

Ewa LIWARSKA-BIZUKOJC¹
Marcin BIZUKOJC²

NOWA ZAUTOMATYZOWANA PROCEDURA OZNACZANIA UDZIAŁU BAKTERII NITKOWATYCH W KLACZKACH OSADU CZYNNEGO

Bakterie nitkowane odgrywają istotną rolę w formowaniu klaczków osadu czynnego, ale ich nadmierna liczba może przyczynić się do pogorszenia właściwości sedymentacyjnych osadu. Dlatego monitorowanie ilości bakterii nitkowatych jest pomocne w utrzymaniu prawidłowego przebiegu oczyszczania ścieków. W pracy przedstawiono nową, zautomatyzowaną procedurę ilościowego oznaczenia udziału bakterii nitkowatych w biomacie osadu czynnego. Procedura składa się z trzech głównych etapów: (1) barwienie bakterii nitkowatych metodą Neissera, (2) zbieranie obrazów mikroskopowych oraz (3) cyfrowa obróbka i analiza obrazów. Procedura służy obliczeniu długości bakterii nitkowatych na danym obrazie oraz stosunku pola powierzchni bakterii nitkowatych do pola powierzchni aglomeratów (klaczków bez nitek). Wstępne wyniki pomiarów długości bakterii nitkowatych korespondują z uzyskanymi w innych ośrodkach naukowych, co oznacza, że procedura może być stosowana do pomiaru ilości bakterii nitkowatych w osadzie czynnym. W porównaniu do wcześniej stosowanych procedur analizy obrazu, ta zaproponowana w niniejszej pracy pozwala na równoczesne przeprowadzenie obróbki i obliczeń parametrów morfologicznych zarówno dla agregatów bez nitek, jak i samych bakterii nitkowatych. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu prostego i szybkiego barwienia preparatu mikroskopowego. Inną zaletą prezentowanej w tej pracy procedury jest to, że makroprogram służący do obróbki obrazów i obliczania parametrów morfologicznych został napisany i jest wykonywany w środowisku programu do zbierania obrazów (NIS Elements AR). Dzięki temu unika się stosowania dwóch osobnych pakietów oprogramowania, jednego do zbierania obrazów, a innego do ich obróbki i analizy.

Słowa kluczowe: barwienie Neissera, cyfrowa analiza obrazu, oczyszczanie ścieków, osad czynny

¹ Autor do korespondencji: Ewa Liwarska-Bizukojc, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 173, 90-924 Łódź, tel.: 42 6313276, ewa.liwarska-bizukojc@p.lodz.pl

² Marcin Bizukojc, Politechnika Łódzka, Katedra Inżynierii Bioprosesowej, ul. Wólczańska 213, 90-924 Łódź, tel.: 42 6313972, marcin.bizukojc@p.lodz.pl

