Software para la cuantificación microbiológica del fango activo a partir del análisis de imagen

Raquel Golfe ingeniera ambiental, Grupo Aguas de Valencia
Ángela Baeza licenciada en Ciencias del Mar, Grupo Aguas de Valencia
María José Tárrega licenciada en Ciencias Biológicas, Grupo Aguas de Valencia
Gloria Fayos doctora en Farmacia, Grupo Aguas de Valencia
Vicente Fajardo licenciado en Farmacia, Grupo Aguas de Valencia
Francisco Zorrilla licenciado en Química, Grupo Aguas de Valencia

En este articulo se describen las técnicas utilizadas para la programación de ImageCAI, una herramienta de análisis de imagen capaz de cuantificar de forma automática diferentes características del fango activo. Esta herramienta cuenta con tres aplicaciones: caracterización del flóculo, cuantificación de bacterias y cuantificación de la viabilidad celular. ImageCAI permite obtener resultados representativos, exactos y fiables, aplicables a la simulación y explotación de cada estación depuradora de aguas residuales (EDAR), reduciendo en gran medida la incertidumbre de los resultados y el tiempo de análisis respecto a la cuantificación manual.

Palabras clave
Análisis de imagen, cuantificación microbiológica, deconvolución, estación depuradora de aguas residuales (EDAR).

Software from the microbial quantification of activated sludge from image analysis
This article describes the techniques used for programming ImageCAI, an image analysis tool able to automatically quantify different characteristics of activated sludge. This tool has three main uses: floc characterization, bacteria quantification and cell viability quantification. ImageCAI also allows obtaining representative, accurate and reliable results applied to both simulation and operation of wastewater treatment plant (WWTP), reducing greatly the uncertainty of the results and the analysis time required compared to those of manual quantification.

Keywords
Image analysis, microbiological quantification, deconvolution, wastewater treatment plant (WWTP).

1. Introducción

En los sistemas de depuración de aguas residuales con fangos activos es importante disponer de una descripción microbiológica cualitativa y cuantitativa del fango que permita comprender su estructura biótica, además de proporcionar una idea de las condiciones de funcionamiento del proceso biológico y posibles alteraciones del mismo.

La observación cualitativa del fango activo mediante microscopía de campo claro y contraste de fases permite identificar los tipos de microorganismos predominantes, determinar la presencia o ausencia de bacterias filamentosas y conocer a grandes rasgos el estado general del flóculo.

Mediante microscopía de epifluorescencia e hibridación fluorescente *in situ* (FISH), hoy en día es posible identificar microorganismos a diferentes niveles taxonómicos (dominio, phylum, clase, familia, género o especie) de importancia en los tratamientos biológicos de aguas residuales: por ejemplo morfotipos filamentosos a nivel de género o especie como *Microthrix* o grupos bacterianos como bacterias nitrificantes, acumuladoras de polifosfato, sulfatorreductoras, etc. Asimismo, la microscopía de epifluorescencia utilizando tinciones fluorescentes permite diferenciar entre células viables y no viables, determinar actividades enzimáticas, etc.

La cuantificación de microorganismos a través de índices clásicos permite la obtención de un valor numérico que posibilita la generación de un registro de los resultados de la observación microscópica, que puede facilitar el diagnóstico del proceso y la aplicación de medidas de control. Sin embargo, la obtención de estos datos numéricos puede ser un proceso costoso y con una elevada incertidumbre al realizarse de forma manual y dependiente en gran medida del criterio del técnico que realice las observaciones.

El análisis de imagen es una de las técnicas informáticas más utilizadas para la cuantificación, ya que a partir de una serie de imágenes tomadas previamente es posible obtener un dato cuantitativo mediante un ordenador, una cámara digital y un software de análisis de imagen. Esta técnica ofrece una exactitud muy elevada, ya que, mientras que el ojo humano es capaz de distinguir entre 16 tonalidades de grises, los programas de análisis de imagen trabajan con 256 niveles distintos, lo que amplía enormemente la profundidad de la imagen, o lo que es lo mismo, la información proporcionada por ella. El único inconveniente que presenta este tipo de análisis es el de requerir el procesado de un gran número de imágenes, siendo un proceso lento y muy laborioso. Por ello, es necesario el diseño de una herramienta que facilite una cuantificación microbiológica extensa, lo más exacta posible, representativa, objetiva y rápida para su aplicación en aguas residuales.

En el mercado existen multitud de programas de análisis de imagen capaces de llevar a cabo las cuantificaciones de áreas específicas de una imagen.

