

ANTÓNIO LUÍS PEREIRA DO AMARAL

DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS DE
ANÁLISE DE IMAGEM PARA APLICAÇÃO EM
PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS



UNIVERSIDADE DO MINHO
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOLÓGICA
1998

Departamento de Engenharia Biológica
Universidade do Minho

Desenvolvimento de Técnicas de Análise de Imagem para Aplicação em Processos Biotecnológicos

Tese de Mestrado em Engenharia Biológica de:
António Luís Pereira do Amaral

Orientador
Eugénio Campos Ferreira
Co-orientador
Manuel Magalhães Mota

1997 - 1998

Este trabalho foi parcialmente financiado por uma bolsa da *Ambassade de France au Portugal* e da Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Preâmbulo

Na elaboração desta tese procurou-se englobar de um modo homogêneo os diferentes trabalhos da mesma. Deste modo, é feita de início uma descrição sumária do elemento aglutinador, i.e., da técnica de análise de imagem, e dos objectivos do trabalho, bem como dos materiais e métodos utilizados. A partir deste ponto procurou-se descrever com mais detalhe cada um dos trabalhos elaborados. Assim, a tese está organizada do seguinte modo:

No primeiro capítulo é dada uma Introdução geral à análise de imagem. Deste modo são referidas as etapas principais da técnica de análise de imagem, bem como das suas aplicações na área da biotecnologia.

No segundo capítulo são referidos os Materiais e Métodos utilizados no decurso deste trabalho, com uma ênfase especial na metodologia experimental e componente informática utilizada.

Nos terceiro, quarto, quinto e sexto capítulo são apresentados individualmente cada um dos trabalhos realizados. Estes capítulos encontram-se divididos nos sub-capítulos: Sumário, Introdução, Programa, Resultados e Discussão e Conclusões. O terceiro capítulo refere-se ao Reconhecimento Semi-Automático de Protozoários por Análise de Imagem; o quarto ao estudo da Mobilidade da *Tetrahymena pyriformis* em Contacto com Tóxicos; o quinto à Correlação entre Actividades e Dimensões Fractais de Agregados Microbianos Presentes em Digestores Anaeróbios e o sexto à Determinação Quantitativa de Fluorescência num Digestor Anaeróbio Perturbado.

Os sétimo e oitavo capítulo referem-se respectivamente à Bibliografia e Nomenclatura. Em anexo apresentam-se os apêndices.

Em termos de notação, a tese encontra-se organizada do seguinte modo:

Os nomes dos aparelhos, *hardware* e *software* utilizados encontram-se em itálico. Os nomes das rotinas e subrotinas programadas encontram-se em itálico, e as funções próprias do *Matlab* e *Visilog* em itálico e sublinhado (pretende-se seguir o paradigma do *hiperlink*: em apêndice é apresentado um glossário das funções).

O autor gostaria de expressar a sua gratidão a todos os que o acompanharam no decurso deste trabalho.

Ao orientador, Doutor Eugénio Campos Ferreira, por todo o apoio prestado e disponibilidade demonstrada, bem como todo o encorajamento e conselhos outorgados durante o decorrer deste trabalho.

Ao co-orientador, Professor Manuel Mota pelo apoio prestado e pelos conselhos dados no decurso deste trabalho.

À Doutora Madalena Alves, por todo o apoio prestado tanto ao nível experimental, como na melhor compreensão dos fenómenos envolvidos na digestão anaeróbia.

Je voudrais remercier au Professeurs Marie-Noëlle Pons et Hervé Vivier qui m'on permis d'effectuer un séjour au LSGC (Laboratoire des Sciences du Génie Chimique - Nancy), et pour leurs nombreuses conseils.

Ao Eng. Nuno Faria e à Nataline por todo o apoio prestado, e pela amizade sempre demonstrada.

À Dr.^a Ana Nicolau pelo apoio prestado, pela ajuda a nível experimental e por todos os esclarecimentos prestados ao nível da identificação dos protozoários estudados.

Ao Eng. José Maria Oliveira pelos esclarecimentos prestados ao nível do tratamento estatístico dos resultados.

Ao Doutor João Monteiro por todos os esclarecimentos prestados.

Ao Sr. Manuel Santos pela ajuda técnica prestada no trabalho experimental.

Às instituições e organismos que contribuíram para a consecução deste trabalho, *Ambassade de France au Portugal e Fundação para a Ciência e Tecnologia.*

A todos os colegas de trabalho por todo o apoio prestado e encorajamento recebido, com um enorme voto de gratidão.

Em especial à minha família por todo o apoio prestado ao longo destes anos.

Resumo

Os objectivos principais deste trabalho foram os seguintes:

- Reconhecimento e identificação automática de algumas espécies de protozoários presentes em estações de tratamento de águas residuais por técnicas de análise de imagem. A Análise de Componentes Principais foi utilizada com o intuito de obter os melhores eixos possíveis.

- Estudo da influência de três tóxicos (cicloheximida, cobre e triton X-100) na mobilidade do protozoário ciliado *Tetrahymena pyriformis* em meio líquido. Os parâmetros velocidade e número de mudanças de direcção foram determinados através de técnicas de análise de imagem.

- Estudo da correlação entre dimensões fractais, diâmetro equivalente, actividade metanogénica acetoclástica e velocidade de sedimentação de agregados microbianos de dois digestores anaeróbios de diferentes configurações. As dimensões fractais, dimensão fractal estrutural mássica, dimensão fractal estrutural área *vs.* diâmetro de Feret e dimensão fractal área *vs.* perímetro e o diâmetro equivalente foram determinados através de técnicas de análise de imagem.

- Estudo das actividades metanogénicas acetoclástica e hidrogenofílica de um consórcio de microrganismos de um digestor anaeróbio perturbado, bem como a correlação com a fluorescência observada, quando excitado a 420 nm. Os parâmetros índice de fluorescência, número de bactérias fluorescentes por floco e fluorescência do fundo foram estudados através da análise de imagem.

As principais conclusões retiradas destes trabalhos são as seguintes:

- Os protozoários *Trachelophyllum*, *Tetrahymena*, *Opercularia*, *Colpidium*, *V. microstoma* com pedúnculo, *V. convallaria* com pedúnculo, *Zoothamnium* com pedúnculo, *Glaucoma*, *V. convallaria* e *Prorodon* foram bem identificados e os diferentes grupos de protozoários ciliados (nadadores, sésseis, móveis de fundo e carnívoros) foram reconhecidos e separados. Os protozoários indicadores de uma baixa eficiência de uma estação de tratamento de águas residuais, como *V. microstoma* e *Opercularia* foram razoavelmente bem identificados.

- As formas das linhas de tendência foram as esperadas, uma vez que, com o aumento da concentração dos tóxicos, a velocidade da *T. pyriformis* diminuiu. Os resultados obtidos para o número de mudanças de direcção mostraram-se fortemente dependentes do número de *T. pyriformis* presente a cada concentração de tóxico. A mobilidade deste protozoário pode ser utilizada como um bom indicador biológico de poluição, uma vez que é um bom indicador da presença e concentração de tóxicos.

- A dimensão fractal melhor correlacionada com o diâmetro equivalente e com a actividade acetoclástica foi a dimensão fractal estrutural mássica, enquanto que a dimensão fractal estrutural área *vs.* diâmetro de Feret se mostrou a melhor correlacionada com a velocidade de sedimentação. A determinação destes parâmetros morfológicos pode ser usada como um método simples e rápido de monitorizar, em certa medida, a estabilidade das propriedades morfológicas dos agregados microbianos anaeróbios, que têm um papel importante na tecnologia do tratamento anaeróbio de águas residuais.

- As bactérias presentes num digestor anaeróbio revelaram-se bastante sensíveis às perturbações efectuadas (suspensão de alimentação e suspensão de alimentação mais entrada de ar), bem como as actividades metanogénicas específicas acetoclástica e hidrogenofílica que demonstraram uma tendência geral crescente ao longo do tempo. Os parâmetros índice de fluorescência, número de bactérias fluorescentes por floco e fluorescência do fundo não se mostraram correlacionáveis com os anteriores, à excepção da fluorescência do fundo que se correlacionou com a concentração de sólidos voláteis de uma forma exponencial.

Abstract

The main objectives of this work were the following:

- Automatic recognition and identification of protozoan species present in wastewater treatment plants by image analysis techniques. Principal Component Analysis was used to obtain the best possible axis.

- The influence of three toxics (cicloheximide, copper and triton X-100) in the mobility of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis* in PPY (*Proteose Peptone Yeast Extract Medium*) liquid medium was studied. The parameters velocity and movement changes were determined by image analysis techniques.

- The correlation between fractal dimensions, equivalent diameter, methanogenic activity in acetate and settling velocity of microbial aggregates from two anaerobic digesters with different configurations was studied. The mass structural fractal dimension, area *vs.* Feret diameter structural fractal dimension and area *vs.* perimeter fractal dimension, were determined by image analysis techniques.

- The methanogenic acetoclastic and hydrogenophilic activities of a bacterium consortia from a disturbed anaerobic digester, and correlating with the fluorescence observed when excited at 420 nm was studied. The parameters fluorescence index, fluorescent bacterial number per floc and background fluorescence were studied by image analysis techniques.

The main conclusions to be withdrawn are the following:

- The protozoa *Trachelophyllum*, *Tetrahymena*, *Opercularia*, *Colpidium*, *V. microstoma* with stalk, *V. convallaria* with stalk, *Zoothamnium* with stalk, *Glaucoma*, *V. convallaria* and *Prorodon* were reasonably well identified and, the different ciliated protozoa groups (free-swimming, sessile, crawling and carnivorous) were recognised and separated. Also, the protozoan indicators of a low efficiency of a wastewater treatment plant, like *V. microstoma* and *Opercularia* were reasonably well identified.

- The shapes of the trend lines were as expected: With the increase of the toxic's concentrations the velocity of the *Tetrahymena pyriformis* decreased. The results obtained for the number of direction changes is heavily dependent on the number of *T. pyriformis* present at each toxic concentration. The protozoan mobility can be used as a good biological pollution indicator, as it is a good indicator of the presence and concentration of a toxic.

- The fractal dimension best correlated with the equivalent diameter and with the acetoclastic activity was the mass fractal dimension, whereas the fractal dimension area *vs.* Feret diameter was the best correlated with the settling velocity. The determination of these morphological parameters may be used, as a fast and simple method, to monitor, at some extent, the stability of the morphological properties of anaerobic microbial aggregates which play a crucial role in the anaerobic wastewater treatment technology.

- The methanogenic activity and the biomass concentration were shown to be sensitive to the disturbances (starvage and starvage + air). The parameters fluorescence index, fluorescent bacterial number per floc and background fluorescence were not correlated with the above-mentioned parameters, exception made to the background fluorescence and the volatile solids concentration which were shown to correlate in an exponential way.

Índice

Preâmbulo	1
Resumo	3
Abstract	4
Índice	5
Lista de Figuras	7
Lista de Tabelas	10
1. Introdução Geral	13
2. Materiais e Métodos	18
2.1 Reconhecimento Semi-Automático de Protozoários por Análise de Imagem.	19
2.2 Estudo da Mobilidade da <i>Tetrahymena pyriformis</i> em Contacto com Tóxicos.	20
2.3 Correlação entre Actividades e Dimensões Fractais de Agregados Microbianos Presentes em Digestores Anaeróbios.....	22
2.4 Determinação Quantitativa da Fluorescência num Digestor Anaeróbio Perturbado	26
3. Reconhecimento Semi-Automático de Protozoários por Análise de Imagem.....	28
3.1 Sumário	29
3.2 Introdução.....	30
3.3 Programa	37
3.4 Resultados e Discussão	49
3.5 Conclusões	57
4. Estudo da Mobilidade da <i>Tetrahymena pyriformis</i> em Contacto com Tóxicos	62
4.1 Sumário	63
4.2 Introdução.....	64
4.3 Programa	69
4.4 Resultados e Discussão	80
4.5 Conclusões	88
5. Correlação entre Actividades e Dimensões Fractais de Agregados Microbianos Presentes em Digestores Anaeróbios	92
5.1 Sumário	93
5.2 Introdução.....	94
5.3 Programa	100
5.4 Resultados e Discussão	105
5.5 Conclusões	118
6. Determinação Quantitativa de Fluorescência num Digestor Anaeróbio Perturbado	122
6.1 Sumário	123
6.2 Introdução.....	124
6.3 Programa	129
6.4 Resultados e Discussão	136

6.5	Conclusões	145
7.	Bibliografia	148
8.	Nomenclatura	153
	Apêndices	i
	Apêndice A: Resultados Intermédios Obtidos no Reconhecimento Semi-Automático de Protozoários	ii
	Apêndice B: Configuração do Sistema de Aquisição do Estudo da Mobilidade da <i>Tetrahymena</i> <i>pyriformis</i>	ix
	Apêndice C: Equações e Correlações Calculadas na Correlação entre Actividades e Dimensões Fractais	x
	Apêndice D: Curvas de Calibração na Determinação Quantitativa da Fluorescência.....	xiii
	Apêndice E: Glossário das funções do <i>Matlab</i> utilizadas	xvi
	Apêndice F: Glossário das funções do <i>Visilog</i> utilizadas.....	xix
	Apêndice G: Conteúdo do CD-ROM	xxii

Lista de Figuras

Figura 1.1 - FOTOSENSOR DE UMA CÂMARA CCD (Russ, 1991).	14
Figura 2.1 - Representação da instalação experimental do Reconhecimento Semi-Automático de Protozoários por Análise de Imagem.	19
Figura 2.2 - Representação da instalação experimental do estudo da Mobilidade da <i>Tetrahymena pyriformis</i> em Contacto com Tóxicos.	21
Figura 2.3 - Representação da instalação experimental da Correlação entre Actividades e Dimensões Fractais de Agregados Microbianos Presentes em Digestores Anaeróbios.	25
Figura 2.4 - Representação da instalação experimental da Determinação Quantitativa da Fluorescência num Digestor Anaeróbio Perturbado.	27
Figura 3.1 - Sucessão dos protozoários dominantes numa ETAR ao longo do tempo (Curds <i>et al.</i> , 1970).	31
Figura 3.2 - a) - d) ciliados nadadores. e) ciliado móvel de fundo. g) - j) ciliados sésseis. k) e l) ciliados carnívoros.	32
Figura 3.3 - Representação dos parâmetros no círculo de correlações.	35
Figura 3.4 - Imagem resultante da aquisição (ponto 1).	37
Figura 3.5 - Operação <i>merge_maxima</i> sobre uma imagem (Noesis, S.A., 1998).	41
Figura 3.6 - Operação <i>watershed</i> sobre uma imagem (Noesis S.A., 1998).	41
Figura 3.7 - Imagem resultante da função <i>logical_sub</i> (ponto 20).	42
Figura 3.8 - Imagem resultante da operação <i>xor</i> (ponto 23).	43
Figura 3.9 - Operação <i>numreconstruct</i> sobre uma imagem (Noesis S.A., 1998).	44
Figura 3.10 - Imagem resultante da função <i>reconstruct</i> (ponto 39).	46
Figura 3.11 - Representação do diâmetro de Feret de um objecto.	46
Figura 3.12 - Organigrama do programa <i>ProtoRec</i>	48
Figura 3.13 - Representação dos parâmetros no círculo das correlações.	51
Figura 3.14 - Representação de todos os protozoários nos eixos 1 e 2.	52
Figura 3.15 - Representação da zona ocupada por cada espécie nos eixos 1 e 2.	53
Figura 3.16 - Representação da zona ocupada por cada espécie no eixo 1 e no eixo da área.	54
Figura 3.17 - Representação da zona ocupada por cada espécie tridimensionalmente, a um conjunto de ângulos de (-10°,60°).	55
Figura 3.18 - Representação da zona ocupada por cada espécie tridimensionalmente, a um conjunto de ângulos de (-100°,30°).	55
Figura 4.1 - Estrutura química da cicloheximida.	65
Figura 4.2 - Estrutura química do triton X-100.	65
Figura 4.3 - O protozoário ciliado <i>Tetrahymena pyriformis</i>	66
Figura 4.4 - Corte axial de um cílio (Alberts <i>et al.</i> , 1994).	66
Figura 4.5 - Imagens consecutivas de <i>Tetrahymena pyriformis</i>	67
Figura 4.6 - Imagem resultante da aquisição (ponto 1).	70
Figura 4.7 - Representação gráfica do filtro "Mexican hat" de 17x17.	71
Figura 4.8 - Imagem resultante do filtro "Mexican hat" (ponto 2).	71
Figura 4.9 - Função degrau e respectivos termos da transformada de Fourier (Russ, 1995).	73
Figura 4.10 - Imagem resultante da função <i>iff2</i> (ponto 11).	75
Figura 4.11 - Imagem da eliminação dos objectos com área maior que 500 ou menor que 50 (ponto 17).	76
Figura 4.12 - Organigrama do programa <i>Proto_v8</i>	79
Figura 4.13 - Representação gráfica das velocidades e intervalos de confiança para a cicloheximida.	81
Figura 4.14 - Representação gráfica das velocidades e curva de tendência para a cicloheximida. ...	81
Figura 4.15 - Representação gráfica das velocidades e intervalos de confiança para o cobre.	82
Figura 4.16 - Representação gráfica das velocidades e curva de tendência para o cobre.	83

Figura 4.17 – Representação gráfica das velocidades e intervalos de confiança para o triton X-100.	84
.....	84
Figura 4.18 – Representação gráfica das velocidades e curva de tendência para o triton X-100.	84
Figura 4.19 – Representação gráfica das mudanças de direcção para a cicloheximida.	85
Figura 4.20 – Representação gráfica das mudanças de direcção para o cobre.	86
Figura 4.21 – Representação gráfica das mudanças de direcção para o triton X-100.	86
Figura 5.1 – Definição de caixa vazia, interior e de fronteira.	95
Figura 5.2 – Representação gráfica da dimensão fractal.	96
Figura 5.3 – Representação gráfica da dimensão fractal mássica.	97
Figura 5.4 – Representação gráfica da dimensão fractal área vs. perímetro.	97
Figura 5.5 – Representação gráfica da dimensão fractal área vs. diâmetro de Feret.	97
Figura 5.6 – Exemplos de imagens recolhidas no decurso deste trabalho.	98
Figura 5.7 – Imagem resultante da aquisição (ponto 1).	100
Figura 5.8 – Imagem resultante da eliminação dos objectos na fronteira (ponto 10).	102
Figura 5.9 – Imagem de um grânulo (ponto 11).	103
Figura 5.10 – Organigrama do programa <i>Imago_v5</i> .	104
Figura 5.11 – Representação gráfica da dimensão fractal mássica (D_{Bm}) em função do diâmetro e intervalos de confiança respectivos.	108
Figura 5.12 – Representação gráfica da curva de tendência da dimensão fractal mássica (D_{Bm}) em função do diâmetro.	108
Figura 5.13 – Representação gráfica da actividade em acetato em função da dimensão fractal mássica (D_{Bm}), e intervalos de confiança respectivos.	110
Figura 5.14 – Representação gráfica da curva de tendência da actividade em acetato em função da dimensão fractal mássica (D_{Bm}).	110
Figura 5.15 – Representação gráfica da velocidade de sedimentação em função da dimensão fractal área vs. diâmetro de Feret (D_A^{Df}), e respectivos intervalos de confiança.	111
Figura 5.16 – Representação gráfica da curva de tendência da velocidade de sedimentação em função da dimensão fractal área vs. diâmetro de Feret (D_A^{Df}).	112
Figura 5.17 – Representação gráfica da dimensão fractal mássica (D_{Bm}) em função do diâmetro equivalente, para o reactor I.	112
Figura 5.18 – Representação gráfica da actividade em acetato em função da dimensão fractal mássica (D_{Bm}), para o reactor I.	113
Figura 5.19 – Representação gráfica da velocidade de sedimentação em função da dimensão fractal Área vs. Diâmetro de Feret (D_A^{Df}), para o reactor I.	113
Figura 5.20 – Representação gráfica da dimensão fractal mássica (D_{Bm}) em função do diâmetro equivalente, para o reactor II.	114
Figura 5.21 – Representação gráfica da actividade em acetato em função da dimensão fractal mássica (D_{Bm}), para o reactor II.	115
Figura 5.22 – Representação gráfica da velocidade de sedimentação em função da dimensão fractal área vs. diâmetro de Feret (D_A^{Df}), para o reactor II.	115
Figura 5.23 – Representação gráfica da dimensão fractal mássica (D_{Bm}) em função do diâmetro equivalente, para cada reactor e para o conjunto da ambos.	116
Figura 5.24 – Representação gráfica da actividade em acetato em função da dimensão fractal mássica (D_{Bm}), para cada reactor e para o conjunto da ambos.	116
Figura 5.25 – Representação gráfica da velocidade de sedimentação em função da dimensão fractal área vs. diâmetro de Feret (D_A^{Df}), para cada reactor e para o conjunto da ambos.	117
Figura 6.1 – Representação esquemática resumida da digestão anaeróbia (Alves, 1998).	125
Figura 6.2 – Espectro de excitação e emissão (nm) do co-factor F_{420} a pH 8,2 (Doddema <i>et al.</i> , 1978).	126
.....	126
Figura 6.3 – Exemplos de imagens recolhidas no decurso deste trabalho.	128
Figura 6.4 – Representação das cores da representação RGB com o comprimento de onda (Russ, 1991).	130
Figura 6.5 – Imagem inicial de 24 bits.	130

Figura 6.6 - Imagem resultante da aquisição e soma ponderada das imagens dos canais azul e verde (ponto 1)	131
Figura 6.7 - Imagem resultante da remoção do fundo (ponto 6).....	132
Figura 6.8 - Imagem da máscara final não binária (ponto 13).....	133
Figura 6.9 - Organigrama do programa <i>Fluor_v4</i>	135
Figura 6.10 - Evolução dos sólidos voláteis ao longo do tempo.	137
Figura 6.11 - Evolução da actividade acetoclástica específica ao longo do tempo.	137
Figura 6.12 - Evolução da actividade acetoclástica total ao longo do tempo.	138
Figura 6.13 - Evolução da actividade hidrogenofílica específica ao longo do tempo.	138
Figura 6.14 - Evolução da actividade hidrogenofílica total ao longo do tempo.	139
Figura 6.15 - Evolução da conversão dos ácidos ao longo do tempo.	140
Figura 6.16 - Evolução do número de bactérias fluorescentes / floco ao longo do tempo.	141
Figura 6.17 - Evolução do índice de fluorescência ao longo do tempo.	141
Figura 6.18 - Evolução da fluorescência do fundo ao longo do tempo.	142
Figura 6.19 - Evolução dos diversos parâmetros ao longo do tempo.....	142
Figura 6.20 - Correlação entre a actividade hidrogenofílica total e a concentração de sólidos voláteis.	143
Figura 6.21 - Correlação entre a fluorescência do fundo e a concentração de sólidos voláteis.	143
Figura 6.22 - Representação gráfica dos parâmetros Índice de fluorescência e Fluorescência do fundo.....	144
Figura 8.1 - Curva de calibração do ácido acético.	xiii
Figura 8.2 - Curva de calibração do ácido propiónico.....	xiv
Figura 8.3 - Curva de calibração do ácido butírico.	xv

Lista de Tabelas

Tabela 3.I – Matriz das correlações.....	34
Tabela 3.II – Matriz dos valores próprios.....	34
Tabela 3.III – Matriz dos vectores próprios.....	35
Tabela 3.IV – Tabela das coordenadas nos novos eixos.....	35
Tabela 3.V – Matriz das correlações dos parâmetros estudados.....	49
Tabela 3.VI – Matriz dos valores próprios da matriz de correlações.....	50
Tabela 3.VII – Matriz dos vectores próprios da matriz de correlações.....	50
Tabela 3.VIII – Valores dos eixos 1, 2 e 3 para os diversos protozoários, bem como os intervalos de confiança (95%).....	53
Tabela 4.I – Valores da média das velocidades e respectivo intervalo de confiança (95%) para a cicloheximida.....	80
Tabela 4.II – Valores da média das velocidades e respectivos intervalos de confiança (95%) para o cobre.....	82
Tabela 4.III – Valores da média das velocidades e respectivos intervalos de confiança (95%) para o triton X-100.....	83
Tabela 5.I – Valores médios das dimensões fractais D_A^P , D_A^{Df} , D_{Bm} e respectivos intervalos de confiança (95%) para cada amostra.....	106
Tabela 5.II – Valores médios da actividade em acetato, velocidade de sedimentação e diâmetro equivalente e respectivos intervalos de confiança (95%) para cada amostra.....	107
Tabela 5.III – Correlações das curvas obtidas para as diferentes dimensões fractais em função do diâmetro.....	107
Tabela 5.IV – Correlações das curvas obtidas para a actividade em acetato em função das diferentes dimensões fractais e do diâmetro.....	109
Tabela 5.V – Correlações das curvas obtidas para a velocidade de sedimentação em função das diferentes dimensões fractais e do diâmetro.....	111
Tabela 6.I – Teores de F_{420} em diversas espécies de bactérias metanogénicas (Reynolds, 1986; Dolfing e Mulder, 1985).....	127
Tabela 6.II – Valores da actividade em acetato, hidrogenofílica e dos sólidos suspensos voláteis, ao longo do tempo.....	136
Tabela 6.III – Valores das concentrações dos ácidos acético, propiónico e butírico à entrada e à saída, ao longo do tempo.....	139
Tabela 6.IV – Valores da área total de bactérias fluorescentes/floco, índice de fluorescência e fluorescência do fundo, ao longo do tempo.....	140
Tabela 8.I – Valores dos parâmetros calculados para cada imagem de protozoário.....	ii
Tabela 8.II – Valores dos eixos 1, 2 e 3 calculados para cada imagem de protozoário.....	v
Tabela 8.III – Ligações entre o vídeo e o computador (PC) através da RS-232C.....	ix
Tabela 8.IV – Valores dos coeficientes das equações e correlação para o diâmetro em função da D_A^{Df}	x
Tabela 8.V – Valores dos coeficientes das equações e correlação para o diâmetro em função da D_A^P	x
Tabela 8.VI – Valores dos coeficientes das equações e correlação para o diâmetro em função da D_{Bm}	x
Tabela 8.VII – Valores dos coeficientes das equações e correlação para a actividade em acetato em função da D_A^{Df}	xi
Tabela 8.VIII – Valores dos coeficientes das equações e correlação para a actividade em acetato em função da D_A^P	xi
Tabela 8.IX – Valores dos coeficientes das equações e correlação para a actividade em acetato em função do diâmetro.....	xi

Tabela 8.X – Valores dos coeficientes das equações e correlação para a actividade em acetato em função da D_{Bm} .	xi
Tabela 8.XI – Valores dos coeficientes das equações e correlação para a velocidade de sedimentação em função da D_A^{Df} .	xii
Tabela 8.XII – Valores dos coeficientes das equações e correlação para a velocidade de sedimentação em função da D_A^P .	xii
Tabela 8.XIII – Valores dos coeficientes das equações e correlação para a velocidade de sedimentação em função do diâmetro.	xii
Tabela 8.XIV – Valores dos coeficientes das equações e correlação para a velocidade de sedimentação em função da D_{Bm} .	xii
Tabela 8.XV – Valores das áreas da calibração do ácido acético.	xiii
Tabela 8.XVI – Valores das áreas da calibração do ácido propiónico.	xiv
Tabela 8.XVII – Valores das áreas da calibração do ácido butírico.	xv

1. Introdução Geral

A análise de imagem é, neste momento, um complemento bem estabelecido das técnicas de microscopia óptica uma vez que permite uma classificação e quantificação rotineira, não subjectiva e automática de microrganismos. Com o aumento exponencial das capacidades dos computadores, bem como a diminuição do seu preço, a análise de imagem tornou-se uma rotina em várias aplicações de tecnologia celular. As aplicações mais comuns vão desde a enumeração de bactérias em alimentos sólidos, microscopia *in situ* para monitorização em linha de fermentações, análise de texturas de colónias, sequenciação do ADN, análise de resíduos de pólvora, determinação da biomassa, etc (Vecht-Lifchitz *et al.*, 1992). Aplicações mais recentes da análise de imagem centram-se no estudo do crescimento pulsátil de ápices de hifas, diferenciação bioquímica de colónias fúngicas e diferenciação de micélio de culturas submersas fúngicas, distribuição do tamanho de gotas de uma emulsão, adesão microbiana e mobilidade (Vecht-Lifchitz *et al.*, 1992) entre muitas outras.

O termo análise de imagem, comumente utilizado engloba, em sentido lato, não só a análise de imagem propriamente dita, como também os processos prévios de captura e tratamento da imagem (Dougherty, 1994, Jähne, 1995 e Russ, 1991 e 1995).

Os métodos de aquisição mais utilizados são por câmara de vídeo acoplada a microscópio, densitómetros de varrimento laser, microscópios electrónicos ou mesmo por digitalização de fotografias. À excepção deste último, as imagens são adquiridas através de uma placa de aquisição de imagens instalada no computador.

A câmara de vídeo analógica monocromática CCD possui sensores que consistem num elevado número de elementos fotossensíveis. Estes, durante a fase de acumulação recebem cargas eléctricas provenientes dos fotões absorvidos, logo, proporcionais à iluminação. Estas cargas são então transportadas sequencialmente ao longo do *chip* de sensor a sensor e, finalmente, em diferenças de voltagem à saída (Jähne, 1995).

A representação de um fotosensor encontra-se na figura seguinte:

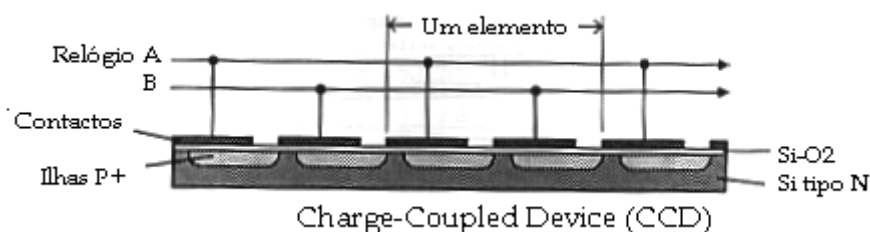


Figura 1.1 - Fotosensor de uma câmara CCD (Russ, 1991).

Através da placa de aquisição de imagens, a informação analógica (diferenças de voltagem) é transformada em informação digital em que cada pixel corresponde a um espaço da

imagem (com um mínimo limitado pelos sensores de captura da câmara) e possui um valor que corresponde à média desse espaço.

Consoante o número de *bits* atribuído a cada pixel na representação digital assim diferirá o número de cores que uma imagem pode conter. Para imagens em escala de cinzentos (ainda as mais vulgarmente utilizadas) é normal cada pixel ser representado por 8 *bits* (1 *byte*) a que correspondem 256 cores possíveis. Os formatos de ficheiros de gravação mais comuns são o *tiff* (*Tagged Image File Format*), o *bmp* (*Windows Bitmap*) e o *gif* (*CompuServe Bitmap*). Para imagens a cores é usual utilizar-se o formato de composição de cores *RGB* (*Red, Green e Blue*), ou o *CMYK* (*Cyan, Magenta, Yellow e black*) para acomodar a informação das diversas cores. Assim, cada pixel necessita de 24 *bits* para conter a informação necessária a uma imagem a cores, sendo, no caso do formato *RGB*, 8 bits alocados ao canal de vermelhos (*Red*), 8 bits ao canal de verdes (*Green*) e os outros 8 ao canal de azuis (*Blue*). Como uma imagem normal (512x512 pixels) em formato de 24 *bits* (*True Color*) ocupa um razoável espaço em disco (cerca de 768 *Kbytes*) é conveniente guardá-la em formato comprimido como por exemplo *jpeg* (*Joint Photographers Expert Group*). É também por esta razão que as imagens vídeo normalmente se encontram comprimidas em computador em formato *mpeg* (*Moving Pictures Expert Group*) ou *mpeg2*.

Depois de adquiridas, as imagens são processadas de modo a obter-se por norma uma imagem binária contendo apenas a informação que interessa ao investigador. O primeiro passo do processamento de imagens é normalmente de eliminar o ruído aleatório adquirido durante a aquisição da imagem. Neste passo pode-se utilizar um filtro em que cada pixel é substituído pelo valor de uma operação englobando os vizinhos do mesmo. Os filtros mais comuns para este fim são os filtros de média, de mediana, adaptativo, o filtro *wiener* e os filtros de baixas frequências, entre outros (Dougherty, 1994). No caso da existência de um ruído periódico, i.e. que se propaga de um modo não aleatório em toda a imagem, este pode ser identificado com recurso às transformadas de Fourier (Jähne, 1995) e retirado de seguida.

Seguidamente deve-se aumentar o contraste da imagem visualizada, através de uma normalização, equalização por histograma ou alterando a intensidade de visualização através da aplicação de uma função logarítmica ou exponencial ao valor de cada pixel. Pode-se ainda evidenciar os contornos dos objectos por aplicação de um filtro como o "*Mexican hat*", o filtro de Laplace, de Sobel, de Roberts, outros filtros de altas frequências ou operadores derivativos de 1ª ordem (Russ, 1995).

Para a binarização da imagem é necessário estabelecer um limite de detecção de cor que distinga os objectos do fundo. Este limite pode ser definido manualmente ou obtido automaticamente pelo cálculo da média ou da mediana da imagem, bem como através de outros parâmetros como o método da determinação do limite de detecção de cor óptimo de Otsu (1979).

As imagens podem então ser binarizadas, o que possibilita a obtenção dos objectos com valor 1 e do fundo com valor 0 (os objectos surgem em cor branca sobre um fundo preto).

É necessário por vezes melhorar a imagem binária de modo a resolver alguns problemas, tais como: remoção de objectos que se encontrem parcialmente cortados pela fronteira da imagem, de modo a não falsear os resultados obtidos; remoção de sujidades, o que pode ser conseguido através de um filtro de tamanho ou forma que apenas selecciona os objectos que interessam ao investigador; separação de objectos contíguos através de operações booleanas (e, ou, etc), erosões, dilatações, esqueletonização ou *watershed*, entre outras.

A partir das imagens binárias obtidas é que o termo análise de imagem, em termos restrito, realmente se aplica. Assim, as imagens são analisadas e calculados os parâmetros de interesse como por exemplo o número de objectos, tamanho, distribuição de áreas, momentos, dimensões fractais, parâmetros morfológicos (esfericidade, compacidade, excentricidade, etc), entre muitos outros.

A imagem binária pode ainda servir como uma máscara das regiões de interesse na imagem original, e proceder também à determinação de momentos mássicos e tons de cinzento, entre outros.

Neste trabalho em particular, foram efectuados os estudos seguintes:

- Identificação e diferenciação de diversas espécies de protozoários ciliados presentes em estações de tratamento de águas residuais através do uso da técnica de Análise de Componentes Principais. Os dados morfológicos Diâmetro de Feret, Área, Perímetro, Diâmetro Equivalente, Excentricidade, Forma de Feret, Comprimento, Valor Máximo de Cinzentos, Valor Médio de Cinzentos, Valor Mínimo de Cinzentos, Forma Área-Perímetro, Desvio Padrão de Cinzentos e Largura foram determinados através da análise de imagem;

- Quantificação da redução da mobilidade do protozoário *Tetrahymena pyriformis* quando em contacto com diversas concentrações dos tóxicos cicloheximida, cobre e triton X-100. A velocidade e sentido de deslocamento da *T. pyriformis* foram determinados através da análise de imagem

- Relacionamento da morfologia de agregados microbianos, provenientes de digestores anaeróbios, através do cálculo das dimensões fractais, com a actividade metanogénica acetoclástica e velocidade de sedimentação. As dimensões fractais mássica, área *vs.* diâmetro de Feret e área *vs.* perímetro foram determinadas através da análise de imagem;

- Determinação quantitativa da fluorescência de consórcios metanogénicos e correlação com as actividades metanogénica acetoclástica e hidrogenofílica e com a concentração de sólidos

voláteis. Os parâmetros índice de fluorescência, fluorescência do fundo e número de bactérias fluorescentes por floco foram determinados através da análise de imagem.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reconhecimento Semi-Automático de Protozoários por Análise de Imagem.

As amostras foram recolhidas dos tanques de arejamento da estação de tratamento de águas residuais de Maxéville, Nancy. Foram mantidas em laboratório pelo período máximo de 24 horas com arejamento fornecido por uma bomba de aquário e temperatura a rondar os 20 °C.

Para a observação ao microscópio foi colocada uma gota numa lâmina e coberta com uma lamela (18x18 mm) e observadas num microscópio de contraste de fase *Dialux 20* (*Leitz, Stuttgart*). A ampliação utilizada foi de 400x, para todos os protozoários e a fonte de luz foi mantida no valor mínimo.

A aquisição foi efectuada com o auxílio de uma câmara de escala de cinzentos *CCTV* (*Hitachi, Tokyo*) com escala de 256 valores, com uma placa de aquisição de imagens *Meteor* (*Matrox, Montreal*) e utilizando o *software Visilog 5.1* (*Noesis SA, les Ulis*). O valor do contraste de aquisição foi de 200% e da luminosidade de 150%, definidos no *software* de aquisição *Visilog 5.1*.

O número de imagens adquiridas foi de 295 que foram posteriormente tratadas pelo programa *ProtoRec.sc5* a correr num computador pessoal (*PC*) com *CPU Intel-Pentium II* de 266 MHz e 96 Mbytes de memória RAM.

Uma representação da instalação é apresentada de seguida:

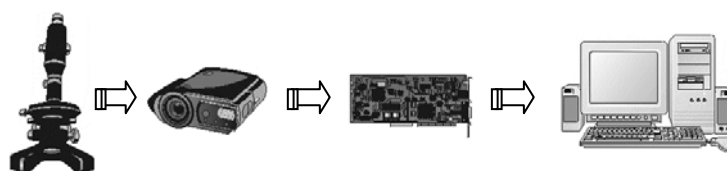


Figura 2.1 – Representação da instalação experimental do Reconhecimento Semi-Automático de Protozoários por Análise de Imagem.

2.2 Estudo da Mobilidade da *Tetrahymena pyriformis* em Contacto com Tóxicos.

Estudou-se o efeito que três tóxicos (cicloheximida, cobre e triton X-100), a diversas concentrações, possuíam sobre as tetrahymenas. Como cada tóxico possui uma acção diferente sobre o protozoário em causa, as concentrações de cada um deles utilizadas foram diferentes. Foram assim recolhidas imagens dos protozoários após um certo tempo de contacto com os tóxicos que foram gravadas em vídeo para posterior análise das mesmas e obtenção dos valores da mobilidade em cada caso. Foi necessário também proceder à recolha de imagens de tetrahymenas sem tóxico para controlo.

O meio utilizado foi o meio líquido PPY (*Proteose Peptone Yeast Extract Medium*) do catálogo *Catalogue of Strains of CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa)* (Tomkins *et al.*, 1995). Este meio tem a seguinte composição: peptona proteose 20,0 g/l, extracto de levedura 2,5 g/l, pH entre 6,6 e 6,8.

Usaram-se culturas axénicas de *Tetrahymena pyriformis*, estirpe GL previamente incubadas durante 18 a 24 horas.

As tetrahymenas foram observadas numa lupa binocular SZ 4045TR-CTV (*Olympus, Tokyo*) com a ampliação máxima (40x). Foram, deste modo, adquiridas por uma câmara de vídeo CCD AVC D5CE (*Sony, Tokyo*), e transmitidas para o vídeo S-VHS Panasonic AG-5700-E (*Matsushita, Tokyo*) e registadas em fita magnética. Posteriormente estas foram digitalizadas por uma placa de aquisição de imagens DT 3155 (*Data Translation, Marlboro*) com o auxílio do *software* comercial *Global Lab Image (Data Translation, Marlboro)* e guardadas em computador em formato *tiff* com um tamanho de 512x512 pixels e 256 tons (8 bits) de cinzento. Para o comando do avanço do número de *frames* (imagens em fita magnética) do vídeo foi utilizado um programa desenvolvido em *QuickBasic* versão 4.5 (*Microsoft Corporation, Seattle*), descrito no trabalho de Amaral (1996): *Videol4.bas*. Em ambas as operações, aquisição para vídeo e digitalização para computador, foi necessária a utilização de um monitor de vídeo PVM 1440QM (*Sony, Tokyo*).

Os dados foram obtidos através do programa *Proto_v8* a correr num Computador pessoal (PC) com CPU *Intel-Pentium MMX* de 166 MHz e 32 Mbytes de memória RAM.

Uma representação da instalação é apresentada de seguida:

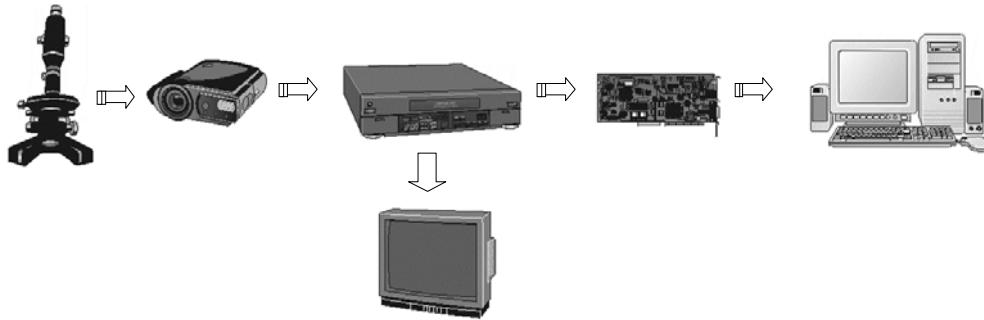


Figura 2.2 - Representação da instalação experimental do estudo da Mobilidade da *Tetrahymena pyriformis* em Contacto com Tóxicos.

2.3 Correlação entre Actividades e Dimensões Fractais de Agregados Microbianos Presentes em Digestores Anaeróbios

Foram utilizados dois filtros anaeróbios de leito fixo, construídos em vidro acrílico e com enchimento de anéis de *Raschig* em PVC de 21 mm de diâmetro, com área específica de leito de 230 m²/m³ e porosidade de 92,5%. O digestor I é de configuração tradicional de modo ascendente e o digestor II foi segmentado em 3 andares. Neste último colocou-se um separador gás-líquido-sólido em cada andar. O volume inicial de líquido foi de 14,2 e 17,7 l para os digestores I e II, respectivamente.

O substrato utilizado foi um efluente lácteo sintético, obtido por diluição de leite magro comercial com água. Foram adicionados 5 g/l de NaHCO₃ para manter a alcalinidade em valores elevados (2500-5000 mg/l CaCO₃). A partir do dia 343 passaram-se a adicionar soluções de macro (0,6 ml/g CQO) e de micronutrientes (1 ml/l). As soluções de macronutrientes e micronutrientes encontram-se explicitadas de seguida.

- Solução de macronutrientes: 174 g/l de NH₄Cl, 28,3 g/l de KH₂PO₄, 28,3 g/l de (NH₄)₂SO₄, 25,0 g/l de MgCl₂.6H₂O e 45,0 g/l de KCl.

- Solução de micronutrientes: FeCl₂.6H₂O (2 g/l); H₃BO₃ (0,05 g/l); ZnCl₂ (0,05 g/l); CuCl₂.2H₂O (0,038 g/l); MnCl₂.4H₂O (0,5 g/l); (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O (0,05 g/l); AlCl₃.6H₂O (0,09 g/l); CoCl₂.6H₂O (2 g/l); NiCl₂.6H₂O (0,092 g/l); Na₂SeO₃.5H₂O (0,164 g/l); EDTA (1 g/l); Resazurina (0,2 g/l); HCl 37% (1 ml/l).

O inóculo foi obtido de um digestor anaeróbio de tratamento de lamas integrado na estação de tratamento de lamas residuais de Cambados, Maia. Foram adicionados a ambos os digestores 3,6 l de lamas com um teor de sólidos suspensos totais de 40 g/l, cuja fracção volátil era de 51,5%.

As actividades metanogénicas em acetato e H₂/CO₂ foram determinadas de acordo com os métodos descritos por Alves (1998) e envolveram os seguintes passos:

- Tampão anaeróbio (meio basal): Adicionou-se 1 ml/l de uma solução de rezaurina (1 g/l) e 0,5 g/l de cisteína-HCl a água destilada. Após ajuste do pH a um valor de 7-7,2 (adição de NaOH ou HCl 8N), leva-se à ebulição em aquecimento lento, até o indicador de rezaurina mudar

de cor rosa para incolor, indicativo de condições anaeróbias. O tampão é, seguidamente, arrefecido em gelo na presença de azoto até uma temperatura de 40 a 50 °C. Adiciona-se então 3,05 g/l de bicarbonato de sódio e substitui-se o azoto por N₂/CO₂.

- Substrato líquido: O substrato líquido utilizado foi o acetato. É assim possível determinar a actividade metanogénica específica das bactérias metanogénicas acetoclásticas. A solução *stock* do substrato líquido foi preparada numa concentração 100 vezes superior à de trabalho. A solução de acetato foi assim preparada com uma concentração de 3 M, neutralizada a pH 7 e armazenada a 4 °C.

A determinação da actividade metanogénica foi efectuada pelo seguinte procedimento:

Cada teste com substratos líquidos envolve ensaios em duplicado e ainda um ensaio em branco. O volume de trabalho é de 12,5 ml e o volume total de 25 ml. A cada frasco previamente lavado com N₂/CO₂ (80/20) adicionam-se, em condições anaeróbias, volume de biomassa e de tampão anaeróbio de tal modo que, num volume de 12,5 ml a concentração de sólidos voláteis esteja compreendida entre 2 e 5 g/l. Os frascos são fechados com rolhas de borracha butírica nº 2048-11800 (*Belco glass, Inc, Vineland, N.M.*) e seladas com cápsula em alumínio nº13214 (*Pierce, Reino Unido*).

Os frascos são aclimatizados a 37 °C com agitação a 150 rpm num agitador orbital *Certomat R (Braun, Frankfurt)* durante uma noite. Seguidamente adicionam-se 125 µl de substrato, excepto aos frascos relativos aos ensaios em branco. Após remoção do excesso de pressão, devido à degradação do substrato residual, os frascos são incubados a 37 °C e a 150 rpm.

Após 1 hora de incubação nessas condições, inicia-se a medição da pressão desenvolvida nos frascos (em mV). As leituras são repetidas com intervalos de tempo de 1 a 2 horas, dependendo da velocidade de produção, dando-se especial atenção à fase inicial, que é a considerada para o cálculo da actividade metanogénica específica. O teste considera-se terminado quando a pressão deixar de variar, indicando que todo o substrato foi consumido.

Determina-se então o volume de espaço vazio de cada frasco por injeção de uma quantidade conhecida de ar e por registo do correspondente aumento de pressão (em mV) por ml de ar injectado (mV/ml). Este procedimento é realizado em triplicado para cada frasco. Por fim determinam-se os sólidos voláteis (SV) presentes em cada frasco com a totalidade do conteúdo dos mesmos.

Os valores de mV medidos são representados graficamente em função do tempo e calculam-se os respectivos declives na zona linear inicial, em mV/hora. Dividindo estes declives pelos valores de mV/ml, correspondentes ao aumento de pressão do ar injectado, exprimem-se os valores obtidos em ml de biogás produzido por hora (ml/h). A percentagem de metano presente no biogás produzido é determinada pela equação:

$$MP = \frac{V_h + V_c}{V_c} \times \%CH_4 \quad (5.1)$$

em que:

V_h - Volume de gás inicialmente presente no frasco.

V_c - Volume de biogás produzido durante o teste.

$\% CH_4$ - Percentagem de metano no biogás contido em cada frasco.

Sendo V_c e V_h calculados pelas seguintes expressões:

$$V_c = \frac{\text{leitura final, mV}}{\text{mV/ml}} \quad (5.2)$$

$$V_h = \frac{\text{leitura em mV correspondente a 1 atm}}{\text{mV/ml}} \quad (5.3)$$

Multiplicando os ml de gás produzido numa hora por 24, pela percentagem de metano (MP) e pelo factor de calibração do transdutor (FC) e dividindo o resultado pelos sólidos voláteis, obtém-se o valor final da actividade metanogénica específica:

$$\text{Act. met. específica} = \frac{\text{ml/h} \times 24 \times \text{MP} \times \text{FC}}{\text{SV}} \quad (5.4)$$

Expressa-se em ml CH_4 @PTN/gSV.dia. FC representa um factor de calibração de cada transdutor utilizado, e contempla a conversão dos valores para as condições PTN. Aos valores da actividade assim obtidos subtrai-se a actividade específica, calculada da mesma forma para os brancos.

Na determinação da actividade hidrogenofílica o procedimento é idêntico ao da actividade acetoclástica com a excepção de em vez de se adicionar acetato, pressurizarem-se os frascos com H_2/CO_2 , a 1 bar.

As amostras, para a determinação dos parâmetros morfológicos, por análise de imagem, foram retiradas e guardadas a 4 °C até serem adquiridas.

A aquisição das imagens procedeu-se por deposição dos flocos e grânulos, anteriormente recolhidos, numa placa de Petri, e visualização através da lupa binocular SZ 4045TR-CTV 40x máx.

(*Olympus, Tokyo*) acoplada com uma câmara CCD AVC D5CE (*Sony, Tokyo*) e placa de aquisição de imagem DT 3155 (*Data Translation, Marlboro*).

As imagens foram digitalizadas com um tamanho de 512x512 pixels e em escala de cinzento de 256 cores através do *software Global Lab Image 3.21 (Data Translation, Marlboro)*. Foram posteriormente tratadas pelo programa *Imago_v5 (Amaral, 1996)*, para *Matlab 5.1*, para a determinação dos parâmetros morfológicos. Este programa foi executado num computador pessoal (PC) com *CPU Intel-Pentium MMX* de 166 MHz e 32 Mbytes de memória RAM.

A velocidade de sedimentação foi calculada por medição do tempo que uma partícula demorava a percorrer uma certa distância vertical em meio aquoso. Este procedimento foi efectuado para 50 partículas por amostra.

Uma representação da instalação é apresentada de seguida:

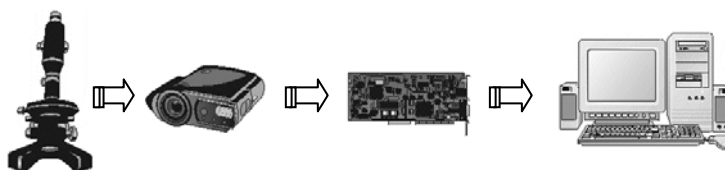


Figura 2.3 - Representação da instalação experimental da Correlação entre Actividades e Dimensões Fractais de Agregados Microbianos Presentes em Digestores Anaeróbios.

2.4 Determinação Quantitativa da Fluorescência num Digestor Anaeróbio Perturbado

O reactor utilizado foi um digestor anaeróbio de 5,9 litros de capacidade que funcionou com uma agitação de 100 rpm e resguardado da luz. O inóculo era proveniente de um digestor anaeróbio da estação de tratamento de águas residuais (ETAR) de Braga. O volume inicial de inóculo foi de 4 litros, contendo um teor de SV de 3 g/l.

A solução de alimentação possuía uma carência química de oxigénio (CQO) de 6 g/l, constituída por uma mistura de acetato, propionato e butirato com uma razão em CQO de 24:34:41.

O caudal desta solução alimentado ao reactor foi de 0,236 l/dia (0,164 ml/min) equivalendo a um tempo de retenção de 25 dias. A composição das soluções de macro e micronutrientes é a mesma da referenciada no item 2.3.

As amostras, para a análise dos sólidos voláteis (SV) e composição em AGV, foram retiradas de 3 em 3 dias, aproximadamente, enquanto que para a análise da actividade metanogénica e da fluorescência foram retiradas de 7 em 7 dias.

