

DISCRETIZACIÓN DE BACTERIAS POR MEDIO DE VISIÓN ARTIFICIAL

Resumen- Este documento presenta una solución a una problemática de salud pública, ya que es un tema desconocido para muchos se presenta de forma general la condición de la problemática en Colombia y las soluciones y restricciones en otros países. El uso de antibióticos para control de enfermedades en el área agrícola es muy común, con la diferencia que existe la tendencia de usar antibióticos veterinarios para control de bacterias en frutos como el tomate. Por falta de regulación y rigurosidad los alimentos contaminados están afectando la población ya que tienen libre distribución sin importar los bactericidas que se les apliquen.

I. INTRODUCCIÓN

En una de las despensas más grandes de Colombia como lo es el altiplano cundi-boyacense se ha fomentado por parte de asesores con poca ética, entre ellos ingenieros agrícolas, técnicos agropecuarios, etc; el uso de productos veterinarios como reemplazo de ciertos agroquímicos. El bajo costo de los antibióticos de uso pecuario y el alto costo de insumos agrícolas son una de las causas de que el campesino productor resuelva utilizar antibióticos a su libre albedrío.

El rastreo de la presencia de antibióticos se puede realizar mediante el cultivo de bacterias sobre la muestra de material contaminado, para esto se ha escogido una de las especies residentes dentro de la mucosa intestinal con las cuales el ser humano realiza mutualismo, creando una dependencia con estas, debido a que hay 3 filos bacterianos predominantes en la microbiota intestinal del ser humano se escogerán entre estos las bacterias sobre las cuales se realizará el análisis de perjuicio antimicrobiano de los productos aplicados sobre el cultivo de tomate.

Hay muchas maneras de determinar los cambios en las poblaciones bacterianas debido a los antibióticos, en placas de agar son las más comunes, y el conteo por unidades formadoras de colonias es una de las técnicas más utilizadas, otra manera muy utilizada es el conteo utilizando microscopía de fluorescencia donde el conteo es realizado por el contraste que generan tintes y longitudes de onda específicas donde según el tipo de bacteria proporciona información sobre la población estudiada. La idea principal del proyecto es crear un método de conteo de bacterias que no utilice aproximados, llegando a poder contar individuo por individuo, realizando un barrido por todo el cultivo para así tener mediciones más

precisas en cuanto a los cambios de la población bacteriana; la solución del problema se basa en crear una herramienta que emplee la visión artificial para reconocer y discretizar la cantidad de bacterias presentes en una muestra.

II. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

En la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín no existen sistemas contadores de microorganismos que involucren automatización, aprovechando las herramientas y asesorías que nos brinda la asignatura de visión artificial se ha propuesto resolver el problema de conteo de microorganismo por unidad, para poder determinar la cantidad de bacterias sobre una muestra y relacionar dicho conteo con los procesos que se han utilizado regularmente.

Ya que los problemas que se pueden solucionar bajo la visión artificial son los que simulan procesos que una persona puede resolver con la observación se pretende mejorar y tecnificar el conteo, que le requiere a un laboratorista un largo tiempo, y poder tomar conclusiones con datos más fieles en un menor tiempo.

En el conteo de microorganismos hay varios inconvenientes, entre ellos están: la cantidad de microorganismos, la distribución, el solapamiento, el movimiento relativo entre ellos, entre otros; todo esto es a lo que se debe enfrentar un sistema de conteo automatizado, donde los parámetros de tamaño, forma, vida media, transparencia, etc, cambian de una especie a otra radicalmente.

