



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Instrumentación y Control Automático

SISTEMA AUTOMÁTICO PARA ANÁLISIS DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS MEDIANTE TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:
Arturo Méndez Rubio

Dirigida por:
M. en C. Juan José García Escalante

SINODALES

M. en C. Juan José García Escalante
Presidente

Dr. Achim M. Loske Mehling
Secretario

Dr. Ivan Terol Villalobos
Vocal

M. en C. Beatriz Álvarez Mayorga
Suplente

M. en C. Roberto A. Gómez Loenzo
Suplente

Dr. Gilberto Herrera Ruiz
Director de la Facultad de Ingeniería



Firma



Firma



Firma



Firma



Firma

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre de 2008
México

RESUMEN

El crecimiento de microorganismos en cultivos líquidos puede ser monitoreado de distintas formas. Uno de los métodos de conteo más común es el llamado conteo en placa, que consiste en esparcir un volumen conocido de cultivo líquido en una caja de petri y contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) que crecen. Las principales desventajas de este método son que el crecimiento y la distribución de las UFC en la superficie de agar no son homogéneos, ocasionando que las colonias tengan formas y diámetros diferentes, así como crecimiento traslapado. El conteo de las UFC puede realizarse de manera “manual” o, automática. Los métodos de conteo manual son confiables, pero tediosos y requieren de una gran inversión de tiempo. Los contadores de colonia automatizados pueden reconocer fácilmente las UFC, ya sea por su color, tamaño, forma, etc., y pueden contarlas con rapidez, pero son demasiado caros para ser comprados por laboratorios pequeños y centros educativos que no cuenten con el presupuesto para adquirir un equipo comercial. En esta tesis se presenta el diseño de un sistema automatizado que facilita la identificación, clasificación, segmentación y el conteo de UFC cultivadas en cajas de petri mediante procesamiento digital de imágenes, principalmente a través de la morfología matemática con resultados similares o superiores a los obtenidos con equipos comerciales, reduciendo el tiempo invertido en el conteo en placa. Para este fin, se plantearon dos algoritmos diferentes y se evaluó la eficiencia de cada uno, comparando los resultados contra los del conteo manual y de un equipo comercial. En el primero de ellos, se tomó como base la técnica de segmentación de imágenes a color. Una segunda propuesta, fundamentada en los resultados obtenidos con el primer algoritmo, se desarrolló tomando como base una metodología de segmentación binaria que utiliza la transformación conocida como *ultimate erosion*. Se presenta el diseño y la construcción de un dispositivo automatizado que permite realizar la captura y el análisis de la imagen a través de una computadora personal. El análisis estadístico demostró que el sistema novedoso posee una efectividad del 99.12% en comparación con el 99.42% del equipo comercial.

Palabras clave: Unidades formadoras de colonias, segmentación, procesamiento digital de imágenes, conteo automático.



SUMMARY

The growth of microorganisms in liquid cultures can be monitored in different ways. One of the most common methods is the so-called “plate counting method”, which consist of spreading a known volume of liquid culture on a petri dish and counting the number of colony forming units (CFU) growing after several hours or days. The main disadvantages of this method are that growth and distribution of CFU on the surface of agar are not homogeneous, causing the colonies to have different shapes, sizes and overlapping. Counting of CFU can be done manually, or automatically. Manual counting is reliable, but tedious, and time consuming. Automated colony counters are fast and can easily recognize CFU, by their color, size, or shape. However they are still too expensive for small laboratories and schools that do not have the resources to purchase expensive commercial equipment. The design of an automated system to facilitate identification, classification, segmentation and counting of CFU, using digital image processing and mathematical morphology, is presented in this thesis. Results are similar or superior to commercially available equipment. Two different algorithms were developed to assess their efficiency. The first algorithm was based on a technique for color image segmentation. A second proposal, based on the results obtained with the first algorithm, was developed following a binary segmentation methodology, which uses the transformation known as *ultimate erosion*. The design and construction of an automated device to capture and analyze images from petri dishes with a personal computer is described. Statistical analysis showed that the novel system has an effectiveness about 99.1% as compared to about 99.4% of the commercial equipment.

Keywords: Colony forming units (CFU), segmentation, digital image processing, automatic counting.



DEDICATORIAS

A mis padres Ana Martha Rubio y Edgar Méndez, por brindarme su cariño en todo momento

A mi hermana, Analy.

A toda mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor M. Castaño Meneses, al Dr. Gilberto Herrera Ruiz y al Dr. Rodrigo Castañeda Miranda por todo el apoyo que me brindaron durante esta etapa.

A mis asesores, M. C. Juan José García Escalante y Dr. Achim M. Loske Mehling que fueron parte importante en la realización de esta tesis. Gracias por su amistad y paciencia.

A mis sinodales, M. C. Beatriz Álvarez Mayorga, Dr. Ivan Terol Villalobos y M. C. Roberto A. Gómez Loenzo por aceptar formar parte del jurado y por sus comentarios y correcciones.

A la Dra. Sofía Arvizu Medrano, Dra. Montserrat Hernández Iturriaga, M. C. Julián Esquivel, M. C. María Dolores García Parra por facilitarme los cultivos y aclarar muchas de mis dudas.

Al M. C. Francisco Fernández y al M. C. Ulises Mora Álvarez.

A todos mis compañeros, Luis, Edgar, Omar y principalmente a Vladimir y a Ernesto por su ayuda en la parte final de este trabajo.

A todos mis amigos.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	
ANTECEDENTES	4
CAPÍTULO 2	
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	
2.1 La microbiología.....	18
2.1.1 Unidades formadoras de colonias.....	19
2.1.2 Microorganismos bajo análisis.....	19
2.1.2.1 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	19
2.1.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	20
2.1.2.3 <i>Lactococcus lactis</i>	21

	Página
2.2 Crecimiento bacteriano y cultivo microbiano.....	21
2.2.1 Medios de cultivo.....	22
2.2.2 Curva de desarrollo microbiano.....	23
2.2.3 Cuantificación del desarrollo microbiano.....	24
2.2.3.1 Conteo celular directo.....	24
2.2.3.2 Conteo celular indirecto. Células viables.....	25
2.2.3.3 Dilución de las suspensiones celulares antes de la siembra en placa....	26
2.2.3.4 Fuentes de error en el conteo en placa.....	27
2.3 Óptica básica.....	27
2.3.1 Tamaño del sensor.....	28
2.4 El Procesamiento digital de imágenes.....	34
2.4.1 Parámetros fundamentales de un sistema de procesamiento de imágenes.	35
2.4.1.1 Calidad de la imagen.....	35
2.4.1.2 Profundidad de campo.....	37
2.4.2 Iluminación.....	38
2.5 Morfología matemática.....	40
2. 5. 1 Morfología binaria.....	41
2. 5. 2 Dilatación.....	41
2. 5. 3 Erosión.....	43
2. 5. 4 Apertura y cierre.....	45
2. 5. 5 Procedimientos de pre-procesamiento.....	48
2.5.5.1 Detección de bordes.....	48

	Página
2.5.5.2 Umbral (<i>threshold</i>).....	51
2. 5. 6 Procedimientos de segmentación.....	53
2.5.6.1 Filtrado morfológico.....	53
2.5.6.2 Función distancia.....	55
2.5.6.3 Esqueleto.....	58
2.5.6.4 Watershed.....	61
2.5.6.5 <i>Ultimate erosion</i>	63
 CAPÍTULO 3	
METODOLOGÍA	
3.1 Los cultivos utilizados para el análisis.....	66
3.2 Diseño del sistema de captura de la imagen.....	66
3.3 Diseño del sistema de procesamiento de imágenes.....	68
3.4 Mejora a la técnica de segmentación de imágenes a color de Shiji y Hamada (1999).....	69
3.5 El sistema de iluminación.....	71
3.6 Algoritmo de segmentación basado en <i>ultimate erosion</i>	74
3.7 Diseño del dispositivo automático.....	76
3.7.1 El circuito de control del motor a pasos.....	79
 CAPÍTULO 4	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	82
4.1 Resultados del algoritmo de Shiji y Hamada mejorado.....	83
4.2 Resultados del método de segmentación mediante <i>ultimate erosion</i>	84

	Página
4.2.1 Implementación del algoritmo con la imagen de prueba.....	84
4.2.2 Implementación del algoritmo con imágenes de cultivos bacteriológicos	88
4.2.2.1 Análisis de los resultados de las muestras del Grupo 1.....	88
4.2.2.2 Análisis de los resultados de las muestras del Grupo 2.....	93
4.2.2.3 Análisis de los resultados de las muestras del Grupo 3.....	98
4.2.2.4 Análisis general de los resultados.....	102
4.3 Comparativo con otros algoritmos de segmentación y conteo de bacterias.....	106
4.4 El dispositivo final.....	107
4.5 La interfaz gráfica.....	107
 CAPÍTULO 5	
CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	111
ANEXO	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1.1. Contador automático de colonias microbianas desarrollado en los Laboratorios <i>Fort Detrick</i> y <i>Allen B. Du Mont</i> (1957)	5
1.2. Equipo contador de colonias Modelo 870 fabricado por <i>Artek Systems Corp.</i>	6
1.3. Resultados de la evaluación de un cultivo en caja de petri, (<i>Marotz et al.</i> , 2001).....	11
1.4. Clases típicas de imágenes de colonias, (<i>Wang</i> , 2006)	14
1.5. Sistema de iluminación y adquisición de la imagen COVASIAM.....	16
2.1. Curva de crecimiento típica de una población bacteriana (<i>Madigan y Martinko</i> , 1998).....	24
2.2. Técnica de dilución en placa (<i>Madigan y Martinko</i> , 1998).....	25
2.3. Procedimiento para la determinación de células viables usando diluciones seriadas de la muestra y la técnica de dilución en placa (<i>Madigan y Martinko</i> , 1998).....	26
2.4. Enfoque de un objeto.....	28
2.5. Formatos de CCD.....	29
2.6. Cuerda del montaje C.....	30
2.7. La nitidez.....	31
2.8. Combinaciones entre montajes C y CS.....	34

Figura	Página
2.9. Parámetros fundamentales para la elección del lente (<i>Edmund Optics Inc., USA, (2007)</i>).....	35
2.10. Representación geométrica de la profundidad de campo (DOF) a diferentes aperturas del lente (<i>Edmund Optics Inc., USA, 2007</i>)	37
2.11. Posición de un elemento estructural cuadrado en una imagen denominada <i>S</i> ..	40
2.12 Dilatación con un elemento estructural circular, con el origen en el centro del mismo.....	42
2.13. Erosión con un elemento estructural circular, con el origen en el centro del mismo.....	44
2.14. Apertura morfológica.....	46
2.15. Cierre morfológico.....	47
2.16. Detección de bordes con diferentes operadores. (a) Imagen original; (b) Roberts; (c) Prewitt; (d) Sobel y (e) Frei-Chen.....	51
2.17. Umbral (<i>threshold</i>).....	52
2.18 Tipos de espacios métricos para elemento estructural b_G : (a) <i>City-Block</i> , (b) <i>Chessboard</i> , (c) Octagonal y (d) Euclidiano.....	57
2.19. (a) Imagen de entrada f y (b) Función Distancia = $\varepsilon b_G(f)$	58
2.20. Esqueleto de un triángulo: (a) esqueleto, (b) disco máximo para un esqueleto de punto, (c) disco mayor para un punto no esqueleto.....	60
2.21. Diferentes tipos de esqueletos.....	60

Figura	Página
2.22. Comparación de detección de bordes por gradiente morfológico y <i>watershed</i> ; (superior izq.) gradiente con bajo umbral, (superior der.) gradiente con umbral muy alto, (inferior izq.) esqueleto conectado de un umbral bajo, (inferior der.) líneas de división del <i>watershed</i> . (S. Beucher, 1990).....	62
2.23 <i>Watersheds</i>	63
2.24. Sucesivas separaciones de los bordes interiores para encontrar el <i>ultimate erosion</i> (L. Vincent, 1990).....	64
2.25. (a) Ultimate erosion, (b) Bandas de distancia, (c) Segmentación por <i>ultimate erosion</i> y <i>skeletonization</i> (L. Vincent, 1990).....	65
3.1. Cámara digital DFK 31BF03 (<i>The Imaging Source Europe GmbH</i>).....	67
3.2. Diseño del sistema de captura de la imagen.....	68
3.3. Contador de colonias manual (<i>Reichert Darkfield Québec</i> , mod. 3325).....	69
3.4. Diagrama de bloques del método basado en el mejoramiento de la técnica de segmentación de imágenes a color desarrollada por Shiji y Hamada (1999)	70
3.5. Diagrama eléctrico del anillo de LEDs.....	73
3.6. Lámpara de anillo de LEDs, a) plantilla para el circuito impreso y b) circuito terminado.....	73
3.7. Diagrama de bloques del algoritmo de segmentación implementado.....	75
3.8. Contador de colonias automático <i>AccuCount 1000</i>	75
3.9. Diseño del plato giratorio.....	77
3.10. Plato de acrílico terminado	77

Figura	Página
3.11. Esquema del dispositivo automático.....	78
3.12. Gabinete de tablero MDF.....	79
3.13 Diagrama del circuito de control del motor a pasos.....	81
4.1. Imágenes de algunos cultivos bacterianos obtenidos con el sistema de captura diseñado.....	82
4.2. Ejemplo de la máscara aplicada a las imágenes adquiridas.....	83
4.3. Resultado de la segmentación aplicada a una imagen de cultivo bacteriológico empleando el algoritmo mejorado a la técnica propuesta por Shiji y Hamada (1999).....	84
4.4. Imagen de prueba con 75 objetos para validación del algoritmo implementado	85
4.5. (a) Imagen binaria de prueba creada manualmente, (b) <i>Ultimate erosion</i> y creación de marcadores.....	85
4.6. (a) Función Distancia y (b) Inverso del Filtro Secuencial Alternado aplicados a la imagen de prueba.....	86
4.7. (a) <i>Watershed</i> y (b) visualización de los objetos segmentados en la imagen de prueba.....	87
4.8 Resultado final y localización de centroides en la imagen de prueba.....	87
4.9. Fotografía del sistema de iluminación con la lámpara de LEDs acoplada.....	88
4.10. (a) Imagen original y (b) máscara de una imagen del Grupo 1 (de 0 a 300 UFC).....	89
4.11. (a) Resultado de la umbralización, (b) eliminación de bordes y <i>ultimate erosion</i> en una imagen del Grupo 1 (de 0 a 300 UFC).....	89

Figura	Página
4.12. (a) Función Distancia y (b) Filtro Secuencial Alternado aplicados a una imagen del Grupo 1 (0 a 300 UFC).....	90
4.13. (a) <i>Watershed</i> y (b) visualización de los objetos segmentados en la imagen de muestra del Grupo 1 (0 a 300 UFC).....	91
4.14. Máscara de la imagen original y localización de centroides de la imagen del Grupo 1 (0 a 300 UFC).....	91
4.15. Comparativo entre el conteo por el equipo comercial (<i>AccuCount 1000</i>) y el conteo manual al Grupo 1 (de 0 a 300 UFC).....	92
4.16. Comparativo entre el conteo por el método de segmentación implementado y el conteo manual al grupo de 0 a 300 UFC.....	92
4.17. (a) Imagen original y (b) máscara de una muestra del Grupo 2 (301 a 600 UFC).....	93
4.18. (a) Resultado de la umbralización, (b) eliminación de bordes y <i>ultimate erosion</i> en una muestra del Grupo 2 (301 a 600 UFC).....	94
4.19. (a) Función Distancia y (b) Filtro Secuencial Alternado aplicados a una imagen del Grupo 1 (301 a 600 UFC).....	94
4.20. (a) <i>Watershed</i> y (b) visualización de los objetos segmentados en la imagen de muestra del Grupo 2 (301 a 600 UFC).....	95
4.21. Máscara de la imagen original y localización de centroides de la imagen de muestra del Grupo 2 (301 a 601 UFC)	95
4.22. Comparativo entre el conteo por el equipo comercial (<i>AccuCount 1000</i>) y el conteo manual al grupo de 301 a 600 UFC.....	96

Figura	Página
4.23. Comparativo entre el conteo por el método de segmentación automático y el conteo manual al grupo de 301 a 600 UFC.....	96
4.24. (a) Objetos que pueden ser segmentados mediante <i>ultimate erosion</i> , (b) objetos que no pueden ser segmentados por este método.....	97
4.25. (a) Segmentación realizada por el método mejorado de segmentación de imágenes a color y (b) segmentación lograda aplicando el método de <i>ultimate erosion</i>	98
4.26. (a) Imagen original y (b) máscara de una muestra del Grupo 3 (más de 601 UFC).....	98
4.27. (a) Resultado de la umbralización, (b) eliminación de bordes y <i>ultimate erosion</i> en una muestra del Grupo 3 (más de 601 UFC).....	99
4.28. (a) Función Distancia y (b) Filtro Secuencial Alternado aplicados a una imagen del Grupo 1 (más de 601 UFC).....	99
4.29. (a) <i>Watershed</i> y (b) visualización de los objetos segmentados en la imagen de muestra del Grupo 3 (más de 601 UFC).....	100
4.30. Máscara de la imagen original y localización de centroides de la imagen de muestra del Grupo 3 (más de 601 UFC).....	100
4.31. Comparativo entre el conteo por el equipo comercial (<i>AccuCount 1000</i>) y el conteo manual al grupo de más de 601 UFC.....	101
4.32. Comparativo entre el conteo por el método de segmentación automático y el conteo manual al grupo de más de 600 UFC.....	101

Figura	Página
4.33. Comparativo entre el conteo por el equipo comercial (<i>AccuCount 1000</i>) y el conteo manual al lote de 525 muestras.....	103
4.34. Error obtenido por el equipo comercial (<i>AccuCount 1000</i>).....	103
4.35. Error en el número de UFC detectadas entre el conteo manual y el conteo con el <i>AccuCount 1000</i> para cada muestra (caja de petri) analizada.....	104
4.36. Comparativo entre el método de segmentación implementado y el conteo manual al lote de 525 muestras.....	105
4.37. Error obtenido por el método de segmentación implementado.....	105
4.38. Error en el número de UFC detectadas entre el conteo manual y el conteo con el método de segmentación implementado para cada muestra (caja de petri) analizada.....	106
4.39 Sistema automático de captura.....	108
4.40 Interfaz gráfica para control del motor a pasos y análisis de la imagen.....	108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I Características de distintos tipos de iluminación.....	39
II Máscaras de los operadores de gradiente común.....	50
III. Características generales del PIC16F877A.....	80

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de microorganismos en cultivos líquidos puede ser monitoreado de distintas formas. Uno de los métodos de conteo más común es el llamado conteo en placa, que consiste en esparcir o incorporar en un medio de cultivo un volumen conocido de cultivo líquido en una caja de petri y contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) que crecen después de un tiempo determinado de incubación. Una de las principales desventajas de este método son que el crecimiento y la distribución de las UFC en el medio de cultivo sólido no son homogéneos, de tal manera que las colonias puedan tener formas y diámetros diferentes, crecimiento adyacente o incluso compartiendo espacio. El conteo de las UFC puede realizarse de manera “manual” o, automática. Los métodos de conteo “manual” que son visualmente realizados por un técnico capacitado; son confiables, pero tediosos y requieren de una gran inversión de tiempo, además con la limitante de que si rebasan las 300 UFC las cuentas son estimadas. Los sistemas de conteo de colonias pueden ser directos o indirectos. Los contadores de colonia automatizados pueden reconocer fácilmente las UFC, ya sea por su color, tamaño, forma, etc., y pueden contarlas con rapidez, pero son demasiado caros para ser comprados por laboratorios que no realizan este tipo de análisis de manera rutinaria o con fines comerciales.

En el campo de la microbiología, una de las áreas que ha mostrado mayor desarrollo es la automatización de los métodos de conteo. En el caso del conteo de UFC en cajas de petri, se han tenido que superar dificultades como: la identificación de las colonias que se tocan o se enciman, así como las diversas formas, tamaños, texturas, colores, intensidades de luz, etc. (Moldenhauer, 2003).

En este trabajo se describen diferentes sistemas y algoritmos que han sido propuestos para la segmentación y el conteo de las UFC, sin embargo, no todos detectan colonias de manera individual si estas crecen encimadas, sino que consideran que todas son del mismo tamaño. También se detalla la metodología llevada a cabo para el diseño de un

sistema automatizado que facilite la identificación, clasificación, separación y el conteo de UFC cultivadas en cajas de petri mediante procesamiento digital de imágenes, principalmente a través de la morfología matemática. Para esto se hace una introducción al tema y posteriormente se explica la forma de adquirir de la imagen, así como los diferentes algoritmos desarrollados, como gradientes, filtros y métodos de segmentación (González y Woods, 2002) para el análisis y procesamiento digital de la imagen que fueron adaptados a las características propias de diferentes clases de microorganismos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Lactococcus lactis*.

En la primera etapa de pruebas se utilizó un contador de colonias manual de campo oscuro, al cual se le adaptó una cámara digital para obtener la imagen de las UFC y procesarla. La preparación y el cultivo de los microorganismos se hizo conjuntamente en el Laboratorio de Ondas de Choque del CFATA-UNAM donde se realizan investigaciones enfocadas a la inactivación de microorganismos por medio de ondas de choque (Loske *et al.*, 2002; M. Álvarez *et al.*, 2004) y en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (FQ-UAQ), en el que se tiene la infraestructura y el personal capacitado para la realización de las técnicas de preparación en base a las normas NOM-110-SSA1-1994 y NOM-092-SSA1-1994.

La meta de esta tesis es el desarrollo de un sistema que sea capaz de contar automáticamente el número de colonias (manchas) sobre la placa, registrar al menos el 98% de las colonias detectadas por el método manual. Finalmente se desea tener la capacidad para almacenar las cuentas viables en memoria, para poder acceder a la información cuando se requiera, crear un reporte impreso y/o un archivo compatible con hojas de cálculo, tener un sistema propio de iluminación controlada con luz visible, así como la opción de visualizar la imagen de la placa en pantalla y obtener un *zoom* de determinada área del cultivo.

El objetivo general de este trabajo es la automatización de un contador de UFC simple, que sea capaz de realizar el conteo en placa de cultivos bacteriológicos cuyos resultados sean similares o superiores a los equipos comerciales existentes en el mercado nacional e internacional, reduciendo el tiempo invertido en el conteo en placa.

Se realizaron comparativos entre el sistema nuevo y dos tradicionales, es decir, un conteo manual y un conteo con equipo automático comercial. Se analizaron las diferencias entre los tres métodos, principalmente en lo que se refiere a la confiabilidad, precisión, rapidez, exactitud y manejo, tratando de mejorar los resultados obtenidos con los sistemas convencionales que demostraron tener una efectividad entre el 76% y el 96% en comparación con el nuevo sistema cuya efectividad fue mayor al 98% .

Se implementó un algoritmo capaz de segmentar colonias traslapadas, registrar el número de UFC en la superficie del agar, almacenar los datos obtenidos en memoria, elaborar un reporte impreso y/o un archivo compatible con hojas de cálculo, así como la ampliación de cierta área de la imagen (*zoom* digital).

Como aportación final del trabajo se presenta el diseño y la construcción de un dispositivo automatizado en el cual se pueden colocar cinco cajas de petri sobre una charola acoplada a un motor, la cual gira, alineando una caja a la vez con la cámara digital para realizar así la captura y el análisis de la imagen a través de una computadora personal (PC).

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

La segmentación es un preproceso importante para el reconocimiento, la clasificación y el conteo de objetos dentro de una imagen. Después de 1954 se propusieron diferentes métodos para la segmentación y el conteo de objetos en imágenes. En el caso tratado aquí, los objetos a contar son unidades formadoras de colonias de bacterias (UFC).

John E. Malligo (1965) publicó cómo los avances de la tecnología electrónica se aplicaron a dispositivos automáticos y semiautomáticos, cubriendo muchos aspectos de las ciencias físicas y biológicas. Un notable progreso hacia la automatización fue el desarrollo de sistemas de barrido (*scanning*) de alta velocidad, los cuales fueron especialmente adaptados para utilizarse en el área de las ciencias biológicas. Una aplicación reveladora fue el contador automático de colonias microbianas, desarrollado como un trabajo de colaboración entre los laboratorios *Fort Detrick* y *Allen B. Du Mont* en 1957 (Figura 1.1).

En los primeros experimentos con este equipo se demostró que era capaz de contar con exactitud y precisión placas de prueba con círculos de plástico que simulaban colonias de bacterias. Cuando fue utilizado con placas que tenían más de 100 colonias vivas, la cuenta de la máquina fue más baja que la realizada visualmente por un técnico. Un estudio preliminar demostró que el contador automático sólo evaluó cerca del 83% de las colonias observadas por el técnico, lo cual pudo deberse a cuatro causas:



Figura 1.1. Contador automático de colonias microbianas desarrollado en los laboratorios *Fort Detrick* y *Allen B. Du Mont* (1957).

(i) Colonias en el área periférica del agar, (ii) imperfecciones ópticas causadas por raspaduras en la superficie del agar o en la caja de petri, (iii) el ajuste del equipo y (iv) la existencia de colonias en contacto unas con otras o encimadas. El área periférica de la placa se enmascaró para prevenir conteos falsos entre el borde de la caja y el nivel del agar. El error debido a las imperfecciones en el agar o en las cajas de petri de cristal (o plástico) fue mínimo debido a la cuidadosa selección y manejo de éstas. Un ajuste en la variación del color del agar o agar con una brillantez mínima proporcionó translucidez al agar. El cuarto factor es el más importante, ya que se demostró la incapacidad del equipo para separar agrupamientos de colonias. Debido a las limitaciones propias del instrumento, fue imposible evitar el traslape de colonias, lo cual llevó a determinar un factor matemático que convertía las lecturas realizadas por la máquina a lecturas realizadas por el técnico. Estos problemas técnicos siguen existiendo hasta nuestros días.

En un estudio realizado a principio de los setentas (Goss *et al*, 1974), se evaluó un equipo contador de colonias modelo 870 fabricado por *Artek Systems Corp.*, donde los principales criterios de selección fueron: (i) discriminación del tamaño de la colonia (sensibilidad), (ii) precisión del instrumento (reproducibilidad), (iii) exactitud y (iv)

viabilidad de interconexión del contador con los sistemas de adquisición de datos automatizados. El último punto es de gran importancia para la utilización óptima de un contador automatizado. Los componentes de este sistema incluían (a) el contador de colonias, (b) una interfase paralelo BCD (*Binary Coded Decimal*) a serial ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*, Código Estadounidense Estándar para el Intercambio de Información) y (c) un teletipo estándar modelo ASR-33 (Figura 1.2). El principal elemento de este sistema era una cámara de televisión de alta velocidad de barrido que podía detectar y registrar diferencias entre la densidad óptica de una colonia de bacterias y el fondo del agar. Un botón era presionado para registrar la cuenta total en un *display* digital. Cuando este botón era presionado, el contenido del *display* BCD era leído y convertido a código ASCII por una interfaz. Esta información era transmitida hacia un teletipo o hacia una computadora para un procesamiento posterior, lo cual se seleccionaba por medio de un interruptor.



Figura 1.2. Equipo contador de colonias modelo 870
fabricado por *Artek Systems Corp.*

En estudios preliminares se examinaron cajas de petri de plástico de 100 mm de diámetro. Como el sistema óptico no veía el 15% del área periférica total, se notó que los bordes externos de la caja no interferían en el proceso de conteo, esto con la condición de que las placas fueran centradas correctamente. Se observó también que objetos pequeños en

el agar, tales como burbujas o grietas fueron detectadas por el equipo aumentando erróneamente el conteo, por lo que este tipo de placas fueron rechazadas para su conteo después de haber sido examinadas visualmente. La reproducibilidad del contador automático resultó ser proporcional al número de colonias para placas con mezclas pobres de bacterias. Repetidos conteos automáticos (10 a 20) en una placa a la vez y en una posición fija variaron aproximadamente 3, 2 y 1% para densidades de colonias de 30 a 100, 200 a 300 y de 600 a 1000, respectivamente. Cuando las mismas placas fueron reposicionadas para otro conteo, el conteo automático varió 12, 4 y 3% para los rangos de densidad anteriores. La influencia adversa de la orientación de la placa en el equipo, principalmente en colonias con muy baja densidad, refleja la interacción de varios factores, como puede ser la inconstante distribución de las colonias en el borde periférico del área barrida ópticamente. En colonias con alta densidad, tanto para placas fijas como reposicionadas, se observó un incremento de la precisión, es decir, aumentó la precisión a expensas de la exactitud.

Chen *et al* (1999) introdujeron un conteo de colonias automático basándose en la segmentación de la imagen, utilizando el siguiente algoritmo para la segmentación y conteo de objetos: El tamaño de las células era de 288 x 384 píxeles con un nivel en escala de grises de 256. Aplicaron un filtro de 3 x 3, para minimizar efectos de ruido; localizaron todos los píxeles con el nivel de escala de grises menor en una vecindad de 5 x 5. Para cada píxel se determinó si el gradiente de su valor en escala de grises en cada dirección (8 direcciones para los 360°) está también sobre el umbral especificado; realizaron un proceso de inundado, una vez encontrado el mínimo potencial, para cada mínimo, procedieron a inundar progresivamente la vecindad de cada punto utilizando una estructura de datos conocida como FIFO (del acrónimo inglés *First In First Out*), la cual contiene inicialmente todos los píxeles en orden de su valor de intensidad. Este proceso de inundado se detenía cuando la FIFO se vaciaba; se depuró la imagen etiquetada mediante un post-procesamiento, calculando primero el centro de cada región. Si el centro no estaba en esa región, la región era descartada. Después, se eliminaron aquellas regiones en las cuales el total de puntos era mayor a cierto rango de tamaño de células.

La calidad de la imagen se vio afectada de muchas formas, como por ejemplo, el tiempo de exposición, el filtro, el contraste de fase y la frecuencia. Finalmente los autores mencionaron que se puede utilizar morfología matemática para mejorar la precisión.

Shiji y Hamada (1999), propusieron un método de segmentación de imágenes a color eliminando la sobre-segmentación. Este método no utiliza sólo las propiedades de cada píxel, sino también la información del contorno de la región. Establecieron como primera etapa del proceso de segmentación ajustar los límites en la posición del borde para crear regiones cerradas, de tal manera que en etapas posteriores se pudiera utilizar la información del contorno; esto se hizo aplicando la transformación *watershed*. Este método hace un etiquetado de la imagen usando las características del histograma y elimina la creación excesiva de marcadores, con lo que se resuelve la sobre-segmentación en imágenes naturales y los límites de las regiones se ajustan en la posición del borde.

Como en la segunda etapa del proceso se utiliza la información del contorno, en la primera etapa se necesitan crear límites en el punto del borde, por medio del *watershed* para la primera aproximación a la segmentación de los objetos dentro de la imagen. Se utiliza el espacio de color *HLS* (Tonalidad, Intensidad y Saturación, por sus siglas en inglés *Hue, Lightness, Saturation*), el cual representa de una mejor manera la curva de respuesta fotópica que el espacio de color RGB (por sus siglas en inglés *Red, Green, Blue*). Después de transformar al espacio *HSL*, mediante la Ecuación (1.1), los marcadores se ajustan para H, S y L respectivamente y se aplica el algoritmo *watershed* en la intersección de los marcadores.

$$\text{con } \theta = \left\{ \frac{\frac{1}{2}[(R-G) + (R-B)]}{\left[(R-G)^2 + (R-B)(G-B) \right]^{\frac{1}{2}}} \right\}$$

$$H = \begin{cases} \theta & \text{si } B \leq G \\ 360 - \theta & \text{si } B > G \end{cases} \quad (1.1)$$

$$S = 1 - \frac{3}{(R+G+B)} [\min(R, G, B)]$$

$$L = \frac{1}{3}(R+G+B)$$

Este método agrupa píxeles con valor similar y produce una eliminación plana. En la unión, los valores no son divididos por amplitudes diferentes sino por ajuste de éstas, el cual se decide por medio del histograma de la región.

Los mínimos regionales que se fijan en los marcadores del gradiente de la imagen se substituyen de la siguiente manera:

1. Se crea un histograma característico.
2. Los valles del histograma se llenan por cerradura, la cual es una operación morfológica.
3. Se crea una imagen etiquetada, asignando una etiqueta para cada píxel con característica de montaña en el histograma.
4. Los marcadores se ajustan en los puntos donde el gradiente de la imagen etiquetada y la característica de la imagen de entrada cambian gradualmente.

Este proceso se aplica a la intensidad de la imagen. Del histograma obtenido, es etiquetada la imagen (las partes no negras son etiquetas) y los marcadores se crean como partes blancas. En el caso de imágenes en color, este proceso se aplica a las imágenes H , L y S respectivamente. El marcador final se ajusta a los píxeles donde existen los tres marcadores. Posteriormente, a estos marcadores se les aplica el *watershed* y se crean las primeras regiones. Las líneas blancas son las primeras regiones de los contornos. Esto

muestra que el método propuesto elimina la segmentación excesiva en métodos convencionales.

Sossa *et al* (2000), desarrollaron un método para contar objetos dentro de una imagen a través de su esqueleto (*skeleton*). Esta técnica se aplicó en objetos convexos, no convexos, alargados o no, con contorno plano sin agujeros, de diferente longitud, de diferente espesor, y con presencia de obstáculos. El número de objetos en una imagen la obtuvieron en función de dos cantidades: el número de puntos terminales (puntos con un solo vecino) y el método donde existen puntos con únicamente tres vecinos en el esqueleto de la imagen. Estos autores propusieron utilizar el esqueleto de los objetos encimados en lugar de su contorno. Como primer paso, la imagen de entrada se umbralizó para obtener una imagen en modo binario, la cual se procesó para obtener su esqueleto así proceder a contar el número de puntos terminales y los tres puntos en el borde. Este algoritmo se probó con cien imágenes en donde en el 94% de los casos el resultado dado fue exitoso. También se presentaron fallas debido principalmente a ruido en el contorno del objeto. La técnica se está tratando de extender al caso de imágenes reales, con el fin de contar con una herramienta lo más general posible para realizar el conteo de objetos sobre imágenes.

Marotz *et al* (2001) presentaron un método para el conteo automatizado de imágenes de cajas de petri digitalizadas, el cual incluía algoritmos muy específicos y efectivos para el reconocimiento de objetos que aseguraban una gran exactitud en la detección. La secuencia de procesamiento implicaba controles internos lo que permitía evaluaciones automatizadas confiables de series de imágenes. El uso de lógica difusa (*fuzzy logic*) y la alta adaptabilidad de los algoritmos llevaron a este método a ser muy amigable para el usuario. Para la digitalización de las imágenes utilizaron diferentes dispositivos como escáneres de cama plana o cámaras de CCD (*Coupling Charge Device*, dispositivos de cargas eléctricas). En este estudio analizaron cajas de petri de 90 mm de diámetro digitalizadas a 300 dpi (*dots per inch*, puntos por pulgada); así las colonias muy pequeñas, detectadas por este método, tenían un diámetro de casi cinco píxeles, aproximadamente 0.4 mm. Para poder detectar colonias más pequeñas simplemente se incrementó la resolución de la digitalización. Este método se basó en el reconocimiento y detección de los centros de

estos objetos a través del máximo local, el cual describe la calidad de un píxel como potencial centro de un objeto (Figura 1.3).

Para evaluar este sistema se realizó un conteo manual de las cajas de petri a través de un monitor y se comparó con el método propuesto. Los resultados produjeron un coeficiente de correlación con una $R^2 = 0.96$.

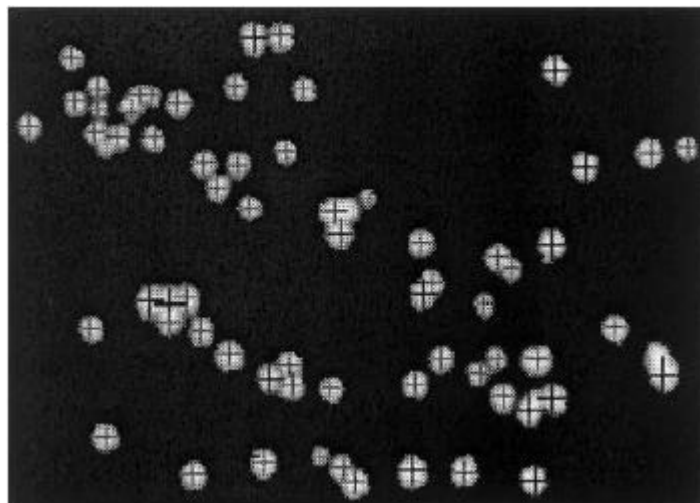


Figura 1.3. Resultados de la evaluación de un cultivo en caja de petri, (Marotz *et al.*, 2001).

Putman *et al* (2005) presentaron un contador de colonias automático que puede procesar imágenes obtenidas de una cámara digital o de un *scanner*. Para la adquisición de la imagen se utilizó una cámara digital (Powershot A75) de Canon con una resolución de 2 Mega píxeles y 32 Mb de memoria. La distancia entre el objeto y el lente fue de 18 cm. No se utilizó flash. Se controló la exposición y la distancia manualmente. Para manejar archivos pequeños se redujo la resolución a 1024 x 768 píxeles, seleccionando una compresión de datos “normal” en formato JPG. Posteriormente, para el análisis, se convirtió la imagen a formato BMP y la resolución cambió a 780 x 574 píxeles en una escala de 8 bits.

