



Facultad de Ingeniería
División de Estudios de Postgrado
Maestría en Computación

AUTOMATIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE CUANTIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS EN IMÁGENES DIGITALES
DE MICROSCOPIA

Tesis de Maestría presentada a la Universidad de los Andes por

Félida Andreina Roa Roa

Como requisito parcial para optar al grado de
Magíster Scientae en Ciencias de la Computación

Realizado con la tutoría del profesor

Antonio Bravo

Mayo, 2008

Resumen

El estudio de técnicas automatizadas para la caracterización de bacterias y colonias de bacterias en imágenes de microscopía electrónica con muestras bacterianas, condujo al diseño e implantación de un conjunto de algoritmos basados en técnicas de procesamiento de imágenes. Las técnicas utilizadas fueron la homogeneización del fondo, segmentación con la transformada de Watershed y reconocimiento de estructuras con la comparación de plantillas (template matching), con la finalidad de identificar las bacterias y, de esta manera, determinar la cantidad, forma y tamaño promedio de las mismas, así como también cuantificar las colonias de bacterias y determinar su tamaño promedio. La homogeneización del fondo de la imagen logró equilibrar las variaciones en los tonos correspondientes al fondo, mejorando el procesamiento realizado por la transformada Watershed para la separación de fondo y objetos (bacterias) y finalmente poder ser identificados por la comparación de plantillas (template matching) mediante el uso de plantillas construidas a partir de la información existente en las imágenes en estudio. Con la automatización del proceso de caracterización de bacterias y colonias de bacterias se logra obtener los resultados de forma rápida, disminuir errores ocasionados por la falta de exactitud en los cálculos y eliminar la subjetividad presente en los resultados finales. El funcionamiento de los algoritmos fue probado al procesar imágenes de diferentes características correspondientes a muestras con distintos organismos. Los resultados obtenidos se compararon con los valores encontrados para las imágenes durante el proceso manual de caracterización de bacterias realizado por un biólogo y la revisión documental. Los resultados obtenidos se encuentran dentro de los rangos sugeridos en los estudios experimentales de los microorganismos contemplados por la literatura.

Palabras Claves: microorganismo, transformada Watershed, template matching, caracterización de bacterias, cuantificación de bacterias, visión artificial.

Índice

Resumen

1	Introducción	1
1.1	Introducción al Problema	1
1.2	Descripción del Trabajo	2
1.3	Objetivos	3
1.3.1	Objetivo general	3
1.3.2	Objetivos específicos	3
1.4	Contribuciones	4
2	Microorganismos	5
2.1	Introducción	5
2.2	Definición	6
2.3	Bacterias	6
2.3.1	Definición	6
2.3.2	Morfología	8
2.3.3	Métodos de cuantificación	11
3	Procesamiento de Imágenes	13
3.1	Introducción	13
3.2	Imagen digital	13
3.3	Almacenamiento y exhibición	14
3.3.1	Formato	14
3.3.2	Resolución	15
3.4	Muestreo y cuantificación	15
3.5	Técnicas básicas de procesamiento	17
3.5.1	Técnicas de procesamiento basadas en puntos de la imagen	17
3.5.2	Técnicas de procesamiento basadas en una región de la imagen	19
3.5.3	Segmentación de imágenes	24
3.5.4	Transformada <i>Watershed</i>	25
3.5.5	Comparación con plantillas (<i>template matching</i>)	26
4	Metodología para la Caracterización de Bacterias	29
4.1	Introducción	29
4.2	Antecedentes	30
4.3	Entorno de software	31

4.3.1	Identificación bacteriana	31
4.3.2	ImageJ	34
4.4	Identificación de bacterias	38
4.4.1	Cuantificación	38
4.4.2	Determinación de forma y tamaño	53
4.5	Identificación de colonias de bacterias	55
4.5.1	Cuantificación	55
4.5.2	Determinación del tamaño de colonias de bacterias	57
5	Resultados y Discusión	59
5.1	Introducción	59
5.2	Identificación de bacterias individuales	59
5.2.1	Cuantificación	60
5.2.2	Determinación de forma y tamaño	79
5.3	Identificación de colonias de bacterias	82
5.3.1	Cuantificación	82
5.3.2	Determinación del tamaño de las colonias de bacterias	85
5.4	Validación	86
5.4.1	Cuantificación	86
5.4.2	Tamaño	87
6	Conclusiones y Perspectivas	88
6.1	Conclusiones	88
6.2	Perspectivas	91
	Bibliografía	93

Índice de Figuras

2.1	Representación de bacterias individuales.	7
2.2	Representación de colonias de bacterias.	7
2.3	Bacterias de tipo cocos.	8
2.4	Clasificación de los cocos. (a) Diplococos, (b) Sarcinas, (c) Estreptococos, (d) Estafilococos.	9
2.5	Bacterias de tipo bacilo.	10
2.6	Morfología bacteriana espirilar.	10
3.1	Representación de píxeles en una imagen.	14
3.2	Zoom de una imagen.	15
3.3	Proceso de digitalización: Muestreo y cuantificación. Tomada de [1].	15
3.4	Arreglo bidimensional que representa los datos de una imagen.	16
3.5	Histograma para los niveles de intensidad de una imagen, con $L = 256$	18
3.6	Ejemplo de la binarización de una imagen (objetos claros y fondo oscuro).	19
3.7	Ejemplo de un algoritmo de suavizamiento utilizando el filtro promediador. Tomada de [2].	20
3.8	Máscaras del operador Sobel.	23
3.9	Máscaras del operador Laplaciano.	23
3.10	Imagen inicial con su respectiva representación como un superficie topográfica.	26
3.11	Proceso de segmentación de una imagen (Figura 3.10).	26
3.12	Imagen generada con los <i>Watersheds</i> encontrados.	27
3.13	Una imagen industrial y una plantilla de una tuerca hexagonal.	27
4.1	Diagrama general de clases para los filtros (clases de usuario en color rosado y clases de la API en color azul).	33
4.2	Descripción de las clases de los filtros (clases de usuario en color rosado y clases de la API en color azul).	34
4.3	Diagrama de clases de la caracterización de bacterias (clases de usuario en color rosado y clases de la API en color azul).	35
4.4	Diagrama de clases de la caracterización de colonias (clases de usuario en color rosado y clases de la API en color azul).	36
4.5	Diagrama de flujo de las fases de la cuantificación bacteriana.	39
4.6	Histograma de una imagen.	40
4.7	Sección izquierda del histograma de la Figura 4.6.	41
4.8	Sección derecha del histograma de la Figura 4.6.	41
4.9	Funciones correspondientes a los valores de la tabla 4.4	43

4.10	Máscaras del operador Prewitt.	45
4.11	Operador de gradiente consistente.	46
4.12	Radio del rolling ball del <i>subtract background</i>	46
4.13	Radio del <i>smooth</i>	47
4.14	Parámetros de la transformada <i>Watershed</i>	48
4.15	Imágenes generadas al aplicar <i>Watershed</i>	48
4.16	Primera submatriz tomada por el algoritmo del <i>template matching</i> para el recorrido.	51
4.17	Segunda submatriz tomada por el algoritmo del <i>template matching</i> para el recorrido.	52
4.18	Submatriz tomada luego del desplazamiento de una columna por el algoritmo del <i>template matching</i> para el recorrido.	52
4.19	Submatriz tomada luego del desplazamiento de n columnas por el algoritmo del <i>template matching</i> para el recorrido.	53
4.20	Diagrama de flujo de las fases de la cuantificación de colonias	55
4.21	Llamadas recursivas de la función de la cuantificación de colonias de bacterias.	57
5.1	Primera imagen original del experimento 1.	60
5.2	Segunda imagen original del experimento 1.	60
5.3	Imagen original del experimento 2.	61
5.4	Imagen original del experimento 3.	61
5.5	Imagen homogeneizada que corresponde a la imagen de la Figura 5.1.	62
5.6	Imagen homogeneizada que corresponde a la imagen de la Figura 5.2.	62
5.7	Imagen homogeneizada que corresponde a la imagen de la Figura 5.3.	63
5.8	Imagen homogeneizada que corresponde a la imagen de la Figura 5.4.	63
5.9	Imagen filtrada que corresponde a la imagen de la Figura 5.7.	64
5.10	Imagen filtrada de la Figura 5.8.	65
5.11	Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.5 por el <i>subtract background</i>	66
5.12	Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.6 por el <i>subtract background</i>	66
5.13	Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.11 por el <i>smooth</i>	67
5.14	Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.12 por el <i>smooth</i>	67
5.15	Imágenes resultantes de la aplicación del <i>Watershed</i> a la imagen de la Figura 5.13.	68
5.16	Imágenes resultantes de la aplicación del <i>Watershed</i> a la imagen de la Figura 5.14.	68
5.17	Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.9 por el <i>subtract background</i>	69
5.18	Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.17 por el <i>smooth</i>	69
5.19	Imágenes resultantes de la aplicación del <i>Watershed</i> a la imagen de la Figura 5.18.	70
5.20	Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.10 por el <i>subtract background</i>	71
5.21	Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.20 por el <i>smooth</i>	72

5.22	Imágenes resultantes de la aplicación del <i>Watershed</i> a la imagen de la Figura 5.21.	72
5.23	Imagen resultante de la fusión de las imágenes de la Figura 5.15.	73
5.24	Imagen resultante de la fusión de las imágenes de la Figura 5.16.	73
5.25	Imagen resultante del procedimiento adicional aplicado a la imagen de la Figura 5.23.	74
5.26	Imagen resultante del procedimiento adicional aplicado a la imagen de la Figura 5.24.	75
5.27	Imagen binaria e invertida de la Figura 5.25.	75
5.28	Imagen binaria e invertida de la Figura 5.26.	76
5.29	Imagen resultante de la fusión de las imágenes de la Figura 5.19.	76
5.30	Imagen resultante del procedimiento adicional aplicado a la imagen de la Figura 5.29.	77
5.31	Imagen binaria e invertida de la Figura 5.30.	77
5.32	Reconocimiento de bacterias en la imagen Invertida de la Figura 5.27.	78
5.33	Reconocimiento de bacterias en la imagen Invertida de la Figura 5.28.	79
5.34	Reconocimiento de bacterias en la imagen Invertida de la Figura 5.31.	80
5.35	Imágenes con reglas de medida en μ	81
5.36	Colonias identificadas por el algoritmo recursivo en la imagen 5.27.	83
5.37	Colonias identificadas por el algoritmo recursivo en la imagen 5.28.	84
5.38	Colonias depuradas en la imagen 5.36.	84
5.39	Colonias depuradas en la imagen 5.37.	85

Índice de Tablas

4.1	Vector con cantidad de píxeles por cada nivel de gris (0-255).	40
4.2	Porcentajes para la homogeneización correspondientes al histograma de la Figura 4.6.	42
4.3	Porcentajes promedio calculados.	43
4.4	Porcentajes promedio calculados y su valor correspondiente en la escala de grises.	43
4.5	Kernel utilizado por el filtro <i>smooth</i>	47
5.1	Tamaños en píxeles de las bacterias presentes en las imágenes de los experimentos 1 y 2.	80
5.2	Coordenadas (x, y) de los puntos capturados por la aplicación.	81
5.3	Distancia entre los puntos de la tabla 5.2.	81
5.4	Tamaños en μ de las bacterias presentes en las imágenes de los experimentos 1 y 2.	82
5.5	Cantidad de colonias presentes en las imágenes del experimento 1.	84
5.6	Tamaño en píxeles de las colonias presentes en imágenes del experimento 1.	85
5.7	Tamaños en μ de las colonias presentes en las imágenes del experimento 1.	85
5.8	Resultados obtenidos por el procesamiento automatizado y el manual.	86

Capítulo 1

Introducción

1.1 Introducción al Problema

Los estudios que se llevan a cabo en las áreas de investigación de la biología, generalmente están relacionados con los microorganismos. Tales estudios, tienen gran impacto económico en el desarrollo agropecuario, en la salud humana y en el medio ambiente. Los microorganismos son organismos microscópicos, compuestos en la mayoría de los casos por una sola célula y pueden existir en cualquier parte del medio ambiente. Entre las categorías de microorganismos se encuentran principalmente: bacterias, hongos, protozoos y virus [3, 4].

Algunas bacterias y hongos son utilizados para la producción de biofertilizantes, los cuales son compuestos ecológicos que aportan los nutrientes requeridos por las plantas y, además, permiten la sustitución total o parcial de fertilizantes sintéticos que causan contaminación de suelos, aguas y alimentos [3].

Los estudios con microorganismos requieren de un elevado número de observaciones visuales, lo que demanda una inversión grande de tiempo y esfuerzo por parte del investigador. Un ejemplo de ello es el estudio de bacterias y colonias de bacterias, en donde los procesos de caracterización son generalmente manuales y dependen directamente del criterio del investigador.

La caracterización manual es un proceso lento, produce resultados con errores significativos, esto debido a la cantidad de observaciones visuales necesarias para determinar

la presencia de bacterias en una muestra, y a la dificultad para identificar visualmente si se trata de una bacteria o de una colonia de bacterias [4].

En algunos Laboratorios de Investigación de muchas Universidades de Venezuela, incluyendo el Laboratorio de Biofertilizantes de la Universidad del Táchira (UNET), el proceso de caracterización bacteriana se realiza de forma completamente manual, debido a que no cuenta con aplicaciones bioinformáticas que faciliten la realización de este proceso.

1.2 Descripción del Trabajo

En el presente trabajo se propone estudiar la automatización del proceso de cacterización de bacterias mediante el uso de técnicas de procesamiento y reconocimiento de patrones. A partir de la imagen de una muestra, se puede determinar la morfología bacteriana, así como la cantidad y tamaño promedio de bacterias, y de colonias de bacterias.

En el Capítulo 2 se desarrolla la terminología fundamental sobre microorganismos, muy específicamente sobre bacterias, por ser éstas los objetos de estudio del presente trabajo.

En el Capítulo 3 se describe el marco teórico relacionado con el procesamiento de imágenes, se definen las técnicas de procesamiento utilizadas para la caracterización de las bacterias y se explica el funcionamiento de cada una de ellas.

El Capítulo 4 presenta la metodología seleccionada para la caracterización de bacterias y la descripción del entorno de software utilizado para implantarla. Este proceso de caracterización se divide en dos etapas, a saber:

1. Identificación de bacterias individuales, para lo cual se establecen las siguientes fases:
 - . Cuantificación, se consideran procedimientos de tratamiento de imágenes como: homogeneización del fondo de la imagen, aplicación de filtros para el realce de contornos, segmentación de la imagen mediante la transformada Watershed, optimización de la imagen segmentada y aplicación de una técnica de comparación por plantillas (template matching).
 - . Cálculo del tamaño promedio para determinar los tamaños de las bacterias cuantificadas y obtener el promedio de los mismos.
-

2. Identificación de colonias de bacterias, para este propósito se establecen las siguientes fases:

- . Cuantificación que comprende los procesos de homogeneización del fondo de la imagen, aplicación de filtros para el realce de contornos, segmentación de la imagen mediante la transformada de watershed, optimización de la imagen segmentada y aplicación de técnica recursiva.
- . Cálculo del tamaño promedio para determinar los tamaños de las colonias cuantificadas y obtener el promedio de los mismos.

En el Capítulo 5, se describe la dificultad para realizar el proceso de caracterización de forma manual, y se muestran los resultados de la aplicación de la metodología descrita en el capítulo 4 a un conjunto de imágenes con información bacteriana. De acuerdo con estas características, los resultados se dividieron en tres experimentos, el primero con imágenes de buen contraste entre el fondo y las estructuras, el segundo con imágenes que presentan problemas de contraste y el tercero con imágenes de poca resolución y contraste.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Automatizar los procesos de cuantificación y caracterización de bacterias en la imagen digital de una muestra.

1.3.2 Objetivos específicos

- Analizar el estado del arte en técnicas de procesamiento digital de imágenes para la cuantificación y caracterización de bacterias.
 - Seleccionar las técnicas de procesamiento digital de imágenes más idóneas para la cuantificación y caracterización de bacterias.
 - Diseñar e implementar algoritmos que permitan caracterizar morfológicamente una muestra bacteriana a partir de su imagen digital.
-

- Diseñar e implementar algoritmos que permitan cuantificar una muestra bacteriana a partir de su imagen digital.
- Desarrollar una interfaz gráfica que permita visualizar la imagen y los resultados.
- Comparar los resultados almacenados en la base de conocimiento obtenida por medios experimentales con los resultados obtenidos del procesamiento automatizado de la imagen de muestra bacteriana.

1.4 Contribuciones

Se integró una serie de algoritmos correspondientes a distintas técnicas de procesamiento de imágenes con la finalidad de caracterizar las bacterias contenidas en imágenes microscópicas de una muestra bacteriana. Los resultados de la caracterización son útiles para la determinación del número de bacterias y colonias existentes en una muestra, el cálculo del tamaño promedio de bacterias y colonias y la clasificación de bacterias según su morfología.

La presente investigación ha servido además para generar la publicación del siguiente trabajo:

- Cuantificación Automatizada de Bacterias en Imágenes Digitales. III Congreso de Bioingeniería 2006. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

Capítulo 2

Microorganismos

2.1 Introducción

Con la evolución de la microbiología el hombre ha podido identificar la importancia de los microorganismos en los procesos de la naturaleza y de los seres humanos, en algunos casos los microorganismos actúan de forma beneficiosa, como por ejemplo en el proceso de fijación de nitrógeno de la atmósfera y fabricación de productos útiles para la humanidad y, en otros casos, son considerados perjudiciales debido a que producen enfermedades en los seres vivos, así como también pueden causar la descomposición de algunos alimentos. En cuanto a las funciones benéficas de los microorganismos, es la microbiología industrial la que se ocupa de su estudio y aplicación. En la actualidad, algunos microorganismos (bacterias y hongos) son usados para la producción de biofertilizantes, los cuales ayudan a la nutrición de las plantas y además permiten la sustitución total o parcial de los fertilizantes sintéticos o químicos que causan contaminación de suelos, aguas y alimentos.

La utilización de los microorganismos por lo seres humanos data desde tiempos remotos. El hombre los utilizó sin saber que existían, cuando inventó al azar la manera de fabricar cerveza, vinagre, vino y pan. En la década de los años 40 del siglo xx el futuro de la microbiología industrial era incierto, debido a los escasos productos que eran fabricados utilizando microorganismos. Fue con el descubrimiento de la penicilina que se impulsaron los procedimientos microbiológicos, debido a que su producción a gran escala generó un beneficio para la humanidad.

2.2 Definición

Los microorganismos son formas de vida muy pequeñas que sólo se pueden observar mediante el microscopio. El término microorganismo se puede aplicar a cualquier organismo de dimensiones microscópicas con propiedades estructurales y funcionales [4]. Con el surgimiento de la microbiología como ciencia, se determinó que la mayoría de ellos no pertenecen ni al mundo animal ni al mundo vegetal, razón por la cual se creó un tercer reino, el protista [3]. En este reino, se clasifican los microorganismos de acuerdo con su estructura celular, en dos grupos: protistas eucariotas o superiores, que incluyen hongos, algas y protozoos, y protistas procariotas o inferiores donde se ubican bacterias y algas verdes.

Sin embargo, con los avances tecnológicos en microscopía, se logró diferenciar claramente dos tipos de células: procarióticas, que no poseen núcleo, y las células eucarióticas que si lo tienen. Con la finalidad de diferenciar los procariotas de las eucariotas se creó otro reino llamado Monera [4]. Este reino abarca aquellos organismos que tienen células procarióticas, quedando el reino protista como contenedor de los organismos eucariotas (células con núcleo).

2.3 Bacterias

2.3.1 Definición

Las bacterias son células procariotas universalmente distribuidas, algunas de gran importancia para la medicina o la industria (ver Figura 2.1) [4]. Estos microorganismos están compuestos generalmente de proteínas y ácidos nucleicos ¹. Algunos poseen funciones beneficiosas para el ser humano, como el caso de la fermentación para la producción de etanol y antibióticos, la fijación del nitrógeno al suelo y el tratamiento biológico de aguas residuales. Otros microorganismos denominados patógenos causan graves enfermedades [3].

Las principales características de las bacterias son las siguientes:

¹Nombre genérico de los ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico.



Figura 2.1: Representación de bacterias individuales.

- Son unicelulares y puedes tener forma esférica, bacilar o de espiral.
- Se reproducen asexualmente por fisión binaria.
- Pueden o no ser fotosintéticas.
- Pueden ser móviles o inmóviles mediante flagelos [4].
- Generalmente son heterótrofas².

A la agrupación de bacterias originadas a partir de una bacteria madre, que se establecen y extienden por determinado medio, se le denomina colonia bacteriana (ver Figura 2.2) [5].

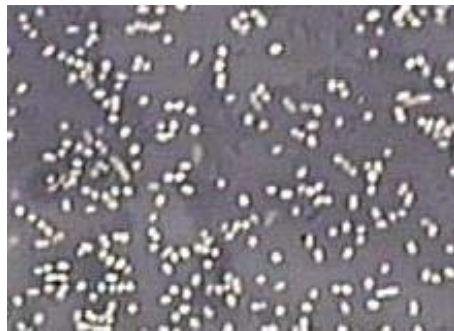


Figura 2.2: Representación de colonias de bacterias.

²Dicho de un organismo incapaz de elaborar su propia materia orgánica a partir de sustancias inorgánicas, por lo que debe nutrirse de tejido orgánico.

2.3.2 Morfología

Tamaño

Las células bacterianas varían notablemente en su tamaño, aunque se consideran relativamente pequeñas. La unidad de medida para expresar su tamaño es el micrómetro. El tamaño puede variar en la misma especie bacteriana, dependiendo de la fase de desarrollo y del medio donde se encuentren. Este parámetro no debe ser considerado como una característica que pueda ser utilizada para su identificación [4].

Forma

La forma bacteriana generalmente es una característica propia de cada especie. Con regularidad es constante, aunque puede variar ligeramente de acuerdo con la fase de crecimiento y condiciones ambientales [4]. Las bacterias según su forma se pueden dividir en tres grupos: cocos, bacilos y espirilos. Cada grupo a su vez puede adoptar diferentes agrupaciones características, las cuales ayudan a su identificación.

1. **Cocos.** Este término proviene del latín *coccus* y éste del griego *kokkos*, que significa baya. Son bacterias de forma esférica o elipsoidal (Figura 2.3), generalmente se organizan en distintas agrupaciones, parejas, cadenas, paquetes, tétradas, entre otros” [4].



Figura 2.3: Bacterias de tipo cocos.

Como se observa en la Figura 2.4.a , los cocos pueden asociarse en pareja y reciben el nombre de diplococos. Por ejemplo el diplococo *Neisseria gonorrhoeae*, que es el agente causal de la gonorrea y el *Pneumococo* que es responsable de la neumonía

infecciosa, entre otros. En algunos casos, los cocos se aglomeran formando grupos de cuatro elementos, denominándose tetracocos, tal como se muestra en la Figura 2.4.a. Las sarcinas, igualmente son especies de bacterias cocales que forman paquetes de ocho, dieciséis, treinta y dos, o más micrococos (ver Figura 2.4.b). Una de ellas es la *Sarcina ventriculi*, la cual habita en sitios muy ácidos como suelos, barro, heces y en el contenido estomacal. Cuando los cocos se agrupan en tres, cuatro o más células dispuestas en forma lineal, tal como se observa en la Figura 2.4.c, reciben el nombre de estreptococos que desempeñan funciones importantes en la producción de leche ácida y otros fermentos. Y finalmente, los cocos que se agrupan de manera irregular formando racimos (ver Figura 2.4.d) se les conocen como estafilococos, éstos se encuentran comúnmente en las fosas nasales, piel humana y en animales [5].

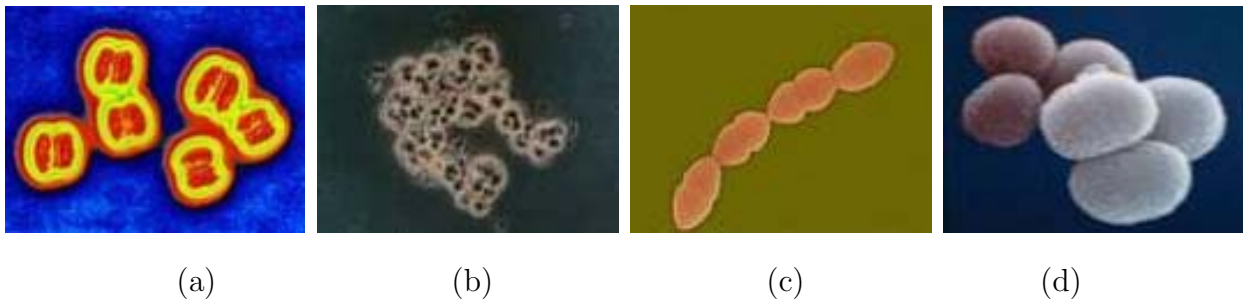


Figura 2.4: Clasificación de los cocos. (a) Diplococos, (b) Sarcinas, (c) Estreptococos, (d) Estafilococos.

2. **Bacilos.** Proviene del vocablo latín bacillus, que significa varita pequeña o bastoncillo. Son bacterias de forma cilíndrica o de bastón (ver Figura 2.5), con extremos que pueden ser redondeados o rectos, semejando un cigarro [4]. Estas bacterias se pueden encontrar en grupos de dos denominados diplobacilos, o en cadenas similares a las que presentan los cocos por los que se les llama estreptobacilos. Son útiles en la producción de antibióticos tales como bacitracina, gramicidina y polimixina, entre otros. También se han utilizado como biocontroladores en la erradicación de ciertas plagas en cultivos de importancia económica, de las cuales son parásitos [5].

3. **Espirilos.** Son bacterias de forma helicoidal con movilidad flagelar (ver Figura



Figura 2.5: Bacterias de tipo bacilo.

2.6). Dentro de este grupo se pueden encontrar especies benéficas y patógenas. La especie *Azospirillum Lipoferum* es un organismo fijador de nitrógeno, de importancia agronómica debido a que establece una relación simbiótica laxa con plantas herbáceas tropicales y con cereales cultivados. Un ejemplo de espirilo patógeno es el género *Helicobacter* asociado con las úlceras pilóricas en los humanos [5]. Los espirilos cortos, con menos de una vuelta de espiral, son denominados vidrios. Otro grupo de bacterias de forma espirilar lo constituyen los espirilos propiamente dichos, los cuales son más largos, con cuerpo rígido. Y, por último, las espiroquetas constituyen el tipo espirilar con paredes celulares flexibles y móviles mediante un apéndice denominado filamento axial [4].



Figura 2.6: Morfología bacteriana espirilar.

