

Recibido: 27 de agosto de 2010
Aceptado: 21 de octubre de 2010**ARTIFICIAL VISION SYSTEM FOR THE RECOGNITION AND COUNTING
OF COLONY FORMING UNITS (CFU)****SISTEMA DE VISIÓN ARTIFICIAL PARA EL RECONOCIMIENTO Y EL
CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)****PhD. César A. Peña Cortés, MSc. Luis C. Peña Cortés, MSc. Gonzalo Moreno C.****Universidad de Pamplona**

Ciudadela Universitaria. Pamplona, Norte de Santander, Colombia.

Tel.: 57-7-5685303, Fax: 57-7-5685303, Ext. 156

E-mail: {cesarapc, luisca_pe, gmoren }@unipamplona.edu.co

Abstract: This paper presents an automatic system for the recognition and counting of colony forming units (CFU), the system use techniques of digital image processing. The procedure was developed for sanitary control of the high quality milk production process, and is characterized by low costs unlike those in the market, high performance and ease of use.

Keywords: Artificial Vision, Colony forming units (CFU), milk, aerobes-mesophiles.

Resumen: Este artículo presenta un sistema automático para el reconocimiento y conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) utilizando técnicas de tratamiento digital de imágenes. El procedimiento se desarrolló para el control sanitario en el proceso de producción de leche de alta calidad y se caracteriza por su bajo costo a diferencia de los existentes en el mercado, el alto rendimiento y facilidad de uso.

Palabras clave: Visión Artificial, Unidades formadoras de colonia (UFC), leche, aerobios mesofilos.

1. INTRODUCCIÓN

La Universidad de Pamplona y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, por medio de su participación en el programa “*Fortalecimiento de las Alianzas Productivas de la Cadena Láctea en la Provincia de Pamplona, Norte de Santander*” pretendió mejorar la competitividad de los productores vinculados a las alianzas productivas de la provincia de Pamplona mediante el ajuste y validación de tecnologías en los aspectos críticos de la cadena láctea a través de varios proyectos en asocio con el sector productivo regional y en especial, por intermedio del proyecto: “Mejoramiento de la calidad e inocuidad de la leche de las explotaciones vinculadas a las alianzas productivas en la Provincia de Pamplona”

Una limitante del proceso productivo de la leche, es el bajo nivel de tecnificación, las malas prácticas de ordeño y en general los aspectos nutricionales y de manejo que influyen también en la calidad sanitaria y composicional de la leche, las cuales tienen implicaciones en la salud pública y pueden afectar la elaboración de productos transformados que le dan un valor agregado al producto final.

Dentro del proceso de producción de leche en cuanto a la inocuidad y calidad de la leche se refiere, se desarrollaron varias pruebas para estudiar el estado sanitario de la misma, midiendo parámetros tales como conteo de aerobios mesofilos, coliformes totales y fecales en diferentes lugares desde la toma de la muestra en el sitio de

ordeño, pasando por los camiones recolectores, los sitios de almacenamiento y finalmente la plataforma de recepción, con el fin de determinar posibles sitios de contaminación. Para ello existen varias pruebas que se utilizan para evaluar dicha calidad, tales como el conteo de bacterias en placa, conteo de coliformes tanto totales como fecales, el conteo de células somáticas y la detección de antibióticos como residuos en el producto final y los productos derivados (Martinez, 2001).

Las pruebas mencionadas anteriormente son pruebas de rutina a llevarse a cabo en explotaciones productivas con adecuados estándares sanitarios, sin embargo, dentro de ellas, la cuenta de aerobios mesofilos, procedimiento cuya técnica de referencia se denomina recuento en placa, es un procedimiento muy dispendioso (Marotz y col, 2001) y más, en condiciones en que debe llevarse a cabo un procesamiento abundante de muestras, toda vez que involucra la identificación manual de todos y cada uno de los crecimientos bacterianos presentes en una caja de petri sin llegar a identificarlos por duplicado usando para ello un sistema de identificación particular (por ejemplo: marcándolos con un marcador permanente), con objeto de expedir finalmente un resultado.