Para realizar el conteo utilizaron un programa comercial llamado ProtoCol, y realizaron comparativos con conteos previos realizados manualmente y obtuvieron una

correlación con una $R^2 = 0.96$. Los conteos automáticos fueron ligeramente menores (entre el 10 y el 15%) en comparación con los manuales.

El conteo de 96 cajas de petri en modo manual, llevó un tiempo aproximadamente de 144 minutos y por el método automático tomó entre 3 y 5 minutos. También utilizaron una cámara digital (Pix 5700) de Nikon con características similares a la anterior. Utilizaron este tipo de cámaras, ya que su manejo es sencillo.

Zhang *et al.* (2006) presentaron un marco para segmentar imágenes basándose en la fusión de la segmentación de marcas. Este marco combina segmentaciones de marcas generadas por diferentes algoritmos. Primero separaron una imagen heterogénea en un conjunto de marcas encimadas, después desarrollaron una segmentación a la imagen en cada marca y calcularon un valor el cual representa la consistencia entre dos marcas segmentadas. Posteriormente utilizaron un método para seleccionar un conjunto de marcas segmentadas y etiquetadas para poder maximizar en función del criterio global. Finalmente usaron esas marcas seleccionadas con su etiquetado para reconstruir la segmentación de la imagen completa. El algoritmo completo incluyó los siguientes pasos:

- Separación de la imagen en pequeñas marcas encimadas.
- Segmentación de cada marca por medio de múltiples algoritmos.
- Cálculos entre marcas encimadas.
- Búsqueda de la segmentación óptima de las marcas y su etiquetado para maximizar la función general de criterio.
- Reconstrucción general de la segmentación completa.

Este marco puede combinar marcas segmentadas generadas por diferentes tipos de algoritmos. La combinación puede tener el beneficio de integrar varios algoritmos y mejorar los resultados de segmentación. Además, el proceso de separación y reconstrucción hace posible equilibrar parámetros para desarrollar la segmentación de una imagen ya que las marcas pequeñas pueden segmentarse fácilmente.

Vanzella y Torre (2006) propusieron un nuevo método de segmentación para imágenes naturales y complejas cuyas principales ventajas son dos: primero su versatilidad, proporciona resultados satisfactorios en una gran variedad de imágenes sin ajustar parámetros; segundo es básicamente un parámetro libre con la única excepción de controlar el granulado final de la segmentación. La mayor limitante de este método es evidente en comparación con la segmentación que realiza el ojo humano. Nuestro ojo extrae objetos de cualquier fondo con mucha facilidad. Este método de segmentación, el cual no utiliza ningún conocimiento previo, es en algunos casos capaz de aislar siluetas bien definidas de un fondo agrupado.

Wang (2006) presentó una metodología para segmentación y clasificación de imágenes en alta resolución. El tamaño y volumen de la información de las imágenes tomadas por una cámara digital de alta resolución fue de diez a cien veces mejor que las adquiridas por una cámara CCD ordinaria. Para acelerar el proceso de segmentación de imágenes grandes, primero las clasificó usando estas imágenes en baja resolución, para posteriormente procesarlas a través de un algoritmo de segmentación rápida. Este algoritmo se basa en una técnica multi-resolución y la fusión del resultado de la detección del contorno y el resultado de la segmentación. Usando esta metodología, el proceso completo de segmentación de la imagen se reduce cientos de veces en comparación con el método de segmentación tradicional y la precisión no disminuye. Este sistema fue desarrollado en ambiente Windows. El tamaño máximo de la caja de petri era de 9 cm de diámetro, la resolución más baja de la imagen era de 2048 x 1536 x 24 bits, y la más alta de 2560 x 1920 x 24 bits. La medición de la resolución fue de al menos 0.06 mm/píxel. Cuando se tomó la imagen, ésta se redujo, debido a su gran tamaño, de 4 a 5 veces para un procesamiento óptimo. Se realizaron análisis para 50 colonias con distintos parámetros. Las imágenes se clasificaron en 6 clases para reducir la cantidad de cálculos y aumentar la velocidad de procesamiento: a) imagen vacía, b) unas cuantas colonias, c) muchas colonias de tamaños similares, d) muchas colonias con tamaños diferentes, e) gran variación en el tamaño de las colonias y f) muchas colonias pequeñas encimadas con colonias grandes (Figura 1. 4).

Entre los principales parámetros que se manejaron en las imágenes están: la escala de grises, la magnitud del gradiente y el número y tamaño de las colonias. Para cada clase de imagen se configura el procedimiento correspondiente para el procesamiento y segmentación de la imagen, se aplica una umbralización (*thresholding*) y un alisado (*smoothing*) para las imágenes sencillas (utilizando diferentes algoritmos de umbralización para cada clase). Para las clases complicadas se empleó otro algoritmo de segmentación más robusto.

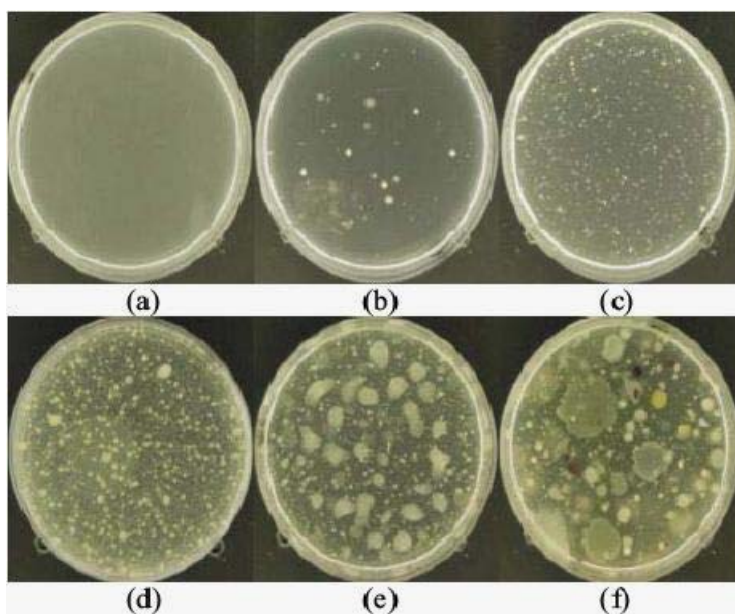


Figura 1.4. Clases típicas de imágenes de colonias (Wang, 2006).

En imágenes de colonias complicadas, las superficies de las colonias son distintas en color, intensidad de luz y fondo, lo que dificulta la segmentación. Suponiendo que cada colonia tenía un color e intensidad de luz similar, se aplicó una umbralización óptico-dinámica sobre la imagen completa para obtener valores de umbralización para diferentes regiones recalculando la umbralización para cada píxel. Finalmente, la imagen en escala de gris se convirtió a modo binario y las colonias se extrajeron de la imagen. Estas funciones se utilizaron para la primera y segunda segmentación. La segunda segmentación sólo se usó en el fondo o en la colonia.

Sin embargo, no todos los métodos mencionados pueden identificar las UFC de manera individual cuando estas crecen encimadas y no se distinguen los diferentes tamaños que puedan tener. Corkidi *et al* (2003) propusieron un sistema llamado COVASIAM (*Confluent and Various Sizes Image Analysis Method*), el cual es un método automatizado que utiliza las propiedades ópticas y de procesamiento digital de imágenes para la detección y separación de colonias microbianas encimadas y de diferentes tamaños cultivadas en cajas de petri. Este método aprovecha las propiedades ópticas de la mayoría de las colonias microbianas. La caja de petri es epi-iluminada con el fin de dirigir la luz que reflejan las colonias hacia un detector de imágenes. Conjuntamente desarrollaron un algoritmo de segmentación de objetos multi-nivel para la separación y el conteo de objetos conglomerados y con diferentes tamaños. Las pruebas las realizaron con muestras de microorganismos que forman colonias con propiedades físicas contrastantes ya que cubren el rango de brillantez a opacas, con superficies suaves o rugosas, y con baja o alta curvatura. Este sistema se comparó evaluando un promedio de 95.47% en comparación con el conteo manual y con el método automatizado basado en segmentación por umbral único, el cual evaluó un 76%.

El sistema COVASIAM (Figura 1.5) está compuesto por un detector de imágenes, una lámpara de halógeno con un espejo colector integrado que sirve para iluminar las cajas de petri. La iluminación es controlada por un *dimmer*, también se utilizó una lente biconvexa para enfocar. Para el desarrollo de los algoritmos de procesamiento de las imágenes se utilizó el programa comercial Imagena 2000 (Biocom, Francia), el cual utiliza un método simple de segmentación por umbral único. Corkidi *et al* tienen una patente en trámite del proceso automatizado para contar colonias utilizando este sistema COVASIAM (*U.S. Patent Application 60126688*).

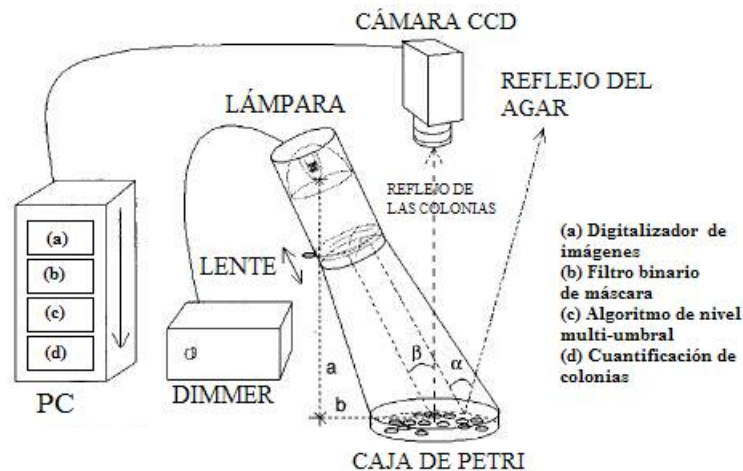


Figura 1.5. Sistema de iluminación y adquisición de la imagen COVASIAM.

Existe otra patente desarrollada por Marvin Weiss (2002) que consiste en un sistema y método para contar objetos en una imagen, particularmente colonias de microorganismos en un medio de cultivo. Se basa principalmente en los siguientes pasos: (a) proporcionar una imagen que incluya por lo menos un objeto definido en la imagen al menos de un color; (b) la identificación de objetos en la imagen teniendo en cuenta un color que exceda un umbral para proporcionar un número de objetos identificados; (c) la evaluación del número de los objetos identificados para determinarse si cada objeto satisface los criterios y puede ser contado, o no satisface los criterios y es incierto y necesita análisis adicional; (d) repetición de los pasos (b) y (c) para los objetos que son inciertos en color y que exceden el umbral hasta que cumplan los criterios; y (e) proporcionar un conteo de los objetos, por el que la exactitud de la cuenta se realce. Cada objeto se prueba preferiblemente para diferentes criterios incluyendo tamaño, la calidad de la visibilidad, color, superficie y forma.

En la microbiología, una de las áreas con mayor desarrollo es la automatización de los métodos de conteo. En el caso del conteo de UFC en cajas de petri, se han tenido que superar diferentes dificultades tales como: la distinción entre colonias que se tocan o se enciman, la identificación de cada colonia como una unidad, a pesar de las formas, tamaños, texturas, colores, intensidades de luz, etc., que las diferencian. Algunos sistemas utilizan cámaras fotográficas o equipo de video acoplados a sistemas automatizados y de

procesamiento de imágenes. Se han propuesto diferentes algoritmos para el conteo de colonias, sin embargo, no todos son apropiados para detectar colonias que se enciman y algunos consideran que los tamaños de estas colonias son uniformes.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 La microbiología

La microbiología es la ciencia encargada del estudio de los microorganismos, seres vivos pequeños (de *mikros* "pequeño", *bios*, "vida" y *logos*, "estudio"), también conocidos como microbios. Es la rama de la biología dedicada a estudiar los organismos que son sólo visibles a través del microscopio (virus, procariontes y eucariontes simples). Son considerados microbios todos los seres vivos microscópicos consistentes en una sola célula, es decir unicelulares, así como aquellos que forman agregados celulares en los cuales todas las células son equivalentes (en los cuales no existe diferenciación celular). Los microorganismos pueden ser eucariotas (las células poseen núcleo), tales como los hongos y los protistas, o procariotas (células carentes de núcleo), como las bacterias y los virus (aunque los virus no son considerados seres vivos estrictamente hablando) (Schlegel, 1997; Madigan y Martinko, 1998).

Aunque los conocimientos microbiológicos de que se dispone en la actualidad son muy amplios, todavía es mucho lo que queda por conocer y constantemente se efectúan nuevos descubrimientos en este campo. Se estima que sólo un 1% de los microbios existentes en la biosfera han sido estudiados hasta el momento. Por lo tanto, a pesar de que han pasado más de 300 años desde el descubrimiento de los microorganismos, la ciencia de la microbiología se halla todavía en su infancia en comparación con otras disciplinas biológicas tales como la zoología, la botánica o incluso la entomología (ciencia que trata del estudio de los insectos) (Schlegel, 1997; Madigan y Martinko, 1998).

2.1.1 Unidades formadoras de colonias

En la microbiología, el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) es una medición del número de bacterias viables. A diferencia del conteo directo en microscopio, donde todas las células, vivas y muertas son contadas, la determinación del número de UFC únicamente da información sobre las células viables. Por comodidad, los resultados de su conteo se dan en UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro) (Schlegel, 1997; Madigan y Martinko, 1998).

La teoría de la técnica de conteo de las UFC establece que una sola bacteria puede crecer y convertirse en una colonia por fisión binaria (método de reproducción asexual que implica partir de una célula madre en dos porciones aproximadamente iguales). Estas colonias son diferentes entre sí microscópicamente. Sin embargo algunas bacterias no se separan completamente durante este proceso y los resultados del conteo serán menores al número de células contadas utilizando métodos directos.

Esta técnica permite al usuario conocer cuántas UFC existen por mililitro o gramo en una muestra, es decir, se puede estimar la carga microbiológica o el grado de contaminación en diversos materiales como de agua, vegetales, suelo o frutos y en productos industriales y equipo.

2.1.2 Microorganismos bajo análisis

2.1.2.1 *Escherichia coli* O157:H7

Escherichia coli es un bacilo (bastón) no esporulado, Gram negativo (tinción roja) anaerobio facultativo y generalmente móvil. La mayoría de las cepas son fermentadoras de lactosa. Se considera como parte de la flora normal del intestino del hombre y de la mayoría de los animales de sangre caliente (Doyle y Cliver, 1990). Aunque la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* son inocuas y viven en los intestinos de los seres humanos y animales saludables, este serovar produce una potente toxina y puede ocasionar enfermedad grave. La combinación de letras y números en el nombre de la bacteria se refiere a los marcadores específicos que se encuentran en su superficie y la distingue de otros tipos de

Escherichia coli. O157:H7 es una causa emergente de enfermedad transmitida por los alimentos. Como medidas preventivas para la infección con *Escherichia coli* O157:H7 se puede mencionar la cocción adecuada de la carne de vacuno molida, evitando la leche no pasteurizada y lavándose bien las manos. Entre otras fuentes conocidas de la infección figuran el consumo de coles de Bruselas, lechuga, salami, leche y jugos no pasteurizados y después de nadar o beber agua contaminada con aguas de alcantarillado.

Este microorganismo tiene características muy particulares, que le permiten sobrevivir y crecer en diversos ambientes y alimentos (Arvizu, 1999):

- A valores de pH entre 5.5 y 7.5 la velocidad de crecimiento es similar, pero disminuye rápidamente a niveles más bajos (Buchanan y Klawitter, 1992). El mínimo pH de crecimiento se encuentra entre 4.0 y 4.5 (Buchanan y Bagi, 1994).
- Experimentalmente este patógeno sobrevive de varias semanas a meses en alimentos como mayonesa, salchichas y queso Cheddar entre otros. La sobrevivencia se extiende de manera importante cuando se disminuye la temperatura de almacenamiento.
- La temperatura mínima de crecimiento es aproximadamente de 8 a 10° C (Buchanan y Bagi, 1994; Rajkowski y Marmer, 1995).
- Muchas cepas de *Escherichia coli* O157:H7 no se desarrollan a temperaturas mayores de 44° C. El límite superior de temperatura de crecimiento es dependiente del medio de cultivo.
- *Escherichia coli* O157:H7 no presenta una resistencia especial a los compuestos antimicrobianos que se utilizan en los alimentos (Buchanan y Doyle, 1997).

2.1.2.2 *Listeria monocytogenes*

Es un bacilo corto Gram positivo (tinción azul oscura o violeta), no esporulado y móvil a temperaturas de 20 a 25° C (Bergy, 1984). Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza; se ha encontrado frecuentemente en plantas, suelo y agua. *Listeria monocytogenes* se ha aislado de 42 especies de mamíferos, 22 especies de pájaros, peces, crustáceos e insectos; que incluyen una diversidad de animales domésticos. A principios de

los 80's este microorganismo fue reconocido como un patógeno capaz de ser transmitido al hombre por los alimentos (Arvizu, 1999).

Listeria monocytogenes tiene características que le permiten sobrevivir o crecer en una gran variedad de condiciones y alimentos:

- Es un microorganismo psicrótrofo, es decir, se desarrolla a temperaturas de refrigeración, es capaz de crecer a 1.1° C.
- Tiene la capacidad de sobrevivir varias semanas a -18° C en diversos alimentos.
- Sobrevive periodos largos en condiciones de baja humedad, permanece 40 días a 25° C en alimentos marinos con 2.0 a 2.35 % de humedad.

2.1.2.3 *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis es una especie de bacteria no esporulante, no mótil (habilidad de moverse espontáneamente e independientemente), Gram-positiva usada extensamente en la producción de mantequilla y queso (Madigan y Martinko, 1998).

Lactococcus lactis son cocos que se agrupan en pares y en cortas cadenas, de 0,5 a 1,5 µm de longitud. Al fermentar leche, *Lactococcus lactis* produce grandes cantidades de ácido láctico.

Lactococcus lactis subespecie *lactis* se usa en los estadios tempranos de la producción de los siguientes quesos: Brie, Camembert, Cheddar, Colby, Gruyère, Parmesano y Roquefort. El uso de *Lactococcus lactis* en la industria láctea es delicado si se llega a contaminar el cultivo iniciador, teniendo como consecuencia características diferentes a las deseadas en el producto final (Coffey, 2002).

2.2 Crecimiento y cultivo microbiano

Se entiende por crecimiento microbiano al aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Por lo tanto, no se refiere al crecimiento de un único microorganismo

denominado ciclo celular, sino al crecimiento demográfico de una población. En esta sección, se describirá en términos generales el crecimiento y cultivo de microorganismos.

A lo largo del ciclo celular tiene lugar la replicación del material genético, la síntesis de componentes celulares, la elongación de la bacteria para alcanzar un tamaño doble del inicial y su división por bipartición para dar lugar a dos células hijas. Las poblaciones de bacterias crecen de forma explosiva acumulando grandes números en un periodo de tiempo muy reducido. Como el efecto de los microorganismos depende de su número, entender cómo se produce el crecimiento microbiano es importante para poder evitar o reducir sus efectos nocivos y potenciar los benéficos (Madigan y Martinko, 1998).

El cultivo de microorganismos consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada. En general, podemos distinguir cultivos líquidos y sólidos en función de las características del medio y cultivos discontinuos y continuos en función de la disponibilidad de nutrientes en el medio (Madigan y Martinko, 1998).

2.2.1 Medios de cultivo

Para crecer, un microorganismo necesita nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares. Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se pueden clasificar en autótrofos si es el CO₂ atmosférico (microorganismos que fotosintetizan) y heterótrofos si utilizan carbono orgánico. Los medios de cultivo se pueden clasificar en definidos cuando su composición química se conoce totalmente y complejos cuando están compuestos por mezclas de extractos de materiales complejos (extracto de levadura, extracto de carne, etc.). Por otra parte, los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos si se añade algún agente solidificante que no sea consumible por los microorganismos (normalmente agar).

En función de los microorganismos que pueden crecer en ellos, los medios pueden ser generales, selectivos cuando favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos mientras suprimen el de otros, diferenciales cuando alguno de sus componentes permite

identificar las colonias de un tipo de microorganismos, selectivo-diferenciales cuando combinan las dos características anteriores (por ejemplo, el agar de MacConkey para identificar *Escherichia coli*), y medios de enriquecimiento que permiten aislar un tipo determinado de microorganismo a partir de una mezcla (Madigan y Martinko, 1998).

2.2.2 Curva de desarrollo microbiano

En un cultivo microbiano, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano (Figura 2.1) (Madigan y Martinko, 1998):

1.- Fase *lag* o de adaptación. En ésta etapa, los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) para iniciar la fase de crecimiento exponencial.

2.- Fase exponencial o logarítmica. En ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio.

3.- Fase estacionaria. En ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente a las de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia industrial. Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano.

La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en los ambientes naturales.

4.- Fase de muerte. Se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo.

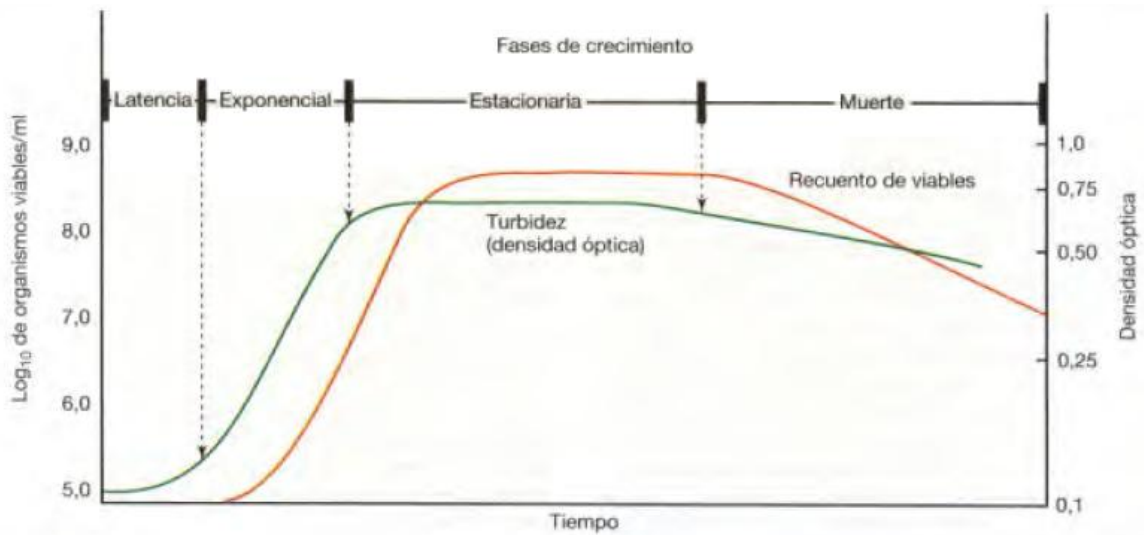


Figura 2.1. Curva de crecimiento típica de una población bacteriana (Madigan y Martinko, 1998).

2.2.3. Cuantificación del desarrollo microbiano

El crecimiento de poblaciones se mide estimando los cambios en el número de células, en la cantidad de algún componente de las mismas (por ejemplo, proteína) o en el peso total seco de las células.

2.2.3.1 Conteo celular directo

El número de células de una población se puede determinar contando una muestra con el microscopio mediante el método de conteo directo. El conteo directo se puede hacer de dos formas, en muestras secas o en muestras líquidas. En muestras líquidas se utilizan contadores de campo oscuro, sobre cuya superficie de vidrio está marcada una rejilla con pequeños cuadrados de área conocida. Cada cuadrado de la rejilla contiene un volumen pequeño conocido. Este conteo directo por microscopía presenta ciertas limitaciones: (1) no distingue las células vivas de las muertas; (2) las células pequeñas son difíciles de ver y algunas posiblemente se pierden en el conteo; (3) en ocasiones la precisión no es adecuada; (4) se requiere un microscopio de contraste de fases cuando las muestras no se tiñen; (5) el

método no suele ser adecuado para suspensiones con baja densidad celular; (6) las células móviles se deben inmovilizar antes del conteo.

2.2.3.2 Conteo celular indirecto. Células viables.

En el método de conteo anterior se cuentan tanto células vivas como muertas. En muchos casos interesa contar sólo las vivas. Con ese fin se han desarrollado métodos de conteo de células viables. Una célula viable se define como aquella que es capaz de dividirse y dar lugar a una descendencia. El método usual para realizar una determinación de células viables se basa en contar el número de células de la muestra que es capaz de formar colonias sobre un medio sólido adecuado. Por esta razón, el conteo de células viables también se llama conteo en placa o conteo de colonias. En este procedimiento se supone que cada célula viable puede formar una colonia.

Hay dos formas de realizar un conteo en placa para viables: la técnica de extensión en placa y la técnica de dilución en placa, que es la que se utilizará para el cultivo de microorganismos que se analizarán en el presente trabajo. En la técnica de dilución en placa (Figura 2.2) se coloca con la pipeta un volumen conocido (normalmente 0.1 – 1.0 ml) de cultivo en una caja de petri estéril, en la que se añade el medio con agar derretido. Posteriormente se mezcla todo con suaves movimientos de la caja sobre la superficie de la mesa antes de dejar que el agar se solidifique. Como la muestra se mezcla con el medio derretido, se pueden usar volúmenes de inóculo mayores que en la técnica de recuento por extensión; sin embargo, con esta técnica el organismo que se cuenta debe ser capaz de resistir la temperatura del agar derretido a 45° C (Madigan y Martinko, 1998).

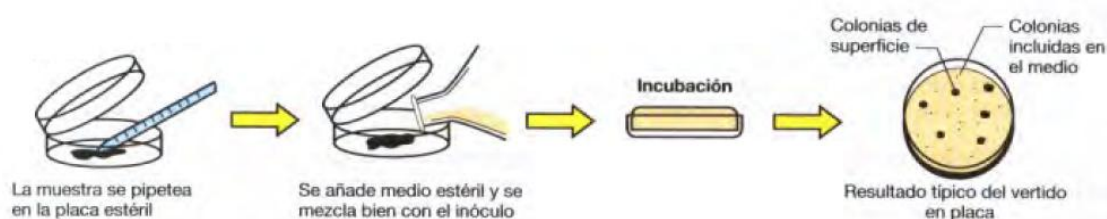


Figura 2.2. Técnica de dilución en placa (Madigan y Martinko, 1998).

2.2.3.3 Dilución de las suspensiones celulares antes de la siembra en placa

En las dos técnicas mencionadas anteriormente es importante que el número de colonias que aparezcan en las placas no sea demasiado grande, pues algunas colonias se podrían traslapar, dando estimaciones erróneas. También es importante que el número de colonias no sea demasiado bajo para que el cálculo sea estadísticamente significativo. En la práctica, el número de colonias por placa varía entre 30 y 300.

Para obtener el número apropiado de colonias casi siempre se diluye la muestra. Como raramente se conoce de antemano el número de células viables, normalmente se hace más de una dilución. Lo más frecuente es realizar diluciones decimales de la muestra (Figura 2.3) (Madigan y Martinko, 1998).

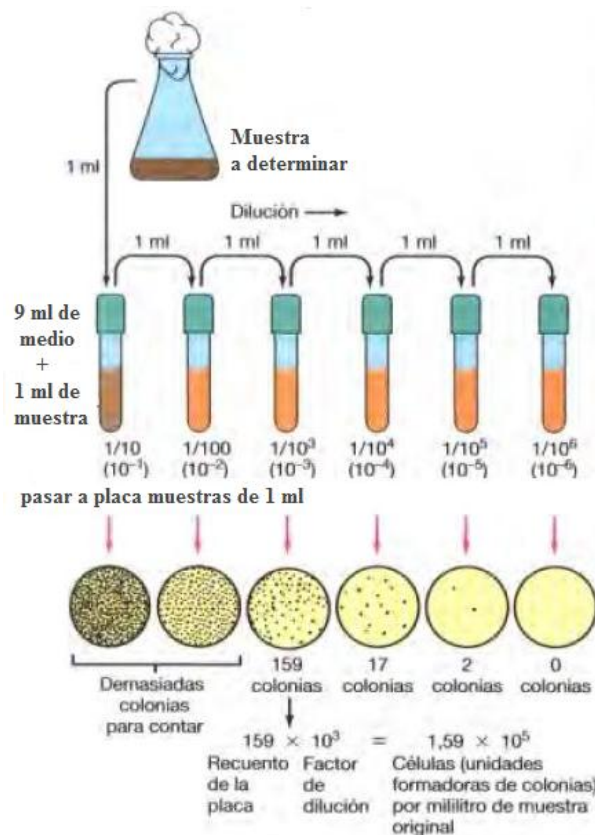


Figura 2.3. Procedimiento para la determinación de células viables usando diluciones seriadas de la muestra y la técnica de dilución en placa (Madigan y Martinko, 1998).

Para hacer una dilución de 10^{-1} , se mezclan 0.5 ml de la muestra con 4.5 ml de diluyente o 1 ml de la muestra con 9 ml del diluyente. Si se necesita una dilución de 10^{-2} , se pueden mezclar 0.05 ml de diluyente o 1 ml de la muestra con 4.95 ml del diluyente o 0.1 ml con 9.9 ml. Por otra parte, una dilución de 10^{-2} se puede hacer de modo seriado haciendo sucesivamente dos diluciones de tipo 10^{-1} . En la mayor parte de los casos se realizan dichas diluciones seriadas para alcanzar la dilución final deseada. Así, si se requiere una dilución de 10^{-6} se puede lograr haciendo tres diluciones sucesivas de 10^{-2} o seis sucesivas de 10^{-1} (Madigan y Martinko, 1998).

2.2.3.4 Fuentes de error en el conteo en placa

El número de colonias que se obtiene en una determinación de viables no sólo depende del tamaño del inóculo sino también de lo adecuado que sea el medio de cultivo y de las condiciones de la incubación. Las células depositadas en la caja de petri no se desarrollarán todas en colonias a la misma velocidad y si se emplea un corto tiempo de incubación, se obtendrán menos colonias de las posibles. Además, el tamaño de las colonias varía y si se desarrollan colonias muy pequeñas pueden pasar desapercibidas en el conteo. Es habitual establecer las condiciones de incubación (medio, temperatura y tiempo) que permitan obtener el mayor número de colonias para un determinado organismo. La determinación de viables puede estar sujeta a grandes errores y, si se desean conteos precisos, han de hacerse con cuidado y preparar las cajas de las diluciones por duplicado. Una agrupación de dos o más células sólo producirá una colonia, de modo que el recuento de viables será erróneamente menor (Madigan *et al.*, 1998).

2.3 Óptica básica

Para la captura de la imagen se deben de tomar en cuenta diferentes aspectos, como lo son el enfoque, el tipo de sensor de la cámara, la distancia de trabajo, la longitud focal y el tipo de lente, los cuales se explican a continuación.

El enfoque se define como la variación de la distancia entre el plano focal y el lente, hasta que el plano focal y la unión de los rayos coinciden (Figura 2. 4).

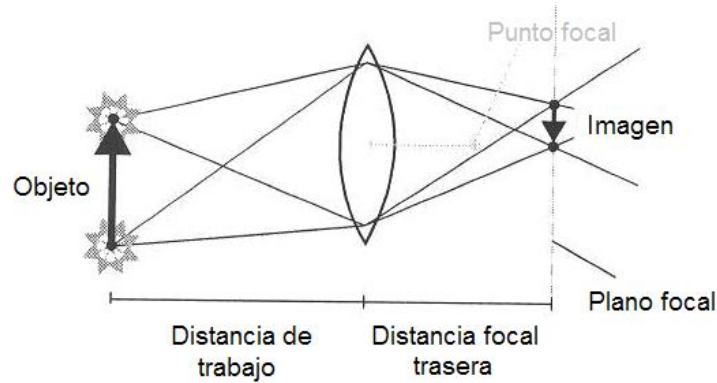


Figura 2.4 Enfoque de un objeto.

La principal característica es la relación entre el tamaño de la imagen y el tamaño del objeto.

$$aumentado = \frac{\text{tamaño de la imagen resultante}}{\text{tamaño del objeto}} \quad (2.1)$$

El aumento depende también de la distancia de trabajo. A mayor distancia, el objeto es más pequeño en la imagen. Al parámetro que describe lo anterior se le conoce como longitud focal.

$$longitud\ focal = \frac{\text{distancia de trabajo} * \text{tamaño de la imagen}}{\text{tamaño del objeto} + \text{tamaño de la imagen}} \quad (2.2)$$

2.3.1 Tamaño del sensor

El área activa del tamaño del sensor de una cámara normalmente se especifica por su dimensión horizontal. Este parámetro es importante para determinar el aumento del lente requerido para obtener un campo de visión deseado. El aumento principal PMAG (*primary magnification*) del lente se define como la relación entre el tamaño del sensor y el campo de visión (Ecuación 2.3).

$$PMAG = \frac{\text{tamaño del sensor (mm)}}{\text{campo de visión (mm)}} \quad (2.3)$$

Hoy en día la mayoría de las cámaras digitales tienen sensores de tipo CCD que son circuitos integrados con un número determinado de condensadores enlazados o acoplados. Bajo el control de un circuito interno, cada condensador puede transferir su carga eléctrica a uno o a varios de los condensadores que estén a su lado en el circuito impreso. La capacidad de resolución o detalle de la imagen depende del número de células fotoeléctricas. Este número se expresa en píxeles. A mayor número de píxeles, mayor resolución. Actualmente las cámaras fotográficas digitales incorporan CCDs con capacidades de hasta ciento sesenta millones de píxeles (160 megapíxeles). En la Figura 2.5 se muestran los diferentes tipos de CCD existentes. Normalmente, sólo se utilizan los valores horizontales.

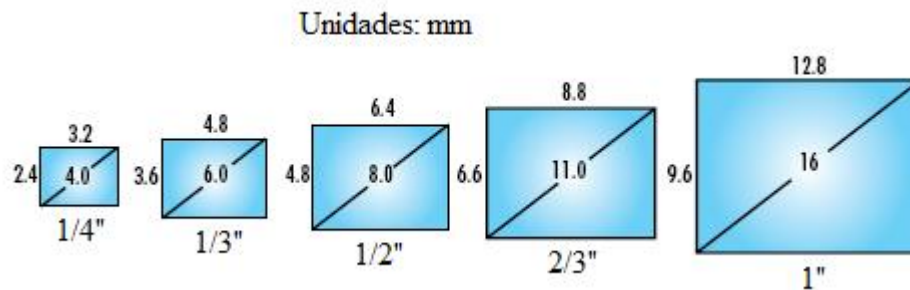


Figura 2.5. Formatos de CCD.

Anteriormente, las fotografías eran tomadas por cámaras fotográficas con un tubo acoplado. El diámetro externo del tubo era de 1/2, 2/3, ó 1 de pulgada, mientras que el área sensible a la luz en la parte delantera del tubo era por consiguiente más pequeña. Al montaje de lentes de tubo acoplados a la cámara se le llama montaje C. Consiste en aproximadamente 1 pulgada de cuerda que facilita el intercambio de lentes de modo simple, sencillo y robusto (Figura 2.6). El montaje CS sólo difiere de esta en la distancia focal de la ceja.

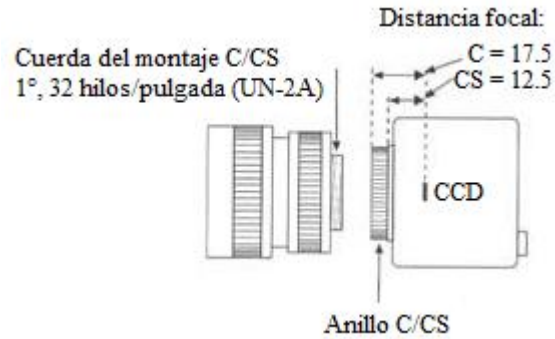


Figura 2.6. Cuerda del montaje C.

En el caso de lentes de 1/3 de pulgada, su círculo de imagen es ligeramente más grande que la diagonal de un CCD de 1/3. Así este círculo brillante cubre completamente el CCD de 1/3. Si se hubiera utilizado un CCD de 1/2 en lugar del de 1/3, el punto brillante no hubiera cubierto al CCD y sus esquinas permanecerían oscuras. Resumiendo, el formato de los lentes tiene que ser más grande o igual al formato del CCD.

Desafortunadamente, los lentes poseen defectos que ocurren principalmente en los bordes. Por lo tanto, es recomendable elegir un formato de la lente que sea lo más grande posible. Esto es para prevenir que los rayos de luz que pasan a través de las piezas externas de la lente resalten los defectos. La herramienta utilizada es el diafragma (iris). El diafragma no sólo disminuye los efectos del lente, también afecta la nitidez. Para describir el concepto de nitidez, obsérvese la Figura 2.7. Dos puntos de luz crean dos imágenes A' y B' . La longitud focal trasera se fija de modo que la imagen A esté exactamente en el CCD.