2.3.3 Métodos de cuantificación

Los métodos de cuantificación son aquellos que permiten estimar la población bacteriana de una muestra o cultivo. Los métodos más comunes y de mayor uso son:

1. Contaje celular. Las células bacterianas pueden ser contadas de forma directa o indirecta mediante el uso de alguna de las siguientes técnicas:

- Método de Petroff Hausser: En esta técnica se utiliza una cámara similar al hemocitómetro (especie de portaobjetos con áreas calibradas). Se coloca un volumen conocido de la suspensión bacteriana bajo el cubreobjetos y se observa al microscopio, seguidamente se cuentan las células en el área establecida de la cámara. Para calcular matemáticamente el número de bacterias por unidad de volumen, se determina el volumen del área calibrada de dicha cámara. En el método no se pueden distinguir las bacterias vivas de las muertas.
- Recuento en placas o recuento en colonias: Es un recuento indirecto de bacterias, el cual permite determinar el número de ellas, gracias a la capacidad de las células bacterianas de crecer en placas con medio de cultivo sólido y formar colonias sobre el agar ³. Para realizar esta técnica, se hacen diluciones de la muestra y se coloca 1 ml de cada una de ellas en una placa de petri estéril, a la cual se adiciona agar nutritivo. Después de la incubación en condiciones adecuadas, se cuenta el número de colonias y se calcula el número de bacterias por unidad de volumen. Este método es utilizado cuando se desea conocer el número de bacterias viables que pueden estar causando alguna enfermedad.

2. Método de asa calibrada. Mediante esta técnica se determina la carga bacteriana viable en una muestra. Se utiliza un asa de platino de la cual se conoce el diámetro del anillo empleado para la inoculación. Se extiende una asa de cultivo sobre una placa de agar adecuado para el desarrollo bacteriano, después de la incubación se cuentan las colonias obtenidas y se calcula el número de bacterias por unidad de

³Sustancia multilaminosa que se extrae de algunas algas, utilizada como medio de cultivo, en farmacia, en bacteriología y en ciertas industrias.

volumen, utilizando el factor de corrección previamente calculado según el diámetro del asa empleada.

3. Densidad celular. El método más empleado para medir la densidad celular o turbidez de un cultivo consiste en el uso de un aparato denominado espectrofotómetro. Este instrumento expresa dicha turbidez en unidades de densidad óptica o absorbancia, la cual aumenta en relación directa con la población bacteriana presente.
 4. Masa celular. La estimación de la masa celular permite determinar indirectamente la población bacteriana. Se puede utilizar como índice de la masa celular, el peso seco total de la muestra de un volumen conocido de cultivo o algún componente celular directamente relacionado con ella, como el contenido del nitrógeno o carbono [4].
-

Capítulo 3

Procesamiento de Imágenes

3.1 Introducción

El procesamiento digital de imágenes es un campo fascinante que forma parte de nuestra vida diaria. En sus inicios el procesamiento de imágenes estaba restringido a campos de investigación de las ciencias de la computación, matemática y astronomía. En la actualidad se ha convertido en una disciplina generalizada, indispensable en aplicaciones de diversos campos de investigación, como robótica [6], visión artificial [7], control industrial [8] y medicina [9, 10].

Diversos factores han intervenido en la evolución del procesamiento de imágenes, como la capacidad de adquisición de imágenes por ayuda de sistemas de cómputo con rango dinámico mas amplio que el ojo humano, la gran cantidad de información almacenada en una imagen de forma compacta y sencilla, y el procesamiento por parte de los computadores con métodos que de otra forma se torna imposible implementarlos.

3.2 Imagen digital

La imagen digital es definida como una señal de intensidad distribuida espacialmente $f(x, y)$, donde f es la intensidad del píxel y (x, y) define la posición del píxel en los ejes ortogonales definidos usualmente como horizontal y vertical. De esta manera, la imagen se asume como una matriz de X filas y Y columnas con P cuantizaciones de intensidad

de niveles de grises, correspondientes a valores en el rango $[0, P - 1]$ [11].

Se puede decir entonces que el píxel es la porción más pequeña que se obtiene al subdividir una imagen. Como se observa en la Figura 3.1, los píxeles son pequeños cuadrados o rectángulos cuyo valor puede representar colores, blancos o negros únicamente, o tonos de grises.

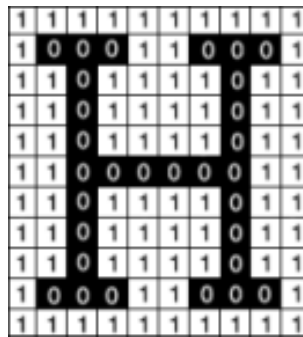


Figura 3.1: Representación de píxeles en una imagen.

Entre los procedimientos básicos que pueden ser aplicados para modificar imágenes digitales de n -dimensiones están el cambio en el contraste y brillo, la combinación con otras imágenes, la rotación, el aumento y la disminución, además pueden ser transmitidas en pocos segundos a cualquier parte del mundo.

3.3 Almacenamiento y exhibición

3.3.1 Formato

Los formatos de archivos digitales almacenan la información codificando de forma individual todos los píxeles de la imagen. En algunos casos, los archivos ocupan mucho espacio debido a su gran cantidad de información. Las cámaras digitales suelen realizar una forma de compresión del archivo para reducir el tamaño del mismo y eliminan lo que carece de valor, pero una vez visualizada de nuevo la imagen el proceso de compresión se invierte. Dependiendo del tipo de compresión existen diferentes clases de archivos digitales, unos sufren pérdida de datos y otros no [12].

3.3.2 Resolución

A la capacidad de diferenciar los detalles espaciales en una imagen se le denomina resolución. Por lo general, la frecuencia espacial a la cual se realiza la adquisición de una imagen digital (la frecuencia de muestreo) es un buen indicador de la resolución. Este es el motivo por el cual las expresiones puntos por pulgadas (dpi) o píxeles por pulgada (ppi) son términos comunes y sinónimos utilizados para expresar la resolución de imágenes digitales. Generalmente, el aumento de la frecuencia de muestreo también ayuda a aumentar la resolución. Los píxeles de una imagen pueden ser vistos de forma individual cuando se aplica el zoom a la misma [11] (Figura 3.2).

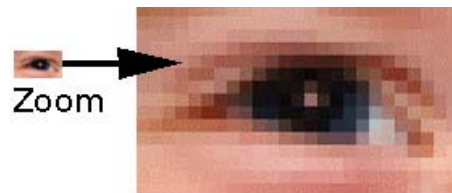


Figura 3.2: Zoom de una imagen.

3.4 Muestreo y cuantificación

La creación de imágenes requiere la conversión de los datos detectados en la imagen física a datos digitales. Esto se logra mediante dos procesos: muestreo y cuantificación. El muestreo es la digitalización espacial de las coordenadas (x, y) y cuantificación la digitalización de los niveles de gris, es decir, la digitalización de la amplitud. El proceso completo es presentado en la Figura 3.3:

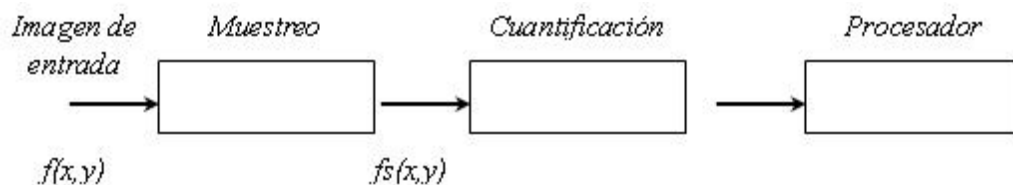


Figura 3.3: Proceso de digitalización: Muestreo y cuantificación. Tomada de [1].

La imagen $f(x, y)$ se puede expresar como un arreglo rectangular de dos dimensiones

$N \times M$, de la forma como se explicó en la sección 3.2, tal como se muestra en la Figura 3.4, donde cada elemento del arreglo es una cantidad discreta. El término a la derecha de la ecuación de esa figura es lo que se conoce como imagen digital, donde cada elemento de la imagen es lo que anteriormente se definió como píxel.

$$f(x,y) \approx \begin{vmatrix} f(0,0) & f(0,1) & \dots & f(0,M-1) \\ f(1,0) & f(1,1) & \dots & f(1,M-1) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ f(N-1,0) & f(N-1,1) & \dots & f(N-1,M-1) \end{vmatrix}$$

Figura 3.4: Arreglo bidimensional que representa los datos de una imagen.

Gianfranco Passariello y Fernando Mora (1995), explican como el proceso de muestreo realiza una partición del espacio $N \times M$ píxeles (resolución de la imagen), asignando a cada uno un par de coordenadas en el espacio bidimensional (x, y) . La cuantificación asocia a cada píxel una cantidad discreta, proporcional a la intensidad de radiación correspondiente a la coordenada espacial (x, y) [1].

Dado que las cantidades utilizadas por los procesadores de los equipos de computación son expresadas en potencias de 2, las cantidades discretas asociadas a los píxeles N y M generalmente están definidas por la ecuación (3.1):

$$N = 2^n, M = 2^m \quad (3.1)$$

Donde n y m representan el número de bits necesarios para expresar N y M respectivamente. Del nivel de precisión de la cuantificación que se realice sobre la imagen digital depende el intervalo de variación del color o nivel de gris. Para una cuantificación de k bits el número de niveles de gris viene dado por la ecuación (3.2):

$$G = 2^k \quad (3.2)$$

En este caso, el intervalo de variación estaría comprendido entre 0 y 2^{k-1} . De acuerdo con las ecuaciones (3.1) y (3.2) se puede calcular el número de bits requeridos para almacenar una imagen de $N \times M$ píxeles y k bits de cuantificación, como se muestra en la ecuación (3.3):

$$b = N \times M \times k \quad (3.3)$$

Las imágenes con 256 niveles de gris (cuantificación de 8 bits) son las más utilizadas en la mayoría de sistemas de procesamiento digital.

3.5 Técnicas básicas de procesamiento

En el procesamiento de imágenes existe una gama de procedimientos que permite realizar una serie de operaciones a la imagen digital. El objetivo es realzar y, de esta manera, destacar los elementos importantes dentro de la imagen. A estos procedimientos se les ha definido como técnicas de procesamiento de imágenes, que se pueden dividir en dos categorías [2]:

1. Técnicas basadas en puntos de la imagen, que agrupan aquellas operaciones de procesamiento donde el valor del píxel de salida sólo depende de su valor de entrada.
2. Técnicas basadas en una región de la imagen, donde un píxel de la imagen de salida depende tanto del valor del píxel en la imagen de entrada como de la vecindad del mismo.

3.5.1 Técnicas de procesamiento basadas en puntos de la imagen

Las técnicas basadas en puntos de una imagen son aquellas que se implementan a través de algoritmos que alteran el valor de un píxel, analizando exclusivamente su valor actual o su ubicación en la imagen. El procesamiento basado en puntos consiste en realizar un barrido píxel por píxel dentro de la imagen a procesar [2] y, de esta manera, generar una imagen de salida con las modificaciones realizadas por el procedimiento aplicado.

Histograma de una imagen

El histograma de una imagen es una técnica usada ampliamente como herramienta cualitativa y cuantitativa. El histograma de una imagen de niveles de gris cuantificado a 8 se define como una gráfica que a cada valor posible de nivel de gris bits entre [0-255] le asigna

la proporción de píxeles en la imagen con dicho valor [11]. En general se representa como un gráfico de barras en el que las abscisas son los distintos tonos de gris y las ordenadas la frecuencia relativa con la que cada tono aparece en la imagen.

El histograma de una imagen se puede representar como una función discreta $h(i)$, donde i es igual a $\{0, 1, 2, \dots, L - 1\}$ y L es el número posible de niveles de gris para la imagen. El histograma puede proporcionar información importante acerca del brillo y contraste de una imagen. En la Figura 3.5 se muestra el histograma de una imagen.

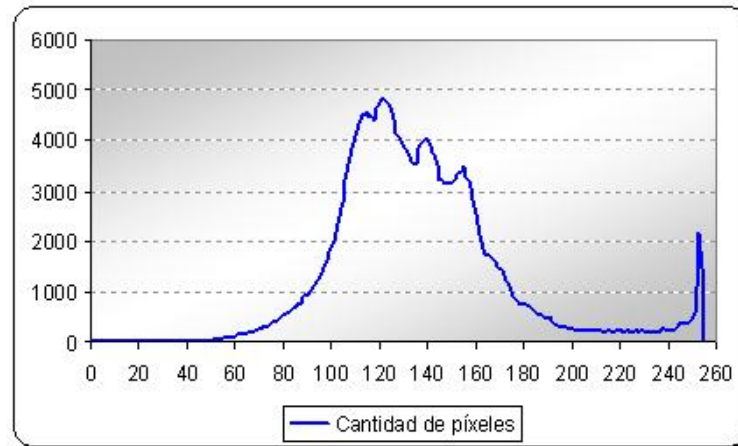


Figura 3.5: Histograma para los niveles de intensidad de una imagen, con $L = 256$.

Binarización de imágenes

La binarización es una técnica basada en un concepto simple. Su finalidad es convertir una imagen en escala de grises a una binaria (blanco y negro únicamente). Esta conversión se realiza de acuerdo con un parámetro Θ establecido, denominado umbral de brillo, que es escogido y aplicado a una imagen $f(x, y)$ en escala de grises de la siguiente manera [13]:

$$\begin{aligned} \text{Si } f(x, y) \geq \Theta & \quad f(x, y) = \text{objeto} = 1 \text{ or } 255 \\ \text{Sino} & \quad f(x, y) = \text{fondo} = 0 \end{aligned}$$

Esta versión es para aquellos casos en que interesa identificar objetos claros y fondo oscuro, para el caso contrario, objetos oscuros y fondo claro, se aplicaría el criterio de la siguiente manera:

$$\text{Si } f(x, y) \geq \Theta \quad f(x, y) = \text{objeto} = 0$$

Sino $f(x, y) = fondo = 1 \text{ o } 255$

En la imagen de la Figura 3.6 se muestra un ejemplo de la imagen generada luego de aplicar la técnica de binarización a una imagen.

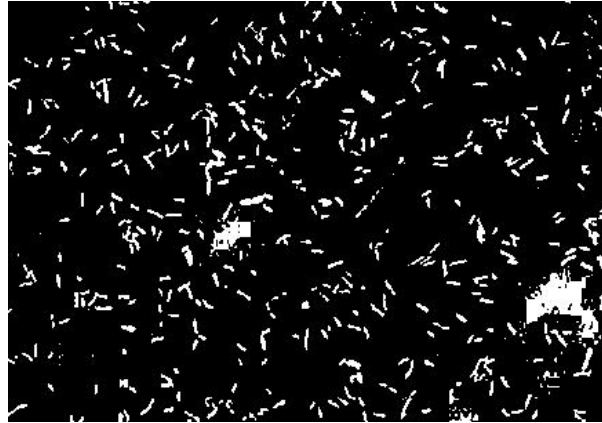


Figura 3.6: Ejemplo de la binarización de una imagen (objetos claros y fondo oscuro).

3.5.2 Técnicas de procesamiento basadas en una región de la imagen

Las técnicas basadas en agrupaciones de píxeles de una imagen o regiones, son aquellas que se implementan a través de algoritmos que alteran el valor de un píxel, analizando un conjunto de puntos bajo un determinado criterio. Este conjunto de píxeles es denominado vecindad. Normalmente el centro de la vecindad es el píxel de interés, el cual es reemplazado por un nuevo valor, producto de la aplicación de un algoritmo [2]. A través de la aplicación de estas técnicas se pueden obtener características originales de la imagen, como es el caso de la extracción y el realce de contornos, el suavizamiento, la incorporación de borrosidad y la atenuación del ruido aleatorio.

Filtro promediador

El filtro promediador es una técnica que tiene como finalidad promediar las muestras de la entrada y por lo tanto suprime las variaciones rápidas en la imagen de salida. Esta técnica consiste en realizar un recorrido secuencial a la imagen e ir examinando cada uno de sus píxeles, y determinar el valor del píxel de salida de acuerdo con los siguientes criterios:

Si $M_h(x, y) > PmGVecindad + \Theta$ entonces $M_h(x, y) = PmGVecindad$

Si no $M_h(x, y) = M_h(x, y)$

donde $M_h(x, y)$ es el valor de la magnitud del píxel en estudio, $PmGVecindad$ es el promedio de los niveles de grises de los píxeles de la vecindad, Θ es el valor de un umbral preestablecido.

El valor del tamaño de la vecindad es un parámetro sensible en el filtro, debido a que si se escoge una vecindad muy grande se puede introducir borrosidad considerable a la imagen. El valor del umbral pudiera determinarse a partir de información del ruido que contamina a la imagen tal como la varianza del mismo [1]. En la Figura 3.7, se presenta un algoritmo simple para realizar el suavizamiento de una imagen contaminada con ruido aleatorio.

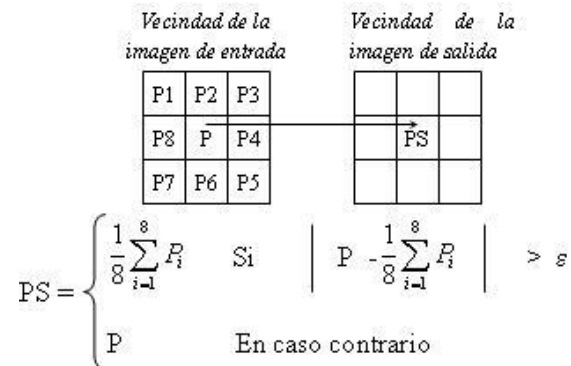


Figura 3.7: Ejemplo de un algoritmo de suavizamiento utilizando el filtro promediador. Tomada de [2].

Convolución

La convolución viene dada por una operación en la cual se multiplica cada píxel perteneciente al rango de la ventana o máscara que define al operador que identifica el proceso a aplicar, por su correspondiente peso en la máscara de convolución. Se realiza la suma de tales productos, y se escribe ese resultado en la posición del píxel central de la vecindad (píxel en estudio), la ventana se desplaza y se repite la operación para cada píxel de la imagen.

La ecuación de la convolución se muestra en la ecuación (3.4).

$$y(i, j) = \sum_{m=-K1}^{K2} \sum_{n=-L1}^{L2} h(m, n)x(i - m, j - n) \quad (3.4)$$

Detección de contornos

Un problema de importancia fundamental en el análisis de imágenes es la detección de bordes o contornos. La detección de contornos es una de las etapas del proceso de segmentación cuyo objeto es fragmentar la imagen en regiones asociadas a los diferentes elementos que componen la escena, y que puede ser utilizada posteriormente para el análisis automático de los mismos mediante algoritmos de reconocimiento de formas [14].

Los contornos caracterizan las fronteras de los objetos y por lo tanto, son de gran utilidad de cara a la segmentación e identificación de objetos en la imagen [1]. Los puntos del borde son como zonas de píxeles en las que existen cambios bruscos en los niveles de gris. Estos cambios se manifiestan de diferentes formas, incluyendo cambios en intensidad, color y textura. Un enfoque clásico para la detección de bordes, sería aquel en el cual la imagen se somete a un aumento de contraste (acentuación) en los contornos, seguida por un detector de borde por umbral. Si denotamos como $f(x, y)$ la imagen de entrada, $G(x, y)$ la imagen luego de la acentuación de bordes, U_b el umbral para bordes de bajo a alto y U_a el umbral para bordes de alto a bajo, entonces se puede decir que se tiene un borde en sentido positivo si:

$$G(x, y) \geq U_b \quad (3.5)$$

o un borde en sentido negativo si:

$$G(x, y) < U_a \quad (3.6)$$

La selección del valor umbral es uno de los aspectos importantes en detección de bordes. Un nivel de umbral muy elevado, no permitirá la detección de elementos estructurales de la imagen si estos no tienen suficiente amplitud, por el contrario, un umbral de muy poca amplitud causará que el ruido se detecte falsamente como bordes en la imagen [2].

Filtro Gaussiano

El filtrado gaussiano es una operación local sobre las imágenes que puede interpretarse como el uso de una máscara de convolución que recorre la imagen píxel por píxel. En este tipo de operaciones locales, la máscara se va haciendo coincidir con cada píxel mediante un barrido por filas o columnas. Una vez superpuesta la máscara, el número contenido en cada celda de ésta es multiplicada por el valor del píxel coincidente en la imagen original y luego todos estos se suman para obtener el valor del píxel de la imagen de salida. Puesto que el valor del píxel de salida debe estar entre 0 y 255, es común que se requiera una operación de reescalamiento.

Para el filtrado gaussiano, suele usarse una máscara de 3×3 o una de 5×5 y los valores de las celdas dependen del valor de la desviación estándar (σ), seleccionada. A mayor σ mayor suavización de la imagen de salida. El filtro Gaussiano se calcula mediante la ecuación (3.7).

$$G_{\sigma}(i, j) = \frac{1}{2\pi\sigma} e^{-\frac{i^2+j^2}{2\sigma^2}} \quad (3.7)$$

donde i, j corresponden a la fila y columna en la máscara tomando como fila y columna 0 el centro de la misma.

Operadores basados en gradientes

La determinación de un buen contorno en una imagen, dependerá de la fuente de radiación, la iluminación, y la distancia del objeto a la fuente de radiación. De allí, en el proceso de detección de bordes, es necesario aplicar a la imagen operaciones de filtrado que realcen los cambios en los valores de gris, y atenúen las áreas de la imagen donde existan valores de grises constantes, para posteriormente introducir el resultado de esta operación a un detector de borde [15]. Los métodos más usados para la implantación de detectores de borde, son aquéllos que utilizan operadores de filtrado de tipo lineal que realizan la detección independientemente de su dirección. Entre este tipo de operadores se encuentran, el operador gradiente y el operador de Laplace. El operador gradiente se basa en el cálculo de la primera derivada de la imagen bidimensional $I(x, y)$, por lo tanto dicho operador tendrá la forma según la ecuación (3.8):

$$\nabla I(x, y) = \frac{\partial I(x, y)}{\partial x} \hat{i}_x + \frac{\partial I(x, y)}{\partial y} \hat{i}_y \quad (3.8)$$

donde \hat{i}_x y \hat{i}_y , representan los vectores unitarios en dirección x e y respectivamente.

El operador de Laplace se encarga de realizar el reforzamiento de bordes, en base al Laplaciano de una imagen bidimensional de acuerdo a la expresión de la ecuación (3.9).

$$\nabla^2 I(x, y) = \frac{\partial^2 I(x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 I(x, y)}{\partial y^2} \quad (3.9)$$

En imagenología discreta los operadores gradiente y de Laplace, se aproximan en base a diferencias finitas, generando un arreglo de pesos que corresponden a los valores de la diferencia sobre una vecindad local de la imagen, este arreglo es conocido como máscara, ventana o kernel del operador. La aplicación de la forma discreta de tales operadores se realiza con un proceso de convolución. La Figura 3.8 muestra las máscaras del operador Sobel de tamaño 3×3 , usadas para obtener el gradiente en dirección x y en dirección y . El lector puede referirse a [15] para encontrar otra serie de máscaras utilizadas para estimar la primera derivada.

$$\begin{array}{cccccc} -1 & -2 & -1 & -1 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & -2 & 0 & 2 \\ 1 & 2 & 1 & -1 & 0 & 1 \end{array}$$

Figura 3.8: Máscaras del operador Sobel.

De igual manera, el operador Laplaciano puede ser aproximado por máscaras de convolución de tamaño $N \times N$. La figura 3.9 muestra tres máscaras del operador Laplaciano, cada una de ellas depende del tipo de aproximación por diferencias finitas utilizado.

$$\begin{array}{ccccccccc} 0 & -1 & 0 & -1 & -1 & -1 & 1 & -2 & 1 \\ -1 & 4 & -1 & -1 & 8 & -1 & -2 & 4 & -2 \\ 0 & -1 & 0 & -1 & -1 & -1 & 1 & -2 & 1 \end{array}$$

Figura 3.9: Máscaras del operador Laplaciano.

3.5.3 Segmentación de imágenes

Las técnicas de segmentación de imágenes se basan en la organización o agrupamiento de un conjunto de formas, donde las principales características para esa organización son la proximidad, similitud y continuidad. El proceso de segmentación particiona una imagen en regiones (también llamadas clases o subconjuntos) que son homogéneas con respecto a una o más características [16, 17, 18]. La segmentación de imágenes está enmarcada en los problemas de visión por computadora, como una herramienta para el reconocimiento de objetos basada en técnicas de extracción de formas, las cuales verifican tres propiedades básicas: ser suficientemente generales para poder describir un amplio rango de formas, permitir al mismo tiempo la extracción del objeto de la escena que lo contiene y, por último, facilitar la comparación con formas similares [19].

En análisis de imágenes bidimensionales, la segmentación puede ser definida, como el particionamiento del conjunto de datos del espacio bidimensional, en un conjunto disjuncto de regiones o grupos, cuya unión representa dicho espacio. Para ello, debe ser tomado en cuenta un conjunto de puntos o píxeles de la imagen, a los cuales se les analiza características como, la posición en el espacio de intensidades, las relaciones topológicas y las características de las fronteras entre los conjuntos [18][20]. El proceso de segmentación se encarga de evaluar si cada punto de la imagen pertenece o no al objeto de interés. Esta técnica de procesamiento de imágenes genera una imagen binaria, donde los puntos que pertenecen al objeto se representa con un uno, mientras que los que no pertenecen al mismo se representan con un cero.

En la literatura, ha sido propuesta una amplia variedad de técnicas de segmentación, sin embargo, no se ha podido establecer una técnica estándar, que genere resultados satisfactorios para todas las aplicaciones imagenológicas. El desarrollo de la técnica de segmentación, depende tanto del análisis a realizar sobre la escena bidimensional como de la representación de los elementos de dicha escena. En tal sentido, las técnicas de segmentación comunmente reportadas pueden ser clasificadas en tres categorías: (1) segmentación basada en puntos, (2) segmentación basada en contornos y (3) segmentación basada en regiones [18][20][21][22].

3.5.4 Transformada *Watershed*

La transformada de *Watershed* es una herramienta para la segmentación de imágenes en el campo de la morfología matemática [23]. Existen diversas definiciones de esta transformada relacionadas con algoritmos secuenciales y sus implementaciones paralelas [24]. El *Watershed* puede ser clasificado como una segmentación basada en regiones.

La idea intrínseca de este método proviene de la ciencia de la geografía basado en un paisaje o relieve topográfico inundado con agua, las cuencas hidrográficas se dividen por líneas del dominio de atracción de la lluvia caída sobre la región. Un enfoque alternativo es el de imaginar el paisaje inmerso en un lago con agujeros perforados en los mínimos locales. Cuencas (también llamadas cuencas de captación) se llenan de agua a partir de estos mínimos locales y en los puntos donde el agua procedente de las diferentes cuencas se reúne, las presas se construyen. Cuando el nivel de agua ha alcanzado los más altos picos en el paisaje, el proceso se detiene. Como resultado de ello, el paisaje es dividido en regiones o cuencas separadas por diques denominados líneas de cuencas hidrográficas o simplemente *Watersheds* [24].

La transformada *Watershed* considera la magnitud del gradiente de una imagen como una superficie topográfica Figura 3.10. Los píxeles que tienen la más alta intensidad en la magnitud del gradiente corresponden a las líneas del *Watershed*, las cuales representan los límites de las regiones. El agua es colocada sobre cualquier píxel y delimitada por líneas divisorias, las corrientes fluyen hacia abajo a un régimen común de acuerdo con los mínimos de intensidad local. Los píxeles de drenaje para un mínimo común forman una cuenca de captación, que representan las regiones [24].

El proceso de segmentación con la transformada *Watershed* para una imagen de entrada cualquiera (Figura 3.10), se ilustra en las imágenes de la Figura 3.11.