La realización de este tipo de análisis puede llevarse a cabo por medio de varios procedimientos o equipos disponibles en el mercado o en la literatura científica que han sido diseñados para evitar muchos de los inconvenientes cotidianos de la técnica tradicional, entre ellos se cuenta con: métodos automatizados (Putman y col, 2005), equipos para realizar el recuento electrónico de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), las técnica de film seco rehidratado, epifluorescencia directa en filtro (Rosmini y col, 2004) entre muchos otros.

Los procedimientos mencionados involucran costos elevados debido a los costos de procesamiento por los materiales utilizados y por el valor elevado de equipos para poder hacer la lectura de las placas los cuales son de difícil accesos para muchas instituciones y no se encuentran disponibles en las instalaciones de la Universidad, es por esto que se decidió trabajar mancomunadamente entre los docentes de diversas dependencias de la Universidad de Pamplona, con el propósito de encontrar una manera económica, rápida y accesible, para llevar a cabo este procedimiento en nuestro campus, utilizando materiales disponibles fácilmente en la mayoría de

los laboratorios, como son una cámara digital, una fuente de luz, un computador y cajas de petri.

Este artículo esta organizado de la siguiente forma: en la sección dos se presenta brevemente el procedimiento tradicional para el conteo de unidades formadoras de colonia, a partir de la sección tres se ilustra el procedimiento para el conteo automático de unidades formadoras de colonias distribuidos de la siguiente forma: en la sección inicial se presenta la segmentación de la imagen con el fin de ubicar la caja de Petri, en la siguiente sección, se ilustra el procedimiento para la localización y el conteo de colonias, seguido por una sección donde se presentan los resultados obtenidos y por último las conclusiones.

2. PROCEDIMIENTO TRADICIONAL PARA EL CONTEO EN PLACA DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA

El conteo de unidades formadoras de colonia es un procedimiento que se basa brevemente en: tomar un mililitro de una muestra (leche, para este caso) y depositarlo usando para ello una pipeta en un tubo contenido 9 ml de una solución estéril, después de lo cual se lleva a vortex por 8 segundos, posterior a esto, 1 ml de este tubo se remueve y se introduce en un segundo tubo contenido también 9 ml de solución estéril. Este procedimiento se repitió hasta que la muestra estuviera diluida suficientemente (aproximadamente la octava dilución) (Herigstad y col, 2001).

Después del anterior procedimiento, se toman 10 μ l de la última dilución y se esparcen uniformemente en una caja de petri, se incuban por 17 a 20 horas a una temperatura de aproximadamente 37 °C para finalmente hacer la lectura, la cual generalmente se lleva a cabo manualmente, ayudándose de un marcador de vidrio, una fuente de luz y un papel donde escribir, todo esto se realiza para que usando el marcador y a contraluz, se identifiquen uno a uno cada crecimiento bacteriano denominados colonias y por medio del marcador, se marquen los mismos como ya identificados, tomando nota de esto, con el objeto de no contarlos por duplicado y con el fin de reportarlos finalmente al técnico encargado de hacer su análisis, sin embargo, este es un procedimiento muy engorroso y pese a la experiencia de la persona que lleva a cabo la lectura, no deja de ser muy dispendioso.

Debido a las características del procedimiento mencionado anteriormente, algunos laboratorios

cuentan con equipos que facilitan su lectura, como es el caso del denominado contador de colonias de Quebec (ver Figura 1), el cual en sus diversas presentaciones desde las versiones más manuales hasta las más avanzadas, básicamente cuenta con un lente de aumento, una fuente de luz, una cuadrícula y contador digital (unos botones que sirven para llevar la cuenta del número de colonias, cada vez que el usuario ve una unidad formadora pulsa un botón), que en teoría evita la necesidad de usar el marcador y de llevar la cuenta en un papel, dado que el contador digital facilita dicho proceso. Este tipo de contadores a pesar de su fácil acceso, no dejan de ser costosos y no descartan muchos de los inconvenientes en lo tedioso y dispendioso de las labores de conteo e identificación de los crecimientos.