1. Wstęp

Bakterie nitkowate wchodzą w skład konsorcjów mikroorganizmów tworzących osad czynny. Badania przeprowadzone z pomocą nowoczesnych technik biologii molekularnej w 28 oczyszczalniach ścieków w Danii wykazały, że bakterie nitkowate stanowią przeciętnie około 24% bakterii tworzących kłaczkę osadu czynnego [11]. Wiele wskazuje na to, że bakterie nitkowate odgrywają kluczową rolę w formowaniu kłaczków osadu czynnego tworząc szkielet, do którego przyłączają się bakterie zooglealne [2]. Jednak obecność bakterii nitkowatych w osadzie czynnym, zwłaszcza w nadmiernej ilości, może przyczynić się do niekorzystnych zmian w strukturze kłaczkowej, których skutkiem jest zwiększenie objętości kłaczków, a w konsekwencji tzw. puchnięcie osadu [5, 6]. Dane literaturowe podają, że zidentyfikowano między 20 a 30 typów bakterii nitkowatych odpowiedzialnych za puchnięcie osadu czynnego [2]. Do najczęściej występujących bakterii nitkowatych należy zaliczyć *Nocardia* sp., Typ 1701, Typ 021N, *Thiothrix* sp., *Sphaerotilus natans* i *Microthrix parvicella* [2, 4]. Warto zwrócić uwagę, że bakterie nitkowate są pod względem fizjologicznym lepiej przystosowane do życia w oczyszczalniach ścieków niż bakterie zooglealne. Charakteryzują się one mianowicie niższymi stałymi nasycenia substratu węglowego (K_S) oraz tlenu (K_O) niż bakterie zooglealne, co oznacza, że mają lepsze powinowactwo do tych substratów. Mogą przetrwać dłużej w warunkach deficytu substratu, o czym świadczą niższe stałe szybkości wymierania dla bakterii nitkowatych w porównaniu z bakteriami zooglealnymi.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje dotyczące charakterystyki bakterii nitkowatych niezwykle istotne, poza identyfikacją, jest określenie ich udziału w biomacie osadu czynnego w sposób ilościowy. Eikelboom i van Buijsen opracowali skalę liczbową wyrażającą udział bakterii nitkowatych w osadzie czynnym nazywaną indeksem bakterii nitkowatych (FI, z ang. *filaments index*) [2]. Według tej skali osad, któremu przypisuje się cyfrę „0” to osad, w którym praktycznie nie ma bakterii nitkowatych. Natomiast osad oznaczony cyfrą „5” charakteryzuje się bardzo dużą liczbą nitkowatek. Jest to jednak bardzo szacunkowe i subiektywne określenie liczebności bakterii nitkowatych w osadzie czynnym. Rozwój technik mikroskopowych oraz komputerowych pozwolił na opracowanie nowych, zobiektywizowanych metod obliczania udziału bakterii nitkowatych w osadzie czynnym. Metody te wykorzystują cyfrową obróbkę i analizę obrazu.

Jedną z pierwszych procedur umożliwiających zautomatyzowany pomiar długości nitkowatek na obrazie opracował da Motta i wsp. [3]. Procedura ta obejmowała następujące etapy: (1) przygotowanie dwóch preparatów przyżyciowych; (2) prowadzenie obserwacji pod powiększeniem 100x i zebranie 70 obrazów; (3) przekształcenie obrazów RGB do obrazów w skali szarości; (4) zastosowanie filtrów wzmacniających brzożki obiektów (filtrów delinearacyjnych) oraz filtrów supresyjnych do usunięcia halo; (5) przekształcenie obrazów w skali szarości.

rości do obrazów binarnych; (6) odróżnienie agregatów od nitek z pomocą filtra morfologicznego i odejmowania obrazów; (7) odróżnienie nitek od tzw. debrisu (szczątki, zanieczyszczenia niebędące bakteriami nitkowatymi, ale podobne pod względem morfologicznym) na podstawie pola powierzchni rzutu i promienia obrotowego (RG, z ang. *radius gyration*), obiekty, których pole powierzchni rzutu wynosiło powyżej 200 pikseli, a RG powyżej 1 piksela klasyfikowane były jako bakterie nitkowane, (8) przeprowadzenie szkieletyzacji obiektów (nitki), w wyniku czego otrzymujemy obiekty o grubości 1 piksela, (9) pomiar całkowitej długości nitki na obrazie (z ang. *total length per image*).

Inną procedurę pomiaru ilości bakterii nitkowatych na obrazach z pomocą metod komputerowych proponuje Mesquita et al. [8, 9, 10]. Procedura ta jest udoskonaloną wersją wcześniejszej, opracowanej w tym samym zespole badawczym przez Amarala i Ferreirę [1]. Składa się ona z następujących etapów: (1) pobór 25 μl próby i przygotowanie preparatu przyżyciowego, należy wykonać trzy niezależne preparaty; (2) obserwacje mikroskopowe w jasnym polu pod powiększeniem 100x i zebranie około 200 obrazów; (3) wstępna obróbka obrazów obejmująca korektę tła oraz przekształcenie obrazów RGB do obrazów w skali szarości; (4) odróżnienie nitki od agregatów poprzez odejmowanie obrazów, (5) segmentacja obrazów z agregatami i obrazów z bakteriami nitkowatymi, (6) pomiar parametrów morfologicznych. Mierzono dwa podstawowe parametry morfologiczne, to jest indywidualną długość nitki na obrazie (FL, z ang. *the filaments individual length*) oraz całkowitą długość nitki na obrazie do objętości (TL/vol, z ang. *total filaments length per volume*).