Claramente se puede observar como el agua (color azul en la imagen) va inundando la superficie (Figura 3.10) de la imagen, el proceso de inundación continúa hasta que se llega a los límites máximos de las cordilleras de esa superficie, en ese momento el proceso es detenido y las líneas de cuencas hidrográficas han sido determinadas. El resultado final se puede observar en la imagen de la figura 3.12.

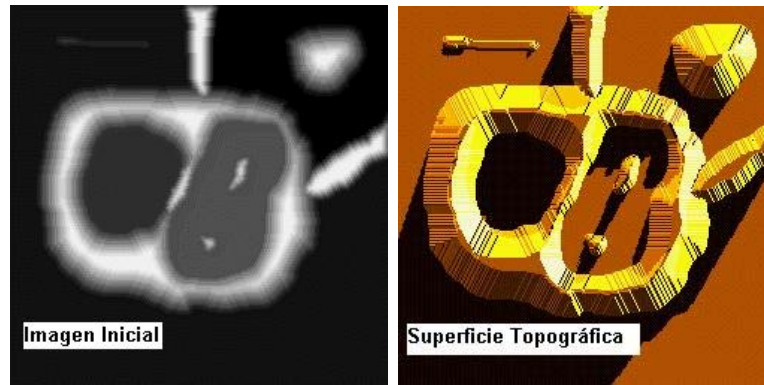


Figura 3.10: Imagen inicial con su respectiva representación como un superficie topográfica.

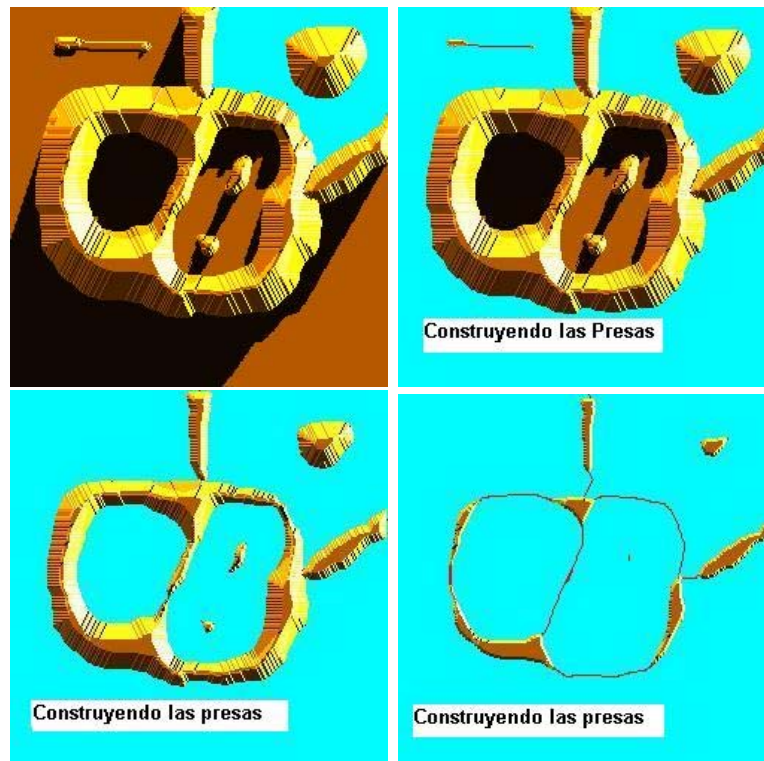


Figura 3.11: Proceso de segmentación de una imagen (Figura 3.10).

3.5.5 Comparación con plantillas (*template matching*)

El *template matching* es un método de filtrado utilizado para detectar características particulares en una imagen. Siempre y cuando la apariencia de esta característica en la imagen se conozca con precisión, se puede realizar la detección de la misma con un

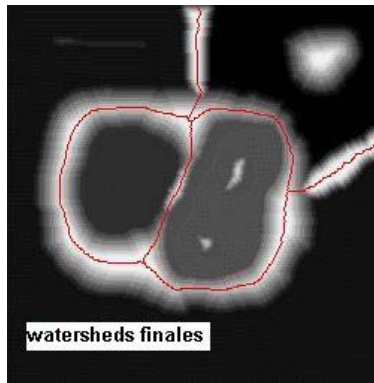


Figura 3.12: Imagen generada con los *Watersheds* encontrados.

operador denominado plantilla (*template*). Es por esto que se define el *template matching* como una técnica usada para encontrar pequeñas partes de una imagen que coinciden con el operador [25].

Esta técnica puede ser usada en la detección de contornos en imágenes [25], en la industria como parte del control de calidad [8] o como una vía para manejar robots móviles [6].

La plantilla es una subimagen que debe lucir justo como la imagen original del objeto que se está identificando. La Figura 3.13 muestra una imagen industrial y una de las plantillas relevantes.

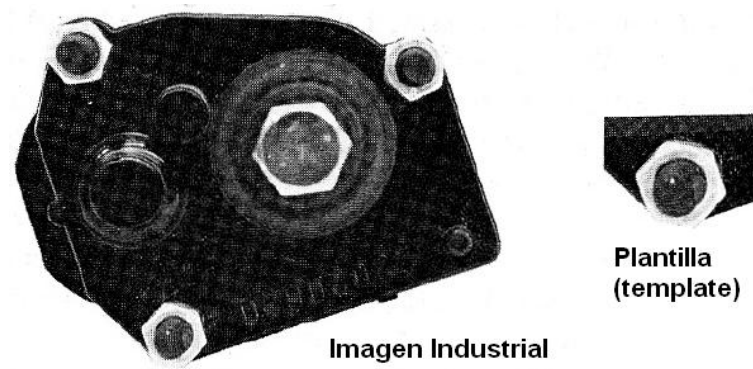


Figura 3.13: Una imagen industrial y una plantilla de una tuerca hexagonal.

Existen diferentes enfoques para efectuar el *template matching*. Algunos enfoques son mas rápidos y en algunas casos realizan mejor la comparación. El método de ejecución básico del *template matching* consiste en realizar un recorrido a través de todos los píxeles

de la imagen original y luego compararlos con el patrón. Mientras este método es uno de los más simples para implementar y entender, igualmente es uno de los más lentos en ejecución.

La implementación del método simple de esta técnica, primero crea una subimagen (*template*), denominada $w(i, j)$ donde (i, j) representan las coordenadas de cada uno de los píxeles. Luego se desplaza el centro de la subimagen w sobre cada punto (x, y) en la imagen original $f(x, y)$ y calcula la suma de los productos entre los coeficientes en $f(x, y)$ y la correspondiente vecindad de píxeles en el área abarcada por la máscara del filtro w . Este método es denominado filtrado espacial lineal [25].

Generalmente, el método de filtrado lineal sólo es usado en sistema de hardware dedicado debido a su alto costo computacional. Sin embargo, una manera de disminuir esta complejidad, es mediante el uso de filtrado de dominio espacial, el cual es implementado a través del teorema de la convolución (Sección 3.5.2).

Capítulo 4

Metodología para la Caracterización de Bacterias

4.1 Introducción

Las bacterias juegan un papel fundamental en la naturaleza y en el hombre, la presencia de una flora bacteriana normal es indispensable. La caracterización de muestras bacterianas es un proceso de gran utilidad en el ámbito de la microbiología, debido a que a través de estos estudios, se pueden reproducir organismos con características particulares, útiles para la elaboración de productos en la industria y producción de medicinas, entre otros.

Mediante el uso de técnicas de imagenología es posible automatizar el proceso de caracterización de estos microorganismos, permitiendo determinar datos morfológicos importantes para el estudio de la fisiología celular, de la síntesis de proteínas y la genética.

Los avances tecnológicos en imagenología han permitido tanto desarrollar metodologías para la detección de características importantes en las imágenes como extraer información de interés particular para los investigadores. En este sentido, se pueden mencionar como las técnicas más resaltantes, la segmentación de imágenes, el reconocimiento de patrones, los filtros para el realce y detección de contornos, entre otros.

Para la identificación de organismos de poco tamaño en imágenes, como es el caso de las bacterias, sus imágenes deben ser sometidas a una etapa de preprocesamiento que permita

suavizar variaciones en su brillo y contraste generados al momento de su adquisición. Posteriormente el problema se centra en encontrar en la imagen los microorganismos, utilizando la transformada Watershed como herramienta para la segmentación de la imagen. Por último basándose en patrones establecidos para cada organismo, las bacterias existentes en la muestra son identificadas usando el algoritmo del *template matching*.

La última etapa de la caracterización es la determinación de la forma y el cálculo del tamaño promedio, basado en las bacterias encontrados por el *template matching*.

4.2 Antecedentes

En el campo de la microbiología se han realizado distintos estudios con microorganismos, con la finalidad de mejorar las aplicaciones de estos organismos. En 1991, Reyes realizó un estudio de cuantificación de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos [26].

Posteriormente en el año 2004, un grupo de investigadores llevaron a cabo otro estudio para la caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato[27]. En este trabajo se evaluó la abundancia y distribución de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato. Para ello se realizaron aislamientos de bacterias y hongos, caracterizando e identificando los mas frecuentes y determinando su eficiencia relativa.

Sin embargo, estos casos representan estudios realizados que fueron soportados por métodos de caracterización manual. En el procesamiento digital de imágenes existen diversos estudios que se pueden tomar como base para la automatización de este proceso, siendo necesaria la incorporación de una técnica de segmentación y una técnica de identificación de microorganismos.

En el año 1991 Vincent y Soile [28] publicaron un trabajo que presentó un rápido y flexible algoritmo para el procesamiento del Watershed en imagenes digitales en escala de grises. Este algoritmo se basó en una analogía del proceso de inmersión de agua, en el cual la inundación eficiente es lograda mediante la simulación de una cola de píxeles.

En el año 2001, Roerdink [24] realizó un análisis de la transformada Watershed presentando una revisión detallada de las definiciones de la transformada Watershed y su asociación con los algoritmos de implementación secuencial. Así mismo plateó un enfoque

para la implementación paralela del algoritmo secuencial.

Otro estudio realizado en el año 2002 [29], propuso una nueva técnica para mejorar la segmentación con Watershed, reduciendo la sobre segmentación que es generada en aquellos casos en que la imagen contiene gran cantidad de ruido.

Cole, Austin y Cole [30], desarrollaron un procedimiento para el reconocimiento visual de objetos usando el *template matching*, el cual abordó el problema de la reducción de la cantidad de elementos de la serie de patrones o plantillas utilizada para la comparación con la imagen en estudio. Para ello se propuso una etapa de preprocesamiento con la extracción de las áreas de interés (manchas) existentes en la imagen.

4.3 Entorno de software

La metodología que se describe a continuación se implanta a través del desarrollo de un componente de software denominado Identificación Bacteriana y la reutilización del componente ImageJ.

4.3.1 Identificación bacteriana

Definición

El componente Identificación Bacteriana está formado por un conjunto de clases ¹ con la implantación de técnicas de procesamiento digital seleccionadas en esta investigación para la caracterización de bacterias.

Características

Este componente fue diseñado con la metodología de programación orientada a objetos y desarrollado en el lenguaje de programación Java. Cada técnica de procesamiento corresponde a una o mas clases de objetos² de este componente.

Las clases de usuario se encuentran organizadas en el paquete³ Imágenes. Para la

¹Agrupación de datos (variables o campos) y de funciones(métodos) que operan sobre estos datos.

²Instancia de una clase.

³Conjunto de clases que están relacionadas entre si.

manipulación de las imágenes en las clases de este paquete, se utilizaron algunas clases de paquetes que forman parte de la Interfaz de Programación de Aplicaciones (API) de Java. Los paquetes usados son los siguientes: `java.awt`, `javax.swing`, `java.io` y `javax.imageIO`.

Filtros

A continuación se enumeran los filtros de procesamiento implantados en este componente:

1. Histograma. Descrito en la sección 3.5.1.
2. Binarización. Descrito en la sección 3.5.1
3. Invertir. Descrito en la sección 4.4.1
4. Gaussiano. Descrito en la sección 3.5.2
5. Filtros con operadores basados en gradientes. Descrito en la sección 4.4.1
6. Homogeneización del fondo de la imagen. Descrito en la sección 4.4.1
7. Optimización. Descrito en la sección 4.4.1

Técnicas de identificación

Las técnicas de identificación implantadas en este componente se enumeran a continuación:

1. Caracterización de Bacterias. Descrito en la sección 4.4.1
2. Caracterización de Colonias. Descrito en la sección 4.5.1

Diagrama de Clases

1. Diagrama general de clases para los filtros. En la Figura 4.1 se muestra un diagrama de clases general que puede ser utilizado para estructurar los filtros desarrollados. La clase identificada como Filtro fue dibujada con líneas punteadas indicando que en lugar de ella se coloca la clase del filtro correspondiente. La Figura 4.2 muestra el conjunto de filtros utilizados para desarrollar la presente aplicación.
-

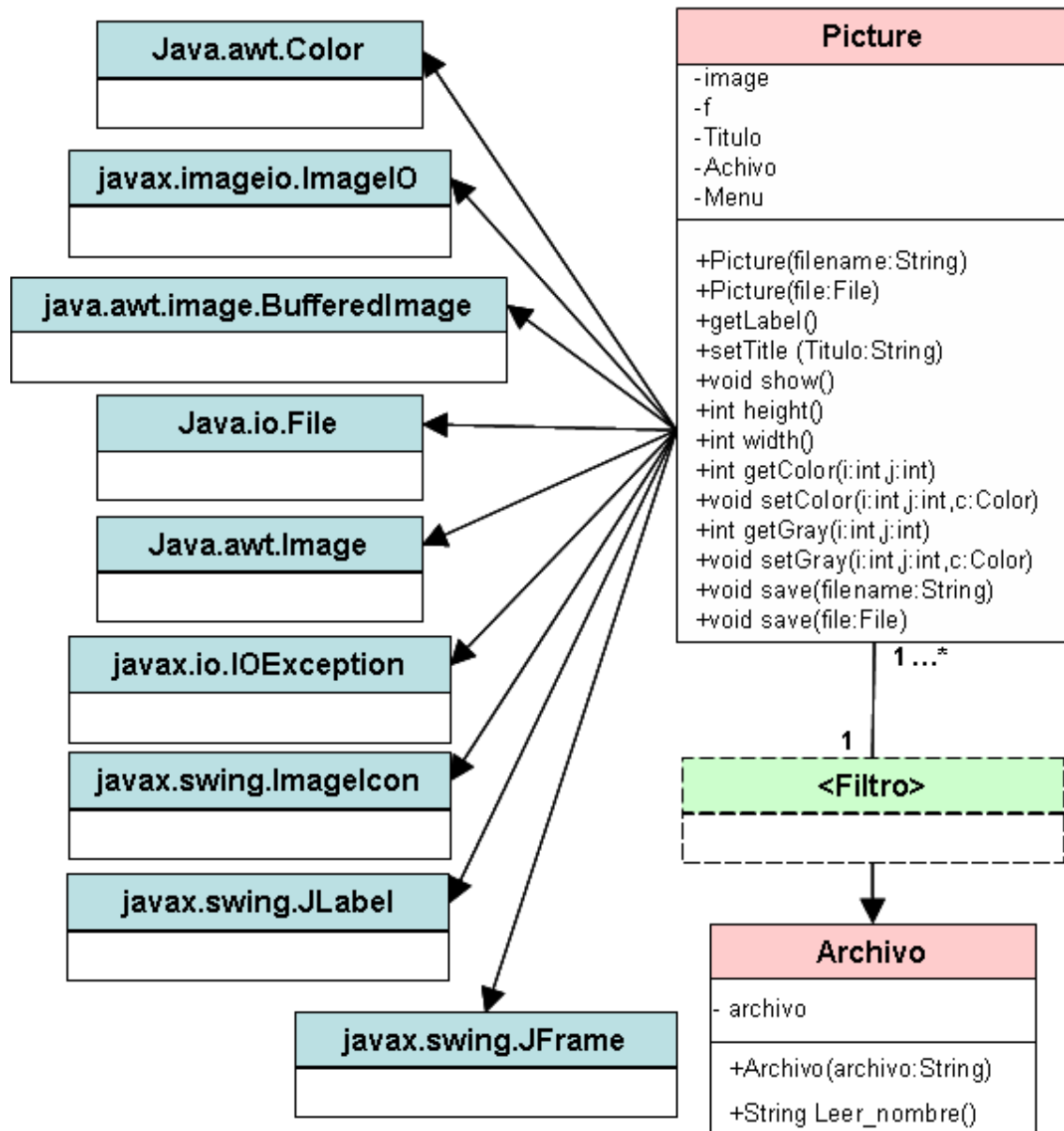


Figura 4.1: Diagrama general de clases para los filtros (clases de usuario en color rosado y clases de la API en color azul).

2. Diagrama de clases para las técnicas de identificación. El diagrama de clases para la técnica de caracterización de bacterias se muestra en la Figura 4.3, de igual forma, el diagrama de clases correspondiente a la técnica de caracterización de colonias se muestra en la Figura 4.4.

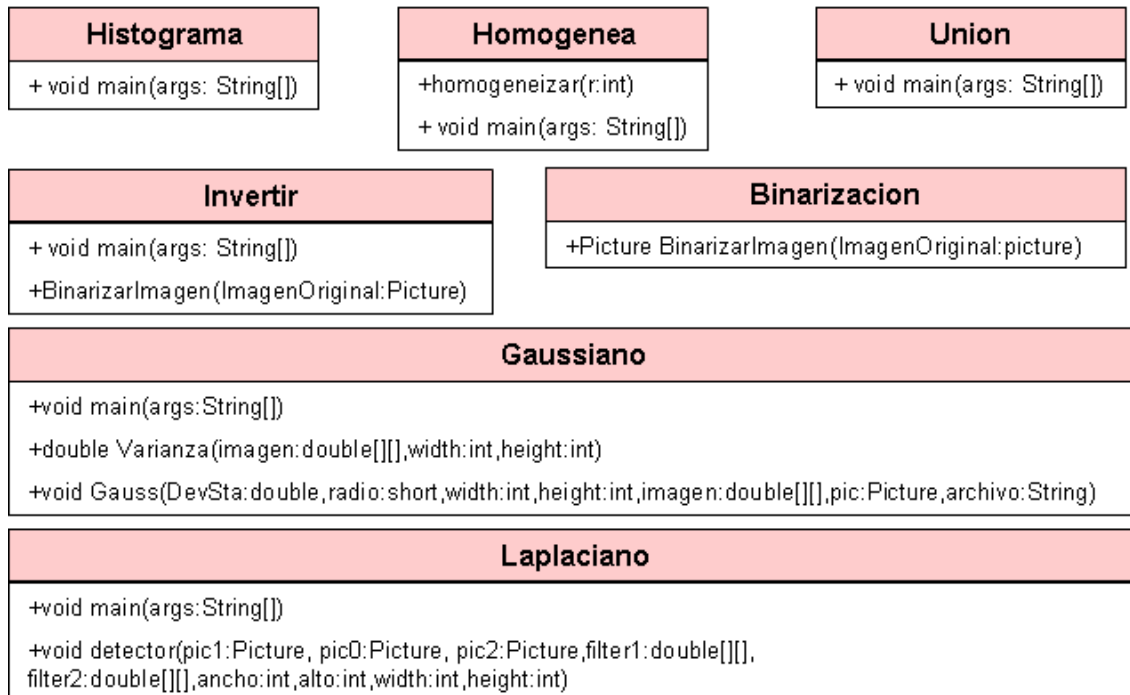


Figura 4.2: Descripción de las clases de los filtros (clases de usuario en color rosado y clases de la API en color azul).

4.3.2 ImageJ

Definición

El ImageJ es un software de dominio público para el procesamiento de imágenes inspirado en el NIH image para Macintosh. Esta aplicación puede ser ejecutada como un componente de software (applet) desde un sitio Web o como una aplicación de escritorio.

Características

Las características predominantes del componente se encuentran enumeradas a continuación:

1. Multiplataforma: Puede ser ejecutado en cualquier plataforma de hardware y software Linux, Mac OS 9, Mac OS X, Windows, and the Sharp Zaurus PDA.
2. Código abierto: ImageJ y su código fuente están disponibles de forma gratuita para el dominio publico, con licencia pública general (GPL).

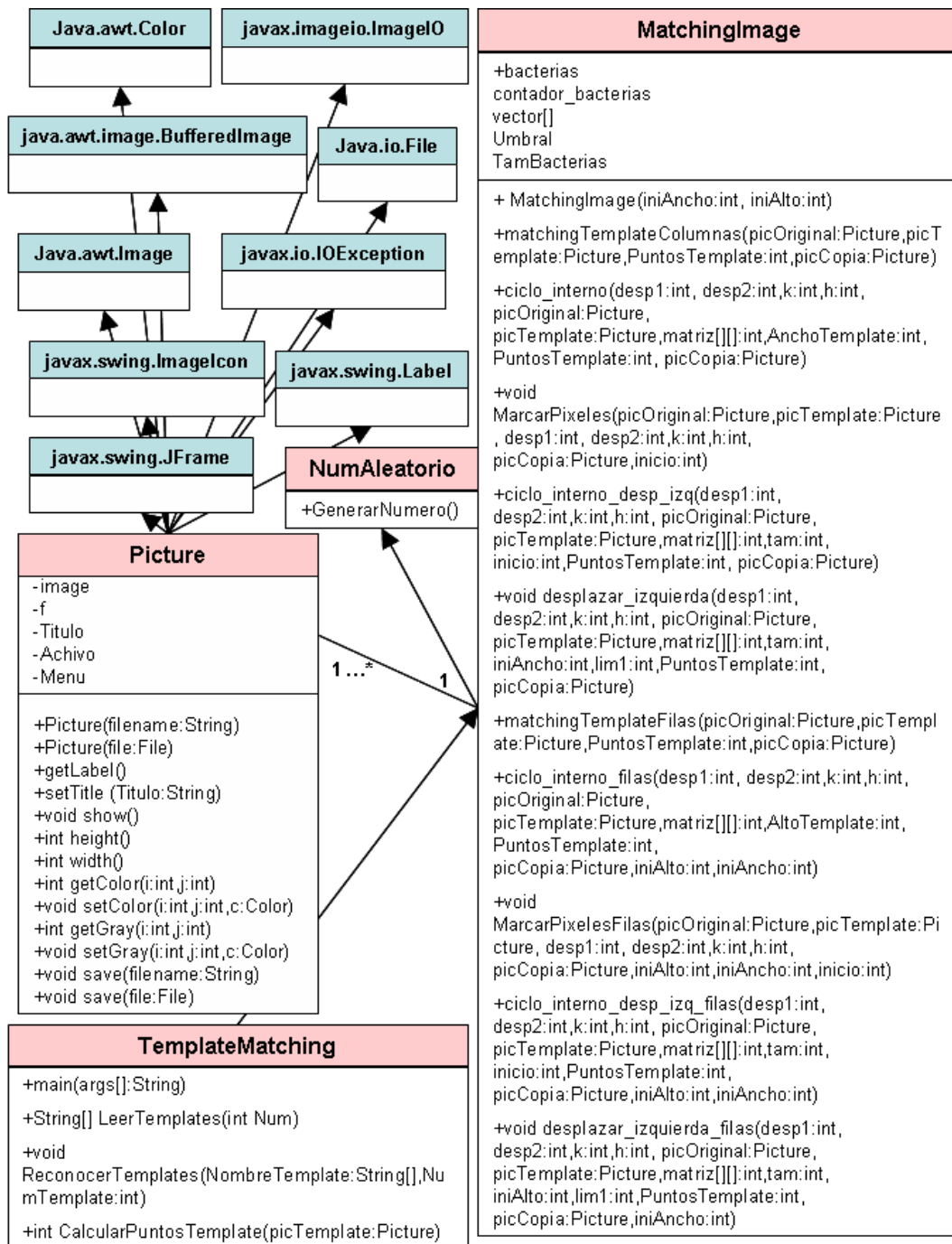


Figura 4.3: Diagrama de clases de la caracterización de bacterias (clases de usuario en color rosado y clases de la API en color azul).

3. Macros: Tareas automáticas y herramientas creadas de forma personalizada mediante el uso de macros. Automáticamente se genera el código del macro usando el comando grabar. Más de 200 macros están disponibles en el sitio Web de ImageJ.

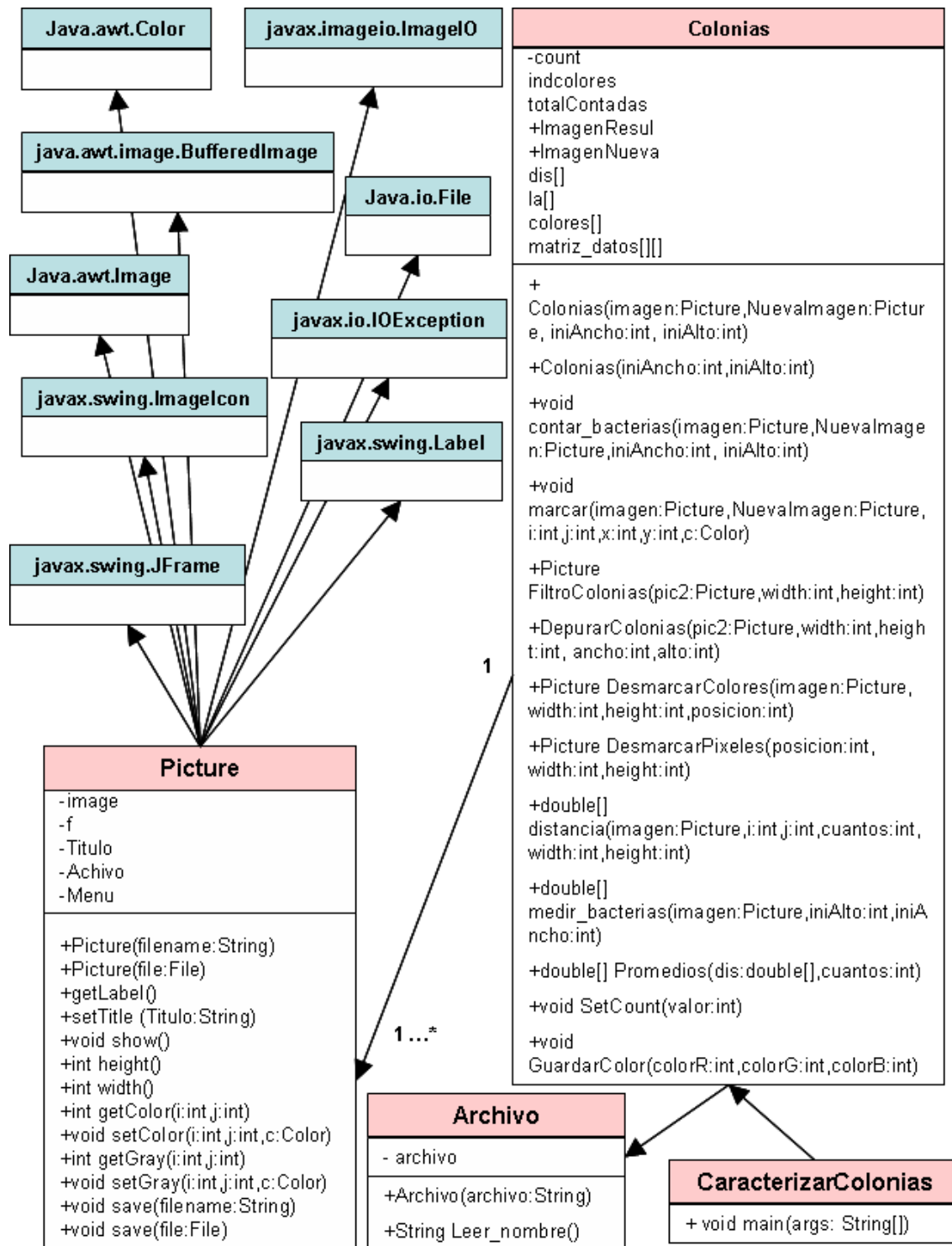


Figura 4.4: Diagrama de clases de la caracterización de colonias (clases de usuario en color rosado y clases de la API en color azul).

