

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Tytuł rozprawy: Zastosowanie analizy statystycznej do identyfikacji bakterii na podstawie widm dyfrakcyjnych kolonii bakterii

Autor rozprawy: mgr inż. Agnieszka Suchwałko

Promotor: prof. n. tech. dr hab. n. fiz. inż. lek. med. Halina Podbielska

Bakterie należą do organizmów powszechnie występujących w przyrodzie. Ich zdolność do przetrwania w najtrudniejszych warunkach i możliwości adaptacji stanowią wyzwanie w obszarze mikrobiologii. Identyfikacja i analiza oporności bakterii jest istotnym problemem w zwalczaniu patogenów. Z drugiej strony, badania związane z pozytywnym wpływem bakterii pozwalają na ich wykorzystanie w różnych obszarach naszego życia.

Recenzowana rozprawa doktorska prezentuje metodę identyfikacji bakterii. Wykorzystując opracowany w zespole układ optyczny, Doktorantka zaproponowała metodologię wydzielenia wektora cech z zarejestrowanych widm dyfrakcyjnych kolonii bakterii, redukcję jego wymiaru oraz wykorzystanie w procesie klasyfikacji kolonii bakterii. Podjętą w rozprawie tematykę uważam za w pełni uzasadnioną, interesującą i aktualną dla współczesnych prac z dyscypliny Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej.

Autorka sformułowała 7 tez pracy.

1. Uwzględnienie w procesie identyfikacji naturalnego podziału widm dyfrakcyjnych na obszary oraz średnicy widm ma istotny wpływ na możliwości identyfikacji bakterii.
2. Wyznaczenie na podstawie wartości pikseli właściwych cech liczbowych uwzględniających charakterystyczną teksturę i morfologię zarejestrowanych widm dyfrakcyjnych Fresnela kolonii bakterii, zapewnia optymalne wykorzystanie informacji przez nie niesionej.
3. Wybór odpowiednich cech liczbowych spośród cech ekstrahowanych z widm dyfrakcyjnych Fresnela kolonii bakterii pozwala na budowę optymalnych modeli klasyfikacyjnych.

4. Zastosowanie normalizacji zarejestrowanych widm dyfrakcyjnych Fresnela kolonii bakterii zapewnia ich dokładniejsze porównanie między sobą, co prowadzi do zmniejszenia wartości błędu identyfikacji.
5. Metoda cechuje się dokładnością, która umożliwia identyfikację na poziomie serowarów bakteryjnych.
6. Wprowadzenie nieznaczących modyfikacji układu optycznego zapewnia powtarzalność pomiarów niezależnie od osoby wykonującej rejestrację z zaledwie nieznacznym pogorszeniem otrzymanych wyników.
7. Zastosowanie właściwych sposobów i algorytmów klasyfikacji i identyfikacji oraz weryfikacji otrzymanych wyników pozwala na uzyskanie rezultatu identyfikacji bakterii z najmniejszym możliwym błędem.

Rozprawa doktorska jest napisana w formie autoreferatu na podstawie publikacji. Monotematyczny spis publikacji, stanowiący podstawę do ubiegania się o stopień doktora nauk technicznych obejmuje jeden rozdział w książce anglojęzycznej wydanej przez Formatex Research Center, Hiszpania, dwie publikacje w czasopiśmie *Optics Express* wyróżnionym na liście filadelfijskiej, trzech publikacjach zamieszczonych w materiałach konferencji międzynarodowych oraz zgłoszenie patentowe. Autoreferat obejmuje 75 stron i podzielony został na kilka nienumerowanych rozdziałów.

Rozdział pierwszy zawiera bogaty przegląd literatury w obszarze identyfikacji bakterii. Po wstępnym wskazaniu wybranych publikacji dotyczących bakterii i ich występowania w przyrodzie, rozdział zawiera odniesienia do literatury opisującej identyfikację bakterii w laboratoriach mikrobiologicznych, sposoby przygotowania próbek do posiewu i hodowli. Wskazuje m.in. techniki biochemiczne, testy diagnostyczne, metody molekularne, immunologiczne, spektrometrię mas. Szczególną uwagę zwraca Doktorantka na metody optoelektryczne bazujące na wykorzystaniu światła jako nośnika informacji. Obok technik fluorescencyjnych oraz spektroskopowych, analizowane jest wykorzystanie dyfrakcji światła na koloniach bakterii hodowanych na podłożach stałych. Ta ostatnia metoda wykorzystana została w badaniach realizowanych w ramach recenzowanej rozprawy doktorskiej. Układ optyczny opracowany i skonstruowany został w zespole promotora rozprawy. Opracowano model fizyczny transformacji światła na koloniach bakterii i wykazano, że kolonie różnych bakterii generują unikalne widma dyfrakcyjne Fresnela odzwierciedlające ich własności amplitudowo-fazowe.

