



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY

A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV TEORETICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ ELEKTROTECHNIKY

DEPARTMENT OF THEORETICAL AND EXPERIMENTAL ELECTRICAL ENGINEERING

NÁVRH OPTOVLÁKNOVÉHO BIOSENZORU SE SPEKTRÁLNÍ ANALÝZOU V BLÍZKÉ INFRAČERVENÉ OBLASTI

DESIGN OF FIBER-OPTIC BIOSENSOR WITH NEAR-INFRARED SPECTRAL ANALYSIS.

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Pavel Křepelka

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Jan Mikulka, Ph.D.

BRNO 2019

Abstrakt

Práce se zabývá měřením a interpretací NIR spekter bakteriálních buněk a výzkumem biosenzorických technik, využívající tuto analytickou techniku. Je zde rozebrán současný stav vědění v oblasti NIR spektroskopie v mikrobiologii a technologie optovláknových biosenzorů. Z rozboru vyplývá, že NIR je vhodnou technikou pro přímou molekulární analýzu bakterií, která však trpí nízkou citlivostí a nedostatečnou interpretací bakteriálních spekter. V další části práce je uveden teoretický rozbor technik spektrální analýzy a technologie optovláknových senzorů. V praktické části práce jsou představeny experimenty a výzkum vedoucí k odstranění těchto nevýhod NIR spektroskopie v mikrobiologii. Je zde shrnuta řada experimentů sloužící k interpretaci NIR spekter bakterií a návrh optovláknového senzoru pro zvýšení citlivosti této techniky. V této práci byly určeny a částečně interpretovány spektrální regiony důležité pro identifikaci bakteriálních kmenů a navržen senzor pro analýzu bakterií, který je schopný klasifikovat kmeny na základě 10^5 zachycených buněk. Tím byly splněny cíle této práce.

Klíčová slova

Infračervená spektroskopie, spektroskopie, bakterie, biosenzor, identifikace, klasifikace, evanescentní pole, kavitní zesílení

Abstract

This thesis deals with a measurement and interpretation of NIR spectra of bacterial cells and design of biosensor using this analytical technique. In the first chapter, there is introduction of current state of knowledge in the field of NIR spectroscopy in microbiology and technology of fiber optic biosensors. The summary of this chapter shows that NIR is a suitable technique for direct molecular analysis of bacteria, but it suffers from low sensitivity and insufficient interpretation of bacterial spectra. In the next part of the thesis, there is a theoretical background of spectral analysis techniques and technology of fiber optic sensors. In the practical part of this work, there is suggested the elimination of disadvantages of NIR spectroscopy in microbiology by a series of experiments used for interpretation of NIR spectra of bacteria and design of fiber optic sensor to increase sensitivity of this technique. In this work, spectral regions important for the identification of bacterial strains were determined and partially interpreted and the sensor for bacterial analysis capable of classifying strains based on 10^5 captured cells was designed. Therefore, the objectives of this work were fulfilled.

Keywords

Infrared spectroscopy, spectroscopy, bacteria, biosensor, identification, classification, evanescent field, cavity amplification

Bibliografická citace:

KŘEPELKA, P. Návrh optovláknového biosenzoru se spektrální analýzou v blízké infračervené oblasti. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2019. 129s. Vedoucí práce: doc. Ing. Jan Mikulka, Ph.D.

Prohlášení

„Prohlašuji, že svou závěrečnou práci na téma „Návrh optovláknového biosenzoru se spektrální analýzou v blízké infračervené oblasti“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího dizertační práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené závěrečné práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této závěrečné práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....
podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu dizertační práce doc. Janu Mikulkovi, Ph.D. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé dizertační práce.

Dále děkuji prof. Fernandovi Perez-Rodriguezovi a doc. Petrovi Drexlerovi, Ph.D. za pomoc při zpracování mé dizertační práce.

V Brně dne **1. srpna 2019**

.....
podpis autora(-ky)

Obsah

1	Úvod	14
2	Současný stav problematiky.....	15
2.1	NIR spektroskopie v mikrobiologii.....	15
2.2	Optovláknové biosenzory.....	30
2.3	Intenzitně založená kavitně zesílená absorpční spektroskopie (CEAS).....	35
3	Teoretický rozbor	36
3.1	Spektroskopie blízké infračervené oblasti v mikrobiologii	36
3.2	NIR obraz bakteriální buňky	42
3.3	Fresnelovy rovnice pro výpočet absorbovaného evanescentního pole	46
3.4	Modelování evanescentního multimódového optovláknového senzoru ...	48
3.5	Intenzitně založená kavitně zesílená spektroskopie (CEAS).....	56
3.6	Shrnutí	59
4	Cíle práce.....	61
5	Experimentální měření, interpretace a klasifikace NIR spekter bakterií	62
6	Návrh širokopásmového optovláknového biosenzoru s evanescentním snímáním a kavitním zesílením.....	96
7	Závěr	118
8	Literatura.....	120
	Seznam symbolů, veličin a zkratk.....	127
	Seznam příloh.....	129
1	Příloha č. 1: Modely evanescentního multimódového optovláknového senzoru	
1		
1.1	Model evanescentního multimódového optovláknového senzoru podle Xuye [98].....	1
1.2	Model evanescentního multimódového optovláknového senzoru podle Chena [101], [102]	5
1.3	Model evanescentního multimódového optovláknového senzoru podle Mignani [106].....	14
2	Příloha č. 2: Matematické a statické zpracování NIR spekter	1
2.1	Vyhlazování.....	1
2.2	Odstranění trendu	2
2.3	Derivace.....	2
2.4	Korekce rozptylu světla.....	3
2.5	Analýza hlavních komponent (PCA).....	4
2.6	Metoda částečných nejmenších čtverců (PLS)	5
2.7	Validace modelů v NIR spektroskopii.....	7

Seznam obrázků

Obrázek 1 – PCA výstup NIR spekter různých bakteriálních kmenů [2].....	17
Obrázek 2 – Původní (horní), normalizované (prostřední) a derivované (dolní) spektra <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis a <i>Bacillus cereus</i> [9].....	20
Obrázek 3 – Proces kontaminace kuřecích filet zobrazený pomocí výstupu PLS modelu. Výsledky ukazují predikovanou hodnotu koncentrace <i>Enterobacteriaceae</i> (log CFU/g). Převzato z [10].	21
Obrázek 4 - Sestava přístroje pro spektrální zobrazování [10]	21
Obrázek 5 – Druhá SG derivace spektra bakterií ve vodném roztoku podle Fernanda Cámara-Martose [12] a Dimitrise Alexandrakise [11].	24
Obrázek 6 - Prostor PCA skóre (vlevo, osy: PC1,PC2 – prostor skóre hlavních komponent) a PCA principiálních komponent spekter bakterií rozdílného Gramova barvení [14].....	25
Obrázek 7 – Typické NIR spektrum bakteriální suspenze [14].....	26
Obrázek 8 – Typické MIR spektrum 3 kmenů patogenních bakterií [19].	29
Obrázek 9 – Princip kolorimetrického senzoru amoniaku. Reakce plynu s barvivem zapříčiní změnu barvy barviva. Tato změna je vyhodnocena pomocí FOS [29].....	31
Obrázek 10 – Princip SPR senzoru podle Sciacca. Kovové nanočástice byly navázány na konec optického vlákna. Na povrch nanočástic je navázán analyt. SPR rezonanční frekvence závisí na indexu lomu analytu a projevuje se jako utlumená vlnová délka ve spektru odraženého světla [30].....	32
Obrázek 11 – FOS využívající FEWS podle K.Miyajima. Fluorescent (Cy5) je excitován pomocí evanescentní vlny a emitované světlo se pak odráží v optickém vlákne a je detekováno fotodiodou. Touto technikou byla detekována E.Coli v koncentracích 1000 buněk/mL [34].	33
Obrázek 12 – Principiální schéma senzoru založeného na „Whispering gallery modes“ podle S.Feaze. Touto technikou lze detekovat viry a další nanočástice. Světlo je navázáno do rezonátoru a poté do detektoru. Nepatrná změna indexu lomu na povrchu rezonátoru způsobí velkou změnu výstupního signálu [38].....	34
Obrázek 13 – Jednoduché experimentální zapojení IBBCEAS pro měření NO ₂ a NO ₃ . Experiment provedl E.Ventrillard-Courtillot a kol. [41].	36
Obrázek 14 – Spektrum 1% roztoku aspirinu ve vodě (a) a diferenční spektrum (odečet čisté vody) (b) [42].....	37
Obrázek 15 – Porovnání Gaussova (Gaussian), Lorentzova (Lorentzian) a Voightova (Voight) profilu pro modelování absorpčních peaků. Parametry funkce $A = 1$, $\sigma = 100$ a $\beta = 0,5$ Převzato z [45].	39
Obrázek 16 – NIR spektrum proteinu (žlutě) a dekomponované peaky [46].	40

Obrázek 17 – 2D synchronní (a) a asynchronní (b) konturní mapa IR spekter proteinu s pertrubací teploty [48].....	42
Obrázek 18 - Primární aminy.	44
Obrázek 19 - Molekula cysteinu.	44
Obrázek 20 - Struktura bakteriální buňky. Obrázek je převzat z [52].	45
Obrázek 21 – Poměr výkonů dopadajícího a odraženého paprsku v oblasti totálního vnitřního odrazu (TIR). Jde o výpočet rovnic 16 a 17. Výkon závisí na polarizaci (s – horní křivka, p – spodní křivka). Platí pro rozhraní mezi křemenem ($n_1=1,457$) a vzduchem ($n_2=1$) s extinkčním koeficientem $\kappa_2 = 0.1$	48
Obrázek 22 – Vysvětlení proměnných vystupující v rovnici 19. (a) Rovina šíření paprsku definovaná úhly γ a θ . (b) Boční pohled na rovinu šíření paprsku. (c) Vícenásobné Fresnelovi odrazy ve vlákne [53].....	50
Obrázek 23 – Povolená kombinace úhlů (θ a γ) pro vedení světla pomocí TIR. Povolené kombinace jsou znázorněny žlutě. $n_{co} = 1.432$, $n_{cl}=1.33$	52
Obrázek 24 – Závislost Fresnelova koeficientu odrazu na úhlu dopadu. Podmínky byly modelovány pro tyto podmínky: $\lambda = 980$ nm, $n_{co} = 1.432$, $n_{cl}=1.33$, $\alpha_2=10$	54
Obrázek 25 – Počet a vzdálenost mezi odrazy ve vlákne v závislosti na úhlu osvitu. Podmínky byly modelovány pro vlákno o průměru 105 μ m a azimutním úhlem osvitu 45 °.	55
Obrázek 26 – Přenos senzoru pro různé úhly osvitu. Absorpční koeficient vzorku: 1 (červená), 10 (modrá). Vlnová délka: 980 nm, Délka: 10 cm, Průměr: 105 μ m, Index lomu vzorku: 1.33.	56
Obrázek 27 – Citlivost na změnu absorpčního koeficientu vzorku na úhlu osvitu. Vlnová délka: 980 nm, Délka: 10 cm, Průměr: 105 μ m, Index lomu vzorku: 1.33... ..	56
Obrázek 28 – Principiální schéma CEAS. Vstupní světlo I_0 je uvězněno mezi zrcadly o odrazivosti R. Výstupní intenzita I_n je pak funkcí absorpce kavity a zrcadel.....	57
Obrázek 29 – Principiální schéma IBBCEAS [40].	59
Obrázek 30 – Porovnání citlivost transmisní spektroskopie a kavitních metod. Je vidět, že CEAS a CRDS jsou extrémně citlivé pro měření málo absorbujících vzorků s nízkým extinkčním koeficientem. Podmínky měření: $R = 0,99$, $d = 1$ mm, délka kavity = 1 m, modulační frekvence = 1 °MHz. CRDS a CEAS vykazují podobnou citlivost, CEAS je ale díky závislosti na fluktuaci zdroje světla méně přesná.	59
Obrázek 31 – Transmisní spektrum (vlevo) a prostor PCA skóre (vpravo) transmisních NIR spekter bakterií [62].....	64
Obrázek 32 – Predikční přesnost modelů (přesnost kalibrace). Nejsvětější je výsledek modelu PLS2-DA s kódováním příslušnosti, tmavší (uprostřed) jsou výsledky PLS-DA s „dummy“ kódováním, a nejtmavší Optimalizovaný PLS2-DA podle M.Barkera a W.Rayense [13] s ortogonální transformací [62].	65
Obrázek 33 – 1. PLS zátěžový vektor [62].	65

Obrázek 34 – Schéma nasazení UNS pro klasifikaci NIR spekter bakterií [62].	66
Obrázek 35 – Příprava dehydratovaných bakteriálních suspenzí [67].	68
Obrázek 36 – NIR spektrum bakteriální suspenze [67].	69
Obrázek 37 – Spektra dehydratovaných bakteriálních suspenzí na filtru ze skelných vláken [67].	69
Obrázek 38 – Naměřené NIR spektra bakterií [62].	76
Obrázek 39 – PCA (horní) a PLS2-DA (spodní) prostor skóre NIR spekter bakterií [62].	77
Obrázek 40 – Druhá derivace naměřených spekter s interpretací některých spektrálních oblastí. Vložený graf ukazuje váhový vektor PLS2-DA [62].	78
Obrázek 41 – Experimentální spektrum složené se superpozice šesti peaků [62].	79
Obrázek 42 – Vliv úrovně šumu na přesnost algoritmů [62].	81
Obrázek 43 – Druhá derivace spektra E.Coli (modrá) a proložené spektrum (červená) vypočítané pomocí DE [62].	83
Obrázek 44 - MIR spektrum bakteriálních vzorků. Po matematickém zpracování [88].	88
Obrázek 45 - NIR spektrum bakteriálních vzorků. Po matematickém zpracování [88].	89
Obrázek 46 - 2D korelační mapa mezi MIR-NIR spektry bakterií. Stupeň šedi ukazuje úroveň korelace [88].	90
Obrázek 47 - Korelace mezi NIR spekrem a MIR peakem interpretovaný jako vibrace Amidu I (1965-1) [88].	91
Obrázek 48 - Korelace mezi NIR spekrem a MIR peakem interpretovaný jako P=O valenční vibrace fosfolipidů (1263 cm ⁻¹) [88].	92
Obrázek 49 - Korelace mezi NIR spekrem a MIR peakem interpretovaný jako CH ₂ asymetrické valenční vibrace v mastných kyselinách (2924 cm ⁻¹) [88].	93
Obrázek 50 – Spektra bakteriálních vzorků použitých pro kalibraci klasifikačního modelu po matematickém zpracování (druhá derivace Savitzky-Golay, MSC) [88].	94
Obrázek 51 – Prostor PLS-DA skóre celého spektra (vlevo) a zkráceného spektra (vpravo) [88].	95
Obrázek 52 – Útlum InF ₃ vlákna (pravá osa, oranžová) a typické MIR spektrum bakteriální buňky (levá osa, modrá).	97
Obrázek 53 - Útlum SiO ₂ vlákna (pravá osa, oranžová) a typické NIR spektrum bakteriální buňky (levá osa, modrá).	97
Obrázek 54 – Index lomu vody (Teplota: 20 °C (červená), 30 °C (zelená)).	98
Obrázek 55 – Imaginární část indexu lomu vody.	99

Obrázek 56 – Relativní intenzita evanescentního pole. V grafu je naznačena tloušťka bakterie (860 nm). Efektivní index lomu se pak vypočítá z poměrů obsahů vytyčených křivkou.	100
Obrázek 57 – Závislost efektivního indexu lomu na tloušťce bakteriální buňky „t“ a činitele zaplnění „R“. Podmínky: $n_1 = 1.432$, $n_2 = 1.33$, $\theta = 70^\circ$, $\lambda = 980$ nm.	101
Obrázek 58 – Imaginární složka indexu lomu bakteriální buňky vypočítaná ze spektroskopických měření (Kubelka-Munkova aproximace).	101
Obrázek 59 - Přenos senzoru v záv. na vlnové délce. Bez vzorku (osa vlevo) a se vzorkem (osa vpravo).	102
Obrázek 60 – Přenos senzoru bez vzorku (modrá) a se vzorkem (červená). $t = 215$ nm, $R = 0,8$	103
Obrázek 61 – Reflektivita navrženého dielektrického zrcadla ($w_0 = 1550$ nm). Úhel osvitů: 0° (modrá), 70° (červená).	105
Obrázek 62 – Reflektivita navrženého složeného dielektrického zrcadla ($w_0 = 1550$ nm, $w_1 = 2100$ nm). Úhel osvitů: 0° (modrá), 70° (červená).	105
Obrázek 63 – Reflektivita navrženého zrcadla ($w_0 = 1550$ nm, $w_1 = 2100$ nm) pro všechny vlnové délky a úhly osvitů.	106
Obrázek 64 – Transmisivita optimalizovaného zrcadla ($w_0 = 1550$ nm, $w_1 = 2150$ nm). Úhel osvitů: $0^\circ - 10^\circ$	107
Obrázek 65 - Reflektivita optimalizovaného zrcadla ($w_0 = 1550$ nm, $w_1 = 2150$ nm). Úhel osvitů: $0^\circ - 10^\circ$	107
Obrázek 66 - Transmisivita optimalizovaného zrcadla ($w_0 = 1550$ nm, $w_1 = 2150$ nm). Úhel osvitů: $0^\circ - 10^\circ$. Rozhraní: vzduch – sklo.	108
Obrázek 67 – Přenos senzoru bez rozhraní a bez vzorku. Přenos ovlivňuje jen absorpce vody. Parametry modelu: Úhel osvitů: 80° , $L = 1$ cm, $a=52,5$ μ m, $n_{co}=1,457$, $n_{cl}=1,440$, $R = 0$, $t = 0$. Relativní transmise je malá, pro použití kavitní techniky musí být nejméně 99%.	109
Obrázek 68 – Relativní transmise senzoru. LEVÁ OSA: Přenos senzoru bez rozhraní (pouze bakterie na vzduchu). PRAVÁ OSA: Přenos senzoru s kavitou ($R=0,9999$, pouze bakterie na vzduchu). Parametry modelu: Úhel osvitů: 80° , $L = 1$ cm, $a=52,5$ μ m, $n_{co}=1,457$, $n_{cl}=1,440$, $R = 0,8$, $t = 215$ nm. Relativní změna transmise po aplikaci kavity se několikanásobně zvýší.	109
Obrázek 69 – Vysvětlení k maticové analýze fokusace světla.	110
Obrázek 70 - Přenos senzoru při kolimovaném (modrá) a fokusovaném (červená) osvitů. Fokusační čočka: $f = 100$ mm, $D = 25$ mm.	111
Obrázek 71 – Citlivost senzoru v závislosti na úhlu osvitů fokusovaným světlem ($f = 15$ mm).	113
Obrázek 72 - Realizace modelovaného biosenzoru (části výkresu vycházejí z technické dokumentace Thorlabs Inc.).	115

Obrázek 73 – Výstupní signál modelu zatížený šumem (červená) a bez šumu (modrá). Parametry modelu: Úhel osvitu: 65 °, Fokusační zrcadlo $f = 15$ mm, $NA = 0,36$, Délka $L = 5$ mm, Průměr vlákna $d = 100$ μm , Index lomu InF_3 , Prostředí senzoru: vzduch, Zaplněnost $R = 0,7$, Tloušťka: $t = 215$ nm, Vstupní výkon: 1 mW.	115
Obrázek 74 - Modelovaný výstupní výkon navrženého biosenzoru pro všechny předložené kmeny včetně šumu na detektoru (znázorněny různými barvami). Spektrum bylo derivováno 3. SG derivací.....	116
Obrázek 75 - PLS2-DA prostor skóre. Klasifikátor byl kalibrován na datech z modelovaného biosenzoru. Kmeny bakterií jsou znázorněny různými barvami. .	117
Obrázek 76 – Geometrie navázání světla do optického vlákna.....	2
Obrázek 77 – Počet módů v multimódovém vlákne.	3
Obrázek 78 – Rozložení výkonu ve vlákne podle Xuyue [98]. Obrázek ukazuje pokles výkonu ve vlákne absorbovaný evanescentním polem. Parametry modelu: $\lambda = 980$ nm, $n_1 = 1.432$, $n_2=1.05$, $\alpha = 20$, $N=100$, $R = 52$ μm , $L = 1$ m.....	5
Obrázek 79 – Rozdělení výkonu podle místa vstupu do vlákna. N je volitelný parametr, tímto parametrem se určuje jemnost výpočtu [101]......	7
Obrázek 80 –Kvantizační koeficient a úhel $\theta\phi$ jednotlivých módů. $N = 1000$	8
Obrázek 81 – Průběh koeficientu odrazu pro $\alpha_2 = \log(4)$ a $\alpha_2 = \log(5)$. Vertikální příčka označuje kritický úhel.....	9
Obrázek 82 - Goos-Hanchenův posuv.	10
Obrázek 83 - Závislost Goos-Hanchenova posuvu pro nepolarizované světlo ($S = S_s + S_p^2$) podle Chena [101] a Rabadyho [105]......	11
Obrázek 84 - Hloubka penetrace d_p a ekvivalentní délka L_p	12
Obrázek 85 - Obrázek vysvětlující vliv vstupního úhlu na koeficientu „donut ratio“. Vnitřní vyprázdňená oblast se začíná objevovat při $\gamma=\theta_c$ a zvětšuje se se zvyšujícím úhlem [101]......	13
Obrázek 86 – Výsledek modelování pro absorpční koeficient vzorku $\alpha_2=0$ a $\alpha_2=100$. Model podle Chena byl modifikován – viz kapitoly 1.2.1 až 1.2.4. Největší citlivost na α_2 vykazuje model při úhlech osvitu okolo 50 °. Při dalším zvyšování úhlu již nelze světlo navázat. Podmínky: $\lambda = 980$ nm, $n_1 = 1.432$, $n_2=1$, $N=100$, $R = 52$ μm , $L = 1$ m. Nelinearita je způsobena podmínkou $S = 0$ po překročení definované vzdálenosti od TIR.....	14
Obrázek 87 – Znázornění mimoosových paprsků, které se šíří pod úhlem ϕ k axiální rovině vlákna – upraveno z [101]......	15
Obrázek 88 – Vizualizace rovnice 96. Podmínky: $\lambda = 980$ nm, $n_{co} = 1.432$, $n_{cl}=1.05$, $r = 52$ μm	16
Obrázek 89 – Vizualizace rovnice 97. Podmínky: $\lambda = 980$ nm, $n_{co} = 1.432$, $n_{cl}=1.05$, $n_{ex}=1.33$, $r = 200$ μm . Integrál této plochy podle 97 je roven 4. 10 – 4	17

Obrázek 90 - Rozložení výkonu v evanescentním poli (η) podél taperu s proměnným průřezem r.....	19
Obrázek 91 - Dobře separovatelný prostor PCA skóre NIR spekter bakterií.	5
Obrázek 92 - Vliv RMSECV a RMSEC na počtu latentních komponent [114].	8

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Interpretace peaků převzatá z publikace [2].....	16
Tabulka 2 - Interpretace peaků převzatá z publikace [7].....	18
Tabulka 3 - Interpretace peaků převzatá z publikace [9].....	19
Tabulka 4 - Interpretace peaků převzatá z publikace [10].....	20
Tabulka 5 - Interpretace peaků převzatá z publikace [11]. Všechny vazby jsou přítomny především v lipidech nacházejících se v buněčné stěně a ostatních částech buňky.	22
Tabulka 6 - Interpretace peaků převzatá z publikace[12].....	23
Tabulka 7 - Interpretace peaků převzatá z publikace [14].....	26
Tabulka 8 - Interpretace peaků převzatá z publikace [15].....	26
Tabulka 9 - Některé studie o použití NIRS pro odhalování kontaminace potravin	28
Tabulka 10 - Nejdůležitější části MIR spektra bakterie [19].....	30
Tabulka 11 - Přehled detekčních limitů některých technik. Reference a popis optických struktur lze nalézt v [39].	35
Tabulka 12 - Chemické složení bakterií.....	43
Tabulka 13 - Přesnost klasifikačních modelů (CCR) bakteriálních suspenzí.....	70
Tabulka 14 - Přesnost klasifikačních modelů (CCR) dehydratovaných vzorků.....	70
Tabulka 15 - Příprava dat a přesnost PLS2-DA modelu.....	78
Tabulka 16 - Průměrná vzdálenost mezi peaky nalezených pomocí prokládacích algoritmů a skutečnou pozicí peaků v závislosti na počtu modelovaných peaků....	80
Tabulka 17 - Průměrná vzdálenost mezi peaky nalezených pomocí prokládacích algoritmů a skutečnou pozicí peaků. Tyto hodnoty závisí na inicializační metodě a počtu derivací v kritériální funkci.	81
Tabulka 18 - Dekomponované peaky s nejmenší ANOVA p-hodnotou	82
Tabulka 19 - Vybrané MIR peaky. PLS-DA modelu se zúčastnily pouze části spektra s vysokou korelací k těmto peakům.....	88
Tabulka 20 - Peaky se silnou korelací s Amidy I (1965 cm^{-1}).....	90
Tabulka 21 - Peaky se silnou korelací s CH_2 v mastných kyselinách (2924 cm^{-1})... ..	92
Tabulka 22 - Parametry zpracování spekter a klasifikační síla PLS-DA modelu.....	94

1 ÚVOD

Tato práce se zabývá výzkumem biosenzoru s možností analýzy bakteriálních buněk v malých koncentracích. Buňky jsou analyzovány využitím NIR¹ spektroskopie. Jak z rozboru současného stavu problematiky vyplývá (viz kap. 2), NIR spektroskopie se těší soustavnému nárůstu aplikací v oblasti mikrobiologie, a to zejména v úlohách identifikace bakteriálních kmenů. Tyto aplikace se nachází ve fázi pokusů o interpretaci a porozumění spekter bakterií. Ale už nyní je jasné, že využití NIR spektroskopie je logické vyústění snah o rychlou analýzu buněk v malých koncentracích pomocí molekulárně vibračních technik. Potenciál molekulárně vibračních metod byl dostatečně prokázán pomocí spektroskopie střední infračervené oblasti. MIR² spektrum bakterií je v současné době poměrně dobře prozkoumáno a čemž svědčí řada vědeckých publikací i dedikovaných přístrojů pro identifikaci buněk pomocí MIR spekter. Nevýhodou zůstává komplikovaná příprava vzorku a omezený výběr materiálů vhodných pro MIR. Naproti tomu NIR spektrum bakterie doposud není jednoznačně určeno, a i když se o interpretaci jednotlivých spektrálních částí pokouší řada vědeckých týmů, obecně uznávaná interpretace chybí. V této práci jsou za pomoci 4 spektroskopických experimentů (v NIR regionu) identifikovány spektrální oblasti důležité zejména pro identifikaci bakteriálních kmenů. Úloha identifikace bakteriálních kmenů často (v mikrobiologické, biochemické i medicínské praxi) vyžaduje možnost vyhodnocovat spektrum v nízkých koncentracích. Z tohoto důvodu byl navržen senzor založený na optovláknové optice a kavitním zesílení, který je schopen změřit NIR spektrum ve vybraných spektrálních regionech z malého počtu buněk. Spojením techniky evanescentního snímání s NIR spektroskopií vede k odemčení potenciálu této analytické metody v mikrobiologii.

Uvedený návrh může posloužit k výrobě senzoru, který dokáže identifikovat (nebo jinak klasifikovat – růstový cyklus, stav buňky...) bakteriální kmen na základě 10^5 buněk adherovaných na povrchu senzoru. Tato citlivost je zásadní pro určování kmenů v medicínské mikrobiologii i medicíně.

¹ Near Infrared Spectroscopy – Spektroskopie blízké infračervené oblasti.

² Mid-Infrared Spectroscopy – Spektroskopie střední infračervené oblasti.

2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

V této části práce jsou uvedeny nejdůležitější publikace zabývající se využitím NIR spektroskopie v mikrobiologii, aplikacemi optovláknových biosenzorů včetně technologie kavitního zesílení.

Rozbor publikací o NIR spektroskopii je důležitý zejména kvůli shrnutí dosavadních vědomostí o NIR spektru bakterie. Jak bude ukázáno, jasně stanovená interpretace NIR spektra buněk doposud chybí a bude cílem praktické části této práce.

Některé optovláknové senzory a jejich aplikace v biochemii jsou uvedeny v kap. 2.2. Kvůli nasazení NIR spektroskopie byl vybrán senzor s multivídným vláknem s kavitním zesílením (viz kap. 2.3). Jak je vidět z rozboru současného stavu problematiky, toto unikátní řešení, které umožňuje přímou analýzu navázaných buněk, nebylo doposud publikováno.

2.1 NIR spektroskopie v mikrobiologii

NIRS nachází své uplatnění především v agronomii, potravinářství, polymerním a petrochemickém průmyslu, v biochemickém a farmaceutickém průmyslu. To je dáno především jednoduchostí přípravy vzorků a silnou penetrací světla do vzorku. Metoda je neinvazivní a v porovnání s ostatními klasickými laboratorními analytickými postupy rychlá a levná. Z těchto důvodů se NIRS masivně používá v kontrole a řízení výrobních procesů ve výše jmenovaných odvětvích.

I když je pro NIRS typické nasazení v oblasti zemědělství (především kvantifikace vlhkosti, proteinů a mastných kyselin v zemědělských produktech [1]), NIRS stále progresivněji zasahuje do mikrobiologie, a to především v aplikacích pro odhalení bakteriální kontaminace potravinářských produktů. Na počátku 21. století začaly masivně vycházet publikace popisující možnosti NIRS pro identifikaci bakteriálních druhů.

První průkopnická práce v této oblasti byla publikace autorů L.E. Rodriguez-Saony a kol.[2], která zkoumala možnosti identifikace šesti bakteriálních kmenů. Bakteriální buňky byly přefiltrovány pomocí filtrační membrány ze skelných mikrovláken (Whatman, Glass fiber filter) a z oxidu hlinitého (Whatman, Anodisc). NIR spektrum dehydratované směsi bylo následně změřeno technikou difusní reflektance (DRIFT[3]), touto technikou lze měřit vzorky způsobující silný rozptyl světla. Šest kmenů bylo změřeno v různých koncentracích. Tímto postupem lze determinovat úroveň minimální koncentrace nutnou pro spolehlivou identifikaci kmenů. Konstantní množství bakterií na filtru bylo zajištěno vážením mokré

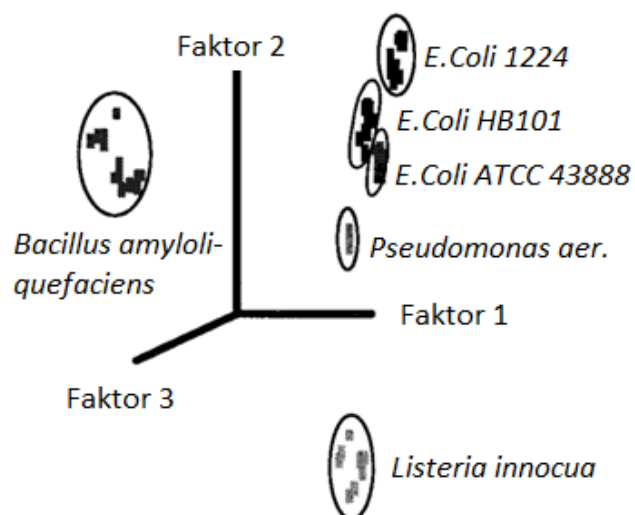
bakteriální pelety³ (10 mg). Protože spektrální kontury NIR spektra zpravidla nejsou výrazné (obr. 38), autoři zvýraznili změny ve spektrech pomocí druhé Savitzky-Golay derivace spektra [4] a použitím algoritmu pro potlačení efektu rozptylu světla (Standard Normal Variate – SNV [5]). Jedním z cílů experimentu byla interpretace peaků typických pro spektrum bakteriálních buněk, k tomu posloužili změřená spektra základních bakteriálních komponent (standard kyseliny dioxyribonukleonové, glykogen standard, lecitin standard, standard kyseliny N-acetylmuramové). Nejvýraznější peaky spektra bakterií a jejich složek jsou uvedeny v tab. 1.

Tabulka 1 - Interpretace peaků převzatá z publikace [2]

Vlnočet [cm ⁻¹]	Vln. délka [nm]	Molekulová vazba
5912	1691	C-H (1. overton) valenční mód CH ₃
5776	1731	C-H (1. overton) valenční mód CH ₂
5673	1763	C-H (1. overton) valenční mód aromatických CH skupin
5191	1926	O-H valenční mód a H-O-H deformační mód polysacharidů (peak byl pozorován u glykogenu a kyseliny N-Acetylmuramové)
5056	1998	N-H (1. overton) valenční mód DNA
4865	2055	C-H amidové skupiny (A/I) v proteinech
4607	2171	C-H amidové skupiny (B/II) v proteinech
4416	2264	C-H kombinovaný mód v polysacharidech
4342, 4261, 4190, 4142, 4061	2303, 2347, 2387, 2414, 2462	C-H, O-H, N-H vazby pozorované v kyselině N-Acetylmuramové

Všechna spektra byla dekorelována pomocí PCA [5], výstupní graf zobrazující skóre (prostor daný vypočítanými „hlavními“ komponentami) vykazoval zřetelnou klasterizaci dat podle bakteriálních druhů (obr. 1). Na základě těchto poznatků je možné konstatovat, že DRIFT je velmi vhodnou a přímočarou technikou pro měření dehydratované bakteriální suspence a lze tak získat spektrum čisté biomasy na základě které může být identifikován kmen bakterií.

³ Bakteriální pelet je biomasa vzniklá centrifugací bakteriálního roztoku.



Obrázek 1 - PCA výstup NIR spekter různých bakteriálních kmenů [2].

L.E. Rodriguez-Saona v související studii [6] porovnával klasifikační schopnosti modelů, postavených na 4 různých technikách měření spekter. Pro porovnání použil 6 bakteriálních kmenů a výsledky vyhodnocoval z klasterizace dat v PCA skóre prostoru. Porovnávané metody:

- Měření suspenze ve skleněné kyvetě (0,5 mm) – Spektra byla přikryta absorpcí vody. Protože autoři využívali spektrální oblast 1000-2500 nm, kde je silná absorpce O-H vazeb, tuto techniku nelze pro klasifikaci bakterií využít.
- Měření na IR kartách z porózního polyetyleny. Ukázalo se jako nezbytné odstranění supernatantu (dextrózy), které ruší spektrum bakterií. I když byla pozorována klasterizace dat, nestabilita tloušťky dehydratovaného filmu a absorpce polyetyleny v oblasti 2272 – 2500 nm zůstává nevýhodou této techniky.
- Filtrování pomocí Anodisc membrány. Anodisc membrány zajišťují homogenní bakteriální film už při použití 5 mg mokré pelety. Buňky byly lyzovány pomocí hydroxidu sodného, který ještě zvýšila meziklastrové vzdálenosti v prostoru PCA skóre.
- Přímé měření lyofilizovaného vzorku se ukázalo jako těžko opakovatelné (rozdílná morfologie a distribuce částic). Další možností je resuspendace lyofilizovaného prášku a filtrace pomocí Anodisc filmu. Tato technika ukazuje podobné výsledky jako předchozí, ale přímé filtrování suspenze přes Anodisc membránu se zdá být rychlejší a praktičtější postup pro přípravu vzorku.

V následující studii L.E. Rodriguez-Saona a kol. [7] použili stejnou techniku pro klasifikaci bakteriální kontaminace džusu. Autoři kontaminovali jablečný džus pěti bakteriálními kmeny a extrahovali bakteriální suspenzi filtrací. Po aplikaci ethanolu, pouhý 1 mg bakteriální suspence přefiltrovaný přes Anodisc filtr stačil pro identifikaci kmenů bakterií. Spektra byla opět zpracována druhou Savitzky-Golay derivací a pro dekorelaci dat posloužila PCA transformace. Bylo možné sledovat dobrou klasterizaci dat v prostoru PCA skóre. Podobnou klasterizaci vykazoval i výstup algoritmu SIMCA. Tímto postupem byla analyzována i čistá bakteriální suspenze. Pro identifikaci se ukázaly nejdůležitější spektrální oblast 2000 – 2500 nm. Jako nejdůležitější peaky pro identifikaci bakteriálních kmenů byly určeny tyto:

Tabulka 2 - Interpretace peaků převzatá z publikace [7]

Vlnočet [cm ⁻¹]	Vln. délka [nm]	Molekulová vazba
4860, 4592	2058, 2178	N-H valenční módy
4920	2033	C=O karbonylové sloučeniny
4688,4468	2133, 2238	Kombinovaný mód aminových kyselin
4676	2138	HC=CH vazby
4400-4000	2273-2500	C-H overtóny a kombinované módy lipidů a karbohydrátů

Je nutné podotknout, že přidání ethanolu ovlivnilo spektrum čisté bakteriální biomasy, a to především C-H valenční módy v amidech, tj. v oblastech 2127 – 2309 nm a 2353 – 2500 nm.

Podobné výsledky přinesla identifikace bakterií extrahovaných přímo z džusu, avšak jen na úrovni druhů. Kmeny *E.Coli* nebylo možné rozlišit. Koncentrace bakterií se pohybovala mezi 10⁴ a 10⁵ CFU/mL, pro dosažení této koncentrace bylo nutné přefiltrovat 200 mL infikovaného džusu, avšak v případě čerstvého džusu by bylo nutné přefiltrovat 1 – 2L.

S. Sivakesava a kol.[8], zkoumal možnosti NIRS pro měření parametrů fermentace (viz níže) a pokračoval ve výzkumu možností NIRS v mikrobiologii. V roce 2004 zveřejnili studii o identifikaci mikroorganismů pomocí FTIR-ATR a NIRS. Autoři zkoumali 5 bakteriálních druhů ve formě suspenzí v destilované vodě. Suspence byly měřeny optovláknovou sondou měřící intenzitu odraženého světla. Následně byla spektra komprimována pomocí PCA a spektrální variace byly analyzovány modelem CVA. I přes odečtení O-H absorpčních peaků vody, spektra měla velmi nízkou kvalitu kvůli nevhodně zvolené technice měření. Je zajímavé, že autoři vyvodili závěry o úspěšném nasazení NIRS pro klasifikaci bakteriální z dobré klasterizace dat v CVA skóre prostoru. Je ovšem důležité si uvědomit, že na rozdíl od PCA, CVA pouze maximalizuje rozptyl dat mezi třídami⁴ a bez odpovídající validace

⁴ Viz kap. 2.5.

má zobrazování klasterizace v CVA skóre prostoru zanedbatelnou vypovídající hodnotu.

Vzápětí publikovala Janie Dubois, členka týmu Rodriguez-Saony, a kol.[9] studii o bakteriální identifikaci pomocí NIRS zobrazování. 5 μ l bakteriální suspenze (0,5 OD⁵) bylo deponováno na hliníkový podklad a důkladně vysušeno ve vakuové komoře. Hyperspektrální obraz⁶ byl snímán skenováním (reflektance, 1200 – 2350 nm) – viz obr. 4. Touto technikou lze měřit spektra s vysokým prostorovým rozlišením a určit tak oblasti kontaminace vzorku. Po aplikaci 2. SG derivace (viz obr 2) byly suspenze taxonomicky klasifikovány klasifikačním modelem PLS. Bylo pozorováno velmi dobré rozlišení mezi gram pozitivními a gram negativními kmeny (viz kap. 3.2) na základě intenzity odrazu na vlnové délce 1940 nm, která reprezentuje volnou a vázanou vodu. Předpokládá se, že různé složení buněčné stěny má různou schopnost odolávat dehydratačním procesům. Tento peak je především ovlivněn molekulárními vazbami uvedenými v tab. 3 (první 2 řádky).

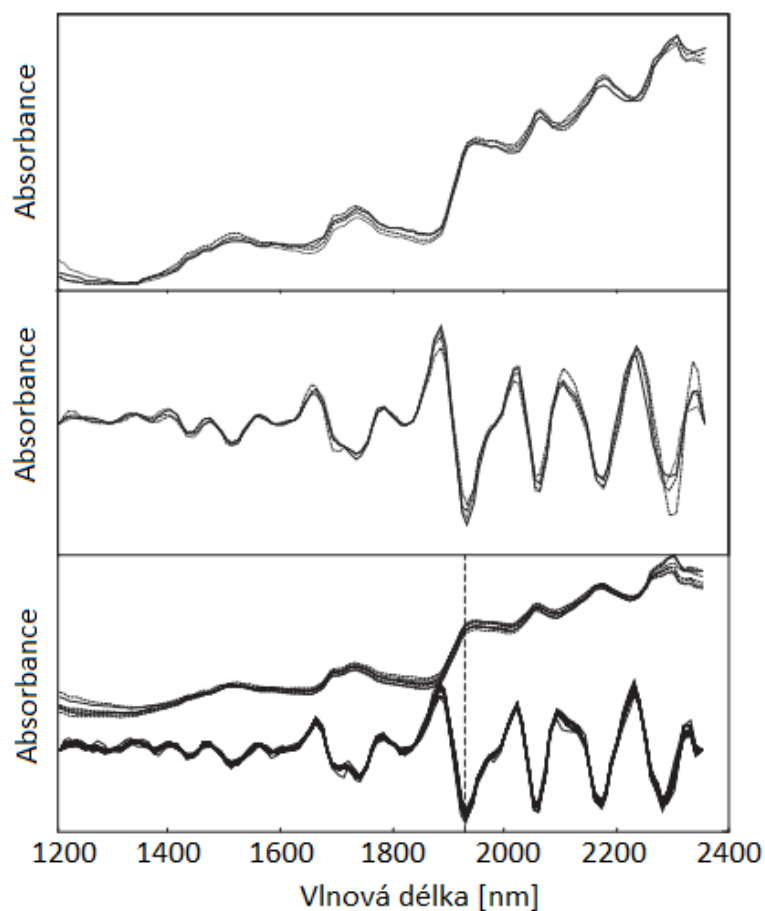
Tabulka 3 - Interpretace peaků převzatá z publikace [9]

Vlnočet [cm ⁻¹]	Vln. délka [nm]	Molekulová vazba
5155	1940	O-H valenční a deformační módy ve nevázané vodě
5141	1945	O-H valenční a deformační módy v proteinech
5952	1680	cis dvojité vazby v nenasaturovaných mastných kyselinách
5935	1685	C-H valenční módy v aromatických sloučeninách

V další části studie byl úspěšně diskriminován kmen *B.cereus* od ostatních kmenů na základě vlnové délky 1680 nm (viz tab. 3). Další kmeny byly rozeznány pomocí PLS modelu, ale detailní popis kalibrace a validace modelu není v publikaci uveden.

⁵ Optical Density – údaj rovnající se absorbanci (tedy logaritmu absorpce).

⁶ Hyperspektrální obraz je obraz, kde je možné získat několik spektrálních bodů z každého pixelu obrazu.



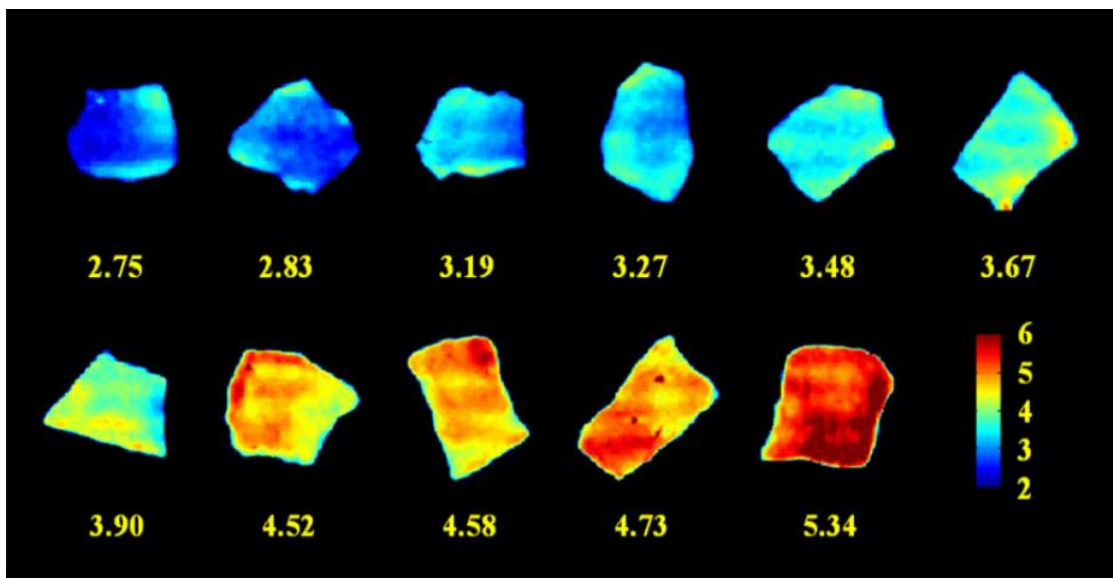
Obrázek 2 - Původní (horní), normalizované (prostřední) a derivované (dolní) spektra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Enteritidis a *Bacillus cereus* [9].

Podobnou studii publikoval i Yao-Ze Feng a kol. [10], v rámci které prováděl kvantifikaci bakteriální kontaminace kuřecích filet bakterií *Enterobacteriaceae*. S použitím spektrálního okna 930 – 1450 nm byli autoři schopni kvantifikovat kontaminaci s přesností SEP⁷ 0,22 log CFU/g. Nejdůležitější vlnové délky jsou uvedeny v tab. 4. Největší přínos této studie je velice názorné zobrazení šíření bakteriální kontaminace na filetě. Na obr. 3 je průběh kontaminace zobrazený jako výstup PLS modelu kalibrovaný na vlnových délkách z tab. 4.

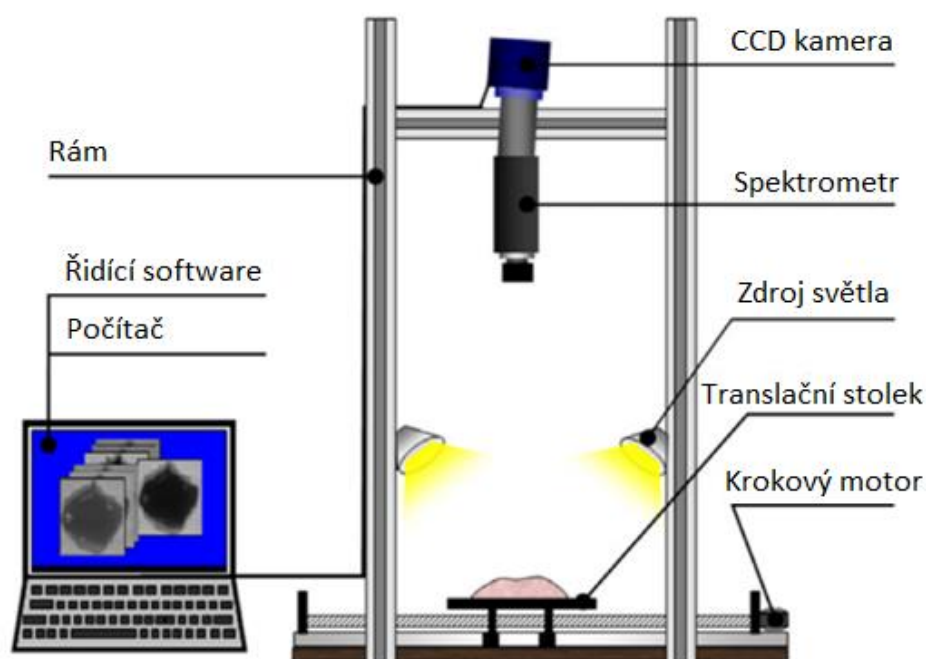
Tabulka 4 - Interpretace peaků převzatá z publikace [10]

Vlnočít [cm ⁻¹]	Vln. délka [nm]	Molekulová vazba
10753	930	O-H 3. overton
8920	1121	C-H 2. overton
7435	1345	O-H 2. overton

⁷ SEP je jiné vyjádření RMSE, Kvantifikace chyby pomocí RMSE je vysvětlena v kap. 2.7. přílohy 2.



Obrázek 3 – Proces kontaminace kuřecích filetů zobrazený pomocí výstupu PLS modelu. Výsledky ukazují predikovanou hodnotu koncentrace *Enterobacteriaceae* (log CFU/g). Převzato z [10].



Obrázek 4 - Sestava přístroje pro spektrální zobrazování [10].

V roce 2008 byla uveřejněna stěžejní studie autorů Dimitrise Alexandrakise a kol [11]. Spektra bakteriálních suspenzí pěti druhů nanesených na zlaté podložce (tloušťka vrstvy 0,1 mm) byla pořízena trans-reflektanční sondou. Spektra byla rozdělena do kalibrační a validační skupiny v poměru 2:1, derivována (2. derivace SG) a klasifikována modely SIMCA a PLS2-DA. Nejpřesnější klasifikace byly

vytvořeny využitím spektrální oblasti 700 – 900 nm, to je dáno především silnou absorpcí vody v ostatních částech spektra, a to zejména kolem 1440 nm a 1950 nm. Modely dosahovaly 100% úspěšnost validace a byly dokonce schopny rozeznat i jednotlivé druhy stejného rodu (*Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*). PCA skóre ukazuje velmi dobrou klasterizaci dat a je jasné, že spektrum v této oblasti nese informace o rozlišení zkoumaných bakteriálních druhů. Zkoumáním vlastních čísel hlavních PCA komponent, byly následující peaky identifikovány jako nejdůležitější pro klasifikaci bakteriálních druhů:

Tabulka 5 - Interpretace peaků převzatá z publikace [11]. Všechny vazby jsou přítomny především v lipidech nacházejících se v buněčné stěně a ostatních částech buňky.

Vlnočet [cm ⁻¹]	Vln. délka [nm]	Molekulová vazba
14045	712	-CH ₃
13477	742	-CH ₂
13227	756	-CH a H ₂ O
12077	828	-RNHR' vazby a -RNH ₂
11990,11792	834, 848	-RNHR' vazby
11389,11337, 11136	878,882,898	CH ₃

Fernando Cámara-Martos a kol. identifikovali a kvantifikovali bakterie mléčného kvašení přímým měřením suspenzí [12]. Bohužel autoři zahrnuli do experimentu pouze 3 kmeny. Suspenze byly zředěny do různých koncentrací tak, aby bylo možné studovat možnosti měření bakteriální koncentrace (3-8 log CFU⁸/mL). Samotné měření probíhalo na tenké vrstvě vzorku pomocí transreflektanční techniky s integrační sférou. Touto metodou lze velmi efektivně zachytit difuzní světlo, které vystupuje všemi směry ze vzorku. Vzhledem k dostupné instrumentaci, autoři měřili suspenze ve spektrálním regionu 1100 - 2500 nm, což se podle ostatní dostupné literatury zdá být jako ne příliš vhodný region vzhledem k silné absorpci vody. Autoři zvolili klasické zpracování spektra, tj. SG derivace, a modelování pomocí PCA a PLS. Podle očekávání, spektra naprosto ovládla absorpce vody (1450 nm a 1940 nm) a proto byla aplikována 2. SG derivace pro zvýraznění spektrálních detailů. Je zajímavé, že výsledek derivace nekopíruje originální spektrální kontury. To může být dáno nevhodně zvolenými parametry derivace anebo výpočtem derivace z malého počtu bodů (20 bodů ze celkového počtu 5091 bodů v rozsahu 1100 - 2500 nm, tzn. že derivace pokrývala 5,5 nm), což vede ke zvýraznění šumu a značnému potlačení originálních spektrálních kontur. Na obr. 5 můžeme vidět porovnání výsledku derivace spektra podle Fernanda Cámara-Martose a klasický výsledek derivace podle Dimitrise Alexandrakise. I přes tuto

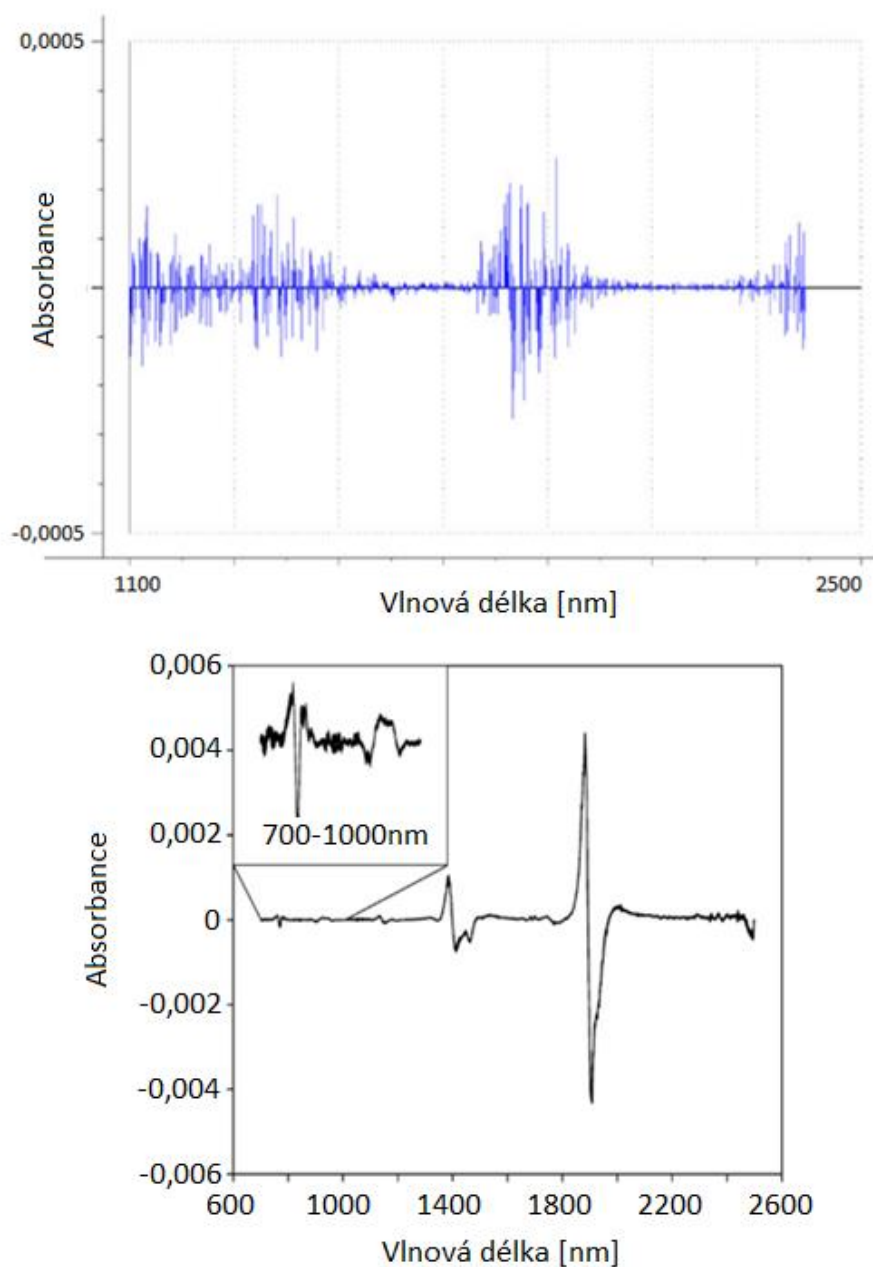
⁸ CFU je jednotka vyjadřující počet živých bakterií ve vzorku.

odvážnou matematickou operaci, použitím regionu 1490 - 2000 nm byla pozorována klasterizace dat podle bakteriálních druhů v PCA skóre prostoru, i když bylo v prvních 3 principiálních komponentách popsáno jen 55% variance. V rámci interpretace důležitých peaků byly identifikovány tyto spektrální oblasti:

Tabulka 6 - Interpretace peaků převzatá z publikace[12]

Vlnočet [cm ⁻¹]	Vln. délka [nm]	Molekulová vazba
6579	1520	Molekulové vazby v proteinech
5181	1930	C=O valenční a deformační módy v proteinech
6098-5600	1640-1786	Aromatické a heterocyklické molekuly
5000-4545	2000-2200	C-H kombinační pásmo amidů a C-H první overton metylenu

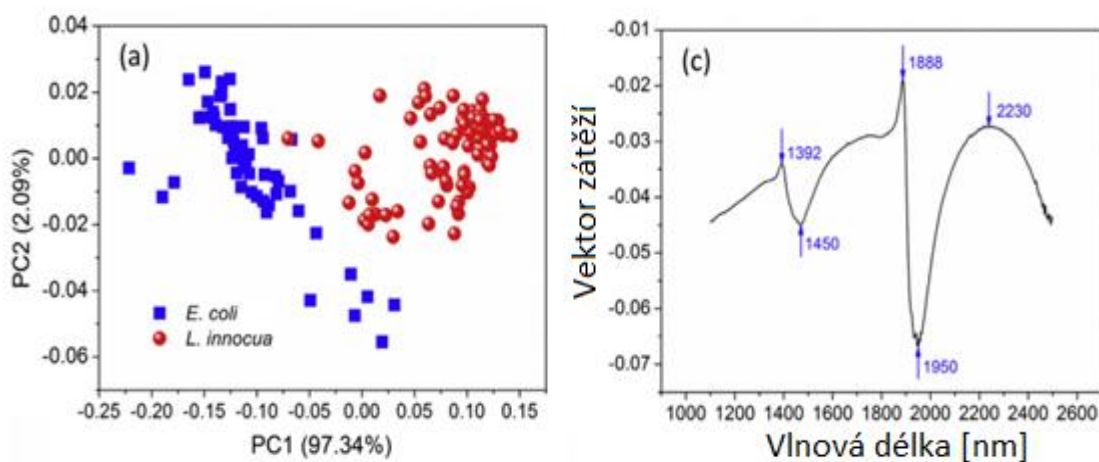
Všechny modely (PCA,PLS) vykazovaly dobrou schopnost klasifikace pokud byly použity vzorky s vysokou koncentrací bakterií (8 – 9 log CFU/mL). Výsledky je ovšem těžké komparovat, protože autoři použili regresní model (PLS) pro klasifikační úlohu. Třídy byly kódovány do ordinálních čísel a výsledná chyba měření je uvedena ve formě standardní chybě predikce (SEP). Je nutné podotknout, že tento způsob klasifikace nemá žádný matematický důkaz. V případě použití PLS pro klasifikaci, je nutné použít PLS2-DA podle Barkra and Rayense[13] a kódovat nezávislé proměnné do vícerozměrné matice. SEP se v případě křížové validace s vyloučením jednoho prvku pohybovala okolo 0,12, což napovídá úspěšnosti klasifikace 100%. SEP PLS modelu pro kvantifikaci bakteriální kontaminace v rozsahu 3-9 log CFU/mL byla 0,28 log CFU/mL.