Fig. 1. Sistema tradicional para el conteo de colonias (contador de quebec)

Por esta razón en este artículo se presenta un procedimiento automático del conteo de unidades formadoras de colonias, y su implementación se calcula alrededor de una decima parte del valor del contador de Quebec citado previamente.

3. SEGMENTACIÓN DE LA IMAGEN

En la figura 2 se puede apreciar una imagen de una caja de petri en la cual se realizó un cultivo para recuento de UFC. El sistema de visión desarrollado toma imágenes con una resolución de 5 megapixeles con el fin de poder identificar adecuadamente las colonias a pesar de su reducido tamaño.

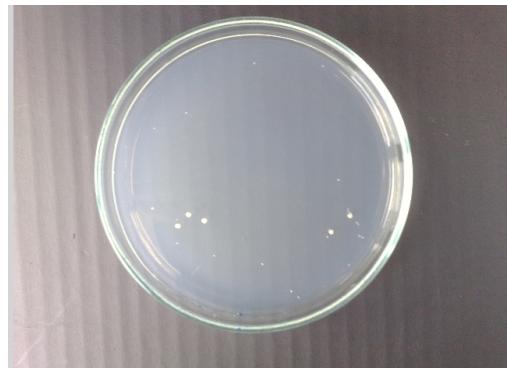


Fig. 2. Imagen de la caja de Petri que aloja el cultivo de colonias a examinar

El primer paso consiste en la ubicación y segmentación de la caja de Petri de la imagen. Para esto se procedió a la transformación de la imagen partiendo del espacio de colores RGB (Rojo, Verde, Azul) (Chen, X. y Chen, H., 2010), al espacio de colores HSV (Tonalidad, Saturación, Brillo) (Duncan, J. S. y Ayache, N. 2000) con el fin de hacer un poco más robusto el sistema ante los cambios de luz que suelen ocurrir en los diferentes ambientes de trabajo de los laboratorios (Sun, Q., Luo, Z., 2009). En la figura 3 se ilustra el canal H (Tonalidad) donde se puede apreciar una clara diferencia entre los valores correspondientes a la caja de Petri y los valores de la superficie donde se ubica la caja.

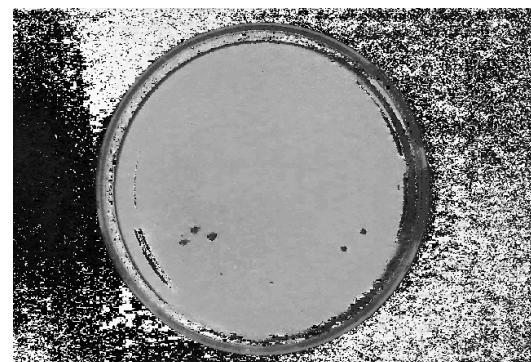
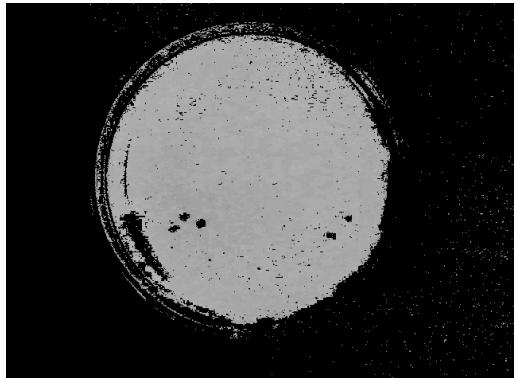


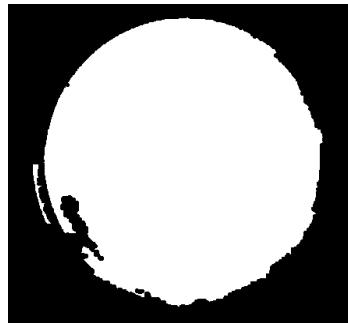
Fig. 3. Componente H del modelo de colores HSV

Posteriormente se realiza una umbralización de la imagen con el fin de identificar los píxeles correspondientes a la caja de Petri. Para esta acción se tomaron varias imágenes del fondo y de la caja de Petri (por separado) bajo diferentes condiciones de luz y se analizaron sus histogramas. Se obtuvo que la tendencia de los valores del canal H de los píxeles correspondientes a la caja de Petri están dentro de un rango de 0.5 a 0.65. Estos valores se tomaron para realizar la umbralización de la imagen.