Obydwie opisane wyżej procedury pozwalają na szybki, obiektywny i zautomatyzowany pomiar liczebności bakterii nitkowatych w osadzie czynnym. Okazały się przydatne w monitorowaniu osadu czynnego zarówno w laboratoryjnych, jak i pełnowymiarowych układach technologicznych do oczyszczania ścieków. Mesquita et al. wykazał, że istnieje korelacją między liczbą bakterii nitkowatych wyrażonych jako TL/vol a wartością indeksu objętościowego osadu [9]. W dalszych pracach Mesquita et al. oszacowali wartość krytyczną TL/Vol, powyżej której następuje puchnięcie osadu [10]. Wynosi ona 7 mm/ μl [10]. Pomimo wielu badań i wskazania pewnych zależności pomiędzy makroskopowymi a mikroskopowymi wskaźnikami puchnięcia osadu potrzebne są dalsze prace potwierdzające te zależności. Wynika to przede wszystkim z tego, że rzeczywiste układy technologiczne do oczyszczania ścieków są układami stochastycznymi i różniącymi się między sobą.

Celem niniejszej pracy było opracowanie nowej, zautomatyzowanej procedury ilościowego oznaczenia udziału bakterii nitkowatych w biomacie osadu czynnego. W ramach procedury obliczana jest długość bakterii nitkowatych na danym obrazie oraz stosunek pola powierzchni bakterii nitkowatych do pola powierzchni aglomeratów (kłaczków bez nitki).

2. Procedura oszacowania ilościowego bakterii nitkowatych w osadzie czynnym

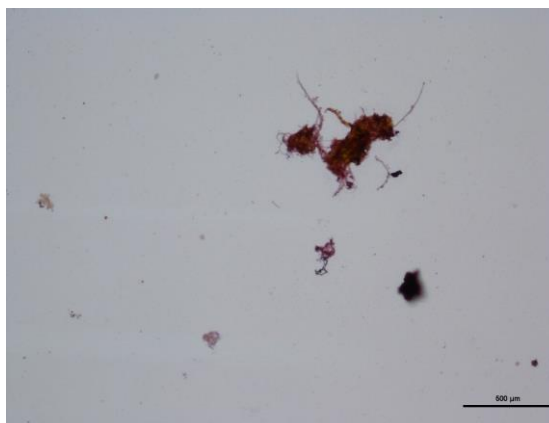
Opracowana procedura składa się z trzech głównych etapów: (1) barwienie bakterii nitkowatych metodą Neissera, (2) zbieranie obrazów mikroskopowych oraz (3) cyfrowa obróbka i analiza obrazów. Wymienione etapy omówiono kolejno poniżej. Szczególną uwagę poświęcono cyfrowej obróbce i analizie obrazów.

Barwienie Neissera przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną przez Eikelboom i van Buijsen [4]. Z badanej próby osadu czynnego wykonano dwa niezależne rozmazy na całej powierzchni szkiełka podstawowego (26×76 mm). W celu wykonania rozmazu na szkiełko podstawowe nanoszono niewielką ilość zawiesiny osadu o znanej objętości. Każdy z rozmazów wysuszone, a następnie poddano barwieniu. Najpierw naniesiono mieszaninę barwników składającą się z dwóch roztworów: błękitu metylenowego (roztwór A) i fioletu krystalicznego (roztwór B) w proporcji 2:1. Po zabarwieniu preparatu i usunięciu nadmiaru wyżej wymienionych barwników naniesiono na preparat roztwór chryzoidyny. Na koniec delikatnie spłukano nadmiar barwników i wysuszone preparat. Zastosowana metoda barwienia Neissera pozwoliła w wystarczającym, jak na potrzeby analizy obrazu, stopniu wyróżnić bakterie nitkowate na obrazach mikroskopowych. Barwienie to jest tanie i proste, a jego wykonanie nie przekracza 40 minut.

