

ІНФОРМАЦІЙНА ТЕХНОЛОГІЯ ОЦІНКИ КОЛЬОРОВИХ ЗОБРАЖЕНЬ МЕТАХРОМАЗІЇ ВОЛЮТИНОВИХ ГРАНУЛ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* УКМ Y-517

О.М. Громозова¹, Т.Л. Качур¹, В.В. Вишневецький², О.С. Сичов²

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

²Інститут проблем математичних машин і систем НАН України,
проспект Академіка Глушкова, 42, Київ, 03187, Україна
e-mail: gren.elen@gmail.com

Дослідження присвячене розробці інформаційної технології аналізу кольорових зображень, що є актуальним для оцінки результатів цитохімічних досліджень як в біології, так і в медицині. **Мета.** Розробка алгоритмів та відповідного програмного забезпечення для якісного та кількісного обліку реакції метахромазії волютинових гранул дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517, а також комплексної інформаційної технології для проведення моніторингових досліджень, що базуються на використанні цих мікроорганізмів. **Матеріали та методи.** Об'єкт дослідження – дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517 з української колекції мікроорганізмів, що культивували впродовж 24 год. при 28^o С. Реакцію метахромазії волютинових гранул фіксували при мікроскопіюванні препаратів, забарвлених метиленовим синім за методом Льюфлера. Фотографії клітин у цифровому вигляді передавали до спеціалізованого порталу та обробляли за допомогою комп'ютерного аналізу. **Результати.** Алгоритм комп'ютерного аналізу зображень складався з 3-х етапів: 1. Визначення (розпізнавання) поодиноких волютинових гранул; 2. Оцінка ступеня метахромазії для окремої гранули; 3. Інтегральна оцінка ступеня метахромазії для всього зображення. Розроблено та апробовано інформаційну технологію для підтримки моніторингу явища метахромазії, що включає отримання цифрових зображень, їх транспорт до віддаленого портального сервера та автоматичну обробку. Інформаційна технологія інтегрована до порталу масштабного біофізичного експерименту «Геліомед». **Висновки.** Запропонований метод комп'ютерної обробки зображень дозволив дати кількісну та якісну оцінку в автоматичному режимі метахроматичному забарвленню волютинових гранул та підтвердив раніше запропоновану класифікацію цього явища на основі візуальної експертизи.

Ключові слова: волютинові гранули, метахромазія, цифрове зображення, інформаційна технологія, RGB-модель.

Сучасні цитохімічні дослідження потребують інструментальних методів оцінки результатів. Особлива увага повинна приділятися розробці інформаційних (автоматизованих) технологій аналізу кольорових зображень. Саме такі питання були актуальні при визначенні результатів тривалого моніторингу реакції метахромазії (МТХ) волютинових гранул в умовах зміни космічної погоди (біо-астрономічний ефект Чижевського-Вельхова) [1]. Як відомо, в основу реакції покладено характерний зсув у спектрі поглинання барвника (метиленового синього), який викликаний його агрегацією (за певних умов) при взаємодії з неорганічними поліфосфатами – основними компонентами

волютинових гранул [2, 3]. Багаторічні дослідження цього ефекту підтвердили зв'язок між мікроорганізмами (за цією ознакою) та космофізичними факторами [4]. Таким чином, можна розглядати цей показник як потенційний біоіндикатор геофізичних подій. Не менш важливе впровадження комп'ютерної оцінки зображень при цитохімічних методах ідентифікації волютинових гранул у процесах очистки стічних вод від надлишків фосфору та важких металів [5]. Саме завдяки наявності неорганічних поліфосфатів волютинові гранули мікроорганізмів можуть давати метахроматичне забарвлення, що є в основі цитохімічної ідентифікації цих структур [6].

Метою роботи було дослідження валідності алгоритмів програмного забезпечення та комплексної інформаційної технології для якісного та кількісного обліку реакції метахромазії волютинових гранул дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517 з Української колекції мікроорганізмів. Умови проведення експерименту були строго стандартизовані. Культивування проводили на середовищі сусло-агар в термостаті при 28° С впродовж 24 год. Одночасно з пересівом клітин на свіже середовище робили мазок на предметному склі. Після підсихання мазок фіксували жаром та фарбували метиленовим синім за Льюфлером [7]. Аналіз результатів проводили при мікроскопіюванні (мікроскоп "PrimaStar", Zeiss) візуально. Відсутність метахромазії (синє забарвлення волютину) позначали як 1; 2–3, відповідно, різний ступінь прояву метахромазії (рис.1). Для подальшої комп'ютерної оцінки зображення мазки фотографували при збільшенні $\times 1000$ та в цифровому форматі надсилали до спеціалізованого порталного серверу проекту «Геліомед» (<http://geliomed.immsp.kiev.ua>).