Obrázek 5 – Druhá SG derivace spektra bakterií ve vodném roztoku podle Fernanda Cámara-Martose [12] a Dimitrise Alexandrakise [11].

Další studie zabývající se analýzou možností NIRS pro identifikaci bakteriálních kmenů vyšla v roce 2014 od autorů Yao-Ze Feng a kol. [14] Autoři měřili přímo bakteriální suspence pomocí transreflektanční sondy oproti zlatému podkladu, stejně jako Dubois. Takto bylo změřeno celkem 7 druhů dvou bakteriálních rodů v koncentraci 0,15-9 log CFU/mL. Data byla rozdělena na kalibrační a validační v poměru (2:1). Pro zesílení signálu, všechna spektra byla derivována a byly aplikovány metody pro potlačení efektu rozptylu světla (SNV, MSC). Pro klasifikaci byl použit model PLS-DA. Problematika použití jednoduchého PLS-DA byla

rozebrána výše. V experimentu byl nasazen i nelineální model – SVM⁹. Podle předpokladů, spektru dominuje absorpce vody, a to především v oblasti 1450 nm a 1960 nm (O-H valenční mód). Dobrá separace mezi dvěma rody (*E.Coli* a *Listeria*) v PCA prostoru byla pozorována při použití oblasti 400-1000 nm (VIS-SWNIR¹⁰ rozsah). Tyto kmeny mají rozdílné gramovo barvení, takže se předpokládá rozdílná skladba buněčné stěny a rozdílná schopnost zadržovat vodu. Proto je klasterizace zapříčiněna výhradně množstvím změřené vody (viz obr. 6).



Obrázek 6 - Prostor PCA skóre (vlevo, osy: PC1,PC2 – prostor skóre hlavních komponent) a PCA principiálních komponent spekter bakterií rozdílného Gramova barvení [14].

V oblasti 1100-2500 nm je klasterizace poněkud horší, ale stále lze dobře rozeznat většinu spekter. Ke klasifikaci přispívají nejvíce tyto peaky: 1392, 1450, 1888, 1950 and 2230 nm. Tyto vlnové délky jsou ovlivněny především valenčními vibracemi O-H vazeb. Zajímavé je, že další principiální proměnná PCA transformace obsahuje informaci pro rozpoznání jednotlivých kmenů *E.Coli*, a to především s přispěním těchto vlnových délek: 1406, 1496, 1902 and 1996 nm, které jsou asociovány s vazbami ROH, N-H, $-CO_2H$ a $CONH_2$ strukturami. PLS-DA model pro rozlišení mezi *E.Coli* a *Salmonelou* byl validován s přesností 96,83% v VIS-SWNIR rozsahu a 100% v NIR rozsahu. To je překvapivé vezmeme-li v potaz fakt, že kalibrace a validace se zúčastnily vzorky s koncentrací menší než 1 log CFU/mL. Metodou výběru nejdůležitějších spektrálních částí pro PLS-DA diskriminaci, byly vybrány tyto vlnové délky: 454,456,1884,1886,1890 nm. Stejnou technikou byly vytvořeny modely pro rozpoznání jednotlivých kmenů *E.Coli* a *Listerie*. I když je přesnost predikce přímo aplikovaných modelů malá, lze ji zvýšit vyřazením spekter

⁹ Support Vector Machine je metoda strojového učení, sloužící zejména pro klasifikaci a také pro regresní analýzu.

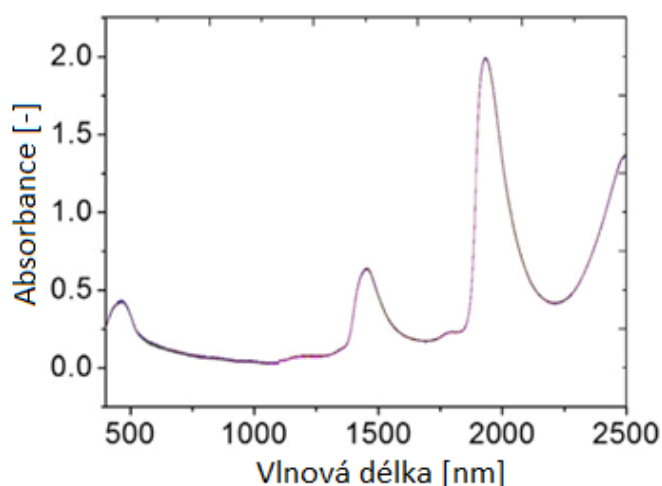
¹⁰ SWNIR je spektrum v oblasti 700-1000 nm. VIS značí viditelné spektrum (380-750 nm).

malých koncentrací a výběrem důležitých vlnových délek, a to zejména těch uvedených v tab. 8.

Tabulka 7 - Interpretace peaků převzatá z publikace [14].

Vlnoččet [cm^{-1}]	Vln. délka [nm]	Molekulová vazba
8880	1126	N–H valenční mód
5333	1875	C–H struktury v dlouhých řetězcích mastných kyselin
5203	1922	C=O valenční mód (2. overton)
5045	1982	N–H valenční mód
4230	2364	C–H valenční mód (2. overton)
4016	2490	C–H deformační mód (2. overton)

Výběrem těchto vlnových délek se zvýšila přesnost predikce PLS-DA modelu na 77,78%. Přesnost validace SVM modelu s i bez výběru vlnových délek je 85,19%.



Obrázek 7 - Typické NIR spektrum bakteriální suspenze [14].

V roce 2001 Sakhamuri Sivakesava a kol.[15] uveřejnil studii, zabývající možnostmi MIR, NIR a Ramanovské spektroskopie pro monitorování parametrů mléčné fermentace (množství biomasy, glukózy a kyseliny mléčné). I když autoři shledávají MIR spektroskopii jako nejpřesnější (MIR-PLS model vykazuje nejlepší výsledky), modely kalibrované na základě NIR spekter mají rovněž nízkou chybu validace. V NIR spektru byly detekovány tyto významné spektrální oblasti:

Tabulka 8 - Interpretace peaků převzatá z publikace [15].

Vlnoččet [cm^{-1}]	Vln. délka [nm]	Molekulová vazba
11111-9524	900-1050	C-H (3. overton) valenční mód
8696-8000	1150-1250	C-H (2. overton) valenční mód
7407-6060	1350-1650	O-H valenční mód cukrů
6944-6803	1440-1470	O-H valenční mód vody
7502-5165	1333-1936	C=O 3. overton karbonylových skupin

Spektra byla kalibrována pomocí PLS modelu s daty z HPLC¹¹ měření. Pomocí kros-validace byla vypočítána SEP glukózy - 7,86 g/L, mléčné kyseliny - 1,5 g/L a biomasy počítané v OD - 0,38. I když MIRS vykazovala menší chybu predikce, je jasné, že NIR spektra rovněž obsahují informace o měřených složkách fermentace. Důslednější předzpracování dat (spektrální derivace, odstranění efektu rozptylu světla) by mohlo vést k lepšímu výkonu modelu.

O dva roky později (2003) Simona Tosi navázal na práci S. Sivakesava a zaměřil se na měření výše uvedených složek fermentace pomocí NIRS [16]. Parametry fermentace byly měřeny přímo v bioreaktoru, pomocí optovláknové sondy s 2 mm měřicí dráhou. Data byla následně derivována (2. derivace podle Norrise[17]), a pro predikci komponent byl opět použit PLS model. SEP počítané na nezávislé množině dat jsou následující: glukóza - 2,6 g/L, mléčná kyselina - 1,4 g/L a biomasa - 0.8 g/L. Jak je vidět v porovnání z prací S. Sivakesava, sofistikovanější zpracování dat vedlo k vyšší přesnosti modelu.

Další početné studie diskutují nasazení NIRS v odhalování, identifikování a kvantifikování bakteriální kontaminace v potravinářství, jejich přehled je uveden v tab. 9. Za všechny jmenujme příspěvek Phunsiri Suthiluk a kol. [18], ve kterém autoři kvantifikovali bakteriální kontaminaci strouhaného zelí. Zelí bylo oplachováno fyziologickým roztokem, který byl následně měřen transmittanční technikou v rozsahu 700 - 1100 nm. Současně byly změřeny NIR spektra vzorků homogenizovaného zelí. Tím se zajistila analýza kontaminace nejen na povrchu, ale i uvnitř vzorků. Spektra byla transformována druhou derivací a algoritmy pro odstranění rozptylu světla (MSC). Následně byla data rozdělena na kalibrační a validační (1:1) skupinu. Využitím kalibračních dat vznikl PLS model pro predikci bakteriální koncentrace. SEP na validačním vzorku se pohybovala u obou typů vzorků okolo 0,46 log CFU/g. Rozsah koncentrací byl 3 - 7 log CFU/g.

Přehled studií zabývajících se odhalováním kontaminace potravin pomocí NIRS je uveden v tab. 9.

¹¹ HPLC je zkratka pro vysokouúčinnou kapalinovou chromatografii sloužící k separaci složek vzorku za účelem stanovení jejich přítomnosti i koncentrace ve vzorku.

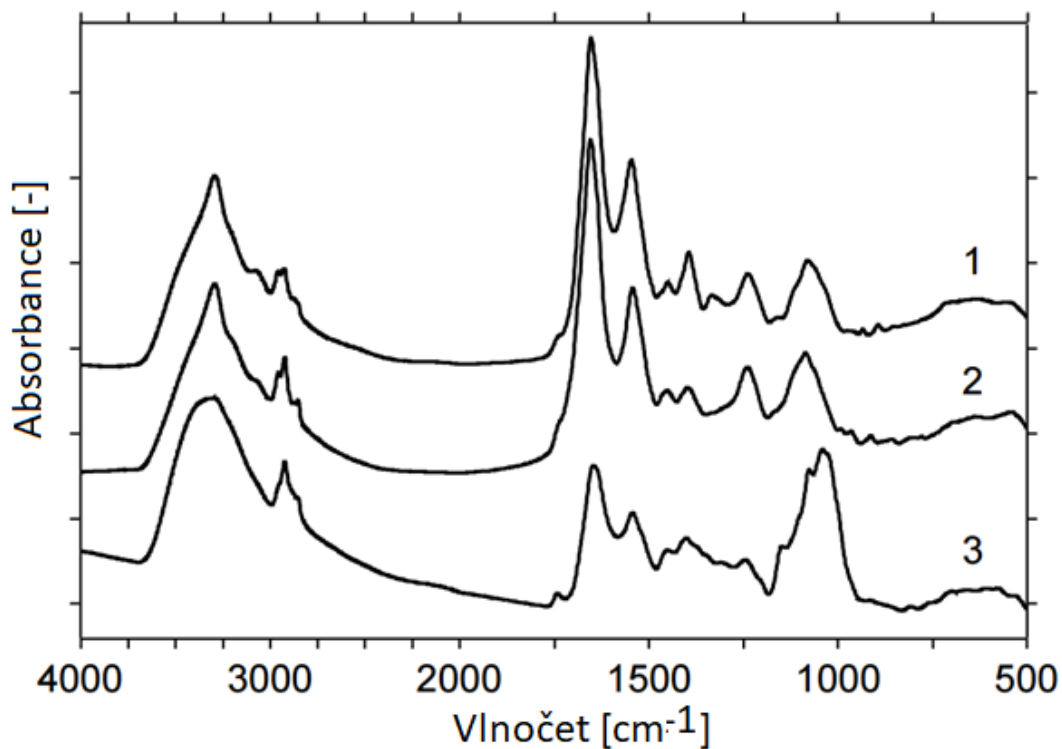
Tabulka 9 – Některé studie o použití NIRS pro odhalování kontaminace potravin

Fekální kontaminace drůbežích zdechlín.	Hyperspektrální zobrazování, 400-900 nm, PCA, LR	Windham, W. R., Lawrence, K. C., Park, B. and Buhr, R. J. (2003b). Visible/ NIR spectroscopy for characterizing fecal contamination of chicken carcasses. <i>Trans. ASAE</i> . 46(3):747–751.
Fekální kontaminace zařízení při zpracování drůbeže.	VIS-NIRS, 1565 nm, 1645 nm	Chao, K., Nou, X., Liu, Y., Kim, M. S., Chan, D. E., Yang, C. C., Patel, J. and Sharma, M. 2008. Detection of fecal/ingesta contaminants on poultry processing equipment surfaces by visible and near-infrared reflectance spectroscopy. <i>Appl. Eng. Agr.</i> 24(1):49–55.
Fekální kontaminace jablek.	Hyperspektrální zobrazování, 400 – 900 nm, PCA	Kim, M. S., Chao, K., Chen, Y. R., Chan, D. and Mehl, P. (2000). Hyperspectral imaging system for food safety: Detection of fecal contamination on apples. <i>Photonic Detection and Intervention Technologies for Safe Food</i> , <i>Proceed. SPIE</i> . 4206:174–184.
Kontaminace kukuřičných zrn plísněmi.	550-1700 nm	T. C. Pearson and D. T. Wicklow, “Detection of corn kernels infected by fungi,” <i>Transactions of the ASABE</i> , vol.49, no.4, pp. 1235–1245, 2006.
Mikrobiální kontaminace kuřecího masa.	SW-NIR DRIFT, PCA, PLS	Lin, M., Al-Holy, M., Mousavi-Hesary, M., Al-Qadiri, H., Cavinato, A. G. and Rasco, B. A. (2004). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage in chicken meat by diffuse reflectance spectroscopy (600–1100 nm). <i>Let. Appl. Microbiol.</i> 39:148–155.
Kažení vepřového masa.	1000-1800 nm, PCA, CDA, PLS	K. Horváth, Z. Seregély, E. Andrassy, I. Dalmadi, and J. Farkas, “A preliminary study using near infrared spectroscopy to evaluate freshness and detect spoilage in sliced porkmeat,” <i>Acta Alimentaria</i> , vol.37, no.1, pp. 93–102, 2008.
Kažení filet ze pstruha.	600-1100 nm, PCA, PLS	M. Lin, M. Mousavi, M. Al-Holy, A. G. Cavinato, and B. A. Rasco, “Rapid near infrared spectroscopic method for the detection of spoilage in rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) fillet,” <i>Journal of Food Science</i> , vol. 71, no. 1, pp. S18–S23, 2006.
Počet somatických buněk v mléce.		Tsenkova, R., Atanassova, S., Morita, H., Ikuta, K., Toyoda, K., Iordanova, I. K. and Hakogi, E. (2006). Near infrared spectra of cow’s milk for milk quality evaluation: disease diagnosis and pathogen identification. <i>J. Near Infrared Spectrosc.</i> 14(6):363–370.
Celková bakteriální kontaminace v mléce.	600-1880 nm, SIMCA, ANN	Petya, V., Tsvetelina, D., Stefka, A. and Roumiana, T. (2010). Detection of bacterial contamination in milk using NIR spectroscopy and two classification methods- SIMCA and neuro-fuzzy classifier. <i>Third IFAC International Conference Agricontrol</i> . 3(1), 10.3182/20101206-3-JP-3009.00039.

Jak je vidět z uvedeného přehledu, mnoho studií se snaží o interpretaci peaků NIR spektra bakterií. Ucelená, obecně přijímaná interpretace však chybí a navrhané interpretace jsou neúplné a mnohdy v rozporu. Celková nejednoznačnost NIR spekter vede k časté nesprávné aplikaci statistických modelů a nedostatečné validaci. Opačná situace je v oblasti MIR spektroskopie bakterií, tyto techniky jsou v mikrobiologii používány již řadu let a především práce prof. Naumanna [19] ustanovily obecně uznávanou a ucelenou interpretaci peaků v MIR spektrech. Pro kontext je uvedena tabulka nejvýraznějších peaků a MIR spektrum patogenních mikroorganismů (Tabulka 10). Od té doby byla vydána řada publikací zabývajících se tematikou identifikace mikroorganismů pomocí MIRS. Například Janbu a kol. [20] spolehlivě identifikoval 30 kmenů *Listeria*. Al-Holy a kol. [21] dokázal pomocí MIRS identifikovat 4 potravinové patogeny (*Bacillus cereus*, *Salmonella*

enterica, *Escherichia coli*, *Listeria spp.*) s 94% úspěšností. Na obrázku 8 je typické MIR spektrum bakterií, jsou zde vidět jeho dominantní peaky.

Zásadní nevýhodou všech typů vibračních spektroskopí (NIRS, MIRS, Ramanova spektroskopie) zůstává princip stanovení bakteriálních kmenů na základě měření množství molekul, což znemožňuje měření vzorků s více bakteriálními druhy. NIRS a MIRS se proto omezuje výhradně na měření monokultur.



Obrázek 8 - Typické MIR spektrum 3 kmenů patogenních bakterií [19].

Tabulka 10 - Nejdůležitější části MIR spektra bakterie [19].

Vlnočet [cm ⁻¹]	Molekulová vazba
3500	O-H valenční mód hydroxylových skupin
3200	N-H valenční mód proteinů (amid A)
2959	C-H asym. valenční mód -CH ₃
2934	C-H asym. valenční mód -CH ₂
2921	C-H asym. valenční mód -CH ₂ v mastných kyselinách
2898	C-H valenční mód -CH ₃ v methinu
2872	C-H sym. valenční mód -CH ₃
2852	C-H sym. valenční mód -CH ₂ v mastných kyselinách
1741	C=O valenční mód v esterech
1715	C=O valenční mód v esterech, RNA/DNA
1695,1685,1675	Amidy I (antiparalelní skládané listy, β smyčky v proteinech)
1655	Amidy I (α helix)
1637	Amidy I (β skládané listy)
1548	Amidy II
1515	Pásmo „Tyrosinu“
1468	C-H deformační mód CH ₂
1400	C=O sym. valenční mód COO ⁻ vazby
1310-1240	Amidy III v proteinech
1250-1220	P=O asym. valenční mód PO ₂ ⁻ fosfolipidů
1200-900	C-O-C, C-O vibrace aromatických jader v karbohydrátech (C-O-P, P-O-P)
1085	P=O sym. valenční mód PO ₂
720	C-H deformace CH ₂
900-600	Oblast „otisku prstu“ (skeletální vibrace molekulových struktur)

2.2 Optovláknové biosenzory

Optovláknové biosenzory¹² se stávají značně rozšířeným diagnostickým nástrojem v biomedicinském a chemickém odvětví, enviromentálních studiích a v průmyslu. Vývoji tohoto typu senzorů se v současné době věnuje mnoho vědeckých týmů po celém světě. Jako hlavní detekční princip se už od počátku vývoje optovláknových biosenzorů využívá imunoassay¹³, která pomocí biochemických vazeb přibližuje zkoumané molekuly k povrchu vlákna, a tak je možné detekovat i stopové množství zkoumaných látek [22]. Překotný výzkum v odvětví pohání zejména pokrok v laserové technice a telekomunikacích. Podle některých studií [23], [24], použití širokospektrální analýzy ve spojení s optovláknovým snímáním může odemknout nečekaný potenciál zejména v biomedicině. Tato práce se zabývá návrhem optovláknového senzoru založeném na spojení těchto technik.

V posledních letech se stále více výzkumných skupin specializuje na vývoj optovláknových biosenzorů (FOS) pro detekci bakterií. Například Taniguchi a kol. [25], vyvinul optovláknový imonusenzor¹⁴ pro detekci bakterií vyskytující se v potravinách. Pomocí sendvičové imunoassay byla na povrchu optického vlákna

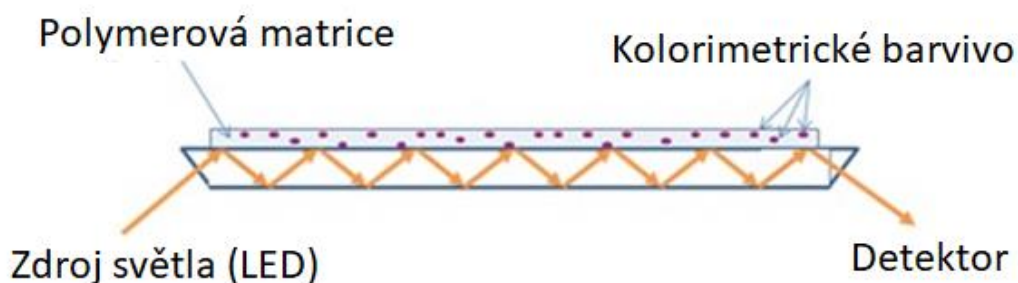
¹² Angl. Fiber Optics Sensors – FOS.

¹³ Imunoassay je metoda, využívající vazbu protilátka – antigen.

¹⁴ Senzor využívající imunoassay.

imobilizována zkoumaná *E.Coli* a detekována pomocí fluorescenčně značených polyklonálních protilátek. Touto technikou dosáhl autor úspěšné detekce bakterií v koncentracích 10^2 až 10^7 CFU/mL. Fluorescenčního značení bylo nezbytné pro dosažení vysoké citlivosti. FOS však vyniká vysokou citlivostí i bez použití jakéhokoliv značení. Velmi elegantní design FOSu pro kolorimetrickou detekci amoniaku byl publikován v časopise *Microsystem Technologies* [26]. Snímání bylo založeno na polymerovém filmu, citlivém na detekovaný plyn, který byl deponován na povrch optického vlákna. Tento senzor byl schopen detekovat koncentrace od 100 ppm¹⁵. Jeho stavba je zobrazena na obr. 9.

Díky unikátním vlastnostem se optovláknové senzory masivně používají pro detekci teploty [27], tlaku, akcelerace a pozice [28].



Obrázek 9 – Princip kolorimetrického senzoru amoniaku. Reakce plynu s barvivem zapříčiní změnu barvy barviva. Tato změna je vyhodnocena pomocí FOS [29].

Zejména pro biomedicínské aplikace je masivně využíván jev povrchových plasmonů¹⁶. SPR je široce zkoumaný fenomén, vznikající na rozhraní dvou médií s opačnými dielektrickými konstantami (kov a dielektrikum). Jev využívá kolektivní oscilace náboje elektronů excitovaných příchozím světlem. Rezonanční frekvence (při které dochází k výše popsanému jevu) pak závisí mimo jiné na indexu lomu prostředí – tzn. zkoumaného média. Deponováním metalické vrstvy (ve formě souvislé vrstvy nebo nanočástic) na optické vlákno vzniká SPR-FOS. Injektované světlo interaguje s metalickou vrstvou, vzniká SPR a prošlé světlo je analyzováno spektrometrem. Frekvence světla s nejmenší amplitudou je pak závislá na indexu lomu zkoumaného prostředí. Sciacca a kol [30] použili SPR-FOS pro velmi citlivou detekci gastrických nádorových markerů.

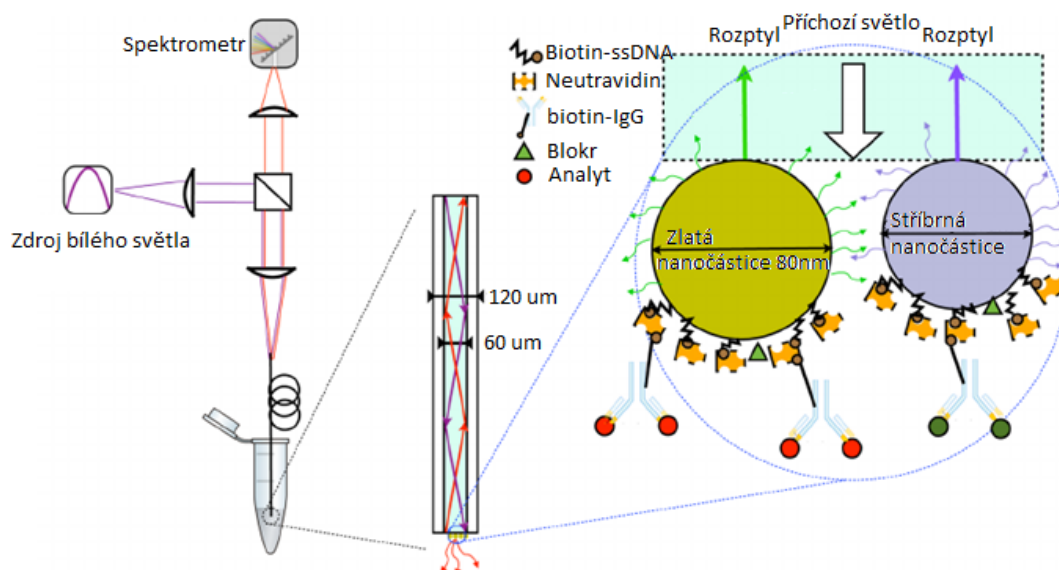
I když tato technika přímo nesouvisí s tématem disertační práce, SPR-FOS je v oboru biomedicíny (včetně detekce bakterií) široce nasazovaná a je vhodné identifikovat výhody a nevýhody této konkurenční techniky. Výhodou je velmi vysoká

¹⁵ Ppm, angl. Particles per million, je výraz pro jednu miliontinu celku.

¹⁶ Ang. Surface Plasmon Resonance – SPR.

citlivost a relativně jednoduché měření SPR jevu ve spektrech. Tyto výhody vyvažuje řada nevýhod a to zejména:

- Není možná kvantitativná analýza z důvodu limitace šířky pásma rezonančním rozsahem vodivostního pásma elektronů v kovu.
- Omezená optická tloušťka vzorku.
- Omezené možnosti následné analýzy vzorku.

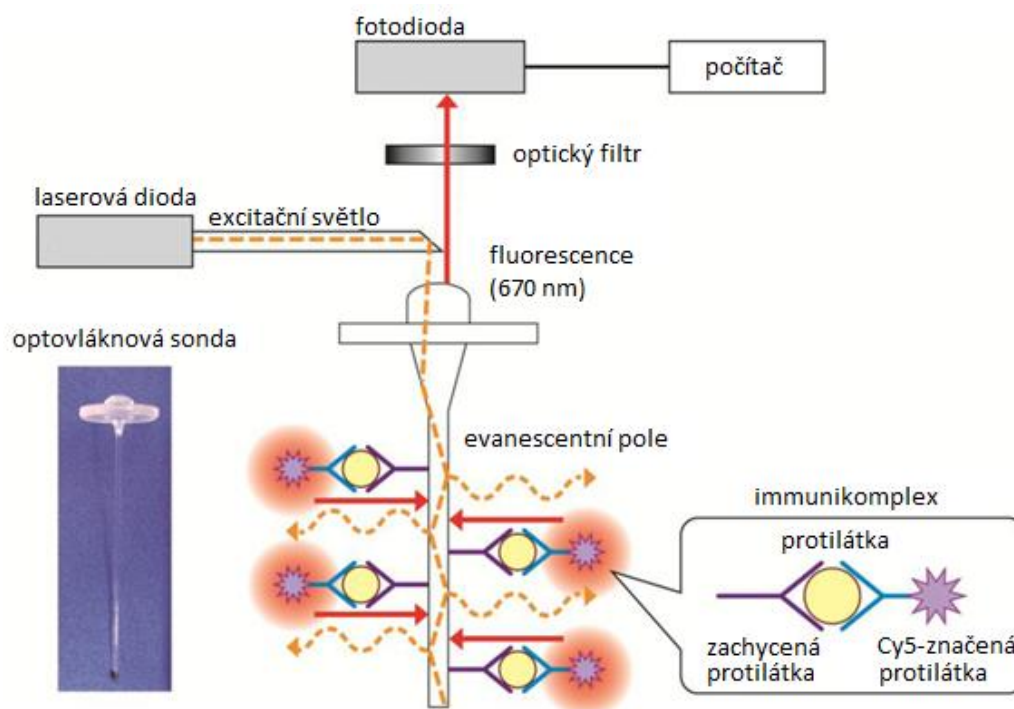


Obrázek 10 – Princip SPR senzoru podle Sciacca. Kovové nanočástice byly navázány na konec optického vlákna. Na povrch nanočástic je navázán analyt. SPR rezonanční frekvence závisí na indexu lomu analytu a projevuje se jako utlumená vlnová délka ve spektru odraženého světla [30].

Evanescentní snímání některé tyto nevýhody překonává. Optovláknová evanescentní spektroskopie (FEWS)¹⁷ vykazuje vysokou laterální selektivitu, robustnost a kompaktnost (díky optickým vláknům). Preejith a kol. [31] představil metodu a FEWS instrumentaci pro určení koncentrace proteinů. Proteiny interagovaly s bioaktivní vrstvou tvořenou imobilizovaným barvivem na povrchu optického multivídného vlákna. Změny ve struktuře funkční vrstvy vyvolané vazbou proteinu byly detekovány posunem absorpčního peaku v závislosti na jeho koncentraci. Autoři deklarují citlivé měření koncentrace až na úroveň mikrogramů. V další publikaci [32] byl obdobný senzor použit pro monitoring *Streptococci*

¹⁷ Angl. Fiber Evanescent Wave Spectroscopy - FEWS.

mutans v lidských slinách. Snímání bylo založeno na reakci sacharózy¹⁸. Intenzita reakce byla indikována imobilizovanou fotosensitivní vrstvou deponovanou na jádře opt. vlákna. Ferreira a kol. [33] navrhli FOS pro analýzu růstu *Escherichia Coli*. Bakterie se přichytily na bioaktivním polymeru imobilizovaném na vlákne. Zachycené bakterie způsobily absorpci a rozptyl evanescentní vlny.

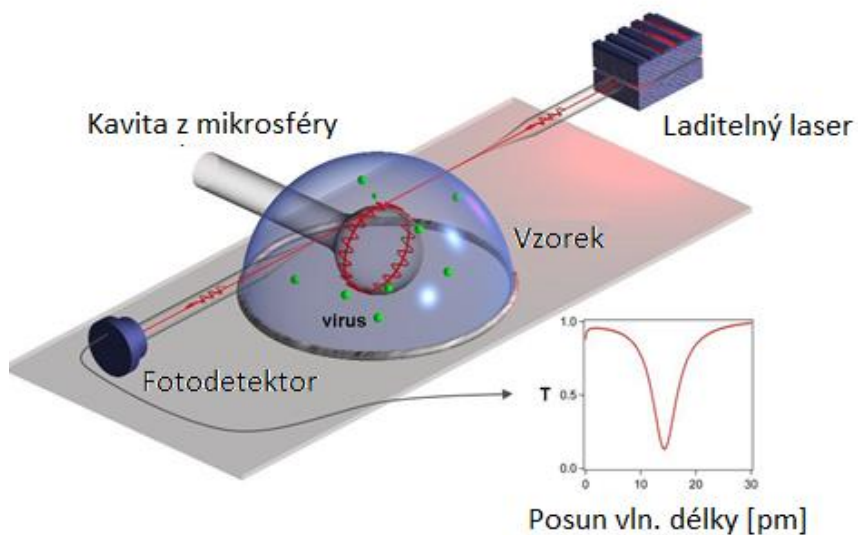


Obrázek 11 – FOS využívající FEWS podle K.Miyajima. Fluorescent (Cy5) je excitován pomocí evanescentní vlny a emitované světlo se pak odráží v optickém vlákne a je detekováno fotodiodou. Touto technikou byla detekována E.Coli v koncentracích 1000 buněk/mL [34].

V poslední době získávají na popularitě techniky syntézy mikrostruktur pro zvýšení senzitivity a síly evanescentního pole. V této oblasti se zejména prosazují fotonické krystaly, které jsou vyrobeny z periodicky se opakujících mikrostruktur. Tyto struktury dodávají sensorům unikátní vlastnosti založené na rezonanci světla. V roce 2014, Jensen a kol. představili evanescentní senzor založený na fotonickém krystalu [35]. Popsaný senzor sloužil pro detekci fluorescenčně značených biomolekul ve vodním prostředí. Vzorek byl přiveden do mikro-děří fotonického krystalového vlákna. Měřením excitovaného světla byl dosažen spodní limit koncentrace DNA 0,1 μM . V dalších studiích byly použity fotonické krystaly s negativním indexem lomu pro zesílení evanescentního pole [36].

¹⁸ Sacharóza je molekula složená z glukózy a fruktózy, se kterou se všichni setkáváme v podobě bílého cukru.

Dalším důležitým oborem výzkumu FOS jsou mikrostrukturální rezonátory založené na jevu „whispering gallery modes“¹⁹. Yuze Sun a kol [37] uvedl ve svém shrnujícím článku spodní limit detekce této techniky v řádech 100 pg. Další autoři referují o vzrůstající oblibě tohoto typu mikrostruktur především díky dostupnosti a jednoduchosti integrace do mikrofluidních systémů.



Obrázek 12 – Principiální schéma senzoru založeného na „Whispering gallery modes“ podle S.Feaze. Touto technikou lze detekovat viry a další nanočástice. Světlo je navázáno do rezonátoru a poté do detektoru. Nepatrná změna indexu lomu na povrchu rezonátoru způsobí velkou změnu výstupního signálu [38].

¹⁹ Vlny, které se šíří pomocí odrazů v uzavřeném prostoru.

Tabulka 11 – Přehled detekčních limitů některých technik. Reference a popis optických struktur lze nalézt v [39].

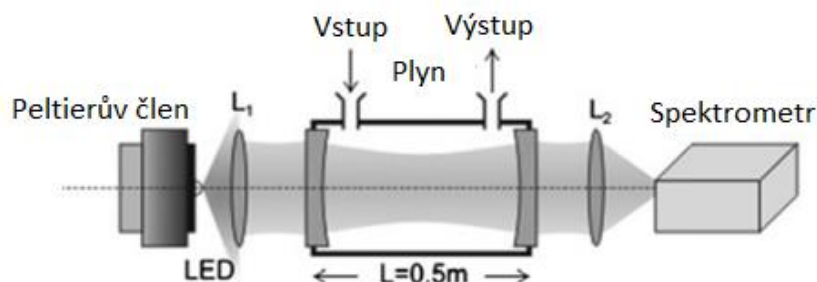
Technologie	Optická struktura	Analyt	Detekční limit
SPR	SPR	Objemový	10^{-5} - 10^{-8} IL
	SPR zobrazování	Objemový	10^{-5} - 10^{-7} IL
	SPR optický heterodyn	Proteiny	0,2 nm
	Fázově citlivý SPR	Proteiny	1,3nM
	Vlnově modulovaný SPR	DNA	10pM
	Úhlově modulovaný SPR	Protein (PSA)	0,15ng/mL
	SPR s hranolem	Bakterie Salmonella	100 cfu/mL
Rezonátory („Whispering gallery modes“)	Kruhový rezonátor na čipu	Objemový	10^{-4} - 10^{-7} IL
		DNA	100 nm
		Proteiny	20-250pg/mm ² , 0,1 nm
		Bakterie	10 ⁵ CFU/mL
	Dielektrické mikrosféry	Objemový	10^{-7} IL
		DNA	1 pg/mm ²
		Protein	10 pg/mm ²
		Bakterie	100 CFU/mL
	Kapilární opto-fluidní sféra	Objemový	10^{-6} - 10^{-7} IL
		DNA	4 pg/mm ² , 10pM
		Protein	1 pg/mm ² , 3pM
		Virus	1000 virů/mL
FOS	Braggovy mřížky	Objemový	10^{-6} IL
		DNA	0,7 µg/mL, 0,1 µM
	Dlouhé Braggovy mřížky	Objemový	10^{-4} IL
		Protein	2 µg/mL
	Nanovláknko	Objemový	10^{-7} IL
	Fabry-Perotova kavita	Objemový	10^{-5} IL
		DNA	76 µM. 1,7ng
		Protein	25 µg/mL

2.3 Intenzitně založená kavitně zesílená absorpční spektroskopie (CEAS)

Kavitně zesílená spektroskopie (CEAS) je technika pro zesílení signálů slabě absorbujících vzorků. Metoda je založena na kavitě, přes kterou několikanásobně prochází světlo a tím je zvětšena interakční délka světla a vzorku. První funkční kavitní spektrometr představil pravděpodobně Jackson [40] v roce 1962. Jackson používal tuto techniku pro měření atomových spekter. Pro spektroskopické účely lze využít CEAS buzenou nekoherentním zdrojem světla – tzv. Nekoherentní širokospektrální kavitně zesílená absorpční spektroskopie²⁰. Tyto kavity skládající se z vysokoodrazných zrcadel jsou buzeny nekoherentními zdroji jako je LED, Xenonové lampy apod. Typicky je širokospektrální světlo analyzováno pomocí rozptylu nebo interferometrickým měřením. Teoretický rozbor IBBCEAS je uveden v kap. 3.5. Od roku 2003, kdy byla tato technika publikována, byla představena řada aplikací pro měření a charakterizace plynů (kvůli nízké absorpci) – např. měření

²⁰ Angl. Incoherent broad-band cavity-enhanced absorption spectroscopy, IBBCEAS.

koncentrace NO_3 a NO_2 , HNO_2 ²¹, analýza dechu atd. Hlavními výhodami této techniky jsou relativní jednoduchost designu, vysoké temporální rozlišení a spektrální šířka. Na druhou stranu tato technika nedosahuje takové citlivosti jako časově založená kavitní ring-down spektroskopie (CRDS) protože výsledek měření ovlivňuje fluktuační intenzity budícího zdroje záření.



Obrázek 13 – Jednoduché experimentální zapojení IBBCEAS pro měření NO_2 a NO_3 . Experiment provedl E.Ventrillard-Courtillot a kol. [41].

3 TEORETICKÝ ROZBOR

Pro úspěšný návrh biosenzoru je nutné uvést teoretické základy spektroskopie i optovláknové techniky. V této kapitole jsou sepsány metody spektrální analýzy nezbytné pro splnění cílů této práce. Pro pochopení návrhu biosenzoru s NIR spektroskopií je vhodné prostudovat přílohu 2, která se zabývá matematickým zpracováním NIR spekter. Některé z uvedených technik se používá přímo v návrhu biosenzoru. Důležitá kapitola 3.4 popisuje model šíření módů v biosenzoru, což je nezbytné pro určení přenosu senzoru. Další modely šíření jsou uvedeny v příloze č. 1. Hlavním fyzikálním jevem, který využívá navržený biosenzor je evanescentní pole. Nejdůležitější výpočty jsou uvedeny v kap. 3.3. Výstupní signál senzoru je zesílen kavitou, její teoretický rozbor lze najít v kap. 3.5.

3.1 Spektroskopie blízké infračervené oblasti v mikrobiologii

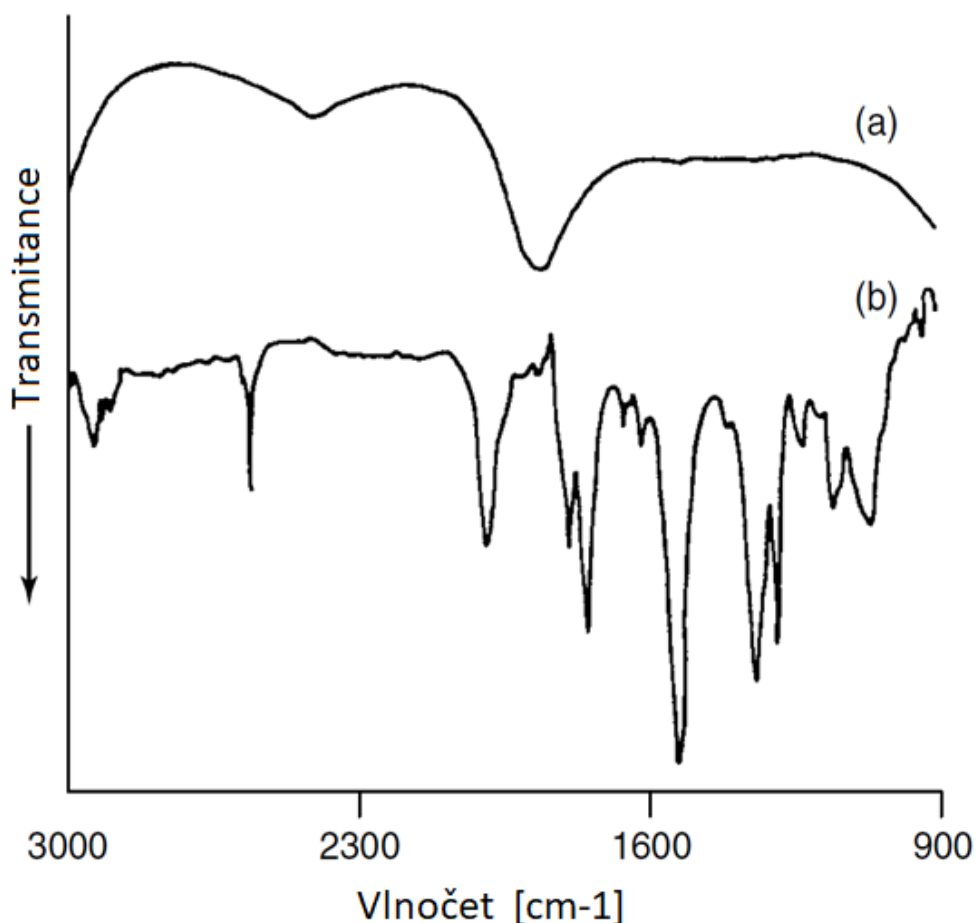
IR spektra komplexních vzorů obsahují mnoho širokých a překrývajících se peaků. Tento jev ještě výraznější v NIR části spektra, kde dochází k absorpcím kombinačních módů molekulových vazeb, které se vyznačují svojí spektrální šířkou. Prolínání absorpčních peaků znemožňuje jejich interpretaci. Níže jsou uvedeny některé konvenční metody pro nalezení a interpretaci těchto peaků. Tyto techniky

²¹ Kyselina dusitá.

jsou aplikovatelné i na spektra naměřené optovláknovým biosenzorem navrženým v kap. 6.

3.1.1 Diferenční spektroskopie

Tato jednoduchá technika spektroskopie slouží pro zvýraznění změn ve spektrech. Používá se pro interpretaci spekter, které se účastní klasifikace, nebo pro analýzu spekter vzorků, na které působí různá intenzita ovlivňující veličiny – např. teplota. Normalizovaná spektra jednotlivých vzorků se odečítají matematicky, nebo lze měřit více vzorků současně a odečet se realizuje poměrovým měřením²². Příklad diferenčního spektra je na obrázku níže. Je zde vidět, že v původním spektru (a) nejsou vidět spektrální kontury aspirinu (b). Ty lze zaznamenat až po odečtení spektra vody.



Obrázek 14 – Spektrum 1% roztoku aspirinu ve vodě (a) a diferenční spektrum (odečet čisté vody) (b) [42].

²² K poměrovým měřením s používá dvousvazkový spektrometr.

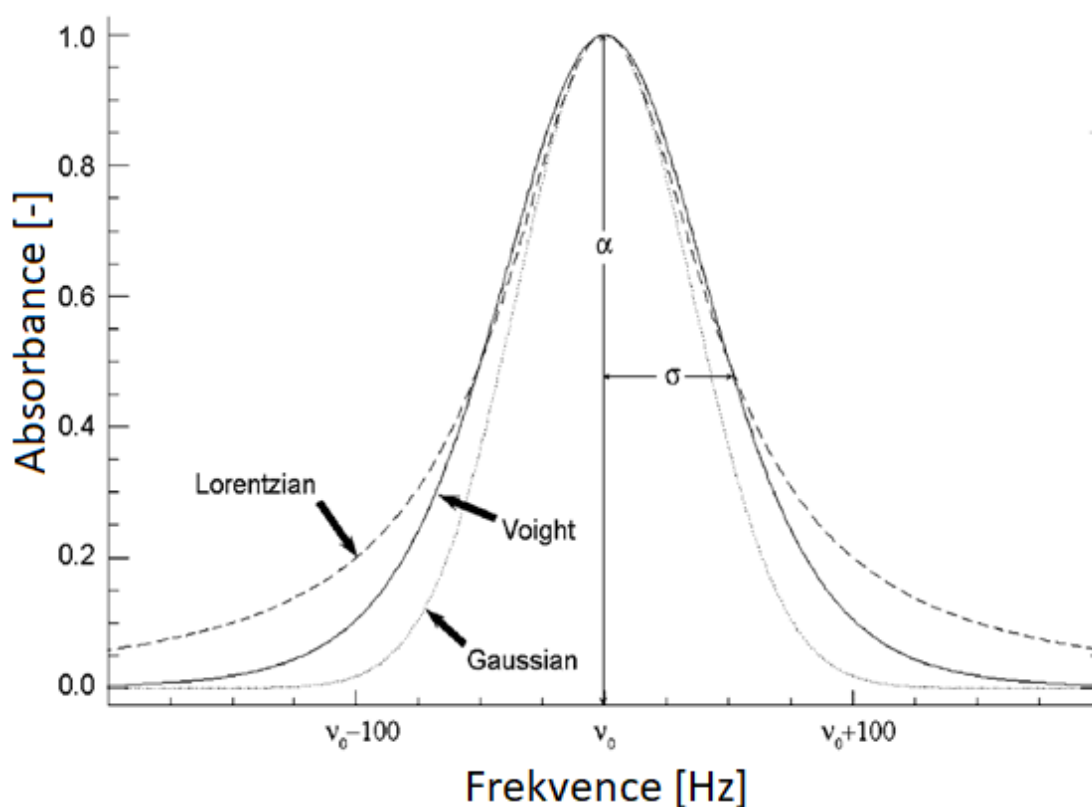
3.1.2 Prokládání křivkou

Další možností dekompozice spektra je prokládání křivkou. Analyzované spektrum je pomocí matematické aproximace dekomponováno na jednotlivé peaky. Superpozicí těchto peaků lze zpětně sestavit analyzované spektrum. Z matematického hlediska jsou peaky reprezentovány jako statistická funkce vyjadřující distribuci absorpce. Peaky jsou obvykle charakterizovány tzv. Voightovou funkcí, která modeluje rozložení absorpce (zapříčiněné především Doplerovým jevem) a Lorentzovo rozložení (zapříčiněné především kolizním a turbulentním rozšířením) [43]. Vztah 1 vyjadřuje Voightovu funkci, jejíž funkcionální tvar dovoluje pomocí speciálního parametru „ β “ modelovat Gaussovo nebo Lorentzovo rozložení. Pro „ $\beta = 1$ “ má křivka Gaussův tvar a pro „ $\beta = 0$ “ má křivka Lorentzův tvar. Obvykle je každý peak definován následujícími parametry:

- Pozice („ w_0 “) – vlnová délka (nebo vlnočet) středu peaku, která odpovídá vibrační frekvenci izolované molekuly.
- Amplituda („ A “) – výška peaku obvykle udávaná absorbancí, která odpovídá koncentraci vzorku a absorpčnímu koeficientu (absorpci vazby)²³.
- Šířka („ σ “) – šířku peaku ovlivňují dynamické procesy ve vzorku a efektivní doba relaxace molekul – viz [43][44].
- Parametr náležitosti do Gaussova, resp. Lorentzova rozložení (β)

$$V(w) = A \frac{1}{(1 + \beta^2 \left(\frac{w-w_0}{\sqrt{2}\sigma}\right)^2)^{\frac{1}{\beta^2}}}. \quad (1)$$

²³ Viz Lambert-Beerův zákon, vztah **Error! Reference source not found.**

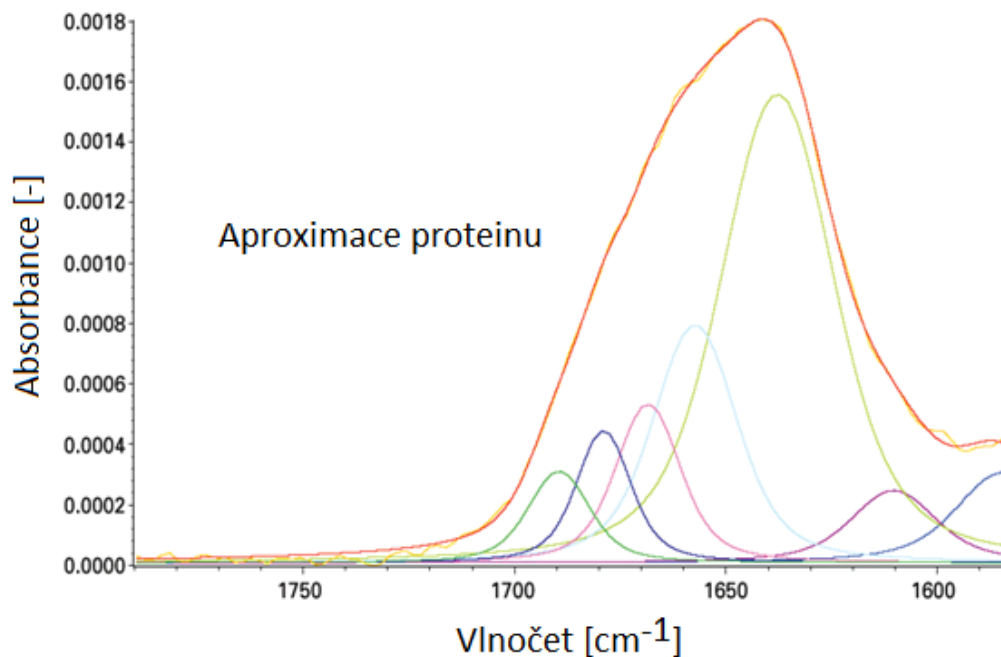


Obrázek 15 – Porovnání Gaussova (Gaussian), Lorentzova (Lorentzian) a Voightova (Voight) profilu pro modelování absorpčních peaků. Parametry funkce $A = 1$, $\sigma = 100$ a $\beta = 0,5$
Převzato z [45].

Cílem metody je minimalizovat rozdíl mezi prokládaným spektrem a spektrem, které vzniklo superpozicí modelovaných peaků – viz vztah 2.

$$\min \left\| \left\| X(w) - \sum_s A_s \frac{1}{(1 + \beta_s^2 \left(\frac{w-w_0}{\sqrt{2}\sigma_s}\right)^2)^{\frac{1}{\beta_s^2}}} \right\| \right\| \quad (2)$$

Estimace parametrů („ A “, „ w_0 “, „ σ “, „ β “) probíhá zpravidla iterační optimalizační metodou založenou na metodě nejmenších čtverců. Jedna ze široce akceptovaných metod je Levenberg-Marquardova metoda (LM). LM je obdoba Gauss-Newtonovi optimalizační metody a klasické metody nejvyššího gradientu. Více v [45][44]. Příklad proloženého spektra bílkovin je na obr. 16. Prokládání spekter křivou bylo cílem praktické části této práce – viz kap. 5.1.3.



Obrázek 16 – NIR spektrum proteinu (žlutě) a dekomponované peaky [46].

3.1.3 2D korelační spektroskopie

Dvoudimenzionální korelační spektroskopie je široce používaný nástroj pro analýzu spekter, která jsou měřena pod vlivem externí měnící se veličiny²⁴. Ačkoliv je tato metoda popsána pro NIR spektroskopii, své uplatnění najde i v ostatních molekulárně vibračních technikách, Rentgenové spektroskopii, NMR atd. [47]. Stejně jako ostatní techniky pro spektrální analýzu, 2D korelační spektroskopie slouží pro extrakci informace o chemické struktuře vzorku ze spekter, které obsahují široké a překrývající se peaky a jsou proto obtížně interpretovatelné. 2D korelační spektroskopie je vynikající nástroj pro měření biologických vzorků, protože jejich spektra mají právě tento charakter – viz [48]. Pro výpočet 2D korelačních spekter se zavádí pojem dynamické spektrum, to je spektrum, od kterého je odečteno referenční spektrum („ $A_0(w)$ “ kde „ w “ označuje vlnovou délku) – viz vztah 3 a 4. Jako referenční spektrum se obvykle považuje průměrné spektrum ze všech měření. V 2D kor. spektroskopii dále počítá synchronní a asynchronní 2D korelační spektrum, oba typy spekter se liší svým předpisem a rozdílnou interpretací výsledků.

²⁴ Např. teplota, čas, tlak, koncentrace atp.

$$\hat{A}(w, x) = A(w, x) - A_0(w), \quad (3)$$

$$A_0(w) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n A(w, x_i). \quad (4)$$

V rámci praktické části této práce byla publikována studie korelační MIR-NIR spektroskopie, která měla za úkol pomoci v interpretaci NIR peaků bakteriálních buněk. Synchronní 2D korelační spektrum posloužilo pro odhalení některých závislostí a pomohlo k identifikaci některých peaků – více v kap. 5.1.3.

3.1.3.1 Synchronní 2D korelační spektrum

Tento typ spektra reprezentuje vzájemnou korelaci intenzit (absorbancí) mezi všemi dvojicemi vlnových délek. Předpis vyjadřuje vztah 5 a v podstatě jde o průměr „n“-krát změřených kovariancí absorbance na dvou vlnových délkách („w₁“, „w₂“).

$$\Phi(w_1, w_2) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n \hat{A}(w_1, x_i) \cdot \hat{A}(w_2, x_i). \quad (5)$$

Pokud je hodnota kovariance velká, dvojice vlnových délek je navzájem závislá. Peaky na hlavní diagonále korelačního spektra (symetrické mapy), se nazývají auto-peaky a vyjadřují autokorelaci spekter. Symetrické mapy se vyjadřují ve formě 2D grafů nebo konturních map (viz reference 17).

