

Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023

Analiza slika biofilmova

Student: Ivan Furač

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirjana Domazet-Lošo

Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023

Sadržaj

1.	Uvod	3
2.	Opis korištenih slika biofilma	4
3.	Metode analize digitalnih slika	6
4.	Program BiofilmQ	9
5.	Biblioteka OpenCV	10
6.	Zaključak i nastavak rada	17
7.	Literatura	18

Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023

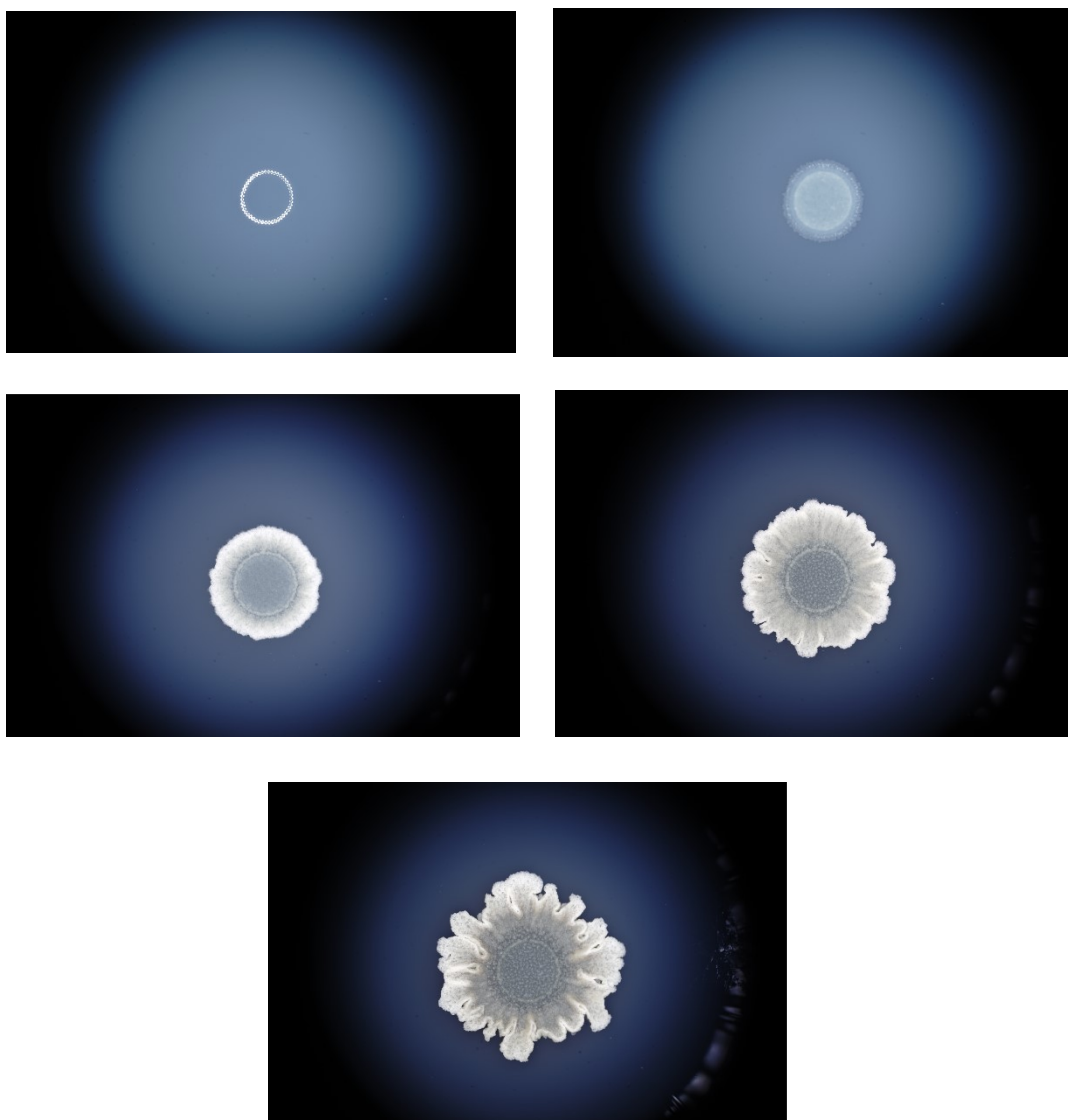
1. Uvod

Bakterije se u prirodi nalaze u dva oblika: u mobilnom, planktonskom obliku gdje se slobodno kreću okolišem te u statičnom obliku kao biofilmovi, odnosno stanju u kojem bakterijske stanice dijele resurse i zaštićene su od različitih štetnih uvjeta [1]. Biofilmovi su složene zajednice bakterijskih stanica pričvršćene za površinu, a stanice su međusobno povezane strukturom polimera koja se uglavnom sastoji od polisaharida, proteina i izvanstanične DNA [2]. Razvoj bakterijskog biofilma je vrlo složen proces za koji se pokazalo da se sastoji od diskretnih faza koje se mogu usporediti s razvojem eukariotskog organizma [3]. Diskretne faze razvoja uključuju brojne morfološke promjene, ali i molekularne procese, odnosno promjene na razini gena. Ti se molekularni procesi istražuju uzimanjem uzoraka bakterija u određenim trenucima razvoja biofilma nad kojima se zatim provodi transkriptomička i proteomička analiza. U radu [4] objašnjen je primjer postupka i korištene opreme za snimanje razvoja biofilma u standardiziranim laboratorijskim uvjetima, s unaprijed zadanim vrijednostima temperature i vlažnosti. Biofilm se fotografira korištenjem kamere postavljene na stereomikroskop u određenim vremenskim intervalima te je konačni rezultat niz fotografija. Kako bi se odredili relevantni trenuci u vremenu koji predstavljaju različite faze razvoja, fotografije pregledava stručna osoba koja detektira morfološke promjene u razvoju biofilma i na temelju toga odabire reprezentativne fotografije, odnosno faze u kojima se treba provoditi transkriptomička i proteomička analiza biofilma. Ovakva metoda analize slika je kvalitativna metoda, međutim efikasniji rezultati bi se mogli dobiti kvantitativnom analizom. U tu je svrhu potrebno pronaći automatiziranu metodu analize fotografija koja za jednu fotografiju biofilma može izračunati različite parametre poput površine biofilma ili vanjskog opsega biofilma, odnosno duljine krivulje unutar koje se nalazi cijeli biofilm. Intenzitet svjetlosti pojedinih piksela može dati informaciju o debljini biofilma, pa se tako na svjetlijim dijelovima fotografije nalaze deblji slojevi biofilma, dok je na tamnijim dijelovima biofilm tanji. Tijekom razvoja biofilma može se primijetiti kako sredina biofilma postepeno postaje sve tamnija, dok vanjski rub postaje sve svjetliji što znači da se većina bakterijskih stanica u kasnijim fazama razvoja biofilma nalazi na vanjskom rubu. Izračunom ovih parametara za svaku snimljenu fotografiju može se napraviti analiza razvoja biofilma, primjerice analiza brzine širenja usporedbom površina u različitim vremenskim trenucima. Na temelju ovih podataka postoji mogućnost da se kvantitativno odrede relevantni vremenski trenuci koji predstavljaju različite faze razvoja za koje se može provesti molekularna analiza. U nastavku će najprije biti opisan korišteni skup podataka (slika biofilma). Zatim će detaljnije biti opisane neke metode i alati koji se mogu koristiti za rješavanje problema kvantitativne analize slika biofilma te će biti navedeni njihovi nedostaci. Prije toga ukratko će biti opisana teorija koja stoji iza tih alata, odnosno općenito će biti opisane metode analize digitalnih slika.

Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023

2. Opis korištenih slika biofilma

Skup slika biofilma koji je korišten u ovom radu dobiven je od strane Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu i prikazuje razvoj biofilma bakterijske vrste *Bacillus subtilis*. Skup se sastoji od ukupno 721 slike koje su fotografirane u razmacima od 6 minuta, tako da cijeli skup prikazuje razvoj biofilma kroz točno 72 sata (3 dana). U nastavku je za primjer prikazano 5 slika iz skupa koje su vremenski međusobno jednako razmaknute, odnosno prikazuju 5 faza razvoja biofilma od početka do kraja.



Slika 1 Primjeri iz skupa slika biofilma

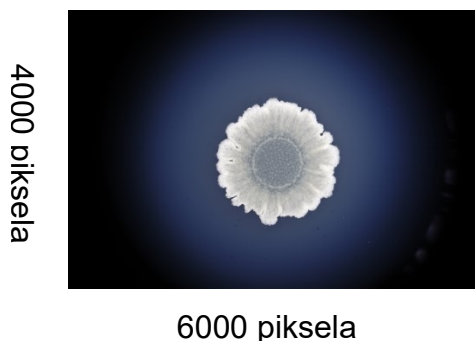
Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023

Slike su dobivene u ARW formatu, a to je format koji koriste Sonyeve kamere za spremanje slika. Ovakve slike nisu komprimirane i općenito zauzimaju puno memorije, zbog čega ovaj format može zabilježiti informacije o velikom broju detalja u slici. Za provođenje kvantitativne analize ovih slika, potrebno ih je pretvoriti u odgovarajući drugi format s obzirom da ARW sadrži neprocesirane podatke koji se ne mogu pregledavati, a za to se može koristiti program Sony Imaging Edge Desktop. Slike se u ovom radu pretvaraju u format TIFF (engl. Tag Image File Format) s obzirom da takav format podržava program BiofilmQ, a u slučaju korištenja programskog jezika Python i biblioteke OpenCV nije bitno koji se format koristi tako da je najefikasnija opcija pretvaranje slika u TIFF format. TIFF ima mogućnost spremanja više slika (odnosno slojeva) unutar jedne datoteke, a također može sadržavati i različite dodatne metapodatke. Datoteke spremljene u TIFF formatu također nisu komprimirane te zauzimaju puno više memorije čak i od datoteka spremljenih u ARW formatu, s obzirom da sadrže procesirane podatke o sva 3 RGB kanala te se mogu prikazati i pregledavati. U tablici ispod prikazana je usporedba memorijskog zauzeća različitih formata u kojima je spremljena ista slika.

Tablica 1 Usporedba memorijskog zauzeća različitih formata

ARW	23.5 MB
TIFF	68.7 MB
JPG	2.09 MB

Dimenzije slika su 6000 x 4000 piksela, pri čemu svaki piksel sadrži vrijednost za svaki od 3 RGB kanala, odnosno ukupno 3 vrijednosti.



Slika 2 Dimenzije slika

Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023

3. Metode analize digitalnih slika

Prvi dio procesa analize digitalnih slika uključuje pripremu podataka, odnosno predprocesiranje slika. Predprocesiranje može uključivati sljedeće korake:

- Pretvaranje slika u odgovarajući format
 - Na primjer slike pretvaramo iz ARW formata u TIFF format.
- Uklanjanje slika koje su izvan fokusa
 - Ovaj se postupak može napraviti izračunom srednje vrijednosti intenziteta svih piksela na slici. Mutnije slike općenito imaju manje intenzitete od jasnih, oštarih slika. Za razdvajanje mutnih od oštarih slika odabire se određena vrijednost praga. Sve slike čija je srednja vrijednost intenziteta piksela ispod praga smatraju se mutnima te se uklanjaju iz skupa. U skupu slika koji je korišten u ovom radu nije bilo potrebno provoditi ovaj korak.
- Uklanjanje šuma
 - Najjednostavniji način uklanjanja šuma je korištenje konvolucijskog filtera srednjih vrijednosti. Intenzitet svakog piksela se zamjenjuje srednjom vrijednosti intenziteta određenog broja okolnih piksela. Broj okolnih piksela koji se uzimaju u obzir naziva se jezgra.
- Poravnanje slika
 - Zbog pomicanja kamere uslijed dužih snimanja može doći do prividnog pomaka objekta od interesa na slikama. Ovaj se problem može riješiti poravnanjem slika na referentnu sliku korištenjem različitih tehnika, poput metode korelacije ili metode srednjih kvadrata.
- Obrezivanje slika
 - U slučaju da su slike prevelikih dimenzija, korisno ih je obrezati (engl. crop) kako bi se smanjila računalna složenost analize, ali i olakšala segmentacija o čemu će više riječi biti u nastavku.

