

RECONNAISSANCE SEMI-AUTOMATIQUE DE LA MICROFAUNE DES BOUES ACTIVEES DES STATIONS D'EPURATION DES EAUX USEES : PROTOREC V 2.0

M. DA MOTTA, M.N. PONS, H. VIVIER

◊ **Laboratoire des Sciences du Génie Chimique
CNRS-ENSIC-INPL
BP 451, 1 54001 Nancy cedex, France**

N. ROCHE

◊ **IUT de Marseille, Dept. GCGP
Université de Marseille, BP 157
13388 Marseille, France**

L.P. AMARAL, E.C. FERREIRA, M. MOTA

◊ **Centro de Engenharia Biológica – IBQF
Universidade do Minho
4710-057 Braga, Portugal**

Résumé

Une procédure a été développée pour la reconnaissance semi-automatique de protozoaires présents dans les boues activées. Après sélection sur l'image de la zone d'intérêt où se trouve l'individu, la taille et la forme de la silhouette de ce dernier sont caractérisées par onze paramètres. La classification selon l'espèce se fait par étape, chacune faisant appel à une procédure d'analyse factorielle discriminante. Durant la phase de validation un taux de reconnaissance supérieur à 70% a été obtenu pour la plus grande partie des espèces prises en compte.

I. INTRODUCTION

Dans les bassins des stations de traitement biologique d'eaux usées, règne un écosystème constitué essentiellement par des bactéries, des protozoaires et des métazoaires. Les protozoaires sont représentés par des amibes, des flagellés et des ciliés. Ces derniers sont les plus nombreux et sont divisés selon leur régime alimentaire en carnivores et en bactériophages. Les bactériophages aident à améliorer la qualité de l'effluent final, en abaissant sa turbidité et sa Demande Biologique en Oxygène (DBO). Ils peuvent être classés selon leur mobilité en mobiles de fond, sessiles et ciliés nageurs. Curds et Cockburn (1) ainsi que Madoni (2) font état de corrélations entre le fonctionnement de la station d'épuration et ces groupes ou même avec chaque espèce de protozoaire.

Actuellement l'identification et le comptage des protozoaires sont réalisés de façon manuelle, ce qui demande du temps et la présence d'un opérateur spécialisé. Compte tenu de ces difficultés on cherche à développer un outil d'analyse d'images pour automatiser ces tâches. Le principe de base est de détecter le protozoaire sur l'image, d'obtenir sa silhouette, dont la taille et la forme sont caractérisées par plusieurs

descripteurs et d'identifier le protozoaire par rapport à des valeurs de descripteurs contenues dans une base de données établie avec l'aide d'experts. La première difficulté est la localisation du protozoaire dans l'image, car il peut être lié aux flocons de boues activées. La première version de l'outil (3) s'est révélée, lors d'une utilisation systématique, peu robuste vis à vis de la présence de bactéries filamenteuses en grand nombre. Certaines espèces de protozoaires présents n'étaient pas incluses dans la base de données. La seconde version (4) a permis une meilleure segmentation des protozoaires et a utilisé une base de données plus complète. Cependant la segmentation n'était pas encore complètement satisfaisante.

Dans la nouvelle version (ProtoRec v 2.0), la méthode de séparation a été modifiée : il a été décidé de travailler sur des zones d'intérêt contenant les protozoaires par sélection de cette zone par l'opérateur à l'aide d'un curseur. Cela permet de supprimer des étapes de seuillage, où l'opérateur intervenait de toute manière, et de rendre le programme plus robuste et efficace. Pour améliorer la phase d'identification de nouveaux descripteurs morphologiques ont été introduits. La classification se fait par analyse factorielle discriminante.

II. MATERIELS ET METHODES

Un suivi de la population de protozoaires du bassin d'aération de la station d'épuration de Braga (Portugal) a été réalisé sur une période de deux semaines. Le système d'acquisition utilisé est constitué d'un microscope Axioskop (Zeiss, Oberkochen, Suisse), sur lequel a été connectée une caméra CCD AVC D5CE (Sony). Les observations se font sur des états frais, c'est-à-dire que les protozoaires sont vivants (et actifs). Le signal est traité par un adaptateur CMA-D5CE (Sony) et numérisé à l'aide d'une carte d'acquisition DT 3155 (Data Translation, USA).