3.1.3.2 Asynchronní 2D korelační spektrum

Na rozdíl od synchronní 2D korelační mapy, tento typ spektra reprezentuje korelaci sekvencí variací mezi dvojicemi vlnových délek („w₁“, „w₂“). Předpis je dán vztahy 6 a 7. Rovnice v podstatě vyjadřuje, jak jsou spektrální variace na daných vlnových délkách rozdílné vlivem pertrubované veličiny. Výsledná mapa je antisymetrická a peaky vznikají pouze tehdy, pokud dynamické spektrální variace jsou mimo fázi.

$$\psi(w_1, w_2) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n \hat{A}(w_1, x_i) \cdot \sum_{k=1}^n N_{ik} \hat{A}(w_2, x_k), \quad (6)$$

kde „N_{ik}“ vyjadřuje prvek v Hilbert-Nodově matici N – více v [48].

$$N_{ik} = \begin{cases} 0 & \text{if } i=k \\ 1 & \text{if } i \neq k \end{cases} \cdot \frac{1}{\pi(k-i)}. \quad (7)$$

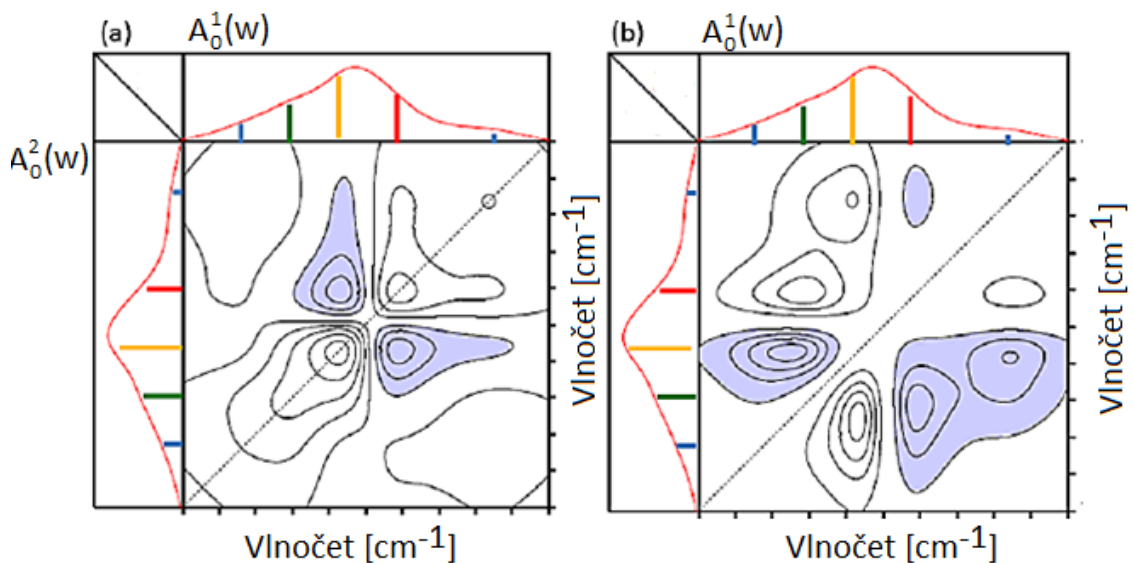
Peaky v asynchronním 2D korelačním spektru se interpretují zejména společně se synchronním spektrem, a to podle těchto pravidel („A“ značí peak v asynchronním spektru, „S“ značí peak v synchronním spektru):

$A > 0, S > 0$ Absorbance vzhledem k pertrubované veličině se mění u w_1 a pak w_2 .

$A > 0, S < 0$ Absorbance vzhledem k pertrubované veličině se mění u w_2 a pak w_1 .

$A = 0, S \neq 0$ Absorbance vzhledem k pertrubované veličině se mění najednou.

$A \neq 0, S = 0$ Sekvence nelze určit.



Obrázek 17 - 2D synchronní (a) a asynchronní (b) konturní mapa IR spekter proteinu s pertrubací teploty [48].

3.2 NIR obraz bakteriální buňky

Po chemické stránce tvoří bakterie jednu z nejkompexnějších tříd buněk [49]. Z chemického hlediska bakteriální buňka obsahuje tyto molekuly (většinou ve formě polymerů):

Tabulka 12 – Chemické složení bakterií.

Procentuální zastoupení	Molekuly
70%	Voda
15%	Proteiny
6%	RNA
2%	Fosfolipidy
2%	Polysacharidy
1%	DNA
4%	Ostatní molekuly

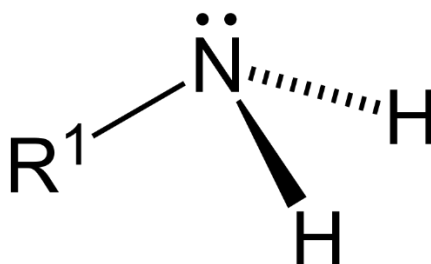
Buňky se rozdělují na prokaryotické a eukaryotické. Název prokaryotická buňka vychází z řeckého pojmenování pro (před) a karyon (jádro). To naznačuje jeden z nejvýraznějších rozdílů pro- a eukaryotické buňky. Prokaryotická buňka postrádá jádro.

U obou typů buněk lze rozlišit tři základní chemické polymery, které tvoří strukturu buňky. Mezi tyto polymery patří nukleové kyseliny (DNA, RNA), proteiny a lipidy. Struktury tvořící tyto polymery se ale u prokaryotické bakterie velmi liší. Deoxyribonukleová kyselina, tedy nositelka dědičné informace, je u bakterií volně umístěna v cytoplazmě ve formě chromozomu. Je uchycena cytoplazmatickou membránou pomocí struktury zvané mezomom, která napomáhá replikaci DNA při dělení buňky. Z chemického hlediska jde o polymer nukleotidů (dále deoxyribóza, kyselina fosforečná, dusíkatá báze) spojených fosfodiesterovými můstky. Některé bakterie obsahují další samostatné molekuly DNA – tzv. plazmidy [10]. Další typ nukleové kyseliny – ribonukleová kyselina (RNA) slouží jako prostředník při přepisu genetické informace z DNA do jeho funkční formy. RNA tvoří hlavní složku ribozomů, tj. struktur, které jsou umístěny volně v cytoplazmě a jsou odpovědné za proteosyntézu. Z chemického hlediska je RNA velmi podobná DNA až na výskyt ribózy v nukleotidu a nahrazení dusíkaté báze thyminu uracilem. Koncentrace RNA v buňce je o několik řádů vyšší než koncentrace DNA. Nejvýraznější IR aktivní molekulové vazby nukleonových kyselin jsou $P=O^{25}$, a to především jejich antisymetrický valenční vibrační mód.

Proteiny jsou nejčastější strukturou vyskytující se v buňce. Jsou finálními vykonavateli genetické informace (po přepisu z DNA a překladu z RNA) a jsou odpovědné za téměř všechny aktivní procesy odehrávající se v buňce. Např. enzymatické proteiny katalyzují metabolické reakce pro zajištění dostatečného přísunu energie, zatímco strukturální proteiny tuto energii přeměňují na mechanický pohyb. Z chemického hlediska se jedná o řetězec aminokyselin spojených

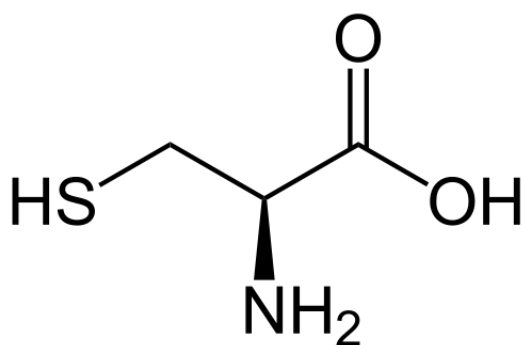
²⁵ Vazba se nachází v molekule PO_2 .

peptidovou vazbou. Každá aminokyselina nese speciální postranní řetězec, který může být chemicky odlišný a zajišťuje funkci vznikajících proteinů.



Obrázek 18 - Primární aminy.

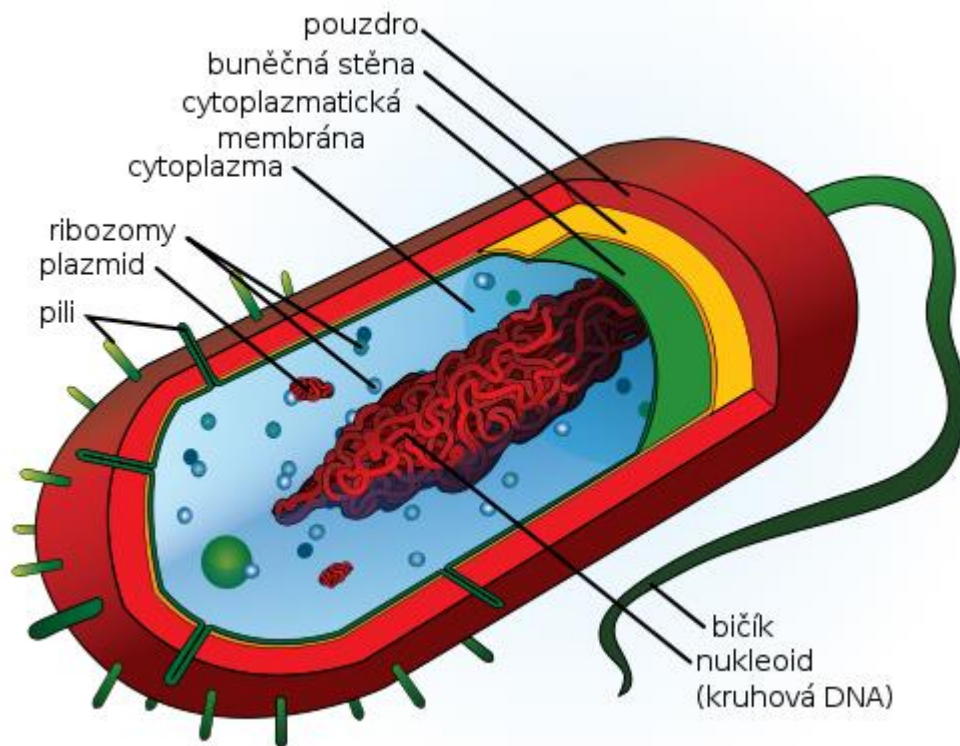
V IR spektru proteinů absorbují především peptidové řetězce (CH₃), a N-H valenční módy v amidové skupině A a B [50]. Další významnou molekulovou vazbou z hlediska IR vibrační spektroskopie je C=O vazba v amidové skupině I. Výraznou absorpci vykazují C-N a N-H valenční módy vazeb nacházející se v amidové skupině II a I. V IR spektru mohou být také viditelné postranní aminové řetězce. Tyto řetězce jsou specifické pro jednotlivé proteiny a jejich IR spektrum se využívá pro jejich identifikaci – např. S-H vazby v cysteinu lokalizované na 2551 cm⁻¹.



Obrázek 19 - Molekula cysteinu.

Fosfolipidy jsou hlavní složkou cytoplazmatické membrány, která odděluje bakteriální buňku od svého okolí. Fosfolipid se skládá z hydrofobní a hydrofilní složky. Hydrofilní složka je vystavena okolí, zatímco hydrofobní složka tvoří vnitřní vrstvu cytoplazmatické membrány. Díky tomuto sestavení může cytoplazmatická membrána filtrovat přicházející látky z okolního prostředí pomocí selektivních kanálů. Chemicky jsou fosfolipidy složeny z dlouhých uhlíkatých řetězců, které jsou zakončeny fosfátovou nabitou skupinou. Silnou absorpci fosfolipidů lze naměřit především v případě CH₂,CH₃ a NH₃ symetrických a antisymetrických valenčních a deformačních vibrací [51][50]. Fosfodiesterly jsou detekovatelné na vlnové délce 1240 nm kde vykazují P=O antisymetrické valenční vibrace.

Další struktury bakteriální membrány se liší podle tzv. gramova barvení [49]. U gram-pozitivních bakterií je přítomna silná vrstva peptidoglykanu, která dosahuje až 90% hmotnosti buňky. U gram negativních je tato vrstva slabší, ale je přítomna ještě jedna cytoplazmatická membrána obalující peptidoglykan, který tvoří okolo 20% hmotnosti buňky. Především paralelní polysacharidové řetězce N-acetylglukosaminu and N-acetylmuramové kyseliny je možné zachytit v IR spektru (C-H,C=O). Detailní výčet všech IR aktivních molekulových vazeb je uveden v tabulce 10.



Obrázek 20 - Struktura bakteriální buňky. Obrázek je převzat z [52].

3.3 Fresnelovy rovnice pro výpočet absorbovaného evanescentního pole

Protože biosenzor navržený v praktické části této práce využívá absorpci evanescentního pole, budou v této kapitole stručně základní výpočty nezbytné pro kvalifikovaný návrh.

Index lomu lze definovat jako komplexní číslo, tato reprezentace je nutná pro analýzu modelů s úhlem dopadu vyšším než kritickým – viz rovnice 8, která lze řešit jen v komplexním oboru čísel.

$$\sin(\theta_t) = \frac{n_1}{n_2} \cos(\theta_0). \quad (8)$$

V případě totálního vnitřního odrazu je splněna podmínka 9.

$$\frac{n_1}{n_2} \cos(\theta_0) > 1. \quad (9)$$

„Sin(θ_t)“ pak lze řešit jen v oboru komplexních čísel – viz rovnice 10 a 11.

$$\cos(\theta_t) = \sqrt{1 - \sin^2(\theta_t)} = i\sqrt{\sin^2(\theta_t) - 1}, \quad (10)$$

$$\cos(\theta_t) = i \sqrt{\frac{\sin^2(\theta_0) - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}{\frac{n_2}{n_1}}}. \quad (11)$$

Po dosazení rovnic 10 a 11 do Fresnelových rovnic, dostáváme poměr dopadající a odražené intenzity elektrického pole²⁶ v případě totálního odrazu.

$$\frac{E_r^s}{E_0^s} = \frac{n_1 \cos \theta_0 - i \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_0 - n_2^2}}{n_1 \cos \theta_0 + i \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_0 - n_2^2}}, \quad (12)$$

$$\frac{E_r^p}{E_0^p} = \frac{n_2^2 \cos \theta_0 - i \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_0 - n_2^2}}{n_2^2 \cos \theta_0 + i \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_0 - n_2^2}}. \quad (13)$$

Jak vyplývá z předchozích rovnic, absolutní hodnota poměru intenzit dopadajícího a odraženého pole je vždy 1. Pokud tedy vyjadřujeme index lomu pouze jako reálné číslo, nastává totální odraz bez ztráty energie. To platí v případě,

²⁶ Neboli koeficienty odrazu.

že je druhé prostředí bezztrátové. V opačném případě je potřeba zavést komplexní index lomu – viz vztah 14.

$$\hat{n} = n - i\kappa. \quad (14)$$

V této reprezentaci vyjadřuje „n“ reálný index lomu, který má vztah k rychlosti šíření světla v daném prostředí. Imaginární část „κ“ se nazývá extniční koeficient a je proporční absorpčnímu koeficientu látky na dané vlnové délce („α“) – viz vztah 15.

$$\kappa = \frac{A}{cL}, \quad (15)$$

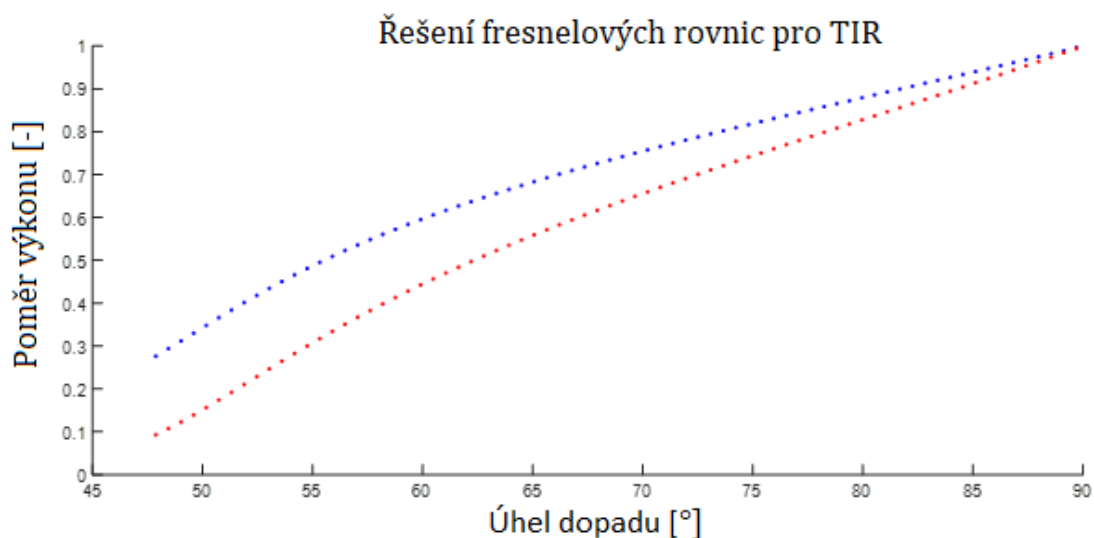
- A – Změřená absorbance. Je nutné upozornit, že změřená absorbance je závislá na metodice měření. Uvedená absorbance platí pro transmisní měření a nelze ji přímo aplikovat pro evanescentní snímání²⁷.
- c – koncentrace analytu.
- L – délka měřicí dráhy neboli tloušťka vzorku.

Substitucí 14 do 12-13 dostáváme Fresnelovi rovnice pro komplexní index lomu. Rovnice 16 a 17 vyjadřují poměr výkonu dopadajícího a odraženého paprsku. Výpočet těchto rovnic je uveden ve formě grafu v obr. 21.

$$\left(\frac{E_r^s}{E_0^s}\right)^2 = \left[\frac{(n_1 - i\kappa_1)\cos\theta_0 - i\sqrt{(n_1 - i\kappa_1)^2\sin^2\theta_0 - (n_2 - i\kappa_2)^2}}{(n_1 - i\kappa_1)\cos\theta_0 + i\sqrt{(n_1 - i\kappa_1)^2\sin^2\theta_0 - (n_2 - i\kappa_2)^2}} \right]^2, \quad (16)$$

$$\left(\frac{E_r^p}{E_0^p}\right)^2 = \left[\frac{(n_2 - i\kappa_2)^2\cos\theta_0 - i(n_1 - i\kappa_1)\sqrt{(n_1 - i\kappa_1)^2\sin^2\theta_0 - (n_2 - i\kappa_2)^2}}{(n_2 - i\kappa_2)^2\cos\theta_0 + i(n_1 - i\kappa_1)\sqrt{(n_1 - i\kappa_1)^2\sin^2\theta_0 - (n_2 - i\kappa_2)^2}} \right]^2. \quad (17)$$

²⁷ Absorbance je logaritmus absorpce. Absorpce je převrácená hodnota transmise.



Obrázek 21 – Poměr výkonů dopadajícího a odraženého paprsku v oblasti totálního vnitřního odrazu (TIR). Jde o výpočet rovnic 16 a 17. Výkon závisí na polarizaci (s – horní křivka, p – spodní křivka). Platí pro rozhraní mezi křemenem ($n_1=1,457$) a vzduchem ($n_2=1$) s extinkčním koeficientem $\kappa_2 = 0.1$.

3.4 Modelování evanescentního multimódového optovláknového senzoru

Pro návrh optovláknového senzoru je nutné stanovit model šíření světla. Jeden z nejkompaktnějších modelů evanescentního multimódového optovláknového senzoru stanovil A. Messica a kol. [53]. Vycházel ze standardních geometrických modelů šíření módů v multimódovém vlákne²⁸. Tyto modely byly doplněny o výpočet evanescentního pole a jeho útlumu. Model Messicy a kol. navíc dovoluje parametrizovat podmínky navazování světla (úhel osvitů navazovaného světla). Model popisuje absorpci v rovném, multimódovém vlákne se skokovou změnou indexu lomu buzeným **nekoherentním** zdrojem světla. Model nepopisuje interference jednotlivých módů.

3.4.1 Základní rovnice modelu

Předpokládejme ideálně přímé multimódové vlákno s indexem lomu jádra „ n_{co} “ a indexem lomu okolí „ n_{cl} “. Uvažujme silně vedoucí vlákno s normalizovanou

²⁸ Jde především o práce Kapanyho [115] a Pottera [56].

frekvencí $\gg 1$ (parametr „V“). Tzn. že vlákno přenáší velký počet módů. Normalizovaná frekvence lze vypočítat podle vztahu 18.

$$V = \frac{2\pi a}{\lambda} \sqrt{n_{co}^2 - n_{cl}^2}, \quad (18)$$

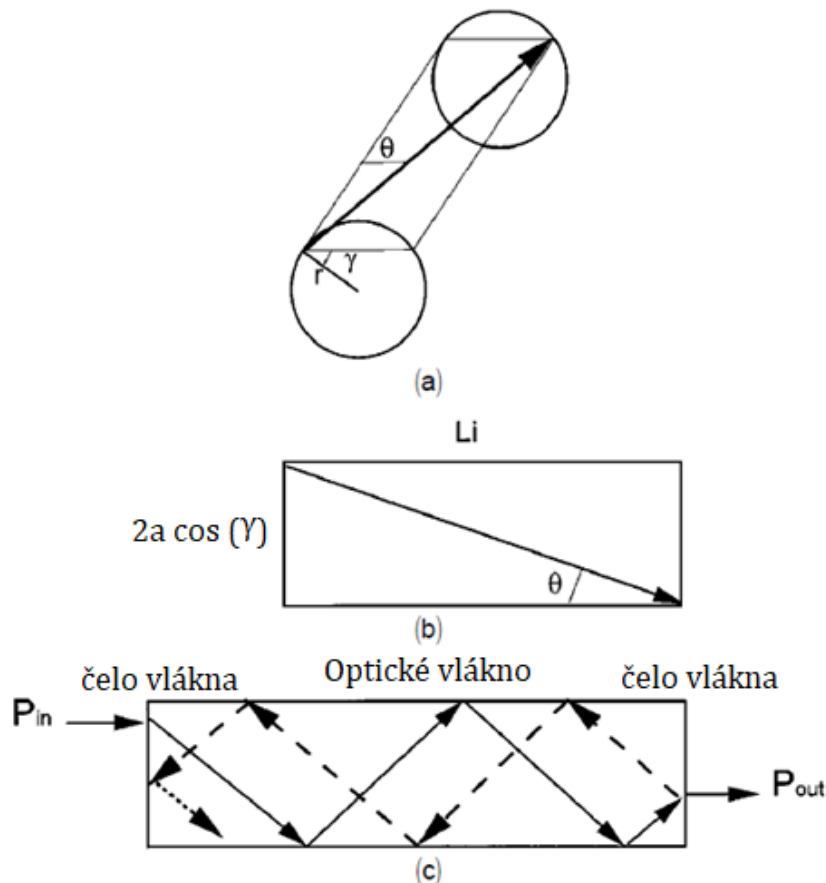
kde „ λ “ je vlnová délka světla a „ a “ vyjadřuje poloměr vlákna. Přenos vlákna se pak spočítá podle základní rovnice modelu.

$$P(L, a) = \int \int T(r, \gamma, \theta, \varphi) I(r, \gamma, \theta, \varphi) dS d\Omega, \quad (19)$$

- $P(L, a)$ – Výkonová transmitance vlákna o délce „ L “ a poloměru „ a “.
- $I(r, \gamma, \theta, \varphi)$ – Intenzitní distribuční funkce na čele vlákna.
 - Směr šíření paprsku je definována axiálním úhlem „ θ “ a úhlem „ γ “, tj. úhlem roviny šíření paprsku – viz obr. 22²⁹.
 - r, φ – polární souřadnice vstupu na čele vlákna³⁰.
- $T(r, \gamma, \theta, \varphi)$ – Obecná transmisní funkce počítaná s Fresnelových rovnic, absorpcí, TIR atd.

²⁹ Pro více informací, viz originální článek autora [53].

³⁰ Pro více informací, viz originální článek autora [53].



Obrázek 22 – Vysvětlení proměnných vystupující v rovnici 19. (a) Rovina šíření paprsku definovaná úhly γ a θ . (b) Boční pohled na rovinu šíření paprsku. (c) Vícenásobné Fresnelovi odrazy ve vlákně [53].

Transmisní funkce byla definována pomocí analýzy jevů uvnitř vlákna a byla stanovena takto:

$$T(r, \gamma, \theta, \varphi) = \frac{T_{ps}^2(R_{atr})^N e^{-\alpha_{co} L_p}}{M(\theta, \gamma)}. \quad (20)$$

Vysvětlení všech symbolů použitých v uvedené rovnici lze nalézt v podkapitolách níže.

3.4.2 Podmínka šíření světla v jádře vlákna

Úhly „ θ “ a „ γ “ definují úhel dopadu paprsku na rozhraní, je proto nutné zavést efektivní úhel odrazu, který popisuje úhel paprsku vůči rozhraní při interakci.

$$\cos \psi = \sin \theta \cos \gamma. \quad (21)$$

Je zřejmé, že základní podmínka pro TIR ($\sin \psi \geq \frac{n_{co}}{n_{cl}}$), musí být zachována. Z rovnice 21 lze pak odvodit podmínku pro vedení světla v multimódovém vlákne:

$$\psi \leq \sqrt{1 - \frac{n_{cl}^2}{n_{co}^2}}, \quad (22)$$

$$\psi \leq \frac{\sqrt{n_{co}^2 - n_{cl}^2}}{n_{co}}. \quad (23)$$

Pro „ $\gamma = 0$ “, paprsky procházejí osou vlákna a kritický úhel „ θ_c “ je pak dán pouze indexy lomu prostředí:

$$\theta_c = \sin^{-1} \frac{\sqrt{n_{co}^2 - n_{cl}^2}}{n_{co}}. \quad (24)$$

Vztah 24 byl oproti originální publikaci opraven, správný tvar tohoto vztahu je v originální publikaci R.J. Pottera[54] a vychází ze vztahů 21 a 23. Dále je nutné definovat následující veličiny:

Maximální úhel „ θ_M “, který definuje maximální inklinaci světla, která ještě projde rozhraním okolí-jádro vlákna (index lomu okolí předpokládáme = 1).

$$\theta_M = \sin^{-1} \frac{1}{n_{co}}. \quad (25)$$

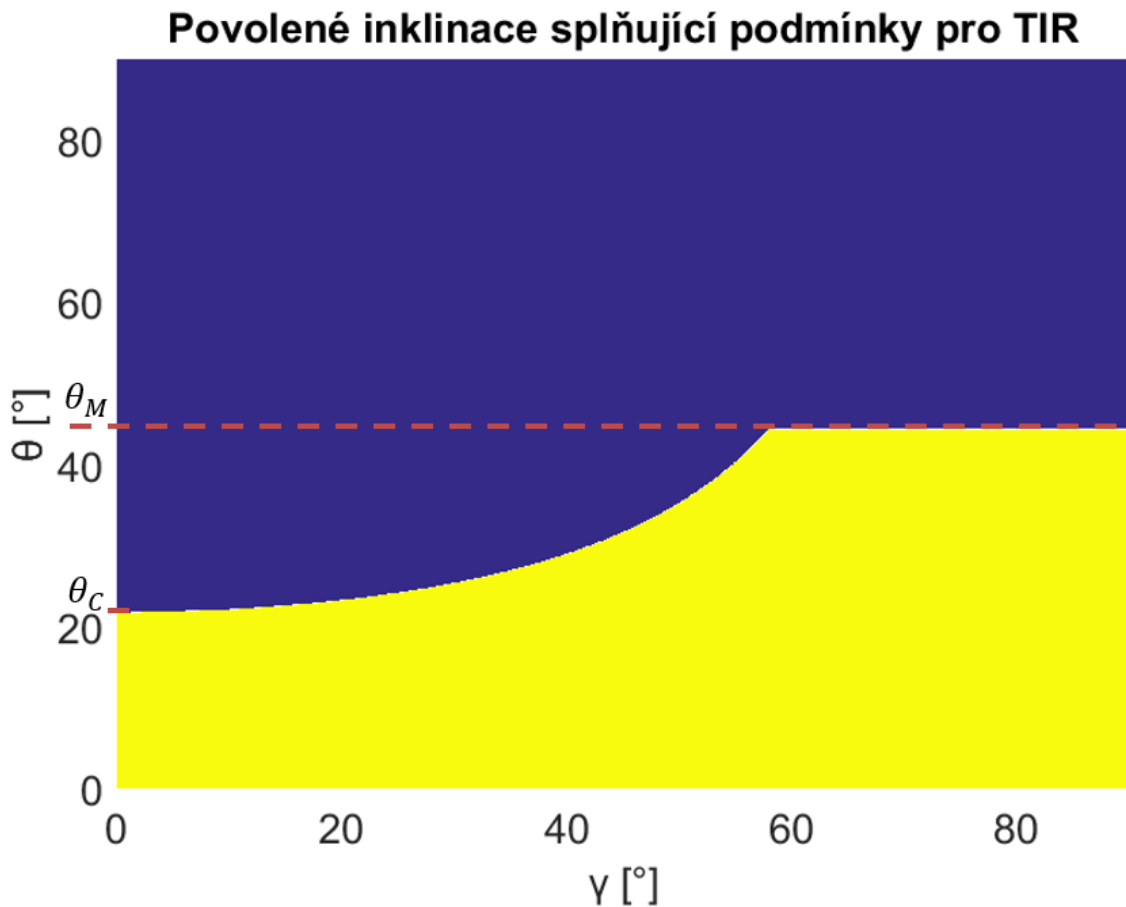
Dolní hranici „ γ_m “ pro paprsky s inklinací v rozmezí $\theta_c - \theta_M$.

$$\gamma_m = \cos^{-1} \frac{\sin \theta_c}{\sin \theta}. \quad (26)$$

Integrační limity pro „ γ “ jsou pak následující (graficky zobrazeny na obr. 23):

$$\begin{aligned} 0 \leq \gamma \leq 90^\circ & \text{ pro } \theta \in (0, \theta_c), \\ \gamma_m \leq \gamma \leq 90^\circ & \text{ pro } \theta \in (\theta_c, \theta_M). \end{aligned} \quad (27)$$

Je vidět, že vlivem efektivního úhlu se vlákem šíří i paprsky, které do vlákna vstupují pod větším úhlem, než dovoluje numerická apertura vlákna (větší než θ_c) – tzv. mimoosové paprsky.



Obrázek 23 – Povolená kombinace úhlů (θ a γ) pro vedení světla pomocí TIR. Povolené kombinace jsou znázorněny žlutě. $n_{co} = 1.432$, $n_{cl} = 1.33$.

3.4.3 Fresnelovy odrazy na čele vlákna

Odraz na čele vlákna lze spočítat z úhlu inklinace „ θ “, úhel „ γ “ je pro tento výpočet irelevantní, protože se jedná o úhel kolmý na rovinu čela vlákna. Výkonové transmisní koeficienty (pro s a p polarizaci) odvozené ze základního tvaru Fresnelových rovnic [55] jsou (rovnice platí pro navazování z prostředí $n = 1$):

$$T_p = \frac{4n_{co} \cos(\theta)b}{(n_{co} \cos \theta + b)^2}, \quad (28)$$

$$T_s = \frac{4n_{co} \cos(\theta)b}{(\cos \theta + n_{co}b)^2}, \quad (29)$$

$$b = \sqrt{1 - n_{co}^2 \sin^2 \theta}. \quad (30)$$

Výsledná transmise pro nepolarizované světlo:

$$T_{ps} = \frac{T_p + T_s}{2}. \quad (31)$$

3.4.4 Intrinsická a evanescentní absorpce

Pro výpočet absorpce senzoru je nutné znát počet odrazů a dráhu mezi jednotlivými odrazy. V Messicově modelu byly použity vztahy stanovené ve studiích Pottera [56].

Celkový počet odrazů paprsku:

$$N = \frac{L \tan \theta}{2a \cos \gamma}. \quad (32)$$

Vzdálenost mezi odrazy:

$$L_i = \frac{2a \cos \gamma}{\sin \theta}. \quad (33)$$

Zajímavé je, že celková dráha, kterou paprsek urazil je nezávislá na úhlu šikmě vedených paprsků („ γ “). Šikmě vedené paprsky mají více odrazů, ale kratší dráhu mezi odrazy (viz obr. 25).

$$L_p = NL_i = \frac{L}{\cos \theta}. \quad (34)$$

Výpočet pro intrinsickou absorpci multimódového vlákna pak vychází z Lambert-Beerova zákona („ α_{co} “ je absorpční koeficient jádra)³¹:

$$a_{cl} = e^{-\alpha_{co} L_p}. \quad (35)$$

Evanescentní útlum závisí rovněž na polarizaci a vychází z rovnic 16 a 17. Upravením těchto rovnic pro optické vlákno, je možné sestavit vztah pro výpočet reflexních výkonových koeficientů. Postup odvození je uveden v referenční literatuře [53].

$$r_s^2 = 1 - \frac{4n_{co}n_{cl}^2 \cos \psi \left(\frac{\kappa_{cl}}{n_{cl}} - \frac{\kappa_{co}}{n_{co}} \right)}{(n_{co}^2 - n_{cl}^2) \sqrt{n_{co}^2 \sin^2 \psi - n_{cl}^2}}, \quad (36)$$

$$r_p^2 = 1 - \frac{4n_{co}n_{cl}^2 \cos \psi \left(\frac{\kappa_{cl}}{n_{cl}} - \frac{\kappa_{co}}{n_{co}} \right) (2n_{co}^2 \sin^2 \psi - n_{cl}^2)}{(n_{co}^2 - n_{cl}^2) \sqrt{n_{co}^2 \sin^2 \psi - n_{cl}^2} (n_{co}^2 \sin^2 \psi - n_{cl}^2 \cos^2 \psi)}, \quad (37)$$

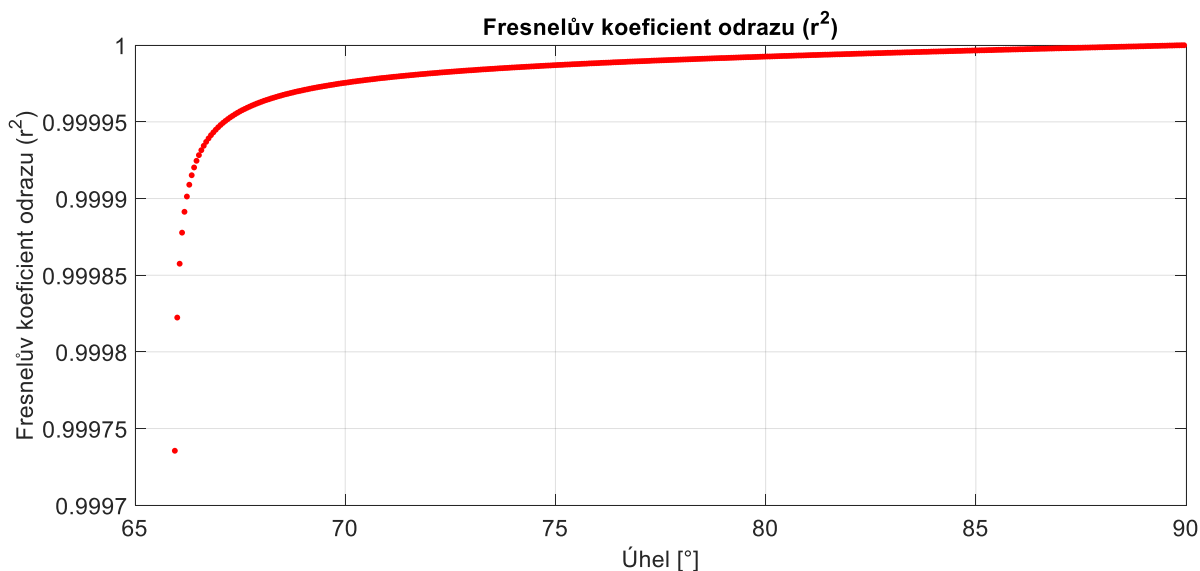
³¹ Vztah je platný pro jeden mód.

- κ_{co}, κ_{cl} je koeficient závislý na absorpčním koeficientu jádra a prostředí.³²

Pro nepolarizované světlo opět platí:

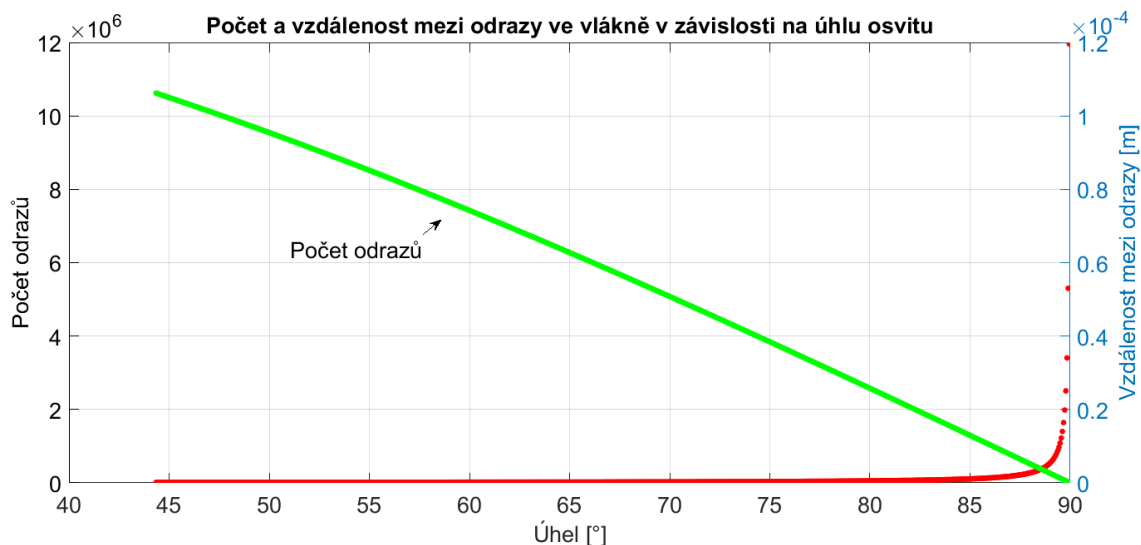
$$R_{atr} = \frac{r_p^2 + r_s^2}{2}. \quad (38)$$

Výpočet „ R_{atr} “ pro různé úhly dopadu je na obrázku 24. K největšímu útlumu dochází při úhlu blízkému TIR.



Obrázek 24 – Závislost Fresnelova koeficientu odrazu na úhlu dopadu. Podmínky byly modelovány pro tyto podmínky: $\lambda = 980 \text{ nm}$, $n_{co} = 1.432$, $n_{cl}=1.33$, $\alpha_2=10$.

³² $\kappa = \frac{\alpha\lambda}{2\pi}$



Obrázek 25 – Počet a vzdálenost mezi odrazy ve vlákne v závislosti na úhlu osvitu. Podmínky byly modelovány pro vlákno o průměru 105 μm a azimutním úhlem osvitu 45 $^\circ$.

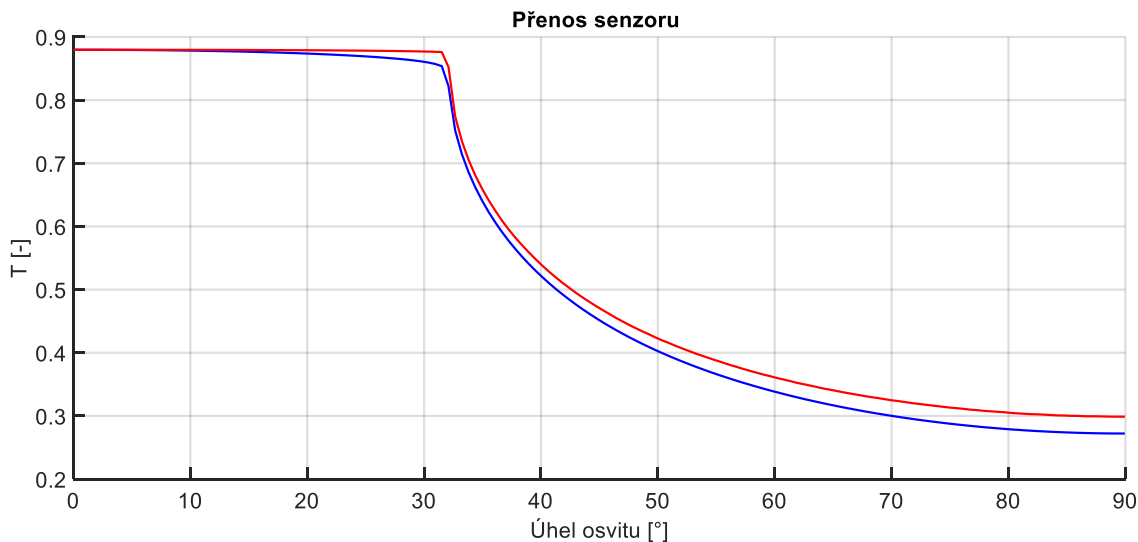
3.4.5 Odraz na koncích vlákna

I když je vliv odrazu na koncích vlákna z hlediska výkonové ztráty zanedbatelný, model ho zahrnuje. Pomocí Fresnelových rovnic ve standardním tvaru lze vypočítat koeficient odrazu „ R_{back} “. Výsledný podíl odražené energie je pak popsán rovnicí 39 – viz obr. 22c.

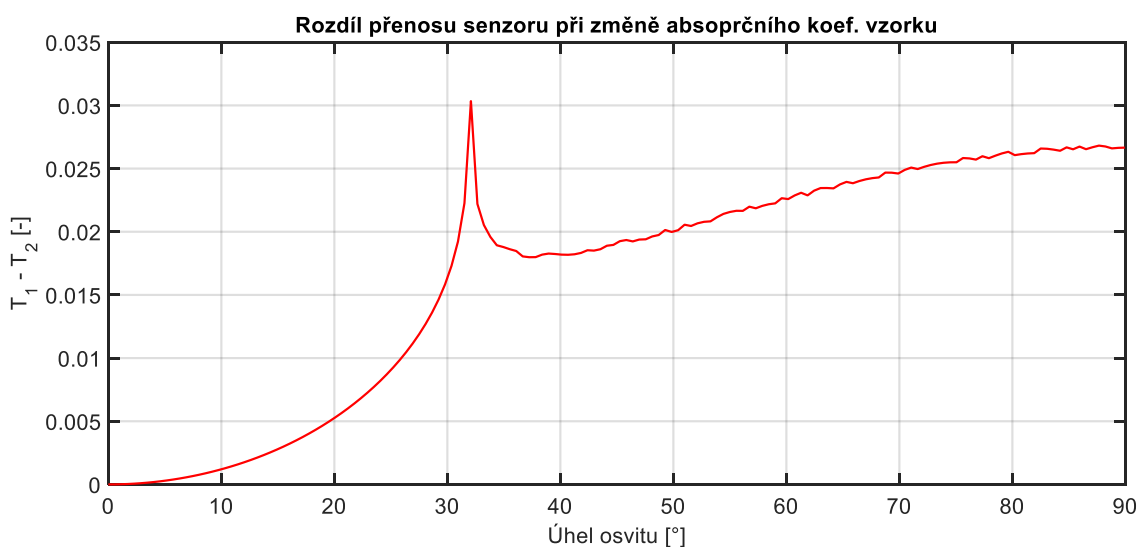
$$M(\theta, \gamma) = 1 - (R_{\text{back}}^2 (R_{\text{atr}})^N e^{-\alpha_{\text{co}} L_p})^2. \quad (39)$$

3.4.6 Přenos senzoru

Na obrázku 26 je graf závislosti přenosu senzoru vypočítaného podle rovnice 19. Přenos je konstantní, po překročení numerické apertury vlákna klesá. V grafu jsou průběhy pro různé hodnoty absorpčního koeficientu vzorku, jejich rozdíl je zobrazen na obr. 27. Je vidět, že největší citlivost na změnu absorpčního koeficientu vzorku je těsně po překročení akceptačního úhlu optického vlákna. S vzrůstajícím úhlem citlivost stoupá, protože větší část světelného výkonu je vedena mimosovými paprsky, které jsou citlivější na změny abs. koef. vzorku.



Obrázek 26 – Přenos senzoru pro různé úhly osvitů. Absorpční koeficient vzorku: 1 (červená), 10 (modrá). Vlnová délka: 980 nm, Délka: 10 cm, Průměr: 105 μ m, Index lomu vzorku: 1.33.

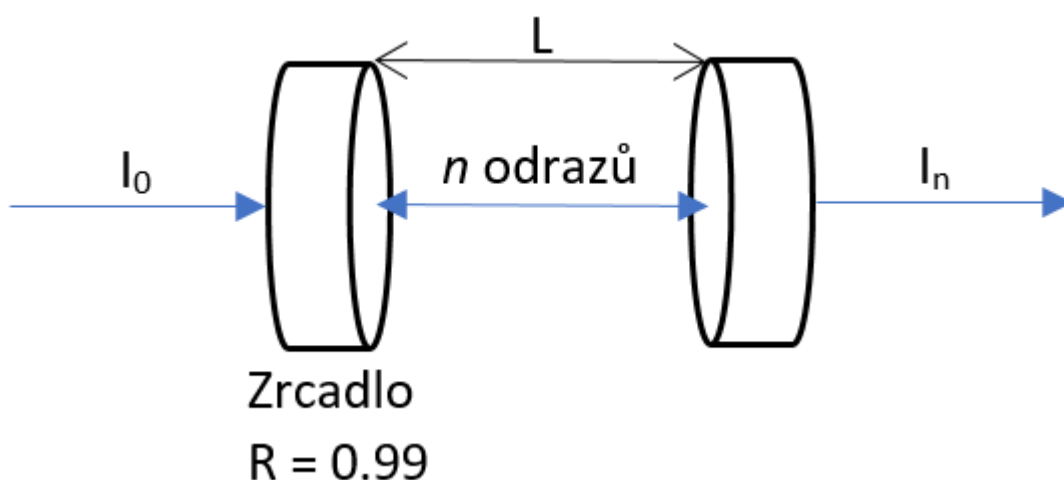


Obrázek 27 – Citlivost na změnu absorpčního koeficientu vzorku na úhlu osvitů. Vlnová délka: 980 nm, Délka: 10 cm, Průměr: 105 μ m, Index lomu vzorku: 1.33.

3.5 Intenzitně založená kavitně zesílená spektroskopie (CEAS)

Jak vyplývá z předchozího teoretického rozboru, absorpce světla evanescentní vlnou je velmi malá. Jedním ze způsobů, jak absorpci zesílit, spočívá v mnohonásobné interakci světla se vzorkem – tato velmi citlivá technika detekce se nazývá kavitně zesílená spektroskopie.

Principiální schéma CEAS je na obr. 28. Vstupní světlo má konstantní intenzitu (I_0), který je tlumen v kavitě a změřen detektorem za kavitou. Velkou výhodou CEAS je její jednoduchost a přímočarost, měření je však ovlivněno fluktuací zdroje světla. Pokud uvažujeme základní uspořádání z obr. 28 **Error! Reference source not found.**, v kavitě se udrží pouze některé módy záření, dané geometrií kavity. Navíc se kvůli termálnímu driftu a mechanické nestabilitě kavity tyto módy mění. Tyto vlivy je nutné vzít v úvahu při návrhu CEAS sestavy. Jednoduchost metody umožňuje použití širokospektrálního nekoherentního zdroje světla³³, což je komplikované v případě CRDS kvůli nízkému výkonu a složitosti fokusace širokospektrálního nekoherentního světla.



Obrázek 28 – Principiální schéma CEAS. Vstupní světlo I_0 je uvězněno mezi zrcadly o odrazivosti R. Výstupní intenzita I_n je pak funkcí absorpce kavity a zrcadel.

V rámci IBCEAS existují detekční techniky využívající disperzní člen za kavitou³⁴, nebo interferometrické měření³⁵. Principiální zapojení IBCEAS je na obr. 29. Na obrázku je znázorněn širokospektrálního světla s výstupní intenzitou „ I_{in} “. Světlo je uvězněno mezi zrcadly s odrazivostí „R“. Pokud je mezi zrcadly vložen vzorek s absorpcí „L“, je možná psát vztah pro výpočet výstupní intenzity v ustálením stavu kavity:

$$I(\lambda) = I_{in}(\lambda)(1 - R(\lambda))^2(1 - L(\lambda)) \sum_{n=0}^{\infty} (1 - L(\lambda))^{2n}. \quad (40)$$

Pokud je integrační čas zásadně větší než časová konstanta kavity a jsou splněny fyzikální podmínky „ $R < 1$ “ a „ $L < 1$ “, série konverguje do tvaru:

³³ Angl. Incoherent Broadband Cavity Enhanced Spectroscopy, IBCEAS.

³⁴ Lepší časová a horší spektrální rozlišitelnost.

³⁵ Horší časová a lepší spektrální rozlišitelnost.

$$I(\lambda) = I_{in}(\lambda) \frac{(1-R(\lambda))^2(1-L(\lambda))}{1-R(\lambda)^2(1-L(\lambda))^2}. \quad (41)$$

Pokud nedochází k absorpci světla („L = 0“), rovnice 41 přechází do tvaru:

$$I(\lambda) = I_{in}(\lambda) \frac{(1-R(\lambda))}{(1+R(\lambda))}. \quad (42)$$

Po vyjádření absorpce vzorku („L“) pomocí Lambert-Beerova zákona (vztah 70), lze vyjádřit vztah pro přímý výpočet extinkčního koeficientu „ε“.

$$\varepsilon(\lambda) \approx \frac{1}{d} \left(\frac{I_{in}(\lambda)}{I(\lambda)} - 1 \right) (1 - R(\lambda)), \quad (43)$$

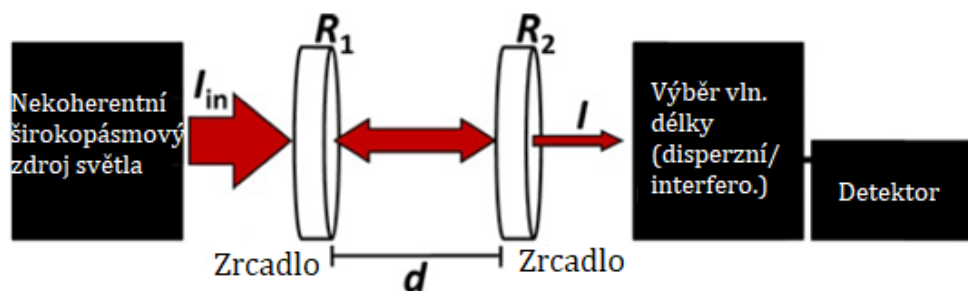
- d – Tloušťka vzorku.

Rovnice 43 podléhá značnému zjednodušení a platí za podmínek „L → 0“ a „R → 1“. Původní odvození lze nalézt například v knize od G.Garliandiho a H.P.Loocka [40].

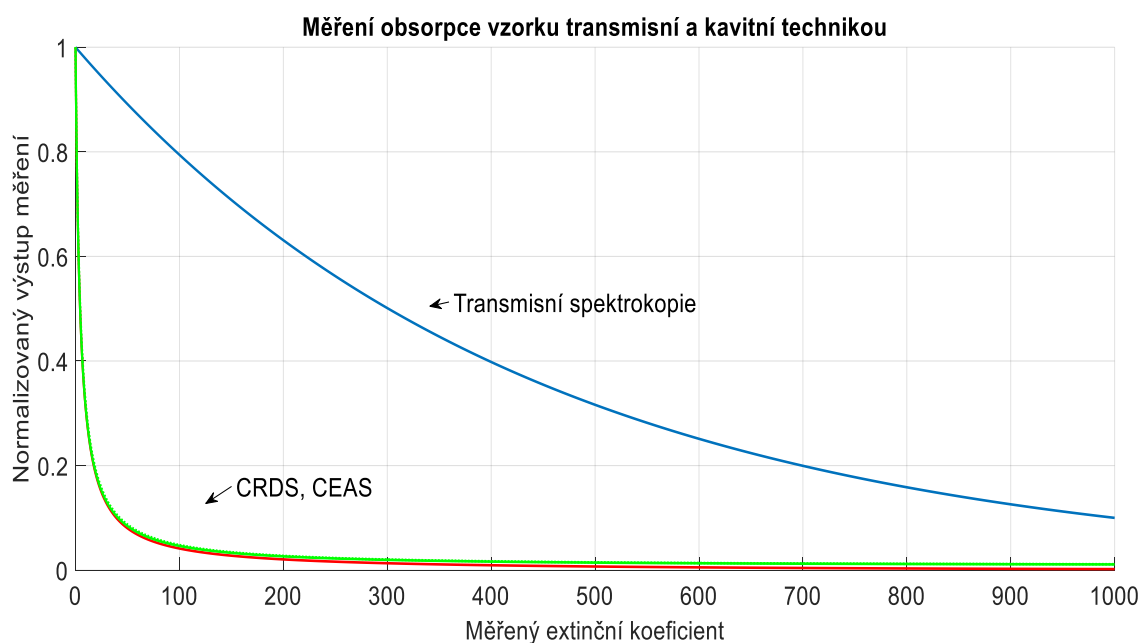
Výhody a nevýhody IBBCEAS pro použití v širokospektrální spektroskopii:

- Citlivost: CEAS je obecně méně citlivá³⁶, ale je citlivější než jednopruřadová spektroskopie. CEAS je citlivá jen v malém rozsahu extinkčního koeficientu.
- Spektrální selektivita: Kromě spektrální limitace zdroje se projevuje spektrální limitace zrcadel. Výhoda IBBCEAS je v simultánnosti měření širokého rozsahu vlnových délek. Tím lze dosáhnout lepší chemické a fyzikální charakterizace vzorků.
- Časová rozlišitelnost: Obě techniky (CRDS a CEAS) jsou omezeny časovou konstantou kavity.
- Adaptibilita: Kavitní metody mají velkou výhodu v jejich adaptibilitě na měření různých typů vzorků (zejména plynné, dále kapalné a pevné) různými metodami – transmise, odraz, evanescentní snímání, rozptyl světla, fluorescence atd.
- Praktické parametry: CEAS má výhody zejména v její jednoduchosti a dostupnosti, na druhou stranu navazování světla do kavity snižuje robustnost. CRDS je technicky náročnější a zpravidla méně robustní.

³⁶ Vzhledem k CRDS.



Obrázek 29 – Principiální schéma IBBCEAS [40].



Obrázek 30 – Porovnání citlivost transmisí spektroskopie a kavitních metod. Je vidět, že CEAS a CRDS jsou extrémně citlivé pro měření málo absorbujících vzorků s nízkým extinkčním koeficientem. Podmínky měření: $R = 0,99$, $d = 1$ mm, délka kavity = 1 m, modulační frekvence = 1 MHz. CRDS a CEAS vykazují podobnou citlivost, CEAS je ale díky závislosti na fluktuaci zdroje světla méně přesná.

Více o využití CEAS techniky lze nalézt v kap. 2.3.

3.6 Shrnutí

Jak je zřejmé z přechozích kapitol, optovláknové biosenzory nabízí slibnou alternativou k drahým a časově náročným diagnostickým technikám nasazovaných v klinických laboratořích, jako je ELISA³⁷, hmotností spektroskopie, nebo elektrochemické biosenzory. Zatímco klasická ELISA trpí nízkou citlivostí a zahrnuje

³⁷ Z angl. enzyme-linked immunosorbent assays. Imunologická sloužící k detekci protilátek.

vysoký počet časově a technicky náročných kroků, elektrochemické senzory vykazují nižší specifitu, vysoký práh detekce a zdlouhavou přípravu vzorků. Současně používané metody pro detekci bakterií bez značení zahrnují především PCR³⁸, fenotypickou analýzu, hmotnostní spektroskopii (MALDI) a biochemické mikroarraye³⁹.

I když tyto metody vynikají svojí citlivostí (především různé modifikace PCR jsou schopny detekovat bakterie od koncentrací 10 CFU/mL), specifitou a reprodukovatelností, tyto nástroje neumožňují hlubší analýzu vzorku. Například PCR nedokáže ani rozlišit živé a neživé buňky. Biochemická mikroarraye založené na používání kmenově specifických oligonukleotidiových prób, je perfektní nástroj pro rychlou bakteriální identifikaci, to však nezahrnuje další analýzu bakterií. Pro úspěšnou identifikaci je nutné použít vysoce koncentrovaný vzorek (8 log CFU/mL). Zatímco výstupem MALDI je chemická informace, instrumentace je stále nedostupná a příprava vzorků je složitá. Navzdory těmto limitacím, MALDI zůstává nejbližším kompetitorem FOS. Pokud by bylo FOS rozšířeno o spektrální analýzu, bylo by možné chemicky analyzovat vzorky s velmi nízkým detekčním limitem.

Jak bylo prokázáno v referenčních studiích [57] a [58], rozšíření FOS o spektrální analýzu umožňuje využít obrovský potenciál této techniky. Kavitní zesílení se zdá být perfektním nástrojem pro nezbytné zesílení odezvy senzoru. Toto zesílení je nutné pro spektroskopickou analýzu nízkých koncentrací zkoumané látky.

³⁸ Polymerázová řetězová reakce je metoda rychlého a snadného zmnožení úseku DNA založena na principu replikace nukleových kyselin.

³⁹ Jde o komplexní přístroj pro mikrofluidní buněčnou analýzu.

4 CÍLE PRÁCE

Z rozboru současného stavu problematiky je zřejmé, že NIR spektroskopie má pro použití v mikrobiologii velký potenciál vzhledem ke své jednoduchosti, větší penetrační hloubce světla a přímočaré přípravě vzorků. Nevýhodou zůstává nízká interpretovatelnost NIR spekter bakterií a nízká citlivost (detekce overtonů a kombinovaných vibrací).

Cílem této práce je interpretovat NIR spektrum bakterie, najít nejdůležitější peaky a spektrální regiony podstatné pro analýzu bakteriálních buněk s akcentem na identifikaci bakteriálních kmenů.

Dalším cílem této práce je výzkum technik pro zmírnění nevýhody nízké citlivosti a možnosti analyzovat a identifikovat bakteriální kmeny v menším množství (10^5 buněk). Toto je důležité pro včasné odhalení bakteriálních infekcí. K dosažení tohoto cíle bude navržen biosenzor s možností NIR spektroskopie.

