

# Raport

## Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării tridimensionale a biofilmelor mono- și polimicrobiene

efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a  
agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*

(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Colectiv de redacție:

Coordonatori: Prof. dr. Daniela Zaharie, Prof. dr. Gabriela Tănăsie

Membri:

Asist .univ. dr. Csilla Zambori – sect.2

Doctorand Kristian Miok – sect.3, sect.5

Prof. dr. Daniela Zaharie – sect.4, sect.5

Data finalizării: 15.11.2019

## 1. Introducere

Microscopul confocal cu scanare laser (CLSM) este un sistem electronic, alcătuit dintr-un microscop optic, un computer și un sistem laser folosit pentru procesarea imaginilor. Cu ajutorul microscopului cu scanare laser se pot obține imagini realizate pe secțiuni foarte subțiri, cu rezoluție foarte mare și de calitate înaltă prin îndepărtarea interferențelor care pot apărea între lumina provenită de la diferite câmpuri de emisie dealungul probei, focusarea realizându-se într-un singur plan (confocal) (Herraiz et.al. 2012).

Microscopul confocal cu scanare laser este considerat un sistem de imagistică digitală sau video care produce imagini electronice (Palmer et.al. 2006).

Microscopia confocală este o tehnică foarte populară și utilizată în ultimii ani, având aplicabilitate mare în multe domenii de interes actual dar și datorită obținerii unor imagini digitale de calitate superioară a diferitor specimene simplu, dublu sau triplu marcate fluorescent. Se utilizează culorile roșu, verde și albastru (metoda RGB) și astfel se obțin informații cu privire la afișarea distribuției a până la 3 probe fluorescente, efectul de deteriorare, viteza de scanare, focalizarea axială, strălucirea și dimensiunea orificiilor de tip pinhole. În comparație cu microscopul optic conventional, cel confocal permite controlul adâncimii de câmp, eliminarea perturbațiilor imaginii din lipsa de focalizare, precum și posibilitatea analizei din punct de vedere optic al unor secțiuni de eșantioane subțiri. În microscopia confocală se practică filtrarea spațială pentru a elimina lumina nefocalizată sau strălucirile în eșantioanele mai subțiri decât planul de focalizare.

Prepararea probei de studiat nu necesită tratamente speciale, iar informațiile care se pot obține de la elemente tisulare transparente care reflectă lumina sunt ușor de obținut. Metoda poate fi utilizată și în combinație cu alte tehnici clasice de fluorescență, precum în cazul detectării de celule nemarcate într-o populație de celule marcate fluorescent sau a evidențierii interacțiunilor între celulele de cultură pe substrat opac, marcate fluorescent, are de asemenea aplicație în biologia celulară, prin studiul imaginilor obținute de la molecule, celule vii și țesuturi.

În prezent, în microbiologie există numeroase metode de investigare experimentală a formării biofilmului. În funcție de modul în care biofilmele intră în contact cu mediul pentru creștere acestea pot fi: metode de studiu care folosesc sisteme de curgere în flux continuu a mediului de creștere la nivelul biomasei sau metode care au la bază difuzia simplă într-un sistem static (Palmer, R.J. Jr. 2010).

Cele mai cunoscute metode de formare a biofilmului sunt: metodele de creștere în plăci de microtitrare, sistemele cu cameră de flux, dispozitivul Robbins, sistemele PFR (reactorul cu bujie flow), reactorul pentru biofilme în centrele de control ale bolilor, alte modele cu curgere flux, sistemele microfluidice.

## Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor

Asocierea tehnicilor microbiologice, cu microscopia confocală cu scanare laser, este singurul mod în care se poate obține o reprezentare realistă a distribuției spațiale și a dinamicii biofilmului, prin determinarea rolului diferitelor specii microbiene ca și agenți microbieni coadezivi pe diferite suprafețe de adeziune. (Al- Ahmad et.al. 2007, Jung et.al. 2010, Tomas et.al., 2010).

## 2. Descrierea experimentelor și colectarea imaginilor

Testarea capacității de formare a biofilmelor monomicrobiene (*Staphylococcus spp.* și *E. coli*) și testarea capacității de formare a biofilmelor polimicrobiene (*Staphylococcus spp* + *E. coli*), s-a realizat prin metoda de creștere în plăci de microtitrare elaborată de Djordjevic și colab. identificându-se tulpinile bacteriene cu capacitatea cea mai mare de formare a biofilmului în urma determinării densității optice (DO) cu ajutorul spectrofotometrului, cuantificarea ratei de creștere (biofilme mono – polimicrobiene). Asocierea *Staphylococcus aureus* și *E.coli* s-a realizat din probe recoltate din aceeași sursă biologică, respectiv din secreție plagă și lichid cefalorahidian. S-a observat că atât tulpinile din genul *Staphylococcus* cât și *E. coli*, au capacitatea de a forma biofilme cu diferențe intraspecifice pentru anumite specii din cadrul celor două genuri ceea ce relevă rezistența anumitor specii bacteriene crescute în condiții optime pentru dezvoltarea proceselor patologice (vezi raportul 2.3.1).

Vizualizarea biofilmului s-a realizat cu ajutorul microscopului confocal Zeiss LSM 700 care este prevăzut cu sursă externă UV pentru fluorescență, și sursa de excitare laser pentru microscopia confocală. Inițial, probele au fost vizualizate în epifluorescență după care au fost supuse examinării prin microscopie confocală.

Procedeu utilizat pentru creșterea mono- și duo - biofilmelor pentru vizualizarea la microscopul confocal este asemănător cu cel descris în raportul 2.3.3. După creșterea biofilmelor, godeurile au fost spălate cu 150 mM NaCl și reumplute cu TSB și Film Tracer LIVE/DEAD biofilm viability dyes (ThermoFisher), diluție preparată din soluția stoc conform protocolului de lucru. Kitul Film Tracer LIVE/DEAD biofilm viability conține un marker specific pentru celule vii care emite în verde fluorescent (SYTO 9) (480/500nm) și iodura de propidium (490/635nm) care emite în roșu și pătrunde prin membrana afectată a celulelor analizate, marcând ADN-ul celular. Placa a fost apoi incubată la întuneric la 30° C pentru 20 min pentru marcarea fluorescență a bacteriilor.

Pentru analiză placa de microtitrare a fost montată la nivelul suportului pentru plăci al microscopului confocal și examinată cu ajutorul obiectivelor de 10x și 40x. Ulterior fluorescența emisă a fost captată la 500 nm pentru a vizualiza fluorescența fluorocromului SYTO9 și 636 nm pentru iodura de propidium. Viteza de scanare a fost de 400 Hz cu frecvența de 1024x1024 pixeli pentru fiecare câmp în parte. Scanarea s-a realizat pe trei direcții (x, y și z), numărul pașilor fiind variabil în funcție de grosimea biofilmului.

## 3. Metode și măsuri utilizate în cuantificarea biofilmelor tridimensionale

### 3.1. Pre-procesarea stivei de imagini

Imaginile de biofilme înregistrate folosind microscopia laser confocală sunt reprezentate ca o stivă de imagini bidimensionale, fiecare imagine bidimensională reprezentând un nivel din stivă. Pentru a facilita cuantificarea caracteristicilor biofilmului, stiva de imagini trebuie în prealabil procesată. În continuare sunt descrise pe scurt principalele tipuri de pre-procesări aplicate stivei de imagini.

*Aliniere.* Pentru a putea fi extrase informații din stiva de imagini acestea trebuie să fie aliniată, astfel încât proiecția pe nivelul de bază (cel care reprezintă sub-stratul) a unei regiuni din fiecare dintre nivele următoare să corespundă aceleiași arii din substrat. Dacă imaginile din stivă nu sunt aliniată, atunci acest lucru trebuie făcut în prealabil folosind metode de aliniere a imaginilor (image registration).

*Segmentare (orizontală).* Această etapă are ca scop transformarea fiecărei imagini din stivă într-o imagine binară care conține doar valorile 0 și 1. Un pixel care are valoarea 1 corespunde unei regiuni în care există biomasă iar un pixel care are valoarea 0 corespunde unei regiuni care nu conține biomasă. Dimensiunea regiunii asociate unui pixel din imagine depinde de rezoluția la care este înregistrată imaginea. În imaginile prelucrate în cadrul proiectului dimensiunea regiunii aferente unui pixel este de  $1.07 \times 1.07 \mu\text{m}$ . Imaginile prelucrate sunt reprezentate pe nivele de gri, în sensul căa fiecare pixel are asociată o valoare întreagă cuprinsă între 0 și 255, cu valorile extreme asociate astfel: 0 pentru negru și 255 pentru alb.

Segmentarea se realizează folosind *algoritmi de binarizare*. Cel mai simplu algoritm de binarizare este cel care folosește un prag constant: oricărui pixel din imaginea inițială care are valoare mai mare decât pragul  $i$  se asociază valoarea 1 și oricărui pixel care are valoarea mai mică decât pragul  $i$  se asociază valoarea 0. Întrucât condițiile de iluminare pot varia, este dificil de identificat un prag adecvat pentru orice imagine. Din acest motiv au fost dezvoltate metode de segmentare binară bazate pe valori adaptive ale pragului, cum este metoda Otsu ([Sezgin and Sankur, 2004](#)) folosită în pachetul software ComStat. Metoda Otsu se bazează pe ideea de a minimiza intra-varianța (varianța corespunzătoare valorilor pixelilor care sunt incluși în aceeași clasă) și de a maximiza inter-varianța (varianța corespunzătoare valorilor pixelilor care sunt incluși în clase diferite).