4. Plugins: El ImageJ se complementa mediante la inclusión de componentes desarrollados en Java.
5. Herramientas: El ImageJ es un herramienta para el procesamiento de imágenes (biblioteca de clases) y desarrollo de componentes de software (applets, servlets o aplicaciones).
6. Velocidad: ImageJ es un programa de procesamiento de imágenes en Java, cuya ejecución es de gran rapidez. Puede filtrar una imagen de 2048×2048 en 0.1 segundo; esto significa 40 millones de píxeles en un segundo.
7. Tipos de datos: Imágenes de 8-bit en escala de grises o de color indexado, 6-bit de enteros sin signo, 32-bit de punto flotantes y color RGB.
8. Formatos de archivo: Maneja imágenes con formato TIFF, RAW, GIF, JPEG, BMP, PNG, PGM, FITS.

Filtros

Los filtros del componente ImageJ usados en este trabajo son los siguientes:

1. Sustracción de fondo (*subtract background*). El filtro *subtract background* implementado como parte del componente ImageJ, está basado en el concepto del algoritmo de Rolling Ball [31]. Este concepto consiste en que dada una imagen de dos dimensiones en escala de grises, la misma tiene una tercera dimension (height) para el valor de la imagen de cada uno de sus puntos, creando de esta manera una superficie. La envoltura alcanzada por el volumen de la bola es el fondo.

Los parámetros que utiliza la implementación de este filtro en el componente ImageJ, son los siguientes [32]:

- . El radio de la bola rodante. Es el radio de la curvatura de la parábola. Como una regla, para imágenes de 8 bits o RGB, este podría ser como máximo el valor del radio del objeto mas grande que no es parte del fondo en la imagen.

- . Tipo de fondo. El fondo claro permite el procesamiento de la imagen con fondo claro (blanco) y objetos oscuros.

2. Filtro de suavizamiento (smooth)

El filtro *smooth*, inserta borrosidad a la imagen o selección de la misma que se esté trabajando. Es implantado como un filtro promediador (Sección 3.5.2). En el ImageJ se usa el algoritmo descrito en [33].

Plugins

Del conjunto de plugins disponibles en el ImageJ sólo se usa la transformada *Watershed* en este trabajo. Esta implementación del *Watershed* corresponde a la versión desarrollada por Daniel Sage [34], basándose en el algoritmo de simulación de inversión propuesto por Vincent y Soile en el año 1991 [28].

4.4 Identificación de bacterias

En esta etapa se llevaron a cabo las tareas necesarias para caracterizar las bacterias presentes en la imagen de la muestra, determinando cantidad, forma y calculando tamaño promedio de las mismas.

4.4.1 Cuantificación

Con el propósito de automatizar la cuantificación de bacterias individuales en imágenes de microscopía, se establecieron las siguientes fases: homogeneización del fondo de la imagen, aplicación de filtros para el realce de contornos, segmentación de la imagen mediante la transformada *Watershed*, optimización de la imagen segmentada y aplicación del *template matching*. En el diagrama de flujo de la figura 4.5 se presentan las fases mencionadas anteriormente.

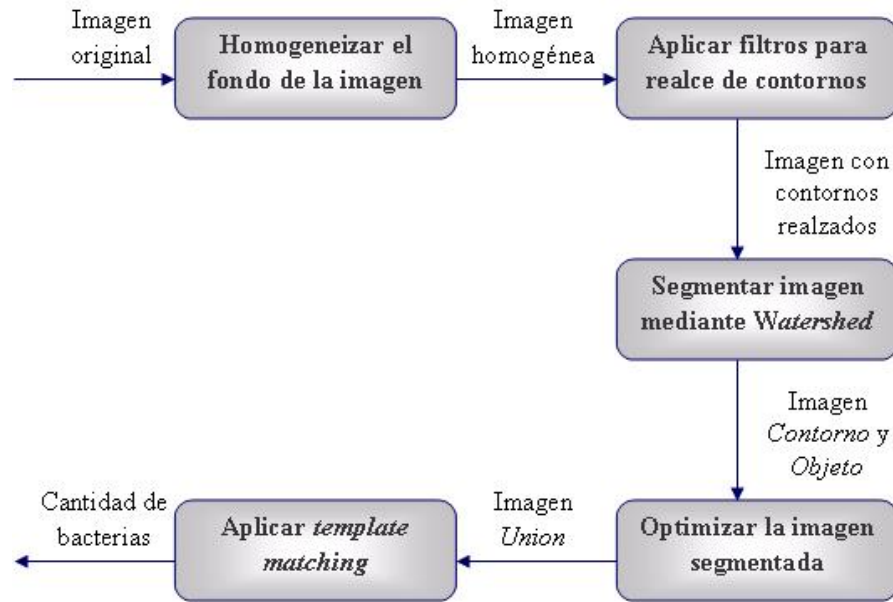


Figura 4.5: Diagrama de flujo de las fases de la cuantificación bacteriana.

Homogenización del fondo de la imagen de la muestra bacteriana

La homogeneización del fondo de una imagen consiste en equilibrar los tonos de los píxeles pertenecientes a ella. Es una técnica que se basa en el procesamiento de puntos de una imagen, la cual para lograr el equilibrio de tonos utiliza el promedio de los histogramas de un conjunto n de imágenes con las mismas dimensiones $ancho \times alto$ en su tamaño y características diversas (brillo y contraste) . El algoritmo desarrollado basado en esta técnica comprende 3 pasos: cálculo del histograma, determinación de funciones promedio y aplicación del filtro a la imagen.

Como dato de entrada, se debe seleccionar un conjunto n de imágenes con tamaño $ancho \times alto$.

El primer paso consiste en obtener el histograma (ver sección 3.5.1) para las n imágenes escogidas.

Con el fin de construir el histograma de cada imagen, se diseñó e implementó un algoritmo que toma como entrada una imagen de muestra bacteriana en escala de grises, de tamaño $ancho \times alto$ y produce un vector de 256 posiciones con la cantidad de píxeles y con el nivel de gris correspondiente a cada posición. El algoritmo realiza un recorrido sobre la imagen leyendo el valor de cada píxel, mediante el uso de un vector de enteros h

de 256 posiciones acumula en cada posición la cantidad de píxeles existentes en la imagen con el mismo nivel de gris. Por ejemplo, si el valor del píxel es 56, incrementa en uno el valor del vector h en la posición 56 y así sucesivamente para los $ancho \times alto$ píxeles que contiene cada imagen. Al finalizar el recorrido, el algoritmo genera el vector h con el número de píxeles que corresponden en la imagen a cada nivel de gris, tal como se muestra en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Vector con cantidad de píxeles por cada nivel de gris (0-255).

Nivel de gris	0	1	2	...	253	254	255
Cantidad de píxeles	0	0	0	...	2177	1494	0

El histograma de una imagen se puede graficar como una función (x, y) cuyas coordenadas corresponden al índice y valor de las posiciones del vector respectivamente, como se observa en la Figura 4.6.

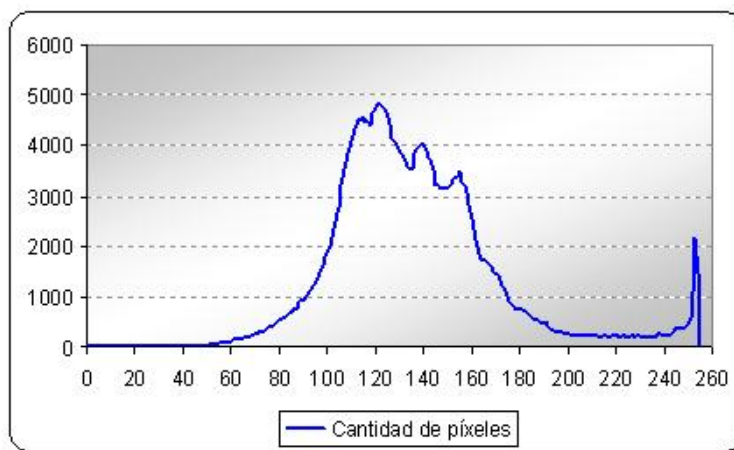


Figura 4.6: Histograma de una imagen.

Una vez obtenidos los histogramas de las n imágenes se determina, el primero y el último nivel de gris con presencia de píxeles en el histograma de cada imagen.

En las secciones del histograma de la Figura 4.6, mostradas en las Figuras 4.7 y 4.8, se observa que el primer nivel de gris presente en la imagen es el 4 y el último es el 254, cada uno con un solo píxel con ese nivel de gris en la imagen.

Una vez determinados el primero y el último nivel de gris con presencia en la imagen, se calcula el nivel de gris que corresponde a los porcentajes 25%, 50%, 75% y 99.8% para

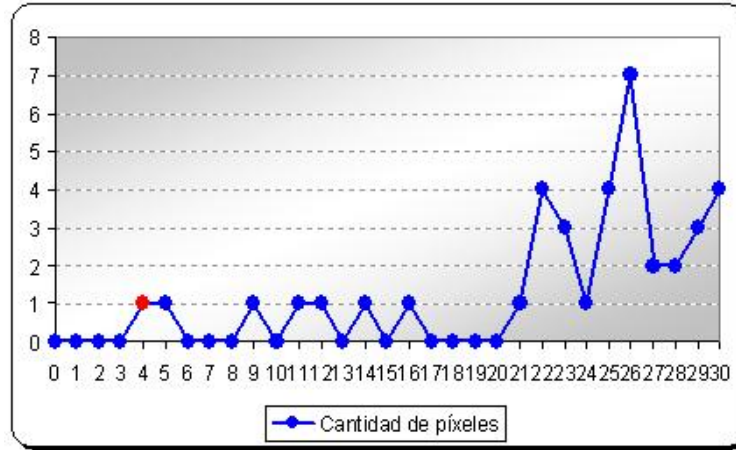


Figura 4.7: Sección izquierda del histograma de la Figura 4.6.

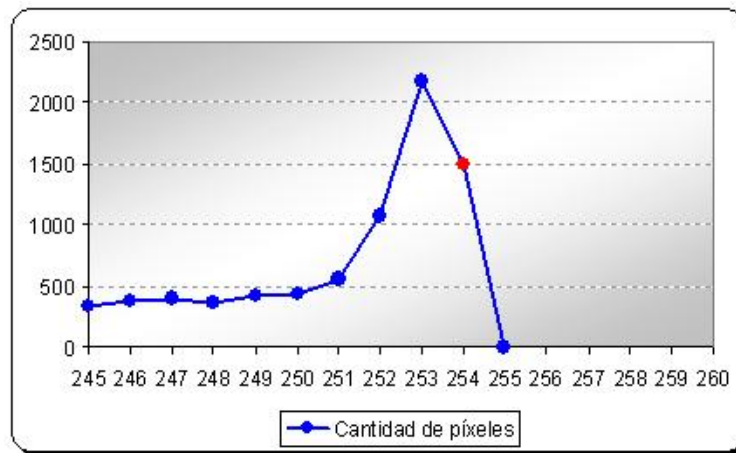


Figura 4.8: Sección derecha del histograma de la Figura 4.6.

el rango abarcado por cada imagen y se obtiene el número de píxeles respectivo, mediante el uso de la ecuación (4.1):

$$P_{oc_{i,j}} = \frac{(V_{max_j} - V_{min_j})i}{100} + V_{min_j} \quad (4.1)$$

donde P_{oc} es igual a los valores correspondientes a los porcentajes 25, 50, 75 y 99.8 en la escala de grises, V_{max} es el valor máximo de nivel de gris con presencia en la imagen, V_{min} es el valor mínimo de nivel de gris con presencia en la imagen. $i = \{25, 50, 75, 99.8\}$ y $0 \leq j < n$, n es el número de imágenes.

Para obtener el valor del primer porcentaje (25) del histograma de la Figura 4.6, la

aplicación de la ecuación (4.1) quedaría de la siguiente manera:

$$P_{oc_{25,0}} = \frac{(254 - 4)25}{100} + 4 \quad (4.2)$$

$$P_{oc_{25,0}} = 67 \quad (4.3)$$

El cálculo de los valores de los porcentajes restantes, para 2 imágenes, se observan en la siguiente tabla 4.2:

Tabla 4.2: Porcentajes para la homogeneización correspondientes al histograma de la Figura 4.6.

Porcentajes	0	25	50	75	99.8
Poc Imagen1 (Nivel de gris)	4	67	129	192	254
Poc Imagen2 (Nivel de gris)	0	64	127	191	253

El segundo paso de la homogeneización consiste en la determinación de las funciones promedio (Figura 4.9) para los histogramas calculados en la etapa anterior. En este caso, el algoritmo toma como entrada los valores correspondientes a los porcentajes (0, 25, 50, 75 y 99.8) calculados para las n imágenes y produce como salida, las funciones promedio de los histogramas.

Inicialmente obtiene el promedio para cada porcentaje (25, 50, 75 y 99.8) con los valores de cada una de las imágenes, de acuerdo con la ecuación (4.4):

$$P_{m_i} = \left(\sum_{j=0}^{n-1} P_{oc_{i,j}} \right) / n \quad (4.4)$$

donde P_m es el promedio del valor correspondiente al porcentaje i de las n imágenes, y n es el número de imágenes. $i = \{0, 25, 50, 75, 99.8\}$, $0 \leq j < n$.

En la tabla 4.3 se muestran los porcentajes promedios calculados.

A continuación con la ecuación 4.1 se determina los valores de estos mismos porcentajes para la escala de grises, resultado los siguientes valores: 0, 64, 128, 191, 254, los mismos corresponden a las coordenadas del eje x (ver tabla 4.4).

Con los valores de la tabla 4.4 se construyen cuatro funciones correspondientes a los cuatro rangos establecidos por los porcentajes promedio calculados, tal como se muestra

Tabla 4.3: Porcentajes promedio calculados.

Porcentaje i	Pm_i (Coordenada y)
0	2
25	66
50	128
75	192
99.8	254

Tabla 4.4: Porcentajes promedio calculados y su valor correspondiente en la escala de grises.

i	x	y
0	0	2
25	64	66
50	128	128
75	191	192
99.8	254	254

en la Figura 4.9.

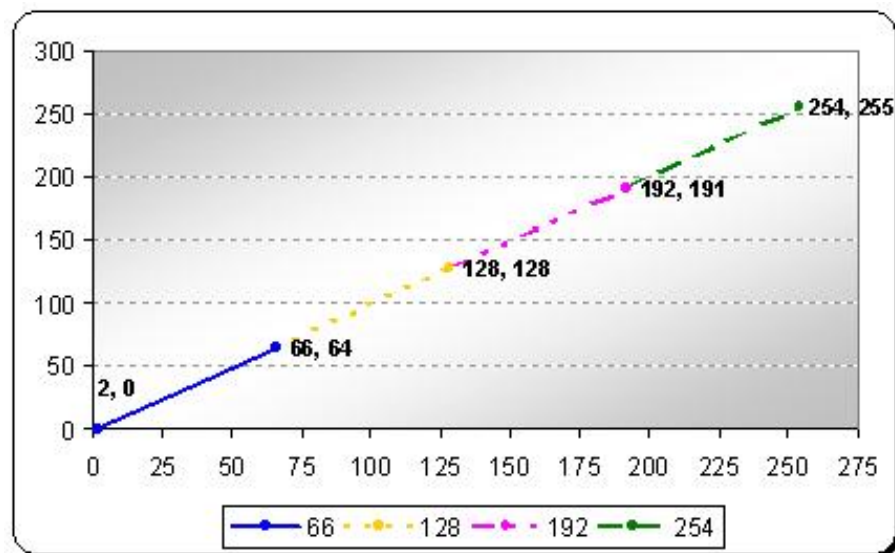


Figura 4.9: Funciones correspondientes a los valores de la tabla 4.4

Las funciones se obtienen sustituyendo en la ecuación de la recta (4.5), los puntos (x, y) correspondientes al porcentaje y su respectivo promedio.

$$y = \left(\frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \right) (X - x_1) + y_1 \quad (4.5)$$

De esta manera se obtienen las 4 funciones representadas por las ecuaciones (4.6), (4.7), (4.8) y (4.9):

$$Y1 = (m)(X - x_1) + y_1 \quad (4.6)$$

$$Y2 = (m)(X - x_2) + y_2 \quad (4.7)$$

$$Y3 = (m)(X - x_3) + y_3 \quad (4.8)$$

$$Y4 = (m)(X - x_4) + y_4 \quad (4.9)$$

Las 4 funciones identificadas en la Figura 4.9, se encuentran expresadas en las ecuaciones (4.10), (4.11), (4.12) y (4.13)

$$Y1 = (1)(X) + 2 \quad (4.10)$$

$$Y2 = (0.9688)(X - 64) + 66 \quad (4.11)$$

$$Y3 = (1.0159)(X - 128) + 128 \quad (4.12)$$

$$Y4 = (0.9688)(X - 191) + 192 \quad (4.13)$$

Como ejemplo de cálculo, para obtener la función del primer tramo de la recta, se toman los datos que se encuentran en la tabla 4.4, y se sustituyen en la ecuación 4.5, como se muestra en (4.14) y al resolver esta ecuación se obtiene la función $Y1$ (4.15).

$$Y1 = \left(\frac{66 - 2}{64 - 0}\right)(X - 0) + 2 \quad (4.14)$$

$$Y1 = (1)(X) + 2 \quad (4.15)$$

De esta misma manera se calculan las otras 3 funciones $Y2$, $Y3$ y $Y4$ representadas por las ecuaciones (4.11), (4.12) y (4.13), respectivamente.

El tercer y último paso de la homogeneización es el filtrado de la imagen. Para filtrar la imagen, el algoritmo toma como dato de entrada el valor de cada píxel $P_{i,j}$ de la imagen en cada componente RGB y, dependiendo del rango en que se encuentra el valor de la componente, calcula su valor correspondiente en el eje Y según la función que le

corresponda en las ecuaciones (4.10), (4.11), (4.12) o (4.13). Por ejemplo, si el valor del píxel era $P_{i,j}R = 86$, $P_{i,j}G = 210$ y $P_{i,j}B = 131$, se calcula el valor de Y mediante el uso de las ecuaciones (4.11), (4.13) y (4.12), respectivamente. A continuación se muestra el cálculo del valor de Y para $P_{i,j} = (86, 210, 131)$:

$$YComponenteR = (0.9688)(86 - 64) + 66 \quad (4.16)$$

$$YComponenteG = (0.9688)(210 - 191) + 192 \quad (4.17)$$

$$YComponenteB = (1.0159)(131 - 128) + 128 \quad (4.18)$$

Una vez calculado el nuevo valor RGB para el píxel en estudio, en este caso $P_{inuevoi,j} = (87, 210, 131)$, el algoritmo sustituye el valor RGB del píxel en estudio por el nuevo valor calculado, es decir, $P_{i,j} = P_{inuevoi,j}$, y de esta misma manera sustituye el RGB de cada píxel de la imagen en estudio.

Aplicación de filtros para el realce de contornos

En esta fase se aplican técnicas de realce de contornos para aquellas imágenes con problemas de contraste, especialmente en aquellos casos en que el fondo y las bacterias tienden a confundirse debido a problemas de luminosidad en la captura, o más aún, problemas de pigmentación de la muestra. Como técnicas de realce se escogieron filtros que implantan operadores basados en gradientes. Como máscaras de convolución se utilizan:

1. Máscara tradicional del filtro Laplaciano (ver máscaras de la Figura 3.9)
2. Máscara de Sobel (ver máscara de la Figura 3.8)
3. Máscara de Prewitt (Figura 4.10)

$$\begin{array}{cccccc} -1 & -1 & -1 & -1 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & -1 & 0 & 1 \end{array}$$

Figura 4.10: Máscaras del operador Prewitt.

4. Operador de Gradiente Consistente [35] (Figura 4.11).

-0.112737	0.000000	0.112737	-0.112737	0.274526	-0.112737
0.274526	0.000000	0.274526	0.000000	0.000000	0.000000
-0.112737	0.000000	0.112737	0.112737	0.274526	0.112737

Figura 4.11: Operador de gradiente consistente.

Segmentación de la imagen microscópica de la muestra bacteriana

Para la segmentación de la imagen digital de la muestra bacteriana se usa el componente ImageJ descrito en la sección 4.3.2 de este documento. El proceso de segmentación de la imagen toma como dato de entrada la imagen bacteriana homogénea y retorna 2 imágenes: una con la identificación de los contornos de los objetos de interés (se identifica como *Contorno*), las bacterias, y la segunda, una imagen binaria con los objetos identificados en negro y el fondo blanco (se identifica como *Objetos*).

El proceso de segmentación se lleva a cabo en dos etapas, la primera de filtrado de la imagen y la segunda de aplicación de la transformada *Watershed*.

En la etapa de filtrado se aplican dos técnicas de procesamiento, la primera denominada *subtract background* [32] y la segunda *Smooth* [33].

El *subtract background* es un filtro que permite extraer el fondo de la imagen mediante la aplicación del algoritmo de rolling ball [31]. Este filtro toma como dato de entrada el valor del radio (ver Figura 4.12) y el color de fondo (blanco o negro), con la finalidad de especificar el color al que se quiere convertir el fondo de la imagen.

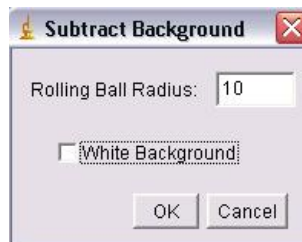


Figura 4.12: Radio del rolling ball del *subtract background*.

Para el caso de las imágenes de las muestras bacterianas, por recomendación de Sage [34], el valor del radio fue colocado en 10 y el color del fondo en negro.

La otra técnica de filtraje aplicada en esta etapa fue un filtro suavizador denominado

smooth, el cual funciona bajo la filosofía de los filtros promediadores (sección 3.5.2), de la siguiente manera: calcula el promedio de la vecindad $vn \times vn$ de cada píxel y lo reemplaza por su valor original. El kernel utilizado por este filtro para una vecindad 3×3 , se puede observar en la tabla 4.5.

Tabla 4.5: Kernel utilizado por el filtro *smooth*.

1	1	1
1	1	1
1	1	1

De igual forma, para el caso de las imágenes de las muestras bacterianas, Sage [34] sugiere tomar el valor del radio en 1.0 (Figura 4.13).

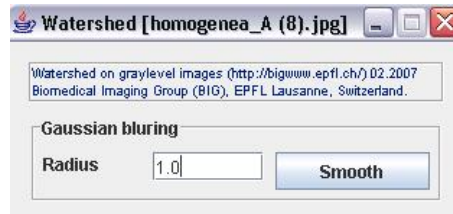


Figura 4.13: Radio del *smooth*.

La segunda etapa de la segmentación procesa la imagen mediante la transformada *Watershed*, con la finalidad de segmentar la misma y, de esta manera, encontrar los objetos de interés como son las bacterias.

El *Watershed* toma como dato de entrada la imagen generada por el *smooth*, se consideran los parámetros reportados por Sage [34]. Debido a que el fondo luego de aplicar el *subtract background* fue llevado a negro, se selecciona la opción Objetos claros/Fondo oscuro (*Bright objects/Darck background*), Precisión 4 (Precision) y Min/Max nivel: 0-100, tal como se muestra en la Figura 4.14.

Una vez procesada la imagen con la transformada *Watershed*, de acuerdo con los parámetros establecidos anteriormente, el ImageJ genera 5 imágenes (Figura 4.15):

- . Imagen binaria con objetos identificados en color negro y fondo blanco (Object/Background binary)

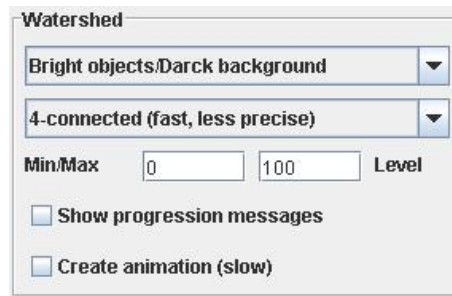


Figura 4.14: Parámetros de la transformada *Watershed*.

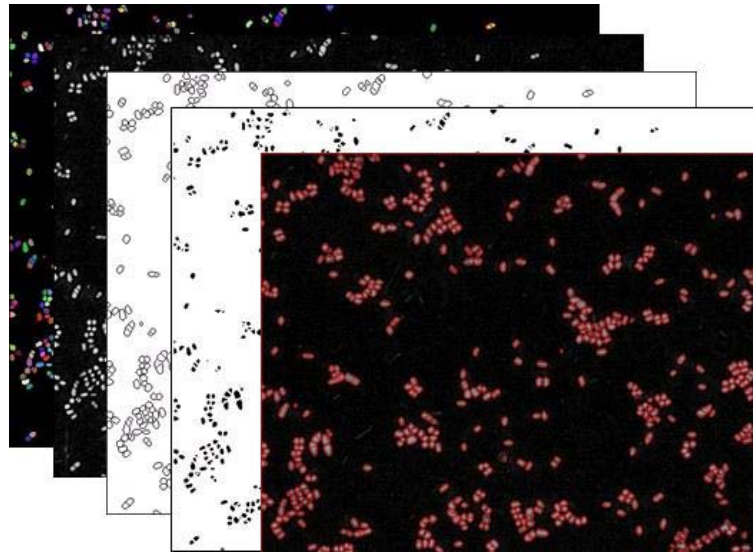


Figura 4.15: Imágenes generadas al aplicar *Watershed*.

- . Imagen binaria con contornos de objetos identificados en color negro y fondo blanco (*Watershed lines*).
- . Imagen con las presas identificadas por líneas de color rojo (*Overlaid dams*).
- . Cuencas etiquetadas por colores aleatorios (*Labelized basins*).
- . Cuencas coloreadas en escala de grises (*Colorized basins*).

De este conjunto de imágenes para la cuantificación de las bacterias sólo se utilizan *Objeto (Object/Background binary)* y *Contorno (Watershed lines)*.

Optimización de la imagen segmentada

Una vez generadas las dos imágenes resultado del *Watershed*, se procede a unir estas imágenes con el objetivo de obtener una imagen binaria sobre la cual estuvieran identificadas tanto el área como los contornos de las estructuras segmentadas.