Obserwacje mikroskopowe prowadzono w taki sposób, aby na obrazie widoczne były zarówno aglomeraty, jak i bakterie nitkowate. W przypadku niniejszej procedury obserwacje prowadzono z pomocą mikroskopu Nikon Eclipse Ni pod obiektywem 10×, a do zbierania i analizy obrazów wykorzystano program komputerowy NIS ELEMENTS AR software (Nikon, Japonia). Na podstawie wcześniejszych analiz statystycznych uznano, że w celu uzyskania wiarygodnych statystycznie wyników należy zebrać co najmniej 40 niezależnych obrazów [7]. Obrazy zapisywano w formacie tif o rozdzielczości 1280×960. Przykładowy obraz przedstawiono na rys. 1.

W ramach trzeciego etapu procedury przeprowadzono cyfrową obróbkę i analizę zebranych obrazów. Zostało to zrealizowane z pomocą napisanego w tym celu makroprogramu działającego w środowisku programu NIS Elements AR. Etap ten składa się z następujących części: (1) segmentacja obrazu i wybranie wszystkich obiektów, (2) usunięcie obiektów nie będących kłaczkami osadu czynnego (3) przekształcenie obrazu w obraz binarny i obliczenie powierzchni całych agregatów wraz z nitkami, (3) uzyskanie obrazu binarnego bez nitek poprzez filtrowanie morfologiczne obrazu i obliczenie powierzchni samych agregatów, (4) otrzymanie obrazu binarnego bakterii nitkowatych poprzez wykonanie operacji odejmowania od obrazu binarnego z nitkami obrazu bez nitek, (5) skeletonizacja obrazu binarnego bakterii nitkowatych i obliczenie

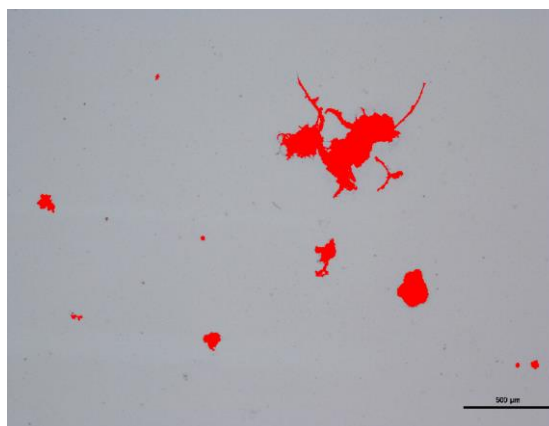
długości nitek. Na rys. 2-6 przedstawiono przykładową obróbkę obrazu kłaczków osadu czynnego znajdujących się na prezentowanym wcześniej rys. 1.



Rys. 1. Barwiony obraz kłaczków osadu czynnego

Fig. 1. Stained image of activated sludge flocs

Segmentację wykonano w warstwie niebieskiej, która stanowi sama w sobie obraz w skali szarości (rys. 2).

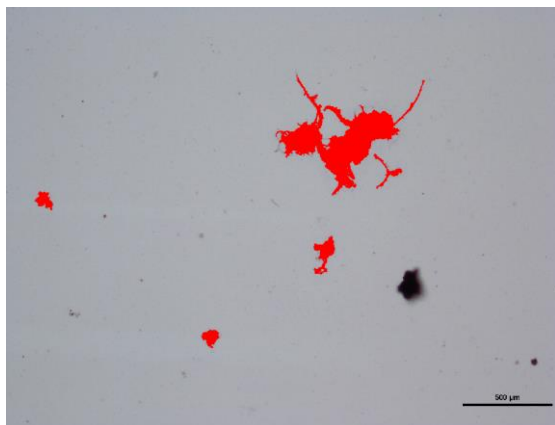


Rys. 2. Segmentacja kłaczków osadu czynnego

Fig. 2. Segmentation of activated sludge flocs

Istotą segmentacji jest ustalenie takiego progu, który umożliwi odróżnienie obiektów od tła. Próg (*threshold*) segmentacji liczony jest jako różnica między poziomem szarości (z zakresu 0-255), dla którego występuje maksymalna liczba pikseli na obrazie a zadaną subiektywnie wartością (z zakresu 0-255). Dla