*Fig. 4. Resultado de la imagen umbralizada*

En la figura 4 se puede apreciar la imagen resultante de la umbralización y la respectiva binarización. Se puede observar que varios pixeles correspondientes al fondo pasaron dentro del umbral. El umbral no se puede hacer tan restrictivo debido a que los valores los pixeles bajo diferentes condiciones de luz suelen cambiar y si el umbral es muy restrictivo se corre el riesgo de no detectar partes de la caja de Petri.

Con el fin de eliminar los pixeles correspondientes al fondo se eliminan los conjuntos de pixeles adyacentes menores a un tamaño de 100 (grupos reducidos), de igual forma se realizaron las operaciones morfológicas de relleno de objetos y closing (Pajares M., G. y Cruz G., J. M., 2008), (Yang S., et. al., 2010).

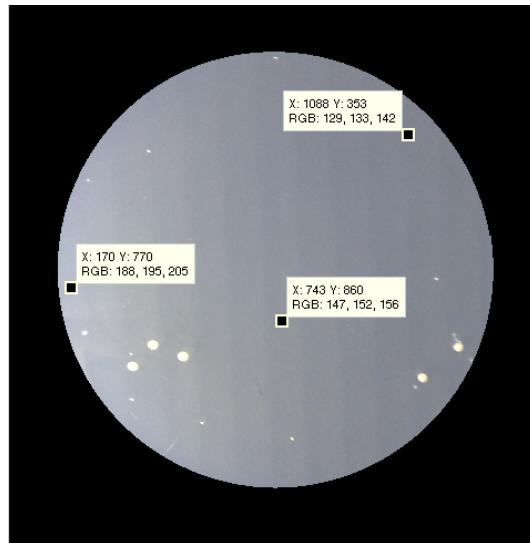
*Fig. 5. Resultado de las operaciones morfológicas*

Por último en esta etapa se procede a examinar cada una de las regiones (conjuntos de pixeles adyacentes). En primer lugar se selecciona la región de mayor tamaño (observese en la figura 5 la existencia de dos regiones). Se calcula el centroide en los dos ejes coordenados y se calcula el radio aproximado de la región. Con estos datos se realiza la segmentación de muestra a partir de la imagen original tal como se puede apreciar en la figura 6.

*Fig. 6. Imagen segmentada*

4. LOCALIZACIÓN Y CONTEO DE LAS COLONIAS

Una vez se ha realizado la segmentación del contenido de la caja de Petri en la imagen original se procede a la localización de las colonias. Para obtener esta localización es preciso diferenciar los pixeles correspondientes a las colonias de los correspondientes al fondo.

*Fig. 7. Valor Pixel fondo de la imagen*

Si se realiza una umbralización tomando como base los valores de los pixeles correspondientes al fondo de la imagen, se pierden varios pixeles correspondientes a colonias. Esto se debe a que el valor de los pixeles del fondo varía continuamente en la imagen debido a los factores de iluminación.

Por ejemplo, vease la figura 7 donde se ilustran los valores de las componentes RGB de tres pixeles correspondiente al fondo. Se puede apreciar que la componente del canal R varía de 129 a 188, la

componente G de 133 a 195, la componente B de 142 a 205. Por otra parte en la figura 8 se aprecian los valores de dos pixeles correspondientes a las colonias. Uno de ellos se encuentra muy bien diferenciado del fondo debido a que tiene las componentes RGB: [252, 255, 223] mientras que el otro tiene componentes muy similares (RGB: [191, 192, 196]) con algunos pixeles correspondientes al fondo (ubicados en otras posiciones).

De diversas imágenes tomadas se pudo observar que los pixeles de las colonias que usualmente se confundían con el fondo, correspondían a colonias de tamaño reducido ubicadas en los sitios con menor iluminación en la imagen. Si se aumentaba la iluminación se detectaba que las colonias tendían a ser captadas con un tamaño inferior, lo que ocurría que en algunos casos no fueran detectadas.