5 EXPERIMENTÁLNÍ MĚŘENÍ, INTERPRETACE A KLASIFIKACE NIR SPEKTER BAKTERIÍ

Potenciál NIRS pro klasifikaci bakterií byl ukázán v přehledu současného stavu problematiky. V experimentální části práce jsou provedeny 4 experimenty, které testují klasifikační sílu vybraných statistických modelů, porovnávají možnosti spektrální analýzy, srovnávají metody přípravy vzorků a interpretují důležité spektrální peaky pomocí metod prokládání křivkou a korelační spektroskopie. Tyto experimenty jsou důležité pro návrh biosenzoru s možností NIR spektrální analýzy.

5.1.1 Testování klasifikačních modelů pro identifikaci NIR spekter bakteriálních kmenů

5.1.1.1 Úvod

Tento experiment se zabývá porovnáním některých základních klasifikačních modelů pro rozlišení bakteriálních kmenů na základě jejich NIR spekter. Největší pozornost je věnována PLS-DA modelu, tento klasifikátor se v oblasti chemometrie⁴⁰ používá nejčastěji. Na konci experimentu jsou zkoumány některé pokročilé nelineární modely založené na UNS[59] a fuzzy modelování[60]. Modely byly validovány LOO křížovou validací⁴¹.

5.1.1.2 Materiály a metodika

V prvním experimentu byla měřena spektra bakteriální suspence těchto kmenů:

- *Lactobacillus acidophilus* (6 měření)
- *Staphylococcus epidermidis* (8 měření)
- *Enterococcus durans* (8 měření)

⁴⁰ Statistika v analytické chemii. Více o chemometrii v kap. **Error! Reference source not found.** přílohy č. 2.

⁴¹ LOO je typ křížové validace s vyloučením jednoho vzorku, Více v kap. 2.7 přílohy č.2.

- *Escherichia coli* (6 měření)

Měření probíhalo transmisní metodou, suspence byla měřena v transmisní kyvetě o šířce 0,2 mm. Jako supernatant⁴² byl použit takový roztok, jehož složení zaručuje zachování bakteriální koncentrace v čase (angl. maximum recovery diluent - CM0733, Thermo Fisher Scientific).

Parametry techniky akvizice NIR spekter:

- NIR spektrometr: Varian Cary 5E.
- Spektrální rozlišení: 3nm.
- Průměrování: 0,1s.
- Rozsah: 900-1450 nm.

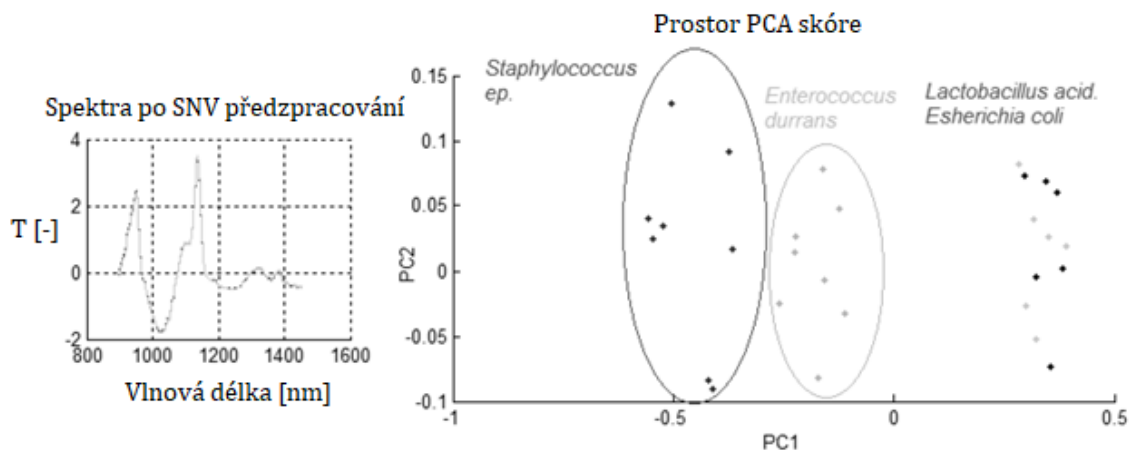
Matematické zpracování spekter:

- Jako referenční spektrum bylo použito spektrum vody.
- Derivace SG - viz kap. 2.3. přílohy 2.
- Explorační analýza: PCA – viz kap. 2.5 přílohy 2.
- Předzpracování spekter: OSC (Ortogonalní korekce signálu) [61].
- Klasifikace: PLS-DA – viz kap. 2.6 přílohy 2.
- Validace: LOO-CV (křížová validace) – viz kap. 2.7 přílohy 2.

5.1.1.3 Výsledky

Na obr. 31 je uveden prostor vytyčený principiálními komponentami PCA, tzn. komponenty, které postihují největší variabilitu dat. Jak je vidět, spektra *Staphylococcus epidermidis* a *Enterococcus durans* obsahují unikátní variabilitu a lze je separovat. Na druhou stranu spektra *Lactobacillus acidophilus* a *Escherichia coli* nelze determinovat. Protože je PCA pouze explorační analýza, nebere v potaz třídění spekter a je tedy nutno použít klasifikační model.

⁴² Supernatant je označení tekutiny nad sedimentem, která vzniká centrifugací.



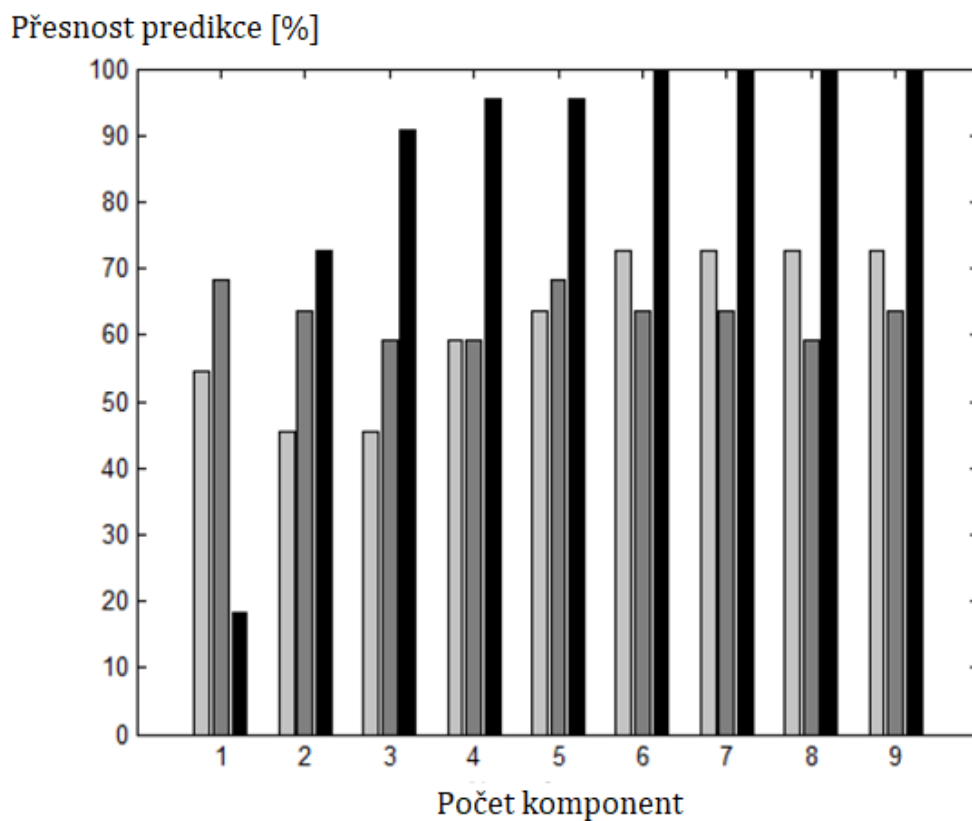
Obrázek 31 – Transmisní spektrum (vlevo) a prostor PCA skóre (vpravo) transmisních NIR spekter bakterií [62].

Pro klasifikaci byl použit model PLS-DA, tento model lze implementovat ve 3 modifikacích.

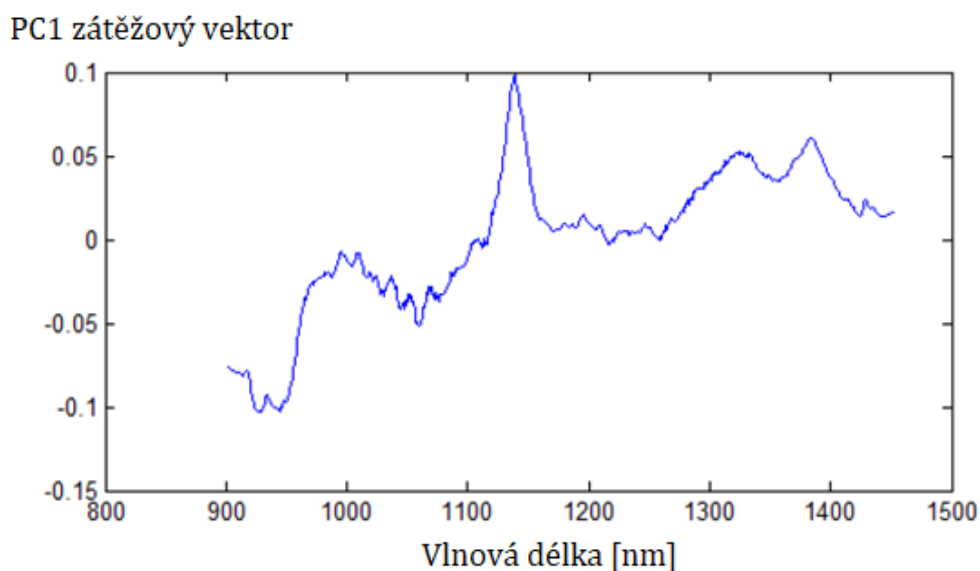
- Tzv. „dummy“ kódování. Jde v podstatě o použití klasického PLS regresního modelu [63], kde se místo nezávislé kvantitativní proměnné používá číselné označení třídy pro klasifikaci - *Staphylococcus epidermidis* = 1, *Enterococcus durans* = 2, atd. Tento přístup byl použit v publikaci F.C Martose [12].
- PLS2-DA s kódováním příslušnosti. Tento přístup využívá vícedimenzionální PLS, jednotlivé třídy jsou pak kódovány stupněm příslušnosti - *Staphylococcus epidermidis* = [1 0 0 0], *Enterococcus durans* = [0 1 0 0], atd.
- Optimalizovaný PLS2-DA podle M.Barkera a W.Rayense [13].

Výsledky klasifikace jsou shrnuty v obr. 32. Nejvyšší úspěšnost klasifikace dosáhl model „Optimalizovaný PLS2-DA podle M.Barkera a W.Rayense [13]“ při použití 6 latentních komponent. Výsledky validace pomocí „Leave-one-out“ křížové validace (LOO-CV) jsou shrnuty v grafu 32. Protože LOO-CV dává značně optimistické výsledky, pro další závěry je nutný větší počet měření.

Pro částečnou interpretaci spektra byl použit váhový vektor PLS modelu, který udává důležitost hodnot na určitých vlnových délkách pro tvorbu klasifikačního modelu. Tento vektor dosahuje vysokých hodnot u vlnových délek interpretovaných dalšími autory – např. 3. overton valenčního módu C-H vazeb v region 900-1050 nm, valenční mód N-H vazeb na 1126 nm a 2. overton C-H na 930 nm. Více v kap. 2.1.

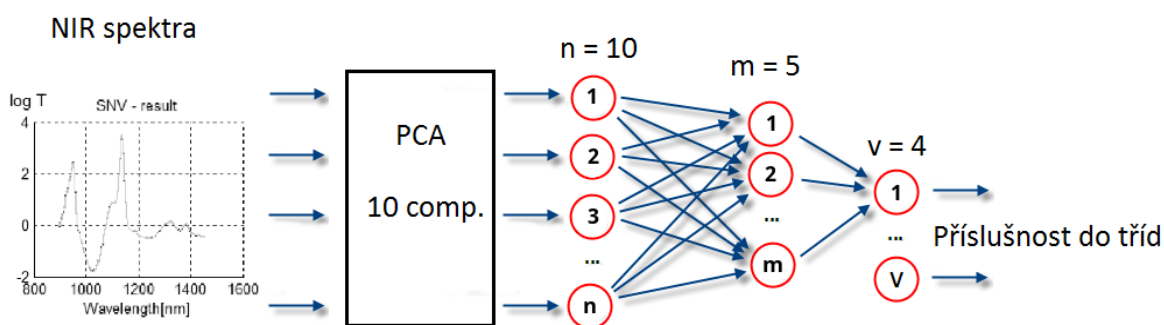


Obrázek 32 – Predikční přesnost modelů (přesnost kalibrace). Nejsvětlejší je výsledek modelu PLS2-DA s kódováním příslušnosti, tmavší (uprostřed) jsou výsledky PLS2-DA s „dummy“ kódováním, a nejtmavší Optimalizovaný PLS2-DA podle M.Barkera a W.Rayense [13] s ortogonální transformací [62].



Obrázek 33 – 1. PLS zátěžový vektor [62].

Protože NIR spektrum bakteriálních buněk je komplexní, v některých případech je vhodné použít klasifikační model, který postihuje i nelineární závislosti. Modely založené na strojovém učení, např. umělá neuronová síť (UNS), se stále více prosazují ve spektroskopii, protože jsou schopny řešit tyto typy úloh. Pro testování UNS byla použita topologie, která je zobrazena na obr. 34. Aby se potlačila kolinearita dat, dimenze naměřených NIR spekter byla redukována na 10 pomocí PCA transformace. PCA skóre sloužilo jako vstup UNS. Na výstupu UNS byly 4 neurony, které indikovaly příslušnost do jednotlivých tříd. Pro učení byl použit algoritmus zpětného šíření chyby [64]. Tato technika dosahovala úspěšnosti 100% na omezeném vzorku dat. Model byl validován LOO-CV křížovou validací. Protože UNS mají tendenci k přeučení (tzv. overfitting – tzn. stav, kdy model ztratil schopnost generalizace a model predikuje správně jen na kalibračních datech) a LOO-CV dává optimistické ohodnocení modelu, pro další závěry je nutné model validovat na větší skupině dat.



Obrázek 34 – Schéma nasazení UNS pro klasifikaci NIR spekter bakterií [62].

5.1.1.4 Závěr a diskuze

Výsledky byly prezentovány na konferenci PIERS 2013[60]. Jak je vidět, i přes malé množství naměřených dat lze spektra úspěšně klasifikovat za předpokladu správného výběru klasifikačního modelu a metod předzpracování dat. Zejména PLS-DA model je citlivý na správné kódování příslušnosti. Alternativně lze využít modely založené na strojovém učení (UNS), které dosahují ještě vyšších přesností.

5.1.2 Porovnání přesnosti vybraných klasifikačních modelů kalibrovaných na hydratovaných a dehydratovaných bakteriálních vzorcích

5.1.2.1 Úvod

Tento experiment se zaměřuje především na studium vlivu přípravy bakteriálních vzorků na klasifikační sílu modelů klasifikátorů NIR spekter. Vliv vody v NIR spektroskopii je velice silný, a proto se standardně vzorky dehydratují. Spektra obou typů vzorků (hydratovaných/dehydratovaných) byla klasifikována pomocí obvyklých klasifikačních metod.

5.1.2.2 Materiály a metodika

V tomto experimentu bylo provedeno měření NIR spekter 90 bakteriálních suspensí. Následně byla porovnána klasifikační přesnost modelů kalibrovaných na NIR spektrech suspensí a na NIR spektrech dehydratovaných vzorků. Byly měřeny tyto kmeny:

- *Listeria ivanovii*
- *Escherichia coli*
- *Salmonella enterica*

Bakteriální monokultury byly vypěstovány v TSB⁴³. Pro eliminaci vlivu TSB na NIR spektrum byla suspenze centrifugována a supernatant byl nahrazen destilovanou vodou. Pomocí této procedury lze odstranit všechny potenciální bakteriální produkty, takže je možné měřit čistou biomasu. Stejná úroveň koncentrace byla zajištěna udržováním absorpance bílého světla (420-580 nm) na konstantní úrovni (měřeno v 0,1 mL suspenze). Koncentrace byla měřena klasickou metodou roztěru a počítání kolonií [49] a pohybovala se okolo 10⁸-10⁹ CFU/mL. Celkem bylo připraveno a změřeno 40 inokul.

Parametry metody měření NIR spekter:

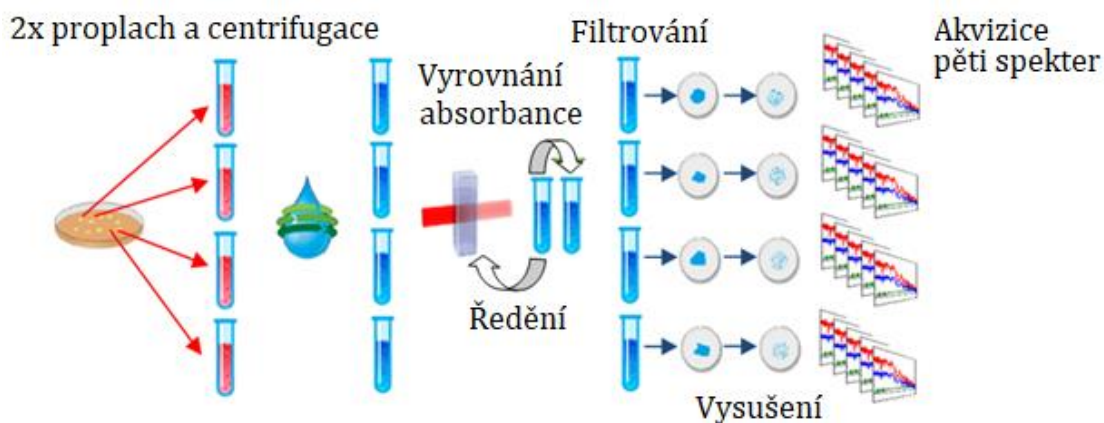
- NIR spektrometr: Perkin Elmer Spectrum One NTS (Shelton, CT, USA).
- Spektrální rozlišení: 1 nm.
- Rozsah: 1100-2500 nm.

⁴³ Triptón-sójový bujón, Sigma-Aldrich č. 22092.

Statická spektrální analýza:

- Derivace SG – viz kap. 2.3. v příloze 2.
- Explorační analýza: PCA – viz kap. 2.5 v příloze 2.
- Předzpracování spekter: EMSC – viz kap. 2.4 v příloze 2.
- Klasifikace: CVA (kanonická analýza)[8], SIMCA[11] a PLS-DA – viz kap. 2.5 v příloze 2., UNS (umělá neuronová síť).
- Validace: LOLO-CV (křížová validace) – viz kap. 2.7 v příloze 2. Pro validaci byla použita spektra jednoho inokula.

V další části experimentu byla měřena spektra dehydratovaných suspenzí. Odstranění vody dovoluje měření nižších koncentrací za cenu složitější přípravy vzorků. Voda byla odstraněna filtrací pomocí membrán ze skelných vláken (Glass fiber filter, Whatman) a vakuové filtrační aparatury (Sartorius, Germany). Filtry se suspenzí byly dehydratovány při teplotě 70 °C po dobu 4h. Tento postup zajišťuje odstranění veškeré nevázané a části vázané vody [65]. Přežití bakterií závisí na mnoha faktorech a je to předmětem mnoha studií [66]. Z tohoto důvodu lze považovat toto měření za destruktivní. Kvalita dehydratace byla monitorována pomocí peaku na 1950 nm (O-H vazby). Z důvodu zamezení opětovné hydratace byl filtr uzavřen v kontejneru se sorbentem (silika gel) a následně umístěn na měřicí okénko NIR spektrometru (integrační sféra) společně s hliníkovým odrazným elementem. Celá procedura přípravy vzorků je zobrazena na obr. 35.

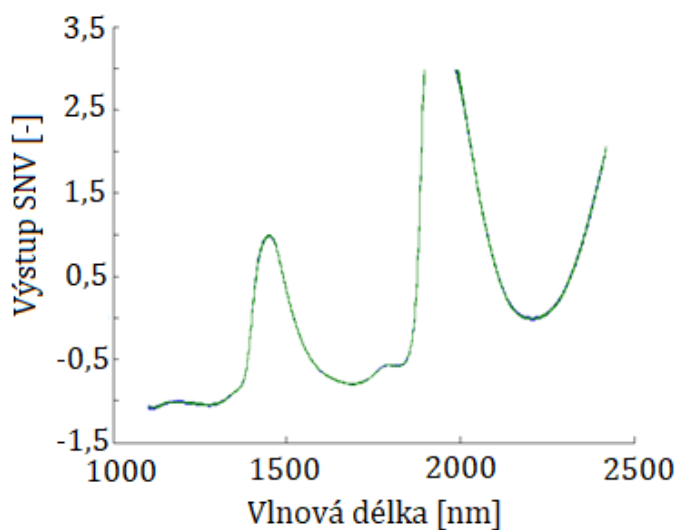


Obrázek 35 – Příprava dehydratovaných bakteriálních suspenzí [67].

5.1.2.3 Výsledky

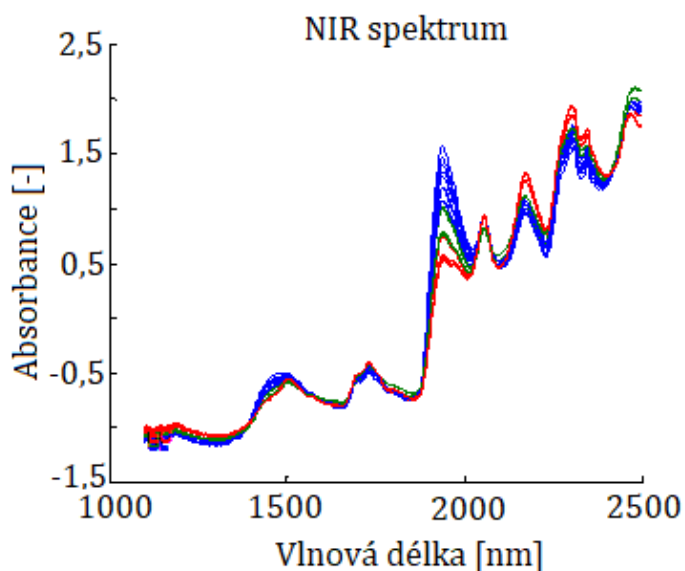
V NIR spektrech bakteriální suspenze jasně dominuje voda. Kombinační mód O-H vazeb vykazuje velkou absorpci na 1950 nm a v oblasti prvního overtonu okolo 1450 nm. Signály generované bakteriální biomasou jsou zakryté absorpcí vody

i při vysokých koncentracích (10^9 CFU/mL). Proto je obtížné bakterie analyzovat i s použitím pokročilé statistiky.



Obrázek 36 - NIR spektrum bakteriální suspenze [67].

Na druhou stranu, ve spektrech dehydrovaných vzorků dominuje oblast 2300-2500 nm. Peaky v této oblasti (zejména okolo 1750 nm) jsou přisuzovány zejména lipidům a proteinům nacházející se v buněčné membráně a v těle buňky. Tato oblast je v případě přítomnosti vody zcela zakryta kombináčnīm módem O-H vazeb.



Obrázek 37 - Spektra dehydratovaných bakteriálních suspenzí na filtru ze skelných vláken [67].

Výsledky ve formě CCR⁴⁴ jsou shrnuty v tab. 13 a 14. Jsou zde porovnány 4 základní klasifikační modely a různé strategie předzpracování dat. Jak je vidět, v případě spekter bakteriálních suspenzí s přítomností vody je přesnost modelů nízká. Na druhou stranu, přesnost modelů vytvořených na základě spekter dehydratované bakteriální biomasy je vyšší, a to zejména v případě použití derivace a EMSC. Modely využívající takto předzpracovaná spektra vykazovaly vysokou přesnost (90-100%, změření LOLO křížovou validací).

Tabulka 13 – Přesnost klasifikačních modelů (CCR) bakteriálních suspenzí.

CRR[%]	CVA	PLS-DA (5 komp)	SIMCA (5 komp)	UNS (10x10 neur.)
Derivace + EMSC	33	36	34	36
Optimalizovaná Der. + EMSC	35 (69x2 der. bodů)	35 (127 der. bodů)	37 (209 der. bodů)	35 (69 der. points bodů)
Převzorkování (71 spektrálních bodů)	40	45	34	35

Tabulka 14 – Přesnost klasifikačních modelů (CCR) dehydratovaných vzorků.

CRR[%]	CVA	PLS-DA (5 komp)	SIMCA (5 komp)	UNS (10x10 neur.)
Bez předzpracování (SNV)	89	83	80	95
S-G druhá derivace, 69 bodů	80	80	82	95
Derivace + EMSC	80	85	95	100
Optimalizovaná Der. + EMSC	100 (69x2 der. bodů)	90 (127 der. bodů)	100 (209 der. bodů)	100 (69 der. bodů)
Převzorkování (71 spektrálních bodů)	100	96	100	100

⁴⁴ Correct classification rate – více v referenční literatuře [116] nebo v kap. 2.7 přílohy 2.

5.1.2.4 Závěr a diskuze

Je zřejmé, že je nutné bakteriální vzorky před měřením dehydratovat. Jedině tak lze dosáhnout vysoké přesnosti klasifikačních modelů. Přesnost zkoumaných algoritmů je podobná. Protože počet měření byl vzhledem k multivariabilitě a kolinearitě dat poměrně malý, pro hlubší diskuzi o možnostech přímého nasazení NIR spektroskopie v mikrobiologii je nutné více měření. Na druhou stranu byl v rámci tohoto experimentu představen důkaz, že NIR spektra obsahují dostatek informací pro klasifikaci bakteriálních kmenů. Pro praktické použití je nutné spektrum blíže analyzovat a interpretovat – touto problematikou se zabývá následující experiment. Uvedené poznatky byly zveřejněny na konferenci IPhDW 2014 a publikovány v časopise IAPGOŠ[57].

5.1.3 Prokládání NIR spekter bakteriálních buněk křivkou

5.1.3.1 Úvod

Jak bylo prokázáno v předchozích experimentech, NIR spektrum nese dostatek informací pro analýzu a klasifikaci bakteriálních buněk. Přestože NIR spektroskopie přináší řadu výhod oproti klasickým identifikačním technikám (jako je PCR[68], nebo MALDI[69]), pro nasazení této techniky ve vědecké a klinické praxi je nutné identifikovat a interpretovat jednotlivé spektrální peaky a jejich závislosti. Teprve potom lze využít výhody, které přináší spektroskopická analýza buněk⁴⁵. Využitím modelů založených na multivariační statistice lze úspěšně kalibrovat klasifikační modely, ale interpretace peaků a porozumění závislostí ve spektru zůstává značně problematická. Spektrální dekompozice provedená prokládání křivkou zjednodušuje spektra a činí tak jednotlivé peaky lépe izolované a interpretovatelné. Spektrum se pomocí této metody rozloží na jednotlivé peaky blízké Gaussovu rozložení, charakterizované svojí polohou, amplitudou a šířkou. Tyto parametry se pak hledají pomocí optimalizačních algoritmů tak, aby se minimalizoval rozdíl mezi naměřeným a syntetizovaným spektrem vzniklým superpozicí všech modelovaných peaků. Tímto přístupem lze izolovat jednotlivé části spekter, které přispívají ke klasifikaci bakteriálních kmenů.

⁴⁵ Např. rychlá příprava vzorků, cenová dostupnost instrumentace i nákladů na měření.

5.1.3.2 Materiály a metodika

V tomto experimentu byly měřeny tyto kmeny:

- *Listeria ivanovii*
- *Escherichia coli*
- *Salmonella enterica*

Příprava vzorků byla shodná s předchozím experimentem – viz obr. 35. Koncentrace bakteriální suspenze byla udržována na úrovni 10^8 CFU/mL. V publikacích [2] se tento limit udává jako nejnižší možná koncentrace pro úspěšnou klasifikaci. Je důležité podotknout, že reálné vzorky nejsou obvykle ve formě koncentrované monokultury. Pro izolaci monokultury je nutné použít obvyklé metody jako je křížový roztěr nebo inokulace na selektivním agaru.

Spektra byla změřena spektrometrem Nicolet Antaris FT-NIR analyzér (Thermo Scientific, USA). Protože dehydratovaná suspenze způsobuje masivní rozptyl světla, pro měření byla použita technika DRIFT s integrační sférou. Rozptyl světla na částicích mikrometrových rozměrů popisuje teorie Mia [70] a projevuje se především nakloněním spektra. Tento jev lze však matematicky eliminovat.

Další parametry měření spekter:

- Spektrální rozlišení: 0.12-0.62 nm.
- Průměrování přes 50 skenů.
- Rozsah: 1100-2500 nm.
- 6224 měřených spektrálních bodů.

Dohromady bylo změřeno 180 spekter (60 spekter každého kmenu) - 3 spektra z každého filtru. Protože se vícenásobné měření stejného filtru považuje za technickou repetici, která by mohla ovlivnit přesnost klasifikačních modelů, dataset byl redukován na 60 pomocí průměrování spekter ze stejného filtru. Tímto je splněna podmínka nezávislosti dat. Na druhou stranu, pro algoritmy prokládání křivou se jeví jako výhodnější použít originální neredukovaný dataset.

Použité metody statistické spektrální analýzy:

- SG druhá derivace spekter. Délka derivačního okénka se měnila v závislosti na intenzitě šumu v daném regionu (více v [71]), touto technikou lze filtrovat šum a zároveň zachovat spektrální kontury.
- Předzpracování spekter – MSC, SNV – viz kap. 2.4 v příloze 2.
- Explorační analýza – PCA – viz kap. 2.5 v příloze 2.
- Klasifikace – PLS2 – DA ([13]) – viz kap. 2.5 v příloze 2.
- Validace – dvojnásobná křížová kros-validace⁴⁶ – viz kap. 2.7 v příloze 2.

⁴⁶ U tohoto typu křížové validace se rozdělují dataset na kalibrační a validační v poměru 1:1.

Prokládání křivkou

Prokládání křivkou slouží pro dekompozici spekter na jednotlivé peaky, které lze jednodušeji interpretovat. Pokud je známa amplituda peaku, je možné přímo aplikovat Beer-Lambertův zákon pro kvantifikaci jednotlivých složek. Přímá interpretace peaků je obvykle nemožná z důvodů fyzikálních jevů [72], které činí peaky široké a způsobuje jejich masivní překrývání. Z těchto důvodů byl použit numerický iterativní přístup (viz níže), který optimalizuje parametry peaků s tvarem Gaussova rozložení. Tvar peaků je dán Heisenbergovým principem neurčitosti [43], Doplerovým jevem⁴⁷ a dalšími jevy, způsobenými molekulárním uspořádáním vzorku. Protože je koherenční čas molekulárních vibrací vysoký (v porovnání s časy molekulárních relaxací), excitované molekuly relaxují rychle v souladu s Gaussovým rozložením. Protože bylo měření provedeno výhradně v pevném skupenství, není nutné aproximovat peaky složitějším rozlišením, jako je Voigtův nebo Lorentzianův profil [73]. Detailní fyzikální analýza je uvedena v referenční literatuře [43], [45], [74], [75]. Gaussova křivka byla implementována podle vztahu 44.

$$t(w) = ae^{-\frac{(w-w_0)^2}{2\sigma^2}}. \quad (44)$$

Modifikací parametrů „a“, „w₀“, „σ“ (amplituda, centrální vlnová délka, šířka) lze měnit tvar peaků. Tyto parametry postupují numerickou optimalizací. Výsledné syntetizované spektrum se skládá ze superpozice jednotlivých optimalizovaných peaků. Superpozici vyjadřuje vztah 45.

$$T(w) = \sum_{i=1}^P a_i e^{-\frac{(w-w_{0i})^2}{2\sigma_i^2}}. \quad (45)$$

Pokud je tedy spektrum dekomponováno na „P“ peaků, je třeba optimalizovat „P*3“ proměnných. Optimalizace je založena na minimalizaci kritéria definovaného ve vztahu 46.

$$c = \sum_{i=w_{min}}^{w_{max}} \left(\frac{d^\alpha T(i)}{d^\alpha w} - \frac{d^\alpha T_m(i)}{d^\alpha w} \right)^2. \quad (46)$$

⁴⁷ Doplerův jev je silný u pohybujících se molekul.

Ve vztahu 46 značí „ T_m “ originální změřené spektrum. Optimalizační kritérium je definováno jako rozdíl mezi změřeným („ T_m “) a syntetizovaným (vztah 45) spektrem. Pro sofistikovanější výpočet kritéria lze použít vztah 47. Tento vztah zohledňuje porovnání spekter ve více derivacích.

$$c = \sum_{\alpha=0}^N C_{\alpha} \sum_{i=w_{min}}^{w_{max}} \left(\frac{d^{\alpha}T(i)}{d^{\alpha}w} - \frac{d^{\alpha}T_m(i)}{d^{\alpha}w} \right)^2. \quad (47)$$

V kriteriální funkci (47) vystupují tyto proměnné:

- N – počet spektrálních derivací pro výpočet kritéria.
- C_{α} – váhový koeficient dané derivace⁴⁸.
- w_{max}, w_{min} – spektrální rozsah.
- $T(i), T_m(i)$ – absorpce i -té vlnové délky originálního a vytvořeného spektra.

Optimalizované proměnné jsou následně minimalizovány klasickými optimalizačními algoritmy jako je Nelder–Mead simplexová metoda (NMSA) [76], Levenberg-Marquardtova metoda (LMA) [77], and Trust-Region-Reflective algoritmus nejmenších čtverců (TRRA) [78]. Tyto algoritmy jsou v podstatě nelineární regresní modely, které nastavují optimalizované parametry tak, aby hodnota kritéria (vztah 46) byla minimální. V rámci tohoto experimentu byly dále zkoumány možnosti nasazení algoritmu Diferenciální Evoluce (DE)[79]. DE je stochastický, populačně založený optimalizační algoritmus přebírající koncept evolučních algoritmů⁴⁹. Výhodou DE je možnost nasazení na nediferencovatelné, nelineární úlohy. Další preferovanou vlastností DE je možnost výběru z více sub-optimalních řešení, které DE nabízí. Tato vlastnost je velmi užitečná pro spektrální dekompozici, protože lze upřednostňovat řešení na základě nějaké apriorní informace. DE obsahuje evoluční principy jako je mutace, selekce a rekombinace. Optimalizované proměnné jsou reprezentované v matici $P \times 3$. Algoritmus pracuje v následujících krocích:

- Inicializuj „ N “ matic optimalizovaných parametrů – „ A “ (velikost $P \times 3$). Jedná se o výchozí (náhodnou) populaci řešení.
- Mutace: Vytvoř matici donoru „ D “ na základě 3 náhodně vybraných matic z populace („ A_r “). Donorová matice se počítá podle vztahu 48, kde „ F “ je vstupní parametr DE⁵⁰,

$$D_i(g + 1) = A_{r1}(g) + F(A_{r2}(g) - A_{r3}(g)). \quad (48)$$

⁴⁸Tímto parametrem lze upřednostňovat prokládání vysokofrekvenční (úzké peaky), nebo nízkofrekvenční (široké peaky) složky.

⁴⁹Více o evolučních algoritmech v [117].

⁵⁰DE je známý jako faktor mutace, tento parametr se zadává v rozsahu 0-1

- Rekombinace: V prvním kroku se kompiluje pokusná matice „**T**“ z donorové matice a původní matice z předchozí populace „**A_i**“. Jednotlivé sloupce donorové matice do pokusné matice jsou kopírované z pravděpodobností CR⁵¹. Pokusná matice se tedy vypočítá podle vztahu 49.

$$T_{ij}(g + 1) = \begin{cases} D_{ij}(g + 1) \text{ s pravěpodobností CR} \\ A_{ij}(g) \text{ s pravěpodobností } 1 - \text{CR.} \end{cases} \quad (49)$$

- Selekcce: Kriteriaální ohodnocení původní matice „**A_i**“ je porovnáno s ohodnocením pokusné matice „**T**“. Matice s lepším kritériem se přenesse do další generace populace a zúčastní se dalších výpočtů.
- Rekombinace a selekcce se opakuje, dokud dochází ke zlepšení kriteriaální hodnoty nejlepšího jedince. Obvykle se implementují ukončovací podmínky výpočtu, jako je časové omezení nebo ukončení algoritmu, pokud nedochází k další optimalizaci – viz [80].

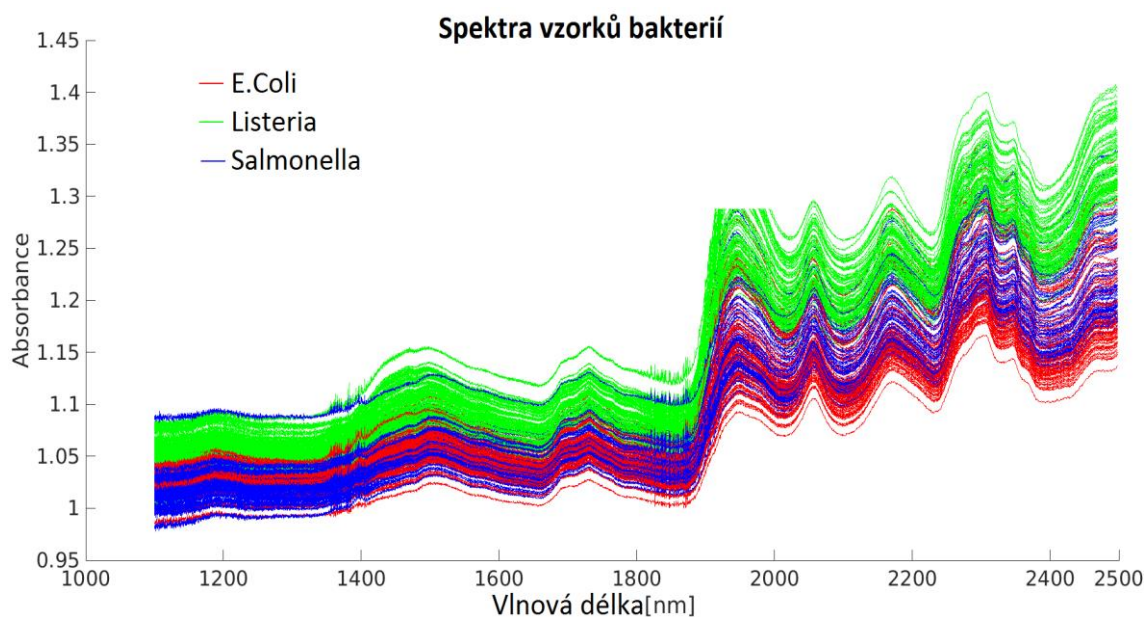
5.1.3.3 Výsledky

V první části experimentu byla změřena spektra všech bakteriálních kmenů ve formě dehydratované suspenze. Spektra jsou zobrazena na obr. 38. Je vidět, že spektru dominují některé peaky. Tyto peaky jsou interpretovány v řadě publikací [81], [82]:

- Karbohydráty – 1483nm, 1490 nm, 2100 nm.
- Proteiny – 2050-2060 nm, 1500-1530 nm.
- Tuky – 2222 nm, 2070 nm, 1203nm.
- Zbytková vlhkost – 1947 nm, 1450 nm.

Hlubší analýzou spektrálních kontur se zabývá několik publikací [2], [9], [12].

⁵¹ CE je známý jako „crossover ratio“.

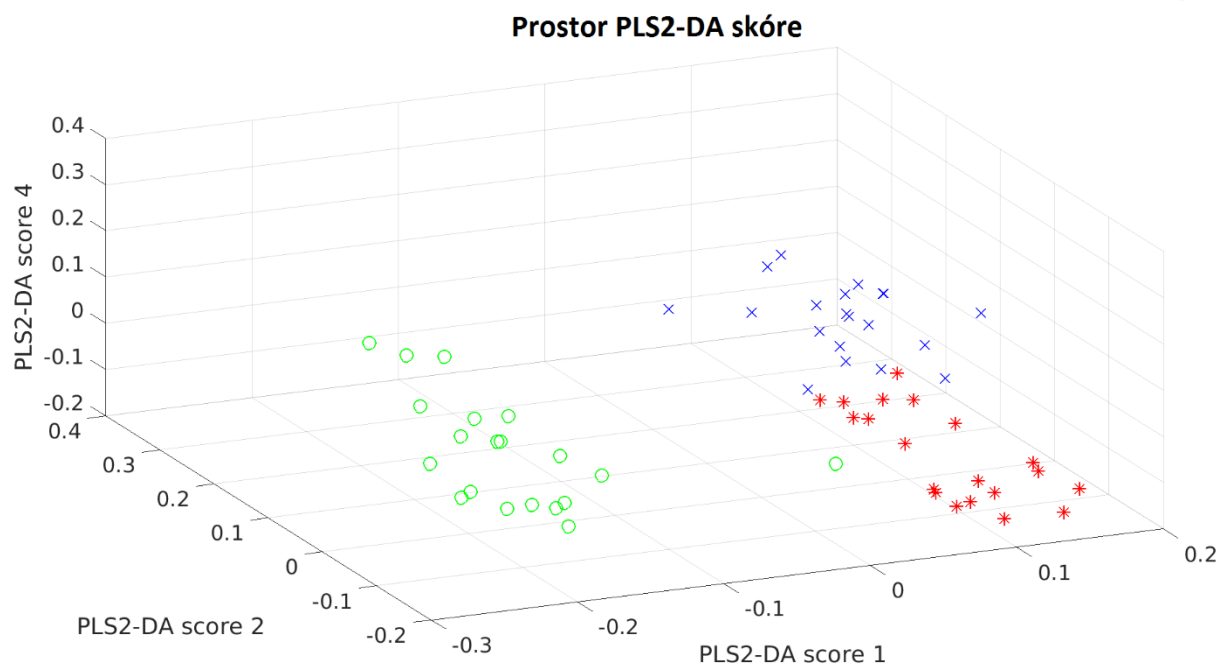
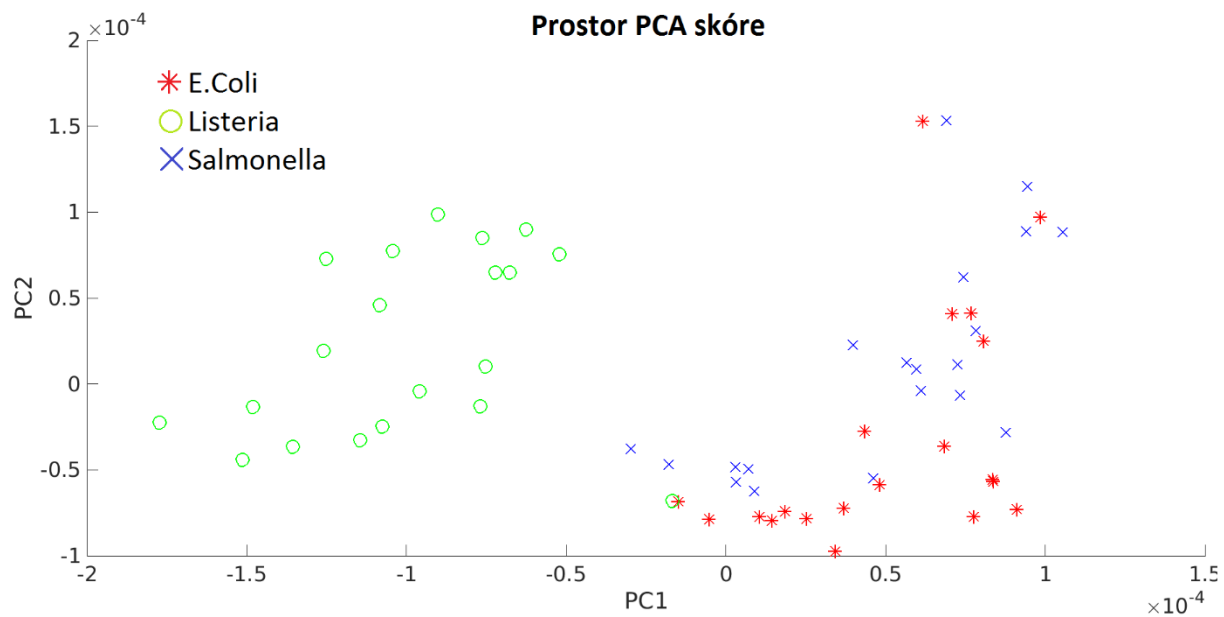


Obrázek 38 – Naměřené NIR spektra bakterií [62].

První krok směrem k úspěšné spektrální klasifikaci je exploratorní analýza. Pro tyto účely byla použita analýza PCA. Výstupní prostor skóre PCA je zobrazen na obr. 39. Zde jsou zřetelné dva oddělené klastry. Protože jeden z klastrů odpovídá *Listeria ivanovii* je možné se domnívat, že toto rozdělení je dáno gramovým barvením. *Listeria ivanovii* má gram-pozitivní barvení, zatímco ostatní měřené kmeny mají gram-negativní barvení⁵². Gram-pozitivní bakterie mají jinou skladbu buněčné stěny, zejména peptidoglykanovou vrstvu, a proto mají značně rozdílné spektrum. Alternativním vysvětlením klasterizace je přítomnost vody u gram-pozitivních bakterií, jejichž skladba buněčné stěny je silně hydrofilní.

Klasifikace naměřených spekter byla provedena pomocí klasifikátoru PLS2-DA, tento model je založen na regresi principiálních komponent s nezávislou kategoriální proměnou. Obr. 39 ukazuje prostor PLS2-DA skóre, kde jsou vidět oddělené klastry patřící jednotlivým bakteriálním kmenům. Protože PLS2-DA je multivariační klasifikační model sestavený pomocí kalibračních dat, je nutné ho validovat. Pro validaci byla použita dvou-průchodová kros-validace. Výsledky kalibrace a validace jsou shrnuty v tab. 15. Při použití 6 principiálních komponent, v průběhu validace bylo správně klasifikováno 93,3% případů.

⁵² Více o gramově barvení v kap. 2.1, nebo v referenční literatuře [49].

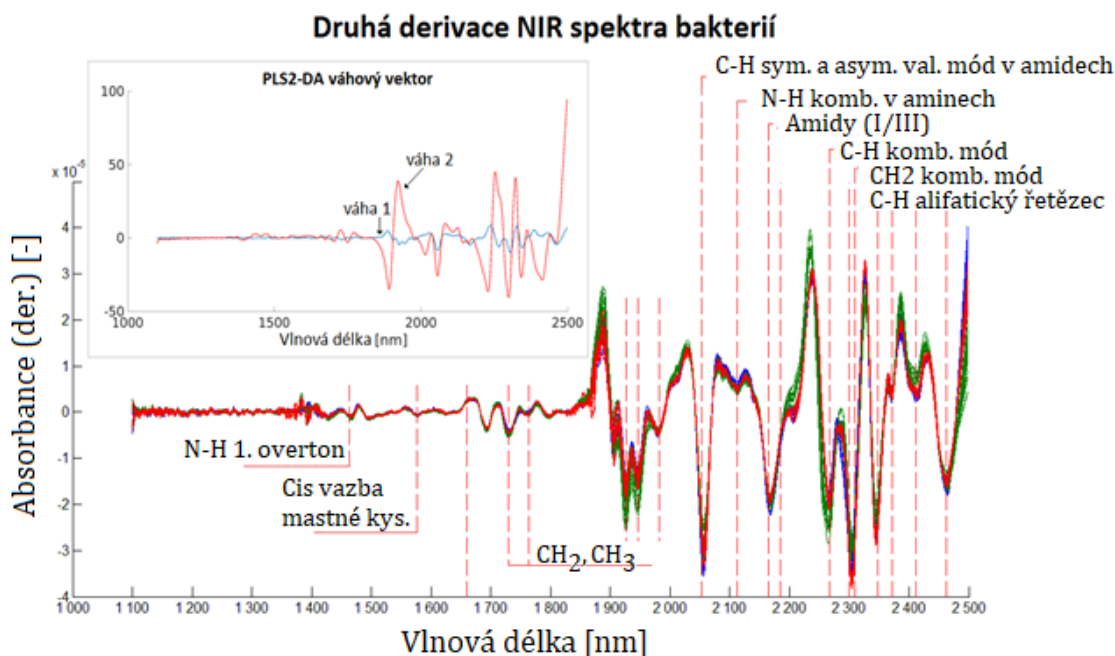


Obrázek 39 – PCA (horní) a PLS2-DA (spodní) prostor skóre NIR spekter bakterií [62].

Tabulka 15 - Příprava dat a přesnost PLS2-DA modelu.

Počet PLS komponent	6
Předzpracování dat	2 nd der. SG, MSC
Počet vzorků pro kalibraci	30
Počet vzorků pro validaci	30
Přesnost kalibrace	97%
Přesnost validace	95%
Validační metoda	2-stupňová kříž. validace

Další standardní metodou interpretace spekter je analýza PLS2-DA váhového vektoru (viz vložený graf v obr. 40). Vysoké hodnoty váhového vektoru jsou především v regionu mezi 2000 a 2500 nm. N-acetylmuramová kyselina z peptidoglykanové vrstvy je zřejmě příčina vysokých hodnot váhového vektoru první komponenty, a to zejména v mezi 2200 a 2500 nm. To odpovídá předpokladům, protože první komponenta opravdu odděluje kmeny podle gramova barvení.



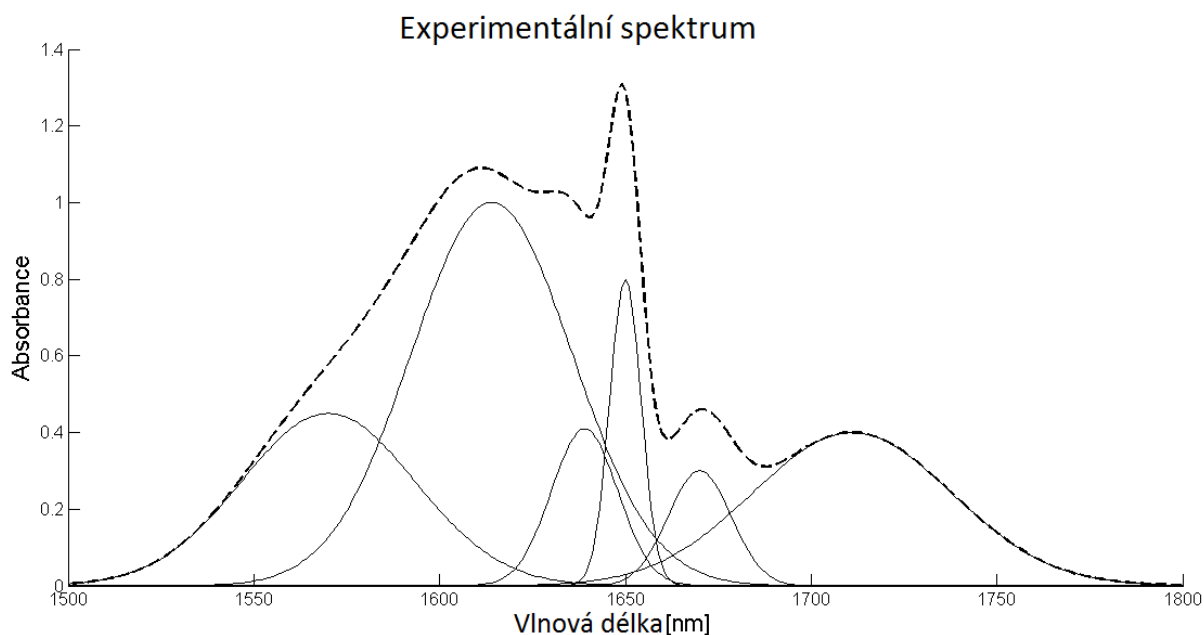
Obrázek 40 – Druhá derivace naměřených spekter s interpretací některých spektrálních oblastí. Vložený graf ukazuje váhový vektor PLS2-DA [62].

I když byly všechny tři kmeny klasifikovány s relativně vysokou úspěšností (93,3%), NIR spektrum obsahuje přehřel informací o jednotlivých bakteriálních

komponentách, které nelze přímo interpretovat a analyzovat. Z tohoto důvodu se druhá část experimentu zabývá prokládáním NIR spekter křivkou, což vede ke zjednodušení a lepší interpretaci spekter.

Analýza algoritmů prokládání křivkou na syntetizovaném spektru

Ve druhé části experimentu bylo syntetizováno umělé spektrum, na kterém byly ohodnoceny jednotlivé techniky prokládání křivkou. Spektrum se skládá z 6 peaků, které se svojí polohou a překryvem blížily k originálním naměřeným spektrům biologických vzorků. Protože jsou parametry syntetizovaných peaků známy, lze zavést kritérium pro porovnání jednotlivých prokládacích technik. Toto kritérium se počítalo jako průměrná vzdálenost mezi nalezenými a skutečnými peaky v syntetizovaném spektru.



Obrázek 41 – Experimentální spektrum složené se superpozice šesti peaků [62].

V rámci této studie byly studovány tyto závislosti:

- **Impakt inicializace konvenčních prokládacích algoritmů**
Výsledky porovnání různých inicializačních strategií jsou uvedeny v tab. 17. Jedna z široce používaných metod je inicializace podle minima 2. derivace spektra a ekvidistantní inicializace. Pro názornost je dále uvedena inicializace blízko a daleko od optima. Algoritmy založené na inicializaci minimem 2. derivace vykazují nejlepší výsledky.
- **Vztah mezi přesností prokládacího algoritmu a výběru derivace**
V tab. 17 jsou uvedeny hodnoty porovnávacího kritéria pro různý počet

derivací, které se zúčastnily formulace kriteriální funkce. Nejnižší skóre mají algoritmy založené na první až třetí derivaci.

- **Vztah mezi přesností prokládacího algoritmu a počtu modelovaných peaků**

Ve tab. 16 jsou uvedeny hodnoty výsledného skóre algoritmů s různým počtem modelovaných peaků. Je zajímavé, že prokládání je úspěšnější (skóre je nižší) při vyšším počtu (více jak 6) modelovaných peaků. Avšak originální syntetizované spektrum vzniklo superpozicí pouze šesti peaků. Vyšší počet modelovaných peaků zřejmě tlačí jejich parametry blíže k optimálnímu řešení, ale v reálných aplikacích je identifikace redundantních peaků nemožná. DE se v tomto porovnání chová velmi výhodně, protože nastavuje amplitudu redundantních peaků na 0, nebo je odsune mimo vyšetřovanou spektrální oblast. Takto jsou redundantní peaky odstraněny a neúčastní se dalších výpočtů.

Tabulka 16 - Průměrná vzdálenost mezi peaky nalezených pomocí prokládacích algoritmů a skutečnou pozicí peaků v závislosti na počtu modelovaných peaků.

Počet modelovaných peaků	5	6	7	8	9
LMA	12.36	2.64	2.52	0.66	0.61
NMSA	20.78	19.85	47.88	27.54	5.47
DE	10.26	3.99	8.71	8.11	2.91

- **Vztah mezi přesností prokládacího algoritmu a úrovní spektrálního šumu**

V reálném měření se v NIR spektrech nachází šum vzniklý akvizicí spektra⁵³. Vyšší derivace musí být použity s obezřetností, protože mají tendenci zvýrazňovat šum. Do syntetizovaného spektra byl přidán šum na několika úrovních. Obr. 42 ukazuje porovnání LMA a DE při různých úrovních spektrálního šumu. I když je LMA méně citlivý na šum, oba algoritmy vykazují sníženou přesnost při použití vyšších derivací (druhé a třetí). Nižší derivace jsou stabilnější, ale všechny porovnávané algoritmy jsou nestabilní, jakmile odstup signál-šum spadne pod 25dB.

