

**BOLETIM DE PESQUISA**

ISSN 1413-9537  
julho, 1998

Número 6/98

**USO SIARCS NA QUANTIFICAÇÃO DAS DIMENSÕES  
DE BACTÉRIAS EM IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FORÇA  
ATÔMICA**

Dinese Osiro  
Luiz Alberto Colnago  
Rubens Bernardes Filho  
Lúcio André de Castro Jorge



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*

*Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária*

*Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

*Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP*

*Telefone: (016) 274 2477 - Fax: (016) 272 5958*

# **USO DO SIARCS NA QUANTIFICAÇÃO DAS DIMENSÕES DE BACTÉRIAS EM IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.**

Denise Osiro<sup>1</sup>

Luiz Alberto Colnago<sup>1,2</sup>

Rubens Bernardes Filho<sup>1,2</sup>

Lúcio André de Castro Jorge<sup>2</sup>

## **Resumo**

O microscópio de força atômica (MFA), introduzido em 1986, tem sido muito utilizado no estudo de sistemas biológicos, como análise de proteínas, DNA, RNA, lipídeos, estruturas supramoleculares, vírus, cromossomos, membranas e até células e tecidos de animais e vegetais (Lyubchenko et al., 1995). Uma das aplicações do MFA tem sido a análise da morfologia de bactérias (Shibatta, et al, 1994 e Osiro,1998). Como as imagens podem ter dezenas de espécimes, as quantificações manuais das suas dimensões com o software do microscópio de força atômica tornam se muito demoradas. Assim avaliou-se o uso software de processamento de imagens SIARCS<sup>®</sup> (Embrapa, 1996), para a quantificação automática das dimensões das bactérias.

---

<sup>1</sup> Instituto de Química de São Carlos, USP, CEP 13560-970, São Carlos SP

<sup>2</sup> Embrapa Instrumentação Agropecuária, CP-741 - CEP 13560-970, São Carlos

## Introdução

Com a introdução do microscópio de força atômica (MFA) em 1986, abriu-se a possibilidade de se obterem imagens de materiais biológicos intactos (Lyubchenko et al., 1995), em alta resolução, em ar e/ou solução e sem o uso de corantes ou de radiação de alta energia, necessários para as microscopias óticas e eletrônicas. O MFA é portanto o primeiro microscópio que pode alcançar resolução em escala nanométrica de amostras biológicas sob condição nativa. A microscopia de força atômica consiste na varredura da superfície da amostra com uma agulha extremamente fina suportada por uma alavanca. Um esquema do funcionamento do MFA está na Figura 1. A imagem da superfície é gerada pela repulsão ou atração desta agulha, que causa uma deflexão na alavanca (eixo Z) para as diversas posições da amostra (eixos X e Y). O monitoramento da deflexão da alavanca é feito através de uma feixe de laser que reflete sobre o verso da alavanca e incide sobre um fotodetector de quatro quadrantes.

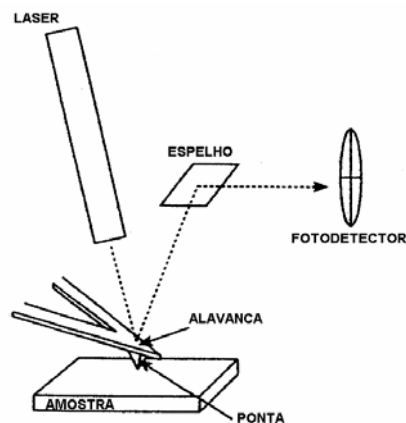


Figura 1 - Desenho esquemático do funcionamento do MFA.

Uma das aplicações do MFA tem sido a análise da morfologia de bactérias (Shibatta, et al, 1994 e Osiro,1998). Como as imagens podem ter dezenas de espécimes as quantificações manuais das suas dimensões com o software do microscópio de força atômica tornam se muito demoradas. Assim avaliou-se o uso software de processamento de imagens SIARCS<sup>®</sup> (Embrapa, 1996), para a quantificação automática das dimensões das bactérias.

