

Segmentation and 3D Reconstruction of Microbial Biofilms

A. Bouchet, J. I. Pastore, L. G. Di Meglio, L. Robuschi y V. Ballarin

Abstract— Capability of microbial biofilms to form biofilms is really important in biotechnology industries, environmental applications and medical applications. Therefore, the study of the structure and development of these organisms is essential. In this paper we develop and implement an algorithm, based on Mathematical Morphology, to analyze the structure and growing of microbial biofilms. This algorithm allows segmentation of a stack of images acquired from *in vivo* observation of microorganisms, using an inverted phase contrast microscope. Finally, a 3D reconstruction for an efficient visualization of the structure and topography of biofilms is done.

Keywords— Biofilms, Mathematical Morphology, Segmentation, 3D Reconstruction.

I. INTRODUCCIÓN

LA MAYOR parte de los microorganismos se desarrollan en interfases (sólido-líquido, líquido-líquido, sólido-aire) formando comunidades conocidas como “*biofilms*” o películas biológicas [1].

Desde principios de la década de 1970, el interés en la investigación de *biofilms* y las tecnologías basadas en los mismos ha ido en constante aumento [2,3]. Un gran número de aplicaciones de microorganismos en biotecnología resultan más eficientes cuando se utilizan *biofilms* como, por ejemplo, en tratamiento de aguas residuales, fabricación de cerveza, biorremediación, celdas de combustible microbianas, entre otros. Sin embargo, la formación de *biofilms* también puede tener efectos perjudiciales. El biofouling genera grandes gastos en procesos industriales y el 65% de las infecciones intrahospitalarias están relacionadas con microbios adheridos a superficies [3]. Las bacterias que viven en *biofilms* son capaces de resistir a los biocidas y a los antibióticos de un modo más eficaz que aquellas que viven como organismos libres y soportan dosis considerablemente mayores de productos antimicrobianos [4].

Los procesos que involucran el uso de microorganismos halófilos tienen gran importancia biotecnológica [5,6]. El

empleo de estos últimos se observa en la industria alimenticia, las curtiembres y el tratamiento de salmueras entre otros procesos [5], muchos de los cuales son desarrollados en Argentina por métodos convencionales.

El estudio del crecimiento de *biofilms* microbianos, en particular de su morfología y estructura, permitirá desarrollar y optimizar bioprocesos basados en el uso de los mismos.

El Procesamiento Digital de Imágenes (PDI) provee un conjunto de técnicas que permiten procesar la información contenida en una imagen y realizar su segmentación con el fin de delimitar e identificar diferentes componentes estructurales dentro de ella [7,8]. En particular, la Morfología Matemática (MM) es uno de los enfoques existentes para el PDI y constituye una sólida teoría basada en conceptos de geometría y teoría de conjuntos que ha sido aplicada con éxito para el procesamiento de diferentes tipos de imágenes [9-11].

Este artículo tiene como objetivos desarrollar e implementar un algoritmo basado en MM que permita la segmentación de un *stack* de imágenes que surge de la observación *in vivo* de los microorganismos y su posterior reconstrucción 3D para visualizar la estructura y crecimiento de *biofilms* microbianos. A modo de ejemplo, para la aplicación de esta metodología, se utilizó la arquea hiperhalófila *Halorubrum* sp.

II. BIOFILMS

En la naturaleza, los microorganismos pueden existir como estructuras colectivas adheridos entre sí (agregados) y/o a superficies (*biofilm*) formando comunidades sésiles capaces de responder y adaptarse a los cambios en el ambiente y llevar a cabo funciones altamente especializadas similares a las de los organismos multicelulares. Los organismos se mantienen unidos entre sí y a la superficie por medio de polímeros extracelulares como proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos secretados por las células [1,12].

Se han propuesto cinco etapas para la formación de *biofilms* (Fig. 1): (1) fijación inicial, (2) unión irreversible, (3) maduración I, (4) maduración II, y (5) dispersión. En la primera etapa, ocurre la adhesión de células individuales a la superficie. A continuación, se desarrollan las microcolonias y las células secretan polímeros, logrando una adhesión más firme (etapa 2). En la tercera etapa, el *biofilm* joven comienza