Con todo ello el objetivo principal de este proyecto ha sido diseñar una herramienta informática basada en el análisis de imagen, que permita tratar multitud de imágenes de forma totalmente automática, y reducir al máximo el tiempo del análisis cuantitativo, eliminando así la subjetividad de la cuantificación manual.

Esta herramienta de cuantificación, ImageCAI, dispone de tres aplicaciones distintas, las cuales permiten obtener resultados de:

- Las poblaciones bacterianas presentes en la muestra del fango biológico, a partir del porcentaje de bacterias en estudio (nitrificantes, PAO, etc.) respecto al total de bacterias presentes en la muestra determinadas mediante FISH. Aplicación llamada 'Cuantificación de bacterias'.
- El estado del flóculo, a partir del porcentaje del flóculo y su respectivo núcleo ocupado en un campo, el número de flóculos y núcleos, la distribución en tamaños que presentan y el grado de compactación de dichos flóculos. Aplicación llamada 'Caracterización del flóculo'.
- La viabilidad celular presente en la muestra, a partir de la cuantificación del porcentaje de células viables y no viables en la muestra de estudio mediante microscopía de fluorescencia. Aplicación llamada 'Viabilidad celular'.

2. Materiales y métodos

2.1. Tratamiento previo al análisis de imagen. La toma de imágenes

Las imágenes han sido tomadas en un microscopio Leica DM 2500 provisto de sistema de fluorescencia y una cámara digital Leica DFC 425C. Para obtener óptimos resultados en la cuantificación de las imágenes es necesario que exista una clara diferencia entre aquello que se desea cuantificar del resto de la imagen o *background*. Para ello es necesario utilizar diferentes técnicas microscópicas según el tipo de cuantificación que se necesite:

- Campo oscuro. Las imágenes obtenidas presentan un fondo negro y estructuras brillantes correspondientes al flóculo a cuantificar (**Figura 1**). Las estructuras brillantes poseen distintas intensidades de grises, siendo posible distinguir el núcleo del

Figura 1. Imagen en campo oscuro.

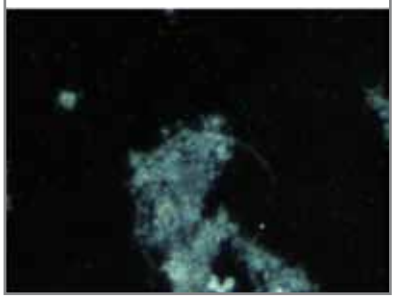


Figura 2. Imagen con sonda EUBmix.

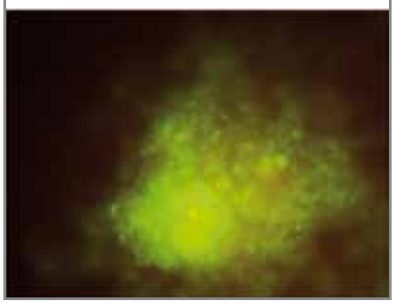
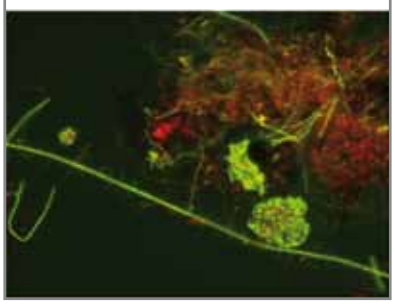


Figura 3. Imagen LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability.



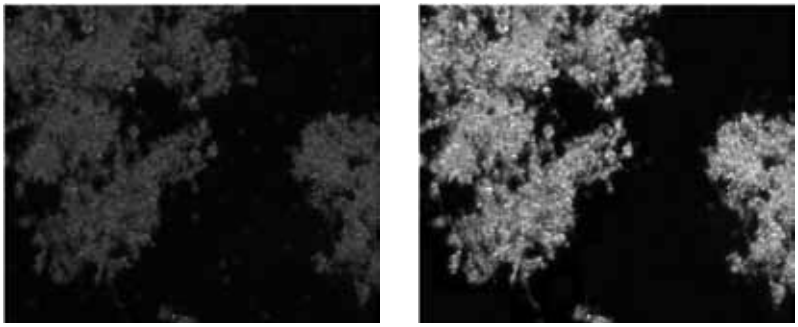
flóculo. Esta técnica se utiliza para la aplicación 'Caracterización del flóculo'.

- Hibridación *in situ* fluorescente. Con esta técnica es necesario tomar dos imágenes de cada campo, una imagen donde se emita fluorescencia sobre el total de bacterias (**Figura 2**) y otra donde se emita fluorescencia solo en las bacterias en estudio, de modo que se obtienen dos imágenes de cada campo con el fondo totalmente negro y estructuras fluorescentes correspondientes al objetivo a cuantificar. Esta técnica se utiliza para la aplicación 'Cuantificación de bacterias'.