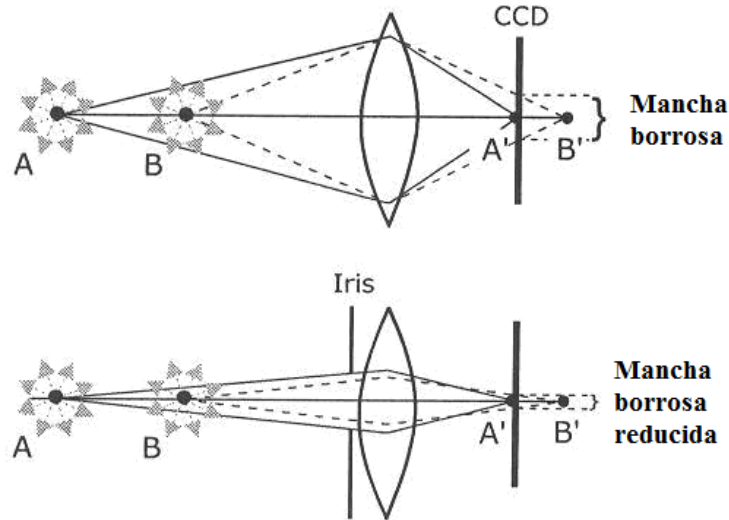


Figura 2.7. La nitidez

El punto B está más cercano al lente y por lo tanto la imagen B' queda detrás de A' . Debido a esto, la imagen de B es un punto borroso en el CCD. A esto se le conoce como “punto escondido”. Esto significa que teóricamente es imposible enfocar un objeto tridimensional. Únicamente una vista seccional del objeto estará realmente en foco mientras que el resto del objeto estará desenfocado en mayor o menor medida. Esta tolerancia de nuestros ojos es la base para el efecto llamado “Profundidad de campo”. En el caso de una película de 35 mm, un punto oculto más pequeño a 1/30 mm es registrado como “nítido”. En el caso de un CCD el tamaño de un *pixel* se puede definir como un punto oculto. Como una regla general, el tamaño de un *pixel* de un CCD moderno es de $5 \times 5 \mu\text{m}$. Es importante conocer la fórmula de la profundidad de campo para encontrar la correspondencia:

$$\text{límite profundidad de campo} = \frac{\text{distancia de trabajo}}{1 \pm \text{punto oculto} * \text{diafragma} * \frac{\text{distancia de trabajo} - \text{longitud focal}}{\text{longitud focal}^2}} \quad (2.4)$$

En conclusión, la profundidad del campo se basa en 3 parámetros:

- Falta de definición en un punto: Mientras más pequeña sea, más pequeña es la profundidad de campo.

- Diafragma: A menor apertura del diafragma, más pequeña es la profundidad de campo.
- Longitud focal: A mayor longitud focal, más pequeña es la profundidad de campo. Así, un incremento pequeño de la longitud focal lleva a una considerable disminución de la profundidad de campo.

Para la selección y el ajuste de los lentes, todos los métodos del cálculo se basan en un “lente ideal”. Las diferencias a los lentes comerciales son insignificantes en la práctica.

Paso 1: Cálculo de la longitud focal.

La longitud focal es un parámetro fundamental del lente. Para representar un objeto totalmente en el CCD, se calcula la longitud focal para la altura y el ancho del objeto. El valor más pequeño es la longitud focal del lente.

$$Longitud\ focal\ del\ ancho = \frac{distancia\ de\ trabajo * ancho\ del\ CCD}{ancho\ del\ objeto + ancho\ del\ CCD} \quad (2.5)$$

$$Longitud\ focal\ de\ la\ altura = \frac{distancia\ de\ trabajo * altura\ del\ CCD}{altura\ del\ objeto + altura\ del\ CCD}$$

Paso 2: Selección del lente

Para ajustar las longitudes focales, se necesitaría *zoom* en los lentes. Estos lentes, sin embargo, tienen desventajas considerables (peso, tamaño, precio, etc.). Por lo tanto, generalmente se utilizan lentes con foco fijo.

Paso 3: Cómo trabajar con distancias muy cortas

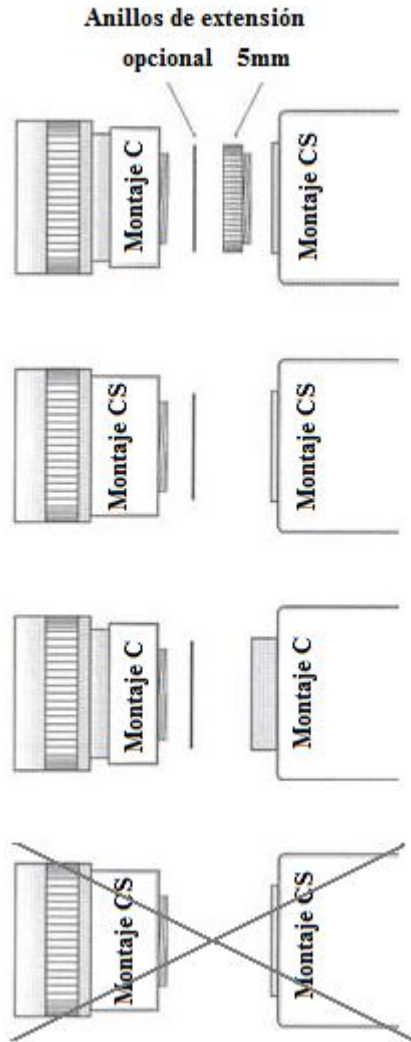
Especialmente en el caso de objetos pequeños, la distancia de trabajo puede ser más corta que la distancia de trabajo mínima, MOD (*minimal working distance*), seleccionada del lente. En este caso, se disminuye la distancia de trabajo mínima colocando anillos de extensión entre el lente y la cámara.

Paso 4: Ajuste

Con los dos tipos de montaje de lentes, podemos obtener cuatro combinaciones (Figura 2.8). Si se quisiera acoplar un lente de montaje C a una cámara de montaje CS, simplemente se enrosca un anillo de extensión a la cámara. Si en el Paso 3 se hubiera requerido un anillo de extensión adicional, este simplemente tendría que haber sido colocado entre la cámara y el lente. A continuación se presentan los tres errores más frecuentes al seleccionar componentes ópticos:

- Incorrecto: El formato de la lente y el de la cámara fotográfica tienen que ser idénticos
- Correcto: El formato del lente debe ser más grande que el del CCD ya que los defectos ópticos aparecen en el borde del lente.
- Incorrecto: Si el formato del lente es más grande que el formato del CCD, este tiene que ser de una mayor/menor longitud focal.
- Correcto: La longitud focal depende exclusivamente del formato del CCD, la distancia de trabajo y el tamaño de objeto.
- Incorrecto: Los anillos de extensión aumentan/reducen la profundidad de campo.
- Correcto: Los anillos de extensión disminuyen la distancia mínima de trabajo.

El contraste del lente se define normalmente en términos del porcentaje del contraste del objeto que es reproducido. La capacidad de un sensor para reducir el contraste normalmente se especifica en decibeles (dB) en cámaras analógicas y en bits en cámaras digitales.



Montaje	Formato	Long. Focal (mm)	MOD (m)
C	1/2"	5	0.1
C	2/3"	8	0.1
C	1/2"	12	0.25
C	2/3"	16	0.25
C	2/3"	25	0.35
C	2/3"	35	0.35
C	2/3"	50	0.90

Figura 2.8. Combinaciones entre montajes C y CS

2.4 El Procesamiento digital de imágenes

El procesamiento de imágenes tiene como objetivo mejorar el aspecto de las imágenes y hacer más evidentes en ellas ciertos detalles que se desean hacer notar. La imagen puede ser generada de muchas formas, por ejemplo, fotográficamente o por medio de monitores de televisión. El procesamiento de las imágenes se puede hacer por medio de métodos ópticos, o bien por medio de métodos digitales.

2.4.1 Parámetros fundamentales de un sistema de procesamiento de imágenes

2.4.1.1 Calidad de la imagen

Un sistema de procesamiento de imágenes debe de crear imágenes con suficiente calidad que permita al usuario extraer la información deseada del objeto. Existe una variedad de factores que contribuyen en general a la calidad de la imagen, como son: resolución, contraste, profundidad de campo, entre otros (*Edmund Optics Inc., USA, 2007*).

En esta sección se explica detalladamente la selección de los componentes de un sistema de procesamiento de imágenes, representado en la Figura 2.9, y su integración a una aplicación específica.



Figura 2.9. Parámetros fundamentales para la elección del lente (*Edmund Optics Inc., USA, 2007*).

El campo de visión es el área visible del objeto bajo inspección; en otras palabras, es la parte del objeto que llena el sensor de la cámara. La distancia de trabajo es la distancia que hay desde la parte frontal del lente hasta el objeto bajo inspección; La resolución es el

tamaño mínimo del objeto que puede distinguirse en un sistema de procesamiento de imágenes. Tener mayor resolución se traduce en obtener una imagen con más detalle o calidad visual. Para las imágenes digitales almacenadas como mapa de bits (BMP), la convención es describir la resolución de la imagen con dos números enteros, donde el primero es la cantidad de columnas de píxeles (cuántos píxeles tiene la imagen a lo ancho) y el segundo es la cantidad de filas de píxeles (cuántos píxeles tiene la imagen a lo alto). La convención que le sigue en popularidad es describir el número total de píxeles en la imagen (usualmente expresado como la cantidad de megapíxeles), que puede ser calculado multiplicando la cantidad de columnas de píxeles por la cantidad de filas de píxeles.

La resolución también se puede definir como la capacidad que tiene un sistema de procesamiento de imágenes de reproducir los detalles de un objeto. Una imagen con baja resolución es por lo general una imagen borrosa en la cual el objeto carece de detalles. La resolución del objeto puede calcularse a partir de la resolución de la cámara y usando el aumento principal del lente (PMAG).

La resolución espacial se define como una resolución en un cambio fijo. En otras palabras, la resolución espacial representa la resolución de una imagen binaria (es decir, la imagen blanca sobre un fondo negro sin tonos de grises). Es una forma de simplificar el sistema, por lo que se convierte en una situación “*on/off*” donde la imagen se puede expresar como una onda cuadrada. A menudo es más fácil pensar en la resolución en términos de una resolución espacial.

Con la Ecuación 2.6 se calcula la resolución del CCD, únicamente para cámaras digitales y con la Ecuación 2.7 la resolución del objeto.

$$\text{resol. cámara} = 2 \times \text{tamaño del píxel } (\mu\text{m}) \quad (2.6)$$

$$\text{resol. cámara} = 2 \times 4.65 \mu\text{m}$$

$$\text{resol. cámara} = 9.3 \mu\text{m}.$$

De la Ecuación 2.3 sabemos que:

$$PMAG = \frac{4.8mm}{134.73mm}$$

$$PMAG = 0.035$$

Por lo tanto,

$$resol. objeto = \frac{resol. cámara (\mu m)}{PMAG} \quad (2.7)$$

$$resol. objeto = \frac{9.3 \mu m}{0.035}$$

$$resol. objeto = 0.265mm$$

Esta es la partícula mínima detectada por el sistema a la distancia de trabajo de 18 centímetros.

2.4.1.2 Profundidad de campo

La profundidad de campo (DOF, *depth of field*), es la zona en la cual la imagen captada por el lente es nítida. La profundidad de campo no es una zona en la que la imagen está enfocada perfectamente sino la zona de la imagen donde el foco es lo suficientemente cercano al plano nítido como para ser aceptable. Por otra parte, mientras más cerca se encuentre la imagen, menor será la profundidad de campo (Figura 2.10).

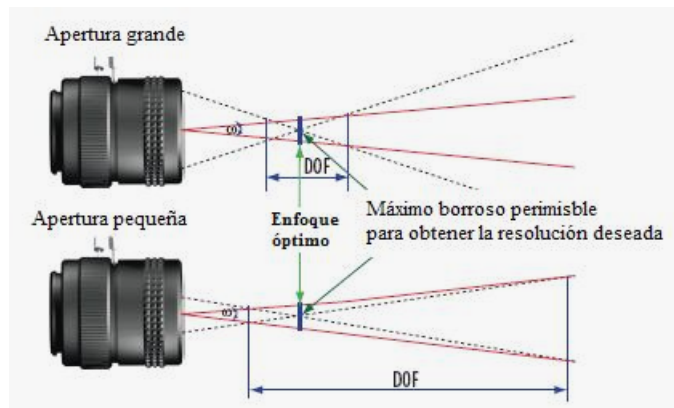


Figura 2.10. Representación geométrica de la profundidad de campo (DOF) a diferentes aperturas del lente (Edmund Optics Inc., USA, 2007).

2.4.2 Iluminación

Para cualquier usuario, no es difícil ajustar correctamente el contraste y la resolución en un sistema de procesamiento de imágenes, mientras se tome en cuenta que hay que contar con un buen sistema de iluminación. De hecho, la calidad de imagen deseada se puede optimizar mejorando la calidad de iluminación del sistema según la aplicación deseada, lo cual ayuda a reducir gastos tanto en *software* como en elementos ópticos (lentes). Se debe tener en cuenta que una buena intensidad de luz en la imagen final depende directamente de la selección de los componentes.

Cada componente afecta directamente la cantidad de luz que incide sobre el sensor, por lo tanto, afecta también la calidad de la imagen del sistema. La apertura de los lentes del sistema de procesamiento influye en la cantidad de luz que incide en la cámara. Debe existir una iluminación mayor conforme la apertura del lente sea menor. La apertura del lente, sistema de aumento, ajustes de la cámara, tipos de filtros y otros parámetros de iluminación afectarán la luz que incide sobre el sensor. La Tabla I muestra algunas características de diferentes tipos de iluminación (*Edmund Optics Inc., USA, 2007*).

Para obtener una imagen con mejor calidad y considerando las ventajas y desventajas de los tipos de iluminación, para este trabajo en particular se eligió la iluminación en forma de anillo, ya que como se observa en las características de la Tabla I se tiene una reducción de las sombras, una iluminación homogénea y no se tendría deslumbramiento en la superficie del agar.

El lente, el sensor y la iluminación juegan un papel muy importante en el contraste de la imagen resultante.

Iluminación	Ventajas	Desventajas	Tipo
<p>Difusa Frontal</p> 	Minimiza las sombras y reflexiones	Características de la superficie menos distinguibles	Anillos fluorescentes
<p>Direccional (sencilla y bilateral)</p> 	Iluminación fuerte y relativamente homogénea	Sombras y deslumbramiento	Sencilla y doble guías de luz de fibra óptica
<p>Anillo</p> 	Reduce sombras, iluminación fuerte y homogénea	Patrón circular de deslumbramiento en superficies altamente reflectantes; difícil montaje en ocasiones	Anillos de LEDs o de Fibra óptica
<p>Sencilla direccional, incidencia inclinada</p> 	Muestra defectos en la superficie del objeto (topología)	Sombreado excesivo	Fibra óptica
<p>Luz Polarizada</p> 	Iluminación homogénea, remueve	Menor intensidad a través de polarizador	El filtro se ajusta a diferentes lentes y fuentes de luz
<p>Luz Estructurada (Generación de línea)</p> 	Extrae las características de la superficie	Fuente muy intensa; luz absorbida por algunos colores	Generación de la línea de luz por diodos de láser o fibra óptica
<p>Axial Difusa</p> 	Libre de sombras, iluminación homogénea, poco deslumbramiento	Menor intensidad a través del divisor de haz interno, afecta al campo de visión y la distancia de trabajo FOV y WD	Iluminadores axiales de LEDs y fibra óptica

Tabla I. Características de distintos tipos de iluminación.

2.5 Morfología matemática

En términos generales, la palabra morfología se refiere al uso de forma y estructura. Para imágenes binarias se definen operaciones morfológicas, y con estas se constituye una herramienta de extracción de componentes de imagen útiles en la representación y descripción de la forma de las regiones. El análisis morfológico se realiza en una imagen de dos dimensiones en términos de alguna forma geométrica predeterminada conocida como *elemento estructural*. Esencialmente, se estudia el modo en que este elemento está contenido en la imagen.

Por ejemplo, en la Figura 2.11 vemos una imagen denominada S . Un cuadro del tamaño ilustrado entra en la imagen si se posiciona su centro en el punto $(1,2)$, pero no entra si se posiciona su centro en $(3,1)$. Es claro que la forma en que el cuadrado entra en S según cambie su posición en el plano refleja la relación existente entre la estructura geométrica de la imagen S y la del cuadro (Dougherty, 1992).

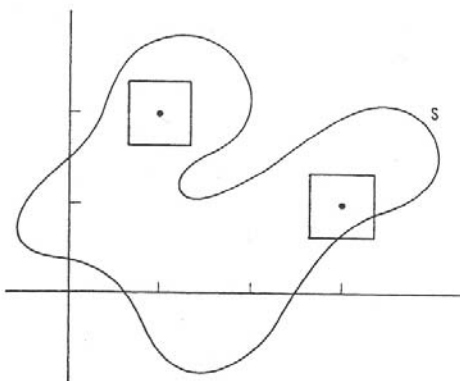


Figura 2.11. Posición de un elemento estructural cuadrado en la imagen denominada S .

Las operaciones morfológicas pueden emplearse con distintos fines, como la detección de bordes, la segmentación y el realce. En base a las operaciones morfológicas se pueden construir filtros morfológicos que pueden utilizarse en lugar de los filtros lineales estándar. Mientras que los filtros lineales distorsionan la forma geométrica subyacente de la imagen, los morfológicos la dejan intacta.

2. 5. 1 Morfología binaria

Las imágenes binarias son aquellas que tienen dos niveles, blanco y negro. Por lo tanto, pueden ser representadas mediante conjuntos. Por ejemplo, el conjunto de todos los *pixeles* blancos de una imagen en blanco y negro constituyen una descripción completa de la imagen. Un elemento estructural es un subconjunto de puntos cuya representación en el plano tiene cierta forma y tamaño. La idea básica es probar la imagen con un elemento estructural y cuantificar el modo en que está contenido dentro de la imagen. En una determinada ubicación dentro de la imagen pueden pasar dos cosas: que el elemento estructural esté contenido o que no lo esté. Marcando las ubicaciones en que está contenido obtenemos información estructural de la imagen. Esta depende de la forma y del tamaño del elemento estructural.

Como ejemplo, se llamará *A* a la imagen de entrada y *B* al elemento estructural. Las operaciones morfológicas básicas son:

- Dilatación
- Erosión
- Apertura
- Cierre

La dilatación y la erosión son dos operaciones morfológicas fundamentales.

2. 5. 2 Dilatación

Es una transformación morfológica que combina dos conjuntos usando la suma vectorial de elementos de un conjunto (Figura 2.12) y es estrechamente relacionada con una clásica operación de conjuntos estudiado por Minkowski, también conocida como suma de Minkowski (Ecuación 2.8)

$$A \oplus B = \{a+b : a \in A \text{ y } b \in B\} \quad (2. 8)$$

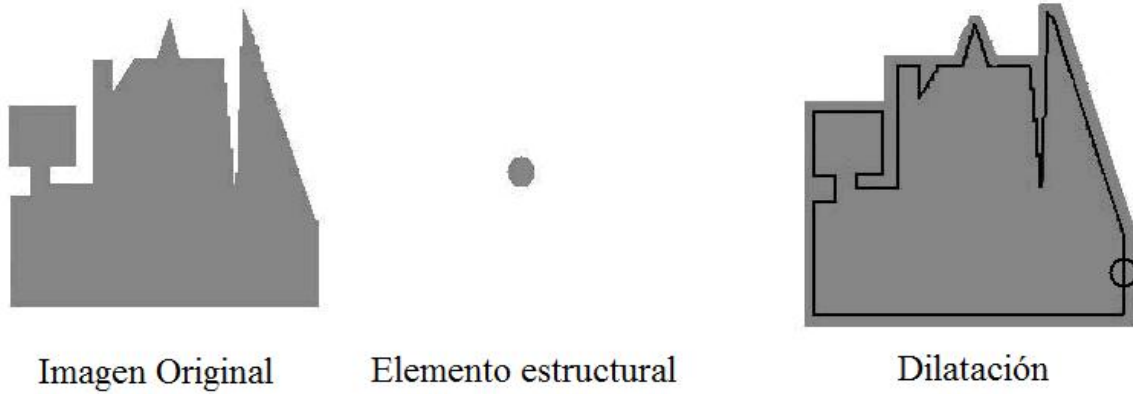


Figura 2.12 Dilatación con un elemento estructural circular, con el origen en el centro del mismo.

Propiedades de la dilatación:

1. Dilatación como unión de traslaciones. La dilatación de A por B puede ser calculada como la unión de traslaciones A por los elementos de B .

$$A \oplus B = \bigcup_{b \in B} (A)_b \quad (2.9)$$

2. Conmutativa.

$$A \oplus B = B \oplus A \quad (2.10)$$

3. Asociativa. Si una imagen A va a dilatarse por un elemento estructural D , el cual a su vez puede ser expresado como la dilatación de B por C , entonces $A \oplus D$ puede calcularse como:

$$A \oplus (B \oplus C) = (A \oplus B) \oplus C \quad (2.11)$$

4. Invariante a traslaciones.

$$(A)_x \oplus B = (A \oplus B)_x \quad (2.12)$$

5. Extensiva. Si el origen se encuentra dentro del elemento estructural, la dilatación tiene el efecto de *agrandar* la imagen de entrada, obteniendo una imagen que incluya a la original. De no ser así, la imagen resultante puede no incluir a la original.

Si B contiene al origen,

$$A \oplus B_0 \supseteq A \quad (2.13)$$

6. Creciente. La relación de contener se mantiene con la dilatación.

$$A \subseteq B \Rightarrow A \oplus D \subseteq B \oplus D \quad (2.14)$$

7. La intersección es no distributiva con respecto a la dilatación, pero cumple:

$$(A \cap B) \oplus C \subseteq (A \oplus C) \cap (B \oplus C) \quad (2.15)$$

$$A \oplus (B \cap C) \subseteq (A \oplus B) \cap (A \oplus C) \quad (2.16)$$

8. La unión es distributiva con respecto a la dilatación.

$$(A \cup B) \oplus C = (A \oplus C) \cup (B \oplus C) \quad (2.17)$$

2. 5. 3 Erosión

Es la transformación que combina dos conjuntos usando la resta vectorial de elementos de conjuntos (Figura 2.13). También conocida como resta de Minkowski (Ecuación 2.18).

$$A \ominus B = \{x \in E^N / x+b \in A \text{ para todo } b \in B\} \quad (2.18)$$

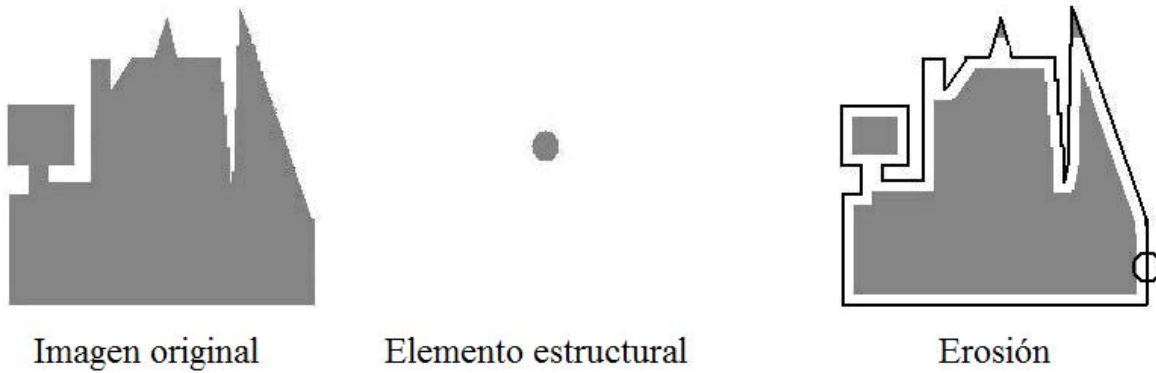


Figura 2.13. Erosión con un elemento estructural circular, con el origen en el centro del mismo.

Propiedades de la erosión:

1. Erosión como intersección de traslaciones

$$A \ominus B = \bigcap_{b \in B} (A)_{-b} \quad (2.19)$$

La erosión de una imagen A por un elemento estructural B es la intersección de todas las traslaciones de A por los puntos $-b$, donde $b \in B$.

2. Antiextensiva. Si el origen se encuentra dentro del elemento estructural, la erosión tiene el efecto de *encoger* la imagen de entrada, obteniendo una imagen incluida dentro de la original. De no ser así, la imagen resultante puede no estar incluida en la original.

Si B contiene al origen,

$$A \ominus B_0 \subseteq A \quad (2.20)$$

3. Invariante a traslaciones

$$(A)_x \ominus B = (A \ominus B)_x \quad (2.21)$$

$$A \ominus (B)_x = (A \ominus B)_{-x} \quad (2.22)$$

4. Creciente

$$A \subseteq B \Rightarrow A \ominus D \subseteq B \ominus D \quad (2.23)$$

5. Dualidad entre erosión y dilatación. La dilatación y la erosión comparten una similitud, en cuanto al resultado que se obtiene cuando se aplican al *foreground* (primer plano) o al *background* (fondo) de la imagen. Es más, su similitud puede formalizarse como una relación de dualidad. Dos operadores son duales cuando la negación de una formulación utilizando el primer operador es igual a la misma formulación utilizando el operador en las variables negadas. En morfología, la negación de un conjunto se considera en el sentido geométrico, es decir, invirtiendo la orientación del conjunto con respecto a los ejes de coordenadas. Esto se llama *reflexión*.

6. La intersección es distributiva con respecto a la erosión.

$$(A \cap B) \ominus C = (A \ominus C) \cap (B \ominus C) \quad (2.24)$$

7. La unión no es distributiva con respecto a la erosión, pero cumple:

$$(A \cup B) \ominus C \supseteq (A \ominus C) \cup (B \ominus C) \quad (2.25)$$

$$A \ominus (B \cap C) \supseteq (A \ominus B) \cup (A \ominus C) \quad (2.26)$$

8. Regla de la cadena para erosiones.

$$(A \ominus B) \ominus C = A \ominus (B \oplus C) \quad (2.27)$$

2.5.4 Apertura y cierre

En la práctica, la erosión y la dilatación se utilizan en pares, la erosión seguida de dilatación o viceversa. En ambos casos, el resultado de aplicarlos repetidamente es la eliminación de detalle específico de la imagen menor al tamaño del elemento estructural, sin una distorsión geométrica global de las características no suprimidas. Por ejemplo, efectuar una apertura, erosión-dilatación (Figura 2.14) por un elemento estructural con

forma de disco, suaviza el contorno, rompe extensiones angostas, elimina pequeñas islas y agudiza picos. Realizar una cerradura, dilatación-erosión (Figura 2.15) por un elemento estructural con forma de disco, suaviza el contorno, une roturas angostas y aberturas delgadas, eliminando pequeños agujeros, y completa espacios en el contorno. La propiedad más saliente de estos filtros es que son *idempotentes*, es decir, la aplicación consecutiva de una apertura o una cerradura no cambia el resultado de la primera aplicación. La importancia práctica es que constituyen estados completos y cerrados de algoritmos para el análisis de imágenes porque las formas pueden describirse en términos de elementos estructurales bajo los cuales pueden aplicarse aperturas o cierres sin que haya ningún cambio (Dougherty, 1992; Jain, 1989).

El origen del elemento estructural no afecta el resultado de una apertura o de una cerradura.

Apertura:

$$\gamma_{\lambda B}(f) = \delta_{\lambda B}(\varepsilon_{\lambda B}(f)) \quad (2.28)$$

Expresada de la siguiente forma en notación de resta y suma de Minkowski:

$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \quad (2.29)$$

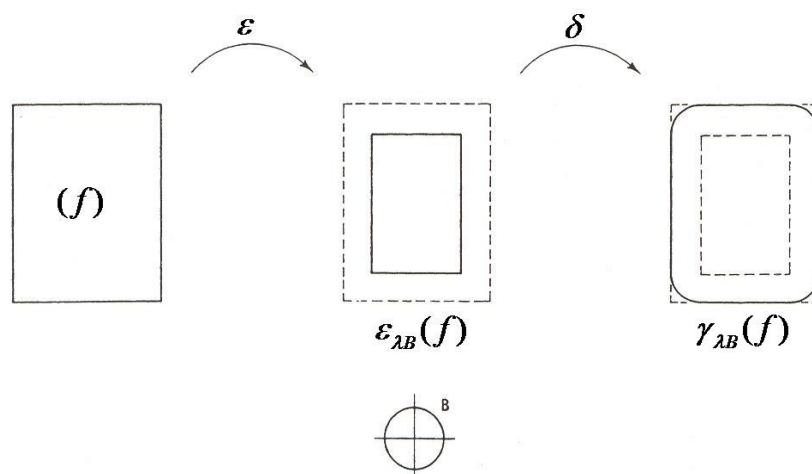


Figura 2.14. Apertura morfológica.

Cierre:

$$\varphi_{\lambda B}(f) = \varepsilon_{\lambda B}(\delta_{\lambda B}(f)) \quad (2.30)$$

O en términos de suma y resta de Minkowski:

$$A \bullet B = [\hat{A} \oplus (-B)] \ominus (-B) \quad (2.31)$$

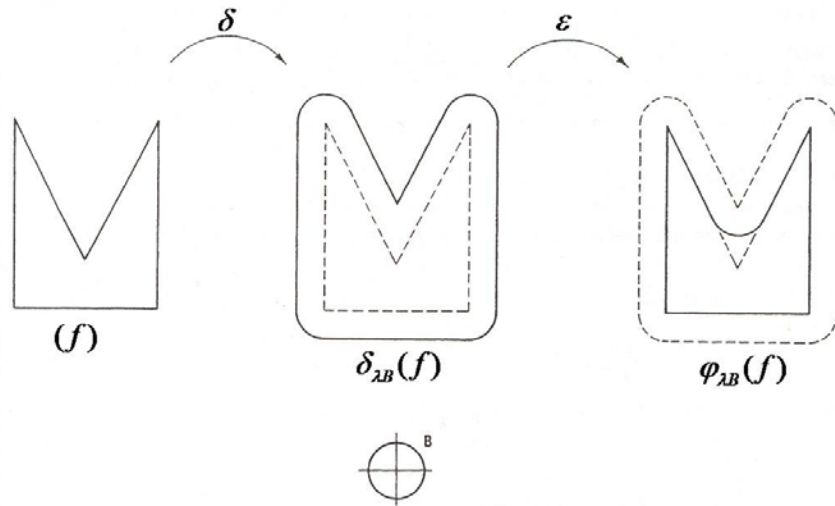


Figura 2.15. Cierre morfológico

En resumen, la dilatación agrega *píxeles* en los bordes de los objetos en una imagen, mientras que la erosión elimina *píxeles* en bordes del objeto. El número de *píxeles* agregados o removidos de los objetos de una imagen depende del tamaño y forma del elemento estructural usado para procesar la imagen. La dilatación y la erosión son usadas a menudo en combinación para efectuar operaciones de procesamiento de imágenes. Luego, la combinación de éstas da origen a los operadores apertura y cierre. El primero consiste en aplicar una erosión seguida de una dilatación aplicando la misma forma estructural. Como resultado esta tiende a "abrir pequeños huecos". El cierre es la aplicación de las operaciones básicas en el sentido inverso y resulta en "cerrar los huecos".

2.5.5 Procedimientos de pre-procesamiento

2.5.5.1 Detección de bordes

Uno de los procesos más importantes y sencillos es la *detección de bordes*. Es importante porque de él se puede empezar a extraer información de la imagen, como pueden ser las formas de los objetos que la componen, y sencillo porque los operadores de detección de bordes son simples máscaras de convolución. Estos operadores son utilizados en aplicaciones para el reconocimiento de formas, aplicaciones industriales, militares, etc.

Dentro de las numerosas aplicaciones para la detección de bordes, los artistas digitales lo usan para crear imágenes con contornos deslumbrantes pues la salida de un detector de bordes puede ser agregada a una imagen original para realzar los bordes. La detección de bordes es a menudo el primer paso en la segmentación de imagen, que es un campo del análisis de la imagen, y se utiliza para agrupar los píxeles en regiones para determinar una composición de la imagen. La detección de bordes también es usada en el registro de imagen, el cual alinea dos imágenes que podrían ser adquiridas en momentos separados y de sensores diferentes.

Los bordes de una imagen contienen mucha de la información de la imagen. Los bordes revelan donde están los objetos, su forma, su tamaño y también sobre su textura. Los ejes o bordes se encuentran en zonas de una imagen donde el nivel de intensidad fluctúa bruscamente, cuanto más rápido se produce el cambio de intensidad, el eje o borde es más fuerte. Un buen proceso de detección de bordes facilita la elaboración de las fronteras de objetos con lo que, el proceso de reconocimiento de objetos se simplifica. Para poder detectar los bordes de los objetos, debemos de detectar aquellos *puntos borde* que los forman.

En general, los bordes de objetos en una imagen los podemos distinguir por los cambios más o menos bruscos de valor entre dos o más píxeles adyacentes. Podemos realizar una clasificación general de los bordes según sea su dirección en:

- *Bordes verticales*, cuando píxeles conectados verticalmente tienen valores diferentes respecto de los anteriores o posteriores.
- *Bordes horizontales*, cuando tenemos píxeles conectados horizontalmente, y estos tienen distintos valores respecto de los anteriores o posteriores.
- *Bordes oblicuos*, cuando tenemos una combinación de las componentes horizontales y verticales.

La diferencia entre los valores de los píxeles nos indica lo acentuado del borde, de forma que a mayores diferencias tenemos bordes más marcados y a menores tenemos unos bordes suavizados. Los filtros utilizados para la detección de bordes son *filtros diferenciales*, que se basan en la derivación o diferenciación. Dado que el promediado de los píxeles de una región tiende a difuminar o suavizar los detalles y bordes de la imagen, y esta operación es análoga a la integración, es de esperar que la diferenciación tenga el efecto contrario, el de aumentar la nitidez de la imagen, resaltando los bordes.

Derivada de primer orden

Muchas técnicas basadas en la utilización de máscaras para la detección de bordes utilizan máscaras de tamaño 3 x 3 o incluso más grandes. La ventaja de utilizar máscaras grandes es que los errores producidos por efectos del ruido son reducidos mediante medias locales tomadas en los puntos en donde se superpone la máscara. Por otro lado, las máscaras normalmente tienen tamaños impares, de forma que los operadores se encuentran centrados sobre los puntos en donde se calculan los gradientes (Ecuación 2.32).

$$\begin{aligned} \frac{\partial f(x, y)}{\partial x} = \Delta_x &= \frac{f(x + d_x, y) - f(x, y)}{d_x} & \Delta_x &= f(i + 1, j) - f(i, j) \\ \frac{\partial f(x, y)}{\partial y} = \Delta_y &= \frac{f(x, y + d_y) - f(x, y)}{d_y} & \Delta_y &= f(i, j + 1) - f(i, j) \end{aligned} \quad (2.32)$$

Los operadores de gradiente común (o gradiente ortogonal) encuentran bordes horizontales y verticales. Estos operadores trabajan mediante convolución. Los operadores de *Prewitt*, *Sobel*, *Roberts* y *Frei-Chen* son operadores dobles o de dos etapas. La detección

de bordes se realiza en dos pasos, en el primero se aplica una máscara para buscar bordes horizontales, y en el segundo paso se buscan los verticales. El resultado final es la suma de ambos. A continuación se muestran algunas máscaras de convolución comunes. Los detectores de fila (horizontales) son H_h y los detectores de columna (verticales) son H_v (Tabla II):

	Roberts	Prewitt	Sobel	Frei-Chen
	0 0 -1	1 0 -1	1 0 -1	1 0 -1
H_h	0 1 0	1 0 -1	2 0 -2	$\sqrt{2}$ 0 $-\sqrt{2}$
	0 0 0	1 0 -1	1 0 -1	1 0 -1
	-1 0 0	-1 -1 -1	-1 2 1	-1 $-\sqrt{2}$ -1
H_v	0 1 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0
	0 0 0	1 1 1	1 2 1	1 $\sqrt{2}$ 1

Tabla II. Máscaras de los operadores de gradiente común.

Los filtros diferenciales ayudan a detectar bordes pues las zonas que en la imagen original son de un tono uniforme (cualquiera sea) se transforman en un gris mediano (valores cercanos al cero). Algunos resultan negros (valores negativos) y otros blancos (valores positivos). Otros bordes no son enfatizados y quedan grises (valores cercanos al cero). Un ejemplo de estos operadores se muestra en la Figura 3.16.