A. Bouchet, CONICET – Grupo de Procesamiento de Imágenes, Facultad de Ingeniería, UNMdP, abouchet@fi.mdp.edu.ar

J. I. Pastore, CONICET – Grupo de Procesamiento de Imágenes, Facultad de Ingeniería, UNMdP, jpastore@fi.mdp.edu.ar

L. G. Di Meglio, Instituto de Investigaciones Biológicas, IIB-CONICET-UNMdP, leonardo_dimeglio@yahoo.com.ar

L. Robuschi, CONICET - Lab. de Bioelectroquímica, División Corrosión, INTEMA, lrobuschi@fi.mdp.edu.ar

V. Ballarin, Grupo de Procesamiento de Imágenes, Facultad de Ingeniería, UNMdP, vballari@fi.mdp.edu.ar

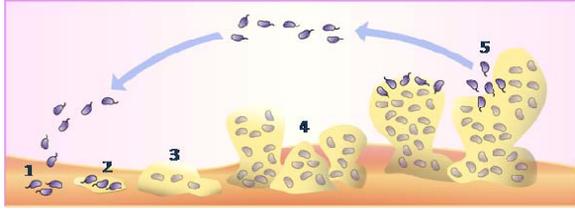


Fig. 1. Etapas del desarrollo de un *biofilm*. (1) Fijación inicial. (2) Unión irreversible. (3) Maduración I. (4) Maduración II. (5) Dispersión. Adaptado de Stoodley et al., 2002 [13].

a estructurarse. Luego, el *biofilm* madura desarrollando una arquitectura característica, determinada por la comunidad microbiana que lo conforma y las condiciones del medio ambiente (etapa 4). En la quinta etapa, algunas células se desprenden del *biofilm* maduro, dispersándose y pudiendo iniciar otra vez el proceso de formación sobre una nueva superficie [13].

III. TÉCNICAS DEL PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

Una imagen en niveles de gris puede ser modelada como una función $f: D_f \subset \square^2 \rightarrow [0, 255]$. En el desarrollo de este trabajo, f denotará una imagen en niveles de gris.

A continuación se presentan las definiciones de los principales conceptos del PDI aplicados en el método propuesto.

A. Morfología Matemática

La MM se basa en conceptos de geometría, álgebra y teoría de conjuntos y fue creada para caracterizar propiedades físicas y estructurales de diversos materiales [9]. Estudia, mediante operaciones no lineales, las estructuras geométricas de las componentes presentes en las imágenes. Esta teoría permite analizar la forma, tamaño, orientación y superposición de objetos presentes en una imagen digital. El aspecto clave de esta metodología reside en el elemento estructurante (EE), un conjunto completamente definido y de geometría conocida, que es comparado con la imagen a partir de traslaciones. La forma y tamaño del EE permiten testear y cuantificar de qué manera dicho elemento se encuentra o no, contenido en la imagen [9, 10].

Las operaciones básicas de la MM son la erosión y la dilatación. Mediante la composición de estas operaciones básicas es posible construir nuevos operadores como, por ejemplo, la apertura y el cierre.

Sean f y g dos imágenes en niveles de gris, con dominios D_f y D_g respectivamente. La dilatación de la imagen f por el EE g , notada por $\delta_g(f)$, se define como [9, 10]:

$$\delta_g(f)_{(s,t)} = \max_{(s-x,t-y) \in D_f, (x,y) \in D_g} \{f(s-x, t-y) + g(x, y)\} \quad (1)$$

La erosión de la imagen f por el EE g , notada por $\varepsilon_g(f)$, se define como [9, 10]:

$$\varepsilon_g(f)_{(s,t)} = \min_{(s+x,t+y) \in D_f, (x,y) \in D_g} \{f(s+x, t+y) - g(x, y)\} \quad (2)$$

Si el EE es plano, es decir $g(x, y) = 0 \forall (x, y) \in D_g$, las ecuaciones (1) y (2) pueden escribirse de la siguiente manera:

$$\delta_g(f)_{(s,t)} = \max_{(s-x,t-y) \in D_f, (x,y) \in D_g} \{f(s-x, t-y)\} \quad (3)$$

$$\varepsilon_g(f)_{(s,t)} = \min_{(s+x,t+y) \in D_f, (x,y) \in D_g} \{f(s+x, t+y)\} \quad (4)$$

Mediante la combinación de las operaciones básicas, pueden definirse los filtros morfológicos básicos apertura y cierre de la siguiente forma [9, 10]:

La apertura morfológica de una imagen f por el EE g es definida por:

$$\gamma_g(f) = \delta_g(\varepsilon_g(f)) \quad (5)$$

La apertura es de utilidad para eliminar pequeños detalles luminosos en relación al EE, quedando el resto de la imagen relativamente sin modificaciones.