Rozdział drugi przedstawia cel badań, 7 tez pracy oraz 11 zadań badawczych. Uwagi dotyczące tej części zawarte są w dalszej części recenzji.

Rozdział trzeci omawia zrealizowane prace badawcze w podziale na 6 etapów. Każdy z etapów przedstawiony został w publikacjach monotematycznych. Opis kolejnych etapów pokazuje ewolucję metodologii, zmierzającej do opracowania identyfikatora kolonii bakterii.

Etap I wykazał możliwość wydzielenia z widm dyfrakcyjnych Fresnela kolonii bakterii danych umożliwiających identyfikację bakterii. Dokonano eksperymentalnego podziału na 3, 5, i 10 obszarów, a wyznaczone w każdym obszarze wartości średnie oraz wariancje zwizualizowano wykorzystując metodę elementów skończonych (PCA – Principal Component Analysis).

W etapie II badawczym zwiększono liczbę gatunków bakterii z 4 do 7. Wnioski z uzyskanych wyników badań wskazały do konieczność zastosowania bardziej zaawansowanej analizy statystycznej.

W etapie III wprowadzono normalizację obrazu widma dyfrakcyjnego oraz przetestowano dwa kolejne klasyfikatory. Wybrano kwadratową analizę dyskryminacyjną (QDA) oraz maszynę wektorów wspierających (SVM). W analizie porównawczej wykorzystano wskaźniki czułości, specyficzności oraz błąd klasyfikacji.

Na etapie IV zaproponowano dodatkowo trzeci i czwarty moment statystyczny (tj. skośność i kurtozę) oraz jednorodność i entropię.

Etap V podsumowuje dotychczasowe wyniki oraz proponuje porównanie z metodą identyfikacji bakterii opracowaną przez grupę badaczy w Stanach Zjednoczonych. Więcej szczegółów dot. tej części znajduje się w dalszej części recenzji.

Etap VI obejmuje optymalizację całej metody, poczynając od etapu przygotowania próbek, rejestracji widma oraz analizy danych. Widmo rejestrowano w 7 różnych odległościach pomiędzy próbkami znajdującymi się na szalce Petriego a obiektywem kamery rejestrującej widmo dyfrakcyjne, celem znalezienia najlepszego ustawienia. Dodano kolejną cechę (promień) określającą odległość pomiędzy środkiem a krawędzią widma. Zastosowano metodę losowania warstwowego oraz zrezygnowano z klasyfikatora LDA wykorzystując jedynie klasyfikatory QDA i SVM.

Kolejny rozdział (Dyskusja i wnioski) wskazuje na cechy opracowanej metody, spełniające wymogi techniki stosowanej komercyjnie.

Podsumowanie wskazuje na realizację postawionych celów rozprawy doktorskiej.

Obszerny Spis literatury zawiera 110 pozycji dobrze dobranych i wykorzystanych w badaniach, prowadzonych w ramach realizacji tematu badawczego.

Kolejne rozdziały rozprawy zawierają streszczenie napisane w języku polskim i angielskim oraz Curriculum Vitae Doktorantki.

Rozprawa zawiera elementy, które uznać można jako wkład Doktoranta w badania nad identyfikacją kolonii bakterii na podstawie analizy statystycznej widma dyfrakcyjnego. Zaliczam do nich:

1. Przeprowadzenie badań pilotażowych i opracowanie wstępnej metody analizy obrazów widma dyfrakcyjnego Fresnela. Wykorzystując proste narzędzia statystyczne Doktorantka uzyskała obiecujące wyniki, zachęcające do dalszej pracy badawczej w tym obszarze.
2. Stopniową modyfikację opracowanej metody, prowadzącej do poprawy wyników analizy widma i identyfikacji kolonii bakterii. Modyfikacja obejmowała dopasowanie odległości pomiędzy próbkami znajdującymi się na szalce Petriego a obiektywem kamery rejestrującej widmo dyfrakcyjne, zwiększenie liczby cech, redukcję wymiaru przestrzeni cech na podstawie rankingu, opracowanego w oparciu o błędy klasyfikacji QDA dla modeli zbudowanych z uwzględnieniem wszystkich cech z danego zestawu. Ostateczne badania wykazały, że najlepsze wyniki klasyfikacji uzyskano, wykorzystując maszynę wektorów podpierających.
3. Dbałość Doktorantki o komercjalizację opracowanej aplikacji. Opracowanie i przetestowanie docelowej metody, która umożliwi szybką i dokładną identyfikację kolonii bakterii. W ramach przygotowania do komercjalizacji przeprowadzono testy badające wpływ przesunięcia wiązki światła oświetlającej kolonię bakterii względem środka kolonii. Badania te są konieczne do oprogramowania urządzenia kontrolującego przesuw szalki Petriego w procesie centralizacji kolonii bakterii i wiązki światła.