Para a determinação da fluorescência foi colocado um volume de 5 µl de amostra numa lâmina e coberto com lamela. Foram então observadas, num microscópio de epi-fluorescência *Axioscop* (Zeiss, Oberkochen), a uma ampliação de 400 vezes, e comprimento de onda de excitação de 420 nm. Seguidamente foram fotografadas em rolo 800 ASA Kodak e com um tempo de exposição constante de 15 segundos.

A revelação foi efectuada do mesmo modo para todos os negativos, procedendo-se de seguida a uma digitalização através de um digitalizador de mesa *HP Deskscan IIc* (Hewlett-Packard, Palo Alto), com os mesmos parâmetros para todas as imagens (600x600 dpi, contraste 120 e luminosidade 120), para um formato *jpeg* de 24 bits.

Os dados foram obtidos através do programa *Fluor_v4* a correr num computador pessoal com CPU *Intel-Pentium II* de 233 MHz e 64 Mbytes de memória RAM.

A determinação das actividades metanogénica e hidrogenofílica foi efectuada como referido no item 2.3.

Para a determinação da composição em ácidos gordos voláteis (AGV) foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC). As amostras foram primeiramente centrifugadas durante 10 min a 15000 rpm para decantação de resíduos sólidos. A coluna utilizada foi a coluna de ácidos gordos voláteis *Chrompack*, 300 x 6,5 mm, (*Chrompack, New Jersey*), detector 870-UV (*Jasco, Tokyo*), bomba 880-PU (*Jasco, Tokyo*), forno *Column Thermostat* (*Chrompack, New Jersey*) e o eluente utilizado foi H₂SO₄ a 0,01 N a um caudal de 0,7 ml/min e com uma temperatura de operação de 40 °C.

A determinação dos sólidos voláteis (SV) foi feita por diferença entre o peso da amostra seca a 103-105 °C, até atingir peso constante, e calcinada a 550 °C. As determinações de sólidos voláteis foram sempre feitas em triplicado.

Uma representação da instalação é apresentada de seguida:

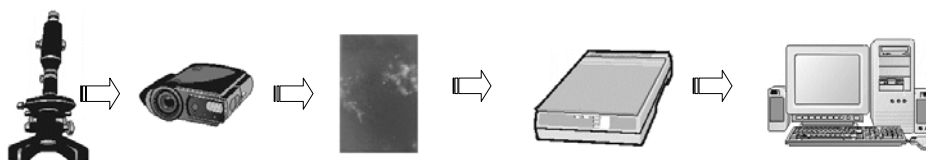


Figura 2.4 - Representação da instalação experimental da Determinação Quantitativa da Fluorescência num Digestor Anaeróbio Perturbado.

3. Reconhecimento Semi- Automático de Protozoários por Análise de Imagem

3.1 Sumário

O estudo proposto incidiu sobre o reconhecimento e identificação automática de protozoários por análise de imagem. Foi necessário, deste modo, elaborar um programa para tratamento automático (ou semi-automático) de imagens digitalizadas de protozoários presentes em estações de tratamento de águas residuais (ETAR's). A partir dos parâmetros calculados por esse programa explorou-se a técnica de Análise de Componentes Principais (ACP) para uma melhor identificação de cada espécie.

O programa elaborado trabalhou correctamente 248 imagens em 295 testadas, o que implica uma taxa de 84% de imagens correctamente tratadas.

As principais conclusões que podem ser retiradas são as seguintes:

Os protozoários *Tetrahymena*, *Trachelophyllum*, *Colpidium*, *Prorodon*, *Glaucoma* e *Opercularia* encontram-se completamente isolados.

Os protozoários *V. microstoma* com pedúnculo, *V. convallaria* com pedúnculo, *Zoothamnium* com pedúnculo, *V. convallaria*, *Zoothamnium*, *V. microstoma*, *Epistylis* e *Prorodon* encontram-se razoavelmente bem separados.

Os diferentes grupos de protozoários encontrados (ciliados nadadores, ciliados sésseis, ciliados móveis de fundo e ciliados carnívoros) podem ser, a partir dos resultados obtidos, reconhecidos e separados.

Os protozoários indicadores de uma baixa eficiência de uma ETAR, como *V. microstoma* e *Opercularia* encontram-se razoavelmente bem isolados, o que permite determinar possíveis anomalias no funcionamento de uma ETAR.

3.2 Introdução

Este estudo incidiu sobre o reconhecimento e identificação automática de protozoários por análise de imagem. Foi proposto elaborar um programa para tratamento automático (ou semi-automático) de imagens digitalizadas de protozoários presentes em estações de tratamento de águas residuais (ETAR's) e identificação de cada espécie.

De referir que não existem na literatura muitas referências ao reconhecimento e identificação automática de protozoários por análise de imagem. Existem algumas tentativas, contudo, de isolar e identificar microrganismos diferentes, tais como o trabalho de Vieira *et al.* (1992) de contagem de bactérias e leveduras presentes no mosto do vinho. Os trabalhos de Pons *et al.* (Pons *et al.*, 1992 e 1993, Pichon *et al.*, 1992 e Baptiste, 1998) procedem a um tratamento automático por análise de imagem para a caracterização de diferentes microrganismos, sendo que o trabalho agora desenvolvido surge no decurso dessa linha.

Os protozoários são referenciados, desde há vários anos atrás, como sendo excelentes indicadores do estado de funcionamento de uma ETAR (Curds *et al.*, 1970, Fernandez-Leborans *et al.*, 1996, Madoni, 1994 e Salvadó *et al.*, 1995). Sendo essenciais em processos de purificação aeróbia os protozoários, e principalmente os ciliados, colonizam espontaneamente os tanques de arejamento. Cerca de 230 espécies de protozoários foram identificados em estações de tratamento de águas residuais (33 flagelados, 25 rizópodes, 6 actinópodes e 160 ciliados) (Madoni, 1994). Felizmente, apenas um número pequeno ocorre frequentemente e a maioria destes aparecem em todo o mundo (Macek, 1989, Madoni *et al.*, 1993, Salvadó *et al.*, 1970 e Yun-Fen *et al.*, 1986). Olhando para o tanque de arejamento como um ecossistema artificial, diferentes grupos funcionais podem ser identificados em função das relações tróficas entre os mesmos, e em relação a bactérias. Deste modo, podem-se discernir os flagelados, ciliados nadadores e ciliados sésseis que se alimentam de bactérias livres; ciliados nadadores de fundo, que se alimentam de bactérias floculantes e ciliados carnívoros que se alimentam de outros protozoários.

Os protozoários, presentes nos tanques de arejamento, numa estação de tratamento de águas residuais (ETAR) diferem muito consoante as condições e o estado de funcionamento da ETAR. Assim, numa fase inicial de arranque predominam as espécies típicas dos efluentes: flagelados e ciliados nadadores. Numa segunda fase, com a formação de lamas activadas, as formas nadadoras são rapidamente substituídas por formas sésseis e móveis de fundo. A terceira e

última fase caracteriza-se por uma microfauna que reflecte as condições estáveis atingidas, isto é, uma densidade elevada da microfauna ($> 10^6$ células por litro), especialmente de sésseis e móveis de fundo. Deve também evidenciar uma comunidade diversificada sem predomínio notório de qualquer espécie. Uma estação a funcionar bem não deve ter em elevada quantidade as espécies presentes na primeira fase. Isto pode, no entanto, acontecer nos casos pontuais de falta de oxigenação, carga excessiva, carga muito variável no tempo e ainda de variações significativas no tempo de retenção entre outras (Curds *et al.*, 1970).

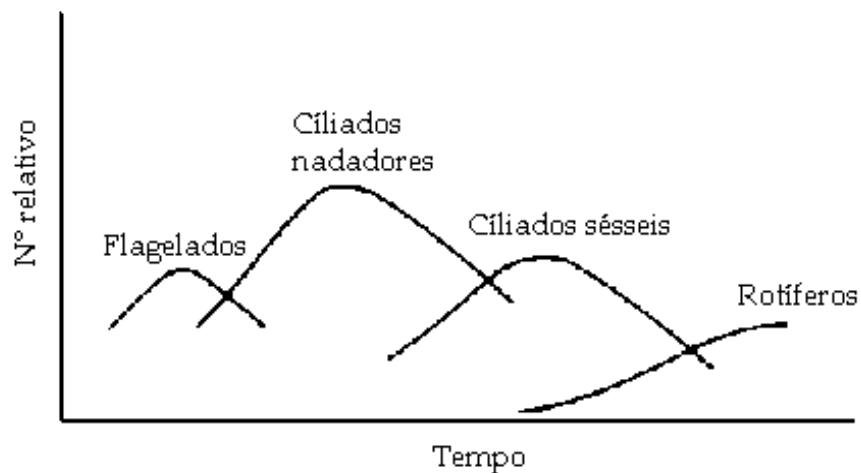


Figura 3.1 – Sucessão dos protozoários dominantes numa ETAR ao longo do tempo (Curds *et al.*, 1970).

O predomínio de algumas espécies pode fornecer valiosas informações sobre o estado de funcionamento de uma ETAR:

- Pequenos flagelados: Revela uma má eficiência que pode ser causada por lamas pouco oxigenadas ou entrada de substâncias em vias de fermentação.
- Pequenas amebas nuas e flageladas: Revela uma má eficiência que pode ser causada por uma carga elevada ou de baixa degradabilidade.
- Pequenos ciliados nadadores ($< 50 \mu\text{m}$): Revela uma eficiência medíocre que pode ser causada por um tempo de contacto demasiado curto ou lamas pouco oxigenadas.
- Grandes ciliados nadadores ($> 50 \mu\text{m}$): Revela uma eficiência medíocre que pode ser causada por uma carga demasiado elevada.
- Ciliados sésseis: Revela uma baixa eficiência que pode ser causada por fenómenos transitórios.
- Ciliados móveis de fundo: Revela uma boa eficiência.
- Ciliados sésseis em conjunção com móveis de fundo: Revela uma boa eficiência.
- Amebas com teca: Boa eficiência indicando estar-se perante uma carga baixa e/ou diluída e uma boa nitrificação.

Exemplos de cada espécie de protozoários, provenientes de imagens obtidas e estudadas, encontram-se apresentadas de seguida, abrangendo os principais tipos de protozoários presentes numa ETAR (ciliados nadadores; ciliados móveis de fundo, ciliados sésseis e ciliados carnívoros):

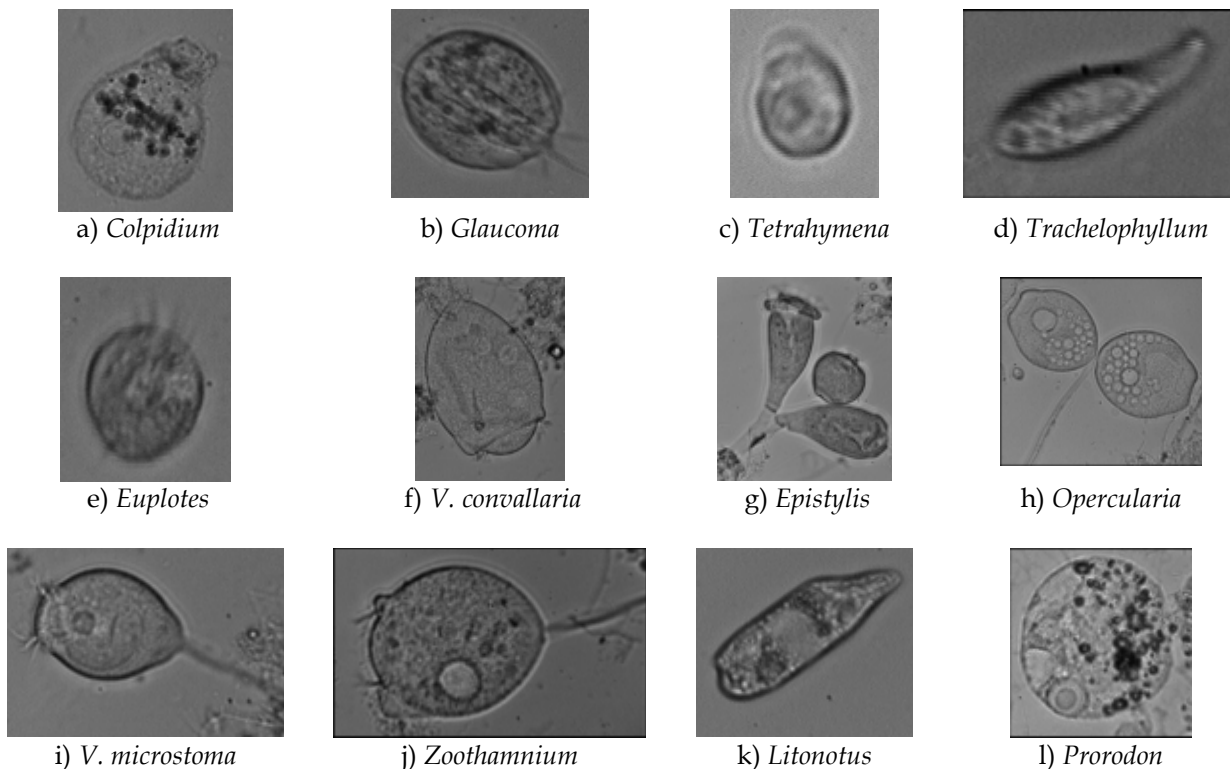


Figura 3.2 – a) - d) ciliados nadadores. e) ciliado móvel de fundo. g) - j) ciliados sésseis. k) e l) ciliados carnívoros.

As principais estruturas externas de locomoção ou ligação dos protozoários estudados são os flagelos, os cílios e o pedúnculo. Os flagelos são compostos por dois microtúbulos centrais e nove periféricos duplos, a que se dá o nome de axonema. Este último é recoberto por uma camada contínua com a superfície do protozoário. Os microtúbulos estão associados a proteínas. Algumas servem para ligar os microtúbulos entre si, enquanto outras geram a força de deslocamento que controla o movimento dos flagelos. Os cílios podem ser considerados como flagelos de menor comprimento, sendo a sua estrutura interna idêntica à dos flagelos (Alberts *et al.*, 1994).

Os pedúnculos são uma estrutura alongada, formada especificamente para ligar um organismo a um substrato vivo ou não. Nos ciliados os pedúnculos surgem como uma extensão viva do corpo do organismo ou como uma secreção de materiais específicos não vivos, ou ainda como uma combinação destes dois (Wetherbee *et al.*, 1994).

Não existem muitos estudos publicados da utilização de análise de imagem no reconhecimento e identificação automática de microrganismos. No entanto, as aplicações mais comuns vão desde a enumeração de bactérias em alimentos sólidos, análise de texturas de

colónias, diferenciação bioquímica de colónias fúngicas e diferenciação de micélio de culturas submersas fúngicas entre outras (Vecht-Lifshitz *et al.*, 1992).

Os protozoários foram obtidos a partir da estação de tratamento de águas residuais de Maxéville, Nancy (França). Para o efeito foram retiradas amostras dos tanques de arejamento e mantidas em laboratório pelo período máximo de 24 horas com arejamento. Os protozoários estudados, num total de 12 espécies, pertenciam a 4 grandes grupos: ciliados nadadores (*Tetrahymena*, *Colpidium*, *Glaucoma* e *Trachelophyllum*), ciliados móveis de fundo (*Euplotes*), ciliados sésseis (*Opercularia*, *V. microstoma*, *V. convallaria*, *Epistylis* e *Zoothamnium*) e ciliados carnívoros (*Litonotus* e *Prorodon*). Os protozoários foram observados ao microscópio em condições bem específicas e constantes, sendo digitalizados através de uma câmara de vídeo CCD, de uma placa de aquisição de imagens e de *software* próprio.

Os protozoários sésseis *Opercularia* e *Epistylis* foram identificados sem pedúnculo, devido à ausência de mionema, enquanto que os restantes (*V. microstoma*, *V. convallaria* e *Zoothamnium*) foram divididos em dois grupos cada, consoante o programa foi capaz de identificar o mionema ou não.

O programa utilizado (*ProtoRec*), foi programado em *Visilog* 5.1 (*Noesis*). Foi assim, desenvolvido um programa, para reconhecimento semi-automático de protozoários, utilizando as funções de mais alto nível de programação do *Visilog*, através da possibilidade de gravação de acções (*ProtoRec.sc5*). Posteriormente foi convertido (*ProtoRec.rsc*) para a linguagem de programação em *Visilog* de mais baixo nível (*COOL*), próxima da linguagem C, utilizando funções da biblioteca própria do *Visilog*. De um modo muito geral (uma descrição mais completa encontra-se numa secção própria - Programa), o programa tem a seguinte sequência:

- Numa primeira fase procede ao melhoramento da imagem e, numa segunda fase o programa reconhece os objectos (protozoários e alguns flocos). Em função da imagem binária obtida o programa pode seguir dois cursos distintos.

- Caso os protozoários se encontrem isolados dos flocos procede-se a uma eliminação dos flocos e depois à fase de análise de imagem propriamente dita, na qual se efectua o cálculo dos parâmetros e eliminação última de flocos.

- No caso de os protozoários se encontrarem em contacto com os flocos o programa contém os seguintes passos: o primeiro procedimento a ser efectuado é a separação dos protozoários ligados a flocos; seguidamente é determinada uma imagem contendo os marcadores dos objectos maiores ou mais regulares e, seguidamente, procede-se à eliminação dos flocos de menores dimensões. É necessário, finalmente, reconhecer e ligar os cílios, flagelos e mionema, isolados pelos tratamentos anteriores, aos protozoários. Como esta última operação pode reintroduzir pequenas sujidades presentes nas lamias é necessário proceder à sua eliminação.

Finalmente, o programa efectua a fase de análise de imagem propriamente dita, na qual se efectua o cálculo dos parâmetros e eliminação última de flocos.

- Por último, os resultados são guardados em ficheiros texto (.txt) e as imagens finais dos objectos identificados numericamente, obtida aquando da determinação dos parâmetros, é guardada em formato binário do *Visilog* (.im5).

Os dados obtidos, através do programa, são posteriormente estudados e organizados de um modo que permita a identificação de cada espécie. No corrente trabalho foi utilizada a técnica de Análise de Componentes Principais (ACP) (Chandwani *et al.*, 1997). Esta é uma técnica que permite representar um determinado número de parâmetros, referentes aos indivíduos estudados, num espaço a duas dimensões, o que torna os resultados mais facilmente compreensíveis. Para este efeito foi utilizado o *software* comercial *XIStat* (Thierry FHAMY, Paris). Os parâmetros escolhidos para serem utilizados na técnica ACP foram os seguintes: Área, Excentricidade, Forma de Feret, Forma Área-Perímetro e Comprimento, uma vez que foram os que propiciaram uma maior diferença de valores entre os diferentes tipos de protozoários estudados.

As operações realizadas por este programa são as seguintes:

- Cálculo da matriz de correlações. Esta matriz representa cada um dos parâmetros em função da correlação de cada um com os outros. Os parâmetros melhor correlacionados terão um valor em módulo mais próximo da unidade.

Tabela 3.I - Matriz das correlações.

	Par. A	Par. B	Par. C	Par. D	Par. E
Parâmetro A	1	$X_{AB}=X_{BA}$	$X_{AC}=X_{CA}$	$X_{AD}=X_{DA}$	$X_{AE}=X_{EA}$
Parâmetro B	X_{BA}	1	$X_{BC}=X_{CB}$	$X_{BD}=X_{DB}$	$X_{BE}=X_{EB}$
Parâmetro C	X_{CA}	X_{CB}	1	$X_{CD}=X_{DC}$	$X_{CE}=X_{EC}$
Parâmetro D	X_{DA}	X_{DB}	X_{DC}	1	$X_{DE}=X_{ED}$
Parâmetro E	X_{EA}	X_{EB}	X_{EC}	X_{ED}	1

- Cálculo da matriz dos valores próprios. Cada valor próprio corresponde a uma percentagem de variabilidade. Se se representar os resultados em função dos n primeiros eixos, a percentagem de variabilidade cumulativa é a soma das n primeiras colunas da matriz.

Tabela 3.II - Matriz dos valores próprios.

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3	Eixo 4	Eixo 5
Valor próprio	y_1	y_2	y_3	y_4	y_5
% de variabilidade	y_1/y_{total}	y_2/y_{total}	y_3/y_{total}	y_4/y_{total}	y_5/y_{total}
% cumulativa	y_1/y_{total}	$(y_1+y_2)/y_{total}$	$(y_1+y_2+y_3)/y_{total}$	$(y_1+y_2+y_3+y_4)/y_{total}$	1

- Cálculo da matriz dos vectores próprios. Esta matriz contém as coordenadas dos vectores dos parâmetros nos novos eixos.

Tabela 3.III - Matriz dos vectores próprios.

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3	Eixo 4	Eixo 5
Parâmetro A	k_{A1}	k_{A2}	k_{A3}	k_{A4}	k_{A5}
Parâmetro B	k_{B1}	k_{B2}	k_{B3}	k_{B4}	k_{B5}
Parâmetro C	k_{C1}	k_{C2}	k_{C3}	k_{C4}	k_{C5}
Parâmetro D	k_{D1}	k_{D2}	k_{D3}	k_{D4}	k_{D5}
Parâmetro E	k_{E1}	k_{E2}	k_{E3}	k_{E4}	k_{E5}

A representação dos parâmetros no círculo de correlação dos eixos 1 e 2 permite evidenciar a correlação dos parâmetros no novo sistema de eixos. Quanto mais próximos dois parâmetros se encontram um do outro maior é a sua correlação.

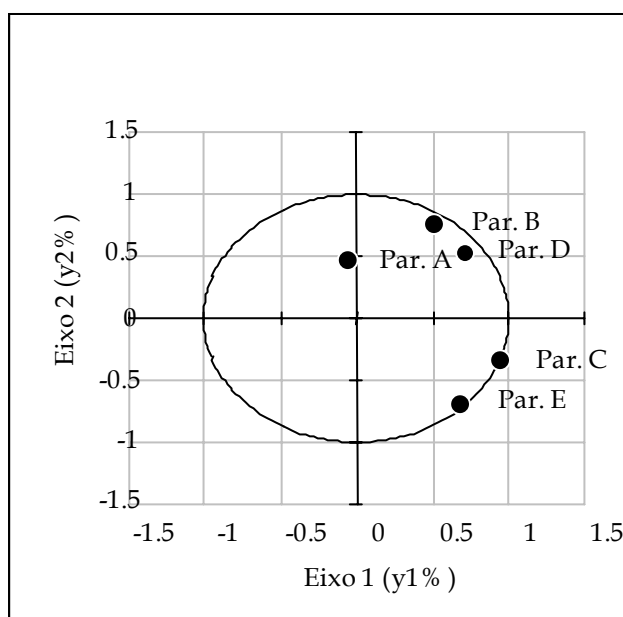


Figura 3.3 - Representação dos parâmetros no círculo de correlações.

- Cálculo da tabela de coordenadas dos indivíduos nos novos eixos. Esta matriz permite determinar a posição de cada indivíduo no novo sistema de eixos e representá-lo posteriormente em gráfico.

Tabela 3.IV - Tabela das coordenadas nos novos eixos.

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3	Eixo 4	Eixo 5
Indivíduo 1	k_{11}	k_{12}	k_{13}	k_{14}	k_{15}
Indivíduo 2	k_{21}	k_{22}	k_{23}	k_{24}	k_{25}
Indivíduo 3	k_{31}	k_{32}	k_{33}	k_{34}	k_{35}
...

Os valores de cada protozoário (i), nos novos eixos, são calculados pela seguinte fórmula:

$$k_{ij} = k_{Aj} \frac{A_i - \mu_A}{\sigma_A} + k_{Bj} \frac{B_i - \mu_B}{\sigma_B} + k_{Cj} \frac{C_i - \mu_C}{\sigma_C} + k_{Dj} \frac{D_i - \mu_D}{\sigma_D} + k_{Ej} \frac{E_i - \mu_E}{\sigma_E} \quad (6.1)$$

Em que A, B, C, D e E são os parâmetros calculados, μ a média, σ o desvio padrão e i representa cada um dos protozoários.

3.3 Programa

A descrição do programa apresentada a seguir tem por base a versão em linguagem de mais alto nível, uma vez que permite evidenciar melhor o funcionamento de cada função utilizada no mesmo. Ao invés, o programa de mais baixo nível, de funcionamento em tudo idêntico a este, explora funções de muito baixo nível e dilui a apreensão imediata de cada uma das funções pela subdivisão destas em múltiplos comandos individuais. As funções próprias do *Visilog* encontram-se melhor explicitadas no Apêndice F.

O programa, numa primeira fase procede ao melhoramento da imagem inicial do protozoário, com 256 tons de cinzento possíveis, da qual constam os seguintes passos:

1. Aquisição da imagem original, em formato *tiff*.

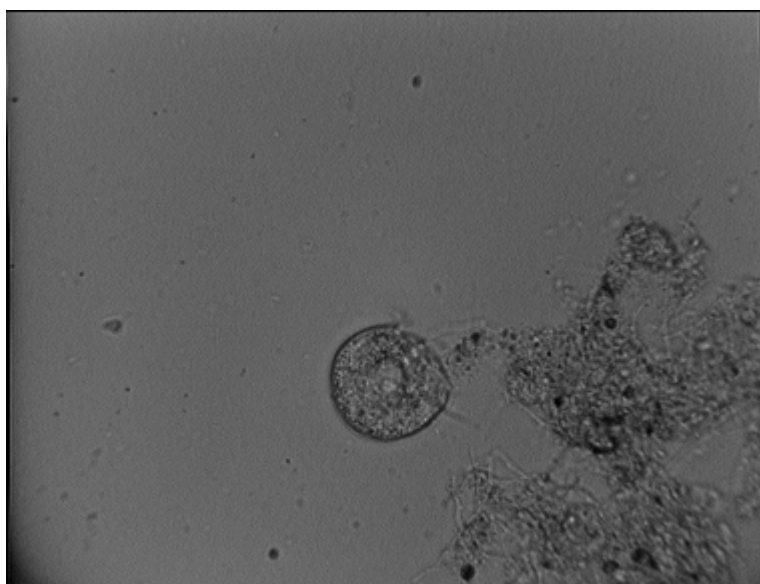


Figura 3.4 - Imagem resultante da aquisição (ponto 1).

2. Aplicação de um filtro de convolução triangular 2 de tamanho de caixa 3x3, com o objectivo de suavizar a mesma e eliminar ruídos provenientes da aquisição. Os filtros de convolução são filtros lineares (Russ, 1995), isto é, são filtros que são uma combinação linear dos valores do pixel em causa e dos que o rodeiam, e obedecem às seguintes regras:

$$\varphi(f+g) = \varphi(f) + \varphi(g) \quad (6.2)$$

$$\varphi(\lambda f) = \lambda\varphi(f) : \lambda \in \mathbb{R} \quad (6.3)$$

Em que φ é um filtro linear e f e g são imagens.

Um filtro linear com os coeficientes apresentados na matriz da esquerda, operando sobre a parte de uma imagem apresentada na matriz da direita, apresenta o resultado seguinte:

k_4	k_3	k_2
k_5	k_0	k_1
k_6	k_7	k_8

$I_{n-1,m-1}$	$I_{n,m-1}$	$I_{n+1,m-1}$
$I_{n-1,m}$	$I_{n,m}$	$I_{n+1,m}$
$I_{n-1,m+1}$	$I_{n,m+1}$	$I_{n+1,m+1}$

$$O_{n,m} = 1/K' (k_0 I_{n,m} + k_1 I_{n+1,m} + k_2 I_{n+1,m-1} + k_3 I_{n,m-1} + k_4 I_{n-1,m-1} + k_5 I_{n-1,m} + k_6 \times I_{n-1,m+1} + k_7 \times I_{n,m+1} + k_8 \times I_{n+1,m+1}) \quad (6.4)$$

Em que $O_{n,m}$ é o valor do elemento (n,m) da matriz resultante e o valor de K' (constante para normalizar o resultado) é definido por :

$$K' = k_0 + k_1 + k_2 + k_3 + k_4 + k_5 + k_6 + k_7 + k_8 \quad (6.5)$$

A matriz do filtro triangular 2, presente no *software Visilog*, é a seguinte:

1	1,29	1
1,29	2	1,29
1	1,29	1

O valor de K' para este filtro é de 11,16.

3. Equalização, por histograma, da imagem para aumentar a gama dos valores de cinzento utilizada e o contraste. Se uma imagem contém n pixeis que utilizam m valores de cinzento, existe uma média de n/m pixeis por valor de cinzento. Uma imagem está correctamente contrastada se o número de pixeis se aproxima deste valor para cada valor de cinzento (Noesis S.A., 1998). O princípio desta equalização é o de tentar uniformizar o histograma da imagem.

4. Aplicação do filtro de mediana de tamanho de caixa 4x4, de modo a reduzir o ruído provocado pela operação anterior. O filtro de mediana é um filtro não linear que substitui o valor do pixel central pela mediana dos valores que se encontram na caixa definida à sua volta pelo tamanho do caixa (Russ, 1995).

5. Determinação da imagem do fundo através da operação *closing* aplicada 15 vezes consecutivas e da aplicação de um filtro linear de média (ponto 5) com o intuito de suavizar a mesma. A operação *closing* substitui os valores de cada pixel pelo maior valor à sua volta, o que, para fundos mais claros que os objectos, permite evidenciar o fundo e ir gradualmente eliminando os objectos.

6. Aplicação do filtro de média de caixa 30x30 que substitui o valor central pela média dos valores que se encontram na caixa definida à sua volta pelo tamanho do caixa. Isto vai permitir suavizar a imagem do fundo.

7. Subtracção da imagem de fundo à imagem resultante do ponto 2, para retirar o fundo da mesma e uniformizar diferenças de valores de pixeis devidas a diferenças de iluminação. Isto permite também evidenciar os objectos presentes na imagem.

Numa segunda fase o programa reconhece os objectos (protozoários e alguns flocos) através das operações seguintes:

8. Escolha manual do limite de detecção de cor óptimo.

9. Binarização através do limite de detecção de cor em que os objectos adquirem valor 1 e o fundo valor 0.

10. Operação de *closing*, aplicada 1 vez, para fechar possíveis contornos abertos. Deste modo, pixeis de valor 1 que se encontrem a uma distância de dois ou menos pixeis são ligados entre si.

11. Preenchimento das zonas interiores dos objectos através de uma função própria do *Visilog*: *hole-fill*. Esta função primeiramente calcula a imagem inversa da imagem binária, depois efectua uma dilatação geodésica da imagem inversa. A dilatação geodésica consiste em efectuar sucessivas dilatações em que cada uma é seguida por uma intersecção com a imagem original até convergir, o que garante que os objectos dilatados não irão atingir os outros objectos. Finalmente, inverte a imagem inversa de modo a obter-se a imagem binária original com as zonas internas dos objectos preenchidas.

Em função da imagem binária obtida o programa pode seguir dois cursos distintos. O utilizador, nesta fase deve seleccionar uma das opções disponíveis: 'protozoários isolados' ou 'protozoários não isolados'. Caso os protozoários se encontrem isolados dos flocos procede-se a uma eliminação dos flocos com os seguintes passos:

12. Eliminação dos objectos em contacto com as extremidades da imagem através de uma função própria do *Visilog*: *border-kill*. Esta função actua do seguinte modo: primeiramente retém apenas os pontos que se encontram na fronteira da imagem, seguidamente esses pontos actuam como marcadores para a reconstrução dos objectos em contacto com a fronteira, por último apenas os objectos que se encontram na imagem original e não se encontram nesta última imagem são considerados.

13. Eliminação dos objectos mais pequenos (sujidades presentes nas lamas), através de uma operação *opening* aplicada 15 vezes e reconstrução dos objectos remanescentes (ponto 14). A operação *opening*, numa primeira fase vai eliminar consecutivamente os pixeis presentes na fronteira dos objectos. Numa segunda fase vai adicionar consecutivamente pixeis à fronteira do objecto resultante da primeira fase. Quando aplicada 15 vezes consecutivas elimina objectos até um tamanho máximo de 30x30 pixeis.

14. A operação *reconstruct* é uma função própria do *Visilog*, que tem por objectivo a reconstrução do objecto original a partir do seu marcador e vai reconhecer todos os pixels que se encontram ligados aos marcadores na imagem original. Esta operação é efectuada a partir da última imagem e da imagem resultante do ponto 12.

Depois destas operações (utilizadas quando os protozoários se encontram isolados dos flocos) procede-se à fase de análise de imagem propriamente dita, na qual se efectua o cálculo dos parâmetros e eliminação última de flocos. Esta fase encontra-se desenvolvida mais adiante, do ponto 40 ao ponto 45.

No caso de os protozoários se encontrarem em contacto com os flocos o programa contém os seguintes passos:

O primeiro procedimento a ser efectuado é a separação dos protozoários ligados a flocos. As operações constantes deste procedimento são as seguintes:

15. Determinação da função distância da imagem binária, através de uma função própria do *Visilog*: *distance*. Esta função calcula a distância de cada pixel de um objecto à fronteira mais próxima. O resultado é uma imagem de nível de cinzentos calculada a partir da soma de imagens de erosões consecutivas. Assim, cada pixel x , de um objecto X , adquire um valor de cinzento I igual à distância em número de pixels da fronteira do objecto mais próxima (Noesis, S.A. 1998).

$$I = d_8 [x , \delta(X)] \quad (6.6)$$

Para uma grelha quadrada a distância, d_8 , calculada é a denominada distância num tabuleiro de xadrez:

$$d_8 [(i,j) , (h,k)] = \max (|h - i| , |k - j|) \quad (6.7)$$

16. Determinação da imagem dos máximos regionais da função distância (abrangendo uma gama de 2 níveis de cor) e identificação numérica de cada um dos máximos obtidos através de funções próprias do *Visilog*: *merge_maxima* e *label* (ponto 17). A função *merge_maxima* calcula os máximos regionais do seguinte modo: Primeiramente o factor de contraste (número de níveis de cor a abranger pelo máximo) é subtraído da imagem original. O resultado desta subtracção é então usado para reconstruir numericamente a imagem. Por último são calculados os máximos regionais da imagem reconstruída numericamente.

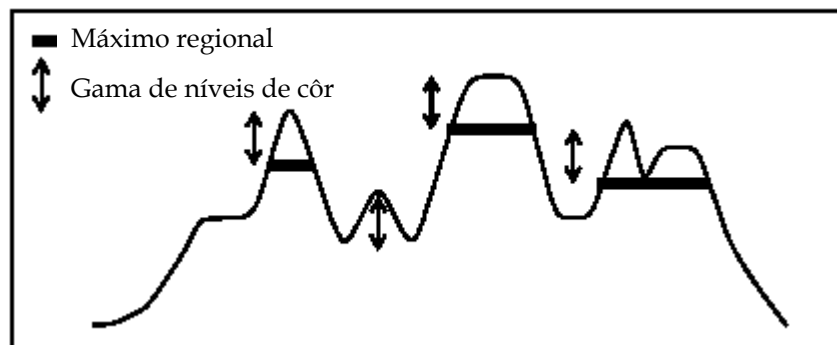


Figura 3.5 - Operação *merge_maxima* sobre uma imagem (Noesis, S.A., 1998).

17. Utilização da função *label* que atribui um valor inteiro diferente a cada conjunto de pixels ligados (objecto).

18. Cálculo da imagem inversa da função distância e utilização da mesma e da imagem resultante do ponto 17, para a determinação das linhas de separação dos objectos através de uma função própria do *Visilog*: *fastwatershed* (ponto 19). A determinação da imagem inversa da função distância permite à função *fastwatershed*, determinar as bacias da imagem, enquanto que a imagem dos máximos permite determinar o número de objectos a separar, uma vez que funciona como uma imagem de marcadores.

19. A função *fastwatershed* determina as denominadas linhas de separação, que representa numa imagem binária. O princípio de funcionamento desta função é chamado de imersão e baseia-se na simulação da subida da água a partir de um determinado conjunto de marcadores. Um ponto da linha de separação aparece quando duas frentes distintas da água se juntam.

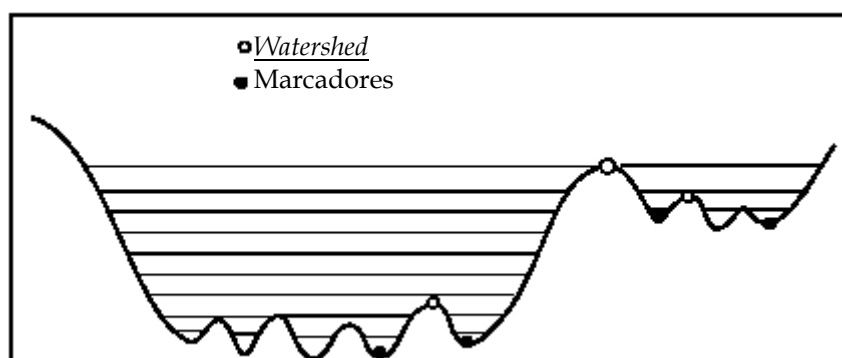


Figura 3.6 - Operação *watershed* sobre uma imagem (Noesis S.A., 1998).

20. Isolamento dos objectos por eliminação dos pixels que definem as linhas de separação na imagem binária original através da função *logical_sub*. Esta última retém os pixels de valor 1 que se encontrem na primeira imagem, mas não na segunda. Assim, obtida a imagem binária das linhas de separação e eliminando os pixels de valor 1 desta última na imagem resultante do ponto 11, obtém-se uma imagem binária com os objectos separados.

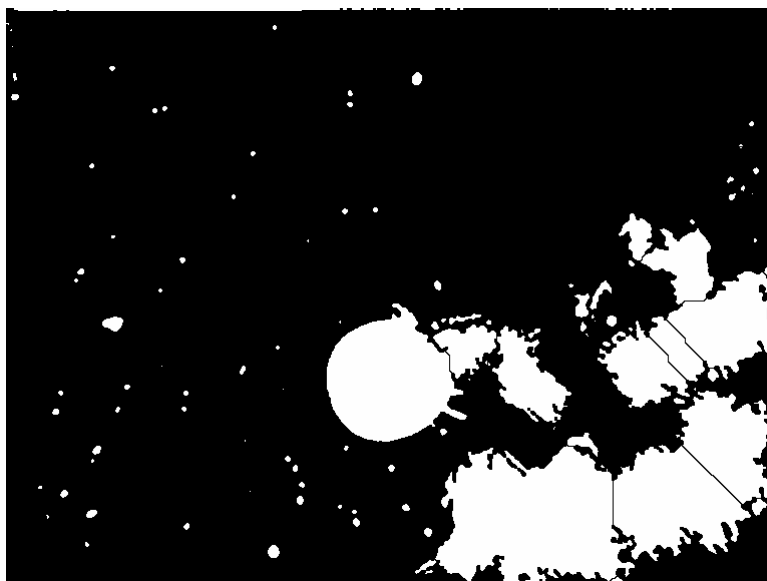


Figura 3.7 – Imagem resultante da função *logical sub* (ponto 20).

O reconhecimento dos cílios, flagelos e mionema é obtido através das operações seguintes:

21. Utilização da operação erosão (*erode*), aplicada 5 vezes sobre a imagem resultante do ponto 20, reconstrução dos objectos remanescentes (ponto 22) e utilização da operação lógica *xor* (ponto 23) entre esta última imagem e a imagem resultante do ponto 14. A imagem resultante da operação erosão seguida da reconstrução dos objectos contém apenas os objectos de dimensões superiores a 10x10 pixels.

22. A operação *reconstruct* é aplicada à última imagem e à imagem resultante do ponto 20.

23. A operação *xor*, que compara duas imagens, tem o seguinte significado: 'ou um ou outro, mas não os dois', isto é apenas retém os pixels com valor 1 que estão presentes ou numa imagem ou na outra, mas não nas duas. Deste modo, quando aplicada à última imagem e à imagem resultante do ponto 20, a imagem resultante vai possuir apenas os objectos em que uma das dimensões seja inferior a 11 pixels, como é o caso dos cílios, flagelos e mionema.

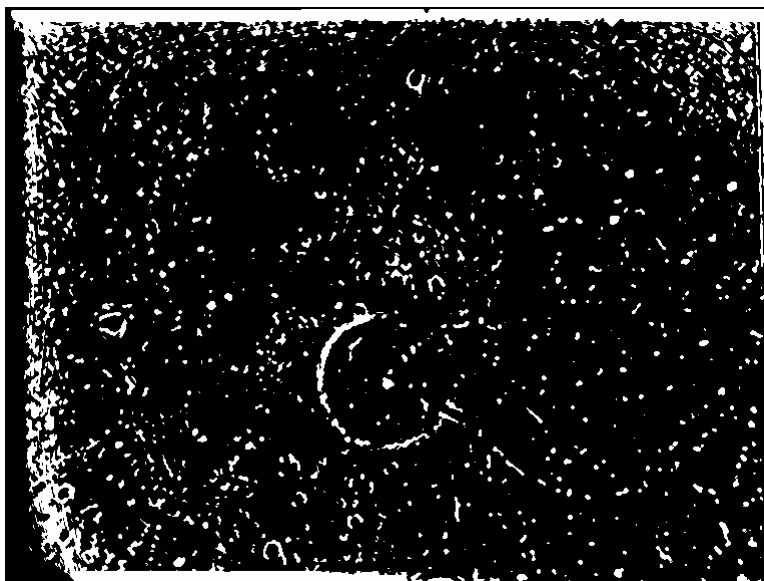


Figura 3.8 - Imagem resultante da operação *xor* (ponto 23).

24. Dilatação dos cílios, flagelos e mionema em 1 pixel.

25. Eliminação dos objectos em contacto com as extremidades da imagem através de uma função própria do *Visilog*: *border-kill*.

Seguidamente é determinada uma imagem contendo marcadores dos objectos maiores ou mais regulares. Os seguintes passos compõem esta operação:

26. Suavização extrema da imagem do ponto 5, através da aplicação de um filtro linear de baixas frequências gaussiano de caixa 7x7 (Russ, 1995). É utilizada uma função própria do *Visilog*: *lowpass_7x7*. Este filtro é aplicado cinco vezes consecutivas. A matriz gaussiana de tamanho de caixa 7, presente no *software Visilog*, é a seguinte:

0,25	0,37	0,47	0,5	0,47	0,37	0,25
0,37	0,54	0,68	0,74	0,68	0,54	0,37
0,47	0,68	0,86	0,93	0,86	0,68	0,47
0,5	0,74	0,93	1	0,93	0,74	0,5
0,47	0,68	0,86	0,93	0,86	0,68	0,47
0,37	0,54	0,68	0,74	0,68	0,54	0,37
0,25	0,37	0,47	0,5	0,47	0,37	0,25

O valor de K' (constante para normalizar o resultado) é igual a 28,44.

27. Inversão da imagem e subtracção do valor unitário 10 (ponto 28) para determinação posterior dos máximos regionais abrangendo uma gama de 10 níveis de cor.

28. Subtracção do valor 10.

29. Reconstrução numérica da imagem invertida a partir desta última e da imagem resultante do ponto 27, com uma função própria do *Visilog*: *numreconstruct*. Nesta função, a cada

passo a imagem resultante da subtracção é dilatada por um elemento estrutural de tamanho unitário. Este algoritmo é baseado num método recursivo em que o mínimo da imagem dilatada e da imagem invertida é retido e usado como imagem inicial da próxima iteração. Esta operação repete-se até não haver mais mudanças. Isto implica que os picos e vales são atenuados resultando uma imagem muito mais homogénea.

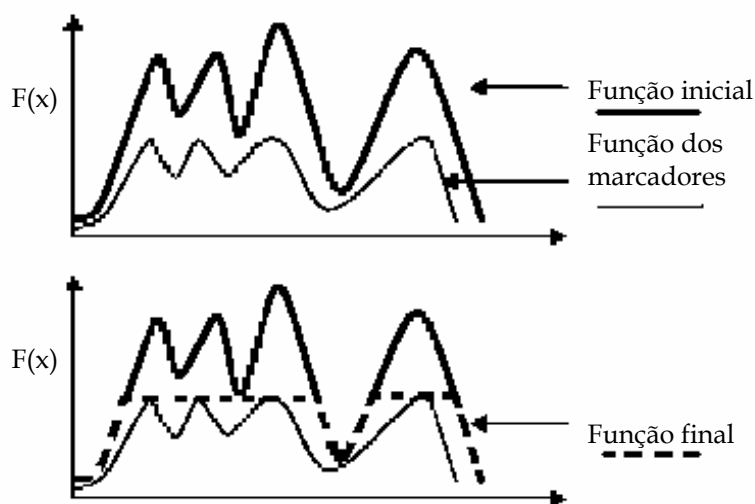


Figura 3.9 - Operação *numreconstruct* sobre uma imagem (Noesis S.A., 1998).

30. Determinação da imagem dos máximos da última imagem (abrangendo uma gama de 10 níveis de cor) e identificação numérica de cada um dos máximos obtidos através de funções próprias do *Visilog*: *fastmaxima* e *label*. A função *fastmaxima* calcula os máximos regionais.

31. A função *label* atribui um valor inteiro diferente a cada conjunto de pixeis ligados (objecto).

32. Determinação de linhas internas de separação nos objectos através de uma função própria do *Visilog*: *fastwatershed*. A imagem resultante da aplicação do filtro *lowpass_7x7* permite à função *fastwatershed*, determinar as bacias da imagem. A imagem dos máximos permite à função *fastwatershed* determinar o número de objectos a separar. A função *fastwatershed* determina as linhas de separação que representa numa imagem binária com valor 1 sobre um fundo de valor 0.

33. Cálculo da imagem dos marcadores através da operação lógica *and* da imagem resultante do ponto 25 e da imagem de linhas internas. Esta operação vai permitir rodear internamente os objectos por uma linha fechada.

34. Preenchimento das zonas interiores dos objectos através de uma função própria do *Visilog*: *hole-fill*.

Procede-se então à eliminação dos flocos de menores dimensões do seguinte modo:

35. Utilização da operação abertura (*opening*), aplicada 15 vezes, e reconstrução dos objectos remanescentes através de uma função própria do *Visilog: reconstruct* (ponto 36). Quando aplicada 15 vezes consecutivas a função *opening* elimina objectos até um tamanho máximo de 30x30 pixels.

36. A operação *reconstruct* é aplicada à última imagem e à imagem resultante do ponto 34.

É necessário, finalmente, ligar os cílios, flagelos e mionema, isolados pelos tratamentos anteriores, aos protozoários:

37. Ligação aos protozoários através da utilização da operação lógica *or* entre esta última imagem e a imagem resultante do ponto 36. Deste modo, são ligados os cílios, flagelos e mionema que se encontram a 1 pixel de distância e que haviam sido separados dos protozoários aquando da aplicação do filtro *watershed*.

Como esta última operação pode reintroduzir na última imagem pequenas sujidades presentes nas lamias (possuindo uma das dimensões inferior a 11 pixels) é necessário proceder à sua eliminação:

38. Utilização da operação erosão, aplicada 15 vezes e reconstrução dos objectos remanescentes pela função própria do *Visilog: reconstruct* (ponto 39). Quando aplicada 15 vezes consecutivas, a operação erosão elimina objectos até um tamanho máximo de 30x30 pixels.

39. A operação de reconstrução (*reconstruct*) é efectuada a partir da última imagem e da imagem resultante do ponto 37.

Este procedimento vai eliminar os objectos (sujidades) reintroduzidos na última operação que não ficaram ligados aos protozoários, obtendo-se assim a imagem final binária dos protozoários.

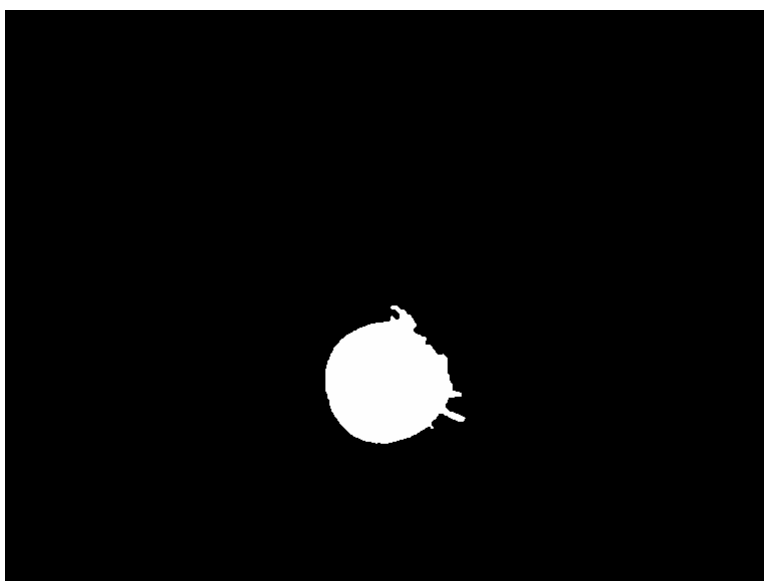


Figura 3.10 - Imagem resultante da função *reconstruct* (ponto 39).

Procede-se finalmente à fase de análise de imagem propriamente dita, na qual se efectua o cálculo dos parâmetros e eliminação última de flocos. Esta fase pode ser representada por dois processos distintos:

40. Utilização da função *label* que atribui um valor inteiro diferente a cada conjunto de pixels ligados (objecto).

41. Determinação, através de uma função própria do *Visilog (analyse grey in)*, dos parâmetros seguintes: Diâmetros de Feret, Área, Perímetro, Diâmetro Equivalente, Excentricidade, Forma de Feret, Comprimento, Valor Máximo de Cinzentos, Valor Médio de Cinzentos, Valor Mínimo de Cinzentos, Forma Área-Perímetro, Desvio Padrão de Cinzentos e Largura. Os parâmetros calculados referem-se à projecção do protozoário no plano de captura da imagem. Os diversos parâmetros encontram-se explicados de seguida:

- Diâmetros de Feret - máxima distância entre 2 tangentes paralelas que tocam lados opostos de um objecto (Glasbey, 1994). Foram utilizados os seguintes ângulos: 0°, 18°, 36°, 54°, 72°, 90°, 108°, 126°, 144° e 162°.

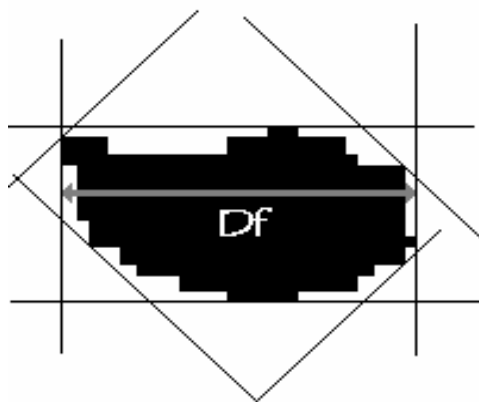


Figura 3.11 - Representação do diâmetro de Feret de um objecto.

- Área - área do protozoário.

- Perímetro - perímetro do protozoário.

- Diâmetro Equivalente - diâmetro de um círculo com a mesma área do protozoário.

- Excentricidade - $E = \frac{(4\pi^2)(m_{20} - m_{02})^2 + 4m_{11}^2}{A^2}$ (6.8)

em que m_{ij} representa o momento de ordem i,j do objecto e A a área (Glasbey, 1994).

- Forma de Feret - máximo diâmetro de Feret a dividir pelo diâmetro de Feret a 90° (Noesis, S.A., 1998).

- Comprimento - maior valor dos diâmetros de Feret do protozoário.

- Valor Máximo de Cinzentos - maior valor dos pixels pertencentes aos protozoários na escala de cinzentos (0 a 256).