En la etapa de optimización se diseña e implementa un algoritmo para la unión de las imágenes mencionadas. Para ello se crea una tercera imagen (se identifica como *Union*) con todos sus píxeles en blanco, el algoritmo cambia a rojo los píxeles que dentro de esta imagen coinciden con los píxeles identificados con color negro en la imagen *Contorno*, de la misma forma se cambia a color verde los píxeles que en la imagen *Union* coinciden con los píxeles identificados con color negro en la imagen *Objetos*, de acuerdo con:

Si $PContorno_{i,j}$ es igual a negro entonces

$PUnion_{i,j}$ igual a rojo

Si no $PObjeto_{i,j}$ es igual a negro entonces

$PUnion_{i,j}$ igual verde

donde $PContorno$ son los píxeles correspondientes a la imagen *Contorno*, $PObjeto$ son los píxeles correspondientes a la imagen *Objeto*, $PUnion$ son los píxeles correspondientes a la imagen *Union*, m es el ancho de *Contorno*, *Objeto* y *Union* y n es el alto de *Contorno*, *Objeto* y *Union*. $0 \leq i < m$, $0 \leq j < n$.

La imagen resultante de este procedimiento presenta zonas de interés (bacterias) que no están rellenas completamente por los objetos detectados por el *Watershed*, por lo tanto el algoritmo completa las áreas faltantes en las zonas de interés. Para lograr esto, recorre nuevamente la matriz de datos correspondiente a la imagen, en ventanas de $n \times m$, para cada ventana calcula la cantidad de píxeles negros existentes $pixnegro$, si $pixnegro$ es menor o igual a un umbral preestablecido $porcnegro$, entonces cambia todos los píxeles de la ventana a negro (cero), de lo contrario deja los píxeles con el mismo color (blanco). Para calcular el valor de $pixnegro$ se utiliza la ecuación (4.19).

$$pixnegro = \sum_{i=0}^n \sum_{j=0}^m P_{n_i,j} \quad (4.19)$$

donde $pixnegro$ es la cantidad de píxeles negros en la ventana, n es el ancho de la ventana,

m es el alto de la ventana, P_n son los píxeles negros en la ventana. $0 \leq i < n$, $0 \leq j < m$.

La imagen resultante de este procedimiento (se identifica como *Rellena*), fue convertida en una imagen blanco y negro (se identifica como *Convertida*), donde los píxeles negros representan las bacterias y los píxeles blancos el fondo de la muestra bacteriana. La binarización fue implantada como parte de este trabajo, basada en la sección 3.5.1 del capítulo 3. Para finalizar, a la imagen *Convertida* se le aplica la técnica del negativo de una imagen.

Aplicación del *template matching*

Con el fin de determinar el número de bacterias presentes en la imagen, se diseña e implanta un algoritmo que se basa en la técnica de procesamiento digital de imágenes conocida como *template matching* (sección 3.5.5). Esta técnica consiste en buscar sobre una imagen pequeñas zonas de interés, en este caso las bacterias, mediante la coincidencia de las mismas con plantillas predefinidas que poseen características similares a las zonas de interés de la imagen en estudio. El algoritmo implantado toma como dato de entrada una imagen digital con la muestra bacteriana y retorna una imagen con las bacterias identificadas, devolviendo además el número de bacterias reconocidas en esa imagen.

El algoritmo funciona de la siguiente manera: lee la imagen *Invertida* generada en la fase anterior, que es la imagen sobre la cual se requiere realizar la cuantificación. Seguidamente, se escoge el organismo presente en la imagen de entrada con el fin de seleccionar las plantillas que debe utilizar el algoritmo para el reconocimiento.

Para cada tipo de organismo se crea un conjunto de plantillas m de tamaño $a \times b$ de diferentes formas y posiciones con la finalidad de abarcar en un alto porcentaje las variaciones de las bacterias presentes en cada imagen. Estas plantillas fueron construidas como subimágenes binarias a partir de la imagen original, en las cuales los píxeles negros (valores en 0) representan el fondo y los blancos (valores en 255) las bacterias.

Posteriormente, el algoritmo recorre la imagen original comparando secciones de la imagen del mismo tamaño que la plantilla con cada una de las plantillas pertenecientes al grupo seleccionado, y mediante la aplicación del teorema de la convolución (sección 3.5.2 del documento) se determina la similitud de cada zona de la imagen con la plantilla que

se está evaluando.

El resultado de la convolución es el *Score* del matching, valor que representa el grado de similitud entre el área en estudio y la plantilla. La ecuación de la convolución, fue implantada para este caso de la siguiente manera:

$$Score(i, j) = \frac{\sum_{k=i-a/2, x \leq a} \sum_{l=j-b, y \leq b} f(k, l)g(x, y)}{a \times b} \quad (4.20)$$

donde *Score* es el Score del matching para el píxel (i, j) de la imagen original, a y b son las dimensiones del tamaño de la plantilla, f es la imagen en estudio, g es la imagen de la plantilla. Para $(a/2 \leq x < ancho\ de\ la\ imagen\ original)$ y $(b/2 \leq y < alto\ de\ la\ imagen\ original)$.

Para la evaluación del *Score* se establece el valor de un umbral predefinido, este valor debe ser un número entre 0 y 1. Una vez calculado el *Score* mediante la convolución se procede a determinar si la sección de la imagen en estudio corresponde a bacteria, para ello el algoritmo evalúa el valor *Score*, si éste es mayor o igual al umbral establecido en el matching, se incrementa el contador de bacterias, de lo contrario se continúa con el recorrido sobre la imagen y el análisis respectivo para la siguiente zona.

El recorrido sobre la imagen se lleva a cabo por filas, tomando submatrices del mismo tamaño de la plantilla, es decir, $a \times b$, como se muestra en la Figura 4.16.

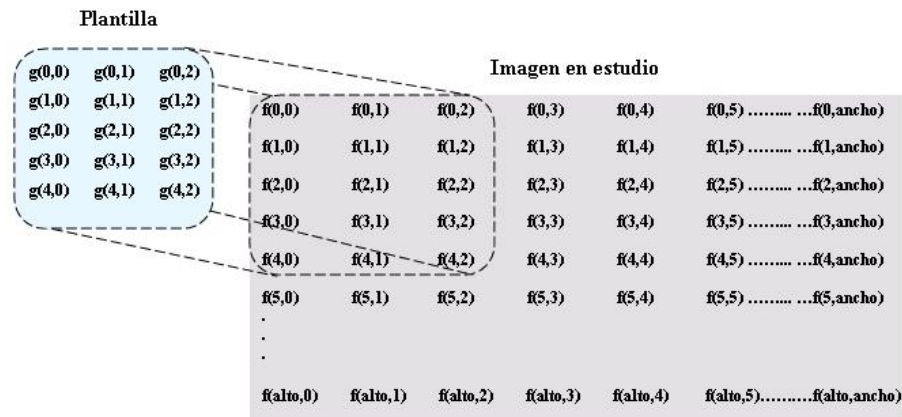


Figura 4.16: Primera submatriz tomada por el algoritmo del *template matching* para el recorrido.

Para cada submatriz se aplica la ecuación (4.20) y se evalúa el *Score*. Si el *Score*

cumple con la condición de aceptación se mueve la ventana a la siguiente submatriz $a \times b$ en la imagen original, es decir, b columnas a la derecha (Figura 4.17). Si por el contrario el valor del *Score* no cumple con la condición de aceptación se mueve la ventana una sola columna a la derecha, tomando esa submatriz de $a \times b$ y se ejecuta el mismo procedimiento (Figura 4.18). Si esa zona es aceptada como bacteria se desplaza la ventana a la siguiente columna múltiplo de b , de lo contrario se sigue desplazando la ventana una sola columna a la derecha (Figura 4.19) hasta alcanzar la siguiente columna múltiplo de b (Figura 4.17), en cuyo caso se repite el mismo procedimiento descrito anteriormente.

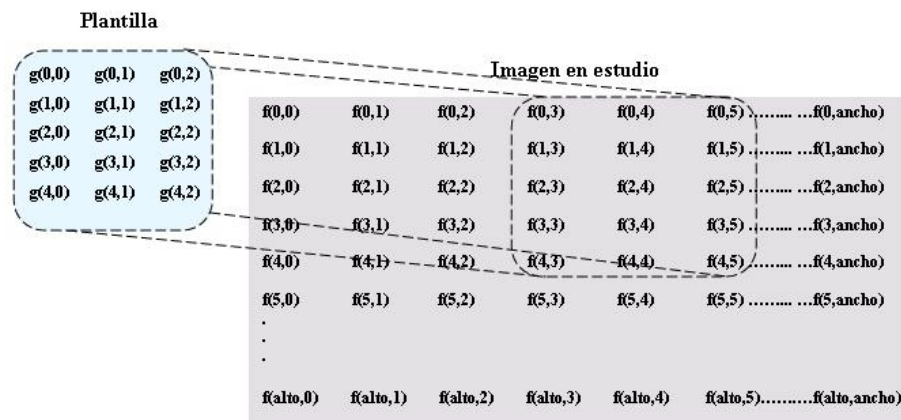


Figura 4.17: Segunda submatriz tomada por el algoritmo del *template matching* para el recorrido.

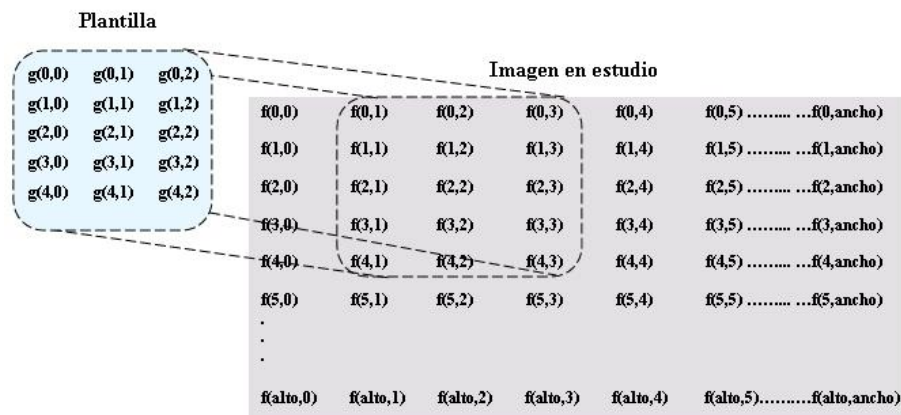


Figura 4.18: Submatriz tomada luego del desplazamiento de una columna por el algoritmo del *template matching* para el recorrido.

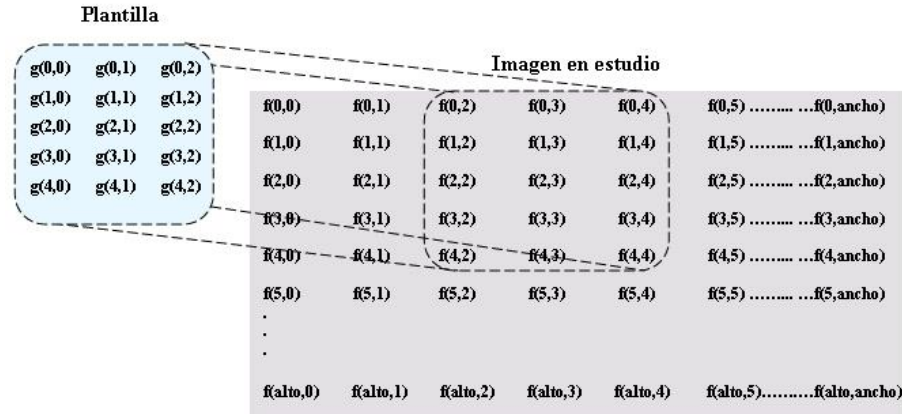


Figura 4.19: Submatriz tomada luego del desplazamiento de n columnas por el algoritmo del *template matching* para el recorrido.

Cada vez que se encuentran en la imagen original píxeles que son identificados como bacterias, se marcan los mismos, con la finalidad de no ser tomados en cuenta nuevamente por el algoritmo en su recorrido. Al finalizar el recorrido por filas, se realiza el mismo recorrido desplazando la ventana sobre la imagen por columnas, con el propósito de tomar en cuenta los píxeles que no son identificados como bacterias durante el recorrido por filas.

Cada recorrido incluye el procedimiento de comparación para todas las plantilla pre-existentes para el microorganismo en estudio.

4.4.2 Determinación de forma y tamaño

La morfología de las bacterias contenidas en un imagen se determina por la forma identificada por los patrones utilizados por el *template matching*.

El cálculo del tamaño promedio de las bacterias presentes en una imagen se realiza aplicando la ecuación de la distancia euclidiana (4.21) entre dos puntos $A(x_1, y_1)$ y $A(x_2, y_2)$. Como se menciona en la sección 3.4, la imagen puede ser analizada como una matriz de datos, donde cada dato es un píxel con coordenadas (x, y) en el plano cartesiano. Por esta razón, el tamaño se determina como el máximo de las distancias existentes entre dos píxeles pertenecientes a una bacteria.

$$d = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2} \quad (4.21)$$

donde d es la distancia entre dos puntos, (x_1, y_1) y (x_2, y_2) son las coordenadas de los puntos.

Tomando como base la ecuación (4.21), se construye la ecuación (4.22) utilizada por el algoritmo diseñado e implantado como parte del producto de este trabajo.

$$T_{am_i} = \max_{j=1}^{num}(d_{ij}) \quad (4.22)$$

donde T_{am_i} es el tamaño de la bacteria i , d es la distancia entre un par de píxeles de la bacteria i , num es el número de bacterias encontradas y j el número de pares de píxeles contenidos en cada bacteria.

Una vez calculado el tamaño de cada bacteria se obtiene el promedio del tamaño de las bacterias contenidas en la imagen, sustituyendo los tamaños encontrados en la ecuación (4.23).

$$TamProm = \left(\sum_{i=0}^{num} T_{am_i} \right) / num \quad (4.23)$$

donde $TamProm$ es el tamaño promedio de las bacterias, T_{am_i} es el tamaño de la bacteria i y num es el número de bacterias encontradas.

El algoritmo toma como datos de entrada la imagen generada por el *template matching* con las bacterias identificadas y la cantidad de bacterias encontradas, registradas en el contador de bacterias descrito en la sección anterior.

El tamaño promedio obtenido está expresado en píxeles, con la finalidad de establecer su equivalencia a micras (μ)⁴, fue necesario calcular la cantidad de píxeles que abarcan una μ .

Para determinar esta equivalencia, se debe capturar a través del microscopio la imagen digital del patrón de calibración en μ . En tal sentido, se desarrolla una aplicación para la identificación interactiva (usuario-computador) con ayuda del ratón, de los puntos de la imagen que identifica las coordenadas del inicio y fin de una línea que define una μ sobre la imagen. La separación entre cada par de líneas en la imagen de la Figura 5.35 corresponde a una μ . Se utiliza la ecuación (4.21) para obtener el valor en píxeles de una μ .

⁴Medida de longitud utilizada para medir cuerpos muy pequeños ($10^{-3}mm$)

4.5 Identificación de colonias de bacterias

En esta etapa se llevan a cabo las tareas necesarias para caracterizar las colonias de bacterias presentes en la imagen de la muestra, determinando la cantidad y calculando el tamaño promedio de las mismas.

4.5.1 Cuantificación

Con el propósito de automatizar la cuantificación de colonias de bacterias en imágenes de microscopía, se establecieron las siguientes fases: homogeneización del fondo de la imagen, aplicación de filtros para el realce de contornos, segmentación de la imagen mediante la transformada *Watershed*, optimización de la imagen segmentada y aplicación de técnica recursiva. En el diagrama de flujo de la figura 4.20 se presentan las fases mencionadas anteriormente.

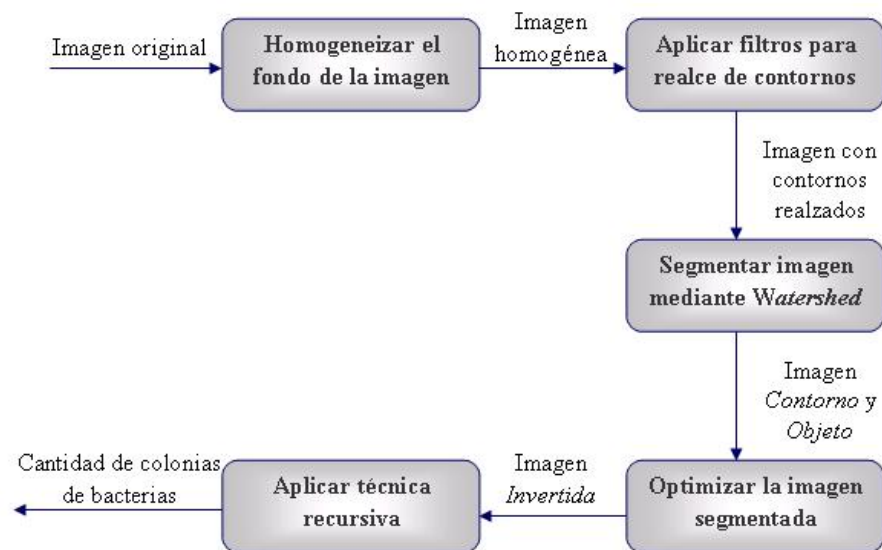


Figura 4.20: Diagrama de flujo de las fases de la cuantificación de colonias

Las primeras 4 fases fueron desarrolladas en la sección 4.4.1. La última fase, aplicación de técnica recursiva, se explica a continuación.

Aplicación de técnica recursiva

Para la determinación del número de bacterias presentes en la imagen de la muestra bacteriana, se diseñó e implantó un algoritmo basado en recursividad en programación. Una función se dice que es recursiva, si una expresión en el cuerpo de una función llama a la propia función [36]. La recursividad es entonces el proceso de definir algo en términos de si mismo [36]. El algoritmo recursivo tuvo como finalidad buscar en los píxeles con el valor correspondiente a la presencia de bacterias (blanco-255) e irlos marcando como pertenecientes a una colonia de bacterias.

El algoritmo utiliza como datos de entrada la imagen *invertida* (imagen binaria correspondiente a la inversa de la fusión entre los objetos y el contorno identificados en la segmentación), una matriz de datos *mdatos* de *ancho* \times *alto* que inicialmente tiene todos sus valores en cero (0) y un contador de colonias con valor inicial igual a uno (1). El algoritmo recorre la imagen píxel por píxel, y evalúa el valor de cada uno de ellos de la siguiente manera: si el valor de las componentes RGB del píxel es igual a 255, asigna en esa posición (i, j) de *mdatos* el valor del contador de colonias e incrementa este contador en uno (1) y procede a llamar la función recursiva, la cual realiza el mismo procedimiento para los píxeles superior $(i - 1, j)$, inferior $(i + 1, j)$, derecho $(i, j + 1)$ e izquierdo $(i, j - 1)$, y así sucesivamente la función se llama así misma, hasta que el píxel en estudio no cumple con la condición de igualdad, es decir, tiene valor cero (0) (forma parte del fondo).

Cada vez que el píxel en estudio cumple la condición establecida, se marca la matriz de datos con el valor del contador de bacterias, identificándolo como perteneciente a dicha colonia. Cuando se encuentra un píxel que no cumple con la condición establecida finalizan las llamadas recursivas a la función, se evalúa un nuevo píxel en el recorrido general de la imagen (Figura 4.21), incrementándose el contador de colonias y realizándose el mismo procedimiento hasta que finaliza el recorrido de la imagen.

Una vez finalizado este recorrido, la cantidad de colonias de bacterias queda registrada en el contador de colonias, e identificadas por distintos colores en la imagen resultado.

En la imagen resultado el algoritmo identifica todas las agrupaciones de píxeles contenidas en la imagen. Como las colonias de bacterias son aquellos grupos de mas de una bacteria, es necesario aplicar un filtro que discrimine de las colonias encontradas, aquellas

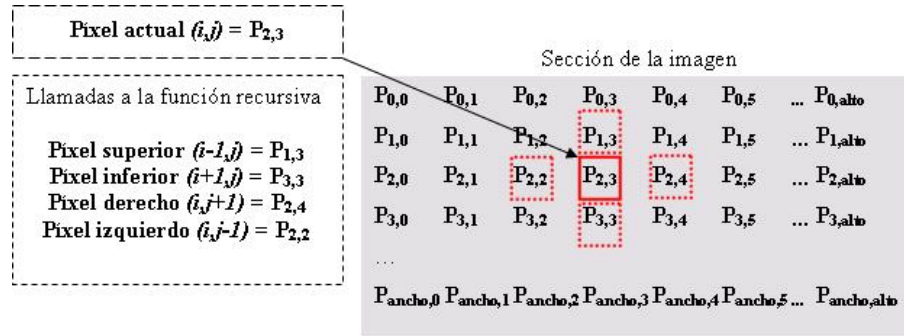


Figura 4.21: Llamadas recursivas de la función de la cuantificación de colonias de bacterias.

que estén formadas por una sola bacteria.

Para lograr este objetivo se diseña e implanta un algoritmo que procesa la imagen resultante, de la siguiente manera, recorre la matriz de datos contando la cantidad de píxeles $CantPix$ que fueron identificados como parte de una colonia a través de su número, por ejemplo para la colonia No. 25 los datos pertenecientes a ella fueron marcados con el No.25 en la $mdatos$; además promedia la cantidad de píxeles identificados como bacterias en las plantillas correspondientes a ese organismo, de acuerdo con la ecuación 4.24

$$PPlantilla = \left(\sum_{i=0}^{i < np} PiPlantilla_i \right) / np \quad (4.24)$$

donde $PPlantilla$ es igual al promedio de píxeles identificados como bacteria en cada plantilla, np es el número de plantillas, $PiPlantilla$ es igual al número de píxeles identificados como bacteria en cada plantilla. $0 \leq i < np$.

Cada valor $CantPix$ obtenido se compara con $PPlantilla$, si $CantPix$ es mayor o igual que $PPlantilla$, significa que esa colonia está formada por mas de una bacteria, de lo contrario decrementa en uno (1) el contador de colonias y marca con cero(0) los valores correspondientes a esa colonia en la matriz de datos. El resultado de este algoritmo es una imagen con las colonias de bacterias depuradas y la cantidad de colonias encontradas.

4.5.2 Determinación del tamaño de colonias de bacterias

El tamaño promedio de las colonias de bacterias se calcula con el mismo procedimiento propuesto en la sección 4.4.2, con la diferencia de que las ecuaciones son aplicadas a todos

los píxeles pertenecientes a una colonia. En este caso, el algoritmo toma como dato de entrada la imagen generada en la sección anterior y el número de colonias determinado igualmente en la etapa anterior y registrado en el contador de colonias.

Capítulo 5

Resultados y Discusión

5.1 Introducción

Para probar la metodología propuesta para la caracterización de bacterias, se realizaron tres experimentos con imágenes microscópicas de muestras bacterianas. En el primer experimento se procesan dos imágenes de alto contraste, en las cuales las bacterias se encuentran bien diferenciadas del fondo. En el segundo experimento se procesa una imagen con problemas de contraste, debido a que en algunas regiones los tonos del fondo coinciden con los tonos de las bacterias. En el tercer experimento se procesa una imagen con pobre contraste y, por tanto, con dificultad para identificar las bacterias.

En las Figuras 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4, se observan las imágenes originales que fueron procesadas en los tres experimentos. Estas imágenes al ser procesadas directamente por técnicas de reconocimiento de patrones (*template matching*) no producen resultados confiables, debido a variaciones en los fondos de las imágenes, bacterias muy tenues, similitud en las tonalidades de algunas agrupaciones de bacterias y los fondos, y agrupaciones de bacterias con bordes poco diferenciados.

5.2 Identificación de bacterias individuales

En esta etapa se ejecutaron las fases descritas en la metodología (ver sección 4.4) con la finalidad de obtener los resultados de la cuantificación de bacterias y la determinación de



Figura 5.1: Primera imagen original del experimento 1.



Figura 5.2: Segunda imagen original del experimento 1.

forma y tamaño promedio.

5.2.1 Cuantificación

En cada una de las fases se utilizan los mismos tres experimentos (Figuras 5.1 a la 5.4) para probar la cuantificación de bacterias. Los resultados generados en cada fase se presentan



Figura 5.3: Imagen original del experimento 2.



Figura 5.4: Imagen original del experimento 3.

a continuación:

Homogenización del fondo de la imagen de microscopía de la muestra bacteriana

- Experimento Nro. 1. Imágenes con alto contraste
-

Los resultados obtenidos de aplicar la técnica de homogeneización a las imágenes de este experimento, se muestran en las Figuras 5.5 y 5.6.



Figura 5.5: Imagen homogeneizada que corresponde a la imagen de la Figura 5.1.

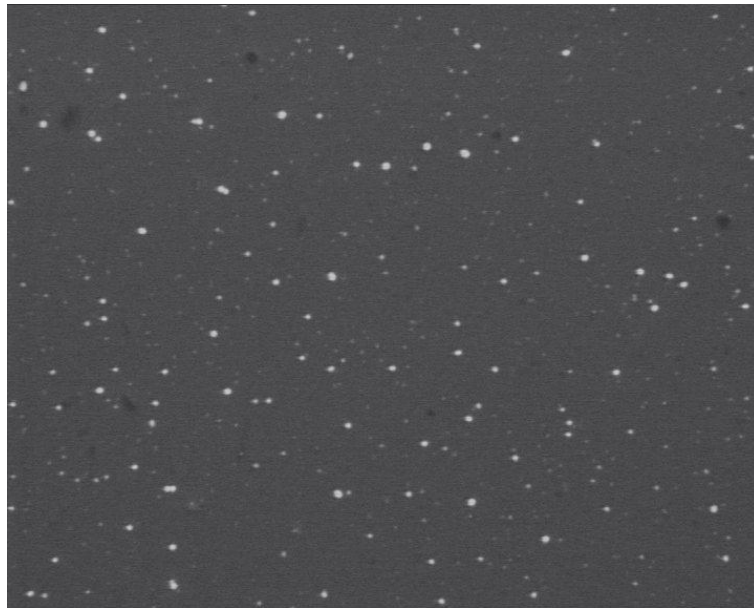


Figura 5.6: Imagen homogeneizada que corresponde a la imagen de la Figura 5.2.

- Experimento Nro. 2. Imágenes con problemas de contraste.

Al procesar la imagen de la Figura 5.3 mediante la técnica de homogeneización, se obtuvo como resultado la imagen de la Figura 5.7.

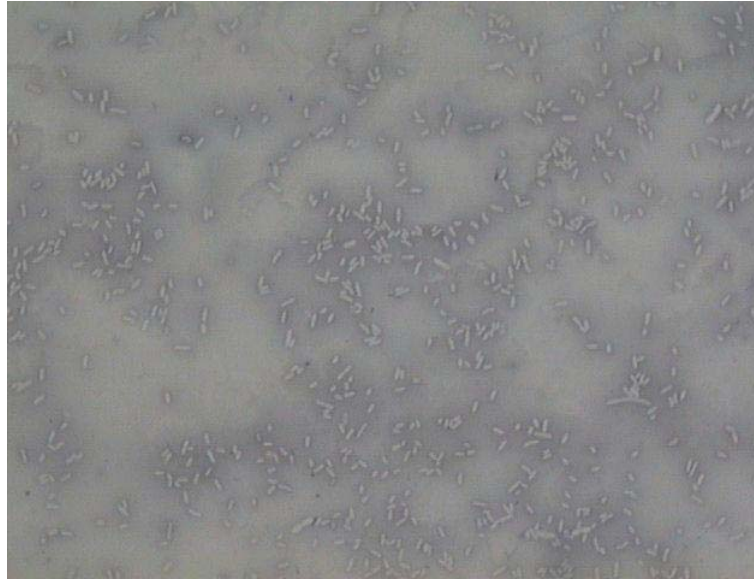


Figura 5.7: Imagen homogeneizada que corresponde a la imagen de la Figura 5.3.