## Materiais e Metodos

As bactérias utilizadas foram *E. coli* JM-109 e BRL.

Os substratos utilizados foram o vidro (lâmina da Corning) e a mica (muscovita). As lâminas de vidro foram limpas e hidrofilizadas com banho de  $H_2SO_4/H_2O_2$  na proporção de 7:3, durante 1 hora na câmara de ultra-som, e um segundo banho de  $H_2O/H_2O_2/NH_4OH$  na proporção de 5:1:1, durante 30 minutos na câmara de ultra-som. As lâminas de mica foram usadas após clivagem recente e tratamento com 3-aminopropiltrietoxisilano.

As amostras foram preparadas a partir de cultura em meio líquido e sólido: 1) A *E.coli* cultivada em meio líquido foi centrifugada obtendo-se as bactérias como precipitado. Uma quantidade de *E.coli* foi suspensa em 3 ml de tris-HCl  $10^{-4}$  M. 2) Do meio sólido (agar) removeu-se uma colônia de *E.coli*, que foi suspensa em 3 ml de tris-HCl  $10^{-4}$  M.

As bactérias em suspensão foram depositadas (10 $\mu$ l) sobre a lâmina de vidro ou mica, deixando repousar durante 1 hora aproximadamente. Em seguida, as lâminas foram lavadas afim de

remover excessos de bactérias não aderidas ao substrato e seca em dessecador.

As amostras foram analisadas em microscópio de varredura por sonda Topometrix TMX-2010. As imagens das bactérias foram obtidas com o microscópio operando no modo contato e “quase contato” e com “scanner” de  $70\mu\text{m}$ . A ponta de varredura utilizada no modo contato foi de  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , com geometria piramidal e raio menor que  $50\text{nm}$ . No modo “quase contato” utilizou-se ponta de Si, de geometria piramidal triangular, com raio menor que  $20\text{nm}$ . As imagens das bactérias *E.coli* foram processadas com o próprio “software” da Topometrix. As imagens nos vários modos de análise e de preparação de amostras foram avaliadas pelo SIARCS.

## Resultados e discussões

Na Figura 2 está uma imagem típica de MFA das bactérias preparadas em lâminas de vidro e mica e operando no modo “quase contato”. Nesta figura pode-se ver um grande número de bactérias.

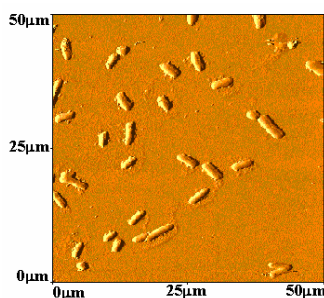


Figura 2. Imagem de MFA, modo “quase contato”, de bactérias depositadas sobre mica.

Com o software do microscópio é possível fazer as medidas de comprimento e largura das bactérias individualmente. Esse processo é bastante demorado pois é necessária a marcação manual tanto da largura como do comprimento de cada bactéria. Com o uso do SIARCS o processo pode ser automatizado.

Um exemplo do uso do SIARCS (figura 3) é a quantificação das *E.coli* presentes na figura 2. Na Figura 3A está uma imagem de MFA, tratada com o software do microscópio para acentuar o contorno das bactérias. Com a análise da imagem, o SIARCS identifica as bactérias e as destaca com uma cor vermelha (Figura 3B). O SIARCS também permite desmarcar objetos, como por exemplo as bactérias do lado direito superior que estão apenas parcialmente na imagem. Em seguida binariza-se a imagem, separando completamente a área da bactéria do substrato (Figura 3C). Após identificar cada objeto (bactéria) dando cores diferenciadas (Figura 3D), calcula automaticamente o comprimento e a largura de cada bactéria, 26 neste caso, gerando a Tabela I.