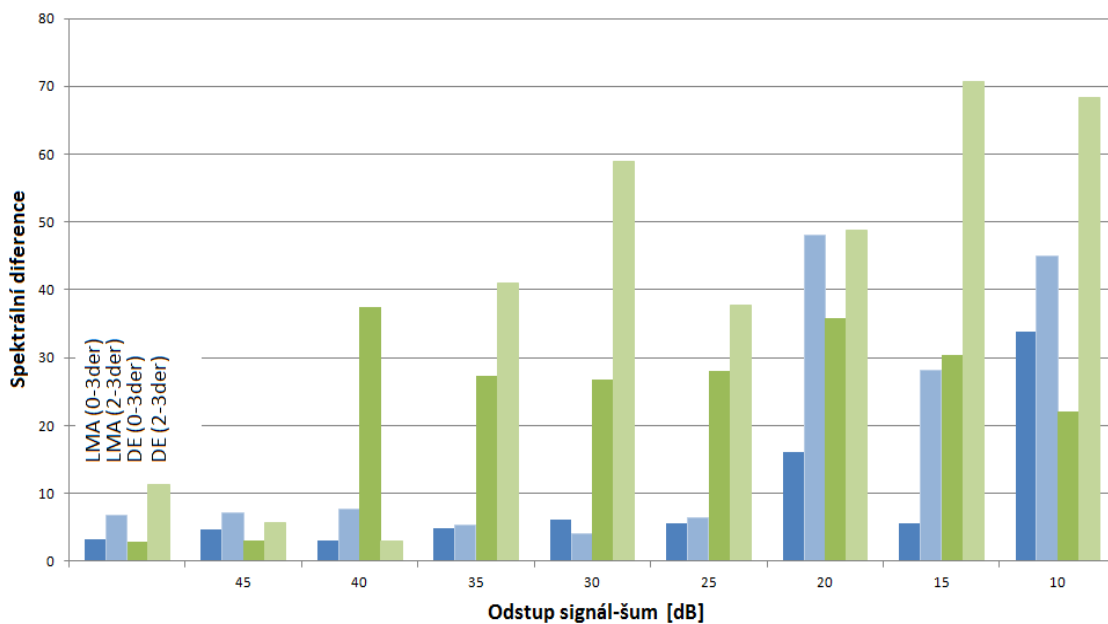
⁵³ Více o tomto jevu lze nalézt v referenční literatuře [118].

Tabulka 17 – Průměrná vzdálenost mezi peaky nalezených pomocí prokládacích algoritmů a skutečnou pozicí peaků. Tyto hodnoty závisí na inicializační metodě a počtu derivací v kriteriální funkci.

Levenberg-Marquardtova metoda (LMA)					Diferenciální evoluce (DE)	
Stupně derivace přítomné v kriteriální funkci	Inicializační metoda				Stupně derivace přítomné v kriteriální funkci	Náhodná inicializace
	min. 2nd der.	Ekvidistantní	Vzdálená optimu	Blízká optimu		
0,1,2,3	2,68	32,53	36,00	13,03	0,1,2,3	3,04
1,2,3	2,64	32,42	28,96	13,35	1,2,3	7,26
2,3	2,65	39,12	72,88	13,61	2,3	12,38
3	2,73	24,26	27,95	11,57	3	14,20

Nelder-Mead simplexová metoda (NMSA)				
Stupně derivace přítomné v kriteriální funkci	Inicializační metoda			
	min. 2nd der.	Ekvidistantní	Vzdálená optimu	Blízká optimu
0,1,2,3	12,43	52,47	63,93	20,27
1,2,3	19,85	46,42	41,08	19,83
2,3	35,94	34,95	57,62	26,17
3	16,06	43,10	53,89	26,54

Citlivost algoritmů na šum



Obrázek 42 – Vliv úrovně šumu na přesnost algoritmů [62].

V závěrečné části experimentu byla na základě výše uvedených poznatků proložena naměřená spektra bakterií⁵⁴. Spektra byla rozdělena do 4 částí, na každou část byly algoritmy prokládání křivkou aplikovány odděleně. Tento postup vedl k lepším výsledkům než aplikace algoritmů na celé spektrum. Jak vyplývá z předchozího rozboru, NMSA není vhodná pro tyto typy úloh a vykazuje nízkou

⁵⁴ Jde o stejná spektra, které byly předtím klasifikovány konvenčním klasifikátorem (PLS2-DA).

přesnost, protože se jedná o heuristickou metodu bez důkazu konvergence při řešení nelineárních problémů. Protože LMA a TRRA vykazují stejné výsledky, bude představeno pouze porovnání DE a LMA. Pro inicializaci optimalizačního algoritmu byla použita ekvidistantní strategie. Optimalizační kritérium se počítalo z druhé a třetí spektrální derivace (vztah 47). To je rozumný kompromis mezi imunitou vůči spektrálnímu šumu a nutností aproximace vysokofrekvenčních detailů ve spektrech.

Přesnost algoritmů vyjádřena jako průměrná odchylka mezi proloženým a originálním spektrem:

- LMA: 3,25 % (rychlost: 21s - procesor Intel i7, 2GHz)
- DE: 1,57 % (rychlost: 31 min - procesor Intel i7, 2GHz)

Jak je vidět, DE je přesnější, ovšem za cenu řádově větší výpočetní náročnosti. Tento fakt vedl k návrhu hybridního algoritmu, kde LMA sloužilo pro inicializaci DE algoritmu. Tento přístup kombinuje rychlost LMA a přesnost DE. Pomocí této hybridní strategie bylo dosaženo přesnosti 1,71% za 124 sekund. Tím byl snížen výpočetní čas z 31 min na 124 sekund při zachování přesnosti. V případě této techniky musí být speciální péče věnována udržování diverzity populace v DE. V tomto experimentu byla heterogenita populace zajištěna modifikací algoritmických parametrů – faktor mutace a CR (viz kap. 5.1.3.2)⁵⁵.

Kvůli identifikaci nejdůležitějších peaků z hlediska identifikace bakteriálních kmenů, byla provedena jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA [83]). V rámci této analýzy byly zkoumány rozptyly všech parametrů peaků (pozice, amplituda, šířka). Jak je vidět z tabulky 18, nejnižší p-hodnotu, a tedy největší rozptyl mezi třídami, vykazuje peak na 2200 nm. Tento peak je asociován s peptidoglykanovou vrstvou v buněčné membráně. Další silný peak byl lokalizován na 2310 nm. V tomto regionu se nachází signál CH₂ struktury v mastných kyselinách. Tento peak byl shledán jako důležitý z hlediska klasifikace i v dalších studiích[9].

Tabulka 18 - Dekomponované peaky s nejmenší ANOVA p-hodnotou

log(p)	Lokace [nm]	Parametr	Interpretace
-14	2,220	Šířka	N-H valenční mód
-11	2,220	Amplituda	N-H valenční mód
-10	2,184	Lokace	cis vazba v mastných kyselinách
-7	2,310	Šířka	CH ₂ valenční a deformační mód v mastných kyselinách
-2	2,056	Amplituda	N-H val.m., amidy A/I v proteinech

Další interpretované peaky:

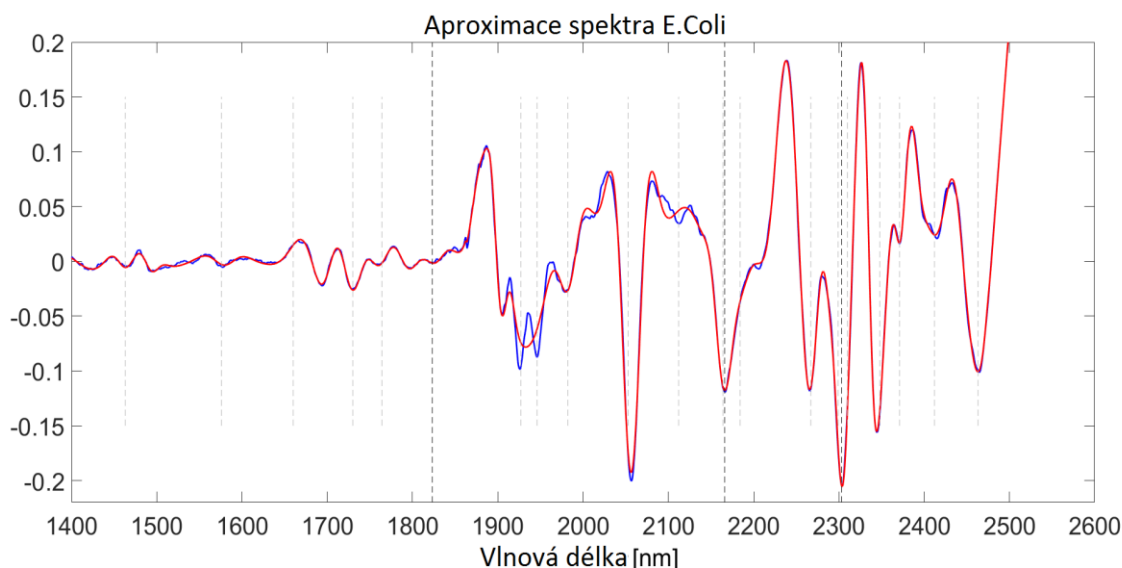
- 1463nm – N-H první overton [9],[84].

⁵⁵ Některé další techniky pro zajištění generality algoritmu jsou uvedeny v referenční literatuře[79].

- 1600 nm – C-H valenční první overton [12],[9],[2],[84].
- 1700-1759 – CH₃ a CH₂ valenční první overton [2],[84].
- 1927 nm – O-H kombinační mód vody.
- 1982 nm – C=O v amidech [12].
- 2053nm – N-H symetrické a asymetrické valenční módy v amidech v proteinech [7],[2],[84].
- 2164 nm – amidy [2],[84].
- 2184 nm – cis vazba v nenasatovaných mastných kyselinách [9].
- 2267 nm – C-H kombinační vazba v polysacharidech [2].
- 2299 nm - N-acetylmuramová kyselina v peptidoglykanové vrstvě [2].
- 2310 nm – CH₂ deformační mód [9],[2],[84].
- 2330-2368 nm – C-H alifatické skupiny [7].

Všechny tyto významné peaky jsou znázorněny na obr. 40 a jejich vlnové délky jsou ještě reprezentovány šedými čarami v obr. 43.

Na závěr byly parametry všech peaků použity pro samotnou klasifikaci spekter. Každé naměřené spektrum bakterií bylo aproximováno 31 peaky, tzn. že měření bylo reprezentováno 93 parametry⁵⁶. Pro klasifikaci byl opět použit model PLS2-DA s dvoustupňovou křížovou validací. Přesnost klasifikace byla stanovena na 91,7%, tzn. že vysoký klasifikační výkon byl udržen i přes značné zjednodušení spektra – 6224 spektrálních bodů bylo převedeno na 93 parametrů.



Obrázek 43 – Druhá derivace spektra E.Coli (modrá) a proložené spektrum (červená) vypočítané pomocí DE [62].

⁵⁶ Každý peak má 3 parametry, pro 31 peaků tedy vychází 93 parametrů.

5.1.3.4 Závěr a diskuze

Prokládání NIR spekter bakterií křivkou napomáhá jejich pochopení a interpretaci. Nasazení této techniky je ale netriviální, protože výsledky závisí na mnoha parametrech, jako je úroveň šumu, inicializace, forma kritéria a počet modelovaných peaků. Na druhou stranu, DE se zdá být vhodným kandidátem pro tuto úlohu, protože vykazuje vysokou toleranci na nastavení výše uvedených parametrů. Výpočetní nároky DE se dají minimalizovat nasazením LMA pro jeho inicializaci. Jakmile je spektrum dokomponováno na jednotlivé peaky, lze jim přiřadit jednotlivé buněčné komponenty (proteiny, mastné kyseliny, buněčná stěna). Nejdůležitější peaky pro klasifikaci se vyskytovaly v oblasti 2000-2500 nm, kde generují signál převážně proteiny a mastné kyseliny – a to zejména N-H valenční vibrace (2220 nm), cis vazby v nenasaturovaných mastných kyselinách (2184 nm) a CH₂ valenční vazby v mastných kyselinách a proteinech (2310 nm). Zatímco originální spektra byla klasifikována podle konvenčních algoritmů z přesností 95%, úspěšnost klasifikace na základě parametrů aproximovaných peaků dosáhla 91,7%. Tento výsledek ukazuje, že i přes značné zjednodušení spektra je klasifikace bakteriálních kmenů možná. Experiment a jeho výsledky jsou detailněji rozebrány v článku autora[71].

5.1.4 NIR-MIR korelace spekter bakteriálních buněk

5.1.4.1 Úvod

2D korelační spektroskopie se zdá být jako velmi vhodný nástroj pro analýzu a interpretaci spekter bakterií. Tato technika je založená na porovnání spektra vzorku v MIR a NIR oblasti. V MIR spektrálním rozsahu (2.5 μm - 25 μm), absorbují převážně fundamentální vibrační módy, které jsou dobře separovatelné a popsané. Overtony a kombinační módy vznikající v NIR spektru lze následně interpretovat pomocí korelace s MIR fundamentálními peaky.

I když existují studie použitelnosti NIRS pro klasifikaci a identifikaci bakteriálních kmenů [6], [9], [85], obecně přijímaná interpretace NIR spekter bakterií chybí. Naproti tomu, mnoho studií spekter mikroorganismů v MIR pásmu dokazují použitelnost této metody pro přesnou identifikaci bakteriálních kmenů. Základních 13 spektrálních regionů bylo identifikováno Helmem[86] a Naumanem[87]. Poté bylo zveřejněno mnoho vědeckých článků zabývajících se problematikou identifikace patogenních bakterií([20],[21]). Společnost Bruker vyvinula zařízení pro akvizici FTIR spekter z mikrotitračních destiček pro klasifikaci bakteriálních kmenů.

Je jasné, že pochopení NIR spektra bakterií je zásadní krok pro použitelnost této metody v praxi a NIR-MIR 2D korelační spektroskopie se zdá být skvělým nástrojem.

5.1.4.2 Materiály a metodika

Ve studii byly použity lyofilizované bakteriální suspence ze Španělské kolekce kultur:

- *Lactobacillus sakei* (CECT 4808)
- *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014)
- *Lactococcus lactis ssp. Lactis* (ATCC 19435^T)
- *Listeria monocytogenes* (NCTC 11994)
- *Listeria ivanovii* (ATCC 19119)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 23235)
- *Salmonella enteritidis* (CECT 556)
- *Escherichia coli* serotyp O25:H42 (CECT 686)

Kultury byly kultivovány do formy oddělených kolonií, 2 dny před měřením byla každá kolonie resuspendována v čistém médiu a inkubována po dobu 16h.

Samotná akvizice spekter byla provedena následujícím způsobem:

1. Koncentrace bakteriální suspenze byla normalizována na 10^7 CFU/mL měřením optické hustoty pomocí fotometru Labsystems Bioscreen C.
2. Byly odebrány vzorky ve všech růstových fázích (exponenciální, stacionární, fáze odumírání).
3. 15 mL suspenze bylo centrifugováno a kvůli eliminaci vlivu živného média byl 2x vyměněn supernatant.
4. Suspenze byly filtrovány vakuovým systémem Millipore Sterifil Aseptic System přes membrány Whatman GF-5 (25 mm) a vysušeny (50 °C, 6h).
5. Akvizice NIR spekter:
 - Bruker FT-NIR MPA s PbS Detektorem. DRIFT měření s integrační sférou.
 - Rozsah: 12,500-3,600 cm^{-1} .
 - Rozlišení: 16 cm^{-1} .
 - 32 skenů v 772 bodech.
6. Akvizice MIR spekter:
 - Bruker FT-MIR Bruker Tensor 27 s CsI děličem svazku a DTGS detektorem
 - Rozsah: 4,000-250 cm^{-1} .
 - Rozlišení: 4 cm^{-1} .
 - 50 skenů v 1994 bodech.

Celkem bylo změřeno 28 spekter osmi bakteriálních kmenů. Spektra byla upravena Savitzky-Golay filtrem (2. derivace; polynom 3. stupně; šířka: 31 bodů pro MIR a 17 pro NIR).

Korelační mapa

2D korelační spektroskopie byla použita pro vytvoření korelační mapy mezi NIR a MIR spektry bakteriálních vzorků [48]. Velké kladné hodnoty bodů v mapě znázorňují silnou přímou závislost, zatímco velké záporné hodnoty vyjadřují silnou nepřímou závislost. Postup získání korelační mapy je následující:

1. Bylo změřeno 28 NIR a 28 MIR spekter různých kmenů.
2. Dynamická spektra byla vypočtena odečtením průměrného spektra:

$$\begin{aligned}\widetilde{A}_{NIR}(v_n, i) &= A_{NIR}(v_n, i) - \overline{A}_{NIR}(v_n), \\ \widetilde{A}_{MIR}(v_m, i) &= A_{MIR}(v_m, i) - \overline{A}_{MIR}(v_m),\end{aligned}$$

kde:

$A(v_n, i)$ - vlnová délka „ v_n “ i-tého spektra

$\bar{A}(v_n)$ - průměrné spektrum

$\tilde{A}(v_n, i)$ - dynamické spektrum.

3. Synchronní korelační spektrum „ $\Phi(v_n, v_m)$ “ reprezentuje stupeň korelace mezi datovým bodem (absorpce na vlnové délce) v NIR (v_n) a v MIR (v_m) pásmu.

$$\Phi(v_n, v_m) = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p \widetilde{A}_{NIR}(v_n, i) \cdot \widetilde{A}_{MIR}(v_m, i).$$

Další informace o 2D korelační spektroskopii lze nalézt v referenční literatuře [48].

Klasifikační model

V další části studie byla popsána problematika identifikace bakteriálních kmenů na základě NIR spekter. I když klasifikace není hlavní záměr toho experimentu, slouží jako ověření správné korelace MIR-NIR spekter bakterií. Bylo změřeno 90 spekter těchto kmenů:

- *Listeria ivanovii* (ATCC 19119)
- *Salmonella enteritidis* (CECT 556)
- *Escherichia coli* serotyp O25:H42 (CECT 686)

Mikroorganismy byly měřeny na filtrační membráně se stejným protokolem přípravy jako v předchozím experimentu.

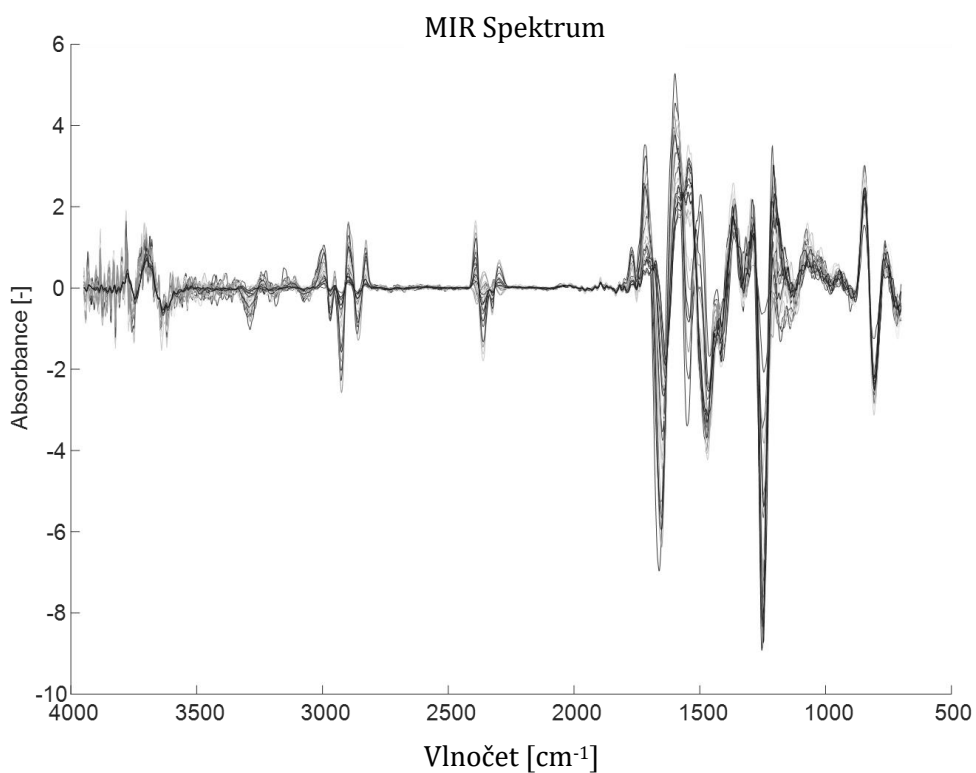
Akvizice NIR spekter:

- Thermo Scientific Nicolet Antaris. DRIFT měření s integrační sférou.
- Rozsah: 1,100-2,500 nm.
- Rozlišení: 1 cm⁻¹.
- 60 skenů.

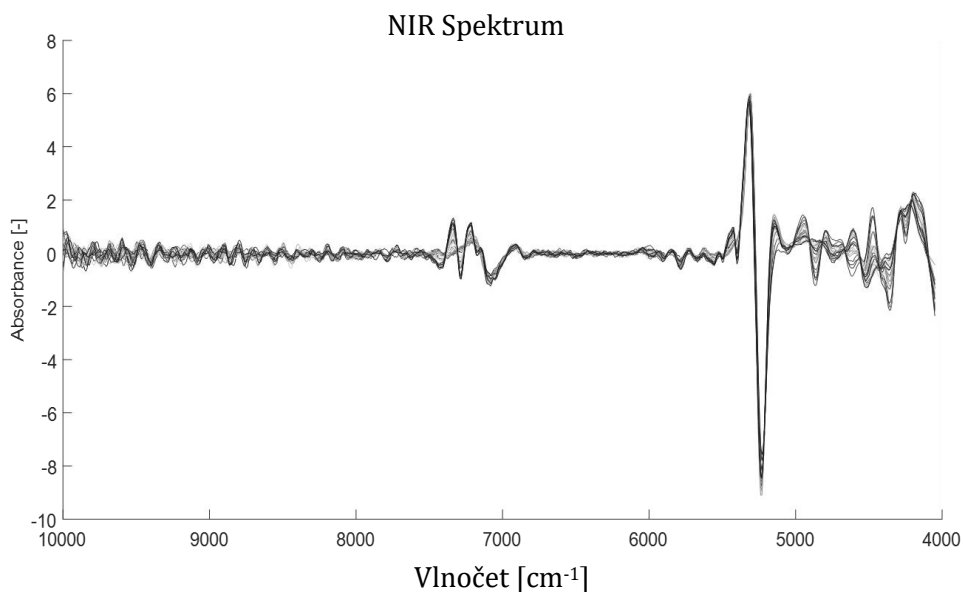
NIR spektra byla klasifikována pomocí PLS-DA modelu a validována dvojnásobnou kros-validací. V dalším kroku se zúčastnily kalibrace pouze peaky s vysokým korelačním koeficientem ($r > 0,5$) s vybranými MIR peaky – viz tab. 19. MIR a NIR spektra po matematickém zpracování jsou na obr. 44 a 45.

Tabulka 19 – Vybrané MIR peaky. PLS-DA modelu se zúčastnily pouze části spektra s vysokou korelací k těmto peakům.

	Vlnová délka	Vlnočet
P=O valenční mód	7,918 nm	1,263 cm^{-1}
Amidy II	6,460 nm	1,548 cm^{-1}
Amidy III	7,634-8,065 nm	1,240 – 1,310 cm^{-1}
Amidy I	5,900 nm	1,695 cm^{-1}
CH ₂ v mastných kyselinách	3,420 nm	2,924 cm^{-1}



Obrázek 44 - MIR spektrum bakteriálních vzorků. Po matematickém zpracování [88].



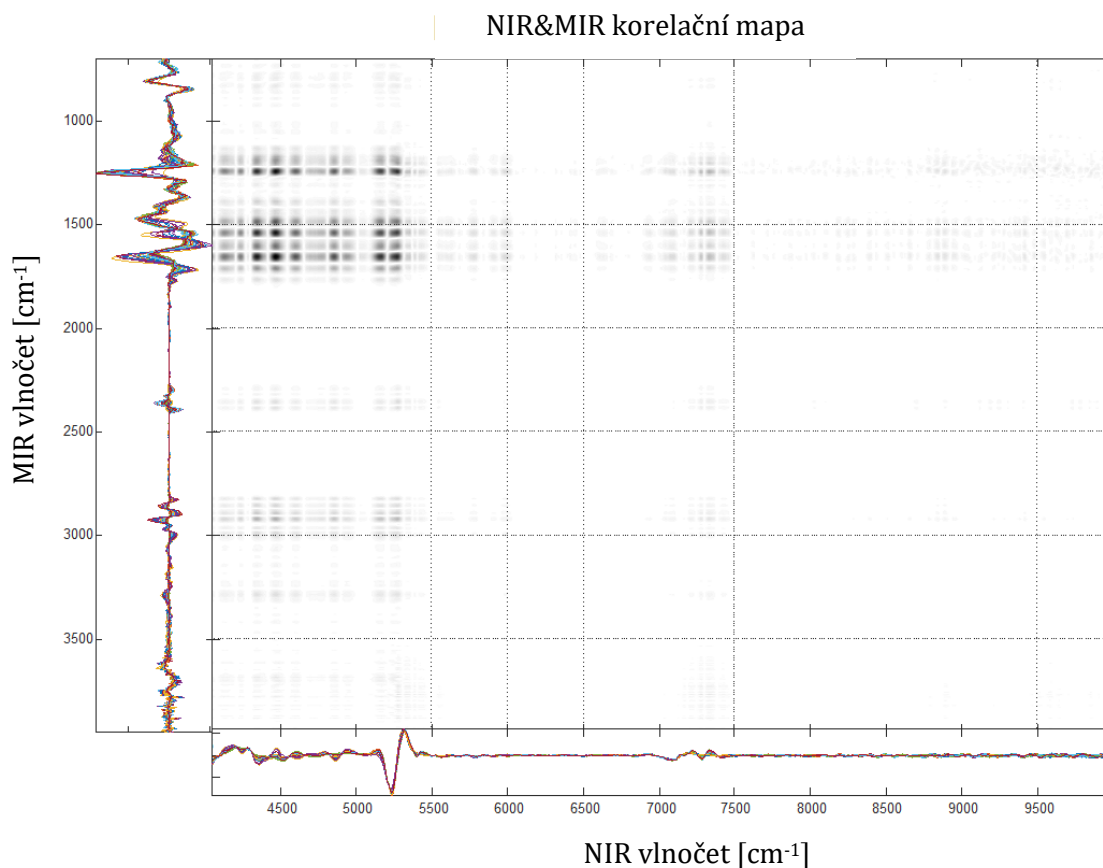
Obrázek 45 - NIR spektrum bakteriálních vzorků. Po matematickém zpracování [88].

5.1.4.3 Výsledky

Vypočítaná korelační mapa (obr. 46) ukazuje stupeň korelace mezi NIR (osa X) a MIR (osa Y) spektry jako úrovně šedé. Jinými slovy, tmavší části mapy ukazují silnější korelace mezi NIR-MIR datovými body (vlnové délky).

V MIR spektru (osa Y v obrázku 46) lze pozorovat region s vysokou korelací ($1000\text{ cm}^{-1} - 1800\text{ cm}^{-1}$) který podle dostupné literatury [19], [89] odpovídá vibracím proteinů v Amidových skupinách, O-H, CH_2 deformačnímu módu a C-H valenčního módu v polysacharidech. Další oblast se silnou korelací je okolo 3000 cm^{-1} , v této části spektra jsou absorbovány převážně valenční vibrační módy CH_2 a CH_3 v lipidech.

V NIR spektru lze nalézt oblast s vysokou korelací v rozsahu $4,000\text{ cm}^{-1}$ do $5,500\text{ cm}^{-1}$ ($1,818\text{ nm} - 2,500\text{ nm}$) – viz osa X na obr. 46. Tato část spektra je nejčastěji přiřazována kombinovaným vibracím C-H, N-H a O-H vazeb. Další významná oblast s vysokou korelací leží v pásmu $7,000\text{ cm}^{-1} - 7,500\text{ cm}^{-1}$ ($1,333\text{ nm} - 1,428\text{ nm}$). V tomto pásmu absorbuje především první overton C-H kombinovaných vibrací.



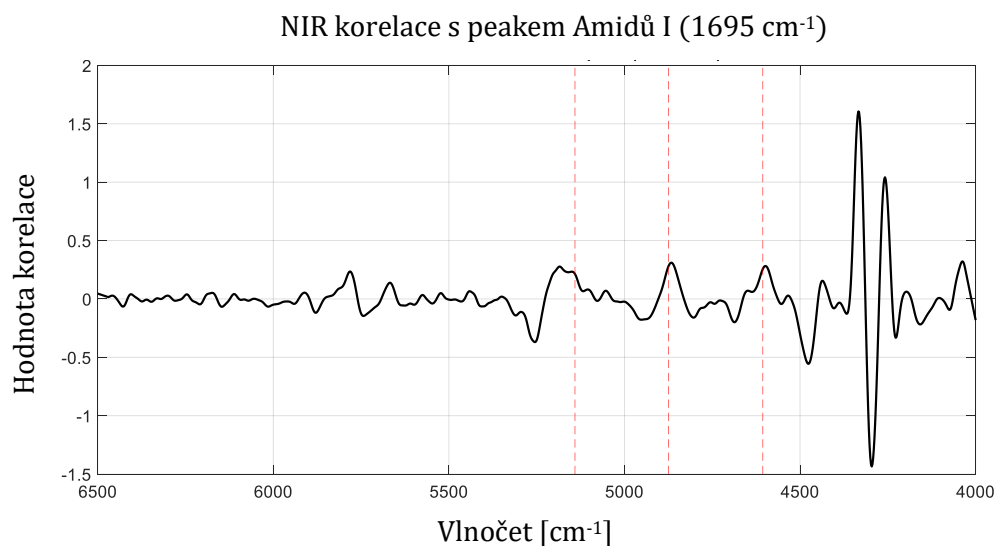
Obrázek 46 - 2D korelační mapa mezi MIR-NIR spektry bakterií. Stupeň šedi ukazuje úroveň korelace [88].

Obrázek 47 ukazuje korelaci mezi peakem Amidů I v MIR ($1,695\text{ cm}^{-1}$) a kompletním NIR spektrem. Hodnoty na jednotlivých vlnových délkách vyjadřují stupeň korelace vzhledem k peaku Amidu I. Vyšší (pozitivní/negativní) hodnoty reprezentují vyšší (přímou/nepřímou) korelaci. Hecht a kol.[90], Cámara-Martos a kol. [12], a Rodríguez-Saona a kol. [2] identifikovali většinu peaků, které měly vysokou korelaci právě se skupinou Amidů I – viz Tab. 20.

Tabulka 20 - Peaky se silnou korelací s Amidy I (1965 cm^{-1}).

	Vlnová délka	Vlnočet
Amidy A/I a Amidy B/II [2]	2,052-2,060 nm a 2,171-2,178 nm	4,854–4,874 cm^{-1} a 4,592–4,606 cm^{-1}
Vázaná voda v proteinech[90]	1,945 nm	5,141 cm^{-1}
Proteiny [12].	1,520 nm	6,579 cm^{-1}

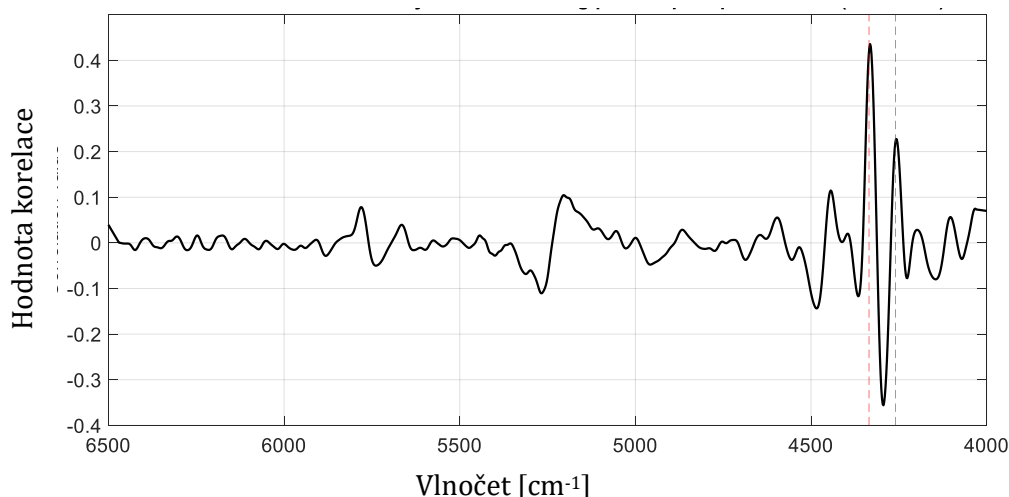
Kromě těchto peaků existují další oblasti s vysokou korelací, a to zejména oblast okolo $4,332\text{ cm}^{-1}$ (P-O vazba), $1,548\text{ cm}^{-1}$ (Amidy II) a $1,310\text{-}1,240\text{ cm}^{-1}$ (Amidy III). Tyto oblasti se zdají být nemožné separovat od spektrálních pásem Amidů I.



Obrázek 47 - Korelace mezi NIR spektrem a MIR peakem interpretovaný jako vibrace Amidu I ($1695\text{-}1$) [88].

Velmi silnou korelaci NIR spektra s peakem valenčních vibrací P=O vazby ($1,263\text{ cm}^{-1}$) ukazuje obr. 48. Tomuto korelačnímu spektru dominují dva peaky ($4,332\text{ cm}^{-1}$, $4,258\text{ cm}^{-1}$). Rodriguez-Saona et al. [2] identifikoval tyto peaky pomocí měření standardů fosfolipidu (lecitin). P=O valenční vibrační mód je tedy velmi spolehlivě detekovat NIR spektroskopií. Peaky asociované s amidovými skupinami se rovněž vyskytují v korelačním spektru P=O vibrací. To je zřejmě zapříčiněno chemickou strukturou membrány komplexních lipidů, jako např. sfingolipidů.

NIR korelace s P=O asymetrickým valenčními vibracemi v fosfolipidech
(1263 cm⁻¹)



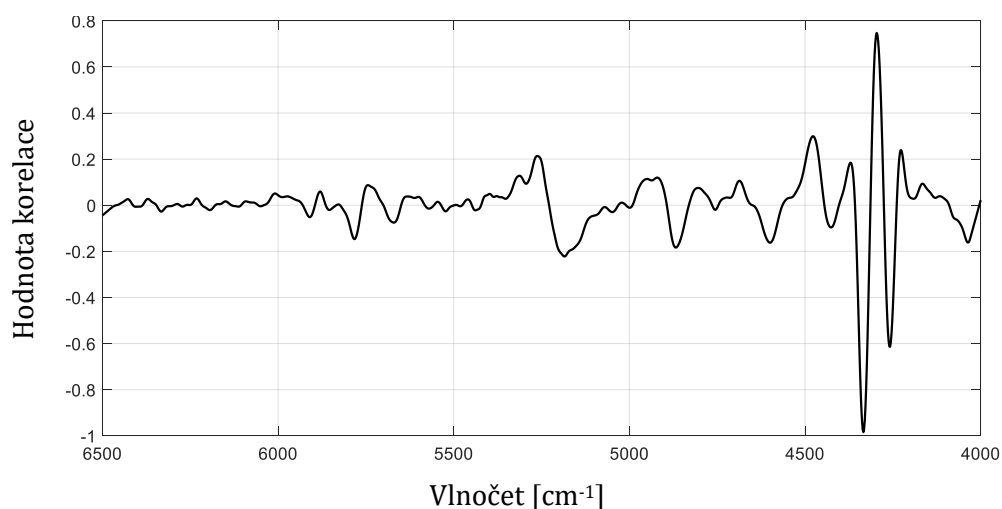
Obrázek 48 - Korelace mezi NIR spektrem a MIR peakem interpretovaný jako P=O valenční vibrace fosfolipidů (1263 cm⁻¹) [88].

Obrázek 49 ukazuje korelaci NIR spektra s peakem, který Nauman [19] identifikoval jako C-H asymetrické valenční vibrace v methylenu v mastných kyselinách. Jak bylo predikováno, s tímto peakem bylo korelováno mnoho spektrálních regionů, především region 4,000 – 5,000 cm⁻¹. Seznam spektrálních regionů v NIR spektru, které vykazují vysokou korelaci s tímto peakem je uveden v tabulce 21.

Tabulka 21 - Peaky se silnou korelací s CH₂ v mastných kyselinách (2924 cm⁻¹).

	Vlnová délka	Vlnočet
C-H valenční/deformační vib. [2]	2,366 nm	4,226 cm ⁻¹
Aminokyselina, kombinované v.[7]	2,134-2,233 nm	4,478-4,686 cm ⁻¹
O-H valenční/deformační vib.	2,080 nm	4,808 cm ⁻¹
C=O, karbonyl overton v mastných kyselinách [7]	2,033 nm	4,920 cm ⁻¹

NIR korelace s C-H asymetrickým valenčními vibracemi CH₂ v mastných kyselinách (2924 cm⁻¹)



Obrázek 49 - Korelace mezi NIR spektrem a MIR peakem interpretovaný jako CH₂ asymetrické valenční vibrace v mastných kyselinách (2924 cm⁻¹) [88].

Další silnou korelaci lze nalézt na vlnočtu na 4,294 cm⁻¹ (2,329 nm). V této oblasti absorbují především C-H valenční a deformační vibrace v polysacharidech [82].

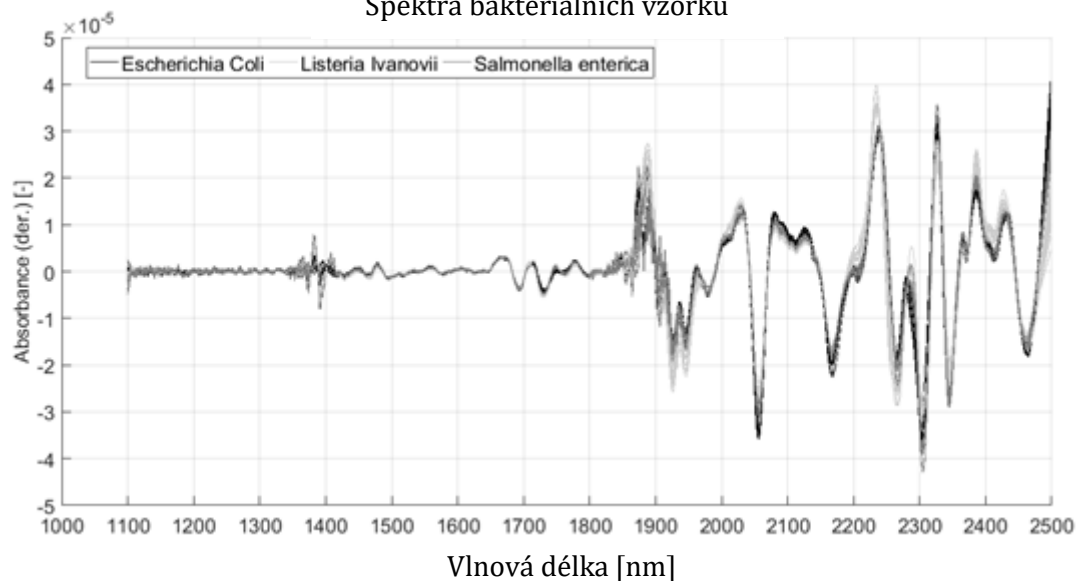
Ne všechny MIR peaky identifikované Naumanem [19] mají významné korelace s NIR spektrem. Především C=O a C-O vazby mají mizivý impakt do NIR spektra, především kvůli slabé absorpci těchto vazeb.

V další části studie byl sestaven model pro klasifikaci bakterií na základě NIR spekter. Tento model byl sestaven kvůli ilustraci použitelnosti této studie v úloze identifikace kmenů. Celkem byly změřeny 3 bakteriální kmeny, které sloužili pro kalibraci a validaci modelu. Obrázek 50 ukazuje spektra po matematickém zpracování. Pro klasifikaci byl použit PLS-DA klasifikační model. Kmen byl správně klasifikován v 85% případů – viz Tabulka 22. Aby se zvýšila úspěšnost klasifikace, byly vybrány pouze ty části NIR spektra, které vykazovali vysokou korelaci k některému s důležitých MIR peaků (korelační koeficient > 0,5). Model kalibrovaný na tento dataset vykazoval úspěšnost 96%. Na obrázku 51 lze porovnat prostor skóre PLS-DA modelu. Jak je vidět, model založený na vybraných datových bodech vykazuje vyšší separabilitu. Z uvedeného vyplývá, že NIR-MIR korelace pomohla zvýšit klasifikační sílu modelu, protože odstranila části spekter s nízkou korelací, a tudíž s nízkou informační hodnotou.

Tabulka 22 - Parametry zpracování spekter a klasifikační síla PLS-DA modelu

	Celé spektrum	Zkrácené spektrum
PLS-faktory pro predikci	3	3
Matematické zpracování	Druhá der. (SG, MSC)	Druhá der. (SG, MSC)
Počet datapointů pro kalibraci	45	45
Počet datapointů pro validaci	45	45
CCR kalibrace (%)	88	96
CCR validace (%)	85	94
Validační metoda	2-fold kros-validace	2-fold kros-validace

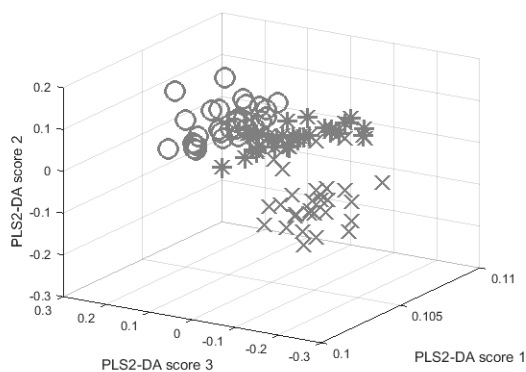
Spektra bakteriálních vzorků



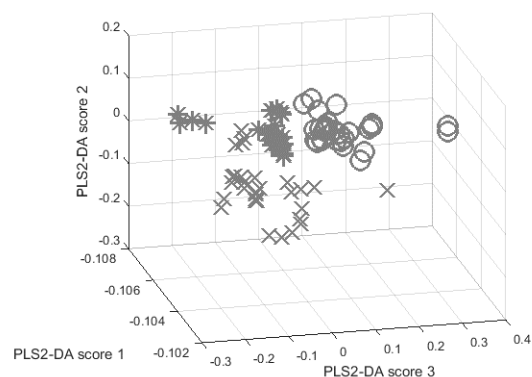
Obrázek 50 - Spektra bakteriálních vzorků použitých pro kalibraci klasifikačního modelu po matematickém zpracování (druhá derivace Savitzky-Golay, MSC) [88].

Je důležité upozornit, že měření bylo provedeno pro vysoké koncentrace bakteriálních buněk ($\sim 10^7$ CFU/mL), za kontrolovaných podmínek růstu a v kontrolovaném prostředí. Všechny tyto aspekty významně ovlivňují NIR/MIR spektra. Z experimentů nicméně vyplývá, že některé spektrální části MIR spektra bakterií jsou korelované s NIR peaky, takže analýza buněk NIR spektroskopií je možná.

Prostor skóre PLS2-DA – celé spektra



Prostor skóre PLS2-DA – zkrácené spektra



Obrázek 51 – Prostor PLS-DA skóre celého spektra (vlevo) a zkráceného spektra (vpravo) [88].

5.1.4.4 Závěr a diskuse

NIR-MIR korelace posloužila pro studium použitelnosti NIR spektroskopie bakteriálních buněk. Výsledky dokazují, že majoritní peaky v NIR spektru jsou asociovány se základními bakteriálními konstituenty (proteiny, fosfolipidy, polysacharidy). Např. amidové skupiny se nachází v proteinech (40-60% suché váhy bakteriální buňky [19]), fosfolipidy se nacházejí v polysacharidech, což je základní stavební kámen buněčné membrány a buněčné stěny, a tudíž zabírá významnou část váhy buňky. Fundamentální vibrační módy asociované s těmito makromolekulami se nachází v MIR části spektra a vykazují vysokou korelaci k těmto NIR spektrálním regionům.

I přes to, že z NIR spektra lze určit kvantitu některých základních stavebních prvků bakterií, ne všechny fundamentální peaky v MIR byly korelovány, a tudíž nelze přeciť úplný chemický obraz buňky.

Tato studie ukázala na části NIR spektra bakteriální buňky, které jsou důležité pro její analýzu. Úspěšnost klasifikace bakteriálních kmenů na základě jejich NIR spekter byly zvýšena výběrem částí spektra s vysokou korelací k MIR peakům interpretovaným jako základní konstituenty bakteriálních buněk.

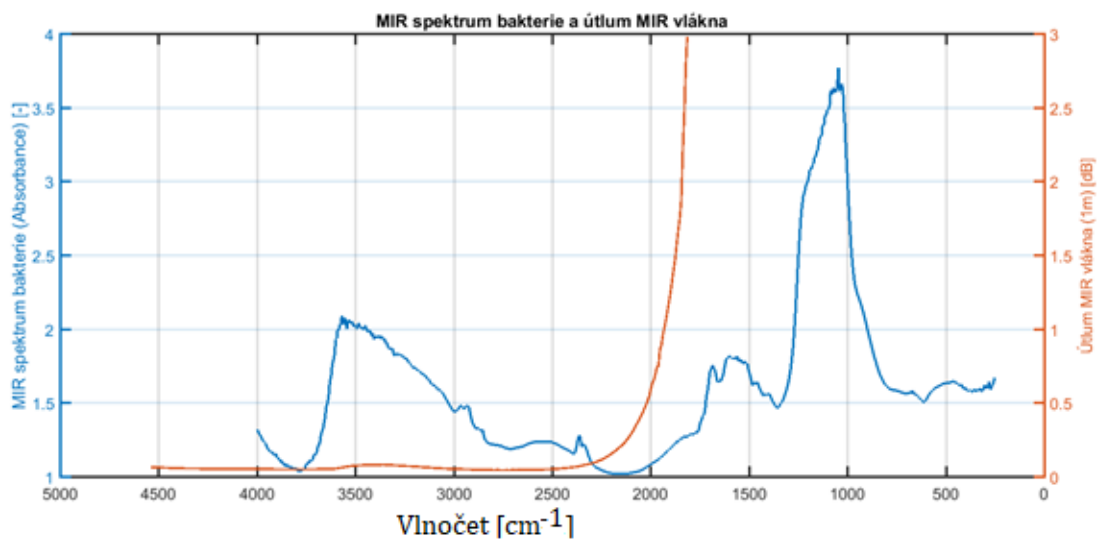
Experiment a jeho výsledky jsou detailněji rozebrány v článku autora [88], který je v době psaní této práce v recenzním řízení.

6 NÁVRH ŠIROKOPÁSMOVÉHO OPTOVLÁKNOVÉHO BIOSENZORU S EVANESCENTNÍM SNÍMÁNÍM A KAVITNÍM ZESÍLENÍM

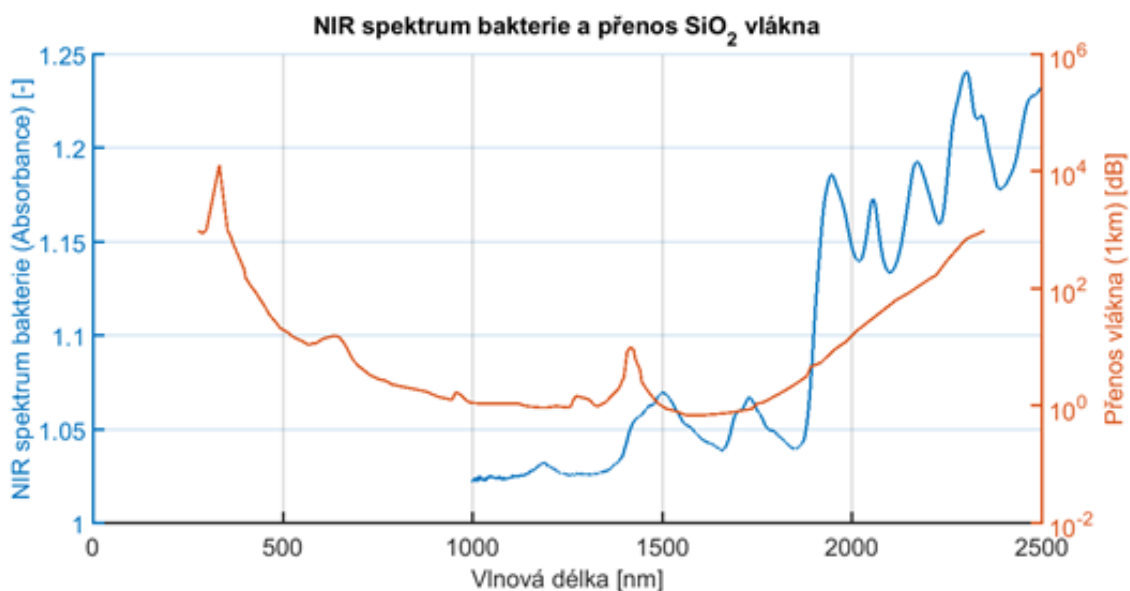
Jak z experimentů uvedených v kapitole 5 vyplývá, NIR spektrum obsahuje dostatek informací pro analýzu a klasifikaci bakteriálních druhů. V této kapitole bude navržen a namodelován optovláknový senzor, který bude schopen měřit spektrum vzorku navázaného na povrch senzoru v daném rozsahu a tím zvýšit citlivost NIR spektroskopie. Dále bude navržen model pro kavitní zesílení a výsledná spektra matematicky zpracována. Cílem je namodelovat senzor, který bude dostatečně citlivý, aby bylo možné změřit spektrum již 10^5 navázaných buněk.

6.1.1 Výběr spektrální oblasti pro analýzu bakterií

Většina fundamentálních peaků zásadních pro analýzu a následnou klasifikaci bakteriálních vzorků se nachází v MIR spektru. Tento spektrální region je však pro funkci optovláknového senzoru nevhodný, protože standardní vlákna z oxidu křemičitého absorbují záření vlnových délek delších než cca. 2200 nm. I když existují vlákna z alternativních materiálů (ZrF_4 , InF_3 , As_2S_3), potřebné šíře přenosového spektrálního okna nedosahují. Tuto situaci demonstruje obrázek 52. Klíčovou část spektra ($500-2000\text{ cm}^{-1}$) vlákno nepřenáší.



Obrázek 52 - Útlum InF_3 vlákna (pravá osa, oranžová) a typické MIR spektrum bakteriální buňky (levá osa, modrá).



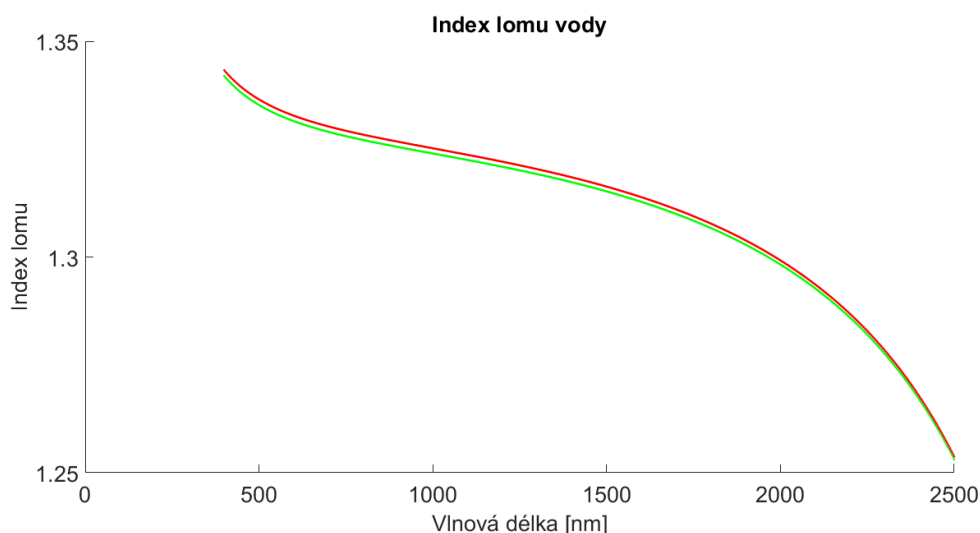
Obrázek 53 - Útlum SiO_2 vlákna (pravá osa, oranžová) a typické NIR spektrum bakteriální buňky (levá osa, modrá).

Na obrázku 53 je vidět, že standardní vlákno z oxidu křemičitého dobře přenáší vlnové délky v regionu 400-2200 nm. Přenosové okno vlákna pokrývá vlnové délky C-H overtonu (1333-1428 nm). Části spektra, které odpovídají vibracím Amidů I (1945 nm, 1520 nm, 2052-2060 nm, 2171-2178 nm), byly identifikovány v kap. 5.1.4 a rovněž spadají do pásma přenosu tohoto materiálu. Dalším důležitým spektrálním regionem je 2310-2366 nm, kde podle studií uvedených v kap. 5.1.3 a 5.1.4 absorbují především valenční a deformační módy CH_2

v mastných kyselinách. V této oblasti rovněž absorbují P=O vazby, které jsou důležité pro analýzu spekter bakteriálních buněk. Absorpce SiO₂ je v této oblasti 20x vyšší, což znemožňuje použití tohoto materiálu pro úspěšnou analýzu bakteriálních buněk. Již zmíněný InF₃ nelze použít pro MIR spektroskopii, ale perfektně pokrývá celé požadované pásmo v NIR oblasti (1300 nm – 2500 nm). V návrhu senzoru bude tedy použit tento materiál.

6.1.2 Evanescentní snímání

Prostředí, ve kterém dochází k analýze vzorku je voda. Pro výpočet přenosu senzoru je nutné znát její index lomu v komplexním tvaru. S teplotou se mění rychlost šíření světla, a tudíž i její index lomu (reálná část). Vztah mezi teplotou a indexu lomu vody je uveden v empirických rovnicích v referenční literatuře [91].



Obrázek 54 – Index lomu vody (Teplota: 20 °C (červená), 30 °C (zelená)).

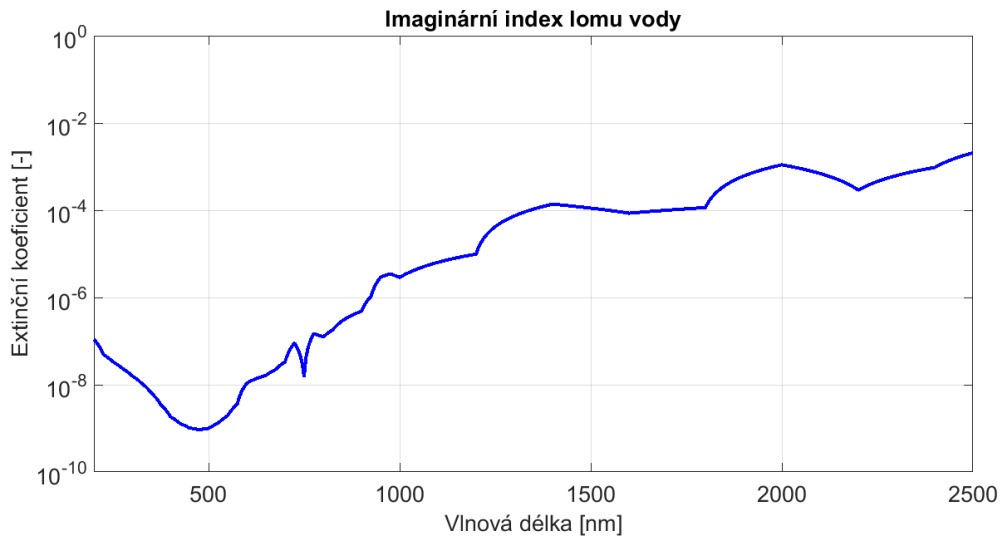
Imaginární část indexu lomu, která vyjadřuje absorpci světla v materiálu, je odvozena z absorpčního koeficientu a vlnové délky podle vztahu 50. Absorpční koeficient („ α “) lze určit z Lambert-Beerova zákona, za předpokladu, že je známá naměřená absorbance („ A “), délka vzorku („ d “) a koncentrace („ C “)⁵⁷.

$$\kappa = \frac{\alpha \lambda}{2\pi} \quad (50)$$

$$\alpha = \frac{A}{Cd} \quad (51)$$

⁵⁷ Pro měření absorpce vody v květu je $C = 1$.

Absorbanci je možné získat spektroskopickým měřením. Tyto data jsou dostačující pro modelování evanescentního snímání bez přítomnosti bakterií.



Obrázek 55 – Imaginární část indexu lomu vody.

Aby bylo možné vypočítat změnu přenosu navrhovaného senzoru při měření vzorku, je nutné vyjádřit přítomnost bakteriálních buněk jako změnu (komplexního) indexu lomu okolí jádra optického vlákna. Index lomu bakteriální buňky byl změřen např. imerzní refraktometrií[92] a je stanoven na 1,338. Pokud je vrstva organické hmoty tenčí než penetrační hloubka evanescentního pole, je nutné efektivní index lomu aproximovat např. podle Maxwell-Garnettovi rovnice[93] – viz rovnice 52. Tato aproximace udává, jaký lze stanovit makroskopický efektivní index lomu („ ϵ_{eff} “) kompozitních materiálů. Pro aproximaci je nutné znát dielektrické konstanty organické vrstvy („ ϵ_1 “) a okolí („ ϵ_0 “) a jejich objemový poměr („ δ “). Dielektrická konstanta lze vypočítat z indexu lomu podle jednoduché rovnice 53⁵⁸. Pro objemový poměr je pak nutné znát penetrační hloubku a tloušťku vzorku. Výpočet poměru je pak znázorněn na obrázku 56. Na obrázku je znázorněna tloušťka bakterie 0,86 μm ⁵⁹ a rozsah hloubky „z“, kterou zabírá buňka. Objemový poměr lze analyticky spočítat podle vztahu 54, kde „t“ je tloušťka bakterie.

