

APLICAÇÕES DE TÉCNICAS DE ANÁLISE DE IMAGEM EM MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

A.L. AMARAL, M. MOTA e E.C. FERREIRA*

Centro de Engenharia Biológica - IBQF, Universidade do Minho, 4700 Braga, Portugal

Fax: 053.678986 e-mail: ecferreira@deb.uminho.pt

RESUMO: São evidenciadas algumas aplicações da análise de imagem em microbiologia ambiental, nomeadamente: o reconhecimento e identificação automática de algumas espécies de protozoários presentes em estações de tratamento de águas residuais; o estudo da influência de três tóxicos na mobilidade do protozoário ciliado *Tetrahymena pyriformis* em meio líquido; a correlação entre actividade metanogénica, velocidade de sedimentação e parâmetros morfológicos de agregados microbianos em digestores anaeróbios; e finalmente o estudo da correlação entre as actividades metanogénicas acetoclástica e hidrogenofílica e a fluorescência de um consórcio de microrganismos de um digestor anaeróbio. Procura-se assim demonstrar a utilidade das técnicas de análise de imagem na monitorização quer de processos de tratamento de águas residuais quer da própria qualidade ambiental.

PALAVRAS-CHAVE: Análise de Imagem, Tratamento de Efluentes Líquidos, Microbiologia Ambiental, Agregados Microbianos, Protozoários

1 INTRODUÇÃO

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 microbiologia ambiental. As aplicações mais comuns vão desde o estudo do crescimento pulsátil de ápices de hifas, diferenciação bioquímica de colónias fúngicas e diferenciação de culturas fúngicas submersas, adesão microbiana, estudo da mobilidade (Vecht-Lifchitz e Ison, 1992) a quantificação de bactérias filamentosas, contagem de leveduras viáveis e não viáveis e estimação da tortuosidade de meios porosos entre outras (Ferreira, 1998).

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, Glasbey e Horgan, 1994, Jähne, 1995 e Russ, 1995), que são de primordial importância. A análise de imagem possibilita o melhoramento de imagens, bem como a identificação e isolamento automático de

partículas para o estudo da mesmas, sendo uma técnica expedita que permite a obtenção de informação morfológica, proporcionando uma redução de tempo e trabalho ao investigador.

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 (ETAR) através do uso da técnica de Análise de Componentes Principais (Amaral *et al.*, 1999 e Geladi e Grahn, 1996). A análise de imagem foi usada para determinar os parâmetros morfológicos diâmetro de Feret (máxima distância entre 2 tangentes paralelas que tocam lados opostos de um objecto), Área, Perímetro, Diâmetro Equivalente, Excentricidade (parâmetro de orientação local), Forma de Feret (máximo diâmetro de Feret a dividir pelo diâmetro de Feret a 90°), Comprimento (maior dos diâmetros de Feret), Forma Área-Perímetro (razão entre o quadrado do perímetro de Crofton e o produto de $4p$ pela área) e Largura (menor dos diâmetros de Feret). Com a utilização da técnica de análise de componentes principais procurou identificar-se cada uma das espécies de protozoários presentes, e deste modo inferir do estado de funcionamento de uma ETAR (Madoni, 1994).
- Quantificação da redução da mobilidade do protozoário *Tetrahymena pyriformis* quando em contacto com diversas concentrações dos tóxicos cicloheximida (0,0002, 0,001, 0,002, 0,01 e 0,05 mg/l), cobre (50, 100, 200, 300 e 400 mg/l) e triton X-100 (12,5, 25, 50 e 75 mg/l). A velocidade da *T. pyriformis* foi determinada através da análise de imagem. Procurou, deste modo, obter-se uma relação entre o decréscimo da mobilidade do protozoário *T. pyriformis* e a concentração dos tóxicos testados.
- Relacionamento da morfologia de agregados microbianos, presentes em digestores anaeróbios, com a actividade metanogénica e velocidade de sedimentação. Foram determinados, através da técnica de análise de imagem, os parâmetros morfológicos Convexidade (razão entre o perímetro do menor objecto convexo ajustável e o perímetro do objecto), Compacidade (razão entre a área de um objecto e a área de um círculo com o perímetro do objecto), Esfericidade (razão entre a área de um objecto e a área de um círculo com o perímetro do menor objecto convexo ajustável), Extensão (razão entre a área de um objecto e a área da caixa que o objecto cobre), Excentricidade, diâmetro de Feret e Solidez (razão entre a área do objecto e a área do menor objecto convexo ajustável), bem como diversas dimensões fractais (medida da irregularidade da fronteira de um objecto) (Amaral, 1998). Procurou evidenciar-se a relação entre a morfologia dos agregados de um digestor anaeróbio e a actividade.
- 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 (média dos valores de fluorescência das bactérias) e fluorescência do fundo (média dos valores de fluorescência do fundo) foram determinados através da análise de imagem. Procurou-se, assim, estabelecer uma relação entre a fluorescência evidenciada por um consórcio bacteriano proveniente de um digestor anaeróbio e a sua actividade metanogénica.

