

# VALIDAÇÃO DE MÉTODO BASEADO EM VISÃO COMPUTACIONAL PARA AUTOMAÇÃO DE CONTAGEM DE VIABILIDADE DE LEVEDURAS EM INDÚSTRIAS ALCOOLEIRAS.

ARNALDO IBANHE MONGELO<sup>1</sup>  
DIOGO SOARES DA SILVA<sup>2</sup>  
LIA NARA BALTA QUINTA<sup>3</sup>  
HEMERSON PISTORI<sup>4</sup>  
MARNEY PASCOLI CEREDA<sup>5</sup>

**RESUMO:** A automação aumenta a velocidade de processamento das informações, com reflexos na produtividade e eficiência do processo produtivo. Este artigo aborda a automação do método de análise de viabilidade de leveduras usado em usinas de álcool com um “software” denominado BioViC e sua validação pela comparação com métodos clássicos. Para isso, uma fermentação foi acompanhada pela contagem de células viáveis e inviáveis. O número de células viáveis foi obtido pelo método padrão de contagem em placas. A avaliação feita pelo método tradicionalmente usado nas usinas que usa azul de metileno em câmara de Neubauer ao mesmo tempo em que imagens foram captadas e avaliadas em microscópio óptico. Posteriormente, essas imagens foram submetidas a técnicas de visão computacional e reconhecimento de padrões. A análise estatística do número de células de leveduras viáveis e inviáveis obtida para visão humana e com BioViC (visão computacional) não diferiu para as amostras com Brix 6 e 3, mas ambas superestimaram a contagem padrão por plaqueamento. O BioViC contou melhor as leveduras inviáveis (azuis) que as viáveis (incolores), portanto há necessidade de ajuste da automação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Visão computacional, inovação, leveduras viáveis, etanol, automação.

## VALIDATION OF A COMPUTER VISION-BASED METHOD FOR THE AUTOMATION OF THE COUNTING PROCESS FOR YEAST VIABILITY DETERMINATION ON ETHANOL DISTILLERIES.

**ABSTRACT:** Automation increases information processing speed, with gains in production productivity and efficiency. This paper investigates the automation of the method for yeast viability analysis used in the distilleries with the software (BioViC) and its validation in comparison to classical methods. For that a fermentation was followed by counting the viable and not viable cells. The number of viable cells was obtained by standard plate count. The evaluation was performed by the direct method traditionally used in distilleries by using staining with methylene blue in a Neubauer chamber, at the same time that images were captured and evaluated using an optical microscope. Subsequently, these images were

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo, Mestrando em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco, UCDB, bolsista FUNDECT, Campo Grande-MS. E-mail: aimongelo@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Aluno graduação Engenharia da Computação-GPEC/INOVISÃO- Universidade Católica de Campo Grande UCDB. E-mail: Diogo.ec.2013@gmail.com

<sup>3</sup> Engenheira de Computação, Mestranda em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco, UCDB, Campo Grande-MS. E-mail: lianaraq@gmail.com

<sup>4</sup> Engenheiro de Computação, docente-pesquisador da Universidade Católica Dom Bosco, UCDB-INOVISÃO, Campo Grande-MS. E-mail: pistori@ucdb.br

<sup>5</sup> Engenharia Agrônoma, Docente permanente do programa de Mestrado em Biotecnologia - UCDB, Centro de Tecnologia e Análise do Agronegócio, Campo Grande/MS. E-mail: cereda@ucdb.br

subjected to techniques of computer vision and pattern recognition techniques to identify and count viable and non viable yeast. Statistical analysis of the number of viable and non viable yeast obtained by human vision and by BioViC (computer vision) not differ for Brix 6 and 3, but are overestimated in relation to plating counts. The BioViC results were much better with blue colored cells (non viable) than the colorless (viable) cells, so the automatized method needs some adjustments.