- Valor Médio de Cinzentos - valor médio dos pixels pertencentes aos protozoários na escala de cinzentos.

- Valor Mínimo de Cinzentos - menor valor dos pixels pertencentes aos protozoários na escala de cinzentos.

$$\text{- Forma Área-Perímetro - FAP} = \frac{P_{\text{Crofton}}^2}{4\pi A} \quad (6.9)$$

em que o perímetro de Crofton (P_{Crofton}) é a média das distâncias entre as intersecções nos 8 ângulos (Noesis, S.A., 1998).

- Desvio padrão de cinzentos - desvio padrão dos valores de todos os pixels do protozoário.

- Largura - menor valor dos diâmetros de Feret do protozoário.

42. Eliminação de objectos bastante irregulares (flocos), através do cálculo da razão entre o perímetro e o comprimento de cada objecto e comparação com um valor de referência. Os valores de referência são de 6 para o caso de os objectos após a binarização se encontrarem isolados e de 5 para o caso contrário.

43. Imposição do limite de detecção de cor, dos objectos a serem eliminados (flocos), com o valor dos pixels do objecto após o ponto 40.

44. Eliminação dos flocos através da operação morfológica *xor* entre a última imagem e a imagem do ponto 40.

Por último, os resultados são guardados em ficheiros texto (.txt) e as imagens finais de cada objecto identificado numericamente, obtida aquando da determinação dos parâmetros, é guardada em formato *Visilog* (.im5):

45. Gravação dos ficheiros dos resultados e imagem em disco.

Um organigrama do programa é referido de seguida:

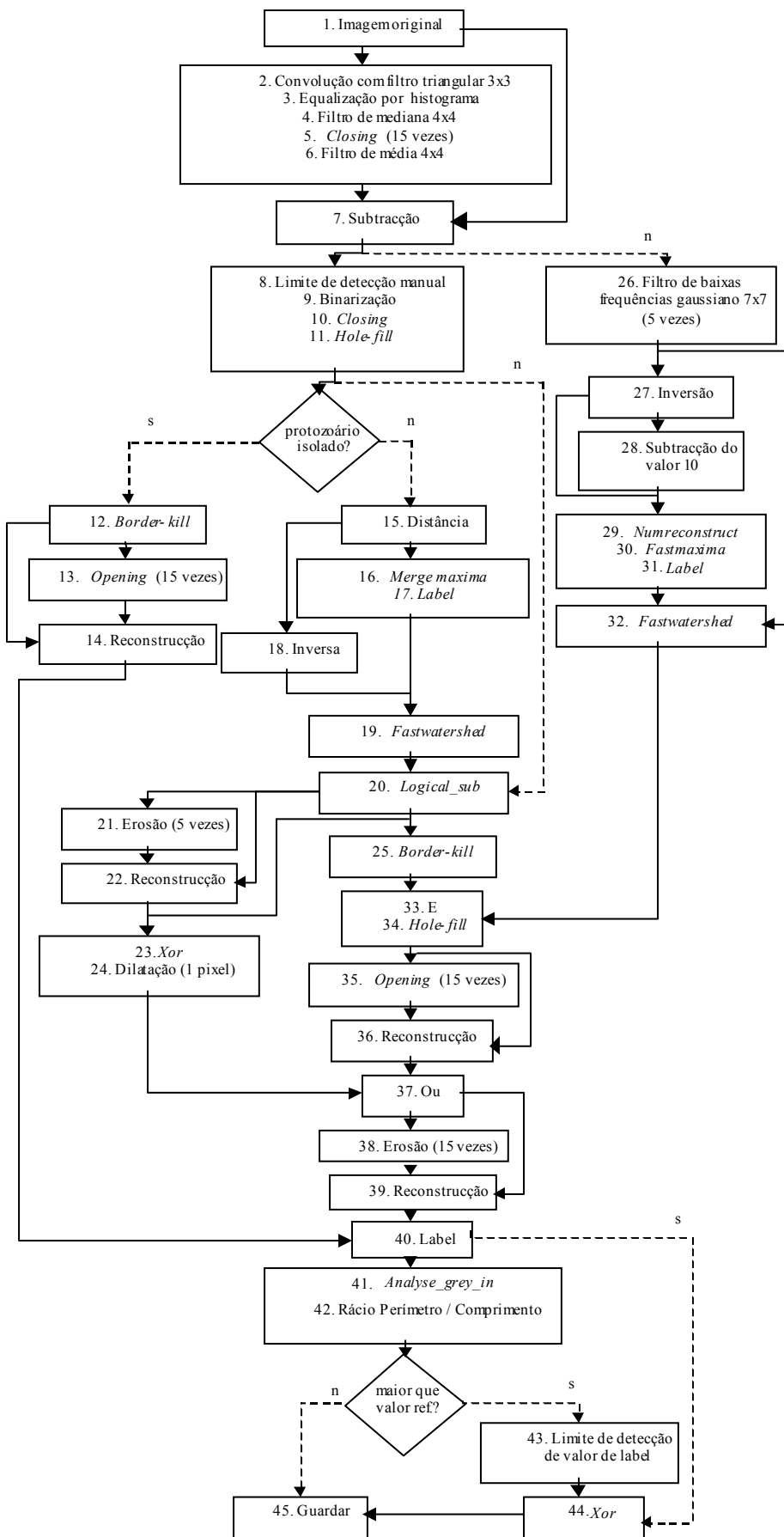


Figura 3.12 - Organigrama do programa ProtoRec.

3.4 Resultados e Discussão

Os resultados mais importantes encontram-se descritos de seguida. Os valores dos parâmetros calculados pelo programa (Forma de Feret, Forma Área-Perímetro, Excentricidade, Área e Comprimento), para cada elemento das espécies de protozoários estudadas encontram-se no apêndice A. Os valores de cada elemento das espécies de protozoários no eixo 1, 2 e 3 encontram-se tabelados também no apêndice A.

Numa primeira fase foram utilizados todos os resultados obtidos, e observados os gráficos referentes a cada espécie de protozoário. Os valores que se encontravam fora da área de localização foram rejeitados. Procedeu-se então a nova determinação de todos os valores calculados pela técnica ACP (Análise de Componentes Principais). Todos os valores apresentados nos resultados e no apêndice A referem-se apenas aos valores não rejeitados, tratados novamente pela técnica ACP

Os resultados foram analisados segundo a técnica ACP na qual, primeiramente é calculada a matriz das correlações dos parâmetros estudados, que se encontra de seguida:

Tabela 3.V – Matriz das correlações dos parâmetros estudados.

	Forma de Feret	Forma AP	Excentricidade	Área	Comprimento
F. Feret	1	-0,0093	0,1092	-0,1926	-0,0988
F. AP	-0,0093	1	0,7168	-0,0348	0,4950
Exc.	0,1092	0,7168	1	-0,2124	0,2833
Área	-0,1926	-0,0348	-0,2124	1	0,7581
Comp.	-0,0988	0,4950	0,2833	0,7581	1

Pela observação da Tabela 3.V é evidente que os parâmetros mais bem correlacionados são o Comprimento e a Área, logo, pode-se concluir que estes dois parâmetros não permitem uma boa diferenciação das espécies de protozoários quando representados num gráfico com estes dois eixos. Já a Forma Área-Perímetro e a Forma de Feret poderiam ser utilizados, como os dois eixos de um gráfico, para tentar diferenciar as espécies entre si. Contudo e para determinar os melhores eixos do gráfico procedeu-se ao cálculo das matrizes dos valores e vectores próprios desta matriz de correlações. Assim, os melhores eixos, para a diferenciação das espécies de protozoários, são obtidos através da combinação linear dos parâmetros atrás referenciados e não da escolha de dois deles individualmente.

De seguida apresentam-se as matrizes dos valores próprios (Tabela 3.VI) e dos vectores próprios (Tabela 3.VII) da matriz das correlações.

Tabela 3.VI - Matriz dos valores próprios da matriz de correlações.

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3	Eixo 4	Eixo 5
Valor próprio	2,0933	1,6520	0,9247	0,2578	0,0721
% de variabilidade	0,4187	0,3304	0,1849	0,0516	0,0144
% cumulativa	0,4187	0,7491	0,9340	0,9856	1,0000

Tabela 3.VII - Matriz dos vectores próprios da matriz de correlações.

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3	Eixo 4	Eixo 5
Forma de Feret (FF)	-0,0714	-0,3195	0,9413	-0,0697	-0,0446
Forma AP (FAP)	0,5623	-0,3466	-0,1393	-0,6662	-0,3170
Excentricidade (E)	0,4550	-0,5074	-0,0897	0,7182	-0,1079
Área (A)	0,3256	0,6476	0,2288	0,1863	-0,6226
Comprimento (C)	0,6047	0,3177	0,1850	-0,0294	0,7059

Os eixos 1, 2 e 3 garantem uma percentagem cumulativa de variabilidade de aproximadamente 93% e foram, por isso, os utilizados.

Para o cálculo das coordenadas (Co) de cada protozoário (i) nos novos eixos (1, 2 e 3), as equações utilizadas são as seguintes:

$$Co_i^1 = -0,0714 \frac{FF_i - \mu_{FF}}{\sigma_{FF}} + 0,5623 \frac{FAP_i - \mu_{FAP}}{\sigma_{FAP}} + 0,455 \frac{E_i - \mu_E}{\sigma_E} + 0,3256 \frac{A_i - \mu_A}{\sigma_A} + 0,6047 \frac{C_i - \mu_C}{\sigma_C} \quad (6.10)$$

$$Co_i^2 = -0,3195 \frac{FF_i - \mu_{FF}}{\sigma_{FF}} - 0,3466 \frac{FAP_i - \mu_{FAP}}{\sigma_{FAP}} - 0,3195 \frac{E_i - \mu_E}{\sigma_E} + 0,6476 \frac{A_i - \mu_A}{\sigma_A} + 0,3177 \frac{C_i - \mu_C}{\sigma_C} \quad (6.11)$$

$$Co_i^3 = -0,9413 \frac{FF_i - \mu_{FF}}{\sigma_{FF}} - 0,1393 \frac{FAP_i - \mu_{FAP}}{\sigma_{FAP}} - 0,0897 \frac{E_i - \mu_E}{\sigma_E} + 0,2288 \frac{A_i - \mu_A}{\sigma_A} + 0,1850 \frac{C_i - \mu_C}{\sigma_C} \quad (6.12)$$

A representação dos parâmetros no círculo de correlação dos eixos 1 e 2 encontra-se na Figura 3.13 e a representação de todos os protozoários na Figura 3.14.

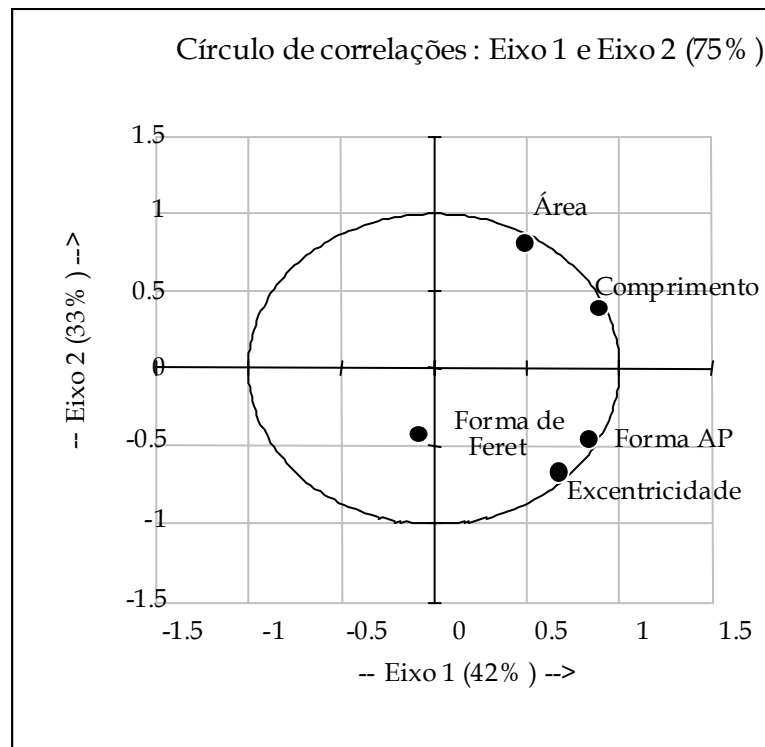


Figura 3.13 - Representação dos parâmetros no círculo das correlações.

No conjunto destes dois sistemas de eixos, nota-se que os parâmetros Forma Área-Perímetro e Excentricidade são os que estão melhor correlacionados enquanto que os parâmetros Forma de Feret e Comprimento são os que se encontram menos correlacionados. Isto pode ser retirado pela análise da figura anterior, uma vez que os parâmetros mais próximos são a Forma Área-Perímetro e a Excentricidade e os mais afastados são a Forma de Feret e o Comprimento.

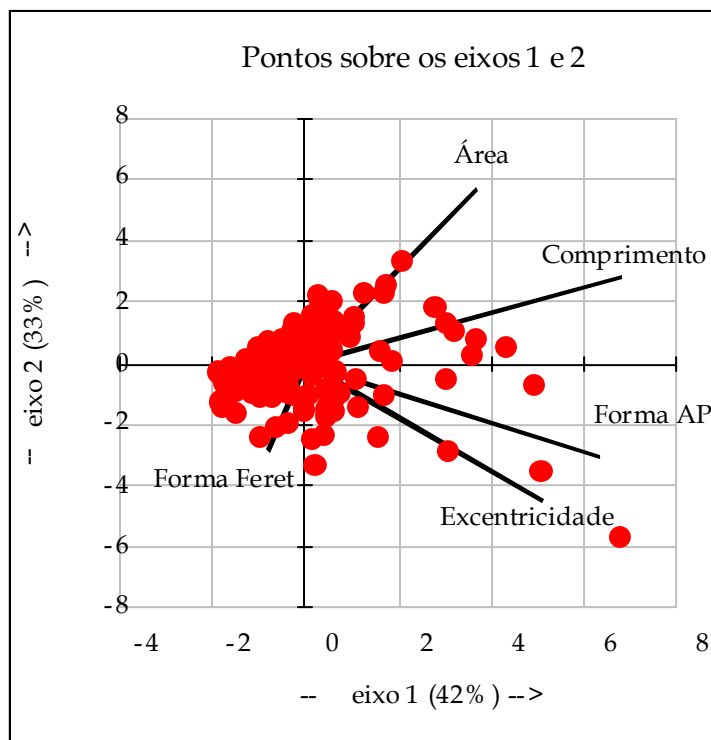


Figura 3.14 - Representação de todos os protozoários nos eixos 1 e 2.

Os valores médios de cada espécie de protozoário nos eixos 1, 2 e 3, bem como o intervalo de confiança associado, encontram-se na Tabela 3.VIII. O termo 'c/ped' à frente do nome dos protozoários refere-se ao protozoário quando reconhecido com o respectivo pedúnculo.

O intervalo de confiança (Conf.) é calculado a partir da seguinte expressão (Miller, 1992):

$$\text{Conf.} = t \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (6.13)$$

Em que:

t - Parâmetro de Student para n-1 amostras.

σ - Desvio padrão.

n - Número de amostras recolhidas.

Tabela 3.VIII - Valores dos eixos 1, 2 e 3 para os diversos protozoários, bem como os intervalos de confiança (95%).

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3
<i>Colpidium</i>	-1,029 ± 0,151	0,225 ± 0,312	-0,374 ± 0,552
<i>V. convallaria c/ped</i>	3,563 ± 0,827	0,591 ± 0,977	-0,074 ± 0,581
<i>V. convallaria</i>	0,414 ± 0,275	0,961 ± 0,367	0,237 ± 0,426
<i>Epistylis</i>	-0,057 ± 0,239	0,836 ± 0,356	0,112 ± 0,353
<i>Euplotes</i>	-1,151 ± 0,207	-0,446 ± 0,156	-0,214 ± 0,430
<i>Glaucoma</i>	-0,043 ± 0,205	0,287 ± 0,307	-0,470 ± 0,547
<i>Litonotus</i>	0,480 ± 0,326	-1,084 ± 0,438	-0,084 ± 0,976
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,008 ± 1,004	-1,407 ± 0,671	-0,324 ± 0,668
<i>V. microstoma</i>	-1,116 ± 0,256	-0,335 ± 0,260	0,052 ± 0,490
<i>Opercularia</i>	0,843 ± 0,488	2,039 ± 0,436	0,466 ± 0,482
<i>Prorodon</i>	-0,620 ± 0,289	0,798 ± 0,372	-0,456 ± 0,215
<i>Tetrahymena</i>	-1,675 ± 0,128	-0,929 ± 0,230	-0,073 ± 0,699
<i>Trachelophyllum</i>	-0,165 ± 0,371	-2,090 ± 0,420	0,583 ± 0,866
<i>Zoothamnium c/ped</i>	2,546 ± 1,117	0,320 ± 0,693	0,734 ± 1,064
<i>Zoothamnium</i>	0,142 ± 0,288	1,119 ± 0,353	0,185 ± 0,580

A representação gráfica do centróide de cada protozoário nos eixos 1 e 2, bem como a sua área de localização, encontram-se na Figura 3.15.

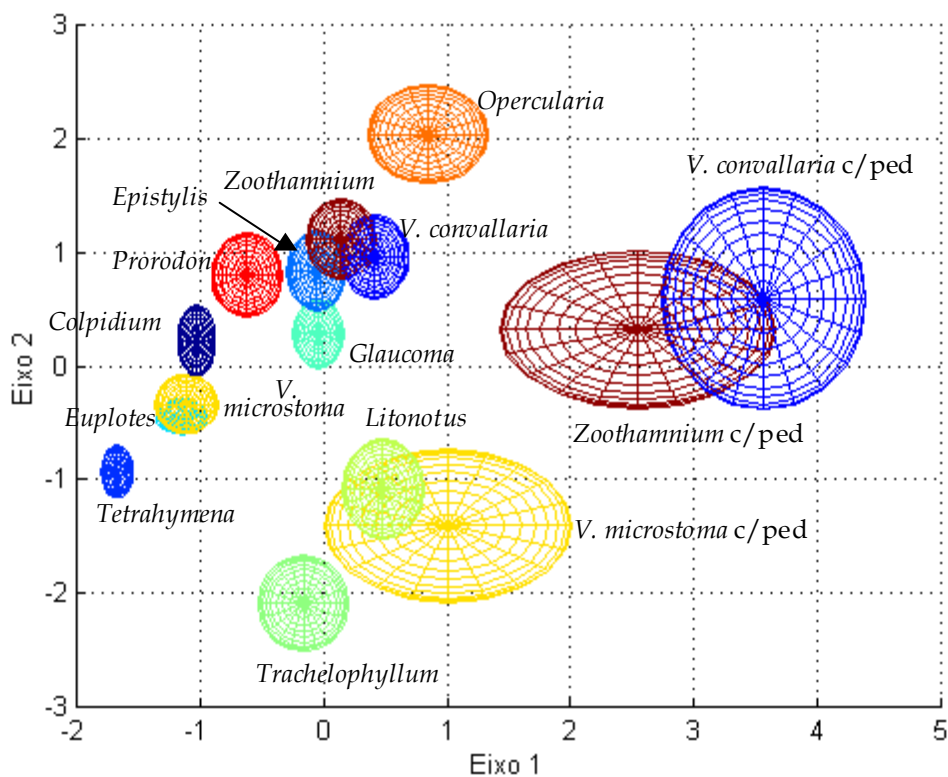


Figura 3.15 - Representação da zona ocupada por cada espécie nos eixos 1 e 2.

Neste sistema de eixos, os protozoários *Tetrahymena*, *Trachelophyllum*, *Colpidium*, *Prorodon* e *Opercularia* são os que se encontram completamente separados, sendo que o *Glaucoma*, a *V. convallaria* com pedúnculo, a *V. microstoma* com pedúnculo e o *Zoothamnium* com pedúnculo estão também razoavelmente bem separados.

Para melhor se poder distinguir cada espécie de protozoário procedeu-se à escolha de um terceiro eixo, com o intuito de melhor isolar e visualizar o centróide de cada uma, bem como o seu volume de localização, numa representação tridimensional. A representação gráfica do centróide de cada protozoário nos eixos 1 e 3 encontra-se na Figura 3.16. Esta representação surge como uma vista de frente do gráfico tridimensional, enquanto que a Figura 3.15 pode ser encarada como uma vista de cima desse mesmo gráfico.

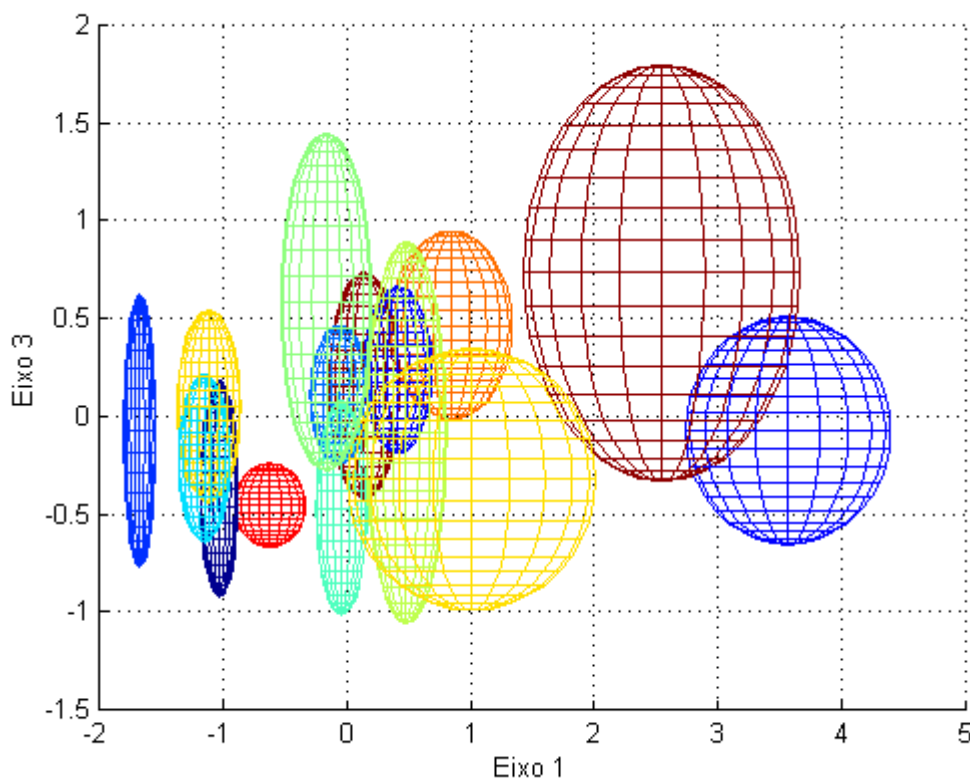


Figura 3.16 – Representação da zona ocupada por cada espécie no eixo 1 e no eixo da área.

Neste sistema de eixos, os protozoários *Tetrahymena* e *Prorodon* encontram-se perfeitamente isolados, enquanto que os protozoários *V. microstoma* com pedúnculo, *Trachelophyllum*, *Zoothamnium* com pedúnculo e *V. convallaria* com pedúnculo se encontram razoavelmente bem separados.

Procedeu-se então à inclusão dos valores do eixo 3 como um terceiro eixo (eixo dos Z's).

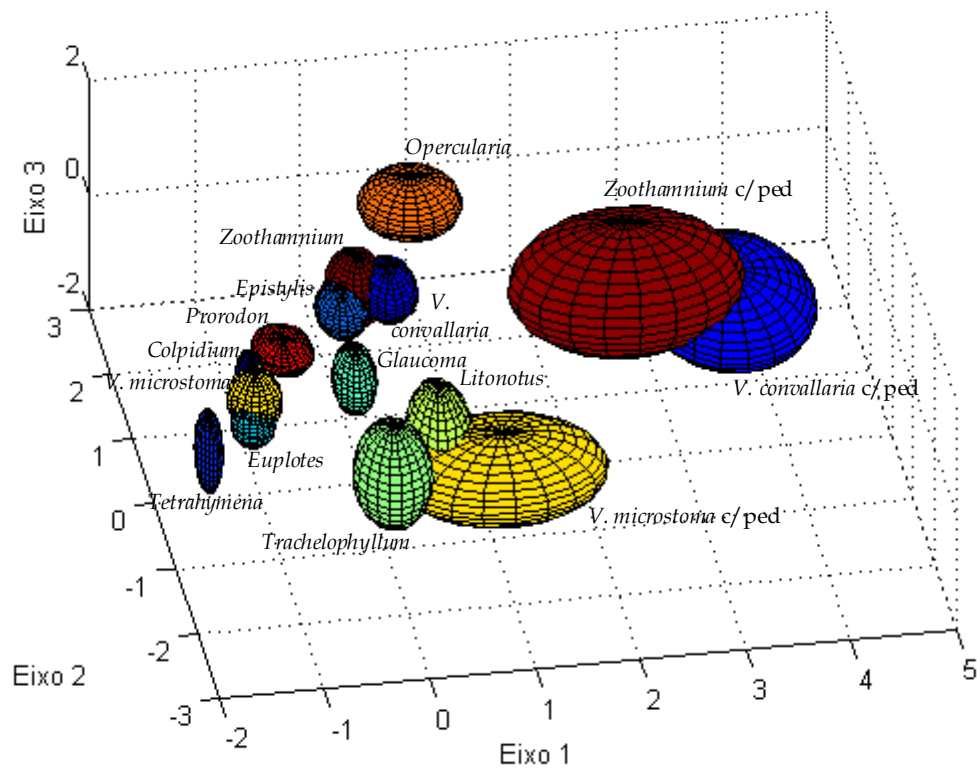


Figura 3.17 - Representação da zona ocupada por cada espécie tridimensionalmente, a um conjunto de ângulos de $(-10^\circ, 60^\circ)$.

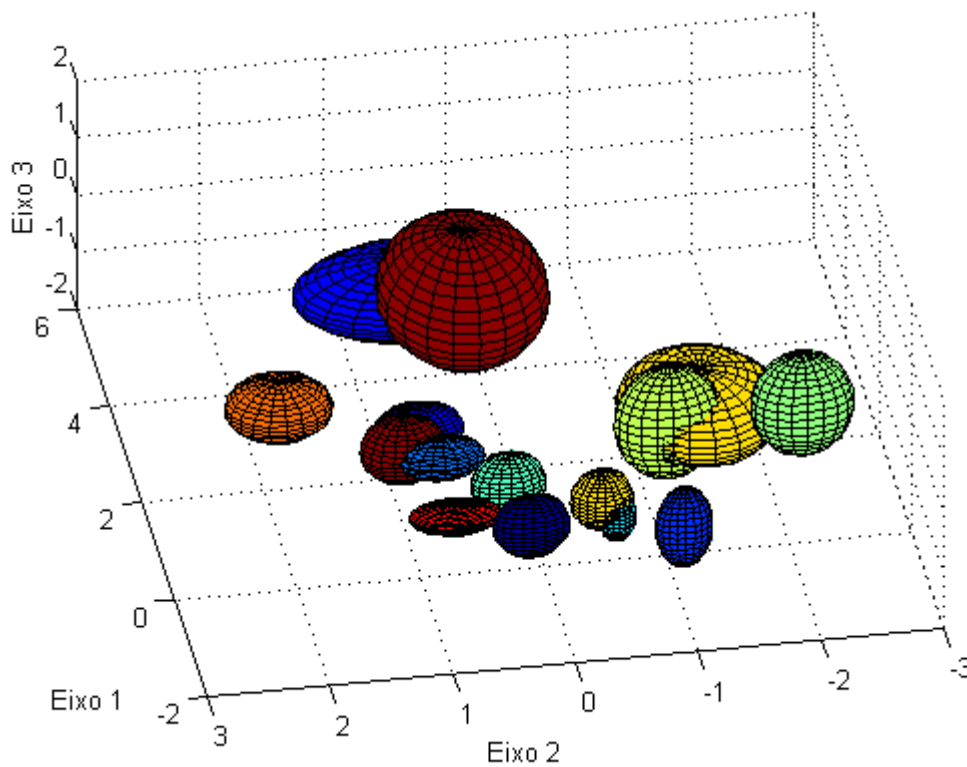


Figura 3.18 - Representação da zona ocupada por cada espécie tridimensionalmente, a um conjunto de ângulos de $(-100^\circ, 30^\circ)$.

A partir destas representações pode-se retirar o seguinte:

Os protozoários *Tetrahymena*, *Trachelophyllum*, *Colpidium*, *Prorodon*, *Glaucoma* e *Opercularia* encontram-se completamente isolados. Os protozoários *V. microstoma* com pedúnculo, *V. convallaria* com pedúnculo, *Zoothamnium* com pedúnculo, *V. convallaria*, *Zoothamnium*, *V. microstoma*, *Epistylis* e *Prorodon* encontram-se razoavelmente bem separados.

3.5 Conclusões

No decurso deste trabalho deparou-se com algumas dificuldades inerentes ao facto de se estudar protozoários de amostras provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais. As principais dificuldades encontram-se expostas de seguida:

- Os protozoários encontram-se, em bastantes casos, total ou parcialmente oclusos pelos flocos existentes nas amostras, dificultando deste modo a correcta separação e identificação das espécies pelo programa.

- As condições de iluminação foram mantidas o mais constantes possível, durante a aquisição das várias imagens, nomeadamente ao nível da intensidade de luz emitida e do contraste e luminosidade escolhidas no *software* de aquisição. Contudo, por análise das imagens obtidas, verificou-se que os tons de cinzento do fundo oscilavam de modo ainda significativo, indicando diferenças de iluminação entre imagens. Por esta razão os tons de cinzento dos protozoários, determinados pelo programa, não foram utilizados nos resultados.

- Os protozoários ciliados móveis de fundo encontram-se, na maior parte do tempo, agarrados aos flocos ou caminhando sobre estes, o que dificulta extremamente o isolamento e reconhecimento destas espécies pelo programa. Deste modo optou-se, sempre que possível, por adquirir imagens destes protozoários nos seus deslocamentos entre flocos diferentes.

- Os protozoários nadadores (*Tetrahymena*, *Colpidium*, *Glaucoma* e *Trachelophyllum*), quer ciliados quer flagelados, deslocam-se de um modo extremamente rápido. Tendo sido usada uma ampliação de 400 vezes (de modo a evidenciar bem os cílios) este problema tornou-se ainda mais acutilante. Assim, a aquisição da imagem teve de ser efectuada com uma deslocação da lâmina quase constante (de modo a que o protozoário se encontrasse no raio de acção da câmara) e com constantes correcções da focagem (devido ao movimento aleatório no plano perpendicular à câmara). Deste modo, em algumas imagens estes protozoários surgem ligeiramente desfocados, essencialmente devido ao movimento dos próprios.

- Os protozoários ciliados ou flagelados apresentam um problema para a aquisição de imagens dos mesmos: os cílios ou flagelos não se encontram, regra geral, no plano óptimo de focagem do corpo do protozoário, o que implica surgirem desfocados neste caso. Optou-se, deste modo, por tentar focar o melhor possível os cílios ou flagelos, uma vez que facilita extremamente o seu reconhecimento pelo programa e estes influem de maneira mais decisiva para os parâmetros calculados. Logo, em algumas imagens o corpo destes protozoários surge ligeiramente desfocado de molde a os cílios aparecerem o mais bem focados possível.

- No caso dos protozoários ciliados sésseis com mionema (*V. microstoma*, *V. convallaria* e *Zoothamnium*) o problema referido no ponto anterior também surge, com a dificuldade de focagem do mionema do pedúnculo. Optou-se neste caso por separar cada uma destas espécies em 2 classes, consoante o programa reconhecia o mionema ou não. Deste modo, os protozoários referidos foram classificados em grupos distintos: com pedúnculo e sem pedúnculo.

- Os protozoários ciliados sésseis sem mionema (*Opercularia* e *Epistylis*) foram reconhecidos, pelo programa, sem pedúnculo. Este facto derivou da dificuldade de focar correctamente o pedúnculo dos mesmos e consequentemente do programa o reconhecer.

- No caso das amostras em causa surgiu outro problema: o protozoário *Zoothamnium*, que surge habitualmente em colónia, surgia isolado. Deste modo, a sua identificação correcta torna-se mais difícil uma vez que pode ser facilmente confundido com o protozoário *V. convallaria* e vice-versa. A diferença de posicionamento do núcleo foi utilizada para a identificação, pelo utilizador, destes dois protozoários, contudo nem sempre foi fácil a sua distinção.

As principais conclusões extraídas dos resultados obtidos são as seguintes:

- O programa trabalhou correctamente 248 imagens em 295 testadas, o que implica uma taxa de 84% de imagens correctamente tratadas.

- Destas, o utilizador conseguiu identificar 208. Após a primeira determinação dos valores referentes à técnica de Análise de Componentes Principais (ACP), foram rejeitados 62 imagens de protozoários cujos valores se encontravam fora da área de localização dos mesmos. Procedeu-se então a nova determinação de todos os valores calculados pela técnica ACP para as restantes 146 imagens.

- Os resultados obtidos permitem identificar isoladamente os protozoários seguintes: *Tetrahymena*, *Trachelophyllum*, *Colpidium*, *Prorodon*, *Glaucoma* e *Opercularia* que se encontram completamente isolados. Os protozoários *V. microstoma* com pedúnculo, *V. convallaria* com pedúnculo, *Zoothamnium* com pedúnculo, *V. convallaria*, *Zoothamnium*, *V. microstoma*, *Epistylis* e *Prorodon* encontram-se razoavelmente bem separados.

- Os protozoários *V. convallaria* e *Zoothamnium*, que são morfológicamente muito parecidos, encontram-se com resultados muito idênticos e consequentemente muito próximos nos gráficos. Isto sucede para os dois casos existentes, isto é, quando reconhecido com pedúnculo e sem pedúnculo.

- Os diferentes grupos de protozoários estudados (ciliados nadadores, ciliados sésseis, ciliados móveis de fundo e carnívoros) podem ser, a partir dos resultados obtidos, reconhecidos e identificados.

- O grupo de protozoários ciliados sésseis (*V. microstoma*, *V. convallaria*, *Zoothamnium*, *Epistylis* e *Opercularia*) aparece relativamente bem isolado dos outros grupos de protozoários especialmente quando representado nos eixos 1 e 2, ocupando maioritariamente o quadrante positivo do eixo 1 e do eixo 2. Dado que estes protozoários possuem área e comprimento, maiores que os restantes (*Epistylis*, *V. convallaria*, *Zoothamnium* e *Opercularia* são os protozoários de maiores dimensões desta amostra), a sua posição no eixo 1 é a mais elevada.

- O grupo dos protozoários ciliados sésseis reconhecidos com pedúnculo (*V. microstoma* com pedúnculo, *Zoothamnium* com pedúnculo e *V. convallaria* com pedúnculo), aparecem bem isolados em relação ao resto dos protozoários. Estes protozoários são também os que apresentam valores mais elevados no eixo 1. Refira-se o facto de que o parâmetro que mais influi para este eixo ser o comprimento e estes protozoários possuem elevados comprimentos devido à presença do mionema.

- O grupo dos protozoários ciliados móveis de fundo (*Euplotes*) aparece nos quadrantes negativos de todos os eixos obtidos.

- O grupo dos protozoários ciliados nadadores (*Colpidium*, *Glaucoma*, *Tetrahymena* e *Trachelophyllum*) aparece relativamente bem isolado especialmente quando representado nos eixos 1 e 2, ocupando maioritariamente o quadrante negativo do eixo 1. Dado que estes protozoários possuem área e comprimento, regra geral, menor que os restantes, a sua posição no eixo 1 é a mais baixa.

- O grupo dos protozoários ciliados carnívoros (*Prorodon* e *Litonotus*) aparece relativamente bem isolado quando representado nos eixos 1 e 2, bem como nos eixos 1 e 3, com valores intermédios entre os dois grupos mencionados acima.

- O protozoário sésbil *V. microstoma* encontra-se razoavelmente bem isolado, especialmente quando reconhecido com pedúnculo. Este facto é importante, uma vez que a presença de *V. microstoma* em elevado número, nos tanques de arejamento em fase estacionária, pode ser indicativo de um deficiente arejamento e consequentemente de uma baixa eficiência.

- O protozoário sésbil *Opercularia* encontra-se bem isolado, o que permite, tal como com a *V. microstoma*, indicar o estado de funcionamento de uma ETAR. Quando em número predominante, este protozoário, pode ser indicador de cargas demasiado elevadas, lamas activadas de baixa qualidade, CBO's elevadas (Carência Bioquímica de Oxigénio) e consequentemente uma baixa eficiência.

- Os protozoários indicadores de uma baixa eficiência (*V. microstoma* e *Opercularia*) encontram-se bem isolados, o que pode permitir determinar anomalias no funcionamento de uma ETAR. Apesar de a *V. microstoma* se encontrar algo sobreposta ao *Litonotus*, como este é móvel ao se introduzir o parâmetro mobilidade, num futuro trabalho, poderão ser facilmente separáveis.

4. Estudo da Mobilidade da
Tetrahymena pyriformis em
Contacto com Tóxicos

4.1 Sumário

O objectivo deste trabalho foi o estudo da influência de três tóxicos, cicloheximida, cobre e triton X-100, na mobilidade do protozoário ciliado *Tetrahymena pyriformis* em meio líquido PPY (*Proteose Peptone Yeast Extract Medium*). Foi elaborado, com este intuito, um programa em ambiente *Matlab*, para a determinação da velocidade e número de mudanças de direcção de cada protozoário presente num conjunto de imagens consecutivas.

As principais conclusões obtidas são as seguintes:

A forma das linhas de tendência obtidas foram, regra geral, as teoricamente previstas. Assim notou-se um decréscimo da velocidade de deslocamento das tetrahymenas com o aumento da concentração dos tóxicos utilizados.

Apenas para a concentração mais elevada (75 mg/l) do tóxico triton X-100, se verificou a morte das tetrahymenas, enquanto que, para as concentrações mais altas de cicloheximida (0,05 mg/l) e de cobre (400 mg/l), tal não se verificou o que corrobora o que seria teoricamente esperado.

Os resultados obtidos para o número de mudanças de direcção encontram-se fortemente dependentes do número de *Tetrahymena pyriformis* presente em cada concentração de tóxico. Assim sendo, não foi possível retirar conclusões definitivas.

A principal ilação a tirar deste trabalho é que a mobilidade dos protozoários pode ser utilizada como um bom indicador biológico de poluição, uma vez que, é um bom indicador da presença e da concentração de tóxicos, estando estes dois parâmetros inversamente relacionados.

4.2 Introdução

A presença de substâncias poluentes no ambiente pode ter consequências muito nefastas nos seres vivos e em última análise, no próprio Homem. É assim, de primordial importância saber aferir a qualidade de um determinado local ou ambiente. Dentro das substâncias poluentes mais comuns e prejudiciais encontram-se os tóxicos produzidos por diversas indústrias. Sabe-se que um tóxico é-o para uma determinada espécie e pode não o ser para outras, bem como afectar negativamente cada espécie de um modo quantitativo diverso. Isto é, uma espécie pode não ser sensível a um determinado tóxico (a uma dada concentração) enquanto outra pode ser ligeiramente afectada e outra ainda pode ser severamente afectada. Entre os seres vivos mais sensíveis à presença de tóxicos encontram-se os protozoários que são afectados a concentrações bastante baixas, na ordem dos poucos mg/l ou mesmo µg/l. É por esta razão que os protozoários são largamente utilizados como indicadores biológicos de poluição (IBP's) (Fenchel, 1987).

Existem poucos trabalhos reportados na literatura sobre o estudo quantitativo da mobilidade de protozoários após contacto com tóxicos. Este facto deve-se à dificuldade de calcular a mobilidade de objectos manualmente, em número significativo, e à possibilidade apenas recente de processar e analisar imagens por computador em tempos razoáveis. Assim, os trabalhos reportados são em baixo número, dos quais se realçam os de Tsuchido *et al.* (1994) sobre o efeito do *stress* sobre a mobilidade da *Escherichia coli*, de Lee *et al.* (1994) sobre a locomoção das células do endotélio e de Häder *et al.* (1994, 1996 e 1997 e Lebert *et al.*, 1996 e 1997) sobre a influência da gravipercepção em *Euglena gracilis*. Não foram encontradas referências da velocidade da *Tetrahymena pyriformis* em meio líquido PPY na literatura, contudo é conhecido um estudo sobre o efeito de situações de *stress* na mobilidade da bactéria *Bacillus subtilis* (Tsuchido *et al.*, 1994).

Este trabalho incidiu no caso particular de uma determinada espécie de protozoário ciliado, *Tetrahymena pyriformis*, e no estudo da acção de três substâncias tóxicas: cicloheximida, cobre e triton X-100.

A cicloheximida é um antibiótico e, como tal, actua ao nível da inibição da síntese proteica. Este antibiótico bloqueia a reacção de translocação dos ribossomas sobre o ácido ribonucleico (ARN) mensageiro durante a síntese das proteínas do citosol (parte sólida do citoplasma) (Wistreich *et al.*, 1998). A Figura 4.1 representa a estrutura química da cicloheximida.

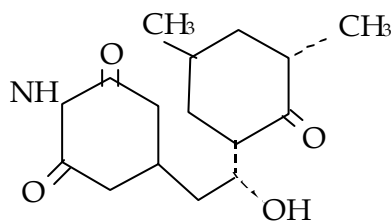


Figura 4.1 - Estrutura química da cicloheximida.

O triton X-100 é um detergente não iónico, mais propriamente, uma amónia quaternária. As amónias quaternárias, como todos os detergentes, possuem uma extremidade hidrofílica polar e uma outra hidrofóbica apolar e são compostos que possuem uma acção muito eficiente sobre os protozoários. O triton X-100 reage com os lípidos das membranas celulares microbianas alterando a permeabilidade e estrutura das mesmas, o que pode implicar a perda de componentes celulares essenciais (Wistreich *et al.*, 1998). A estrutura química do triton X-100 está representada na Figura 4.2.

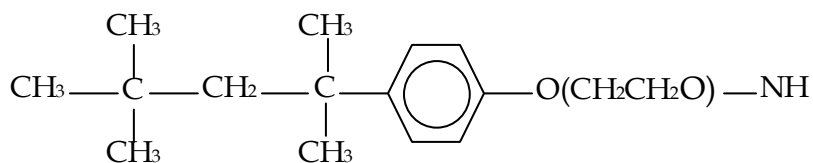


Figura 4.2 - Estrutura química do triton X-100.

O cobre é um metal pesado e actua por precipitação de enzimas e outras proteínas essenciais. No caso específico da *Tetrahymena pyriformis*, um excesso de cobre no meio implica uma elevada concentração deste na membrana interior das mitocôndrias, o que diminui a taxa de fixação do oxigénio da mesma. Isto acontece, uma vez que o cobre, quando em excesso pode implicar a inibição da enzima succinato desidrogenase (SDH) e a oxidação dos transportadores de electrões (Wakatsuki *et al.*, 1986).

No caso presente estudou-se a relação da proporcionalidade entre a concentração destes três tóxicos e um parâmetro que induz, de certa forma, a viabilidade da *Tetrahymena*. Esse parâmetro foi a mobilidade em meio líquido PPY que, no caso da *Tetrahymena*, é propiciado pelos cílios que a cobrem. A Figura 4.3 representa uma *Tetrahymena pyriformis*.

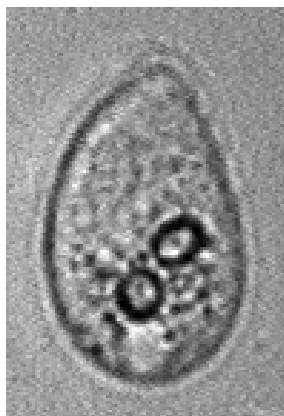


Figura 4.3 - O protozoário ciliado *Tetrahymena pyriformis*.

Este protozoário pertence à classe *Ciliata*, ordem *Hymenostomatida*, família *tetrahymenidae* e tem um comprimento de cerca de 40 a 60 μm . A par das *Paramecium* sp. é um dos protozoários mais bem estudados na microbiologia (Wistreich *et al.*, 1998).

A *Tetrahymena pyriformis* contém duas séries de cílios que começam na base da boca e se estendem até ao outro extremo. Estes podem ser considerados, *grosso modo*, como uma forma mais curta de flagelos. Como estes, são compostos por dois microtúbulos centrais e nove periféricos (duplos), a que se dá o nome de axonema. Este último é recoberto por uma camada contínua com a superfície do protozoário. As estruturas ciliares possuem uma rede coordenadora de fibras que fica imediatamente abaixo da membrana do protozoário.

Os microtúbulos estão associados a proteínas. Algumas servem para ligar os microtúbulos entre si, enquanto outras geram a força de deslocamento que controla o movimento dos cílios. A proteína mais importante é a dineína ciliar que interage com os microtúbulos adjacentes para gerar a força de deslocamento dos microtúbulos. Como estes se encontram ligados, o deslocamento de um microtúbulos em relação aos outros vai provocar um dobramento destes dois (Alberts *et al.*, 1994).



Figura 4.4 - Corte axial de um cílio (Alberts *et al.*, 1994).

A *T. pyriformis* move-se por batimento dos cílios num movimento helicoidal, i.e. o corpo roda sobre o seu próprio eixo avançando na direcção da parte anterior do corpo (Jahn *et al.*, 1979). Sabendo que as células necessitam de força protónica como fonte de energia para o seu movimento, se o microrganismo está em *stress* devido à presença de um tóxico, o seu nível de energia é inferior e conseqüentemente também o será a sua mobilidade.

Existem dificuldades neste estudo da mobilidade, uma vez que o protozoário estudado apresenta um movimento não linear. Outra dificuldade é o facto de o movimento ser monitorizado ao longo de um plano e, por isso mesmo, não ser possível calcular a componente normal do movimento a esse plano. Foi por isso necessário ter estes aspectos em atenção na recolha das imagens a serem analisadas. É preciso também ter em atenção o movimento das células mortas devido aos movimentos *brownianos*.

As imagens foram gravadas em vídeo, com velocidade de gravação de 25 *frames* por segundo e foram, posteriormente, digitalizadas a intervalos de tempo de 80 ms (de 2 *frames* em 2 *frames*). As figuras seguintes apresentam exemplos de imagens do protozoário *Tetrahymena pyriformis*. Estas figuras representam imagens consecutivas de conjunto de imagens, de espaçamento temporal igual a 80 ms.

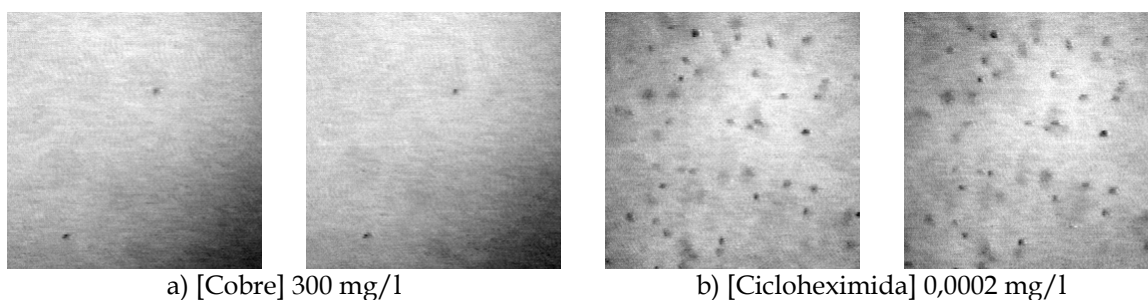


Figura 4.5 - Imagens consecutivas de *Tetrahymena pyriformis*.

Devido ao facto de os protozoários aparecerem definidos por um número extremamente baixo de pixels, nas imagens digitalizadas, foi elaborado um programa (*mudar.m*) para recolher parte da imagem, aumentá-la e guardá-la como uma nova imagem.

O programa (*Proto_v8*) foi concebido para tratar automaticamente cada conjunto de imagens a um determinado espaçamento temporal (por omissão definido a 80 ms). O programa é constituído por várias subrotinas e pode ser dividido em seis partes principais.

- De início, as imagens são filtradas, de modo a evidenciar os protozoários. É utilizado, para este propósito, um filtro "*Mexican hat*" (Russ, 1995) de 17x17 pixels de tamanho de caixa.

- Durante a aquisição das imagens surge um ruído que se pode considerar periódico. Para identificar e eliminar esse ruído o programa determina a transformada rápida bidimensional de Fourier (Jähne, 1995) da imagem e diminui a amplitude dos picos correspondentes nesta imagem. Para se obter a imagem inicial livre de ruído o programa procede então ao cálculo da transformada inversa da imagem das transformadas tratada.

- Para a binarização da imagem dos protozoários, é necessário determinar o limite de detecção óptimo. Este é calculado pela multiplicação por um factor (0,8) da média da imagem. Os pixels com valor de cinzento inferior ao limite são considerados como objectos (valor 1) e o resto, de valor superior, como fundo (valor 0).

- Segue-se uma fase de limpeza da imagem binária, em que se procede à eliminação dos objectos que intersectam a fronteira da imagem e dos objectos com área inferior a 50 pixels ou superior a 500 pixels. Deste modo restam os protozoários integralmente reconhecidos na imagem binária.

- Para a determinação dos parâmetros estudados é necessário conhecer a posição de cada protozoário nas duas imagens consecutivas. Para o efeito, é obtida uma máscara das imagens binárias, que apenas contém as zonas comuns a ambas (referentes ao mesmo protozoário). Com esta máscara, é possível identificar cada protozoário presente em ambas as imagens.

- A partir deste momento inicia-se a análise de imagem no sentido mais restrito. É calculada a localização de cada protozoário nas imagens binárias consecutivas e, com este parâmetro, podem-se determinar os valores da velocidade de deslocamento e da direcção do movimento dos protozoários.

4.3 Programa

Os programas referidos a seguir foram desenvolvidos para correrem em ambiente *Matlab* 5.1. A descrição dos mesmos concentra-se nas operações ou sequência de operações realizadas sobre as imagens de um modo mais geral e compreensível. Não são, por isso, referenciadas todas as pequenas instruções internas do programa. As funções próprias do *Matlab* encontram-se melhor explicitadas no Apêndice E.

Nas imagens digitalizadas os protozoários aparecem muito pequenos e definidos por um número extremamente baixo de pixels. Houve assim necessidade de aumentar o tamanho dos mesmos para melhorar a veracidade dos parâmetros calculados. Este propósito foi atingido com a programação de uma pequena rotina (*mudar.m*) que, seleccionava parte da imagem, aumentava-a e guardava-a como uma nova imagem. Assim, a todas as imagens digitalizadas, de formato 512x512, foi recolhida a zona de 200 a 455 pixels, obtendo-se deste modo uma matriz quadrada de 256x256 pixels. Essa matriz foi aumentada para um tamanho de 512x512 utilizando o método bicúbico (The MathWorks, 1997) para a intrapolação dos valores em falta. Este método calcula o valor de cada pixel da nova matriz através de uma média pesada dos valores da caixa de 4x4 pixels à volta do pixel correspondente da matriz original. Deste modo obteve-se um ganho de 2x2, isto é de 4 vezes no tamanho dos protozoários.

Este programa foi concebido para o tratamento automático de todas as imagens presentes numa determinada directoria. Deste modo, necessita de um ficheiro contendo os nomes das imagens a serem tratadas e de outro ficheiro contendo o novo nome das mesmas a serem gravadas. Ambos os programas se situam na directoria onde se encontram as imagens e possuem um formato de ficheiro de dados de *Matlab*, de extensão *.mat*. Deste modo, o ficheiro das imagens iniciais (*buscam.mat*) contém uma variável com os nomes das imagens e o ficheiro das imagens tratadas (*gravam.mat*) contém outra variável com os nomes das imagens finais. Este programa, por omissão, lê as imagens iniciais em formato *tiff* e escreve as imagens finais em formato *bmp*.