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.

Foi colocada uma gota numa lâmina e coberta com uma lamela para a observação num microscópio de contraste de fase *Dialux 20 (Leitz, Stuttgart)*, com uma ampliação de 400x. A aquisição da imagem foi efectuada com o auxílio de uma câmara analógica *CCTV (Hitachi, Tokyo)*, de uma placa de aquisição de imagens *Meteor (Matrox, Montreal)* e utilizando o *software Visilog 5.1 (Noesis SA, les Ulis)*. Os dados morfológicos foram obtidos por um programa desenvolvido para o efeito. A Fig. 1 ilustra alguns tipos de ciliados após aquisição da imagem.

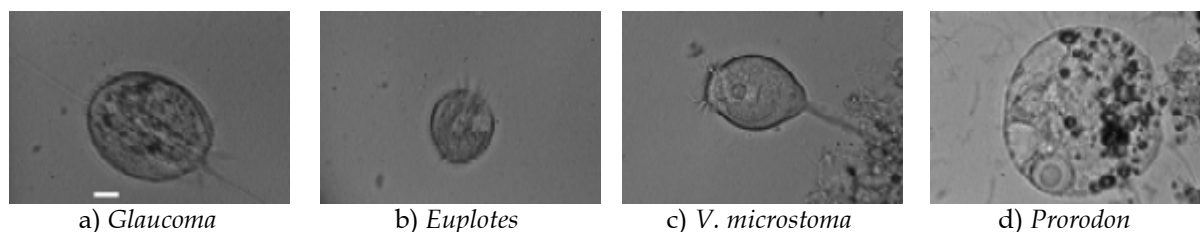


Fig. 1 – Ciliados a) nadador b) móvel de fundo c) séssil d) carnívoro (a barra branca representa 10 µm).

2.2 Estudo da mobilidade do ciliado *T. pyriformis* em contacto com tóxicos

Estudou-se o efeito de três tóxicos (cicloheximida, cobre e triton X-100), a diversas concentrações, no protozoário ciliado *Tetrahymena pyriformis*. Foram gravadas em vídeo imagens animadas dos protozoários após 24 horas de contacto com os tóxicos para posterior análise e obtenção dos valores da mobilidade. Procedeu-se também à recolha de imagens de *T. pyriformis* sem tóxico para controlo.

O meio utilizado foi o meio líquido *PPY* do catálogo *Catalogue of Strains of Culture Collection of Algae and Protozoa* (Tomkins *et al.*, 1995). Usaram-se culturas axénicas de *T. pyriformis* GL previamente incubadas durante 18 a 24 horas.