- Tinción con LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability. Con esta técnica también es necesario tomar dos imágenes por campo, una imagen donde se emite fluorescencia en las células viables y no viables (**Figura 3**) y otra imagen donde se emite fluorescencia solamente en las células no viables. Esta técnica se utiliza para la aplicación 'Viabilidad celular'.

Con el objetivo de que los resultados sean lo más representativos posible, es necesario tomar imágenes de entre 20 y 40 campos diferentes de la muestra para cada una de las aplicaciones.

Figura 4. Porcentaje de píxeles saturados. Izquierda: imagen original; derecha: % píxeles saturados.



2.2. Técnicas utilizadas en análisis de imagen

2.2.1. Tratamiento previo de las imágenes

La persona responsable d preparar las muestras para el análisis de imagen procura establecer las mejores condiciones de trabajo. Sin embargo, frecuentemente se observa que las imágenes captadas presentan algunas deficiencias que dificultan el reconocimiento de los objetos en la imagen. Para evitar este inconveniente es necesario aplicar diferentes técnicas para que la imagen a cuantificar se encuentre en condiciones óptimas. Las técnicas que se han utilizado para mejorar las imágenes según la aplicación elegida en el software se señalan en la **Tabla 1**.

A continuación se muestra un ejemplo de las técnicas más relevantes utilizadas por el software:

- Porcentaje de píxeles saturados. Se trata de una técnica para ajustar el contraste de las imágenes que consiste en modificar el histograma de gris a partir de un porcentaje de píxeles saturados fijados por el operador. Esta técnica permite unificar criterios a la hora de binarizar las imágenes (**Figura 4**).

- Filtro erosión/dilatación. Esta técnica permite eliminar los pequeños microorganismos no asociados al flóculo en la aplicación 'Es-

Tabla 1. Técnicas de mejora de la imagen.

Caracterización del flóculo	Cuantificación de bacterias	Viabilidad celular
% píxeles saturados Filtro de erosión/dilatación	Deconvolución de imágenes Filtro de ruido	Separación por canales Deconvolución de imágenes Filtro de ruido

Figura 5. Filtro erosión/dilatación. Izquierda: imagen original; derecha: filtro erosión/dilatación.

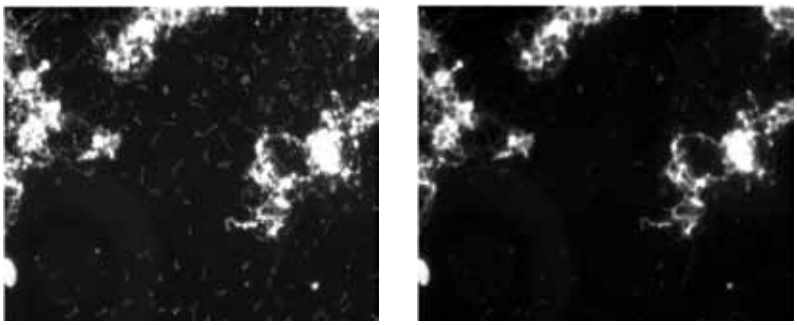
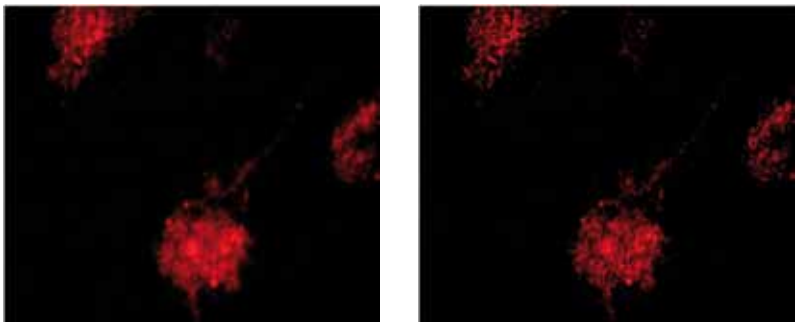


Figura 6. Deconvolución de imágenes de fluorescencia. Izquierda: imagen original; derecha: filtro deconvolución.



tado del flóculo', como espiroquetas que están presentes en las muestras y que, en caso de no eliminarse, darían un error por exceso en la cuantificación del flóculo (**Figura 5**).

- Deconvolución de imágenes de fluorescencia. Uno de los errores más comunes en imágenes de fluorescencia es la degradación de la imagen, produciendo un enmarañamiento de la imagen. Esta técnica proporciona una imagen más limpia y contrastada donde es posible distinguir un mayor número de detalles (**Figura 6**).