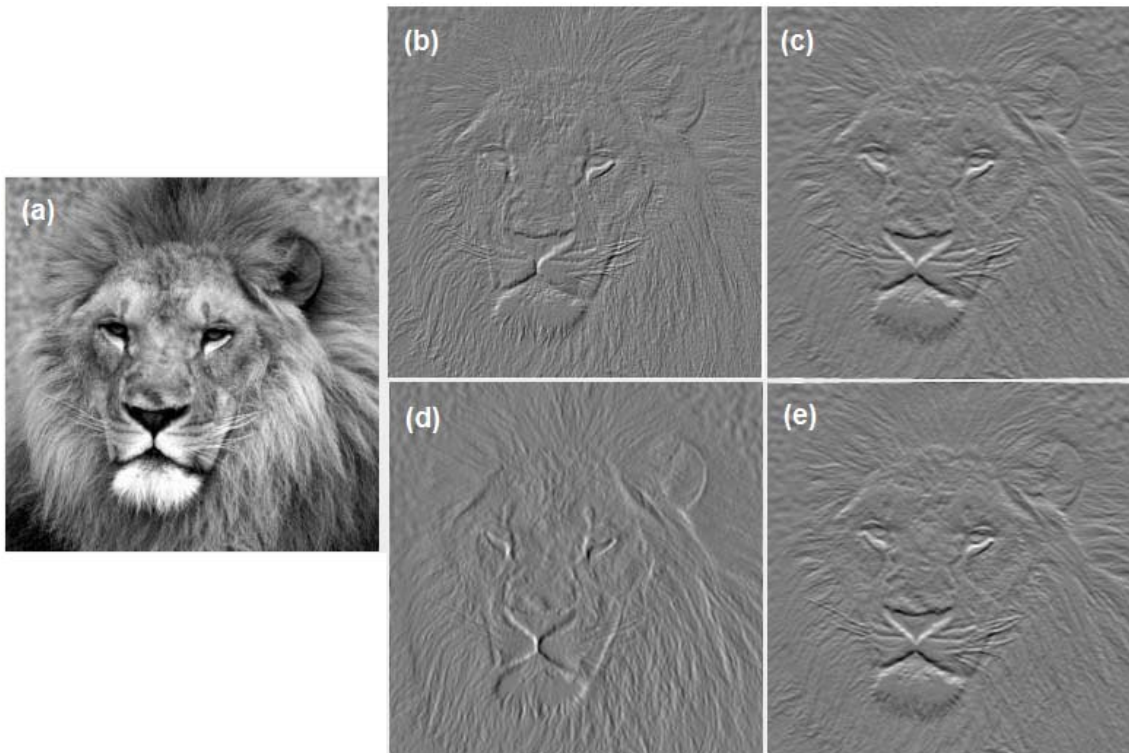


Figura 2.16. Detección de bordes con diferentes operadores. (a) Imagen original; (b) Roberts; (c) Prewitt; (d) Sobel y (e) Frei-Chen.

Esta alteración de los bordes produce una ilusión de relieve. La imagen parece hundirse y sobresalir, iluminada por una fuente de luz. Los tonos claros parecen estar más iluminados, y los oscuros parecen sombras. Las zonas que en la imagen original eran más oscuras parecen hundirse, mientras que las más claras sobresalen. Es como considerar a la imagen como una superficie bidimensional en un espacio tridimensional, siendo el valor del píxel la altura de la superficie en ese punto.

2.5.5.2 Umbral (*threshold*)

Una de las transformaciones más sencillas, que podemos aplicar a una imagen es la umbralización (*threshold*). Esta transformación genera una imagen en dos tonos (blanco y negro) a partir de otra con múltiples niveles de gris, es decir, la salida es binaria (Figura 2.17). Puede afirmarse que la umbralización es en realidad un caso extremo de ampliación de contraste ($x_1 = x_2$; $y_0 = y_1 = 0$; $y_2 = y_3 = L-1$).

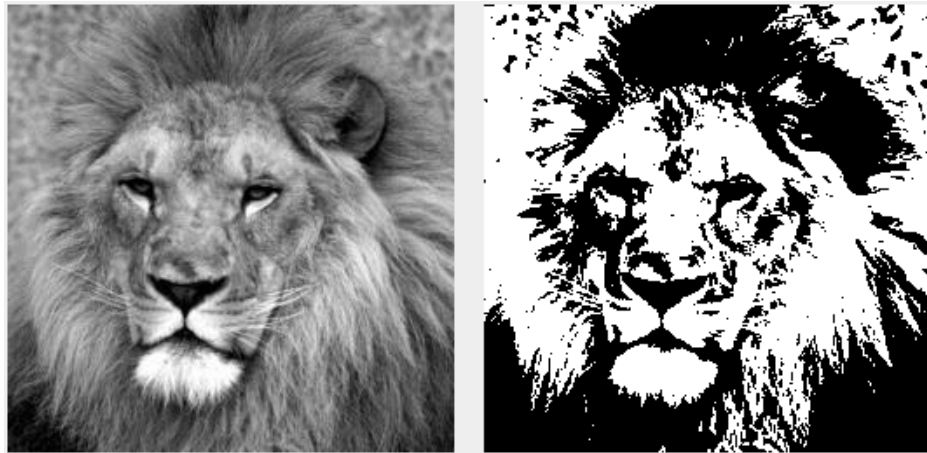


Figura 2.17. Umbral (*threshold*).

La umbralización es una de las más importantes y sencillas técnicas de segmentación, puesto que en muchas aplicaciones de procesamiento de imágenes queremos dividir una imagen de grises en subregiones. El valor de umbral B es el que decide qué puntos de la imagen son cambiados a negro y cuáles a blanco. La elección de B es uno de los mayores problemas de la umbralización, puesto que no podemos dar reglas a seguir para calcularlo. Cada imagen tendrá uno o varios valores válidos para B según sea la segmentación que queramos conseguir. Una buena forma de elegirlo es por medio del histograma.

La expresión matemática de esta transformación es:

$$g(x, y) = \begin{cases} 0 & \text{para } 0 \leq f(x, y) < B \\ 1 & \text{para } B \leq f(x, y) \leq 255 \end{cases} \quad (2.33)$$

El umbralizado transforma el histograma de la imagen original en un histograma de dos puntos, con valores sólo para el negro y el blanco.

2.5.6 Procedimientos de segmentación

2.5.6.1 Filtrado morfológico

Un filtro morfológico es cualquier transformación no lineal, creciente e idempotente. Los dos filtros morfológicos más elementales son la apertura y el cierre. Concretamente, la apertura es un filtro morfológico antiextensivo. El cierre es un filtro morfológico extensivo. Para la construcción de nuevos filtros morfológicos se parte de los básicos y mediante composición o combinación con otras operaciones se implementan los filtros alternos, los filtros alternos secuenciales y de contraste, entre otros (Fernández, 1994).

Las aplicaciones básicas de los filtros morfológicos son la atenuación de ruido y la extracción selectiva de objetos en la imagen. Ambas aplicaciones son importantes en visión artificial, pues técnicas de interpretación o medida fallarán en presencia de ruido, mientras que la selección de estructuras y objetos es fundamental en los procesos de segmentación.

Filtros Alternos

Si tenemos ζ y ψ que son dos filtros morfológicos con $\psi \leq \zeta$. Combinándolos podemos generar cuatro filtros, crecientes e idempotentes: $\zeta\psi$, $\psi\zeta$, $\zeta\psi\zeta$, $\psi\zeta\psi$, que satisfacen las siguientes propiedades:

$$1. \Psi \leq \Psi\zeta \Psi \leq \zeta\Psi \text{ ó } \leq \Psi\zeta \leq \zeta\Psi\zeta \leq \zeta \quad (2.33)$$

$$2. \zeta\Psi\zeta = \Psi\zeta \Leftrightarrow \Psi\zeta\Psi = \leq \zeta\Psi \Leftrightarrow \Psi\zeta \geq \zeta\Psi \quad (2.34)$$

$$3. \zeta\Psi\zeta \text{ es el menor filtro mayor que } \zeta\Psi \wedge \Psi\zeta \quad (2.35)$$

$$4. \Psi\zeta\Psi \text{ es el mayor filtro menor que } \zeta\Psi \wedge \Psi\zeta \quad (2.36)$$

Para el caso de una apertura arbitraria γ , y un cierre arbitrario ϕ con un mismo elemento estructural, se tiene que $\gamma\phi$, $\phi\gamma$, $\gamma\phi\gamma$ y $\phi\gamma\phi$, son filtros. La combinación de γ , y ϕ ,

genera la secuencia: $\varphi \rightarrow \gamma\varphi \rightarrow \varphi\gamma\varphi \rightarrow \varphi\gamma\varphi \rightarrow \dots$. Es importante señalar que, salvo en el caso que se cambie el elemento estructural, la composición de más de tres operadores no va a proporcionar un nuevo filtro, ya que si $\zeta\psi$ es idempotente, entonces $\zeta\psi\zeta\psi = \zeta\psi$.

Filtros alternos secuenciales

El filtrado de una imagen por ruido simétrico “blanco y negro” puede ser realizado con la combinación de apertura y cierre o cierre y apertura. Sin embargo, cuando el nivel de ruido en la imagen es alto, estos filtros alternos sencillo no resuelven el problema, pues el empleo de elementos estructurales elevados deterioran el resto de estructuras de la imagen. Una solución a esto es la creación de filtros alternos secuenciales. La aparición de filtros alternos secuenciales en morfología matemática se debe a los trabajos realizados por S. Sternberg en 1986.

Si se consideran dos familias de operadores $\{\zeta_i\}$ y $\{\psi_i\}$ tales que $\{\zeta_i\}$ crece con i , $\{\psi_i\}$ decrece con i y $\psi_1 \leq \zeta_1$, se tiene entonces que:

$$\dots \psi_n \leq \dots \leq \psi_2 \leq \psi_1 \leq \zeta_1 \leq \zeta_2 \leq \dots \leq \zeta_n \dots \quad (2.37)$$

Las composiciones de filtros morfológicos presentes a continuación:

$$N_i = \zeta_i \psi_i \dots \zeta_2 \psi_2 \zeta_1 \psi_1 \quad (2.38)$$

$$M_i = \psi_i \zeta_i \dots \psi_2 \zeta_2 \psi_1 \zeta_1 \quad (2.39)$$

son filtros alternos secuenciales y forman una composición encadenada de aperturas y cierres, realizadas con un tamaño creciente de elemento estructural. Es necesario tener en cuenta la forma del elemento estructural, pues si se trata de elementos cuadrados y el factor o índice del filtro es i , los elementos tendrán una altura y un ancho de $2i + 1$. Por ejemplo, N_4 sería una composición de cierre seguido de apertura con elemento estructural tamaño 3×3 . Al resultado de estos dos filtros se aplicaría un cierre y una apertura realizada con un

elemento estructural de tamaño 5 x 5, y así sucesivamente, hasta aplicar una última apertura con un elemento estructural de tamaño 9 x 9.

Es fácil demostrar que los filtros alternos secuenciales constituyen filtros morfológicos y satisfacen la siguiente ley de absorción:

$$i \leq j \rightarrow ASF_j ASF_i = ASF_j \text{ y } ASF_i ASF_j \leq ASF_j \quad (2.40)$$

La eficacia de los filtros alternos secuenciales en la eliminación de ruido está ampliamente demostrada y constituye en muchas aplicaciones un paso previo en la segmentación de imágenes.

2.5.6.2 Función distancia

La Función Distancia es uno de los operadores clásicos en el procesamiento de imágenes y se puede definir de la siguiente manera. Dada una imagen binaria con valores $\{0, k\}$, donde $k \neq 0$ representa el objeto de interés (*foreground*) y 0 representa el fondo de la imagen (*background*), la Función Distancia nos regresa una imagen en escala de grises, donde el valor de cada píxel representa la distancia mínima al fondo de la imagen. A pesar de que esta definición es sencilla, existen muchos algoritmos para la Función Distancia que tienen conceptos en común los cuales ayudan a su clasificación (Zampirolli y Latufo, 2000). Este operador se puede implementar por medio de diferentes espacios métricos (Borgefors, 1986): *City-block*, *Chessboard*, *Octagonal*, *Chamfer* y Euclidiana los cuales se explican a continuación.

Sean x y $y \in Z^2$, $d(x, y)$ es la distancia entre x y y si:

- (i) $d(x, y) = d(y, x)$;
- (ii) $d(x, y) \geq 0$;
- (iii) $d(x, x) = 0$.
- (iv) $d(x, y) = 0 \Leftrightarrow x = y$;
- (v) $d(x, y) \leq d(x, z) + d(z, y)$.

Algunos espacios métricos para $d(x, y)$, donde $x = (x_1, x_2) \in Z^2$ y $y = (y_1, y_2) \in Z^2$ se representan de la siguiente manera:

$$\text{City-block: } d_4(x, y) = |x_1 - y_1| + |x_2 - y_2|;$$

$$\text{Chessboard: } d_8(x, y) = \max\{|x_1 - y_1|, |x_2 - y_2|\};$$

$$\text{Euclidiano: } d_E(x, y) = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2}$$

Para el espacio métrico Euclidiano se trabaja con el cuadrado de la distancia Euclidiana $(d_E)^2 \in Z$, esto para obtener imágenes con enteros.

Se define la Función Distancia de un píxel x a un conjunto X , como:

$$d(x, X) = \min\{d(x, y) : y \in X\}. \quad (2.41)$$

La Función Distancia denotada como $\Psi_d(f)$ es definida como:

$$\Psi_d(f)(x) = d(x, \{y \in E : f(y) = 0\}), \quad (2.42)$$

que es el valor de la distancia mínima que va desde un píxel al fondo de la imagen.

Shih y Mitchell en el 2004 fueron los primeros en demostrar que la Función Distancia se puede obtener por erosión morfológica usando un elemento estructural b_G aplicada a una imagen f en escala de grises con valores 0 y k :

$$\Psi_d(f) = \varepsilon b_G(f). \quad (2.43)$$

El radio de b_G y el valor de k deben ser más grandes que la mayor distancia del objeto en f . El origen de b_G es cero con valores negativos decrecientes a partir del origen. La forma de b_G depende del espacio métrico usado en la Función Distancia.

Algo muy importante para este operador es la idempotencia, es decir, si se le aplica una erosión por el mismo elemento estructural en varias ocasiones, el resultado siempre es el mismo:

$$\varepsilon b_G (\varepsilon b_G (f)) = \varepsilon b_G (f). \quad (2.44)$$

Por ejemplo, en la Figura 2.18a se muestra el elemento estructural b_G para los espacios métricos *City-Block*, *Chessboard*, Octagonal y Cuadrado del Euclidiano, considerando que el origen está marcado en negritas y la mayor distancia en la imagen resultante es 2.

La Figura 2.19b ilustra la erosión de una imagen binaria f (Figura 2.18a) por b_G , usando el espacio Euclidiano.

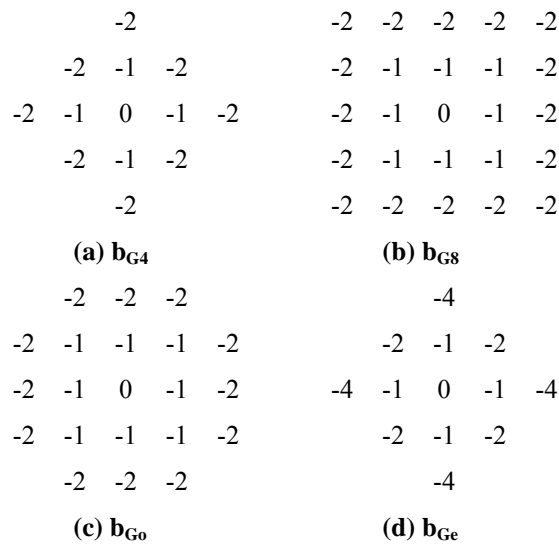


Figura 2.18. Tipos de espacios métricos para elemento estructural b_G : (a) *City-Block*, (b) *Chessboard*, (c) Octagonal y (d) Euclidiano.

0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	k	k	k	0	0	0
0	0	k	k	k	k	k	0	0
0	k	k	k	k	k	k	k	0
0	k	k	k	0	k	k	k	0
0	k	k	k	k	k	k	k	0
0	0	k	k	k	k	k	0	0
0	0	0	k	k	k	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0

(a)

0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	0	0	0
0	0	1	2	4	2	1	0	0
0	1	2	2	1	2	2	1	0
0	1	4	1	0	1	4	1	0
0	1	2	2	1	2	2	1	0
0	0	1	2	4	2	1	0	0
0	0	0	1	1	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0

(b)

Figura 2.19. (a) Imagen de entrada f y (b) Función Distancia = $\varepsilon b_G(f)$.

2.5.6.3 Esqueleto

El esqueleto o *skeletonization*, es una transformación de un componente de una imagen digital en un subconjunto de componentes de la misma imagen original. Existen diferentes categorías para esta transformación: una de ellas se basa en la Función Distancia y un subconjunto específico de la imagen transformada es una *distancia esqueleto*. El componente original puede ser reconstruido a partir de esta *distancia esqueleto*. Otra categoría de define por adelgazamiento (*thinning*) y el resultado utilizando este algoritmo sería un conjunto de arcos o curvas conectadas (Klette, 2002).

Dado un punto en el interior a una imagen binaria, existe un disco que contiene un punto en su centro y se extiende dentro de la imagen. Relacionando el disco en un punto, hay dos posibilidades: ya sea que exista otro disco que encaje dentro de la imagen y que contenga a propio disco o no existe tal disco contenido dentro de la imagen. Cualquier disco que cumpla con la segunda condición es conocido como disco máximo. Los centros de todos los discos máximos forman el esqueleto (o eje medio) de la imagen (Dougherty, 1992).

Para visualizar esto, si consideramos un triángulo isósceles como el de la Figura 2.20, cuyo esqueleto se representa en el inciso (a), el inciso (b) muestra un disco máximo $D(x)$ situado en el punto x , de modo que x se encuentra en el esqueleto. En el inciso (c), $D(w)$ es el disco más grande situado en w ; sin embargo, no es un máximo ya que está propiamente contenido en D' que a su vez se ubica dentro del triángulo. Por lo tanto, w no está en el esqueleto. Para una imagen A , denotamos el esqueleto como $Skel(A)$. La Figura 2.21 ilustra algunos esqueletos. Hay que notar que imágenes diferentes pueden tener el mismo esqueleto, ya que el esqueleto es muy sensible al ruido. Además, puede haber conjuntos conectados que puedan tener esqueletos desconectados.

Lantuéjoul propuso la siguiente fórmula morfológica para el esqueleto de una imagen binaria (Lantuejoul, 1977).

$$Skel(S) = \cup \{(S \ominus nB) - [(S \ominus nB) \circ B] : n = 0, 1, 2, \dots\} \quad (2.45)$$

Donde \ominus y \circ son apertura y cerradura morfológica morfológicas respectivamente, y B es un elemento estructural en forma de disco.

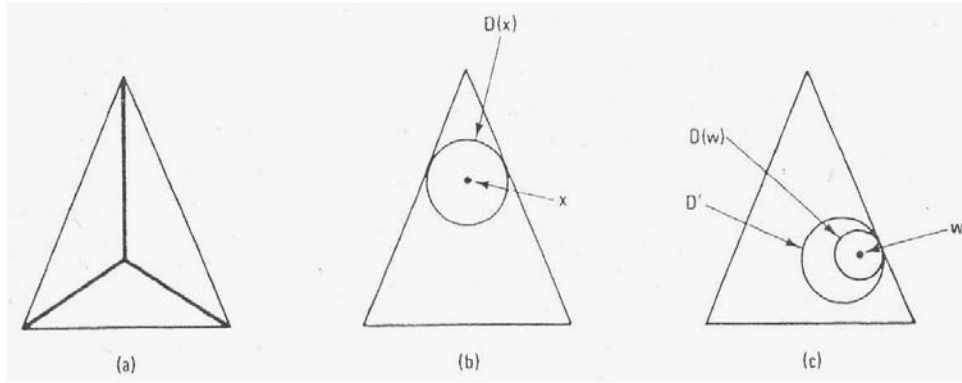


Figura 2.20. Esqueleto de un triángulo: (a) esqueleto, (b) disco máximo para un esqueleto de punto, (c) disco mayor para un punto no esqueleto.

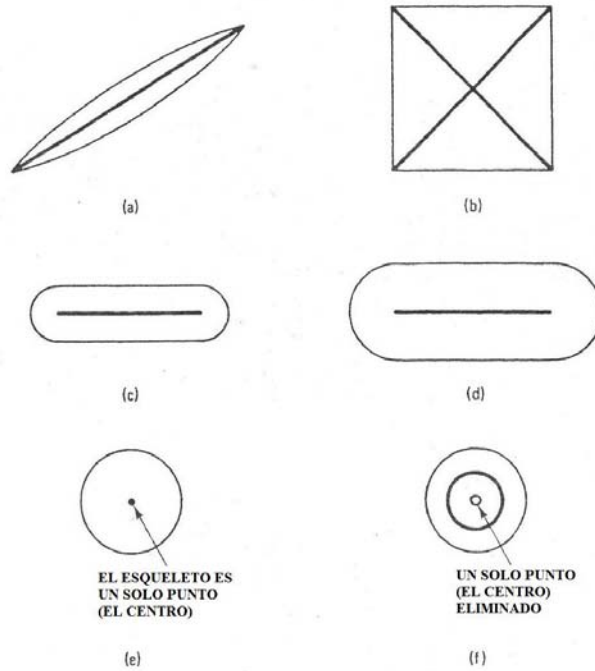


Figura 2.21. Diferentes tipos de esqueletos.

2.5.6.4 Watershed

La transformación *watershed* es uno de los métodos más utilizados para segmentación de imágenes en el campo de la morfología matemática. Fue propuesto por Digabel y Lantuéjoul en 1978 y después mejorado por Beucher y Lantuéjoul en 1979. El concepto de *watershed* es general y se puede aplicar a cualquier imagen en escala de grises. En particular, una poderosa metodología de segmentación en escala de grises resulta de aplicar el *watershed* al gradiente morfológico de la imagen a segmentar.

Existen dos formas básicas de segmentar una imagen. La primera es en base a los bordes y detectando cambios locales en la imagen. La segunda es una segmentación de regiones en base a aproximaciones y similitud de regiones. Desafortunadamente esta transformación nos conduce a una sobre segmentación de la imagen. Para superar este problema se propuso un método llamado segmentación por control de marcadores (Meyer y Beucher, 1990), el cual se basa en la idea de que los sistemas de visión artificial conocen la ubicación de los objetos que serán segmentados.

Un enfoque clásico es aplicar un gradiente y umbralizar este para producir bordes binarios en la imagen. Un inconveniente de este método es la selección de un valor apropiado del umbral. Aún si se ignora el problema de producir bordes falsos por elección de un umbral muy bajo, el problema permanece. Si el umbral es muy bajo, entonces los bordes son muy amplios y se experimenta un adelgazamiento excesivo, por lo que los bordes no serían muy precisos; si el umbral es muy alto, entonces muchos bordes no serán detectados y los que sí, podrían llegar a romperse.

Los lados superior izquierdo y superior derecho de la imagen de un gel (Figura 2.22) muestran los resultados de un umbral muy bajo y un umbral muy alto del gradiente respectivamente. El lado inferior izquierdo muestra el grosor de borde del esqueleto conectado de la imagen resultante de un umbral bajo super-impuesto en la imagen original. Los componentes del esqueleto tienden a encontrarse con sus correspondientes componentes en la imagen. Finalmente la imagen inferior derecha de la Figura 2.22

muestra la superposición en la imagen original de las líneas de división del *watershed* y como se ajustan mejor los bordes de los componentes en la imagen del gel.

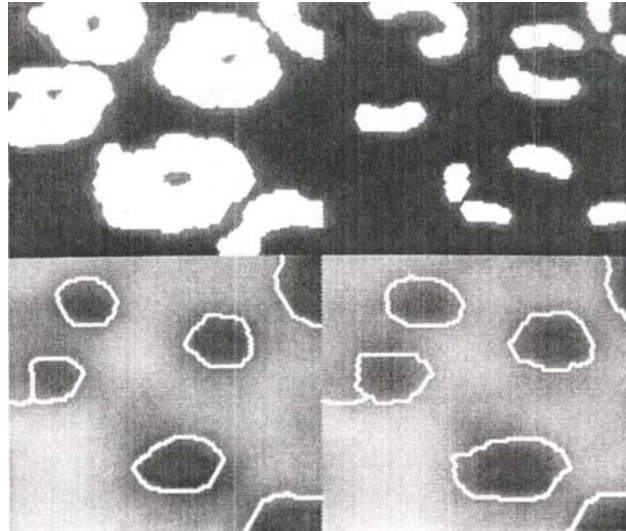


Figura 2.22. Comparación de detección de bordes por gradiente morfológico y *watershed*; (superior izq.) gradiente con bajo umbral, (superior der.) gradiente con umbral muy alto, (inferior izq.) esqueleto conectado de un umbral bajo, (inferior der.) líneas de división del *watershed*. (S. Beucher, 1990).

Si se considera el gradiente de la imagen desde la perspectiva del *watershed* y asumiendo que la imagen a segmentar consiste en manchas discontinuas como el gel de la Figura 2.22. Bajo esta idea, el gradiente morfológico consistirá en anillos blancos (gradiente alto) con interiores negros (gradiente bajo) los cuales serán colocados sobre un fondo negro. Tomando una visión sencilla, los mínimos son los mínimos regionales, de modo que cada uno es una región plana con un tono de gris bajo en la imagen. Suponiendo que la imagen procesa tres puntos en el espacio: (1) aquellos que pertenecen a un mínimo regional, (2) aquellos en los que una gota de agua imaginaria, colocada en la superficie del gradiente sobre el punto se reducirá a un mínimo único, y (3) aquellos en los cuales una gota de agua puede convertirse en más de un mínimo. Para un mínimo regional dado, el conjunto de puntos para que una gota de agua caiga en el mínimo regional se llama “cuenca” (*catchment basin*) o *watershed* del mínimo. Los puntos en los que una gota de agua puede caer en más de un mínimo desde las líneas de cresta de la superficie topográfica se conocen como líneas de división. Estos conceptos se ilustran en la Figura 2.23. Las

líneas de división del gradiente morfológico de una imagen proporcionan la imagen deseada con bordes delgados de la imagen original.

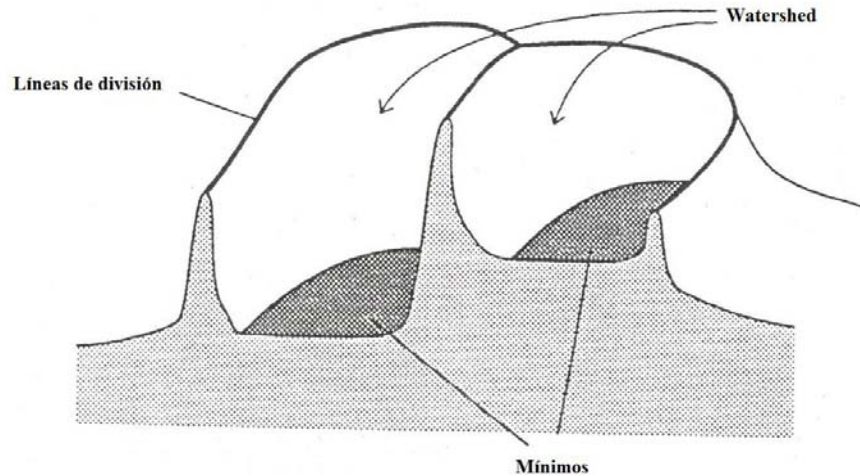


Figura 2.23. *Watersheds*.

2.5.6.5 *Ultimate erosion*

Uno de los principales problemas de la segmentación de imágenes en escala de grises es la existencia de objetos dentro de la imagen que están en contacto o traslapados. Por ejemplo, en la Figura 2.24a hay tres objetos traslapados que forman un componente conexo. El objetivo principal es lograr la segmentación de cada componente individualmente y así separar los tres objetos que conforman este conjunto. La clave para este problema y para muchos problemas de segmentación, es el encontrar marcadores para cada uno de los objetos. Esto se puede lograr utilizando un procedimiento conocido como *ultimate erosion* (Dougherty, 1992; Talbot y Terol, 1992).

Sea B un disco de radio r fijo en el origen. La Figura 2.24a puede ser erosionada sucesivamente por B para separar los bordes interiores de radio r . Como producto de la secuencia de esta erosión, se obtienen componentes desconectados y en distintas etapas de la iteración algunos de estos desaparecen. Un componente final es aquel componente que permanece un paso antes de desaparecer. La unión de estos componentes finales es lo que

se conoce como *ultimate erosion* (relativo al radio r) y se denota por $Ult(A)$. La *ultimate erosion* de la Figura 2.24a se aprecia en la Figura 2.24f.

Las capas removidas sucesivamente en la Figura 2.25 corresponden a las bandas de distancia al interior de la imagen. Los puntos en la primera banda (externos) son menores que el radio r de los bordes, los puntos de la segunda banda son menores que $2r$ pero mayores o iguales a r desde el borde, etc. (Figura 2.25b).

En la Figura 2.25c se muestra el resultado de la segmentación aplicando el *ultimate erosion* y una *skeletonization* de la imagen original.

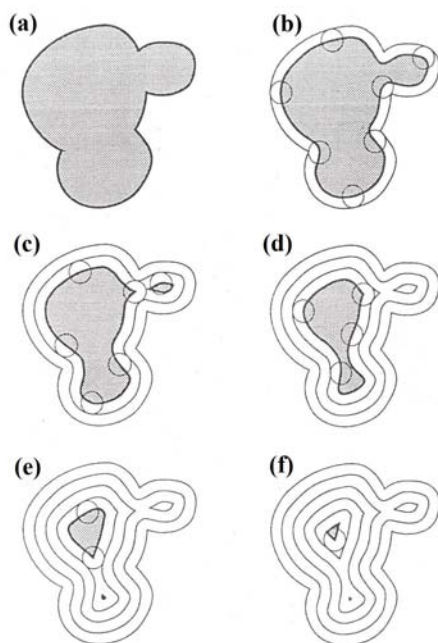


Figura 2.24. Sucesivas separaciones de los bordes interiores para encontrar el *ultimate erosion* (L. Vincent, 1990).

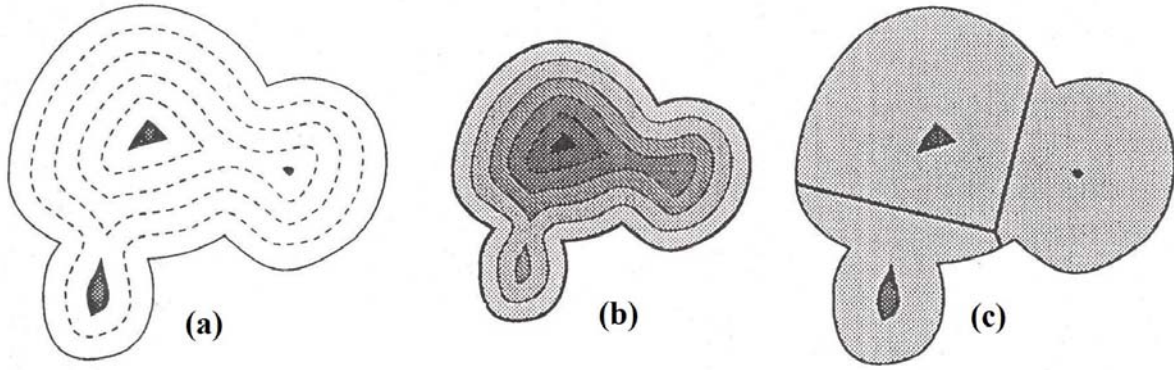


Figura 2.25. (a) Ultimate erosion, (b) Bandas de distancia, (c) Segmentación por *ultimate erosion* y *skeletonization* (L. Vincent, 1990).

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

3.1 Los cultivos utilizados para el análisis

Los microorganismos que se utilizaron para el desarrollo de esta tesis fueron *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Lactococcus lactis*. Se obtuvieron del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Estos cultivos se hicieron siguiendo la técnica de dilución en placa. Se usaron cajas de petri desechables estériles de 9 cm de diámetro.

Todo el procedimiento se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-110-SSA1-1994), que proporciona las guías generales para la preparación de diluciones para el examen microbiológico de alimentos y es técnicamente equivalente a la Norma Internacional ISO 6887-1983 (E) *Microbiology General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination. International Organization for Standardization*.

3.2 Diseño del sistema de captura de la imagen

Una vez conocidos el modo de preparación de los cultivos bacterianos y los principales parámetros y características de un sistema de procesamiento que influyen en la calidad de la imagen se procedió a capturar una imagen digital de cada una de las muestras utilizando para esto un sistema de captura diseñado específicamente para este trabajo.

Las imágenes de los cultivos fueron capturadas en formato BMP utilizando una cámara digital a color modelo DFK 31BF03 (*The Imaging Source Europe GmbH*) que se muestra en la Figura 3.1, la cual tiene un CCD de 1/3 pulg. (4.8 x 3.6 mm), una resolución de 1024 x 768 *píxeles*, espaciado entre *píxeles* de 4.65 μm , montaje tipo CS, conexión a la PC a través de la plataforma IEEE 1394, también conocida como *firewire* y el *software* utilizado fue el IC Capture 2.0 proporcionado por el mismo fabricante de la cámara.



Figura 3.1. Cámara digital DFK 31BF03 (*The Imaging Source Europe GmbH*).

A esta cámara se le adaptó un lente en base a diferentes parámetros compatibles con la cámara como tipo de montaje, formato y tipo de sensor (CCD), resolución, espaciado entre *píxeles*, campo de visión horizontal y distancia de trabajo. El lente seleccionado fue el modelo NT56-786 (*Edmund Optics Inc., USA*), de 8 mm de foco fijo que cumple con las características apropiadas para este tipo de aplicación específica.

Tomando en cuenta las principales características de la cámara, criterios de selección del lente y parámetros específicos del sistema como la distancia de trabajo y campo de visión, el sistema de captura diseñado para esta aplicación específica que es la segmentación y conteo de UFC en cajas de petri se muestra en la Figura 3.2.

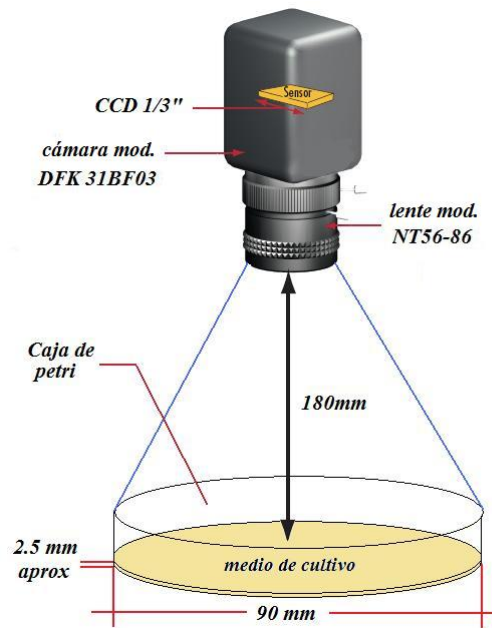


Figura 3.2. Diseño del sistema de captura de la imagen.

3.3 Diseño del sistema de procesamiento de imágenes

Una vez desarrollado el cultivo bacteriano, se continuó con la adquisición de la imagen de las UFC en la caja de petri. Las primeras imágenes se tomaron acoplando la cámara digital a un contador de colonias manual de campo oscuro (*Reichert Darkfield Québec*, mod. 3325) (Figura 3.3).

Debido al material con que están hechas las cajas de petri, se tenían muchos reflejos no deseados en los bordes de la imagen por lo que se realizó una máscara para cortar esta área. Ya habiendo eliminado la zona no deseada de la imagen, seleccionada la región de interés y conociendo las bases de la morfología matemática y procedimientos para el procesamiento de imágenes se procedió a realizar un algoritmo que nos ayude a realizar la segmentación y conteo de UFC.



Figura 3.3. Contador de colonias manual (*Reichert Darkfield Québec*, mod. 3325).

Se desarrolló un primer algoritmo basado en un método de mejoramiento de una técnica de segmentación de imágenes a color desarrollada por Shiji y Hamada (1999), utilizando el *watershed* y la información de los contornos de la imagen en la cual se eligen ciertos parámetros de forma manual. La mejora propuesta a este algoritmo se hizo realizando una selección de forma automática de dichos parámetros.

3.4 Mejora a la técnica de segmentación de imágenes a color de Shiji y Hamada (1999)

A continuación se describen brevemente las modificaciones realizadas al algoritmo de Shiji y Hamada para la selección automática de los marcadores:

- Se normalizaron las imágenes obtenidas en los canales H, S y V que estaban en niveles de 0-1, a niveles de 1-256 (escala de grises).
- Los valores de los histogramas se almacenaron en variables, las cuales se ordenaron ascendentemente de tal forma que fuera posible la identificación de las secciones de los histogramas que mayor información proporcionan acerca de los objetos o regiones dentro de la imagen, obteniendo de esta forma marcadores particulares para cada histograma.
- Mediante la intersección de los marcadores particulares fue posible generar el mapa de marcadores generales de la imagen. Esto se realizó verificando los puntos en los

que los marcadores particulares coincidían y donde el gradiente interno no fuera mayor que cierto parámetro.

Con este algoritmo se analizaron 252 muestras de cultivos de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Lactococcus lactis*. El diagrama a bloques del algoritmo mejorado se muestra en la Figura 3.4

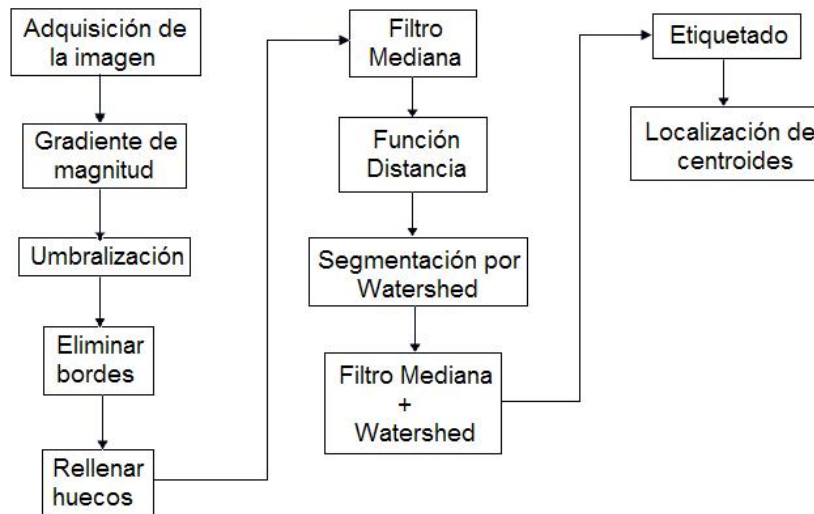


Figura 3.4. Diagrama de bloques del método basado en el mejoramiento de la técnica de segmentación de imágenes a color desarrollada por Shiji y Hamada (1999).