O programa *Proto_v8* possui vários sub-programas de formato *Matlab* (*.m*). Foi concebido para tratar automaticamente cada conjunto de imagens a um determinado espaçamento temporal (por omissão: a 80 ms). Tal como no programa anterior necessita de dois ficheiros (*busca.mat* e *grava.mat*) compreendendo os nomes das imagens a serem tratadas e os nomes dos ficheiros de

resultados. Cada ciclo do programa trata e compara duas imagens consecutivas do conjunto de imagens, logo, sabendo que este tem 6 imagens consecutivas, o programa efectua 5 ciclos automaticamente, para cada conjunto de imagens.

Primeiramente, as imagens são adquiridas e filtradas, de modo a evidenciar os protozoários, que foi efectuado pelo passo seguinte:

1. Aquisição das imagens em formato *tiff*, *bmp* ou *jpeg*. Os valores desta imagem são normalizados, situando-se os seus valores entre 0 e 1.

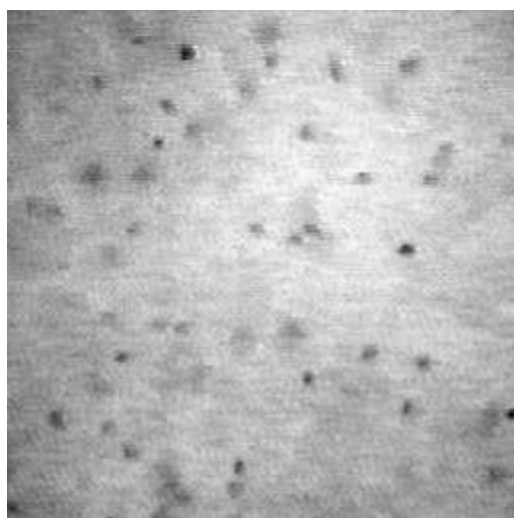


Figura 4.6 - Imagem resultante da aquisição (ponto 1).

2. Utilização de um filtro “*Mexican hat*” (Russ, 1995) de 17x17 pixels. O filtro utilizado de tamanho de caixa 17x17 é o seguinte:

0	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0
0	0	-1	-1	-1	-2	-3	-3	-3	-3	-3	-2	-1	-1	-1	0	0
0	0	-1	-1	-2	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-2	-1	-1	0	0	0
0	-1	-1	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-2	-3	-3	-3	-2	-1	-1	0
0	-1	-2	-3	-3	-3	0	2	4	2	0	-3	-3	-3	-2	-1	0
-1	-1	-3	-3	-3	0	4	10	12	10	4	0	-3	-3	-3	-1	-1
-1	-1	-3	-3	-2	2	10	18	21	18	10	2	-2	-3	-3	-1	-1
-1	-1	-3	-3	-3	4	12	21	24	21	12	4	-3	-3	-3	-1	-1
-1	-1	-3	-3	-2	2	10	18	21	18	10	2	-2	-3	-3	-1	-1
-1	-1	-3	-3	-3	0	4	10	12	10	4	0	-3	-3	-3	-1	-1
0	-1	-2	-3	-3	-3	0	2	4	2	0	-3	-3	-3	-2	-1	0
0	-1	-1	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-2	-3	-3	-3	-2	-1	-1	0
0	0	-1	-1	-2	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-2	-1	-1	0	0
0	0	-1	-1	-1	-2	-3	-3	-3	-3	-3	-2	-1	-1	-1	0	0
0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	0

A representação gráfica do filtro está apresentada a seguir:

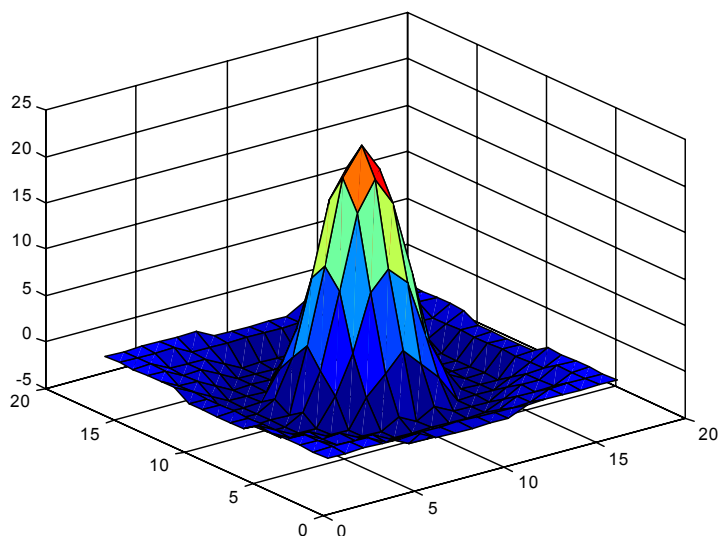


Figura 4.7 - Representação gráfica do filtro "Mexican hat" de 17x17.

As imagens resultantes da aplicação do filtro "Mexican hat" possuem um fundo uniforme, no qual todas as alterações de luminosidade do fundo inicial foram retiradas. Por outro lado, os objectos presentes surgem mais contrastados, nomeadamente os protozoários que aparecem num tom mais escuro do que o fundo.

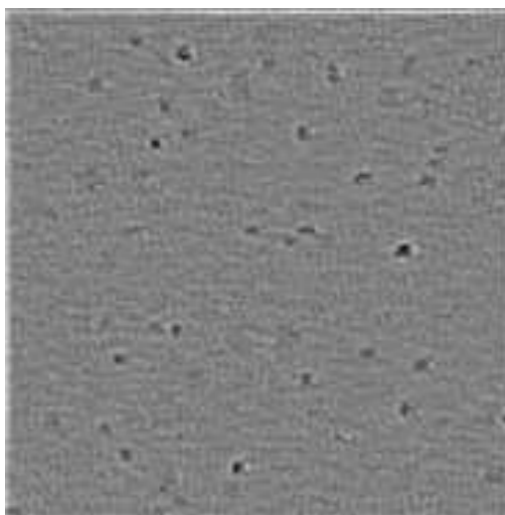


Figura 4.8 - Imagem resultante do filtro "Mexican hat" (ponto 2).

Durante a aquisição das imagens, directamente do vídeo, surge nas mesmas um ruído que se pode considerar periódico. Isto é, um ruído que é comum a toda a imagem e pode ser descrito,

em processamento de imagens no domínio de frequência, por uma amplitude e um ângulo, sendo que a amplitude será sempre de valor elevado em relação ao resto da imagem. A caracterização de uma imagem no domínio do espaço em termos de frequência pode ser obtida a partir das transformadas de Fourier dessa imagem (Jähne, 1995).

O teorema de Fourier afirma que é possível obter qualquer função unidimensional, $f(x)$, como a soma de uma série de termos de senos e co-senos de frequência crescente. A transformada de Fourier de $f(x)$, $F(u)$, descreve cada termo de frequência que deve ser somado para se obter $f(x)$:

$$F(u) = \int f(x)e^{-2\pi iux} dx \quad (7.1)$$

O uso da notação exponencial assenta na identidade matemática:

$$e^{-2\pi iux} = \cos(2\pi ux) - i \sin(2\pi ux) \quad (7.2)$$

Uma das características mais importantes desta transformada é que, sabendo-se $F(u)$ pode-se recuperar, do mesmo modo, $f(x)$:

$$f(x) = \int F(u)e^{2\pi iux} dx \quad (7.3)$$

Estas duas equações são denominadas respectivamente por transformada de Fourier e transformada inversa de Fourier. A função $f(x)$ é, de um modo geral, uma função de números reais e a transformada, $F(u)$, uma função de números complexos. É, usualmente, mais indicado representar a função transformada na sua representação polar:

$$F(u) = |F(u)| e^{i\phi(u)} \quad (7.4)$$

Em que $|F(u)|$ é a amplitude e ϕ é a fase.

Uma representação de uma função degrau unitário e dos termos da respectiva transformada de Fourier, encontra-se de seguida:

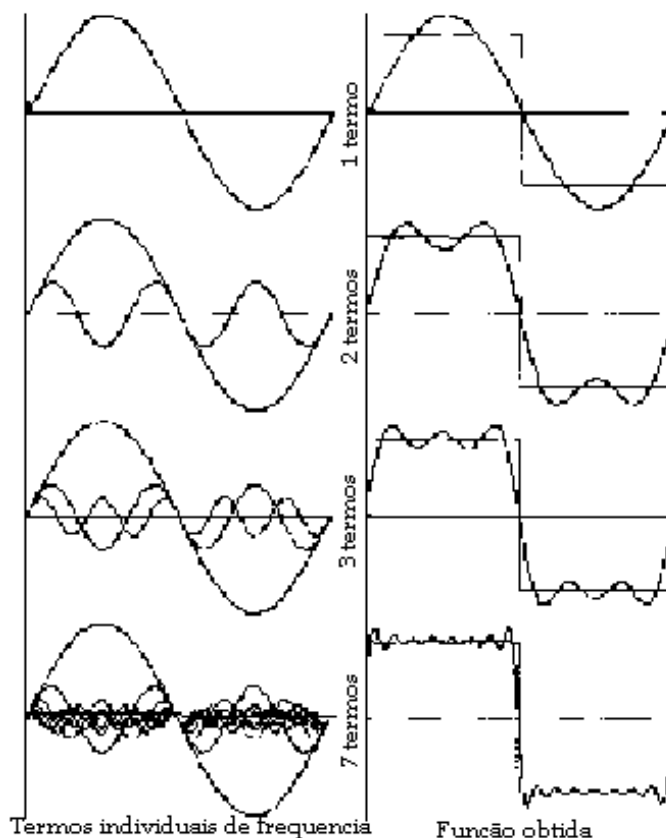


Figura 4.9 - Função degrau e respectivos termos da transformada de Fourier (Russ, 1995).

Na prática, não se faz uso da notação contínua, mas sim da notação discreta:

$$F(u) = \frac{\sum f(x)e^{-\frac{2\pi iux}{N}}}{N} \quad (7.5)$$

e,

$$f(x) = \sum F(u)e^{\frac{2\pi iux}{N}} \quad (7.6)$$

Em ambos os casos, contínua ou discreta, uma extensão directa de unidimensional para bidimensional pode ser obtida por substituição das funções $f(x)$ por $f(x,y)$ e de $F(u)$ por $F(u,v)$ e efectuando a soma dos termos sobre duas variáveis em vez de uma. Neste caso é possível efectuar a transformada unidireccional sobre cada linha horizontal, produzindo um resultado intermédio de números complexos. Seguidamente, outra série unidimensional pode ser obtida em cada linha vertical, obtendo-se finalmente a transformada bi-direccional.

Para identificar e eliminar esse ruído periódico o programa efectua as operações seguintes:

3. Determinação da transformada rápida bidimensional de Fourier da imagem, através de uma função própria do *Matlab*: `fft2`. O resultado da aplicação desta transformada de Fourier a uma

imagem é uma matriz composta por valores complexos em cada elemento. Estes valores representam a amplitude e a fase dos sinais, sendo que a amplitude (A) é dada pela expressão

$$\sqrt{\text{real}^2 + \text{imaginária}^2} \text{ e a fase } (\phi) \text{ é dada pela expressão } \text{tg}^{-1}\left(\frac{\text{sen}(\phi)}{\text{cos}(\phi)}\right), \text{ ou seja } \text{tg}^{-1}\left(\frac{\text{imaginária}}{\text{real}}\right).$$

4. Deslocamento dos quadrantes da matriz resultante da aplicação da *fft2* para obter uma imagem centrada. Isto pode ser obtido com recurso a uma função própria do *Matlab*: *fftshift*.

Determinação da matriz das amplitudes e da matriz das fases. Para o efeito, foram utilizadas funções próprias do *Matlab*: *abs* (ponto 5) e *angle* (ponto 6):

5. Utilização da função *abs* para a determinação da matriz das amplitudes.

6. Utilização da função *angle* para a determinação da matriz das fases.

7. Identificação dos picos da transformada rápida bidimensional de Fourier responsáveis pelo ruído periódico que se destacam do resto da imagem por possuírem uma amplitude muito mais elevada e podem ser, desta forma, reconhecidos.

A eliminação do ruído periódico deve ser efectuada com o cuidado de se diminuir o valor da amplitude, mas não alterar a fase do ruído, uma vez que, esta última guarda a informação do local do mesmo. Assim, e estando estas últimas informações sobre a forma de um complexo imaginário, foi mantida a fase do mesmo, isto é, a relação entre parte real e imaginária, e a amplitude foi diminuída através das seguintes operações:

8. Aplicação de uma operação de abertura em escala de cinzentos aos picos da matriz das amplitudes, sendo o elemento estruturante um círculo de diâmetro de 6 pixels, que se encontra representado de seguida:

0	0	1	1	0	0
0	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	0
0	0	1	1	0	0

Esta operação resulta da aplicação de uma erosão em escala de cinzentos seguida de uma dilatação em escala de cinzentos, com o elemento estruturante anterior. Isto vai permitir uma diminuição considerável dos picos da matriz das amplitudes.

9. Cálculo da nova matriz da transformada rápida bidimensional de Fourier, sem os picos referentes ao ruído periódico. Este passo é conseguido com recurso à nova matriz das amplitudes e à matriz das fases. A partir destas duas matrizes pode-se reconstruir a matriz dos números complexos correspondentes. A parte real do número complexo é dada pela expressão $\text{Acos}(\phi)$ e a parte imaginária por $\text{tg}(\phi) \times \text{parte real}$.

Cálculo da imagem resultante do ponto 2 desprovida de ruído de fundo: Recorre-se a duas funções próprias do *Matlab*: *fftshift* e *ifft2*.

10. Utilização da função *fftshift* para voltar a reposicionar os quadrantes iniciais.

11. Utilização da função *ifft2* para o cálculo da transformada inversa.

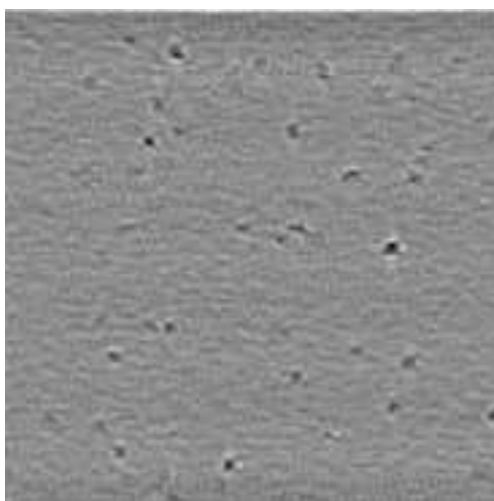


Figura 4.10 - Imagem resultante da função *ifft2* (ponto 11).

Além do ruído e do fundo da imagem também outras informações podem ser eliminadas, mas desde que seja efectuada uma correcta identificação dos picos, não são, regra geral, muito significativas.

Para o reconhecimento e binarização da imagem dos protozoários, é necessário determinar o limite de detecção de cor óptimo, o que é atingido do seguinte modo:

12. Cálculo do limite de detecção de cor pela multiplicação por um factor (0,8) da média da imagem. Este método é bastante simples e rápido, e propicia um bom reconhecimento de objectos em imagens com um fundo uniforme, uma vez que as diferenças de luminosidade do fundo foram anteriormente eliminadas. Não foi necessário assim utilizar métodos de determinação do limite de detecção de cor mais morosos, tais como o método de Otsu (1979).

13. Criação de uma máscara dos protozoários presentes nas imagens. Os pixels com valor de cinzento inferior ao limite são considerados como objectos e o resto, de valor superior, como fundo, criando-se assim uma imagem binária de fundo com valor 0 e protozoários com valor 1.

Segue-se uma fase de limpeza da imagem binária. Nesta fase podem-se considerar os seguintes passos:

14. Para o reconhecimento de cada objecto é utilizada uma operação própria do *Matlab*, *bwlabel*, que efectua uma identificação numérica dos objectos: Isto é, identifica cada objecto pela substituição dos valores dum conjunto de pixels ligados por um valor inteiro diferente de objecto para objecto.

15. Eliminação dos objectos que intersectam a fronteira da imagem, isto é, os objectos na fronteira são retirados pela remoção de todos os pixels de valor igual aos pixels presentes na fronteira da imagem.

16. Determinação da área de cada objecto através da função do *Matlab* *bwarea*.

17. Eliminação dos objectos com área inferior a 50 pixels ou superior a 500 pixels de modo a restarem apenas os protozoários na imagem binária.



Figura 4.11 - Imagem da eliminação dos objectos com área maior que 500 ou menor que 50 (ponto 17).

É necessário conhecer a posição de cada protozoário nas duas imagens consecutivas. Assim sendo, são efectuadas as seguintes operações:

18. As duas imagens binárias com os protozoários completamente reconhecidos são então comparadas logicamente e é obtida uma máscara que apenas contém as zonas comuns a ambas (referentes ao mesmo protozoário), através da função lógica *and*.

19. Com esta máscara, cada protozoário presente nas duas imagens pode ser então reconhecido. Este passo efectua-se através de duas operações próprias do *Matlab*: *bwlabel*, que efectua uma identificação numérica dos objectos presentes na máscara e *bwselect* (ponto 20).

20. Utilização da função do *Matlab* *bwselect*, que reconhece em cada uma das imagens o protozoário respectivo, através do número de cada protozoário.

A partir deste momento pode-se considerar terminada a parte do processamento de imagem e inicia-se a análise de imagem propriamente dita. Para este estudo é necessário

determinar a localização de cada protozoário nas imagens binárias consecutivas, tendo sido também calculado o valor da área.

21. O valor da área de cada protozoário é calculado através de uma função própria do *Matlab*: *bwarea*.

22. A localização de cada protozoário, em cada imagem binária consecutiva, é calculada com recurso à determinação dos centróides dos protozoários (momentos de ordem 1, para o eixo dos xx e dos yy). Estes são definidos do seguinte modo (Glasbey, 1994):

Sendo A a matriz binária em causa e i e j os índices de, respectivamente, ordenada e abcissa, e $\text{val}(A(i,j))$ o valor do elemento (i,j) da matriz, vem:

$$m_{10} = \frac{\sum_i \left(\sum_j (i \text{ val}(A(i,j))) \right)}{\sum_i \left(\sum_j (\text{val}(A(i,j))) \right)}, \text{ e} \quad (7.7)$$

$$m_{01} = \frac{\sum_i \left(\sum_j (j \text{ val}(A(i,j))) \right)}{\sum_i \left(\sum_j (\text{val}(A(i,j))) \right)} \quad (7.8)$$

O conjunto destes dois momentos explicita o centróide do protozoário:

$$\text{Centróide} = [m_{01}, m_{10}] \quad (7.9)$$

O último passo consiste em determinar os valores da velocidade de deslocamento e da direcção do movimento dos protozoários:

23. Com o valor da localização retira-se a velocidade de deslocamento através das seguintes fórmulas:

Sendo Δ_{xx} a diferença (em μm), no eixo dos xx, entre o centróide do protozoário nas duas imagens consecutivas (A e B), vem:

$$\Delta_{xx} = [(m_{01})_B - (m_{01})_A] \times 2,645 \quad (7.10)$$

Da mesma maneira para o eixo dos yy:

$$\Delta_{yy} = [(m_{10})_B - (m_{10})_A] \times 2,745 \quad (7.11)$$

sendo que os valores 2,645 e 2,745 são os factores de calibração horizontal e vertical de pixels para μm , respectivamente.

A velocidade (em $\mu\text{m/s}$) é dada por:

$$\text{Velocidade} = \frac{\sqrt{\Delta x x^2 + \Delta y y^2}}{\text{N}^\circ \text{ de frames de distância} / 25} \quad (7.12)$$

A direcção do movimento (em graus) é calculada do seguinte modo:

$$\text{se } \Delta x x > 0 \ \& \ \Delta y y > 0 \Rightarrow \text{Direcção} = \text{atan}\left(\frac{\Delta y y}{\Delta x x}\right) \times \frac{90}{\pi/2} \quad (7.13)$$

$$\text{se } \Delta x x < 0 \ \& \ \Delta y y > 0 \Rightarrow \text{Direcção} = 180 + \text{atan}\left(\frac{\Delta y y}{\Delta x x}\right) \times \frac{90}{\pi/2} \quad (7.14)$$

$$\text{se } \Delta x x < 0 \ \& \ \Delta y y < 0 \Rightarrow \text{Direcção} = 180 + \text{atan}\left(\frac{\Delta y y}{\Delta x x}\right) \times \frac{90}{\pi/2} \quad (7.15)$$

$$\text{se } \Delta x x > 0 \ \& \ \Delta y y < 0 \Rightarrow \text{Direcção} = 360 + \text{atan}\left(\frac{\Delta y y}{\Delta x x}\right) \times \frac{90}{\pi/2} \quad (7.16)$$

$$\text{se } \Delta x x == 0 \ \& \ \Delta y y > 0 \Rightarrow \text{Direcção} = 90 \quad (7.17)$$

$$\text{se } \Delta x x == 0 \ \& \ \Delta y y < 0 \Rightarrow \text{Direcção} = 270 \quad (7.18)$$

$$\text{se } \Delta x x < 0 \ \& \ \Delta y y == 0 \Rightarrow \text{Direcção} = 180 \quad (7.19)$$

$$\text{se } \Delta x x > 0 \ \& \ \Delta y y == 0 \Rightarrow \text{Direcção} = 0 \quad (7.20)$$

Por último, os resultados são guardados em ficheiros texto (.txt), escolhidos pelo utilizador, através de uma função própria do *Matlab*: *diary*.

Um organigrama do programa é apresentado de seguida:

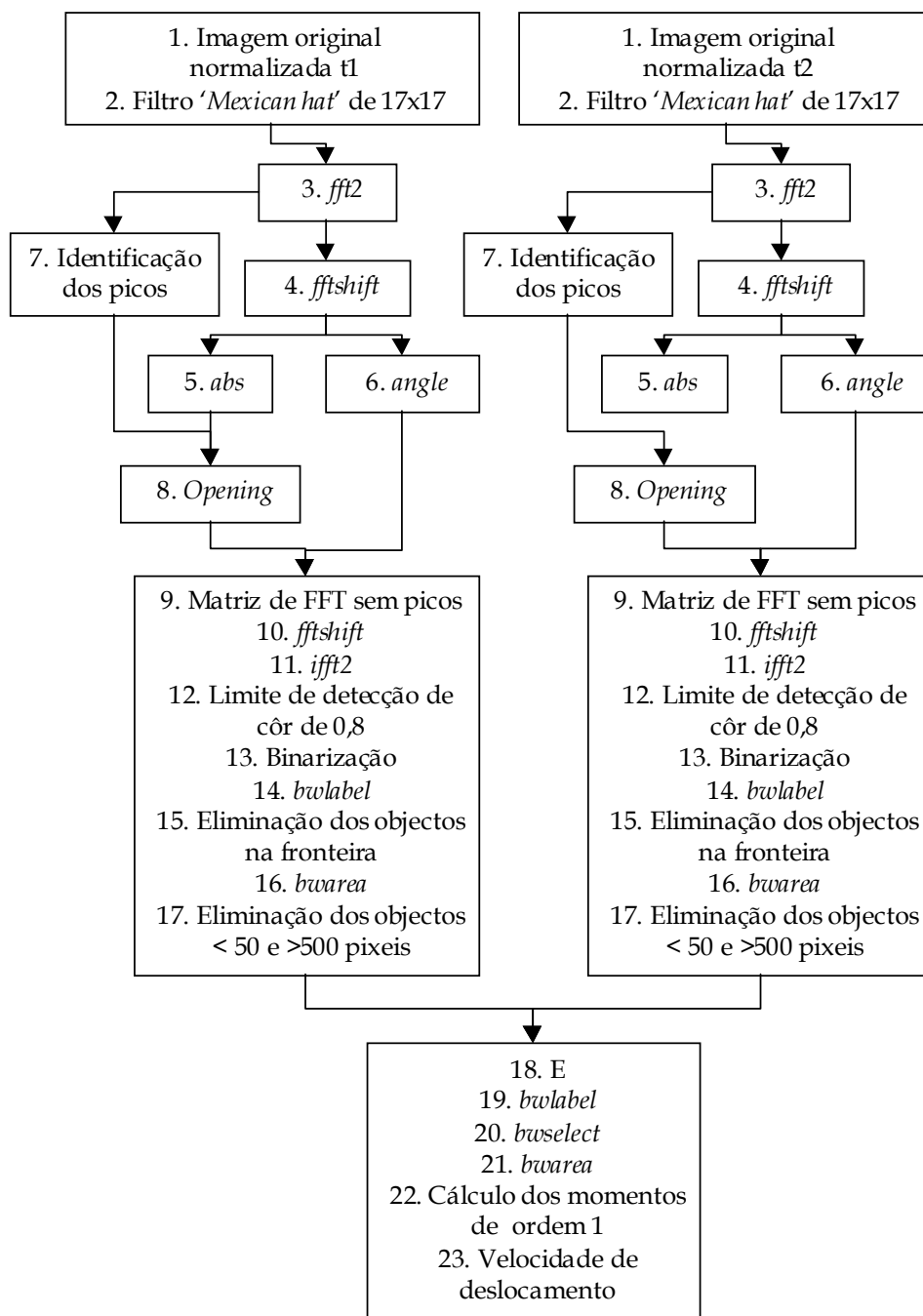


Figura 4.12 - Organigrama do programa *Proto_v8*.

4.4 Resultados e Discussão

No decurso deste trabalho foram recolhidos cinco conjuntos de imagens do protozoário *Tetrahymena pyriformis*, cada um com seis imagens, para cada concentração de tóxico. As imagens de cada conjunto de protozoários foram obtidas com um espaçamento de 2 *frames* em fita magnética gravada a 25 *frames* por segundo. Isto equivale a dizer que o tempo que medeia entre cada imagem digitalizada de um protozoário é de 2/25 s, ou seja 80 ms.

Como os ensaios para as diferentes concentrações foram efectuados em duplicado foram digitalizadas um total de 150 conjuntos de imagens. No total, os resultados resultam da média dos valores de velocidade e mudanças de direcção instantâneas de 1321 protozoários, sendo que, para cada protozoário esses valores foram lidos em média 4 vezes, o que equivale a um total de cerca de 5300 valores.

Apenas os principais resultados obtidos se encontram expostos de seguida, sendo que os dados originais não se encontram referidos devido ao elevado número dos mesmos.

A velocidade média de deslocamento dos protozoários sem tóxico, calculada a partir de 349 protozoários num total de 1429 medições instantâneas de velocidade é de $116,90 \pm 6,65 \mu\text{m/s}$. Este valor foi utilizado como valor zero de concentração para os diferentes tóxicos utilizados: cicloheximida, cobre e triton X-100.

Para a os ensaios com cicloheximida (0,0002; 0,001; 0,002; 0,01 e 0,05 mg/l) após 24 horas os resultados encontram-se na Tabela 4.I:

Tabela 4.I - Valores da média das velocidades e respectivo intervalo de confiança (95%) para a cicloheximida.

[Cicloheximida] (mg/l)	Velocidade ($\mu\text{m/s}$)
0	117 ± 7
0,0002	122 ± 11
0,001	95 ± 8
0,002	95 ± 8
0,01	76 ± 7
0,05	77 ± 8

A representação gráfica das velocidades em função da concentração, com os respectivos intervalos de confiança, encontra-se na Figura 4.13.

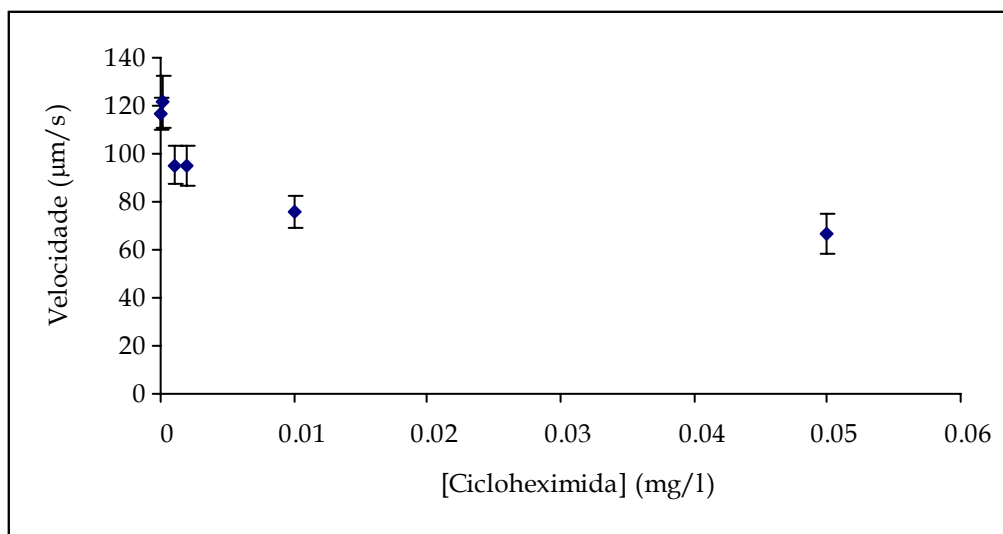


Figura 4.13 - Representação gráfica das velocidades e intervalos de confiança para a cicloheximida.

A representação gráfica das velocidades em função da concentração, com a linha de tendência associada, encontra-se na Figura 4.14.

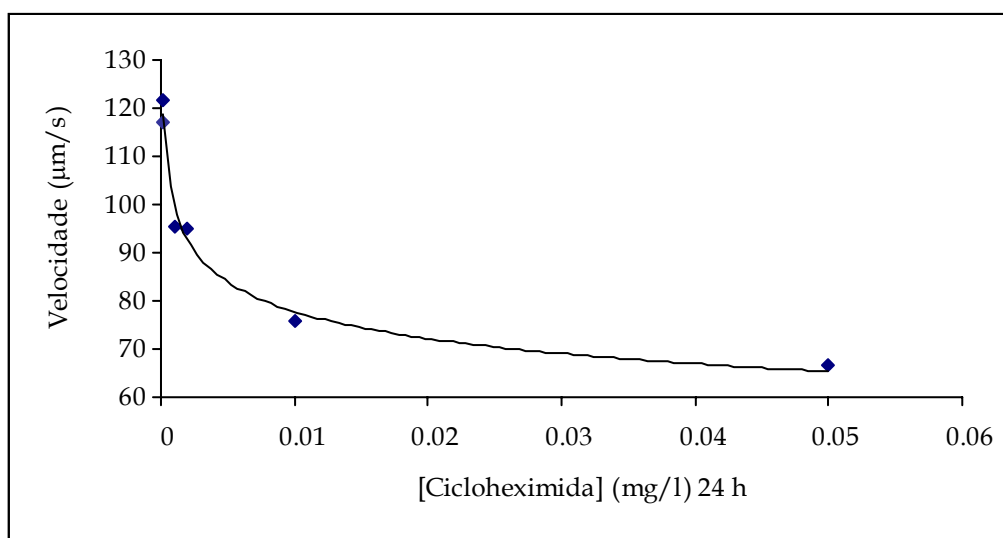


Figura 4.14 - Representação gráfica das velocidades e curva de tendência para a cicloheximida.

Dos resultados expostos na Tabela 4.I pode-se retirar que os valores da velocidade da *Tetrahymena pyriformis* diminuem com o aumento da concentração da cicloheximida, tal como seria de esperar teoricamente. Analisando a Figura 4.14, pode-se concluir que o decréscimo da mobilidade é mais acentuado para as concentrações mais baixas de cicloheximida e tende a estabilizar para os valores mais altos da mesma. É possível ainda retirar duas ilações destes resultados: para concentrações superiores a 0,01 mg/l a mobilidade do protozoário é pouco

alterada com o aumento da concentração e essa mobilidade cifra-se num valor próximo de 70 $\mu\text{m/s}$.

Pela observação da Tabela 4.I e da Figura 4.13 pode-se constatar que os valores dos erros são relativamente elevados, entre 5 a 13% do valor das velocidades. Isto deve-se, principalmente, ao facto de as imagens dos protozoários terem sido adquiridas com uma ampliação muito baixa (40x), do que resulta uma representação dos protozoários num número não muito elevado de pixels. Tal facto, contribui para maiores erros na representação dos protozoários e, conseqüentemente, na descrição da sua localização exacta, logo também no cálculo da velocidade.

Para os ensaios com cobre (50, 100, 200, 300 e 400 mg/l) após 24 horas, os resultados foram os seguintes:

Tabela 4.II - Valores da média das velocidades e respectivos intervalos de confiança (95%) para o cobre.

[Cobre] (mg/l)	Velocidade ($\mu\text{m/s}$)
0	117 ± 7
50	97 ± 8
100	96 ± 16
200	85 ± 10
300	84 ± 15
400	74 ± 13

A representação gráfica das velocidades em função da concentração, com os respectivos intervalos de confiança, encontra-se na Figura 4.15.

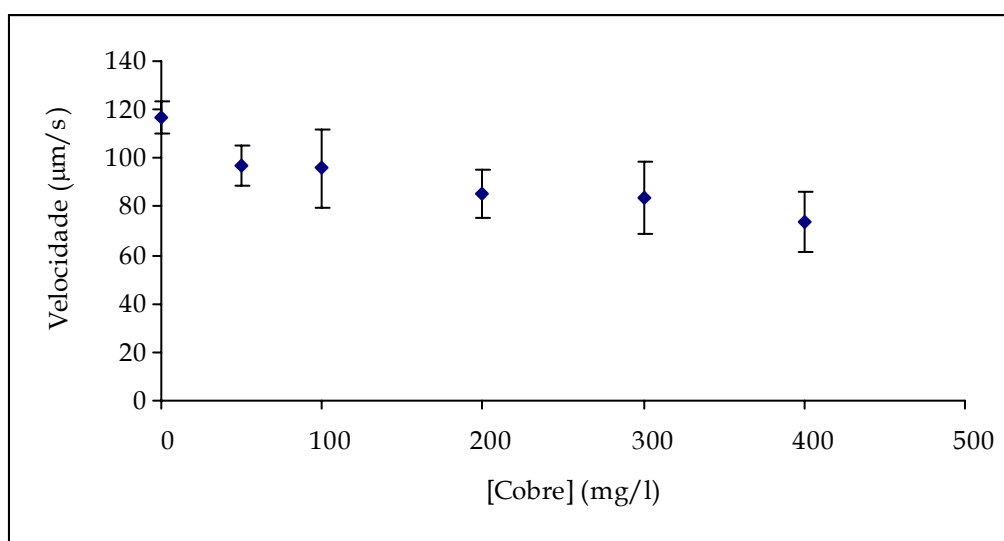


Figura 4.15 - Representação gráfica das velocidades e intervalos de confiança para o cobre.

A representação gráfica das velocidades em função da concentração, com a linha de tendência associada, encontra-se na Figura 4.16.

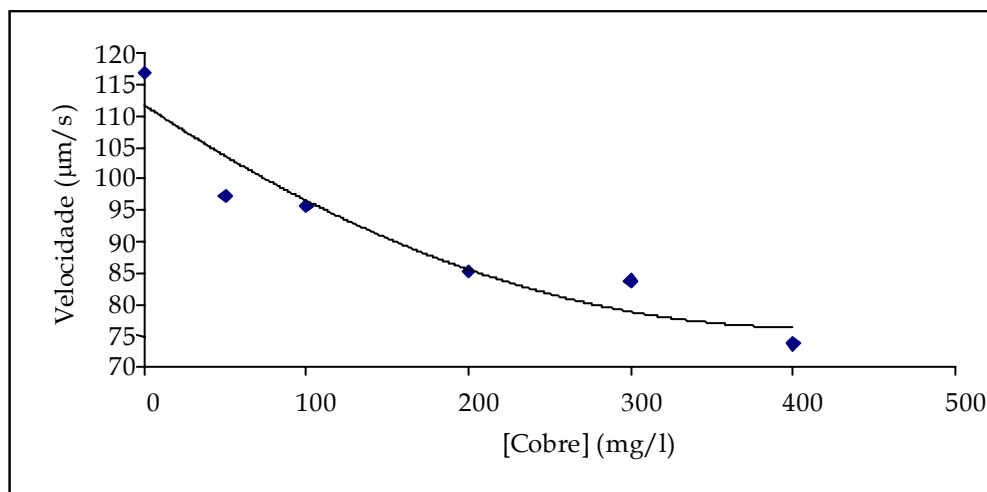


Figura 4.16 - Representação gráfica das velocidades e curva de tendência para o cobre.

Dos resultados expostos na Tabela 4.II pode-se retirar que os valores da velocidade da *Tetrahymena pyriformis* diminuem com o aumento da concentração do cobre, tal como seria de esperar teoricamente. Analisando a Figura 4.16, pode-se concluir que o decréscimo da mobilidade é mais acentuado para as concentrações mais baixas do cobre e tende a estabilizar para os valores mais altos das mesmas, tal como com a cicloheximida. Para concentrações superiores a 300 mg/l a mobilidade do protozoário é relativamente pouco alterada com o aumento da concentração sendo que essa mobilidade se situa num valor próximo de 75 μm/s.

Pela observação da Tabela 4.II e da Figura 4.15 pode-se constatar que os valores dos erros são relativamente elevados, entre 5 a 18% do valor das velocidades. Tal como referido anteriormente, este facto deve-se a uma representação não óptima dos protozoários (em número não muito elevado de pixels).

Para os ensaios com Triton X-100 (12,5 , 25, 50 e 75 mg/l) após 24 horas, os resultados foram os seguintes:

Tabela 4.III - Valores da média das velocidades e respectivos intervalos de confiança (95%) para o triton X-100.

[Triton X-100] (mg/l)	Velocidade (μm/s)
0	114 ± 7
12,5	126 ± 8
25	107 ± 9
50	93 ± 11
75	42 ± 17

A representação gráfica das velocidades em função da concentração, com os respectivos intervalos de confiança, encontra-se na Figura 4.17.

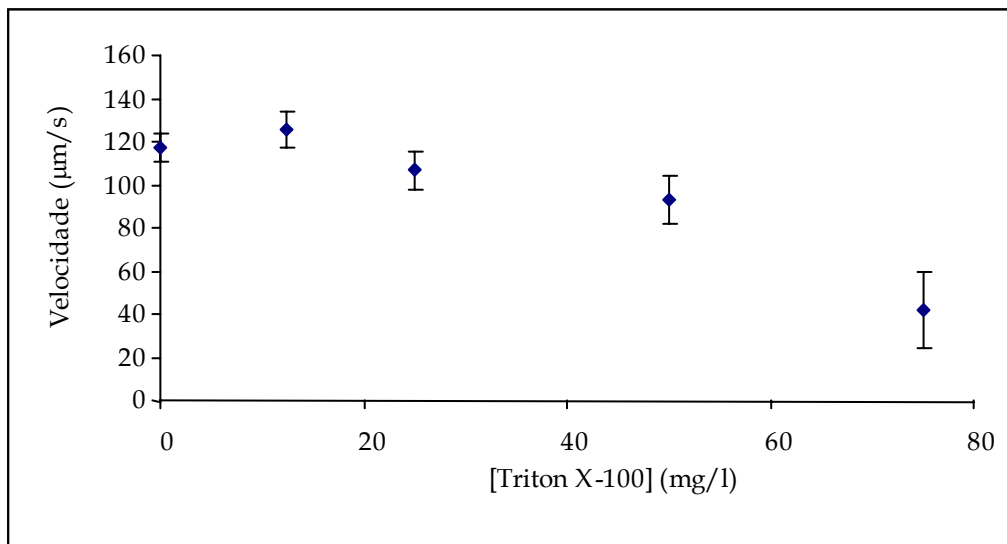


Figura 4.17 - Representação gráfica das velocidades e intervalos de confiança para o triton X-100.

A representação gráfica das velocidades em função da concentração, com a linha de tendência associada, encontra-se na Figura 4.18.

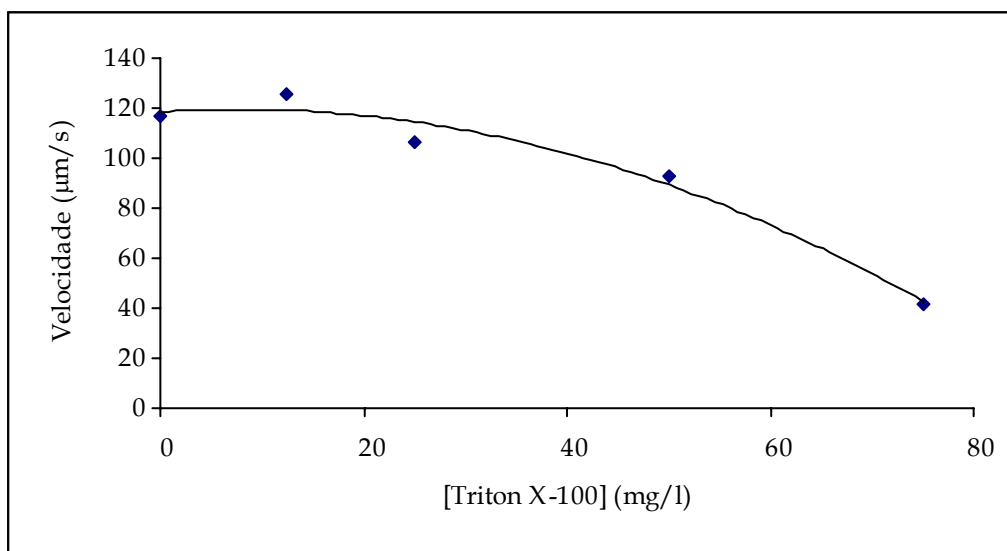


Figura 4.18 - Representação gráfica das velocidades e curva de tendência para o triton X-100.

Dos resultados expostos na Tabela 4.III pode-se retirar que os valores da velocidade da *Tetrahymena pyriformis* diminuem com o aumento da concentração do triton X-100, tal como seria de esperar teoricamente. A forma da linha de tendência da Figura 4.18, parece indicar que

aumentando o valor da concentração de triton X-100 para valores superiores a 75 mg/l a velocidade dos protozoários continuaria a descer. Contudo, tal não é verdade, uma vez que à concentração indicada os protozoários se encontravam mortos. A forma da curva real será, desta forma, diferente da linha de tendência representada no gráfico, que é obtida a partir de poucos valores de concentração do triton X-100

O movimento das tetrahymenas mortas é explicado devido, principalmente, aos movimentos *brownianos*, que no caso presente (observação de protozoários em poços de amostragem) assumem especial importância. Analisando a Tabela 4.III pode-se concluir que os movimentos *brownianos* podem deslocar os protozoários a uma velocidade de 40 $\mu\text{m/s}$.

Pela observação da Tabela 4.III e da Figura 4.17 pode-se constatar que os valores dos erros são elevados, entre 5 a 40% do valor das velocidades. Tal como referido anteriormente, este facto deve-se a uma representação não óptima dos protozoários (em número não muito elevado de pixels).

Estudou-se também a alteração do próprio movimento do protozoário e calculou-se, deste modo, o número de mudanças de direcção dos protozoários. Considerou-se que, entre dois movimentos consecutivos do protozoário, um ângulo superior a 30° indicia mudança de direcção do movimento. Como nem todos os protozoários foram reconhecidos durante todo o período de tempo de um conjunto de imagens, o número de mudanças de direcção, de um dado protozoário, foi normalizado pelo número de leituras de direcção efectuadas ao mesmo.

A representação gráfica do número de mudanças de direcção normalizado, em função da concentração, para os vários tóxicos encontra-se na Figura 4.19, Figura 4.20 e Figura 4.21.

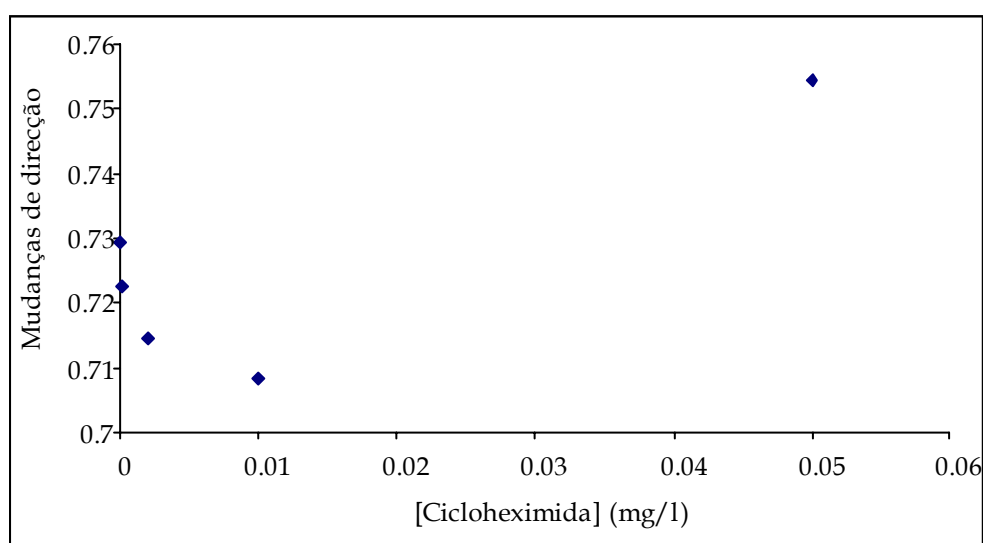


Figura 4.19 - Representação gráfica das mudanças de direcção para a cicloheximida.

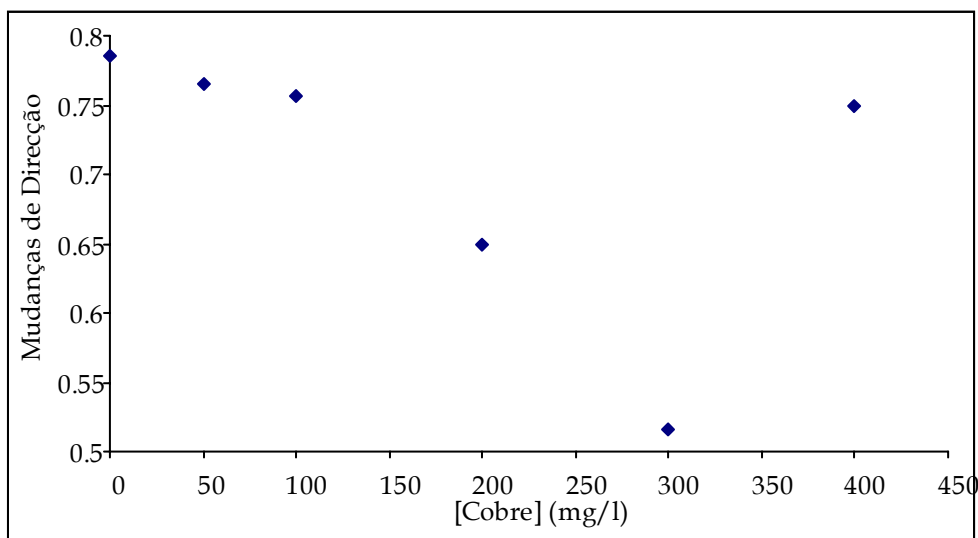


Figura 4.20 - Representação gráfica das mudanças de direção para o cobre.

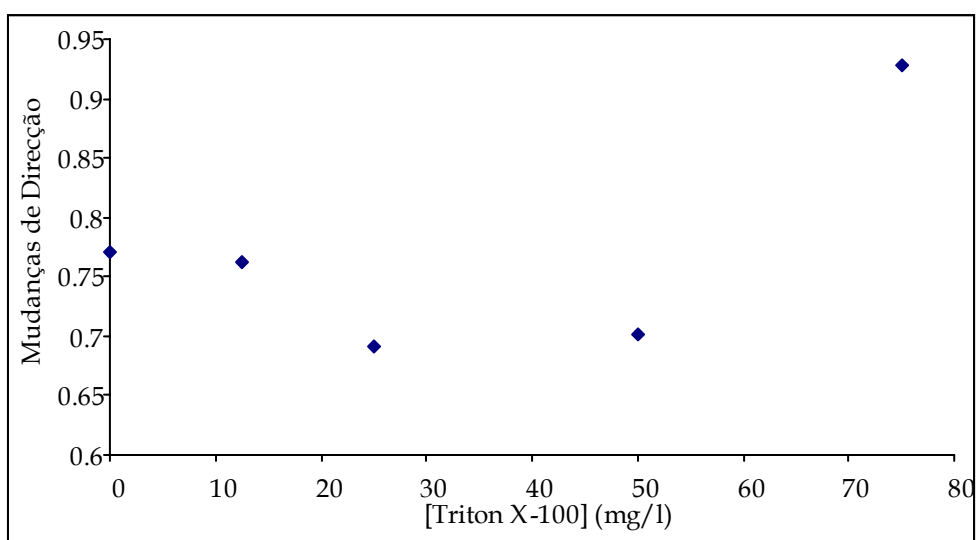


Figura 4.21 - Representação gráfica das mudanças de direção para o triton X-100.

Seria de esperar teoricamente um aumento do número de mudanças de direcção com o aumento da concentração dos tóxicos, o que não sucedeu. De um modo geral notou-se uma tendência de diminuição do número de mudanças de direcção com o aumento da concentração de tóxico, para as concentrações mais baixas e um aumento para as concentrações mais elevadas. Tal facto pode ser explicado pela conjugação de dois factores.

O primeiro factor refere-se ao facto de os protozoários presentes nos poços de amostragem para as concentrações de tóxico menores ser muito elevado. Isto implicou que, independentemente da acção de qualquer tóxico, o movimento dos protozoários ser muito

irregular tendo de constantemente mudar a direcção do seu movimento de modo a evitar os protozoários vizinhos. Conforme a concentração dos tóxicos era maior, o número de protozoários presentes decrescia exponencialmente. Para as concentrações mais elevadas de tóxicos, os protozoários moviam-se livremente, isto é, sem terem de evitar os protozoários vizinhos. Nesta gama de concentrações é notória a influência do tóxico no movimento do protozoário, com o aumento do número de mudanças de direcção.

O segundo factor prende-se com a representação dos protozoários num número não muito elevado de pixeis, o que contribui para maiores erros na representação dos protozoários e consequentemente no cálculo da sua localização e direcção de movimento.

Por todos estes factores, os resultados obtidos, no que respeita ao número de mudanças de direcção, é inconclusivo.

4.5 Conclusões

Este trabalho teve como objectivo estudar a influência de três tóxicos, cicloheximida, cobre e triton X-100, na mobilidade do protozoário ciliado *Tetrahymena pyriformis*. Foram determinados, para o efeito, dois parâmetros relacionados com a mobilidade do protozoário: velocidade e número de mudanças de direcção. Estes resultados, em termos absolutos, reportam-se apenas ao meio líquido *PPY* uma vez que a velocidade de deslocamento de um objecto num meio líquido depende fortemente, entre outros factores, da viscosidade do próprio meio. Em termos relativos contudo, as conclusões genéricas aqui obtidas podem ser extrapoladas para qualquer outro meio líquido.

As principais dificuldades com que se deparou neste trabalho foram as seguintes:

- O movimento do protozoário *Tetrahymena pyriformis* não é linear, isto é, é um movimento sinusoidal, com constantes mudanças da direcção, embora na sua maioria ligeiras.

- As imagens foram adquiridas através de uma câmara de vídeo em ângulo de 90° com a superfície do meio do poço de amostragem. Logo, apenas a componente horizontal das deslocações pôde ser monitorizada, sendo que a componente do deslocamento normal à superfície do mesmo não é contabilizada.