Алгоритм комп'ютерного аналізу зображень складався з 3-х етапів: 1. Визначення (розпізнавання) поодиноких волютинових гранул; 2. Оцінка ступеня МТХ для окремої гранули; 3. Інтегральна оцінка ступеня МТХ для всього зображення.

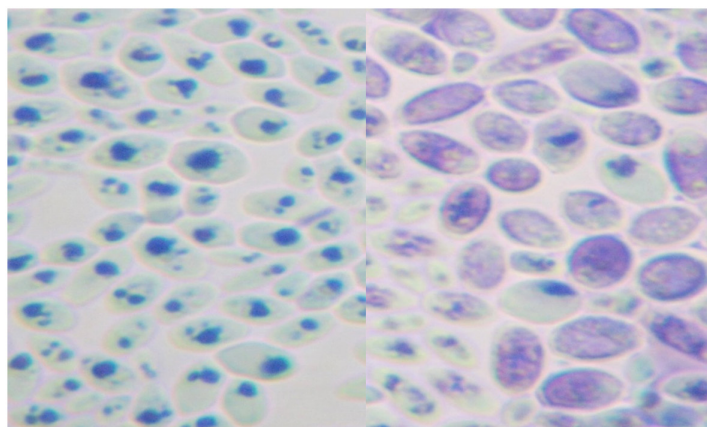
Визначення волютинових гранул на зображенні проводилося шляхом аналізу яскравості окремих ділянок. Волютинові гранули мають вигляд темних плям, оточених більш світлою

частиною клітини. Послідовність аналізу зображення: 1 – знаходимо середню яскравість для частини зображення; 2 – визначаємо частини зображення з яскравістю нижче середньої, котрі оточені пікселями з більшою яскравістю; 3 – проводимо фільтрацію зображення від сторонніх шумів. Додатково були введені наступні обмеження: розмір гранул від 20 до 100 пікселів, края зображення по 120 пікселів з кожної сторони не приймалися до уваги. Таким чином, при використанні цієї схеми розпізнавалося до 97 % волютинових гранул. Для кожного зображення в середньому зафіксовано 300–400 волютинових гранул.

Для остаточної статистичної обробки результатів щодо кількісної оцінки клітин дріжджів з виявленим метахроматичним забарвленням та клітин з його відсутністю, в тому числі для побудови графіків гістограм цієї статті, застосовували програму MS Excel 2007.

Результати та їх обговорення. Як показав автоматичний аналіз зображень пофарбованих метиленовим синім клітин дріжджів, при відсутності метахромазії переважала синя складова (Рис. 2, тип 1). При вираженому ефекті МТХ синя та червона складові були близькі між собою або червона незначно переважала. Зафіксовано 2 типи перехідних процесів. В першому випадку це поступова зміна кольору від синього до червоного, що фіксується частіше. У другому випадку – відмічено появу червоних ділянок в середині синьої волютинової гранули.

Було випробувано декілька алгоритмів для розрахунку індексу МТХ. Найбільше співпадіння з візуальною оцінкою було з наступним індексом:



Тип 1

Тип 3

Рис. 1. Приклади зображень дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517, пофарбованих метиленовим синім

$$IndexMTX \quad VZ = 100 \times \overline{red} / \overline{blue}$$

де $\overline{red}, \overline{blue}$ – середні інтенсивності червоної і синьої компоненти волютинових гранул.

Результати розрахунку індексу МТХ за даною формулою представлені у таблиці 1. Даний параметр стабільно працює для широкого спектру значень яскравості та балансу білого вихідних зображень.

Слід зазначити, що запропоновані індекси добре корелюють з візуальними оцінками. За результатами комп'ютерної обробки зображень індексація явища метахромазії, прийнята за візуальною оцінкою (тип 1, 2, 3), в більшості випадків мала інструментальне підтвердження, про що свідчать гістограми отриманих індексів МТХ (рис. 3). Ці дані можуть свідчити про різний стан волютинових гранул, що демонструє їх забарвлення метиленовим синім, і, безумовно, це явище потребує подальшого вивчення.