Debido al tipo de fuente de iluminación proporcionada por el contador de campo oscuro, la superficie de la caja de petri no era iluminada de forma homogénea, debido a esto, la segmentación de las UFC con este algoritmo no era del todo satisfactoria, principalmente en las que se encuentran traslapadas. Para lograr una mejor iluminación de la superficie de la caja de petri se diseñó un anillo de LEDs ultra brillantes de color blanco el cual se montó en el lente de la cámara utilizando un adaptador especial. Ya lograda una iluminación más homogénea en las imágenes y para corregir el problema de la segmentación de UFC traslapadas se desarrolló un segundo algoritmo que fuera capaz de lograr una mejor segmentación de las UFC. Este algoritmo se basa en una transformación conocida como *ultimate erosion* y fue empleada por Talbot y Terol (1992).

3.5 El sistema de iluminación

Para este diseño se usaron 40 LEDs de 5 mm que consumen una corriente de 20 mA y tienen un voltaje de trabajo de 3.5 V cada uno; 20 resistencias de 120 Ω , ½ W. Fueron alimentados por una fuente de 9 VCD y, para evitar una demanda de corriente alta, se conectaron en una configuración serie-paralelo como se puede observar en el diagrama de la Figura 3.5. Los cálculos realizados para esta configuración se describen a continuación:

Para la resistencia:

$$R = \left(\frac{V_B - (V_L * N_L)}{I} \right) \quad (3.1)$$

donde

- R, es el valor calculado de la resistencia (Ω),
- V_B , es el voltaje de la fuente de alimentación (V),
- V_L , es el voltaje de trabajo del LED (V),
- N_L , es el número de LEDs conectados en serie,
- I, es la corriente que circula por cada LED (mA).

De la Ecuación 3.1 tenemos:

$$R = \left(\frac{9V - (3.5V * 2)}{20mA} \right)$$
$$R = 100\Omega$$

Por lo que se elige una resistencia de 120 Ω .

La corriente de cada conexión en serie de LEDs está dada por:

$$I = \frac{(V_B - V_{TL})}{R}, \quad (3.2)$$

donde

V_{TL} es el voltaje de trabajo de los LEDs conectados en serie (2) y
 R , el valor de la resistencia.

De la Ecuación 3.2:

$$I = \frac{(9V - (2 * 3.8V))}{120\Omega}$$
$$I = 11.66mA$$

La corriente total del circuito (I_T) es:

$$I_T = I * N_P, \quad (3.3)$$

donde

N_P es el número de arreglos en paralelo (20)

De la Ecuación 3.3:

$$I_T = 11.66mA * 20$$
$$I_T = 233.3mA$$

La potencia disipada por el circuito se calcula con la Ecuación 3.4:

$$P = I^2 * R \quad (3.4)$$

$$P = (233.2mA)^2 * 120\Omega$$
$$P = 6.52W$$

Una vez realizados estos cálculos se procedió a realizar el circuito impreso, esto se hizo tomando en cuenta que el anillo de LEDs se iba a montar sobre un adaptador que va acoplado al lente de la cámara.

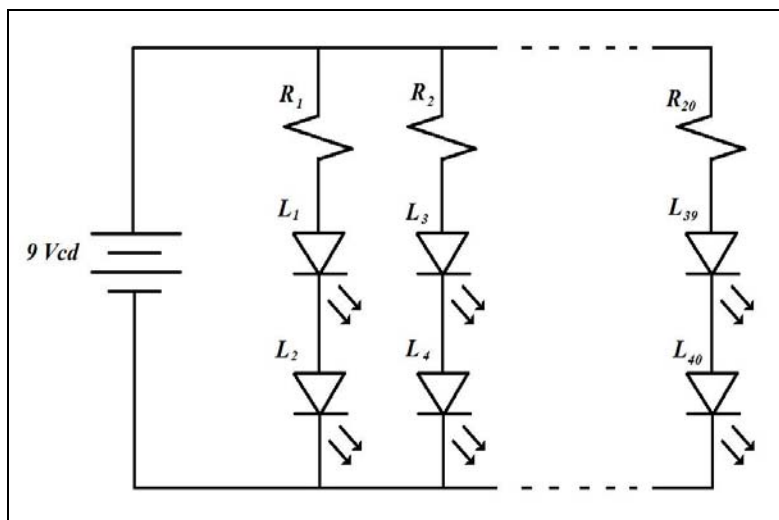


Figura 3.5. Diagrama eléctrico del anillo de LEDs.

La lámpara en forma de anillo con LEDs se puede ver terminada en la Figura 3.6.

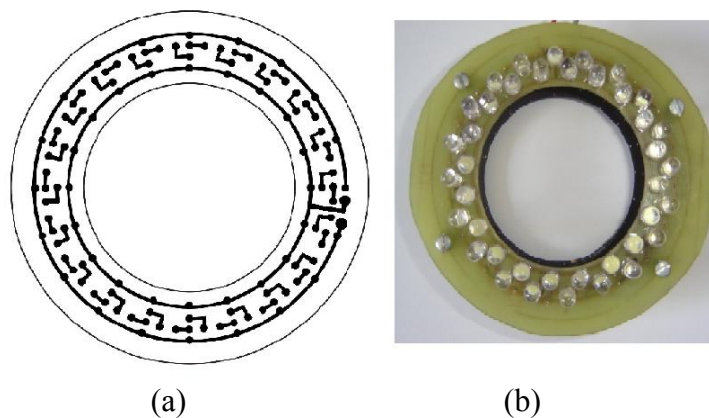


Figura 3.6. Lámpara de anillo de LEDs, a) plantilla para el circuito impreso y b) circuito terminado.

3.6 Algoritmo de segmentación basado en *ultimate erosion*

Para las primeras evaluaciones del algoritmo se hizo manualmente una imagen de prueba en modo binario con 75 objetos de distinto tamaño y diferentes posiciones simulando las UFC en una caja de petri.

El siguiente paso fue obtener la Función Distancia de la imagen original, la cual nos indica la distancia de cada uno de los objetos en blanco de la imagen hacia el fondo de la misma (color negro) y nos es útil para el proceso de segmentación de los objetos. Para eliminar el ruido contenido en la imagen se aplicó un Filtro Secuencial Alternado (ASF) formado por las operaciones de apertura y cierre con el mismo elemento estructural utilizado anteriormente. A la imagen filtrada mediante el ASF, se le aplicó una transformación por *watershed* la cual segmentó la imagen para crear regiones. Esta imagen se utilizó como máscara la cual se utilizó junto con los marcadores creados de aplicar el *ultimate erosion* para hacer una reconstrucción morfológica de donde se obtuvo una segmentación de los objetos para luego etiquetarlos y realizar de modo automático el conteo total de las UFC.

Ya comprobada la eficiencia del algoritmo con una imagen de prueba y con el sistema de iluminación armado y montado sobre el lente de la cámara, se procedió a tomar las imágenes con cultivos reales de bacterias de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, utilizando el *software* IC Capture 2.0 (*The Imaging Source Europe GmbH*) proporcionado por el fabricante de la cámara, procurando que el fondo de la imagen fuera lo más oscuro posible para que resaltaran las UFC, y ajustando el contraste y la intensidad de la imagen. Se entiende por eficiencia a la capacidad de lograr un resultado esperado con el mínimo de recursos disponibles.

El diagrama a bloques del algoritmo implementado se muestra a en la Figura 3.7.

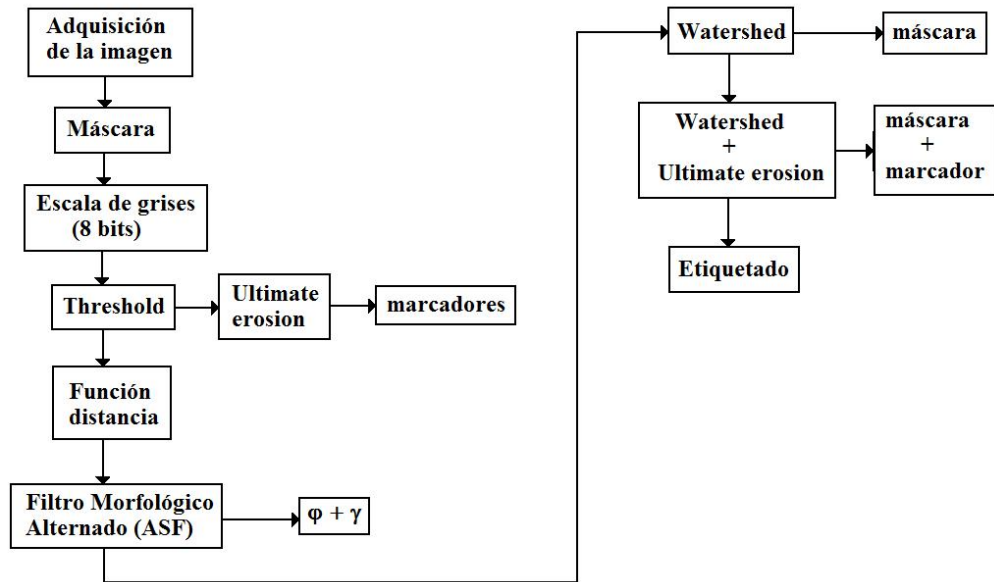


Figura 3.7. Diagrama de bloques del algoritmo de segmentación implementado.

Se tomaron 525 fotografías de los cultivos mencionados a los cuales se les aplicó el algoritmo implementado y posteriormente se realizó un comparativo contra el conteo obtenido de forma manual, que como se sabe es el más confiable, y también contra el obtenido con un contador de colonias automático comercial (*AccuCount 1000*) mostrado en la Figura 3.8 el cual trabaja en base a un barrido por rayo láser. Los resultados del conteo manual y del equipo comercial también fueron proporcionados por el personal capacitado del laboratorio mencionado para poder realizar los comparativos.



Figura 3.8. Contador de colonias automático *AccuCount 1000*.

Para analizar los resultados del algoritmo aplicado directamente a las UFC en cajas de petri, las 525 imágenes se dividieron en tres grupos en base al conteo obtenido de forma manual y se ordenaron en forma ascendente. El primer grupo se seleccionó tomando en cuenta los resultados del conteo de 0 a 300 UFC; el segundo grupo fue de 301 a 600 UFC y el tercero de más de 601 UFC.

Ya seleccionadas las imágenes de cada uno de los tres grupos se procedió a analizarlas con el algoritmo de segmentación desarrollado, siguiendo el procedimiento mostrado en el diagrama de bloques de la Figura 3.7.

Para comprobar la eficiencia del algoritmo implementado aplicado a imágenes de cultivos de UFC, primero se hizo un comparativo entre el conteo obtenido por el equipo comercial (*AccuCount* 1000) y el conteo obtenido por el método manual. Posteriormente se hizo el comparativo entre el conteo obtenido por el método de segmentación implementado y el conteo manual. Esta validación se hizo a través de una correlación para obtener su R^2 , que es un índice estadístico para medir la relación lineal entre dos variables cuantitativas. Este análisis estadístico se realizó a cada uno de los tres grupos por separado y por último al lote completo de 525 muestras.

3.7 Diseño del dispositivo automático

Como aportación final del trabajo se presenta el diseño y la construcción de un dispositivo automatizado en el cual se pueden colocar cinco cajas de petri sobre un plato de acrílico el cual se pintó de color negro mate para evitar reflejos (Figuras 3.9 y 3.10) y se acopló a un motor a pasos, el cual gira, colocando una caja de petri a la vez alineada con la cámara digital para realizar así el procedimiento de captura y análisis de la imagen a través de la PC de manera automática.

Acotaciones: mm.
Material: acrílico

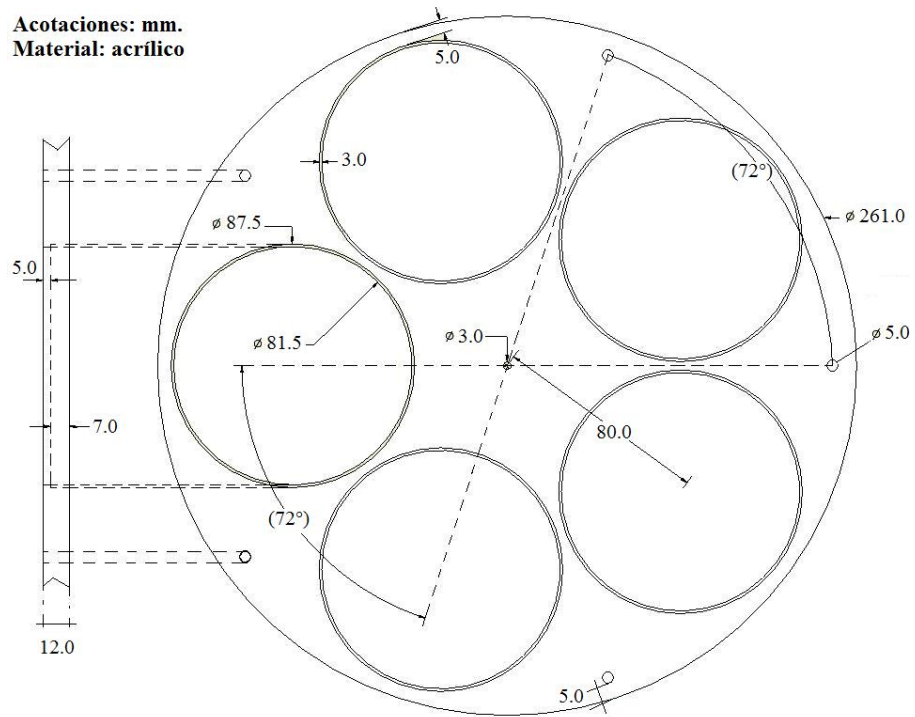


Figura 3.9. Diseño del plato giratorio.



Figura 3.10. Plato de acrílico terminado.

Un esquema de este dispositivo se muestra en la Figura 3.11, en donde se puede apreciar el plato de acrílico montado sobre el motor a pasos, colocado a la distancia de trabajo adecuada y alineado con la cámara para poder adquirir las imágenes. Para evitar reflejos que pueda causar la luz externa, se planeó aislar el sistema de captura dentro de un gabinete.

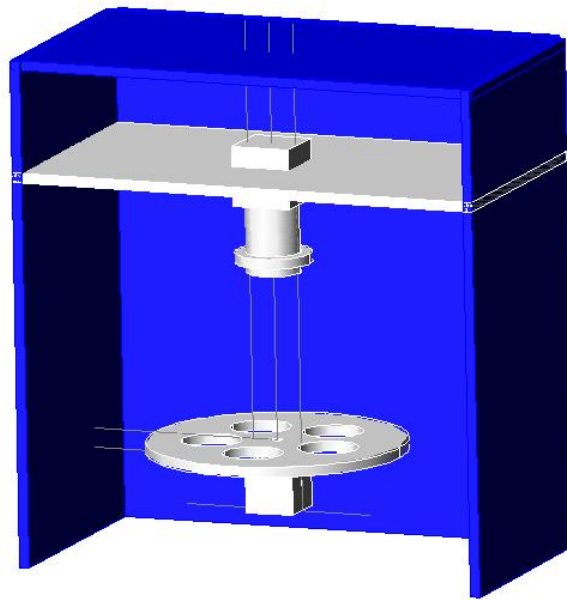


Figura 3.11. Esquema del dispositivo automático.

El material con el que se construyó el gabinete fue de tablero MDF (*Medium Density Fibreboard*), que es un aglomerado elaborado con fibras de madera de 1.6 cm de espesor, 32.2 cm de ancho, 32.2 cm de fondo y 45.7 cm de altura (Figura 3.12).

Posteriormente se diseñó el circuito de control del motor a pasos el cual se describe a continuación.

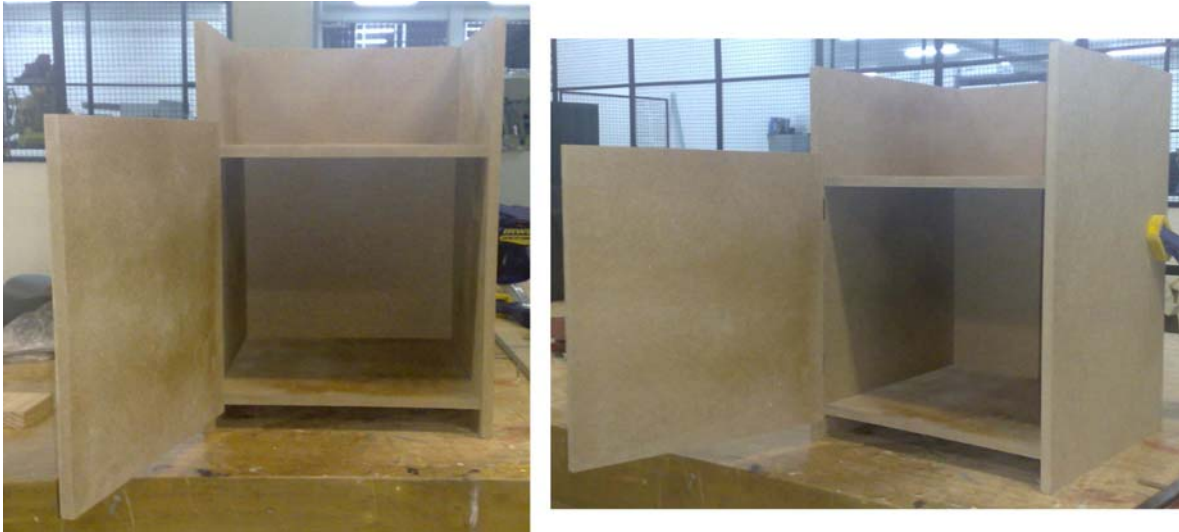


Figura 3.12. Gabinete de tablero MDF.

3.7.1 El circuito de control del motor a pasos

Como se necesita precisión para alinear la cámara digital con una las cajas de petri que van colocadas sobre el plato de acrílico se utilizó un motor a pasos. Estos motores, a diferencia de los motores convencionales, no giran cuando se les aplica corriente si no se hace en la secuencia adecuada. Se le acopló un circuito que permite adaptar los niveles de potencia presentes en el puerto de una PC para poder manejarlo cómodamente por medio de un programa que puede ser desarrollado en casi cualquier lenguaje de programación.

El motor a pasos empleado en esta aplicación fue fabricado por Minebea Co., Ltd., y tiene las siguientes características:

- Unipolar (compuesto por cuatro bobinas)
- Tipo 23LM-K307-P1
- 200 pasos
- 3.0 V / fase
- 1.7 A / fase
- 1.8 Ω / fase
- 1.8° / paso

Para la etapa de control de este motor se utilizó un microcontrolador PIC16F877A fabricado por MicroChip. Algunas de sus principales características se muestran a continuación:

- Soporta modo de comunicación serial, posee dos pines para ello.
- Amplia memoria para datos y programa.
- Memoria reprogramable: La memoria en este PIC es la que se denomina FLASH; este tipo de memoria se puede borrar electrónicamente (esto corresponde a la "F" en el modelo).
- Set de instrucciones reducidas (tipo RISC), pero con las instrucciones necesarias para facilitar su manejo.

En la Tabla III se detallan las características generales de este dispositivo.

Frecuencia máxima	DX-20MHz
Memoria de programa flash palabra de 14 bits	8KB
Posiciones RAM de datos	368
Posiciones EEPROM de datos	256
Puertos E/S	A,B,C,D,E
Número de pines	40
Interrupciones	14
Timers	3
Módulos CCP	2
Comunicaciones Serie	MSSP, USART
Comunicaciones paralelo	PSP
Líneas de entrada de CAD de 10 bits	8
Juego de instrucciones	35 Instrucciones
Longitud de la instrucción	14 bits
Arquitectura	Harvard
CPU	RISC
Canales PWM	2
Ejecución En 1 Ciclo Máquina	-

Tabla III. Características generales del PIC16F877A

A este microcontrolador se le conectó una etapa de potencia para que proporcionara la corriente necesaria para el movimiento del motor, la cual está compuesta por dos etapas. La primera etapa del circuito se encarga de aislar la entrada proveniente de la PC por medio de cuatro opto acopladores 4N32 (uno para cada bobina). La segunda etapa consiste en conectar un buffer de corriente (TIP120) a la salida de cada opto acoplador, para proporcionar la corriente necesaria para poder mover el motor. El diagrama de este circuito de control del motor a pasos se muestra en la Figura 3.13

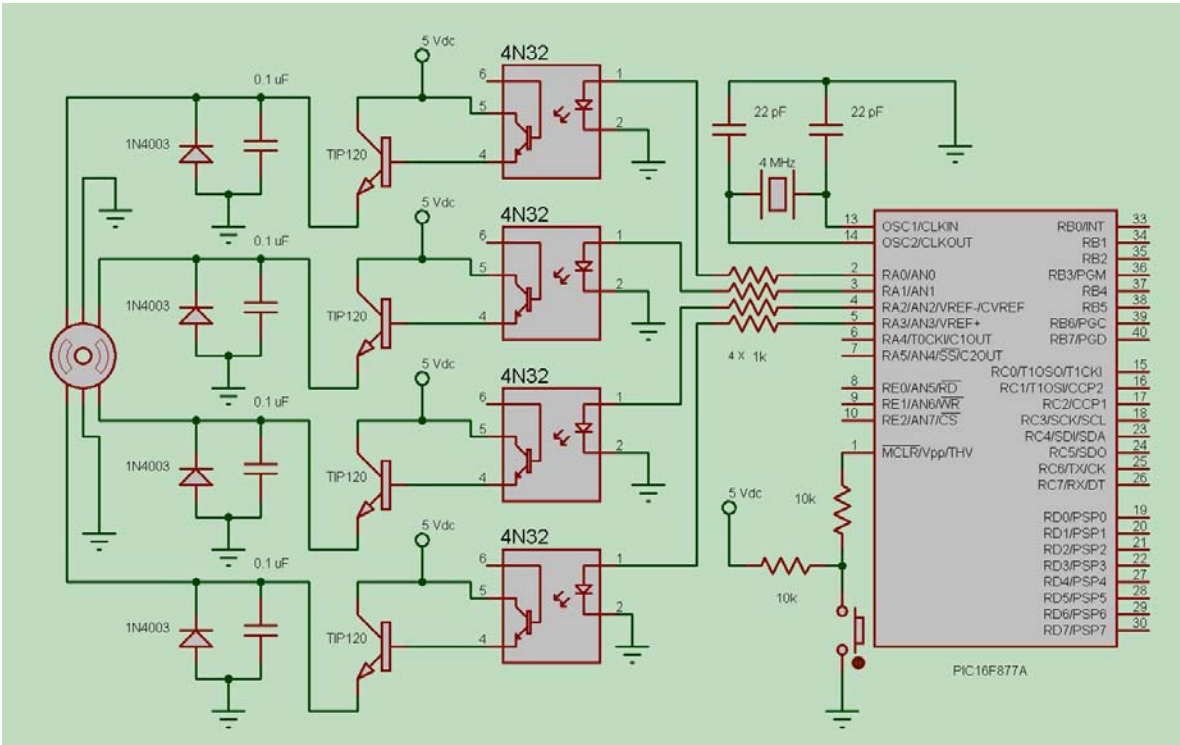


Figura 3.13 Diagrama del circuito de control del motor a pasos.

Para alinear cada una de las cajas de petri con la cámara digital, el motor da cinco pasos de 72° cada uno para posteriormente capturar la imagen y realizar el análisis de esta.

Esta instrucción se realiza vía la computadora, a través de uno de los puertos que envía la señal al microcontrolador y este a la vez al motor.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez adquiridas las imágenes con el sistema de captura diseñado se tuvieron problemas con los reflejos en el borde de la caja de petri, lo cual interfería en el proceso de segmentación y conteo de las UFC. Algunos ejemplos de los resultados se aprecian en la Figura 4.1.

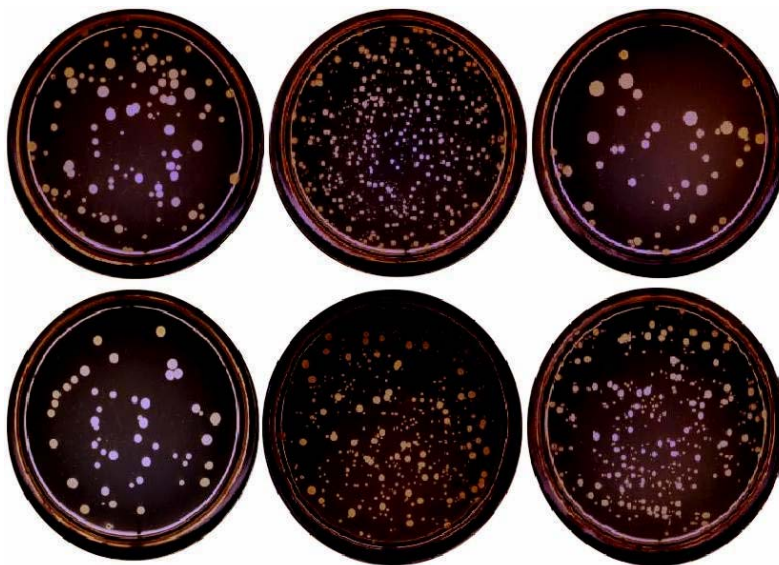


Figura 4.1. Imágenes de algunos cultivos bacterianos obtenidos con el sistema de captura diseñado.

El problema de reflejos en el borde de la caja de petri se resolvió enmascarando la región de interés de la imagen y eliminando la parte no deseada, como se muestra en la Figura 4.2.

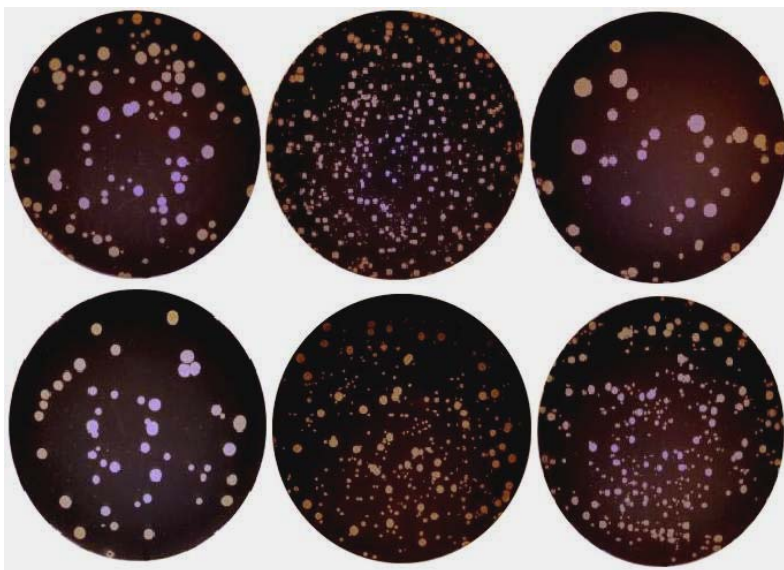


Figura 4.2. Ejemplo de la máscara aplicada a las imágenes adquiridas.

4.1 Resultados del algoritmo de Shiji y Hamada mejorado

Con el primer algoritmo desarrollado, basado en el método de mejoramiento de la técnica de Shiji y Hamada (1999), el principal problema que se tuvo fue que no se pudieron segmentar la mayoría de las colonias traslapadas. Debido al tipo de fuente de luz y a la colocación de esta, que se encuentra en el interior del contador de campo oscuro iluminando la caja de petri por la parte inferior, la iluminación no era homogénea a través de la superficie del agar por lo que no se tenían imágenes con muy buena calidad para poder segmentar las UFC de manera eficiente (Figura 4.3).



Figura 4.3. Resultado de la segmentación aplicada a una imagen de cultivo bacteriológico empleando el algoritmo mejorado a la técnica propuesta por Shiji y Hamada (1999).

Comparando el conteo obtenido por el método manual y el algoritmo mejorado se obtuvo una $R^2 = 0.962$.

El problema de iluminación se corrigió posteriormente ensamblando el anillo de LEDs descrito en la sección 2.7.2. Con este tipo de iluminación se logró obtener una iluminación más homogénea sobre la superficie de la caja de petri.

4.2 Resultados del método de segmentación mediante *ultimate erosion*

4.2.1 Implementación del algoritmo con la imagen de prueba

Para corregir el problema de no poder segmentar las UFC traslapadas por el primer método, se desarrolló un segundo algoritmo basado en *ultimate erosion* que fue empleado por Talbot y Terol en 1992. Los resultados de aplicar el algoritmo a la imagen de prueba (Figura 4.4) y siguiendo los pasos del diagrama de bloques de la Figura 3.7 se muestran paso a paso a continuación.

Como esta imagen se hizo en modo binario (Figura 4.5a) no fue necesario convertirla a escala de grises ni aplicarle el *threshold* (umbral) y se inició con la transformación *ultimate erosion*. En la Figura 4.5b se puede observar el efecto que causa esta transformación sobre los objetos en blanco al aplicarle múltiples erosiones y dejando

aquel objeto un paso antes de que desaparezca por completo. Estas erosiones sucesivas se realizaron con un elemento estructural en forma de disco y de tamaño 1.

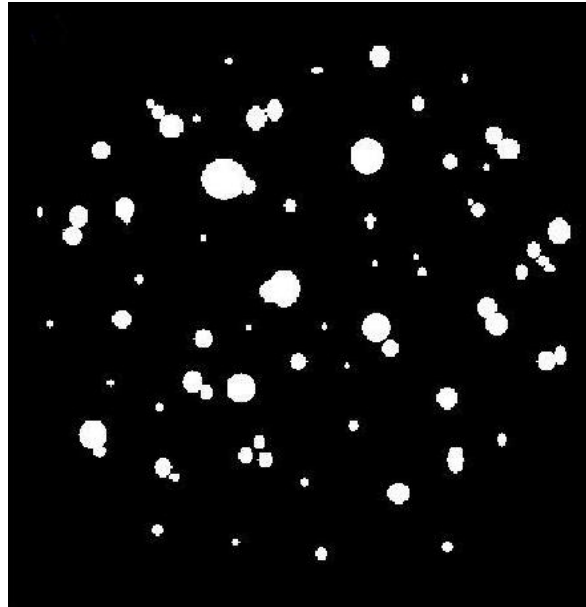


Figura 4.4. Imagen de prueba con 75 objetos para validación del algoritmo implementado.

Cada uno de los puntos blancos resultantes será utilizado como marcador, evitando así una creación excesiva de regiones y una sobre segmentación en la imagen final.

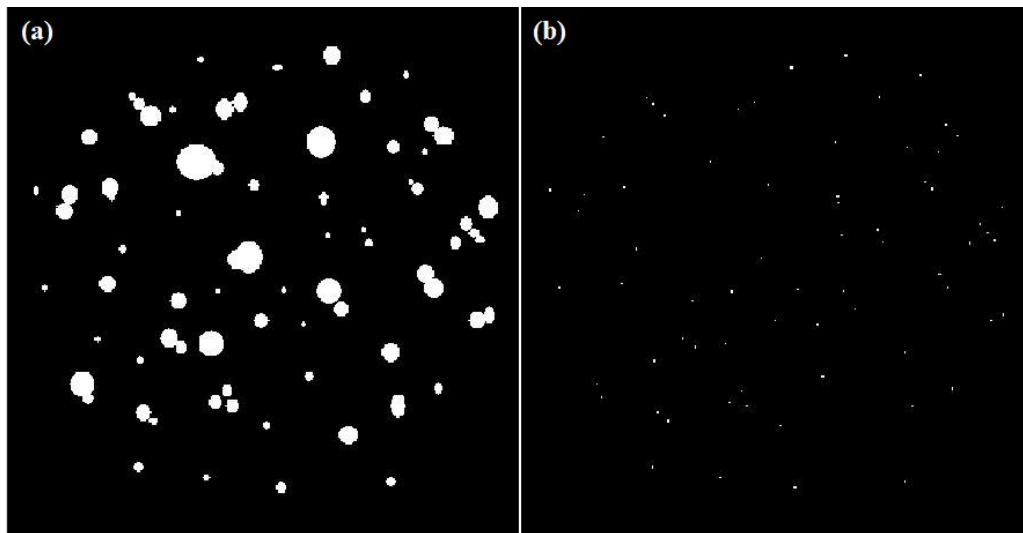


Figura 4.5. (a) Imagen binaria de prueba creada manualmente, (b) *Ultimate erosion* y creación de marcadores.

La imagen resultante de aplicar la Función Distancia y el Filtro Morfológico Alternado (ASF) para eliminar ruido se observa en la Figura 4.6 (a) y (b) respectivamente. En la Figura 4.6b, se ve el inverso de la imagen resultante para una mejor apreciación.

A esta imagen filtrada mediante al ASF se le aplicó el *watershed* (Figura 4.7a) y se creó una máscara con las primeras regiones de la imagen que junto con los marcadores del *ultimate erosion* se hizo la reconstrucción morfológica para lograr la segmentación de las UFC para luego etiquetarlas y realizar el conteo final (Figura 4.7b).

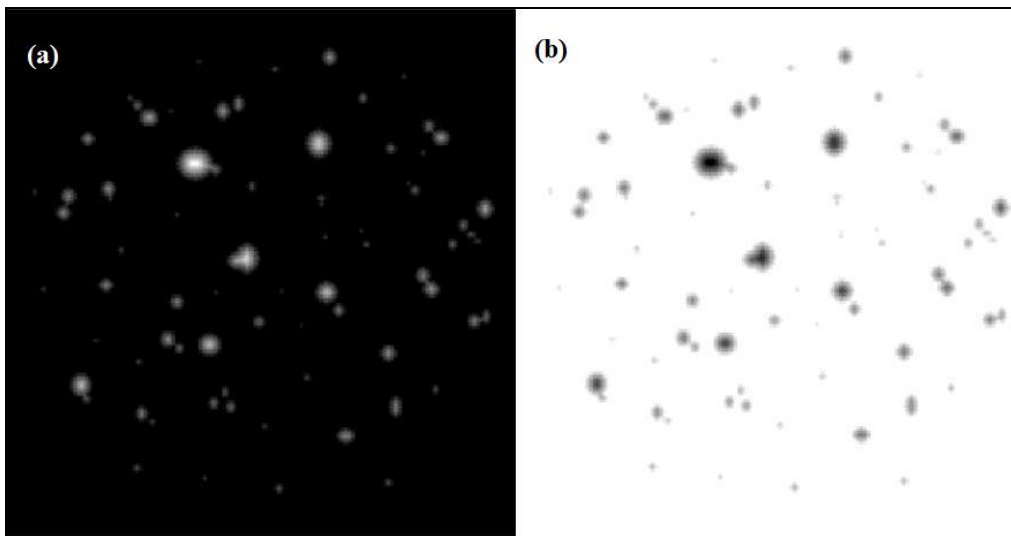


Figura 4.6. (a) Función Distancia y (b) Inverso del Filtro Secuencial Alternado aplicados a la imagen de prueba.

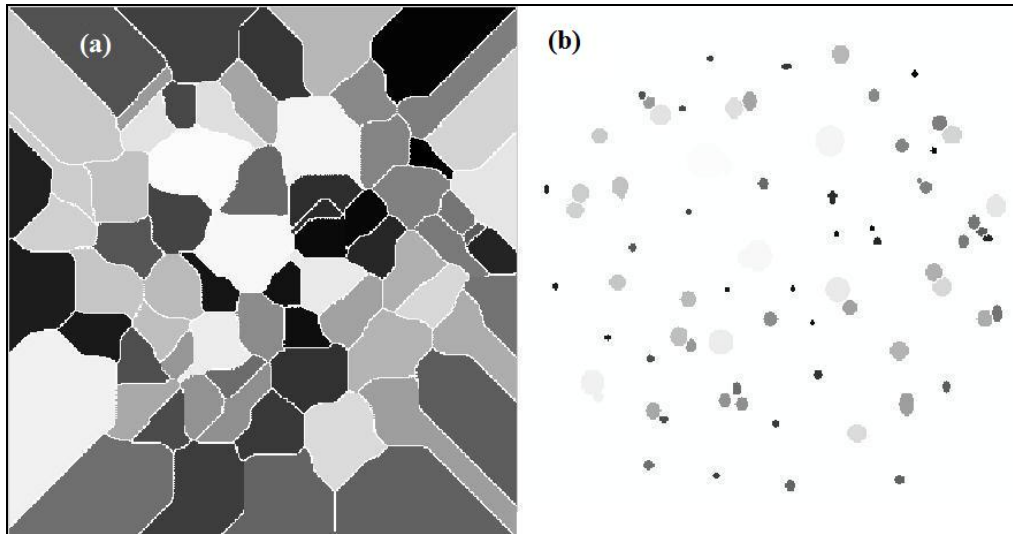


Figura 4.7. (a) *Watershed* y (b) visualización de los objetos segmentados en la imagen de prueba.

La Figura 4.8 muestra el resultado final y la localización de los centros de masa (centroides) de cada uno de los objetos segmentados con el algoritmo implementado.

Como se indicó anteriormente, esta imagen de prueba está formada por 75 objetos y el conteo obtenido al analizar la imagen con el algoritmo implementado fue de 72 objetos, lo cual nos dio una eficiencia del 96.0 %.

