

## Цифровой подход к оценке роста биологических пленок и биоцидного эффекта с использованием электронной микроскопии

*Козлов Константин Сергеевич*

Кафедра физической химии, Москва

*E-mail: Kozlov1517@mail.ru*

Соавторы: Бойко Д.А., Детушева Е.В., Детушев К.В., Пенцак Е.О., Верещагин А.Н., Анаников В.П.

Изучение биологических пленок - ассоциатов микроорганизмов, объединенных биополимерной средой (матриксом), становится все более актуальным вследствие кризиса антибиотикорезистентности [n1], вызванного межбактериальными взаимодействиями через матрикс. Установлено, что примерно две трети инфекционных заболеваний вызваны деятельностью биопленок [n2]. Для того чтобы своевременно разрабатывать эффективные методы противодействия, необходимо быстро и качественно устанавливать механизмы бактериального взаимодействия внутри биопленки, а также экспрессно оценивать влияние антибиотических препаратов на их жизнедеятельность.

В современной микробиологии для исследования биологических пленок используются различные виды микроскопии [n3, n4], одной из которых является сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) [n5]. Благодаря методу возможно проводить анализ морфологии биологических структур, количественный анализ, определять скорость роста биопленок, а также количество матрикса, коррелирующее с числом межбактериальных взаимодействий.

На сегодняшний день масштабное изучение биологических пленок лимитировано низкой скоростью извлечения информации из микроскопических изображений. Вместе с тем, XXI век знаменуется прорывом в области интеллектуального анализа изображений, в частности, с использованием глубокого обучения [n6]. Создание сегментационной нейронной сети, способной к распознаванию клеток, матрикса и подложки микроскопа, на которой располагаются микробиологические образцы, вместе с алгоритмом компьютерного зрения, выделяющим отдельные клетки и определяющим их геометрические размеры, позволяет автоматизировать и ускорять решение различных микробиологических задач.

В нашей работе [n7] разработаны описанные выше алгоритмы. С использованием предварительно размеченных изображений биопленок, зарегистрированных с помощью СЭМ, обучена, оптимизирована и провалидирована нейронная сеть с архитектурой U-Net. Дополнительно с использованием морфологических трансформаций и алгоритма Watershed удалось решить задачу детекции и сегментации отдельных бактериальных клеток в биопленке.

Создание большого набора изображений достигнуто с помощью аппаратной автоматической регистрации. Для того чтобы показать практическую применимость разработанной программной системы (см. Рисунок), она была использована для решения следующих микробиологических задач:

- 1) Анализ биопленки на площади  $\sim 0.1 \times 0.1$  мм<sup>2</sup> с нанометровым разрешением. Определены доли клеток, матрикса и подложки. Построено распределение клеток по размерам, составлена карта плотности числа клеток в зависимости от координаты на подложке. Проведена кластеризация бактериальных клеток с использованием алгоритма DBSCAN.
- 2) Проведено кинетическое моделирование роста биопленок с использованием интеллектуальной обработки 800 СЭМ изображений.

- 3) Проведено исследование влияния четырех различных антибиотиков на жизнедеятельность биопленки и для каждого из веществ построены профили подавления образования бактерий с использованием автоматической сегментации и детекции отдельных клеток 500 СЭМ изображений.

Таким образом, создание протокола для автоматической обработки СЭМ изображений биопленок позволяет упростить проведение микробиологических экспериментов и увеличить их количество. Задача структурной характеристики биопленок на реальном масштабе позволяет более полно описать исследуемые объекты, не теряя при этом в глубине анализа благодаря высокому разрешению электронной микроскопии. Алгоритмы компьютерного зрения, использованные в работе, в будущем могут быть переобучены для анализа трехмерных данных, полученных с помощью объемной электронной микроскопии. Применение цифровых решений на основе компьютерного зрения в микробиологии открывает перспективы к ускоренному открытию антимикробных препаратов.