*Filtrare (verticală).* Una dintre problemele microscopiei confocale este faptul că se pot înregistra imagini de calitate bună doar până la o anumită adâncime care depinde de diferiți factori (densitatea biofilmului, intensitatea radiației laser, sensibilitatea fotomultiplicatorilor, apertura obiectivului etc) ([Heyborn et al., 2000](#)). Din acest motiv, pe lângă segmentarea fiecărei imagini din stivă (procesare pe orizontală) este necesară și o filtrare pe verticală al cărui scop este excluderea pixelilor de biomasă care nu sunt conectați la substrat. Metoda (denumită *connected-volume filtering* în ComStat) se bazează

Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor

pe următoarea idee: se pornește de la pixeli de biomasă (cu valoarea 1) de la nivelul corespunzător substratului și pixelii cu valoarea 1 care nu sunt conectați (învecinați) cu pixeli de biomasă de pe nivelul anterior sunt setați pe 0. Ideea tehnicii de filtrare implementată în Comstat este ilustrată în imaginea de mai jos.

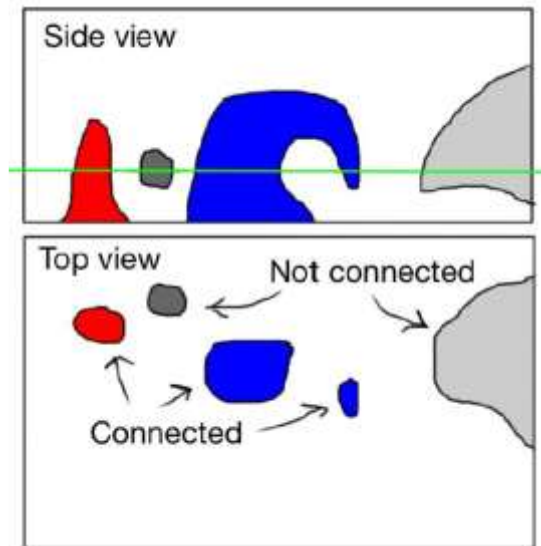


Fig. 1. Ideea metodei connected-volume filtering (Comstat 2.1, 2015)

*Indreptare (smacking).* In cazul în care substratul este deplasat și nu este captat în întregime în primul nivel, stiva de imagini nu va reflecta corect structura biomasei și este necesară o „îndreptare” a imaginii așa cum este ilustrat în imaginea de mai jos (Comstat 2.1 Manual, 2015). Funcția implementată în Comstat 2.1. determină pentru fiecare pixel din imaginea asociată substratului valoarea cea mai mare de pe poziția corespunzătoare în imaginile aferente celorlalte nivele și o plasează pe în pixelul respectiv. Transformarea se aplică înainte de etapa de segmentare și afectează doar nivelul corespunzător substratului.

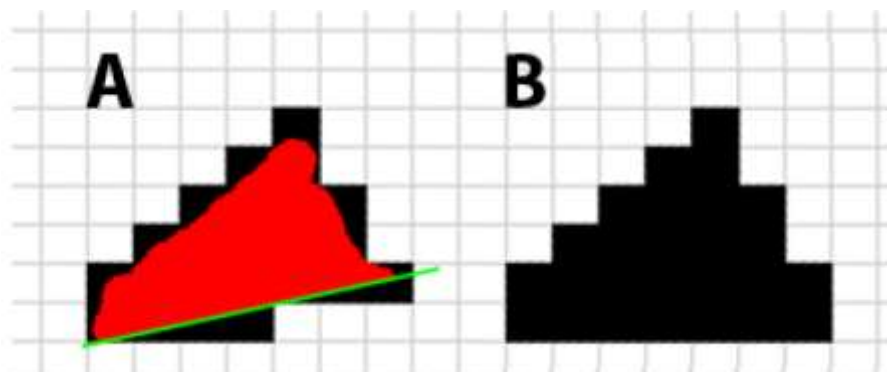


Fig. 2. Ideea tehnicii de smacking (A. Înainte de smacking, B. După smacking; roșu – biomasă, verde – substrat, negru – pixeli corespunzători diferitelor nivele din imagine) (Comstat 2.1, 2015)

### 3.2. Biovolum

Biovolumul (bio-volume) este definit ca numărul de pixeli de biomasă conținuți în toate imaginile din stiva de imagini înmulțit cu volumul unui voxel (dimensiune pixel (Ox) x dimensiune pixel (Oy) x dimensiune pixel (Oz)) și împărțit la aria substratului din stiva de imagini. Valoarea asociată biovolumului este exprimată în ( $\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ ). Biovolumul exprimă volumul total dintr-un biofilm și furnizează o estimare a biomasei din biofilm. Pe lângă biovolum se poate calcula și *aria ocupată de bacterie în fiecare nivel* care reprezintă fracțiunea din aria fiecărui nivel ocupată de biomasă. Acoperirea substratului (*substratum coverage*) este aria acoperită din prima imagine a stivei și reflectă cât de eficient este colonizat substratul de către bacteria din populație.

### 3.3. Distribuția grosimii și grosimea medie

Grosimea (thickness) este definită ca o funcție care asociază fiecărui pixel (x,y) din nivelul de bază (prima imagine din stivă) care corespunde biomasei (valoarea pixelului este 1) un număr care corespunde celui mai înalt pixel ce are valoarea 1 (corespunde unei zone cu biomasă) pe verticala ridicată în pixelul de coordonate (x,y), ignorând eventualii pori/ eventualele goluri din biomasă. Valoarea grosimii este exprimată în  $\mu\text{m}$ . Intrucât pentru fiecare pixel al nivelului de bază este asociată o valoare, în cazul unui biofilm având secțiuni de  $1024 \times 1024$  pixeli, se calculează  $1024 \times 1024$  de valori pe baza cărora se poate determina distribuția grosimii, valoarea medie a grosimii precum și alți indicatori statistici. Valoarea medie a grosimii (*mean biofilm thickness*) furnizează informații privind dimensiunea spațială a biofilmului.

### 3.4. Coeficientul de rugozitate

Coeficientul de rugozitate (roughness coefficient) este o mărime adimensională calculată pornind de la distribuția grosimii folosind relația:

$$R = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|G_i - \bar{G}|}{\bar{G}}$$

În relația de mai sus, N reprezintă numărul de pixeli (dintr-o imagine a stivei),  $G_i$  reprezintă grosimea corespunzătoare pixelului i, iar  $\bar{G}$  reprezintă valoarea medie a grosimii. Rugozitatea furnizează informații privind variabilitatea grosimii în stiva de imagini, fiind un indicator al heterogeneității biofilmului. O altă măsură a variabilității este dimensiunea fractală

### 3.5. Analiza micro-coloniilor

Microcoloniile se identifică în substrat (prima imagine din stivă) ca regiuni separate de pixeli corespunzători biomasei folosind algoritmi de etichetare a componentelor conectate.

## Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor

Există diferiți algoritmi pentru realizarea etichetării, marea majoritate bazându-se pe principiul identificării componentelor conexe în grafuri utilizând în contextul imaginilor binare vecinătăți de tip Moore (4-connected component labelling) sau de tip Neumann (8-connected component labelling) (cap. 3 în [\(Shapiro and Stockman, 2002\)](#)). După identificarea și etichetarea tuturor regiunilor, se aplică o etapă de filtrare în urma căreia se rețin doar regiunile a căror arie depășește o valoare prag (stabilită de către utilizator). Fiecare dintre regiunile selectate reprezintă o micro-colonie iar măsurile ce rezultă din analiză sunt de regulă: (i) numărul micro-coloniilor; (ii) aria fiecărei microcolonii; (iii) aria medie a micro-coloniilor. Numărul și aria micro-coloniilor din substrat furnizează informații utile în ceea ce privește comunitatea din biofilm.

Pe lângă arie, se poate estima și volumul unei microcolonii: se pornește de la pixelii unei microcolonii din substrat și se contorizează toți pixelii conectați ce aparțin biomasei în imaginile următoare din stiva de imagini. Analiza distribuției volumelor micro-coloniilor este utilă în a stabili cum variază micro-coloniile la schimbarea condițiilor de mediu și în a stabili dacă există un volum optim pentru o micro-colonie (la atingerea acestui volum creșterea coloniei încetează).

### 3.6. Analiza distanțelor de difuzie

Distanța de difuzie (diffusion distance) asociată unui pixel ce conține biomasă (pixel cu valoarea 1) este cea mai scurtă distanță (în graful definit pe baza vecinătăților din imagine) de la acel pixel la un pixel ce nu conține biomasă (pixel cu valoarea 0). Media și maximul distanțelor de difuzie corespunzătoare unei imagini furnizează informații privind distanțele care trebuie străbătute de către nutrienți și alte componente ale substratului pentru a ajunge la microcolonii. Distanța de difuzie poate fi calculată atât la nivelul unei imagini (cazul bidimensional - cum a fost descris mai sus) sau la nivelul unei stive de imagini (cazul tridimensional) ([Heydorn et al., 2000](#)).

### 3.7. Raportul suprafață/volum

Pentru a calcula raportul suprafață/volum (surface to volume ratio) trebuie estimată suprafața unui biofilm. Aceasta este definită ca fiind numărul de pixeli ce conțin biomasă care au cel puțin un vecin care nu conține biomasă. În acest context, marginile din jurul stivei de imagini sunt considerate ca fiind cu biomasă cu excepția marginii de sus care este considerată background. Doar suprafețele care sunt expuse la flux de nutrienți sunt incluse în calculul suprafeței. În calculul propriu-zis al suprafeței fiecare pixel este de fapt considerat a fi un voxel cu volumul dimensiune pixel ( $O_x$ ) x dimensiune pixel ( $O_y$ ) x dimensiune pixel ( $O_z$ ), iar suprafața este suma ariilor voxelilor de pe frontieră (care sunt învecinați cu voxelii ce aparțin backgroundului).

Raportul suprafață/volum este calculat împărțind suprafața estimată în modul descris mai sus prin bio-volum (descriș în sect. 3.2.). Acest raport reflectă fracțiunea din biofilm care este expusă la fluxul de nutrienți și indică modul în care biofilmul se adaptează la mediu. O

## Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor

valoarea mare a raportului poate indica existența unei concentrații scăzute de nutrienți: suprafața de contact a crescut pentru a facilita accesul la o cantitate mai mare de nutrienți.

