

Conteo de bacterias a nivel macroscópico utilizando Visión Artificial

Sebastián Londoño Cuello¹, Geraldine Duque Salazar¹, Daniela Ortiz Bedoya¹,
Eliana María López¹ y Santiago Restrepo Álvarez¹

¹ Departamento de ciencias de la computación y la decisión, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín,
Medellín, Colombia

Fecha: 30/06/2019

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estimar la población bacteriana en un cultivo constituye un proceso primordial en áreas bacteriológicas de alimentos, salud, aire, suelo, entre otras. Realizar este conteo manualmente consume grandes cantidades de tiempo y resultados variables. Además, se debe realizar sobre varias muestras para mejorar la confiabilidad del resultado [1].

El método de unidades formadoras de colonia es el más comúnmente empleado para dicho fin, debido especialmente a su facilidad y aplicabilidad. El conteo de colonias en placas de agar suele efectuarse de manera manual, lo cual claramente conlleva altas probabilidades de error. Quien realiza la identificación puede cometer errores de conteo debidos a todo tipo de causas: cansancio visual, falta de tiempo, doble cuantificación, etc. Se desea automatizar esta determinación del número de unidades formadoras de colonia, con el fin de reducir la incertidumbre y obtener mejor calidad en los datos de los cuales se

parte para desarrollar diferentes investigaciones científicas.

DESCRIPCIÓN GENERAL

Las bacterias a utilizar para la estandarización del conteo son un estafilococo grampositivo (*Staphylococcus aureus*) y la enterobacteria *Escherichia coli*, que es gramnegativa. A partir de colonias morfológicamente consistentes de cada especie (previamente obtenidas en el laboratorio de Biología Funcional de la facultad de Biociencias), se tienen suspensiones bacterianas de 5 mL en caldo nutritivo, que se incuban durante 24 horas a 37°C con agitación. Posteriormente se llevan a siembra en varias placas de Petri con agar nutritivo, siguiendo un protocolo de disolución [2].

Los platos se incuban estáticamente durante 12 o 24 horas, tras de lo cual se puede proceder al conteo o a la toma de las imágenes.

ESTADO DEL ARTE

En la actualidad, el conteo de UFC/mL se realiza en los laboratorios de manera predominantemente manual, conllevando alto consumo de tiempo. La manera tradicional de enumeración incluye contadores mecánicos (*click-counter*) y marcación de la placa con resaltador.

En el área se han desarrollado gran variedad de proyectos con diferentes variables, desde la escogencia de la bacteria a estudiar, el enfoque visual (microscópico o macroscópico), los algoritmos de predicción escogidos (ajuste del modelo), etc.

Algunos investigadores han adoptado sistemas de conteo de imágenes avanzados, pero estos dispositivos son muy costosos para pequeños laboratorios y suelen requerir el uso de cámaras digitales [3]. De allí surge la idea de poder realizar este conteo tomando imágenes con un smartphone y obtener el conteo a través de una aplicación móvil. Se ha encontrado que, al optimizar el proceso de extracción de canales, aplicación de filtros sobre la imagen, separación del fondo y aislamiento de las partículas se puede obtener un error de medición del 5% [4]. Y además, al comparar los resultados del conteo arrojado por una aplicación móvil contra colonias generadas mediante simulación, se obtiene una precisión del 98%.

A pesar de todos estos avances, aún hay trabajo por realizar, ya que el proceso de conteo continúa restringido al tipo de bacteria estudiada, las condiciones de

adquisición de la imagen y de su preprocesamiento.

El conteo de colonias en un cultivo por medio de la visión por computador actualmente va enfocado al desarrollo de algoritmos integrados en aplicaciones de celulares y dispositivos móviles. Por ejemplo, en 2017 Sanchez-Fermat, Erika. et. al. propusieron una aplicación de dispositivo android la cual permite contar cultivos microbianos mediante cinco principales pasos: La imagen tomada es cargada en la aplicación, luego es cortada, seguido a esto se convierte a escala de grises, se mejora el contraste y finalmente se segmenta para el conteo. [5], otras técnicas similares se pueden ver en [6] y [7]

Una de las técnicas para el conteo fue propuesta por Gabriel Marcelino Alves y Paulo Estevao Cruvinel en 2016. [8] El método implementado usa técnicas de procesamiento de imágenes digitales tales como la **transformada de Hough** para la detección de colonias de bacterias de forma circular junto a una Cámara-Sensor CCD (dispositivo semiconductor que actúa como un transductor entre la luz de incidencia y la carga eléctrica) para el proceso de la adquisición de las imágenes.

El montaje para la adquisición de las imágenes consiste en un sistema de iluminación frontal (la caja de Petri con el cultivo es situada debajo de una fuente de luz y la cámara CCD) el cual cuenta con 4 lámparas fluorescentes de 20 Watts conectadas a un balasto eléctrico que evita el parpadeo de las lámparas las cuales el sensor puede capturar como ruido, dichas

lámparas están contenidas en una caja de madera totalmente sellada, esto con el fin de obtener las imágenes con el menor ruido posible para su posterior análisis. El método consta entonces de 4 pasos: la adquisición de la imagen mediante el montaje previamente descrito, la aplicación de un algoritmo de segmentación de la imagen, la aplicación de la transformada de hough y la detección y marcación de las colonias de bacterias.