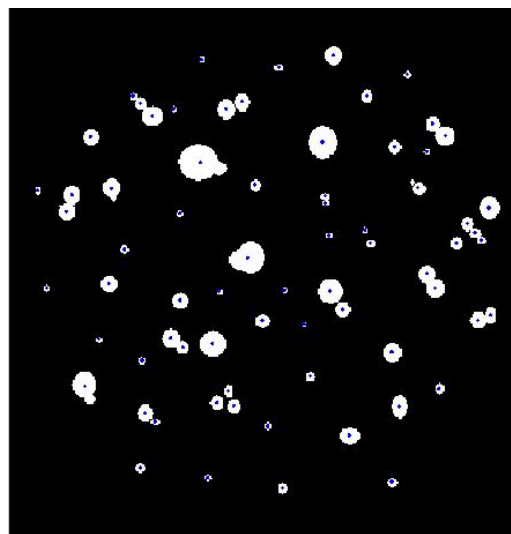


Figura 4.8 Resultado final y localización de centroides en la imagen de prueba.

4.2.2 Implementación del algoritmo con imágenes de cultivos bacteriológicos

Para lograr una iluminación de la muestra más homogénea, se procedió a montar en la cámara digital el sistema de iluminación desarrollado (Figura 4.9). Como se mencionó, el lote total de 525 muestras se dividió en tres grupos para un análisis inicial y finalmente se analizaron los resultados del lote completo.

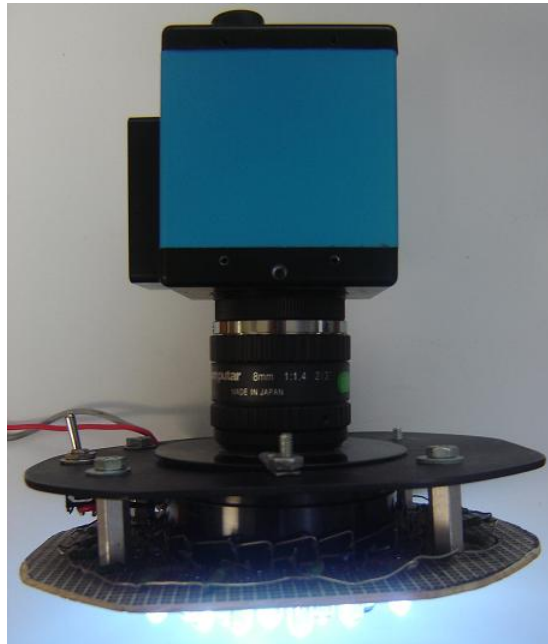


Figura 4.9. Fotografía del sistema de iluminación con la lámpara de LEDs acoplada.

4.2.2.1 Análisis de los resultados de las muestras del Grupo 1

En la Figura 4.10 se ve un ejemplo de una muestra del Grupo 1 y la máscara aplicada para eliminar los reflejos debidos a la luz en los bordes de la caja de petri.

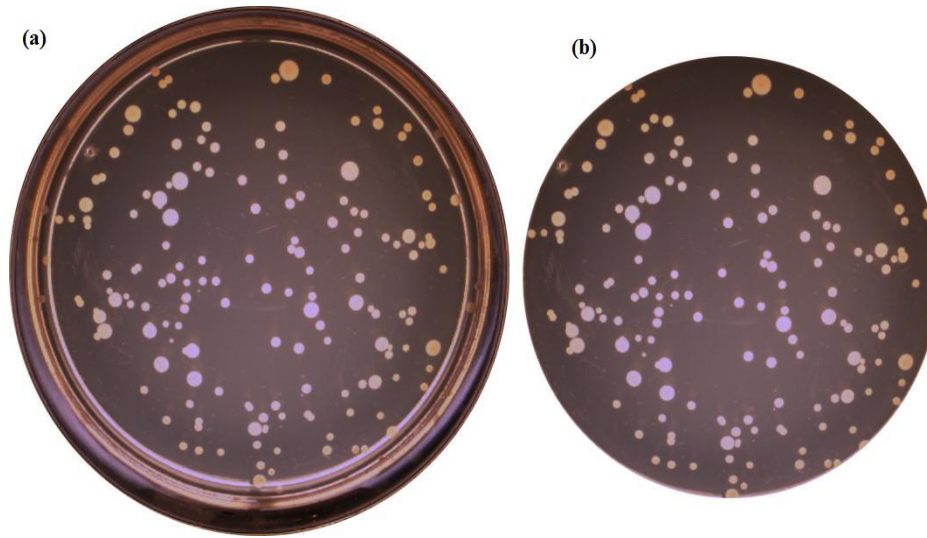


Figura 4.10. (a) Imagen original y (b) máscara de una imagen del Grupo 1 (de 0 a 300 UFC).

La Figura 4.11a muestra el resultado de convertir la máscara de la Figura 4.10b a escala de grises y aplicarle el umbral (*threshold*), en la Figura 4.11b se ve la eliminación del borde, el cual es importante quitar para evitar conteos erróneos, y el *ultimate erosion* con lo que se crearon los marcadores.

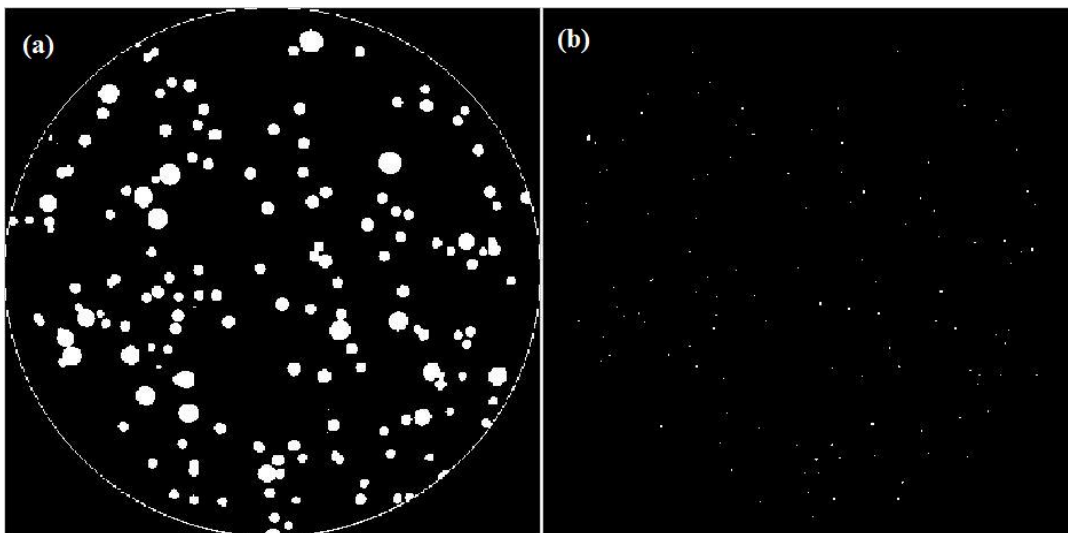


Figura 4.11. (a) Resultado de la umbralización, (b) eliminación de bordes y *ultimate erosion* en una imagen del Grupo 1 (de 0 a 300 UFC).

Del mismo modo que en la imagen de prueba se le aplicó la Función Distancia (Figura 4.12a) y se eliminó ruido aplicando el Filtro Secuencial Alternado (ASF) (Figura 4.12b).

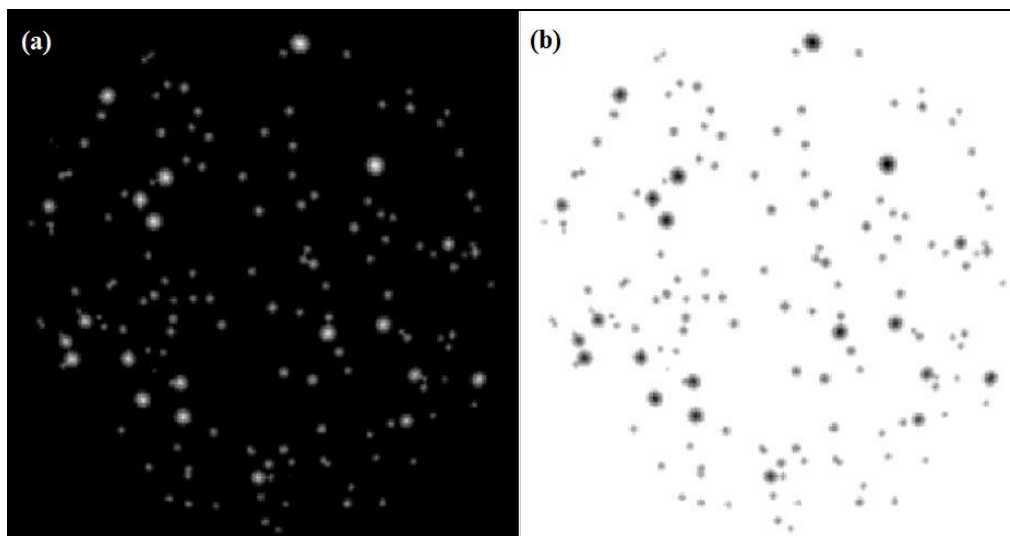


Figura 4.12. (a) Función Distancia y (b) Filtro Secuencial Alternado aplicados a una imagen del Grupo 1 (de 0 a 300 UFC).

La máscara creada al aplicarle el *watershed* a la Figura 4.12b, para la creación de regiones, se muestra en la Figura 4.13a y junto con los marcadores de la Figura 4.11b se obtuvo la reconstrucción morfológica y la segmentación final de las UFC como se ve en la Figura 4.13b.

La máscara de la imagen original y la localización de los centroides de cada una de las UFC segmentadas con el algoritmo implementado a la imagen de muestra del Grupo 1, se muestran en la Figura 4.14.

Para analizar estadísticamente la eficiencia de este algoritmo con este primer grupo, primero se comparó el número de UFC obtenidas por el equipo comercial (*AccuCount 1000*) y el conteo manual. El resultado de ésta correlación se muestra en la gráfica de la Figura 4.15, en la cual se obtuvo una $R^2 = 0.987$.

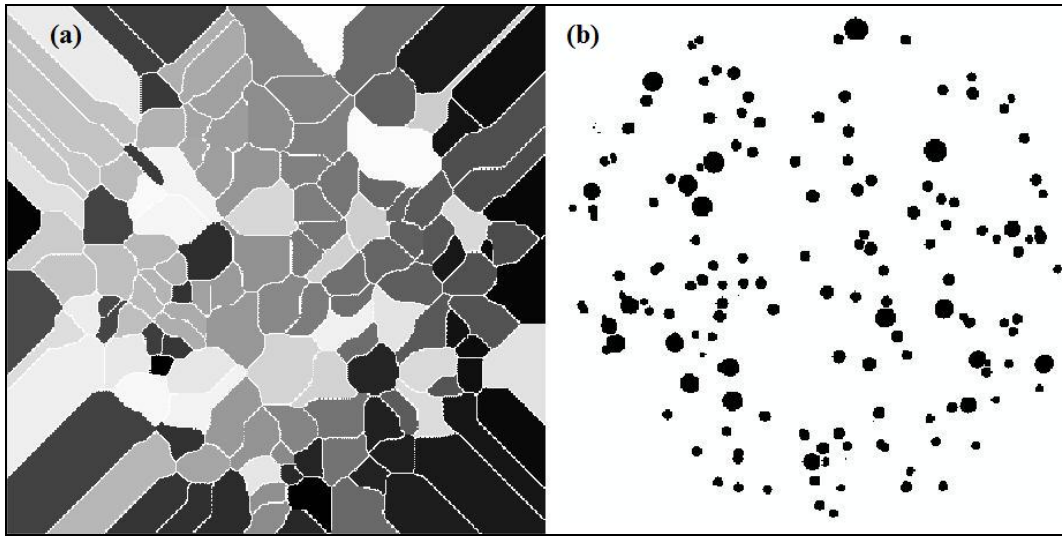


Figura 4.13. (a) *Watershed* y (b) visualización de los objetos segmentados en la imagen de muestra del Grupo 1 (de 0 a 300 UFC).

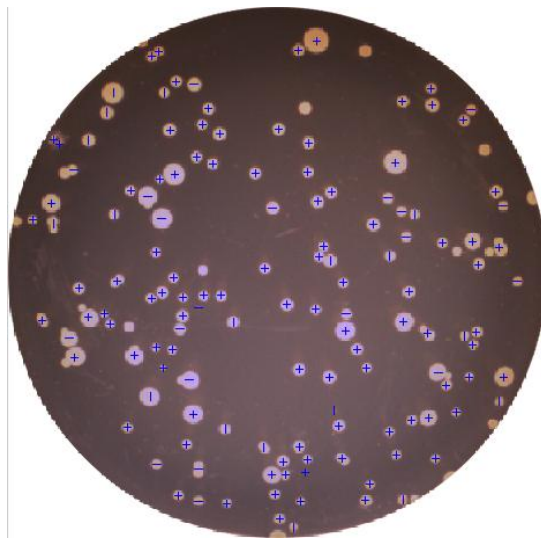


Figura 4.14. Máscara de la imagen original y localización de centroides de la imagen del Grupo 1 (de 0 a 300 UFC).

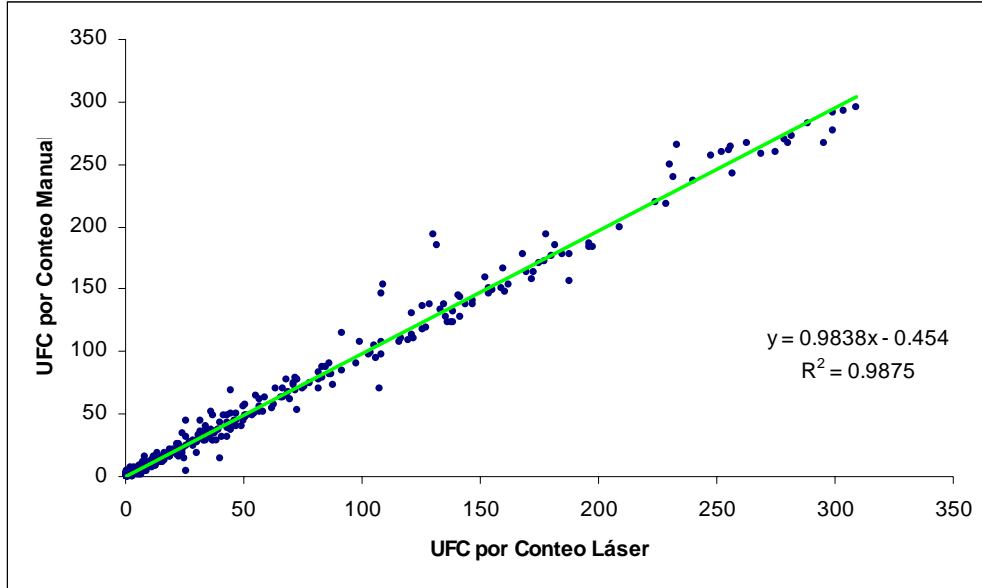


Figura 4.15. Comparativo entre el conteo por el equipo comercial (*AccuCount 1000*) y el conteo manual al Grupo 1 (de 0 a 300 UFC).

Posteriormente se realizó el comparativo entre el conteo obtenido por el método manual y el obtenido por el método de segmentación implementado. El resultado de ésta correlación se muestra en la gráfica de la Figura 4.16, donde se obtuvo una $R^2 = 0.986$.

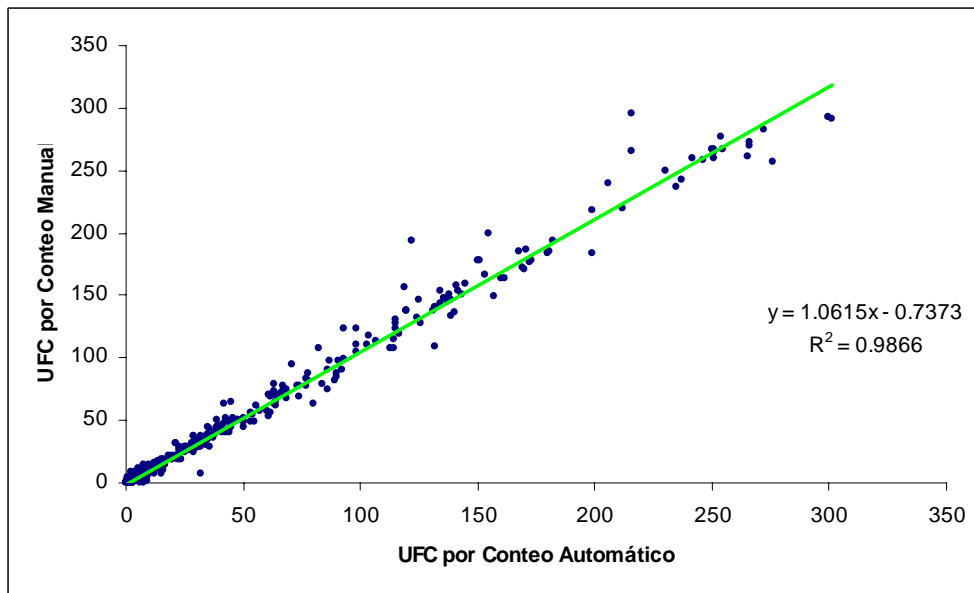


Figura 4.16. Comparativo entre el conteo por el método de segmentación implementado y el conteo manual al grupo de 0 a 300 UFC.

Como se puede apreciar al comparar los resultados para este Grupo1 la diferencia existente entre los conteos obtenidos por el equipo comercial y el método implementado contra el conteo manual, no existe una diferencia significativa, con lo que podemos decir que para el grupo de 0 a 300 UFC el método de segmentación implementado tiene muy buena eficiencia.

4.2.2.2 Análisis de los resultados de las muestras del Grupo 2

El mismo procedimiento se realizó con el Grupo 2 que está formado por conteos que van desde 301 hasta 600 UFC. De la Figura 4.17 a la Figura 4.21 se pueden ver los diferentes pasos del algoritmo desarrollado y aplicado a este segundo grupo.

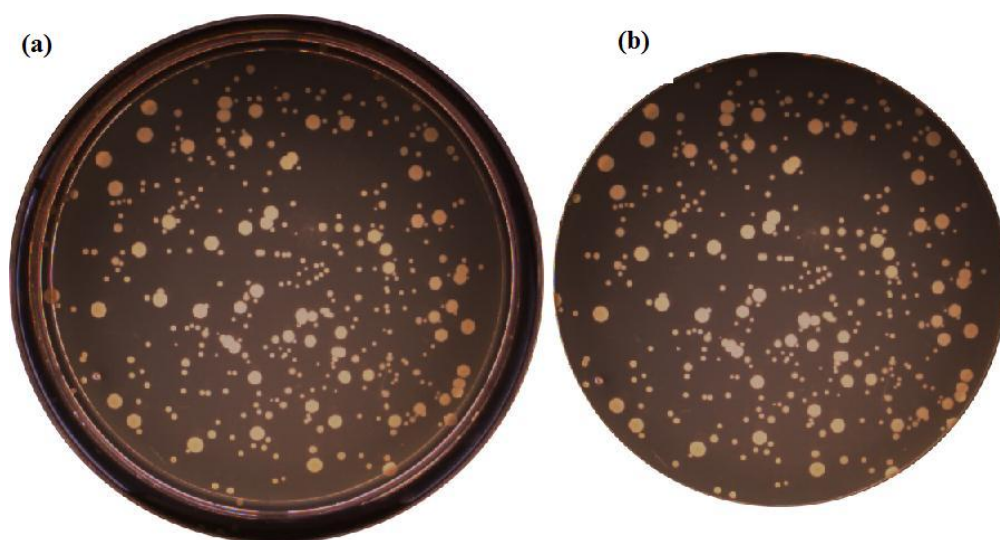


Figura 4.17. (a) Imagen original y (b) máscara de una muestra del Grupo 2 (de 301 a 600 UFC).

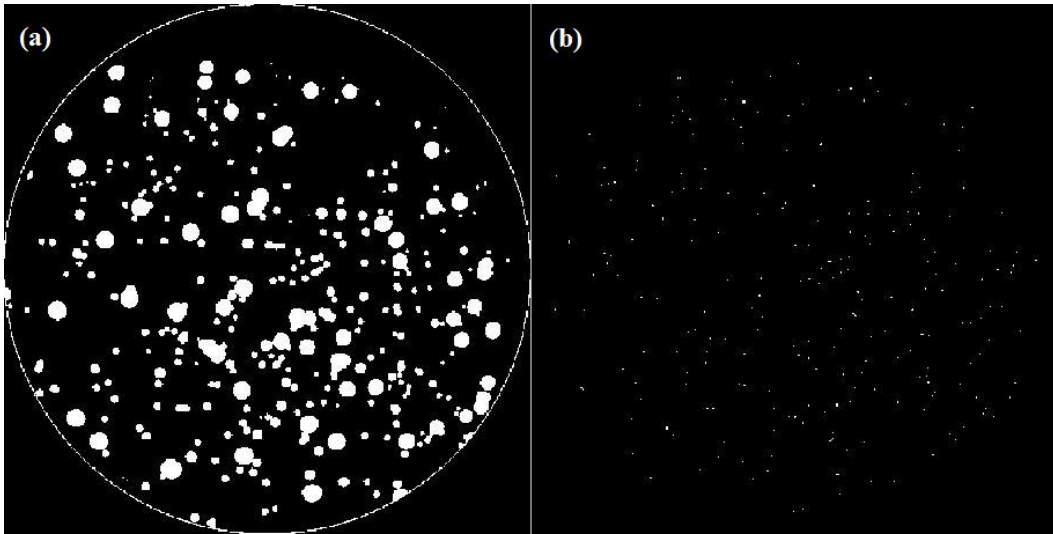


Figura 4.18. (a) Resultado de la umbralización, (b) eliminación de bordes y *ultimate erosion* en una muestra del Grupo 2 (de 301 a 600 UFC).

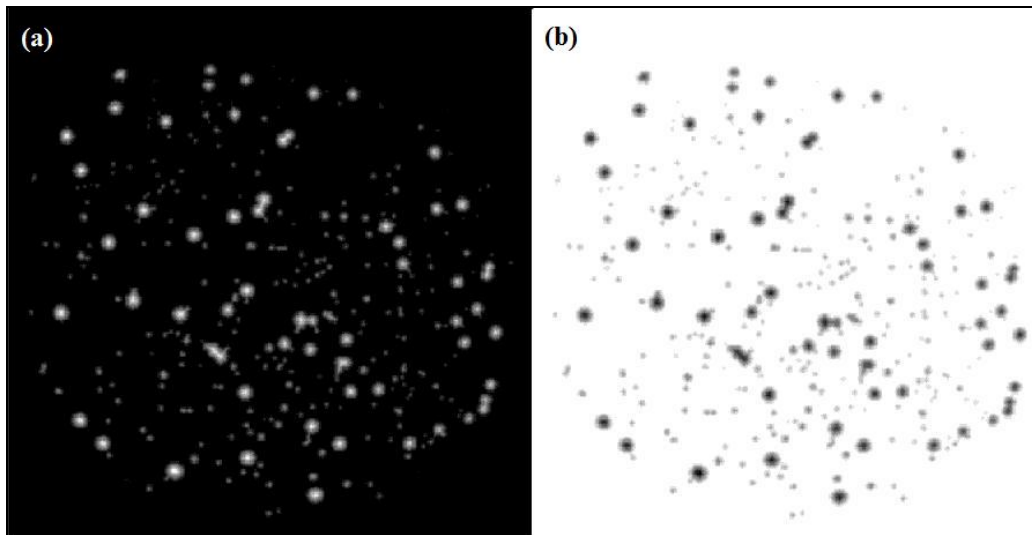


Figura 4.19. (a) *Watershed* y (b) visualización de los objetos segmentados en la imagen de muestra del Grupo 2 (de 301 a 600 UFC).

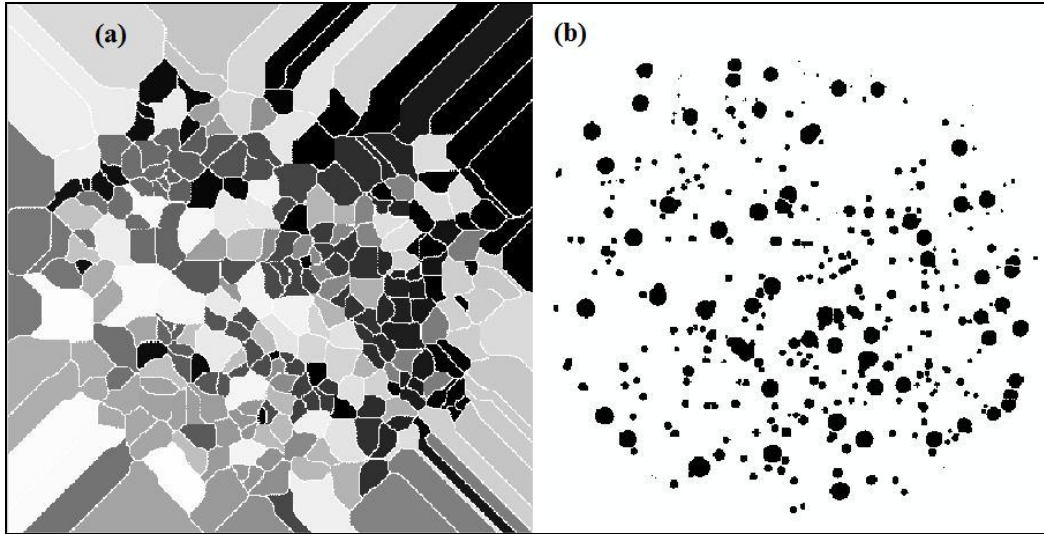


Figura 4.20. (a) *Watershed* y (b) visualización de los objetos segmentados en la imagen de muestra del Grupo 2 (de 301 a 600 UFC).

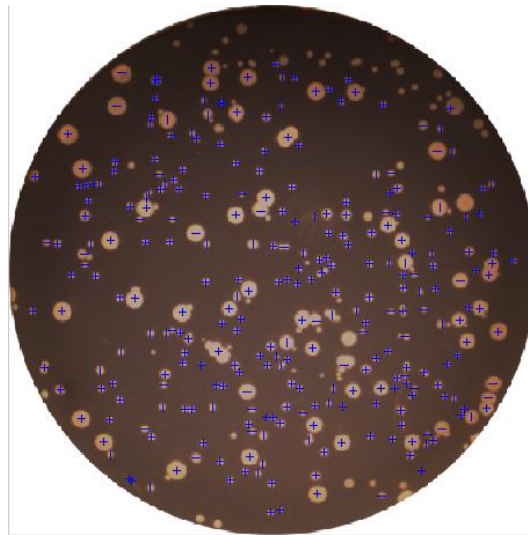


Figura 4.21. Máscara de la imagen original y localización de centroides de la imagen de muestra del Grupo 2 (de 301 a 601 UFC).

De la misma manera que con el Grupo 1 se hizo un comparativo entre el conteo obtenido por el equipo comercial (*AccuCount* 1000) y el conteo obtenido por el método manual, y se obtuvo una $R^2 = 0.902$ y su gráfica se muestra en la Figura 4.22.

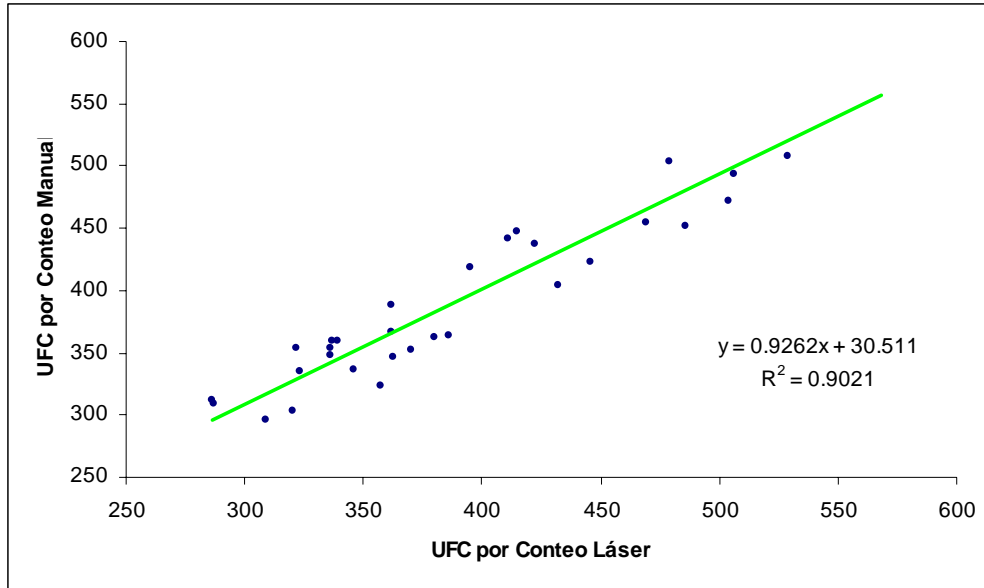


Figura 4.22. Comparativo entre el conteo por el equipo comercial (*AccuCount 1000*) y el conteo manual al grupo de 301 a 600 UFC.

A continuación se realizó el comparativo entre el conteo obtenido por el método manual y el obtenido por el método de segmentación implementado. El resultado de esta correlación se muestra en la gráfica de la Figura 4.23, en la cual se obtuvo una $R^2 = 0.750$.

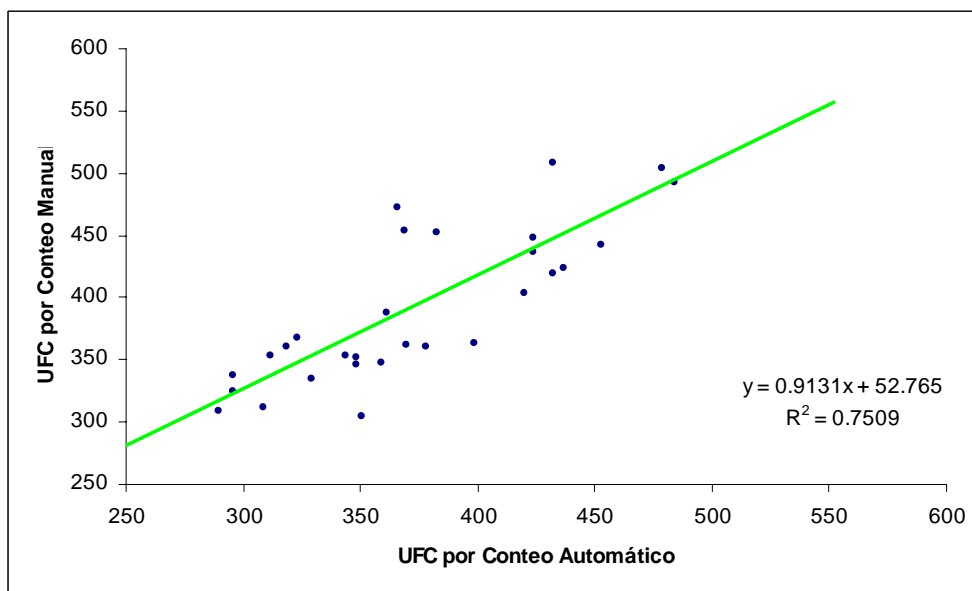


Figura 4.23. Comparativo entre el conteo por el método de segmentación automático y el conteo manual al grupo de 301 a 600 UFC.

Como se puede observar en esta última gráfica, el índice de correlación en este comparativo fue menor y entre otros aspectos se debe al factor de la iluminación, la cual todavía no es homogénea en su totalidad y al traslape que existe entre las UFC en las imágenes ya que debido a este problema no se generan los suficientes marcadores como lo mencionan Talbot y Terol (1992). Esto se demuestra mejor en la Figura 4.24a, en donde los centros de los objetos *A* y *B* están traslapados pero separados por medio de una línea de intersección, esto hace posible su separación utilizando el método de *ultimate erosion*. Caso contrario al de la Figura 4.24b, donde los centros de ambos objetos están del mismo lado de la línea de intersección y no pueden ser separados a través de este método. Esto fue muy notorio en las imágenes del Grupo 2, donde el tamaño de las UFC era más variado, la concentración de éstas en la superficie del agar no era tan homogénea y existía una mayor cantidad de objetos traslapados. Esto se reflejó en el conteo final del método de segmentación implementado.

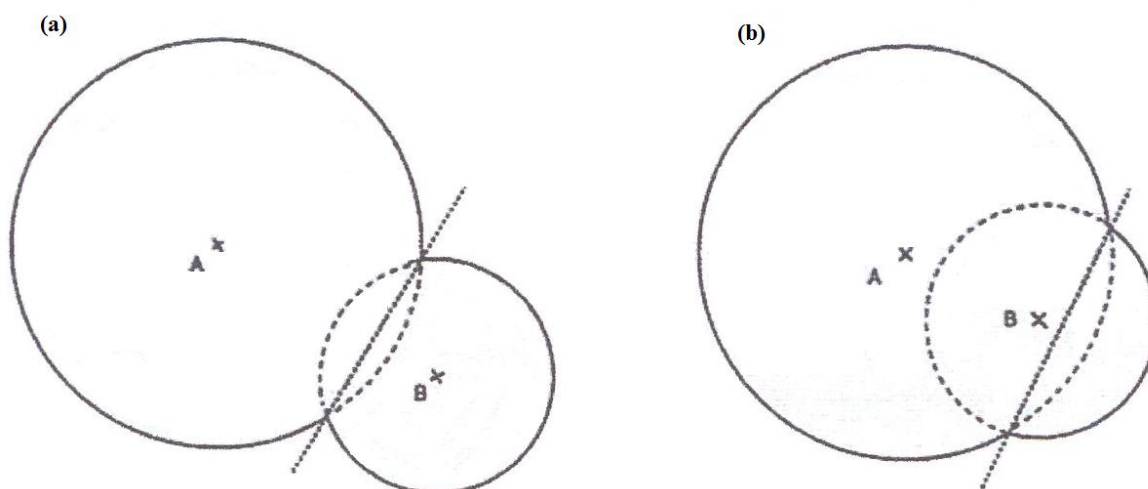


Figura 4.24. (a) Objetos que pueden ser segmentados mediante *ultimate erosion*; (b) objetos que no pueden ser segmentados por este método.

En la Figura 4.25a se presenta un ejemplo del *zoom* de una sección de una imagen de un cultivo donde se aprecia la diferencia entre la segmentación realizada por el método mejorado de segmentación de imágenes a color y la segmentación lograda aplicando el método de *ultimate erosion* (Figura 4.25b).

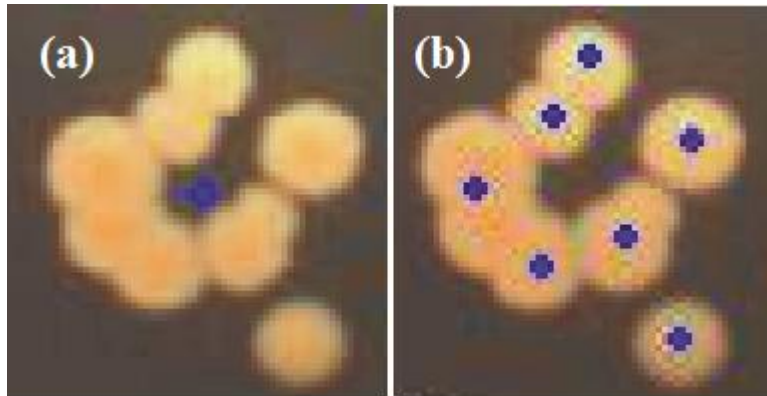


Figura 4.25. (a) Segmentación realizada por el método mejorado de segmentación de imágenes a color y (b) segmentación lograda aplicando el método de *ultimate erosion*.

4.2.2.3 Análisis de los resultados de las muestras del Grupo 3

Finalmente se analizó el Grupo 3 que está formado por conteos de UFC mayores a 601. De la Figura 4.26 a la Figura 4.30 se pueden ver los resultados a una imagen de muestra de los diferentes pasos del algoritmo desarrollado y aplicado a este tercer grupo.

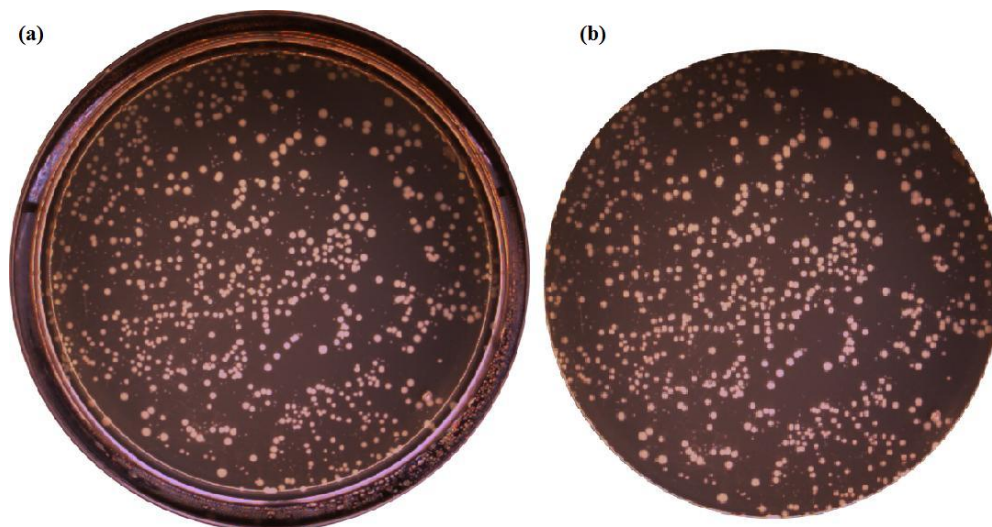


Figura 4.26. (a) Imagen original y (b) máscara de una muestra del Grupo 3 (más de 601 UFC).