A *T. pyriformis* foi observada numa lupa binocular *SZ 4045TR-CTV (Olympus, Tokyo)* com a ampliação máxima (40x). As imagens foram adquiridas por uma câmara de vídeo *CCD AVC D5CE (Sony, Tokyo)*, transmitidas para o gravador de vídeo *S-VHS Panasonic AG-5700-E (Matsushita, Tokyo)* e registadas em fita magnética.

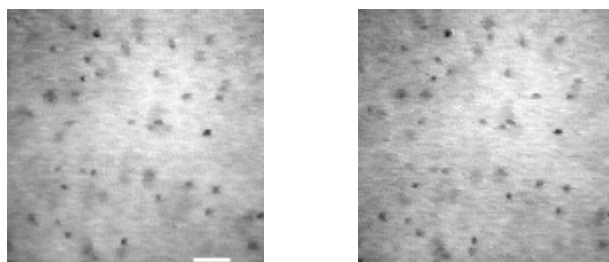


Fig. 2 – Imagens consecutivas de *T. pyriformis* (a barra branca representa 200 μm).

Posteriormente, estas foram digitalizadas por uma placa de aquisição de imagens *DT 3155* (*Data Translation, Marlboro*) com o auxílio do *software Global Lab Image* (*Data Translation, Marlboro*). Para o comando do avanço do número de *frames* (imagens em fita magnética) do vídeo foi utilizado um programa desenvolvido em *QuickBasic 4.5* (*Microsoft Corporation, Seattle*), descrito no trabalho de Amaral (1998). Os dados da velocidade foram obtidos por um programa desenvolvido para o efeito. A Fig. 2 representa duas imagens consecutivas (80 ms) de *T. pyriformis* a uma concentração de ciclohexamida de 0.0002 mg/l.

2.3 Estudo da correlação entre actividade metanogénica, velocidade de sedimentação e parâmetros morfológicos de agregados microbianos em digestores anaeróbios

Os agregados analisados foram retirados de dois filtros anaeróbios alimentados com um substrato láctico sintético de acordo com o descrito por Alves (1998).

As actividades metanogénicas (propionato, butirato, etanol e acetato), actividade em lactose e velocidade de sedimentação foram determinadas de acordo com os métodos descritos por Alves (1998).

Procedeu-se à aquisição das imagens por deposição dos agregados microbianos 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 através do *software Global Lab Image* (*Data Translation, Marlboro*). Os dados morfológicos foram obtidos por um programa desenvolvido para o efeito. A Fig. 3 ilustra alguns exemplos de imagens obtidas.

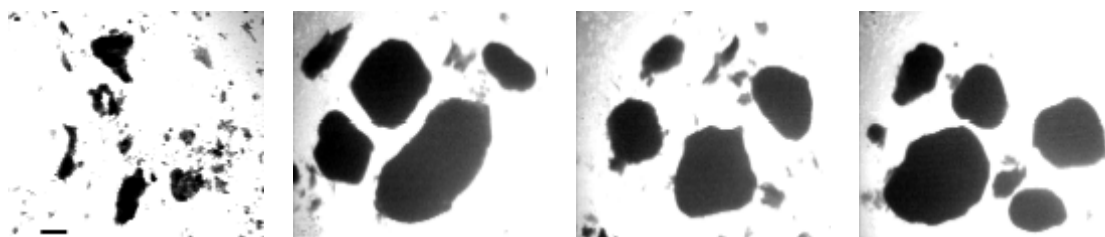


Fig. 3 –Imagens de agregados microbianos (a barra preta representa 2 mm).

2.4 Quantificação da fluorescência no arranque de um digestor anaeróbio

Realizou-se o arranque de um digestor anaeróbio de mistura completa alimentado com ácidos gordos voláteis (AGV), macro e micronutrientes.

A determinação das actividades acetoclástica e hidrogenofílica foi efectuada como referido no item anterior. A determinação dos sólidos voláteis (SV) foi feita por diferença entre o peso da amostra seca a 103-105 °C e calcinada a 550 °C.