La Figure 1 présente les principales étapes du programme. Le pré-traitement a pour but d'améliorer l'image initiale en rehaussant le contour des protozoaires : pour cela on utilise une égalisation, suivie d'un filtre moyen qui va lisser l'image en enlevant les petits débris. Ensuite on réalise une égalisation linéaire avec un champ 16 x 16 et une maximisation. Trois méthodes de seuillage sont proposées à l'opérateur : un seuillage automatique basé sur la variance de l'histogramme, un seuillage avec un seuil fixe (127) et un seuillage manuel.

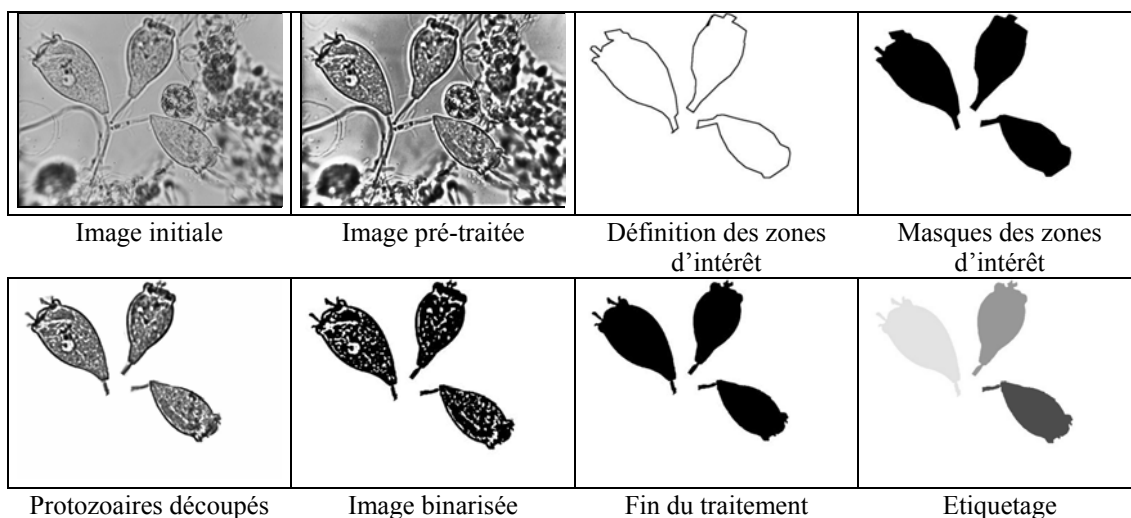


Figure 1 : Etapes principales du programme ProtoRec v2.0.

Les paramètres calculés sont : la surface de la silhouette (S) et son diamètre équivalent (D_{eq}), la longueur et la largeur de son enveloppe polygonale convexe (données respectivement par les diamètres de Férét maximal (F_{max}) et minimal (F_{min})), son excentricité (E), sa circularité $C = P_C^2 / (4\pi S)$ où P_C est le périmètre de Crofton, sa robustesse (Ω_1) (5), son indice de plus grande concavité (Ω_2) (5), son indice de concavité en surface (IC_s), la forme de Férét (diamètre de Férét maximal / diamètre de Férét à 90°) et $IP = P_{10} / P$ où P_{10} est le périmètre après une ouverture d'ordre 10.

La classification automatique est basée sur l'analyse factorielle discriminante (6) (boîte à outils XLstat (T. Fahmy, Paris, France) pour Excel). Des nouvelles variables sont créées : elles sont des combinaisons linéaires des variables originales et mettent en relief les différences entre les classes de protozoaires. L'utilisation de cette méthode requiert une phase d'apprentissage. Pour cette phase des ensembles de 30 individus de chaque espèce ont été sélectionnés, sauf pour *Euplotes* (27 individus) et *Litonotus* (26 individus) en se basant sur les ouvrages de Canler *et al.* (7), Curds (8), Madoni (9) et en s'entourant de l'avis d'experts. Compte tenu que l'on travaille sur des êtres vivants ils peuvent prendre plusieurs positions sous la caméra, ce qui induit une certaine dispersion des paramètres morphologiques et une certaine difficulté d'identification. Les coordonnées des protozoaires dans le nouveau repère s'expriment par :

$$f_j^i = \sum_{k=1}^M V_j^k X_i^k \text{ où } M \text{ est le nombre de paramètres originaux, } X_i^k \text{ est la valeur du}$$

paramètre k pour l'individu i , et V_j^k le vecteur propre du paramètre X^k sur l'axe j . Les M paramètres X^k sont : E , FF ($= F_{max}/F_{min}$), C , Ω_1 , Ω_2 , IC_s , IP , S (μm^2), P_C (μm), F_{max} (μm), et largeur (F_{min}). Chaque classe de protozoaires est caractérisée par son centre de gravité dans le nouvel espace.