El cierre morfológico de una imagen en niveles de gris f por el EE g es definido por:

$$\phi_g(f) = \varepsilon_g(\delta_g(f)) \quad (6)$$

El cierre es de utilidad para eliminar pequeños detalles oscuros en relación al EE, quedando el resto de la imagen relativamente sin modificaciones.

La principal desventaja de la aplicación de los filtros básicos definidos en (5) y (6) es la distorsión producida por el EE sobre las estructuras originales de la imagen [11]. Los filtros básicos pueden combinarse con operadores de reconstrucción en niveles de gris [9] definiendo de esta manera la apertura por reconstrucción y el cierre por reconstrucción [11, 14]:

La apertura por reconstrucción de una imagen f por la imagen marcadora g es definida por:

$$\gamma_{bc,g}^{rec}(f) = \gamma_{bc,g}(f) \quad (7)$$

donde $g = \varepsilon_{bc}(f)$ y bc es el EE utilizado para la reconstrucción. Se reconstruye la imagen f por la imagen marcadora g , mediante iteraciones recursivas, hasta la idempotencia, de la dilatación de g condicionada a f .

El cierre por reconstrucción de una imagen f por la imagen marcadora g es definido por:

$$\phi_{bc,g}^{rec}(f) = \phi_{bc,g}(f) \quad (8)$$

donde $g = \delta_{bc}(f)$ y bc es el EE utilizado para la erosión condicionada. Se reconstruye la imagen f por la imagen marcadora g , mediante iteraciones recursivas, hasta la idempotencia, de la erosión de g condicionada a f .

Mediante la combinación secuencial de los operadores definidos en las ecuaciones (7) y (8) con EEs de tamaño creciente, pueden definirse los Filtros Secuenciales Alternados (ASFs del inglés Alternating Sequential Filters) por reconstrucción [9-11]. Formalmente pueden definirse como sigue:

El filtro secuencial “OC” (opening-closing) de n iteraciones:

$$nb, nc - \gamma^{rec} \phi^{rec}(f) = \gamma_{nb, bc}^{rec}(\phi_{nb, bc}^{rec}(\dots \gamma_{b, bc}^{rec}(\phi_{b, bc}^{rec}(f)))) \quad (9)$$

El filtro secuencial “CO” (closing-opening) de n iteraciones:

$$nb, nc - \phi^{rec} \gamma^{rec}(f) = \phi_{nb, bc}^{rec}(\gamma_{nb, bc}^{rec}(\dots \phi_{b, bc}^{rec}(\gamma_{b, bc}^{rec}(f)))) \quad (10)$$

donde $n \in \mathbb{N}$ y nb representa:

$$nb = \underbrace{\delta_b(\delta_b(\dots(\delta_b(b))))}_{(n-1) \text{ veces}} \quad (11)$$

Los ASFs por reconstrucción permiten homogeneizar regiones de la imagen, eliminando estructuras que no son de interés produciendo menor distorsión que los ASFs tradicionales en los bordes de las estructuras de la imagen.

B. Segmentación de Imágenes

Dentro de la MM una técnica de segmentación de imágenes sumamente útil es la transformada Top-Hat. La segmentación de imágenes es el proceso de dividir a la imagen en varias partes, grupos de píxeles u objetos. Su objetivo es simplificar y/o cambiar la representación de una imagen en otra más significativa y más fácil de analizar. La segmentación se utiliza tanto para localizar objetos de interés como para determinar los límites de éstos dentro de una imagen.

Al aplicar la transformada Top-Hat se logra descubrir aquellas estructuras de la imagen que han sido eliminadas en el filtrado de apertura o cierre. Con la elección de un EE de forma, tamaño y orientación adecuados es posible filtrar la imagen y eliminar determinados elementos de la imagen original, despreciando las regiones que no son de interés en el análisis a realizar. Para esto se utiliza un EE de mayor tamaño que las estructuras de la imagen a detectar. Una operación de diferencia entre la imagen original y la imagen filtrada aumenta considerablemente el contraste de las zonas eliminadas.

La transformada Top-Hat por apertura se define como el residuo entre la identidad y la apertura morfológica [9, 10]:

$$\rho_g^{apert}(f) = f - \gamma_g(f) \quad (12)$$

Esta transformada resalta objetos localmente brillantes que han sido eliminados en el filtrado de apertura en una imagen en niveles de gris.

