

Recibido 28 Ago 2016
Aceptado 12 Mar 2017

ReCIBE, Año 6 No. 1, Mayo 2017

Simulación y Conteo de Unidades Formadoras de Colonias

Simulation and Counting of Colony-Forming Units

Erika P. Sánchez F.¹
erikasafe@gmail.com

Dámaris Núñez R.¹
damaris1782@gmail.com

Roberto O. Cruz L.¹
robanac@gmail.com

Mayra A. Torres H.¹
matorres.26@gmail.com

Elsa V. Herrera M.¹
veronica_qfb@hotmail.com

¹ Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería
Campus Zacatecas, México

Resumen: Este artículo plantea el diseño e implementación de una aplicación móvil que mediante un sistema de visión por computadora permite realizar el conteo de colonias de bacterias en cultivos microbianos disminuyendo significativamente el tiempo de la cuantificación y generando un método estándar de conteo para dispositivos móviles con sistema operativo Android. Así como un simulador de colonias de bacterias que permite generar muestras controlando parámetros de crecimiento de bacterias con el fin de ayudar a probar la eficiencia de la aplicación de conteo de colonias de bacterias.

Palabras clave: Android, aplicación móvil, conteo microbiológico, visión por computadora

Abstract: This article proposes the design and implementation of a mobile application using a computer vision system that allows counting bacterial colonies in microbial cultures, decreasing significantly the time of quantification and generating a standard counting method for mobile devices running Android OS. As well as a bacterial colony simulator that allows generating samples controlling bacterial growth parameters in order to help to test the efficiency of the bacterial colony count application.

Keywords: Android, Mobile Application, Microbiological Counting, Computer Vision

1. Introducción

El área microbiológica forma parte de las actividades cotidianas, diariamente los microorganismos los encontramos participando de manera benéfica y perjudicial, desarrollando diferentes papeles. En el área biológica, una de las tareas es el aislamiento y la identificación. Dependiendo del tipo de muestra y análisis es necesario conocer el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes, este número es tomado en cuenta para cumplir los estándares establecidos bajo normatividad en el área de los alimentos, en el área de salud, análisis de agua, aire y suelo entre otros. Para estos análisis los expertos de estas áreas realizan conteos manuales o muy rudimentarios que consumen grandes cantidades de tiempo con resultados que varían según quien realice el conteo.

Este trabajo de investigación se ha planteado para el área de los alimentos debido a que, a pesar de ser una fuente de nutrientes, a menudo constituyen un medio de cultivo ideal para la multiplicación microbiana. Desde el punto de vista sanitario, los alimentos pueden ser vehículos de infecciones o de intoxicaciones graves, provocando las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA) que constituyen un gran problema de salud pública.

De acuerdo a la importancia de estos microorganismos causantes de importantes ETA, los laboratorios se ven en la necesidad de aplicar distintas técnicas para el aislamiento y conteo de microorganismos presentes en los alimentos, sin embargo, para la identificación se tienen que realizar pruebas con múltiples muestras, estos procedimientos de rutina suelen consumir mucho tiempo y reactivos ya que para la identificación los microorganismos se deben sembrar en varios medios de cultivo para distinguir la bacteria de interés y realizarse por duplicado o triplicado para obtener una mayor confiabilidad en los resultados.

En este trabajo se propone un simulador de colonias de bacterias con el fin de controlar algunos parámetros que afectan al crecimiento de las bacterias, para así generar imágenes de muestras controladas y realizar pruebas utilizando una aplicación móvil para automatizar la cuantificación de colonias de bacterias en placas de cultivo mediante un sistema de visión por computadora, en el que se recorta la imagen, se convierte a escala de grises, se mejora el contraste y se segmenta la imagen para poder realizar el conteo.

2. Técnicas de Aislamiento de Microorganismos y Factores de Crecimiento

Para estudiar las características físicas, químicas y fisiológicas de una bacteria, se necesita que ésta sea aislada en cultivo puro, y el aislamiento en caja Petri es el primer paso para ello. Una vez que ha sido preparado un medio de cultivo, puede ser utilizado para ser inoculado y a continuación incubado en condiciones que favorezcan el crecimiento microbiano. Existen varias técnicas para lograr el aislamiento bacterias, las más utilizadas son Estría Cruzada, Diluciones, Vaciado en Placa y Extensión por Varilla.

Los nutrientes requeridos por las bacterias que se cultivan se encuentran contenidos en los medios de cultivo. Los medios de cultivo son las soluciones nutritivas que se utilizan en el laboratorio para el cultivo de microorganismos.