S obzirom da su slike korištene u ovom radu bile iznimno visoke kvalitete i bez šuma, većinu ovih koraka nije bilo potrebno provoditi. Provedeni su samo prvi i zadnji korak, odnosno pretvorba u odgovarajući format i obrezivanje slike. Sljedeći dio procesa analize digitalnih slika je vjerojatno najvažniji i najteži, a to je segmentacija slike. Segmentacija uključuje detekciju objekata od interesa, odnosno određivanje piksela koji pripadaju tom objektu i njihovo razdvajanje od ostalih piksela koji predstavljaju pozadinu slike. Postoje dvije vrste segmentacije:

- semantička segmentacija
- segmentacija instanci

Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023

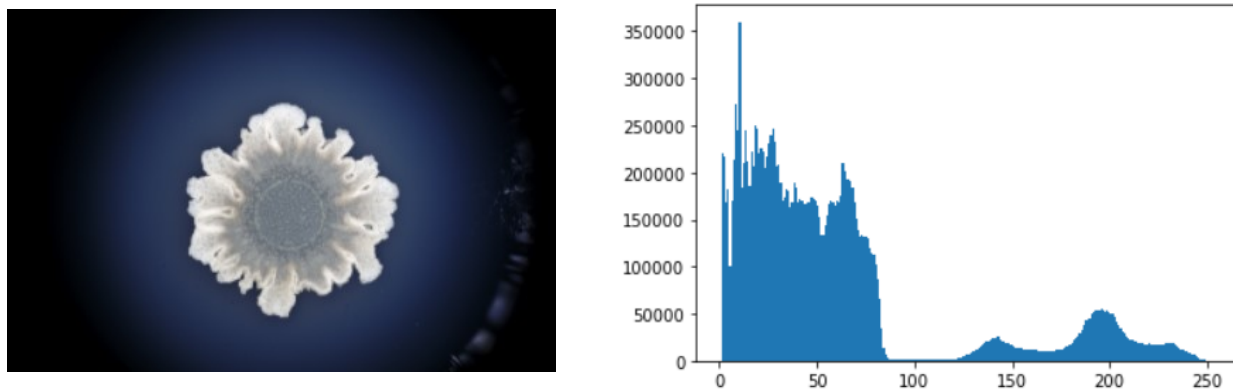
Postupak segmentacije svakom pikselu slike pridružuje oznaku, odnosno klasu. Semantička segmentacija može detektirati klase unutar slike, ali ne može raspoznati konkretne objekte koji pripadaju istoj klasi. U slučaju semantičke segmentacije svi objekti koji pripadaju istoj klasi imaju istu oznaku. Segmentacija instanci s druge strane može razlikovati različite objekte koji pripadaju istoj klasi pri čemu svakom pojedinom objektu pridružuje zasebnu oznaku. Semantička segmentacija dakle može detektirati klase objekata dok segmentacija instanci može raspoznati različite objekte koji pripadaju istoj klasi. Segmentacija instanci općenito je složeniji problem od semantičke segmentacije. S obzirom da se na slikama koje su korištene u ovom radu nalazi samo jedan objekt, jedan biofilm, nema smisla koristiti segmentaciju instanci već je dovoljno koristiti metode semantičke segmentacije. Može se reći da segmentacija instanci uključuje semantičku segmentaciju, ali i dodatan korak detekcije pojedinih objekata na slici. Primjeri postupaka koji se koriste za segmentaciju slike su sljedeći:

- Primjena praga i binarizacija
 - Cilj je pronaći vrijednost praga intenziteta piksela. Svi pikseli čiji je intenzitet ispod zadanog praga klasificiraju se kao pozadina, dok se svi pikseli čiji je intenzitet iznad zadanog praga klasificiraju kao objekt. Ovim načinom segmentacije slika se binarizira, odnosno svi objekti se dijele u dvije klase.
- Detekcija rubova
 - Cilj je detektirati područja na slici gdje se događa nagla promjena u vrijednostima piksela. Takva područja najčešće predstavljaju rub nekog objekta.
- Detekcija regija
 - Ovaj postupak je zapravo suprotan postupku detekcije rubova. Cilj je detektirati područja slike gdje nema velike promjene u intenzitetima piksela. Takva područja predstavljaju jedan objekt u kontinuitetu, odnosno jednu regiju.
- Konvolucijske neuronske mreže
 - Segmentacija korištenjem konvolucijskih neuronskih mreža je najsloženiji postupak, ali i postupak koji najčešće daje najbolje rezultate.

U nastavku će fokus biti na prvom postupku segmentacije koji se temelji na primjeni praga (engl. thresholding). Postoji više metoda kojima se ovo može postići, primjerice Otsu metoda primjene praga ili Ridler-Calvard metoda primjene praga. U ovom se radu koristi Otsu metoda primjene praga. Ova metoda pretpostavlja da se slika sastoji od 2 klase: pozadine i objekta, odnosno u ovom slučaju biofilma. Sliku je potrebno prije primjene praga pretvoriti u tzv. sivi oblik (engl. grayscale), tako da svaki piksel ima samo jednu vrijednost intenziteta. Originalna slika je slika u boji, stoga svaki piksel ima 3 vrijednosti

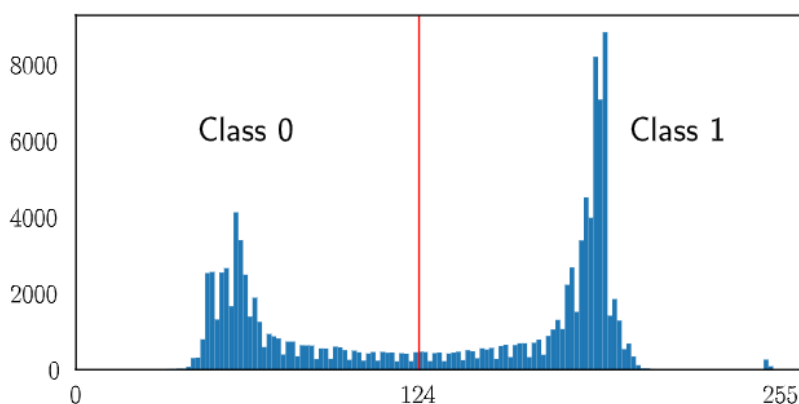
Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023

intenziteta, za svaku od 3 boje (RGB – crvena, zelena i plava). Ako je vrijednost intenziteta piksela kodirana s 8 bita kao u slučaju slika u ovom radu, u originalnoj slici podatak o boji svakog piksela kodiran je s ukupno 24 bita. Nakon pretvaranja slike u sivi oblik, podatak o intenzitetu svakog piksela kodiran je s 8 bita. Histogram slike je graf na kojem x-os predstavlja pojedine vrijednosti intenziteta piksela, a y-os predstavlja broj piksela koji imaju zadanu vrijednost intenziteta. Primjer histograma za jednu od slika biofilma nalazi se ispod.