Lektura rozprawy nasuwa także pewne uwagi o charakterze polemicznym lub dyskusyjnym, które nie wpływają na pozytywną ocenę całości pracy badawczej wykonanej przez Doktorantkę i przedstawionej w recenzowanej rozprawie doktorskiej.

1. Doktorantka sformułowała 7 tez swojej rozprawy doktorskiej. Zabrakło natomiast tezy, która odzwierciedlałaby istotę problemu badawczego. Zaproponowane tezy są zbyt szczegółowe, a niekiedy wręcz oczywiste. Teza 2: „Wyznaczenie na podstawie wartości pikseli właściwych cech liczbowych” czyli wektor cech „uwzględniających charakterystyczną teksturę i morfologię zarejestrowanych widm dyfrakcyjnych Fresnela kolonii bakterii, zapewnia optymalne wykorzystanie informacji przez nie niesionej”. Zdanie nasuwa dwa pytania: (1) do czego odnosi się fragment „informacji przez nie niesionej” (chodzi o bakterie czy piksele), (2) optymalne wykorzystanie informacji – brak celu i kryterium optymalizacji. Teza 3: „Wybór odpowiednich cech liczbowych spośród cech ekstrahowanych” (czyli redukcja wymiaru przestrzeni cech) „z widm dyfrakcyjnych Fresnela kolonii bakterii pozwala na budowę optymalnych modeli klasyfikacyjnych”. Co to są optymalne modele klasyfikacyjne? Teza 4 dotycząca normalizacji jest oczywista. Porównanie obrazów rejestrowanych w różnych warunkach wymaga ich normalizacji. Teza 6 dot. modyfikacji układu optycznego, zgodnie z oświadczeniami nie wchodzi z zakres dorobku Doktorantki. Teza 7: „Zastosowanie właściwych sposobów i algorytmów klasyfikacji i identyfikacji oraz weryfikacji otrzymanych wyników pozwala na uzyskanie rezultatu identyfikacji bakterii z najmniejszym możliwym błędem”. Definicja klasyfikacji, zawarta w przypisach, jest

błędna. Wydzielenie cech nie jest etapem klasyfikacji. Definicja identyfikacji podana w przypisach jest klasyfikacją. Co to znaczy najmniejszy możliwy błąd? Ponieważ pojęcie to jest na tym etapie nieokreślone, teza ta także jest truizmem.

2. Doktorantka porównuje wyniki swoich badań z metodą identyfikacji bakterii opracowaną w Stanach Zjednoczonych. Różne szczepy bakterii wykorzystane w obu eksperymentach budzą pewną wątpliwość co do zasadności porównania obu metod.
3. Skoro środek i krawędzie wyznaczane są interaktywnie, nasuwają się dwa pytania: (1) dlaczego nie automatyczne i (2) jaka jest powtarzalność ich wyznaczania dla jednego operatora i pomiędzy operatorami.
4. W rozprawie brakło odniesienia do tradycyjnych metod identyfikacji. Jaki jest błąd identyfikacji wykonywany metodami tradycyjnymi? Jak określono grupę kontrolną wykorzystaną do testowania aplikacji?

Podsumowanie

Mgr inż. Agnieszka Suchwałko posiada odpowiednią wiedzę z zakresu diagnostyki mikrobiologicznej oraz metod analizy i klasyfikacji danych. Przedstawiona do recenzji rozprawa zawiera sformułowany i rozwiązany problem badawczy oraz stanowi ciekawy wkład w dziedzinę przetwarzania danych biomedycznych zwłaszcza w zakresie analizy danych uzyskanych na podstawie rejestracji widm dyfrakcyjnych. Zawarta w pracy metodologia badań doprowadziła do udowodnienia tez pracy oraz realizacji postawionego celu jakim było opracowanie metody analizy statystycznej cech, wydzielonych z widm dyfrakcyjnych Fresnela kolonii bakterii, umożliwiających identyfikację bakterii. Sformułowany problem badawczy i jego realizacja skłaniają do postawienia wniosku o dopuszczenie mgr inż. Agnieszkę Suchwałko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ca. NieK