- O deslocamento do protozoário no plano vertical dos poços de amostragem, promove a sua saída do plano de focagem da câmara, o que vai esbater a sua imagem e dificultar a sua correcta identificação.

- Os movimentos *brownianos* no próprio líquido assumem particular importância nos poços de amostragem. Estes movimentos podem alterar a velocidade nativa do protozoário e induzir, deste modo, erros nos resultados. Tal facto é corroborado pela observação de células mortas, que possibilitou quantificar a influência dos movimentos *brownianos*, tal como reportado mais adiante.

- A aquisição das imagens foi efectuada com uma ampliação de 40x, o que implicou a representação dos protozoários num número baixo de pixeis. Tal facto induziu um erro maior nos resultados, uma vez que os protozoários não ficam optimamente definidos.

Analisando os resultados obtidos, podem-se retirar as seguintes conclusões:

- O valor da velocidade média da *Tetrahymena pyriformis*, sem tóxico e para o meio líquido PPY, é de cerca de 120 $\mu\text{m/s}$. Este valor não pode ser comparado com valores teóricos, uma vez que estes não vêm referenciados em literatura alguma.

- A forma das linhas de tendência obtidas foram, regra geral, as teoricamente previstas. Assim foi visível um decréscimo da velocidade de deslocamento das tetrahymenas com o aumento da concentração dos tóxicos estudados.

- A linha de tendência para o triton X-100 é, de certo modo errónea, uma vez que, para o último ponto do gráfico, os protozoários se encontravam mortos e, como tal, o valor da velocidade não pode ser inferior ao último valor do gráfico. A linha de tendência obtida não sugere esta tendência, devido à escassez de pontos utilizados.

- A gama de concentrações dos três tóxicos, cicloheximida, cobre e triton X-100, utilizadas permitiu evidenciar a zona decrescente mais importante da curva de velocidade em função da concentração do tóxico, bem como o valor limite da velocidade. A zona inicial de velocidade das tetrahymenas constante não é observada nos gráficos obtidos, à excepção do triton X-100. Contudo, ela pode ser inferida pelos valores da velocidade do protozoário sem tóxico e da concentração de tóxico mais baixa, para cada tóxico, uma vez que os valores obtidos se encontram muito próximos.

- Os valores de estabilização da velocidade média da *Tetrahymena pyriformis*, com o aumento do tóxico em meio líquido PPY, rondam os 75 $\mu\text{m/s}$ para a cicloheximida, os 70 $\mu\text{m/s}$ para o cobre e 40 $\mu\text{m/s}$ para o triton X-100. Estes valores afiguram-se como os valores assintóticos da velocidade do protozoário para cada um dos tóxicos, isto é, um aumento da concentração dos tóxicos acima das gamas utilizadas não provocará alteração significativa na velocidade da *Tetrahymena pyriformis*.

- Apenas para a concentração mais elevada (75 mg/l) do tóxico triton X-100, se verificou a morte das tetrahymenas, enquanto que, para as concentrações mais altas de cicloheximida (0,05 mg/l) e de cobre (400 mg/l), tal não se verificou. Isto é corroborado por estudos efectuados anteriormente (não publicados), nos quais apenas se verificou a morte de todas as tetrahymenas para o tóxico Triton X-100 e a partir dos 75 mg/l.

- Sendo que, o valor de velocidade obtido para a concentração de triton X-100 mais alta utilizada, se reporta a movimentos *brownianos* do próprio líquido e não dos protozoários, é possível quantificar a influência destes. Assim, e sabendo que o valor da velocidade média obtida, neste caso, é de aproximadamente 40 $\mu\text{m/s}$, este será também o valor da velocidade do líquido.

- Uma vez que o valor médio da velocidade do líquido é de 40 $\mu\text{m/s}$, os valores velocidade da *Tetrahymena pyriformis*, em relação ao referencial líquido, deverão ser diminuídos deste valor

- Os resultados obtidos para o número de mudanças de direcção encontram-se fortemente dependentes do número de *Tetrahymena pyriformis* presente a cada concentração de tóxico, como

referido anteriormente. Deste modo, não foi possível retirar conclusões definitivas. No entanto, com os valores obtidos, e atendendo à premissa anterior, estes parecem indiciar um aumento do número de mudanças de direcção com o aumento da concentração de tóxico, especialmente para concentrações mais elevadas. Contudo, não é lícito afirmar seguramente se a presença de cada um dos tóxicos influi no tipo de movimento do protozoário.

A principal ilação a tirar deste trabalho é que a mobilidade dos protozoários é um bom indicador da presença de tóxicos, estando estes dois parâmetros inversamente relacionados. Deste modo, a monitorização e quantificação do movimento dos protozoários, sendo um método rápido e simples, pode ser utilizada como um bom indicador biológico de poluição. Em casos em que o tóxico seja conhecido, a quantificação da velocidade dos protozoários, poderá mesmo ser utilizada para calcular a concentração do mesmo e accionar os mecanismos correspondentes.

Uma segunda ilação que pode ser retirada é a de que uma ampliação maior (200x) pode permitir uma mais correcta identificação destes protozoários e, conseqüentemente, um menor erro na determinação dos parâmetros da mobilidade.

5. Correlação entre Actividades e
Dimensões Fractais de Agregados
Microbianos Presentes em
Digestores Anaeróbios

5.1 Sumário

Este trabalho incidiu sobre o estudo das correlações entre dimensões fractais, diâmetro equivalente, actividade em acetato e velocidade de sedimentação de agregados microbianos provenientes de dois digestores anaeróbios de diferentes configurações e em diferentes condições de operação. Foi utilizado, com este intuito, um programa desenvolvido em ambiente *Matlab*, para a determinação das dimensões fractais mássica, área *vs.* perímetro e área *vs.* diâmetro de Feret.

As principais conclusões retiradas são as seguintes:

A dimensão fractal que se mostrou melhor correlacionável com o diâmetro equivalente foi a dimensão fractal estrutural mássica, cuja curva de tendência, para a gama de valores em causa, se aproxima muito da linearidade.

A dimensão fractal que se mostrou melhor correlacionável com a actividade em acetato foi também a dimensão fractal estrutural mássica, cuja curva de tendência, para a gama de valores em causa, é muito aproximada a uma recta.

A dimensão fractal que se mostrou melhor correlacionável com a velocidade de sedimentação foi a dimensão fractal estrutural área *vs.* diâmetro de Feret. A forma da curva de tendência, para a gama de valores em causa, é um ramo ascendente duma equação de 2^a ordem.

De todas as dimensões fractais estudadas, a dimensão fractal estrutural mássica foi a que obteve melhores correlações globais com os outros parâmetros estudados: diâmetro equivalente, actividade em acetato e velocidade de sedimentação.

A determinação destes parâmetros morfológicos pode ser utilizada, como um método rápido e simples, para inferir, embora de um modo muito geral, a estabilidade das propriedades morfológicas dos agregados microbianos anaeróbios, que têm um papel importante na tecnologia do tratamento anaeróbio de águas residuais.

5.2 Introdução

Os agregados microbianos, em tratamento de águas residuais, podem ser gerados de duas formas básicas: flocos ou grânulos suspensos e biofilmes. Existem também casos de combinação destas duas formas, embora o mesmo não seja tão comum. Nos digestores anaeróbios utilizados, os agregados microbianos apresentam-se sobre a forma suspensa.

As propriedades físicas mais estudadas dos agregados microbianos incluem a sua dispersão, distribuição de tamanhos, velocidade de sedimentação e a morfologia, esta última com recurso ao uso de análise de imagem. A regularidade da morfologia dos grânulos de um digestor anaeróbio, pode indicar o estado de estabilidade do mesmo dado que este parâmetro permite diferenciar entre agregados granulares e floculentos (Bellouti *et al.*, 1997). A monitorização destes parâmetros pode assim, permitir uma optimização contínua do processo de granulação para além da etapa inicial.

A aplicação da análise de imagem para a caracterização de agregados microbianos é uma técnica ainda recente. Existe alguma literatura sobre este assunto, sendo de realçar os trabalhos de Ganczarczyk (1994) e de Dudley *et al.* (1993). Estes autores debruçaram-se sobre o estudo da morfologia de agregados microbianos presentes em sistemas de tratamento biológico de águas residuais. Ganczarczyk estudou a relação entre a velocidade de sedimentação, o diâmetro equivalente e a dimensão fractal de flocos provenientes de lamas activadas, enquanto Dudley estudou o número e tamanho de grânulos provenientes de digestores anaeróbios. São também de realçar os trabalhos de Bellouti *et al.* (1997), Amaral *et al.* (1997), Hermanowicz *et al.* (1995) e Patankar *et al.* (1993) sobre a dimensão fractal de diversos agregados microbianos e morfologia miceliar, respectivamente.

Neste trabalho estudou-se a relação entre velocidade de sedimentação e actividade em acetato, por um lado, e tamanho (diâmetro equivalente) e morfologia (dimensões fractais), por outro. Foram utilizados dois filtros anaeróbios de leito fixo com enchimento de anéis de *Raschig*. O digestor I é de configuração tradicional de modo ascendente e o digestor II foi segmentado em 3 andares. O substrato utilizado foi um efluente lácteo sintético, obtido por diluição de leite magro comercial com água. O inóculo foi obtido de um digestor anaeróbio de tratamento de lamas.

As dimensões fractais surgiram pela incapacidade da geometria Euclidiana de descrever convenientemente as formas encontradas na natureza. Tradicionalmente, as dimensões

reconhecidas eram a dimensão 0 (pontos), 1 (linhas e curvas), 2 (planos e superfícies), 3 (espaço) e uma teórica 4ª dimensão. Besicovitch, expandindo o trabalho anterior de Hausdorff, propôs que algumas formas poderiam ter dimensões fraccionadas como 1,5 ou 2,3. A geometria fractal (Mandelbrot, 1977), e designadamente a dimensão fractal, tem sido recentemente aplicada a todo o tipo de sistemas biológicos e estruturas irregulares presentes na natureza.

A dimensão fractal é um termo genérico sem uma definição restrita e contém um vasto leque de grandezas diferentes embora relacionadas, sendo um indicador da complexidade de um objecto. Uma maior complexidade é definida como um maior número de convulsões e irregularidades ao longo das fronteiras do objecto.

Os valores da dimensão fractal são muito afectados por diversos factores: amostragem, arredondamentos, resolução e pelo próprio valor da dimensão fractal. A própria passagem do sistema métrico para a representação por pixels acarreta variadíssimos problemas, entre eles a representatividade do objecto e uma certa desadequação das fórmulas matemáticas. Para dar um exemplo, um quadrado de área igual a 4 m² e 8 m de perímetro tem, quando representado por pixels, área igual a 4 pixels e perímetro também igual a 4 pixels (para 1 pixel = 1m x 1m).

Para a determinação de diversas grandezas geométricas para o cálculo das dimensões fractais pode-se recorrer ao algoritmo de contagem de caixas (Liebovitch *et al.*, 1989 e Donnelly *et al.*, 1995). Esta técnica baseia-se na sobreposição de uma grelha sobre a imagem binária do objecto (pixels brancos) e exame dos valores dos pixels contidos para determinar se essa caixa contém ou não parte do objecto. Consoante os valores obtidos cada caixa inserir-se-á numa de 3 categorias:

- Caixa interior - Quando está contida inteiramente dentro do corpo do objecto (caixa contendo apenas pixels brancos e sem qualquer pixel preto adjacente);
- Caixa de fronteira - Caixas que cruzam a fronteira do objecto (caixa contendo pelo menos um pixel branco e com um ou mais pixels pretos adjacentes);
- Caixa vazia - Caixas contendo somente pixels negros.

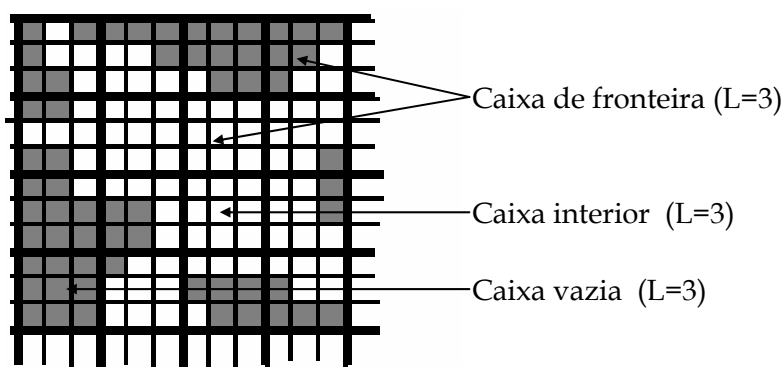


Figura 5.1 - Definição de caixa vazia, interior e de fronteira.

Sabe-se que o número de caixas de lado L necessário para cobrir uma superfície fractal varia à razão de L^{-D} em que D é a dimensão fractal a ser estimada. O número de caixas de tamanho S contendo parte de um objecto pode ser referido como $N(L)$. Sendo o objecto a ser analisado fractal, então $N(L)$ deve ser proporcional a L^{-D} .

$$N(L) = K \times L^{-D} \quad (8.1)$$

Aplicando logaritmos a ambos os membros da expressão verifica-se que:

$$\log[N(L)] = \log[K] - D \times \log[L] \quad (8.2)$$

Representando então $-\log(N(L))$ em função de $\log L$ obtém-se uma recta de declive D . Este declive é obtido através da regressão linear dos pontos obtidos.

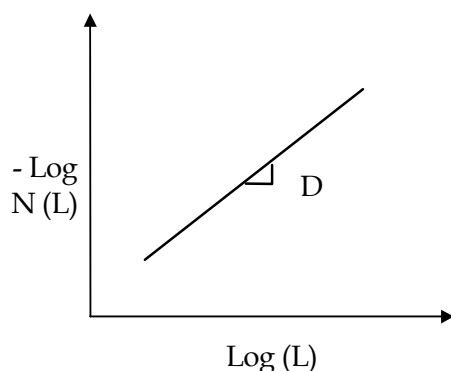


Figura 5.2 - Representação gráfica da dimensão fractal.

No programa em questão, as dimensões fractais calculadas são as dimensões estruturais: mássica (D_{Bm}), a área *vs.* perímetro (D_A^P) e a estrutural área *vs.* diâmetro de Feret (D_A^{Df}).

A dimensão fractal estrutural mássica (D_{Bm}) está compreendida, tal como as demais dimensões fractais, entre os valores de 1 e 2. Esta dimensão fractal tende para 2 em objectos com forma mais regular e homogénea (forma circular adquire valor 2) e para 1 em objectos de forma mais irregular (e fractal), ou com a forma de linha de espessura unitária, de valor 1 (Obert *et al.*, 1990).

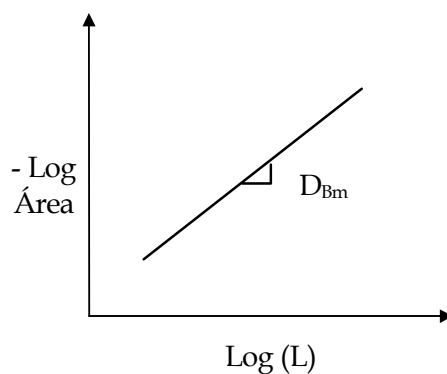


Figura 5.3 - Representação gráfica da dimensão fractal mássica.

A dimensão fractal área *vs.* perímetro (D_A^P) é calculada a partir da representação em gráfico log-log da área do objecto em função do seu perímetro para vários tamanhos de caixa.

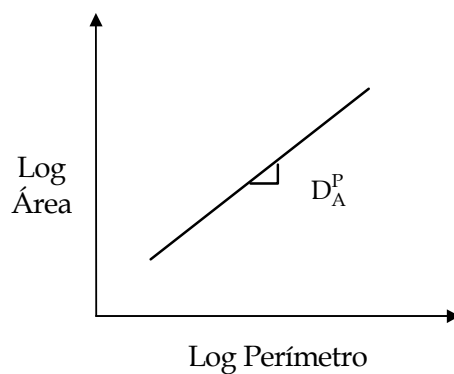


Figura 5.4 - Representação gráfica da dimensão fractal área *vs.* perímetro.

A dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret (D_A^{Df}) é calculada a partir da representação em gráfico log-log da área do objecto em função do seu diâmetro de Feret para vários tamanhos de caixa.

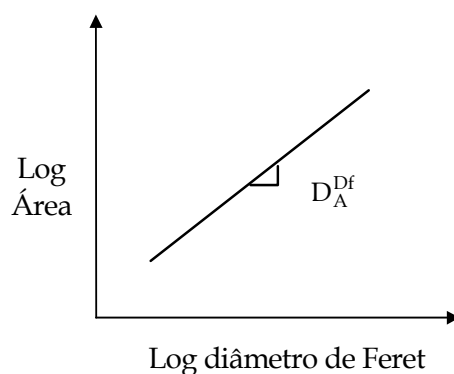


Figura 5.5 - Representação gráfica da dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret.

Compreendidos entre 1 e 2, os valores de D_A^{Df} e de D_A^P aumentam directamente com a regularidade e homogeneidade do objecto (semelhante à dimensão fractal mássica).

Uma dimensão fractal diz-se estrutural se se reporta a aspectos como a área de um objecto ou à forma deste no seu todo. Por outro lado, diz-se de textura se entra com aspectos referentes ao perímetro de um objecto ou às suas convoluções. De um modo geral, as dimensões fractais de textura, quando calculadas através do algoritmo de contagem de caixas, utilizam os valores de tamanho de caixa o mais baixo possível, independentemente do tamanho do objecto. Tal já não acontece com as dimensões fractais estruturais que podem adequar o tamanho de caixa utilizado em função do tamanho do objecto.

As imagens foram digitalizadas com um tamanho de 512x512 pixels e em escala de cinzento de 256 cores através do *software* comercial *Global Lab Image 3.21 (Data Translation, Marlboro)*. Alguns exemplos de imagens recolhidas encontram-se na figura seguinte:

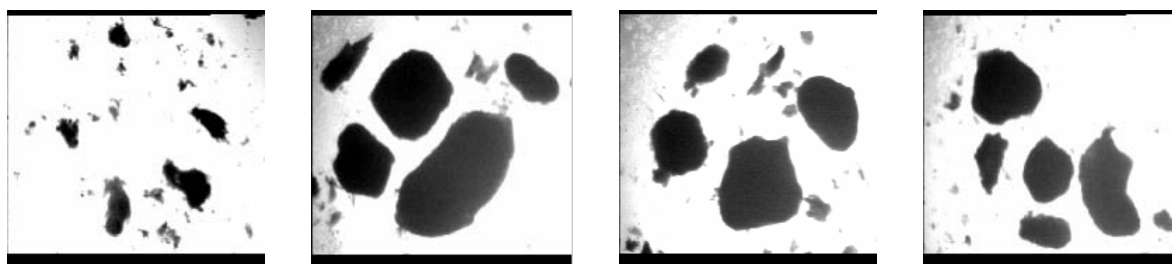


Figura 5.6 - Exemplos de imagens recolhidas no decurso deste trabalho.

O programa utilizado para a determinação do diâmetro equivalente e das diferentes dimensões fractais utilizadas, foi desenvolvido em linguagem *Matlab*. Este programa (*Imago_v5*) tem cinco partes fundamentais. Encontram-se de seguida explicitadas, de uma forma sucinta, as principais operações efectuadas por este programa.

- A primeira parte reside na aquisição e tratamento da imagem. O programa suporta ficheiros de imagem do tipo *bmp* e *tiff* de 256 cores. A 1ª etapa do tratamento de imagem consiste na transformação dos valores da escala de 1 a 256 para a escala de 0 a 1 e eliminação das diferenças de iluminação do fundo.

- Na segunda parte é utilizado, o método de Otsu (1979) para a escolha do valor óptimo do limite de detecção de cor e, depois de calculado este valor, a imagem é binarizada, com os objectos a tomarem o valor 1 e tudo o resto o valor 0.

- Na terceira parte efectua-se o reconhecimento e separação dos objectos presentes. O reconhecimento dos agregados é conseguido através de uma função própria do *Matlab*: *bwlabel*.

Seguidamente, os objectos na fronteira são retirados pela remoção de todos os pixels de valor igual aos pixels presentes na fronteira da imagem.

- Na quarta parte efectua-se o cálculo de todas as dimensões determinadas pelo programa. As dimensões fractais calculadas são as seguintes: dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret (D_A^{Df}), dimensão fractal área *vs.* perímetro (D_A^P), dimensão fractal mássica (D_{Bm}), dimensão fractal superficial (D_{Bs}) e dimensão fractal mássica modificada ($D_{B'm}$). Destas, apenas as três primeiras foram utilizadas no decurso deste estudo. As dimensões fractais foram calculadas pelo método de contagem de caixas (Donnelly *et al.*, 1995 e Liebovitch *et al.*, 1989).

É necessário, nesta fase, determinar os valores da área, perímetro e diâmetro de Feret para os vários tamanhos de caixa. Na determinação do diâmetro de Feret (Glasbey, 1994), utilizam-se as seguintes 8 direcções: 22,5° 45° 77,5° 90° 112,5° 135° 167,5° e 180°. Para minimizar as diferenças do valor da dimensão fractal devidas à diferença de tamanho dos objectos, o tamanho de caixa (L) é definido consoante o tamanho dos mesmos.

- Na última parte efectua-se a gravação dos resultados em ficheiro de texto (extensão txt).

5.3 Programa

O programa utilizado (*Imago_v5*) para a determinação do diâmetro equivalente e das diferentes dimensões fractais utilizadas, foi desenvolvido em linguagem *Matlab*. O programa suporta ficheiros de imagem do tipo *bmp* ou *tiff* de 256 cores. Encontram-se de seguida explicitadas, de uma forma sucinta, as principais operações efectuadas por este programa. A descrição do mesmo concentra-se nas operações ou sequência de operações realizadas sobre as imagens de um modo mais geral e compreensível. Não são, por isso, referenciadas todas as pequenas instruções internas do programa. As funções próprias do *Matlab* encontram-se melhor explicitadas no Apêndice E.

O programa possui subrotinas para a determinação de outros parâmetros morfológicos (convexidade, compacidade e esfericidade), bem como de cálculo de momentos de ordem 0, 1 e 2 e distribuição normal de tamanhos, que não entraram no âmbito deste trabalho. Para uma descrição mais pormenorizada, o programa encontra-se descrito em Amaral (1996).

A primeira parte reside no tratamento da imagem através de uma filtragem, remoção de partículas na fronteira da imagem e remoção de sujidades.

1. Aquisição da imagem inicial. Esta pode ser de formato *bmp* ou *tiff* de 256 cores (8 bits). Os valores desta imagem são normalizados, situando-se os seus valores entre 0 e 1 o que permite a visualização em *Matlab*.

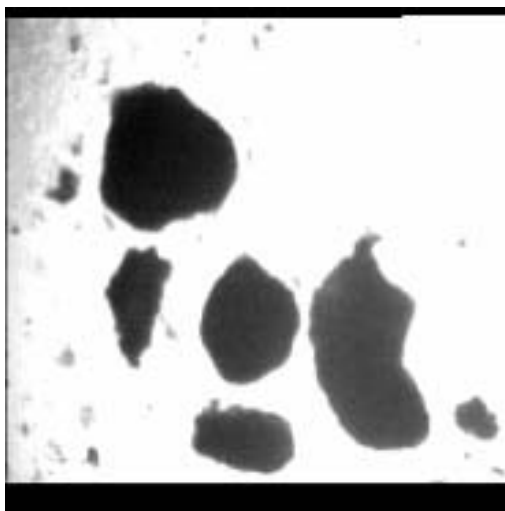


Figura 5.7 - Imagem resultante da aquisição (ponto 1).

2. Determinação da imagem inversa para atenuação dos efeitos da iluminação não homogénea (pontos 3, 4 e 5).

3. Determinação da imagem do fundo através da utilização do método de recolha do mínimo valor presente em cada quadrado de 10x10 pixels, na fronteira de 20 pixels da imagem, e interpolação dos valores em falta pelo método bicúbico (ponto 4) (The MathWorks, 1997).

4. Utilização do método bicúbico que calcula o valor de cada pixel da nova matriz através de uma média pesada dos valores da caixa de 4x4 pixels à volta do pixel correspondente da matriz original.

5. Subtracção dos valores calculados no ponto 4, à imagem do ponto 2.

6. Determinação da imagem inversa.

Na segunda parte procede-se ao cálculo do limite de detecção de cor óptimo e binarização da imagem.

7. Determinação do limite óptimo de detecção de cor pelo método de Otsu (1979).

Sejam os pixels de uma dada imagem representados em L níveis de cinzento. O número de pixels no nível i é dado por n_i , o número total de pixels por N e o histograma normalizado p_i :

$$p_i = \frac{n_i}{N} \quad (8.3)$$

Se se dicotomizar o histograma em duas classes C_0 e C_1 (fundo e objectos), por um limite de detecção de cor de nível k, os valores da probabilidade da ocorrência de cada classe (ω) e os valores médios de cada classe (μ) são dados, respectivamente por:

$$\begin{cases} \omega_0 = \sum_{i=1}^k p_i \\ \omega_1 = \sum_{i=k+1}^L p_i \end{cases} \quad (8.4)$$

e

$$\begin{cases} \mu_0 = \sum_{i=1}^k i p_i / \omega_0 \\ \mu_1 = \sum_{i=k+1}^L i p_i / \omega_1 \end{cases} \quad (8.5)$$

A média total da imagem original é dada por:

$$\mu_T = \sum_{i=1}^L i p_i \quad (8.6)$$

a variância entre classes é dada por:

$$\sigma^2_B = \omega_0 \omega_1 (\mu_1 - \mu_0)^2 \quad (8.7)$$

e a variância total dos níveis é dada por:

$$\sigma^2 = \sum_{i=1}^L (i - \mu_T)^2 p_i \quad (8.8)$$

O limite óptimo é o valor k^* que maximiza η :

$$\eta(k) = \frac{\sigma_B^2(k)}{\sigma^2} \quad (8.9)$$

logo:

$$\sigma_B^2(k^*) = \max_{i \leq k < L} \sigma_B^2(k) \quad (8.10)$$

8. Binarização da imagem. Os pixels com um valor inferior ao limite de detecção de Otsu (1979) ficam com valor 1 (objecto), e todos os outros com valor zero (fundo).

Na terceira parte efectua-se o reconhecimento e separação dos objectos presentes.

9. O reconhecimento dos agregados é conseguido através de uma função própria do *Matlab*: *bwlabel*, que efectua uma identificação numérica dos objectos: Isto é, identifica cada objecto pela substituição dos valores dum conjunto de pixels ligados por um valor inteiro diferente de objecto para objecto.

10. Eliminação dos objectos que intersectam a fronteira da imagem, isto é, são retirados todos os pixels de valor igual aos pixels presentes na fronteira da imagem.



Figura 5.8 - Imagem resultante da eliminação dos objectos na fronteira (ponto 10).

Na quarta parte isolam-se os objectos e escolhem-se os tamanhos de caixa a serem utilizados para o cálculo das dimensões fractais. Com o intuito de minimizar as diferenças do valor da dimensão fractal devidas à diferença de tamanho dos objectos, o tamanho de caixa (L) é definido consoante o tamanho.

11. Isolamento dos objectos através de uma função própria do *Matlab*: *imcrop*.



Figura 5.9 – Imagem de um grânulo (ponto 11).

12. Determinação do tamanho horizontal e vertical de cada objecto. Isto é atingido através da função própria do Matlab: *size*.

13. Escolha dos tamanhos de caixa. Para os objectos com uma das dimensões (horizontal ou vertical) maior que 25 e menor que 36 e os tamanhos de caixa são de 1, 2, 4 e 8. Para os objectos com uma das dimensões maior que 36 e menor que 68 os tamanhos de caixa são de 2, 4, 8 e 16 e, finalmente, para os objectos com ambas as dimensões maiores que 68 os tamanhos de caixa são de 4, 8, 16 e 32.

Na quinta parte efectua-se o cálculo das dimensões calculadas para este trabalho: dimensão fractal estrutural área *vs.* diâmetro de Feret (D_A^{Df}), dimensão fractal área *vs.* perímetro (D_A^P) e dimensão fractal estrutural mássica (D_{Bm}):

14. Determinação dos valores da área para os vários tamanhos de caixa. Esta é calculado verificando para cada caixa de tamanho L que compõe a imagem se existe algum pixel de valor 1, isto é, pertencente ao objecto.

15. Determinação dos valores do perímetro para os vários tamanhos de caixa. O perímetro é calculado por uma verificação das caixas contabilizadas para a área para determinar se os limites exteriores às mesmas contêm algum pixel não pertencente ao objecto.

16. Determinação do diâmetro de Feret (Glasbey, 1994). Este é calculado como o maior diâmetro de Feret, para o tamanho de caixa 1 ($L = 1$), em 8 direcções distintas ($22,5^\circ$ 45° $77,5^\circ$ 90° $112,5^\circ$ 135° $167,5^\circ$ e 180°). A partir deste valor determinam-se os valores para todos os outros tamanhos de caixa, utilizando o valor arredondado para cima da divisão do diâmetro de Feret de tamanho de caixa 1 por cada tamanho da caixa (L). Em *Matlab*, tal é conseguido pela função do *Matlab*: *ceil*.

$$\text{Diâmetro de Feret (L)} = \text{ceil}(\text{diâmetro de Feret (1)/L}) \quad (8.11)$$

17. Determinação das dimensões fractais. Depois de logaritmizados os valores obtidos procede-se a uma regressão linear para determinar o declive da curva log (área) *vs.* log (Y). Em *Matlab* tal é conseguido utilizando o operador \ :

$$D_A^{Df} = \text{vector} [\log (\text{área})] \setminus \text{vector} [\log (\text{diâmetro de Feret})] \quad (8.12)$$

$$D_A^P = \text{vector} [\log (\text{área})] \setminus \text{vector} [\log (\text{perímetro})] \quad (8.13)$$

$$D_{Bm} = \text{vector} [\log (\text{área})] \setminus \text{vector} [\log (L)] \quad (8.14)$$

sendo o vector $[\log (Y)]$, o vector que contém os valores logaritmizados do parâmetro Y e o vector $[\log(\text{área})]$ para o parâmetro área, para os diversos tamanhos de caixa.

Por último, os resultados são guardados em ficheiros texto (.txt), escolhidos pelo utilizador, através de uma função própria do *Matlab*.

Um organigrama do programa encontra-se na figura seguinte:

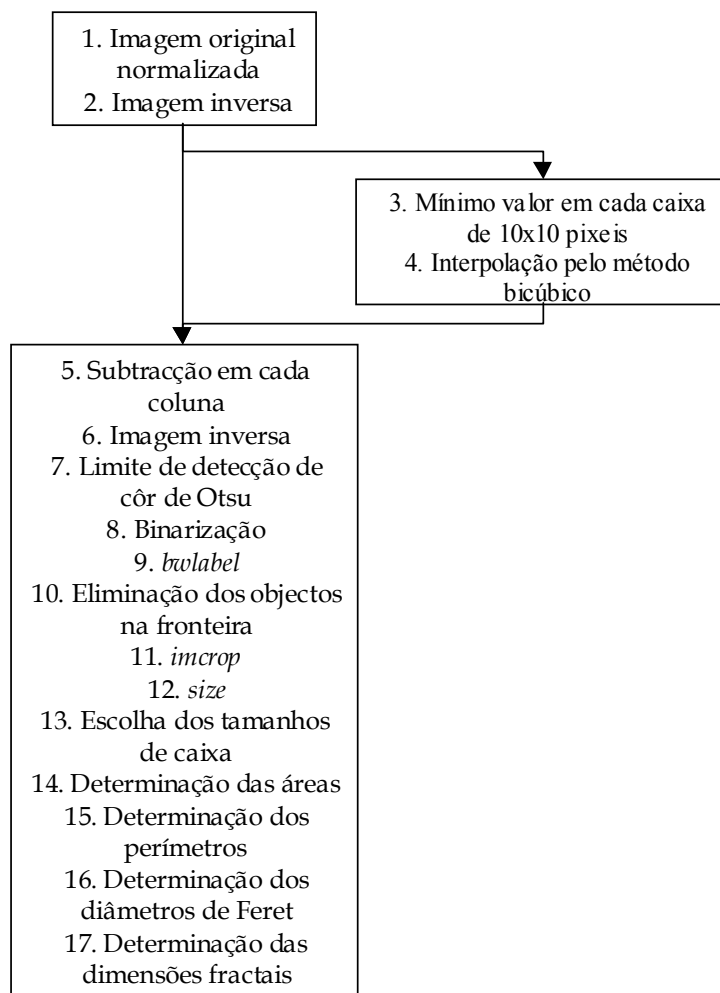


Figura 5.10 - Organigrama do programa *Imago_v5*.

5.4 Resultados e Discussão

A correlação entre dimensão fractal, diâmetro equivalente, actividade em acetato e velocidade de sedimentação de agregados microbianos provenientes de digestores anaeróbios foi investigada neste trabalho. Foram retiradas 25 amostras diferentes de agregados microbianos ao longo do tempo, de 3 locais diferentes (topo, meio e fundo) de 2 digestores anaeróbios, de modo a se obter a maior representatividade possível. Estes possuíam diferentes configurações: O digestor I é um filtro anaeróbio de 1 estágio e o digestor II é um filtro anaeróbio de 3 estágios. Os agregados foram desenvolvidos em diferentes condições de operação e o total de flocos e grânulos estudados foi superior a 4000.

Apenas os principais resultados obtidos se encontram expostos de seguida. O conjunto dos dados originais obtidos não se encontra referido devido ao elevado número dos mesmos.

Os valores médios das dimensões fractais calculadas, dimensão fractal estrutural área *vs.* diâmetro de Feret (D_A^{Df}), dimensão fractal área *vs.* perímetro (D_A^P), dimensão fractal estrutural mássica (D_{Bm}), para cada amostra, bem como os respectivos intervalos de confiança, encontram-se na Tabela 5.I.

Tabela 5.I - Valores médios das dimensões fractais D_A^P , D_A^{Df} , D_{Bm} e respectivos intervalos de confiança (95%) para cada amostra.

Amostra	D_A^P	D_A^{Df}	D_{Bm}
1	1,721 ± 0,012	1,852 ± 0,015	1,794 ± 0,016
2	1,681 ± 0,013	1,814 ± 0,014	1,758 ± 0,013
3	1,636 ± 0,025	1,799 ± 0,017	1,740 ± 0,018
4	1,719 ± 0,019	1,862 ± 0,012	1,807 ± 0,013
5	1,668 ± 0,014	1,815 ± 0,015	1,753 ± 0,013
6	1,675 ± 0,024	1,792 ± 0,014	1,747 ± 0,014
7	1,671 ± 0,017	1,816 ± 0,014	1,753 ± 0,011
8	1,686 ± 0,016	1,813 ± 0,011	1,754 ± 0,010
9	1,670 ± 0,019	1,792 ± 0,015	1,757 ± 0,015
10	1,693 ± 0,015	1,812 ± 0,010	1,765 ± 0,006
11	1,675 ± 0,018	1,822 ± 0,016	1,762 ± 0,012
12	1,670 ± 0,017	1,812 ± 0,009	1,757 ± 0,009
13	1,634 ± 0,017	1,786 ± 0,011	1,730 ± 0,010
14	1,681 ± 0,015	1,812 ± 0,015	1,751 ± 0,010
15	1,675 ± 0,013	1,800 ± 0,010	1,746 ± 0,009
16	1,670 ± 0,027	1,789 ± 0,015	1,739 ± 0,013
17	1,652 ± 0,014	1,804 ± 0,015	1,744 ± 0,011
18	1,666 ± 0,012	1,806 ± 0,011	1,742 ± 0,009
19	1,661 ± 0,013	1,798 ± 0,009	1,743 ± 0,009
20	1,591 ± 0,021	1,763 ± 0,018	1,715 ± 0,017
21	1,643 ± 0,031	1,769 ± 0,017	1,715 ± 0,015
22	1,667 ± 0,025	1,794 ± 0,014	1,730 ± 0,015
23	1,623 ± 0,017	1,773 ± 0,015	1,720 ± 0,014
24	1,657 ± 0,020	1,797 ± 0,013	1,741 ± 0,012
25	1,710 ± 0,013	1,865 ± 0,013	1,805 ± 0,009

Os valores médios da actividade em acetato, velocidade de sedimentação e diâmetro equivalente, para cada amostra, bem como os respectivos intervalos de confiança, encontram-se tabelados de seguida:

Tabela 5.II – Valores médios da actividade em acetato, velocidade de sedimentação e diâmetro equivalente e respectivos intervalos de confiança (95%) para cada amostra.

Amostra	Act. Acetoclástica mlCH ₄ @PTN/gSV.dia	Vel. Sedimentação (m/h)	Diâm. Equivalente (mm)
1	410 ± 24	92 ± 13	3,89 ± 0,18
2	233 ± 20	60 ± 10	2,31 ± 0,19
3	256 ± 14	28 ± 4	2,52 ± 0,30
4	596 ± 14	109 ± 16	4,01 ± 0,27
5	259 ± 41	36 ± 6	1,61 ± 0,14
6	281 ± 6	28 ± 4	2,11 ± 0,11
7	324 ± 43	26 ± 4	1,64 ± 0,11
8	500 ± 6	53 ± 14	1,80 ± 0,14
9	261 ± 27	20 ± 4	1,86 ± 0,13
10	338 ± 39	27 ± 9	1,22 ± 0,06
11	325 ± 19	50 ± 12	1,94 ± 0,13
12	--	--	1,46 ± 0,07
13	140 ± 43	26 ± 4	1,93 ± 0,14
14	254 ± 35	24 ± 4	1,96 ± 0,13
15	488 ± 24	67 ± 12	1,74 ± 0,10
16	237 ± 17	36 ± 6	1,95 ± 0,08
17	149 ± 28	50 ± 12	2,18 ± 0,13
18	268 ± 18	43 ± 8	1,51 ± 0,09
19	83 ± 10	24 ± 3	1,63 ± 0,09
20	90 ± 12	20 ± 2	1,05 ± 0,09
21	102 ± 6	21 ± 3	1,33 ± 0,08
22	128 ± 5	18 ± 2	1,20 ± 0,06
23	144 ± 12	29 ± 4	1,49 ± 0,09
24	173 ± 7	26 ± 4	1,58 ± 0,08
25	--	156 ± 12	4,19 ± 0,27

As equações das curvas obtidas, e respectivas correlações, que melhor se adaptam aos pontos, para a dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret (D_A^{Df}), dimensão fractal área *vs.* perímetro (D_A^P) e dimensão fractal mássica (D_{Bm}), em função do diâmetro equivalente (mm) dos mesmos, encontra-se de seguida. De referir que foram testados os modelos de equação algébrica de 1º grau ($Y = a + bx$), equação algébrica de 2º grau ($Y = ax^2 + bx + c$), equação de potência ($Y = ax^b$) e equação exponencial ($Y = ae^{bx}$).

Tabela 5.III – Correlações das curvas obtidas para as diferentes dimensões fractais em função do diâmetro.

	Equação	Correlação
D_A^{Df}	$y = 0,004x^2 + 0,0031x + 1,7815$	0,819
D_A^P	$y = 0,0008x^2 + 0,0177x + 1,6284$	0,647
D_{Bm}	$y = 0,0038x^2 + 0,003x + 1,7267$	0,837

A melhor correlação obtida (0,837), como pode ser observado na tabela anterior, foi a da dimensão fractal estrutural mássica (D_{Bm}). A equação da curva de tendência correspondente é a seguinte:

$$D_{Bm} = 0,0038d_{eq}^2 + 0,003d_{eq} + 1,7267 \quad (d_{eq} \in [1;5] \text{ mm}). \quad (8.15)$$

A representação gráfica dos pontos, e intervalos de confiança respectivos, encontra-se na Figura 5.11. A curva de tendência e as curvas dos limites de erro da mesma encontram-se na Figura 5.12. Os limites de erro foram calculados para um intervalo de confiança de 95%.

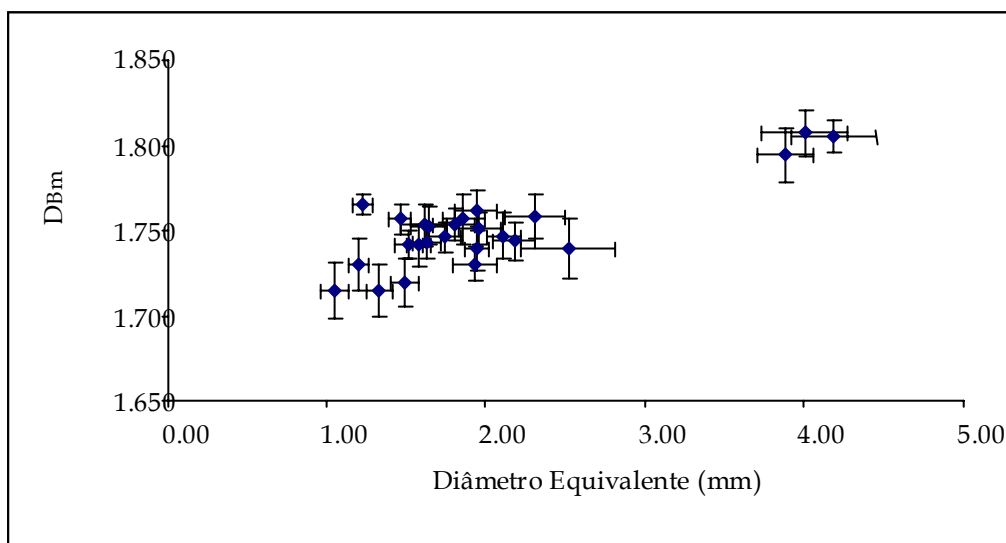


Figura 5.11 - Representação gráfica da dimensão fractal mássica (D_{Bm}) em função do diâmetro e intervalos de confiança respectivos.

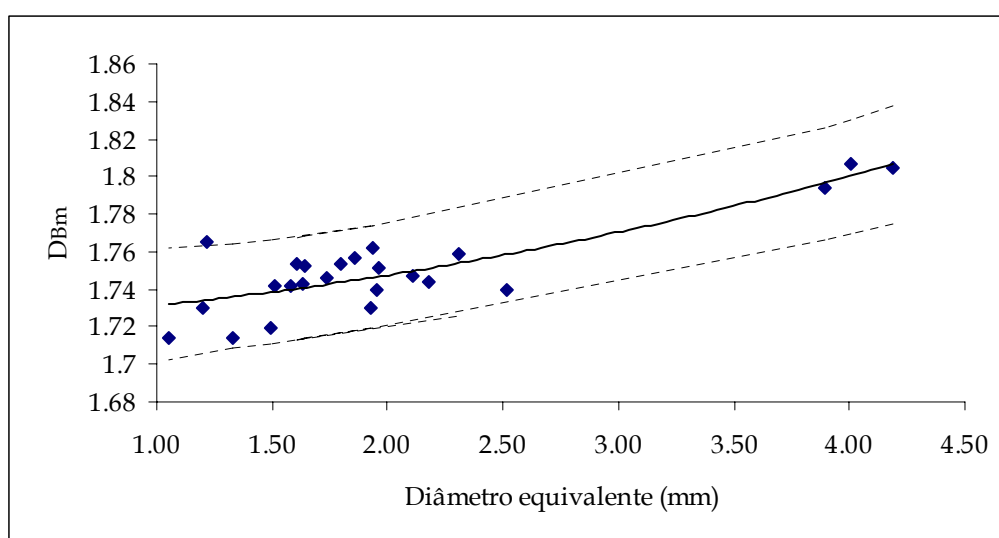


Figura 5.12 - Representação gráfica da curva de tendência da dimensão fractal mássica (D_{Bm}) em função do diâmetro.

Pela análise da Figura 5.12, pode-se concluir que, para a gama de valores estudados, existe uma correspondência praticamente linear entre a dimensão fractal mássica e o diâmetro equivalente dos agregados microbianos. Como o diâmetro equivalente pode ser considerado como um factor representativo da área de um agregado, verifica-se que, quanto maior a área deste mais o agregado tende a possuir elevada dimensão fractal mássica. Isto é, quanto maior o agregado microbiano mais regular se torna.

Foram testadas várias formas de curvas de tendência para os valores da actividade em acetato ($\text{mlCH}_4\text{@PTN/gSV.dia}$) em função da dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret (D_A^{Df}), da dimensão fractal área *vs.* perímetro (D_A^{P}), da dimensão fractal mássica (D_{Bm}) e do diâmetro. Foram testados os modelos de equação algébrica de 1º grau, equação algébrica de 2º grau, equação de potência e equação exponencial. As equações que melhor se adequaram aos valores obtidos estão representadas na Tabela 5.IV.

Tabela 5.IV - Correlações das curvas obtidas para a actividade em acetato em função das diferentes dimensões fractais e do diâmetro.

	Equação	Correlação
Diâmetro	$y = 11,888x^2 + 47,999x + 119,17$	0,585
D_A^{Df}	$y = 6871,3x^2 - 20382x + 14670$	0,753
D_A^{P}	$y = 23471x^2 - 74351x + 58969$	0,778
D_{Bm}	$y = -3781,9x^2 + 18216x - 20022$	0,781
	$y = 4920,5x - 8338,7$	0,781

A melhor correlação, para todos os parâmetros estudados, foi obtida para a dimensão fractal estrutural mássica, com o ajuste dos pontos a uma recta e ao ramo ascendente dum polinómio de 2º grau ($a < 0$), numa zona dum ramo que é praticamente uma recta, com o valor de 0,781. A equação de 2º grau obtida foi a seguinte:

$$\text{Act. Acetato} = -3781,9 D_{\text{Bm}}^2 + 18216 D_{\text{Bm}} - 20022 \quad (D_{\text{Bm}} \in [1,71;1,82]). \quad (8.16)$$

E a equação de 1º grau foi:

$$\text{Act. Acetato} = 4920,5 D_{\text{Bm}} - 8338,7 \quad (D_{\text{Bm}} \in [1,71;1,82]). \quad (8.17)$$

A representação gráfica dos pontos, e intervalos de confiança respectivos, encontra-se na Figura 5.13 e da curva de tendência e das curvas dos limites de erro da mesma na Figura 5.14.

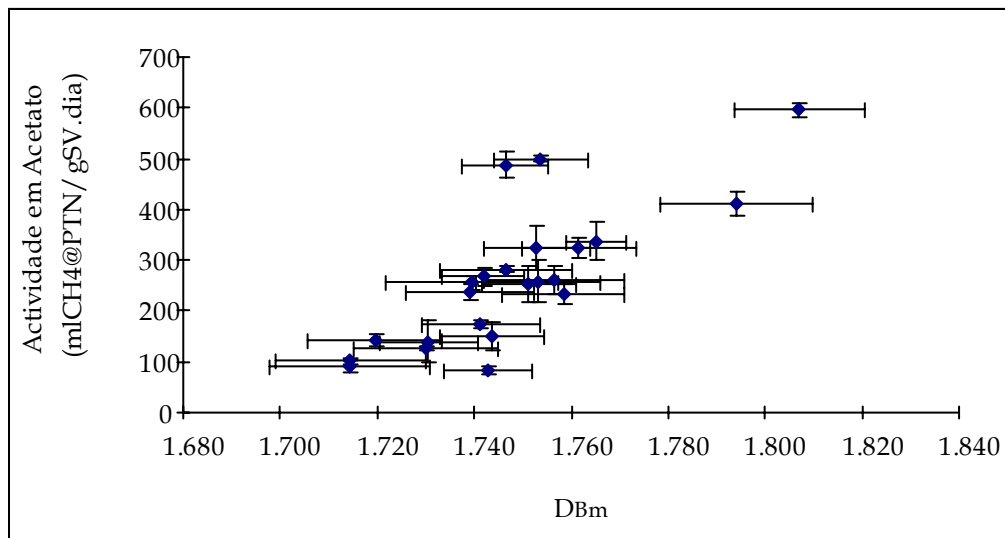


Figura 5.13 - Representação gráfica da actividade em acetato em função da dimensão fractal mássica (D_{Bm}), e intervalos de confiança respectivos.

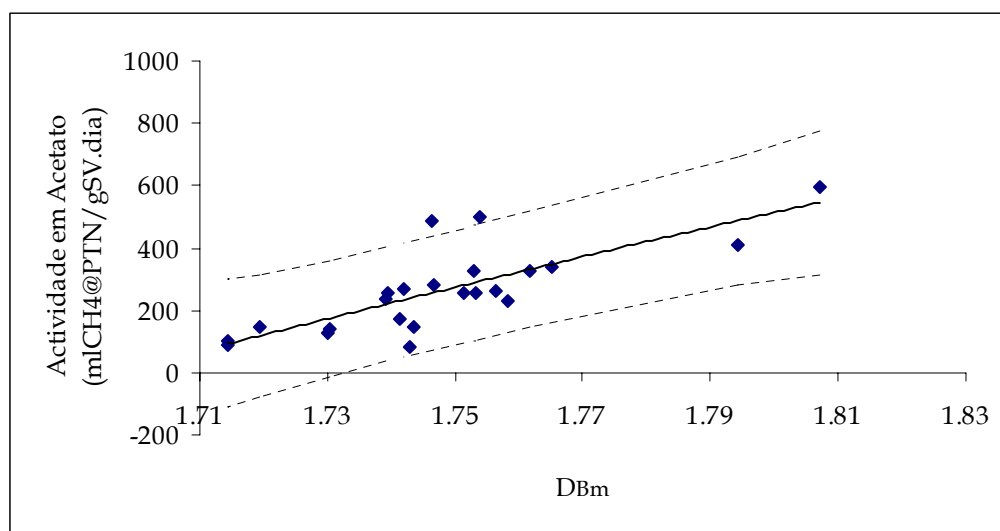


Figura 5.14 - Representação gráfica da curva de tendência da actividade em acetato em função da dimensão fractal mássica (D_{Bm}).

Analisando a Figura 5.14 constata-se que existe uma relação praticamente linear entre a actividade em acetato e a dimensão fractal mássica. Isto é, quanto maior a dimensão fractal mássica de um agregado microbiano, maior a sua actividade. De outra forma, quanto mais regular é o agregado, mais actividade em acetato demonstra.

Foram também testadas várias formas de curvas de tendência para os valores da velocidade de sedimentação (m/h) em função das dimensões fractais e do diâmetro. Foram igualmente aplicados os modelos de equação algébrica de 1º grau, de 2º grau, equação de potência

e equação exponencial. As equações que melhor se adequaram aos valores obtidos estão representadas na Tabela 5.V.

Tabela 5.V – Correlações das curvas obtidas para a velocidade de sedimentação em função das diferentes dimensões fractais e do diâmetro.

	Equação	Correlação
Diâmetro	$y = 10,14x^2 - 20,367x + 37,164$	0,898
D_A^{Df}	$y = 13765x^2 - 48908x + 43469$	0,908
D_A^P	$y = 10779x^2 - 35080x + 28560$	0,786
D_{Bm}	$y = 4300x^2 - 49242x + 42416$	0,889

A melhor correlação, para a velocidade em função dos parâmetros estudados, foi obtida para a dimensão fractal estrutural área *vs.* diâmetro de Feret, com o ajuste dos pontos ao ramo ascendente dum polinómio de 2º grau ($a > 0$) com o valor de 0,908. A equação obtida foi a seguinte:

$$\text{Velocidade} = 13765 D_A^{Df}{}^2 - 48908 D_A^{Df} + 43469 \quad (D_A^{Df} \in [1,76;1,88]). \quad (8.18)$$

A representação gráfica dos pontos, e intervalos de confiança respectivos, encontra-se na Figura 5.15 e da curva de tendência e das curvas dos limites de erro da mesma na Figura 5.16.