La transformada Top-Hat por cierre se define como el residuo entre el cierre morfológico y la identidad [9, 10]:

$$\rho_g^{cierre}(f) = \phi_g(f) - f \quad (13)$$

Esta transformada resalta objetos localmente oscuros que han sido eliminados en la aplicación del cierre morfológico.

IV. MATERIALES

En el presente trabajo se emplearon las imágenes obtenidas del desarrollo de *biofilm* de la arquea hiperhalófila *Halorubrum* sp. La misma fue crecida en celdas de flujo de tipo canal utilizando vidrio como sustrato para la población sésil y siguiendo protocolos estándar según Gilbert y Allison

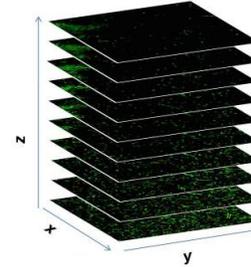


Fig. 2. Stack de imágenes digitales a distintas profundidades del biofilm.

[15]. Una vez iniciado el crecimiento, se realizó la observación *in vivo* de los microorganismos por medio de un microscopio invertido de contraste de fases Nikon TiU con el eje Z motorizado y equipado con una cámara refrigerada Nikon DS-Qi1Mc U2 conectada a una PC, obteniendo un *stack* de imágenes digitales a distintas profundidades del biofilm (ver Fig. 2), a partir de las cuales se pudo reconstruir la estructura 3D del biofilm.

V. MÉTODO PROPUESTO

El algoritmo desarrollado se dividió en las siguientes etapas:

Etapas:

Etapas:

Etapas:

Etapas:

Para los pasos 1 a 3 cada imagen del *stack* es considerada como una imagen independiente, por lo que su ubicación en la profundidad del *stack* del *biofilm* no es relevante hasta la etapa 4. A continuación se detalla cada una de las etapas que conforman el algoritmo desarrollado:

1) *Filtrado morfológico*: Cada una de las imágenes del *stack* fueron filtradas para homogeneizar los niveles de gris de la superficie de la imagen con ASFs por reconstrucción, con secuencia opening- closing y un EE inicial plano con forma de disco unitario;

2) *Top-Hat por cierre*: Se aplicó esta transformada con el objeto de resaltar los objetos localmente oscuros en cada imagen del *stack*.

3) *Binarización*: Se binariza el conjunto de imágenes obtenidas en la etapa anterior para obtener una imagen donde se visualicen únicamente los objetos de interés.

4) *Reconstrucción 3D*: Utilizando el conjunto de imágenes binarias del paso 3, se simuló una superficie 3D que modela la estructura y topografía de los *biofilms* permitiendo observar,

bajo distintos ángulos, la conformación del *biofilm* o parte del mismo.

El algoritmo fue implementado en MatLab® R2008a, utilizando funciones generales de este programa y una librería específica de MM denominada SDC Morphology Toolbox (SDC, 2001) [16] para la aplicación de los ASFs por reconstrucción.

VI. RESULTADOS

En esta sección se muestran los resultados obtenidos a partir de la aplicación del método propuesto. En la Fig. 3 se pueden observar, en la primer columna, las imágenes originales; en la segunda columna, las imágenes resultantes al aplicar el algoritmo propuesto en este trabajo y, por último, la superposición de la imagen resultado sobre la imagen original con el fin de visualizar la segmentación obtenida. A modo de ejemplo, se eligieron tres niveles de profundidad (inicial-intermedio-final).

En la Fig. 4 se observa la reconstrucción 3D de la estructura de un *biofilm* de *Halorubrum* sp. En esta reconstrucción tridimensional se pueden apreciar las estructuras características que forman las células en *biofilm*. En el ejemplo se observan zonas de cúmulos microbianos así como los canales que los circundan y permiten la circulación de nutrientes y deshechos dentro y hacia afuera del *biofilm*.

La reconstrucción de la estructura de un *biofilm* a partir de las imágenes de un *stack*, ofrece una visualización poderosa que permite observar bajo distintos ángulos la conformación del *biofilm* o parte del mismo.

