
Sistema Automático para Contagem de Unidades Formadoras de Colônias

Michael Taynnan A de O Barros*, Pedro Falcão**, Fausy Solino Dias** e Marcelo Sampaio de Alencar **

*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB), Campina Grande, Brasil.

**Instituto de Estudos Avançados em Comunicações (Iecom)

Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campina Grande, Brasil.

e-mail: michael.taob@gmail.com

Abstract: *Colony Forming Unit Counting is a very important process for biomedical research. The manual process needs too much time to be done. Therefore, this paper introduces an Automated System for Colony Forming Unit Counting. Also a modular and efficient method for digital image processing for counting is shown. The system is subdivided into four systems: Image Acquisition System, Image Pre-Processing System, UFC Counting System and the Results Benchmarking. The results show the advantages and the of this system.*

Palavras-chaves: Unidades Formadoras de Colônias, Contagem Automatizada, Processamento Digital de Imagens.

Introdução

Nos últimos anos, os métodos para estimar a quantidade de microrganismos vêm evoluindo para automatização. Novas técnicas tentam aperfeiçoar o tempo de preparação das amostras e automatizar o processo de contagem como em [3] e [6].

Existem dois grandes grupos distintos de técnicas para a contagem de microrganismos. Será tratado aqui apenas o que se chama de Método de Contagem de Colônias (MCC). Este método caracteriza-se pela contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), sem identificar o tipo de microrganismo, já que dispensa o uso de microscópios[1].

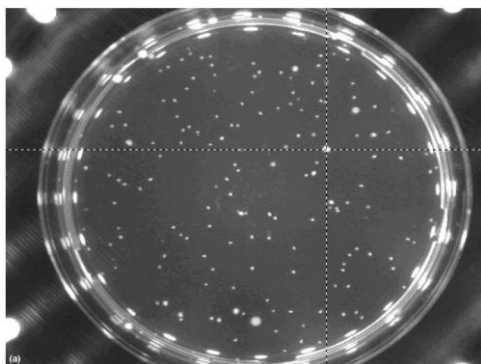


Figura 1: Placa de Petri com UFCs [1].

Sua vantagem principal é o baixo custo em equipamentos e a grande desvantagem é a demora no processo de preparação das amostras, por causa do período de incubação necessária para o crescimento das UFC, que pode durar até 48h dependendo da espécie de bactéria analisada. Estas UFC são desenvolvidas em placas de Petri e nelas são estudadas apenas a contagem, não se importando com o tipo de subespécies existentes na placa. A seleção da bactéria é conseguida utilizando o meio de cultura apropriado para o desenvolvimento da bactéria [2].

O objetivo deste artigo é mostrar o desenvolvimento de um sistema automático para contagem das UFC.

A automatização da contagem possibilita:

- Realizar com velocidade a contagem de UFCs;
- Eliminar o erro aleatório inerente a cada técnico;
- Ter o registro digital do momento da realização da contagem.

Um aplicativo de processamento digital de sinais foi criado para a contagem automatizadas das colônias de bactérias nas placas Petri. O aplicativo chama-se BacCont 1.0 e foi desenvolvido na linguagem Python. Esse aplicativo apresenta bom desempenho além de ser modular e escalável, aderindo a novas técnicas de processamento de imagens rapidamente.

O artigo está organizado da seguinte maneira: Introduce-se o processo de contagem junto com a técnica de processamento digital de imagens nas seguintes seções, apresenta-se o aplicativo, mostra-se também vários experimentos realizados com contagem manual e contagem automatizada e indicar-se a técnica mais vantajosa.

Métodos e Metodologia

O processo de contagem pode ser dividido em quatro etapas distintas: aquisição das imagens, pré-processamento, contagem e aferição. Cada etapa apresenta desafios e objetivos específicos e o seu resultado depende do sucesso da etapa anterior.

Sistema de Aquisição de Imagens -- O sistema de aquisição utiliza uma câmera digital para adquirir as imagens da placa de Petri em diversos instantes de tempo. Nesta etapa dois aspectos são críticos para a obtenção de imagens com qualidade satisfatória: o

sistema de iluminação (SI) e a qualidade da câmera (resolução, lentes, etc.).

Pré-Processamento das Imagens -- Apesar de todos os cuidados tomados na etapa anterior, as imagens resultantes ainda apresentam problemas de luminosidade não-uniforme e ruído. O objetivo desta etapa é compensar estes efeitos utilizando técnicas de processamento de imagens [3].

Processo de Contagem das UFCs -- Após o pré-processamento, a imagem está pronta para o processo de contagem. Assim como na etapa anterior, técnicas de processamento de imagem são utilizadas para identificar as colônias e incrementar o contador de resultados [4].

