensor", Electronic Journal of Biology, 2005, Vol. 1(2): 17-20;
- [6] Olivier Frey, Fabian Rudolf, and Andreas Hierlemann, "HIGH-RESOLUTION LIVE CELL IMAGING OF THE YEAST LIFE CYCLE", Bio Engineering Laboratory, Basel, Switzerland;
- [7] M. Barbu, S. Caraman, G. Ifrim, G. Bahrim, E. Ceanga, "State Observers for Food Industry Wastewater Treatment Processes," Journal of Environmental Protection and Ecology, vol. 12, pp. 678-687, 2011;
- [8] Caraman, S., Ceangă, E., Frangu, L., Mencinicopschi, Gh., „Modelarea și conducerea proceselor biotehnologice”, Editura Didactică și Pedagogică, București, pp. 263, 2002.
- [9] Benavides, Micaela; Coutinho, Daniel; Hantson, Anne-Lise; et al. "Robust Luenberger observers for microalgal cultures", JOURNAL OF PROCESS CONTROL Volume: 36 Pages: 55-63 Published: DEC 2015.
- [10] Amicarelli, Adriana; Quintero, Olga; di Sciascio, Fernando , "Behavior comparison for biomass observers in batch processes", ASIA-PACIFIC JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING Volume: 9 Issue: 1 Pages: 81-92 Published: JAN 2014.
- [11] Coutinho, Daniel; Wouwer, Alain Vande , "A robust non-linear feedback control strategy for a class of bioprocesses", IET CONTROL THEORY AND APPLICATIONS Volume: 7 Issue: 6 Pages: 829-841 Published: APR 2013
- [12] Petre, Emil; Bunciu (Stanciu), Elena, "Adaptive and Robust-Adaptive Control Strategies for a Class of Fed-Batch Fermentation Processes", CONTROL ENGINEERING AND APPLIED INFORMATICS Volume: 15 Issue: 1 Pages: 53-62 Published: MAR 2013
- [13] Barrigon, Jose M.; Ramon, Ramon; Rocha, Isabel; et al., "State and specific growth estimation in heterologous protein production by *Pichia pastoris*", AIChE JOURNAL Volume: 58 Issue: 10 Pages: 2966-2979 Published: OCT 2012
- [14] Selisteanu, D.; Petre, E.; Roman, M.; et al., "Estimation of kinetic rates in a baker's yeast fed-batch bioprocess by using non-linear observers", IET CONTROL THEORY AND APPLICATIONS Volume: 6 Issue: 2 Pages: 243-253 Published: JAN 2012
- [15] Hulhoven, X.; Wouwer, A. Vande; Bogaerts, Ph., "State observer scheme for joint kinetic parameter and state estimation", CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE Volume: 63 Issue: 19 Pages: 4810-4819 Published: OCT 1 2008

- [16] Hulhoven, X.; Wouwer, A. Vande; Bogaerts, Ph., "Hybrid extended Luenberger-asymptotic observer for bioprocess state estimation", CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE Volume: 61 Issue: 21 Pages: 7151-7160 Published: NOV 2006.
- [17] Rapaport, A; Dochain, D., "Interval observers for biochemical processes with uncertain kinetics and inputs", MATHEMATICAL BIOSCIENCES Volume: 193 Issue: 2 Pages: 235-253 Published: FEB 2005
- [18] Goffaux, G; Vande Wouwer, A., "Bioprocess state estimation: Some classical and less classical approaches", Edited by: Meurer, T; Graichen, K; Gilles, ED, Conference: Symposium on Nonlinear Control and Observer Design Location: Univ Stuttgart, Stuttgart, GERMANY Date: SEP 15-16, 2005
- [19] "CONTROL AND OBSERVER DESIGN FOR NONLINEAR FINITE AND INFINITE DIMENSIONAL SYSTEMS", Book Series: LECTURE NOTES IN CONTROL AND INFORMATION SCIENCES, Volume: 322 Pages: 111-128 Published: 2005
- [20] Farza, M; Hammouri, H; Othman, S; et al., "Nonlinear observers for parameter estimation in bioprocesses" CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE Volume: 52 Issue: 23 Pages: 4251-4267 Published: DEC 1997
- [21] Caraman S., Barbu M., *Modelarea și conducerea proceselor biotehnologice. Lucrări practice. Volumul 1: Modelarea și estimarea stării și parametrilor proceselor biotehnologice*, Editura Fundației Universității "Dunărea de Jos" din Galați, ISBN 973-627-240-0, 2005.