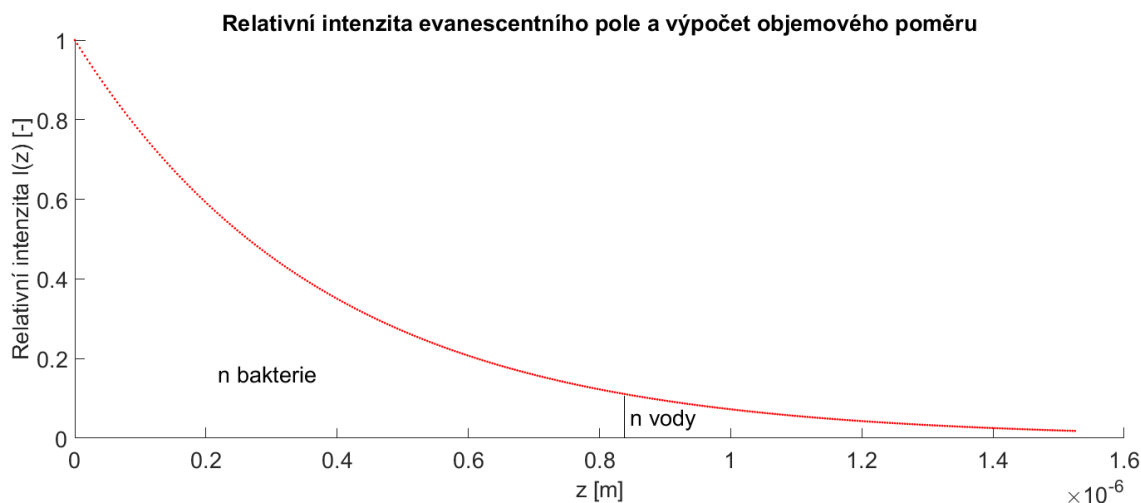
$$\frac{\epsilon_{eff}-\epsilon_0}{\epsilon_{eff}+2\epsilon_0} = \delta \left(\frac{\epsilon_1-\epsilon_0}{\epsilon_1+2\epsilon_0} \right). \quad (52)$$

$$n = \sqrt{\epsilon_r}. \quad (53)$$

⁵⁸ Tato rovnice platí pro nemagnetické materiály.

⁵⁹ Podle [92].

$$\delta = \frac{\int_0^t e^{-\frac{z}{a}} dz}{\int_0^\infty e^{-\frac{z}{a}} dz} = 1 - e^{-\frac{t}{a}}. \quad (54)$$

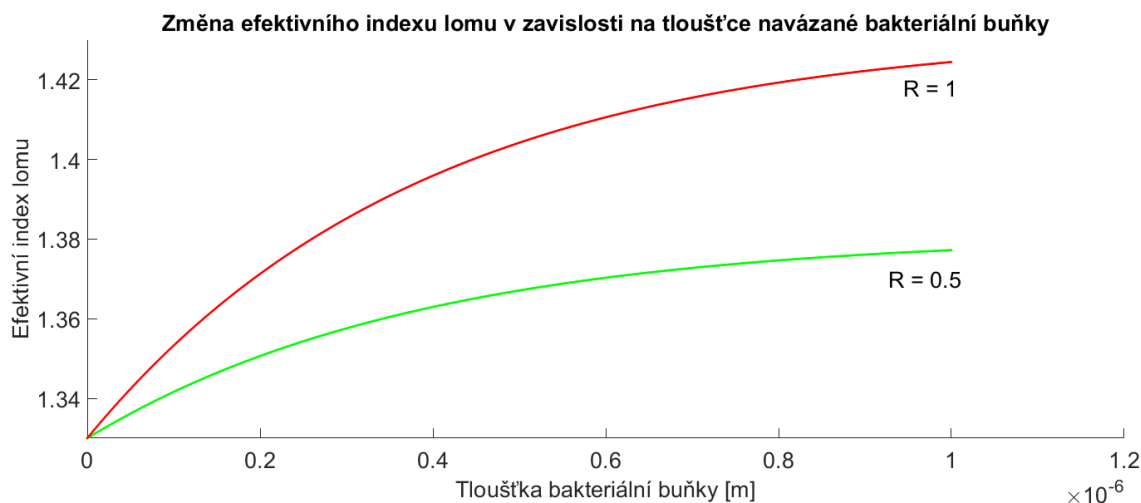


Obrázek 56 - Relativní intenzita evanescentního pole. V grafu je naznačena tloušťka bakterie (860 nm). Efektivní index lomu se pak vypočítá z poměrů obsahů vytyčených křivkou.

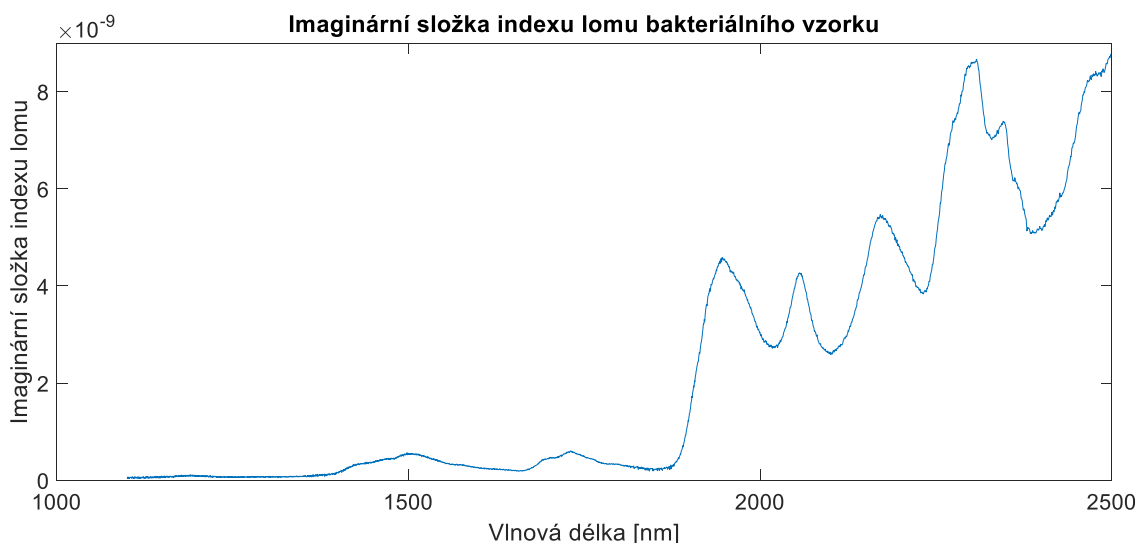
Další nutný parametr pro výpočet modelu je činitel zaplnění „R“. Činitel zaplnění udává, jaká část aktivní délky vlákna je zaplněna vzorkem. Tento parametr se pohybuje v rozsahu 0 (bez vzorku) – 1 (vlákno je plně obklopeno vzorkem). Rovnice 55 je pak upravena do tvaru 56 pro výpočet konečného efektivního indexu lomu „ n_{eff} “.

$$\varepsilon_{\text{eff}} = \frac{2(1-\delta)\varepsilon_0 + (1+2\delta)\varepsilon_1}{(1-\delta)\varepsilon_1 + (2+\delta)\varepsilon_0} \quad (55)$$

$$n_{\text{eff}} = \sqrt{\varepsilon_0} + R(\sqrt{\varepsilon_{\text{eff}}} - \sqrt{\varepsilon_0}) \quad (56)$$



Obrázek 57 - Závislost efektivního indexu lomu na tloušťce bakteriální buňky „t“ a činitele zaplnění „R“. Podmínky: $n_1 = 1.432$, $n_2 = 1.33$, $\theta = 70^\circ$, $\lambda = 980$ nm.

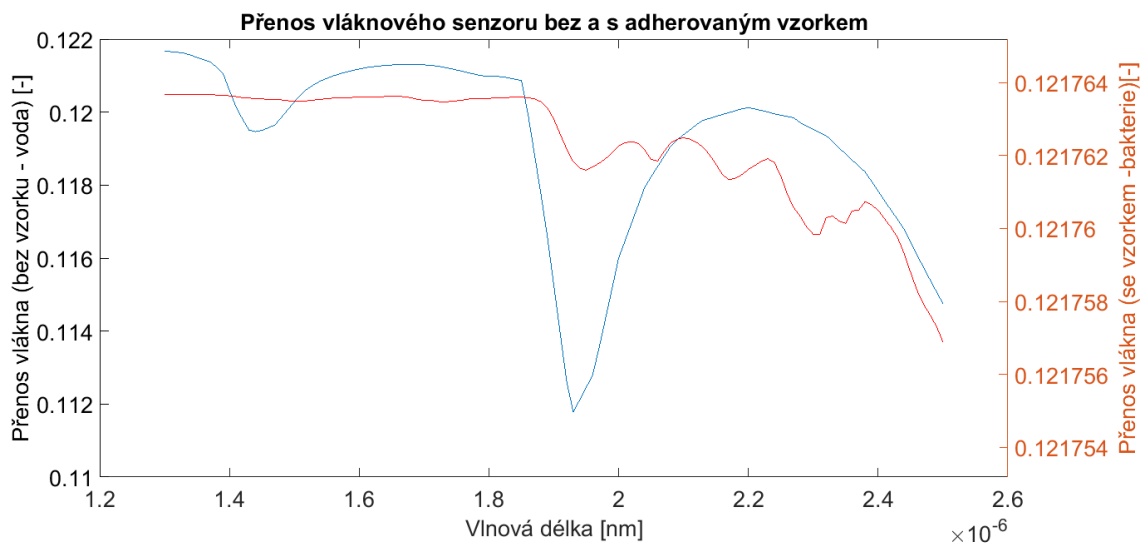


Obrázek 58 - Imaginární složka indexu lomu bakteriální buňky vypočítaná ze spektroskopických měření (Kubelka-Munkova aproximace).

Je vidět (viz obr. 57), že se zvyšující se tloušťkou vzorku „t“ stoupá efektivní index lomu, protože větší část evanescentního pole zabírá bakterie s indexem lomu 1.432. S klesajícím činitelem zaplnění pak tento efekt lineárně klesá.

Pro určení imaginární části indexu lomu bakterie lze využít spektroskopická měření uvedené v experimentu v kap. 5.1.3. Na rozdíl od transmisní spektroskopie, u difuzně-reflexní spektroskopie nelze určit absorpční koeficient přímo z Lambert-Beerova zákona. Je nutno použít Kubelka-Munkovu aproximaci – viz 57. Kubelka-Munkův model vyjadřuje přibližný vztah mezi naměřenou DRIFT reflektancí „R“ a absorpčním koeficientem „k“ a rozptylovým koeficientem „s“. Je důležité podotknout, že převládající jev, který tvoří extinkci světla je jeho rozptyl. Na obrázku 58 je zobrazena imaginární část indexu lomu bakteriální buňky v závislosti na vlnové délce. Při známém absorpčním koeficientu se imaginární část indexu lomu vypočítá podle rovnice 50.

$$\frac{k}{s} = \frac{(1-R_\infty)^2}{2R_\infty}. \quad (57)$$



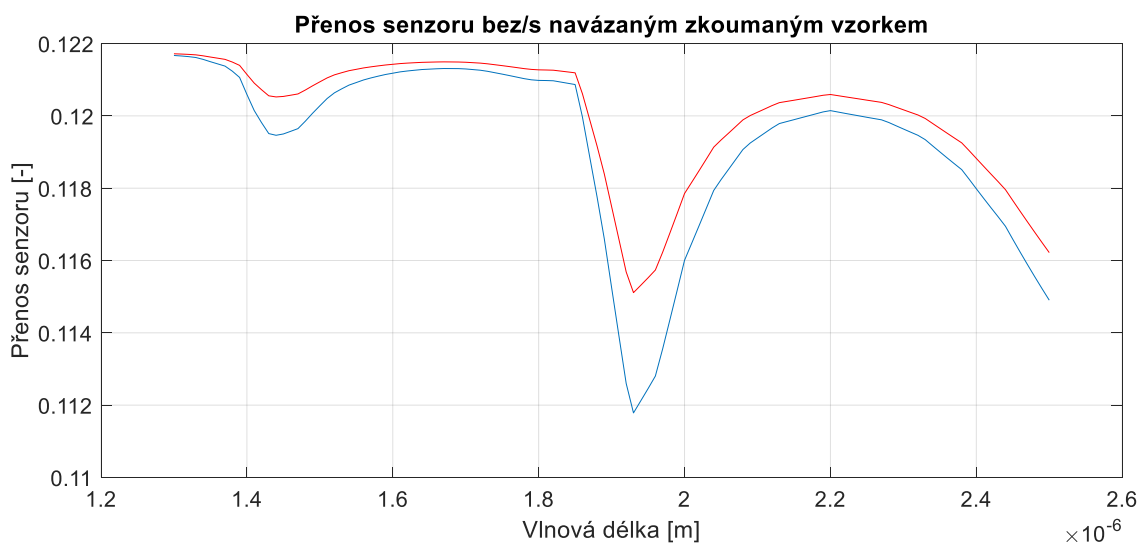
Obrázek 59 - Přenos senzoru v záv. na vlnové délce. Bez vzorku (osa vlevo) a se vzorkem (osa vpravo).

Na obrázku je vypočítaný přenos optovláknového senzoru pro různé vlnové délky (se vzorkem a bez vzorku). Model je počítán podle Messicy (viz kap. 3.4). Přenos optického výkonu senzorem byl vypočítán následovně:

- Vstupní parametry:
 - Aktivní délka senzoru: 10 mm
 - Úhel osvitů: 80 °
 - Průměr vlákna: 105 μm
 - $n_{co} = 1.457$, $n_{cl} = 1.440$
 - $R = 0$ a 1
 - $t = 3 \mu\text{m}$
 - $T = 20 \text{ °C}$
- Výpočet úhlu odrazu paprsku uvnitř vlákna (lom světla).
- Výpočet možných úhlů „ γ “ tak, aby byl efektivní úhel vždy větší než kritický – viz rovnice 27.
- Výpočet pro každou vlnovou délku:
 - Reálná část indexu lomu vody: výpočet viz [91].
 - Imaginární část indexu lomu vody: viz obr. 55.
 - Intrinsická absorpce vlákna podle měření výrobce (Thorlabs Inc.).
 - Pro každý úhel „ γ “:
 - Výpočet indexu lomu buňky – viz 55. Pro tento výpočet je nutné znát efektivní úhlu dopadu.

- Výpočet evanescentní absorpce (viz 37,36), transmise interface (viz 28,29), a intrinsické absorpce (viz 35).
- Výpočet celkového přenosu vlákna váženým průměrem.

Pro reálnější podmínky měření nyní uvažujme „ $R = 0,8$ “. Podle referenční literatury [92] je např. u kmene *Escherichia coli* nejkratší rozměr bakteriální buňky 860 nm⁶⁰. Protože je buňka z 70% tvořena vodou⁶¹ a změřená imaginární část indexu lomu je určena z dehydratované suspenze, tloušťka byla stanovena $t = 215$ nm. Redukovaná tloušťka lépe reflektuje reálné složení bakteriální buňky. Změnu přenosu ukazuje následující graf.



Obrázek 60 – Přenos senzoru bez vzorku (modrá) a se vzorkem (červená). $t = 215$ nm, $R = 0,8$

6.1.3 Kavitní zesílení

Jak je vidět z předchozí kapitoly, změna přenosu optovláknového senzoru po navázání bakteriálních buněk (80% zaplnění, $t = 215$ nm) je jen těžko detekovatelná a spektrální kontury bakteriální buňky úplně vymizeli. Pro zesílení odezvy senzoru byla nasazena kavitní technika popsána v kap. 3.5. Pro intenzitně založenou kavitně zesílenou spektroskopii je nutné vytvořit kavitou pomocí polopropustných zrcadel. Zrcadla lze na koncích vláken vytvořit nanesením metalických nebo dielektrických vrstev. Vzhledem k nižší absorpci a větším designovým možnostem dielektrických

⁶⁰ Předpokládejme, že je buňky na taperu navázání nejdelší stranou.

⁶¹ Viz kap. 3.2.

reflektorů se v současné době téměř výhradně používají vláknové reflektory s dielektrickými vrstvami. Reflektory s dielektrickými vrstvami jsou založeny na velkém počtu tenkých vrstev z dielektrického materiálu, které jsou v tomto případě nanášené přímo na čelo vlákna. Správným výběrem materiálu⁶² a tloušťky vrstvy lze docílit požadovaných vlastností reflektoru. Ze sledovaných vlastností to jsou především reflektivita a transmisivita v závislosti na vlnové délce, polarizaci světla a úhlu osvitu. Pro návrh dielektrického reflektoru se standardně používá střídání materiálů s nízkým („n_l“) a vysokým indexem lomu („n_h“) a tloušťce rovnající se čtvrtině vlnové délky procházejícího světla. Opakováním těchto vrstev s vysokým rozdílem indexů lomu lze docílit požadovaných parametrů zrcadla v širokém rozsahu vlnových délek (tzv. QWOT – „quarter wave optical thickness“, čtvrt-vlnná tloušťka). Pro úplnost je zde uveden základní postup návrhu dielektrického reflektoru avšak zevrubnější popis návrhu dielektrických zrcadel je nad rámec této práce a je více popsán v referenční literatuře[94]. Na obrázku 61 je reflektivita osmivrstvého zrcadla z vrstev (SiO₂, TiO₂). Index lomu těchto materiálů je 1,4443 a 2,4538. Reflektor je designovaný na vlnovou délku „w₀ = 1550 nm“. To odpovídá tloušťce 268 nm pro SiO₂ a 158 nm pro TiO₂. Výsledná reflektivita lze spočítat podle vztahu 58 (kde „n_s“ značí index lomu substrátu a „p“ počet vrstev) a rozsah vlnových délek s touto reflektivitou lze určit podle vztahu 60.

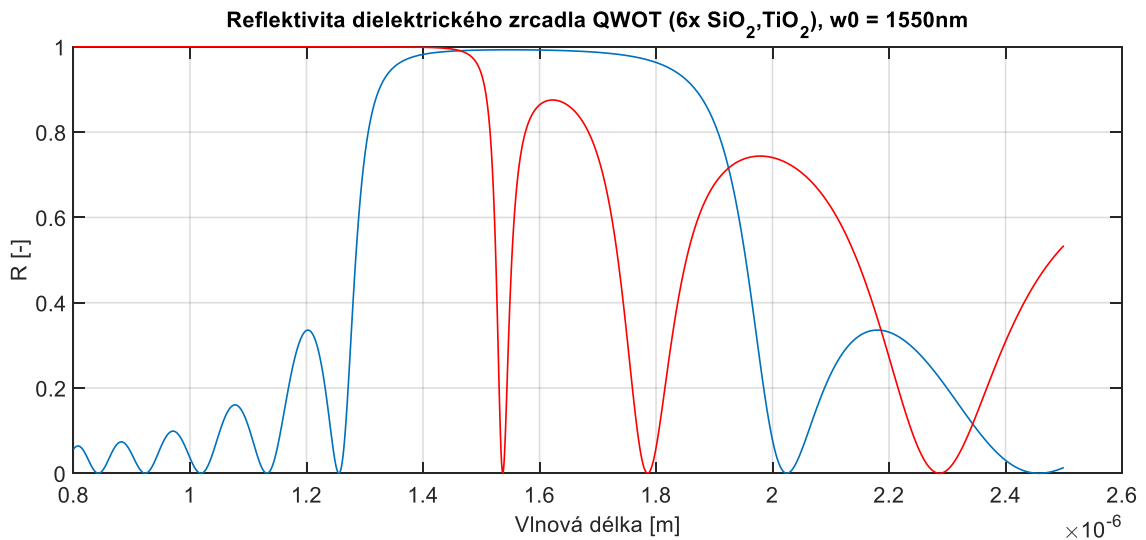
$$R = \left(\frac{1-n_E}{1+n_E} \right)^2, \quad (58)$$

$$n_E = \frac{n_h^{2p+2}}{(n_s n_l)^{2p}}, \quad (59)$$

$$\lambda_{12} = \frac{\lambda_0}{1 \pm \Omega}, \quad (60)$$

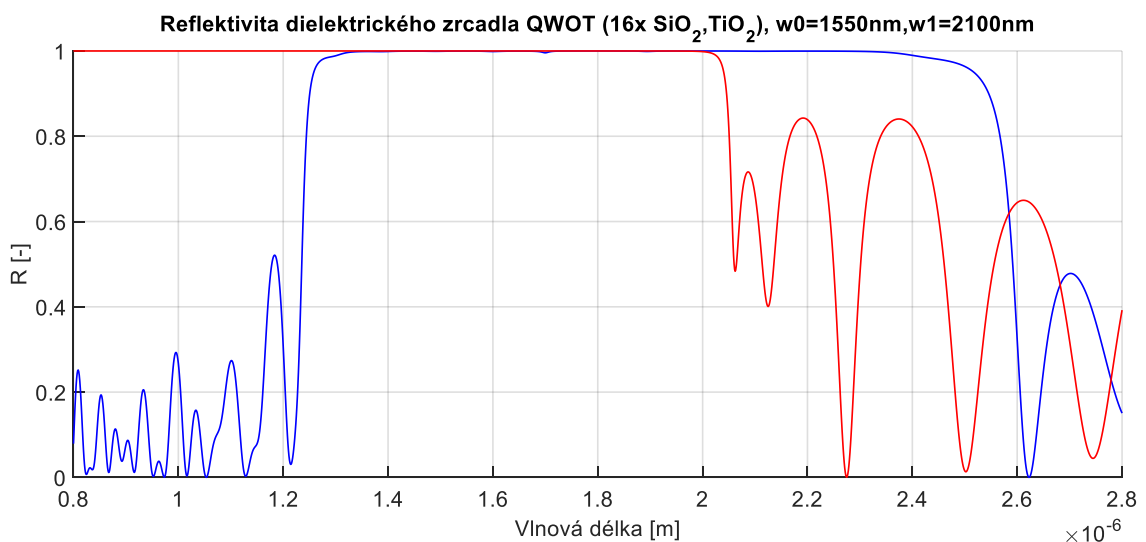
$$\Omega = \frac{2}{\pi} \sin^{-1} \left(\frac{n_h - n_l}{n_h + n_l} \right). \quad (61)$$

⁶² Výběr materiálu určuje jeho index lomu.

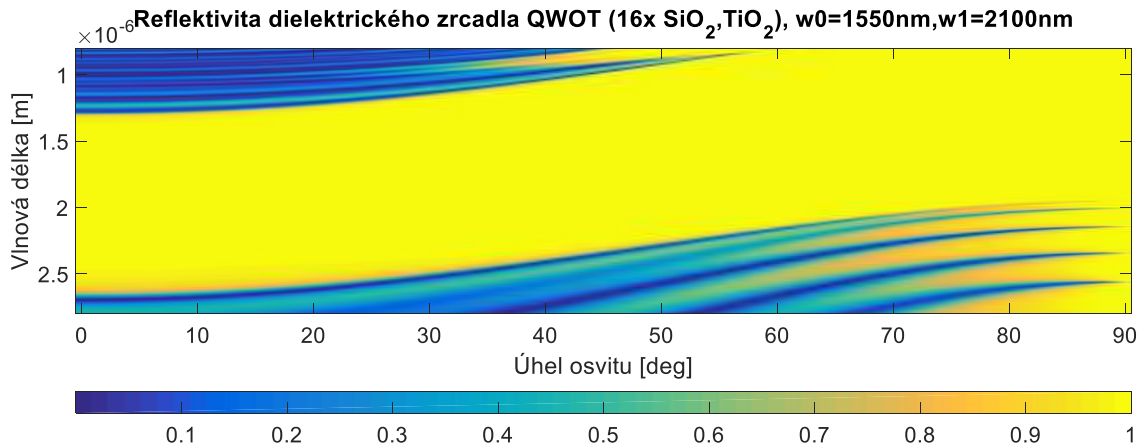


Obrázek 61 - Reflektivita navrženého dielektrického zrcadla ($w_0 = 1550 \text{ nm}$). Úhel osvitu: 0° (modrá), 70° (červená).

Pro uvedený příklad je vypočítaná reflektivita 0,94, což odpovídá při zanedbání absorpce transmissi 6%. Pokles reflektivity je na vlnových délkách 1328 nm a 1860 nm. Protože pro správnou funkci biosenzoru je nutné pokrýt širší spektrální obraz (1400 nm – 2300 nm), byla přidána další sada dielektrických vrstev navržených pro vlnovou délku „ $w_1 = 2150 \text{ nm}$ “. Tímto postupem lze rozšířit oblast s vysokou reflektivitou – viz obr 62. Pro účely modelu byly reflektivity vypočítány podle K.J.Pascoe [95].



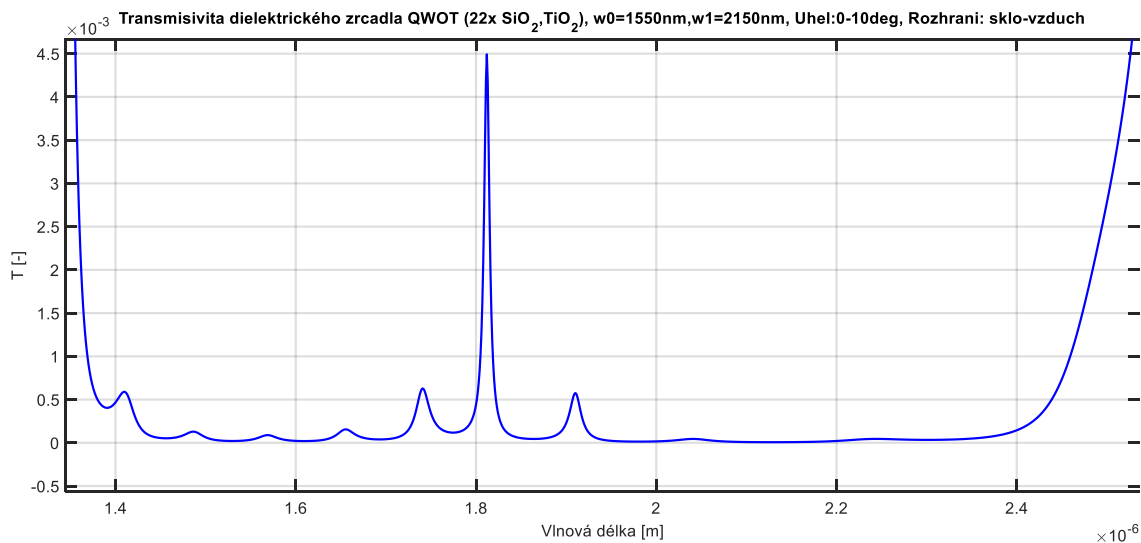
Obrázek 62 - Reflektivita navrženého složeného dielektrického zrcadla ($w_0 = 1550 \text{ nm}$, $w_1 = 2100 \text{ nm}$). Úhel osvitu: 0° (modrá), 70° (červená).



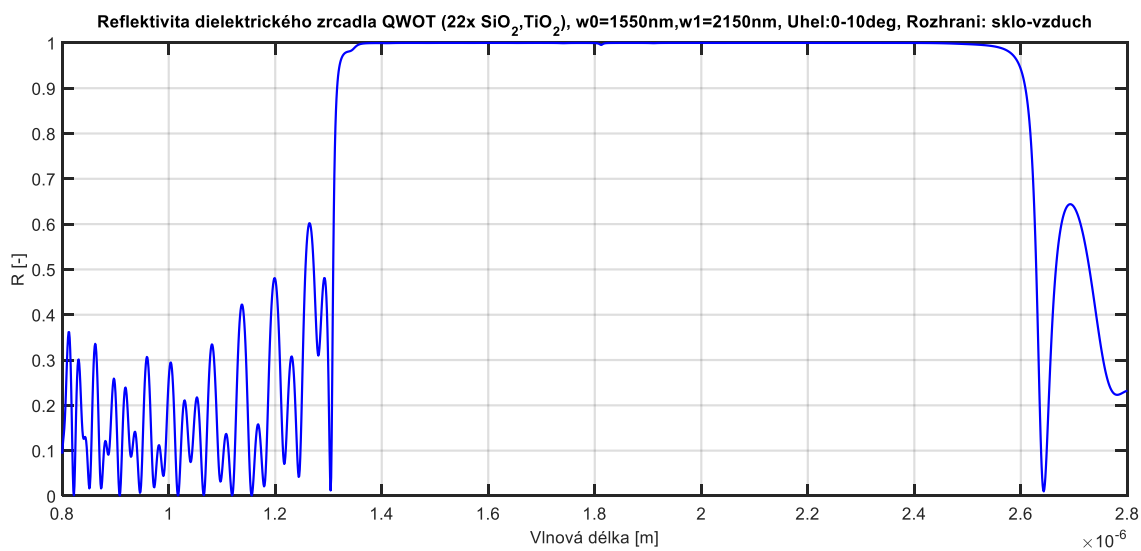
Obrázek 63 – Reflektivita navrženého zrcadla ($w_0 = 1550 \text{ nm}$, $w_1 = 2100 \text{ nm}$) pro všechny vlnové délky a úhly osvitu.

Jak vyplývá z kap. 3.4, pro buzení mimoosových paprsků je vhodné světlo do vlákna navázat po velkém úhlem (úhel vzhledem k ose vlákna $> 70^\circ$). Tím jsou vybudeny zejména mimoosové paprsky, které nejvíce indukují evanescentní pole. Reflektivita navrženého dielektrického reflektoru se ovšem s úhlem osvitu mění – viz červený průběh na obr. 62. Celkový 2D graf závislosti reflektivity na vlnové délce a úhlu osvitu je na obr. 63. Dielektrický reflektor je tedy nutné modifikovat, tak aby bylo dosaženo vysoké reflektivity i při osvitu v daném rozmezí úhlů. Pro optimální návrh je nutné znát distribuci úhlů dopadů na čelo vlákna, to lze vypočítat z modelu přenosu optického vlákna. Mějme optické vlákno (průměr $105 \mu\text{m}$), které je osvětleno pod úhlem 75° . Při znalosti indexu lomu vlákna (1.457), lze stanovit úhel lomu na čele vlákna na 41.5° . Podle rovnic 27 a 21 lze pak vypočítat distribuci efektivního úhlu odrazu „ ε “. Pro úhel odrazu na čele pak platí „ $\varepsilon_0 = 90^\circ - \varepsilon$ “. Paprsky tedy dopadají na čelo optického vlákna pod úhly 0° až 10° .

Finální návrh se sestává z 22 vrstev SiO₂ + TiO₂ navržených na 1550 nm a 2150 nm. Transmisivita optimalizovaného reflektoru je na obr. 64. Je vidět, že i při úhlech osvitu 0 - 10° je zajištěna transmisivita okolo 0,01%.



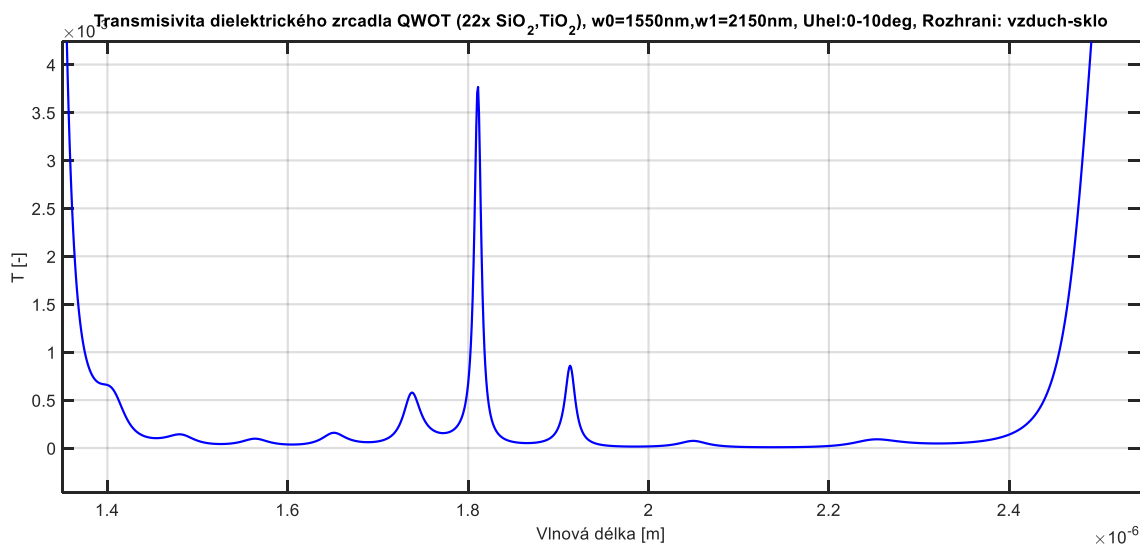
Obrázek 64 - Transmisivita optimalizovaného zrcadla ($w_0 = 1550 \text{ nm}$, $w_1 = 2150 \text{ nm}$). Úhel osvitu: $0^\circ - 10^\circ$.



Obrázek 65 - Reflektivita optimalizovaného zrcadla ($w_0 = 1550 \text{ nm}$, $w_1 = 2150 \text{ nm}$). Úhel osvitu: $0^\circ - 10^\circ$.

Uvedené parametry jsou počítány pro rozhraní sklo-vzduch⁶³. Kvůli modelu navázání světlo do vlákna, je nutné znát transmisivitu reflektoru pro rozhraní vzduch-sklo – viz obr. 66.

⁶³ Tj. rozhraní, kde probíhá kavitní zesílení.



Obrázek 66 - Transmisivita optimalizovaného zrcadla ($w_0 = 1550 \text{ nm}$, $w_1 = 2150 \text{ nm}$). Úhel osvitu: $0^\circ - 10^\circ$. Rozhraní: vzduch – sklo.

6.1.3.1 Optimální prostředí evanescentního snímání

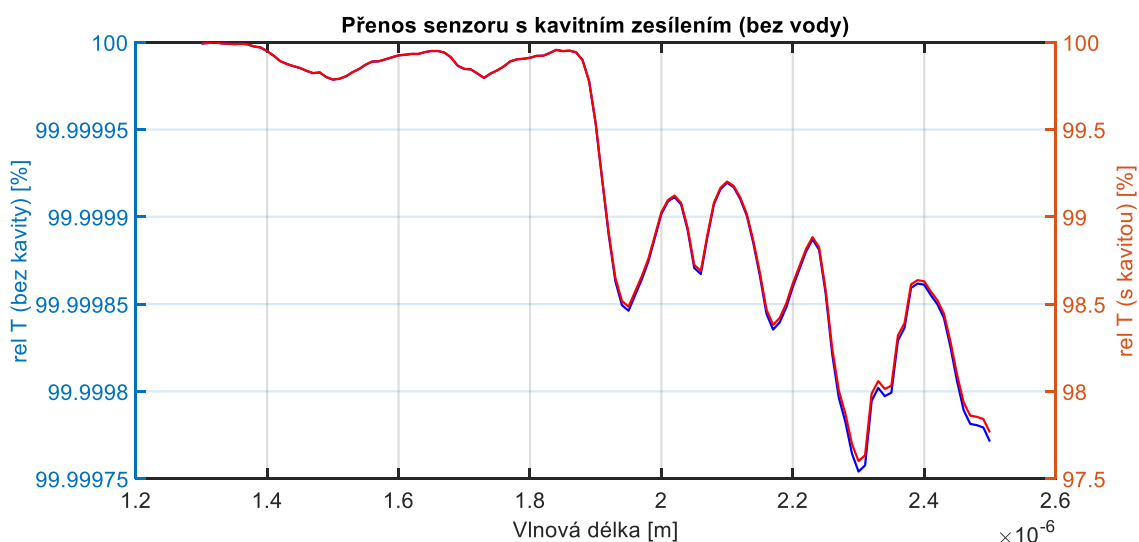
Po uzavření optovláknového senzoru do kavity se závislost transmise na absorpčním koeficientu změní podle vztahů 42 a 43. Pro nízké absorpce by se měla citlivost na změny absorpčního koeficientu zněkolikanásobit. To je vidět na obrázku 30, kde je křivka znázorňující výstupní transmissi strmější pro malé absorpční (extinční) koeficienty. Z obrázku je zřejmé, že efekt kavity se projeví při absorpci vzorku pod 1%. Pokud tuto hodnotu porovnáme s grafem na obr. 67⁶⁴, je jasné že absorpce vody je moc vysoká na to, aby bylo možné aplikovat kavitní zesílení. Uvažujme tedy přenos senzoru na vzduchu⁶⁵. Jak je vidět na obr. 68, absorpce vzorku v evanescentním poli je tak malá (max. změna relativní transmise $2,45 \cdot 10^{-4}\%$), že její detekce by sice byla nemožná vzhledem ke stabilitě zdroje světla a šumu senzoru, ale po průchodu kavitou je relativní změna přenosu velká (2,4%).

⁶⁴ Obrázek ukazuje přenos senzoru bez vzorku a bez započtení transmise rozhraní „T_{ps}“ – viz kap. 3.4.3.

⁶⁵ Tohoto lze docílit vysušením taperu po aplikaci roztoku se vzorkem.



Obrázek 67 – Přenos senzoru bez rozhraní a bez vzorku. Přenos ovlivňuje jen absorpce vody. Parametry modelu: Úhel osvitu: 80° , $L = 1$ cm, $a=52,5$ μm , $n_{co}=1,457$, $n_{cl}=1,440$, $R = 0$, $t = 0$. Relativní transmise je malá, pro použití kavitní techniky musí být nejméně 99%.



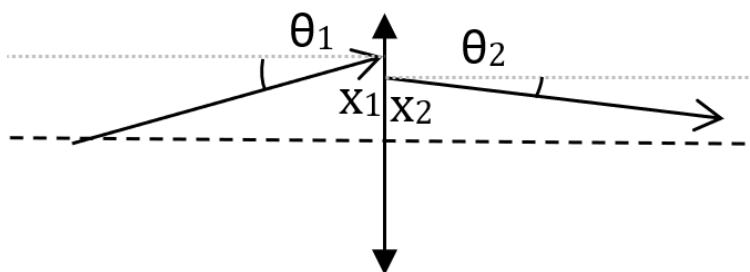
Obrázek 68 – Relativní transmise senzoru. LEVÁ OSA: Přenos senzoru bez rozhraní (pouze bakterie na vzduchu). PRAVÁ OSA: Přenos senzoru s kavitou ($R=0,9999$, pouze bakterie na vzduchu). Parametry modelu: Úhel osvitu: 80° , $L = 1$ cm, $a=52,5$ μm , $n_{co}=1,457$, $n_{cl}=1,440$, $R = 0,8$, $t = 215$ nm. Relativní změna transmise po aplikaci kavity se několikanásobně zvýší.

6.1.4 Finální model senzoru

Doposud byly všechny modely buzeny kolimovaným světlem pod definovaným úhlem vzhledem k ose vlákna. Více realistický model je však fokusované světlo (pomocí čočky nebo parabolického zrcadla). Pro převod kolimovaného světla na fokusovaný paprsek lze použít maticovou analýzu („Ray

transfer matrix analysis“, „ABCD matrix analysis“ – ABCD maticová anlyza). Tento matematický nástroj slouží pro popis šíření světla v případech, kdy je směr určen pomocí paraxiálních paprsků. Tato technika vyžaduje, aby popisované paprsky svíraly s optickou osou pouze malé úhly⁶⁶. Více o této technice je možné nalézt v referenční literatuře[96]. Transformace mezi vstupní a výstupní rovinou u spojné čočky s fokusační vzdáleností 50 mm lze vypočítat podle vztahu 62. V tomto vztahu symbolizuje „ θ “ úhel paprsku vzhledem k ose optické soustavy, a souřadnice „ x “ vzdálenost od středu čočky – viz obr. 69.

$$\begin{pmatrix} x_2 \\ \theta_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{0,05} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ \theta_1 \end{pmatrix}. \quad (62)$$

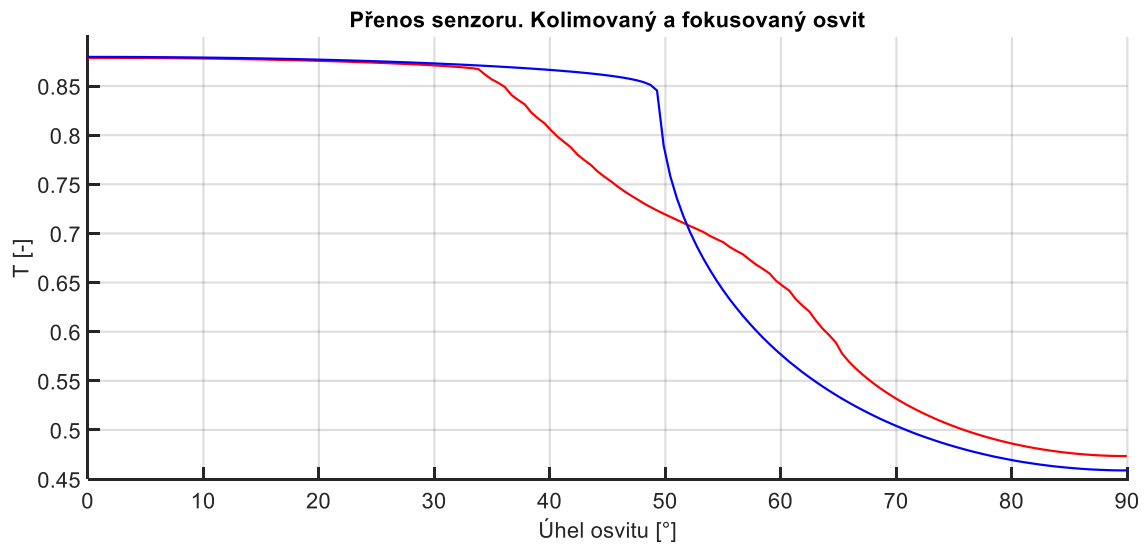


Obrázek 69 - Vysvětlení k maticové analýze fokuse světla.

Vážený průměr příspěvků jednotlivých paprsků „ $\vartheta(i)$ “ se pak počítá podle poměrů ploch na vstupní straně čočky („ R “ – poloměr vstupní apertury, „ $r(i)$ “ – vzdálenost od středu počítané plochy) – viz rovnice 63. V grafu 70 je pak vidět porovnání přenosu vlákna při osvětlení kolimovaným světlem a při osvětlení fokusovaným světlem. Pokles přenosu senzoru vlivem překročení mezního úhlu odrazu dochází při menším úhlu. To je zapříčiněno divergencí paprsků po fokusaci. V grafu je modelována čočka s fokusační vzdáleností 15 mm osvětlena kolimovaným světlem v optické ose čočky.

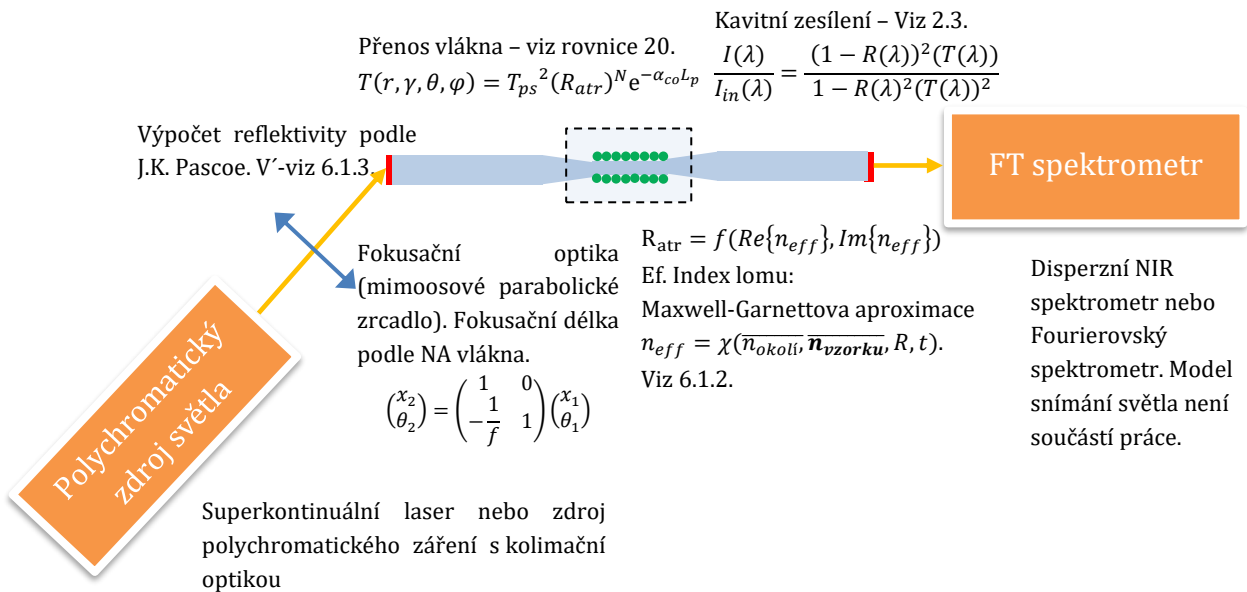
$$\vartheta(i) = \frac{r(i)^2 - r(i-1)^2}{R^2}. \quad (63)$$

⁶⁶ Tzn., aby platilo $\alpha \approx \sin \alpha$.



**Obrázek 70 - Přenos senzoru při kolimovaném (modrá) a fokusovaném (červená) osvitu.
Fokusační čočka: $f = 100$ mm, $D = 25$ mm.**

Zde je uvedeno závěrečné shrnutí modelu optovláknového biosenzoru s kavitním zesílením a NIR spektroskopií, jeho základní princip a výpočty:



Přehled základních výpočtů modelu

1. Zdroj světla intenzity $I(\lambda)$ a úhlu θ_{in0} vzhledem o ose vlákna. Poloměr paprsku: x_{max} .
2. Fokusace: $\begin{pmatrix} x_2(x_1) \\ \theta_2(x_1) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ 0 \end{pmatrix}$ $x_1 = (0 \dots x_{max})$
 $\theta_{in}(x_1) = \theta_2(x_1) + \theta_{in0}$, Viz rovnice 62.
3. Intenzita jednotlivých paprsků: $I(\lambda, \theta_{in}) = \vartheta(\theta_{in}) I(\lambda) T_{dr}(\lambda, \theta_{in})$
 $\vartheta(\theta_{in})$ - viz 63.
 $T_{dr}(\lambda, \theta_{in})$ - Transmise dielektrického reflektoru
4. Přenos vlákna:
 $P(\lambda, L, a) = \int \int T(\lambda, r, \gamma, \theta, \varphi) I(\lambda, \theta_{in}) dS d\Omega$ - pro bližší popis, viz kap. 3.4.
 $T(\lambda, r, \gamma, \theta, \varphi) = (\lambda, R_{atr})^N e^{-\alpha_{co} L_p}$ - pro bližší popis, viz kap. 3.4.
5. Evanescentní snímání:
 Komplexní index vzorku a okolí $\overline{n_{okolí}}, \overline{n_{vzorku}}$. (Určený ze spektroskopických měření)
 Výpočet efektivního indexu lomu: $\overline{n_{eff}} = \chi(\overline{n_{okolí}}, \overline{n_{vzorku}}, R, t)$
 - Maxwell-Garnettova aproximace (tloušťka vzorku t).
 - Koeficient zaplnění (R).
 - Výpočet R_{atr} podle kap. 3.4.4.

6. Kavitní zesílení:

$$\frac{I_{out}(\lambda)}{I(\lambda)} = \iint \frac{(1 - R(\lambda, d\Omega))^2 (1 - P_{s\Omega}(\lambda, L, a, dS, d\Omega))}{1 - R(\lambda, d\Omega)^2 (1 - P_{s\Omega}(\lambda, L, a, dS, d\Omega))^2} dS d\Omega$$

$R(\lambda)$ – reflektivita dielektrického reflektoru.

6.1.5 Sestavení a analýza modelu

Pro analýzu modelu z hlediska realizovatelnosti a určení minimálního potřebného množství vzorku pro úspěšnou klasifikaci uvažujeme následující konfiguraci:

- Zdroj světla: Thorlabs Inc. SLS201L/M (halogenová lampa) s minimálním navázaným výkonem 10 mW rozloženým ve spektrálním regionu 300-2500 nm. Světlo je navázáno do vlákna InF₃ (Průměr: 100 μm, 0.26 NA⁶⁷). Jelikož se v modelu využívá spektrální rozsah 1100-2500 nm a vzhledem k numerické apertuře vlákna uvažujeme v modelu navázaný výkon 1 mW.
- Mimoosové parabolické zrcadlo pro kolimaci (NA = 0,36, f = 15 mm) a fokusaci. Světelný paprsek se fokusuje na čelo vlákna pod úhlem 65 °. Jak ukazuje obrázek 71, pod tímto úhlem má optovláknový biosenzor největší citlivost na změnu absorpčního koeficientu navázané látky.



Obrázek 71 – Citlivost senzoru v závislosti na úhlu osvětlení fokusovaným světlem (f = 15 mm).

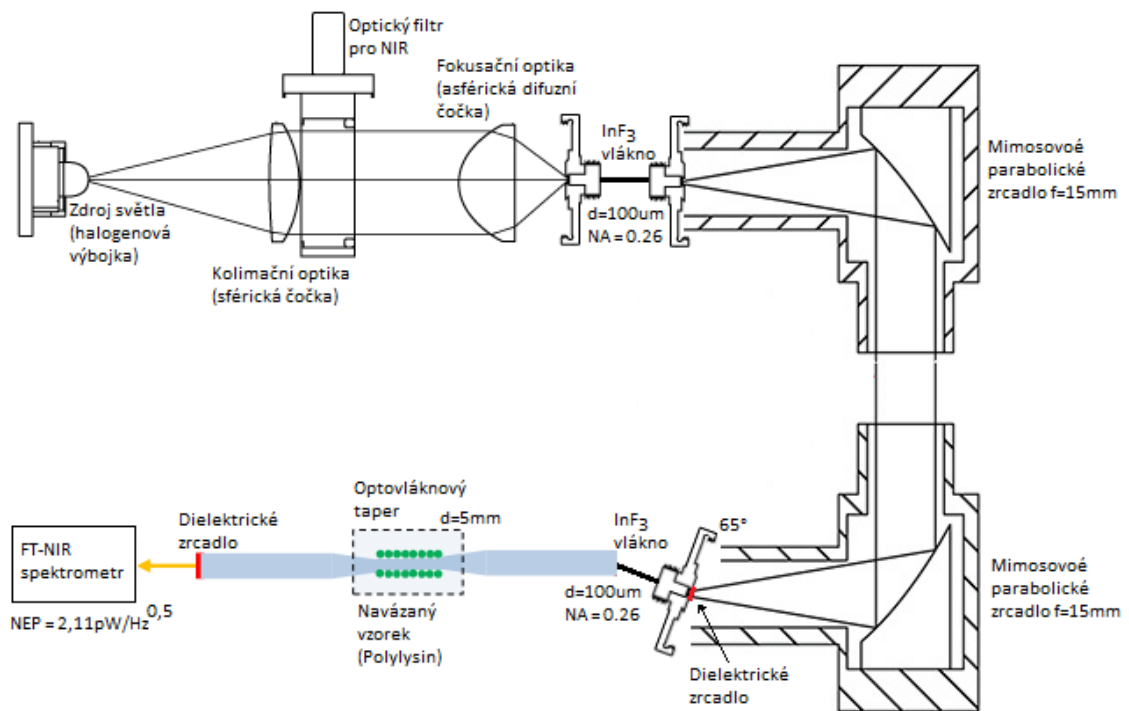
⁶⁷ Numerická apertura: parametr určující akceptační úhel vlákna.

- InF₃ optické vlákno Thorlabs Inc. (průměr 100 μm), Numerická apertura: 0,26. Na koncích optického vlákna jsou nanesena dielektrická zrcadla – viz kap. 6.1.3. Jádru vlákna je v délce 5 mm obnažené a pokryté atraktantem (např. Poly-L-lysin. Více v [97]).
- FTIR spektrometr s termoelektricky chlazeným InGaAs detektorem. NEP⁶⁸ = 2.11 pW/Hz^{0.5}. Např. Thorlabs Inc. PDA10DT.

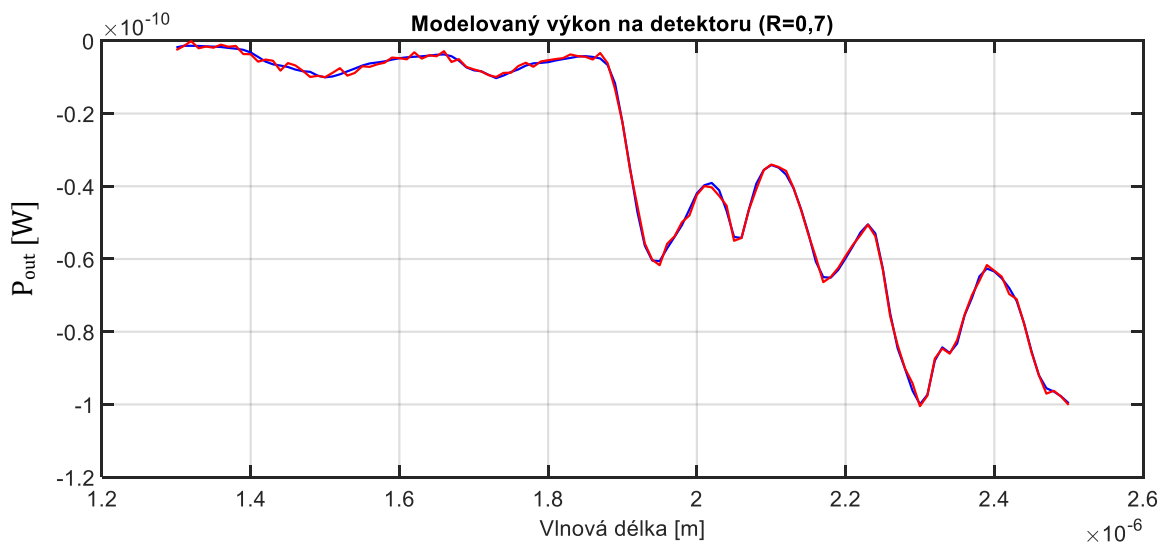
Popsaná konfigurace je na obr. 72. Světlo z halogenová výbojky je kolimováno a následně fokusováno na čelo prvního InF₃ vlákna (1 mW). Toto optické vlákno slouží pro jednoznačné určení bodového zdroje světla, které je pak využíváno pro fokusaci na funkční (druhé) vlákno. Pomocí parabolických zrcadel je světlo přivedeno na funkční vlákno pod úhlem 65 °. Jádru funkčního vlákna je na 5 mm obnaženo a pomocí atraktantu (např. Poly-L-lysin. Více v [97]) jsou na povrch vlákna navázány bakteriální buňky určené pro analýzu. Oba konce vlákna jsou opatřeny dielektrickými reflektory pro dosažení kavitního zesílení. Uniklé světlo z kavity je analyzováno pomocí FT spektrometru s InGaAs detektorem. Přenos celé soustavy byl vypočítán pomocí uvedeného modelu (viz kap. 6.1.4) a k výstupnímu signálu byl přičten bílý šum o výkonu 2.11 pW, což odpovídá integračnímu času detekce 0,5s u stanoveného detektoru. Na obrázku 73 je výstupní signál na senzoru při obsazenosti „R = 0,7“ (modelovaná tloušťka buněk „t = 215 nm“). Pro eliminaci vlivu nerovnoměrné reflektivity dielektrických zrcadel a absorpce vlákna je odečteno spektrum pozadí⁶⁹. Jak je vidět, spektrální kontury jsou dostatečné pro úspěšnou klasifikaci kmenů.

⁶⁸ NEP – z angl. Noise equivalent power označuje takový výkon při jehož detekci je na výstupu detektoru poměr signálu a šumu roven jedné

⁶⁹ Pozadí je změřeno akvizicí spektra bez vzorku („R = 0“).