Aferição dos Resultados -- Ao fim da contagem é esperada que certo nível de erro esteja presente. O objetivo desta etapa é a estimativa do valor do erro e a elaboração de um procedimento de compensação, de forma a reduzir o erro final [4].

Processamento digital de imagens para contagem automatizada de bactérias consiste na captura da imagem de uma placa de Petri por meio de câmeras digitais fornece um arquivo JPG (*Joint Photographic Experts*) de alta resolução para a realização da contagem.

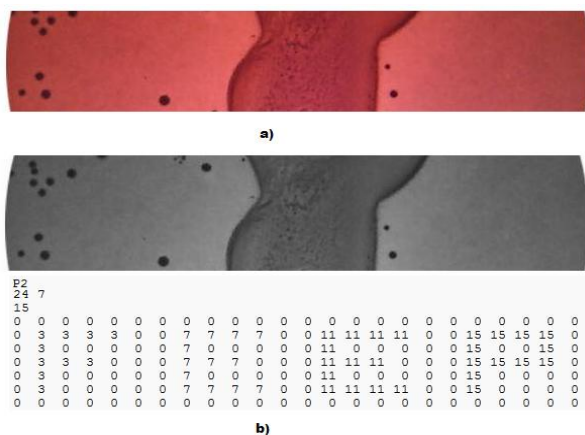


Figura 2: Exemplo de imagem JPG (a) e imagem PGM (b).

Para uma maior confiabilidade da enumeração de colônias, torna-se necessário a conversão desta imagem capturada para o formato PGM (*Portable GrayscaleMap Format*). Esse formato apresenta imagens em escala de cinza, para processamento em formato texto. Exemplos dos formatos de imagens e como o formato PGM se comporta em modo texto são mostrado na Figura 2.

O processamento é realizado de acordo com a resolução da imagem em PGM. Primeiro é estabelecido um filtro dinâmico que analisa os níveis de tonalidade da imagem. Se ela for escura o filtro é amenizado, permitindo que mais conjuntos de pontos sejam contados.

Comparado a parte imagem mais clara com os pontos a serem contados e obtendo uma alta diferença, o filtro torna a contagem precisa. A qualidade da imagem é importante na precisão dos resultados, e a imagem

deve ter alta resolução e colônias sejam definidas nitidamente.

Em seguida o *software* varre a matriz da imagem para detectar os conjuntos de pontos previamente filtrados da imagem original. Recursivamente, são verificadas as bordas de cada colônia e armazenadas as posições dos *pixels* que a compõem. É feita uma nova varredura para encontrar a próxima colônia, sendo repetido o ciclo até que não haja mais colônias a serem contadas.

O BacCont 1.0 é um *software* desenvolvido para a contagem automatizada de UFC por imagens digitais. Este produto foi desenvolvido em linguagem Python, e apresenta ferramentas necessárias para que o usuário faça uma contagem confiável de colônias de bactérias. Apresenta uma interface gráfica totalmente intuitiva como na Figura 3.

O BacCont 1.0 utiliza o método de processamento digital de imagens de colônias de bactérias descrito anteriormente. Este *software* foi produzido em ambiente Linux, mas como Python é uma linguagem interpretada, o aplicativo pode rodar em qualquer outro sistema operacional que suporte a máquina virtual Python.

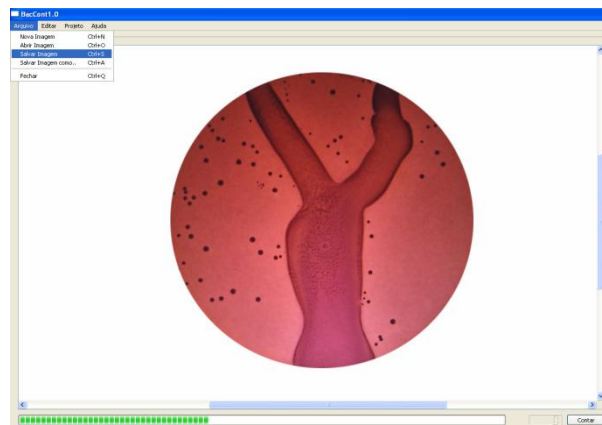


Figura 3: Interface Gráfica do BacCont 1.0.

Para a realização das atividades e dos testes, foi necessário estudar a preparação de inóculos, que no caso utilizou-se a bactéria *E. Coli*. A inoculação inicia com a ativação da cepa bacteriana liofilizada derivada da ATCC (*American Type Culture Collection*), colocando-a no meio de cultura TSB (Caldo de Soja de Tripton) e levando-o por 24h à estufa, que mantenha a temperatura em torno de 37°C.