- Experimento Nro. 3. Imágenes con pobre contraste.

El resultado del proceso de homogeneización de la imagen de la Figura 5.4, es la imagen que se muestra en la Figura 5.8.



Figura 5.8: Imagen homogeneizada que corresponde a la imagen de la Figura 5.4.

En las Figuras 5.5 a la 5.8, se observa que la aplicación del filtro de homogeneización permite nivelar los tonos correspondientes al fondo y a los objetos de interés (bacterias),

lo que facilita la visualización de estos microorganismos.

Aplicación de filtros para el realce de contornos

- Experimento 1. Imágenes con alto contraste

Para las imágenes (Figuras 5.5 y 5.6) de este experimento no se aplicaron filtros con operadores basados en gradientes debido a que por su alto contraste, son segmentadas adecuadamente por la transformada *Watershed* y el *template matching* y, de esta manera, se evita el gasto computacional que representa el procesamiento de imágenes con esos filtros.

- Experimento 2. Imágenes con problemas de contraste.

La imagen procesada en este experimento (Figura 5.7) fue filtrada con el operador de gradiente consistente definido en la Figura 4.11 [35]. El resultado de este filtrado se observa en la imagen de la Figura 5.9.

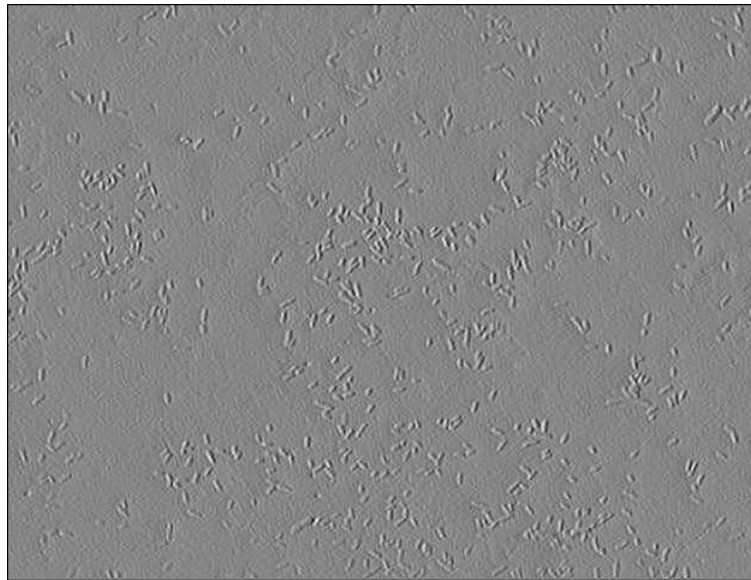


Figura 5.9: Imagen filtrada que corresponde a la imagen de la Figura 5.7.

- Experimento 3. Imágenes con pobre contraste.

La imagen procesada en este experimento (Figura 5.8) fue filtrada con el operador de gradiente consistente y con la misma máscara definida para el Experimento 2. El

resultado de este filtrado se observa en la imagen de la Figura 5.10.

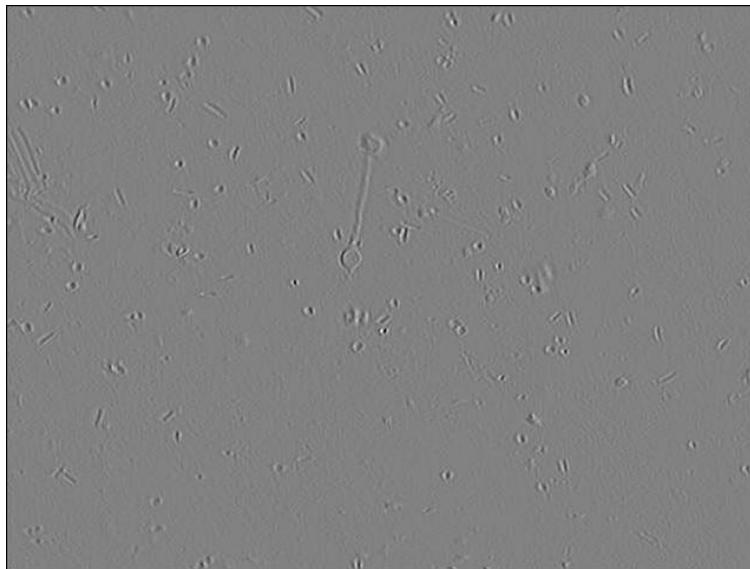


Figura 5.10: Imagen filtrada de la Figura 5.8.

Como se observa en las Figuras 5.9 y 5.10, el filtro resaltó los cambios bruscos existentes en las imágenes, los cuales significan bordes de bacterias o colonias. Este realce en los bordes favorece la segmentación de la imagen.

Segmentación de la imagen de microscopía de la muestra bacteriana

- Experimento 1. Imágenes con alto contraste.

En la etapa de filtrado de la fase de segmentación, se aplicó el filtro *subtract background* a las dos imágenes en estudio (Figuras 5.5 y 5.6), como resultado se obtuvo las imágenes de las Figuras 5.11 y 5.12. Posteriormente a las imágenes de las Figuras 5.11 y 5.12 se les aplicó el filtro *smooth* dando como resultado las imágenes de las Figuras 5.13 y 5.14.

Para cada imagen los parámetros del filtro fueron fijados en 10 y 0.1, respectivamente. El color del fondo en el *subtract background* fue de negro para las dos imágenes.

En las Figuras 5.11 y 5.12 se observa la sustracción de fondo o cambio a color negro realizada por el filtro utilizado. Así mismo, en las Figuras 5.13 y 5.14 se aprecia el suavizado de bordes identificado por la aparición de borrosidad en la imagen.

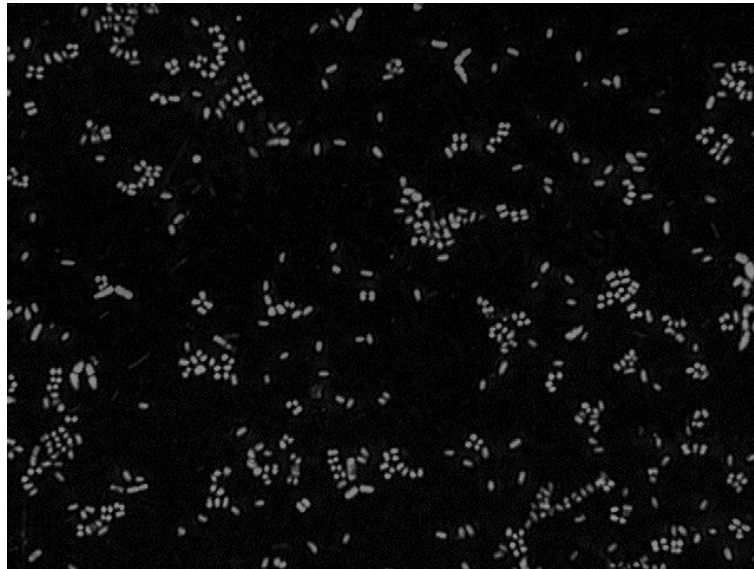


Figura 5.11: Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.5 por el *subtract background*.



Figura 5.12: Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.6 por el *subtract background*.

Como resultado de la aplicación de estos filtros se disminuye la sobre segmentación, lo que evita la identificación de áreas de fondo como bacterias.

En la etapa de aplicación de la transformada *Watershed* a las imágenes de las Figuras

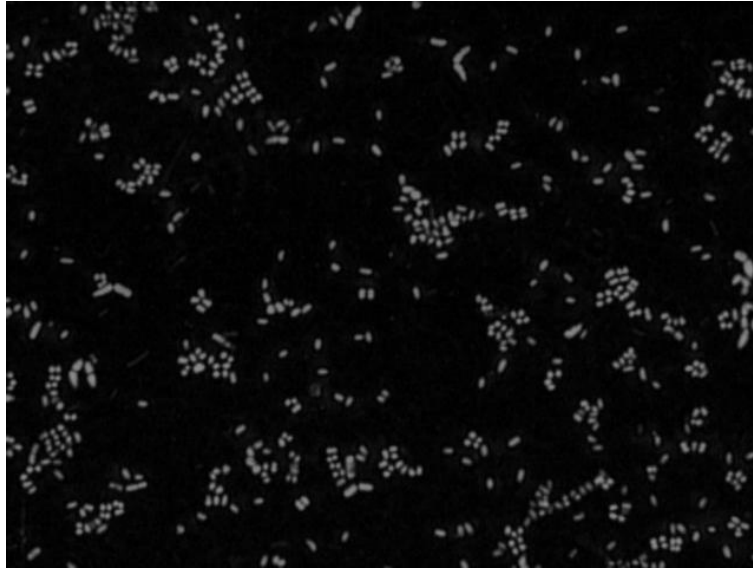


Figura 5.13: Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.11 por el *smooth*.

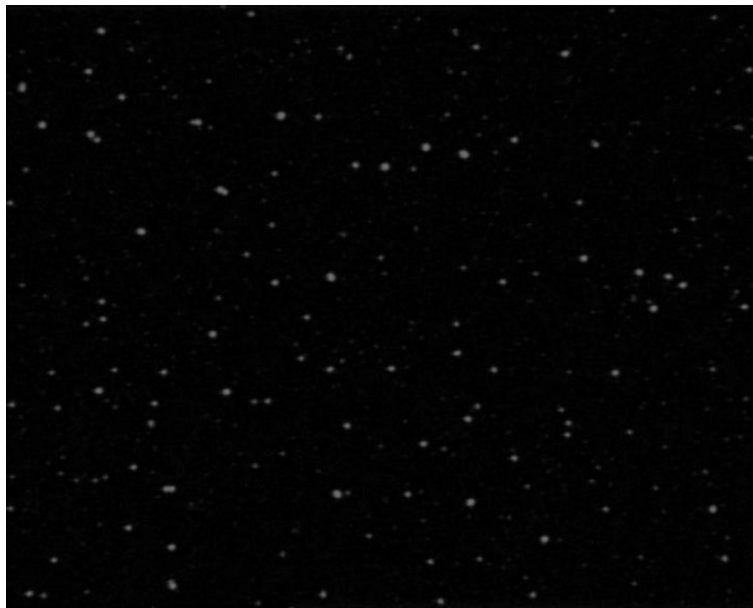


Figura 5.14: Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.12 por el *smooth*.

5.13 y 5.14, se generan 4 imágenes, dos por cada imagen de entrada.

En cada segmentación, la primera imagen resultante contiene la fragmentación de objetos (se identifica con el nombre de *objeto*) y la segunda imagen resultante contiene la identificación de los contornos correspondientes a los objetos de interés en la imagen original (se identifica con el nombre de *Contorno*).

La imagen Objeto y Contorno correspondientes a las imágenes procesadas se muestran en la Figuras 5.15 y 5.16.

En las Figuras 5.15 y 5.16 se observa que la segmentación separó el fondo (color blanco) de los objetos de interés que son las bacterias, permitiendo la identificación de estos organismos.

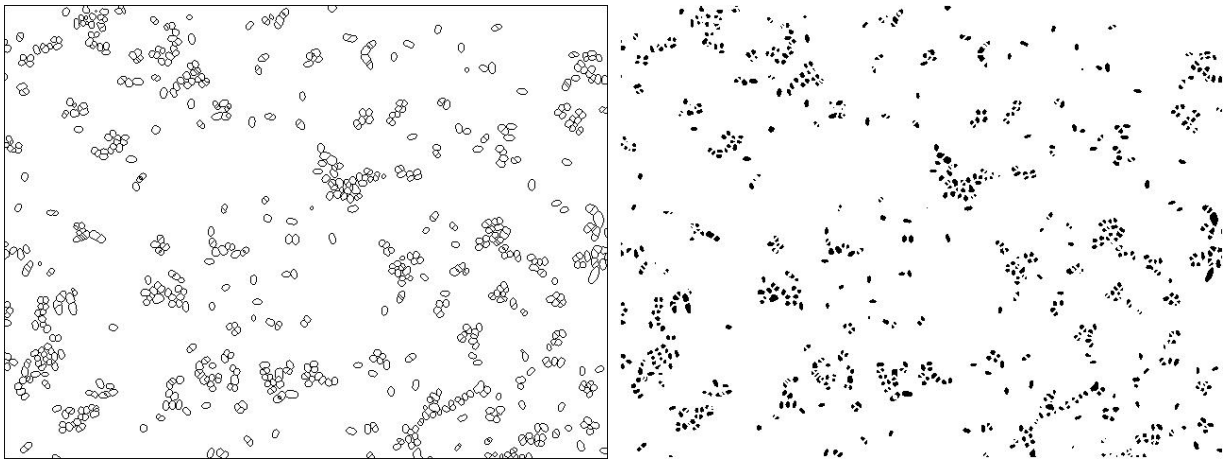


Figura 5.15: Imágenes resultantes de la aplicación del *Watershed* a la imagen de la Figura 5.13.

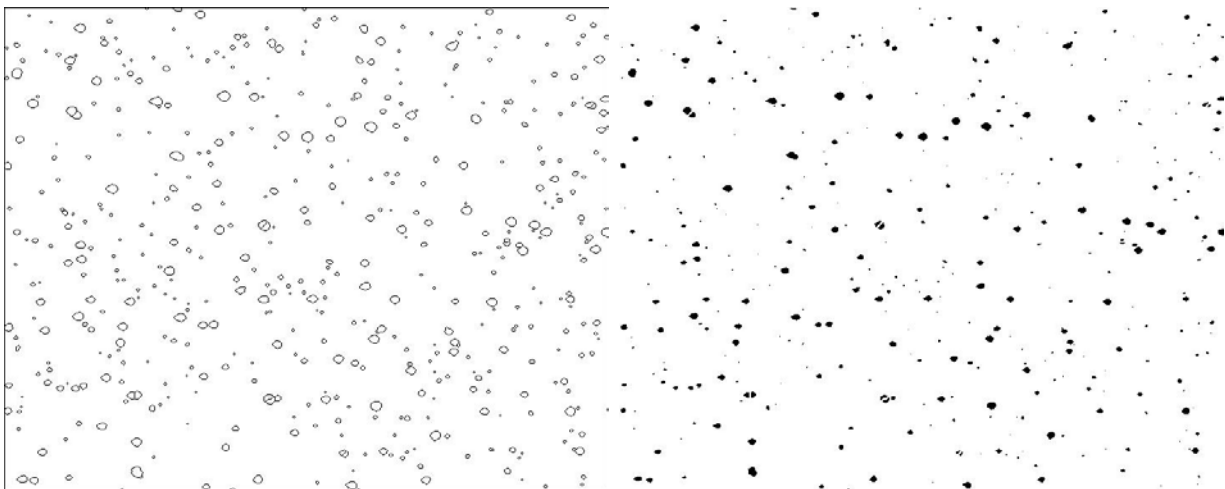


Figura 5.16: Imágenes resultantes de la aplicación del *Watershed* a la imagen de la Figura 5.14.

- Experimento 2. Imágenes con problemas de contraste.

La imagen de la Figura 5.9 fue filtrada con el *subtract background* y el *smooth*. El radio para cada filtro de 10 y 0.8, respectivamente. El color de fondo para el *subtract Background* se fija en negro. El resultado del procesamiento de cada filtro se puede observar en las imágenes de las Figuras 5.17 y 5.18.

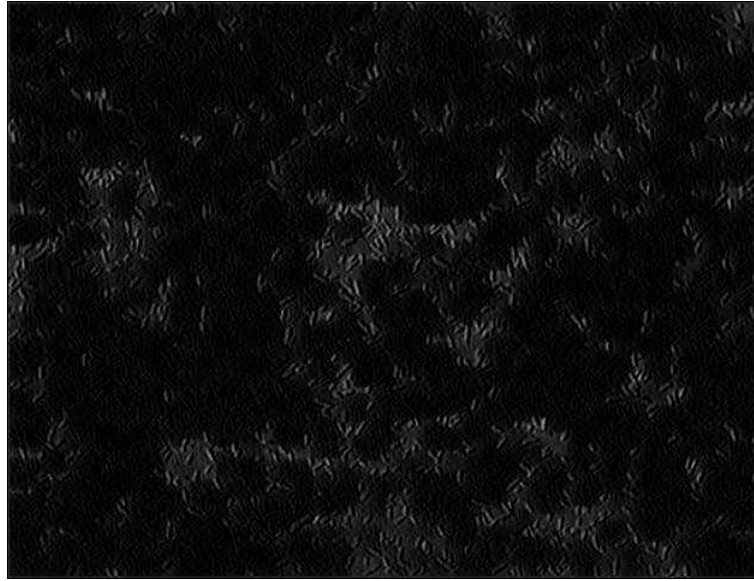


Figura 5.17: Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.9 por el *subtract background*.

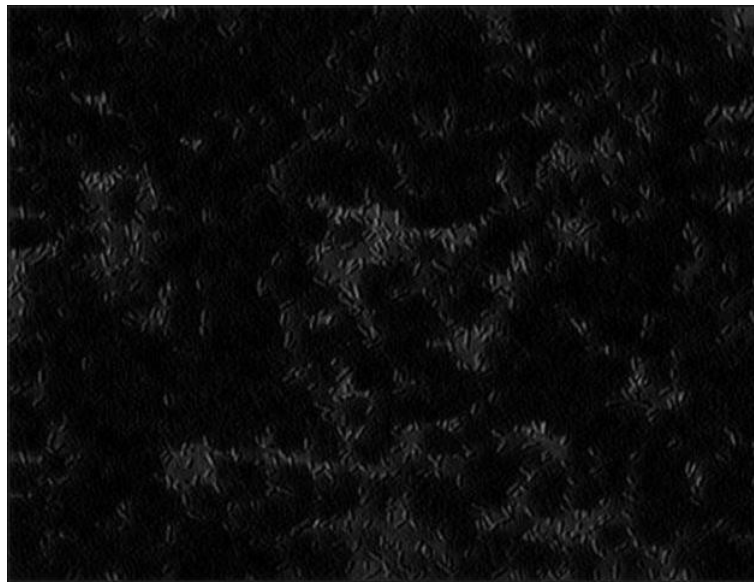


Figura 5.18: Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.17 por el *smooth*.

En las Figuras 5.17 y 5.18 se observa la sustracción de fondo y suavizado de bordes realizados por los filtros.

La segmentación de la imagen de la Figura 5.18 con la transformada *Watershed* genera dos imágenes (Figura 5.19), la primera imagen contiene la fragmentación de objetos (denominada Objeto) y la segunda imagen contiene la identificación de los contornos correspondientes a los objetos de interés en la imagen original (Contorno).

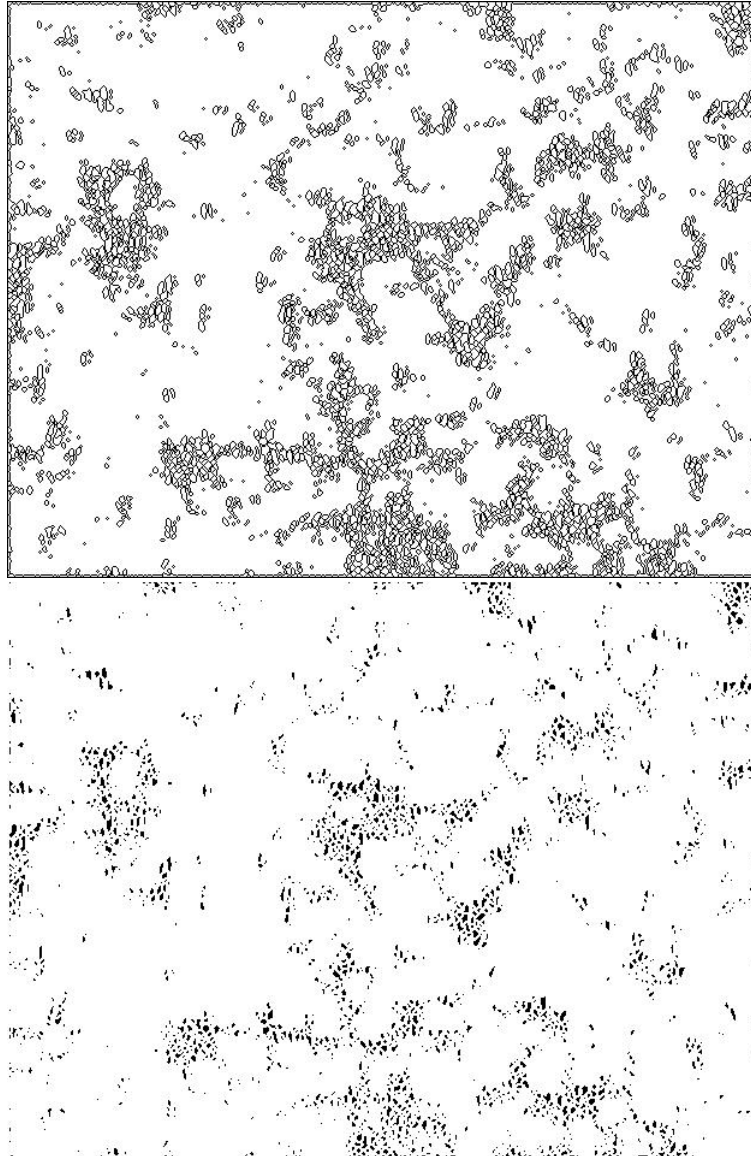


Figura 5.19: Imágenes resultantes de la aplicación del *Watershed* a la imagen de la Figura 5.18.

En la Figura 5.19 se observa que la segmentación separó el fondo (color blanco) de

los objetos de interés que son las bacterias, permitiendo la identificación de estos organismos.

- Experimento 3. Imágenes con pobre contraste.

En la etapa de filtrado se procesa la imagen (Figura 5.10) con el *subtract background* y el *smooth*. El radio para cada filtro fue de 10 y 1.0, respectivamente. El color de fondo para el *Subtract Background* es negro. En las imágenes de las Figuras 5.20 y 5.21 se observa el resultado del procesamiento de cada filtro.

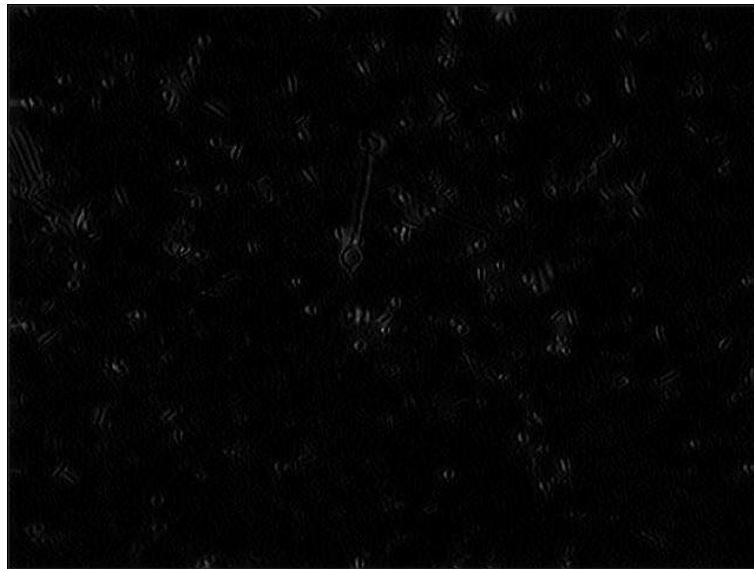


Figura 5.20: Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.10 por el *subtract background*.

En las Figuras 5.20 y 5.21 se observa la sustracción de fondo y suavizado de bordes realizados por los filtros.

La aplicación de la transformada *Watershed* a la imagen de la Figura 5.21 genera dos imágenes (Figura 5.22) como resultado del proceso de segmentación. La primera imagen contiene la fragmentación de objetos (se identifica como Objeto) y la segunda imagen contiene la identificación de los contornos correspondientes a los objetos de interés en la imagen original (se identifica como Contorno).

En la imagen de la Figura 5.22 se observa la sobre segmentación realizada a la imagen de la Figura 5.21, ésto como consecuencia de la pobre resolución y bajo contraste

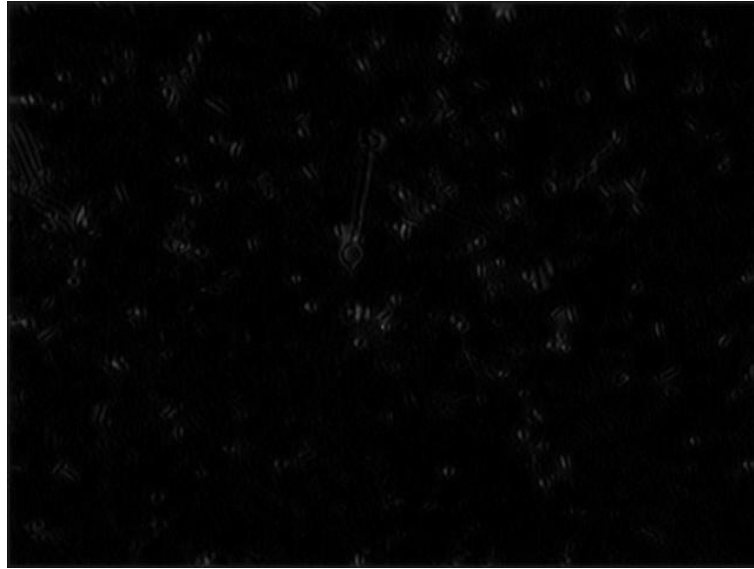


Figura 5.21: Imagen resultante del filtrado de la imagen de la Figura 5.20 por el *smooth*.

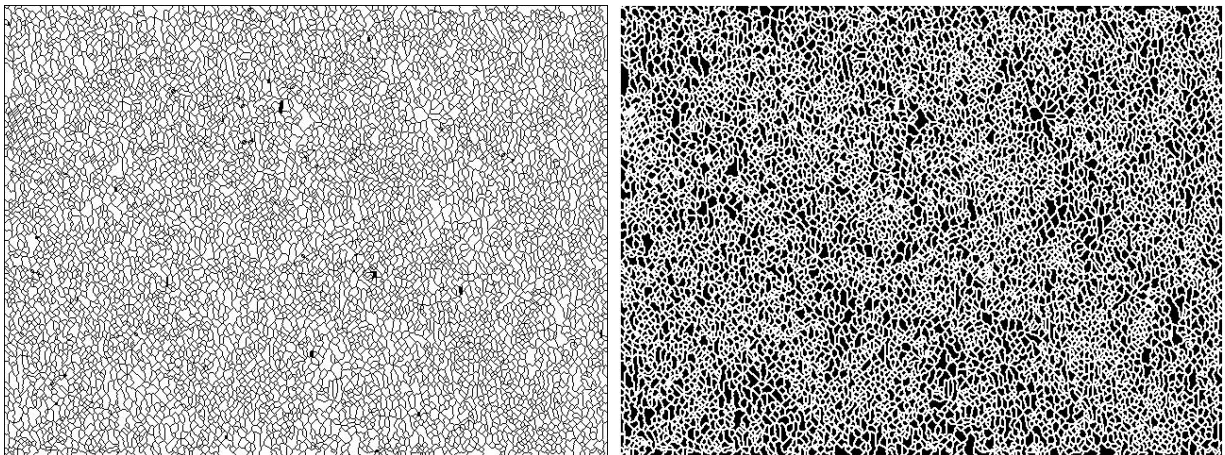


Figura 5.22: Imágenes resultantes de la aplicación del *Watershed* a la imagen de la Figura 5.21.

presentado por la imagen original (Figura 5.4), lo cual origina detecciones de falsos bordes por parte del *Watershed*. La sobresegmentación presentada imposibilita la identificación de bacterias, razón por la cual no se puede continuar a las siguiente fase con este experimento.