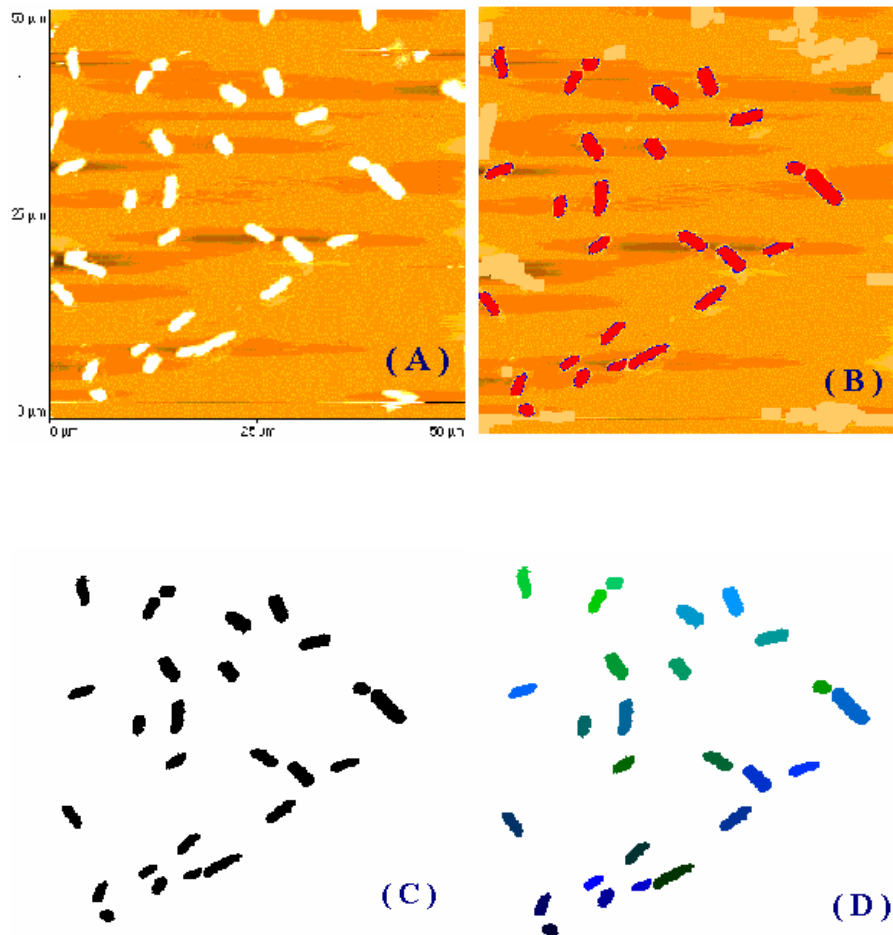


Figura 3- Ilustra as várias etapas do processo de análise das imagens de *E.coli*, pelo SIARCS: ( A ) imagem de MFA da *E.coli*, ( B ) imagem com demarcação das áreas das bactérias de acordo com a sua topografia, ( C ) imagem binarizada, ( D ) as bactérias são tratadas individualmente.

TABELA I- Comprimento e largura das bactérias presentes na imagem da Figura 2 realizado pelo SIARCS.

Bactéria	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )
1	1,86	1,58
2	3,15	1,43
3	2,58	1,72
4	2,44	1,15
5	2,58	1,29
6	5,44	1,43
7	3,58	1,43
8	3,58	1,43
9	4,30	1,58
10	4,01	1,86
11	3,72	1,43
12	3,15	1,43
13	3,72	1,72
14	2,72	1,72
15	4,44	1,86
16	5,44	2,01
17	3,72	1,43
18	2,44	1,58
19	3,58	1,86
20	3,01	1,86
21	4,15	1,58
22	3,58	2,15
23	3,72	2,01
24	3,15	1,58
25	3,72	1,72
26	2,15	1,58



Várias imagens (de  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ ) foram analisadas com o SIARCS e os dados estão apresentados na forma de histogramas (Figura 4 a 7). A Figura 4 apresenta o histograma do comprimento da *E.coli* e a Figura 5 o histograma da sua largura, sendo o substrato, neste caso, a mica-APTES. Nas Figuras 6 e 7 estão, respectivamente, os histogramas da largura e do comprimento das bactérias depositadas em vidro hidrofílico.