**KEYWORDS:** Computer vision, innovation, viable yeasts, ethanol, automation

## 1. INTRODUÇÃO

Entende-se como fundamental o avanço tecnológico, assim como a geração e incorporação de inovações para manter e aprimorar a competitividade do etanol produzido no Brasil. Na área específica da fermentação alcoólica e de seu acompanhamento, muito pouco foi feito em automação. O etanol no Brasil é produzido por via fermentativa usando leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. As destilarias alcoólicas brasileiras operam com o sistema de fermentação denominado "Melle-Boinot", nos quais as leveduras são recicladas por fermentações consecutivas (LIMA, AMORIM e BASSO, 2001). O método clássico de contagem de microrganismos viáveis é realizado em placas de Petri contendo meio de cultura e pode levar até 72 horas. Pelo tempo que é necessário para conseguir a contagem, esse método não pode ser usado nas usinas. Em razão deste obstáculo, o método padronizado e adotado pelas usinas é o método de azul de metileno em câmara de Neubauer, com contagem em microscópio óptico como descrito por Lee; Robinson; Wang (1981).

Na perspectiva de suprir as necessidades da indústria é necessário considerar a automação que possibilita aumentar a velocidade de processamento das informações para tomada de decisões (EID e SCOPINHO, 1998). No Brasil, Corrêa et al. (1990) relatam análise de viabilidade de células em microscópio de fluorescência, no entanto, o método apesar de sensível e simples é oneroso. Na área de visão computacional, Lamprecht, Sabatini e Carpenter (2007) desenvolveram um software de código aberto que pode reconhecer as partículas por diferentes atributos das regiões de interesse (ROI), como a morfologia, cor, textura, entre outros.

Embora disponíveis, fica difícil adotar as técnicas citadas em avaliação de viabilidade das leveduras em razão da necessidade de adaptação para a detecção e classificação das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Para viabilizar a substituição da visão humana pela computacional, que caracteriza a automação, há necessidade de validar a tecnologia com o método de corante usado nas usinas, mas também com o método clássico de contagem em placas. Assim a pesquisa interdisciplinar teve como objetivo comparar o método usado nas usinas brasileiras com as contagens realizadas com visão computacional, como forma de melhorar o desempenho das usinas no acompanhamento da viabilidade de leveduras em imagens digitalizadas de lâminas tratadas com corantes vitais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa, de caráter multidisciplinar, foi desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Visão Computacional (INOVISÃO) e pelo Grupo de Biotecnologia Aplicada a Agroindústrias da Universidade Católica Dom Bosco, MS, onde os ensaios foram realizados.

### 2.1. A fermentação alcoólica

O mosto ajustado em 12° Brix foi inoculado com leveduras selecionadas *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 1% (p/v). Cada ensaio constou de 1,5 litros de mosto inoculado, em triplicata, em recipientes plásticos de 2 litros. Amostragens foram feitas sempre quando o valor caiu para °Brix 6 e 3.

## **2.2. Avaliação das células de leveduras por microscópio**

Utilizou-se coloração com azul de metileno como descrito por Ceccato-Antonini (1996). Uma alíquota da mistura de amostra e corante foi transferida para a câmara de Neubauer e a avaliação realizada em microscópio óptico com aumento de 400X, dotado de interface para captação de imagem. As células com alta atividade fisiológica não se colorem (incolores) enquanto que as células inviáveis são coloridas de azul. As mesmas imagens contadas entre 4 retículos padronizado da lâmina foram captadas para avaliação por visão computacional.

## **2.3. Avaliação e contagem das células de leveduras pelas fotos**

As imagens captadas dos campos da lâmina foram transferidas para um laptop e recortadas através de um programa de editor de imagens “Microsoft Office Picture Manager ©” de maneira que em cada imagem permanecesse somente os 4 retículos que foram posteriormente contados através do “software”.

## **2.4. Avaliação das células de leveduras por contagem pelo BioViC**

O BioViC é um “software” baseado em visão computacional desenvolvido para a contagem de leveduras em imagens digitalizadas. Este software pode ser dividido em três módulos principais:

**Pré-processamento:** consiste em preparar a imagem para a coleta de seus atributos e posterior classificação. Este módulo faz o realce das leveduras, separa as células que podem estar juntas e elimina todo o fundo da imagem, deixando somente a parte central da levedura. Este procedimento tem a finalidade de evitar possíveis enganos do classificador com os “ruídos” da imagem ou agrupamentos de leveduras.