każdego obrazu próg był obliczany indywidualnie tak, aby uniezależnić wybór obiektów od wahań poziomu jasności obrazu. Obiekty niebędące ani kłaczkami ani nitkami usunięto z obrazu poprzez automatyczne filtrowanie wielkością i czynnikiem kształtu (rys. 3).



Rys. 3. Usunięcie obiektów niebędących kłaczkami osadu czynnego

Fig. 3. Removal of the objects, which are not activated sludge flocs

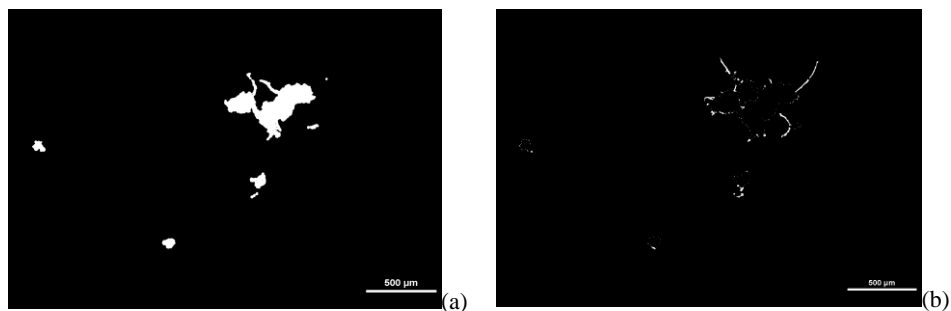
Można dodatkowo zastosować usuwanie ręczne podczas analizy poszczególnych obrazów. Następnie tak oczyszczony obraz przekształcono w obraz binarny przypisując wartości zero (białe piksele) obiektom, a wartości 1 – tłu (czarne piksele) (rys. 4).



Rys. 4. Obraz binarny agregatów i nitek

Fig. 4. Binary image of aggregates and filaments

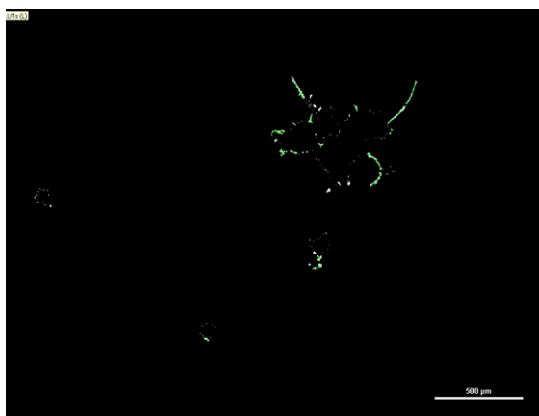
Celem dalszej obróbki obrazu było oddzielenie agregatów od nitek. Dokonano tego w dwóch krokach. Najpierw usunięto nitki z obrazu binarnego z pomocą filtrów morfologicznych (dwukrotne zamykanie i otwieranie z jądrem kulistym dwunastopikselowym). Następnie z pomocą funkcji logiczną XOR odjęto obraz z agregatami (rys. 5a) od obrazu zawierającego całe klaczki (agregaty i nitki) widoczne na rys. 4, co pozwoliło na uzyskanie obrazu samych bakterii nitkowatych (rys. 5b).