Slika 3 Primjer histograma

Otsu metoda za prag pokušava pronaći takvu vrijednost intenziteta koja će minimizirati varijancu intenziteta piksela unutar istog segmenta (npr. između piksela koji pripadaju pozadini ili između piksela koji pripadaju biofilmu). Istovremeno, maksimizira se varijanca intenziteta piksela između različitih segmenata, odnosno klasa tako da pikseli koji pripadaju pozadini budu što više različiti od piksela koji pripadaju objektu (biofilmu). Primjer izračunatog praga korištenjem Otsu metode nalazi se na slici ispod.

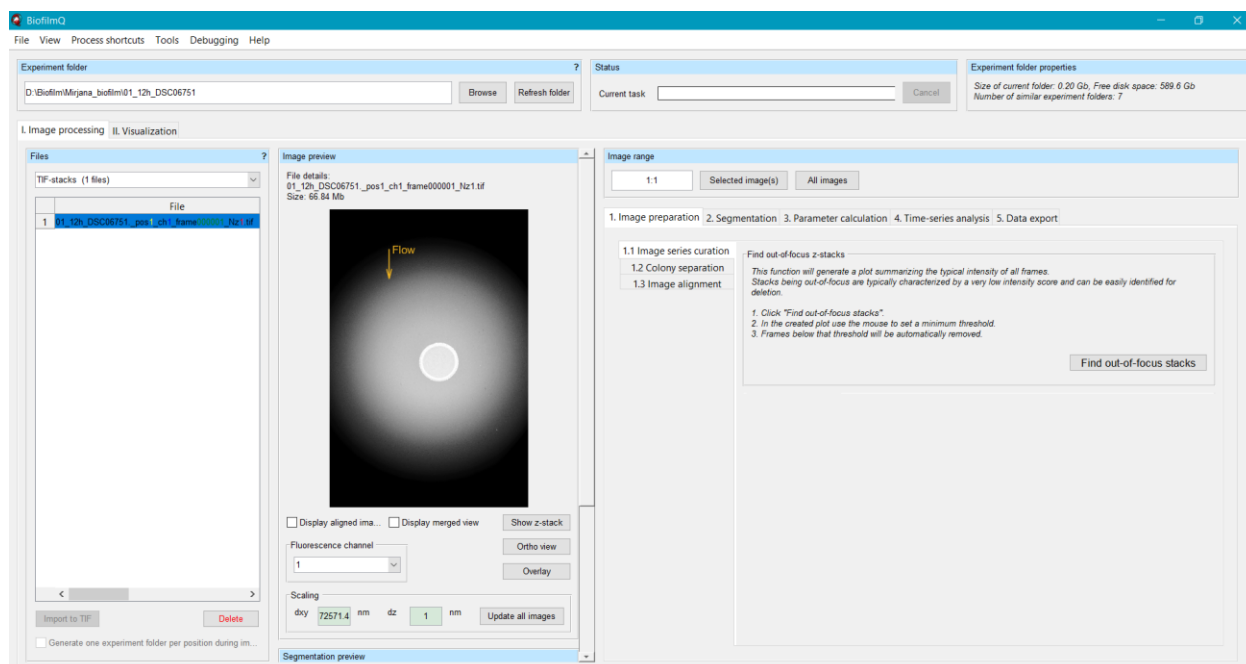


Slika 4 Primjer praga izračunatog korištenjem Otsu metode

Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023

4. Program BiofilmQ

BiofilmQ je alat za kvantitativnu analizu slika biofilmova [5]. Alat je napisan u programskom jeziku MATLAB i može se koristiti preko grafičkog sučelja. Alat nudi mogućnost predprocesiranja slika, uključujući sve prethodno navedene korake predprocesiranja te specifičnu metodu segmentacije biofilma. Volumen koji zauzima segmentirani dio slike, koji predstavlja biofilm, pretvara se u velik broj kocaka, odnosno pseudostanica. Na slici ispod nalazi se grafičko sučelje alata BiofilmQ.



Slika 5 Grafičko sučelje alata BiofilmQ

Problem koji se pojavio kod korištenja ovog alata je velika vremenska složenost obrade slike, što posebno dolazi do izražaja kod korištenja skupa u kojem se nalazi veći broj slika. Skup slika koji je korišten u ovom radu sadrži ukupno 720 slika, te takav skup nije bilo moguće obraditi ovim alatom. Također, dosta poteškoća se pojavljivalo prilikom učitavanja slika. Iako BiofilmQ podržava format TIFF, program zahtijeva da se slike pretvaraju u interni TIF format koji se sastoji od više slojeva, odnosno predstavlja tzv. stog slojeva (engl. TIF stack). S obzirom da skup slika koji je korišten u ovom radu nema eksplicitne podatke o trećoj dimenziji (debljini sloja biofilma), pojavljivalo se dosta problema prilikom vizualizacije rezultata segmentiranja.

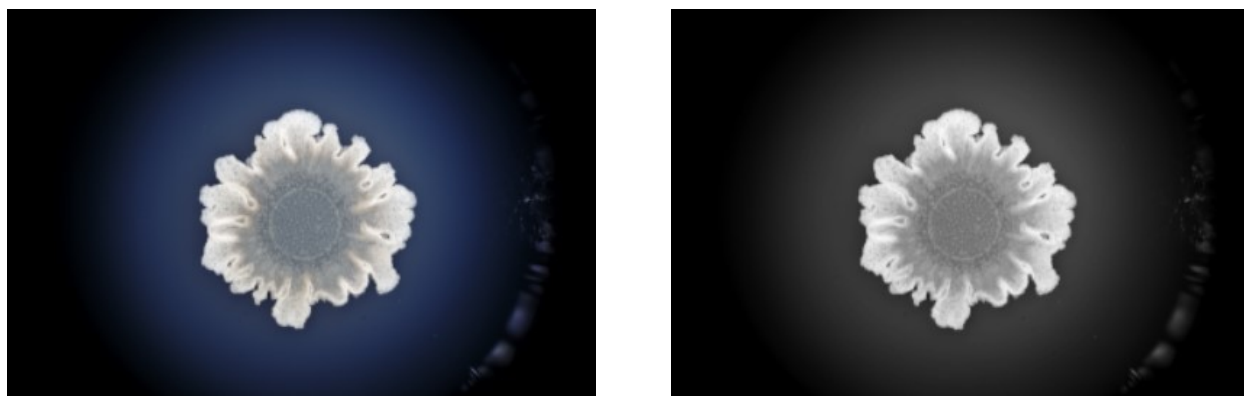
Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023