- [22] http://www.apepur.ugal.ro/rezultate/RapStiintific_Observere_ro.pdf
- [23] Bastin, G. și Dochain, D., „On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors”, Elsevier, Amsterdam, 1990.
- [24] Selișteanu, D., „*Modelarea și conducerea bioreactoarelor*”, Teză de doctorat, Universitatea din Craiova, 1999.
- [25] Lewis, F., "Optimal Estimation with an Introduction to Stochastic Control Theory", John Wiley & Sons, Inc., 1986
- [26] Barbu, M., Caraman, S. Ceangă, E., „Stochastic Estimation Techniques for Biotechnological Processes”, In: Control Engineering and Applied Informatics, Vol. 6, No. 4, ISSN 1454-8658, pp. 43-51., 2004
- [27] Barbu, M., Caraman, S. Ceangă, E., „State and Parameter Estimators for the Biosynthesis Processes”, 6th International Conference on Technical Informatics, CONTI'2004, Timisoara, Romania, Vol. 49, Pp. 139-144, Mai 27-28, 2004
- [28] Valdinei Luís Belini, Philipp Wiedemann, Hajo Suhr, „In situ microscopy: A perspective for industrial bioethanol production monitoring”, Journal of Microbiological Methods 93 (2013) 224–232;
- [29] Camisard V, Brienne J, Baussart H, Hammann J, Suhr H, „Inline characterization of cell concentration and cell volume in agitated bioreactors using in situ microscopy: application to volume variation induced by osmotic stress”, Biotechnol Bioeng. 2002 Apr 5;78(1):73-80;
- [30] Tibayrenc P., Preziosi-Belloy L., Roger J.M., Ghommidh C., 2010, „Assessing yeast viability from cell size measurements”, J Biotechnol. 2010 Aug 20; 149(1-2): 74-80. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.06.019. Epub 2010 Jun 25;
- [31] Christmann, Ingo Steinwart, "Support Vector Machines", Book Information Science and Statistics 2008, ISBN: 978-0-387-77241-7 (Print) 978-0-387-77242-4;
- [32] Ning Wei,1 Jia You,1 Karl Friehs,1 Erwin Flaschel,1 Tim Wilhelm Nattkemper2, "An In Situ Probe for On-Line Monitoring of Cell Density and Viability on the Basis of Dark Field Microscopy in Conjunction With Image Processing and Supervised Machine Learning", Bielefeld University, Faculty of Technology, Applied Neuroinformatics

- Group, Bielefeld, Germany-Published online 1 February 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/bit.21368;
- [33] Rares Potcoava BUIGA, "Raport stiintific - Proiect: 137/2014 (CTC-Videoscope)", Cod proiect: PN-II-PT-PCCA-2013-4-2289;
- [34] Guillier L, Pardon P, Augustin J-C (2006), "Automated image analysis of bacterial colony growth as a tool to study individual lag time distributions of immobilized cells". *J Microbiol Meth* 65(2):324–334.