Статья подготовлена в соавторстве с Бойко Даниилом Александровичем, Детушевой Еленой Владимировной, Детушевым Константином Викторовичем, Пенцак Евгением Олеговичем, Верещагиным Анатолием Николаевичем, Ананиковым Валентином Павловичем

### Источники и литература

- 1) Larsson D.G.J. & Flach C.F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*. 20, 257–269.
- 2) An A. Y., Choi K. Y. G., Baghela A. S. & Hancock R. E. W. (2021). An Overview of Biological and Computational Methods for Designing Mechanism-Informed Anti-biofilm Agents. *Frontiers in Microbiology*, 12, 640787
- 3) Hartmann R., Jeckel H., Jelli E., Singh P. K., Vaidya S., Bayer M. et al. (2021) Quantitative image analysis of microbial communities with BiofilmQ. *Nature Microbiology*. 6, 151 –156.
- 4) Mountcastle S. E., Vyas N., Villapun V. M., Cox S. C., Jabbari S., Sammons R.L. (2021) Biofilm viability checker: An open-source tool for automated biofilm viability analysis from confocal microscopy images. *npj Biofilms Microbiomes*. 7, 44.
- 5) Golding C. G., Lamboo L. L., Beniac D. R. & Booth T. F. (2016) The scanning electron microscope in microbiology and diagnosis of infectious disease. *Scientific Reports*. 6 , 26516
- 6) Ronneberger O., Fischer P. & Brox T. (2015). U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation.
- 7) Kozlov K.S., Boiko D.A., Detusheva E.V., Detushev K.V., Pentsak E.O., Vereshchagin A.N., & Ananikov V.P. (2023). Digital biology approach for macroscale studies of biofilm growth and biocide effects with electron microscopy. *Digital Discovery*, 2, 1522-1539.

### Иллюстрации

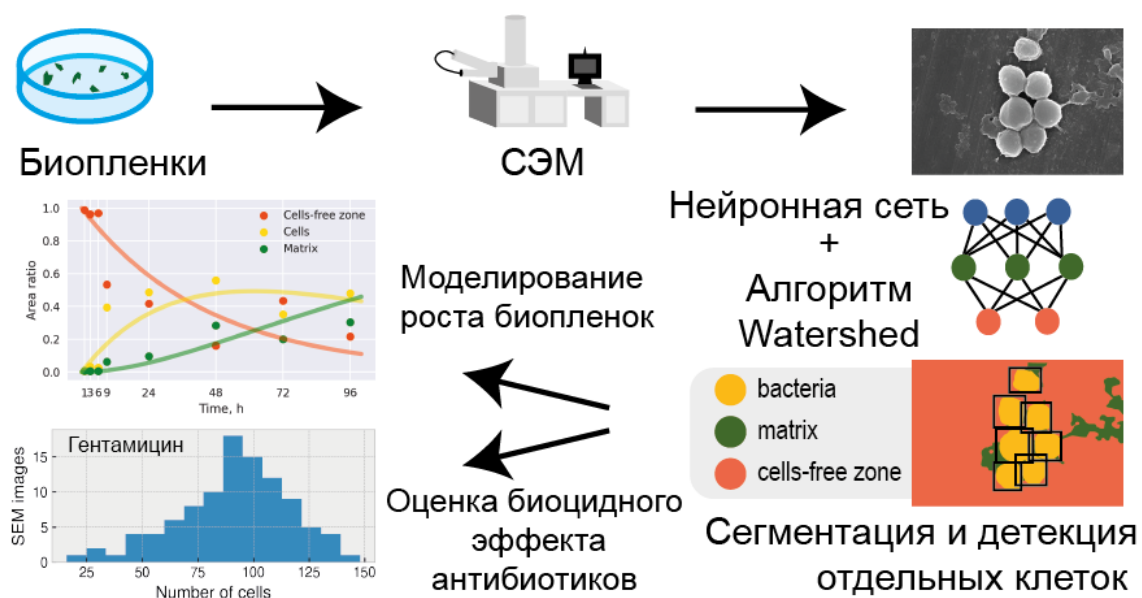


Рис. : 1. Цифровой подход к анализу микроскопических изображений биопленок.