5. Biblioteka OpenCV

Zbog prethodno opisanih poteškoća koje su se pojavile prilikom korištenja alata BiofilmQ, u nastavku rada napravljena je vlastita programska implementacija za segmentaciju slika biofilma i određivanja parametara poput površine biofilma i vanjskog opsega biofilma. Korišteni su programski jezik Python i biblioteka OpenCV. OpenCV je biblioteka otvorenog koda koja uključuje velik broj algoritama iz područja računalnog vida, a napisana je u programskom jeziku C++ [6]. U nastavku je ukratko opisana implementacija za segmentaciju slika biofilma koja je napravljena korištenjem ove biblioteke, a cjeloviti kod može se pronaći u obliku Jupyter bilježnice na GitLab-u preko poveznice koja je navedena u literaturi [7].

Prvi korak je učitavanje slike i pretvorba u tzv. grayscale oblik. Slike biofilmova izvorno su kodirane u BGR formatu, na što treba obratiti pozornost prilikom konverzije. Za konverziju se koristi funkcija `cvtColor`, koja kao prvi argument prima izvornu sliku, a kao drugi argument format pretvorbe, primjerice:

- `COLOR_BGR2RGB`
- `COLOR_RGB2GRAY`
- `COLOR_BGR2GRAY`



Slika 6 Pretvorba slike biofilma u grayscale oblik

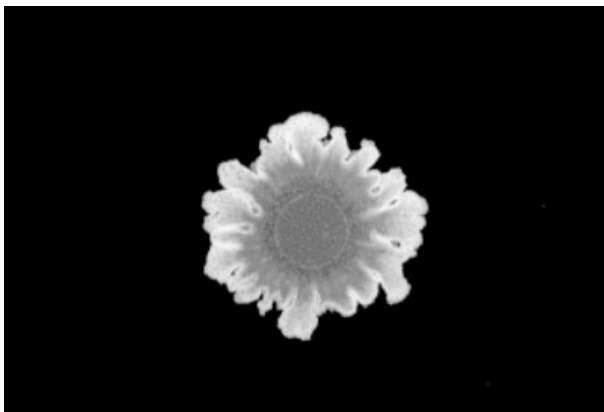
Sljedeći korak je primjena Otsu metode za razdvajanje piksela pozadine i objekta, odnosno cilj je detekcija točne površine koju zauzima biofilm. Za to se koristi funkcija `threshold`. Rezultat je prikazan na slici ispod.

Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023



Slika 7 Primjena praga korištenjem Otsu metode

U gornjoj slici svim pikselima koji pripadaju pozadini vrijednost je postavljena na 0 (crna boja), dok je svim pikselima koji pripadaju biofilmu vrijednost postavljena na 255 (bijela boja). Može se reći da se na gornjoj slici nalazi maska segmentiranog objekta, a segmentirani objekt može se dobiti primjenom operacije AND nad pikselima maske i izvorne slike.



Slika 8 Segmentirani biofilm

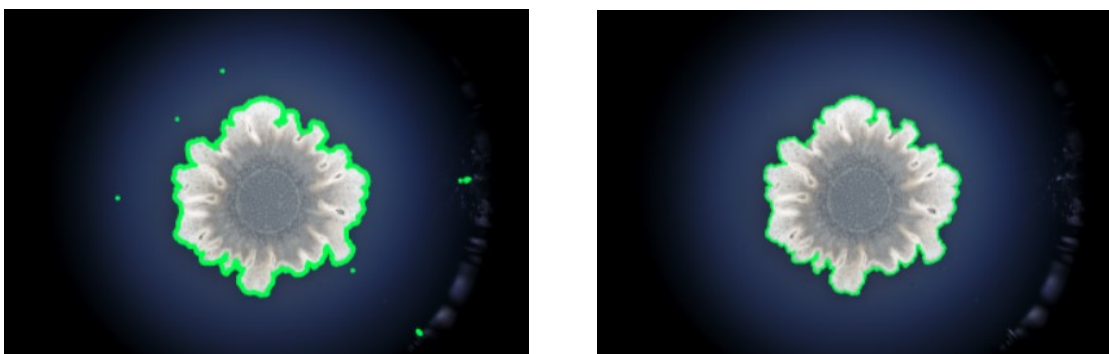
Sljedeći korak je računanje parametara segmentiranog biofilma. U ovome se radu računaju površina koju zauzima biofilm te duljina krivulje koja zatvara biofilm, odnosno duljina vanjske konture. Za određivanje kontura koristi se funkcija findContours. Funkcija kao argumente prima izvornu sliku na kojoj je potrebno pronaći konture te metode koje se koriste za određivanje hijerarhijske organizacije kontura, odnosno određivanje koje se od pronađenih kontura vraćaju u rezultatu te za aproksimaciju konture. Više o argumentima koje koristi ova funkcija može se pronaći u službenoj dokumentaciji [6].

Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023

Ovdje se koriste sljedeće metode:

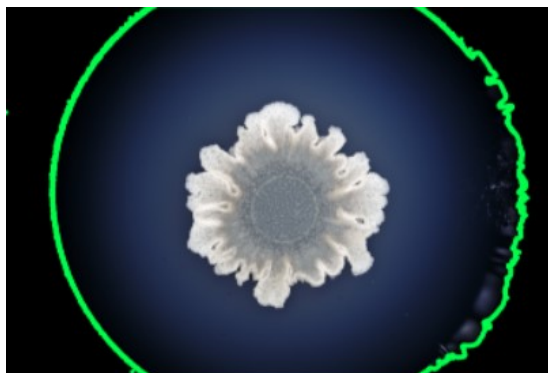
- RETR_EXTERNAL – u rezultatu se vraćaju samo vanjske konture (cilj je pronaći vanjsku konturu biofilma)
- CHAIN_APPROX_NONE – u rezultatu se vraćaju sve točke koje čine konturu, odnosno nema aproksimacije (cilj je dobiti što točniji rezultat s obzirom da biofilm sadrži puno zakrivljenih linija)

Funkcija findContours kao rezultat općenito vraća polje od više pronađenih kontura. Neke od tih kontura mogu se odnositi na vrlo male objekte u slici, poput različitih praznina unutar biofilma i takve konture treba ignorirati. Drugim riječima, potrebno je proći kroz sve vraćene konture i pronaći onu koja je najveće duljine. Upravo ta kontura odnosi se na cijeli biofilm.