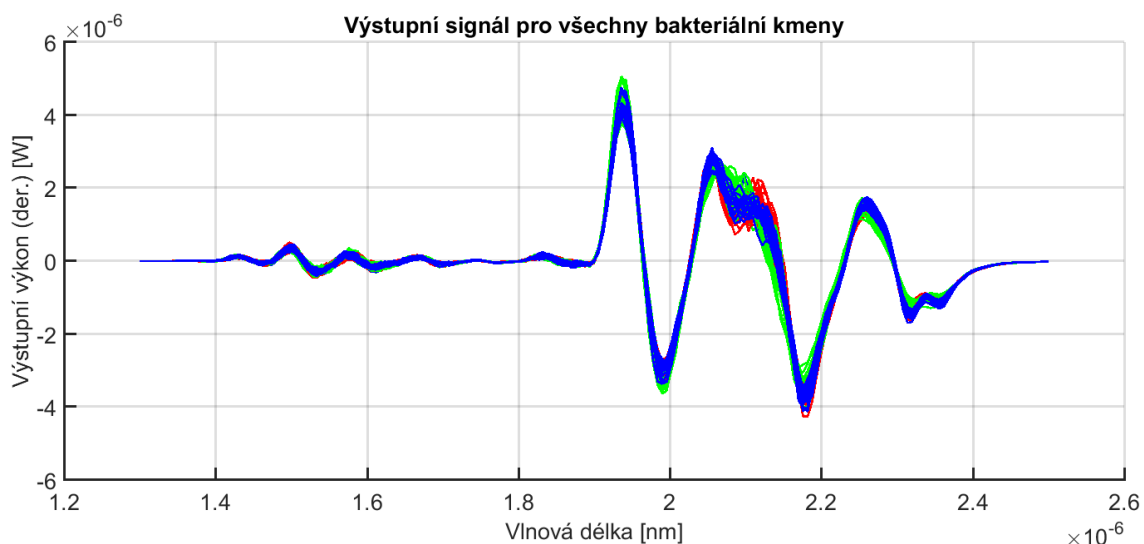
Obrázek 72 - Realizace modelovaného biosenzoru (části výkresu vycházejí z technické dokumentace Thorlabs Inc.).



**Obrázek 73 - Výstupní signál modelu zatížený šumem (červená) a bez šumu (modrá).
 Parametry modelu: Úhel osvětlení: 65 °, Fokusační zrcadlo f = 15 mm, NA = 0,36, Délka L = 5 mm, Průměr vlákna d = 100 μm, Index lomu InF₃, Prostředí senzoru: vzduch, Zaplněnost R = 0,7, Tloušťka: t = 215 nm, Vstupní výkon: 1 mW.**

V dalším kroku analýzy modelu byl vypočítán výstupní signál pro 10^5 bakteriálních buněk. V každé iteraci výpočtu bylo modelu předloženo naměřené spektrum bakterií reprezentované imaginárním indexem lomu podle kap. 6.1.2. Pro

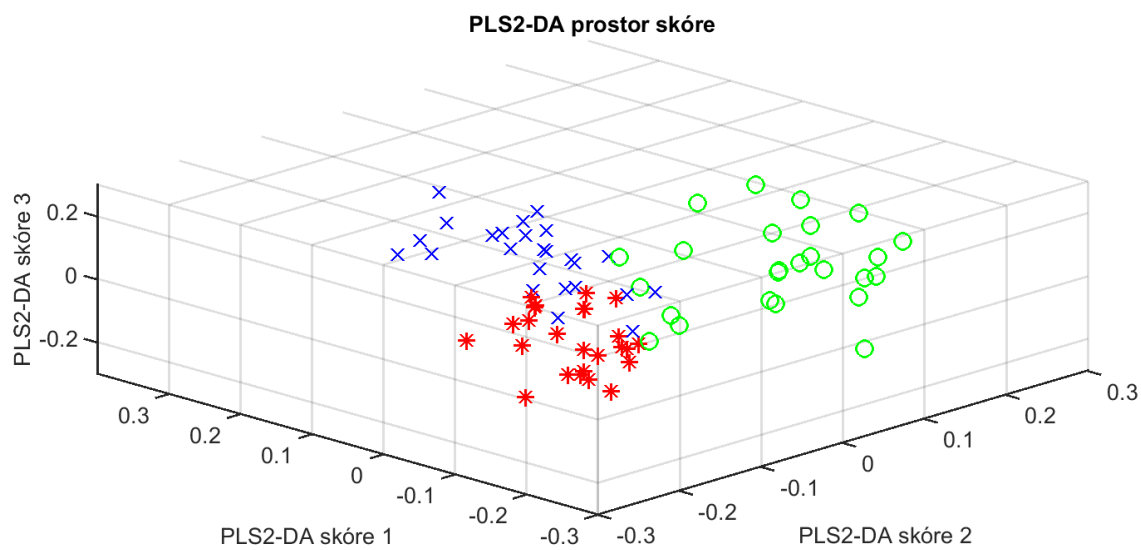
každé naměřené spektrum bylo pomocí modelu uvedeného v této kapitole vypočítán výstupní signál zatížený šumem tak, jak je zobrazeno na obrázku 73. Namodelované výstupní signály všech bakteriálních kmenů jsou zobrazeny na obr. 74.



Obrázek 74 - Modelovaný výstupní výkon navrženého biosenzoru pro všechny předložené kmeny včetně šumu na detektoru (znázorněny různými barvami). Spektrum bylo derivováno 3. SG derivací.

Následně byly výstupní spektra klasifikována pomocí stejného klasifikátoru, jako v kap. 5.1.3.2 (PLS2-DA). Tento postup dokázal původně klasifikovat bakteriální kmeny v množství 10^{10} buněk. Cílem této práce je, aby bylo dosaženo stejné klasifikační síly při použití řádově menšího (10^5) množství bakteriálních buněk. PLS2-DA prostor skóre klasifikátoru, který byl kalibrován na základě dat z modelu biosenzoru je na obr. 75. Je vidět, že došlo k dobré klasterizaci dat podle jednotlivých kmenů. Model byl validován křížovou validací (viz kap. 5.1.3.2). V průběhu validace, PLS2-DA klasifikátor správně klasifikoval bakteriální kmen v 94% případech, což je porovnatelné s výkonem původního klasifikátoru uvedeným v kap. 5.1.3, který vycházel ze spekter naměřených z 10^{10} bakteriálních buněk. Nový klasifikátor založený na modelu širokopásmového optovláknového biosenzoru s evanescentním snímáním a kavitním zesílením dosáhl stejné klasifikační úspěšnosti při akvizici spektra z pouhých $3 \cdot 10^5$ ⁽⁷⁰⁾ bakteriálních buněk.

⁷⁰ Pokud je délka senzoru 5 mm, průměr vlákna 100 μm a koeficient zaplnění 0,7. Pak lze na plochu senzoru umístit X buněk o velikosti 2 μm^2 .



Obrázek 75 - PLS2-DA prostor skóre. Klasifikátor byl kalibrován na datech z modelovaného biosenzoru. Kmeny bakterií jsou znázorněny různými barvami.

7 ZÁVĚR

Jak ukazuje úvodní kapitola této práce, NIR spektroskopie se zdá být velice vhodná technika pro nasazení v mikrobiologii. Dosavadní výzkum ukazuje možnosti NIR spektroskopie pro identifikaci bakteriálních kmenů, avšak pro plnohodnotné nasazení této techniky je nezbytné splnit dvě podmínky:

- Porozumět a alespoň částečně interpretovat NIR spektrum bakteriálních buněk.
- Zvýšit citlivost této techniky tak, aby bylo možné získat spektrum i z malého počtu buněk (10^5). Jedině tak lze tuto techniku nasadit v medicínské a biochemické praxi.

Celkem byly provedeny 4 experimenty, jejichž výsledky přispěly k lepší interpretaci NIR spekter bakterií. Protože se jedná multivariační problém, velká část experimentů se zabývala statistickým vyhodnocením spekter.

První experiment se zabývá porovnáním klasifikačních modelů a metod předzpracování dat. Jako nejvhodnější model byl identifikován PLS2-DA se správným kódováním příslušnosti. Stanovení klasifikačního modelu je nezbytné pro následující experimenty.

Experiment uvedený v kap. 5.1.2 se zaměřil na přípravu vzorků. Z experimentu vyplývá, že je nutné bakteriální vzorky před měřením dehydratovat. Jedině tak lze dosáhnout dostatečné přesnosti klasifikačních modelů. Dále byl představen důkaz, že NIR spektra obsahují dostatek informací pro klasifikaci bakteriálních kmenů.

V další části práce bylo zkoumáno prokládání NIR spekter bakterií křivkou. To pomáhá jejich pochopení a interpretaci. Nasazení této techniky je ale netriviální, protože výsledky závisí na mnoha parametrech, jako je úroveň šumu, inicializace, forma kritéria optimalizace a počet modelovaných peaků. Spektrum bylo dokomponováno na individuální peaky a byly jim přiřazeny jednotlivé buněčné komponenty (proteiny, mastné kyseliny, buněčná stěna). Nejdůležitější peaky pro klasifikaci se vyskytovaly v oblasti 2000-2500 nm, kde absorbují převážně proteiny a mastné kyseliny. Úspěšnost klasifikace na základě parametrů aproximovaných peaků dosáhla 91,7%.

V klíčovém experimentu byla provedena NIR-MIR korelace, která posloužila studiu použitelnosti NIR spektroskopie pro identifikaci bakteriálních buněk. Výsledky dokazují, že majoritní peaky v NIR spektru jsou asociovány se základními bakteriálními konstituenty (proteiny, fosfolipidy, polysacharidy). Na druhou stranu ne všechny fundamentální peaky v MIR spektru byly korelovány, a tudíž nelze přecíst úplný chemický obraz buňky. Tato studie ukázala na části NIR spektra, které jsou důležité pro identifikaci bakteriálních kmenů. Úspěšnost klasifikace

bakteriálních kmenů na základě jejich NIR spekter byla zvýšena výběrem částí spektra s vysokou korelací k MIR peakům, které reprezentují základní konstituenty bakteriálních buněk.

V kap. 6 je popsán návrh optovláknového senzoru, který odstranil jednu ze zásadních limitací NIR spektroskopie, a tou je nízká citlivost. Buňky jsou vázány na povrch vlákna, kde je prostřednictvím absorpce evanescentního pole změřeno jejich spektrum. Důležitým aspektem návrhu biosenzoru je, aby dovoľoval akvizici spekter ve všech vlnových délkách, které byly v předchozích experimentech identifikovány jako důležité pro klasifikaci bakteriálních kmenů. Z toho důvodu bylo použito multimódové vlákno. Pro zesílení signálu nad detekovatelnou mez bylo použito kavitní zesílení. Touto konfigurací lze měřit ty části NIR spekter, které předchozí experimenty určily jako důležité z hlediska klasifikace bakterií. Konfigurace umožňuje měřit spektra s vysokou citlivostí, pro úspěšnou klasifikaci stačí malé množství vzorku – 10^5 bakterií.

V praktické části této práce bylo částečně interpretováno NIR spektrum bakterií. V současné době existují publikace s pokusy o tuto interpretaci, jsou však kusé a ve vzájemném rozporu. Proto je interpretace pro další výzkum v této oblasti zásadní. Nasazení NIR spektroskopie však stále brzdí nízká citlivost, ta byla zvýšena použitím technologie optovláknového biosenzoru s evanescentním snímáním a kavitním zesílením. Tato technologie dovoľuje měřit NIR spektra bakterií v malém množství, což je zásadní pro medicínskou a biochemickou praxi. Úspěšná analýza bakterií v malé koncentraci může přispět k včasnému odhalení bakteriálních infekcí a septických stavů.

8 LITERATURA

- [1] J. J. Workman, "Review of Near-Infrared and Infrared Spectroscopy," *Handb. Org. Compd.*, pp. 79–129, 2001.
- [2] L. E. Rodriguez-Saona, F. M. Khambaty, F. S. Fry, and E. M. Calvey, "Rapid detection and identification of bacterial strains by Fourier transform near-infrared spectroscopy," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, pp. 574–579, 2001.
- [3] J. Kauppinen and J. Partanen, *Fourier Transforms in Spectroscopy*, vol. 6. 2001.
- [4] A. Savitzky and M. J. E. Golay, "Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures," *Anal. Chem.*, vol. 36, no. 8, pp. 1627–1639, 1964.
- [5] H. Mark, "Chemometrics in near-infrared spectroscopy," *Anal. Chim. Acta*, vol. 223, no. C, pp. 75–93, 1989.
- [6] L. E. Rodriguez-Saona, F. M. Khambaty, F. S. Fry, E. M. Calvey, and S. S. W. Washington, "A Novel Approach for the Rapid Discrimination of Bacterial Strains by Fourier-Transform Near-Infrared Spectroscopy," *Photonic Detect. Interv. Technol. Safe Food, Proc. SPIE*, vol. 4206, pp. 22–31, 2001.
- [7] L. E. Rodriguez-Saona, F. M. Khambaty, F. S. Fry, J. Dubois, and E. M. Calvey, "Detection and identification of bacteria in a juice matrix with Fourier transform-near infrared spectroscopy and multivariate analysis," *J. Food Prot.*, vol. 67, no. 11, pp. 2555–2559, 2004.
- [8] S. Sivakesava, J. Irudayaraj, and C. Debroy, "DIFFERENTIATION OF MICROORGANISMS BY FTIR-ATR AND NIR SPECTROSCOPY," *Am. Soc. Agric. Eng.*, vol. 7, no. 3, pp. 951–957, 2004.
- [9] J. Dubois, E. Neil Lewis, F. S. Fry, and E. M. Calvey, "Bacterial identification by near-infrared chemical imaging of food-specific cards," 2005.
- [10] Y. Feng, G. Elmasry, D. Sun, A. G. M. Scannell, D. Walsh, and N. Morcy, "Near-infrared hyperspectral imaging and partial least squares regression for rapid and reagentless determination of Enterobacteriaceae on chicken fillets," *Food Chem.*, vol. 138, no. 2–3, pp. 1829–1836, 2013.
- [11] D. Alexandrakis, G. Downey, and A. G. M. Scannell, "Detection and identification of bacteria in an isolated system with near-infrared spectroscopy and multivariate analysis," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 10, pp. 3431–3437, 2008.
- [12] F. Cámara-Martos, G. Zurera-Cosano, R. Moreno-Rojas, R. M. García-Gimeno, and F. Pérez-Rodríguez, "Identification and Quantification of Lactic Acid Bacteria in a Water-Based Matrix with Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Regression Modeling," *Food Anal. Methods*, vol. 5, no. 1, pp. 19–28, Feb. 2012.
- [13] M. Barker and W. Rayens, "Partial least squares for discrimination," *J. Chemom.*, vol. 17, no. 3, pp. 166–173, 2003.
- [14] Y. Feng, G. Downey, D. Sun, D. Walsh, and J. Xu, "Towards improvement in classification of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and their strains in isolated systems based on chemometric analysis of visible and near-infrared spectroscopic data," *J. Food Eng.*, vol. 149, pp. 87–96, 2015.
- [15] S. Sivakesava, J. Irudayaraj, and D. Ali, "Simultaneous determination of

- multiple components in lactic acid fermentation using FT-MIR , NIR , and FT-Raman spectroscopic techniques," *Process Biochem.*, vol. 37, pp. 371–378, 2001.
- [16] S. Tosi, M. Rossi, E. Tamburini, G. Vaccari, A. Amaretti, and D. Matteuzzi, "Assessment of In - Line Near-Infrared Spectroscopy for Continuous Monitoring of Fermentation Processes," *Biotechnol. Prog.*, vol. 19, pp. 1816–1821, 2003.
- [17] Karl Norris, "Applying Norris Derivatives. Understanding and correcting the factors which affect diffuse transmittance spectra," *NIR news*, vol. 12, no. 1, p. 6, 2001.
- [18] P. Suthiluk, S. Saranwong, S. Kawano, S. Numthuam, and T. Satake, "Possibility of using near infrared spectroscopy for evaluation of bacterial contamination in shredded cabbage," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 43, pp. 160–165, 2008.
- [19] D. Naumann, "Infrared Spectroscopy in Microbiology," *Encycl. Anal. Chem.*, pp. 102–131, 2000.
- [20] A. O. Janbu, T. Møretrø, D. Bertrand, and A. Kohler, "FT-IR microspectroscopy: A promising method for the rapid identification of *Listeria* species," *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008.
- [21] M. A. Al-Holy, M. Lin, H. Al-Qadiri, A. G. Cavinato, and B. A. Rasco, "Classification of foodborne pathogens by Fourier transform infrared spectroscopy and pattern recognition techniques," *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.*, 2006.
- [22] B. Chang *et al.*, "Surround optical fiber immunoassay (SOFIA): An ultra-sensitive assay for prion protein detection," *J. Virol. Methods*, vol. 159, no. 1, pp. 15–22, 2009.
- [23] H. Waechter, J. Litman, A. H. Cheung, J. A. Barnes, and H. P. Loock, "Chemical sensing using fiber cavity ring-down spectroscopy," *Sensors*, vol. 10, no. 3, pp. 1716–1742, 2010.
- [24] H. P. Loock, "Ring-down absorption spectroscopy for analytical microdevices," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 25, no. 7, pp. 655–664, 2006.
- [25] M. Taniguchi *et al.*, "A fiber optic immunosensor for rapid bacteria determination," *3rd Kuala Lumpur Int. Conf. Biomed. Eng. 2006*, vol. 15, pp. 308–311, 2007.
- [26] K. Schmitt, J. Rist, C. Peter, and J. Wöllenstein, "Low-cost fiber-optic waveguide sensor for the colorimetric detection of ammonia," in *Microsystem Technologies*, 2012, vol. 18, no. 7–8, pp. 843–848.
- [27] L. Hoffmann, M. S. Müller, S. Krämer, and M. Giebel, "Applications of fibre optic temperature measurement," *Proc. Est. Acad. Sci. engineering*, vol. 13, no. 4, pp. 363–378, 2007.
- [28] A. Vallan, M. L. Casalicchio, and G. Perrone, "Displacement and acceleration measurements in vibration tests using a fiber optic sensor," in *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 2010, vol. 59, no. 5, pp. 1389–1396.
- [29] K. Schmitt, J. Rist, C. Peter, and J. Wöllenstein, "Optical fiber waveguide sensor for the colorimetric detection of ammonia," in *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, 2011, vol. 8066, pp. 80661Y–80661Y–6.

- [30] B. Sciacca and T. M. Monro, "Dip biosensor based on localized surface plasmon resonance at the tip of an optical fiber.," *Langmuir*, vol. 30, no. 3, pp. 946–54, 2014.
- [31] P. V. Preejith, C. S. Lim, A. Kishen, M. S. John, and A. Asundi, "Total protein measurement using a fiber-optic evanescent wave-based biosensor," *Biotechnol. Lett.*, vol. 25, no. 2, pp. 105–110, 2003.
- [32] A. Kishen, M. S. John, C. S. Lim, and A. Asundi, "A fiber optic biosensor (FOBS) to monitor mutans streptococci in human saliva," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 18, no. 11, pp. 1371–1378, 2003.
- [33] A. P. Ferreira, M. M. Werneck, and R. M. Ribeiro, "Development of an evanescent-field fibre optic sensor for Escherichia coli O157:H7," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, no. 6, pp. 399–408, 2001.
- [34] K. Miyajima *et al.*, "Fiber-optic fluoroimmunoassay system with a flow-through cell for rapid on-site determination of Escherichia coli O157: H7 by monitoring fluorescence dynamics," *Biosensors*, vol. 3, no. 1, pp. 120–131, 2013.
- [35] J. B. Jensen *et al.*, "Photonic crystal fiber based evanescent-wave sensor for detection of biomolecules in aqueous solutions.," *Opt. Lett.*, vol. 29, no. 17, pp. 1974–1976, 2004.
- [36] M. Tsang and D. Psaltis, "Reflectionless evanescent-wave amplification by two dielectric planar waveguides: erratum.," *Opt. Lett.*, vol. 32, no. 1, p. 86, 2007.
- [37] Y. Sun and X. Fan, "Optical ring resonators for biochemical and chemical sensing," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 399, no. 1, pp. 205–211, 2011.
- [38] S. Faez *et al.*, "Fast, Label-Free Tracking of Single Viruses and Weakly Scattering Nanoparticles in a Nanofluidic Optical Fiber," *ACS Nano*, vol. 9, no. 12, pp. 12349–12357, Dec. 2015.
- [39] X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, and Y. Sun, "Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review," 2008.
- [40] G. Gagliardi and Hans-Peter Loock, *Cavity-Enhanced Spectroscopy and Sensing*, vol. 179. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.
- [41] I. Ventrillard-Courtillot, E. Sciamma O'Brien, S. Kassi, G. Méjean, and D. Romanini, "Incoherent broad-band cavity-enhanced absorption spectroscopy for simultaneous trace measurements of NO₂ and NO₃ with a LED source," *Appl. Phys. B*, vol. 101, no. 3, pp. 661–669, Nov. 2010.
- [42] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, vol. 8. 2004.
- [43] M. Bradley, "Curve Fitting in Raman and IR Spectroscopy : Basic Theory of Line Shapes and Applications," *Thermo Fish. Sci. Appl. Note 50733*, 2007.
- [44] M. Miyamoto, T. Arai, M. Komatsu, A. Yamamoto, and T. Mikouchi, "Evaluation of a curve-fitting method for diffuse reflectance spectra in the UV-Visible-NIR wavelength region," *Polar Sci.*, vol. 3, no. 2, pp. 110–116, 2009.
- [45] A. J. Brown, "Spectral curve fitting for automatic hyperspectral data analysis," *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.*, vol. 44, no. 6, pp. 1601–1607, 2006.
- [46] S. Stöckel, J. Kirchhoff, U. Neugebauer, P. Rösch, and J. Popp, "The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 47, no. October, pp. 89–109, 2015.
- [47] E. L. Elson and D. Magde, "Fluorescence correlation spectroscopy. I.

- Conceptual basis and theory," *Biopolymers*, vol. 13, pp. 1–27, 1974.
- [48] I. Noda, "Techniques of two-dimensional (2D) correlation spectroscopy useful in life," *Biomed. Spectrosc. Imaging*, vol. 4, pp. 109–127, 2015.
- [49] S. Baron, *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- [50] A. Barth, "Infrared spectroscopy of proteins," *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, vol. 1767, no. 9. pp. 1073–1101, 2007.
- [51] Lukas K. Tamm, "Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers.," *Q. Rev. Biophys.*, vol. 30, no. 4, pp. 365–429, 1997.
- [52] MEFANET, "Struktura bakterii," 2017. [Online]. Available: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Struktura_bakterii.
- [53] A. Messica, A. Greenstein, and A. Katzir, "Theory of fiber-optic, evanescent-wave spectroscopy and sensors," *Appl. Opt.*, vol. 35, no. 13, p. 2274, 1996.
- [54] R. J. Potter, "Transmission Properties of Optical Fibers*†," *J. Opt. Soc. Am.*, 1961.
- [55] J. A. Stratton, *Electromagnetic Theory*, vol. 14, no. 11. 1941.
- [56] R. J. Potter, E. Donath, and R. Tynan, "Light-Collecting Properties of a Perfect Circular Optical Fiber*," *J. Opt. Soc. Am.*, vol. 53, no. 2, p. 256, Feb. 1963.
- [57] P. Krepelka, F. Pérez-Rodríguez, and K. Bartusek, "BACTERIAL PATTERN IDENTIFICATION IN NEAR-INFRARED SPECTRUM," *Inform. Autom. Pomiaru w Gospod. i Ochr. Środowiska*, vol. 4, no. 3, pp. 58–60, Sep. 2014.
- [58] L. Baldassarre *et al.*, "Mapping the amide I absorption in single bacteria and mammalian cells with resonant infrared nanospectroscopy," *Nanotechnology*, vol. 27, no. 7, p. 075101, 2016.
- [59] Q. Chen, J. Cai, X. Wan, and J. Zhao, "Application of linear / non-linear classification algorithms in discrimination of pork storage time using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 44, pp. 2053–2058, 2011.
- [60] P. Krepelka, "Identification of bacteria strains via advanced methods for the statistical processing of near-infrared spectra," *Prog. Electromagn. Res. Symp.*, pp. 910–914, 2013.
- [61] T. Fearn, "On orthogonal signal correction," *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 50, no. 1, pp. 47–52, 2000.
- [62] P. Krepelka, F. C. Martos, G. D. Posada-Izquierdo, and F. Pérez-Rodríguez, "Measuring and application of NIR light absorption coefficient of bacteria," in *Progress in Electromagnetics Research Symposium*, 2014.
- [63] H. Abdi and L. J. Williams, "Partial least squares methods: Partial least squares correlation and partial least square regression," *Methods Mol. Biol.*, vol. 930, pp. 549–579, 2013.
- [64] M. Cilimkovic, "Neural Networks and Back Propagation Algorithm," *Fett.Tu-Sofia.Bg*, 2010.
- [65] E. A. Disalvo *et al.*, "Structural and functional properties of hydration and confined water in membrane interfaces," *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1778, no. 12. pp. 2655–2670, 2008.
- [66] L. C. Lievens and K. van't Riet, "Convective drying of bacteria," Springer Berlin Heidelberg, 1994, pp. 71–89.
- [67] P. Krepelka, F. Pérez-Rodríguez, and K. Bartusek, "BACTERIAL PATTERN

- IDENTIFICATION IN NEAR-INFRARED SPECTRUM," *IAPGOŚ*, vol. 3, pp. 58–60, 2014.
- [68] L. Vienvilay Phandanouvong, L. Liliana Betancourt, and V. Fernando Rodriguez, "Identification and quantification of lactic acid bacteria by real-time PCR," *Determ. y cuantificación Bact. acidolácticas por PCR en tiempo real*, vol. 15, no. 1, pp. 1897–1906, 2010.
- [69] A. Cherkaoui *et al.*, "Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 4, pp. 1169–1175, 2010.
- [70] W. Hergert and T. Wriedt, *The Mie Theory, Basics and Applications*, vol. 169. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [71] P. Krepelka, I. Hynstova, R. Pytel, F. Pérez-Rodríguez, J.-M. Roger, and P. Drexler, "Curve fitting in Fourier transform near infrared spectroscopy used for the analysis of bacterial cells," <http://dx.doi.org/10.1177/0967033517705032>, May 2017.
- [72] E. Balan *et al.*, "Line-broadening effects in the powder infrared spectrum of apatite."
- [73] J. G. Dodd, L. K. DeNoyer, J. G. Dodd, and L. K. DeNoyer, "Curve-Fitting: Modeling Spectra," in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, P. R. Griffiths, Ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [74] Y. Katsumoto, D. Adachi, H. Sato, and Y. Ozaki, "Usefulness of a curve fitting method in the analysis of overlapping overtones and combinations of CH stretching modes," *J. Near Infrared Spectrosc.*, vol. 10, no. 1, p. 85, 2002.
- [75] I. Wesley *et al.*, "A curve-fitting approach to the near infrared reflectance measurement of wheat flour proteins which influence dough quality," *J. Near Infrared Spectrosc.*, vol. 7, no. 1, p. 229, 1999.
- [76] D. M. Olsson and L. S. Nelson, "The Nelder-Mead Simplex Procedure for Function Minimization," *Technometrics*, vol. 17, no. 1, pp. 45–51, 1975.
- [77] S. Roweis, "Levenberg-Marquardt Optimization," *Notes, Univ. Toronto*, 1996.
- [78] A. R. Conn, N. I. M. Gould, and P. L. Toint, "Trust-region methods," *Book*, vol. MPS/SIAM S, p. 959, 2000.
- [79] S. Kundu, S. Biswas, S. Das, and P. N. Suganthan, "Crowding-based local differential evolution with speciation-based memory archive for dynamic multimodal optimization," in *Proceeding of the fifteenth annual conference on Genetic and evolutionary computation conference - GECCO '13*, 2013, p. 33.
- [80] M. Safe, J. Carballido, I. Ponzoni, and N. Brignole, "On Stopping Criteria for Genetic Algorithms," *Adv. Artif. Intell. – SBIA 2004*, pp. 405–413, 2004.
- [81] J. J. Workman, "Interpretive Spectroscopy for Near Infrared," *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 31, no. 3, pp. 251–320, 1996.
- [82] J. Workman and L. Weyer, *Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy*. 2007.
- [83] S. Howard, "One-way ANOVA," *Exp. Des. Anal.*, pp. 171–190, 2012.
- [84] B. G. Osborne, T. Fearn, and P. H. Hindle, *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*, 2nd. ed. Harlow, Essex, England, New York: Longman Scientific & Technical, Wiley, 1993.
- [85] D. Alexandrakis, G. Downey, and A. G. M. Scannell, "Detection and

- Identification of Bacteria in an Isolated System with Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, pp. 3431–3437, 2008.
- [86] D. Helm, H. Labischinski, G. Schallehn, and D. Naumann, "Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy.," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 137, no. 1, pp. 69–79, 1991.
- [87] D. Naumann, D. Helm, and H. Labischinski, "Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy.," *Nature*, vol. 351, pp. 81–82, 1991.
- [88] P. Krepelka, A. Bolívar, and F. P. Rodríguez, "Two-Dimensional Mid and Near-Infrared Correlation Spectroscopy for Bacterial Identification," *J. Near Infrared Spectrosc. (In Rev.)*, 2019.
- [89] R. Davis and L. Mauer, "Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria," *Curr. Res. Technol. Educ. Top. ...*, no. 1, pp. 1582–1594, 2010.
- [90] K. T. Hecht and D. L. Wood, "The Near Infra-Red Spectrum of the Peptide Group," *Proc. R. Soc. Lond. A. Math. Phys. Sci.*, 1956.
- [91] R. Fernandez-Prini and R. B. Dooley, "Release on the Refractive Index of Ordinary Water Substance as a Function of Wavelength , Temperature and Pressure," *Int. Assoc. Prop. Water Steam*, 1997.
- [92] P. Y. Liu *et al.*, "Real-Time measurement of single bacterium's refractive index using optofluidic immersion refractometry," in *Procedia Engineering*, 2014.
- [93] T. C. Choy, *Effective Medium Theory: Principles and Applications*. 2016.
- [94] "Optical coatings," *Springer Ser. Opt. Sci.*, 2015.
- [95] Zz, *Relectivity and Transmissivity Through Layered Lossy Media: A User-Friendly Approach*. 2001.
- [96] E. Stijns and H. Thienpont, "Fundamentals of Photonics," in *Optical and Digital Image Processing: Fundamentals and Applications*, 2011.
- [97] C. Herath, C. Wang, M. Kaya, and D. Chevalier, "Fiber loop ringdown DNA and bacteria sensors," *J. Biomed. Opt.*, vol. 16, no. 5, p. 050501, 2011.
- [98] X. Zhuang, P. Li, and J. Yao, "A Novel Approach to Evaluate the Sensitivities of the Optical Fiber Evanescent Field Sensors," *Fiber Opt. Sensors*, pp. 165–184, 2012.
- [99] J. Crisp and B. Elliott, *Introduction to Fiber Optics*. 2005.
- [100] Y. Wu, X. Deng, F. Li, and X. Zhuang, "Less-mode optic fiber evanescent wave absorbing sensor: Parameter design for high sensitivity liquid detection," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 122, no. 1, pp. 127–133, 2007.
- [101] G. Y. Chen, C. Codemard, P. Gorman, J. S. P. Chan, and Michalis N Zervas, "Angle-Resolved Characterization and Ray-Optics Modeling of Fiber-Optic Sensors," *J. Light. Technol.*, vol. 33, no. 24, 2015.
- [102] G. Y. Chen, C. A. Codemard, M. N. Zervas, T. M. Monroe, and D. G. Lancaster, "Enhanced Pump Absorption of Active Fiber Components with Skew Rays," *J. Light. Technol.*, 2016.
- [103] A. W. Snyder and J. D. Love, *Optical Waveguide Theory*. 1st ed. London, UK: Chaoman and Hall, 1983.
- [104] D. F. Swinehart, "The Beer-Lambert Law," *J. Chem. Educ.*, vol. 39, no. 7, p. 333, 1962.
- [105] R. I. Rabady, "Goos-Hänchen shift in the miniaturized total internal reflection

- lens," *Opt. Eng.*, vol. 53, no. 4, p. 045101, 2014.
- [106] A. Grazia, M. Riccardo, and F. L. Ciaccheri, "Evanescent Wave Absorption Spectroscopy by Means of Bi-tapered Multimode Optical Fibers," *Appl. Spectrosc.*, vol. 52, no. 4, pp. 546–551, 1998.
- [107] L. Józefowski, J. Fiutowski, T. Kawalec, and H.-G. Rubahn, "Direct measurement of the evanescent-wave polarization state," *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 24, no. 3, p. 624, 2007.
- [108] R. Hall, "Illumination Models," Springer, New York, NY, 1989, pp. 63–114.
- [109] Åsmund Rinnan, F. van den Berg, and S. B. Engelsen, "Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 28, no. 10, pp. 1201–1222, Nov. 2009.
- [110] Å. Björck, *Numerical Methods for Least Squares Problems*. 1996.
- [111] J. Koljonen, T. Nordling, and J. Alander, "A review of genetic algorithms in near infrared spectroscopy and chemometrics: past and future," *J. Near Infrared Spectrosc.*, vol. 16, no. 1, p. 189, 2008.
- [112] R. Bro and A. K. Smilde, "Principal component analysis," *Anal. Methods*, vol. 6, no. 9, p. 2812, 2014.
- [113] W. K. AstHärdle, *Handbooks of Partial Least Square*. 2011.
- [114] K. W. C. Poon *et al.*, "Quantitative reagent-free detection of fibrinogen levels in human blood plasma using Raman spectroscopy," *Analyst*, vol. 137, no. 8, p. 1807, 2012.
- [115] N. S. Kapany, J. J. Burke, and C. C. Shaw, "Fiber Optics X Evanescent Boundary Wave Propagation," *J. Opt. Soc. Am.*, vol. 53, no. 8, p. 929, 1963.
- [116] T. Naes, T. Isakson, T. Fearn, and T. Davies, *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. Chichester: NIR Publications, 2002.
- [117] T. Back, *Evolutionary Algorithms in Theory and Practice: Evolution Strategies, Evolutionary Programming, Genetic Algorithms*. New York, New York, USA: Oxford University Press, 1996.
- [118] Y. Ozaki, W. F. McClure, and A. a. Christy, *Near-infrared spectroscopy in food science and technology*. 2006.
- [119] S. C. Gill and P. H. von Hippel, "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data," *Anal. Biochem.*, vol. 182, no. 2, pp. 319–326, 1989.

SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK

ANN	Umělá neuronová síť
ATR	Chemická analytická metoda využívající zeslabený úplný odraz
CDA	Kanonická diskriminační analýza
CEAS	Kavitně zesílená absorpční spektroskopie
CFU	Jednotky formující kolonie (počet bakteriálních buněk)
CRDS	Časově rozlišená kavitně zesílená spektroskopie
CVA	Kanonická analýza
DRIFT	Difuzně-reflektanční infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
EMSC	Rozšířená korekce rozptylu světla
FEWS	Evanescentní optovláknová spektroskopie
FOS	Optovláknový senzor
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GA	Genetické algoritmy
HPLC	Plynová chromatografie
IBBCEAS	Kavitně zesílená nekoherentní širokopásmová absorpční spektroskopie
IR	Infračervené světlo
K-NN	Algoritmus k-nejbližších sousedů (strojové učení)
LA	Lagrangův interpolační algoritmus
LDA	Lineární diskriminační analýza
LR	Lineární regrese
LWR	Lokálně váhovaná regrese
MIR	Infračervené světlo střední infračervené oblasti
MIRS	Spektroskopie střední infračervené oblasti (2500 nm-25000 nm)
MLR	Multilineární regrese
MSC	Korekce rozptylu světla
NEP	Výkon, při kterém je poměr signálu k šumu roven 1
NIR	Světlo blízké infračervené oblasti
NIRS	Spektroskopie blízké infračervené oblasti (700-2500 nm)
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OD	Optická hustota (absorbance)
PCA	Analýza hlavních komponent
PLS	Regrese metodou částečných nejmenších čtverců
PLS2-DA	Diskriminační analýza metodou částečných nejmenších čtverců.

PLS-DA	Diskriminační analýza metodou částečných nejmenších čtverců (vícedimenzionální kódování)
PPM	Jedna miliontina celku
SEP	Směrodatná odchylka predikce
SG	Savizky-Golay filtr
SIMCA	Klasifikační metoda využívající vnitřní analogie tříd
SNR	Poměr signál – šum
SNV	Standardní normální odchylka. Soubor dat s průměrem 0 a směrodatnou Odchylkou 1
SPR	Rezonance povrchových plazmonů
SVM	Algoritmy podpůrných vektorů. Metoda strojového učení
SWNIR	Světlo velmi blízké infračervené oblasti (700-1100 nm)
TIR	Totální vnitřní odraz
UNS	Umělé neuronové sítě
VIS	Viditelné světlo

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Modely evanescentního multimódového optovláknového senzoru

Příloha č. 2: Matematické a statické zpracování NIR spekter

1 PŘÍLOHA Č. 1: MODELÝ EVANESCENTNÍHO MULTIMÓDOVÉHO OPTOVLÁKNOVÉHO SENZORU

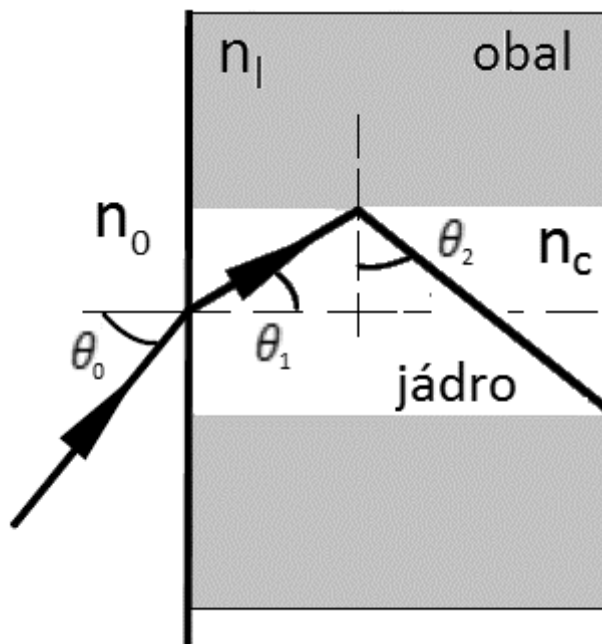
1.1 Model evanescentního multimódového optovláknového senzoru podle Xuye [98]

Autoři Zhuang Xuye a kol. [98] uvažují cylindrické optické vlákno tvořené jádrem s indexem lomu n_{co} a obalem s indexem lomu n_{cl} . Světlo je ve vlákne vedeno pomocí totálního interního odrazu (více o vláknové optice v referenční literatuře [99]), takže platí rovnice 64.

$$\theta_c > \sin^{-1}\left(\frac{n_{cl}}{n_{co}}\right). \quad (64)$$

Aby se světelný paprsek do vlákna úspěšně navázal, je nutné, aby dopadal na čelo optického pod úhlem menším, než je numerická apertura vlákna⁷¹. Numerická apertura vlákna udává, pod jakým maximálním úhlem musí být světlo navázáno, aby se uskutečnil totální odraz uvnitř vlákna. Situaci ukazuje obr. 76.

⁷¹ Numerická apertura je bezrozměrná veličina, která vyjadřuje schopnost optického vlákna navázat z okolí do svého jádra optický výkon.



Obrázek 76 – Geometrie navázání světla do optického vlákna.

Z obr. 76 lze pomocí goniometrických funkcí odvodit rovnici pro maximální úhel θ_0 (vztah 65) při kterém je světlo úspěšně navázáno do jádra optického vlákna.

$$\theta_{0,\max} = \sin^{-1} \left(\frac{1}{n_0} \sqrt{n_c^2 - n_l^2} \right) = \sin^{-1} \left(\frac{1}{n_0} NA \right), \quad (65)$$

- NA je numerická apertura vlákna.

Nyní lze definovat koeficient poměru výkonu přenášeného evanescentní vlnou (P_{cl}) k celkovému výkonu procházejícího světla:

$$\eta = \frac{P_{cl}}{P_{cl} + P_{co}}, \quad (66)$$

- P_{co} vyjadřuje výkon v jádře optického vlákna.

Řešením integrálů Poyntingových vektorů⁷² lze odvodit vztah pro výpočet poměru přenášeného výkonu j-tého módu.

⁷² Poyntingovy vektory popisují tok energie elektromagnetického pole – viz referenční literatura [75] a [76].

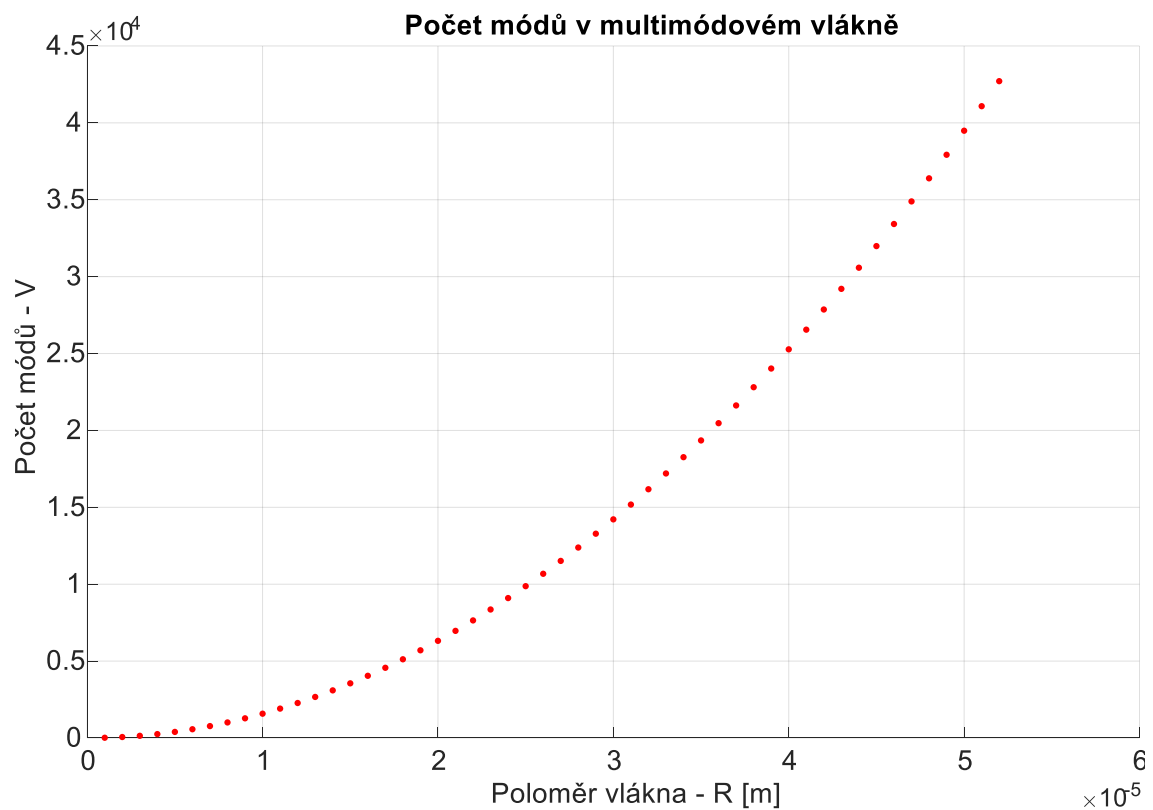
$$\eta_j = \frac{j}{N\sqrt{2N-2j}}. \quad (67)$$

Kde „N“ je celkový počet módů šířících se ve vlákne a vypočítá se z normalizované frekvence – viz 68 a 69. Grafické znázornění je na obr. 77.

$$N = \frac{4V^2}{\pi^2}, \quad (68)$$

$$V = \frac{2\pi d}{\lambda} NA. \quad (69)$$

- λ je vlnová délka světla.
- d je poloměr vlákna.



Obrázek 77 – Počet módů v multimódovém vlákne.

Na základě Lambert-Beerova zákona lze odvodit vztah pro absorpci světla („a“) v látce s absorpčním koeficientem „ α “ a dané délce interakce „l“:

$$a = \sum_{j=1}^N r_j e^{-\alpha(\lambda)l\eta_j}. \quad (70)$$

V této rovnici „ r_j “ vyjadřuje, jaká část světla se navazuje do daného módu. V případě rovnoměrného osvětlení jsou všechny koeficienty „ r “ stejné a platí rovnice 71.

$$r_j = \frac{1}{N}. \quad (71)$$

Protože se absorpce vyjadřuje jako poměr vstupního a výstupního výkonu v logaritmu, lze dosazením do rovnice 70 psát vztah pro výpočet absorpce senzoru založeném na evanescentním snímáním. Detailnější analýzu vztahu lze nalézt v referenční literatuře [100].

$$A = -\log \left(\frac{\alpha(\lambda)l}{N} \sum_{j=1}^N e^{-\eta_j} \right), \quad (72)$$

- $\alpha(\lambda)$ – koeficient absorpce daného média vyjádřen z molárního absorpčního koeficientu (ϵ) a koncentrace (c) $\alpha = \frac{\epsilon c}{\log_{10} e}$.
- l – délka obnaženého vlákna.
- η_j – poměr přenášeného výkonu j -tého módu.

Zde je důležité podotknout, že absorpce podle vztahu 72 platí jen pro krátký element vlákna. Pro přesný výpočet komplexního vlákna je nutné použít iterativní metodu, která spočítá celkovou absorpenci jako součet elementárních absorpcí. Reziduální energie, která zůstane po průchodu daným elementem (pro jeden mód) lze pak spočítat podle 73.

$$P_{cl_out(j,k)} = P_{cl_in(j,k)} e^{-\alpha(\lambda)\Delta l} = \frac{\eta_j}{N} P_{in(j,k)} e^{-\alpha(\lambda)\Delta l}, \quad (73)$$

$$P_{in(j,k+1)} = \eta_j (P_{cl(j,k)} + P_{c(j,k)}). \quad (74)$$

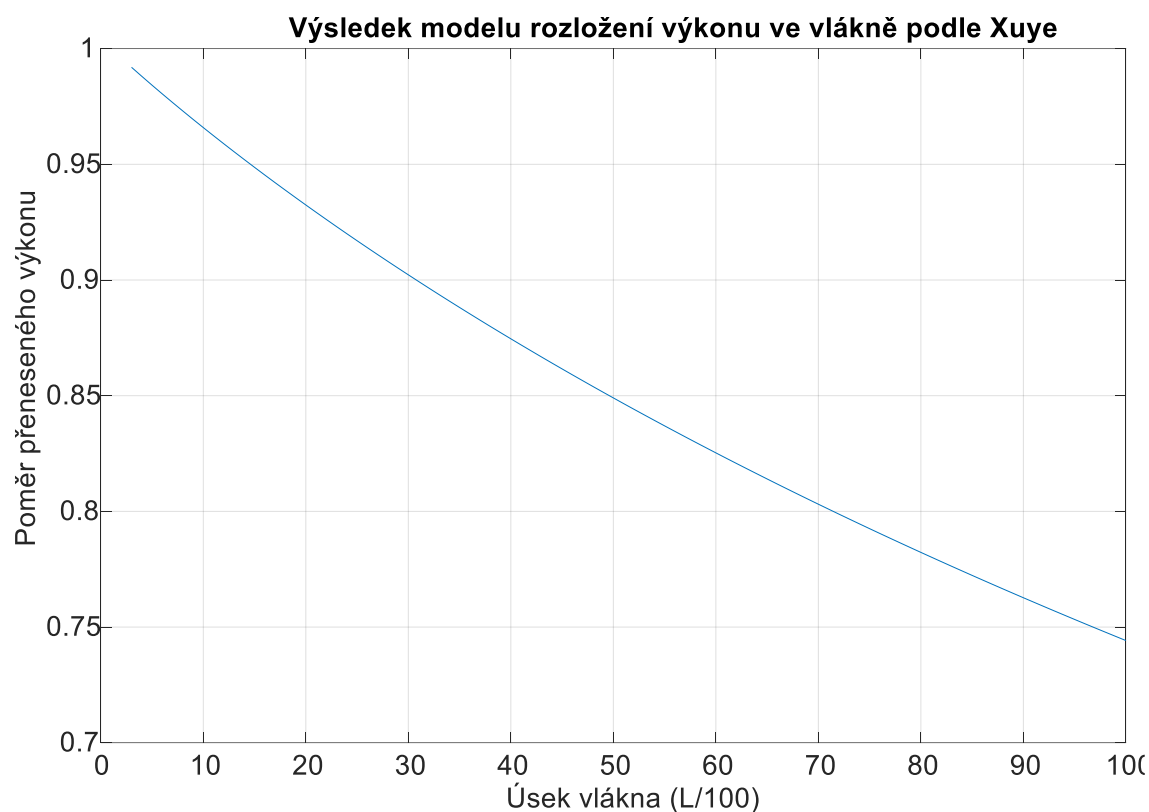
Ztráta výkonu v evanescentním poli pro krátký element vlákna lze pak přepsat do tvaru:

$$\Delta P_{cl(j,k+1)} = P_{cl_out(j,k)} - P_{cl_in(j,k)} = (e^{-\alpha(\lambda)\Delta l} - 1) P_{cl_in(j,k)}. \quad (75)$$

V limitním stavu ($\Delta l \rightarrow dl$) pak přechází rovnice 75 do 76. Rovnice 76 a 66, spolu s jednoduchým vztahem definující počáteční podmínku $P_{in} = (P_{cl(j,0)} + P_{co(j,0)}) \frac{1}{N}$ definují chování modelu.

$$dP_{cl(j,k+1)} = P_{cl_out(j,k)} - P_{cl_in(j,k)} = (e^{-\alpha(\lambda)\Delta l} - 1) P_{cl_in(j,k)}. \quad (76)$$

Je nutné podotknout, že tento model funguje jen pokud s analytem interaguje světlo vedené v plášti vlákne. Nepřesnost modelu dále navyšuje nemožnost modelování mimoosových paprsků (angl. skew rays).



Obrázek 78 - Rozložení výkonu ve vlákne podle Xuye [98]. Obrázek ukazuje pokles výkonu ve vlákne absorbovaný evanescentním polem. Parametry modelu: $\lambda = 980 \text{ nm}$, $n_1 = 1.432$, $n_2 = 1.05$, $\alpha = 20$, $N = 100$, $R = 52 \text{ }\mu\text{m}$, $L = 1 \text{ m}$.

1.2 Model evanescentního multimódového optovláknového senzoru podle Chena [101], [102]

Ve své studii z roku 2015 G.Y. Chen a kol. [101] představili komplexní metodu pro charakterizaci útlumu v cylindrickém multimódovém optickém vlákne. Metoda byla následně korigována v roce 2016 [102]. Model obsahuje popis paprsků přímých i mimoosových. Tzv. mimoosové (neboli šikmě vedené) paprsky jsou takové paprsky, které neprocházejí osou vlákna a jejich trajektorie v rámci optického vlákna vykresluje šroubovici. Mimoosové paprsky jsou často využívané

v optovláknových senzorech, protože mají více odrazů na jednotku délky, a proto jsou citlivější na perturbace okolního prostředí. Model podle Chena dokáže vypočítat přenášený výkon optickým vláknem. Výkon může být utlumen v evanescentním poli v médiu, které obklopuje jádro nebo plášť optického vlákna. Metoda spočívá v rozdělení jednotlivých módů do módových skupin. Výstupní výkon je dán součtem výkonů všech módů.

Podmínky platnosti modelu:

- Nepolarizované kolimované světlo.
- Rozměry vlákna jsou větší než vlnová délka světla.
- Vláknem je perfektně rovné.
- Intenzita vstupního světla je nezávislá na vstupním úhlu („ θ “).
- Odraz světla na koncích vlákna je konzistentní a je ignorován pro výpočet modelu. Tato podmínka platí jen pro korigovaný model [102].
- Paprsky s úhlem odrazu větším, než je kritický úhel jsou ztraceny a neúčastní se výpočtu.
- Útlum světla v plášti je zanedbatelný.

Přenos je modelován na následující rovnici:

$$P_{out}(\theta) = \sum_{i=1}^N (P_{out}^{co}(\theta, i) + P_{out}^{cl}(\theta, i)), \quad (77)$$

- $P_{out}^{co}(\theta, i)$ – Výstupní výkon i -tého módu v jádře vlákna charakterizovaného vstupním úhlem navazovaného světla „ θ “.
- $P_{out}^{cl}(\theta, i)$ – Výstupní výkon i -tého módu v obalu vlákna charakterizovaný vstupním úhlem navazovaného světla „ θ “.

Další členy rovnice 77 jsou vysvětleny dále.

1.2.1 Výkon navázaný v jádře vlákna

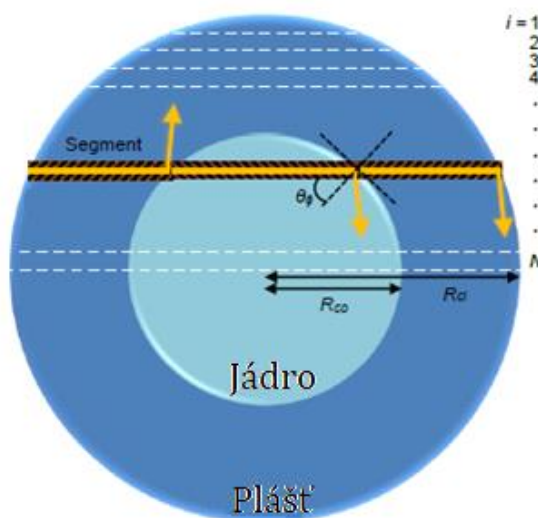
Z hlediska modelování přenosu výkonu může paprsek zůstat v jádře vlákna, nebo uniknout do pláště. Výkon uzavřený v jádře je popsán následující rovnicí:

$$P_{out}^{co}(\theta, i) = P_{in} F_{co}(i) (R_{co-cl}(\theta, i) \cdot \alpha_{co}(\theta, i))^{N_r(\theta, i) \cdot L}. \quad (78)$$

- P_{in} : Vstupní výkon.
- $F_{co}(i)$: Část i -tého módu, která proniká do jádra. Kvantzitační úrovně vzhledem k místu vstupu do vlákna jsou zobrazeny na obr 79.

$$F_{co}(i) = \frac{2}{N\pi} \sin(\cos^{-1}(1 - \frac{i}{N})), \quad (79)$$

- $R_{co-cl}(\theta, i)$: Fresnelův koeficient odrazu na rozhraní optického jádro a pláště – viz níže.
- $\alpha_{co}(\theta, i)$: Koeficient útlumu v jádře – viz níže.
- $N_r(\theta, i)$: Počet odrazů paprsku i-tého módu za jednotku délky – viz níže.
- L : délka optického vlákna.



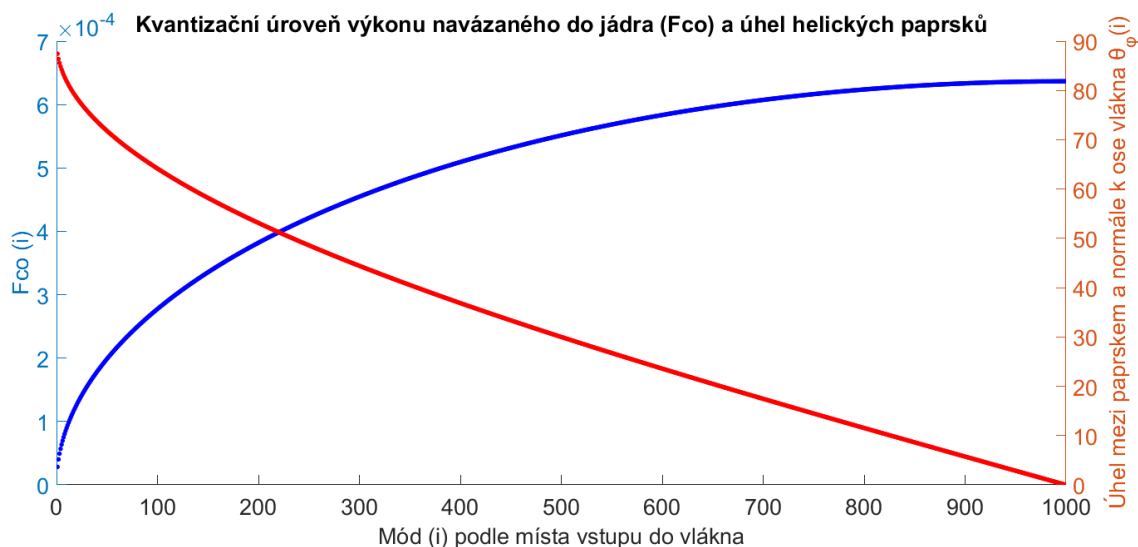
Obrázek 79 – Rozdělení výkonu podle místa vstupu do vlákna. N je volitelný parametr, tímto parametrem se určuje jemnost výpočtu [101].