Para a determinação da fluorescência foi colocado um volume de 5 µl de amostra numa lâmina e coberto com uma lamela. Foram então observadas, num microscópio de epi-fluorescência *Axioscop* (*Zeiss, Oberkochen*), a uma ampliação de 400x, e comprimento de onda de excitação de 420 nm. Seguidamente foram fotografadas em rolo *Kodak 800 ASA* 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*) para um formato de 24 bits. Os dados de fluorescência foram obtidos por um programa desenvolvido para o efeito.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Reconhecimento semi-automático de protozoários por análise de imagem

Os parâmetros calculados para cada protozoário foram tratados pela análise de componentes principais. Esta técnica permite uma representação, dos dados obtidos, num menor número de eixos, com uma perda mínima da variabilidade total.

A representação gráfica do centróide de cada protozoário nos dois primeiros eixos (1 e 2), obtidos a partir da análise de componentes principais, bem como a sua área de localização, encontra-se na Fig. 4. Para melhor distinguir-se cada espécie de protozoário procedeu-se à escolha do 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 3 eixos encontra-se na Fig. 5.

A partir destas representações pode retirar-se o seguinte:

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

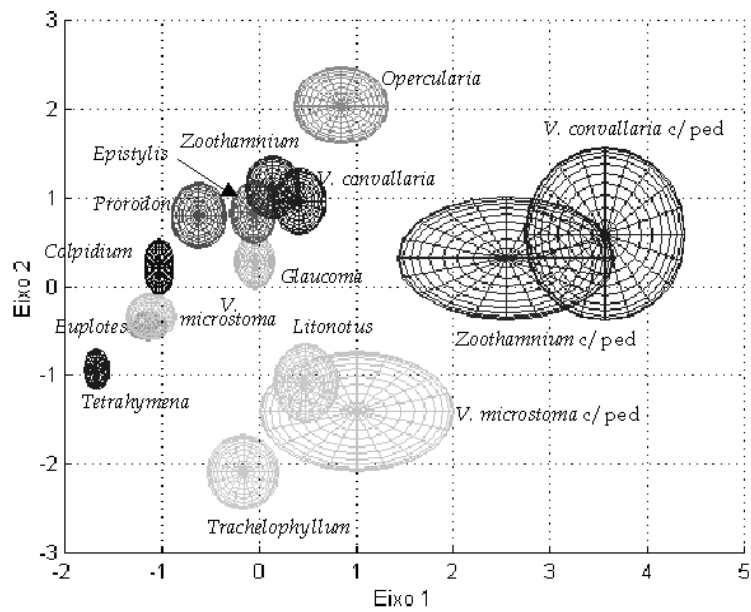


Fig. 4 – Representação da zona ocupada por cada espécie nos eixos 1 e 2

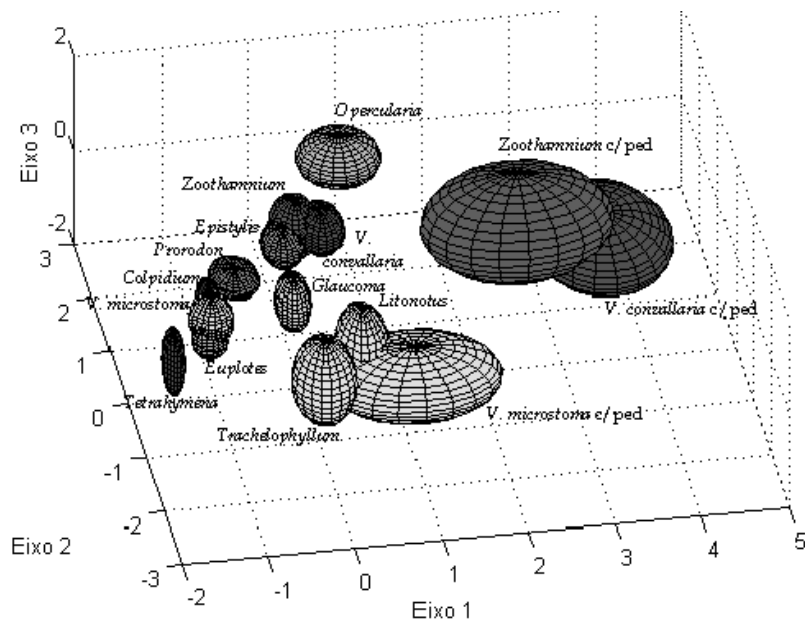


Fig. 5 – Representação da zona ocupada por cada espécie tridimensionalmente.