**Extração de Atributos:** Nesta etapa somente as regiões de interesse (ROI), que são as regiões que continuaram na imagem após o pré-processamento, são analisadas. Cada ROI apresenta as informações de cada levedura. Com estas informações (atributos de forma, cor e textura) foi criado um arquivo ARFF (Attribute-relation File Format), que armazena as informações obtidas para a posterior classificação. Para a extração de atributos de forma foi aplicado o algoritmo de Kcurvatura definido por Silva e Gonçalves (2007) e “Shape Descriptors” conforme Queiroz e Pistori (2010). Já para a extração de atributos de cor foram extraídos os valores no modelo de cor HSB descrito por Quinta e Pistori (2009). Para atributos de textura foram utilizados mapas de iteração.

**Classificação das Leveduras:** Com o arquivo ARFF gerado, a classificação pode ser realizada, comparando os atributos do conjunto de treinamento com as informações extraídas da imagem a ser testada, decidindo assim a qual classe a levedura pertence, neste caso viável ou inviável. Para os experimentos foram utilizados o algoritmo de aprendizagem supervisionada C4.5 de acordo com Quinlan (1996) com os parâmetros “default” do “software” Weka.

Foram utilizadas cinco imagens para o treinamento, e cada uma destas imagens foram extraídas amostras de viável e inviável e 96 imagens foram usadas para os testes que geraram os resultados apresentados.

## **2.5. Contagem das células viáveis de leveduras por plaqueamento**

O plaqueamento foi feito como padrão para estabelecer o número real de células viáveis. As mesmas amostras coletadas para a avaliação por corante foram diluídas em séries decimais em solução salina (0,85%). Volumes de 0,1 mL de cada diluição espalhados com o auxílio da alça de Drigalsky em placas de Petri contendo meio de cultura Extrato de Malte Agar. As placas

foram incubadas a 30°C por 24-72 horas e posteriormente contadas com intervalo de 24 horas (TORTORA; FUNKE; CASE et al. 2002).

## 2.5. Análise estatística

Os resultados das avaliações de células viáveis e inviáveis (corante vital) e das viáveis por contagem em placa foram calculados em médias que foram submetidas a análise de Variância com teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software SISVAR.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens em placas e avaliações por visão humana e computacional ao longo do processo de fermentação são apresentadas na Tabela 01, ajustadas para o mesmo índice de células de leveduras  $10^{11}$ . Como esperado o teor de açúcares do mosto caiu a partir de 12° Brix até 3° Brix, quando a fermentação foi considerada estabilizada para fins de contagem. A medida que o açúcar foi sendo consumido e o etanol formado, a contagem reduziu, mas as médias não diferiram significativamente. A contagem em placas é o método padrão para leveduras viáveis, mas não conta as inviáveis, uma vez que o método baseia-se no fato de que cada célula microbiana viável irá formar uma colônia visível e isolada quando fixada em um meio de cultura sólido adequado (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA,1997).

**Tabela 01:** Valores médios para as três técnicas de contagens de células de leveduras viáveis e inviáveis, em amostras coletadas de fermentação alcoólica, em dois valores de Brix (médias de três repetições).

| Método de contagem | °Brix | Células Viáveis $10^{11}/L$ | Células Inviáveis $10^{11}/L$ | °Brix | Células Viáveis $10^{11}/L$ | Células Inviáveis $10^{11}/L$ |
|--------------------|-------|-----------------------------|-------------------------------|-------|-----------------------------|-------------------------------|
| Plaques            | 6     | 0,2418 a                    | ----                          | 3     | 0,1708 a                    | ----                          |
| BioVic             | 6     | 0,9292 b                    | 0,4195 a                      | 3     | 0,9694 ab                   | 0,4041 a                      |
| Imagens            | 6     | 1,6083 c                    | 0,3569 a                      | 3     | 1,4792 b                    | 0,3750 a                      |
| Microscópio        | 6     | 1,6195 c                    | 0,3403 a                      | 3     | 1,4236 b                    | 0,3625 a                      |
| Média Geral        |       | 1,0997                      | 0,3722                        |       | 1,0108                      | 0,3805                        |
| CV %               |       | 12,57                       | 13,28                         |       | 30,60                       | 14,09                         |

\* Médias seguidas por uma mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade.