III. ESTADO DEL ARTE

El problema de la cuantificación de microorganismos ha sido estudiado en varios países, uno de ellos México, como se indica en el artículo Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado Masivo” [4], donde se especifica y se hace un estudio de este problema enfocado a la ecología microbiana y microbiología clínica con una técnica de conteo que es rápida y económica que las demás como el Método de Goteo en Placa. Consiste en poner

gotas de 20 μl de diluciones seriadas con las bacterias en placas de medio. Estas crecen para luego proceder al conteo de las colonias haciendo los cálculos requeridos para ello, esta técnica tiene un buen límite de de detección, sin embargo el proceso suele ser largo, y a veces engorroso dado que para más efectividad se toman dos placas o más dependiendo de la población. El proceso de conteo consiste en hallar por medio de una regla de tres el número de colonias en un ml, para luego usar el factor de dilución en la cual se contaron las colonias para hallar el número de bacterias (UFC/ml). Y aunque el método es relativamente eficiente, se recalca un conteo más minucioso logra mejores resultados.

Para el año 2016, la revista electrónica de Computación, Informática, Biomédica y Electrónica (ReCIBE), escriben un artículo, “Simulation and Counting of Colony-Forming Units”[2], donde se plantea el diseño y la implementación de una herramienta para el conteo de colonias bacterianas mediante el uso de un sistema de visión por computadora. El funcionamiento de esta herramienta es sencillo. Se comienza con la adquisición y digitalización de la imagen, posteriormente se pasa al pre-procesamiento de la imagen, que consta de: recorte, filtrado, mejoramiento y segmentación de la imagen. Por último, se realiza el conteo. En esta herramienta, para el conteo se usa el método de Euler, donde, la imagen segmentada, se invierte y etiqueta. En el proceso de inversión, las colonias que estaban en negro se transforman a blanco. Luego en la fase de etiquetado, se asignan etiquetas a todos los objetos encontrados en la imagen inversa. Así, el número de colonias será igual al número de etiquetas obtenidas.

En otro caso de investigación, se describe el desarrollo y resultados de un biosensor basado en bioluminiscencia para el conteo de bacterias en alimentos [1].

El procedimiento es que se extrae adenosina 50-trifosfato (ATP) de las bacterias y luego reacciona con luciferina-luciferasa generando bioluminiscencia. Con un medidor de luz se capta la señal eléctrica que transmite la bioluminiscencia.

En condiciones experimentales óptimas, el biosensor mostró una respuesta lineal a las bacterias estándar en un rango de concentración de 103 a 108 unidades formadoras de colonias (CFU) por mililitro con un coeficiente de correlación de 0,925 ($n = 22$) en 5 min.

La principal característica de este método es que tiene un bajo costo, fácil operación y rápida respuesta.

En [6] desarrollaron un software que los autores llamaron “NICE” (NIST’s Integrated Colony Enumerator), en el cual el usuario puede importar una imagen de la placa de agar en la cual quiere contar las UFC, posterior a esto la imagen es convertida a escala de grises usando la iluminación de la imagen y se procede a crear una cuadrícula dependiendo de

las columnas y filas que el usuario ingrese (por ejemplo, 8x3 en una placa que tiene 24 regiones); el software contará las UFC de cada región creada de la siguiente forma: primero aplica un filtro de gauss para eliminar el posible ruido de la imagen, posteriormente usa un “Thresholding” para separar las colonias del fondo (eliminar la placa), ese “Thresholding” se selecciona automáticamente basándose en el histograma de la imagen o también puede ser ingresado manualmente por el usuario, se procede a utilizar una “extended minima function” la cual va a permitir que los centros de cada colonia sean visibles y no se solapen, estos serán visibles como como puntos negros, finalmente se cuentan estos puntos y estas serán las UFC de la región seleccionada, comparando los resultados del software y el conteo manual se encontró un error del 3% lo cual hace el método viable.

IV. DESARROLLO DE LA SOLUCIÓN

Para el desarrollo de la solución se obtuvieron un conjunto de 20 muestras de la bacteria E. coli obtenidas por medio del laboratorio de bioprocesos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, cada una de estas imágenes tiene un tamaño de 128 x 120 píxeles:



Fig. 1



Fig. 2

Preprocesamiento: En la imagen se pueden encontrar algunas regiones borrosas, esto representa un problema para el conteo, ya que no se logra visualizar las separaciones entre las bacterias.

Para corregir esta complicación, se aplica un filtro gausseano; ésto le dará un toque de nitidez a la imagen.