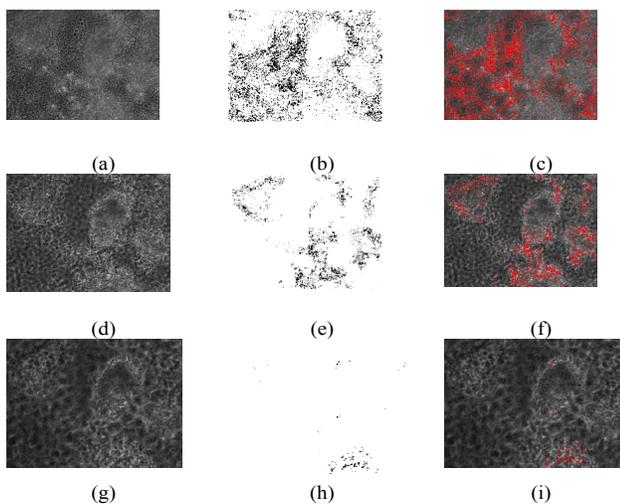


Fig. 3. (a)-(d)-(g) Imagen original. (b)-(e)-(h) Imagen resultado. (c)-(f)-(i) Superposición.

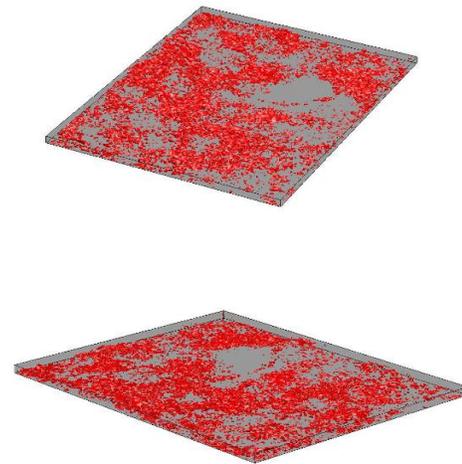


Fig. 4. Diferentes vistas de la reconstrucción 3D del *biofilm* de *Halorubrum* sp.

VII. CONCLUSIONES

La caracterización morfológica de *biofilms* permite a los investigadores del área crear un juicio objetivo sobre las características estructurales de un *biofilm* y entre *biofilms*, a través de medidas de cobertura de superficie, porosidad de superficie, correlación espacial, entropía, etc. En este trabajo se presentó un método automático, basado en Morfología Matemática, para la segmentación de un *stack* de imágenes que surge de la observación *in vivo* de microorganismos, con el fin de analizar y visualizar la estructura y desarrollo de su crecimiento. Por otro lado, la vectorización de las imágenes segmentadas facilita la visualización, permitiendo navegar en la estructura 3D y observar de mejor forma las estructuras internas que no son fácilmente visibles desde una perspectiva exterior.

REFERENCES

- [1] P.S. Stewart, and M.J. Franklin, "Physiological heterogeneity in biofilms," *Nat Rev Micro*, vol. 6, pp. 199-210, 2008.
- [2] H.M. Lappin-Scott, J. Jass, and J.W. Costerton, *Microbial Biofilms: Formation and control. Cap. 1*. Eds. Denyer, S. P., Gorman, S. P. & Sussman, M. Blackwell scientific Publications, London, 1993, pp. 29-50.
- [3] E. Karunakaran, J. Mukherjee, B. Ramalingam, C.A. Biggs, "*Biofilmology*": a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. Appl Microbiol Biotechnol, 2011.
- [4] J.G. Elkins, D.J. Hassett, P.S. Stewart, H.P. Schweizer, and R. McDermott, *Protective Role of Catalase in Pseudomonas aeruginosa Biofilm Resistance to Hydrogen Peroxide*. App. and Environ. Mic., vol. 65 (10), pp. 4594-4600, 1999.
- [5] R. Margesin, and F. Schinner, *Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology*. Extrem., vol. 5, pp. 73-83, 2001.
- [6] F. Kargi, *Enhanced biological treatment of saline wastewater by using halophilic bacteria*. Biotechnology Letters, vol. 24, pp. 1569-1572, 2002.
- [7] R.C. Gonzalez and R.E. Woods, *Digital image processing*, Upper Saddle River, Prentice Hall, N. J., 2002.
- [8] G.A. Baxes, *Digital image processing: principles and applications*, Wiley, New York, 1994.