Slika 9 Odabir konture najveće duljine

Iako su gornje konture prikazane na izvornim slikama u boji, postupak pronalaženja kontura mora se provesti nad slikom koja je pretvorena u sivi format (grayscale) te segmentirana. Ukoliko se postupak provodi nad nesegmentiranom slikom, dobivaju se nepredvidljivi rezultati, a razlog leži u svjetlu mikroskopa koje stvara krug oko biofilma i koje algoritam prepoznaje kao samostalni objekt na slici, što se može vidjeti ispod.



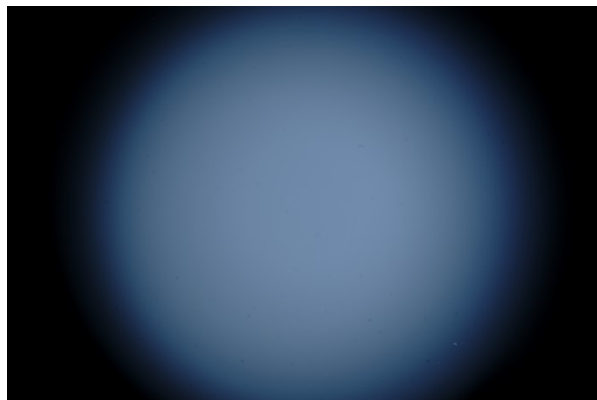
Slika 10 Problemi kod određivanja kontura

Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023

Nakon što su uspješno određene konture biofilma, na temelju njih se može izračunati površina koju biofilm zauzima, kao i duljina same konture. Za to se koristi funkcija `contourArea`, koja u pozadini koristi tzv. Greenovu formulu i integrale, te funkcija `arcLength` koja računa duljinu krivulje.

Prethodno je spomenuto kako se kod određivanja kontura može pojaviti problem da algoritam daje nepredvidljive rezultate, odnosno detektira svjetlosni krug mikroskopa kao zaseban objekt umjesto biofilma i to se može riješiti tako da se slike prije određivanja kontura segmentiraju. Međutim, ovaj se problem pojavljuje i kod samog postupka segmentacije i to u sljedećim situacijama:

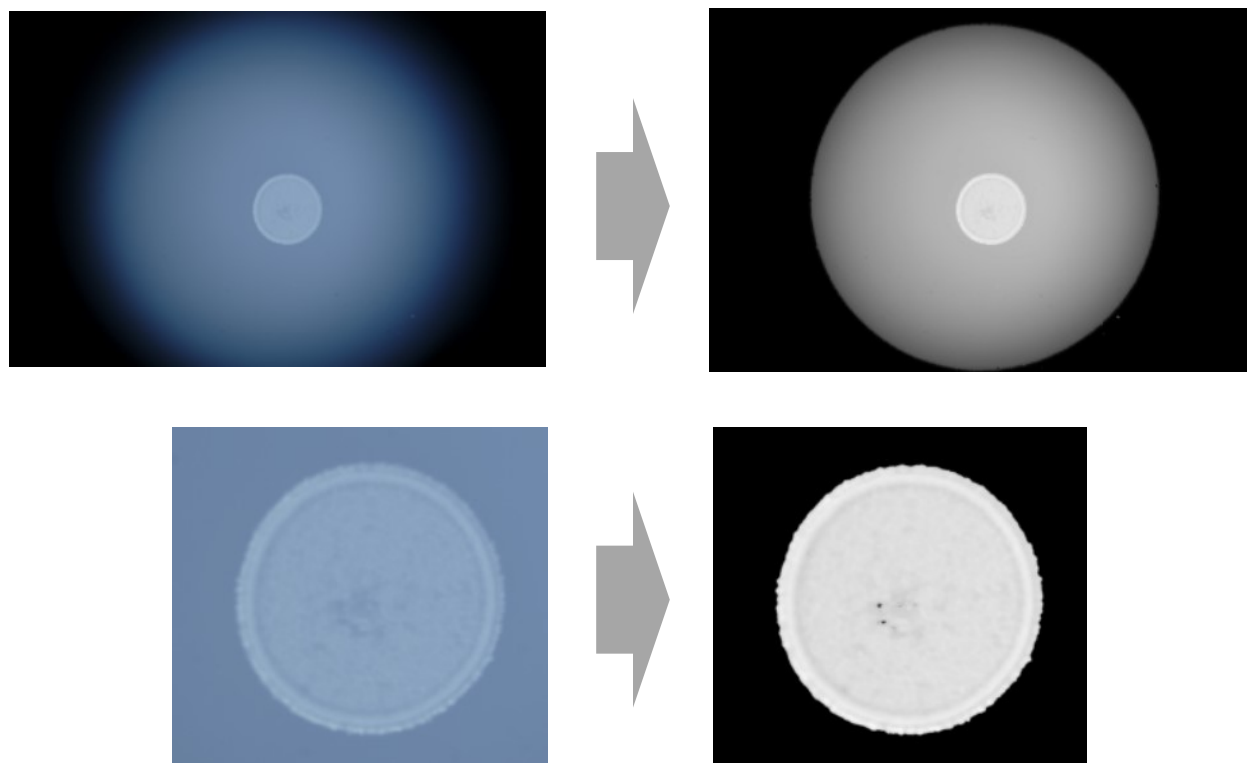
- u početnim trenucima razvoja biofilm nije dovoljno vidljiv da bi ga algoritam prepoznao kao zaseban objekt, već detektira samo svjetlosni krug mikroskopa
 - ovaj se problem može riješiti tako da se jednostavno ignoriraju rezultati dobiveni na slikama koje predstavljaju takve trenutke