O coeficiente de variação (CV) do experimento variou de 12,57, 13,28, 30,60 e 14,09 % (Tab.01) para as contagem (viáveis e inviáveis) em Brix 6 e para as inviáveis em Brix 3, valores esses que podem ser considerados altos para experimento de laboratório, com a maior variação ocorreu na contagem de células inviáveis (azuis) nas três metodologias avaliadas.

Comparando-se os resultados da avaliação de células viáveis e inviáveis por visão humana e computacional (BioViC), observa-se que a contagem por visão humana e a computacional sobre as imagens (fotos) não diferiram para as amostras com Brix 6 e 3, evidenciando o potencial para uso das imagens digitalizadas em um módulo de visão computacional. Em Brix 6 houve diferença significativa entre a contagem por placa confrontada com visão humana e computacional, mas quando o valor do Brix caiu a 3 e ocasionou maior estresse por exposição ao etanol gerado, os três métodos apresentaram a mesma contagem apenas para as leveduras consideradas inviáveis (azuis). Para as células viáveis (incolores) as contagens não diferiram entre imagens e visão humana, embora superestimasse a contagem em relação as placas. O BioViC apresentou contagens intermediárias entre as placas e a contagem por imagem ou visão humana. A avaliação feita por visão humana e computacional não diferiram nas contagens para as leveduras inviáveis, mostrando que o “software” avaliou melhor as células

coloridas de azul que as incolores. Isto foi causado pela baixa representatividade do conjunto de treinamento (cinco imagens), sendo agravado pela semelhança entre as viáveis e o fundo da imagem.

#### 4. CONCLUSÕES.

Os resultados obtidos permitiram estabelecer maior acerto para leveduras inviáveis em função de atributos de cor. Como o importante para a aplicação desta metodologia de automação da contagem são as células viáveis, que estão diretamente ligadas ao tempo de fermentação e rendimento de etanol, há necessidade de ajuste da metodologia.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CECCATO - ANTONINI, S.R. **Guia prático de microbiologia**. Araras: UFSCar. (1996),
- CORRÊA, B. et al. Método fluorescente (diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) para o estudo da viabilidade de *Cryptococcus neoformans* em liquor. Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo v. 32, p.46-50, 1990.
- EID, F.; SCOPINHO, R. A. (coord.). Reestruturação produtiva, política industrial e contratação coletiva nos anos noventa: as propostas dos trabalhadores. Agroindústria da cana-de-açúcar Projeto de Pesquisa e Formação Sindical, GEP-SUCRO, São Carlos. 1998.
- LAMPRECHT M. R.; SABATINI D. M. and CARPENTER A. E. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. **BioTechniques**, v. 42, pp. 71-75, 2007.
- LEE, S.S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, n.11, p.641-649, 1981.
- LIMA, U. A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. de. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.;SCHIMIDELL, W. **Biotechnologia industrial**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, v.3, cap. 1, p.1-39, 2001.
- QUEIROZ, J. H. F. de S.; PISTORI, H.. **Desenvolvimento de um sistema de visão computacional para o monitoramento e controle de experimentos laboratoriais realizados com larvas do aedes aegypti I**, 2010. Qualificação de Bacharel em Engenharia de Computação na Universidade Católica Dom Bosco , Campo Grande – MS.
- QUINLAN, J. R. Improved use of continuous attributes in C4.5. **Journal of Artificial Intelligence Research**, v. 4, p.77– 90, 1996.
- QUINTA, L. N. B.; PISTORI H. **Desenvolvimento de um sistema de visão computacional para o controle microbiano em processos de produção de etanol**, 2009. Qualificação de Bacharel em Engenharia de Computação na Universidade Católica Dom Bosco,Campo Grande - MS .
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V., SILVEIRA, N. **Contagem total de microorganismos Mesófilos, Aeróbios Psicrófilos e Bolores e Leveduras em placas**. In: **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. p. 7-29, 1997.
- SILVA, J. A.; GONÇALVES, W. N. **Modelos ocultos de markov aplicados na identificação de comportamento de animais**, 2007. Qualificação de Bacharel em Engenharia de Computação na Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande - MS
- TORTORA, G.J. FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827p.