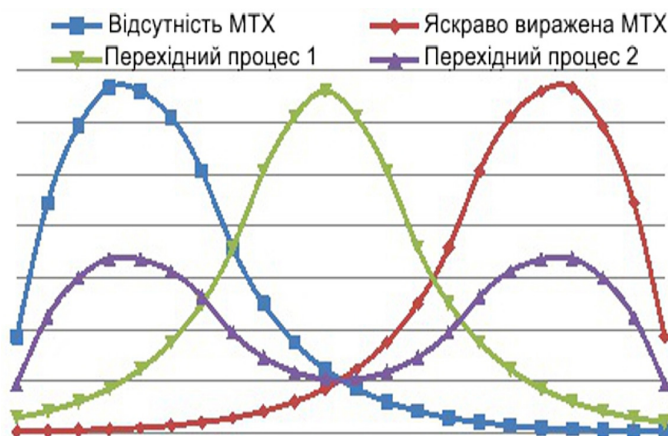


Рис. 2. Схематичний графік яскравості синьої і червоної складових для різних ступенів МТХ

Таблиця 1

Значення індексу МТХ для різних варіантів фарбування волютинових гранул

Зображення 1 типу	Індекс МТХ	Зображення 2 типу	Індекс МТХ	Зображення 3 типу	Індекс МТХ
	47		75		86
	55		76		90
	61		79		91
	66		80		96
	66		83		101

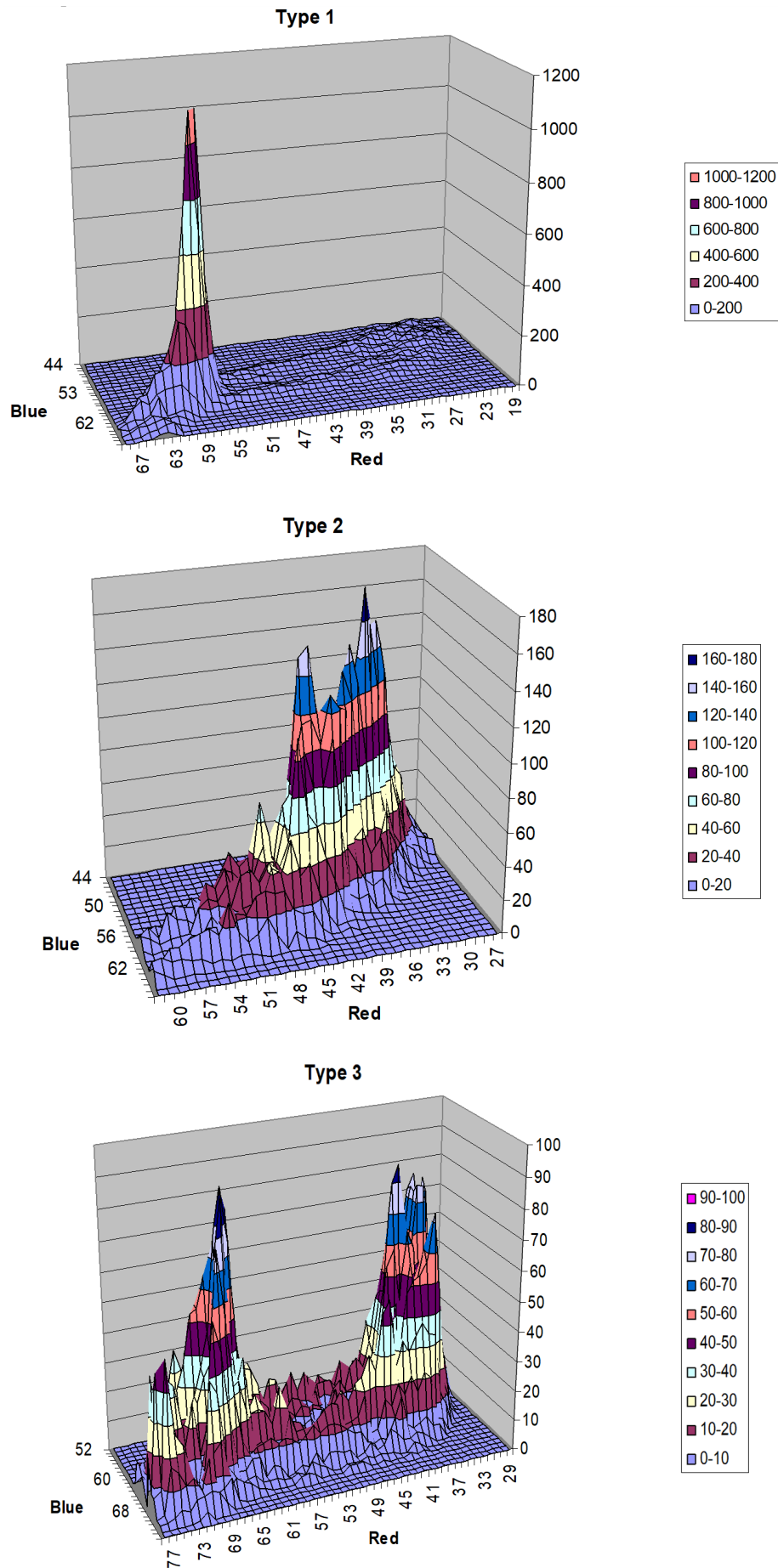


Рис. 3. Гістограми розподілення пікселів зображень волотинкових гранул для різних типів реакцій

Обговорення. Запропонований комп'ютерний облік реакції МТХ вже при перших обговореннях із спеціалістами з біофізики дозволив зробити припущення, що перехід зі стану 1 до стану 3 через стан 2 має схожість з фазовим переходом (наприклад, замерзання води починає фіксуватись при випадінні перших кристалів). Отже, найбільшу складність у подальшій модернізації алгоритму складають визначення порогів для класифікатору стану МТХ з 1 в 2 та з 2 в 3. Цілком можливо, що для більш якісної класифікації явища МТХ слід додатково використати парадигми сучасних нейронних мереж.