Optimización de la imagen segmentada

- Experimento 1. Imágenes con alto contraste.

Las imágenes contorno y objeto (Figuras 5.15 y 5.16) son procesadas con la finalidad de unir las en una sola imagen. La fusión de la imagen de la Figura 5.15 da como resultado la imagen de la Figura 5.23.

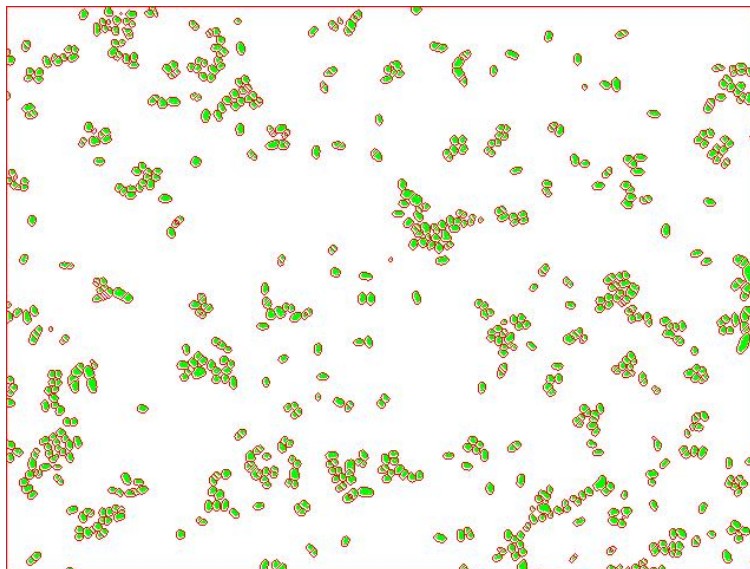


Figura 5.23: Imagen resultante de la fusión de las imágenes de la Figura 5.15.

En la Figura 5.24 se observa la imagen resultante de la union de las imágenes de la Figura 5.16.

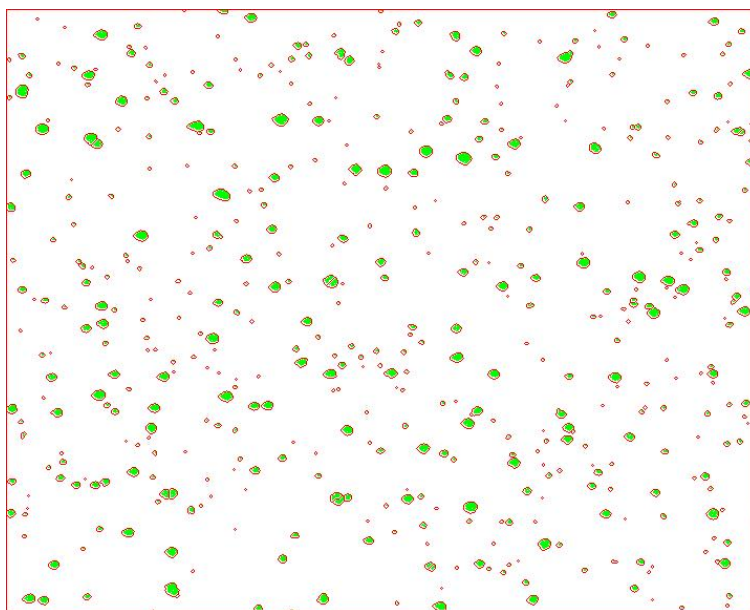


Figura 5.24: Imagen resultante de la fusión de las imágenes de la Figura 5.16.

En las imágenes de estas Figuras resultantes los contornos están representados por el color rojo y los objetos por el color verde.

Con la finalidad de cubrir las zonas que quedaron en blanco entre los objetos y contornos de las imágenes de las Figuras 5.23 y 5.24, se aplica un procesamiento adicional que genera como resultado las imágenes de las Figuras 5.25 y 5.26, en la cual las zonas rellenas se observan en color azul.

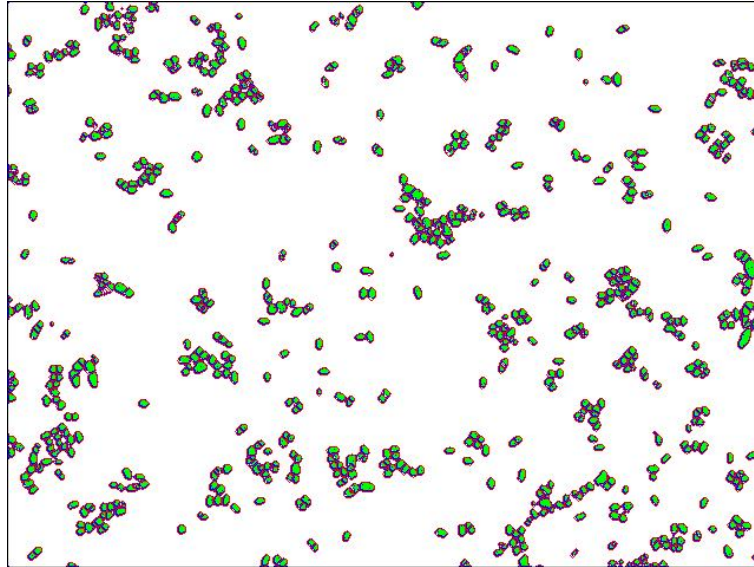


Figura 5.25: Imagen resultante del procedimiento adicional aplicado a la imagen de la Figura 5.23.

Finalmente, estas imágenes son binarizadas e invertidas con la finalidad de ser usada por el *template matching* en el conteo. Las imágenes binaria e invertida de las Figuras 5.25 y 5.26, se muestran en las Figuras 5.27 y 5.28 respectivamente.

En las Figuras 5.27 y 5.28 se observan las áreas correspondientes a las bacterias, como resultado de la fase de afinación de la imagen.

- Experimento 2. Imágenes con problemas de contraste.

Las imágenes Contorno y Objeto (Figura 5.19) son procesadas con la finalidad de mezclarlas en una sola imagen. El resultado de esta unión se observa en la Figura 5.29. donde los bordes están representados por el color rojo y los objetos por el color verde.

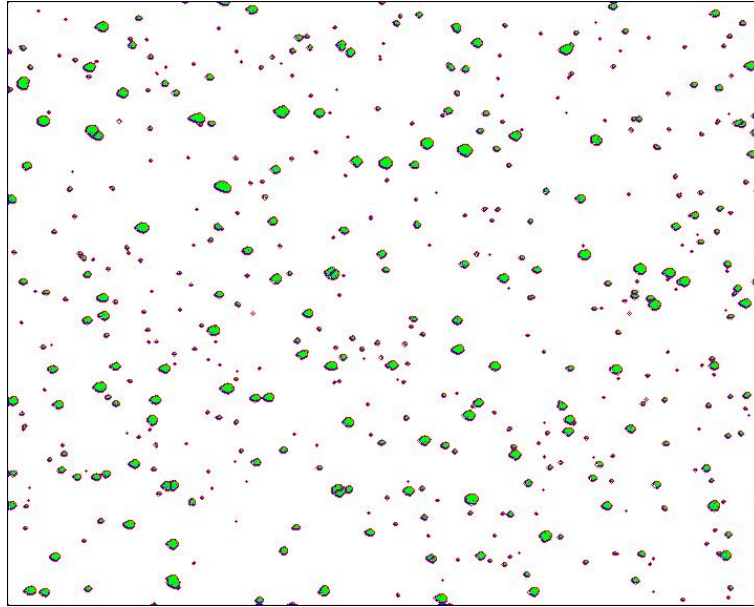


Figura 5.26: Imagen resultante del procedimiento adicional aplicado a la imagen de la Figura 5.24.

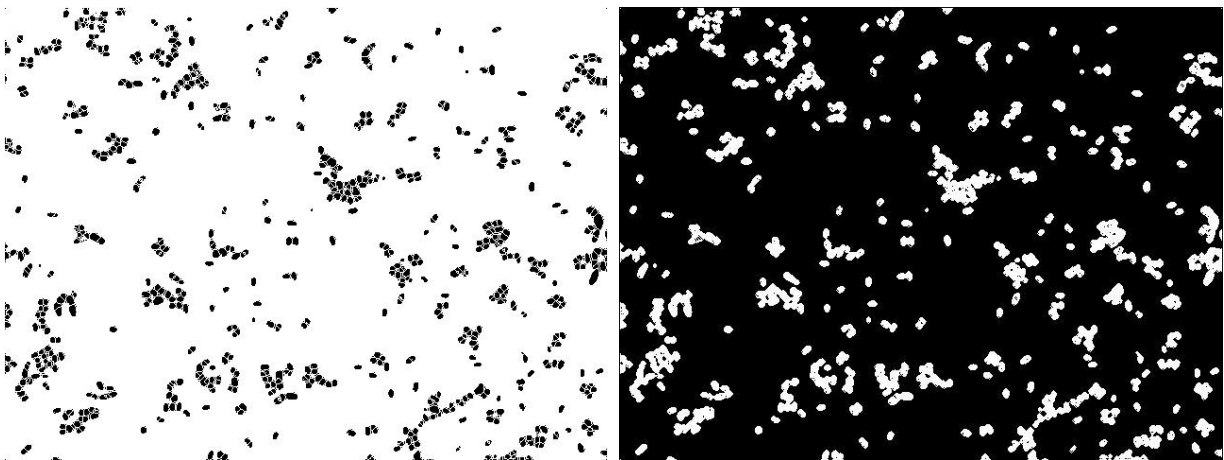


Figura 5.27: Imagen binaria e invertida de la Figura 5.25.

Con la finalidad de cubrir las zonas que quedaron en blanco entre los objetos y contornos de la imagen de la Figura 5.29, se aplica un procesamiento adicional que genera como resultado la imagen de la Figura 5.30, en la cual las zonas rellenas se observan en color azul.

Finalmente, esta imagen es binarizada e invertida con la finalidad de ser usada por el *template matching* en el conteo. La imágenes binaria e invertida de la Figura 5.30,

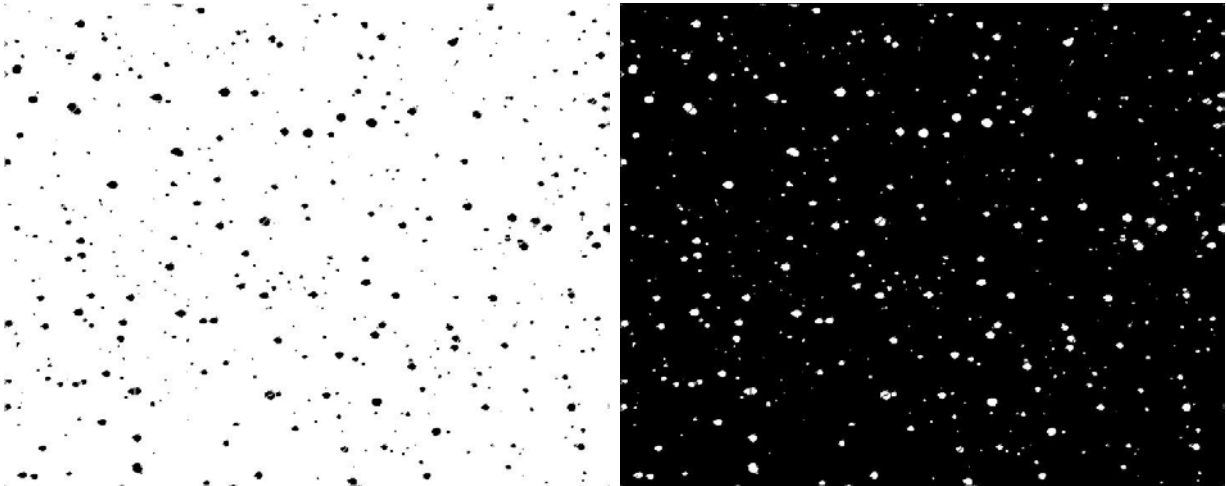


Figura 5.28: Imagen binaria e invertida de la Figura 5.26.

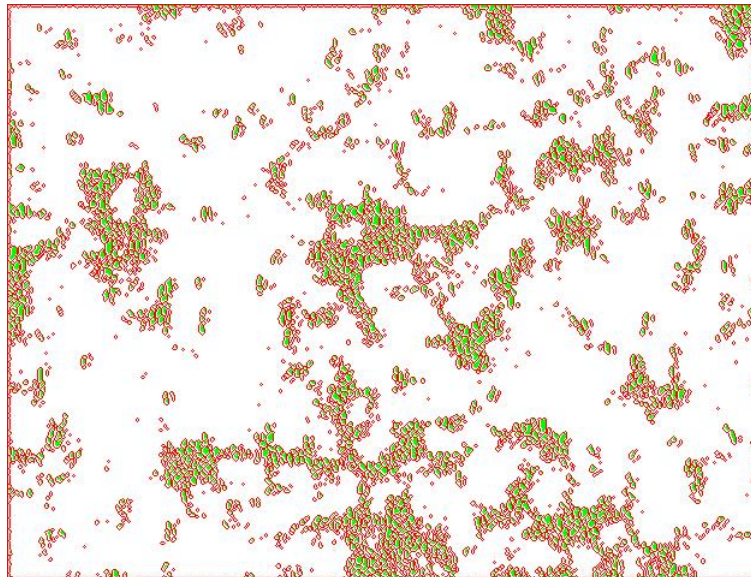


Figura 5.29: Imagen resultante de la fusión de las imágenes de la Figura 5.19.

se muestra en la Figura 5.31.

En la Figura 5.31 se observan las áreas correspondientes a las bacterias, como resultado de la fase de afinación de la imagen.

Aplicación del *template matching*

- Experimento 1. Imágenes con alto contraste.

El *template matching* es aplicado a las imágenes de las Figuras 5.27 y 5.28, con 7

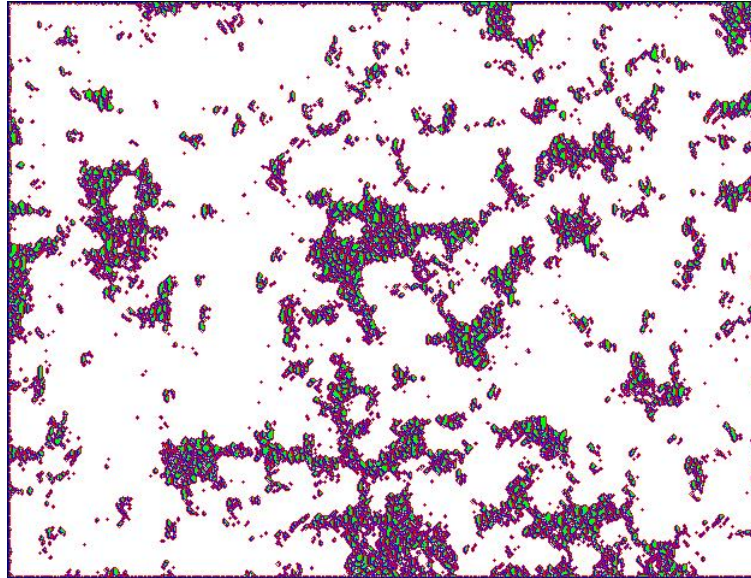


Figura 5.30: Imagen resultante del procedimiento adicional aplicado a la imagen de la Figura 5.29.

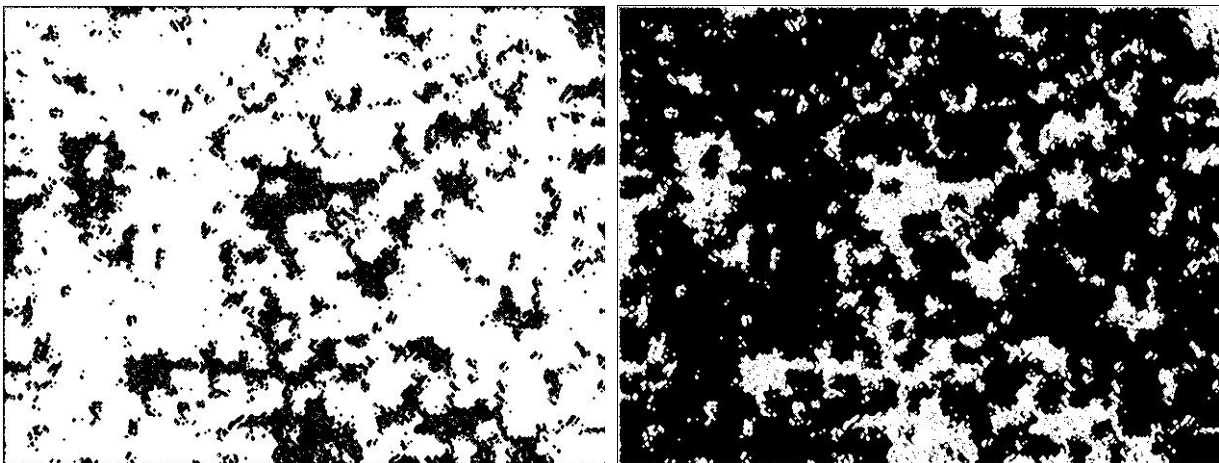


Figura 5.31: Imagen binaria e invertida de la Figura 5.30.

(primera imagen) y 6 (segunda imagen) patrones predefinidos para cada organismo. El resultado de este proceso representa la cantidad de bacterias existentes en cada imagen, como se observa en su correspondiente imagen en las Figuras 5.32 y 5.33, cuyos valores son 844 y 361 bacterias respectivamente.

En las Figuras 5.32 y 5.33 se aprecia el reconocimiento de bacterias realizado por el *template matching*, identificado por áreas de colores pintadas en las zonas blancas

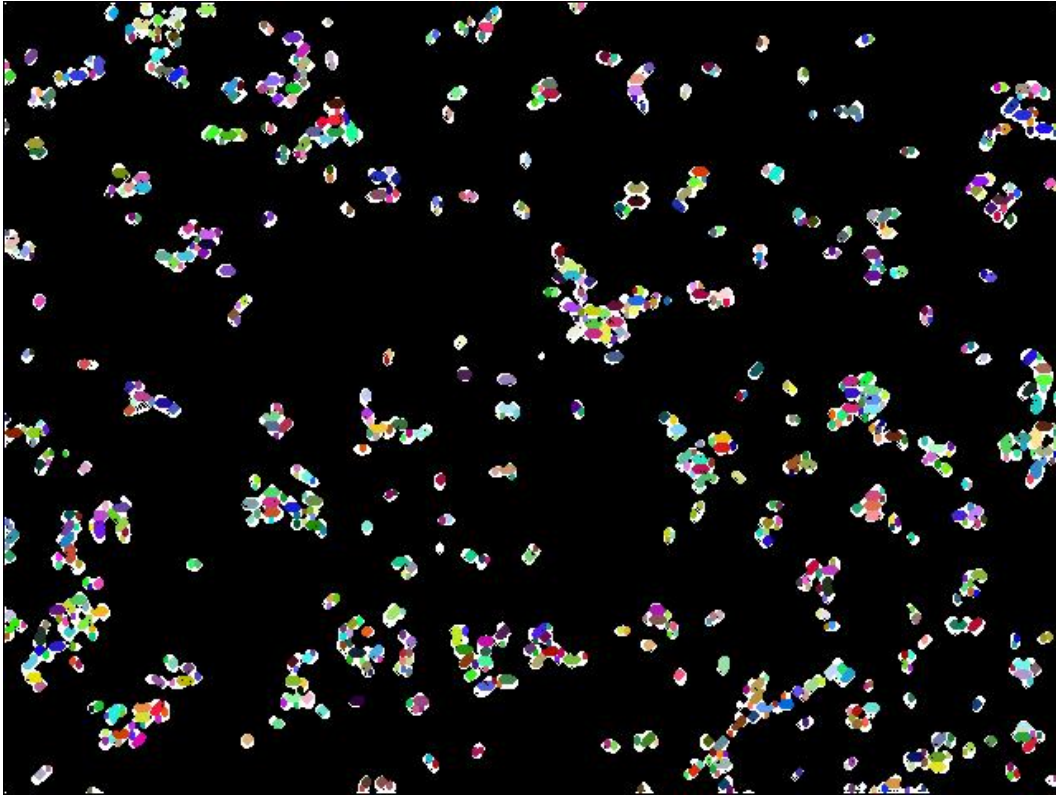


Figura 5.32: Reconocimiento de bacterias en la imagen Invertida de la Figura 5.27.

de la imágenes de entrada (Invertidas).

- Experimento 2. Imágenes con problemas de contraste.

La Figura 5.31 es procesada con el *template Matching* el cual utilizó los 6 patrones predefinidos para ese organismo, dando como resultado 1117 bacterias identificadas en la imagen, como se observa en la imagen de la Figura 5.34.

El *template matching* identifica como bacterias las áreas de colores pintadas en las zonas blancas de la imagen de entrada (Invertida) que se observan en la imagen de la Figura 5.34.



Figura 5.33: Reconocimiento de bacterias en la imagen Invertida de la Figura 5.28.

5.2.2 Determinación de forma y tamaño

Forma

En las Figuras 5.32, 5.33 y 5.34 se observan las formas de las bacterias presentes en cada imagen, correspondientes a coco-bacilos (semiovaladas), cocos (circulares) y bacilos (bastoncillos), respectivamente, es decir, la clasificación morfológica de las bacterias planteada en la bibliografía. Estas formas de bacterias, son las mismas que contienen las plantillas construidas para cada organismo en estudio.

Esta identificación de forma de las bacterias, evidencia la efectividad de la metodología planteada en esta investigación para reconocer objetos de interés que se encuentran en las imágenes con características particulares, en este caso, los microorganismos.

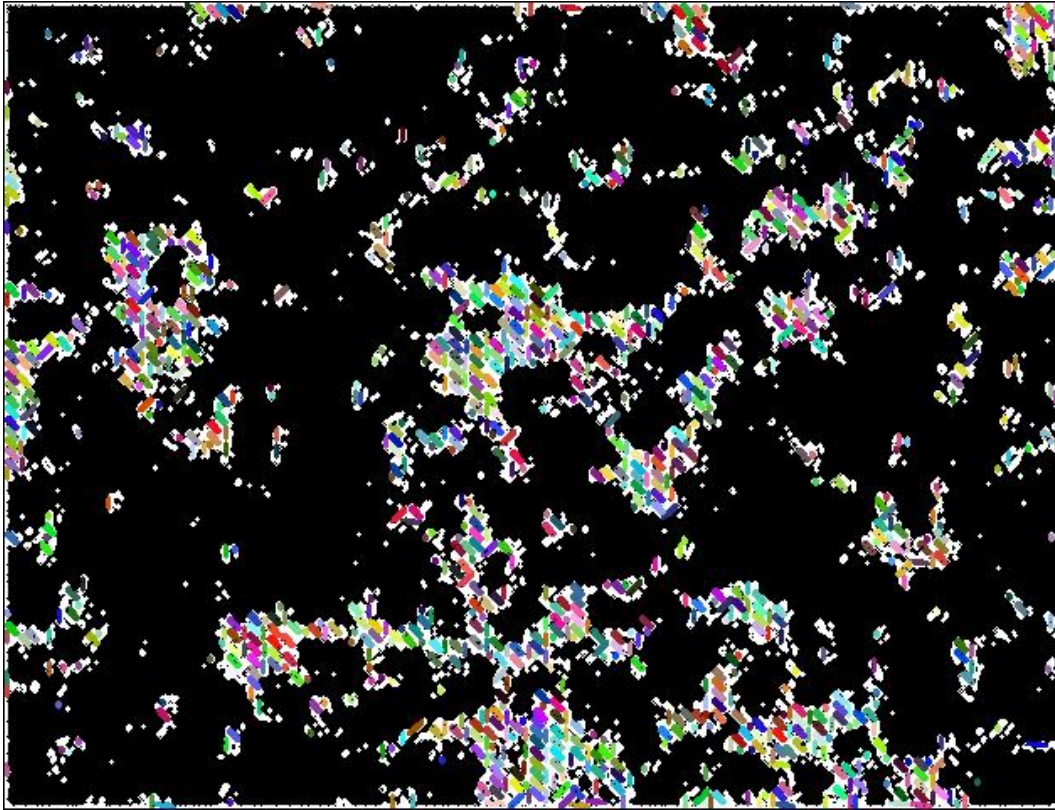


Figura 5.34: Reconocimiento de bacterias en la imagen Invertida de la Figura 5.31.

Tamaño

Los resultados arrojados por los algoritmos desarrollados para el cálculo del tamaño promedio de las bacterias individuales, localizadas en las imágenes de los experimentos 1 y 2, se presentan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1: Tamaños en píxeles de las bacterias presentes en las imágenes de los experimentos 1 y 2.

<i>Experimento</i>	Imagen Original	Imagen usada para el cálculo	Tamaño Promedio en píxeles	Longitud mas larga en píxeles
Primero	Figura 5.1	Figura 5.32	5.7	11.2
Primero	Figura 5.2	Figura 5.33	3.7	11.0
Segundo	Figura 5.3	Figura 5.34	8.0	12.4

Para realizar la equivalencia de longitud en píxeles a μ , se utilizan las imágenes que se muestran en la Figura 5.35.

Los puntos capturados sobre las imágenes de la Figura 5.35, a través de la aplicación

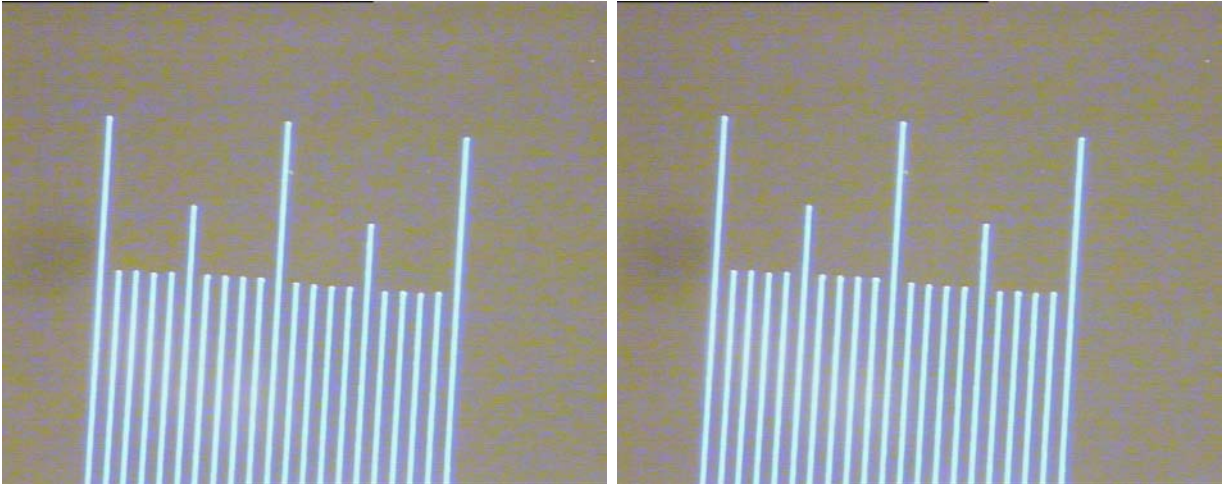


Figura 5.35: Imágenes con reglas de medida en μ .

interactiva mediante el uso del ratón, se muestran en la tabla 5.2.