- [35] Niblack W (1985), "An introduction to digital image processing". Strandberg Publishing Company, Birkerød
- [36] Pierre Tibayrenc, Laurence Preziosi-Belloy, Charles Ghommidh, "Single-cell analysis of *S. cerevisiae* growth recovery after a sublethal heat-stress applied during an alcoholic fermentation", *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2011 Jun;38(6):687-96. doi: 10.1007/s10295-010-0814-6. Epub 2010 Aug 24;
- [37] J.S. Guez, J.Ph. Cassar, F. Wartelle, P. Dhulster, H. Suhr, "The viability of animal cell cultures in bioreactors: Can it be estimated online by using in situ microscopy", *Process Biochemistry* Volume 45, Issue 2, February 2010, Pages 288–291;
- [38] Shapiro, Linda and Stockman, George. "Computer Vision", Prentice-Hall, Inc. 2001
- [39] Bittner C., Wehnert G. and Scheper T. (1998) *In situ* Microscopy for On-Line Determination of Biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 60(1): 24-35;
- [40] Schilling J. (2004) *Bioworld*, 1: 8-9;
- [41] Nattkemper T.W., Ritter H. and Schubert W. (2001) A Neural Classifier Enabling High-Throughput Topological Analysis of Lymphocytes in Tissue Sections. *IEEE Trans. on Inf. Techn. In Biomed.*, 5(2): 138-149;
- [42] Nattkemper T.W., Twellmann T., Schubert W. Et al. (2003) Human vs. Machine: Evaluation of Fluorescence Micrographs. *Computers in Biology and Medicine*, 33(1): 31-43.
- [43] C. Ramya, V. Nirmala, "Cancer Detection by Cell Segmentation Using Clustering and Watershed Algorithms", *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, volume 3, Special Issue 3, March 2014, ISSN (Online): 2319-875;
- [44] L. Vincent and P. Soille, "Watersheds in digital spaces: An efficient algorithm based on immersion simulations," *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell.*, vol. 13, pp. 583–598, 1991;
- [45] Bleau and L. J. Leon, "Watershed-based segmentation and region merging," *Computer Vis. Image Understand.*, vol. 77, no. 3, pp.317–370, 2000;
- [46] J. M. Gauch, "Image segmentation and analysis via multiscale gradient watershed hierarchies", *IEEE Trans. Image Process.*, vol. 8, pp. 69–79, 1999;
- [47] R.C.Gonzalez and R.E.Woods, *Digital Image Processing*. Englewood Cliffs, NJ, USA: Prentice-Hall, 2002;
- [48] J. Park and J. M. Keller, "Snakes on the watershed," *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. 23, no. 10, pp. 1201–1205, 2001.
- [49] S.-Y. Chen, S.-U. Chen, H.-Y. Wu, W.-J. Lee, Y.-H. Liao, and C.- K. Sun, "In vivo virtual biopsy of human skin by using noninvasive higher harmonic generation microscopy," *IEEE J. Sel. Topics Quantum Electron.*, vol. 16, no. 3, pp. 478–492, 2010;
- [50] H. Kobatake and S. Hashimoto, "Convergence index filter for vector fields", *IEEE Trans. Image Process.*, vol. 8, no. 8, pp. 1029– 1038, 1999;

- [51] Mehmet Sezgin and Bulent Sankur „Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation”, 13(1), 146–165 (January 2004);
- [52] Pornphan Dulyakarn, Yuttapong Rangsanseri, and Punya Thitimajshima “Histogram transformation based threshold selection for Image Segmentation” 2000;
- [53] https://en.wikipedia.org/wiki/Otsu%27s_method
- [54] N. Bolshakova and F. Azuaje, “Clustering validation techniques for genome expression data,” *Genomic Signal Process.*, vol. 83, no. 4, pp. 825–833, 2003;
- [55] E. Ceangă, I. Munteanu, A. Bratcu, M. Culea, Semnale, Circuite și Sisteme, vol. 1: Analiza semnalelor, Ed. Academica, Galați, 2001, ISBN 973-8316-16-2
- [56] L. Frangu, Recunoașterea formelor și prelucrarea imaginilor, Ed. Academica, Galați, 2001, ISBN 973-8316-18-9
- [57] Jain, Anil K., *Fundamentals of Digital Image Processing*, Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall, 1989, pp. 150-153.