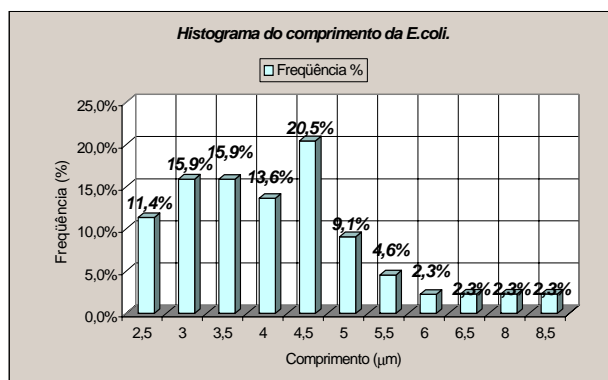


Figura 4- Histograma do comprimento da *E.coli* BRL depositada sobre mica-APTES.

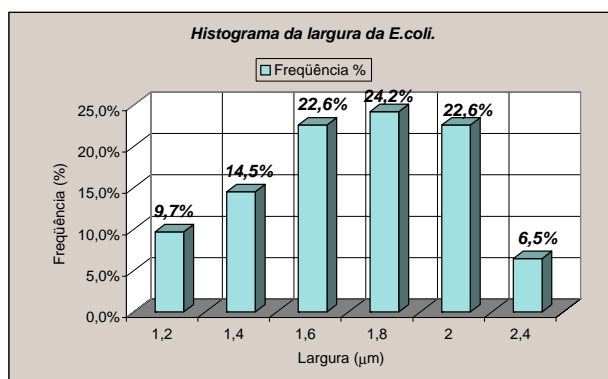


Figura 5 Histograma da largura da *E.coli* BRL depositada sobre mica-APTES.

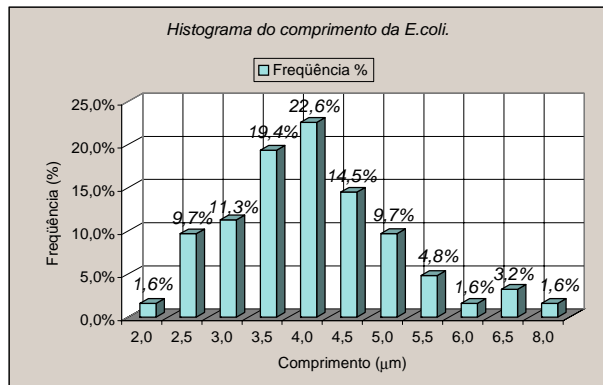


Figura 6- Histograma do comprimento da *E.coli* BRL depositada sobre vidro hidrofílicado.

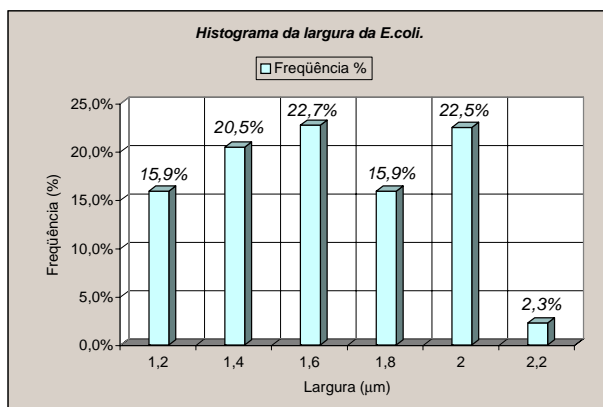


Figura 7- Histograma da largura da *E.coli* BRL depositada sobre vidro hidrofílicado.