Machine Vision Based Bacteria Colony Counter

Para familiarizar la máquina con imágenes reales de bacterias, crearon una imagen sintética donde se solapan círculos, elipses, para que reconociera estas formas sin necesidad de un manual.

Estandarizaron la toma de foto desde distancias, iluminación calidad de la imagen.

Luego de tener la foto deseada se realizan filtraciones a la imagen para eliminar ruido y suavizar imágenes; hasta que la imagen tenga dos pixeles 0 y 1, hacen una preparación de la imagen para identificar las formas morfológicas de la foto desde el área, perímetro u orientación, esta clasificación se hace siempre para cada imagen, luego la imagen es leída por el software para luego hacer el conteo; es decir realizan un pre procesamiento y clasificación de la imagen para estandarizar todas las fotos y poder ser leída y analizada por el programa.[9]

Deep learning approach to bacterial colony classification

Este proyecto buscaba clasificar géneros y especies bacterianas a partir del análisis de la textura de las colonias. Para evaluar este enfoque se empleó una base de datos DIBaS de imágenes de diferentes bacterias, la cual contiene más de 600 imágenes de más de 30 géneros y especies. Utilizaron herramientas como redes convolucionales para obtener descripciones de la imagen ya que contiene características aprendidas automáticamente basadas en muchas imágenes de entreno; estas descripciones de imagen luego se codifican y se clasifican en las máquinas de soporte.[10]

PROPUESTA DE SOLUCIÓN

Se implementarán técnicas de visión por computador(visión artificial) para dicha solución. Inicialmente se elaborará un montaje mecánico con el fin de estandarizar la altura y posición desde la cual se tomarán las fotografías. Además se controlará la iluminación y el fondo para maximizar el contraste y disminuir los efectos reflectivos de la tapa de vidrio del plato de Petri.

Se procurará obtener la mayor cantidad posible de imágenes (dentro de los límites de tiempo de ensayo y uso de material de laboratorio) para obtener un mejor ajuste en cuanto a la convergencia del modelo computacional que permitirá automatizar el conteo.

Pretende lograrse una generalización(modelo) que distinga entre ambas bacterias y brinde información sobre el porcentaje de colonias en la placa. Una vez obtenida la automatización del conteo se hará una comparación con métodos de conteo manual (cámara de Neubauer), y se tomarán las medidas de dispersión pertinentes entre ambas para determinar la variación entre los dos métodos de conteo.

Finalmente se investigará la posibilidad de determinar el tiempo de crecimiento de las bacterias a partir de la magnitud de las colonias. Además se pretende extrapolar la automatización a otras especies bacterianas o fúngicas.

REFERENCIAS

- [1] Errors, S. T. (2016). Chapter 7 - Errors associated with colony count procedures. Statistical Aspects of the Microbiological Examination of Foods, 3rd (Third Edition). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803973-1/00007-1>
- [2] Maier, R.M., Pepper, I.L., and Gerba, C.P. (2000) Section 1: Basic Protocols. *Environmental Microbiology*. Academic Press, San Diego.
- [3] J. Minoi, T. Chiang, T. Lim, Z. Yusoff, A. Karim and A. Zulharnain, "Mobile vision-based automatic counting of bacteria colonies", 2016 *International Conference on Information and Communication Technology (ICICTM)*, 2016. Available: 10.1109/icictm.2016.7890774 [Accessed 26 June 2019]. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.413.3227&rep=rep1&type=pdf>
- [4] M. Goyal, "Machine Vision Based Bacteria Colony Counter", *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, vol. 2, 2012. [Accessed 26 June 2019]. <https://sci-hub.tw/https://ieeexplore.ieee.org/document/7890774>
- [5] Sanchez-Fermat, Erika., Cruz-Lejía, Roberto., Torres-Hernández, Mayra., Herrera-Mayorga, Elsa. "Mobile Application for automatic counting of bacterial colonies". *Trends and Applications in Software Engineering*. 2017.
- [6] Marquard D, Austerjost J, Düsterloh S, Schneider-Barthold C, Beutel S, Scheper T and Lindner P. "A Novel Image Analyzing Algorithm for Colony Plate Counting with Handheld Devices". *Advances in Biotechnology and Microbiology*. 2018.
- [7] Austerjosh, Jonas., Marquard, Daniel, Raddatz, Lukas., Geier Dominik., Becker, Thomas., Scheper, Thomas., Lindner, Patrick., Beutel, Sascha. "A smart device application for the automated determination of *E. coli* colonies on agar plates". *Engineering in Life Sciences*. 2017.
- [8] Marcelino, Alves, Gabriel. Estevao Cruvinel, Paulo. "Customized Computer Vision and Sensor System for colony recognition and live bacteria counting in agriculture". *Sensor and transducers*. 2016.
- [9] E. M. Goyal, «Machine Vision Based Bacteria Colony Counter,» *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, vol. Volume 2, April 2012.

[10] Zieliński B, Plichta A, Misztal K, Spurek P, Brzywczy-Włoch M, Ochońska D » *Deep learning approach to bacterial colony classification*, September 14, 2014.