Fig. 8. Ejemplo valor pixeles correspondientes a las colonias

Con el fin de solucionar el problema se decidió crear una imagen formada por los valores mínimos de las componentes de los pixeles por subregiones en la imagen. Basicamente esta imagen corresponde con los valores de un fondo aproximado que varía acorde con los efectos provocados por los cambios de iluminación en la imagen.

En la figura 9 se puede apreciar una imagen de un fondo aproximado donde se aprecia claramente que no se encuentran ninguna de las colonias. Para la creación de este fondo se realizó la operación morfológica de erosión para cada una de las componentes RGB de la imagen. La operación de erosión consiste básicamente en crear un elemento estructurante de una forma y tamaño predeterminado (en este caso se utilizó un disco de 50 pixeles) el cual se ubica en cada uno de los pixeles de la imagen, determinando el vecindario correspondiente a dicho pixel y se reemplaza el

mismo con el mínimo valor encontrado en el vecindario para cada una de las componentes RGB.

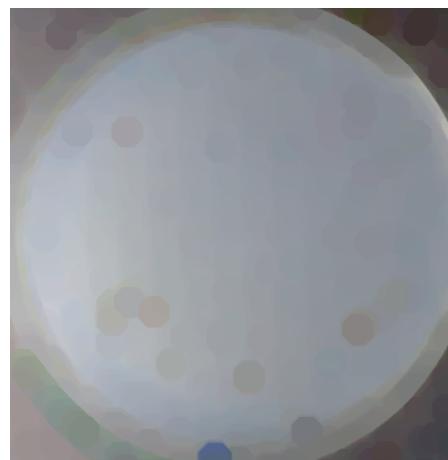


Fig. 9. Imagen erosinada

Una vez obtenido una imagen del fondo aproximado se procede a restar los valores de sus componentes a la imagen original, obteniendo una imagen que contiene como valores máximos los pixeles correspondientes a las colonias, tal como se puede apreciar en la figura 10.

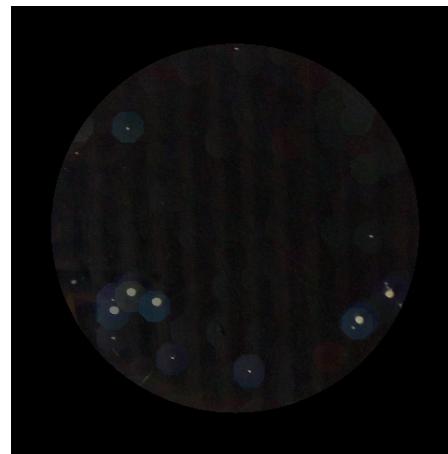
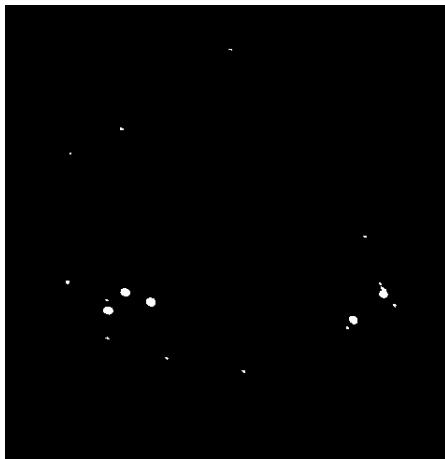


Fig. 10. Resultado de imagen segmentada menos la imagen erosinada

A partir de la figura 10 resulta muy sencillo identificar los pixeles correspondientes a las colonias por medio de una umbralización.

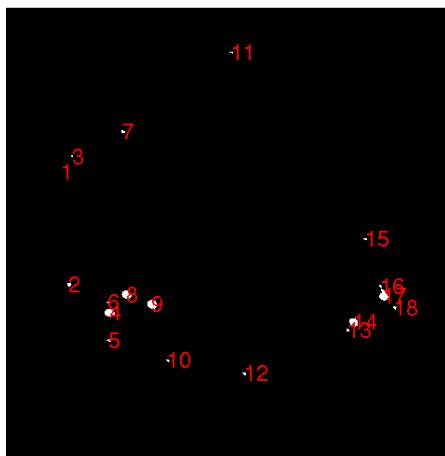
En la figura 11 se puede observar una imagen binaria donde se encuentran claramente identificadas todas las colonias. A partir de esta imagen se realiza la caracterización y el conteo de las colonias.

