

DETECÇÃO DE DIFERENTES MICRORGANISMOS POR APRENDIZADO PROFUNDO USANDO IMAGENS DE MICROSCÓPIO

Cristiano Emanuel Pereira Reis¹, Any Vitória Peviani¹, Larissa Gabriela Silva¹,
Rafaela de Toledo Sampaio¹, Carina Aline Prado¹

¹UFBRA/Centro universitário, Rua: Dolzani Ricardo, 335 - Centro, 12210-110 - São José dos Campos-SP, Brasil, autor 1: cristiano.pereira@aprimorar.com.br, autor 2: any.peviani26@gmail.com, autor 3: laari.gabriella@gmail.com, autor 4 : rafahtoledo16@gmail.com, autor 5: carina.prado@aprimorar.com.br

Resumo

A segmentação de imagens microscópicas é essencial para obter estatísticas precisas de populações microbiológicas. Técnicas convencionais de visão computacional apresentam limitações ao lidar com agrupamentos de microrganismos da mesma linhagem, como leveduras e fungos filamentosos, frequentemente segmentando erroneamente duas ou mais entidades como uma única. O aprendizado profundo supervisionado pode melhorar esses resultados, mas requer grande volume de imagens rotuladas manualmente para treinamento, o que é demorado. Uma solução de segmentação não supervisionada para imagens de leveduras e fungos eliminaria a necessidade de dados rotulados e superaria desafios de grupos semelhantes. A arquitetura U-Net, um autoencoder que gera máscaras de segmentação, foi adaptado com variações de filtros, camadas e pós-processamento. O objetivo foi utilizar a U-Net para segmentação precisa de imagens de leveduras, abordando erros comuns e a dependência de dados manualmente rotulados, nesse estudo foi capturado as imagens de 7 cepas distintas entre esses 3 de leveduras e 4 de fungos filamentosos para o estudo da ferramenta U-Net.

Palavras-chave: leveduras, fungos filamentosos, U-Net, segmentação de imagens, cepas.

Área do Conhecimento: (Biologia Geral e Ciência da Computação)

Introdução

A seleção de imagens por microscópio desempenha um papel crucial na obtenção de estatísticas precisas sobre qualquer tipo de populações microbiológicas como a identificação de diferentes cepas de leveduras e fungos filamentosos. Leveduras e fungos filamentosos são ambos classificados no reino Fungi, mas apresentam diferenças marcantes em termos de estrutura, forma de crescimento e aplicação biotecnológica. Por isso um método que identifique essas diferenças de forma simples irá auxiliar na Biologia celular, principalmente por identificar semelhanças e diferenças cruciais em seu cultivo. Embora técnicas convencionais de visão computacional ofereçam resultados aceitáveis, elas apresentam limitações, especialmente ao lidar com agrupamentos de entidades microscópicas da mesma linhagem, como leveduras da mesma família (HANSON et al., 2018; PRADO et al., 2024). Em tais cenários, algoritmos convencionais frequentemente cometem erros ao segmentar duas ou mais bactérias desses grupos, tratando-as como uma única entidade.

As leveduras são fungos unicelulares, geralmente esféricos ou ovais. Elas crescem principalmente como células isoladas que se reproduzem por brotamento (gemulação) ou fissão binária. Esses microrganismos crescem em forma unicelular, formando colônias semelhantes a bactérias em meios sólidos. Elas reproduzem-se principalmente de forma assexuada por brotamento, mas algumas espécies também se reproduzem por esporulação sexual (HILARES et al., 2020). Essas são encontradas em ambientes ricos em açúcares, como frutas, néctar e solos ricos em matéria orgânica. Além disso, elas são amplamente usadas em processos industriais, como fermentação alcoólica (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* na produção de cerveja, vinho e pão), além de serem modelos de estudo em biologia molecular e biotecnologia. Outras leveduras como a *Candida tropicalis*,

Scheffersomyces stipitis e *Scheffersomyces parashehatae* são utilizadas para produção de bioprodutos de alto valor agregado como o xilitol que é um adoçante dietético (JOFRE et al., 2021). As leveduras são de suma importância para a indústria farmacêutica e alimentícia.