Dans une seconde phase on teste la classification à partir d'individus n'ayant pas été utilisés pendant la phase d'apprentissage : chaque individu est assigné à une classe de protozoaire en fonction de sa distance minimale (au sens de Mahalanobis) aux centres des classes calculés pendant la phase d'apprentissage.

III. RESULTATS

La classification se fait suivant un arbre de décision, un nouvel apprentissage étant réalisé à chaque étape. On sépare dans un premier temps les ciliés sessiles (donc possédant un pédoncule), avec et sans myonème (fibre contractile présente dans le pédoncule de certains protozoaires), des individus mobiles. Les protozoaires ciliés sessiles avec myonème considérés sont : *Carchesium* (Fig. 2a), *Vorticella aquadulcis*, *Vorticella convallaria*, *Vorticella microstoma* (Fig. 2b) et *Zoothamnium*. Les protozoaires sessiles sans myonème pris en compte sont *Epistylis* (Fig. 2c) et *Opercularia* (Fig. 2d). Les ciliés mobiles, qui ne possèdent pas de pédoncule, sont : *Aspidisca cicada*, *Trachelophyllum*, *Litonotus* (un carnivore qui se nourrit d'autres protozoaires comme les vorticelles), *Trithigmostoma* (Fig. 2e) et *Euplotes* (Fig. 2f).

Les protozoaires sessiles sont ensuite classés en fonction de la présence d'un myonème. La Figure 3a montre la bonne séparation entre les individus sessiles avec myonème et ceux sans myonème. Par contre la distinction entre les différentes espèces de sessiles avec myonème (Figure 3b) s'annonce plus délicate : cela reflète les difficultés rencontrées par les experts lors de l'identification visuelle. Les deux espèces de sessiles avec myonème sont relativement bien séparées (Figure 3c). Pour les mobiles (Figure

3d), le problème qui semblerait exister pour *Euplotes* et *A. cicada* ne se pose en fait pas quand on regarde le plan f_1 - f_4 dans lequel ils sont bien séparés.