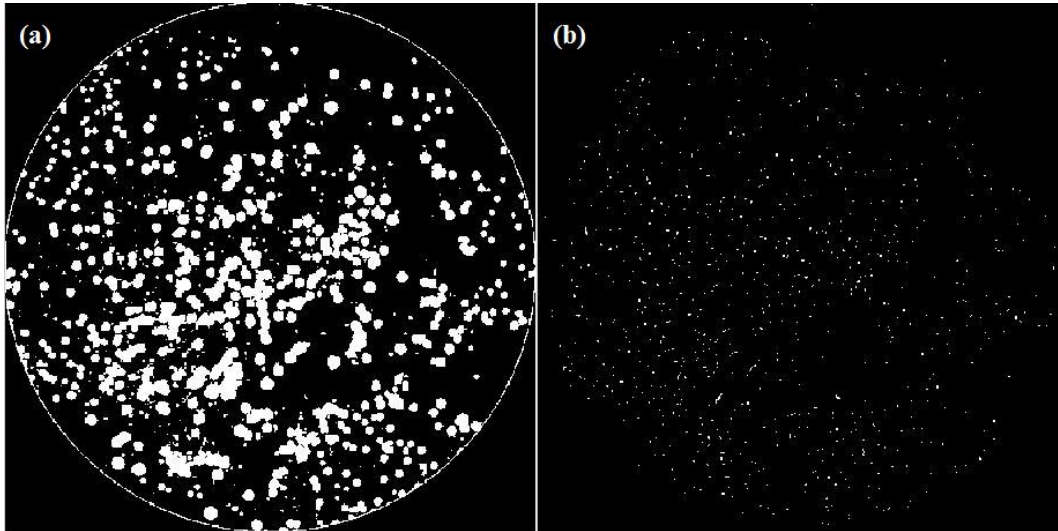


Figura 4.27. (a) Resultado de la umbralización, (b) eliminación de bordes y *ultimate erosion* en una muestra del Grupo 3 (más de 601 UFC).

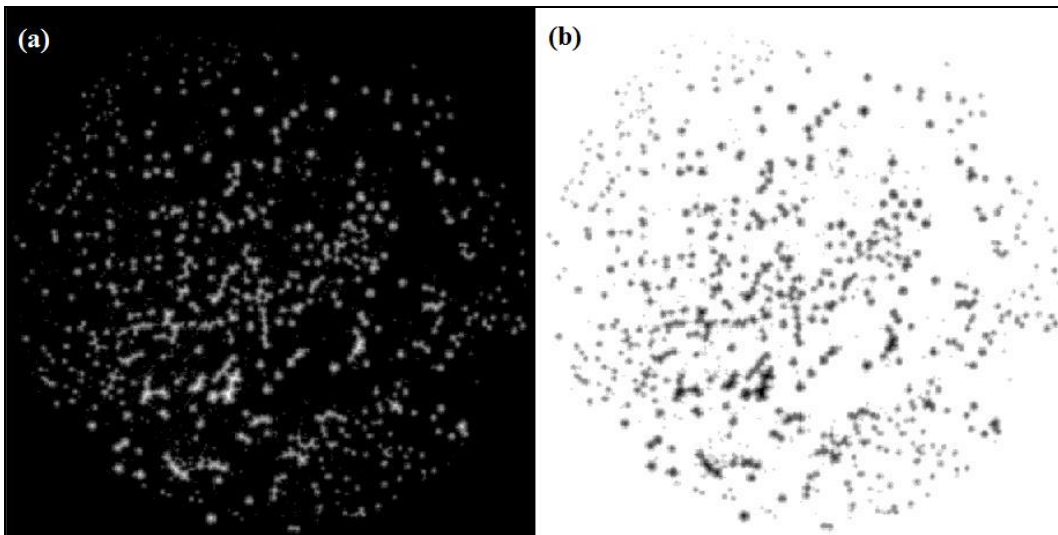


Figura 4.28. (a) *Watershed* y (b) visualización de los objetos segmentados en la imagen de muestra del Grupo 3 (más de 601 UFC).

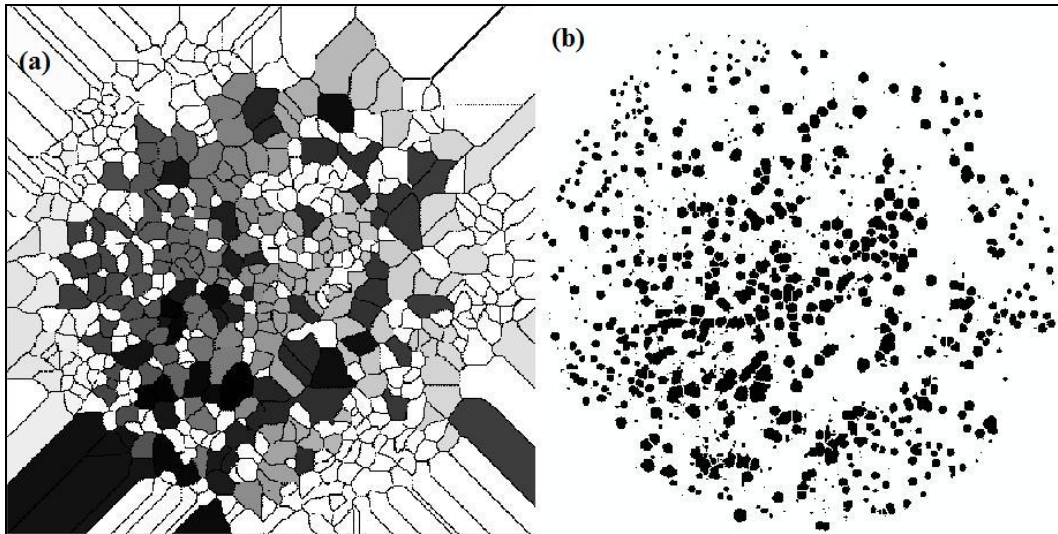


Figura 4.29. (a) *Watershed* y (b) visualización de los objetos segmentados en la imagen de muestra del Grupo 3 (más de 601 UFC).

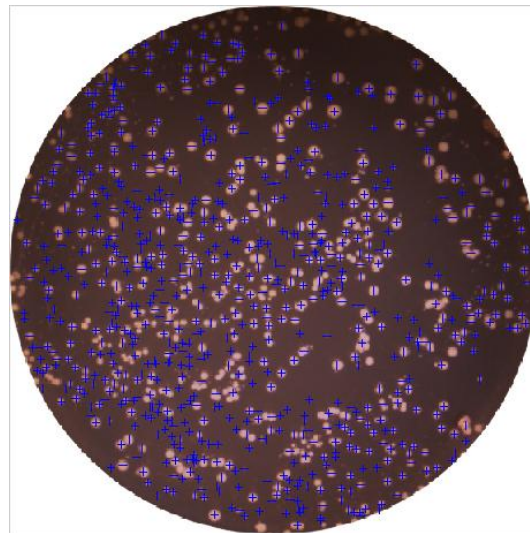


Figura 4.30. Máscara de la imagen original y localización de centroides de la imagen de muestra del Grupo 3 (más de 601 UFC).

Al igual que con los dos grupos anteriores se hizo el comparativo entre el conteo obtenido por el equipo comercial (*AccuCount 1000*) y el conteo obtenido por el método manual, donde se obtuvo una $R^2 = 0.963$ y su gráfica se muestra en la Figura 4.31.

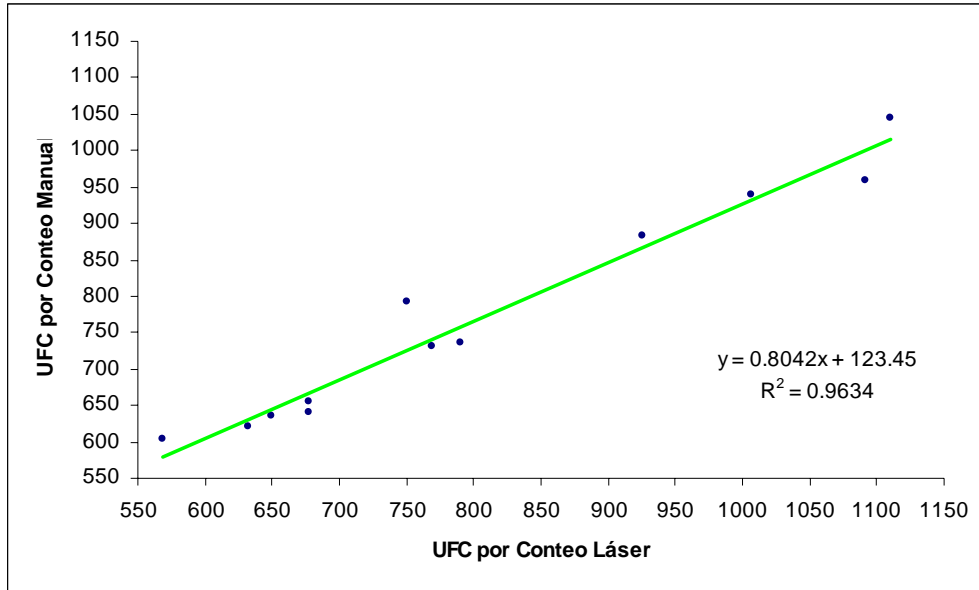


Figura 4.31. Comparativo entre el conteo por el equipo comercial (*AccuCount 1000*) y el conteo manual al grupo de más de 601 UFC.

También se realizó el comparativo entre el método manual y el de segmentación. El resultado de ésta correlación se muestra en la gráfica de la Figura 4.32, en la cual se obtuvo una $R^2 = 0.872$.

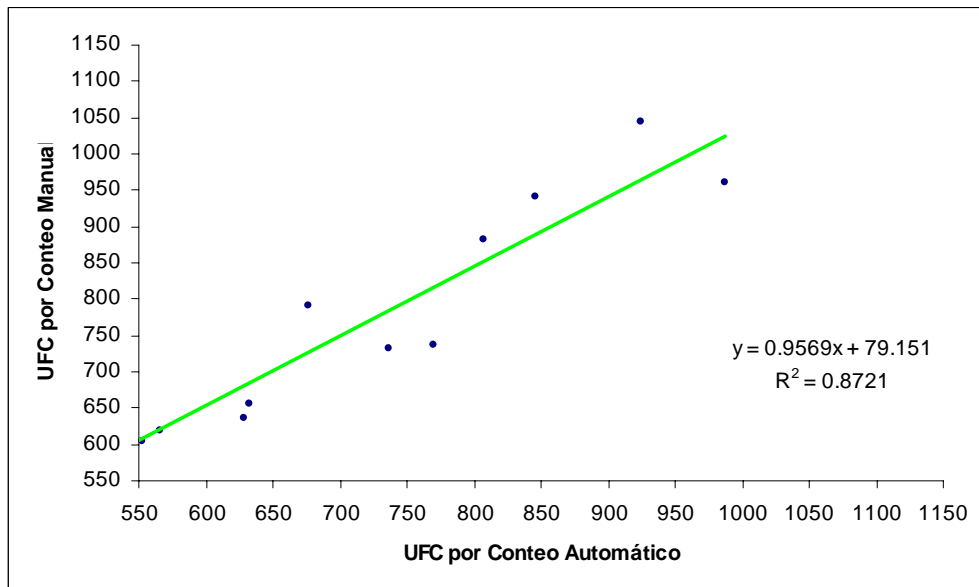


Figura 4.32. Comparativo entre el conteo por el método de segmentación automático y el conteo manual al grupo de más de 600 UFC.

Como sucedió con la correlación del Grupo 2, el índice de correlación en este comparativo fue menor y esto se le atribuye principalmente a la iluminación no homogénea sobre la superficie de la caja de petri sobre todo en las orillas, la cual no es homogénea en su totalidad. El traslape de los objetos en la imagen no influyó mucho en el conteo, ya que, si bien es mayor el número de UFC en la superficie del agar, los tamaños de éstas no variaron demasiado y su distribución fue más uniforme y por lo tanto no hubo demasiadas UFC traslapadas a diferencia de lo observado en las imágenes del Grupo 2.

4.2.2.4 Análisis general de los resultados

La etapa final del análisis de los resultados fue comparar todo el lote de 525 muestras. En el primer comparativo entre el conteo obtenido por el *AccuCount* 1000 y el obtenido por el método manual, se obtuvo una $R^2 = 0.994$; su gráfica se muestra en la Figura 4.33.

Otro análisis que se realizó fue la diferencia entre el conteo manual y el conteo con el equipo comercial en comparación con el número de muestras analizadas (Figura 4.34), cuyos conteos se ordenaron ascendentemente. Es notorio que en las muestras con mayor número de UFC son las que tienen la mayor diferencia en el conteo (no se registran cerca de 140 UFC en una de las últimas muestras que tiene un conteo de más de 900 UFC en el conteo final).

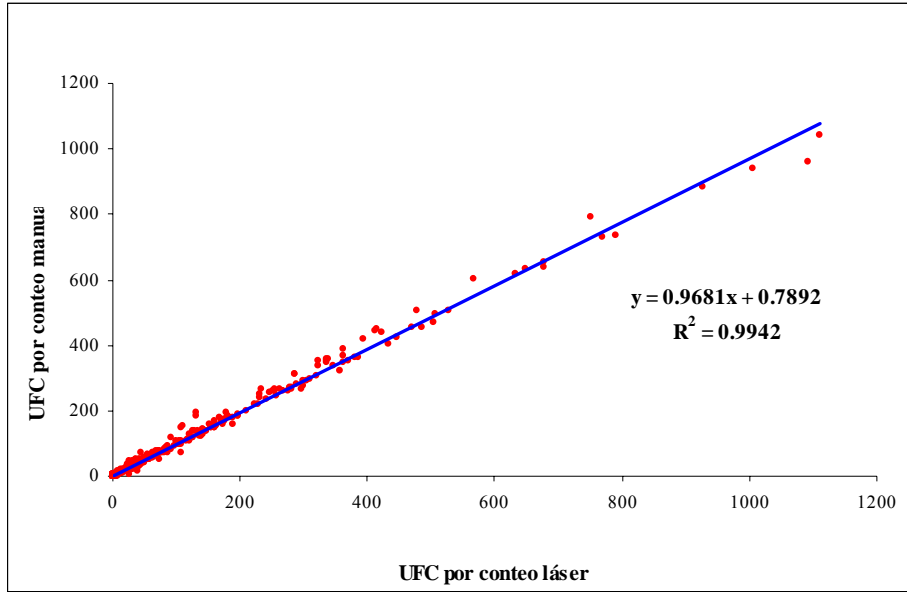


Figura 4.33. Comparativo entre el conteo por el equipo comercial (*AccuCount 1000*) y el conteo manual al lote de 525 muestras.

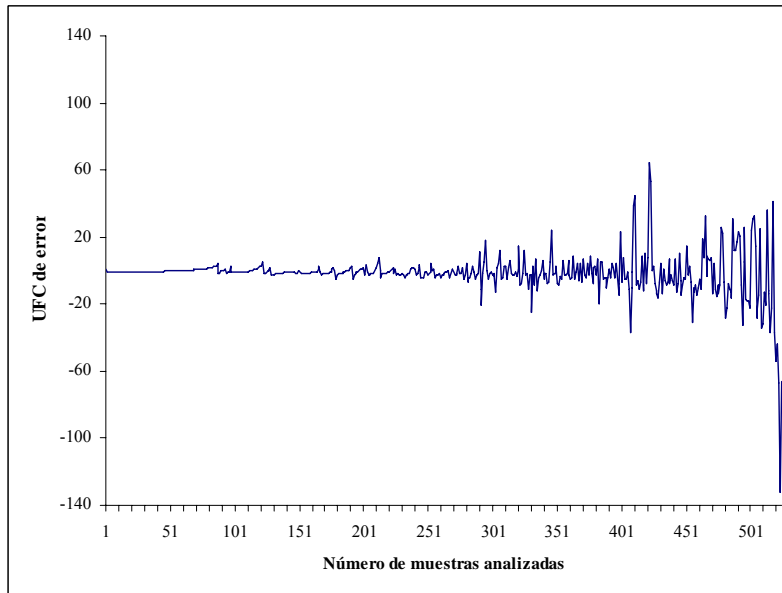


Figura 4.34. Error obtenido por el equipo comercial (*AccuCount 1000*).

En la Figura 4.35 se muestra el resultado del análisis de la diferencia en el número de UFC registradas entre el conteo manual y el conteo con el equipo comercial. Es notorio que a mayor número de UFC el error aumenta.

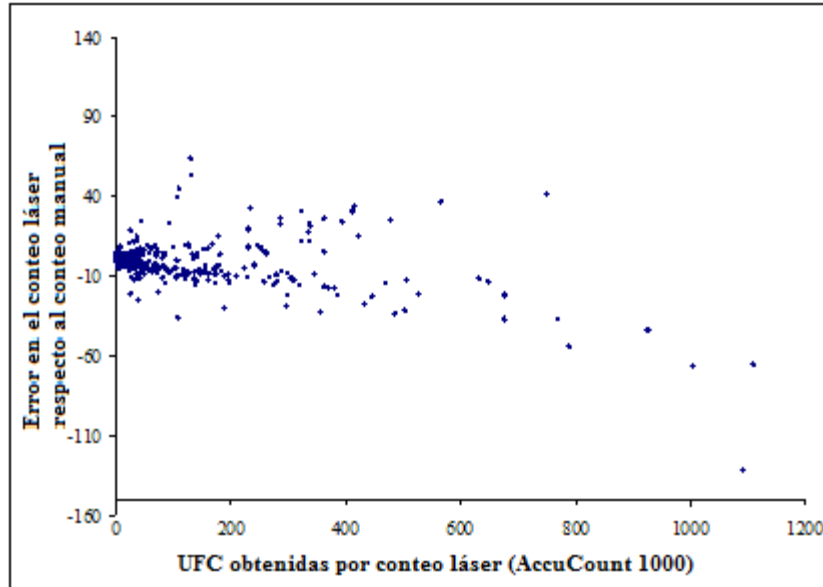


Figura 4.35. Error en el número de UFC detectadas entre el conteo manual y el conteo con el *AccuCount* 1000 para cada muestra (caja de petri) analizada.

Una vez analizado el conteo que se obtuvo con el equipo comercial y comparado con el conteo realizado manualmente, el siguiente paso fue comparar los resultados del conteo alcanzado por el algoritmo de segmentación implementado con el conteo manual. En la Figura 4.36 se presenta la correlación entre estos dos métodos. Se tuvo una $R^2 = 0.991$ en comparación con el 0.994 del equipo comercial.

También se analizó la diferencia entre los resultados del conteo manual y el conteo con el equipo comercial respecto al número de muestras analizadas (Figura 4.37). El resultado de los conteos también fue ordenado ascendentemente. En comparación con el análisis realizado al resultado del conteo del equipo comercial, el cual no registra cierto número de UFC cuando estas se presentan en gran cantidad, con este algoritmo de segmentación implementado es notorio que mientras mayor es el número de UFC, el conteo aumenta (registra aproximadamente 140 UFC extras en una muestra con más de 900 UFC).

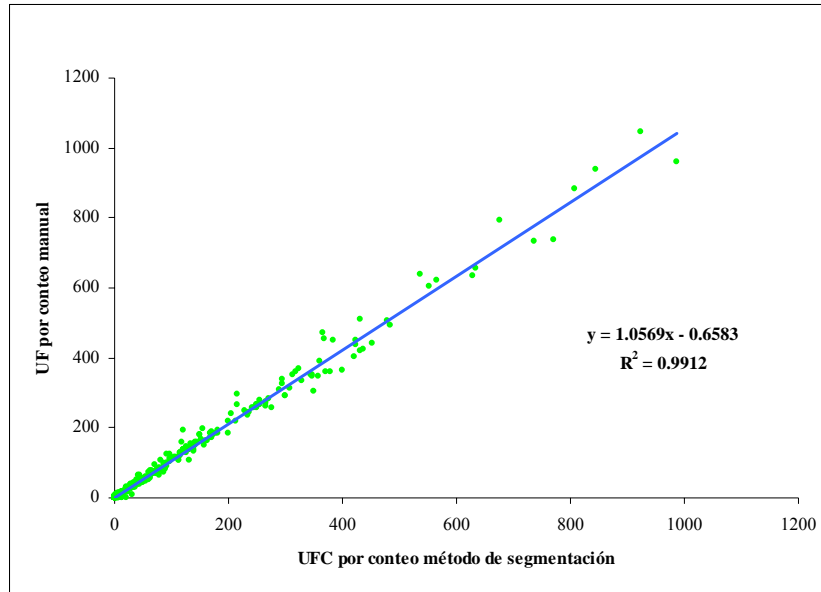


Figura 4.36. Comparativo entre el método de segmentación implementado y el conteo manual al lote de 525 muestras.

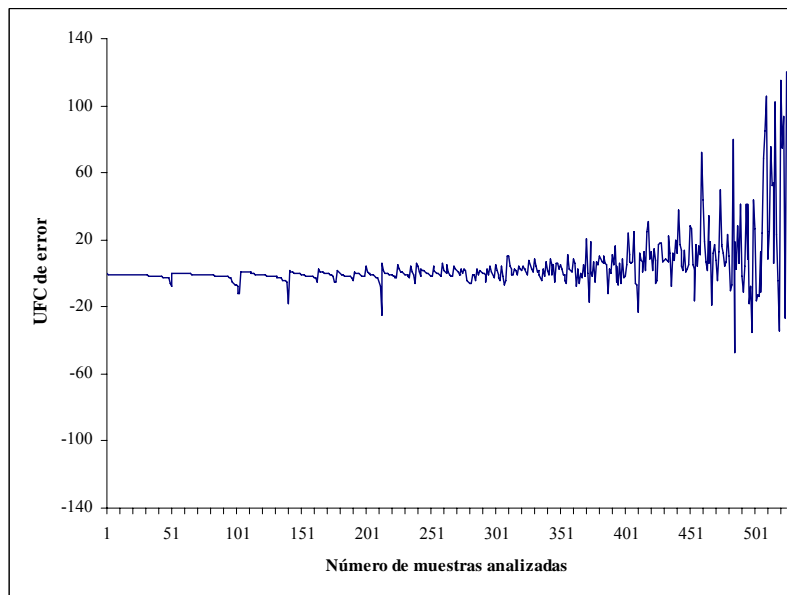


Figura 4.37. Error obtenido por el método de segmentación implementado.

El otro análisis realizado fue la diferencia que hay entre el conteo manual y el conteo con el algoritmo de segmentación implementado en comparación con el número de UFC registradas por este algoritmo. (Figura 4.38).

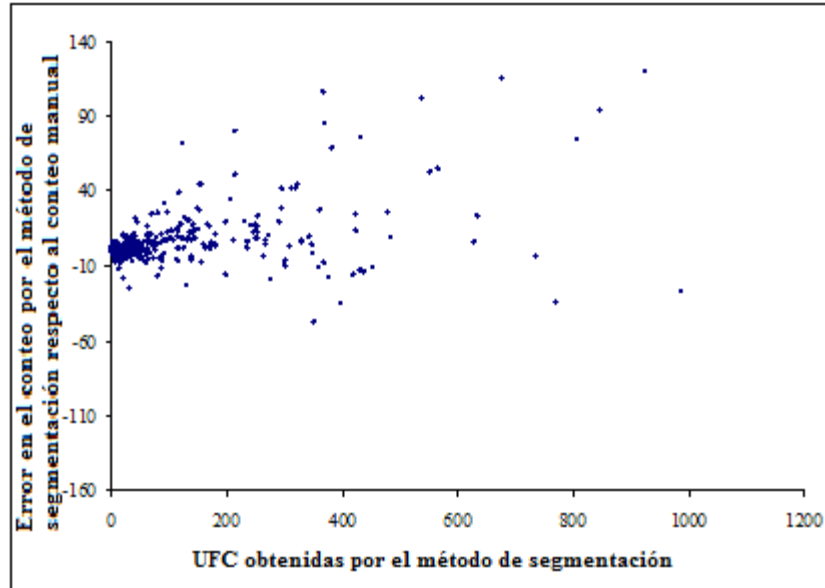


Figura 4.38. Error en el número de UFC detectadas entre el conteo manual y el conteo con el método de segmentación implementado para cada muestra (caja de petri) analizada.

4.3 Comparativo con otros algoritmos de segmentación y conteo de bacterias

Continuando con la evaluación del algoritmo implementado se comparó con otros trabajos de investigación enfocados directamente al conteo de bacterias o células. Se pudo notar que poseen ciertas características en común como son:

- Adquisición de la imagen de forma digital, ya sea a través de una cámara de CCD, de una cámara de alta definición, cámara de televisión de alta velocidad o a través de sistemas de barrido (*scanner*) (Malligo, 1965; Goss *et al.*, 1974; Marotz *et al.*, 2001; Corkidi *et al.*, 2003; Putman *et al.*, 2005; Wang, 2006).
- Para evitar el problema de reflejos en la periferia de la caja de petri se enmascara la imagen para poder trabajar únicamente con la región de interés, aunque se demostró que la región eliminada al enmascarar la imagen no afecta el conteo final siempre y cuando se tenga mucho cuidado en el manejo de la muestra (caja de petri) al momento de la preparación (Malligo, 1965; Goss *et al.*, 1974).

- En algunos casos, uso de la morfología matemática y diferentes transformaciones para mejorar la precisión del sistema (Chen *et al.*, 1999; Marotz *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006; Wang, 2006).

Otro factor común en los artículos revisados fue que el error en el conteo se incrementa debido a la presencia de burbujas en el agar o a imperfecciones y golpes y raspones en la superficie de la caja de petri. Esto último es muy común en el caso de las cajas de vidrio (Malligo 1975). También afecta la presencia de ruido en la imagen, el cual se pudo eliminar aplicando un filtro (Goss *et al.*, 1974; Chen *et al.*, 1999).

En cuanto a la eficacia de los diferentes algoritmos, se obtuvo el 96% por el programa comercial *Protocol* (Putman *et al.*, 1995); el 83% por Malligo (1975), el 94% con el sistema de Sossa *et al.* (2000), el 96% con el de Marotz *et al.* (2001), el 76% y 95.74 % con el sistema COVASIAM (Corkidy *et al.*, 2003), el 99.42% con el *AccuCount 100* y el 99.12% con el algoritmo desarrollado en el presente trabajo. Todos los sistemas fueron comparados con el conteo manual.

4.4 El dispositivo final

El montaje final del sistema automático de captura de las muestras se observa en la Figura 4.39, donde se puede ver la cámara digital en la parte superior y el plato de acrílico motado sobre el motor a pasos el cual está conectado a su circuito de control.

4.5 La interfaz gráfica

Se diseñó un programa en Builder C++ con una interfaz gráfica de fácil manejo para el usuario donde se tiene la posibilidad de cambiar entre las cinco cajas de petri con el cultivo a analizar, realizar el conteo automáticamente, guardar los datos en un archivo, para consultas posteriores y poder guardar la imagen adquirida. La interfaz gráfica realizada se muestra en la Figura 4.40.

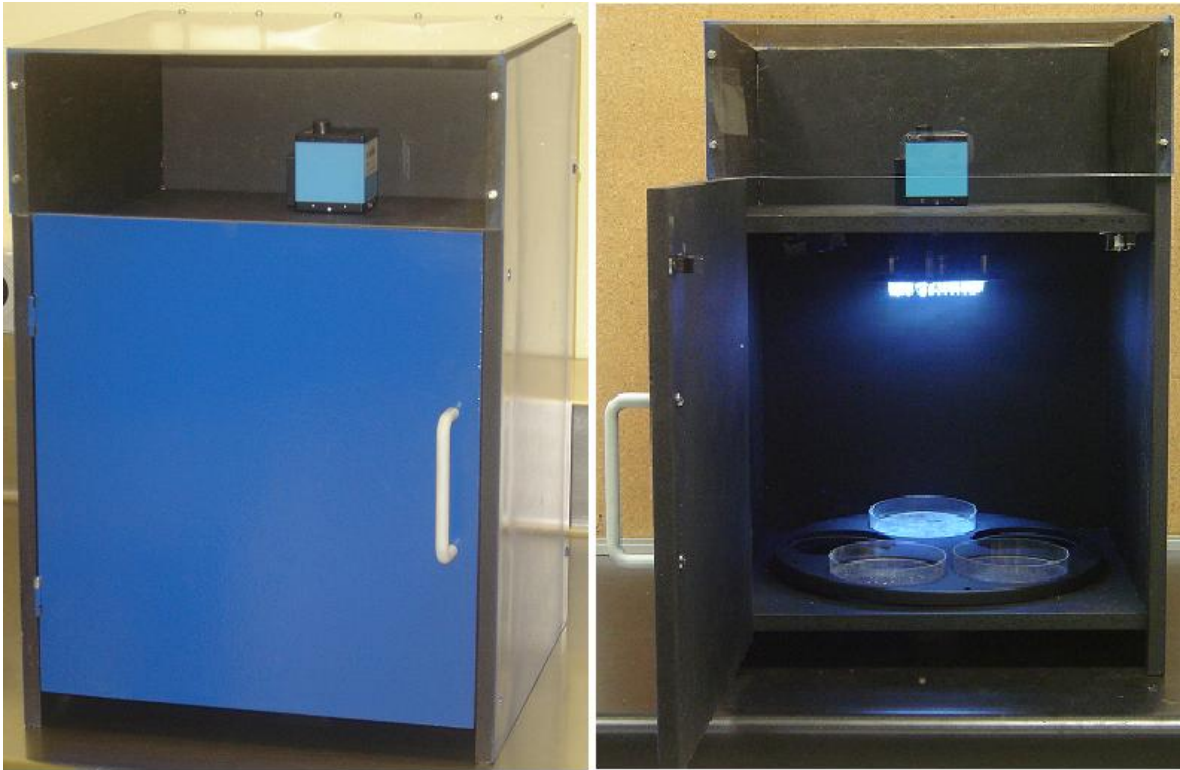


Figura 4.39. Sistema automático de captura.

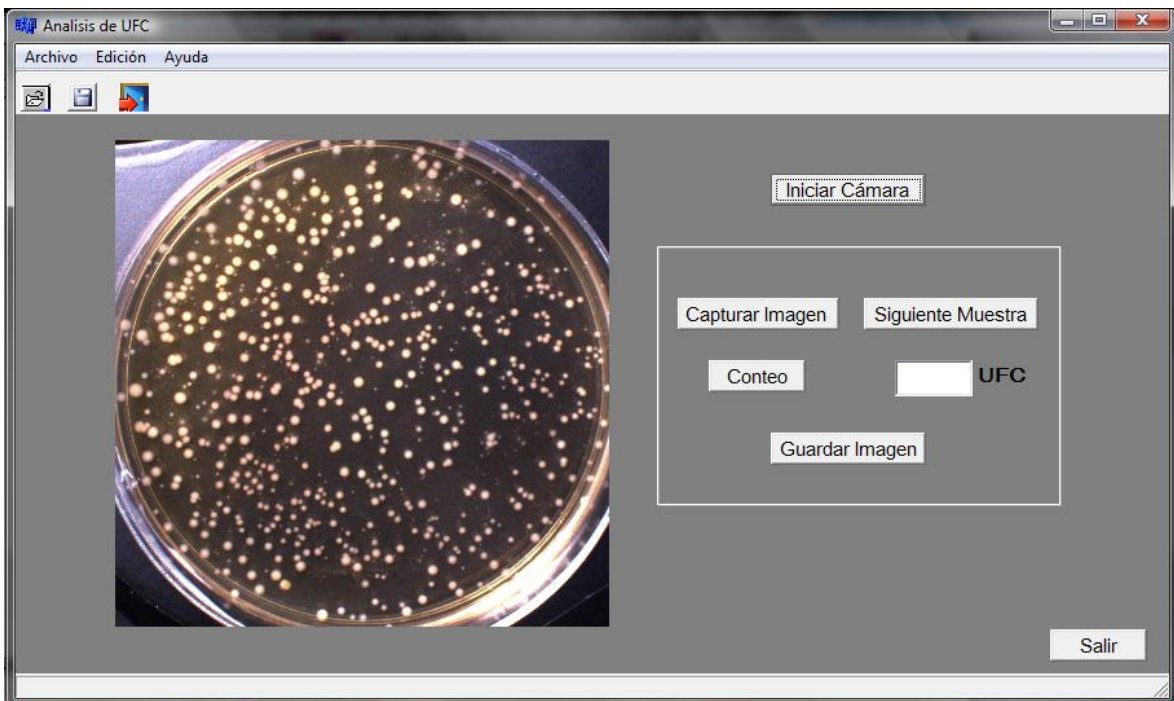


Figura 4.40. Interfaz gráfica para control del motor a pasos y análisis de la imagen.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación se aplicaron técnicas de procesamiento digital de imágenes al estudio de ciertos atributos morfológicos de las UFC cultivadas en cajas de petri. La propuesta principal en el desarrollo de este algoritmo fue lograr una segmentación eficiente de las UFC, separando automáticamente aquellas que se encuentran traslapadas y que son identificables para el ojo humano experto.

Se plantearon dos algoritmos diferentes y se evaluó la eficiencia de cada uno. En el primero, se tomó como base la técnica de segmentación de imágenes a color propuesta por Shiji y Hamada (1999). Este algoritmo no cumplió los objetivos planteados, dado que no separó las conexiones entre las UFC traslapadas. Una segunda propuesta, fundamentada en los resultados obtenidos con el primer algoritmo, se desarrolló tomando como base la metodología de segmentación binaria propuesta por Talbot y Terol (1992), la cual utiliza la transformación conocida como *ultimate erosion*. La implementación de este método aumentó la eficiencia en el proceso de segmentación de las UFC, demostrando que es posible identificar cuando dos o más colonias se encuentran traslapadas en la superficie del agar. El tiempo promedio que tarda el sistema desarrollado en hacer el análisis de cada muestra fue de aproximadamente 3 a 5 segundos, logrando mejorar notablemente el tiempo que toma el conteo de las muestras mediante el método manual, el cual varía dependiendo de la cantidad de UFC. Comparando con el dispositivo comercial de referencia, el sistema presentado en esta tesis resultó ser entre 2 y 3 segundos más lento.

Con el fin de evaluar el algoritmo usado en esta tesis, los resultados de los conteos obtenidos fueron comparados con los de un equipo comercial (*AccuCount 1000*) y con

aquellos obtenidos por el método manual, a través de la colaboración de expertos en la materia. El análisis estadístico demostró que el sistema desarrollado posee una efectividad del 99.12% en comparación con el 99.42% del el equipo comercial. Cabe mencionar que se mejoró la eficiencia de los métodos descritos en la sección de Antecedentes, los cuales también utilizan técnicas de visión computarizada.

Parte importante de este trabajo de investigación fue el diseño y la construcción del dispositivo que permite analizar las muestras de cultivos bacteriológicos de manera automática, permitiendo el manejo fácil por parte de cualquier usuario, además de ser compatible con cualquier sistema de captura digital.

Durante el procedimiento de experimentación y la validación de los resultados se identificaron debilidades en cuanto a la calidad de las imágenes debido a la iluminación, la cual en un principio no fue uniforme y se mejoró empleando un anillo de LEDs que permitió obtener imágenes más homogéneas.

Entre las principales aportaciones de esta tesis está el desarrollo tecnológico asociado a la segmentación y el conteo de UFC en cajas de petri. Esto es de importancia para laboratorios pequeños y centros educativos que no cuenten con el presupuesto para adquirir un equipo comercial como el *AccuCount 1000*.

En cuanto a las mejoras para optimizar el sistema desarrollado, se propone cambiar el sistema de iluminación de LEDs por uno de luz ultravioleta, ya que algunos microorganismos fluorescen al ser estimulados con este tipo de luz, como es el caso de experimentos de transformación bacteriana y de transfección celular. También se pretende crear un reporte donde no sólo se indique el número de UFC por caja, sino que también se muestren diferentes características tales como el tamaño mínimo/máximo de colonias a considerar para el conteo y la cuantificación del área de la placa, es decir, el espacio que ocupan las UFC en la superficie de esta.

BIBLIOGRAFÍA

Arvizu Medrano, S. M., 1999, *Evaluación de riesgos microbianos, implicados en la preparación y almacenamiento de guacamole*, Tesis de Maestría, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.

Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, 1984, Williams & Wilkins (Ed), Baltimore, U. S. A., 1st Edition.

Beucher, S., 1990, *Segmentation d'Images et Morphologie Mathématique*, PhD thesis, Ecole des Mines de Paris.

Beucher, S., y Lantuéjoul, C., 1979, *Use of watersheds in contour detection*, In Proc. International Workshop on Image Processing, Real-Time Edge and Motion Detection/Estimation, Rennes.

Borgefors, G., 1986, *Distance transformations in digital images*, Computer Vision, Graphics and Image Processing, 34:344-371.

Buchanan, R. L. y Bagi, L. K., 1994, *Expansion of response surface models for the growth of Escherichia coli O157:H7 to include sodium nitrite as a variable*. Int. J. Food Microbiol., 23 (317-322).

Buchanan, R. L. y Doyle, M. P., 1997, *Foodborne disease significance of Escherichia coli O157:H7 and other enterohemorrhagic Escherichia coli.*, Food Techn., 51(69-76).