### 4. Instrumente software utilizate în cuantificarea biofilmelor

#### 4.1. Motivație

Parametrii care descriu structura biofilmului microbial se împart în două categorii: prima categorie este aceea a parametrilor care se referă la caracteristicile bidimensionale (2D), iar cea de-a doua categorie este cea a parametrilor care se referă la caracteristicile tridimensionale (3D) ale biofilmului microbial. Prima categorie cuprinde: aria, suprafața de acoperire, porozitatea, distanța de difuziune și entropia texturală. Din a doua categorie fac parte: biovolumul, raportul volum-suprafață, dimensiunea fractală, dispersia spațială, aranjarea spațială, grosimea medie și maximă, coeficientul de rugozitate și identificarea și distribuția spațială a microcoloniilor pe substrat.

Imaginile obținute prin microscopia în fluorescență și microscopia confocală sunt digitalizate, fapt ce stă la baza unor programe software. Imaginile 2D sunt formate din puncte (pixeli) iar cele 3D din voxelii, ceea ce permite analiza imaginilor și transformarea intensității fiecărui pixel sau voxel într-o valoare matematică. În experimentele efectuate vizualizarea și interpretarea parametrilor imaginii s-a realizat cu ajutorul programului Comstat 2.1.

#### 4.2. COMSTAT. Descriere generală și mod de utilizare

##### 4.2.1. Descriere generală

ComStat ( [www.comstat.dk](http://www.comstat.dk) ) este un pachet software dezvoltat în 2000 (Heyborn et al, 2000) care permite cuantificarea caracteristicilor biofilmelor fiind util în determinarea diferențelor între caracteristicile morfologice ale acestora. Este utilizat în principal pentru analiza stivelor de imagini înregistrate folosind microscopia laser confocală (SCLM - confocal laser scanning microscopy).

Comstat a fost inițial implementat ca pachet pentru *MatLab* (<https://www.mathworks.com>), prin urmare necesită instalarea în prealabil a acestui pachet software. Matlab este un pachet software comercial pentru analiza datelor și simulare, folosit în special în domeniul ingineriei și pentru care au fost dezvoltate numeroase pachete, inclusiv în domeniul prelucrării imaginilor.

Versiunea curentă a ComStat este 2.1 (Vorregaard, 2008) și este implementată ca plugin pentru *ImageJ*, care este un software open-source implementat în Java având ca scop prelucrarea imaginilor și având utilitate în diferite domenii științifice. ImageJ este o platformă extensibilă care oferă o suită bogată de funcții pentru vizualizarea și prelucrarea imaginilor: îmbunătățirea calității imaginii (eliminarea zgomot, accentuare contrast), identificarea entităților în imagini (determinare muchii/contururi, segmentare), transformarea imaginilor etc.

## Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor

Comstat2 a fost proiectat să suport imagini obținute folosind microscopie confocală Leica și Zeiss (formatele TCD4D, LIF și LSM).

### 4.2.2. Instalare și mod de utilizare

*Instalare.* Pentru instalarea pachetului ComStat 2.1 se parcurg pașii:

1. Conectare la pagina web a pachetului: <http://www.comstat.dk/>
2. Inregistrare ca utilizator (click pe link [sign up page](#) și completare informații solicitate)
3. Descărcarea locală a arhivei (de exemplu Comstat64 pentru Windows OS pe 64 biți)
4. Dezarhivare – se va crea automat folder-ul Comstat 2.1

*Utilizare.* Pentru utilizare se parcurg pașii:

1. Se lansează Comstat: dublu click pe ImageJ (din folder-ul în care a fost instalat) și click pe Comstat2 de la Plugins.

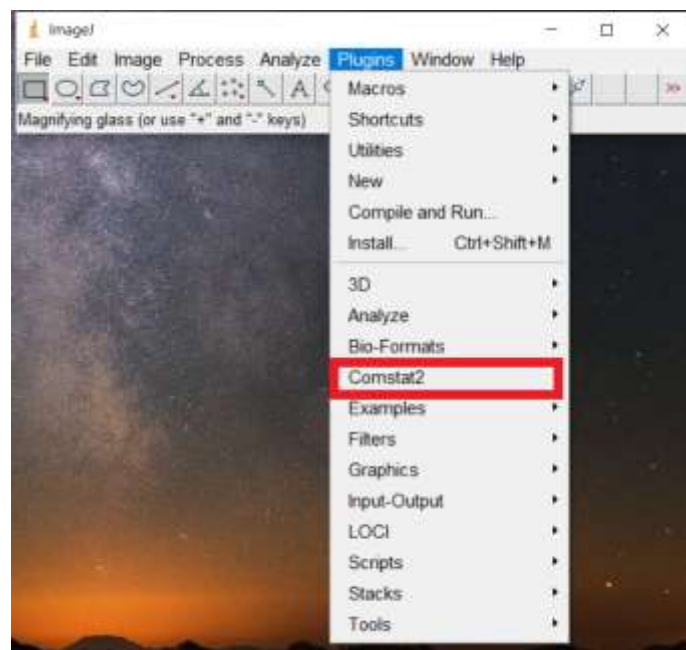


Fig. 3. Lansare în execuție Comstat2 din ImageJ

Ca efect al acestei acțiuni vor apărea 3 ferestre noi (Figura 4):

- *Comstat 2.1* – care conține lista de măsuri ce pot fi estimate pentru una sau mai multe stive de imagini
- *Observed Directories* – unde vor fi afișate directorul (folder-ul) sau directoarele unde se află fișierele de procesat
- *Log* – unde vor fi afișate statusul și rezultatele prelucrărilor

## Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor

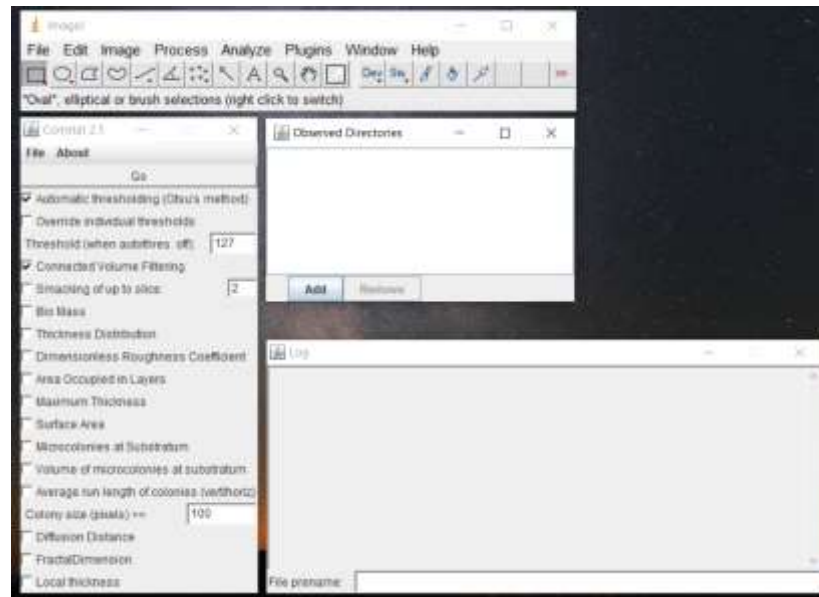


Fig. 4. Ferestrele deschise la lansare Comstat

2. Se adaugă directoarele de lucru prin click pe Add din fereastra Observed Directories, efectul acestei acțiuni fiind crearea ferestrei Images in Directories în care apare lista cu fișierele conținute în directoarele adăugate.

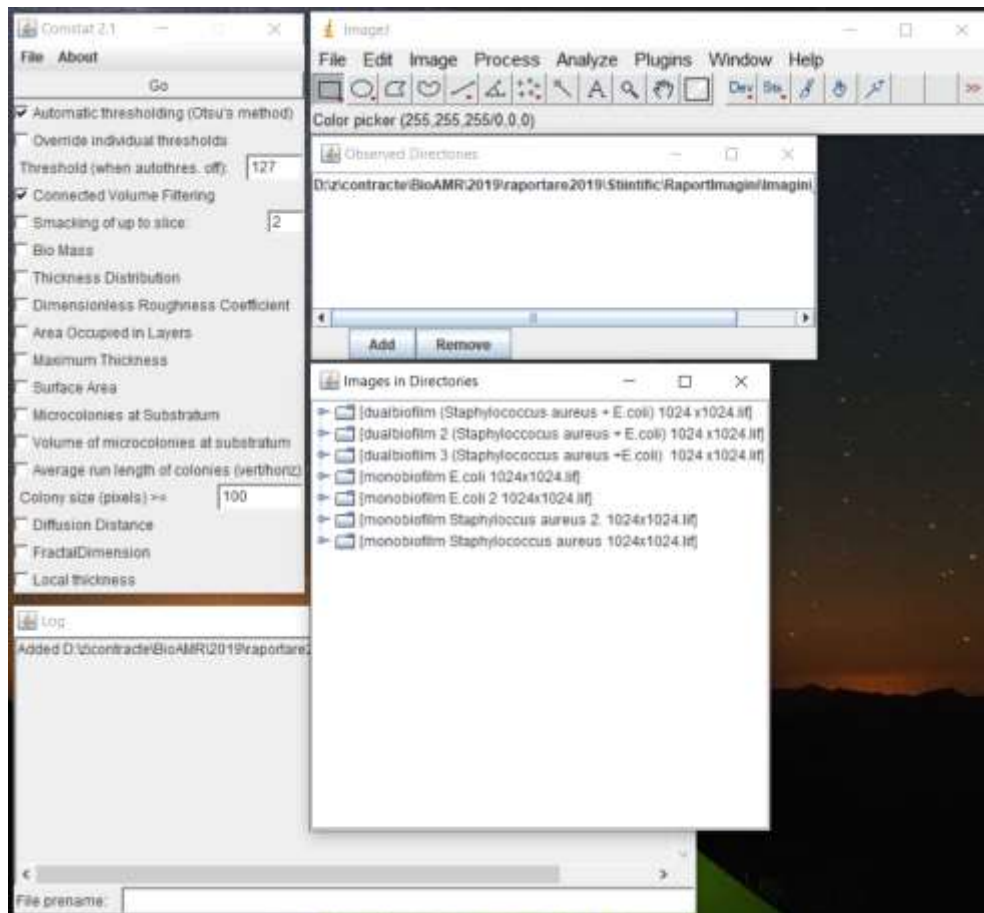


Fig. 5. Adăugarea directorului/directoarelor de lucru și vizualizarea listei de fișiere cu imagini

## Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor

- Se selectează fișierele care vor fi procesate prin click pe icoana-cheie din dreptul fiecărui fișier listat în fereastra Images in Directories. De exemplu este selectat pentru procesare fișierul corespunzător canalului 1 din fișierul Dual Biofilm 3 (Staphylococcus aureus + E. Coli) – series 001.