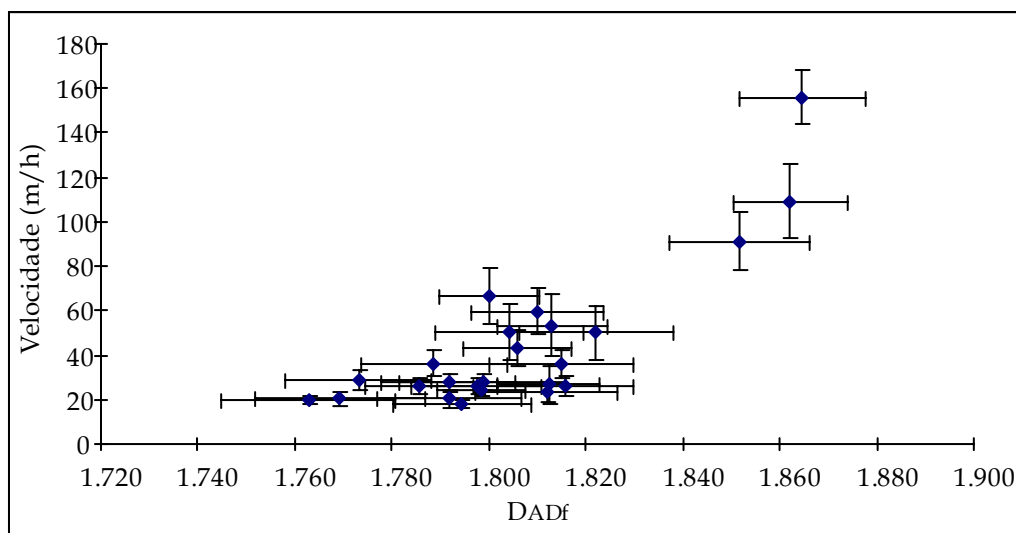


Figura 5.15 – Representação gráfica da velocidade de sedimentação em função da dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret (D_A^{Df}), e respectivos intervalos de confiança.

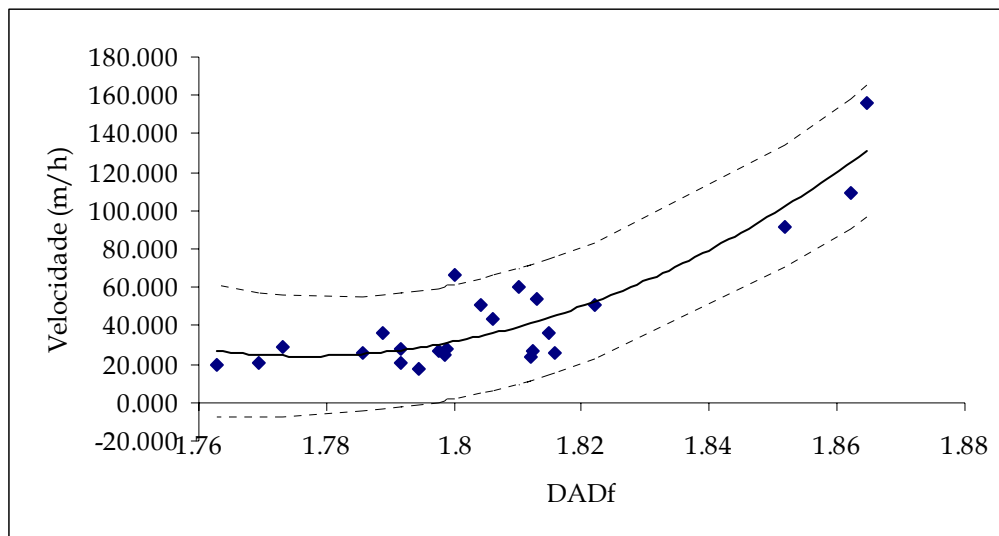


Figura 5.16 - Representação gráfica da curva de tendência da velocidade de sedimentação em função da dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret (D_A^{Df}).

Analisando a Figura 5.16, pode-se retirar que, a um aumento da dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret, logo, da regularidade do agregado, corresponde um aumento da velocidade de sedimentação. Este aumento é tanto maior quanto maior é o valor da dimensão fractal.

Estudando cada um dos reactores isoladamente verificou-se que para o reactor I (de apenas um andar) os valores obtidos foram os seguintes:

Para o diâmetro equivalente, a forma da curva relacionando o diâmetro e a dimensão fractal mássica (D_{Bm}) encontra-se representada graficamente na Figura 5.17.

Neste caso, a correlação obtida não foi a melhor, tendo a dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret obtido uma melhor correlação.

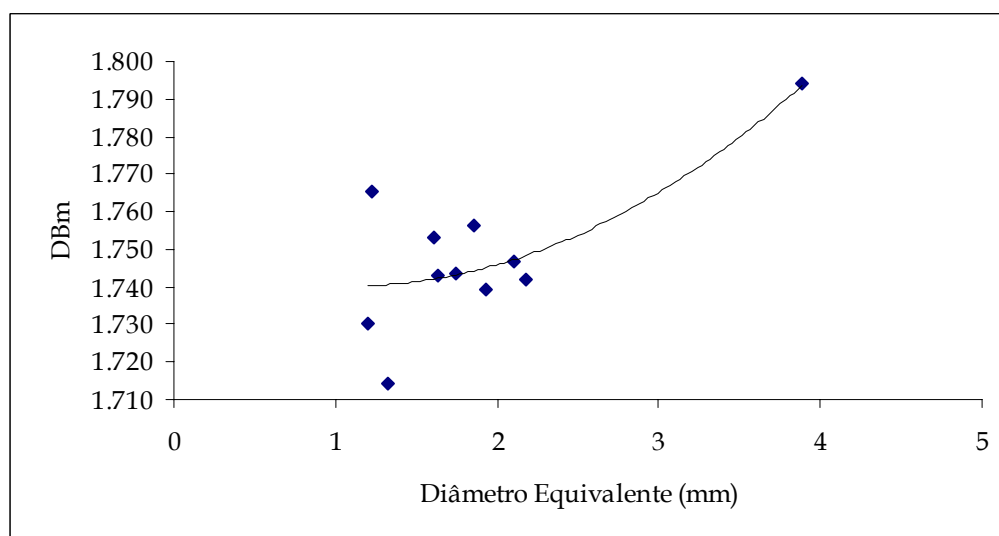


Figura 5.17 - Representação gráfica da dimensão fractal mássica (D_{Bm}) em função do diâmetro equivalente, para o reactor I.

Para a actividade em acetato, a forma da curva relacionando a actividade e o D_{Bm} , encontra-se representada graficamente na Figura 5.18.

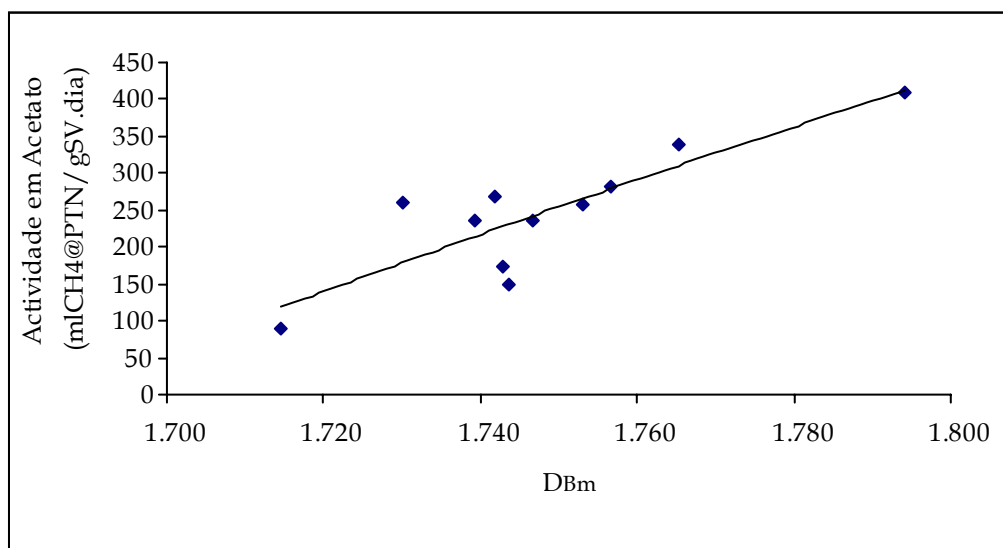


Figura 5.18 - Representação gráfica da actividade em acetato em função da dimensão fractal mássica (D_{Bm}), para o reactor I.

Para a velocidade de sedimentação, a forma da curva relacionando a actividade e o D_A^{Df} , encontra-se representada graficamente na Figura 5.19.

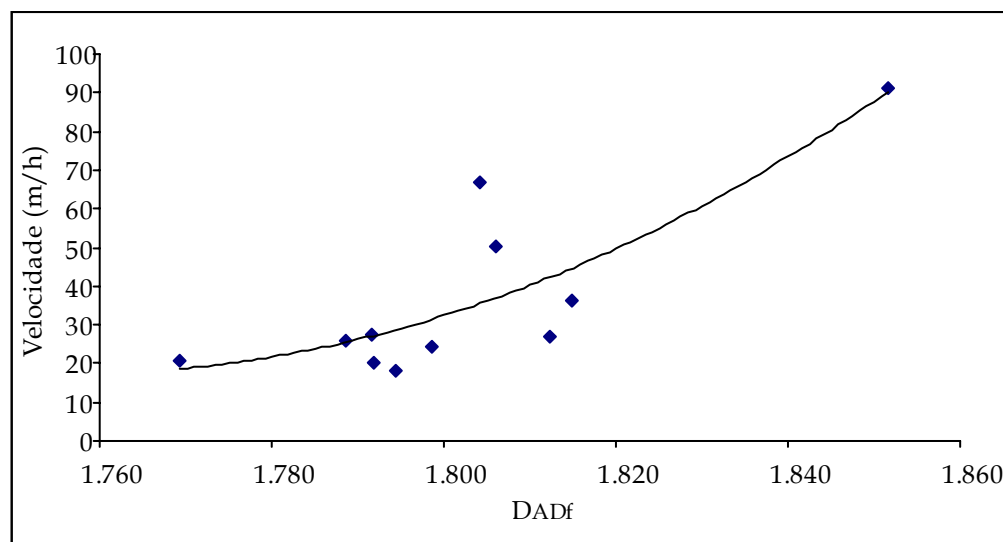


Figura 5.19 - Representação gráfica da velocidade de sedimentação em função da dimensão fractal Área vs. Diâmetro de Feret (D_A^{Df}), para o reactor I.

Em todos os casos a equação obtida foi de 2º grau, como havia sucedido para o conjunto total das amostras. Analisando a Figura 5.18, pode-se concluir que a variação da actividade em

acetato com a dimensão fractal mássica é praticamente linear. Analisando a Figura 5.19, pode-se concluir que a um aumento da dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret corresponde um aumento da velocidade de sedimentação. Este aumento é tanto maior, quanto maior é o valor da dimensão fractal. Analisando a Figura 5.17 pode-se concluir que o mesmo acontece no caso do diâmetro equivalente e da dimensão fractal mássica.

Estes resultados são muito semelhantes aos obtidos pelo conjunto total das amostras.

Para o reactor II, de três andares, os valores obtidos foram os seguintes:

Para o diâmetro equivalente, a forma da curva relacionando o diâmetro e a dimensão fractal mássica (D_{Bm}) encontra-se representada graficamente na Figura 5.20.

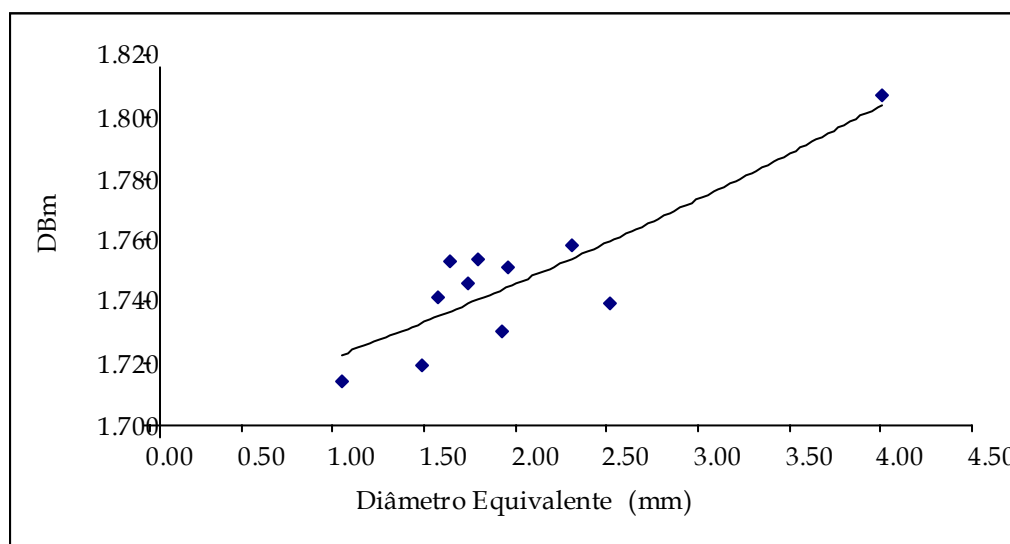


Figura 5.20 - Representação gráfica da dimensão fractal mássica (D_{Bm}) em função do diâmetro equivalente, para o reactor II.

Para a actividade em acetato, a equação do 2º grau relacionando a actividade e o D_{Bm} encontra-se representada graficamente na Figura 5.21.

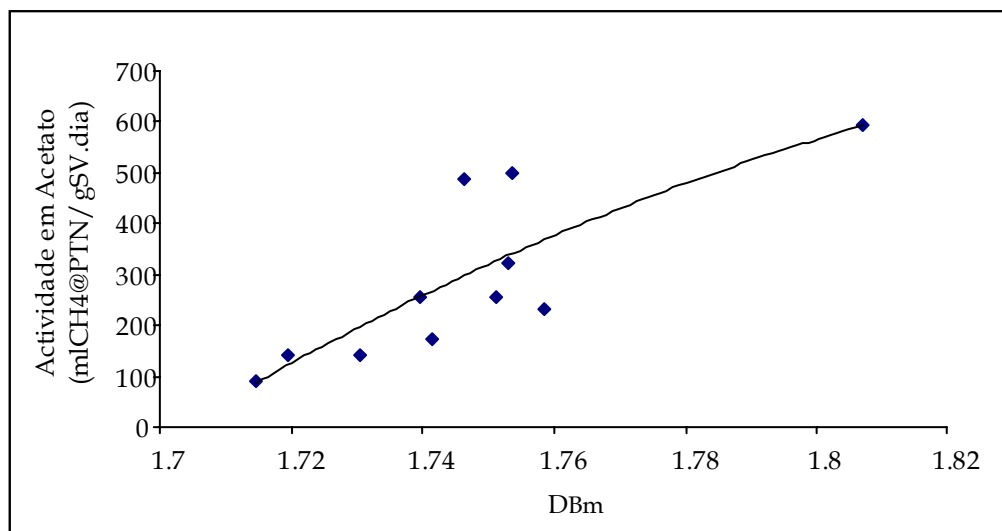


Figura 5.21 - Representação gráfica da actividade em acetato em função da dimensão fractal mássica (D_{Bm}), para o reactor II.

Para a velocidade de sedimentação, a equação do 2º grau relacionando a actividade e o D_A^{Df} , encontra-se representada graficamente na Figura 5.22.

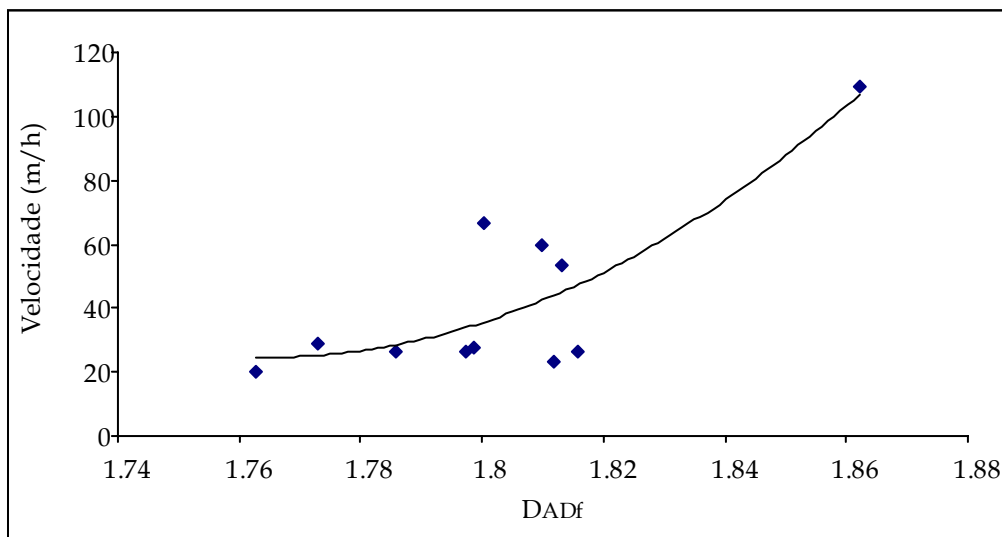


Figura 5.22 - Representação gráfica da velocidade de sedimentação em função da dimensão fractal área vs. diâmetro de Feret (D_A^{Df}), para o reactor II.

Em ambos os casos a equação obtida foi de 2º grau, como havia sucedido para o conjunto total das amostras e para as amostras do reactor I. Analisando a Figura 5.21, pode-se concluir que a variação da actividade em acetato com a dimensão fractal mássica é próxima da linearidade. Analisando a Figura 5.20 pode-se concluir que o mesmo acontece no caso do diâmetro equivalente

e da dimensão fractal mássica. Analisando a Figura 5.22, pode-se concluir que a um aumento da dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret corresponde um aumento da velocidade de sedimentação. Este aumento é tanto maior, quanto maior é o valor da dimensão fractal.

Estes resultados são muito semelhantes aos obtidos pelas amostras provenientes do reactor I e para o conjunto total das amostras.

A comparação das curvas de tendência para cada um dos reactores isoladamente e em conjunto encontra-se apresentada na Figura 5.23, na Figura 5.24 e na Figura 5.25.

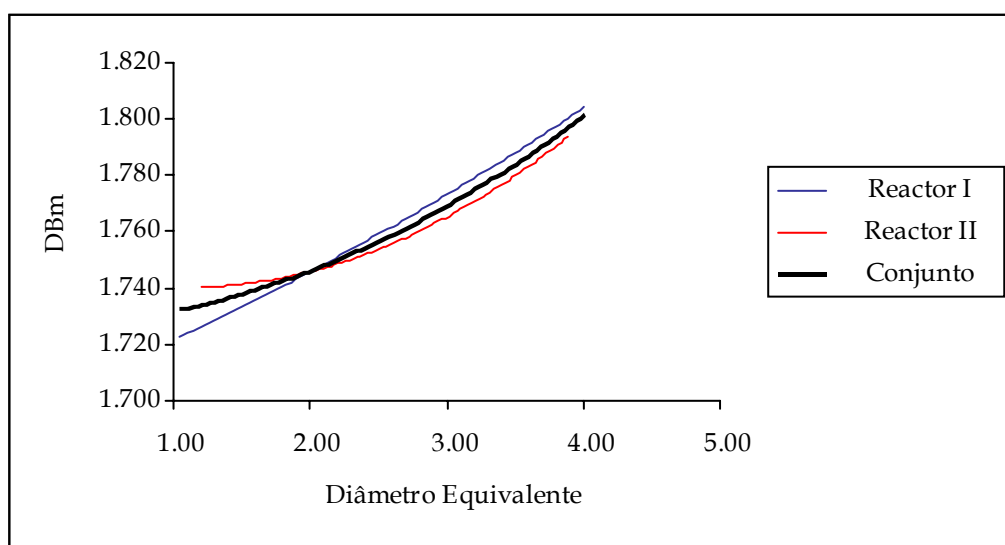


Figura 5.23 - Representação gráfica da dimensão fractal mássica (D_{Bm}) em função do diâmetro equivalente, para cada reactor e para o conjunto da ambos.

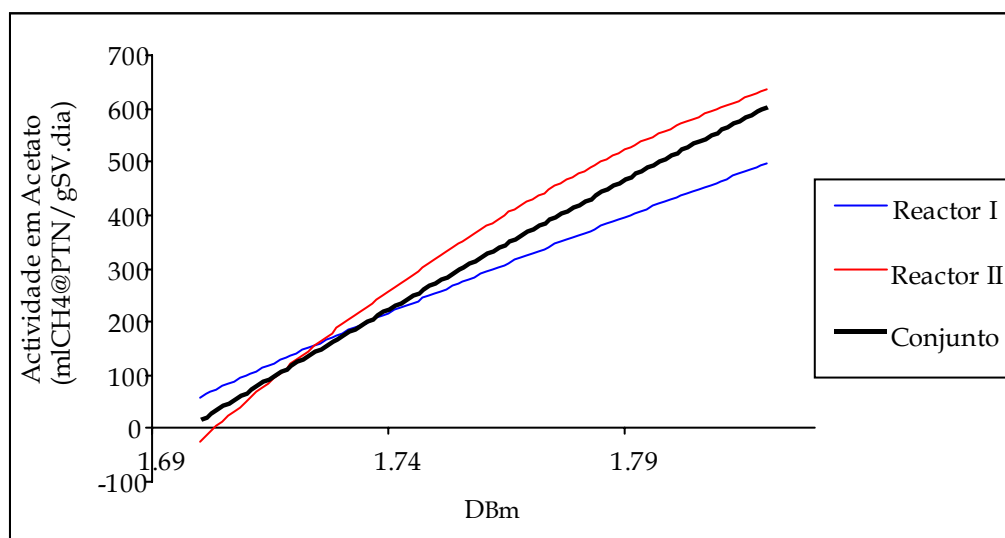


Figura 5.24 - Representação gráfica da actividade em acetato em função da dimensão fractal mássica (D_{Bm}), para cada reactor e para o conjunto da ambos.

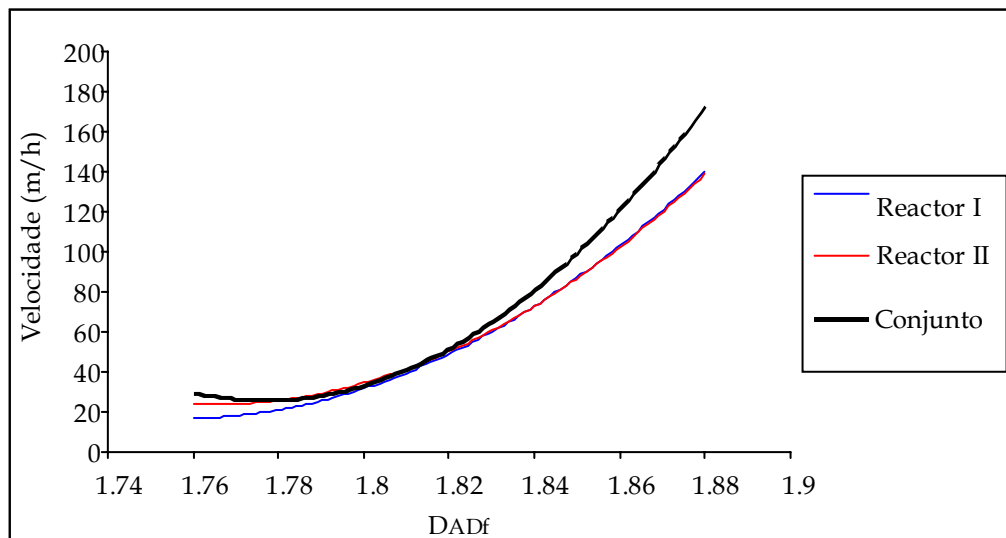


Figura 5.25 - Representação gráfica da velocidade de sedimentação em função da dimensão fractal área vs. diâmetro de Feret (D_A^{Df}), para cada reactor e para o conjunto da ambos.

A média dos valores dos diâmetros equivalentes dos agregados microbianos para cada porta de amostragem foram de 1,71 para a porta 1 (altura de 5 cm), 1,73 para a porta 3 (altura de 32,5 cm) e 2,32 para a porta 6 (altura de 65 cm).

5.5 Conclusões

As principais conclusões que podem ser retiradas deste estudo são as seguintes:

- O tamanho do agregado microbiano e os parâmetros que representam a sua regularidade possuem uma relação directa. Como pode ser observado pela comparação das tabelas VI e VII, quando o tamanho do agregado aumenta, referido em diâmetro equivalente, as diversas dimensões fractais estudadas, área *vs.* diâmetro de Feret (D_A^{Df}), área *vs.* perímetro (D_A^P) e mássica (D_{Bm}), também aumentam.

- Foram testadas várias formas de curva de tendência, equação algébrica de 1º grau, equação algébrica de 2º grau, equação exponencial e equação de potência. As equações que melhores valores de correlação obtiveram, para o estudo do parâmetro diâmetro equivalente, foram equações algébricas de 2º grau, que estão descritas na Tabela 5.III.

- A dimensão fractal que se mostrou melhor correlacionável com o diâmetro equivalente foi a dimensão fractal estrutural mássica, com uma correlação de 0,837 para a equação algébrica de 2º grau. Contudo, a forma da curva obtida, para a gama de valores em causa aproxima-se muito da linearidade, podendo ser considerada como praticamente linear, como pode ser constatado na Figura 5.12.

- Os valores do diâmetro equivalente dos agregados microbianos aumentaram com a sua distância ao fundo do reactor, sendo que os resultados reportados por Dudley *et al.* (1993) permitem apenas concluir da existência de um tamanho específico dos agregados para cada nível do digestor anaeróbio. Contudo, neste trabalho existem poucos pontos para estudar o efeito da localização, no digestor, na dimensão dos agregados.

- No estudo da actividade em acetato em função das dimensões fractais calculadas verificou-se, para a gama de valores em que se trabalhou, uma relação directa. Em todos os gráficos obtidos, a forma da curva é um ramo ascendente duma equação de 2ª ordem ($a < 0$), quer para a actividade em acetato em função da dimensão fractal mássica quer em função da dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret. Contudo, quando para o caso da dimensão fractal mássica a forma é muito aproximada a uma recta, demonstrada na Figura 5.14, podendo ser considerada como tal. Esta forma é válida dentro dos limites estudados: ($D_{Bm} \in [1,71:1,82]$ e $D_A^{Df} \in [1,76:1,88]$).

- A dimensão fractal que se mostrou melhor correlacionável com a actividade em acetato foi a dimensão fractal estrutural mássica. A correlação obtida foi de 0,781, como pode ser observado na Tabela 5.IV.

- No estudo da velocidade de sedimentação em função das dimensões fractais calculadas verificou-se, para a gama de valores em que se trabalhou, uma relação directa. Em todos os gráficos obtidos, a forma da curva é um ramo ascendente duma equação de 2ª ordem ($a > 0$), quer para a velocidade de sedimentação em função da dimensão fractal mássica quer em função da dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret. Esta forma é válida dentro dos limites estudados: ($D_{Bm} \in [1,71:1,82]$ e $D_A^{Df} \in [1,76:1,88]$).

- A dimensão fractal que se mostrou melhor correlacionável com a velocidade de sedimentação foi a dimensão fractal estrutural área *vs.* diâmetro de Feret. A correlação obtida foi de 0,908, como pode ser observado na Tabela 5.V.

- Tal como reportado por Ganczarzyk (1994), a correlação obtida em velocidade *vs.* diâmetro foi inferior para o modelo velocidade = $a \cdot \text{diâmetro}^b$ do que para o modelo velocidade = $a + b \cdot \text{diâmetro}$. De realçar contudo, que Ganczarzyk utilizou grânulos de lamas activadas ao invés deste trabalho em que se estudaram agregados microbianos provenientes de digestores anaeróbios. Ganczarzyk obteve uma correlação de 0,864 para $V = a \cdot d_{eq}^b$ e de 0,902 para $V = a + b \cdot d_{eq}$, contudo nota-se também que a melhor curva obtida está longe de ser linear e possui um aspecto mais de acordo com o primeiro modelo referido.

- A forma das curvas obtidas para o estudo de cada reactor isoladamente aproxima-se muito das formas obtidas para o conjunto dos dois reactores. Assim, a forma obtida para as curvas da actividade em acetato em função da dimensão fractal mássica é bastante linear e a forma das curvas da velocidade de sedimentação em função da dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret, bem como da dimensão fractal mássica em função do diâmetro é um ramo ascendente de uma equação de 2ª ordem ($a > 0$).

- Para o estudo do diâmetro, da actividade em acetato e velocidade de sedimentação de cada reactor isolado, as equações obtidas, na gama de valores estudados, aproximam-se bastante, como pode ser observado na Figura 5.23, na Figura 5.24 e Figura 5.25. Estas são muito próximas entre si e também em comparação com o conjunto de reactores estudados.

- De todas as dimensões fractais estudadas, a dimensão fractal estrutural mássica foi a que obteve melhores correlações globais com os outros parâmetros estudados: diâmetro equivalente, actividade em acetato e velocidade de sedimentação. A dimensão fractal área *vs.* diâmetro de Feret também obteve correlações razoáveis, no conjunto de todos os parâmetros estudados enquanto que a dimensão fractal área *vs.* perímetro não se mostrou particularmente correlacionável com nenhum dos parâmetros obtidos.

- Pelos resultados obtidos, é patente a correlação entre os valores das dimensões fractais estruturais área *vs.* diâmetro de Feret e mássica, bem como do diâmetro equivalente, por um lado e a actividade em acetato e velocidade de sedimentação, por outro. Deste modo, a determinação destes parâmetros morfológicos pode ser utilizada, como um método rápido e simples, para inferir, embora de um modo muito geral, o funcionamento de um digestor anaeróbio. Este método possui também a vantagem de o volume de amostra necessário ser ínfimo.

- Será, no entanto, necessário aumentar significativamente o número de pontos experimentais a fim de obter melhores correlações.

6. Determinação Quantitativa de
Fluorescência num Digestor
Anaeróbio Perturbado

6.1 Sumário

Este trabalho incidiu sobre o estudo da actividade metanogénica de um consórcio bacteriano de um digestor anaeróbio perturbado, ao longo do tempo, e a fluorescência demonstrada pelo mesmo quando excitado a 420 nm. Foram efectuadas duas perturbações, sendo a primeira a suspensão da alimentação e a segunda a suspensão da alimentação e entrada de ar. Foram estudados os parâmetros Índice de Fluorescência, Número Total de Bactérias Fluorescentes por Floco e Fluorescência do Fundo. Foi elaborado um programa (*Fluor_v4*) em ambiente *Matlab*, para a determinação dos parâmetros atrás referidos.

As principais conclusões retiradas são as seguintes:

As bactérias anaeróbias presentes no digestor mostraram-se bastante sensíveis às perturbações verificadas. No caso da segunda perturbação, que envolveu também entrada de ar no sistema, o consórcio de bactérias não chegou a recuperar.

As actividades metanogénicas específicas (acetoclástica e hidrogenofílica) mostraram uma tendência crescente ao longo do tempo, mais acentuada no caso da actividade acetoclástica. As actividades mostraram-se também bastante sensíveis às perturbações verificadas.

Os parâmetros índice de fluorescência, fluorescência do fundo e número de bactérias fluorescentes por floco, não se mostraram relacionáveis com os parâmetros monitorizados tradicionalmente, à excepção da fluorescência do fundo com os sólidos voláteis.

O número de bactérias fluorescentes presentes não se mostrou directamente correlacionável com as actividades calculadas, o que se atribui ao facto de a concentração do co-factor F_{420} ser diferente para diferentes espécies de bactérias metanogénicas.

A fluorescência do fundo e a concentração de sólidos voláteis mostraram-se correlacionáveis, assumindo a linha de tendência uma forma aproximadamente exponencial.

6.2 Introdução

A digestão anaeróbia é um processo atractivo para a conversão de águas residuais, resíduos sólidos e recursos renováveis em metano e outros produtos. Também referida como fermentação metanogénica, é um processo de múltiplas etapas envolvendo um consórcio completo de microrganismos que integra as bactérias metanogénicas. Estas são consideradas como fazendo parte do reino das arqueobactérias, com doze géneros descritos e muitas dezenas de espécies e estirpes. Os géneros mais importantes presentes na digestão anaeróbia são o *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (Alves, 1998).

O objectivo deste trabalho foi estudar evolutivamente a actividade metanogénica acetoclástica e hidrogenofílica durante o arranque de um digestor anaeróbio de mistura completa. A fluorescência devido à presença do co-factor F_{420} foi monitorizada ao longo do tempo.

Na primeira fase da digestão anaeróbia, chamada de hidrólise, os açúcares, proteínas e lípidos são degradados em compostos monoméricos. Na acidogénese, estes últimos são convertidos a hidrogénio e ácidos orgânicos que são seguidamente degradados em ácido acético, hidrogénio e dióxido de carbono, pela acetogénese. Subsequentemente, as bactérias metanogénicas utilizam estes compostos para a produção de metano (Wheatley, 1990). O co-factor F_{420} intervém nesta última fase actuando como um aceitador de electrões, sendo reduzido por uma enzima desidrogenase.

Esta descrição simplificada da degradação anaeróbia está representada na Figura 6.1.

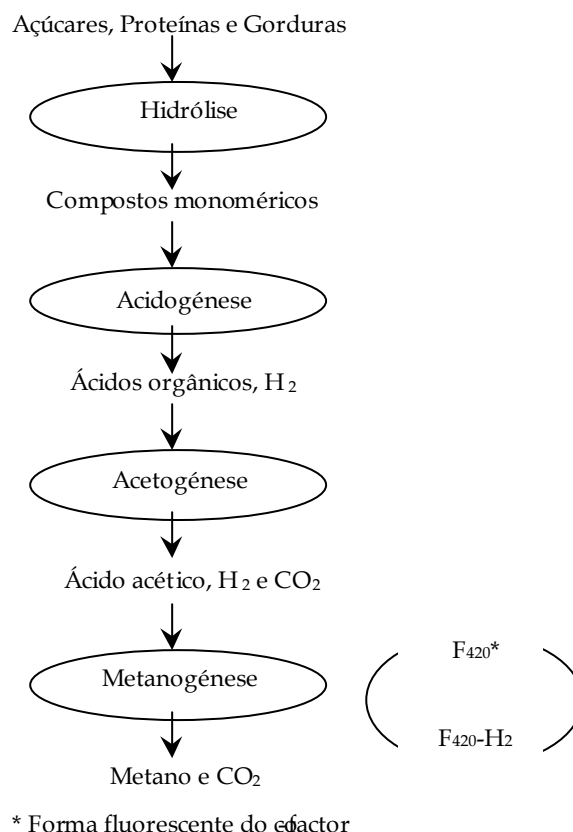


Figura 6.1 – Representação esquemática resumida da digestão anaeróbia (Alves, 1998).

A metanogénese, sendo o passo final da digestão anaeróbia, é o responsável directo pela produção de metano. É também o passo mais lento da cadeia sendo, por isso mesmo, considerado o passo limitante da mesma. A maior parte (70%) do metano formado nesta etapa provém da degradação do acetato pelas bactérias acetoclásticas que são arqueobactérias anaeróbias estritas, tendo sido identificados dois géneros: *Methanoseta* e *Methanosarcina* (Alves, 1998). Como as bactérias acetoclásticas são, de entre todas as bactérias da digestão anaeróbia, as que possuem uma menor resistência a condições adversas, é atribuída uma especial importância às mesmas (Alves *et al.*, 1995).

A selecção de comprimentos de onda de excitação, para a microscopia de fluorescência, correspondendo aos comprimentos de onda de excitação dos co-factores F_{350} e F_{420} (Cheeseman *et al.*, 1972) é um método poderoso para o reconhecimento de bactérias metanogénicas. É também um método muito apropriado para determinar a pureza de culturas metanogénicas, em culturas mistas. Doddema *et al.* (1978), referem que a fluorescência evidenciada a 420 nm pode não ser exclusiva das bactérias metanogénicas e que a fraca fluorescência das bactérias não metanogénicas pode ser devida à presença de flavinas nas células.

O co-factor F_{420} deriva de uma flavina, sendo um análogo da 5-deazaflavina, e é um transportador de electrões envolvido na metanogénese de H_2 e CO_2 . A sua forma reduzida não fluoresce, mas a oxidada sim, absorvendo a 420 nm e emitindo a 472 nm. Encontrando-se presente apenas nas bactérias metanogénicas, a fluorescência evidenciada por estas é função do número de bactérias activas e do seu estado de oxidação. O espectro de excitação e de emissão do co-factor F_{420} , a pH 8,2, encontra-se representado na figura seguinte.

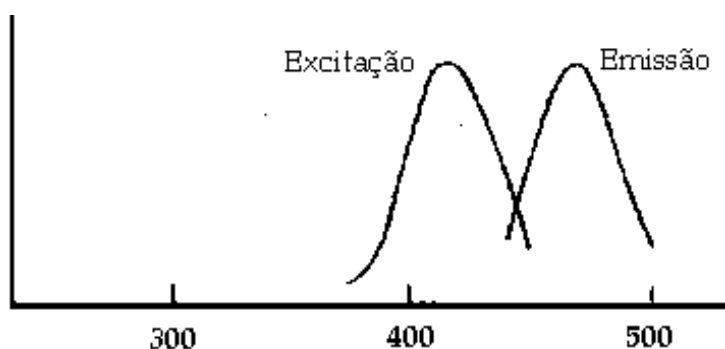


Figura 6.2 - Espectro de excitação e emissão (nm) do co-factor F_{420} a pH 8,2 (Doddema *et al.*, 1978).

Como referido anteriormente, a fluorescência detectada pode ser considerada como um indicador da concentração de espécies metanogénicas. Contudo vários problemas se levantam:

- A análise do co-factor F_{420} intracelular é difícil de implementar como um método de rotina devido à sua complexidade e à falta da molécula de F_{420} comercialmente.

- Sabendo-se que cada espécie metanogénica possui uma concentração diferente desse co-factor, a fluorescência emitida será diferente de espécie para espécie, estando também dependente das próprias condições ambientais (Alves *et al.*, 1995). Logo, quando estudado o conjunto das espécies metanogénicas, o valor da fluorescência observado depende não somente do número das mesmas, mas também das espécies presentes e não poderá ser relacionado directamente com o número de bactérias total.

- As diferentes espécies de bactérias metanogénicas possuem formas e tamanhos diferentes, o que, conjugado com o facto de poderem surgir em aglomerados (flocos), dificulta a determinação do número total de bactérias.

- A existência de lise de células bacterianas provoca a libertação do co-factor F_{420} e o fundo torna-se assim, ele próprio, fluorescente, o que implica uma maior dificuldade de reconhecimento das células.

- Regra geral, as espécies hidrogenotróficas apresentam maiores índices do co-factor F_{420} do que as espécies acetoclásticas (e menor produção de metano), o que impossibilita a correlação directa entre o valor da fluorescência e a actividade metanogénica total (Alves *et al.*, 1995). Os

valores da concentração do co-factor F_{420} , para algumas espécies metanogénicas encontram-se de seguida tabelados.

Tabela 6.I - Teores de F_{420} em diversas espécies de bactérias metanogénicas (Reynolds, 1986; Dolfig e Mulder, 1985).

	Espécie	F_{420} (nmol/gSSV)
Hidrogenotróficas	<i>Methanobacterium formicicum</i>	1200
	<i>Methanobacterium bryantii</i>	1400
	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	40
	<i>Methanobacterium arboriphilus</i>	1800
	<i>Methanogenium marisnigri</i>	700
	<i>Methanospirillum hungatei</i>	1900
Acetoclásticas	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	27
	<i>Methanosaeta soenghenii</i>	330

No entanto, o valor da intensidade de fluorescência global poderá ser usado para estimar a actividade metanogénica global uma vez que, num plano global, quanto melhor adaptado ao substrato um consórcio anaeróbio se apresenta, maiores são os seus índices do co-factor F_{420} e maior a sua produção em metano. Do mesmo modo, o número total de bactérias metanogénicas presentes poderá ser também utilizado, de um modo genérico, para prever a actividade metanogénica.

Não existem muitos trabalhos publicados, na literatura, sobre o estudo e quantificação da fluorescência de microrganismos através da análise de imagem. Destes destacam-se os de Owens *et al.* (1992) sobre a monitorização da fluorescência de NAD(P)H e F_{420} num digestor anaeróbio, Heldal *et al.* (1994) sobre microrganismos presentes em amostras de água, de Raynal *et al.* (1994) sobre *Saccharomyces cerevisiae* e de Dodemna *et al.* (1978), Mink *et al.* (1977) e de Robinson *et al.* (1984) sobre bactérias metanogénicas e de Bitton *et al.* (1993) sobre bactérias.

As imagens foram adquiridas por fotografia, em microscópio de epi-fluorescência, e posteriormente digitalizadas, através de um digitalizador de mesa, para um formato *jpeg* de 24 bits (*true color*). Alguns exemplos de imagens recolhidas encontram-se na figura seguinte:

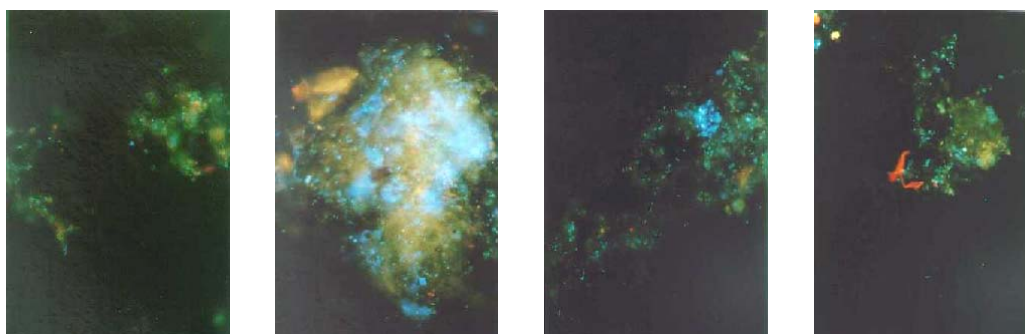


Figura 6.3 – Exemplos de imagens recolhidas no decurso deste trabalho.

Uma pequena explicação do funcionamento do programa encontra-se referida de seguida. Para uma apreciação mais completa do mesmo, este encontra-se mais detalhado numa secção posterior.

O programa (*Fluor_v4*), desenvolvido em *Matlab* (The MathWorks, Inc), lê os formatos *jpeg*, *tiff* e *bmp* e divide a imagem nos seus 3 canais (vermelho, verde e azul). Os canais azul e verde apresentam uma maior distinção entre o fundo escuro e as células fluorescentes. A partir da combinação das imagens do canal azul e verde ($0,286 \times \text{Verde} + 0,714 \times \text{Azul}$), normalizada, procede-se a todo o tratamento:

- Primeiro é aplicado um limite de intensidade de cor, para a identificação das bactérias fluorescentes mais brilhantes. O limite escolhido foi de 0,7 e é criada uma imagem binária contendo apenas os pixels com valor superior a esse limite.

- Seguidamente, e com o intuito de identificar as bactérias com valores de fluorescência inferiores a 0,7, efectuaram-se os seguintes passos: o fundo da imagem proveniente da combinação dos dois canais é removido, através da computação da imagem do fundo e subtracção à original. A imagem resultante contém as bactérias menos fluorescentes (inicialmente no fundo muito mais escuro) muito bem definidas.

- Assim, a partir desta última imagem e com a imagem das bactérias mais fluorescentes é possível identificar todas as bactérias fluorescentes. Isto é conseguido através da escolha das bactérias menos fluorescentes na última imagem (por imposição de um limite de escolha de 0,3) e apagando, da imagem original, tudo o resto que não esteja presente na imagem das bactérias mais fluorescentes. Consegue-se, deste modo, retirar apenas o fundo à imagem original.

- Seguidamente, procede-se a uma fase de limpeza da imagem, na qual as bactérias presentes na fronteira da imagem são identificadas e retiradas bem como todos os pixels isolados, restando deste modo, apenas as bactérias fluorescentes. Com este passo conclui-se a fase de processamento de imagem.

- A parte de análise de imagem propriamente dita é realizada de seguida, efectuando-se o cálculo de: índice de fluorescência, calculado através da razão entre a soma dos valores de todos os pixels da bactéria e a área total da mesma; fluorescência do fundo, calculada através da média da imagem do fundo; número total de bactérias fluorescentes, que é o número total dos objectos (bactérias fluorescentes). A partir deste último parâmetro foi calculado o número de bactérias fluorescentes por floco como sendo o número total de bactérias de cada amostragem pelo número total de flocos da amostragem.

Os resultados obtidos são, seguidamente, guardados em ficheiros de texto (.txt).

6.3 Programa

As imagens foram adquiridas por fotografia, com uma ampliação do microscópio de epifluorescência de 400 vezes, em rolo de fotossensibilidade ISO 800 (Kodak) e reveladas exactamente do mesmo modo para todas as imagens. Foram depois digitalizadas, com os mesmos parâmetros para todas as imagens, para um formato de 24 bits. Para poupar espaço em disco foram convertidas em formato *jpeg*.

O programa *Fluor_v4* foi desenvolvido para correr em ambiente *Matlab* 5.1. A descrição do mesmo concentra-se nas operações ou sequência de operações realizadas sobre as imagens de um modo mais geral e compreensível. Não são, por isso, referenciadas todas as pequenas instruções internas do programa. As funções próprias do *Matlab* encontram-se melhor explicitadas no Apêndice E.

O programa, lê os formatos *jpeg* (24 bits), *tiff* (24 bits) e *bmp* (24 bits) e divide as imagens de 24 bits nos seus 3 canais (vermelho, verde e azul). Os canais azul e verde, no caso presente de consórcios anaeróbios auto-fluorescendo sob luz de 420 nm e emitindo a 472 nm, apresentam uma maior distinção entre o fundo escuro e as bactérias fluorescentes. Deste modo, todo o tratamento posterior foi efectuado a partir da soma ponderada das imagens do canal azul e verde:

1. Aquisição e soma das imagens do canal azul e verde pela seguinte equação:

$$0,286 \times \text{Canal Verde} + 0,714 \times \text{Canal Azul.} \quad (9.1)$$

Estes valores foram obtidos a partir da distância relativa do comprimento de onda da radiação emitida (472 nm) e dos comprimentos de onda do máximo de azul (442 nm) e do máximo de verde (547 nm). Uma representação das curvas de cada uma das cores da representação *RGB* encontra-se na figura seguinte:

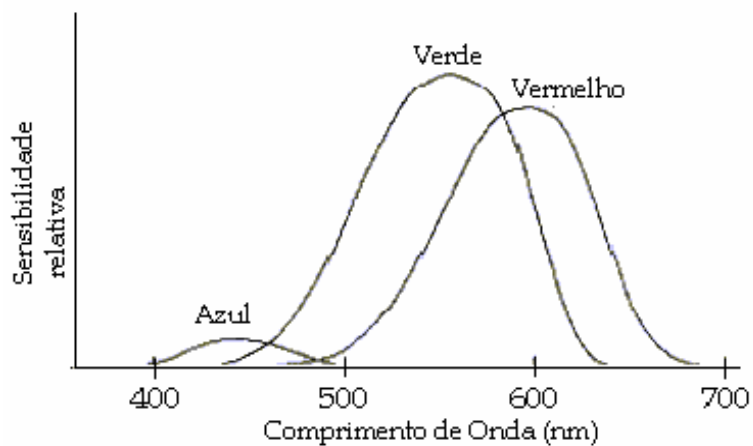


Figura 6.4 - Representação das cores da representação *RGB* com o comprimento de onda (Russ, 1991).

A imagem inicial, em formato *jpeg* de 24 *bits* é a seguinte:

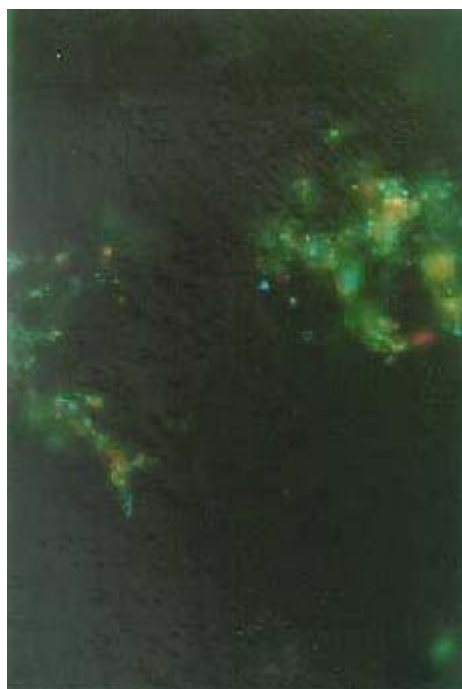


Figura 6.5 - Imagem inicial de 24 bits.

Os valores da imagem resultante são normalizados, situando-se os seus valores entre 0 e 1.



Figura 6.6 – Imagem resultante da aquisição e soma ponderada das imagens dos canais azul e verde (ponto 1)

2. Primeiro é aplicado um limite de intensidade de cor, para a identificação das bactérias fluorescentes mais brilhantes. O limite escolhido foi de 0,7.

3. Criação de uma máscara não binária, contendo apenas os pixels com valor superior ao limite referido, na escala normalizada, correspondendo às bactérias mais fluorescentes. Assim, apenas as bactérias reconhecidas por este método, retêm o valor inicial da imagem resultante do ponto 1, e o resto adquire o valor 0.

Seguidamente, é necessário identificar as bactérias com valores de fluorescência inferiores ao limite do ponto 2. Estas bactérias encontram-se num fundo consideravelmente menos fluorescente que as anteriores e, este facto, permite o seu isolamento. Uma vez que, a diferença entre estas bactérias e o fundo é bastante elevada, se o fundo da imagem for retirado elas sobressaem na imagem resultante. Com este intuito, efectuaram-se os seguintes passos:

4. Determinação da imagem do fundo através da utilização do método de recolha do mínimo valor presente em cada quadrado de 8x8 pixels e interpolação dos valores em falta pelo método bicúbico (ponto 5).

5. Utilização do método bicúbico (The MathWorks, 1997) que calcula o valor de cada pixel da nova matriz através de uma média pesada dos valores da caixa de 4x4 pixels à volta do pixel correspondente da matriz original. Este método, de determinação da imagem do fundo, pode ser utilizado com sucesso neste caso, uma vez que o tamanho das bactérias e agregados, em pixels e para a ampliação usada, raramente ultrapassa este valor.

6. Remoção do fundo da imagem resultante do ponto 1, através da subtração da imagem do fundo. A imagem resultante contém as bactérias menos fluorescentes, inicialmente no fundo muito mais escuro, muito bem definidas e as bactérias mais fluorescentes e agregados, no fundo claro, menos definidas.



Figura 6.7 – Imagem resultante da remoção do fundo (ponto 6).

7. Escolha das bactérias menos fluorescentes da imagem resultante do ponto 1 por imposição de um limite de escolha de 0,3 na última imagem calculada.

8. Obtenção de uma máscara não binária em que apenas os pixels com valores superiores ao limite referido, isto é, as bactérias menos fluorescentes, possuem os valores iniciais, da imagem resultante do ponto 1, e o resto valor 0.

A partir desta última máscara e com a máscara das bactérias mais fluorescentes é possível identificar todas as bactérias fluorescentes. Isto é conseguido através do passo seguinte:

9. Obtenção de uma máscara não binária que contém todas as bactérias fluorescentes, o que é atingido através da escolha dos pixels de valor não nulo, de ambas as máscaras anteriormente calculadas, representando assim as bactérias mais e menos fluorescentes.