Já os fungos filamentosos são multicelulares que crescem como longos filamentos chamados hifas. Essas hifas se ramificam para formar uma rede densa chamada micélio. Os fungos crescem em forma de filamentos, expandindo-se radialmente em meios sólidos. As colônias geralmente têm uma textura de algodão ou veludo devido à formação de hifas. Esses se reproduzem tanto assexuadamente (por esporos conidiais) quanto sexualmente (por esporos meióticos), dependendo da espécie e das condições ambientais. São utilizados na produção de enzimas industriais, antibióticos, ácidos orgânicos (como ácido cítrico por *Aspergillus niger*) e outros bioprodutos. Eles também desempenham um papel significativo na biodegradação e na produção de compostos bioativos. Outros fungos como o *Monascus Ruber* são encontrados no arroz vermelho e produzem fármacos como a lovastatina que combate o colesterol o *Aspergillus terreus* também produz lovastatina mas não produz pigmentos como o *M. ruber* já o *Aerobasidious puluans* produz pigmento e biopolímero (HILARES et al., 2020). Podem ser encontrados em uma ampla gama de ambientes, desde solos até matéria orgânica em decomposição, e até em ambientes aquáticos. Esses microrganismos são de suma importância para a biotecnologia com a produção de diferentes produtos de interesse comercial.

A aplicação de aprendizado profundo supervisionado possui o potencial de aprimorar esses resultados, mas exige uma extensa coleção de imagens selecionadas manualmente para o treinamento do modelo. No domínio das imagens microscópicas de microrganismos, esse processo de seleção envolve a anotação manual de cada espécie presente em cada imagem, consumindo uma quantidade considerável de tempo. Uma solução para a segmentação não supervisionada de imagens microscópicas de leveduras e fungos filamentosos não só eliminaria a necessidade de dados rotulados, mas também abordaria os desafios associados a grupos de leveduras semelhantes (FROHLICH e MADEO, 2000; CAMPBELL et al., 2006).

A arquitetura U-Net funciona como um autodescoberta, utilizando camadas totalmente convolucionais para aprender e criar uma representação da imagem de entrada enquanto gera simultaneamente uma máscara de segmentação correspondente. Nesse processo, a função de perda de reconstrução do autoencoder e a função de perda de corte normalizado suavizado da camada de codificação são minimizadas (HAPSON et al., 2018). Em seguida, dois passos de pós-processamento são aplicados para derivar a segmentação final da imagem fornecida. Essa arquitetura será adaptada para permitir variações no número de filtros, no número de camadas utilizadas e nos passos de pós-processamento.

A abordagem proposta visa otimizar a rede U-Net e investigar a viabilidade de sua aplicação na segmentação de imagens microscópicas de leveduras. O objetivo foi abordar de forma eficaz os desafios mencionados: erros associados à segmentação de grupos de leveduras semelhantes da mesma família e gênero, mas de espécies diferentes, e a exigência de grandes quantidades de dados rotulados manualmente (HAPSON et al., 2018). Nesse trabalho foi elaborado um banco de imagens de fungos filamentosos e leveduras compondo um material para a aplicação da tecnologia de rede U-Net para identificação dessas espécies por suas diferenças, este estudo ainda está em andamento mas os dados preliminares estão apresentados nesse resumo, onde alguns microrganismos foram expostos para elucidar as diferenças entre essas espécies de microrganismos.

Metodologia

Captura das imagens: Para ser realizado esse processo foi realizado o cultivo de 7 cepas diferentes de microrganismos 3 cepas de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis* e *Scheffersomyces pashehatae*) os quais seguiram as condições de cultivo descritas por Prado et al., (2023). As cepas de fungos filamentosos foram 4 (*Aspergillus terreus*, *Aerobasidious pulluans*, *Monascus ruber*, *Monascus purpureus*) o meio de cultivo foi descrito por HILARES et al., (2018) e de OLIVEIRA FILHO et al., (2023).

Após seu cultivo foi realizada a captura das imagens por fotografia de Microscopia óptica (Microscópio metalográfico polarizado -Diglab) com o aumento de 100x e 1000x, esse é alcançado usando uma combinação de uma lente objetiva de 10x e uma lente ocular de 10x e 100x. Os principais pontos foram: A lente objetiva de 10x e a ocular de 10x e 100x combinam-se para fornecer um aumento

total de 100x e 1000x. A iluminação foi feita com luz visível que atravessa a amostra, formando uma imagem ampliada. Com esse aumento, foi possível observar células grandes como as de fungo, bactérias e estruturas celulares básicas como micélio e hifas.

Tratamento das imagens: Foi utilizado a tecnologia U-Net que é uma técnica poderosa para segmentação de imagens profundas, sendo capaz de capturar tanto características globais quanto detalhes finos, tornando-a ideal para tarefas que exigem precisão na classificação de cada pixel em uma imagem, diferenciando com essa técnica as fotografias de leveduras e fungos filamentosos. A imagem passou pelo caminho de contração (encoder), onde suas características são extraídas e resumidas em mapas de características menores e mais abstratos. Em seguida, ela será processada pelo caminho de expansão (decoder), onde é reconstruída em uma máscara de segmentação. A saída final é uma máscara de segmentação onde cada pixel é classificado como parte de uma classe específica (por exemplo, célula ou fundo). Após o treinamento, pode-se alimentar novas imagens microscópicas na U-Net para gerar máscaras preditivas onde as células são segmentadas. A saída foi uma máscara binária onde os pixels correspondentes às células têm o valor 1. Assim, houve a preparação de imagens e máscaras de célula com os seguintes passos:

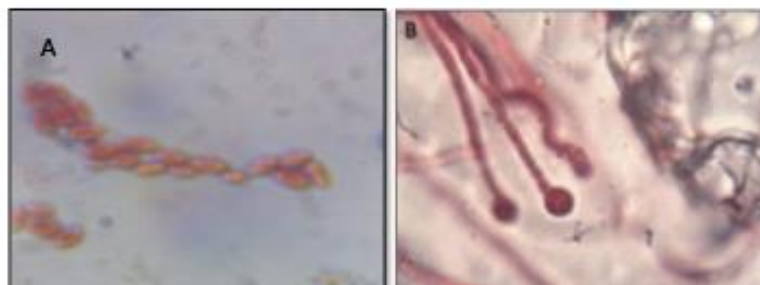
- Implementação da U-Net em uma biblioteca como TensorFlow/Keras ou PyTorch.
- Treinamento da rede.
- Realização de inferência para segmentar novas imagens.
- Contagem e análise de células segmentadas.

Resultados

A U-Net, como modelo de segmentação de imagens, foi aplicada tanto para imagens de fungos filamentosos quanto para imagens de leveduras, mas as diferenças estruturais e morfológicas (Figura 1) desses microrganismos resultam em variações na segmentação e interpretação das imagens elaboradas por microscopia. Ao detalhar as principais diferenças ao usar a U-Net para segmentar imagens de fungos filamentosos e leveduras encontram-se com uma morfologia diferente como explicado a seguir. Foi utilizado uma contagem pelas fotografias ampliadas após o tratamento fotográfico para poder identificar e quantificar estruturas celulares como hifas e micélios.

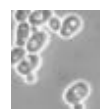



Na Figura 1 é possível identificar as estruturas diferenciadas para leveduras e fungos filamentosos, as leveduras na Figura 1A- apresenta a estrutura de forma arredondada e ovalada é possível contabilizar o número de células (26 células) com o auxílio da ferramenta U-Net, já na Figura 1B- o fungo filamentoso apresenta micélio e hifas bem definidos o que diferencia ambos os microrganismos. Já na Tabela 1 cada figura representa as espécies de leveduras e fungos estudadas, na ferramenta U-Net, essas foram capturadas para abastecer o software, essas podem ser contabilizadas através da imagem, sendo que a *Scheffersomyces parashehatae* apresentou o maior número de células (26) por cm², já a *C. Tropicalis* apresentou o menor número de células (7) por cm², já para a classe dos fungos ambos contêm um micélio e as hifas varia sendo que *M. ruber* apresentou até 10 hifas. Essas também apresentam as suas diferenças sendo que as leveduras (*Scheffersomyces parashehatae*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*) são ovais e os fungos filamentosos (*Monascus ruber*, *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus terreus*) com hifas e micélios.

Figura 1 – Imagens de a) levedura b) fungo filamentoso.



Fonte: Próprio autor

Tabela 1- Diferentes microrganismos classificados em suas classes

Nome Científico	Classificação	Quantidade de células	Imagem*
<i>Sacaromyceas cerevisiae</i>	Levedura	8 células por cm ²	
<i>Candida tropicalis</i>	Levedura	7 células por cm ²	
<i>Scheffersomyces parashehatae</i>	Levedura	26 células por cm ²	
<i>Monascus ruber</i>	Fungo filamentoso	1 micélio com 10 hifas por cm ²	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Fungo filamentoso	1micélio e 3 hifas por cm ²	
<i>Aspergillus terreus</i>	Fungo filamentoso	1 micélio e 4 hifas por cm ²	

Fonte: Próprio autor * Imagens tiradas em microscópio óptico pelo autor

Discussão

1. Morfologia e Estrutura Diferentes

- **Fungos Filamentosos:** Os fungos filamentosos, como *Aspergillus pullulans*, *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber* ou *purpureous*, são caracterizados pela formação de hifas, que são longos filamentos ramificados. As hifas crescem formando uma rede complexa chamada micélio como descrito por CENTENO et al.,(2023).Na segmentação dessas imagens, a U-Net precisa lidar com a identificação e distinção de estruturas longas e ramificadas, onde a continuidade dos filamentos é crucial. A complexidade das ramificações, com interseções e sobreposições de hifas, pode ser um desafio para a segmentação precisa, exigindo que o

modelo capture essas estruturas complexas sem perder detalhes retratado na Figura 1 e diferenciado na Tabela 1.