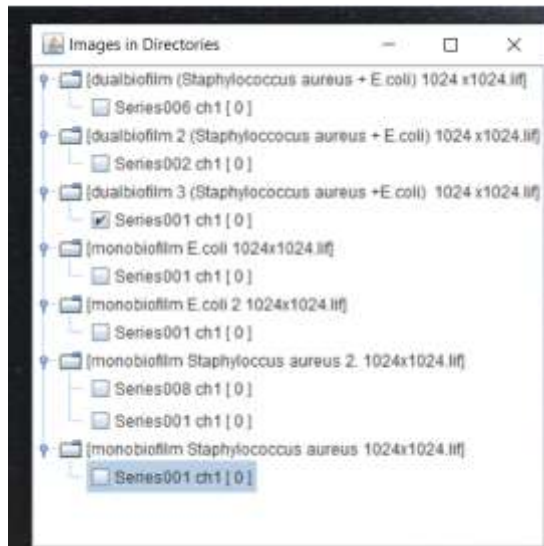


Fig. 6. Selectarea imaginii/imaginilor de prelucrat

- Se bifează în lista de prelucrări din fereastra Comstat2 toate prelucrările care se doresc a fi efectuate și se dă click pe Go. In imaginea de mai jos sunt selectate următoarele prelucrări:
  - Automatic thresholding* (Otsu method) – specifică metoda folosită în etapa de segmentare a imaginilor corespunzătoare nivelelor - este implicit selectată
  - Connected Volume Filtering* – specifică metoda utilizată pentru filtrarea pe verticală - este implicit selectată
  - BioMass, Thickness Distribution, Dimensionless Roughness Coefficient*

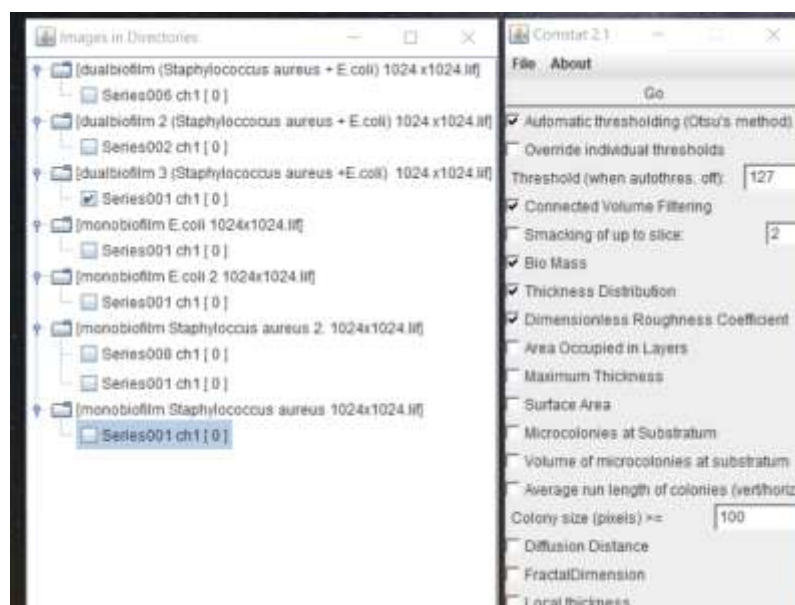


Fig. 7. Selecția tipurilor de pre-procesare a imaginilor și a mărimilor de calculat

## Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor

După efectuarea prelucrărilor rezultatele vor fi afișate în fereastra Log (la finalul prelucrărilor apare: Done with selected images) și în fișiere text salvate în directorul de lucru (cel în care se află fișierul prelucrat). Rezultatele sunt afișate într-un format compatibil cu Excel astfel că pot fi preluate în Excel prin Copy&Paste.

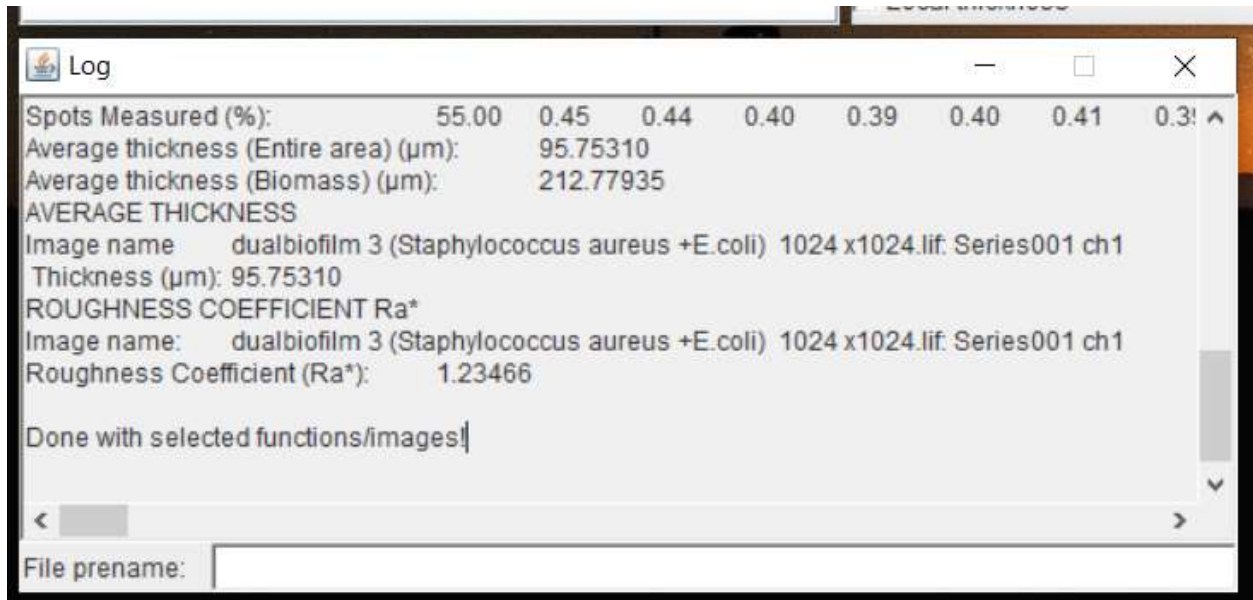


Fig. 8. Exemplu de conținut al ferestrei Log după efectuarea prelucrărilor specificate

Fluxul de prelucrări poate fi sumarizat după cum urmează:

1. Selectarea și încărcarea stivei de imagini
2. Selectarea/deselectarea individuală a fișierelor de prelucrat
3. Selectarea metodelor și a parametrilor folosiți la preprocesare (segmentare și filtrare)
4. Selectarea mărimilor de investigat
5. Vizualizarea și analiza rezultatelor

Observație. Pentru ca rezultatele prelucrărilor să fie corecte este necesar ca substratul să fie în unul din primele două nivele ale stivei de imagini.

### 4.3. Alte instrumente software

Comstat este cel mai popular instrument software pentru analiza imaginilor de biofilme, însă are o serie de limite, printre care faptul că nu permite efectuarea directă a analizei statistice a mărimilor estimate. În ultimii ani au fost dezvoltate și alte instrumente cum ar fi: Daime (Daims et al., 2006), PHLIP (Mueller et al, 2006) și BiofilmQ (Hartmann et.al, 2019).

#### 4.3.1. Daime (Digital Image Analysis In Microbial Ecology)

Daime se particularizează prin faptul că integrează analiza imaginilor bi și tri-dimensionale și permite cuantificarea tiparelor de localizare spațială a microorganismelor în biofilme. Este un program de sine-stătător (nu se bazează pe Matlab sau ImageJ), este gratuit pentru domeniul academic și poate fi descărcat de la <http://www.microbial-ecology.net/daime>. Există varianta atât pentru Windows cât și pentru Unix. Este implementat în C++ și necesită câteva biblioteci specifice pentru a rula (Qt, Tiff, OpenGL). Conține module pentru

## Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor

segmentarea imaginilor (atât pe nivele de gri cât și color) precum și module pentru cuantificarea proprietăților obiectelor din imagini (estimare dimensiuni, suprafață, volum, luminozitate etc). Permite cuantificarea fracțiunii de biovolum a unei populații relativ la biovolumul corespunzător tuturor microbilor din biofilm). *daime* implementează o suită de algoritmi care cuantifică aranjarea spațială a populațiilor de microbi (care au fost în prealabil etichetați folosind markeri fluorescenți). Acești algoritmi pot fi aplicați atât pe imagini bidimensionale segmentate cât și pentru stive de imagini.