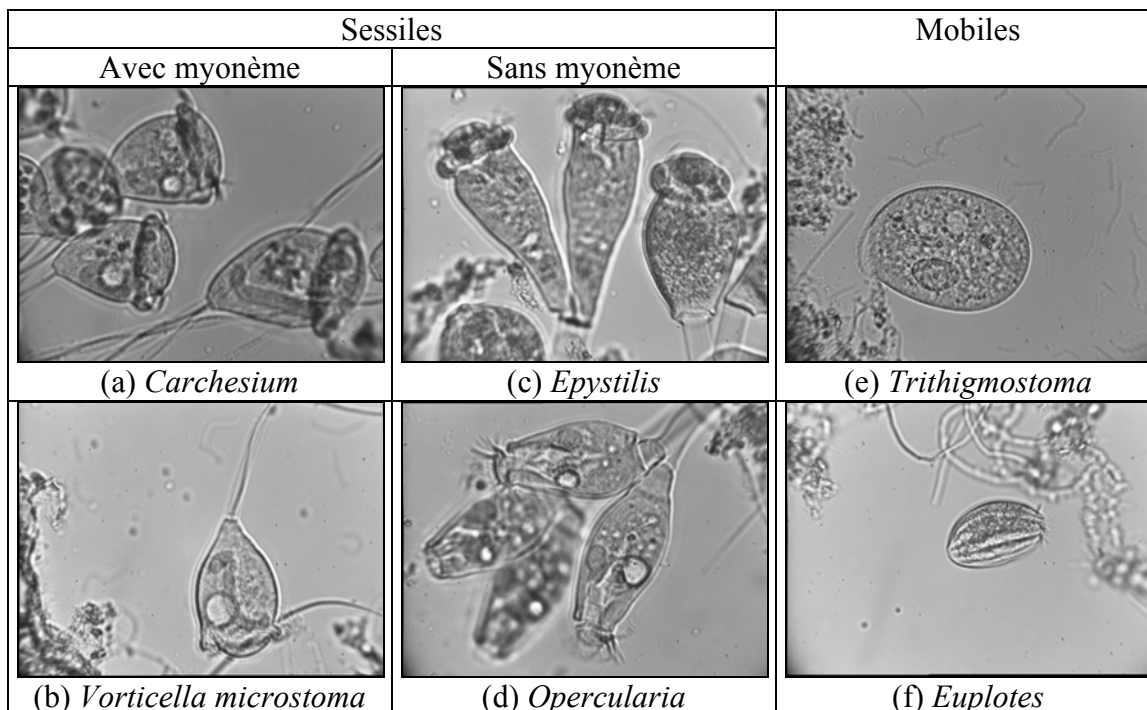


Figure 2 : Quelques exemples de protozoaires

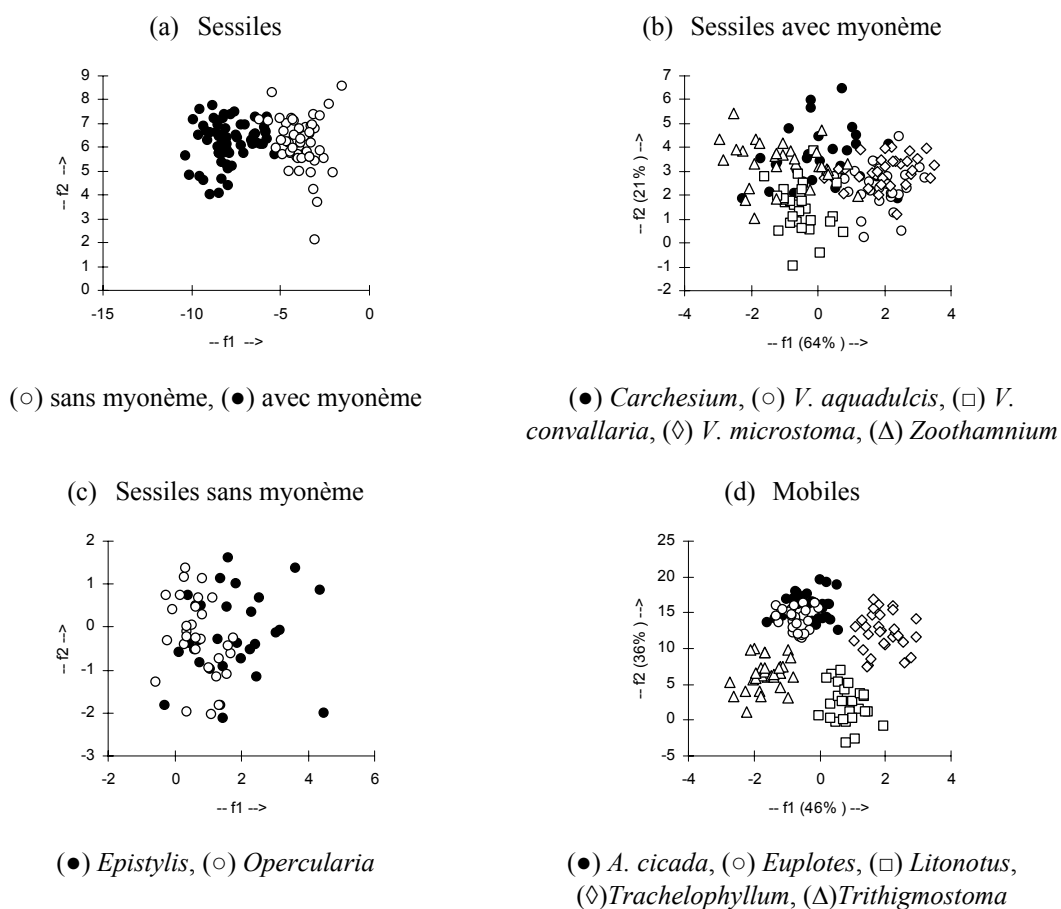


Figure 3 : Position dans les plans f_1 - f_2 des différentes espèces de protozoaires

Le tableau 1 indique les taux de reconnaissance obtenus pendant la phase de validation au cours de laquelle on classe 30 individus de chaque espèce qui n'ont pas participé à la phase d'apprentissage. La qualité de la reconnaissance a été appréciée en fonction de son degré : elle est qualifiée de bonne (> 70%), de raisonnable (entre 50 et 70%), de faible (entre 30 et 50%) et de mauvaise.