En la **Figura 7** se muestra un ejemplo completo del tratamiento de imágenes para la aplicación 'Viabilidad celular'.

2.2.2. Binarización de la imagen

Para poder cuantificar una área en una imagen, es necesario que exista una diferenciación clara entre los grupos de píxeles que conforman la imagen. Por ello, se tiende a convertir la imagen en blanco y negro, de forma que la señal positiva esté representada por los píxeles negros, y la negativa o *background* por los píxeles blancos. Binarizar una imagen consiste en pasarla a blanco y negro de forma que la información contenida en los píxeles constará únicamente de ceros y unos.

La binarización de las aplicaciones de 'Cuantificación de bacterias' y 'Viabilidad celular' se realiza directamente a las imágenes en escala de gris obtenidas como resultado en el

Figura 7. Técnicas de mejora de la imagen: viabilidad celular.

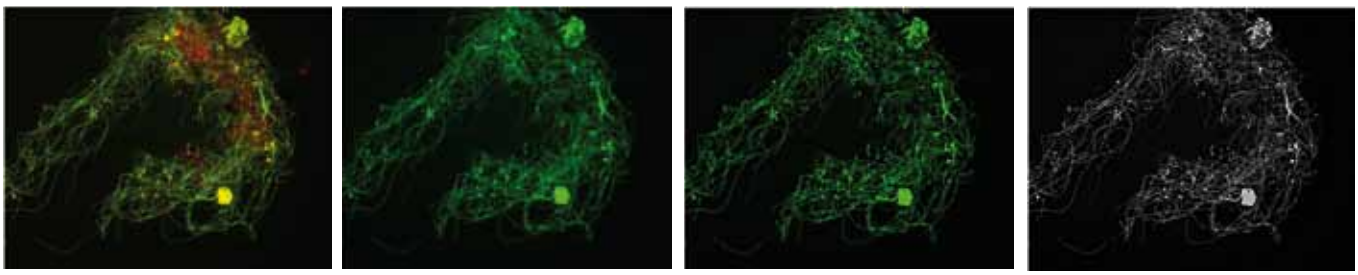


Imagen original viable/no viable. Separación por canales. Deconvolución viable. Escala de gris viable.

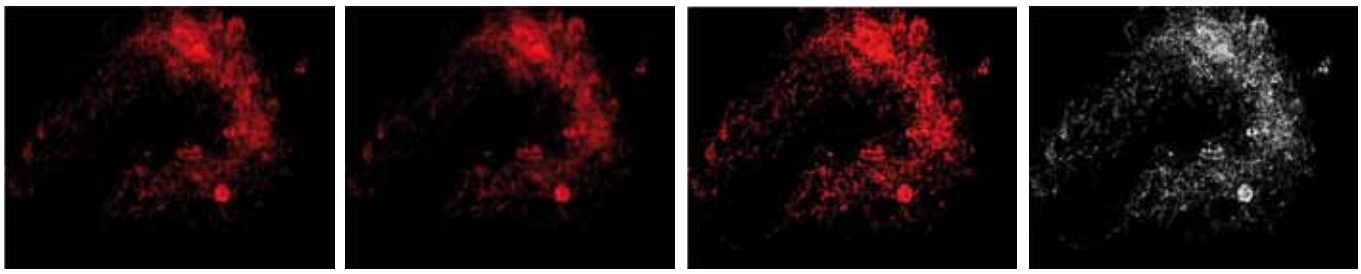


Imagen original no viable. Despeckle no viable. Deconvolución no viable. Escala de gris no viable.

Figura 8. Binarización 'Viabilidad celular'.

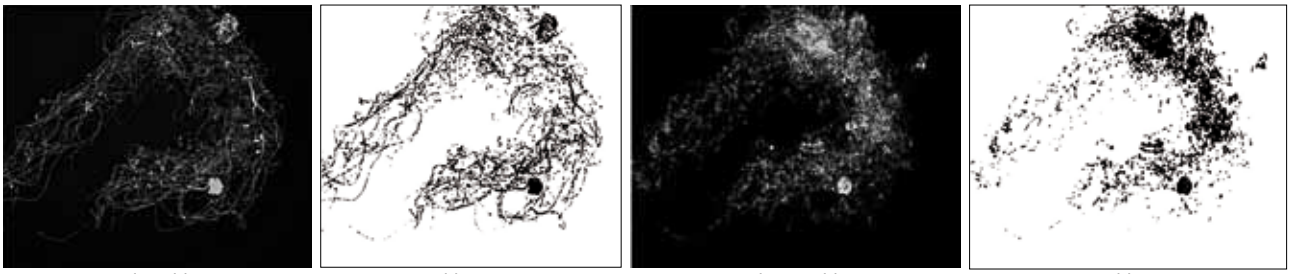


Imagen mejorada viable. Binarización viable. Imagen mejorada no viable. Binarización no viable.