A verificação de ativação da *E. Coli* é constatada pela presença de ácido sulfídrico (H₂S). Após a inoculação, é realizada a diluição seriada, com diversas concentrações. No caso desta pesquisa, foram feitas seis diluições.

Retira-se da amostra 50 µl que se acrescenta a 9 µl de salina, que passa a ser chamada de Diluição 1/10 (10⁻¹) ou Diluição 1. Após homogeneização desta solução, retira-se dela 50 µl e se acrescenta uma nova solução de salina com 9 µl. Essa é a Diluição 1/10 (10⁻²) ou Diluição 2. Esta operação é realizada até a Diluição 1/1.000.000 (10⁻⁶) ou Diluição 6.

Essas diluições são levadas para o refrigerador e conservadas a uma temperatura entre 2°C a 8°C, evitando o desenvolvimento de colônias nas soluções preparadas. Com as diluições prontas, os testes são realizados, utilizando o meio de cultura EMB (Agár-Agár de Eosina Azul de Metileno) para o desenvolvimento da *E. Coli* [2]. Foram realizados testes para escolha do método de contagem e testes do aplicativo de contagem automática de UFC.

Foi desenvolvido um teste para escolha do método de contagem. Para a utilização das diluições preparadas e o meio de cultura EMB, foram escolhidos três possíveis técnicas para compor o método de contagem de UFCs:

- técnica de espalhamento com alça de platina;
- técnica de espalhamento em superfície;
- técnica de espalhamento em profundidade.

Para cada técnica foi confeccionada, nesta fase de teste, uma placa de Petri para cada diluição, o que resultou em 18 placas. Outro item definido para os testes foi a quantidade que a ser colocada do meio de cultura EMB em cada uma. Após algumas avaliações por meio de fotos e estudo de luminância necessária para realizá-las na câmara do contador automático de UFCs, optou-se pelo volume de 20 ml [2].

A técnica a ser escolhida deve ter os seguintes requisitos:

- facilidade e rapidez na sua execução;
- pouca influência do executor nos resultados;
- nitidez e separação das UFCs para a automatização da contagem.

Aqui são mostrados apenas os resultados obtidos pela Técnica de Espalhamento em Superfície, pois com essa técnica a precisão do processamento da imagem é maior.

Execução -- Após a colocação do meio de cultura EMB nas placas de Petri e o seu esfriamento na temperatura ambiente, coloca-se 50 µl da diluição, utilizando uma pipeta automática com esta calibração. O espalhamento é efetuado executando movimentos em oito. Foi padronizado em 30 movimentos, sendo 15 para direita e 15 para esquerda, não ultrapassando a largura dos ombros de cada executor. Os movimentos são feitos sobre a mesa, colocando-se entre a placa de Petri e a mesa uma folha de papel, com o intuito de diminuir o atrito entre os dois corpos. Após este espalhamento mecânico, leva-se para a estufa, aguardando 10h. Passadas 10h realiza-se a contagem de UFCs existentes na placa de Petri.

Resultados -- A separação das UFCs ficou nítida em todas as diluições [2].

Dificuldades e Facilidades -- execução da Técnica de Espalhamento em Superfície tem facilidade e rapidez na sua execução. Os resultados não possuem influência do executor desde que siga as etapas mencionadas acima, tendo uma nitidez excelente, que possibilita a contagem das UFCs, tanto visualmente como utilizando o aplicativo de contagem automática [2].

Para realizar os testes foi desenvolvida uma câmara de coleta de imagem, utilizando PVC ø150mm, com

altura de 50 cm. Foi confeccionada uma base de iluminação. Devido à baixa intensidade luminosa 100 lux, em um primeiro instante, foi necessário acrescentar mais uma lâmpada, o que fez a intensidade luminosa passar para 400 lux.

Apesar das lâmpadas utilizadas serem do tipo compacta, não foi observada influência da luz ultravioleta gerada por elas, já que as contagens demonstraram queda apenas com o esgotamento do meio de cultura, e não antes.

Resultados

Esta seção descreve os resultados obtidos dos testes do Aplicativo de Contagem Automática de UFC (BacCont 1.0) em relação a contagem manual, dando ênfase ao tempo gasto de operação e o erro obtido pelos processos.

A Tabela 1 mostra a diferença de tempo entre contar as colônias manualmente (CM) e contá-las via um processo automatizado. A Tabela 1 mostra também o tempo médio de processamento (TP) de cada processo das imagens avaliadas. A contagem automatizada (CA) foi implementada em linguagens Python e C ANSI e é comparada na Tabela 1 com a CM.