Das doze espécies de protozoários estudadas foi possível identificar completa ou razoavelmente dez delas, 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. Assim,

uma aplicação rotineira desta técnica a amostras retiradas de tanques de arejamento de uma ETAR pode revelar-se um indicador precioso do estado de funcionamento do mesmo.

3.2 Estudo da mobilidade do ciliado *T. pyriformis* em contacto com tóxicos

A representação gráfica das velocidades da *T. pyriformis* em função da concentração da cicloheximida, do cobre e do triton X-100, com a linha de tendência associada, encontram-se representadas na Fig. 6.

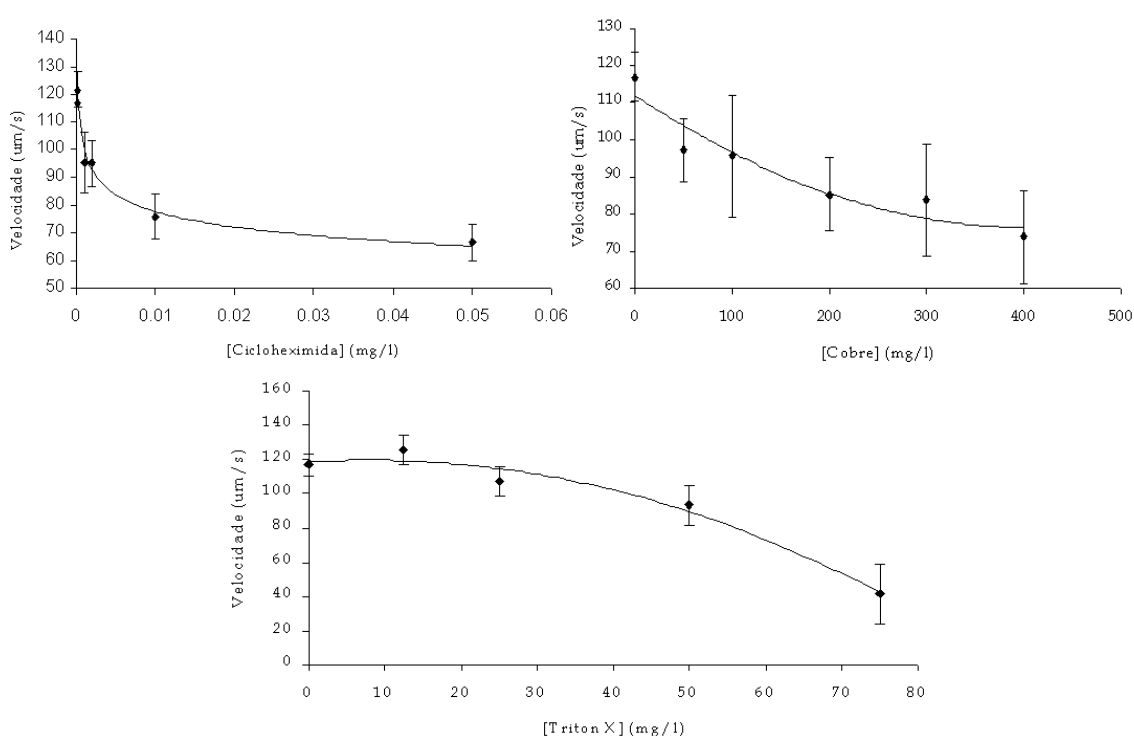


Fig. 6 – Representação gráfica das velocidades e curva de tendência para a cicloheximida, cobre e triton X-100

Para todos os tóxicos testados pode observar-se a diminuição da velocidade da *T. pyriformis* com o aumento da concentração dos tóxicos. Esta diminuição é mais notória para a gama de triton X-100 testada do que para a cicloheximida e cobre.