Таким чином, розроблений метод комп'ютерної обробки зображень дозволив дати кількісну та якісну оцінку в автоматичному режимі метахроматичному забарвленню волутинових гранул. Крім того, він дав можливість інструментальним методом підтвердити запроповану раніше класифікацію цього явища на основі візуальної експертизи. Особлива увага має бути в подальшому приділена перехідному стану цього явища (2 за візуальною оцінкою). Також зазначимо, що окремим важливим результатом цієї роботи ми вважаємо інтеграцію технологій транспорту зображень та алгоритмів обробки явища МТХ до комплексної інформаційної технології підтримки великомасштабних біофізичних експериментів під загальною назвою «Геліомед».

INFORMATION TECHNOLOGY OF COLOR IMAGING ASSESSMENT OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* UCM Y-517 YEAST VOLUTIN GRANULES METACHROMASIA

*O.M. Gromozova¹, T.L. Kachur¹,
V.V. Vishnevsky², O.S. Sychev²*

¹ Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
NAS of Ukraine, 154 Acad. Zabolotny Str.,
Kyiv, 03143, Ukraine

² Institute of Mathematical Machines and Systems
Problems, NAS of Ukraine,
42 Acad. Glushkova Avenue,
Kyiv, 03187, Ukraine

Summary

Background. The research is devoted to the development of color imaging information technology, which is relevant for evaluating the results of cytochemical research in both biology and medicine.

The **aim** of this work was to study the validity of software algorithms and integrated information technology for the qualitative and quantitative analysis of metachromasia reaction of volutin granules of *Saccharomyces cerevisiae* UCM Y-517 yeast. **Material and Methods.** The object of this study was *Saccharomyces cerevisiae* UCM Y-517 yeast from the Ukrainian collection of microorganisms. The yeast was cultivated for 24 hours at 28° C. The metachromatic reaction of volutin granules was detected microscopically by the preparation of yeast cells stained with methylene blue. Digital images of cells were transferred to a specialized web resource for computer processing. **Results.** The algorithm of computer analysis of images included 3 steps: (1) recognition of single volutin granules, (2) assessment of the magnitude of metachromasia for each granule, and (3) integral estimation of the magnitude of metachromasia for the whole image. Information technology was developed and tested to support the daily monitoring of the metachromasia phenomenon, including obtaining the digital images, their transfer to a remote server, and automatic processing. Information technology is integrated into the web portal of the large-scale biophysical experiment "Heliomed". **Conclusions.** The proposed method of computer image processing gave a quantitative and qualitative assessment in the automatic mode of metachromatic staining of volutin granules and confirmed the previously proposed classification of this phenomenon on the basis of visual examination.

Keywords: volutin granules, metachromasia, digital imaging, information technology, RGB model.

1. Biotropic effects of space weather. Ragulskaya MV, editor. Kiev-Spb: BBM; 2010. 312 p.
2. Kulaev IS, Vagabov VM, Kulakovskaya TV High molecular inorganic polyphosphates: biochemistry, cellbiology and biotechnology. Moscow: Scientific World; 2005. 216 p.
3. Pierce E. Histochemistry: Theoretical and Applied. Moscow: Foreign publishing house; 1962. 962 p.
4. Gromozova EN, Grigoriev PE, Kachur TL, Voychuk SI. The influence of cosmophysical factors on the metachromasia reaction of volutein granules of *Saccharomyces cerevisiae*. Biophysical processes and biosphere. 2010; 9(2):67–76.

5. Kisling JD, Van Dyen SJ, Trelsted P, et al. Metabolism of polyphosphates and problems of biotechnology and environmental protection. *Biochemistry*. 2000; 65(3):394–405.
6. Serafim LS, Lemos PC, Levantesi C, Tandoi V, Santos H, Reis MAM. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphateaccumulating microorganisms. *J Microbiol Methods*. 2002; 51(1):1–18. doi: 10.1016/s0167–7012(02)00056–8.
7. Workshop on Microbiology: Textbook. Egorova NS, editor. Moscow: Moscow University Press, 1976. 307 p.

Отримано 28.02.2020