- [9] J. Serra, *Image Analysis and Mathematical Morphology*, Vol I, Academic Press, London, 1982.
- [10] J. Serra, *Image Analysis and Mathematical Morphology*, Vol II, Academic Press, London, 1988.
- [11] J.I. Pastore, E. Moler y G. Meschino, "Segmentación de biopsias de médula ósea mediante filtros morfológicos y rotulación de regiones homogéneas", *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, vol. 21, pp. 37-44, 2005.
- [12] J.W. Costerton, P.S. Stewart and E.P. Greenberg, "Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections", *Sci.*, vol. 284 (5418), pp. 1318-1322, 1999.
- [13] P. Stoodley, K. Sauer, D.G. Davies, and W. Costerton, "Biofilms as Complex Differentiated Communities" *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 56, pp. 187-209, 2002.
- [14] J.A. Bangham y S. Marshall, "Image and Signal processing with mathematical morphology", *IEE Electronics & Communication Engineering Journal*, pp. 117-28, 1998.
- [15] P. Gilbert and D.G. Allison, *Microbial Biofilms: Formation and control*. Cap. 3. Eds. Denyer, S. P., Gorman, S. P. & Sussman, M., pp. 29-50. Blackwell scientific Publications, London, 1993.
- [16] SDC. SDC Morphology Toolbox for MATLAB 5. User's Guide. SDC Information Systems, 2001.



Agustina Bouchet nació en la ciudad de Mar del Plata, Argentina, en 1980. Obtuvo sus títulos de Profesora en Matemática y Licenciada en Ciencias Matemáticas en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata, en los años 2003 y 2005, respectivamente. En 2010 obtuvo el título de Doctora en Ingeniería orientación Electrónica. Desde 2002 trabaja en el Laboratorio de Procesos y Mediciones de Señales, del Departamento de Electrónica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata, estudiando el comportamiento de los operadores de la Morfología Matemática Difusa y su aplicación en el Procesamiento de Imágenes Médicas. Actualmente es becaria postdoctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).



Juan Ignacio Pastore nació en la ciudad de Balcarce, Argentina, en 1977. Obtuvo sus títulos de Profesor en Matemática e Informática Educativa, Profesor en Matemática y Licenciado en Ciencias Matemáticas en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata, en los años 2000, 2001 y 2002, respectivamente. En 2009 obtuvo el título de Doctor en Ingeniería orientación Electrónica. Desde 1998 el Dr. Juan Ignacio Pastore es miembro del Laboratorio de Procesos y Mediciones de Señales, dependiente del Departamento de Electrónica de la Facultad de Ingeniería. Su área de investigación se ha centrado en el Procesamiento de Imágenes aplicando técnicas de Morfología Matemática. También se desempeña como investigador asistente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).



Leonardo G. Di Meglio obtuvo su título de Licenciado en Ciencias Biológicas en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata en el año 2010. Actualmente se encuentra realizando el Doctorado en Ciencias, Área Biología en dicha Facultad desarrollándose como becaria de Postgrado Tipo I de CONICET. Desde 2009 el Lic. Leonardo G. Di Meglio es miembro del Instituto de Investigaciones Biológicas de Mar del Plata (UNMdP-CONICET), realizando parte de su trabajo en el Laboratorio de Bioelectroquímica, División Corrosión, del Instituto en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA-CONICET). Su tema de investigación se centra en el estudio de biofilms de microorganismos hiperhalófilos, su análisis funcional, estructural y su relación con el medio ambiente.



Luciana Robuschi obtuvo su título de Licenciada en Ciencias Biológicas en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata en el año 2008. Actualmente se encuentra realizando el Doctorado en Ciencias, Área Biología en dicha Facultad desarrollándose como becaria de Postgrado Tipo II de CONICET. Desde 2008 la Lic. Luciana Robuschi es miembro del Laboratorio de Bioelectroquímica, División Corrosión, del Instituto en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA-CONICET). Su tema de investigación se centra en el estudio de biofilms electrogénicos, su análisis funcional y estructural.



Virginia Laura Ballarin es Profesora Titular Exclusiva e Investigadora categoría I del Departamento de Ingeniería Electrónica de la Universidad Nacional de Mar del Plata. Es actualmente Vice Presidenta de la Sociedad Argentina de Bioingeniería y Directora del Grupo de Procesamiento Digital de Imágenes de la Facultad de Ingeniería de la UNMdP. Recibió su título de Ingeniera Elect. c/o Electrónica y de Magister Scientae de la Universidad Nacional de Mar del Plata y de Doctora en Cs. Biológica orientación Electrónica de la Universidad Nacional de Tucumán. Ha dirigido 11 tesis de posgrado y 18 de Grado y ha publicado más de cincuenta artículos en revistas con referato y más de cien presentaciones en congresos nacionales e internacionales en los tópicos de procesamiento de digital de imágenes especialmente médicas.