Figura 9. Binarización 'Caracterización del flóculo'.

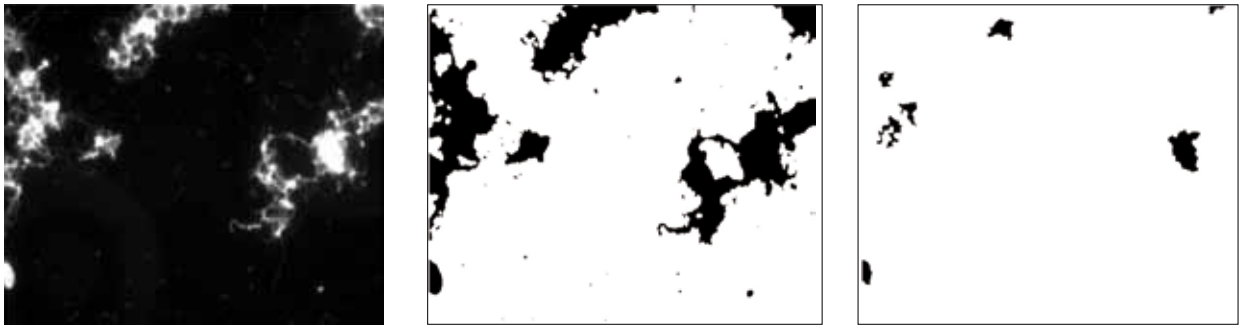


Imagen mejorada flóculo. Binarización flóculo. Binarización de los núcleos.

tratamiento previo de las imágenes. En la **Figura 8** se muestra un ejemplo de la binarización en la aplicación 'Viabilidad celular'.

En cambio, la aplicación 'Caracterización del flóculo' posee un tratamiento de la imagen algo más extenso y con diferentes tipos de binarización. Inicialmente se binariza la imagen tratada para obtener una cuantificación total del flóculo y posteriormente se binariza el núcleo del flóculo con otro método de segmentación. A esta segunda binarización se le aplica un filtro para que solamente muestre los núcleos que contengan como mínimo una cantidad de píxeles fijados, para evitar la cuantificación de núcleos en exceso (**Figura 9**).

2.3. Programación del software para su automatización

Partiendo de un software de libre distribución se ha llevado a cabo la automatización del tratamiento y binarización de múltiples imágenes. Para cada aplicación se ha desarrollado una macro que contiene, paso a paso, las técnicas del tratamiento

Figura 10. Ventanas del software 'Caracteristicas de la muestra'.

Figura 11. Ventanas del software ' Características de la toma de imagen'.

previo de la imagen, la binarización y la obtención de los resultados cuantitativos. Dicha macro genera: una primera ventana para identificar la muestra y seleccionar la aplicación (**Figura 10**); una segunda ventana para caracterizar la toma de imágenes (**Figura 11**); y, por último, una ventana para seleccionar donde se encuentran las imágenes a cuantificar y seleccionar una carpeta de destino donde guardar los resultados.

Cada tipo de cuantificación realiza el tratamiento previo y la binarización de todas las imágenes presentes en la carpeta seleccionada de forma totalmente automática, utilizando una serie de variables y bucles para el tratamiento de múltiples imágenes. Además, se ha programado el software para que se guarden las imágenes originales, las mejoradas y las binarizadas en la carpeta de resultados elegida previamente con el fin de validar los resultados.

Finalmente, se genera automáticamente una hoja de cálculo donde se muestran los resultados de cada una de las imágenes dentro de la misma carpeta de resultados.