Tabla 5.2: Coordenadas (x, y) de los puntos capturados por la aplicación.

<i>Imagen</i>	x_1	y_1	x_2	y_2
1	432	506	440	506
1	433	470	441	472
1	432	492	439	492
2	214	552	222	553
2	285	465	292	465
2	410	499	418	499

A continuación se calculan las distancias en píxeles entre cada par de puntos utilizando la ecuación (4.21), las distancias obtenidas se muestran en la tabla 5.3.

Tabla 5.3: Distancia entre los puntos de la tabla 5.2.

<i>Imagen</i>	<i>Distancia en píxeles</i>
1	8.0
1	9.2
1	7.0
2	9.0
2	7.0
2	8.0

Es importante considerar, que en la utilización de la aplicación interactiva para la determinación del equivalente en píxeles de una μ , se debe tomar en cuenta problemas

asociados a la adquisición de la imagen de referencia (Figura 5.35) como borrosidad en los bordes de la rejilla, posición con respecto al plano cartesiano (x, y) que define a la imagen, y subjetividad por parte del usuario. En tal sentido, para solucionar estos problemas se propone promediar diferentes medidas tomadas en diferentes imágenes de referencia, a objeto de minimizar la subjetividad asociada al usuario.

Se calcula el promedio de las distancias obtenidas y se aplica el factor de conversión a las longitudes colocadas en tamaño promedio y longitud mas larga de la tabla 5.1, obteniéndose los valores que se muestran en la tabla 5.4. El valor promedio representa la cantidad de píxeles por cada μ , siendo este de $8.0 \text{ pix}/\mu$.

Tabla 5.4: Tamaños en μ de las bacterias presentes en las imágenes de los experimentos 1 y 2.

<i>Experimento</i>	Imagen Original	Imagen usada para el cálculo	Tamaño Promedio en μ	Longitud mas larga en μ
Primero	Figura 5.1	Figura 5.32	0.7	1.4
Primero	Figura 5.2	Figura 5.33	0.5	1.4
Segundo	Figura 5.3	Figura 5.34	1.0	1.5

Los tamaños promedio calculados para las imágenes procesadas se encuentran dentro del rango establecido en la literatura para el tamaño de las bacterias, la cual indica que el diámetro de los cocos oscila entre 0.5μ y 4.0μ , y el eje mayor de los bacilos oscila entre 0.5μ y 20μ [37].

5.3 Identificación de colonias de bacterias

En esta etapa se ejecutaron las fases descritas en la metodología con la finalidad de obtener los resultados de la cuantificación de colonias y la determinación de su tamaño promedio.

5.3.1 Cuantificación

Los resultados de las fases homogeneización del fondo de la imagen, aplicación de filtros para el realce de contornos, segmentación de la imagen mediante la transformada *Watershed* y optimización de la imagen segmentada, son los mismos de las fases de cuantificación

de bacterias individuales.

La diferencia entre la cuantificación de bacterias individuales y colonias radica en la aplicación de la técnica recursiva para esta última.

Aplicación de técnica recursiva

Para la cuantificación de colonias de bacterias se seleccionaron las imágenes del experimento 1. La técnica recursiva fue aplicada a las imágenes Invertidas de las Figuras 5.27 y 5.28 generadas en la fase de optimización de la identificación de bacterias individuales. Los resultados obtenidos en este procesamiento se presentan en las Figuras 5.36 y 5.37.

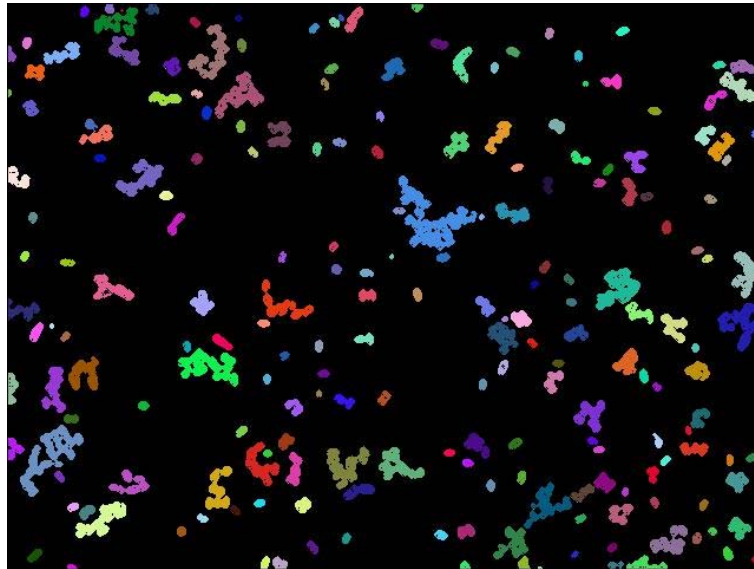


Figura 5.36: Colonias identificadas por el algoritmo recursivo en la imagen 5.27.

Como se puede observar en las Figuras resultantes 5.36 y 5.37, el algoritmo identificó todos los grupos de píxeles blancos sin discriminar las bacterias individuales.

Posteriormente se aplicó un procesamiento adicional (descrito en la sección 4.4.1) que elimina las bacterias individuales del conteo realizado, dando como resultado las colonias identificadas en las imágenes de las Figuras 5.38 y 5.39.

En la tabla 5.5 se muestra la cantidad de colonias identificadas en las imágenes de las Figuras 5.38 y 5.39.



Figura 5.37: Colonias identificadas por el algoritmo recursivo en la imagen 5.28.

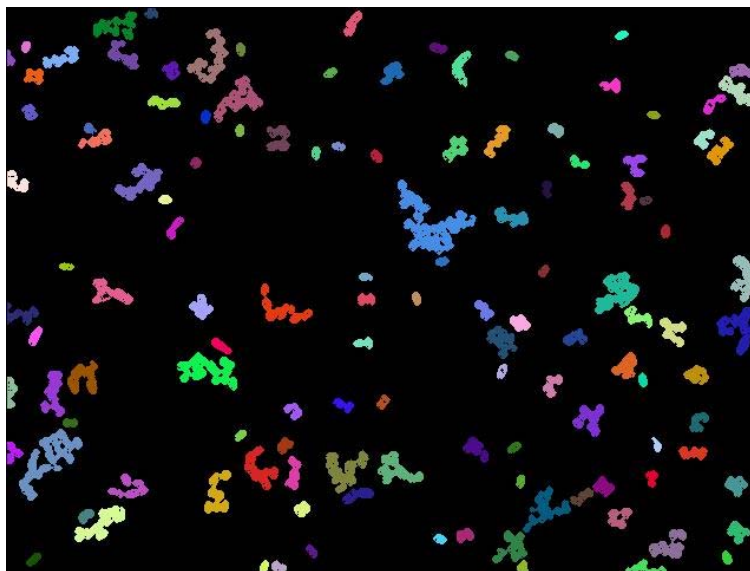


Figura 5.38: Colonias depuradas en la imagen 5.36.

Tabla 5.5: Cantidad de colonias presentes en las imágenes del experimento 1.

Imagen Original	Imagen usada para identificación	Cantidad inicial de colonias	Cantidad final de colonias
Figura 5.1	Figura 5.27	214	125
Figura 5.2	Figura 5.28	381	162

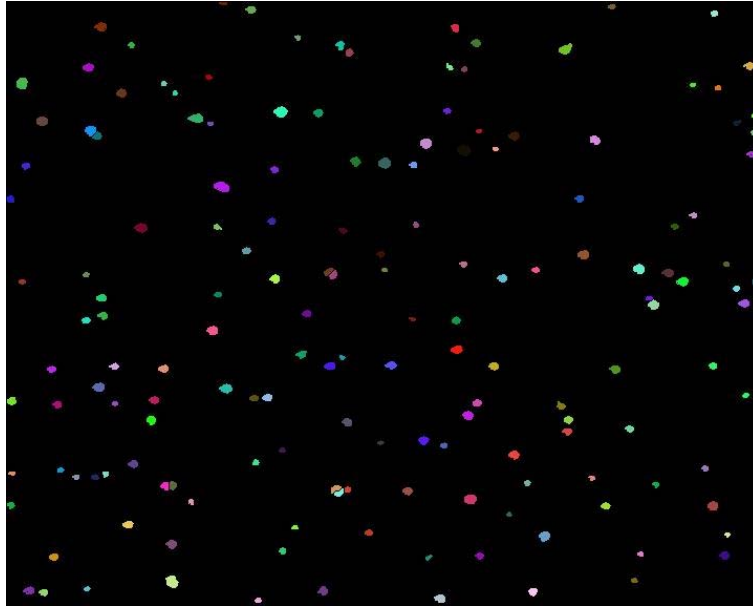


Figura 5.39: Colonias depuradas en la imagen 5.37.

5.3.2 Determinación del tamaño de las colonias de bacterias

Los resultados arrojados por los algoritmos desarrollados para el cálculo del tamaño promedio de las colonias de bacterias, localizadas en las imágenes del experimento 1, se presentan en la tabla 5.6.

Tabla 5.6: Tamaño en píxeles de las colonias presentes en imágenes del experimento 1.

<i>Experimento</i>	Imagen Original	Imagen usada para el cálculo	Tamaño Promedio en píxeles	Longitud mas larga en píxeles
Primero	Figura 5.1	Figura 5.38	21.0	73.4
Primero	Figura 5.2	Figura 5.39	8.3	15.2

Al convertir los tamaños resultantes en píxeles a μ , tomando la equivalencia calculada en la sección 5.2.2 se obtienen los valores que se muestran en la tabla 5.7.

Tabla 5.7: Tamaños en μ de las colonias presentes en las imágenes del experimento 1.

<i>Experimento</i>	Imagen Original	Imagen usada para el cálculo	Tamaño Promedio en μ	Longitud mas larga en μ
Primero	Figura 5.1	Figura 5.38	2.6	9.1
Primero	Figura 5.2	Figura 5.39	1.0	1.9

5.4 Validación

5.4.1 Cuantificación

Con el objeto de evaluar los resultados de la cuantificación de bacterias con el uso de la metodología planteada en esta investigación, se comparan estos resultados con los reportados por el Laboratorio de Biofertilizantes para la primera imagen del experimento 1 y la imagen del experimento 2. En la tabla 5.8 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 5.8: Resultados obtenidos por el procesamiento automatizado y el manual.

Imagen	Resultado procedimiento automático (Nro. de bacterias)	Resultado procedimiento manual (Nro. de bacterias)
Figura 5.1	844	780
Figura 5.3	1117	821

Al observar los resultados obtenidos por el método manual y el método automatizado para la primera imagen del experimento 1, se observa una diferencia despreciable en estos resultados. Con respecto a los resultados obtenidos por ambos métodos para la imagen del experimento 2, se aprecia una diferencia más significativa que pudo ser generada por diversos factores.

Existen factores que afectan la cuantificación manual de bacterias realizada en los laboratorios, generando para una misma muestra diferencias en los resultados. No obstante, estas diferencias deben ser científicamente aceptadas para que estos resultados tengan validez. Dentro de estos factores destacan: la dilución utilizada, el tiempo que tarda el conteo, la disposición de bacterias en grupos, y en general, la experiencia de la persona que realiza la cuantificación manual.

Igualmente existen factores que pueden afectar los resultados del proceso automático de cuantificación de bacterias, como por ejemplo, pigmentación del fondo de la imagen, problemas de iluminación durante el proceso de adquisición, fondos heterogéneos, bacterias muy tenues e incremento de las áreas ocupadas por las bacterias por la aplicación de filtro de realce.

5.4.2 Tamaño

Debido a que una bacteria presenta generalmente dos ejes importantes ¹, en los experimentos realizados en el Laboratorio de Biofertilizantes de la UNET se considera como medida de tamaño el eje del mayor valor. El eje promedio de mayor valor en las bacterias de las imágenes procesadas, calculado por el procedimiento automático corresponden a 0.7μ para los coco-bacilos, 0.5μ para los cocos y 1μ para los bacilos. El tamaño obtenido en el procedimiento manual para los cocobacilos es de 0.75μ de largo. El procedimiento automático consideró el número total de bacterias (844) para calcular el promedio de la longitud, por el contrario el procedimiento manual consideró una muestra menor a 10 bacterias para calcular este promedio.

En virtud de que no se pudo comparar los resultados del procesamiento automático de las otras dos imágenes con los resultados manuales por no estar éstos últimos disponibles, los resultados del procedimiento automático se compararon con los valores reportados por la bibliografía, la cual indica que el diámetro de los cocos oscila entre 0.5μ y 4.0μ , y el eje mayor de los bacilos oscila entre 0.5μ y 20μ [37], lo que evidencia que los valores obtenidos por el procedimiento automático para el eje mas largo de las bacterias se encuentra dentro del rango reportado en la literatura.

¹Por ejemplo si el organismo es un coco-bacilo tendrá forma elipsoidal, definida por un eje mayor D_1 y un eje menor D_2 .

Capítulo 6

Conclusiones y Perspectivas

6.1 Conclusiones

Las conclusiones de esta investigación se estructuraron de acuerdo con los objetivos específicos planteados en la propuesta de este trabajo de grado, y se presentan a continuación:

1. **Analizar el estado del arte en técnicas de procesamiento digital de imágenes para la cuantificación y caracterización de bacterias**

- El análisis de técnicas de procesamiento se realizó en función de las características que presentan las imágenes digitales de microscopía electrónica de muestras bacterianas. Se determinaron las siguientes características: zonas no correspondientes a microorganismos con alto grado de pigmentación debido al proceso de coloración que el biólogo incorpora a la muestra bacteriana, bacterias muy tenues y con bordes poco diferenciados, dificultad para identificar bacterias individuales en muestras donde se registran colonias de bacterias.

En tal sentido, se hizo necesario incorporar técnicas que permitan homogeneizar los efectos asociados al proceso de coloración de las imágenes. Adicionalmente, fue necesario incorporar técnicas de filtrado para atenuar la información correspondiente a estructuras no consideradas como microorganismo, y realzar la información asociada a las muestras bacterianas.

2. **Seleccionar las técnicas de procesamiento digital de imágenes más idóneas**

para la cuantificación y caracterización de bacterias

- El objetivo fue desarrollar técnicas de procesamiento capaces de solucionar los problemas relacionados con las imágenes de muestras bacterianas. Para el mejoramiento de la imagen se eligieron los siguientes filtros: homogeneización del fondo para mejorar las zonas con alto grado de pigmentación, realce de contorno con operador de gradiente consistente para destacar los bordes de las bacterias y colonias, filtro de sustracción de fondo (subtract background) para identificar la información correspondiente al fondo con el objeto de identificar los microorganismos y el suavizamiento (smooth) para disminuir la identificación de falsos contornos en la segmentación.
- Para la identificación de bacterias se escogió la transformada Watershed con el fin de lograr la segmentación de la imagen en bacterias y colonias de bacterias, además se escogió la comparación por plantillas (template matching) para la determinación de su forma.

3. Diseñar e implementar algoritmos que permitan caracterizar morfológicamente una muestra bacteriana a partir de su imagen digital.

- Se desarrolló e implantó un algoritmo basado en la técnica de procesamiento de comparación de plantillas (template matching) que cuantificó las bacterias contenidas en una imagen.
- Se desarrolló e implantó un algoritmo basado en la programación recursiva que determinó la cantidad de colonias de bacterias existentes en una imagen.
- Se utilizaron plantillas en el template matching que permitieron determinar la forma de las bacterias identificadas en la imagen digital.
- Se diseño e implantó un algoritmo que utilizó la ecuación de la distancia euclidiana para el cálculo del tamaño promedio y longitud mas larga de las bacterias y colonias de bacterias.

4. Comparar los resultados almacenados en la base de conocimiento obtenida

por medios experimentales con los resultados obtenidos del procesamiento automatizado de la imagen de muestra bacteriana.

- Al comparar los resultados obtenidos en la cuantificación de bacterias individuales, de forma manual (780 y 821) y automática (844 y 1117) correspondientes a dos de las imágenes procesadas, se observó que el proceso automático determinó 64 bacterias más que el proceso manual para la primera imagen y 296 bacterias más que el manual para la segunda imagen.
- La diferencia determinada para la primera imagen está dentro del rango de aceptación de error para los análisis con microorganismos. Para el caso de la segunda, esta diferencia pudo ser generada por factores que afectaron el proceso manual o el automático.
- El procedimiento de comparación de plantillas determinó la forma de las bacterias contenidas en cada imagen, identificando coco-bacilos en la primera imagen, cocos en la segunda y bacilos en la tercera imagen, correspondiendo a sus formas reales.
- Los resultados obtenidos por el procedimiento manual y automático para los valores de los tamaños promedio de las bacterias existentes en las imágenes procesadas se encuentran dentro de los rangos considerados en la literatura [37].

Adicionalmente, de manera general se puede concluir lo siguiente:

- Se ha incorporado una novedosa técnica de homogeneización del fondo de la imagen que permitió nivelar los tonos correspondientes al fondo y a los objetos de interés (bacterias), facilitando la visualización de estos microorganismos.
 - El operador de gradiente consistente utilizado en el filtro para el realce de contorno destacó los cambios bruscos existentes en las imágenes, los cuales significan bordes de bacterias o colonias. Este realce en los bordes favoreció la segmentación de la imagen.
-

- La técnica de segmentación utilizada permitió discriminar la información asociada a los microorganismo del fondo, debido a que es una técnica de segmentación multiobjeto que se ajusta al problema por existir una marcada diferenciación entre el objeto (bacteria) y el fondo. Tal diferenciación, sino está presente desde el momento de la adquisición se logra con los procedimientos de preprocesamiento propuestos.
- El procedimiento para la cuantificación de colonias de bacterias identificó las agrupaciones de píxeles correspondientes a bacterias en las imágenes, determinó aquellas agrupaciones que corresponden a bacterias individuales y seleccionó únicamente los grupos de píxeles que representan las colonias de bacterias para el conteo correspondiente.

6.2 Perspectivas

En cuanto a las perspectivas generadas por este estudio se consideran las siguientes:

1. Se sugiere integrar los componentes de software usados en la caracterización de bacterias, en una interfaz gráfica robusta, portable y de fácil manejo.
 2. En el plano computacional se recomienda evaluar el rendimiento de la metodología desarrollada en diferentes plataformas Microsoft Windows y Linux.
 3. Desarrollar posteriormente un esquema de validación del software implantado para la caracterización de bacterias y colonias de bacterias, a través de la comparación de los resultados del procesamiento automático con los resultados generados por el experto en su procesamiento manual, comparación de los resultados del procesamiento automático de imágenes con bacterias y colonias de bacterias sintéticas con los resultados del procesamiento manual de esas mismas imágenes o la comparación de los resultados del procesamiento automático con los resultados generados por software comerciales.
 4. Debido a que la ejecución del template matching es directamente proporcional a la cantidad de plantillas utilizadas en el proceso de comparación, se sugiere estudiar la
-

optimización de este proceso mediante la incorporación de una etapa de preprocesamiento para la depuración del conjunto de plantillas utilizadas para el estudio de cada organismo [30].

5. Se recomienda la utilización de la información correspondiente a los resultados generados en el proceso de identificación de bacterias individuales para la identificación de las colonias de bacterias, con el fin de optimizar recursos computacionales y obtener mayor exactitud en esta identificación.
6. Se recomienda la utilización de operadores de morfología matemática para el cálculo del tamaño promedio de bacterias y colonias de bacterias, con la finalidad de mejorar los tiempos de respuesta de este proceso.

Bibliografía

- [1] P. Gianfranco y M. Fernando, *Imágenes Médicas. Adquisición, Análisis, Procesamiento e Interpretación*. Caracas Venezuela: Ediciones de la Universidad Simón Bolívar, 1995.
- [2] R. Medina, “Técnicas básicas de procesamiento,” in *Imágenes Médicas*, G. Passariello y F. Mora, Eds. Caracas, Venezuela: Editorial Equinoccio, Universidad Simón Bolívar, 1995, pp. 61–98.
- [3] R. A. y Richard Bartha, *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Madrid España: Pearson Educación S.A., 2002, vol. 4ta Edición.
- [4] A. B. de Moreno, *Bacteriología y Virología Básicas*. Mérida Venezuela: Editorial Venezolana C.A. Primera Edición, 1988.
- [5] M. S.A. (1997, July) Introducción a la microbiología. Monografias.com S.A. [Online]. Available: <http://www.monografias.com/trabajos16/microbiologia/microbiologia.shtml>
- [6] Kyriacou, Theocharis, G. Bugmann, y S. Lauria., “Vision-based urban navigation procedures for verbally instructed robots,” *Robotics and Autonomous Systems*, vol. 51.1, pp. 69–80, 2005.
- [7] S. Trattner, H. Greenspan, G. Tepper, y S. Abboud, “Automatic identification of bacterial types using statistical imaging methods,” *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 23, pp. 807–820, 2004.
- [8] Aksoy, M. S., O. Torkul, y I. H. Cedimoglu, “An industrial visual inspection system that uses inductive learning,” *Journal of Intelligent Manufacturing*, vol. 15.4, pp. 569–574, 2004.
- [9] A. Bravo, “Simulación y reconstrucción en 4–D del ventrículo izquierdo en imagenología cardiaca,” Ph.D. dissertation, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela, 2006.
- [10] A. Bravo, R. Medina, G. Passariello, y M. Garreau, “Estimation of the deformation field for the left ventricle walls in 4–D multislice computerized tomography,” in *Progress in Pattern Recognition, Image Analysis and Applications, 10th Iberoamerican Congress on Pattern Recognition, CIARP 2005*, ser. Lecture Notes in Computer Science, vol. 3773, La Havana, Cuba, Nov. 2005, pp. 348–359.

-
- [11] R. B. Paranjape, "One-fundamental enhancement techniques," in *Handbook of Medical Imaging: Processing and Analysis*, I. N. Bankman, Ed. San Diego: Academic Press, 2000, pp. 3–18.
- [12] Digitalfotored. (2005, July) Compresión de los archivos digitales. Digitalfotored. [Online]. Available: <http://www.digitalfotored.com/imagenigital/compresionarchivos.htm>
- [13] I. Young, J. Gerbrands, y I.J. Van Vliet. (2006, Jan.) Image processing fundamentals. Quantitative Imaging Group. Delf University of Tecnology. Netherlands. [Online]. Available: <http://www.ph.tn.tudelft.nl/Courses/FIP/noframes/fip.html>
- [14] R. C. Gonzalez, *An Overview of Image Processing and Pattern Recognition Techniques*. USA: Editor Handbook of Geophysical Exploration, 1987.
- [15] W. K. Pratt, *Digital Image Processing*. USA: John Wiley and Sons, 1978.
- [16] K. S. Fu y J. K. Mui, "A survey on image segmentation," *Pattern Recognition*, vol. 13, no. 1, pp. 3–16, 1981.
- [17] A. Mitiche y J. K. Aggarwal, "Image segmentation by conventional and information integrating techniques: a synopsis," *Image and Vision Computing*, vol. 3, no. 2, pp. 50–62, 1985.
- [18] R. A. Haralick y L. Shapiro, *Computer and Robot Vision*. USA: Addison-Wesley Publishing Company, 1992, vol. I.
- [19] D. H. Ballard y C. M. Brown, *Computer Vision*. USA: Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1982.
- [20] R. Horaud y O. Monga, *Vision Par Ordinateur, Outils Fondamentaux*. Paris: HERMES, 1993.
- [21] R. Gonzalez y R. Woods, *Digital Image Processing*. New York: Addison-Wesley Publishing Company, 1992.
- [22] J. Brend, *Digital Image Processing*. Germany: Springer-Verlag, 1993.
- [23] S. Beucher, "The watershed transformation applied to image segmentation," in *10th Pfefferkorn Conf. on Signal and Image Processing in Microscopy and Microanalysis*, Cambridge, England, 1991, pp. 16–19.
- [24] Roerdink y Meijster, "The watershed transform: Definitions, algorithms and parallelization strategies," *FUNDINF: Fundamenta Informatica*, vol. 41, 2000.
- [25] W. C. Yang, "Edge detention using template matching (image processing, threshold logic, analysis, filters)," Ph.D. dissertation, Duke University, USA, 1985.
- [26] I. Reyes, "Cuantificacion de microorganismos solubilizadores de fosfatos en suelos del yacimiento de roca fosforica de monte fresco," Ph.D. dissertation, Universidad Central de Venezuela, Caracas Venezuela, 1991.
-

-
- [27] Y. M. Useche, H. Valencia, y H. Pérez, “Caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres usos de suelo en el sur del trapecio amazónico,” Ph.D. dissertation, Universidad Nacional de Colombia, Bogota Colombia, 2004.
- [28] L. Vincent y P. Soile, “Watershed in digital spaces: An efficient algorithm based on immersion simulations,” *IEEE Transactions on Pattern Analysis and machine intelligence*, vol. 13, pp. 583–598, 1991.
- [29] C. Jung y j. Scharcanski, “Robust watershed segmentation using the wavelet transform,” in *XV Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing*, Brazilian, Brazil, Oct. 2002, pp. 131–137.
- [30] L. Cole, D. Austin, y L. Cole, “Visual object recognizing using template matching,” *FUNDINF: Fundamenta Informatica*, vol. 41, 2000.
- [31] S. Sternbergs, “Biomedical image processing,” *IEEE Computer*, vol. 16, pp. 22–34, 1983.
- [32] T. Boudier. (2007, Oct.) Substract background. ImageJ Documentation Portal. [Online]. Available: <http://imagejdocu/tudor.lu/imagej-documentation-wiki/gui-commands/substract-background>
- [33] G. Landini. (2006, July) Smooth. ImageJ Documentation Portal. [Online]. Available: <http://imagejdocu/tudor.lu/imagej-documentation-wiki/gui-commands/smooth>
- [34] D. Sage. (2008, Feb.) Imagej plugin. watershed segmentation. Biomedical Imaging Group. Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne. Suiza. [Online]. Available: <http://bigwww.epfl.ch/sage/soft/watershed>
- [35] S. Ando, “Consisten gradient operator,” *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, vol. 22.3, pp. 252–264, 2000.
- [36] H. Schildt, *Turbo C/C++. Manual de Referencia*. Madrid Espana: Osborne Mc Graw Hill, 1992.
- [37] R. Stanier, J. Ingraham, M. Wheelis, y P. Painter, *The Microlobial World*. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1986, vol. 5ta Edición.
-