Rys. 5. Obrazy binarne agregatów (a) i nitek (b)

Fig. 5. Binary images of aggregates (a) and filaments (b)

Obrazy bakterii nitkowatych i agregatów posłużyły do obliczenia odpowiednio pola powierzchni nitek i pola powierzchni agregatów. Obraz samych bakterii nitkowatych poddany był dalszej obróbce polegającej na jego skeletonizacji i pruningowi. Pozwoliło to na uzyskanie obrazu, na którym nitki miały grubość 1 piksela (rys. 6). Operacje skeletonizacji i pruningu przeprowadzono z pomocą filtrów o takich samych nazwach. Tak przetworzony obraz bakterii nitkowatych posłużył do pomiaru długości tych bakterii.



Rys. 6. Pomiar długości nitek

Fig. 6. Measurement of filament length

Wstępne badania pokazują, że procedura, zwłaszcza jej trzecia część, pozwala na uzyskanie wartości żądanych parametrów opisujących udział bakterii nitkowatych w osadzie czynnym. Są to pole powierzchni agregatów bez bakterii nitkowatych, pole powierzchni bakterii nitkowatych oraz długość bakterii nitkowatych przypadająca na powierzchnię obrazu. Średnia długość bakterii nitkowatych przypadających na powierzchnię obrazu dla osadu czynnego w Zgierzu wynosiła $2582 \mu\text{m} \pm 1730$, a dla osadu z Grupowej Oczyszczalni Ścieków w Łodzi $8541 \mu\text{m} \pm 7030$. Dla porównania długość nitek przypadająca na powierzchnię obrazu w pracy da Motta et al. (2003) mieściła się w zakresie od 1000 do 2500 μm . Oznacza to, że wyniki uzyskane z pomocą opracowanej procedury można uznać za wiarygodne. Obecnie trwa dalsza weryfikacja procedury na osadzie czynnym z oczyszczalni ścieków w Zgierzu i GOŚ w Łodzi.

3. Podsumowanie

Zaproponowana w niniejszej pracy procedura umożliwia w obiektywny i stosunkowo szybki sposób ocenę ilości bakterii nitkowatych w osadzie czynnym. Może być ona istotnym wsparciem w monitorowaniu pracy rzeczywistych i laboratoryjnych układów technologicznych osadu czynnego.

Zaletą tej procedury w stosunku do wcześniejszych tego typu procedur opracowanych przez zespół z Universidade de Minho w Portugalii [1, 9, 10] jest równoczesne przeprowadzenie obróbki i obliczeń parametrów morfologicznych zarówno dla agregatów bez nitek, jak i samych bakterii nitkowatych. Było to możliwe dzięki zastosowaniu barwienia preparatu mikroskopowego. We wspomnianych wyżej procedurach używano preparatów przyżyciowych, które obserwowano pod dużymi powiększeniami, co w konsekwencji prowadziło do obliczenia parametrów morfologicznych tylko dla bakterii nitkowatych. Jednak pomimo zastosowania prostej i taniej metody barwienia wydłuża ona nieznacznie czas trwania całej procedury, co jest pewnym jej mankamentem. Drugą zaletą prezentowanej w tej pracy procedury jest to, że makroprogram służący do obróbki obrazów i obliczania parametrów morfologicznych został napisany i działa w środowisku programu do zbierania obrazów (NIS Elements AR). W przypadku procedur opracowanych przez Mesquita et al. [9, 10] oraz Amaral i Ferreira [1] obróbka i analiza obrazów była przeprowadzona z pomocą programu Matlab, a zbieranie obrazów z pomocą Image Pro Plus.

Wstępne wyniki badań uzyskane z pomocą tej procedury świadczą, że może być stosowana do ilościowego oszacowania bakterii nitkowatych. Nie wyklucza to dalszych prac nad jej udoskonalaniem i, o ile to będzie możliwe, uproszczeniem.