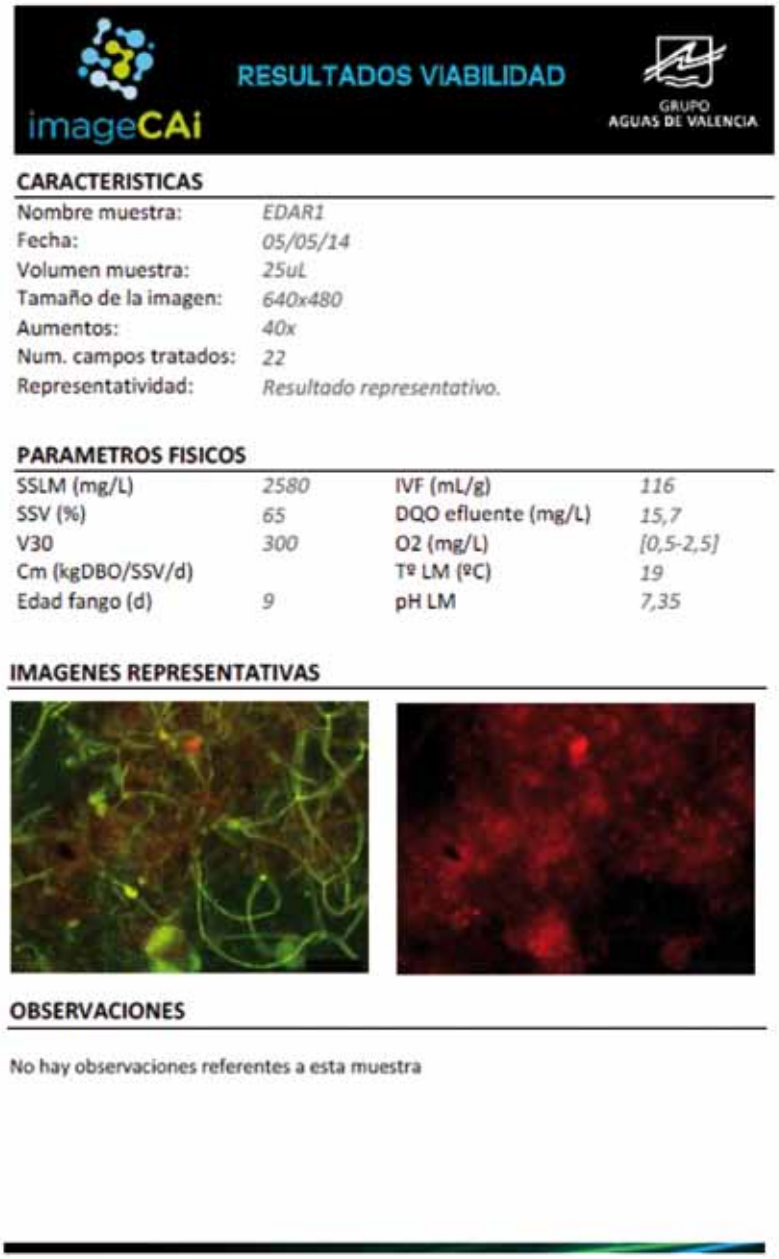
3. Presentación de resultados

Cada aplicación cuenta con una plantilla donde automáticamente se genera un informe final de la cuantificación realizada. Dicho informe contiene una parte en común para las tres aplicaciones, donde se muestran las características de la muestra, la toma de imágenes, la representatividad de la cuantificación, un par de imágenes representativas de la cuantificación y los parámetros físicos de la muestra (**Figura 12**).

Se ha tomado como criterio de representatividad un mínimo de toma de imágenes de 20 campos (Borrás, 2008). A los resultados obtenidos se les realiza un análisis estadístico de medias acumuladas, en el que se observa cómo en los últimos valores del análisis las medias acumuladas tienden a estabilizarse. Por ello se considerará que los resultados son representativos cuando la diferencia entre el máximo y el mínimo de las medias acumuladas de los 10 últimos resultados no sea mayor a 2,5.

Así mismo, ImageCAI presenta los resultados de manera diferente según la aplicación utilizada. En la **Figura 13** se muestra un ejemplo de los tres tipos de resultados que se pueden obtener con las aplicaciones 'Cuantificación de bacterias', 'Viabilidad celular' y 'Caracterización del flóculo', respectivamente.

Figura 12. Parte común del informe final.



imageCAi

RESULTADOS VIABILIDAD

GRUPO AGUAS DE VALENCIA

CARACTERISTICAS

Nombre muestra:	EDAR1
Fecha:	05/05/14
Volumen muestra:	25uL
Tamaño de la imagen:	640x480
Aumentos:	40x
Num. campos tratados:	22
Representatividad:	Resultado representativo.

PARAMETROS FISICOS

SSLM (mg/L)	2580	IVF (mL/g)	116
SSV (%)	65	DQO efluente (mg/L)	15,7
V30	300	O2 (mg/L)	[0,5-2,5]
Cm (kgDBO/SSV/d)		Tº LM (ºC)	19
Edad fango (d)	9	pH LM	7,35

IMAGENES REPRESENTATIVAS

OBSERVACIONES

No hay observaciones referentes a esta muestra

4. Resultados y conclusiones

Para validar el correcto funcionamiento de las aplicaciones automáticas, se realizó el procesado manual y automático de 5 muestras diferentes para comprobar que los resultados obtenidos no difieren en más de un 5% (Borrás, 2008).