Výkonový koeficient pro jednotlivé skupiny se pak spočítá podle rovnice 79.

Úhel mezi paprskem a normálou k tečně v místě odrazu se pak spočítá právě podle čísla skupiny – viz rovnice 80. Jen pro úplnost je uveden i výpočet pro úhel mezi paprskem a normálou k ose vlákna („ θ_z “)

$$\theta_\varphi = \frac{\pi}{2} - \cos^{-1}(1 - \frac{i}{N}), \quad (80)$$

$$\theta_z = \frac{\pi}{2} - \sin^{-1}(\frac{\sin\theta}{n_1}). \quad (81)$$



Obrázek 80 –Kvantizační koeficient a úhel θ_φ jednotlivých módů. $N = 1000$.

1.2.2 Odraz uvnitř vlákna

Pro výpočet odrazu uvnitř vlákna aplikují autoři stejné rovnice jako pro případ navázání světla do vlákna.

$$R_{ws} = \left(\frac{\sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \gamma} - n_1 \cos \gamma}{\sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \gamma} + n_1 \cos \gamma} \right)^2, \quad (82)$$

$$R_{wp} = \left(\frac{n_1 \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \gamma} - n_1 \cos \gamma}{n_1 \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \gamma} + n_1 \cos \gamma} \right)^2. \quad (83)$$

V těchto rovnicích je již použit komplexní index lomu okolí „ n_2 “, který respektuje extinční koeficient „ α_2 “⁷³.

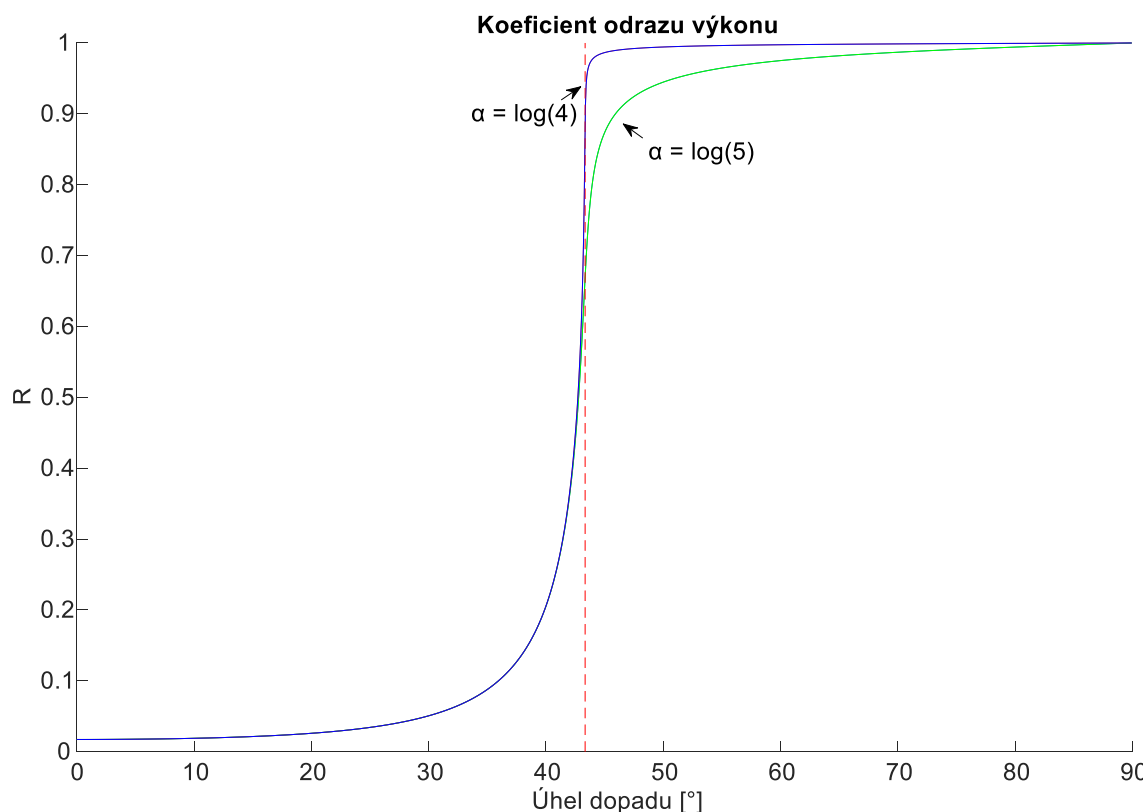
$$n_2 = n_{2R} + j \frac{\lambda \alpha_2}{2\pi}. \quad (84)$$

Na obrázku 81 je uvedena závislost koeficientu odrazu nepolarizovaného světla ($R_w = \frac{R_{ws} + R_{wp}}{2}$) na extinčním koeficientu. Je vidět, že v případě prostředí s „ $\alpha_2 > 0$ “ je koeficient odrazu menší než 1, tento jev je zřetelný zejména v okolí kritického úhlu.

⁷³ Více o extinčním koeficientu v literatuře[119].

V rovnicích 82 a 83 dále vystupuje úhel „ γ “. Tento úhel se nazývá efektivní úhel⁷⁴ a byl definován A.W. Snyderem a J.D.Lovem kol. [103] jako:

$$\gamma = \cos^{-1}(\cos \theta_{\varphi} \cos \theta_z). \quad (85)$$



Obrázek 81 - Průběh koeficientu odrazu pro $\alpha_2 = \log(4)$ a $\alpha_2 = \log(5)$. Vertikální přímka označuje kritický úhel.

1.2.3 Vlastní absorpce senzoru a absorpce evanescentní vlny

V multimódovém vlákně může rovněž docházet k útlumu světla vlivem rozptylu nebo absorpce světla v jádře. Intrinsická absorpce senzoru je definována pomocí výpočtu dráhy, jakou daný mód urazí v rámci jednoho odrazu – L_r ⁷⁵.

$$L_r = \frac{2R \cos \theta_{\varphi}}{\cos \theta_z}. \quad (86)$$

⁷⁴ Efektivní úhel je rozhodující pro výpočet Fresnelových koeficientů.

⁷⁵ Odvození tohoto vztahu je v referenční literatuře [103].

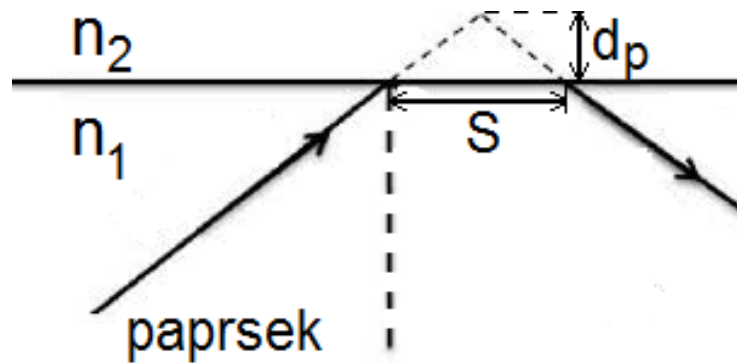
Celkový útlum světla pak lze vypočítat pomocí Lambert-Beerova [104] zákona:

$$\alpha_{int} = e^{-\alpha_1 L_r}. \quad (87)$$

Obdobným způsobem je definována i absorpce evanescentní vlnou:

$$\alpha_{ext} = e^{-\alpha_2 L_p}. \quad (88)$$

Ekvivalentní délka L_p je spočítána za použití Goos-Hanchenova posunu „ S “⁷⁶. Tento posuv nastává při TIR. Je to dráha, po kterou paprsek urazí v druhém prostředí (n_2). Kolmo na tuto dráhu se měří penetrační hloubka d_p vypočítaná podle vztahu 8989. Situaci popisuje obrázek 82.



Obrázek 82 - Goos-Hanchenův posuv.

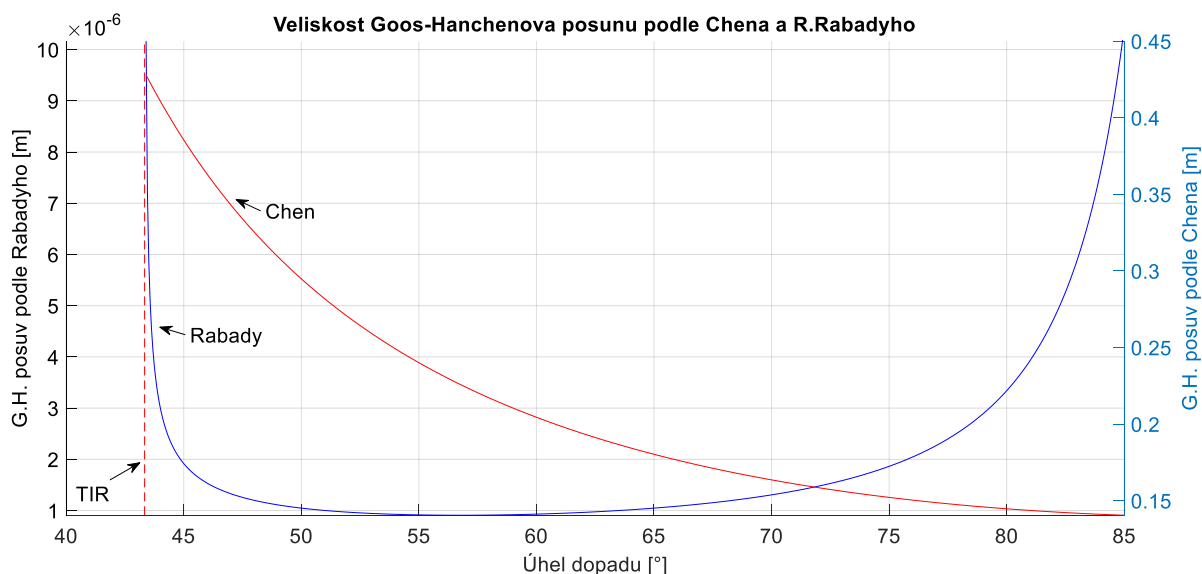
Výpočet velikosti Goos-Hanchenova posuvu je odvozen od studie R.I.Rabadyho [105]. Posuv závislý na polarizaci a spočítá se z úhlu odrazu a indexů lomů – viz 90 91.

$$d_p = \frac{\lambda_0}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_t - n_2^2}}, \quad (89)$$

$$S_s = \frac{\lambda}{\pi} \frac{\tan \gamma}{\sqrt{\sin^2 \gamma - \left(\frac{n_2 R}{n_1}\right)^2}}, \quad (90)$$

$$S_p = \frac{\left(\frac{n_2 R}{n_1}\right)^2}{\sin^2 \gamma \left(\left(1 + \frac{n_2 R}{n_1}\right)^2 - \left(\frac{n_2 R}{n_1}\right)^2 \right)}. \quad (91)$$

⁷⁶ Více o tomto jevu v referenční literatuře [105].



Obrázek 83 - Závislost Goos-Hanchenova posunu pro nepolarizované světlo ($S = \frac{S_s + S_p}{2}$) podle Chena [101] a Rabadyho [105].

Z grafu 83 je vidět, že rovnice 90 s 91 odvozené z referenčního článku napsaného R.I. Rabadyem jsou chybné. Pro další výpočty tedy uvažujme původní rovnice formulované Rabadyem (viz rovnice 92), které ovšem platí jen v okolí TIR. Z tohoto důvodu platí pro úhly vzdálené od TIR „ $S = 0$ “.

$$S_p = \frac{S_s}{\cos \gamma} \frac{\left(\frac{n_2 R}{n_1}\right)^2}{\left(1 + \left(\frac{n_2 R}{n_1}\right)^2\right) \sin^2 \gamma - \left(\frac{n_2 R}{n_1}\right)^2}. \quad (92)$$

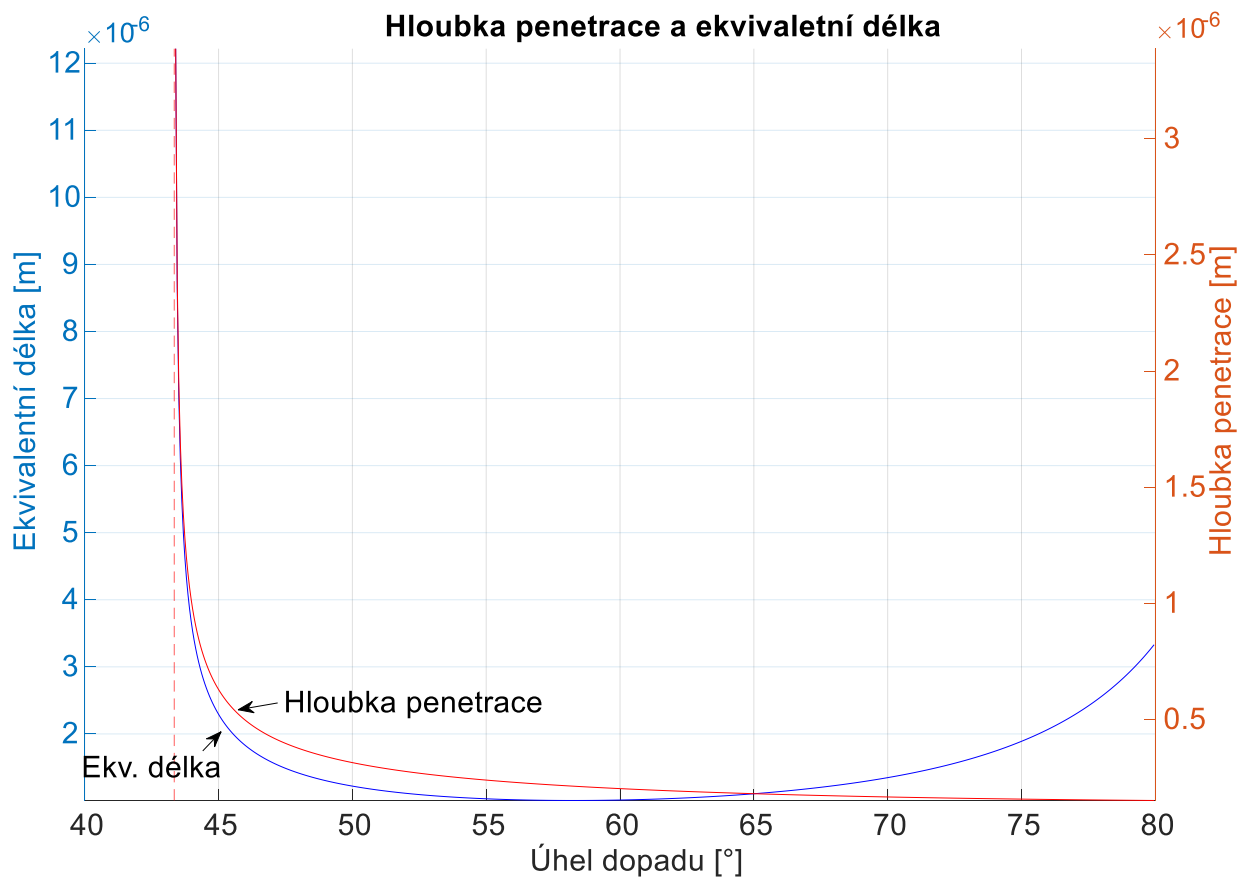
Výsledná ekvivalentní dráha, která je důležitá pro výpočet evanescentní absorpce lze vypočítat Pythagorovou větou.

$$L_p = \sqrt{S^2 + 4d_p^2}. \quad (93)$$

Pro kompletnost je nutné definovat počet odrazů na jednotku délky⁷⁷.

$$N_R = \frac{\cotan \theta_z}{2R \cos \theta_\varphi}. \quad (94)$$

⁷⁷ Touto problematikou se zabýval Snyder a kol. Přesnou metodiku pro určení počtu odrazů lze nalézt v referenčním článku [80].

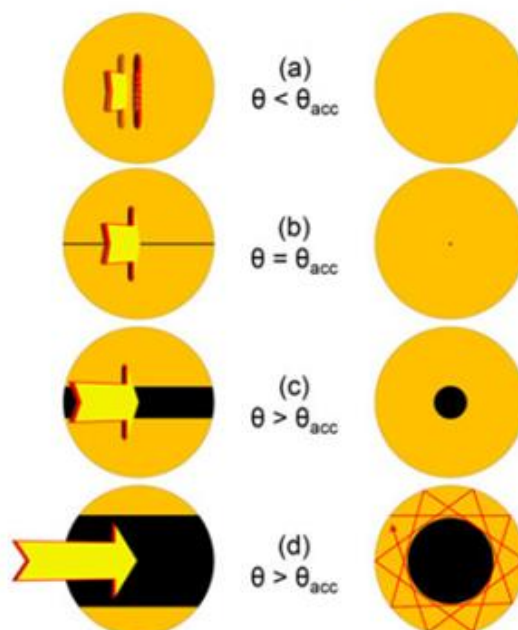


Obrázek 84 - Hloubka penetrace d_p a ekvivalentní délka L_p .

1.2.4 Prostorové rozložení intenzity

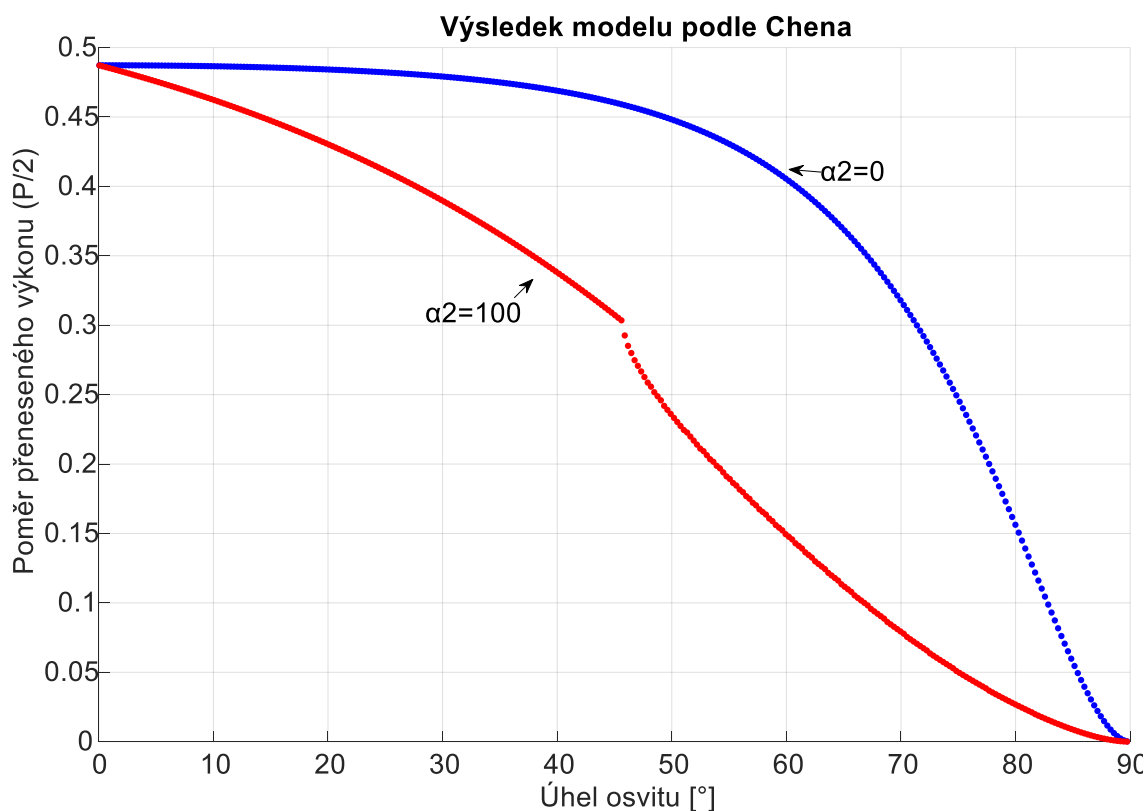
Chen a kol. dále navrhl algoritmus pro odhad prostorového rozložení intenzity na výstupu vlákna. Obvyklé rozložení intenzity světla na výstupu multimódového vlákna je na obr. 85. Toto rozložení bylo vyjádřeno koeficientem „donut ratio“, který udává velikost vyprázdněné oblasti ve středu vlákna vzhledem k jeho celkovým rozměrům – viz Obr. 85. Výsledný profil pak vznikl namapováním všech skupin paprsků do výstupního obrazce.

Vstupní rozložení světla Výstupní rozložení světla



Obrázek 85 - Obrázek vysvětlující vliv vstupního úhlu na koeficientu „donut ratio“. Vnitřní vyprázdňená oblast se začíná objevovat při $\gamma = \theta c$ a zvětšuje se se zvyšujícím úhlem [101].

$$DR_{near}(i) = 1 - \frac{i}{N} \tag{95}$$

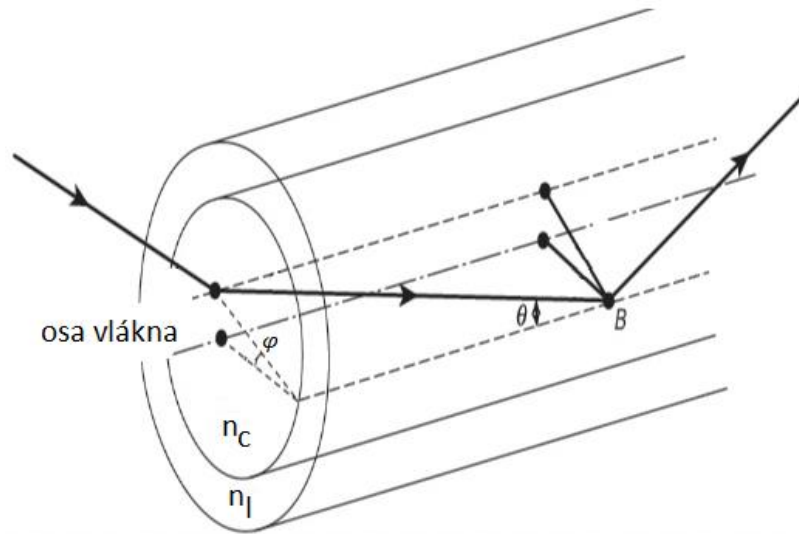


Obrázek 86 - Výsledek modelování pro absorpční koeficient vzorku $\alpha_2=0$ a $\alpha_2=100$. Model podle Chena byl modifikován - viz kapitoly 1.2.1 až 1.2.4. Největší citlivost na α_2 vykazuje model při úhlech osvitu okolo 50 °. Při dalším zvyšování úhlu již nelze světlo navázat. Podmínky: $\lambda = 980$ nm, $n_1 = 1.432$, $n_2=1$, $N=100$, $R = 52$ μ m, $L = 1$ m. Nelinearita je způsobena podmínkou $S = 0$ po překročení definované vzdálenosti od TIR.

1.3 Model evanescentního multimódového optovláknového senzoru podle Mignani [106]

Sofistikovanější výpočet pro determinaci poměru výkonu absorbovanému při evanescentním snímání publikovala A.G. Mignani a kol. v roce 1997 [107]. „ η “ je v tomto případě závislé na úhlu šíření světla, vzhledem k ose optického vlákna („ θ “) a úhlu odrazu u mimoosových paprsků („ φ “) – viz obr. 87. Model rovněž zahrnuje závislost těchto úhlů na měnícím se poloměru vlákna, a tak lze analyzovat i citlivost ztenčených senzorů⁷⁸.

⁷⁸ Tzv. bikonických taperů – více v kap. 2.2.



Obrázek 87 - Znárodnění mimoosových paprsků⁷⁹, které se šíří pod úhlem φ k axiální rovině vlákna - upraveno z [101].

1.3.1 Evanescentní absorbance optických vláken

Mignani definuje rovnici (viz rovnice 96) pro výpočet části energie, která je navázána do evanescentního pole v závislosti na dvou základních prostorových úhlech definující trajektorii paprsku (θ a φ).

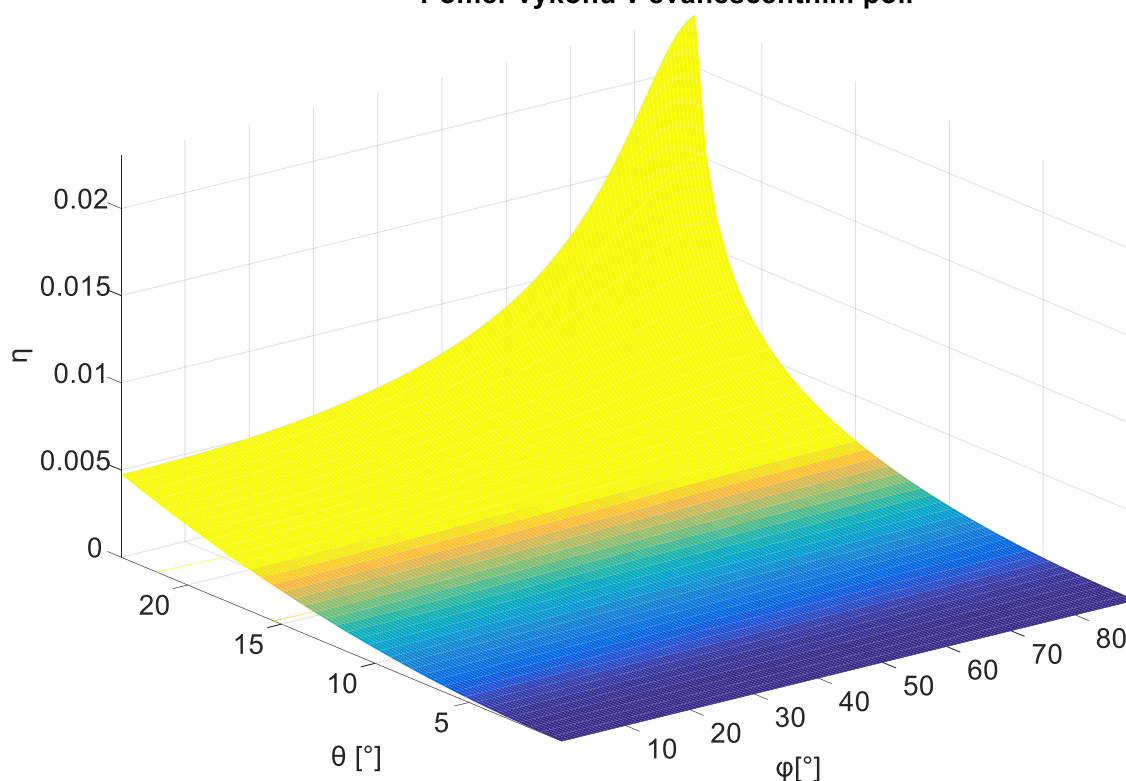
$$\eta(\theta, \varphi) = \frac{\lambda n_{cl} \tan \theta \sin \theta}{2\pi r n_{co}^2 \sin^2 \theta_{co} \sqrt{\sin^2 \theta_{co} - \sin^2 \theta \sin^2 \varphi}} \quad (96)$$

Vysvětlení symbolů:

- η – poměr výkonu navázaného v evanescentní vlně vzhledem k celkovému výkonu.
- θ – úhel šíření světla vzhledem k ose optického vlákna.
- φ – úhel odrazu u šikmě vedených paprsků – viz obr. 87.
- λ – vlnová délka světla.
- n_{co} , n_{cl} – index lomu jádra a okolního prostředí opt. vlákna.
- r – poloměr jádra opt. vlákna.
- θ_{co} – doplňkový úhel ke kritickému úhlu, $\theta_{co} = \cos^{-1}\left(\frac{n_l}{n_c}\right)$. V textu se ještě používá modifikovaný člen $\theta_{fo} = \cos^{-1}\left(\frac{n_c}{n_l}\right)$.

⁷⁹ Angl. skew rays.

Poměr výkonu v evanescentním poli



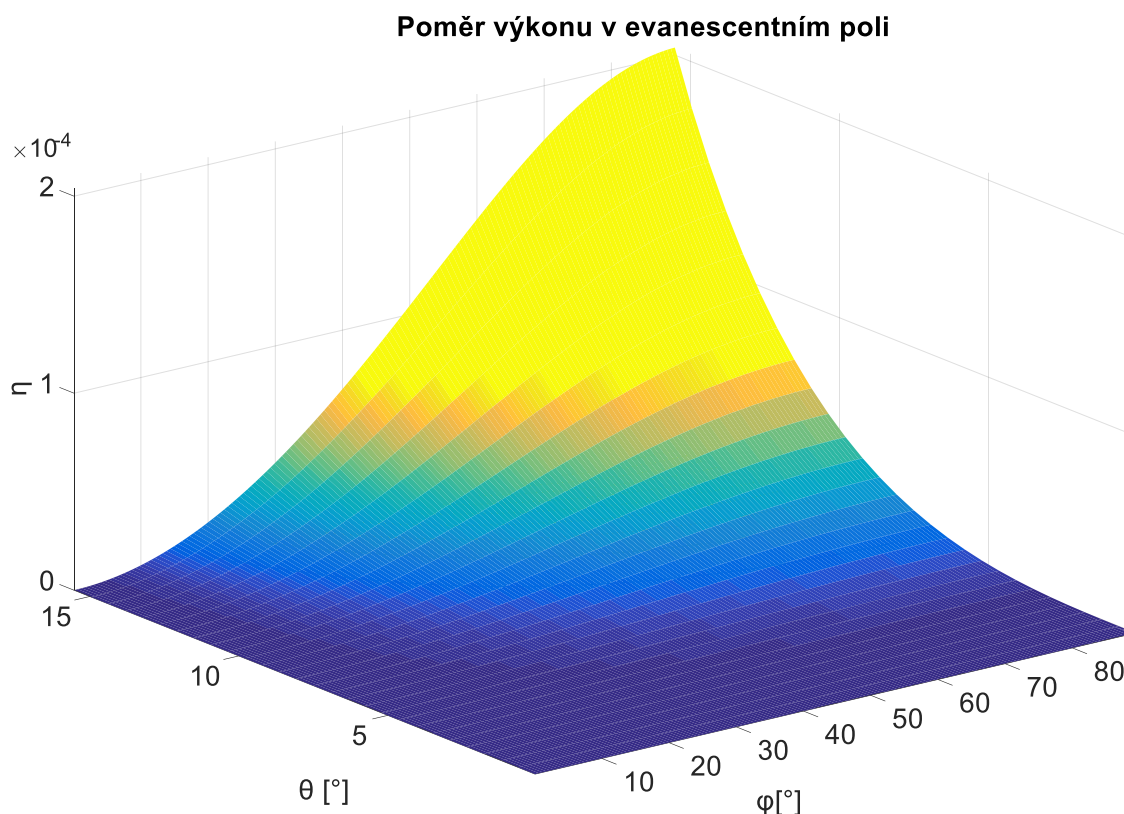
Obrázek 88 - Vizualizace rovnice 96. Podmínky: $\lambda = 980 \text{ nm}$, $n_{co} = 1.432$, $n_{cl} = 1.05$, $r = 52 \text{ }\mu\text{m}$.

Nechť je vlákno osvětleno světlem s nerovnoměrnou úhlovou distribucí. Vztah pro celkový poměr výkonu navázaném v evanescentním poli je pak dán následující rovnicí:

$$\eta = \frac{\int_0^{\theta_{f0}} \int_0^{\pi/2} \eta(\theta, \varphi) P(\theta, \varphi) d\theta d\varphi}{\int_0^{\theta_{f0}} \int_0^{\pi/2} P(\theta, \varphi) d\theta d\varphi}. \quad (97)$$

Pomocí tohoto modelu byla v rámci studie vypočítáno „ η “ pro optické vlákno ($n_{co} = 1,457$, $n_{cl} = 1,4$, $n_{ex} = 1,33^{80}$, $r = 200 \text{ }\mu\text{m}$) osvětlené Lambertovým zdrojem [108]. Poměr výkonu v evanescentním poli byl velmi nízký $\eta = 4 \cdot 10^{-4}$. Více v grafu 89.

⁸⁰ Index lomu vzorku.



Obrázek 89 - Vizualizace rovnice 97. Podmínky: $\lambda = 980 \text{ nm}$, $n_{co} = 1.432$, $n_{cl} = 1.05$, $n_{ex} = 1.33$, $r = 200 \text{ }\mu\text{m}$. Integrál této plochy podle 97 je roven $4 \cdot 10^{-4}$.

Pokud je na povrchu vlákna absorbující médium, konečná absorbance pak lze jednoduše vypočítat podle vztahu 98 na základě absorpčního koeficientu („ α “) a délky vlákna „ L “.

$$A = \alpha L \eta. \quad (98)$$

1.3.2 Absorpce evanescentního pole ve ztenčených optických vláknech

Jedním z přístupů, jak zvětšit „ η “ je jejich tenčení⁸¹. U tohoto typu senzorů dochází ke změně poloměru („ r “) a rovněž ke změně úhlu paprsků vzhledem k ose vlákna („ θ “) – viz rovnice 99.

$$\theta(z) = \sin^{-1}\left(\frac{r(0)}{r(z)} \sin \theta(0)\right). \quad (99)$$

⁸¹ Např. taperovaná vlákna - viz kap. 2.2,

Vztah 98 pak lze zobecnit:

$$A = \alpha \int_0^L L \eta(z) dz, \quad (100)$$

„ $\eta(z)$ “ je pak možné definovat obecněji:

$$\eta(z) = \frac{\int_0^{\theta_{max}(z)} \int_0^{\varphi_{max}(\theta)} \eta(\theta, \varphi, z) P(\theta, \varphi) d\theta d\varphi}{\int_0^{\varphi_{max}(\theta)} \int_0^{\pi/2} P(\theta, \varphi) d\theta d\varphi}. \quad (101)$$

Nové limity pro „ θ “ a „ φ “ pro vedené módy jsou:

$$\theta_{max}(z) = \sin^{-1}\left(\frac{r(0)}{r(z)} \sin \theta_{f0}\right), \quad (102)$$

$$\varphi_{max}(\theta) = \begin{cases} \pi/2 & \text{pro } \theta < \theta_{max0} \\ \sin^{-1} \frac{r(0) \sin \theta_{c0}}{r(z) \sin \theta} & \text{pro } \theta > \theta_{max0} \end{cases}, \quad (103)$$

$$\theta_{max0} = \sin^{-1}\left(\frac{r_w}{r(z)} \sin \theta_{c0}\right). \quad (104)$$

Rovnice 97 pak lze upravit na rovnici 105, která vyjadřuje poměr výkonu ev. vlny při modifikovaném průměru vlákna.

$$\eta(\theta, \varphi, z) = \frac{\lambda n_l \tan \theta \sin \theta}{2\pi r(z) n_c^2 \sin^2 \theta_{c0} \sqrt{\sin^2 \theta_{c0} - \sin^2 \theta \sin^2 \varphi}}. \quad (105)$$

Jak je vidět, zúžení vlákna zvyšuje výkon navázaný v evanescentním poli zvýšením „ η “, a také zvýšením integrálního intervalu rovnice 101.

Je důležité definovat minimální poloměr taperovaného vlákna⁸² „ r_w “. Mezní poloměr je „ r_m “ je definován v rovnici 106. Pokud je poloměr nejužší části vlákna menší než mezní („ r_m “), úhel šíření („ θ “) se zvýší nad kritický úhel a světlo již dále není vedeno optickým vláknem.

⁸² Tzn. Poloměr v nejužším místě taperu.

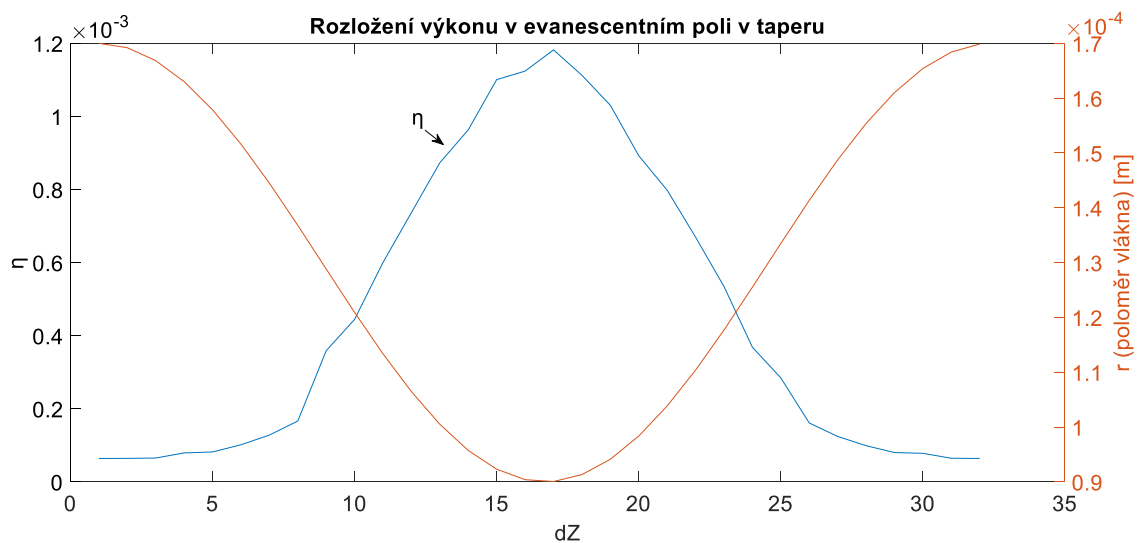
$$r_m = r(0) \frac{\sin \theta_{f0}}{\sin \theta_{c0}}. \quad (106)$$

Na druhou stranu, mimoosové paprsky mohou být vedené i pro úhel šíření větší než kritický, protože platí vztah 101. Minimální poloměr vlákna pro tyto tunelovací paprsky je tedy menší a vypočítává ho rovnice 108.

$$\varphi < \sin^{-1} \left(\frac{\sin \theta_{c0}}{\sin \theta} \right), \quad (107)$$

$$r_{m\varphi} = r(0) \sin \theta_{f0}. \quad (108)$$

Znova bylo přepočítáno „ η “ pro optické vlákno ($n_{co}=1,4, n_{cl}=1,33, r=200 \mu\text{m}$) osvětlené Lambertovým zdrojem [108]. Pokud je vlákno taperované do minimálního poloměru daným rovnicí 108, poměr výkonu v evanescentním poli se zvýšil na „ $\eta = 6 \cdot 10^{-3}$ “. Více v grafu 90.



Obrázek 90 – Rozložení výkonu v evanescentním poli (η) podél taperu s proměnným průřezem r .

2 PŘÍLOHA Č. 2: MATEMATICKÉ A STATICKÉ ZPRACOVÁNÍ NIR SPEKTER

V této části práce jsou uvedeny některé základní statistické metody pro zpracování a vyhodnocování NIR spekter. Porozumění statistiky je důležité i pro návrh optovláknového spektroskopického biosenzoru, protože tvoří nejdůležitější část NIR spektroskopie.

Pro klasifikaci, kalibraci a další analýzu NIR spekter je nutné matematické předzpracování. Matematická transformace spekter se používá především z těchto důvodů:

- Korekce spekter.
Filtrace, průměrování pro redukci šumu, nebo algoritmy pro potlačení vlivu rozptylu světla ve vzorku.
- Zvýšení rozlišení spekter.
Pro zvýraznění nejasných spektrálních kontur se často aplikují metody derivace spekter – Savitzky-Golay filtrování, Norris-Williams derivace, Gap derivace [109].
- Explorační analýza.
Především analýza hlavních komponent (PCA) se používá pro objasnění struktury a závislostí v datech.
- Aplikace empirických vztahů.
Např. dělení spekter (referenčního spektra a spektra vzorku) se využívá pro výpočet absorpce a transmise. Kramers-Kronigova transformace se používá u reflektančních technik pro převod na absorpční (transmisní) spektrum.
- Klasifikace a regrese.
Pro výpočet predikované proměnné se používají především PLS a odvozené algoritmy. V poslední době se rozšiřuje nasazení moderních technik založených na metodách strojového učení (GA, ANN). V případě multivariačních modelů je nutná řádná validace.

2.1 Vyhlažování⁸³

Aplikace klouzavého průměru pro potlačení vysokofrekvenčního šumu ve spektru – viz vztah 109.

$$A(w, t + 1) = \sum_i^n \alpha(i)A(w + i, t). \quad (109)$$

Na spektrum („A“) je aplikován klouzavý průměr délky „n“ s konvolučními vahami („ α “). Pro aritmetický průměr platí vztah 110.

$$\alpha(i = 1 \dots n) = \frac{1}{n}. \quad (110)$$

Další běžně používaný typ vyhlazovacího filtru je Savitzky Golay filtr, který prokládá okolí filtrovaného bodu polynomem, více v odkazované literatuře [109].

2.2 Odstranění trendu

Trend může vznikat difusní povahou vzorku (vlivem difuze světla stoupá absorpce ve vyšších vlnových délkách), nebo vlivy měření. Obecně lze popsat trend takto:

$$A(w) = \alpha A_0(w) + \beta + e(w), \quad (111)$$

kde

- A_0 je reálné spektrum měřeného vzorku.
- α je multiplikatívni faktor.
- β je aditivni faktor trendu.
- e je zbývající šum.

Odstranění trendu spočívá v nalezení těchto koeficientů a odečtením od naměřených spekter. Pro výpočet koeficientů se zpravidla používá metoda nejmenších čtverců.

2.3 Derivace

V moderní NIR spektroskopii se téměř výhradně používá spektrální derivace Savitzky-Golay [109]. Tato transformace zvýrazní spektrální detaily a zároveň zachová většinu spektrálních kontur. Nevýhodou je, že tento typ derivace má 3 parametry (šířka derivačního okna, stupeň polynomu, stupeň derivace), které se musí a priori určit. Transformace je založena na proložení části spektra v derivačním

okně polynomem, stejně jako u Savitzky-Golay vyhlazování, s tím rozdílem že se polynom následně derivuje a transformovaný spektrální bod se určí z již derivovaného polynomu.

2.4 Korekce rozptylu světla

Nejčastěji používaný algoritmus pro eliminaci vlivu rozptylu světla na vzorku je „Multiplicative Scatter Correction“ (MSC) a „Extended Multiplicative Scatter Correction“ (EMSC). Tyto algoritmy byly původně používány pro potlačení multiplikativní složky intenzity u reflexní spektroskopie, dále so rozšířily i do DRIFT spektroskopie, kde je potřeba se vypořádat i s aditivním efektem. Originální MSC je založen na faktu, že rozptyl světla deterministicky závisí na vlnové délce, a proto ho lze separovat od vlivu absorpce. Pro separaci se používá referenční spektrum („ A_{ref} “). Metoda spočívá v nalezení multiplikativního a aditivního efektu rozptylu světla a následného odstranění – viz 112.

$$\mathbf{A} = \alpha \mathbf{A}_{ref} + \beta + e. \quad (112)$$

Rozšířená varianta algoritmu, EMSC, lépe modeluje vliv rozptylu světa. Tato metoda je založena na modelu znázorněném v rovnici 113. Koeficienty modelu se minimalizují metodou nejmenších čtverců [110]. Podrobnější popis algoritmu je uveden v referenční literatuře [5], [111].

$$\mathbf{Z}_i = a_i \mathbf{I} + b_i \mathbf{m} + h_i \mathbf{p} + d_i \lambda + e_i \lambda^2 + \varepsilon_i, \quad (113)$$

kde

- \mathbf{I} – jednotková matice.
- \mathbf{m} – zprůměrované spektrum.
- \mathbf{p} – první kanonická komponenta (viz kap. 2.5 - PCA).
- λ – vektor vlnových délek.
- ε – reziduální variance.
- a, b, h, d, e – koeficienty, které se optimalizují metodou nejmenších čtverců.

Další používaný algoritmus pro potlačení vlivu rozptylu světla je „Standard Normal Variate“ (SNV). Funkci tohoto algoritmu popisuje vztah 114. Výstup algoritmu je také známý pod názvem z-skóre. Výsledkem operace je spektrum, od kterého se odečte spektrum průměrné („ μ_A “) a vydělí se směrodatnou odchylkou spekter („ σ_A “).

$$\hat{A} = \frac{A - \mu_A}{\sigma_A}. \quad (114)$$

2.5 Analýza hlavních komponent (PCA)

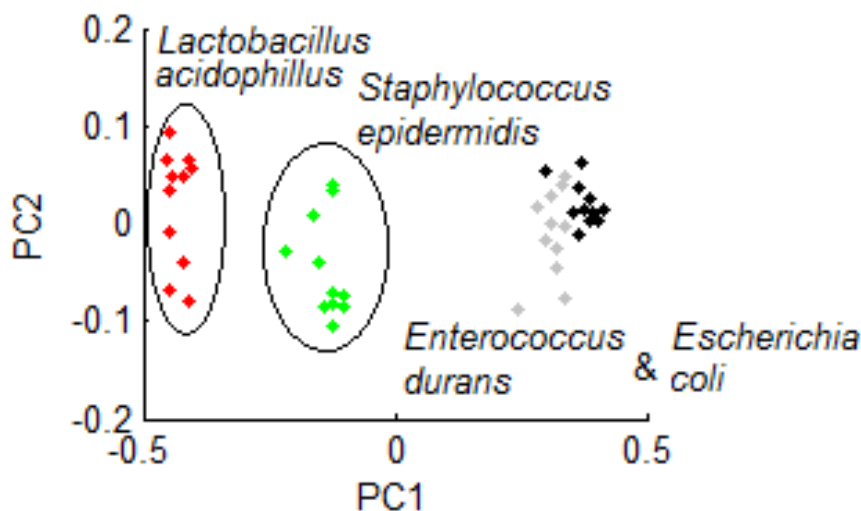
PCA slouží pro kompresi dat. Datová matice (naměřená spektra) je dekomponovaná tak, že spektra jsou vyjádřena lineární kombinací menšího počtu komponent. Datová matice („**X**“) je pak vyjádřena jako součin matice skóre („**T**“) a matice zátěže⁸⁴ („**P**“). Matice „**P**“ se vypočítá metodou nejmenších čtverců[112]. Nepostihnutá část datové variace vystupuje ve vztahu 115 jako residuální matice „**E**“.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E} \quad (115)$$

První (nejdůležitější⁸⁵) komponenta pokrývá největší rozptyl ve vstupních datech a výsledné skóre je pak lineární kombinací vlnových délek. Jde v podstatě o projekci dat do menšího počtu dimenzí. Nejčastěji se používá projekce do 2 nebo 3 rozměrů, protože tyto projekce lze jednoduše vizualizovat. Dále se zobrazuje graf komponentních vah, pomocí kterého lze ukázat, které nezávislé proměnné (vlnové délky) přispívají do hlavních komponent a jak jsou důležité vzhledem k rozptylu dat. PCA je hlavní technikou pro explorační analýzu dat, protože vizualizací skóre lze jednoduše postihnout strukturu dat.

⁸⁴ Angl. loadings.

⁸⁵ Z pohledu PCA jde o komponentu, která nese nejvíce informace.



Obrázek 91 – Dobře separovatelný prostor PCA skóre NIR spekter bakterií.

S analýzou hlavních komponent souvisí regresní model PCR, v rámci kterého se navíc definuje vztah mezi vektorem závislých (predikovaných) proměnných („ y “) a skóre („ T “) – viz vztah 116.

$$y = Tq + f \quad (116)$$

Kde „ q “ odpovídá vektoru výstupních zátěží, které v podstatě popisují, jak skóre souvisí s predikovanou proměnnou „ y “. „ f “ je opět matice residuí. Hlavní účel PCR je odstranění dimenzí ve vstupních datech s nejnižší variabilitou, to odpovídá redukci některých spektrálních vlnových délek, které nemají žádnou spojitost s predikovanou veličinou. Komponenty, které reprezentují nejnižší variabilitu nejsou zahrnuty do predikce a tím se zvyšuje přesnost regrese. Problémem zůstává, které komponenty se mají zahrnout do predikce, to se ve většině publikací řeší experimentálně. Pro eliminaci efektu přeučení⁸⁶ musí být provedena důkladná validace takto experimentálně postaveného modelu – viz níže.

2.6 Metoda částečných nejmenších čtverců (PLS)

⁸⁶ Anlg. over-fitting. Jde o stav, kdy model ztratil schopnost generalizace a nelze použít na jiná data, než na které byl kalibrován.

Dilema optimálního výběru komponent u modelu PCR je řešeno metodou částečných nejmenších čtverců (PLS). PLS počítá komponenty⁸⁷ tak, aby maximalizovala kovarianci mezi maticí predikované veličiny „**y**“ a lineárních kombinací matice dat „**X**“. Tímto je zajištěno, že komponenty odpovídají variabilitě ve vektoru „**y**“. V modelu PLSs se navíc definuje váhový vektor „**w**“, což je jednotkový vektor, který definuje směr jednotlivých komponent. Skóre první komponenty se pak vypočítá podle vztahu 117. Regresí „**X**“ do „**t**“ lze získat zátěžovou matici „**P**“.

$$\mathbf{t}_1 = \mathbf{X}\mathbf{w}_1 \quad (117)$$

Detailní popis výpočtů modelu PLS je uveden v referenční literatuře [113]. Pro predikci se využívají nejdůležitější (první v pořadí) komponenty. Volitelným parametrem však stále zůstává, jak určit jejich počet. Nízký počet komponent vede k nedostatečné přesnosti modelu⁸⁸, na druhou stranu velký počet komponent vede ke ztrátě schopnosti generalizace a k tzv. přeučení modelu (overfitting). Počet komponent se opět volí experimentálně. Z důvodu výše uvedených problémů je správná validace modelu zásadní. Dále existuje klasifikační verze tohoto modelu (PLS-DA), která pracuje s predikovanou proměnou zakódovanou do příslušnosti do jednotlivých tříd.

Kanonická analýza (CVA), nebo také Fisherova lineární diskriminační analýza je grafická analogie lineární diskriminační analýzy (LDA). Tato analýza vytyčuje nový datový prostor tak, že jeho principiální osy mají takový směr, který maximalizuje rozptyl dat mezi třídami a minimalizuje rozptyl dat uvnitř jednotlivých tříd vstupních dat. Pro kanonickou analýzu je nutný výpočet korelační matice („**R**“), která je dána maticovým součinem nezávislých spektrálních dat a výstupní (závislé) proměnné označující příslušnost do tříd („**R_{yx}**“, „**R_{xy}**“, – viz vztah 118. Takto lze jednoduše vizualizovat distribuci dat vzhledem ke klasifikovaným třídám. Tato metoda má silnou tendenci k přeučení (overfittingu), protože modely s větším počtem komponent velice rychle ztrácí schopnost generalizace, a proto její použití bez silné validace je značně problematické.

$$\mathbf{R} = \mathbf{R}_{yy}^{-1} \mathbf{R}_{yx} \mathbf{R}_{xx} \mathbf{R}_{xy} \quad (118)$$

⁸⁷ Resp. matice zátěže **P** a **q**.

⁸⁸ Angl. Underfitting.

2.7 Validace modelů v NIR spektroskopii

Protože klasifikace a kalibrace v NIR/MIR spektroskopii je multivariační kolineární problém, kde je často počet proměnných v měření⁸⁹ vyšší než počet měření, modely mají tendenci k přeučení, tzn. že ztrácí schopnost zobecnění a data která se nepodílela na kalibraci nelze nadále správně vyhodnotit.

Vymezení pojmů chemometrie⁹⁰:

- RMSE je definovaná jako odmocnina průměru (funkce avg) čtverců odchylek všech predikovaných hodnot (\hat{y}) od skutečných (y)

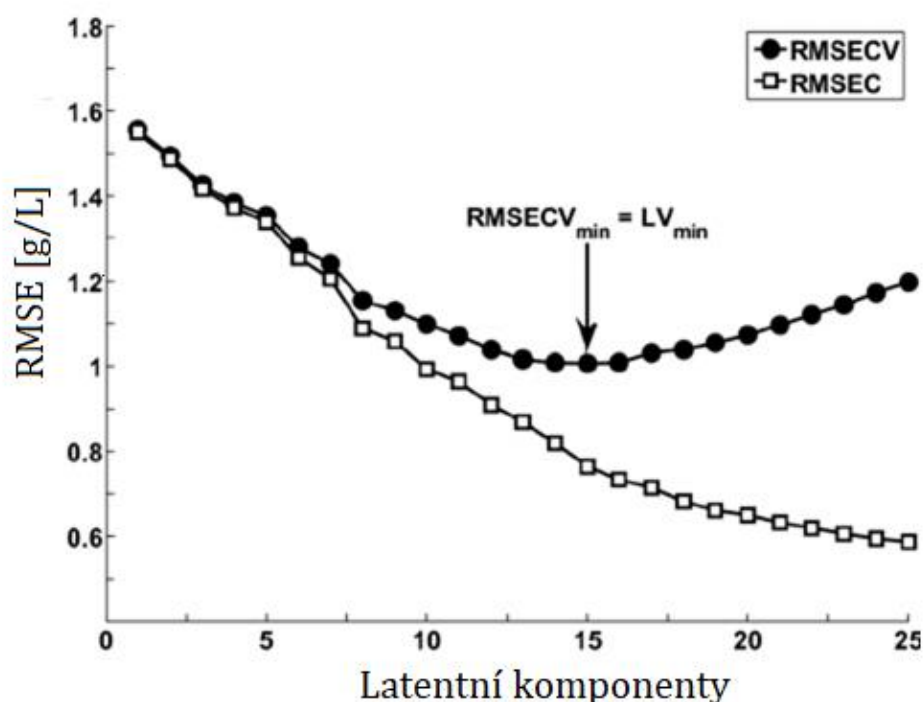
$$RMSE = \sqrt{\text{avg}(\hat{y} - y)^2} \quad (119)$$

- RMSEC – RMSE kalibrace. Jde o výpočet přesnosti modelu na datech, na kterých **byl** model kalibrován. Ve většině případů jde o příliš optimistický výsledek ohodnocení modelu.
- RMSEP – RMSE predikce. Jde o výpočet přesnosti modelu na datech, na kterých **nebyl** model kalibrován. Validační data se nepodílela na kalibraci modelu a byla vyčleněna před samotnou kalibrací.
- RMSECV – RMSE kalibrací pomocí křížové validace (CV). Jde velmi rozšířený typ validace, kdy se data rozdělí na kalibrační a validační soubor a vypočítá se RMSEP. V následujícím kroku se data opět zamíchají a vypočítá se další RMSEP. RMSECV je pak průměrem všech vypočtených RMSEP. Doporučená 2-fold CV rozdělí data na dvě poloviny, v prvním cyklu je první polovina považována za kalibrační a ve druhém za validační, výsledný RMSECV je pak průměrem obou RMSEP. V extrémním případě se validuje model pomocí jednoho měření a počet validačních cyklů je roven počtu měření (tzn. každé měření se používá v jednom cyklu pro kalibraci) – jde o tzv. CV s vyloučením jednoho (leave one out CV, LOO CV). Křížová validace, a především LOO CV, vede k optimistickému ohodnocení výkonu modelu. Používá se, pokud není dostatek dat pro řádnou validaci, lze ji také použít pro optimalizaci struktury modelu – např. pro výběr komponent pro kalibraci.
- CCR – procento správné klasifikace. Udává, v kolika procentech případů model správně klasifikoval spektrum. Zatímco pro úlohu regrese se používá RMSE (popř. MSE, R^2 , RPD), míra úspěšnosti klasifikace se vyjadřuje CCR.

⁸⁹ Ve spektroskopii se za proměnné v měření považují absorpce vzorku na různých vlnových délkách.

⁹⁰ Za chemometrii se obecně považuje použití statistiky v chemii.

Je důležité si uvědomit, že v případě kalibrace multivariačních dat zpravidla klesá RMSEC se zvyšující se komplexností modelu, ta je v případě klasického multivariačního modelování (PCR,PLS) vyjádřena počtem použitých latentních komponent. Na druhou stranu s počtem komponent klesá obecnost modelu a stoupá chyba RMSEP (popř. RMSECV). Dobře nastavený model má takový počet komponent, který dokáže postihnout závislosti v datech, ale nedochází k jeho přeučení. Situaci ukazuje graf 92. Je naprosto zásadní provést validaci na **nezávislých** datech, popř. provést křížovou validaci. Nesprávná kalibrace vede k častým dezinterpretacím výsledků a milným závěrům a možnostech NIR/MIR spektroskopie⁹¹.



Obrázek 92 - Vliv RMSECV a RMSEC na počtu latentních komponent [114].

⁹¹ Příklady nesprávné interpretace jsou uvedeny v kap. 2.1.