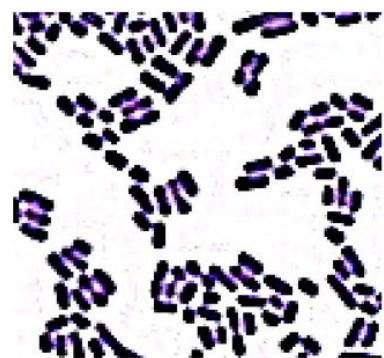


Fig. 3

Esta imagen ahora sin partes borrosas, proveerá más información sobre el número de bacterias que posee muestra.

Análisis de canales de color: Inicialmente se analizan los canales RGB y LAB para encontrar un histograma que ayude a determinar un umbral para facilitar la segmentación, ya que en esta imagen se ven claramente colores predominantes.

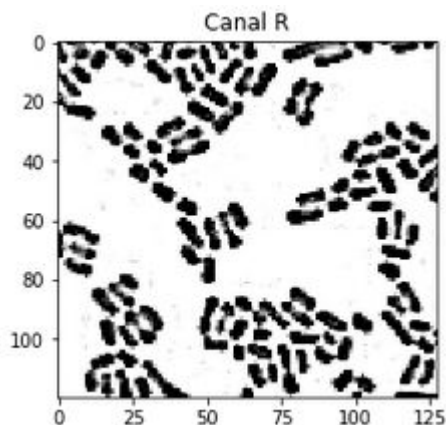


Fig. 4

El canal R del RGB, en éste caso es el mejor, ya que se puede observar que no hay tantos puntos gruesos que pueden ser un grupo de bacterias tan cercanas que no se distinguen bien.

Segmentación: Se decide trabajar con una segmentación por umbral ya que la imagen solo tiene dos picos de colores, en el siguiente paso se determina el umbral adecuado para lograr una mínima pérdida de información.



Fig. 5

El umbral adecuado para el análisis fue 60, pero esto no es suficiente para la segmentación, ya que pueden haber conjuntos pequeños de píxeles que no deberían tomarse en el conteo. Ésto se verifica con una extracción de características de la imagen, teniendo en cuenta el Momento 00, perímetro y áreas ya que en nuestro caso estas características tienen significancia para determinar que es una bacteria y que es ruido.

En efecto se encuentran áreas de 1 píxel, confirmando la suposición anterior, para corregir esta condición se puede

realizar un relleno de regiones con las áreas que se consideran ruido, para identificar las bacterias.

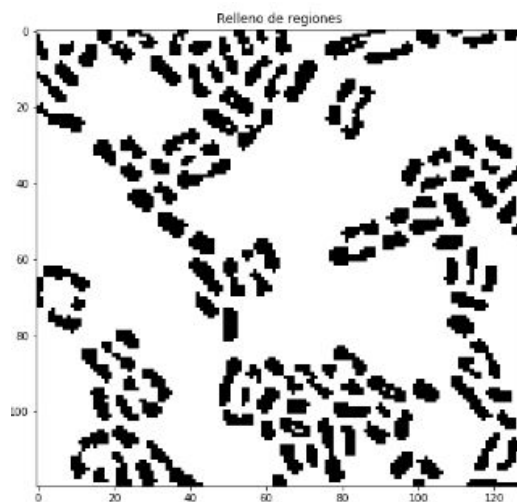


Fig. 6

El área máxima para ruido fue 6 píxeles, este argumento es esencial para el algoritmo que relleno de regiones. Finalmente se logra la eliminación del ruido para posteriormente contar las bacterias.

Conteo: se aplica el conteo a la imagen en general, utilizando un etiquetado de componentes conexas, ya que en los pasos anteriores se confirmó que todos los segmentos en la imagen son bacterias.