Seguidamente, é aplicada uma fase de limpeza da última máscara obtida, que consiste em quatro passos fundamentais:

10. Obtenção de uma imagem binária para o reconhecimento dos objectos, uma vez que a função utilizada só suporta imagens binárias. Esta imagem é obtida pela substituição dos valores dos pixels não nulos, presentes na última máscara, pelo valor 1.

11. Remoção de pixels dispersos na imagem binária (ruído), através da função do *Matlab*: *bwmorph('clean')*.

12. De seguida, os objectos na fronteira da imagem binária são retirados pela remoção de todos os pixels de valor igual aos pixels presentes na fronteira da imagem.

13. Obtenção da máscara final não binária por utilização da imagem resultante do ponto 12 como máscara para retirar as sujidades e objectos na fronteira, da máscara não binária do ponto 9.



Figura 6.8 - Imagem da máscara final não binária (ponto 13).

Segue-se a fase de reconhecimento e isolamento dos objectos (bactérias fluorescentes):

14. Para o reconhecimento de cada objecto é utilizada uma operação própria do *Matlab*, *bwlabel*, que efectua uma identificação numérica dos objectos na imagem resultante do ponto 12. Isto é, identifica cada objecto pela substituição dos valores dum conjunto de pixels ligados por um valor inteiro diferente de objecto para objecto.

15. Isolamento dos objectos, da imagem resultante do ponto 13 através da função própria do *Matlab*: *imcrop*.

16. Escolha dos objectos com tamanho igual ou superior a 3x3 pixels.

Pode-se considerar, a partir deste momento, que a fase de processamento da imagem terminou. Para a determinação dos parâmetros desejados, é necessário proceder à fase de análise de imagem no seu sentido mais restrito.

Os parâmetros calculados no decurso deste estudo foram os seguintes: Índice de Fluorescência, Fluorescência de Fundo e Número de Bactérias Fluorescentes. O modo como são calculados encontra-se descrito de seguida:

17. Determinação prévia da área de cada objecto (bactéria) através da contagem do número de pixels não nulos.

18. Índice de Fluorescência: é a média dos valores da intensidade normalizada, na imagem resultante do ponto 13, de cada bactéria. É calculado como o rácio entre a soma de todos os valores dos pixels pertencentes a cada bactéria fluorescente e a área da mesma. Este cálculo é efectuado utilizando a imagem final do processamento de imagem.

19. Fluorescência de Fundo: é a média dos valores de todos os pixels da imagem do fundo, resultante do ponto 5.

20. Número Total de Bactérias Fluorescentes: obtido através da contagem do número de objectos (bactérias).

Por último, os resultados são guardados em ficheiros texto (.txt), escolhidos pelo utilizador, através de uma função própria do *Matlab*.

Um organigrama do programa encontra-se na figura seguinte:

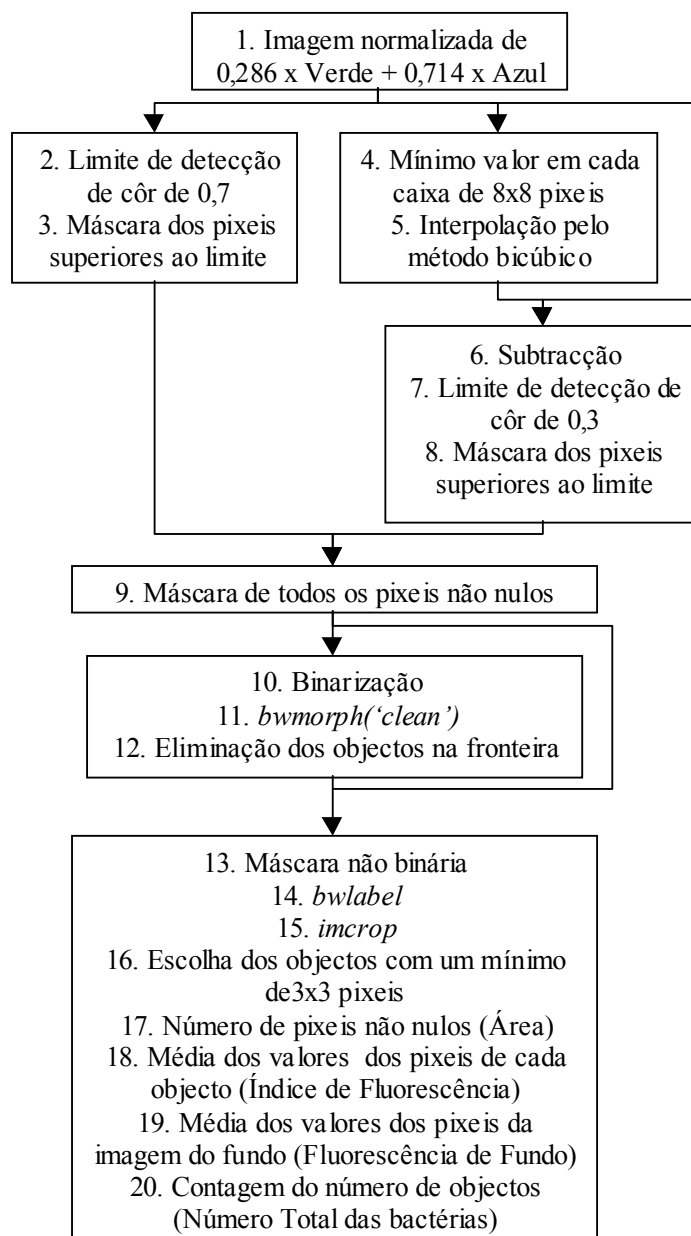


Figura 6.9 - Organograma do programa *Fluor_v4*.

6.4 Resultados e Discussão

Os resultados mais importantes, nomeadamente as actividades e os parâmetros de fluorescência determinados, encontram-se descritos de seguida. As perturbações (suspensão de alimentação e suspensão de alimentação + entrada de ar) sucederam aos 7 e 28 dias respectivamente. Estas perturbações tiveram a duração média de 3 dias.

Para a determinação dos parâmetros de fluorescência foram retiradas cerca de 35 fotografias por amostra.

A evolução das actividades metanogénicas específicas em acetato e H_2/CO_2 e dos sólidos voláteis, ao longo do tempo, encontra-se tabelada de seguida.

Tabela 6.II – Valores da actividade em acetato, hidrogenofílica e dos sólidos suspensos voláteis, ao longo do tempo.

Dia	Act. esp. Acetato mlCH ₄ @PTN/gSV.dia	Act. esp. Hidrogenofílica mlCH ₄ @PTN/gSV.dia	SV (g/l)
Inóculo	--	--	2,03
0	0	0	2,76
4	--	--	3,14
7	3,855	175,3	3,73
11	1,004	137,4	2,933
14	--	--	2,933
17	--	--	2,667
21	0	127,1	1,653
22	--	--	2,073
24	--	--	2,820
28	3,433	357,4	3,227
32	16,627	397,3	0,960
35	7,725	202,2	0,800
39	--	--	1,033
42	47,912	203,4	0,567
46	--	--	1,367
49	82,275	406,0	0,860
53	--	--	0,793

As representações gráficas dos valores da última tabela encontram-se na Figura 6.10, Figura 6.11, Figura 6.12, Figura 6.13 e Figura 6.14.

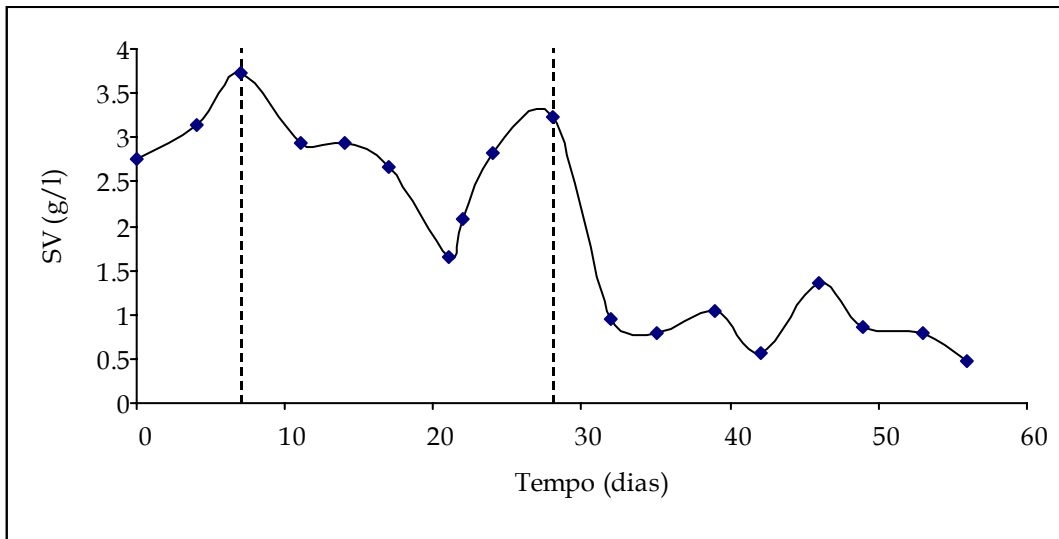


Figura 6.10 - Evolução dos sólidos voláteis ao longo do tempo.

A representação gráfica da evolução dos sólidos voláteis ao longo do tempo, permite evidenciar o decréscimo da matéria orgânica (devida aos microrganismos) em função das perturbações verificadas no digestor. Assim, ao aumento inicial dos sólidos voláteis devido ao crescimento do consórcio metanogénico, existe uma quebra brusca depois da primeira perturbação (ruptura da alimentação), a partir dos 7 dias. Após um novo período de crescimento, com alimentação, dá-se uma nova quebra com a segunda perturbação (ruptura de alimentação e entrada de ar). Isto acontece a partir dos 28 dias. A partir desse momento o valor dos sólidos voláteis manteve-se aproximadamente constante, evidenciando o não crescimento dos microrganismos.

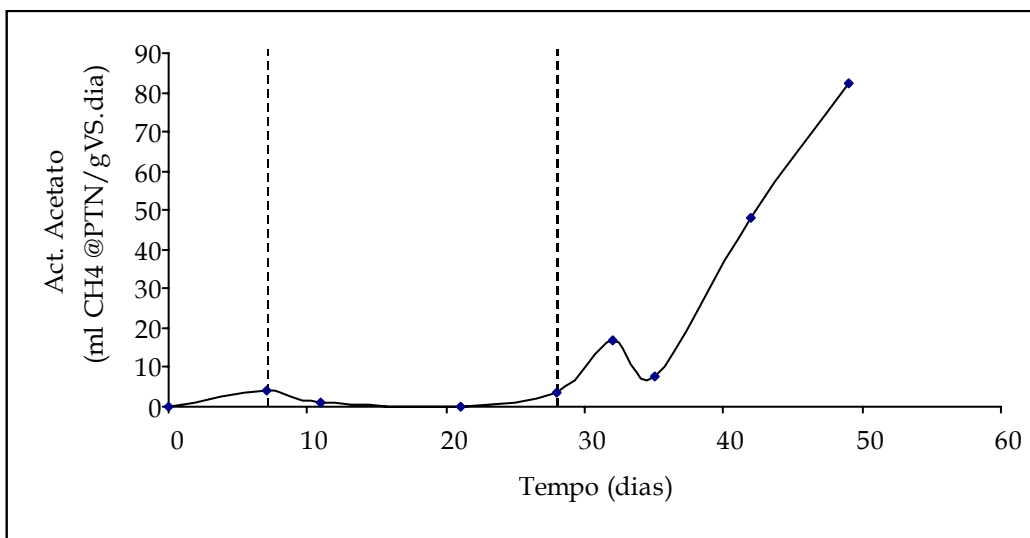


Figura 6.11 - Evolução da actividade acetoclástica específica ao longo do tempo.

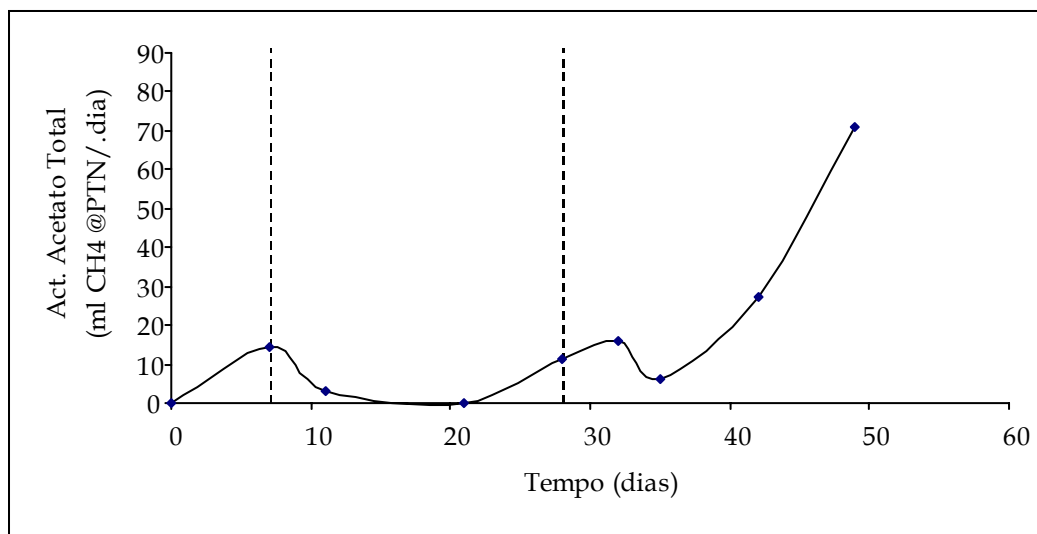


Figura 6.12 - Evolução da actividade acetoclástica total ao longo do tempo.

Analisando a Figura 6.11 pode-se concluir que a actividade acetoclástica específica subiu ao longo do tempo, de um modo exponencial. Apresenta, no entanto uma quebra ligeira a seguir ao dia 7 e uma outra, um pouco mais acentuada, a seguir ao dia 32. Verifica-se que os valores da actividade acetoclástica baixaram imediatamente após a primeira perturbação e pouco depois da segunda perturbação. A actividade acetoclástica total (Figura 6.12) segue a mesma tendência que a específica, embora de uma forma não tão pronunciada.

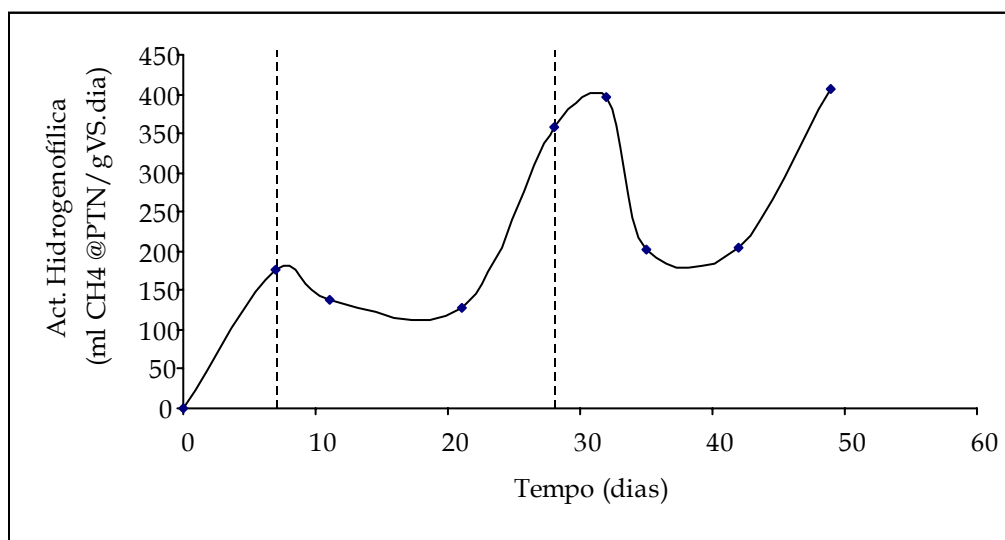


Figura 6.13 - Evolução da actividade hidrogenoflica específica ao longo do tempo.

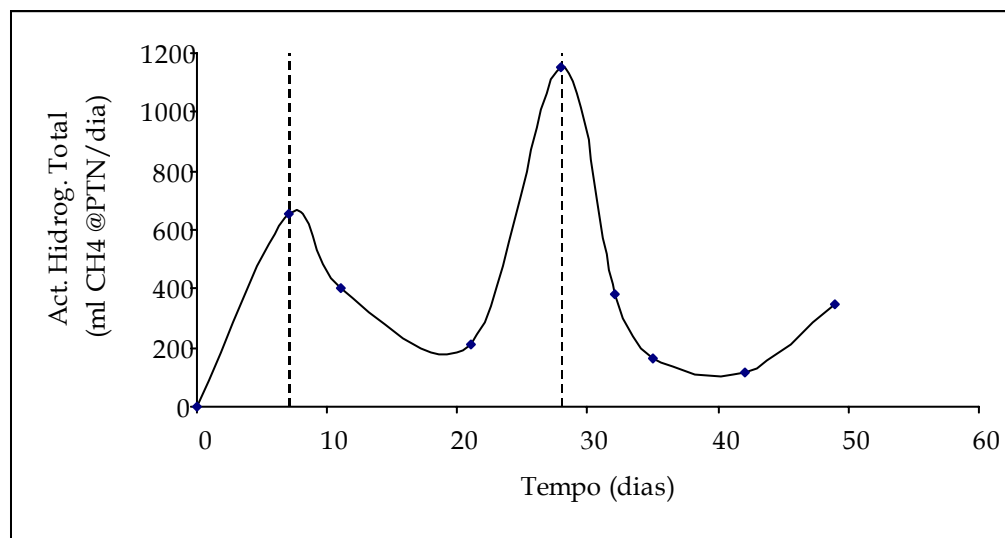


Figura 6.14 - Evolução da actividade hidrogenofílica total ao longo do tempo.

Analisando a Figura 6.13 pode-se concluir que a actividade hidrogenofílica específica subiu, de um modo geral, ao longo do tempo, apresentando uma quebra ligeira a seguir ao dia 7 e uma outra mais acentuada a seguir ao dia 32. Mais uma vez se verifica que os valores da actividade hidrogenofílica baixaram imediatamente após a primeira perturbação e pouco depois da segunda perturbação. A actividade hidrogenofílica total (Figura 6.14) segue a mesma tendência que a específica, embora com um tempo de reacção imediato à segunda perturbação.

A evolução da concentração dos ácidos à entrada e à saída, ao longo do tempo, encontra-se tabelada de seguida.

Tabela 6.III - Valores das concentrações dos ácidos acético, propiónico e butírico à entrada e à saída, ao longo do tempo.

Dia	Ác. Acético (mg/l)		Ác. Propiónico (mg/l)		Ác. Butírico (mg/l)	
	Entrada	Saída	Entrada	Saída	Entrada	Saída
0	--	111,3	--	79,7	--	18,8
4	704,9	31,4	902,2	0	1022,9	0
7	703,5	38,3	922,7	0	1129,0	0
11	633,4	--	798,2	0	943,3	0
14	697,8	31,8	846,9	50,5	1034,4	0
17	767,1	--	944,7	--	1176,6	0
21	965,7	21,4	1181,0	--	1454,2	0
24	893,4	50,8	1094,5	68,2	1353,0	0
28	481,4	203,2	597,8	103,5	742,2	9,5
32	1133,4	0	1461,3	50,1	1846,9	0
35	772,6	15,2	951,3	43,2	1154,4	0
39	658,2	21,9	881,4	57,8	1049,6	0
42	946,3	--	1165,7	61,8	1461,9	0
46	881,4	61,3	1118,4	59,8	1386,7	10,0
49	753,9	--	1010,6	--	1226,2	0
53	693,1	26,2	876,1	44,4	--	0
56	688,4	14,7	876,7	43,6	1046,5	0

A representação gráfica das conversões dos ácidos, ao longo do tempo, encontra-se nas Figura 6.15.

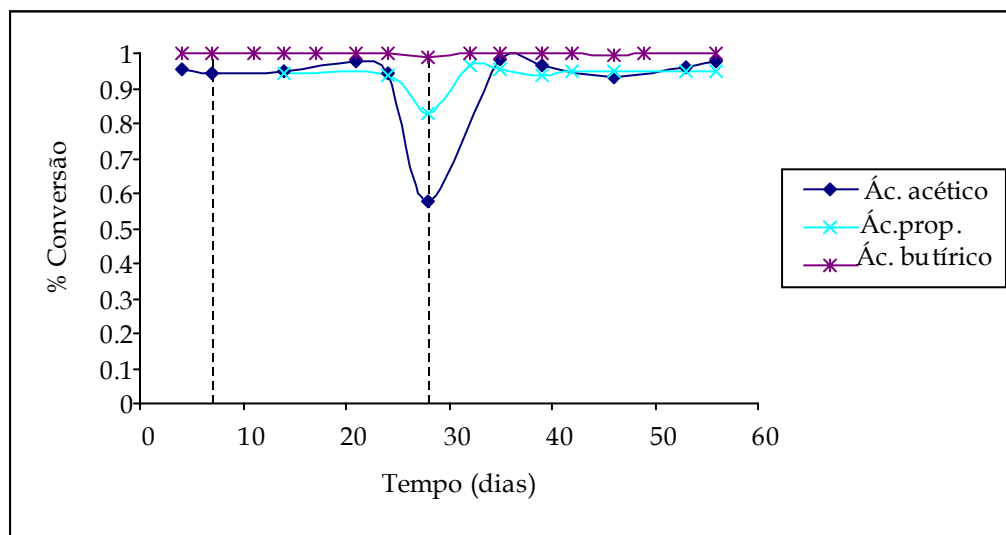


Figura 6.15 – Evolução da conversão dos ácidos ao longo do tempo.

Analisando as figuras obtidas pode-se concluir que a conversão dos ácidos gordos voláteis foi praticamente total, à excepção de quando o sistema foi perturbado com a entrada de ar. Neste caso verificou-se um decréscimo da conversão para todos os ácidos sendo, no entanto mais notório para os ácidos acético e propiônico.

Os valores do número total de bactérias fluorescentes por floco, índice de fluorescência e fluorescência do fundo, ao longo do tempo, encontram-se na Tabela 6.IV.

Tabela 6.IV – Valores da área total de bactérias fluorescentes/floco, índice de fluorescência e fluorescência do fundo, ao longo do tempo.

Dia	Nº Total de Bactérias Fluorescentes / Floco	Índice de Fluorescência	Fluorescência do Fundo
11	9,3	0,6412	0,1145
14	11,1	0,6690	0,1284
17	12,0	0,6453	0,1098
21	14,2	0,6405	0,1132
28	6,1	0,6389	0,1093
32	11,3	0,6364	0,0985
35	8,1	0,6326	0,0988
42	9,8	0,6042	0,0566
49	6,7	0,6479	0,0939

A representação gráfica destes valores encontra-se na Figura 6.16, Figura 6.17 e Figura 6.18:

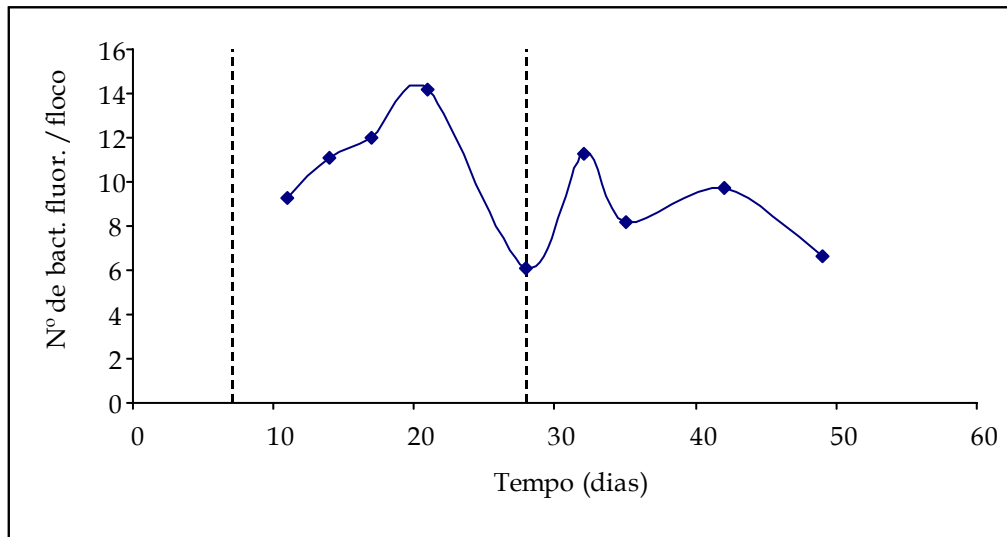


Figura 6.16 - Evolução do número de bactérias fluorescentes / floco ao longo do tempo.

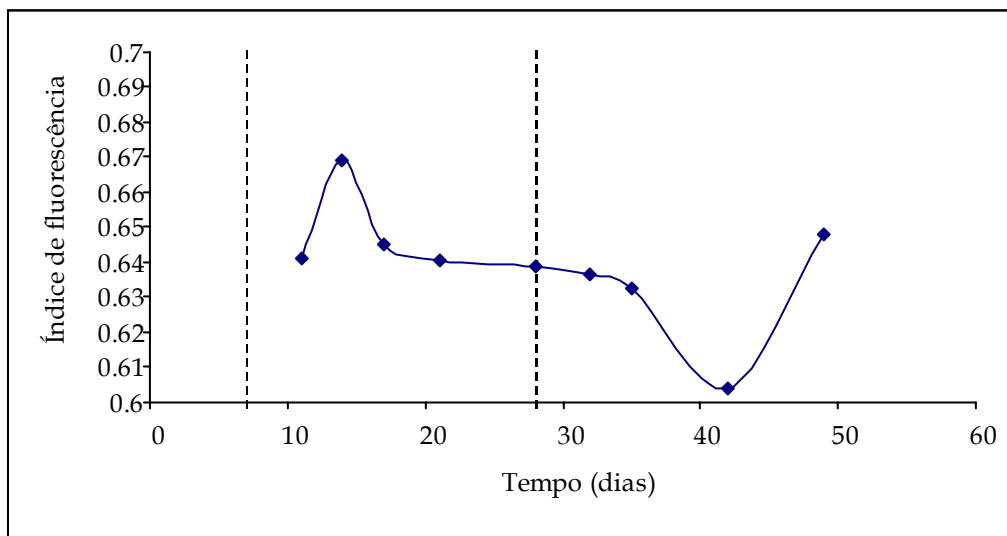


Figura 6.17 - Evolução do índice de fluorescência ao longo do tempo.

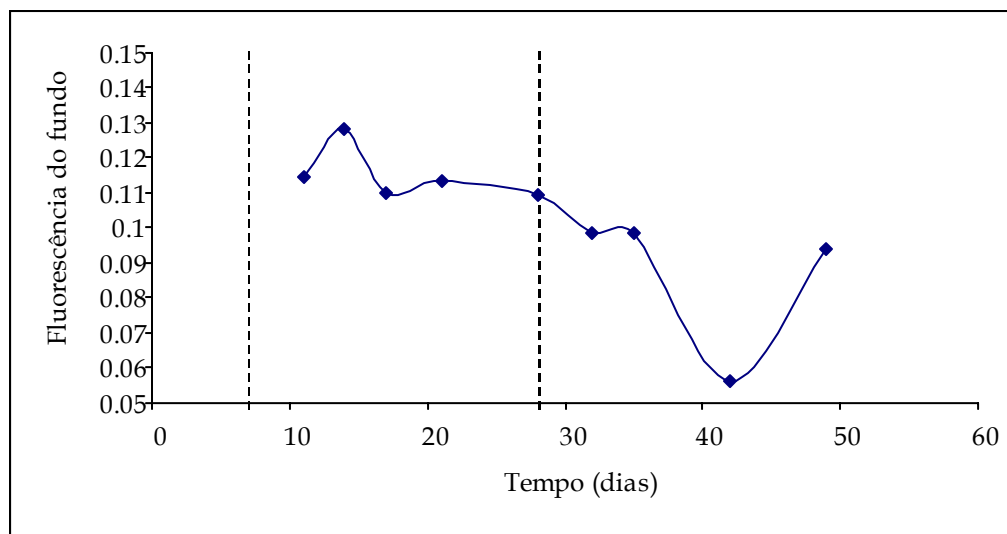


Figura 6.18 - Evolução da fluorescência do fundo ao longo do tempo.

A evolução dos parâmetros tradicionais de monitorização (actividades e sólidos voláteis), ao longo do tempo, encontra-se representada de seguida em comparação com o número total de bactérias por floco. Os valores encontram-se normalizados, para uma melhor comparação.

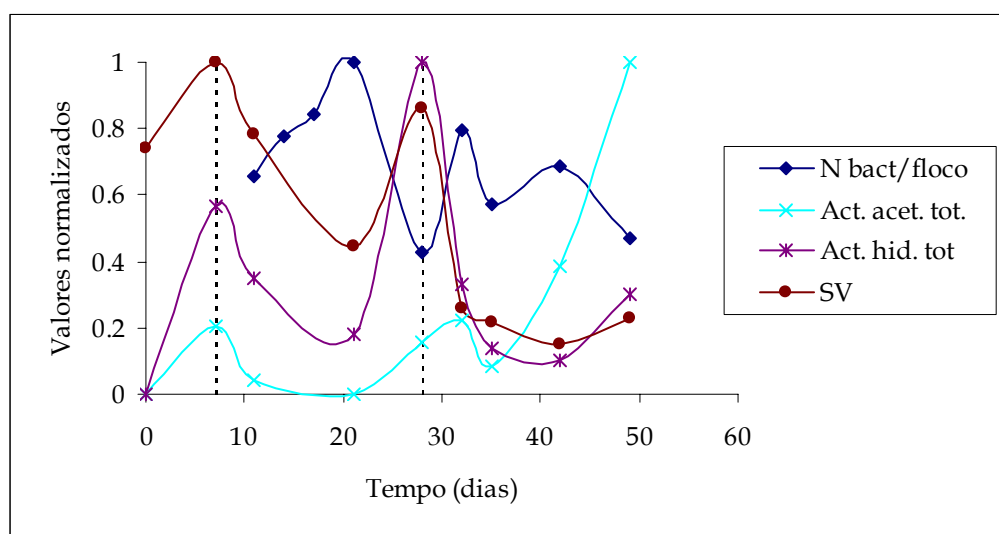


Figura 6.19 - Evolução dos diversos parâmetros ao longo do tempo.

A partir dos valores obtidos não se pode estabelecer uma relação entre o número de bactérias por floco e parâmetros tradicionais de monitorização, variando os primeiros de um modo independente dos restantes.

Os parâmetros actividade hidrogénofílica total e sólidos voláteis, mostraram-se correlacionáveis do modo representado pela Figura 6.20.

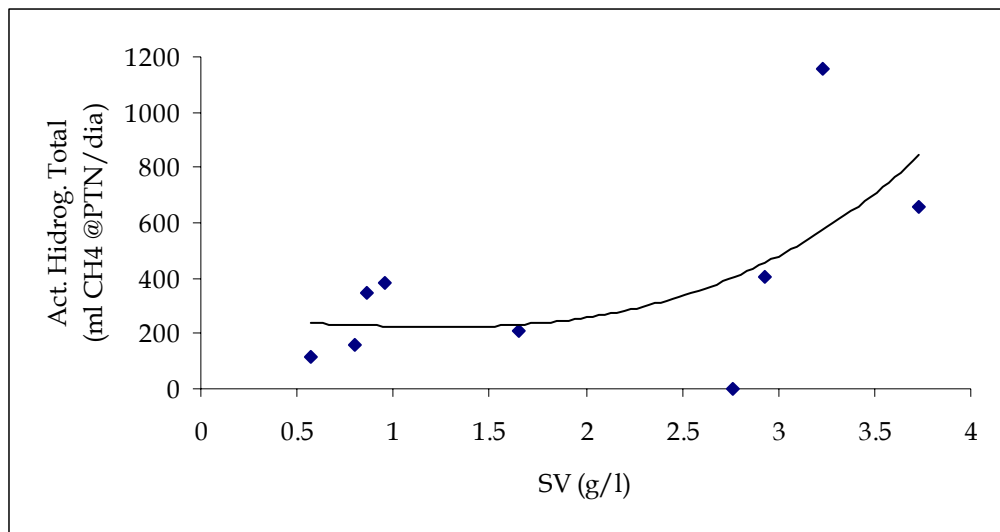


Figura 6.20 – Correlação entre a actividade hidrogenofílica total e a concentração de sólidos voláteis.

Analisando a Figura 6.20 pode-se concluir que a actividade hidrogenofílica total aumenta com o aumento da concentração dos sólidos voláteis, sendo a linha de tendência aproximadamente de uma forma exponencial.

Apenas para o parâmetro obtido através da análise de imagem, fluorescência de fundo, foi possível estabelecer uma relação com um dos parâmetros tradicionais de monitorização, nomeadamente os sólidos voláteis. Essa relação está exposta na figura seguinte:

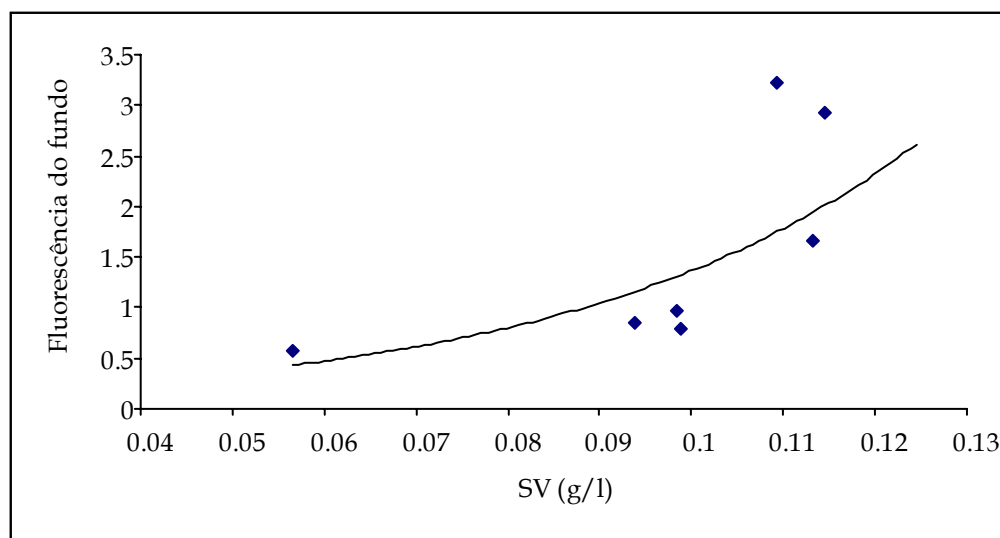


Figura 6.21 – Correlação entre a fluorescência do fundo e a concentração de sólidos voláteis.

Analisando a Figura 6.21 pode-se concluir que a fluorescência do fundo aumenta, conforme seria de esperar com o aumento da concentração dos sólidos voláteis, sendo a linha de tendência, mais uma vez, aproximadamente de uma forma exponencial.

Os parâmetros Fluorescência do fundo e Índice de fluorescência, mostraram-se bem correlacionáveis entre si, como se pode concluir da figura seguinte:

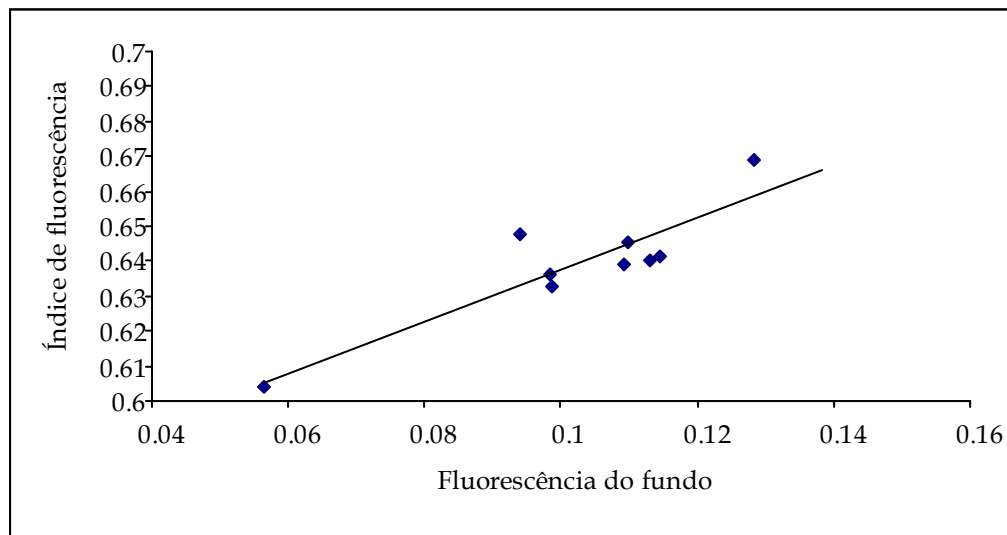


Figura 6.22 - Representação gráfica dos parâmetros Índice de fluorescência e Fluorescência do fundo.

Analisando a Figura 6.22 pode-se retirar que o índice de fluorescência é directamente proporcional à fluorescência de fundo.

6.5 Conclusões

As principais dificuldades encontradas neste trabalho foram as seguintes:

- Cada espécie metanogénica possui uma concentração diferente do co-factor F_{420} , o que implica que a fluorescência emitida será diferente de espécie para espécie, estando também dependente das próprias condições ambientais.
- As diferentes espécies de bactérias metanogénicas possuem formas e tamanhos diferentes, o que, conjugado com o facto de poderem surgir em aglomerados (flocos), dificulta a determinação do número total de bactérias.
- A existência de lise de células bacterianas provoca a libertação do co-factor F_{420} e o fundo torna-se assim, ele próprio fluorescente, o que implica uma maior dificuldade de reconhecimento das células.
- As espécies hidrogenotróficas apresentam maiores índices do co-factor F_{420} do que as espécies acetoclásticas (e menor produção de metano), o que impossibilita a correlação directa entre o valor da fluorescência e a actividade metanogénica total.

As principais conclusões que podem ser retiradas deste trabalho são as seguintes:

- As bactérias anaeróbias presentes no digester mostraram-se bastante sensíveis às perturbações verificadas. Verificou-se, deste modo, um decréscimo pronunciado após qualquer uma das perturbações. No caso da primeira perturbação, com a ruptura da alimentação, o número das mesmas diminui significativamente, numa primeira fase voltando depois a aumentar, passado cerca de 14 dias. No caso da segunda perturbação, que envolveu também entrada de ar no sistema, o consórcio de bactérias não chegou a recuperar.
- As actividades metanogénicas específicas (em acetato e H_2/CO_2) mostraram uma tendência crescente ao longo do tempo, mais acentuada no caso da acetoclástica. Com efeito, esta mostrou-se menos sensível às perturbações efectuadas no sistema, com menores quedas do que a actividade hidrogenofílica. Este facto não era teoricamente previsível, uma vez que as bactérias acetoclásticas (*Methanosaeta* e *Methanosarcina*), responsáveis pela produção de metano a partir do acetato, são as que possuem uma menor resistência a condições adversas.
- A evolução da actividade hidrogenofílica total mostrou-se melhor correlacionável com a evolução da concentração de sólidos voláteis do que a actividade acetoclástica total, assumindo uma linha de tendência aproximadamente exponencial.

- A conversão dos ácidos gordos voláteis foi praticamente total, à excepção de quando o sistema foi perturbado com a entrada de ar, em que houve um decréscimo da conversão para todos os ácidos, mais notório para os ácidos acético e propiónico.

- Os parâmetros índice de fluorescência, fluorescência do fundo e número de bactérias fluorescentes por floco, não se mostraram relacionáveis com os parâmetros acima mencionados à excepção da fluorescência do fundo com os sólidos voláteis.

- Tal como sugerido por Alves *et al.* (1995), o número de bactérias fluorescentes presentes não se mostrou directamente correlacionável com as actividades calculadas, devido não só a possíveis erros na identificação como principalmente ao facto de a concentração do co-factor F₄₂₀ ser diferente para diferentes espécies de bactérias metanogénicas.

- A fluorescência do fundo e a concentração de sólidos voláteis mostraram-se correlacionáveis, assumindo a linha de tendência uma forma aproximadamente exponencial. Este facto pode ser explicado devido à libertação do co-factor F₄₂₀, por lise das bactérias, o que vai implicar uma elevada concentração deste nos flocos (sólidos voláteis). Outra explicação pode ser o facto de existirem bactérias desfocadas presentes nos flocos.

- A forma das curvas índice de fluorescência e fluorescência do fundo são muito parecidas dado que se verificou que as bactérias presentes no interior dos flocos possuíam uma intensidade de fluorescência superior.

7. Bibliografia

Os artigos, livros, capítulos de livros, manuais e relatórios consultados para este trabalho encontram-se referenciados de seguida:

- Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, JD (1994). 'Molecular Biology of the Cell', Garland Publishing Inc, New York.
- Alves, MM (1998). 'Estudo e Caracterização de Digestores Anaeróbios de Leito Fixo', Tese de Doutoramento, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga.
- Alves, MM; Mota, M; Novais, JM (1995). 'Técnicas de Caracterização e Estudo de Digestores Anaeróbios', *Boletim de Biotecnologia*, 52: 25-39.
- Amaral, AL (1996). 'Caracterização Morfológica de Partículas (Agregados)', Relatório de Estágio da Licenciatura de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga.
- Amaral, AL; Alves, MM; Mota, M; Ferreira, EC (1997). 'Morphological Characterization of Microbial Aggregates by Image Analysis', *Proceedings do RecPad'97 - 9ª Conferência de Reconhecimento de Padrões*, 95-100.
- Baptiste, C (1998). 'Caracterisation de Protozoaires de Boues Activées', Rapport de fin d'études, Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, Nancy.
- Bellouti, M; Alves, MM; Novais, TM; Mota, M (1997). 'Flocs vs Granules: Differentiation by Fractal Dimension', *Wat. Res.*, 31:5: 1127-1231.
- Bitton, G; Koopman, K; Jung, K; Voiland, G; Kotob, M (1993). 'Modification of the Standard Epifluorescence Microscopic Method for Total Bacterial Counts in Environmental Samples', *Wat. Res.*, 27:7: 1109-1112..
- Chandwani, RM; Pate, ME; Savery, J; Thornhill, NF; Horstmann, B; Hoare, M; Titchener-Hooker, NJ (1997). 'The Use of Principal Components Analysis as a Database Mining Tool for the Exploratory Diagnosis of Chromatographic Processes', *Bioprocess Eng.*, 17: 229-234.
- Cheeseman, P; Toms-Wood, A; Wolfe, RS (1972). 'Isolation and Properties of a Fluorescent Compound, Factor₄₂₀ from Methanobacterium Strain M.o.H.', *J. of Bacteriology*, 112: 1: 527-531.
- Curds, CR; Cockburn, A (1970). 'Protozoa in Biological Sewage Treatment Processes - Protozoa as Indicators in the Activated Sludge' *Wat. Res.*, 4: 237-249.
- Doddema, HJ; Godfried, DG (1978). 'Improved Identification of Methanogenic Bacteria by Fluorescence Microscopy', *Appl. Env. Microbiol.*, 36:5: 752-754.
- Dolfing, J; Mulder, JW (1985). 'Comparison of Methane Production Rate and Coenzyme F₄₂₀ Content of Methanogenic Consortia in Anaerobic Granular Sludge', *Appl. Env. Microbiol.*, 49: 1142-1145.
- Donnelly, DP; Wilkins, MF; Body, L (1995). 'An Integrated Image Analysis Approach for Determining Biomass, Radial Extent and Box-Count Fractal Dimension of Macroscopic Mycelial Systems', *Binary*, 7: 19-28.
- Dougherty, ER (1994). 'Digital Image Processing Methods', Marcel Dekker, Inc, New York.
- Dudley, BT; Howgrave-Graham, AR; Bruto, AG; Wallis, FM (1993). 'Image Analysis to Quantify and Measure Digester Granules', *Biotechnol. Bioeng.*, 42: 279-283.
- Fenchel, T (1987). 'Ecology of Protozoa', Springer-Verlag, Berlin.
- Fernandez-Leborans, G; Novillo, A (1996). 'Protozoan Communities and Contamination of Several Fluvial Systems', *Wat. Env. Res.*, 68:3: 311-319.

- Ganczarczyk, JJ (1994). 'Microbial Aggregates in Wastewater Treatment', *Wat. Sci. Tech.*, 30:8: 87-95.
- Glasbey, CA; Horgan, CW (1994). 'Image Analysis For the Biological Sciences', John Wiley & Sons, Chichester.
- Häder, DP (1994). 'Real Time Tracking of Microorganisms', *Binary*, 6: 81-85.
- Häder, DP; Lebert, M (1997). 'Effects of the Hypergravity on the Photosynthetic Flagellate: *Euglena gracilis*', *J. Plant Physiology*, 150: 153-159.
- Häder, DP; Rosum, A; Schäfer, J; Hemmersbach, R (1996). 'Graviperception in the Flagellate *Euglena gracilis*, During a Shuttle Space Flight', *J. Biotechnol.*, 47: 261-269.
- Heldal, M; Norland, S; Bratbak, G; Riemann, B (1994). 'Determination of Bacterial Cell Number and Cell Volume by Means of Flow Cytometry, Transmission Electron Microscopy, and Epifluorescence Microscopy', *J. Microbiol. Methods*, 20: 255-263.
- Hermanowicz, SW; Scindler, U; Widerer, P (1995). 'Fractal Structure of Biofilms: New Tools for Investigation of Morphology', *Wat. Sci. Tech.*, 32: 8: 99-105.
- Jahn, TL; Bovee, EC; Jahn, FF (1979). 'How to Know the Protozoa', Wm. C. Brown Company Publishers, Dubuque.
- Jähne, B (1995). 'Digital Image Processing', Springer-Verlag, Berlin.
- Lebert, M; Häder, DP (1997). 'Effects on Hypergravity on the Photosynthetic Flagellate *Euglena gracilis*', *J. Plant Physiology*, 150: 153-159.
- Lebert, M; Richter, P; Porst, M; Häder, DP (1996). 'Mechanism of Gravitaxis in the Flagellate *Euglena gracilis*', *Proceedings of the CEBAS Workshop*, 225-234.
- Lee, Y; McIntire, EV; Zygounakis, K (1994). 'Analysis of Endothelial Cell Locomotion: Differential Effects of Motility and Contact Inhibition', *Biotechnol. Bioeng.*, 43: 622-634.
- Liebovitch, LS; Toth, T (1989). 'A Fast Algorithm to Determine the Fractal Dimension by Box Counting', *Physics Letters A*, 141:89: 386-390.
- Lynn, DH (1992). 'A Brief Review of Approaches Using Ciliated Protists to Assess Aquatic Ecosystem Health' *J. Aquatic Ecosystem Health*, 1: 263-270.
- Macek, M (1989). 'Experimental Approach to the Role of Different Ecological Types of Protozoa in the Activated Sludge System' *Int. Revue Ges. Hydro-biology*, 74:6: 643-656
- Madoni, P (1994). 'La Microfauna nell'Analisi di Qualità Biologica dei Fanghi Attivi, Manuale di Applicazione', Università degli Studi di Parma, Parma.
- Madoni, P (1994). 'A Sludge Biotic Index (SBI) for the Evaluation of the Biological Performance of Activated Sludge Plants Based on the Microfauna Analysis', *Wat. Res.*, 28:1: 67-75.
- Madoni, P; Davdi, D; Chierici, E (1993). 'Comparative Analysis of Activated Sludge Microfauna in Several Sewage Treatment Works', *Wat. Res.*, 27:9: 1485-1491.
- Mandelbrot, B (1977). 'Fractals, Form and Chance'. Freeman, San Francisco.
- MathWorks (The), Inc (1997). 'Matlab: Image Processing Toolbox User's Guide'.
- Miller, JC; Miller, JN (1992). 'Statistics for Analytical Chemistry', Ellis Horwood, New York.
- Mink, RW; Dugan, PR (1977). 'Tentative Identification of Methanogenic Bacteria by Fluorescence Microscopy', *Appl. Env. Microbiol.*, 33:3: 713-717.
- Noesis S.A. (1998). 'Visilog 5 Documentation Set'.
- Obert, M; Pfieler, P; Sernetz, H (1990). 'Microbial Growth Patterns Described by Fractal Geometry', *J. Bacteriology*, 172: 1180-1185.

- Otsu, N (1979). 'A Threshold Selection Method from Gray-level Histograms', *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 1:9: 62-66.
- Owens, JM; Pullammanappallil, P; Chynoweth, DP; Svoronos, SA (1992). 'NAD(P)H and F₄₂₀ Fluorescence Monitoring in Anaerobic Digestion'. 'Modeling and Control of Biotechnical Processes' (Karim, MN; Stephanopoulos, G), Pergamon Press, Oxford.
- Patankar, DP; Liu, TC; Oolman, T (1993). 'A Fractal Model for the Characterization of Mycelial Morphology', *Biotechnol. Bioeng.*, 42: 571-578.
- Pichon, D; Vivier, H; Pons, MN (1992). 'Growth Monitoring on Filamentous Microorganisms by Image Analysis'. 'Modeling and Control of Biotechnical Processes' (Karim, MN; Stephanopoulos, G), Pergamon Press, Oxford.
- Pons, MN; Vivier, H; Rémy, JF; Dods, JA (1993). 'Morphological Characterization of Yeast by Image Analysis', *Biotechnol. Bioeng.*, 42: 1352-1359.
- Pons, MN; Wagner, A; Nivier, H; Marc, A (1992). 'Application of Quantitative Image Analysis to a Mammalian Cell Line Grown on Microcarriers', *Biotechnol. Bioeng.*, 40: 187-193.
- Raynal, L; Barnwell, P; Gervais, P (1994). 'The Use of Epi-Fluorescence to Determine the Viability of *Saccharomyces cerevisiae* Subjected to Osmotic Shifts', *J. of Biotechnol.*, 36: 121-127.
- Reynolds, PJ (1986). 'Support Matrix and Feed Flow Effects in Anaerobic Fixed Bed Reactors'. Tese de Doutoramento, University College of Galway, Ireland.
- Robinson, RW; Akin, DE; Nordsted, RA; Thomas, MV; Aldrich, HC (1984). 'Light and Electron Microscopic Examinations of Methane-Producing Biofilms from Anaerobic Fixed-Bed Reactors', *Appl. Env. Microbiol.*, 48:1: 127-130.
- Russ, JC (1991). 'Computer Assisted Microscopy: The Measurement and Analysis of Images', Plenum Press, New York.
- Russ, JC (1995). 'The Image Processing Handbook', CRC Press, Boca Raton.
- Salvadó, H; Gracia, MP; Amigó, JM (1995). 'Capability of Ciliated Protozoa as Indicators of Effluent Quality in Activated Sludge Plants' *Water Res.*, 29:4: 1041-1050.
- Tomkins, J; DeVille, MM; Day, JC; Turner, MF (1995). 'Catalogue of Strains of CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa)', Natural Environment Research Council, Ambleside.
- Tsuchido, T; Takeushi, H; Kawahara, H; Obata, H (1994). 'Evaluation of Bacterial Injury by Image Analysis of Cell Motion', *J. Fermentation and Bioeng.*, 78:2: 185-187.
- Tsuchido, T; Yasunaga, K; Matsumura, Y; Oku, K (1996). 'Use of A Tumbling Defective Mutant of *Escherichia coli* for Evaluation of Pollutant Toxicity by Computer-Assisted Image Analysis of Bacterial Motion', *Biocontrol Sci.*, 1:1: 61-63.
- Vecht-Lifshitz, SE; Ison, AP (1992). 'Biotechnological Applications of Image Analysis: Present and Future Prospects', *J. Biotechnol.*, 23: 1-18.
- Vieira, JC; Ferreira, EC; Teixeira, JA (1998). 'Phase Contrast Microscopy Coupled to Image Analysis as a Rapid Method to Monitor Wine Flora'. 'Biotec'98 Book of Abstracts' (Mota, M; Ferreira, EC), 393.
- Wakatsuki, T; Tasaki, Y; Imahara, H (1986). 'Respiratory Inhibition by Copper in *Tetrahymena pyriformis* GL', *J. Fermentation Technol.*, 2: 119-127.
- Wetherbee, R; Andersen, RA; Pickett-Heaps, JD (1994). 'The Protistan Cell Surface', Springer Verlag, Berlin.
- Wheatley, A (1990). 'Anaerobic Digestion: A Waste Treatment Technology', Elsevier Science, London.
- Wistreich, GA; Lechtman, MD (1998). 'Microbiology', McMillan Publishing Company, New York.