*Fig. 11. Localización de las colonias*

5. RESULTADOS

En la figura 12 se puede apreciar un ejemplo de una imagen donde se localizo y contó el número de colonias cultivadas en una caja de Petri. Se puede apreciar que se detectaron la totalidad de las colonias a pesar del reducido tamaño de algunas de ellas y los inconvenientes producidos por las variaciones de luz en la imagen.

Además del conteo de las colonias se pueden extraer diversas características de las mismas tales como el tamaño y la excentricidad, en caso de que en un futuro se quieran realizar estudios más profundos de las mismas. Estas propiedades pueden ser analizadas de acuerdo a la evolución temporal con el fin de analizar el comportamiento o crecimiento basándose en los factores ambientales tales como la temperatura y la humedad.

*Fig. 12. Conteo de las colonias*

6. CONCLUSIONES

El algoritmo de visión artificial planteado, detecta y localiza las colonias de una forma muy eficiente a pesar de los cambios lumínicos típicos presentes en un laboratorio.

La automatización del conteo de colonias reduce significativamente el margen de error en dicho procedimiento y evita el cansancio de las personas que realizan el mismo, debido a que es un trabajo rutinario que exige a los usuarios prestar mucha atención.

El desarrollo de este algoritmo permite disminuir costos en los laboratorios, debido a que los aparatos que se encuentran en el mercado para desarrollar estas tareas son bastante costos a pesar de sus limitadas prestaciones.

RECONOCIMIENTOS

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural y a la Universidad de Pamplona, por la financiación del proyecto “Mejoramiento de la calidad e inocuidad de la leche de las explotaciones vinculadas a las alianzas productivas en la Provincia de Pamplona”.

REFERENCIAS

- Chen, X. y Chen, H. (2010). “A novel color edge detection algorithm in RGB color space”. Signal Processing (ICSP), 2010 IEEE 10th International Conference on. **Vol. 1**, 793. Beijing, China.
- Duncan, J. S. y Ayache, N. (2000). “Medical Image Analysis: progress over Two Decades and Challenges Ahead”. IEEE Trans. Patter Anal. Machine Intell, **Vol. 22**, No. 1, 85-106.
- Herigstad, B., Hamilton, M y Heersink, J. (2001). “How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria”. J. Microbiol Meth, **Vol 44**, 121-129.
- Marotz, J., Lübbert, C. y Eisenbeiß, W. (2001). “Effective object recognition for automated counting of colonies in Petri dishes (automated colony counting)”. Comput Meth Prog Biomed, **Vol 66**, 183–198.
- Martínez, L. (2001). “La calidad paga: producción de leche de calidad sanitaria III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche”. México

- Pajares M., G. y Cruz G., J. M. (2008). *Visión por computador*, Alfaomega & Ra-Ma, Segunda edición, México.
- Putman, M., Burton, R. y Nahm, M. H. (2005). "Simplified method to automatically count bacterial colony forming unit". *J. Immunol. Methods*, **Vol 302**, 99– 102.
- Rosmini, M. R., Signorini, M.L., Schneider, R y Bonazza, J.C. (2004). "Evaluation of two alternative techniques for counting mesophilic aerobic bacteria in raw milk". *Food Control*, **Vol 15**, 39–44.
- Sun, Q., Luo, Z. (2009). "Method of Part Recognition Based on Robot Vision and HSV Space". *Computer Science and Engineering*, 2009. WCSE '09. Second International Workshop on. **Vol. 1**, 182. Qingdao.
- Yang S., Feng, Z., Zhang, X. y Yang, H., (2010). "A multi-scale morphologic runway detector". *Computer Engineering and Technology (ICCET)*, 2010 2nd International Conference on. **Vol. 4**, 524. Chengd.