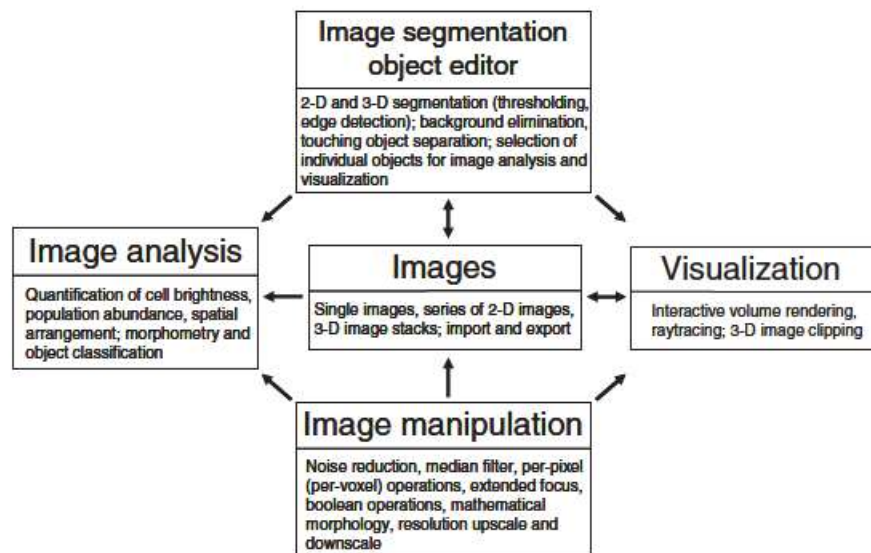


Fig. 9. Tipuri și module de prelucrare în Daime (Daims et al., 2006)

### 4.3.2. **PHLIP** (*PHobia Laser scanning microscopy Imaging Processor*)

Este o aplicație bazată pe Matlab (pachet Matlab care necesită Matlab însă nu se bazează pe instalarea altor pachete) care a fost implementată în 2006 (în cadrul proiectului FP5 - PHOBIA - Phototrophic Biofilms and Its potential Applications) și poate fi descărcată de la <https://sourceforge.net/projects/phlip/>. Ultima actualizare a pachetului a fost realizată în 2013. PHLIP oferă suport pentru preluare imaginilor de la două modele de microscopie Leica (Leica TCS-NT and Leica TCS4D). Pentru partea de segmentare PHLIP oferă atât varianta de setare manuală a pragului cât și o variantă de determinare automată bazată pe o extindere a algoritmului Otsu pentru stive de imagini. La fel ca în Comstat, este posibil să se realizeze eliminarea entităților flotante (care nu au conectivitate cu substratul).

Pentru analiza morfologiei biofilmelor, PHLIP permite estimarea următoarelor mărimi: (1) *biovolumul*, (2) *acoperirea* (raportul dintre aria acoperită cu biomasă și aria totală a fiecărui nivel), (3) *raportul arie pe volum*, (4) *împrăștierea spațială* (varianțele coordonatelor pixelilor de biomasă – separat pentru fiecare dintre cele trei axe de coordonate), (5) *grosimea medie și rugozitatea* (măsoară variabilitatea grosimii), (6) *dimensiunea fractală* (măsoară rugozitatea frontierei biomasei pentru un nivel), (7) *co-localizarea în 3D* (procentul de bio-volum care se suprapun și provin din două canale), (8) *co-localizarea în 2D* (procentul de pixeli cu biomasă care se suprapun și provin din două canale – se determină pe nivelele din stiva de imagini).

## Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor

Principalul avantaj al lui PHLIP în raport cu Comstat este faptul că PHLIP poate opera cu mai multe canale simultan permițând analiza dinamicii spațiale și temporale. Dezavantajul principal este faptul ca PHLIP pare să nu mai fie întreținut.

### 4.3.3. BiofilmQ

Este cel mai recent (Hartmann et al, 2019) și mai sofisticat instrument software dedicat analizei vizuale și statistice a imaginilor de biofilme. Poate fi descărcat de la <https://drescherlab.org/data/biofilmQ/> atât ca arhivă \*.zip (caz în care e necesar să existe Matlab – versiunea MATLAB R2017b sau mai nouă - pe calculatorul unde se instalează BiofilmQ cât și ca pachet executabil (caz în care se va instala doar Matlab Runtime ceea ce nu necesită existența unei licențe de Matlab). Principiul discretizării imaginilor tridimensionale și fluxul tipic de prelucrări sunt descrise în (Hartmann et al, 2019) și ilustrate în următoarele imagini.

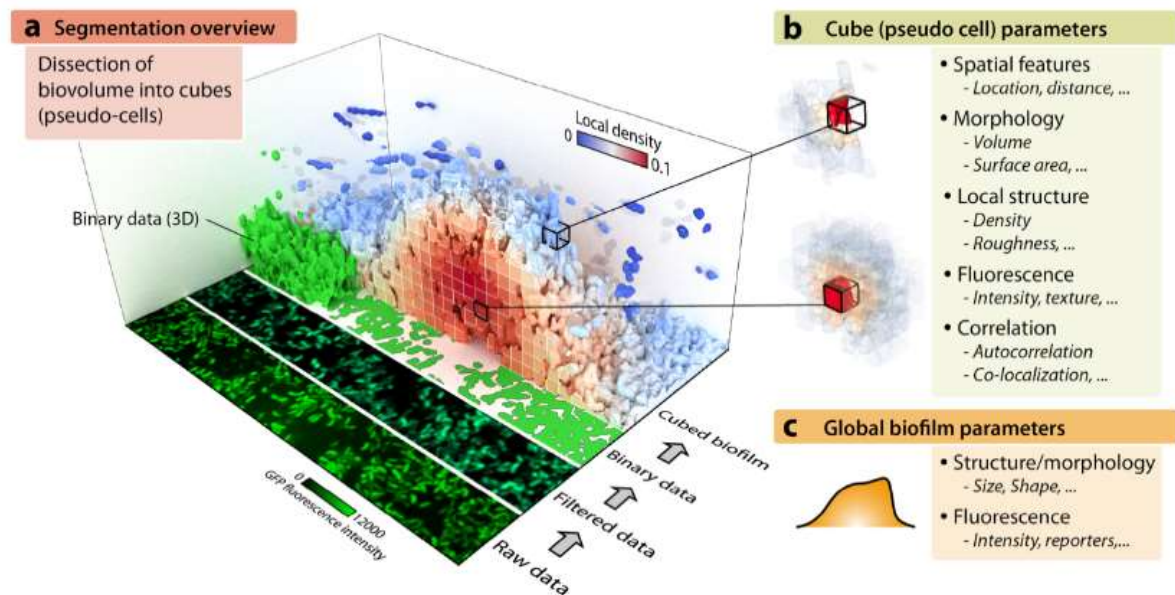


Fig. 10. Principiul discretizării imaginii 3D în pseudo-celule (Hartman et al, 2019): imaginile din stiva de imagini sunt preprocesate (filtrate și segmentate) pentru a se obține o structură 3D de imagini binare; această structură este partiționată în pseudo-celule (cuburi sau voxelii) cu dimensiuni definite de către utilizator; fiecărei pseudo-celule i se atașează caracteristici spațiale (locație), morfologice (volum biomasă), de structură (rugozitate), de fluorescență (intensitate, textură); pornind de la caracteristicile pseudo-celulelor se estimează parametrii globali ai biofilmului.

Pachetul BiofilmQ se instalează ușor parcurgând etapele descrise la <https://drescherlab.org/data/biofilmQ/docs/usage/installation.html>. Pachetul este bine documentat însă interfața este semnificativ mai complexă decât cea a pachetului Comstat.

## Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor

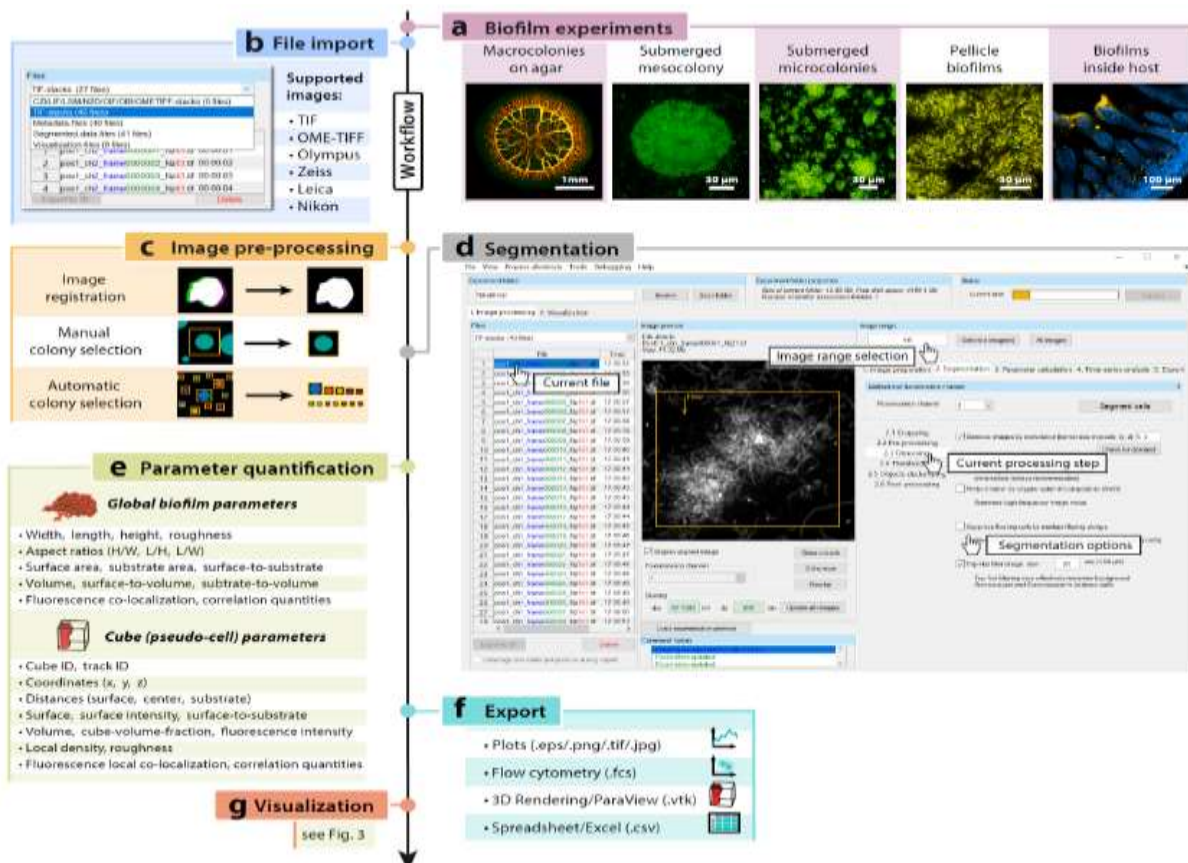


Fig. 11. Fluxul de prelucrări în BiofilmQ: (a) efectuarea experimentelor; (b) importul datelor în BiofilmQ; (c) Pre-procesarea imaginilor (aliniere, selecție); (d) Segmentare; (e) Calculul mărimilor; (f) – (g) exportul și vizualizarea rezultatelor.