Podziękowania

Praca została wykonana w ramach projektu NCBiR NR14-0004-10

Literatura

- [1] Amaral A.L., Ferreira E.C.: Activated sludge monitoring of a wastewater treatment plant using image analysis and partial least squares regression, *Anal. Chim. Acta*, vol. 544, 2005, s. 246-253.
- [2] Bitton G., Koopman B.: Tetrazolium reduction-malachite green method for assessing the viability of filamentous bacteria in activated sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 43/4, 1982, s. 964-966.
- [3] da Motta M., Pons M.-N., Roche N. Monitoring of filamentous bulking In activated sludge systems fed by synthetic or municipal wastewater, *Bioproc. Biosys. Eng.*, vol. 25/6, 2003, s. 387-393.
- [4] Eikelboom D.H., van Buijsen H.J.J.: Podręcznik mikroskopowego badania osadu czynnego, Wydawnictwo „Seidel-Przywecki” Sp. z o.o., Szczecin 1999.
- [5] Guo J., Peng Y., Wang S., Yang X., Wang Z., Zhu A.: Stable limited filamentous bulking through keeping the competition between floc-formers and filaments in balance, *Biores. Technol.*, vol. 103, 2012, s. 7-15.
- [6] Jones P.A., Schuler A.J.: Seasonal variability of biomass density and activated sludge settleability in full-scale wastewater treatment systems, *Chem. Eng. J.*, vol. 164, 2010, s. 16-22.
- [7] Liwarska-Bizukojc E., Bizukojc M.: Effect of selected anionic surfactants on activated sludge flocs, *Enz. Microb. Technol.*, vol. 39, 2006, s. 660-668.
- [8] Mesquita D.P., Amaral A.L., Ferreira E.C.: Identifying different types of bulking in an activated sludge system through quantitative image analysis, *Chemosphere*, vol. 85, 2011, s. 643-652.
- [9] Mesquita D.P., Dias O., Amaral A.L. Ferreira E.C.: Monitoring of activated sludge settling ability through image analysis: validation on full scale wastewater treatment plants, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 32, 2009, s. 361-367.
- [10] Mesquita D.P., Dias O., Dias A.M.A., Amaral A.L. Ferreira E.C.: Correlation between sludge settling ability and image analysis information using partial least squares, *Anal. Chim. Acta*, vol. 642, 2009, s. 94-101.
- [11] Mielczarek A.T., Cragelund C., Erikssen P.S., Nielsen P.H.: Population dynamics of filamentous bacteria in Danish wastewater treatment plant with nutrient removal, *Water Res.*, vol. 46, 2012, s. 3781-3795.

NEW AUTOMATED PROCEDURE TO DETERMINE THE CONTRIBUTION OF FILAMENTOUS BACTERIA IN ACTIVATED SLUDGE FLOCS

Summary

Filamentous bacteria play the important role in the processes of activated sludge flocs formation. At the same time their excess may deteriorate settling properties of activated sludge. That is why, monitoring of the quantity of filamentous bacteria is a helpful tool to assure the efficient run of wastewater treatment processes. In this work a new automated procedure for the estimation of the quantity of filamentous bacteria in the activated sludge was presented. The procedure consisted of the following stages: (1) Neisser staining, (2) grabbing of microscopic images, (3)

digital image processing and analysis. This procedure allows for the calculation of the total length of filaments per image and the ratio of area of filaments to the area of aggregates excluding filaments. The initial results obtained with the use of this procedure were on the same level as obtained earlier by other scientists. It indicates that the procedure can be applied for the measurement of the quantity of filaments in the activated sludge. Compared to the previously applied procedures, the present one allows for simultaneous performance of image processing and calculation of morphological parameters for both aggregates and filaments. It is possible due to application of the fast and simple microscopic slides staining method. Secondly, the macroprogramme realizing the proposed procedure of image processing and calculation of morphological parameters, is written in the same software, which is used for image grabbing, i.e. NIS Elements AR. Thus, using two different software packages (separately for image grabbing and processing) is avoided.

Keywords: digital image analysis, Neisser staining, wastewater treatment, activated sludge

DOI: 10.7862/rb.2013.37

Przesłano do redakcji w lipcu 2013 r.

Przyjęto do druku we wrześniu 2013 r.