Yun-Fen, S; Buikema, AL; Vongue Jr, WH; Pratt, JR and Cairns Jr, J (1986). 'Use of Protozoan Communities to Predict Environmental Effects of Pollutants' *J. Protozool.*, 33:2: 146-151.

8. Nomenclatura

Os símbolos e terminologias utilizados ao longo deste relatório encontram-se devidamente explicitados a seguir:

η – Critério discriminatório da separabilidade de classes
 σ – Desvio padrão.
 ϕ – Fase de uma função
 φ – Filtro linear
 μ – Valor médio
 $\delta(X)$ – Fronteira mais próxima do objecto X
 σ^2 – Variância total
 σ^2_B – Variância entre classes
 ω_i – Probabilidade de ocorrência
 Δ_{xx} – Diferença entre centróides no eixo dos xx
 Δ_{yy} – Diferença entre centróides no eixo dos yy
.im5 – Extensão de ficheiro de gravação de *Visilog*
.m – Extensão de ficheiro de programação de *Matlab*
.mat – Extensão de ficheiro de dados de *Matlab*
.txt – Extensão de ficheiro de texto
Ác. – Ácido
ACP – Análise de Componentes Principais
ADN – Ácido desoxirribonucleico
AGV – Ácidos gordos voláteis
ARN – Ácido ribonucleico

FC - factor de calibração
FF - Forma de Feret
frames - Imagens
gif - *Compuserve Bitmap*
HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*
IBP - Indicador Biológico de Poluição
jpeg - *Joint Photographers Expert Group*
L - Tamanho de caixa
max - Máximo
 $m_{i,j}$ - Momento de ordem i,j
MP - Percentagem de metano
mpeg - *Moving Pictures Expert Group*
n - Número de amostras
NAD - Nicotinamida
NADP - Nicotinamida di-fosfato
PC - Computador pessoal
 P_{Crofton} - Perímetro de Crofton
 π_i - Número de pixels no nível i
pixel - *picture element* (elemento da imagem)
PPY - *Peptone Proteose Yeast Extract Medium*
PTN - Pressão e temperaturas normais ($P=1 \text{ atm}$, $T=0 \text{ }^\circ\text{C}$)
PVC - Cloreto de polivinil
R - Correlação
RAM - *Random Access Memory*
RGB - *Red, Green and Blue*
SDH - Succinato desidrogenase
sp. - Espécie
SV - Sólidos voláteis
t - Parâmetro t de Student
tiff - *Tagged Image File Format*
Val(x) - Valor de x
 V_c - Volume de biogás produzido durante o teste
 V_h - Volume de gás inicialmente presente no frasco

Apêndices

Apêndice A: Resultados Intermédios Obtidos no Reconhecimento Semi-Automático de Protozoários

Os resultados intermédios obtidos encontram-se representados nas tabelas seguintes.

Os valores dos parâmetros calculados pelo programa (Forma de Feret, Forma Área-Perímetro, Excentricidade, Área e Comprimento), para cada elemento das espécies de protozoários estudadas encontram-se na Tabela 8.I.

Tabela 8.I - Valores dos parâmetros calculados para cada imagem de protozoário.

	Forma de Feret	Forma AP	Excentricidade	Área (µm ²)	Comprimento (µm)
<i>Colpidium</i>	1,07	1,33	0,04	858,06	40,02
<i>Colpidium</i>	1,04	1,72	0,03	1242,528	47,85
<i>Colpidium</i>	1,07	1,13	0,01	1521,66	47,85
<i>Colpidium</i>	1,31	1,09	0,04	1533,672	52,78
<i>Colpidium</i>	1,05	1,01	0,01	1659,336	48,14
<i>V. convallaria c/ped</i>	1,02	5,77	0,14	3505,152	127,02
<i>V. convallaria c/ped</i>	1,02	2,91	0,09	3842,748	124,99
<i>V. convallaria c/ped</i>	1,25	4,36	0,07	4412,1	110,2
<i>V. convallaria c/ped</i>	1,08	5,46	0,28	2260,02	141,81
<i>V. convallaria c/ped</i>	1,05	4,81	0,15	1696,716	110,49
<i>V. convallaria</i>	1,38	1,08	0,06	2622,06	69,89
<i>V. convallaria</i>	1,02	1,6	0,05	3040,212	78,3
<i>V. convallaria</i>	1,05	2,25	0,13	2054,808	100,92
<i>V. convallaria</i>	1	1,45	0,05	2665,992	81,49
<i>V. convallaria</i>	1,36	1,35	0,05	2909,172	75,4
<i>V. convallaria</i>	1	1,69	0,09	1650,348	68,44
<i>V. convallaria</i>	1,42	1,79	0,04	1787,52	64,67
<i>V. convallaria</i>	1,24	1,83	0,04	2677,668	71,05
<i>V. convallaria</i>	1,02	1,26	0,03	3099,012	73,08
<i>V. convallaria</i>	1,12	1,45	0,11	1887,48	68,44
<i>V. convallaria</i>	1,06	1,59	0,11	2708,496	83,23
<i>V. convallaria</i>	1,01	1,27	0,06	4208,148	93,67
<i>V. convallaria</i>	1,23	1,32	0,04	3197,544	78,88
<i>Epistylis</i>	1,02	1,52	0,11	1937,712	78,01
<i>Epistylis</i>	1,27	1,13	0,06	1787,268	59,16
<i>Epistylis</i>	1,29	1,4	0,05	1643,376	58
<i>Epistylis</i>	1,22	1,05	0,03	1808,604	57,42
<i>Epistylis</i>	1,03	1,7	0,06	2547,384	82,07
<i>Epistylis</i>	1,01	1,1	0,02	2687,16	62,93
<i>Epistylis</i>	1,22	1,67	0,04	2340,24	72,79
<i>Epistylis</i>	1,04	2,55	0,07	1366,68	67,57
<i>Epistylis</i>	1,18	1,09	0,04	1265,544	46,98

<i>Epistylis</i>	1,05	1,63	0,04	1840,356	69,89
<i>Epistylis</i>	1,04	1,55	0,05	1414,056	52,49
<i>Epistylis</i>	1,01	1,02	0,01	3785,124	75,69
<i>Epistylis</i>	1,14	1,19	0,02	4052,244	80,04
<i>Epistylis</i>	1,02	2,2	0,04	3326,988	84,97
<i>Epistylis</i>	1,68	1,7	0,08	1439,256	63,51
<i>Epistylis</i>	1,28	1,16	0,05	3385,704	80,62
<i>Epistylis</i>	1,01	1,16	0,05	3207,036	80,33
<i>Epistylis</i>	1,05	1,09	0,03	2504,712	66,12
<i>Epistylis</i>	1,24	1,15	0,04	2681,616	71,92
<i>Epistylis</i>	1,02	1,22	0,03	2030,952	57,71
<i>Euplotes</i>	1,01	1,66	0,02	730,968	39,44
<i>Euplotes</i>	1,05	1,69	0,02	778,176	39,73
<i>Euplotes</i>	1,03	1,1	0	510,888	27,55
<i>Euplotes</i>	1,05	1,38	0,02	864,864	42,05
<i>Euplotes</i>	1,32	2,04	0,02	815,136	44,08
<i>Euplotes</i>	1,22	2,31	0,02	493,5	33,93
<i>Euplotes</i>	1,39	2,04	0,04	721,14	40,31
<i>Euplotes</i>	1,12	1,65	0	1021,272	42,63
<i>Euplotes</i>	1,26	1,16	0,03	984,144	42,05
<i>Euplotes</i>	1,11	1,07	0,02	603,876	29,29
<i>Euplotes</i>	1,01	2,23	0,04	638,736	40,6
<i>Euplotes</i>	1,16	1,66	0,02	787,332	37,7
<i>Euplotes</i>	1,16	1,27	0,02	808,08	35,96
<i>Euplotes</i>	1,08	1,1	0,04	763,308	37,41
<i>Euplotes</i>	1,02	1,08	0,01	731,304	31,9
<i>Euplotes</i>	1,1	2,34	0,05	758,184	44,08
<i>Euplotes</i>	1,37	1,98	0,03	868,308	42,92
<i>Euplotes</i>	1,25	1,4	0,03	950,964	41,76
<i>Euplotes</i>	1,84	2,45	0,07	1353,408	64,96
<i>Euplotes</i>	1,23	1,77	0,05	668,22	38,28
<i>Euplotes</i>	1,03	2,02	0,11	1236,48	60,03
<i>Glaucoma</i>	1,02	2,64	0,02	1870,26	56,84
<i>Glaucoma</i>	1,01	2,23	0,05	1573,908	58,58
<i>Glaucoma</i>	1,25	2,17	0,04	1535,352	57,42
<i>Glaucoma</i>	1,04	2,06	0,05	1956,948	69,6
<i>Litonotus</i>	1,55	1,79	0,2	1230,096	70,47
<i>Litonotus</i>	1,1	1,85	0,26	594,636	52,78
<i>Litonotus</i>	1,03	1,97	0,2	1462,356	77,72
<i>Litonotus</i>	1,09	1,62	0,18	829,248	54,81
<i>Litonotus</i>	1,23	1,88	0,18	1221,696	65,83
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,04	1,9	0,06	963,06	56,26
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,4	2,06	0,05	1105,44	57,42
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,05	5,42	0,34	507,528	75,69
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,01	10,61	0,58	511,728	75,98
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,16	2,02	0,07	925,176	50,46
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,79	2,86	0,13	1587,18	87,87
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,06	2,35	0,11	1231,776	73,66
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,45	2	0,07	1092,504	55,39
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,02	3,58	0,18	1058,484	80,04
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,08	1,95	0,02	640,836	34,22

<i>V. microstoma c/ped</i>	1,01	1,82	0,09	760,116	50,46
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,61	3,87	0,2	793,296	78,01
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,06	3,04	0,1	883,764	60,03
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,02	2,79	0,11	592,536	49,59
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,32	2,67	0,15	804,552	60,61
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,02	2,86	0,16	747,852	57,71
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,08	6,05	0,51	904,428	104,11
<i>V. microstoma</i>	1,23	1,1	0,04	469,14	29,58
<i>V. microstoma</i>	1,22	1,05	0,03	865,2	37,41
<i>V. microstoma</i>	1,39	1,64	0,08	798,084	47,85
<i>V. microstoma</i>	1,09	1,04	0,01	1245,972	41,76
<i>V. microstoma</i>	1,25	1,5	0,04	947,1	41,47
<i>V. microstoma</i>	1,51	1,9	0,06	1190,028	58,58
<i>V. microstoma</i>	1,03	1,47	0,04	735,252	37,99
<i>V. microstoma</i>	1,26	1,46	0,04	1559,292	55,39
<i>V. microstoma</i>	1,17	1,35	0,01	981,204	42,34
<i>V. microstoma</i>	1,02	1,45	0,05	1083,096	50,17
<i>Opercularia</i>	1,04	0,97	0,05	3335,052	77,72
<i>Opercularia</i>	1,09	1,19	0,03	3150,84	76,85
<i>Opercularia</i>	1,01	1,01	0,04	3117,156	72,5
<i>Opercularia</i>	1,12	1,45	0,05	3388,14	75,69
<i>Opercularia</i>	1,08	1,12	0,03	3508,428	74,82
<i>Opercularia</i>	1,02	1,44	0,08	4892,16	100,34
<i>Opercularia</i>	1,34	1,61	0,06	3684,324	90,77
<i>Opercularia</i>	1,33	1,26	0,07	4997,244	105,85
<i>Opercularia</i>	1,02	1,16	0,07	5785,08	110,2
<i>Prorodon</i>	1,05	1,41	0,01	1866,312	51,62
<i>Prorodon</i>	1,03	1,1	0,03	2488,668	62,06
<i>Prorodon</i>	1,15	1,54	0,03	2134,692	62,93
<i>Prorodon</i>	1,04	2,05	0,02	1470,672	53,94
<i>Prorodon</i>	1,05	1,11	0,01	1918,98	51,91
<i>Prorodon</i>	1,03	1,73	0,01	1528,968	46,98
<i>Prorodon</i>	1,09	1,08	0,02	1523,256	46,98
<i>Prorodon</i>	1,01	1,11	0,02	1416,996	45,82
<i>Prorodon</i>	1,05	1,24	0,01	3794,868	73,95
<i>Tetrahymena</i>	1,36	1,21	0,04	475,776	30,45
<i>Tetrahymena</i>	1,6	1,14	0,08	517,272	33,35
<i>Tetrahymena</i>	1,06	1,28	0,05	370,44	26,68
<i>Tetrahymena</i>	1,03	1,23	0,08	475,44	34,51
<i>Tetrahymena</i>	1,35	1,22	0,04	306,6	24,65
<i>Tetrahymena</i>	1,24	1,24	0,05	515,004	32,77
<i>Tetrahymena</i>	1,04	1,14	0,04	358,092	24,65
<i>Tetrahymena</i>	1,03	1,13	0,07	386,4	27,55
<i>Tetrahymena</i>	1,42	1,1	0,06	347,424	25,52
<i>Trachelophyllum</i>	1,03	2,26	0,21	775,32	54,81
<i>Trachelophyllum</i>	1,49	1,59	0,17	460,236	38,57
<i>Trachelophyllum</i>	1,65	1,49	0,16	324,408	33,93
<i>Trachelophyllum</i>	1,41	1,94	0,26	455,448	45,53
<i>Trachelophyllum</i>	1,48	2,31	0,23	643,188	53,36
<i>Trachelophyllum</i>	1,03	1,72	0,22	476,616	42,92
<i>Trachelophyllum</i>	1,31	1,62	0,2	441,672	40,02

<i>Trachelophyllum</i>	1,71	2,25	0,28	386,988	42,63
<i>Zoothamnium c/ped</i>	1,07	3,93	0,08	2025,492	90,77
<i>Zoothamnium c/ped</i>	1,59	2,95	0,08	1488,564	79,75
<i>Zoothamnium c/ped</i>	1,04	3,99	0,21	2924,628	120,93
<i>Zoothamnium c/ped</i>	1,17	4,99	0,09	3217,872	132,24
<i>Zoothamnium c/ped</i>	1,41	4,27	0,06	3969,924	126,73
<i>Zoothamnium</i>	1,02	1,23	0,02	2578,464	64,96
<i>Zoothamnium</i>	1,06	1,51	0,04	3150,504	77,72
<i>Zoothamnium</i>	1,21	1,44	0,02	2793,42	67,86
<i>Zoothamnium</i>	1,34	1,98	0,06	2517,06	78,3
<i>Zoothamnium</i>	1,05	1,38	0,05	2558,22	71,92

Os valores de cada elemento das espécies de protozoários no eixo 1, 2 e 3 encontram-se tabelados na Tabela 8.II.

Tabela 8.II – Valores dos eixos 1, 2 e 3 calculados para cada imagem de protozoário.

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3
<i>Colpidium</i>	-1,2317	-0,1908	-0,7448
<i>Colpidium</i>	-0,7913	0,1281	-0,7947
<i>Colpidium</i>	-1,0991	0,5157	-0,5001
<i>Colpidium</i>	-0,9235	0,0081	0,7309
<i>Colpidium</i>	-1,1002	0,6644	-0,5587
<i>V. convallaria c/ped</i>	4,2649	0,6822	-0,4142
<i>V. convallaria c/ped</i>	2,7418	1,9413	0,0115
<i>V. convallaria c/ped</i>	2,9954	1,3787	1,0342
<i>V. convallaria c/ped</i>	4,8650	-0,6602	-0,3527
<i>V. convallaria c/ped</i>	2,9475	-0,3853	-0,6473
<i>V. convallaria</i>	-0,1144	0,6045	1,4120
<i>V. convallaria</i>	0,5362	1,4818	-0,3156
<i>V. convallaria</i>	1,5363	0,5244	-0,3406
<i>V. convallaria</i>	0,4508	1,3918	-0,4494
<i>V. convallaria</i>	0,1821	0,8550	1,3894
<i>V. convallaria</i>	0,1597	0,3499	-0,8185
<i>V. convallaria</i>	-0,2775	-0,0794	1,3514
<i>V. convallaria</i>	0,2196	0,7997	0,6579
<i>V. convallaria</i>	0,1608	1,6592	-0,2849
<i>V. convallaria</i>	0,1767	0,2245	-0,1568
<i>V. convallaria</i>	0,8650	0,9413	-0,2017
<i>V. convallaria</i>	1,1560	2,3862	0,0084
<i>V. convallaria</i>	0,3336	1,3531	0,8272
<i>Epistylis</i>	0,5015	0,5314	-0,5886
<i>Epistylis</i>	-0,5527	0,1731	0,6015
<i>Epistylis</i>	-0,5599	0,0265	0,6457
<i>Epistylis</i>	-0,7665	0,4478	0,3790
<i>Epistylis</i>	0,5874	1,1525	-0,3547
<i>Epistylis</i>	-0,3314	1,4169	-0,4662
<i>Epistylis</i>	0,1036	0,7139	0,5214

<i>Epistylis</i>	0,3285	-0,0117	-0,7542
<i>Epistylis</i>	-1,0943	0,0060	-0,0260
<i>Epistylis</i>	-0,0621	0,7011	-0,4573
<i>Epistylis</i>	-0,5981	0,2145	-0,7270
<i>Epistylis</i>	0,2073	2,2788	-0,1325
<i>Epistylis</i>	0,4717	2,1544	0,5834
<i>Epistylis</i>	1,0041	1,6204	-0,2652
<i>Epistylis</i>	-0,3332	-0,9477	2,5613
<i>Epistylis</i>	0,3910	1,3806	1,1389
<i>Epistylis</i>	0,4375	1,7422	-0,2683
<i>Epistylis</i>	-0,2694	1,2322	-0,2840
<i>Epistylis</i>	-0,0670	1,0042	0,7421
<i>Epistylis</i>	-0,5426	0,8723	-0,6088
<i>Euplotes</i>	-1,2146	-0,1404	-1,0951
<i>Euplotes</i>	-1,1958	-0,1876	-0,8840
<i>Euplotes</i>	-1,9434	-0,1791	-1,0442
<i>Euplotes</i>	-1,2543	-0,0217	-0,8141
<i>Euplotes</i>	-1,0207	-0,6728	0,4871
<i>Euplotes</i>	-1,2044	-0,8895	-0,1920
<i>Euplotes</i>	-1,0627	-1,0136	0,7738
<i>Euplotes</i>	-1,2059	-0,0050	-0,4333
<i>Euplotes</i>	-1,3488	-0,3142	0,2892
<i>Euplotes</i>	-1,8121	-0,3519	-0,6242
<i>Euplotes</i>	-0,8459	-0,4546	-1,1895
<i>Euplotes</i>	-1,3002	-0,3903	-0,3363
<i>Euplotes</i>	-1,5156	-0,2923	-0,3016
<i>Euplotes</i>	-1,4323	-0,2308	-0,7069
<i>Euplotes</i>	-1,7247	-0,0351	-1,0263
<i>Euplotes</i>	-0,6566	-0,5870	-0,7055
<i>Euplotes</i>	-1,0285	-0,7868	0,7386
<i>Euplotes</i>	-1,2523	-0,3867	0,2026
<i>Euplotes</i>	-0,0940	-1,4032	3,2931
<i>Euplotes</i>	-1,1369	-0,7777	-0,0439
<i>Euplotes</i>	0,0772	-0,2542	-0,8705
<i>Glaucoma</i>	-0,0162	0,4320	-0,7968
<i>Glaucoma</i>	-0,0793	0,2448	-0,8777
<i>Glaucoma</i>	-0,2919	-0,1294	0,3407
<i>Glaucoma</i>	0,2158	0,5997	-0,5462
<i>Litonotus</i>	0,5098	-1,4828	1,7785
<i>Litonotus</i>	0,4058	-1,6667	-0,8350
<i>Litonotus</i>	1,0388	-0,4126	-0,7785
<i>Litonotus</i>	-0,0023	-0,9547	-0,7144
<i>Litonotus</i>	0,4490	-0,9046	0,1285
<i>V. microstoma c/ped</i>	-0,4175	-0,1444	-0,8368
<i>V. microstoma c/ped</i>	-0,4671	-0,6556	1,0190
<i>V. microstoma c/ped</i>	3,0247	-2,8010	-1,4160
<i>V. microstoma c/ped</i>	6,6825	-5,6000	-2,4519
<i>V. microstoma c/ped</i>	-0,5123	-0,5415	-0,3040
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,0706	-1,3541	3,1526
<i>V. microstoma c/ped</i>	0,5568	-0,2212	-0,6517
<i>V. microstoma c/ped</i>	-0,4623	-0,8770	1,2404

<i>V. microstoma c/ped</i>	1,6146	-0,9233	-1,0517
<i>V. microstoma c/ped</i>	-1,2658	-0,4614	-0,8305
<i>V. microstoma c/ped</i>	-0,4859	-0,4372	-1,0958
<i>V. microstoma c/ped</i>	1,5004	-2,3136	1,8203
<i>V. microstoma c/ped</i>	0,3781	-0,7295	-0,8924
<i>V. microstoma c/ped</i>	-0,0111	-0,9496	-1,2151
<i>V. microstoma c/ped</i>	0,3670	-1,4054	0,4051
<i>V. microstoma c/ped</i>	0,5331	-1,0710	-1,1822
<i>V. microstoma c/ped</i>	5,0256	-3,4377	-1,2160
<i>V. microstoma</i>	-1,7691	-0,7564	-0,0639
<i>V. microstoma</i>	-1,5334	-0,3420	0,0396
<i>V. microstoma</i>	-0,8219	-0,9954	0,8502
<i>V. microstoma</i>	-1,3780	0,2725	-0,4896
<i>V. microstoma</i>	-1,1622	-0,4798	0,1779
<i>V. microstoma</i>	-0,4764	-0,7968	1,6102
<i>V. microstoma</i>	-1,2380	-0,2565	-1,0033
<i>V. microstoma</i>	-0,6631	0,0391	0,4606
<i>V. microstoma</i>	-1,3272	-0,0922	-0,1663
<i>V. microstoma</i>	-0,7869	0,0619	-0,9002
<i>Opercularia</i>	0,3098	1,7807	-0,0895
<i>Opercularia</i>	0,2112	1,6369	0,1173
<i>Opercularia</i>	0,0944	1,6899	-0,3188
<i>Opercularia</i>	0,4614	1,5111	0,2571
<i>Opercularia</i>	0,2324	1,8463	0,1293
<i>Opercularia</i>	1,6947	2,6724	0,2051
<i>Opercularia</i>	0,9643	1,3923	1,5189
<i>Opercularia</i>	1,6084	2,3793	1,8716
<i>Opercularia</i>	2,0121	3,4378	0,4987
<i>Prorodon</i>	-0,7727	0,7134	-0,5363
<i>Prorodon</i>	-0,3636	1,2013	-0,4210
<i>Prorodon</i>	-0,2868	0,6854	0,0752
<i>Prorodon</i>	-0,4772	0,3021	-0,7298
<i>Prorodon</i>	-0,8872	0,8308	-0,4899
<i>Prorodon</i>	-0,8304	0,4089	-0,7760
<i>Prorodon</i>	-1,0980	0,4256	-0,4098
<i>Prorodon</i>	-1,1125	0,4804	-0,8489
<i>Prorodon</i>	0,2510	2,1306	0,0341
<i>Tetrahymena</i>	-1,7453	-0,9960	0,5912
<i>Tetrahymena</i>	-1,5731	-1,5646	1,8054
<i>Tetrahymena</i>	-1,6693	-0,6665	-0,9989
<i>Tetrahymena</i>	-1,2955	-0,6162	-1,0960
<i>Tetrahymena</i>	-1,9300	-1,1524	0,4615
<i>Tetrahymena</i>	-1,5633	-0,8043	-0,0059
<i>Tetrahymena</i>	-1,8327	-0,5673	-1,0921
<i>Tetrahymena</i>	-1,5937	-0,6705	-1,1452
<i>Tetrahymena</i>	-1,8723	-1,3232	0,8240
<i>Trachelophyllum</i>	0,4560	-1,2383	-1,1329
<i>Trachelophyllum</i>	-0,7340	-1,9961	1,1314
<i>Trachelophyllum</i>	-1,0486	-2,3214	1,9025
<i>Trachelophyllum</i>	0,1064	-2,3991	0,6446
<i>Trachelophyllum</i>	0,3382	-2,2382	1,0864

<i>Trachelophyllum</i>	-0,1191	-1,4692	-1,2326
<i>Trachelophyllum</i>	-0,4609	-1,8630	0,1909
<i>Trachelophyllum</i>	0,1461	-3,1973	2,0750
<i>Zoothamnium c/ped</i>	1,7653	0,1638	-0,4602
<i>Zoothamnium c/ped</i>	0,6920	-0,9015	2,0982
<i>Zoothamnium c/ped</i>	3,5023	0,3296	-0,3462
<i>Zoothamnium c/ped</i>	3,6378	0,8469	0,4705
<i>Zoothamnium c/ped</i>	3,1312	1,1592	1,9065
<i>Zoothamnium</i>	-0,2556	1,3294	-0,4360
<i>Zoothamnium</i>	0,4432	1,5510	-0,0749
<i>Zoothamnium</i>	-0,1000	1,1014	0,5689
<i>Zoothamnium</i>	0,4925	0,4734	1,1515
<i>Zoothamnium</i>	0,1292	1,1390	-0,2826

Apêndice B: Configuração do Sistema de Aquisição do Estudo da Mobilidade da *Tetrahymena pyriformis*

A seguir encontra-se apresentada a configuração das ligações entre a câmara de vídeo (monocromática), o adaptador de tensão e o vídeo bem como entre o vídeo, o monitor, a placa de aquisição do computador e o computador.

- Para a aquisição das imagens para o vídeo, a configuração é a seguinte: A saída do adaptador de tensão da câmara é ligada ao vídeo na tomada **video in**. A saída do vídeo **S-video out** é ligada à entrada **Y/C Input video** do monitor *Sony*. As imagens podem, deste modo, ser visualizadas no monitor com o vídeo ligado em **Stop**. Para se proceder à gravação em fita magnética, basta premir os botões **Record** e **Play** simultaneamente no vídeo.

- A configuração para a aquisição das imagens do vídeo para a placa de aquisição de imagens é a seguinte: A saída do vídeo **video out** é ligada à entrada da placa de aquisição de imagem. Para a monitorização das imagens, a saída do vídeo **S-video out** é ligada à entrada **Y/C Input video** do monitor *Sony*.

- No processo de digitalização das imagens provenientes do vídeo é necessário efectuar o controlo deste último para a selecção das imagens desejadas. O controlo do vídeo (*VTR*), pelo computador (*PC*), é efectuado através da interface **RS-232C**, ligada à porta paralela 1 do computador, com a seguinte configuração:

Tabela 8.III - Ligações entre o vídeo e o computador (PC) através da RS-232C.

VTR (25 pinos)	PC (9 pinos)
1 (FG)	5
2 (TxD)	3
3 (RxD)	2
4 (RTS)	7
5 (CTS)	8
6 (DML)	6
7 (GND)	5

As definições da porta paralela 1 (**com1**) são as seguintes: taxa de fluxo de dados (**baud rate**) = **9600 bps**, paridade ímpar (**parity**) = **odd**, número de *bits* de dados (**data bits**) = **7**, número de *bits* de paragem (**stop bits**) = **1** e sem controlo de fluxo (**flow control**) = **none**.

Apêndice C: Equações e Correlações Calculadas na Correlação entre Actividades e Dimensões Fractais

Para as diferentes equações testadas e parâmetros correlacionados, encontram-se agora todas as equações calculadas e respectivos coeficientes de correlação. Os valores dos coeficientes das equações, e respectivas correlações (R), referentes ao estudo do diâmetro estão na Tabela 8.IV, Tabela 8.V e Tabela 8.VI.

Tabela 8.IV - Valores dos coeficientes das equações e correlação para o diâmetro em função da D_A^{Df} .

	a	b	c	R
$Y = a + bx$	0,0242	1,7578		0,811
$Y = ax^2 + bx + c$	0,004	0,0031	1,7815	0,819
$Y = ax^b$	1,7722	0,0302		0,777
$Y = ae^{bx}$	1,7587	0,0133		0,807

Tabela 8.V - Valores dos coeficientes das equações e correlação para o diâmetro em função da D_A^P .

	a	b	c	R
$Y = a + bx$	0,0221	1,6234		0,647
$Y = ax^2 + bx + c$	0,0008	0,0177	1,6284	0,647
$Y = ax^b$	1,6354	0,031		0,636
$Y = ae^{bx}$	1,624	0,0132		0,641

Tabela 8.VI - Valores dos coeficientes das equações e correlação para o diâmetro em função da D_{Bm} .

	a	b	c	R
$Y = a + bx$	0,0234	1,7038		0,829
$Y = ax^2 + bx + c$	0,0038	0,003	1,7267	0,837
$Y = ax^b$	1,7177	0,0301		0,793
$Y = ae^{bx}$	1,7047	0,0132		0,826

Os valores dos coeficientes das equações, e respectivas correlações (R), referentes ao estudo da actividade em acetato estão na Tabela 8.VII, Tabela 8.VIII, Tabela 8.IX e Tabela 8.X.

Tabela 8.VII - Valores dos coeficientes das equações e correlação para a actividade em acetato em função da D_A^{Df} .

	a	b	c	R
$Y = a + bx$	4509,7	-7869,9		0,751
$Y = ax^2 + bx + c$	6871,3	-20382	14670	0,753
$Y = ax^b$	1E-06	31,971		0,736
$Y = ae^{bx}$	4E-12	17,624		0,735

Tabela 8.VIII - Valores dos coeficientes das equações e correlação para a actividade em acetato em função da D_A^P .

	a	b	c	R
$Y = a + bx$	3562,6	-5672,3		0,744
$Y = ax^2 + bx + c$	23471	-74351	58969	0,778
$Y = ax^b$	0,0012	23,915		0,754
$Y = ae^{bx}$	8E-09	14,438		0,755

Tabela 8.IX - Valores dos coeficientes das equações e correlação para a actividade em acetato em função do diâmetro.

	a	b	c	R
$Y = a + bx$	108,89	51,953		0,582
$Y = ax^2 + bx + c$	11,888	47,999	119,17	0,585
$Y = ax^b$	129,65	0,9434		0,559
$Y = ae^{bx}$	105,08	0,4037		0,540

Tabela 8.X - Valores dos coeficientes das equações e correlação para a actividade em acetato em função da D_{Bm} .

	a	b	c	R
$Y = a + bx$	4920,5	-8338,7		0,781
$Y = ax^2 + bx + c$	-3781,9	18216	-20022	0,781
$Y = ax^b$	1E-06	33,931		0,766
$Y = ae^{bx}$	5E-13	19,259		0,765

Os valores dos coeficientes das equações, e respectivas correlações (R), referentes ao estudo da velocidade de sedimentação estão na Tabela 8.XI, Tabela 8.XII, Tabela 8.XIII e Tabela 8.XIV.

Tabela 8.XI - Valores dos coeficientes das equações e correlação para a velocidade de sedimentação em função da D_A^{Df} .

	a	b	c	R
$Y = a + bx$	1077,8	-1901,9		0,831
$Y = ax^2 + bx + c$	13765	-48908	43469	0,908
$Y = ax^b$	1E-07	33,382		0,813
$Y = ae^{bx}$	1E-13	18,43		0,815

Tabela 8.XII - Valores dos coeficientes das equações e correlação para a velocidade de sedimentação em função da D_A^P .

	a	b	c	R
$Y = a + bx$	740,84	-1190,9		0,656
$Y = ax^2 + bx + c$	10779	-35080	28560	0,786
$Y = ax^b$	0,0006	21,703		0,664
$Y = ae^{bx}$	1E-08	13,158		0,669

Tabela 8.XIII - Valores dos coeficientes das equações e correlação para a velocidade de sedimentação em função do diâmetro.

	a	b	c	R
$Y = a + bx$	33,875	-24,095		0,869
$Y = ax^2 + bx + c$	10,14	-20,367	37,164	0,898
$Y = ax^b$	16,314	1,2831		0,798
$Y = ae^{bx}$	12,036	0,5545		0,817

Tabela 8.XIV - Valores dos coeficientes das equações e correlação para a velocidade de sedimentação em função da D_{Bm} .

	a	b	c	R
$Y = a + bx$	1128,7	-1931		0,824
$Y = ax^2 + bx + c$	4300	-49242	42416	0,889
$Y = ax^b$	3E-07	33,404		0,795
$Y = ae^{bx}$	1E-13	19,006		0,796

Apêndice D: Curvas de Calibração na Determinação Quantitativa da Fluorescência

Encontram-se referidas de seguida as curvas de calibração para os ensaios de *HPLC* (*High Performance Liquid Chromatography*), na determinação dos ácidos gordos voláteis: ácido acético, ácido propiónico e ácido butírico.

Para o ácido acético, os valores da calibração obtidos, encontram-se de seguida:

Tabela 8.XV - Valores das áreas da calibração do ácido acético.

[Ác. Acético] (mg/l)	Área 1	Área 2	Área média
60	68561	64078	66320
120	143137	151863	147500
240	297686	310610	304148
600	804205	765589	784897
1200	1540447	1674554	1607501

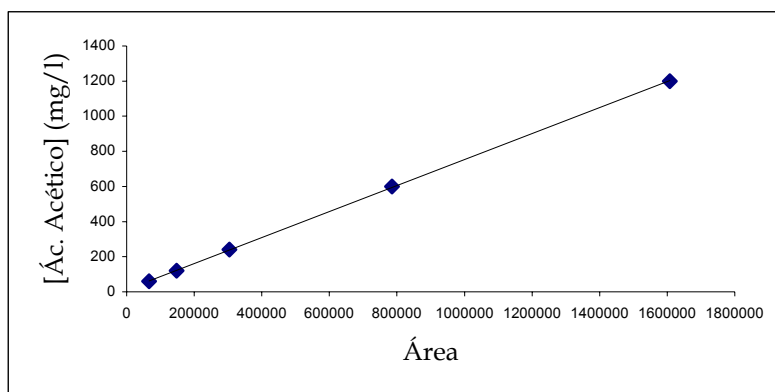


Figura 8.1 - Curva de calibração do ácido acético.

A equação da curva de calibração para o ácido acético é a seguinte:

$$[\text{Ác. Acético}] = 0,0007 \times \text{Área} + 13,228 \quad (12.1)$$

Os valores da variância dos coeficientes da recta (σ^2a e σ^2b) estão apresentados de seguida, bem como o valor do parâmetro t de Student para um grau de confiança de 95% e 3 graus de liberdade.

$$\sigma^2a = 3,4 \times 10^{-6}$$

$$\sigma^2b = 2,785$$

$$t = 3,18$$

A equação da recta, com os respectivos erros é a seguinte:

$$[\text{Ác. Acético}] = (700 \times 10^{-6} \pm 10,8 \times 10^{-6}) \times \text{Área} + (13,228 \pm 9,469) \quad (12.2)$$

Para o ácido propiónico, os valores da calibração obtidos, encontram-se de seguida:

Tabela 8.XVI - Valores das áreas da calibração do ácido propiónico.

[Ác. Propiónico] (mg/l)	Área 1	Área 2	Área média
55,25	49494	45308	47401
110,5	103407	111633	107520
221	215703	225776	220740
552	592310	503418	547864
1105	1140404	1244909	1192657

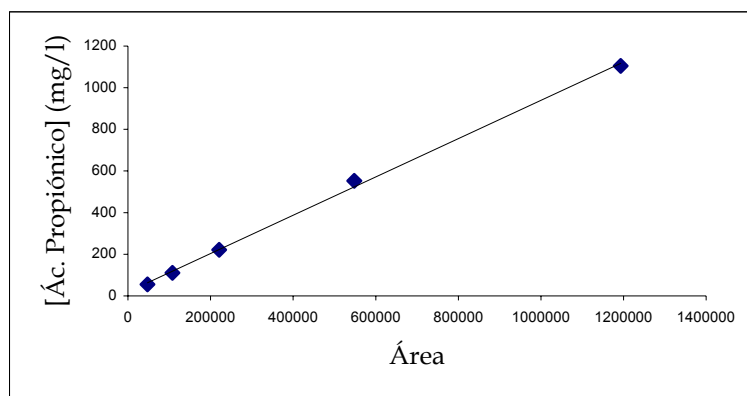


Figura 8.2 - Curva de calibração do ácido propiónico.

A equação da curva de calibração para o ácido propiónico é a seguinte:

$$[\text{Ác. Propiónico}] = 0,0009 \times \text{Área} + 19,237 \quad (12.3)$$

Os valores da variância dos coeficientes da recta estão apresentados de seguida, bem como o valor do parâmetro t de Student para um grau de confiança de 95% e 3 graus de liberdade.

$$\sigma^2a = 2 \times 10^{-5}$$

$$\sigma^2b = 11,993$$

$$t = 3,18$$

A equação da recta, com os respectivos erros é a seguinte:

$$[\text{Ác. Propiónico}] = (92 \times 10^{-5} \pm 6,36 \times 10^{-5}) \times \text{Área} + (19,237 \pm 38,138) \quad (12.4)$$

Para o ácido butírico, os valores da calibração obtidos, encontram-se de seguida:

Tabela 8.XVII - Valores das áreas da calibração do ácido butírico.

[Ác. Butírico] (mg/l)	Área 1	Área 2	Área média
52,8	29579	37593	33586
105,6	77881	85905	81893
211,2	171475	182326	176901
528	466187	449435	457811
1056	810429	978593	894511

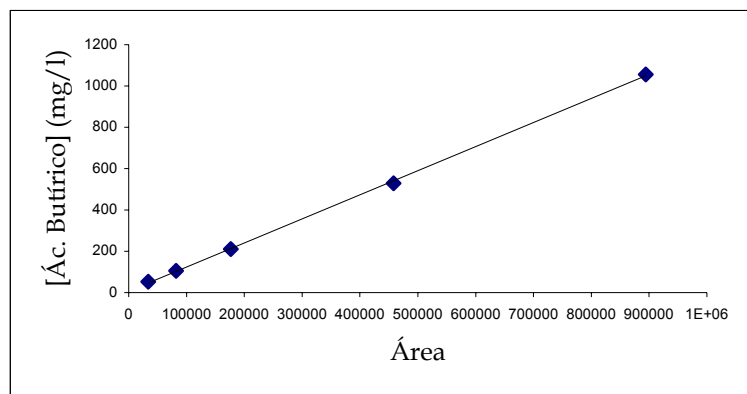


Figura 8.3 - Curva de calibração do ácido butírico.

A equação da curva de calibração para o ácido butírico é a seguinte:

$$[\text{Ác. Butírico}] = 0,0012 \times \text{Área} + 7,6113 \quad (12.5)$$

Os valores da variância dos coeficientes da recta estão apresentados de seguida, bem como o valor do parâmetro t de Student para um grau de confiança de 95% e 3 graus de liberdade.

$$\sigma^2_a = 1,3 \times 10^{-5}$$

$$\sigma^2_b = 5,949$$

$$t = 3,18$$

A equação da recta, com os respectivos erros é a seguinte:

$$[\text{Ác. Butírico}] = (116 \times 10^{-5} \pm 4,134 \times 10^{-5}) \times \text{Área} + (7,611 \pm 18,918) \quad (12.6)$$

Apêndice E: Glossário das funções do *Matlab* utilizadas

Encontram-se de seguida expostas as funções próprias do *Matlab* utilizadas nos diversos programas.

abs

Valor absoluto

ABS(X) é o valor absoluto dos elementos de X. Quando X é complexo, ABS(X) é o módulo complexo (magnitude) dos elementos de X.

angle

Ângulo da fase

ANGLE(H) retorna os ângulos da fase, em radianos, de uma matriz de elementos complexos.

bwarea

Calcula a área dos objectos de uma imagem binária

TOTAL=BWAREA(BW) estima a área dos objectos na imagem binária BW. TOTAL é um escalar cujo valor corresponde *grosso modo* ao número de pixels de valor 1 na imagem, mas não é exactamente igual uma vez que diferentes padrões de pixels possuem pesos diferentes.

bwlabel

Marca pixels ligados numa imagem binária

L = BWLABEL(BW,N) retorna a matriz L, do mesmo tamanho de BW, contendo os marcadores para os pixels ligados em BW. N pode ter um valor de 4 ou 8, onde 4 especifica pixels ligados horizontal ou verticalmente e 8 especifica objectos ligados também diagonalmente. Se este argumento é omitido, por defeito toma o valor 8.

Os elementos de L são valores inteiros maiores ou iguais a 0. Os valores de 0 são o fundo da imagem. Os pixels marcados com 1 formam o primeiro objecto, os marcados com 2 o segundo e aí por diante.

[L,NUM] = BWLABEL(BW,N) retorna em NUM o número de objectos encontrados em BW.

bwmorph

Executa operações morfológicas numa imagem binária

BW2 = BWMORPH(BW1,OPERATION) aplica uma operação morfológica específica à imagem binária BW1.

BW2 = BWMORPH(BW1,OPERATION,N) aplica a operação N vezes. N pode ser infinito e, nesse caso, a operação é repetida até não haver mais alterações.

OPERATION é uma palavra que pode possuir o valor:

'clean' que remove pixels isolados. (1's rodeados por 0's)

bwselect

Selecciona objectos numa imagem binária

$BW2 = BWSELECT(BW1,C,R,N)$ retorna uma imagem binária contendo os objectos que possuem o pixel (R,C) . R e C podem ser escalares ou vectores de igual comprimento. Se R e C forem vectores, $BW2$ contém o conjunto de objectos que possui qualquer dos pixels $(R(k),C(k))$. N pode ter um valor de 4 ou 8 (valor por defeito), onde 4 especifica pixeis ligados horizontal ou verticalmente e 8 especifica objectos ligados também diagonalmente.

ceil

Arredonda um número para o infinito.

$CEIL(X)$ arredonda os elementos de X para os inteiros superiores mais próximos

diary

Grava o texto de uma sessão de *Matlab*

$DIARY$ file_name grava o que mostra no ecrã, no ficheiro file_name. $DIARY$ OFF suspende o comando, e $DIARY$ ON volta a activá-lo.

Usa-se a forma funcional de $DIARY$, como $DIARY('file')$ quando o nome do ficheiro se encontra gravado numa palavra.

fft2

Transformada discreta de Fourier bidimensional

$FFT2(X)$ retorna a transformada discreta de Fourier bidimensional da matriz X . Se X é um vector, o resultado vai possuir a mesma orientação.

$FFT2(X,MROWS,NCOLS)$ completa a matriz X com zeros para formatar a $MROWS$ por $NCOLS$ antes de a transformar.

fftshift

Translada o componente DC para o centro do espectro

Em vectores, $FFTSHIFT(X)$ troca as metades esquerda e direita de X . Em matrizes, troca o primeiro e terceiro quadrantes e o segundo e quarto. Para *arrays* de N_D dimensões troca os 'meios-espaços' de X em cada dimensão.

$FFTSHIFT$ é útil para visualizar a transformada de Fourier com o componente DC no centro do espectro.

ifft2

Transformada inversa discreta de Fourier bidimensional

$IFFT2(F)$ retorna a transformada inversa discreta de Fourier bidimensional da matriz F . Se F é um vector o resultado terá a mesma orientação.

$IFFT2(F,MROWS,NCOLS)$ completa a matriz X com zeros para formatar a $MROWS$ por $NCOLS$ antes de a transformar.

imcrop

Retira uma imagem

IMCROP retira uma imagem para um rectângulo específico. Na sintaxe abaixo é especificada o rectângulo não interactivamente:

I2 = IMCROP(I,RECT)

X2 = IMCROP(X,MAP,RECT)

RGB2 = IMCROP(RGB,RECT)

RECT é um vector de 4 elementos na forma [XMIN YMIN WIDTH HEIGHT] sendo estes valores especificados em coordenadas espaciais.

size

Tamanho de uma matriz

D=SIZE(X), para uma matriz de M por N, retorna o vector de dois elementos D=[M,N] contendo o número de linhas e colunas na matriz. Para N-D *arrays* SIZE(X) retorna um vector de 1 por N dos comprimentos.

Apêndice F: Glossário das funções do *Visilog* utilizadas

Encontram-se de seguida expostas as funções próprias do *Visilog* utilizadas no Reconhecimento Semi-Automático de Protozoários por Análise de Imagem.

analyse_grey_in

Analisa uma imagem em tons de cinzento e retira um conjunto de medidas de cada objecto. Pode efectuar um pré-processamento, uma segmentação para binarizar a imagem e um pós-processamento da imagem binarizada.

border-kill

Elimina todos os objectos que tocam a fronteira da imagem, através do seguinte procedimento:

- a: Intersecção da imagem com a fronteira. O resultado é usado como marcadores.
- b: Reconstrução da imagem a partir dos marcadores. Somente os objectos marcados são reconstruídos.
- c: Diferença lógica entre a imagem original e a imagem reconstruída de modo a obter somente os objectos que não tocam a fronteira da imagem.

distance

Este comando é baseado num método recursivo e trabalha em duas iterações. É usado para a segmentação de objectos, antes da aplicação do comando *watershed*. Este comando calcula a função distância de uma imagem binária numa imagem de tons de cinzento, como a soma de uma série de erosões. Na imagem final, cada pixel pertencendo a um objecto, fica com uma intensidade igual à distância (num tabuleiro de xadrez) em pixels até à fronteira do objecto.

fastmaxima

Este comando determina os máximos regionais numa imagem de tons de cinzento, para uma imagem binária. Um máximo regional, C , é um conjunto de pixels ligados desde que sejam:

- a: pixels de C que possuam a mesma intensidade (I_C).
- b: pixels ligados a C , mas não pertencendo a C (vizinhos), possuem uma intensidade inferior a I_C .

fastwatershed

Efectua uma determinação rápida das linhas de separação a partir de uma imagem de marcadores. Determina as linhas de separação entre os marcadores. A imagem final é uma imagem binária.

O princípio do *fastwatershed* é o chamado de imersão e baseia-se na simulação ds subida da água a partir de um conjunto de marcadores. O nível p é inundado a uma velocidade constante pelas frentes de $p-1$ e o mínimo local aparece ao nível p . Um ponto de separação aparece quando duas frentes distintas se juntam.

hole-fill

Preenche todas as lacunas de um objecto numa imagem binária, através do seguinte procedimento:

a: Calcula o inverso da imagem.

b: Dilatação geodésica dos extremos da imagem para a imagem invertida.

c: Complemento da imagem anterior. Somente as lacunas da imagem são preenchidas.

label

A imagem binária é percorrida de cima para baixo e da esquerda para a direita, para que todos os pixels de um objecto fiquem com o mesmo valor, partindo do valor 1. O valor depende da localização do objecto na imagem. O máximo valor dá o número de objectos presentes na imagem binária original. O algoritmo funciona do seguinte modo:

a: A primeira vez que a imagem é percorrida determina o início de cada objecto.

b: A segunda vez confere a todos os pixels de um objecto o mesmo valor.

logical sub

Esta função determina a diferença lógica entre duas imagens binárias. De notar que esta operação não é comutativa:

$$A - B \neq B - A$$

lowpass 7x7

Os filtros de baixas frequências (*lowpass*) reduzem o contraste da imagem e suaviza os contornos dos objectos. Este filtro permite que as baixas frequências se mantenham e atenua as altas frequências e o ruído. Reduz o contraste mas tende a desfocar a imagem. Este filtro usa um tamanho de caixa de 7x7 pixels.

merge maxima

Neste comando o factor de contraste é subtraído primeiramente da imagem original. O resultado dessa subtracção é usado para reconstruir numericamente a imagem original. Os máximos regionais da imagem reconstruída são denominados os máximos ligados.

Este comando só funciona com objectos de tons de cinzento homogéneos. O factor de ligação depende do contraste local entre objectos de tons de cinzento. Aumentando o factor de ligação em demasia pode eliminar alguns objectos previamente ligados.

numreconstruct

Este comando é utilizado para remover pontos luminosos em imagens escuras. Efectua uma reconstrução numérica a partir de uma imagem de marcadores em tons de cinzento e duma imagem inicial. Este comando é a contraparte em tons de cinzento do algoritmo de reconstrução binária.

Em cada passo do algoritmo a imagem de marcadores é dilatada por um elemento estrutural de tamanho 1. Este algoritmo baseia-se num método recursivo onde o mínimo da imagem dilatada e da imagem dos marcadores é retirado e usado como a imagem de marcadores da iteração seguinte. Esta operação é repetida até se atingir a estabilidade. Deste modo, os picos da imagem são diminuídos, resultando numa imagem muito mais homogénea.

reconstruct

O princípio desta operação é o de reconstruir uma imagem a partir dos marcadores e conservar apenas os objectos contendo esses marcadores. Numa dilatação geodésica, dilatações sucessivas são efectuadas na imagem com marcadores, sendo que cada dilatação é seguida por uma intersecção com a imagem original até convergirem. Isto vai garantir que o marcador dilatado não vai atingir outro objecto. A reconstrução conserva as formas originais de um objecto após uma erosão para eliminar objectos mais pequenos, sendo depois utilizada como imagem dos marcadores.

watershed

Considere-se uma imagem como uma paisagem de montanhas, onde os níveis de cinzento menores, são os vales e os maiores os picos. Os pontos localizados no fundo dos vales são rodeados apenas por pontos com um nível de cinzento superior e não serão modificados. Os pontos localizados no cimo de um pico são rodeados apenas por pontos com menores níveis de cinzento e também não serão alterados.

Todos os outros pontos encontram-se rodeados por valores maiores e menores e serão modificados. O comando extrai o esqueleto formado a partir das linhas de separação dividindo duas bacias não ligadas.

Apêndice G: Conteúdo do CD-ROM

Optou-se por incluir num CD-ROM a listagem dos programas (*listagens.doc*), uma vez que esta era demasiado extensa. Deste CD-ROM fazem também parte os programas em linguagem *Matlab* e *Visilog* (*COOL*).

Assim, a directoria *ProtoRec* contém os programas utilizados para o trabalho Reconhecimento Semi-Automático de Protozoários por Análise de Imagem em linguagem de alto nível (*ProtoRec.sc5*) e *COOL* (*ProtoRec.rsc*).

As directorias *Proto_v8* e *Video* contém os programas para o trabalho Estudo da Mobilidade da *Tetrahymena pyriformis* em Contacto com Tóxicos.

A directoria *Imago_v5* contém o programa para o trabalho Correlação entre Actividades e Dimensões Fractais de Agregados Microbianos Presentes em Digestores Anaeróbios.

A directoria *Fluor_v4* contém o programa para o trabalho Determinação Quantitativa da Fluorescência num Digestor Anaeróbio Perturbado.

São também disponibilizadas as imagens que foram estudadas em cada um dos trabalhos na subdirectoria *Imagens* de cada um dos programas.