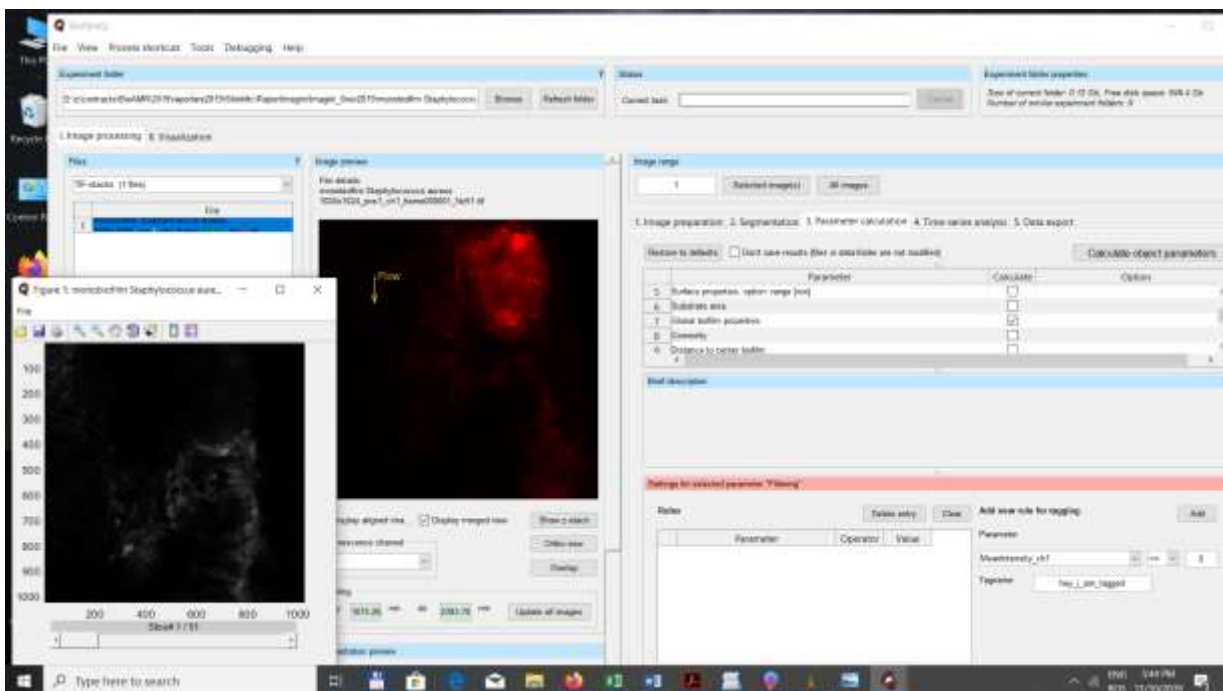


Fig. 12. Interfața specifică prelucrării imaginilor și calculului mărimilor caracteristice

## 5. Studiu de caz: analiză mono și dual – biofilme conținând *Staphylococcus Aureus* și *Escherichia Coli*

### 5.1. Stivele de imagini analizate

Toate imaginile analizate sunt de tip LIF, cu un singur canal - imagini pe nivele de gri, având rezoluția de 1024x1024 pixeli. Dimensiunea voxelului în fiecare dintre imagini este de 1.07 x 1.07 x 2.38, având prin urmare un volum egal cu 2.7507  $\mu\text{m}^3$ .

Imaginile analizate conțin mono biofilme și dual biofilme ce conțin *Staphylococcus aureus* (S.A.) și *Escherichia Coli* (E.Coli) după cum urmează:

- Dual biofilm S.A. + E. Coli (series 006) – 64 nivele
- Dual biofilm S.A. + E. Coli (series 002) – 161 nivele
- Dual biofilm S.A. + E. Coli (series 001) – 179 nivele
- Mono biofilm E. Coli (series 001) – 27 nivele
- Mono biofilm S.A. (series 001) – 51 nivele
- Mono biofilm S.A. 2 (series 001) – 69 nivele
- Mono biofilm S.A. 2 (series 008) – 40 nivele

### 5.2. Rezultate

Toate cele 7 imagini de biofilme au fost analizate folosind Comstat 2.1 pentru estimarea următoarelor mărimi:

- Biovolum
- Coeficient de rugozitate
- Grosime medie (la nivelul suprafeței corespunzătoare biomasei, respectiv la nivelul suprafeței totale)
- Grosime maximă
- Raportul suprafață / volum
- Numărul, aria medie și volumul mediu al micro-coloniilor
- Distanța medie de difuzie

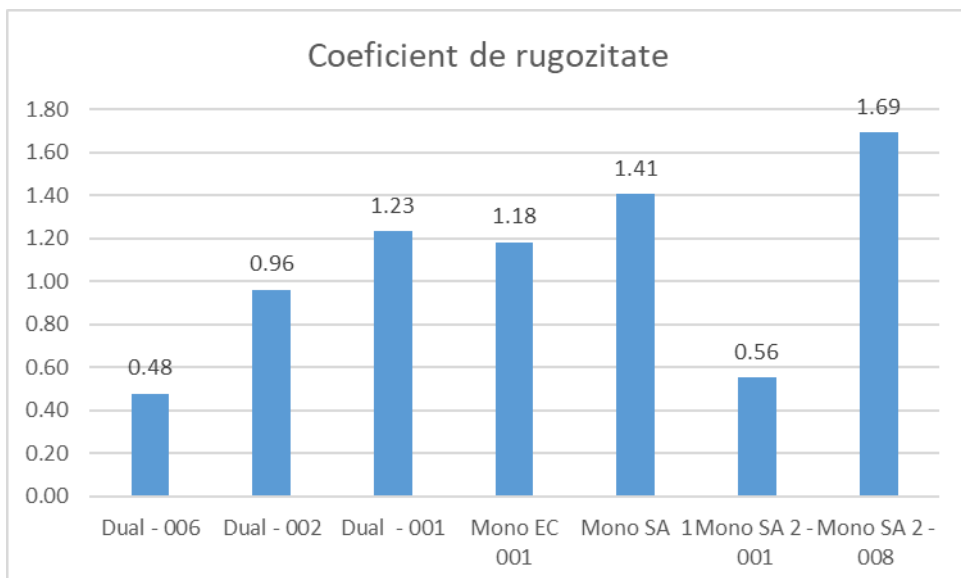
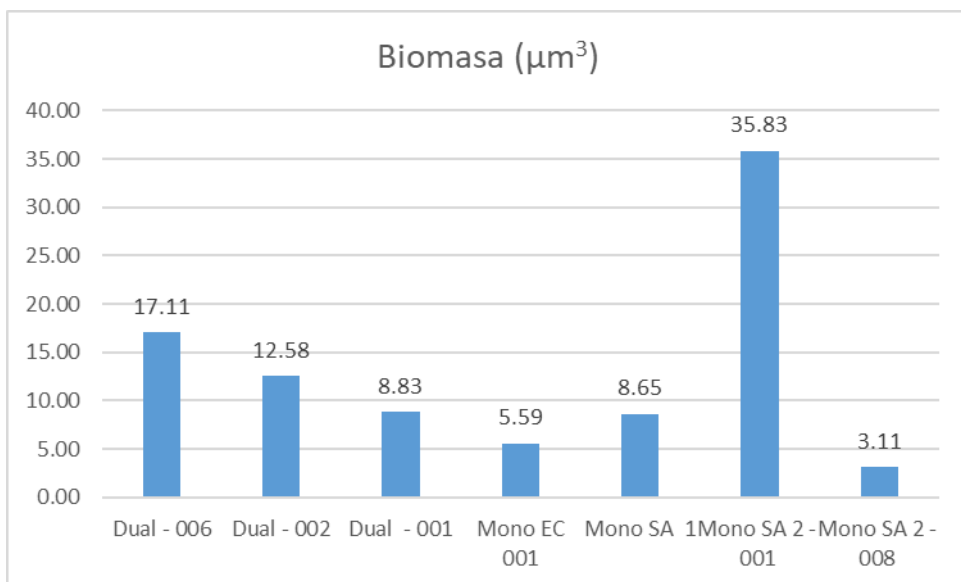
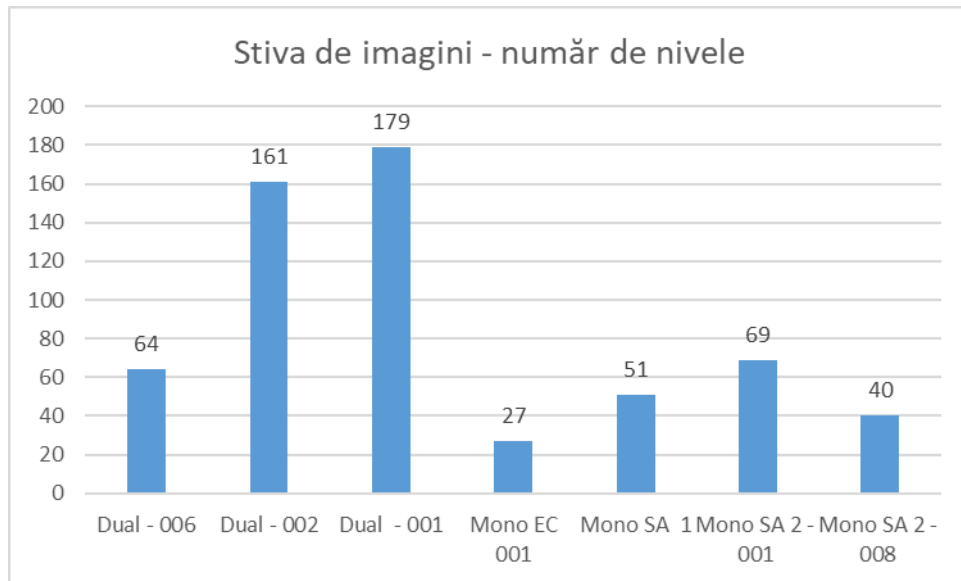
Valorile obținute pentru cele 7 imagini sunt prezentate în Tabelul 1 și vizualizate în diagramele asociate tabelului.

Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor

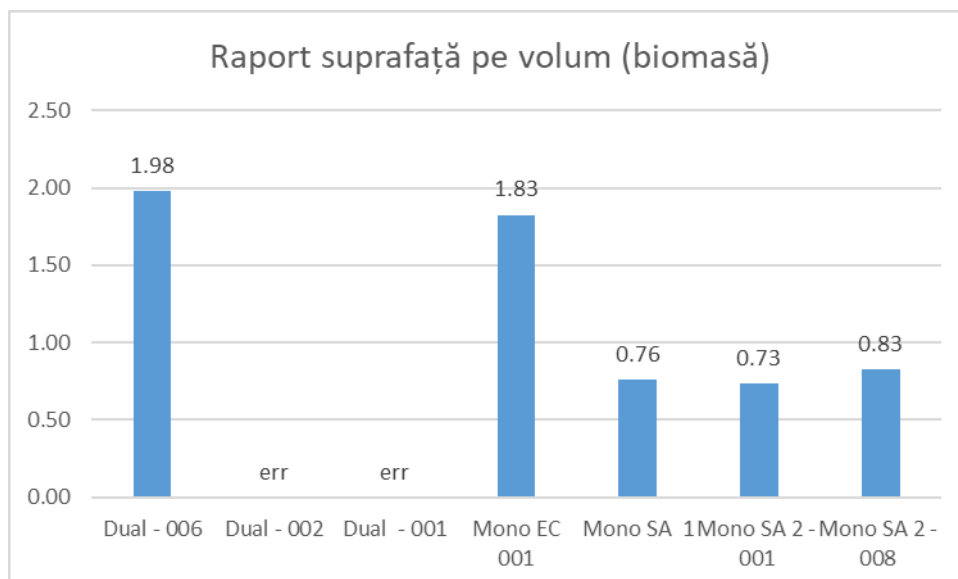
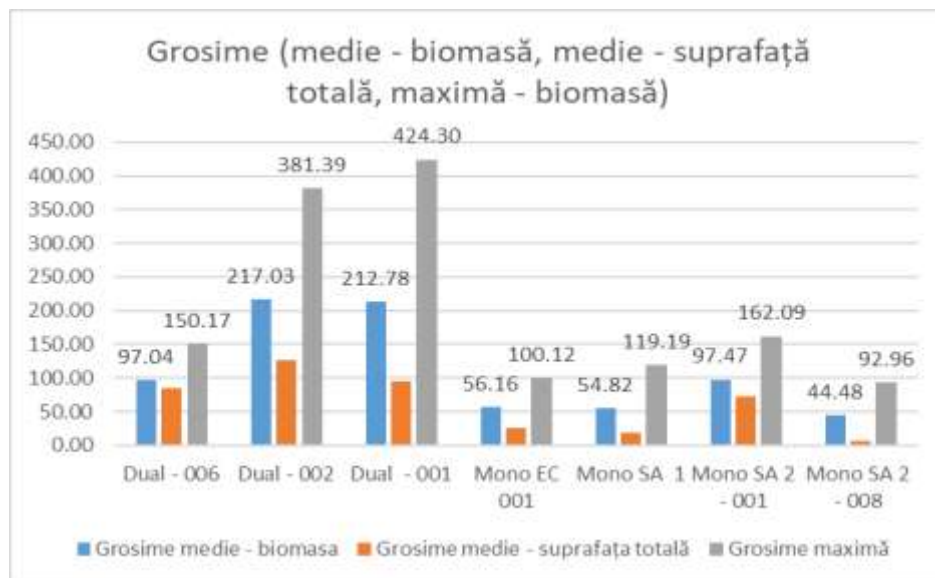
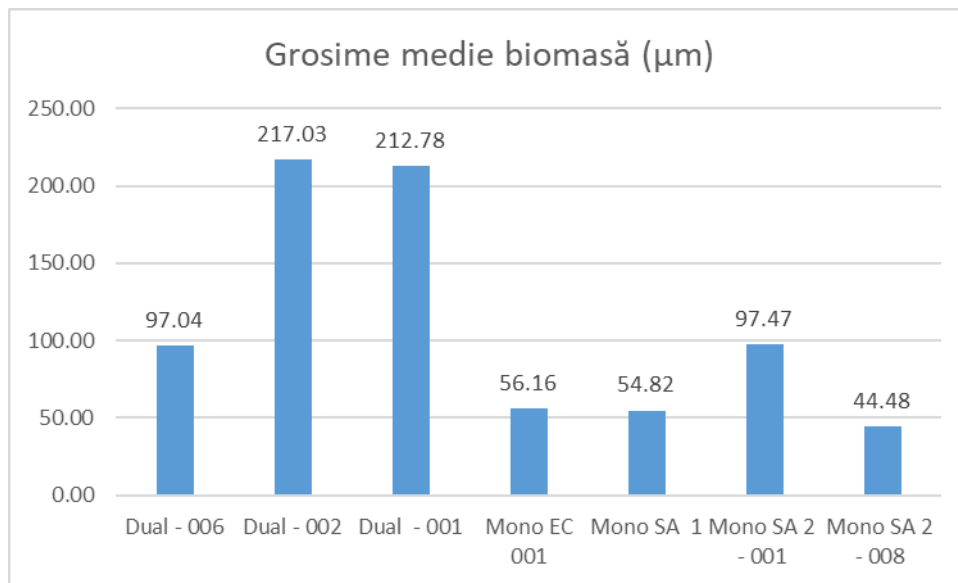
Tabel 1. Rezultate ale analizei cantitative a biofilmelor utilizând Comstat 2.1. (valorile specificate cu ERR nu au putut fi estimate de către Comstat).

Mărime	Nr nivele stiva imagini	Biovolum	Rugozitate	Grosime medie		Grosime maxima	Suprafață/volum	Microcolonii			Distanța difuzie
				Biomasa	Total substrat			Nr.	Arie medie	Volum mediu	
<i>Denumiri COMSTAT 2.1</i>	<i>Slices</i>	<i>Bio Mass</i>	<i>Roughness coefficient</i>	<i>Average thickness biomass</i>	<i>Average thickness entire area</i>	<i>Maximum thickness</i>	<i>Surface to volume ratio</i>	<i>Number of micro-colonies</i>	<i>Avg area of micro-colonies</i>	<i>Avg volume of micro-colonies</i>	<i>Avg diffusion distance</i>
UM		μm <sup>3</sup>	adimensional	μm	μm	μm	μm <sup>3</sup> /μm <sup>2</sup>		μm <sup>2</sup>	μm <sup>3</sup>	μm
Dual Staphylo+Ecoli series 006	64	17.11	0.48	97.04	84.79	150.17	1.98	21	2066.94	15284856.00	0.16
Dual 2 Staphylo+Ecoli series 002	161	12.58	0.96	217.03	127.20	381.39	ERR	24	449.17	14504409.00	ERR
Dual 3 Staphylo+Ecoli series 001	179	8.83	1.23	212.78	95.75	424.30	ERR	11	4543.82	2599425.00	ERR
Mono Ecoli series 001	27	5.59	1.18	56.16	25.46	100.12	1.83	59	478.91	1734561.63	0.07
Mono Staphylo series 1	51	8.65	1.41	54.82	18.29	119.19	0.76	43	1890.27	1104150.00	0.21
Mono Staphylo 2 series 001	69	35.83	0.56	97.47	73.10	162.09	0.73	20	5557.75	36593184.00	0.82
Mono Staphylo 2 series 008	40	3.11	1.69	44.48	6.98	92.96	0.83	16	1078.88	2629236.50	0.06