La **Tabla 2** y la **Figura 14** muestran los resultados de la comparativa entre la cuantificación manual y automática para la aplicación 'Viabilidad celular'. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson como medida de la similitud entre los resultados obtenidos mediante los dos métodos (Selinummi *et al.*, 2005).

Tal y como muestran los resultados en todos los casos estudiados la diferencia entre la cuantificación manual y automática resultó menor al 5% y el coeficiente de correlación de Pearson cercano a 1.

Con todo lo anteriormente expuesto se puede concluir que la herramienta informática ImageCAI es capaz de cuantificar de forma automática diferentes aspectos microbiológicos del fango activo: las características del flóculo en cuanto al área que ocupa y su núcleo, distribución de tamaños, etc.; el porcentaje de determinadas poblaciones bacterianas respecto al total (nitrificantes, PAO, etc.) y el área ocupada por células viables y no viables. La cuantificación automática desarrollada permitirá reducir en gran medida el tiempo de trabajo y el error debido al técnico.

Asimismo, contar con esta herramienta en la explotación de EDAR permitirá:

- Unificar criterios a la hora de identificar una muestra microbiológica y tomar decisiones, ya que es posible establecer unos rangos cuantitativos asociados al estado normal y a estados críticos de forma que se facilite la comprensión causa/efecto y se puedan tomar medidas ante dichas situaciones.
- Monitorizar de forma precisa la evolución del fango cuando ha estado expuesto a diferentes condiciones operacionales, existe presencia de inhibidores del proceso o

Figura 13. Ejemplos de resultados de las tres aplicaciones.

RESULTADOS					
% Células viables	60	±	4	%	
% Células no viables	40	±	4	%	

RESULTADOS					
% Bacterias amonicxidantes	4	±	1	%	

RESULTADOS					
Flóculos	% Ocupación de flóculo	17	±	1	%
	Num flóculos promedio	15	±	1	%
	Distribución de tamaños				
	Pequeños	78	±	1,3	%
	Medianos	18	±	0,4	%
	Grandes	4	±	0,2	%
Núcleos	% Ocupación de núcleos	9	±	1	%
	Num núcleos promedio	16	±	2	
	Distribución de tamaños				
	Pequeños	89	±	1,5	%
	Medianos	9	±	0,5	%
	Grandes	2	±	0,2	%
	Relación núcleo/flóculo	0,46	±	0,05	

Tabla 2. Resultados de la comparativa entre la cuantificación manual y automática para la aplicación 'Viabilidad celular'.

Muestra	Automática	Manual	Coeficiente correlación Pearson	Diferencia (%)
1	68	69	0,99	1
2	65	67	0,99	2
3	47	51	1,00	4
4	60	62	0,98	2
5	74	75	0,99	1

Figura 14. Representación gráfica de la comparativa entre la cuantificación manual y automática de la viabilidad celular.

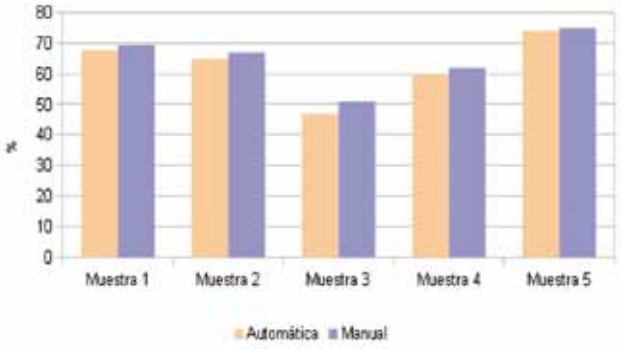
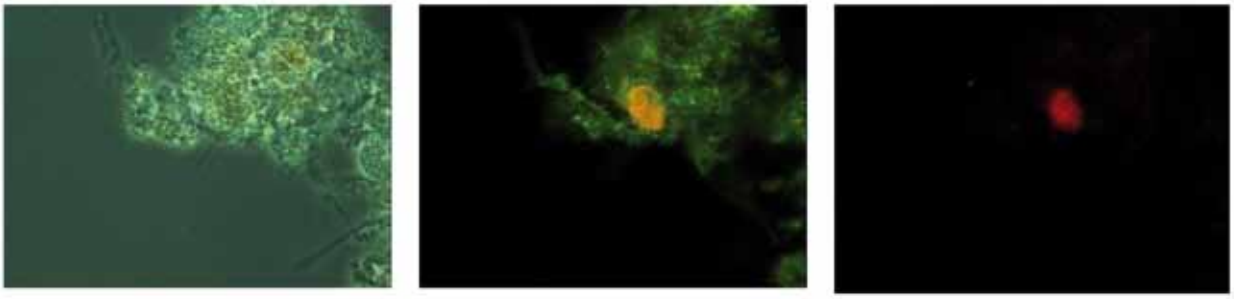


Figura 15. Viabilidad colector 1. Industria de la tenería.