Slika 11 Primjer slike na kojoj biofilm nije dovoljno vidljiv

- u ranim fazama razvoja biofilm postaje vidljiv, međutim razlika u intenzitetima piksela biofilma i područja koje predstavlja svjetlo mikroskopa je takva da algoritam ponovno prepoznaje svjetlosni krug kao zaseban objekt
 - ovaj se problem može riješiti obrezivanjem slike pri čemu se uklanja crna pozadina, a svjetlosni krug postaje nova pozadina
 - primjer rezultata segmentiranja dobivenih prije i nakon obrezivanja prikazan je na slikama ispod

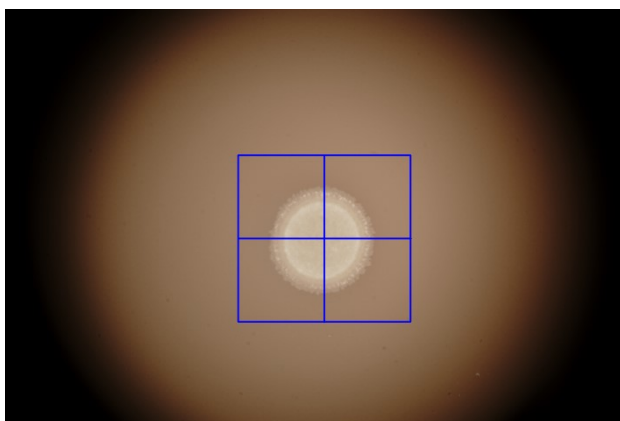
Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023



Slika 12 Rezultati segmentiranja prije i nakon obrezivanja

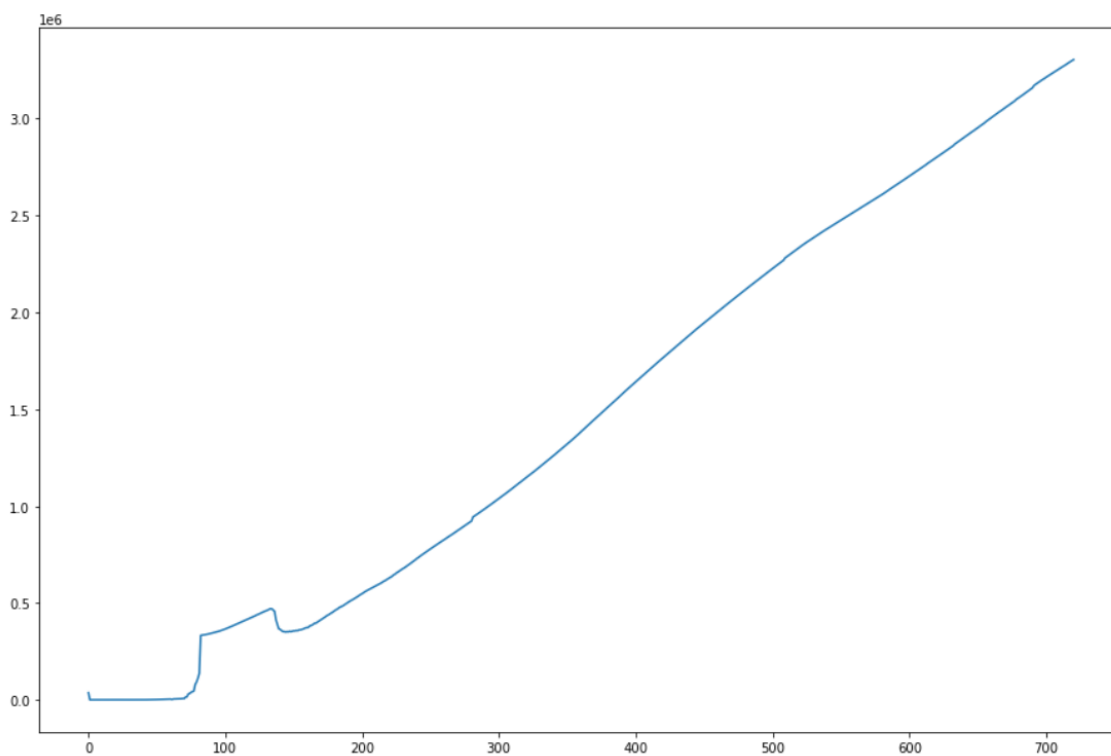
Očito je da u ranim fazama razvoja biofilma slike treba obrezati kako bi se dobili zadovoljavajući rezultati segmentacije, međutim teško je ručno odrediti granicu nakon koje više nije potrebno obrezivati slike. Također, s obzirom da se u skupu nalazi 720 slika biofilma nije nimalo efikasno ni svaku sliku zasebno obrezivati. Iz tih je razloga osmišljen algoritam koji od korisnika traži da ručno odabere dimenzije na koje će se slika obrezati za unaprijed zadan broj tzv. reprezentativnih slika biofilma koje su uzete iz skupa slika tako da vremenski budu jednako razmaknute. U kodu koji se nalazi na GitLabu broj reprezentativnih slika je inicijalno postavljen na 5, što znači da korisnik mora ručno odabrati obrezivanje za 5 reprezentativnih slika koristeći grafičko sučelje koje je prikazano na slici ispod. Dimenzije za obrezivanje svih preostalih slika u skupu dobivaju se interpolacijom dimenzija koje je korisnik ručno odabrao za reprezentativne slike, tako da se dimenzije obrezivanja polako povećavaju za fiksni iznos.

Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023



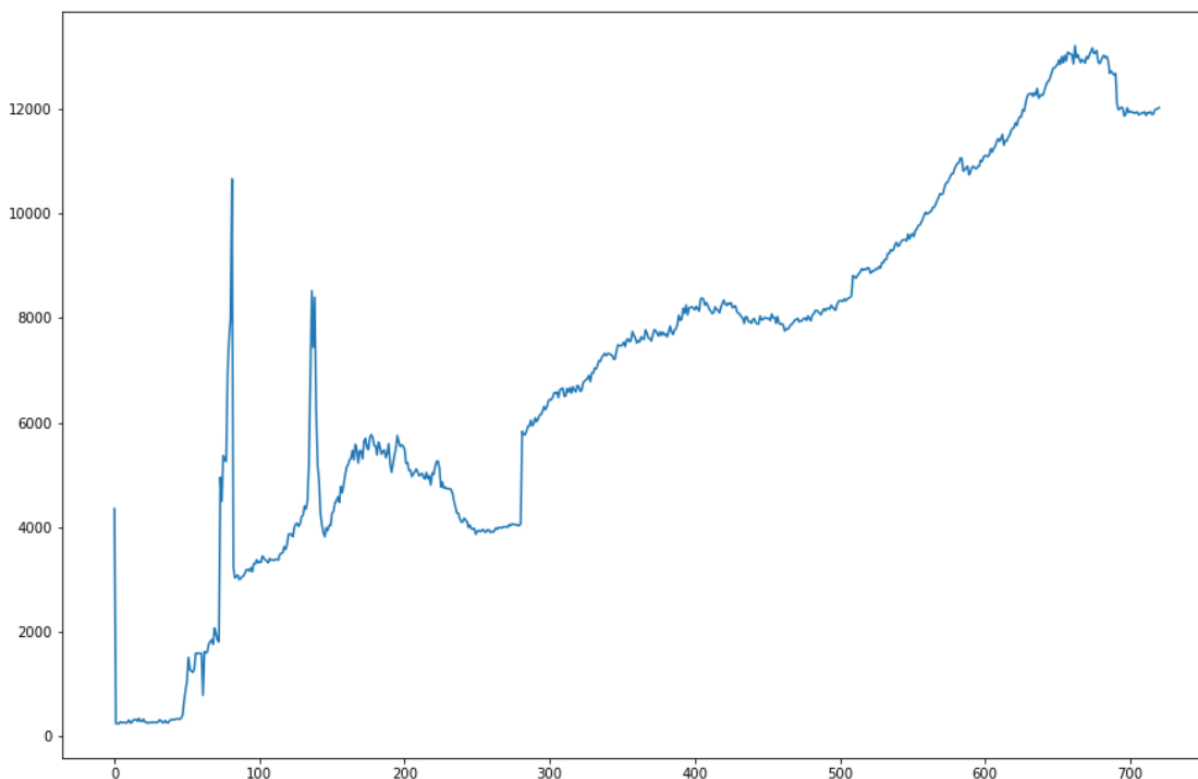
Slika 13 Odabir dimenzija na koje će se slika obrezati

Za svaku sliku se na prethodno opisani način odrede dimenzije obrezivanja, slika se zatim segmentira te se računaju vrijednosti površine biofilma te duljine konture koju zatvara biofilm. Na donjim se grafovima nalaze ove vrijednosti izračunate za svih 720 slika u skupu. Na x-osi se nalazi redni broj slike koji ujedno predstavlja trenutak u vremenu u kojem je slika nastala, a na y-osi su konkretne vrijednosti površine, odnosno duljine konture.



Slika 14 Promjena površine biofilma

Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023



Slika 15 Promjena duljine konture koju zatvara biofilm

Na oba grafa se može primijetiti prethodno spomenuti problem gdje se u početnim fazama razvoja biofilma dobivaju nepredvidljivi rezultati upravo zato što biofilm nije dovoljno vidljiv da bi ga algoritam prepoznao, stoga se te vrijednosti trebaju ignorirati. Može se primijetiti kako se površina biofilma povećava gotovo linearno. Što se tiče promjene u vrijednostima duljine konture, mogu se primijetiti faze bržeg i sporijeg rasta što se može povezati s razvojem zakrivljenih kanalića na rubu biofilma. Skokovi u vrijednostima duljine konture mogu se povezati s nepreciznošću algoritma za detekciju kontura.

Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023

6. Zaključak i nastavak rada

Prethodno opisani algoritmi biblioteke OpenCV vrlo su jednostavni i brzi tijekom izvršavanja, međutim ne daju potpuno precizne rezultate. Veliko ograničenje je segmentacija biofilma tijekom ranih faza razvoja u kojima on nije dovoljno vidljiv, odnosno intenziteti piksela nisu dovoljno izraženi zbog čega algoritam daje nepredvidljive rezultate. Algoritam koji računa duljinu konture koju zatvara biofilm ima određena odstupanja koja su vidljiva na prethodno prikazanom grafu. Uspješnija alternativa ovim algoritmima mogla bi biti implementacija konvolucijske neuronske mreže. Takav model nudi veću ekspresivnost, ali i bolje mogućnosti detekcije nejasnih ili nedovoljno izraženih objekata na slici. Dodatna mogućnost koja nije spomenuta u ovom radu je određivanje debljine biofilma na temelju intenziteta piksela, pri čemu veći intenziteti označavaju deblji sloj biofilma. Na ovaj se način može izračunati brzina povećavanja ili smanjivanja debljine sloja za različite dijelove slike. Očekivano ponašanje je da se sredina biofilma s vremenom stanjuje, dok se uz rub stvara deblji sloj bakterija. Dodatno, moguće je implementirati neuronsku mrežu koja bi obavljala zadatak detekcije pojedinih dijelova samog biofilma. To mogu biti upravo prethodno spomenuti dijelovi, praznina u sredini biofilma te prsten koji se stvara uz rub biofilma.

Analiza slika biofilmova	Verzija: <2.0>
Rezultati projekta	Datum: 17/01/2023

7. Literatura i ostale poveznice

- [1] S. Pradeep and P. E. Arratia, "To biofilm or not to biofilm," *Elife*, vol. 11, Jul. 2022, doi: 10.7554/eLife.80891.
- [2] M. H. Muhammad *et al.*, "Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches," *Front Microbiol*, vol. 11, May 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.00928.
- [3] M. Futo *et al.*, "Embryo-Like Features in Developing *Bacillus subtilis* Biofilms," *Mol Biol Evol*, vol. 38, no. 1, pp. 31–47, Jan. 2021, doi: 10.1093/molbev/msaa217.
- [4] M. Futo *et al.*, "A novel time-lapse imaging method for studying developing bacterial biofilms," *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, p. 21120, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-24431-y.
- [5] R. Hartmann *et al.*, "Quantitative image analysis of microbial communities with BiofilmQ," *Nat Microbiol*, vol. 6, no. 2, pp. 151–156, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41564-020-00817-4.
- [6] Dokumentacija biblioteke OpenCV
<https://docs.opencv.org/4.x/>
- [7] Poveznica na projekt na GitLab-u
<https://gitlab.com/SlonFurki/analiza-slika-biofilmova>