Buchanan, R. L. y Klawitter, L. A., 1992, *The effect of incubation temperature, initial pH and sodium chloride on growth kinetics of Escherichia coli O157:H7*, Food Microbiol. 9 (185-196).

Chen, Y., Bidell, K., Sun, A., Relue, P. A. y Johnson J. D., 1999, *An automatic cell counting method for optical images*, Proceedings of The First Joint BMES/EMBS Conference, Serving Humanity, Advancing Technology, Atlanta, GA, USA.

Coffey, A., Ross, R. P., 2002, *Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application*, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82 (1-4), 303-21.

Corkidi, G.; Diaz-Uribe, R.; Folch-Mallol, J. L.; Nieto-Sotelo, J., 2003, *Automated Colony Counting Using Image-Processing Techniques*, *Rapid Analytical Microbiology: The Chemistry and Physics of Microbial Identification*, Edited by W. P. Olson, Bethesda, MD and Godalming Surrey, UK: Parenteral Drug Association and Davis Horwood International Publishing, Ltd., pp. 263-282., US Patent Application 60126688.

Digabel, H., y Lantuéjoul, C., 1978, *Iterative algorithms*. Actes du Second Symposium Européen d'Analyse Quantitative des Microstructures en Sciences des Matériaux, Biologie et Médecine, Caen, J.-L. Chermant, Ed., Riederer Verlag, Stuttgart, pp. 85-99.

Dougherty, E. R., 1992, *An Introduction to Morphological Image Processing*, SPIE Optical Engineering Press, Volume TT9, ISBN 0-8194-0845-X.

Doyle, M. P. y Cliver, D. O., 1990, *Escherichia coli*, In: Foodborne diseases. Doyle M. P. y Cliver D. O. (Eds.), Academic Press, San Diego, California.

Edmund Optics Inc., 2007, *Application Notes*, pp. 8 – 25, USA.

Edmund Optics Inc., 2008, USA.

URL: <http://www.edmundoptics.com/selectionguide/>.

Fernández, J., 1994, *Desarrollo de técnicas y operadores morfológicos: Aplicación al procesamiento y análisis de imágenes en Cardiología*, Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia.

González, Rafael C. y Woods, Richard E., 2002, *Digital Image Processing*, Prentice Hall, 2nd edition, ISBN-10: 0130946508.

Goss, W. A., Michaud, R. N., McGrath, M. B., 1974, *Evaluation of an Automated Colony Counter*, Applied Microbiology, Vol. 27, No. 1: 264-267.

Jain, A. K., 1989, *Fundamentals of Digital Image Processing*, Prentice-Hall, ISBN 0-13-336165-9.

Klette, G., 2002, *Skeletons in digital image processing*, Technical Report CITR-TR-112, Computer Science Department of the University of Auckland, Nueva Zelanda.

Lantuéjoul, C., 1977, *Sur le modèle de Johnson-Mehl généralisé*, Internal report of the Centre de Morph. Math., Fontainebleau, France.

Lantuéjoul, C., 1978, *La squelettisation et son application aux mesures topologiques des mosaïques polycristallines*, PhD thesis, Ecole des Mines, Paris.

Loske, Achim M.; M-Alvarez Ulises; Hernández-Galicia, Claudia; Castaño-Tostado Eduardo; Prieto, Fernando E., 2002, *Bactericidal effect of underwater shockwaves on Escherichia coli ATCC 10536 suspensions*, Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol. 3, 321-327.

M. Álvarez Ulises,; Loske Achim M.; Castaño-Tostado Eduardo; Prieto Fernando E., 2004, *Inactivation of Escherichia coli O157H:H7, Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes by underwater shockwaves*, Innovative Food Science & Emerging Technologies 5, 459- 463.

Madigan, M. y Martinko, J., 2005, *Brock Biology of Microorganisms*, 10a. Ed., Prentice Hall, ISBN 0-13-144329-1.

Malligo, J. E., 1965, *Evaluation of an Automatic Electronic Device for Counting Bacterial Colonies*, Applied Microbiology, Vol. 13, No. 6.

Marotz, J., Lübert, C., Eisenbeiß, 2001, *Effective object recognition for automated counting of colonies in petri dishes (automated colony counting)*, Computer Methods and Programs in Biomedicine, 66: 183-198.

Meyer F., y Beucher S., 1990, *Morphological Segmentation*, Journal of Visual Communication and Image Representation, Vol. 1, no. 1, pp. 21-46, Academic Press.

Moldenhauer, Jeanne, 2003, *Use of Imaging Processing Techniques for the Counting of Microbial Colonies*, Rapid Microbiology Newsletter , Vol. 2, Issue 5.

Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, *Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*.

Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, *Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico*.

Ortiz Zamora, F. G., 2002, *Procesamiento morfológico de imágenes en color. Aplicación a la reconstrucción geodésica*, Tesis Doctoral, Universidad de Alicante.

Putman, M., Burton, R., Nahm, M. H., 2005, *Simplified method to automatically count bacterial colony forming unit*, Journal of Immunological Methods, 302, pp. 99– 102.

Rajkowski, K. T. y Marmer, B. S., 1995, *Growth of Escherichia coli O157:H7 at fluctuating incubation temperatures*, J. Food. Prot. 58 (1307-1313).

Ryan, K. J y Ray, C. G., 2004, *Sherris Medical Microbiology*, 4a. Edición, Ed. McGraw-Hill, ISBN 0-8385-8529-9.

Schlegel, Hans G., 1997, *Microbiología General*, 7ª. Edición, Ed. Omega, ISBN 84-282-1030-6.

Shih, F. Y., and Wu, Yi-Ta, 2004, *Fast Euclidean distance transformation in two scans using a 3×3 neighborhood*, Computer Vision and Image Understanding, Volume 93 , Issue 2, pp. 195–205, ISSN:1077-3142.

Shiji, A., y Hamada, N., 1999, *Color image segmentation method using watershed algorithm and contour information*, IEEE International Conference on Image Processing, Vol. 4: 305-309.

Sossa, H., y Guzmán, G., 2000, *New method to count objects into an image*, Proceedings of the 15th International Conference on Pattern Recognition, Vol.1: 500-503, ISSN: 1051, 4651.

Sternberg, S., 1986, *Greysacle morphology*, Computer Graphics and image processing, 35, pp. 333-355.

Swanson, S. J., Snider, C. Braden, C. R. *et al.*, 2007, *Multidrug-resistant Salmonella enterica serotype Typhimurium associated with pet rodents*, 356 (1), pp. 21–28.

Talbot, H., y Terol-Villalobos, I., 1992, *Binary image segmentation using weighted skeletons*, SPIE vol. 1769, Image Algebra and Morphological Image Processing III pp. 393-402, San Diego California.

Vanzella, W. y Torre, V., 2006, *A versatile segmentation procedure*, IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics, Part B: Cybernetics, Vol. 36, no. 2: 366-378.

Vincent, L., 1990, *Algorithmes Morphologiques a Base de Files d'Attente et de Lacets. Extension aux Graphes*, PhD thesis, Ecole des Mines de Paris.

Wang, W., 2006, *Colony Delineation on Image Classification*, 18th International Conference on Pattern Recognition (ICPR '06), Vol. 3: 705-708.

Weiss, M., 2002, *System for counting colonies of micro-organisms in petri dishes and other culture media*, US Patent 6381353.

Zampirolli, F. A. y Lotufo, R. A., 2000, *Classification of the distance transformation algorithms under the mathematical morphology approach*, FEEC-Faculdade de Engenhariaia Elétrica e de Computação, Campinas, SP, Brasil.

Zhang, L., Wang, X. Penwarden N., Ji, Q., 2006, *An image segmentation framework based on patch segmentation fusion*, Proceedings of the 18th International Conference on Pattern Recognition (ICPR '06), Vol. 3: 705-708.

ANEXO

3er CONGRESO INTERNACIONAL DE INGENIERÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE INGENIERÍA
Centro Universitario
Cerro de las Campanas
Santiago de Querétaro
Qro., México C.P. 76010
Tel. 01(442)192 12 00
Exts. Fax.

Arturo Méndez Rubio

Universidad Autónoma de Querétaro, División de Estudios de Posgrado,
Facultad de Ingeniería,

Nos complace informarle que su artículo titulado “**Segmentación a color mejorada aplicada a sistemas de identificación de unidades formadoras de colonias**” ha sido aceptado con correcciones menores, con base en la revisión realizada por el Comité Técnico del Tercer Congreso Internacional de Ingeniería, a celebrarse del 23 al 25 de abril del 2007, en las instalaciones de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro. Las sugerencias del comité técnico se detallan a continuación:

- Presentar una tabla con resultados de varias pruebas de los algoritmos para verificar una tendencia clara. Es necesario por la variabilidad que pueden existir entre distintas tomas de un cultivo.
- (Sugerencia) Presentar alguna(s) imagen(es) con los histogramas que mencionan, es decir los pasos intermedios para la segmentación.

Así mismo aprovecho para informarle que contará con 15 minutos para su presentación, rogándole de la manera más atenta se ajuste al tiempo asignado considerando el gran número de ponencias que participan.

Esperamos contar con su valiosa presencia en el evento y aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Comité Organizador

Vianey Torres Argüelles
Coordinadora Académica

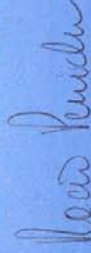


La UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
a través de la FACULTAD DE INGENIERÍA otorga

el presente reconocimiento a
Arturo Méndez Rubio

por haber participado como
PONENTE CON EL ARTÍCULO:
“Segmentación a color mejorada aplicada a sistemas de
identificación de unidades formadoras de colonias”
en el 3er CONGRESO INTERNACIONAL DE INGENIERÍA.

Dr. Gilberto Herrera Ruiz
Director
Facultad de Ingeniería


Dra. Rocio Peniche Vera
Organizadora 3^{er} Congreso
Internacional de Ingeniería


Dr. Eusebio Ventura Ramos
Jefe de la División de Posgrado
Facultad de Ingeniería



Improved Color Segmentation Method to Detect Bacteria Colony Forming Units

A. Méndez Rubio¹, J. J. García Escalante¹, G. Herrera Ruiz¹, A.M. Loske Mehling²

¹*Laboratorio de Biotrónica, Departamento de Posgrado e Investigación, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas s/n, Col. Las Campanas, C. P. 76010 Querétaro, Qro.*

²*Departamento de Nanotecnología, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, A. P. 1-1010, 76000 Querétaro, Qro.*

E-mail: ¹ arturo@fata.unam.mx

Abstract

Several methods for image segmentation have been proposed. This article describes a novel method that facilitates automatic detection and the counting of bacteria colony forming units (CFU) grown in Petri dishes. The purpose of this research was to improve a well-known color image segmentation technique, which is based on manual selection of certain properties of the pixels and the contours of regions forming an image. The algorithm utilized performs an automatic selection of these parameters. A statistical analysis showed that the improved algorithm presented satisfactory results with a coefficient of determination $R^2 = 0.9621$, a coefficient of efficiency $E = 0.9574$, and an average relative variance $ARV = 0.0425$. This provides better segmentation for images of CFU.

Keywords: colony forming units, digital image processing, image segmentation, plate counting, watershed algorithm.

1. Introduction

The growth of micro-organisms in broth can be monitored using different methods. One of the most common counting techniques is plate counting, which consists of spreading a known quantity of suspension with bacteria in Petri dishes containing nutrient agar, and counting the number of colony forming units (CFU) that grow in it (Madigan y Martinko, 1998). The main complication is that the growth and distribution of the CFU on the agar surface are not homogeneous. Colonies have different shapes and diameters, and may grow

overlapping one another. Counting CFU can be performed either by manual methods or automatically. Manual counting is reliable, but requires a significant investment of time.

Image segmentation, i.e., to split the image into several regions and separate the background and the “noise”, is an important pre-process to recognize and classify objects within an image. Different methods have been proposed for segmentation. Wu *et al.* (1998) developed an algorithm for the segmentation of microscopic images of cells with smooth contours. Initially, a parametric image is constructed to approximate the cells to be segmented. Segmentation is performed by adjusting a number of parameters to minimize the approximation error and to obtain the best parametric image. Using a square error adjustment between the original image and the image built as a cost function, the problem of segmentation is transformed into an optimization process which identifies the parameters and that minimizes the cost. The cell region is extracted thresholding the final parametric image, where the threshold is a parameter of the method.

Ying-Tung *et al.* (2005) published a segmentation algorithm based on image contour. This algorithm uses integration of mathematical morphology for edge detection and a region enlargement technique. Images are enhanced through morphological closing operations, detecting the edge of the image by morphological dilation. Zhang *et al.* (2006) divided the image into small patterns, segmenting each of these through different algorithms. Each region in the pattern was assigned a label. Later, they calculated the value of connectivity between two segments of overlapped patterns with a particular type of labeling. Vanzella and Torre (2006) proposed a new segmentation method for natural photographs, normalizing the image fragments in order to obtain a smooth image, which is a segmentation of the original one. Wang (2006) developed a methodology for the segmentation and classification of high resolution images. To accelerate the segmentation process, the author first performed a classification by using a low resolution image. Subsequently, the images were segmented through a rapid algorithm which is based on a multi-resolution technique, the fusion of the contour detection and the results of the similarity segmentation. Using this methodology, the complete processing time of image

segmentation was reduced a hundred times compared to the traditional method of segmentation, yet achieved the same accuracy.

Nevertheless, not all of these methods can identify CFU individually when they grow overlapped, and most of them do not distinguish differences in colony sizes. Corkidi *et al.* (2003) proposed an automated method that uses optical properties of CFU and digital image processing for the detection and separation of overlapped microbial colonies of different sizes cultivated in Petri dishes. These authors also developed an algorithm for multi-level object segmentation, which is useful to separate and count clusters and objects of differing sizes.

This paper describes a new method to facilitate detection, separation and counting of CFU cultivated in Petri dishes. It is an improvement over the segmentation technique for color images developed by Shiji and Hamada (1999). One advantage of the method proposed herein is that it is essentially free of over-segmentation. Over-segmentation may occur when processing images having a fine texture; that is, when a large number of edges are detected by the system. The aforementioned authors used the properties of the image pixels, and also information of the contour of each region, using the watershed algorithm developed by Serra (1988). Their methodology consists of a segmentation process and a region-combining process. However, when applying this algorithm to natural images, too many markers are created. These markers are kernels of new regions. The method generates labeling of the image by manually selecting parameters of the histograms, eliminating the creation of excessive markers. Finally, the limits of the regions are expanded to fit into the position of the edge. In the second process of combining regions, the histograms of the pixels are compared.

Our proposal consists of an automatic selection of the parameters of the histogram. Using this method, a better segmentation than the one published by Shiji and Hamada (1999) was achieved. Their algorithm only fits images with similar properties; however, this current algorithm is more flexible for processing different CFU images, reducing over-segmentation.

2. Materials and Methods

2.1. Implementation of the algorithm developed by Shiji and Hamada

In the first step of the segmentation process, limits of the borders were set in order to create closed regions, thus permitting contour information to be used later. This was performed by applying the watershed algorithm. The method labels the image using the histogram properties and eliminates the excessive creation of markers by lining the boundaries of the regions. This methodology utilizes the HLS (Hue, Lightness, Saturation) color space, which represents the photopic response curve better than the RGB (Red, Green, Blue) color space. After transforming the RGB into a HLS space by Eq. (1), the markers were adjusted to H, L and S, respectively, and the watershed algorithm was applied to the markers intersection:

$$\text{with, } \theta = \left\{ \frac{\frac{1}{2}[(R-G) + (R-B)]}{\left[\frac{1}{2}[(R-G)^2 + (R-B)(G-B)] \right]^{\frac{1}{2}}} \right\}$$
$$H = \begin{cases} \theta & \text{if } B \leq G \\ 360 - \theta & \text{if } B > G \end{cases} \quad (1)$$
$$S = 1 - \frac{3}{(R+G+B)} [\min(R, G, B)]$$
$$L = \frac{1}{3}(R+G+B)$$

The regional minima that were fixed on the markers of the image gradient were replaced as follows:

1. A histogram representing the properties of the image was created.
2. The histogram valleys were filled by closing, which is a morphological operation.
3. A labeled image was generated by attaching a label to each maximum in the histogram.
4. The markers were set at the points where the gradient of the labeled image was located and the feature of the input image was gradually changed.

This process was applied to the lightness (L) of the image. From the resulting histogram, the image was labeled (black parts were not labeled) and markers were created as white parts. The final marker was fixed to the pixels where the three markers were located. Subsequently, the watershed algorithm was applied to these markers and the first regions were created. The white lines were the contours of the regions, demonstrating that this method eliminates over-segmentation to a certain extent.

MATLAB (v. 7.0.0 19920 R14, *The MathWorks, Inc.*, 2004) was used for both the algorithm proposed by Shiji and Hamada (1999) and for this novel method. The first step consisted of converting the original image to a HSV color space and to a grayscale. Grayscale values were used to obtain the gradient. Each of the three HSV channels were separated to obtain an image, creating individual histograms and markers which were manually selected by taking different ranges of the histogram, according to the information obtained from each histogram, further generating an inverse histogram. The internal gradient (∇_A) was obtained by subtracting the erode function $\varepsilon_{(B)}$ from the previously obtained grayscale image (A):

$$\nabla_A = A - \varepsilon_{(B)}(A). \quad (2)$$

The erode function $\varepsilon_{(B)}(A)$, which is the erosion of the image A with a structural element B, was calculated using a disk shape structural element of size 2. The next step was set the minima, in order to modify the intensity of the resulting gradient image by using a morphological reconstruction. This allows for the possibility of obtaining the regional minima at those points where the markers were different from zero. Once the minima were imposed, the watershed algorithm was used to obtain the final image. As explained above, the selection of markers in the histograms was done manually.

To improve the method published by Shiji and Hamada (1999), the images acquired in channels H, S and V were normalized from levels 0 to 1, to levels 1 to 256. The values of the histograms were stored as variables, which were arranged in a declining order. Once accomplished, it was possible to identify the histogram sections that provided more

information about objects or regions within the image, therefore obtaining individual markers for each histogram. A general map was obtained by intersection of these specific markers. This was done by verifying the points where all specific markers matched and where the value of the internal gradient was smaller than a certain parameter. A new marker was defined with this parameter and minimum values were imposed on the gradient, in order to run the watershed algorithm and to obtain the final image.

2.2. Image acquisition of CFU

A total of 102 Petri dishes containing *E. coli* O157: H7 CFU, 102 Petri dishes containing *Listeria monocytogenes* and 50 with CFU of *Lactococcus lactis* were prepared according to the guidelines for the preparation of dilutions for food microbiological examination NOM-110-SSA1-1994 (Norma Oficial Mexicana), and photographed. Images of CFU were obtained in JPG format with a digital camera model DFK 31BF03 with a resolution of 1024 x 768 pixels, and a frame rate of 30 per second (FPS), using IC Capture 2.0 software (*The Imaging Source Europe GmbH*). Brightness, gain, gamma, exposure time and white balance were set to 0, 300, 10, 1/9 s, and AUTO, respectively. The camera was coupled to a dark field colony counter (*Reichert Darkfield Québec*, mod. 3325) with a standard 40 watt soft white incandescent bulb. The working distance between the camera lens and the agar surface was 21 cm. Image analysis was performed using the Image Processing Toolbox of MATLAB. A flow diagram of the algorithm obtained is shown in Figure 1. Manual counting was done by the casting plate technique (Lim, 1998). All colonies on the plate were counted. According to Madigan *et al.* (1998), in to reduce the margin of error, only plates containing more than 30 colonies were considered. If the number exceeded 300 colonies, the following steps were taken:

- From 301 to 500 colonies, the sample was divided into two parts, only one part was counted, and the number of colonies was multiplied by 2.
- From 501 to 800 colonies, the sample was divided into four parts, only one part was counted, and the number of colonies was multiplied by 4.

- For more than 800 colonies, the sample was divided into 10 to 20 sectors, only one sector was counted, and the number of colonies was multiplied by the number of sectors.

The average processing time for each image was 3 to 5 seconds.

3. Results and discussion

The main disadvantage of counting CFU by the method published by Shiji and Hamada (1999) is the manual selection of the markers, which does not guarantee good segmentation, because each different image requires modifications of these parameters. Furthermore, by using this technique it is impossible to automate the process. Our algorithm proved to segment CFU properly, using different illumination and bacterial density. Nevertheless, the sensitivity of the gradient value has to be improved when the markers are imposed. Figure 2 shows that it was possible to reduce over-segmentation and consequently, create larger regions and better marked contours in a color photograph. Figure 3 is an example of using the algorithm published by Shiji and Hamada (1999) on a photograph of CFU. Better segmentation was obtained using this new method (Figures 4 and 5). This was verified by statistical analysis (Figure 6) comparing final counts of CFU obtained by the manual method with those obtained using the method proposed herein (correlation coefficient $R^2 = 0.9621$, coefficient of efficiency $E = 0.9574$, average relative variance $AVR = 0.04251$).

4. Conclusions

A well-known algorithm was improved by automatic selection of the parameters of the histogram. This novel algorithm achieved satisfactory results, providing better segmentation. Results indicate that it was more versatile in processing different images, reducing over-segmentation, whereas other algorithms only fit images with similar characteristics. It was demonstrated that this method is useful for the segmentation of images with various characteristics, such as photographs of CFU in Petri dishes. Our results could be improved by providing images with superior sharpness (lighting control, image focusing etc.), and by making adjustments to the sensitivity of the algorithm, especially close to the border of the image(s).

Acknowledgments

The authors would like to thank Ulises M. Álvarez for advice, Ma. Dolores García for the preparation of the *Lactococcus lactis* samples, Sofía Arvizu, Beatríz Álvarez, and Julián Esquivel for the preparation of the *E. coli* and *L. monocytogenes* samples, and Juan Luis López and Edgar Ulloa for support in the implementation of the algorithms published by Shiji and Hamada.

References

Corkidi, G., Trejo, M., and Nieto-Sotelo, J., Automated Colony Counting Using Image-Processing Techniques, *Rapid Analytical Microbiology: The Chemistry and Physics of Microbial Identification*, Edited by W. P. Olson, Bethesda, MD and Godalming Surrey, UK: Parenteral Drug Association and Davis Horwood International Publishing, Ltd., (2003), p. 263-282.

Lim, D., *Microbiology*, McGraw-Hill, (1998).

Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker J. B., *Biología de los Microorganismos*. 8th edition, Prentice Hall, (1998).

Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1995, Bienes y Servicios. Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

Serra, J., *Image Analysis and mathematical morphology*, Academic Press, (1988), Vol. 2.

Shiji, A., and Hamada, N., Color image segmentation method using watershed algorithm and contour information, (1999), *IEEE Int. Conf. on Image Processing*, Vol. 4: 305-309.

Vanzella, W., and Torre, V., A versatile segmentation procedure, (2006), *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics, Part B: Cybernetics*, Vol. 36, no. 2: 366-378.

Wang, W., Colony delineation on image classification, (2006), 18th International Conference on Pattern Recognition (ICPR '06), Vol. 3: 705-708.

Wu, H. S., and Gil, J., Barba, J., Optimal segmentation of cell images, (1998), Vision Images and Signal Processing, IEEE Proceedings, Vol. 145, no. 1: 50-56.

Ying-Tung Hsiao, Cheng-Long Chuang, Joe-Air Jiang, and Cheng-Chih Chien. A contour based image segmentation algorithm using morphological edge detection, (2005), IEEE International Conference on Man and Cybernetics, Vol.3: 2962-2967, ISBN: 0-7803-9298-1.

Zhang, L., Wang, X. Penwarden N., Ji, Q.. An image segmentation framework based on patch segmentation fusion, (2006), Proceedings of the 18th International Conference on Pattern Recognition (ICPR '06), Vol. 3: 705-708.

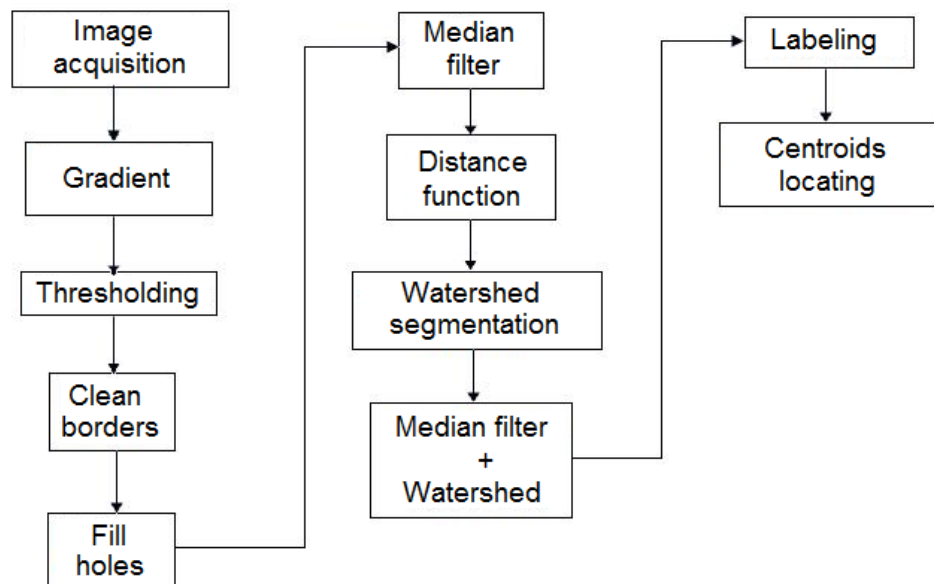


Figure 1. Flow diagram of the implemented algorithm.

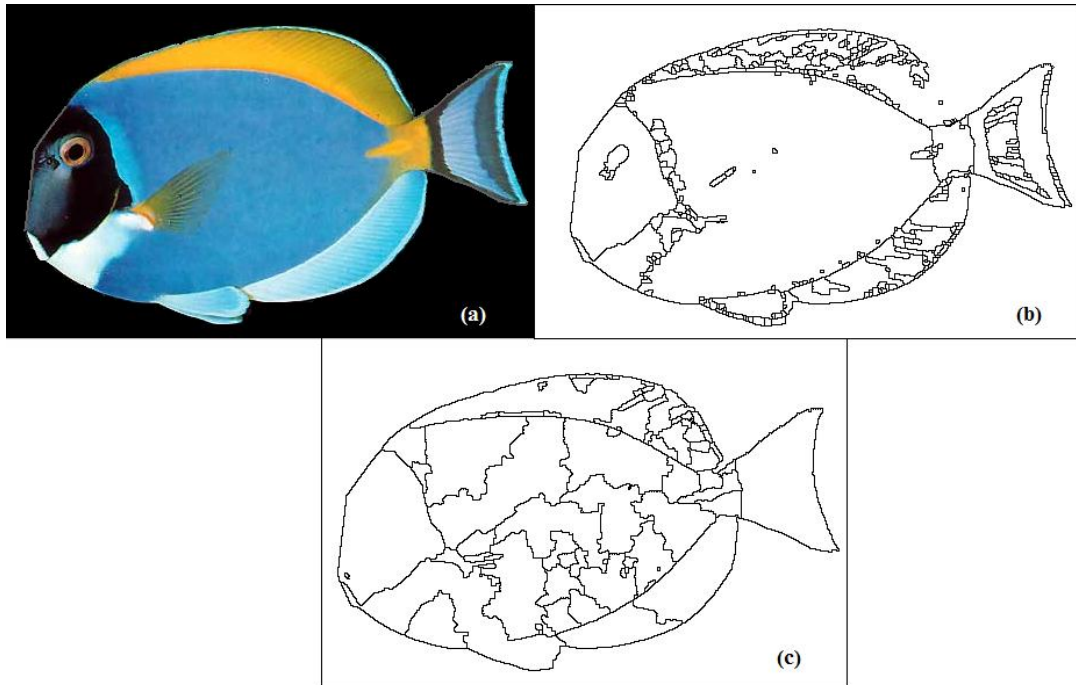


Figure 2. (a) Original image, (b) segmentation by the Shiji and Hamada (1999) method, and (c) segmentation obtained by the new method.

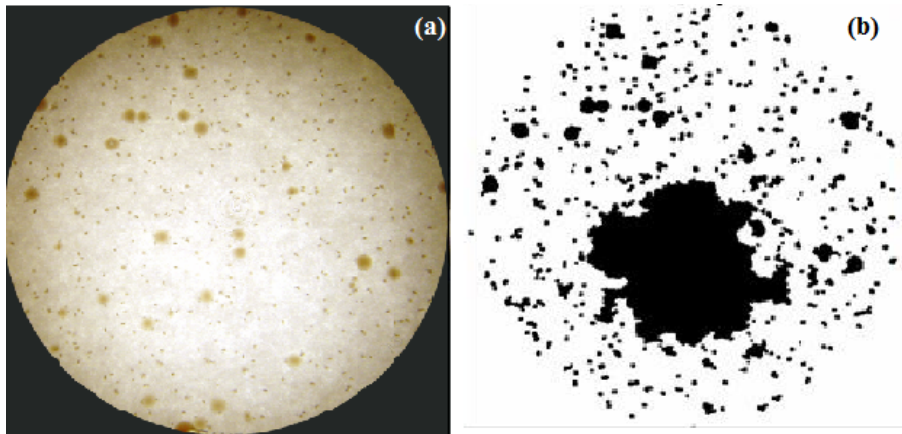


Figure 3. Image segmentation applied to CFU of *E. Coli* O157: H7 using the method published by Shiji and Hamada (1999). (a) Original image, (b) segmented image.

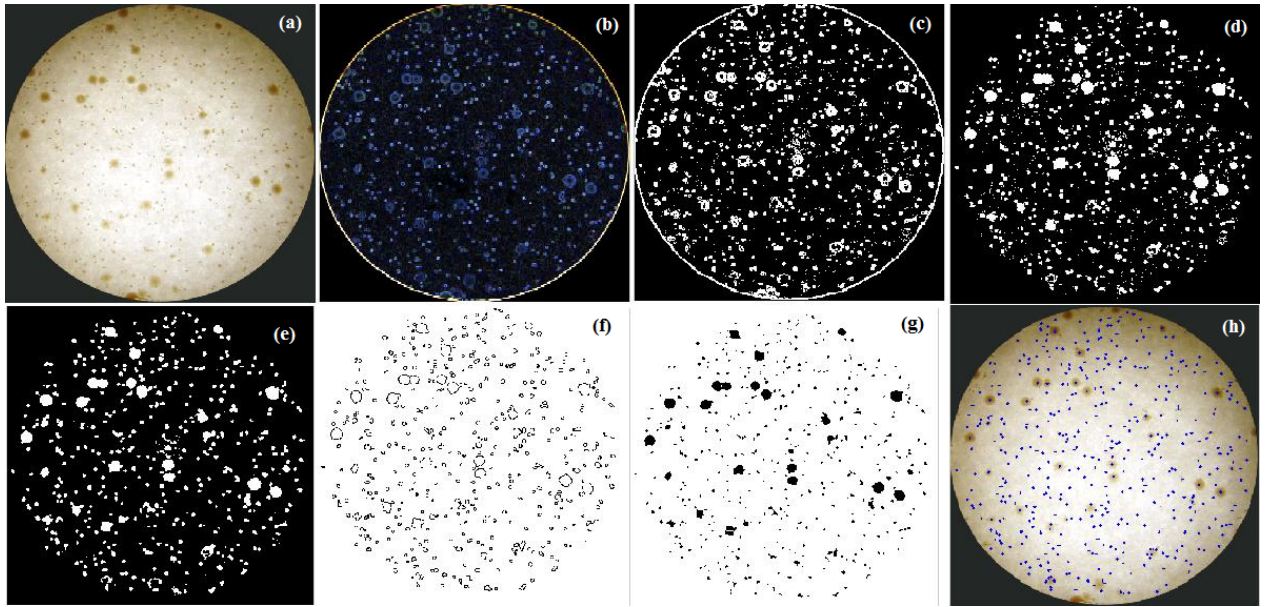


Figure 4. Images of CFU of *E. coli* O157: H7, obtained by using the improved algorithm. (a) Original image, (b) gradient, (c) threshold, (d) clean borders, (e) fill holes and median filter, (f) watershed segmentation, (g) median filter plus watershed, and (h) location of centroids.

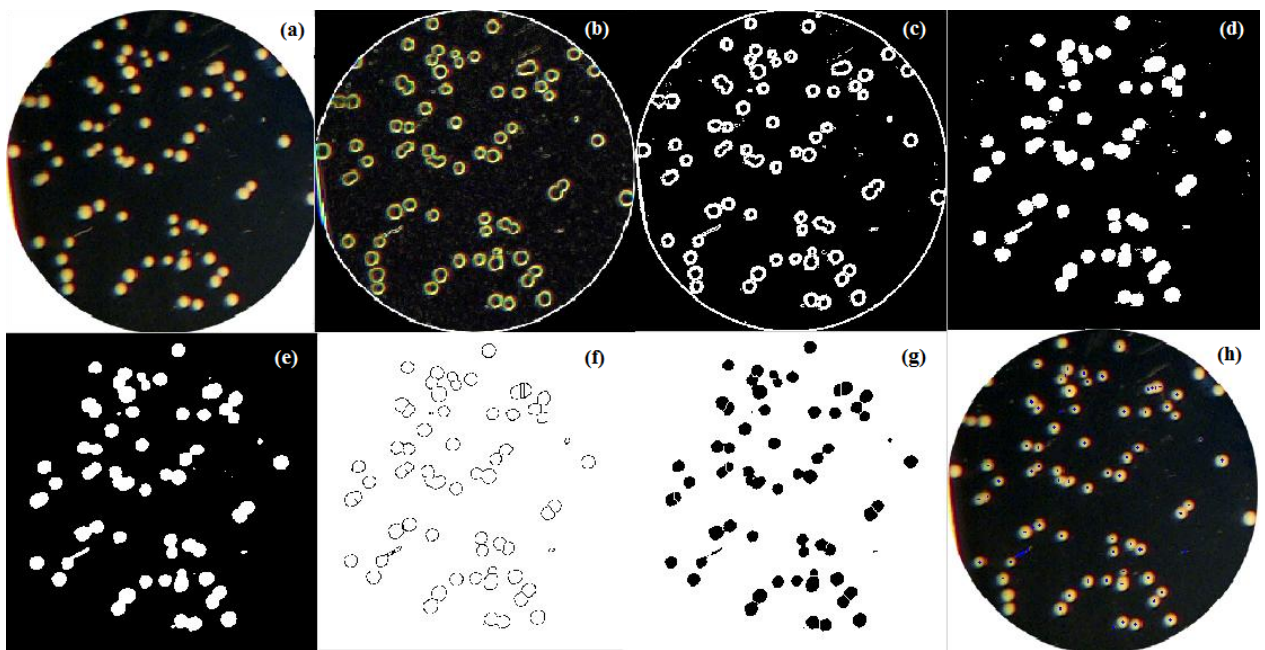


Figure 5. Images of CFU of *Lactococcus lactis*, obtained using the improved algorithm. (a) Original image, (b) gradient, (c) threshold, (d) clean borders, (e) fill holes and median filter, (f) watershed segmentation, (g) median filter plus Watershed, and (h) location of centroids.

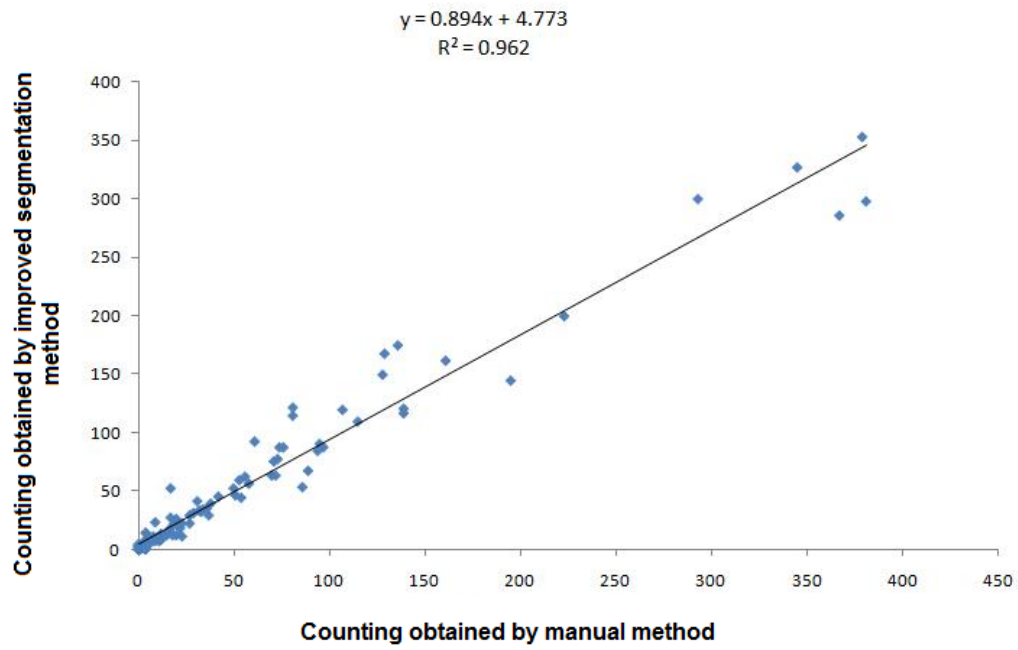


Figure 6. Correlation coefficient between the counts obtained by the improved method of segmentation and the manual method.