Flóculo fango + colector nº 1 contraste de fases x400.

Flóculo fango + colector nº 1 filtro A fluorescencia x400.

Flóculo fango + colector nº 1 filtro 2.1 fluorescencia x400.

Tabla 3. Resultados de toxicidad en los colectores.

Muestra	Viables (%)	No viables (%)	Toxicidad
Blanco	68 ± 4	32 ± 4	-
Colector 1	45 ± 3	55 ± 3	Sí
Colector 2	68 ± 4	32 ± 4	No

se realiza la introducción de nuevos reactivos.

- Mejorar la simulación de las EDAR por medio de la cuantificación real e individualizada de las diferentes fracciones de bacterias presentes en el fango activo (XH, XNIT, XAM, XI) mediante la utilización de la técnica FISH y con ellas los coeficientes cinéticos a introducir en los simuladores.

5. Caso práctico: determinación de la toxicidad en colectores

En este caso práctico se utilizó ImageCAI para determinar la toxicidad en el fango activo de dos muestras de colectores a partir de la cuantificación de la viabilidad celular. Las muestras estudiadas procedían de los colectores de una tenería (colector nº 1) y una industria textil (colector nº 2). Se midió la viabilidad celular a una muestra de fango activo de referencia (blanco) y dos muestras endogenadas durante 10 horas con un inóculo del agua procedente de los colectores con volumen equivalente a los caudales de entrada de los mismos a la EDAR.

La **Figura 15** izquierda muestra flóculo del fango inoculado con el colector nº 1. La imagen del centro muestra el mismo flóculo donde se observan células viables (verde) y no viables (rojo). Como se muestra en la última imagen, en este caso las células no viables se presentan en acúmulos con morfología de bacterias nitrificantes.

Mediante este análisis se ha podido observar el grado de afección del fango por dichos vertidos industriales. Los resultados muestran cómo el colector nº 1, procedente de la industria de la tenería, disminuye la viabilidad celular del fango en un 13%. El contenido del colector nº 2, correspondiente a una industria textil, no presentó toxicidad (**Tabla 3**).

En este caso la utilización de ImageCAI para la cuantificación de la viabilidad celular ha permitido diagnosticar la toxicidad producida por el contenido de un colector industrial sobre el fango activo.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración al Consorcio de Aguas y Residuos de La Rioja.

Bibliografía

[1] Amaral, A.L.; Ferreira, E.C. (2005). Activated sludge monitoring of a wastewater treatment plant using image analysis and partial least squares regression. Analytica Chimica Acta, 544, págs. 246-253. Science Direct.

[2] Andreadakis, A. (1993). Physical and chemical properties of activated sludge floc. Water Res., núm. 27, págs. 1.707-1.714.

[3] Borrás, L. (2008). Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en sistemas EBPR. Tesis doctoral, Universidad Politecnica de Valencia.

[4] Borrás, L.; Alonso, J.L.; Eggöy, P.; Ferrer, J. (2004). Técnica de detección de polifosfatos intracelulares, y cuantificación mediante analisis de imagen. Tecnología del Agua, núm. 23, págs. 56-60.

[5] Daims, H.; Wagner, M. (2007). Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. Appl. Microbiol. Biotechnol., núm. 75, págs. 237-248

[6] Li, D.H.; Ganczarczyk, J.J. (1991). Size distribution of activated sludge flocs. Res. J. Water. Pollut. Control. Fed., núm. 63, págs. 806-814.

[7] Petrusa, J. (2003). Técnicas de analisis de imagen. Aplicaciones en biología. Universitat de Valencia.

[8] Sadalgekar, V.; Mahajan, B.; Shaligram, M. (1988). Evaluation of sludge settleability by floc characteristics. Water Pollut. Control Fed., núm. 60, págs. 1.862-1.863.

[9] Schmid, M.; Thill, A.; Purkhold, U.; Walcher, M.; Yves Bottero, J.; Ginestet, P.; Halkjaer Nielsen, P.; Wuertz, S.; Wagner, M. (2003). Characterization of activated sludge flocs by confocal laser scanning microscopy and image analysis. Water Research, núm. 37, págs. 2.043-2.052.

[10] Selinummi, J.; Seppala, J.; Yli-Harja, O.; Puhakka, J.A. (2005). Software for quantification of labeled bacteria from digital microscope images by automated image analysis. BioTechniques, núm. 39, págs. 859-863.