Les sessiles que l'on rencontre lorsque la qualité du traitement d'épuration est bonne sont *Carchesium*, *Zoothamnium* et *V. aquadulcis*. On obtient une bonne reconnaissance en général sauf pour les vorticelles. En fait l'ensemble des vorticelles peut facilement être séparé des autres protozoaires, mais il est souvent difficile, même pour un expert, de distinguer les différentes espèces. Or certaines sont indicatrices d'une bonne qualité du traitement, d'autres non et il y a un donc intérêt à pouvoir les isoler. La distinction entre *Carchesium* (degré de reconnaissance 37%), *Vorticella aquadulcis* (53%) et *Zoothamnium* (67%) est plus délicate.

En ce qui concerne les mobiles, le taux de reconnaissance est supérieur à 70% pour *Aspidisca cicada* et *Euplotus*.

Type de protozoaires	Qualité de la reconnaissance	Taux de reconnaissance (%)	Qualité du traitement d'épuration
Mobiles de fond	Bonne	81	
Sessiles favorables	Bonne	77	+
<i>Trithigmostoma</i>	Bonne	73	+
<i>Litonotus</i>	Bonne	92	
<i>Trachelophyllum</i>	Bonne	77	-
<i>Epistylis</i>	Bonne	70	+
<i>Opercularia</i>	Raisonnable	60	-
<i>V. convallaria</i>	Mauvaise	20	
<i>V. microstoma</i>	Faible	33	-

Tableau 1 : Qualité et degré de reconnaissance selon les protozoaires pendant la phase de validation ; + = bonne épuration, - épuration médiocre.

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Inspirée de travaux précédents (3, 4), une nouvelle procédure a été développée pour la reconnaissance semi-automatique de protozoaires présents dans les boues activées. Après sélection sur l'image de la zone d'intérêt où se trouve l'individu, la taille et la forme de la silhouette de ce dernier est caractérisée par dix paramètres. La classification selon l'espèce se fait par étape, chacune faisant appel à une procédure d'analyse factorielle discriminante. Durant la phase de validation un taux de reconnaissance supérieur à 70% a été obtenu pour la plus grande partie des espèces prises en compte, ce qui est supérieur à ce qui avait été obtenu précédemment, sauf pour les vorticelles.

Les travaux actuels visent à intégrer de nouveaux protozoaires ainsi que des métazoaires dans la base de données, par collecte d'images d'individus se développant dans des conditions de croissance différente.

V. REMERCIEMENTS

Les auteurs souhaitent remercier le CNPq (Brésil), l'Ambassade de France au Portugal et l'ICCTI (Portugal) pour leur soutien à ce projet.

VI. REFERENCES

- (1) Curds C.R., Cockbrun A. Protozoa in biological sewage-treatment process – II. Protozoa as indicator in the activated-sludge process. *Wat. Res.*, **4**, 237-249 (1970).
- (2) Madoni P., A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge. *Wat. Res.*, **28**, 67-75 (1994).
- (3) Amaral A.L., Baptiste C., Pons M.N., Nicolau A., Lima N., Ferreira E.C., Mota M., Vivier H. Semi-automated recognition of protozoa by image analysis, *Biotechnol. Techniques*, **132**, 111-118 (1999).
- (4) da Motta M., Pons M.N., Vivier H., Amaral A.L., Ferreira E.C., Roche N., Mota M, Study of protozoa population in wastewater treatment plants by image analysis. *Brazilian J. Chem. Eng.*, sous presse (2001).
- (5) Pons M.N., Vivier H., Dodds J.A., Particle shape characterization using morphological descriptors, *Part. Part. Syst. Charact.*, **14**, 272-277 (1997).
- (6) Einax J.W., Zwanziger H.W., Geiss S., *Chemometrics in environmental analysis*, VCH-Wiley, Weinheim (1997)
- (7) Canler J.P., Perret J.M., Ducène P., Cotteux E., *Aide au diagnostic des stations d'épuration par l'observation microscopique des boues activées*, Cemagref Editions (1999).
- (8) Curds C.R., *Protozoa in the water industry*, Cambridge Univ. Press (1992).
- (9) Madoni P., *Atlante Fotografico « Guida all'analisi microscopica del fango attivo »*, AGAC – Regio Emilia, Università degli Studi di Parma (1996).