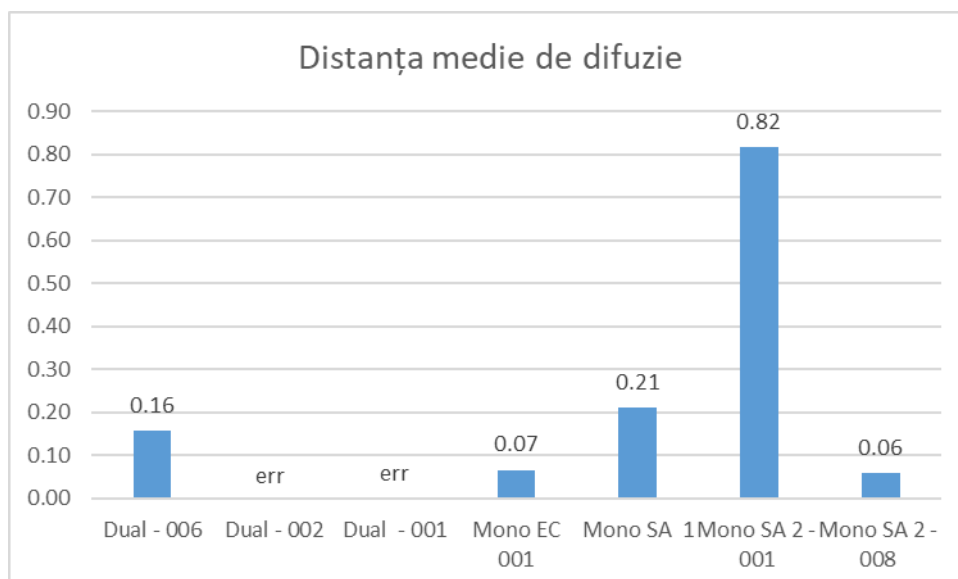
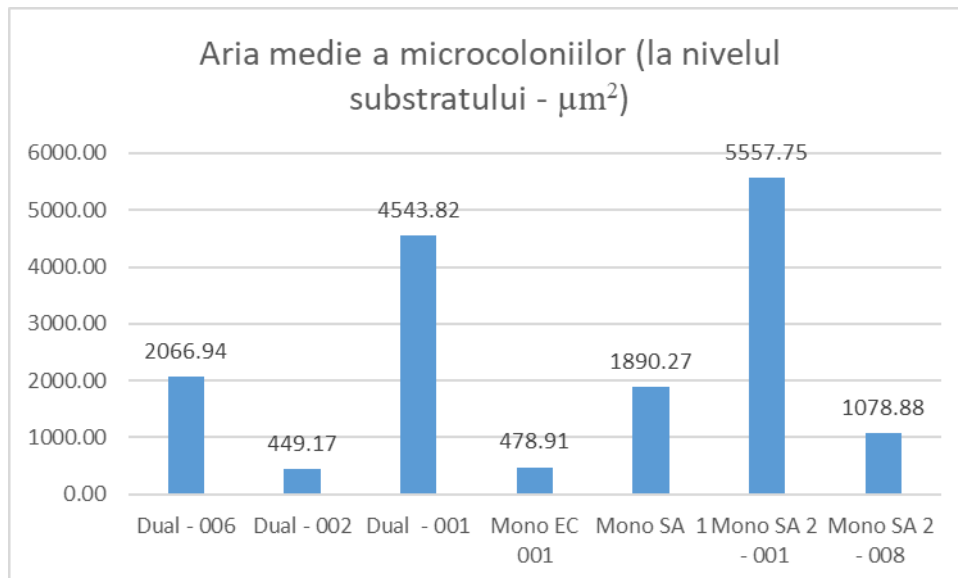
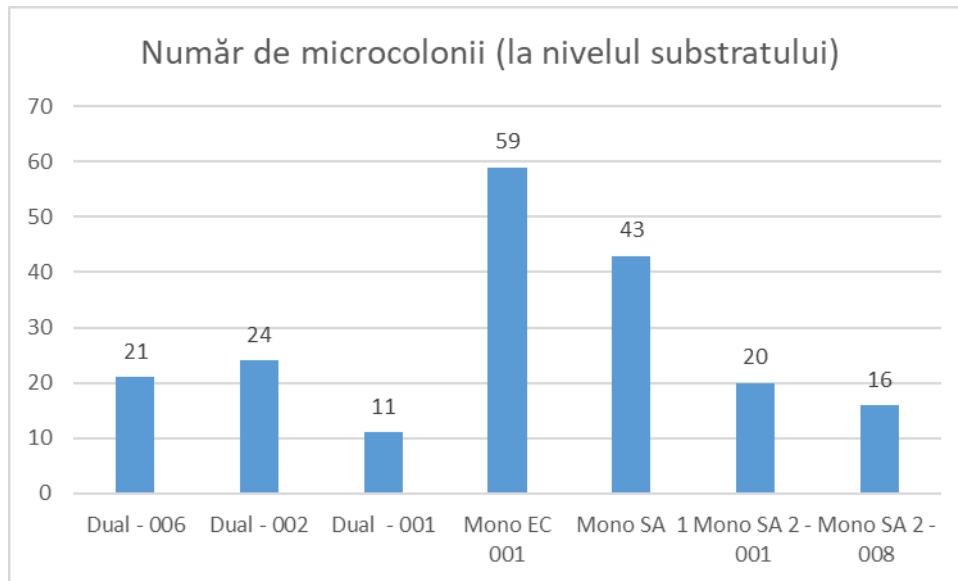
Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor



Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor



Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor



Structura la nivelul substratului

<p>Dual biofilm S.A. + E. Coli (series 006) – 21 micro-colonii</p>	<p>Dual biofilm S.A. + E. Coli (series 002) – 24 micro-colonii</p>
<p>Dual biofilm S.A. + E. Coli (series 001) - 11 micro-colonii</p>	<p>Mono biofilm E. Coli (series 001) - 59 micro-colonii</p>

<p>Mono biofilm S.A. (series 001) - 43 micro-colonii</p>	<p>Mono biofilm S.A. 2 (series 001) – 20 micro-colonii</p>
<p>Mono biofilm S.A. 2 (series 008) – 16 micro-colonii</p>	

### 5.3. Interpretarea rezultatelor

După cum am menționat anterior analiza biofilmului cu ajutorul microscopiei confocale cu scanare laser și a tehnicilor de colorare fluorescențe permite determinarea viabilității bacteriene, a arhitecturii și distribuției spațiale a biofilmului microbial.

În urma studiului realizat cu ajutorul microscopiei confocale cu scanare laser, s-a constatat că biofilmul format a fost heterogen din punct de vedere ale grosimii (medie biomasă,

## Utilizare softuri dedicate și tehnici imagistice avansate în vederea cuantificării biofilmelor

medie suprafață totală, maximă biomasă) și biovolumului observându-se diferențe între monobiofilme (*Staphylococcus aureus*, *E.coli*) și bi-biofilme (*Staphylococcus aureus* + *E.coli*). În schimb, nu s-au observat diferențe semnificative între monobiofilmele formate de *Staphylococcus aureus* și *E.coli*. La bi-biofilmele analizate diferențele observate indică dezvoltarea biofilmului pe înălțime, ceea ce relevă creșterea favorizată a microorganismelor în biofilme polimicrobiene. Creșterea polimicrobiană se datorează comunicării intraspecifice, de regulă prin intermediul așa numitului "quorum sensing" și cooperării metabolice. Interacțiunile din biofilmele cu specii mixte sunt de natură cooperativă (sinergică), competitivă (antagonică) sau neutră, bazată pe fondul genetic al speciilor implicate (Giaouris et al., 2013).

## 6. Concluzii

Datele obținute pot fi folosite în cercetările ulterioare, pentru a evalua modificările care se produc la nivelul biofilmului polimicrobian format și utilizarea unor metode noi de prevenție și terapie antimicrobiană.

Cunoașterea biovolumului și grosimii biofilmului este importantă în patologia umană, în vederea stabilirii metodelor optime de prevenire și combatere deoarece biofilmul polimicrobian prin capacitatea microorganismelor de a se detașa de la nivelul acestuia și de a forma noi microcolonii, este principala cauză a numeroaselor afecțiuni sistemice.

### Bibliografie:

1. Al-Ahmad, A., Wunder, A., Auschill T.M., Follo, M., Braun, G., Hellwig, E., Arweiler, N.B. (2007). The in vivo dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. *Journal of Medical Microbiology*, 56, p.681-687.
2. Comstat 2.1. Manual, 2015
3. Daims, H., Lückner, S., & Wagner, M. (2006). Daimon, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environmental microbiology*, 8(2), 200-213.
4. Giaouris E., Chorianopoulos N., Doulgeraki A., and Nychas G.-J. (2013) Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. *PLoS ONE* 8: e77276.
5. Hartmann, R., Jeckel, H., Jelli, E., Singh, P. K., Vaidya, S., Bayer, M., ... & Besharova, O. (2019). BiofilmQ, a software tool for quantitative image analysis of microbial biofilm communities. *BioRxiv*, 735423.

6. Herraiz, A.G., Leiva, R.G., Aránzazu, C.O., Silvestre, F.J., Antón, J.G. (2012). Confocal laser scanning microscopy for the study of the morphological changes of the postextraction sites, 75, 4, p. 513-519
7. Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B. K., & Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 146(10), 2395-2407.
8. Jung, D.J., Al-Ahmad, A., Follo, M., Spitzmuller, B., Hoth-Hannig, W., Hannig, M., Hannig, C. (2010). Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel in situ. *J Microbiol Methods*; 81, p. 166-174.
9. Lukas N Mueller. L.N., de Brouwer, J.F.C., Almeida, J.S., Stal, L.J., Xavier, J.B., Analysis of a marine phototrophic biofilm by confocal laser scanning microscopy using the new image quantification software PHLIP, *BMC Ecology* 2006, 6:1 doi:10.1186/1472-6785-6-1
10. Palmer, R.J. Jr, Diaz, P.I., Kolenbrander, P.E. (2006). Rapid succession within the Veillonella population of a developing human oral biofilm in situ. *Journal of Bacteriology*, 188, p. 4117-4124.
11. Palmer, R.J. Jr. (2010). Compendium of Continuing Education in Dentistry. Model systems for biofilm research in vitro. Multi-well plate with pins in lid - Supragingival and Subgingival Plaque: Paradigm Biofilms. AEGIS Publications, LLC.
12. M. Sezgin, B. Sankur (2004). "Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation". *Journal of Electronic Imaging*. 13 (1): 146-165
13. Shapiro, L.; Stockman, G. (2002). *Computer Vision*. Prentice Hall. pp. 69-73.
14. Tomas, I., Henderson, B., Diz, P., Donos, N. (2010) - In vivo oral biofilm analysis by confocal laser scanning microscopy: methodological approaches. *Microscopy: Science, Technology, Application and Education* A. Mendez-Vilas and J.Diaz (Eds).
15. Vorregaard, M., Comstat2 - a modern 3D image analysis environment for biofilms, in *Informatics and Mathematical Modelling*. 2008, Technical University of Denmark: Kongens Lyngby, Denmark