Como pode-se observar nos histogramas das Figuras 4 e 6, o comprimento das bactérias *E. coli* variou entre 2,0 e 8,0  $\mu\text{m}$ , sendo que a maioria possui comprimento entre 3,5 e 4,5  $\mu\text{m}$ . A largura da *E. coli* variou entre 1,2 e 2,4  $\mu\text{m}$  (Figura 5 e 7), e a maior parte possui a largura entre 1,4 e 2,0  $\mu\text{m}$ .

Como as imagens por MFA são distorcidas pelo efeito da ponta de varredura, as dimensões reais podem ser calculadas (Osiro, 1998). Na Figura 8 tem-se uma ilustração esquemática dessa interação.

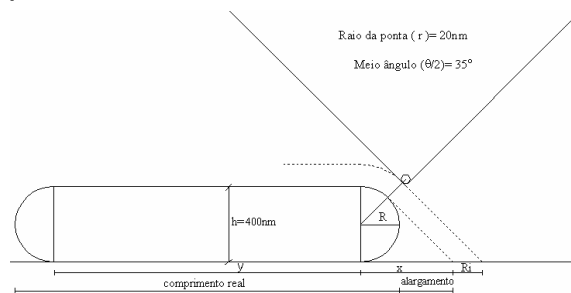


Figura 8- Esquema da interação da sonda do MFA com a superfície da bactéria *E. coli*.

Considerou-se que a ponta é piramidal com um ângulo  $\theta/2 = 35^\circ$  (dados do fabricante), que a bactéria tem altura em torno de 400nm (média das alturas obtidas das imagens de MFA) e raio ( $R = h/2$ ) igual 200nm. O raio da ponta foi considerado 20nm e a distância  $R_i$  entre a ponta e à amostra é desprezível.

Nesta Figura, pode-se ver que há um aumento da imagem (alargamento) da bactéria igual a:

$$\text{Alargamento} = 2(X - R)$$

$$X = R \cdot \left\{ \cos\left(\frac{\theta}{2}\right) + \text{tg}\left(\frac{\theta}{2}\right) \left[ \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) + 1 \right] \right\}$$

Sendo  $X = 384\text{nm}$ , o alargamento  $2(X-R)$  é igual a 368nm.

Portanto, para corrigir as dimensões da *E. coli* deve-se diminuir o valor do alargamento (368 nm) tanto do comprimento quanto da largura observada.

Após as correções, o comprimento das *E.coli* varia entre 1,6 $\mu$ m e 7,6 $\mu$ m e a largura varia entre 0,8 $\mu$ m e 1,6 $\mu$ m.

### Conclusões

O SIARCS mostrou-se uma ferramenta rápida e eficiente para a avaliação das dimensões das bactérias (*E.coli*) a partir de imagens de MFA. Assim considera-se que o uso do MFA juntamente com o SIARCS poderá ser largamente usado em bacteriologia, para a avaliação de bactérias em geral.

### Referências Bibliográficas

- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária (São Carlos, SP), Lúcio André de Castro Jorge e Silvio Crestana. **Sistema integrado para análise de raízes e cobertura do solo - SIARCS**. Patente de Privilégio de Invenção BR INPI n.004276 n.5.519.111. dez. 1996.
- LYUBCHENKO, Y.L.; JACOBS, B.L.; LINDSAY, S.M.; STASIAK, A. Atomic force microscopy of nucleoprotein complexes. **Scanning Microscopy**, Chicago, v.9, n.3, p.705-727, 1995.
- OSIRO, D., **Análise de vírus e bactérias por microscopia de força atômica**. São Carlos: USP-IQSC, 1998, Tese de mestrado.
- SHIBATA-SEKI, T.; WATANABE, W.; MASAI, J. Imaging of cells with atomic force microscopy operated at a "tapping" mode. **Journal of Vacuum Science & Technology B**, New York, v.12, n.3, p.1530-1534, 1994.