A técnica de análise de imagem provou poder ser utilizada para a monitorização da mobilidade deste protozoário que é um bom indicador biológico de poluição. Deste modo, esta técnica pode ser um auxiliar precioso na detecção de possíveis situações de presença de tóxicos.

3.3 Estudo da correlação entre actividade metanogénica, velocidade de sedimentação e parâmetros morfológicos de agregados microbianos em digestores anaeróbios

Durante a operação dos digestores observou-se uma alteração acentuada dos agregados microbianos, especialmente dos que se encontravam no topo dos digestores. A relação entre parâmetros morfológicos, físicos e fisiológicos é especialmente importante em digestores anaeróbios de leito de lamas. Por exemplo, o crescimento de bactérias acidogénicas na superfície dos agregados altera com a sua morfologia e as suas características de sedimentação, bem como o perfil de actividades exibido pelos diferentes grupos tróficos do consórcio. Embora neste trabalho se tenham analisado agregados de filtros anaeróbios, algumas características destes agregados sugerem ocorrência de granulação (vel. sedimentação = 156 m/h; diâmetro = 3.7 mm) em determinada altura da operação.

É interessante verificar o aumento da actividade sintrófica (em propionato e etanol) com o parâmetro morfológico solidez (Fig. 7a). Este comportamento pode estar relacionado com o melhor ambiente encontrado pelos microrganismos sintróficos para a transferência de H_2 com as bactérias hidrogenotróficas. Por outro lado, a actividade acetoclástica e a velocidade de sedimentação mostraram-se razoavelmente correlacionadas com o parâmetro morfológico esfericidade, aumentando com o mesmo (Fig. 7b).

A investigação destas relações pode ser especialmente interessante no estudo dos fenómenos de granulação e desgranulação. Além disso, 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.

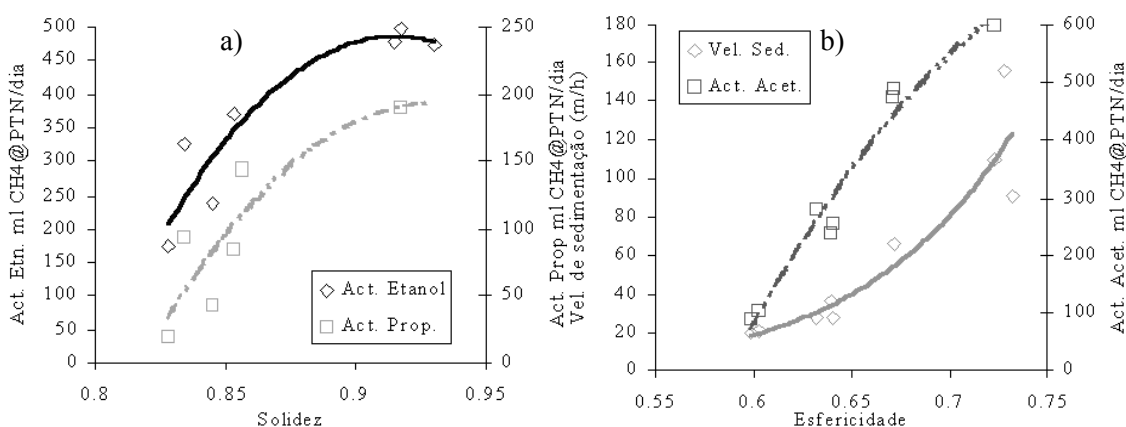


Fig. 7 – a) Actividade em propionato e actividade em etanol em função da solidez.
b) Actividade acetoclástica e velocidade de sedimentação em função da esfericidade.