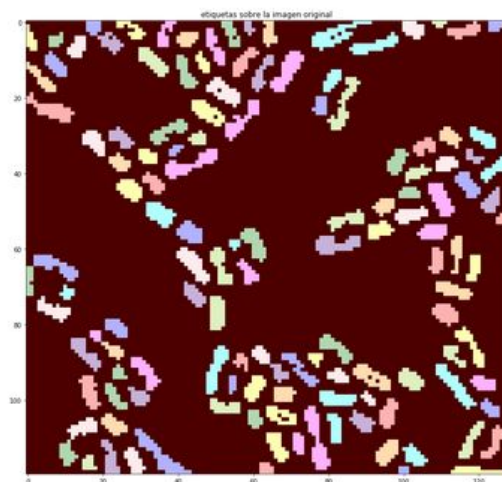


Fig. 7

Para la imagen anterior se tiene un aproximado de 129 bacterias (contado a ojo), como el resultado obtenido por el algoritmo fue 132 se tiene un error del 2%.

Para confirmar el correcto funcionamiento del algoritmo, se realiza una comparación entre los resultados obtenidos mediante un conteo manual y los resultados obtenidos utilizando el algoritmo, en la siguiente tabla se muestran los

resultados.

	Algoritmo	Reales	Error
0	77	70	10.000000
1	86	85	1.176471
2	118	107	10.280374
3	98	90	8.888889
4	98	97	1.030928
5	89	91	2.197802
6	132	129	2.325581
7	102	85	20.000000
8	125	125	0.000000
9	121	118	2.542373
10	93	94	1.063830
11	109	115	5.217391
12	119	115	3.478261
13	94	100	6.000000
14	91	91	0.000000
15	117	113	3.539823
16	121	127	4.724409
17	114	110	3.636364
18	94	102	7.843137
19	106	110	3.636364

Conclusiones:

- Se obtiene para esta muestra un $ECM = 6.26$
- El error se debe en parte al fallo sistemático, esto no asegura un 100% de confiabilidad del resultado real.
- El conteo se ve afectado por la división celular, ya que no se sabe si contar una o dos bacterias.
- No se puede diferenciar cuando una bacteria está muerta ya que ésta no pierde el tinte instantáneamente.

- Algunas bacterias parecen estar estiradas, esto se debe al movimiento, un mejor cálculo se puede hacer mediante un video o métodos de tracking.
- El diafragma afecta el conteo, ya que corta algunas bacterias.
- A diferencia de otros métodos, este no es destructivo.

https://github.com/cdbolivarz/VA_G6_PropAdquis/blob/master/Desarrollo_solucion.ipynb

V. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Luo *et al.*, "Disposable bioluminescence-based biosensor for detection of bacterial count in food," *Anal. Biochem.*, vol. 394, no. 1, pp. 1–6, 2009.
- [2] E. P. Sánchez, "Simulación y Conteo de Unidades Formadoras de Colonias Simulation and Counting of Colony-Forming Units," *ReCIBE*, vol. 28, no. 1, 2016.
- [3] A. Corral Lugo, Y. E. Morales García, L. A. Pazos Rojas, R. D. Martínez Contreras, and J. Muñoz Rojas, "Quantification of cultivable bacteria by the 'Massive Stamping Drop Plate' method," *Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. XIV, no. 2, pp. 147–156, 2012.
- [4] A. Camacho, M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano, and O. Velázquez, "Técnicas básicas de conteo en placa," *Fac. química la UNAM*, pp. 1–10, 2009.
- [5] S. D. Brugger, C. Baumberger, M. Jost, W. Jenni, U. Brugger, and K. Mühlemann, "Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates," *PLoS One*, vol. 7, no. 3, pp. 1–6, 2012.
- [6] M. L. Clarke, R. L. Burton, A. N. Hill, M. Litorja, M. H. Nahm, and J. Hwang, "Low-Cost , High-Throughput , Automated Counting of Bacterial Colonies," no. 10, 2010.

VI. ANEXOS

La implementación de las herramientas dadas por la visión artificial son de gran ayuda para la extracción de características específicas dentro de una imagen, lo que ayuda en gran parte a solucionar problemáticas que se presentan cotidianamente.