- **Leveduras:** Leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *S. parahehatae* são fungos unicelulares que se reproduzem principalmente por brotamento. Elas têm uma forma arredondada ou ovalada, sem ramificações complexas como reportam CAMPBELL et al., (2006) e de OLIVEIRA FILHO et al., (2023). A segmentação de leveduras com a U-Net se concentra em identificar células individuais e, em alguns casos, distinguir células em brotamento. Desafios surgem quando as células estão agrupadas ou muito próximas, pois o modelo deve ser capaz de diferenciar células justapostas que podem parecer uma única entidade. Porém com o tratamento da imagem essas células são visivelmente identificadas como identificado na Figura 1 e diferenciado na Tabela 1.

Com o aprimoramento da ferramenta U-Net foi possível diferenciar a segmentação precisa de 70% de hifas em 100% dos micélios densos que em um primeiro momento pode ser complicada devido à sobreposição e interseção dos filamentos. Já, para as leveduras foi possível trabalhar a capturar de 70 % de ramificações corretas que é essencial para a análise quantitativa e qualitativa das leveduras. Sendo segundo CENTENO et al., (2023) o principal desafio superado para as leveduras a segmentação de células agrupadas ou aglomeradas, onde o modelo precisou evitar a fusão de células adjacentes.

Conclusão

Foi possível com a utilização da tecnologia U-Net consolidar um banco de imagens para identificar leveduras e fungos filamentosos. Com a melhoria da ferramenta U-Net, foi possível realizar a segmentação precisa de hifas em micélios densos nas imagens de fungos filamentosos como por exemplo da espécie *M. ruber*. Para as leveduras, a ferramenta permitiu capturar de forma correta as ramificações, o que é essencial para análises qualitativas da mesma. Essa ferramenta contribuiu de forma significativa para a área da biologia, pois essa auxilia identificar tipos de contaminações em cultivos laboratoriais desses grupos de microrganismos. A U-Net possibilitou uma melhoria na segmentação das leveduras fe a distinção entre células agrupadas ou aglomeradas. Para trabalhos futuros, essa ferramenta U-Net poderá contribuir para identificar mais estruturas celulares como membrana plasmática e mitocôndrias dentro das células de microrganismos, essa também poderá ser utilizada para bactérias.

Referências

- CAMPBELL, J. L., LORENZ, A., WITKIN, K. L., HAYS, T., LOIDL, J., & COHEN-FIX, O. Yeast nuclear envelope subdomains with distinct abilities to resist membrane expansion. **Molecular biology of the cell**, 17(4), 1768- 1778, 2006.
- CENTENO, A. C., MUÑOZ, S. S., GONÇALVES, I. S., VERA, F. P. S., FORTE, M. B. S., da SILVA, S. S., . HILARES, R. T. Valorization of rice husk by hydrothermal processing to obtain valuable bioproducts: Xylooligosaccharides and Monascus biopigment. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, 6, 100358, 2023.
- FROHLICH, K. U., & MADEO, F. Apoptosis in yeast—a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. **FEBS letters**, 473(1), 6-9, 2000.
- HAPSON, P. K., *Saccharomyces cerevisiae*: a unicellular model genetic organism of enduring importance. **Current protocols essential laboratory techniques**, 16(1), e 21, 2018.
- HILARES, R. T., DIONÍZIO, R. M., MUÑOZ, S. S., PRADO, C. A., de SOUZA JÚNIOR, R., da SILVA, S. S., & SANTOS, J. C., Hydrodynamic cavitation-assisted continuous pre-treatment of sugarcane bagasse for ethanol production: Effects of geometric parameters of the cavitation device. **Ultrasonics sonochemistry**, 63, 104931, 2020.
- JOFRE, F. M., dos SANTOS, H. A., HERNANDEZ-PEREZ, A. F., & Felipe, M. D. G. D. A., Xylitol and ethanol co-production from sugarcane bagasse and straw hemicellulosic hydrolysate supplemented with molasses. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 13(4), 3143-3152., 2023

OLIVEIRA FILHO, J. G., BERTOLO, M. R. V., FERNANDES, S. S., LEMES, A. C., da CRUZ SILVA, G., JUNIOR, S. B., ... & Egea, M. B. Intelligent and active biodegradable biopolymeric films containing carotenoids. **Food Chemistry**, 137454., 2023

PRADO, C. A., CUNHA, M. S., TERÁN-HILARES, R., ARRUDA, G. L. D., ANTUNES, F. A. F., PEREIRA, B., & SANTOS, J. C. D., Hydrodynamic cavitation–assisted oxidative pretreatment and sequential production of ethanol and xylitol as innovative approaches for sugarcane bagasse biorefineries. **BioEnergy Research**, 16(4), 2229-2241, 2023.

Agradecimentos :

O presente trabalho foi realizado com apoio do centro universitário UFBRA.