Tabela 1: Avaliação de Desempenho

	CM	CA (Python)	CA (CANSI)
TP (segundos)	33	1,2	0,2
Resultado (colônias)	79	81	81

Também foi percebida uma variação na intensidade luminosa, devido à variação da tensão na rede elétrica, conforme se percebe na Figura 4. Percebe-se também que essa variação estabiliza-se em torno de 350 lux [5].

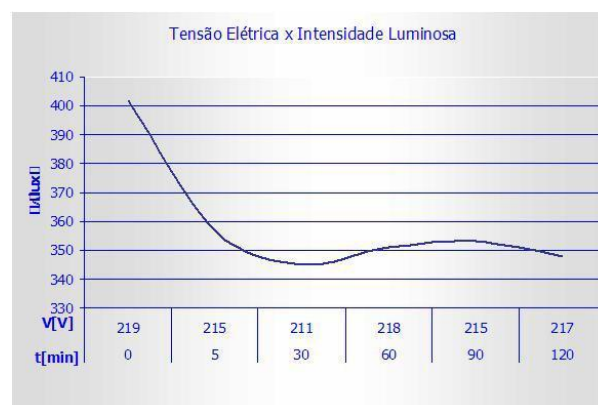


Figura 4: Intensidade luminosa conforme a variação da tensão elétrica no tempo [5].

Discussão

Pela Tabela 1, nota-se a diferença entre os tempos de contagem manual e contagem automatizada. Percebe-se por essa tabela um desempenho melhorado em 96,3%

do tempo. Em casos de contagens de placas de Petri com centenas ou milhares de colônias o tempo médio gasto ficaria em torno de horas. Com o método apresentado esse tempo pode reduzir para minutos.

Todas as placas de Petri geradas no teste para escolha do método de contagem, com as diversas diluições feitas, foram analisadas e contadas pelo aplicativo. Inicialmente, o erro absoluto entre a contagem manual e a contagem do aplicativo ficou em 8%.

Conseguiu-se melhorar este erro para 5%, com melhoras feitas tanto no aplicativo como no método de coleta da imagem.

Conclusão

A contagem automatizada de colônias de bactérias eleva a velocidade em relação à contagem manual das UFCs. Além disso, o erro aleatório inerente de cada técnico e o uso do microscópio são eliminados. Mas para essa técnica é preciso capturar o registro digital do momento da realização da contagem.

Neste artigo foi proposto também um método eficiente na contagem de bactérias, no qual o usuário fornece a entrada (placa de Petri contendo colônias de bactérias) e recebe como saída o número total de UFC que a placa de Petri contém. Nota-se que o desempenho deste sistema reduz em 96,3% o tempo gasto em uma contagem manual.

O Sistema Automático para Contagem de Unidades Formadoras de Colônia é uma solução para ambientes biomédicos, em que é necessária a contagem de modo eficiente e preciso.

Agradecimentos

Agradecemos ao Iecom, ao CCBS da UFCG e ao CNPq pelo suporte na realização deste trabalho.

Referências

- [1] Osowsky, F. (1999) “Sistema Automatizado para Contagem de Colônias através de Processamento Digital de Imagens”, Dissertação de mestrado em Engenharia Elétrica. CEFET-PR.
- [2] Pelczar Jr., J. M. (1997). Microbiologia: conceitos e aplicações, vol. I, 2a ed., São Paulo, Makron Books.
- [3] Ates, H.; Gerek, O. N.; (2009) “An image-processing based automated bacteria colony counter”. ISICIS 2009. 24th International Symposium on Computer and Information Sciences. Páginas: 18 - 23 .
- [4] Chengcui Zhang ; Wei-Bang Chen ; Wen-Lin Liu ; Chi-Bang Chen (2008), “An Automated Bacterial Colony Counting System”, SUTC '08. IEEE International Conference on Sensor Networks, Ubiquitous and Trustworthy Computing. Páginas:

233 - 240.

- [5] Dias F. S. (2009), “Preparação do Laboratório e Elaboração do Procedimento de Estudo da Radiação Não-Ionizante sobre a Bactéria Escherichia Coli”, Projeto e Pesquisa do COPELE-CEEI-UFCG.
- [6] Ingels, Neil B.; Daughters, George T.; Burzio, Agostino; (1968), “New Design for an Automated Bacterial Colony Counter”, Review of Scientific Instruments .Volume: 39 , Issue: 1. Páginas: 115 - 120.