- [58] Linda G. Shapiro and George C. Stockman (2001): “Computer Vision”, pp 279-325, New Jersey, Prentice-Hall, ISBN 0-13-030796-3;
- [59] Barghout, Lauren, and Lawrence W. Lee. "Perceptual information processing system." Paravue Inc. U.S. Patent Application 10/618,543, filed July 11, 2003;
- [60] Batenburg, K J.; Sijbers, J.(2008) "Adaptive thresholding of tomograms by projection distance minimization". *Pattern Recognition*. 42 (10): 2297–2305;
- [61] Batenburg, K J.; Sijbers, J. (June 2009). "Optimal Threshold Selection for Tomogram Segmentation by Projection Distance Minimization" .*IEEE Transactions on Medical Imaging*. 28 (5): 676–686;
- [62] Kashanipour, A.; Milani, N; Kashanipour, A.; Eghrary, H. (May 2008). "Robust Color Classification Using Fuzzy Rule-Based Particle Swarm Optimization" . *IEEE Congress on Image and Signal Processing*. 2: 110–114;
- [63] Barghout, Lauren; Sheynin, Jacob (2013). "Real-world scene perception and perceptual organization: Lessons from Computer Vision". *Journal of Vision*. 13 (9): 709–709;
- [64] R. Kimmel and A.M. Bruckstein. http://www.cs.technion.ac.il/~ron/PAPERS/Paragios_chapter2003.pdf, *International Journal of Computer Vision* 2003; 53(3):225-243;
- [65] R. Kimmel, http://www.cs.technion.ac.il/~ron/PAPERS/laplacian_ijcv2003.pdf, chapter in *Geometric Level Set Methods in Imaging, Vision and Graphics*, (S. Osher, N. Paragios, Eds.), Springer Verlag, 2003. ISBN 0387954880;
- [66] Barghout, Lauren. *Visual Taxometric approach Image Segmentation using Fuzzy-Spatial Taxon Cut Yields Contextually Relevant Regions*. *Communications in Computer and Information Science (CCIS)*. Springer-Verlag. 2014;
- [67] Witold Pedrycz (Editor), Andrzej Skowron (Co-Editor), Vladik Kreinovich (Co-Editor). *Handbook of Granular Computing*. Wiley 2008;
- [68] Barghout, Lauren (2014). *Vision. Global Conceptual Context Changes Local Contrast Processing* (Ph.D. Dissertation 2003). Updated to include *Computer Vision Techniques*. Scholars' Press. ISBN 978-3-639-70962-9;
- [69] Barghout, Lauren, and Lawrence Lee. "Perceptual information processing system." *Google Patents*;
- [70] Lindeberg, T.; Li, M.-X. (1997). "Segmentation and classification of edges using minimum description length approximation and complementary junction cues". *Computer Vision and Image Understanding*. 67 (1): 88–98;

- [71] Ohlander, Ron; Price, Keith; Reddy, D. Raj (1978). "Picture Segmentation Using a Recursive Region Splitting Method". *Computer Graphics and Image Processing*. 8 (3): 313–333;
- [72] Laurentiu Baicu, Sergiu Caraman, Laurentiu Frangu, Miron Mihaela, "Measurement of biomass concentration from a bioprocess by image processing techniques", ISEEE 2017 The 5th International Symposium on Electrical and Electronics Engineering, 20-22 October, Galati, Romania;
- [73] X. Guo, F. Yu, "A Method of Automatic Cell Counting Based on Microscopic Image," 5th International Conference on Intelligent Human-Machine Systems and Cybernetics, Vol. 1, pp. 293-296, 2013;
- [74] J.G.A. Barbedo, "A Review on Methods for Automatic Counting of Objects in Digital Images," *Latin America Transactions, IEEE (Revista IEEE America Latina)*, vol. 10, pp. 2112-2124, 2012;
- [75] T. Höpfner, A. Bluma, G. Rudolph, P. Lindner, T. Scheper, "A review of non-invasive optical based image analysis systems for continuous bioprocess monitoring," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 33, pp. 247–256, 2010;
- [76] Ceanga Emil, Nichita Cristian, Protin Ludovic, Cutululis Antonio, „Theorie de la commande des systemes”, Ed. Tehnica, Bucuresti, 2001, pp. 370;