3.4 Quantificação da fluorescência no arranque de um digestor anaeróbio

A quantificação da auto-fluorescência das bactérias metanogénicas é complexa, porque além de existirem diferentes espécies com diferentes teores de cofactor F_{420} , uma das espécies mais abundantes e importantes em digestores anaeróbios (*Methanosaeta*) apresenta teores muito reduzidos deste cofactor, dificultando a sua detecção. No entanto, neste trabalho tentou-se acompanhar a evolução da fluorescência no arranque de um digestor de mistura completa quantificando os parâmetros descritos anteriormente. Na figura Fig. 8 estão representadas algumas imagens recolhidas. Uma vez que este trabalho ainda se encontra numa fase inicial os resultados obtidos são ainda preliminares.



Fig. 8 – Exemplos de imagens recolhidas no decurso deste trabalho.

4 CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos pode comprovar-se a exequibilidade da utilização da análise de imagem como uma técnica útil na monitorização de processos de microbiologia ambiental. A análise de imagem é também uma técnica que requer uma quantidade ínfima de amostra, rápida e de uma elevada reprodutibilidade, sendo uma técnica recente, revelou-se, no entanto, muito promissora.

Um estudo mais aprofundado das condições óptimas de recolha de imagens, tratamento das mesmas e escolha dos parâmetros representativos de cada processo, bem como a sua simplificação e padronização pode conduzir a uma aplicação rotineira destas técnicas em laboratório.

Estes resultados, bem como uma descrição mais pormenorizada de cada trabalho, pode ser consultada na internet no endereço http://www.deb.uminho.pt/lab_imagem.

5 AGRADECIMENTOS

O autor gostaria de agradecer às seguintes pessoas, sem as quais estes trabalhos não teriam sido possíveis: Nelson Lima, Madalena Alves, Ana Nicolau, Marie-Noëlle Pons, Hervé Vivier, Nicolina Dias e Alcina Pereira. Parte deste trabalho foi suportado por financiamentos do Instituto de Cooperação Científica e Tecnológica Internacional e Embaixada de França em Portugal.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. M. 1998. *Estudo e caracterização de digestores anaeróbios de leito fixo*. Tese de Doutorado, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga.
- AMARAL, A. L. 1998. *Desenvolvimento de técnicas de análise de imagem para aplicação em processos biotecnológicos*. Tese de Mestrado em Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga.
- AMARAL, A. L.; BAPTISTE, C.; PONS, M. N.; NICOLAU, A.; LIMA, N.; FERREIRA, E. C.; MOTA, M.; VIVIER, H. 1999. Semi-automated recognition of protozoa by image analysis. *Biotech. Tech.* **13**, 111-118.
- DOUGHERTY, E. R. 1994. *Digital Image Processing Methods*. Marcel Dekker, Inc, New York.
- FERREIRA, E. C. 1998. Application of image analysis techniques in biotechnology, wastewater treatment and food technology. *Biotec '98 Book of Abstracts*, 203.
- GELADI, P.; GRAHN, H. 1996. *Multivariate image analysis*. John Wiley & Sons, Chichester.
- GLASBEY, C. A.; HORGAN, C.W. 1994. *Image analysis for the biological sciences*. John Wiley & Sons, Chichester.
- JÄHNE, B. 1995. *Digital image processing*. Springer-Verlag, Berlin.
- MADONI, P. (1994). A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Water Research*. **28**, 67-75.
- RUSS, J. C. 1995. *The image processing handbook*. CRC Press, Boca Raton.
- TOMKINS, J.; DEVILLE, M. M.; DAY, J. C.; TURNER, M. F. 1995. *Catalogue of strains of CCAP (culture collection of algae and protozoa)*. Natural Environment Research Council, Ambleside.
- VECHT-LIFSHITZ, S. E.; ISON, A.P. 1992. Biotechnological applications of image analysis: present and future prospects. *J. Biotechnol.* **23**, 1-18.