- [77] Laurențiu Baicu, Laurențiu Frangu, George Ifrim, Sergiu Caraman, -- Control of the Yeast Growth Process Using an Image Processing-Based Transducer, 21st International Conference on System Theory, Control and Computing, October 19 - 21, 2017, Sinaia, Romania.-ISI Proceedings;
- [78] Ranta, I., "On the Mathematical Modelling of Microbial Age Dynamic and Some Control Aspects of Microbial Growth Processes", *Acta Polytechnica Scandinavica, Mathematics and Computer Science Series*, nr. 35, Helsinki, 1982;
- [79] J.M. Wildholm, "The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells," *Stain Technol.*, vol. 47, pp. 189-194, 1972;
- [80] C.J. Baker, M.M. Mock, "An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue," *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, vol. 39, pp. 7-12, 1994;
- [81] L.A. Castro-Concha, R.M. Escobedo, M. de Lourdes Miranda-Ham, "Measurement of Cell Viability," in. V.M. Loyola-Vargas, N. Ochoa-Alejo (eds.), "Plant Cell Culture Protocols," *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, vol. 877, pp. 49-56, 2012;
- [82] M. Bouix, J.-Y. Leveau, "Rapid Assessment of Yeast Viability and Yeast Vitality During Alcoholic Fermentation," *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 107, pp. 217-225, 2001;
- [83] A.R. Boyd, T.S. Gunasekera, P.V. Attfield, K. Simic, S.F. Vincent, D.A. Veal, "A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery," *FEMS Yeast Research*, vol. 3, pp. 11-16, 2003;
- [84] N. Wei, J. You, K. Friehs, E. Flaschel, T.W. Nattkemper, "An In Situ Probe for On-Line Monitoring of Cell Density and Viability on the Basis of Dark Field Microscopy in Conjunction With Image Processing and Supervised Machine Learning," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 97, pp. 1489-1500, 2007;
- [85] N. Wei, A. Saalbach, T. Twellmann, T.W. Nattkemper, E. Flaschel, "Identification of Cell Viability by an In-situ Dark-field Microscopic Sensor," *Electronic Journal of Biology*, vol. 1, pp. 17-20, 2005;
- [86] N. Wei, J. You, K. Friehs, E. Flaschel, T.W. Nattkemper, "In situ dark field microscopy for on-line monitoring of yeast cultures," *Biotechnol. Lett.*, vol. 29, pp. 373-378, 2007;

- [87] S. Burgemeister, T.W. Nattkemper, T. Noll, R. Hoffrogge, E. Flaschel, "CellViCAM— Cell viability classification for animal cellcultures using dark field micrographs," *Journal of Biotechnology*, vol. 149, pp. 310-316, 2010;
- [88] P. Wiedemann, M. Worf, H.B. Wiegemann, F. Egner, C. Schwiebert, J. Wilkesman, J.S. Guez, J.C. Quintana, D. Assanza, H. Suhr, "On-line and real time cellcounting and viability determination for animal cell process monitoringby in situ microscopy," *BMC Proceedings*, vol. 5(Suppl 8), p. 77, 2011;
- [89] Laurențiu Marius Baicu, George Ifrim, Laurențiu Frangu, Sergiu Caraman, ""Viability diagnosis in biotechnological cultures through image processing, 19th International Conference on System Theory, Control and Computing, oct. 2015, Cheile Gradistei, Romania, pp 770-775; - ISI Proceedings
- [90] <http://www.biocon.ugal.ro/>
- [91] Tofan C., Bahrim G., Nicolau A., Zara Margareta, *Microbiologia produselor alimentare – Tehnici și analize de laborator*, Editura Agir, ISBN 973-8130-89, 2002;
- [92] Laurențiu Baicu, George Ifrim, Vasilica Barbu, Laurențiu Frangu, Sergiu Caraman, "Stage evaluation of cell growth in yeast culture through image processing", 20th International Conference on System Theory, Control and Computing, October 2016, Sinaia, Romania, pp.704-709; - ISI Proceedings