La NOM-065-SSA-1993 que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo, los clasifica de acuerdo a su uso (Diario Oficial de la Federación, 1995):

- Medios Selectivos
- Medios Selectivos por Enriquecimiento
- Medios Diferenciales

Las colonias de bacterias que se obtienen mediante el uso de estas técnicas en estos medios pueden ser estudiadas en cuanto morfología colonial, identificación, crecimiento y actividad metabólica de la bacteria.

3. Método Tradicional de Conteo

Cuando se desea cuantificar el número de bacterias presentes en múltiples muestras, los procedimientos de rutina suelen consumir mucho tiempo. En ese periodo las muestras podrían sufrir modificaciones en su población (Corral-Lugo, 2012).

La cuantificación de microorganismos es un elemento crítico en los estudios de ecología microbiana y microbiología clínica. No solo es importante conocer al responsable de un efecto benéfico o identificar al microorganismo potencial de causar alguna infección severa, sino también es importante saber el número de microorganismos implicados, para establecer si éstos serán capaces de desarrollar una función benéfica o perjudicial (Corral-Lugo, 2012).

Existen diferentes tipos de métodos o técnicas para la cuantificación de microorganismos, las cuales se describen a continuación:

3.1 Método de recuento en placa

Consiste en realizar diluciones seriadas 1:10 y extender 0.1 mL de cada dilución en una placa; las placas se incuban hasta que las colonias son apreciables para su recuento. Esta metodología tiene la ventaja de tener un buen límite de detección, sin embargo consume mucho tiempo durante los plaques; en el caso de realizar el recuento de bacterias a partir de muestras cuya población se desconoce se requiere realizar el extendido de siete diluciones y la muestra original (para cada conteo) lo que significa consumir ocho placas de cultivo y alrededor de 25 minutos para los plaques, sin tomar en consideración repeticiones (Ortega Olgúin, 2014).

La norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa (Diario Oficial de la Federación, 1995) sugiere utilizar las siguientes herramientas para el conteo de colonias de bacterias:

- Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador: Está diseñado para el conteo rápido y preciso de las colonias de bacterias y moho en placas de cultivo. Permite el conteo de las colonias por cada pulsación del contador quedando grabado en la pantalla digital.
- Registrador mecánico o electrónico: Combina la función de contador electrónico por presión, con el marcaje mediante el marcador indeleble, impidiendo un doble conteo.

3.2 Sistema Petrifilm

Es un sistema de siembra todo-en-uno. Los ingredientes varían de una placa a otra dependiendo de los microorganismos de interés. En lugar de una placa de Petri, Petrifilm hace uso de película de plástico delgada como soporte del medio de cultivo, generalmente, comprende un agente gelificante soluble en agua fría, los nutrientes y los indicadores para la actividad y la enumeración. Después de la incubación, las colonias típicas se pueden contar ya sea manualmente (facilitado por la rejilla en el fondo de la película y de colonias de color característico) o automáticamente (Ortega Olgúin, 2014).

4. Simulador de Colonias de Bacterias

El propósito del simulador de colonias de bacterias es generar imágenes controladas de bacterias. Este simulador es una aplicación de escritorio que ayuda a realizar las pruebas de eficiencia de la aplicación de conteo automático de colonias de bacterias.

4.1 Esquema General de Funcionamiento

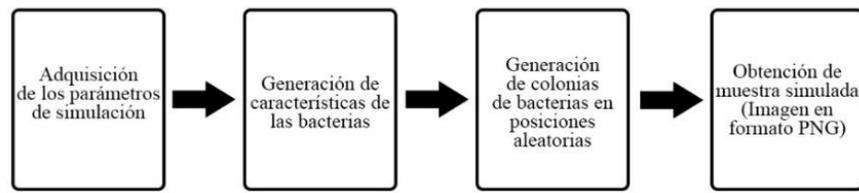


Figura 1. Esquema general secuencial de funcionamiento

La Figura 1 describe el funcionamiento general del simulador de colonias de bacterias. Para generar una muestra se deben obtener los siguientes parámetros de simulación:

- Número de colonias de bacterias
- Número de muestras (imágenes) a simular
- Medio de Cultivo
- Bacterias

4.2 Simulación de Características de Colonias de Bacterias

Con el propósito de hacer una simulación más cercana a la realidad, se seleccionaron cuatro de las bacterias más patógenas de los alimentos, esto porque son microorganismos muy utilizados en laboratorios de microbiología y las características morfológicas de las colonias de estas bacterias no son muy parecidas entre sí. Las bacterias utilizadas en el simulador de colonias de bacterias son las siguientes:

- *Escherichia coli*
- *Salmonella typhimurium*
- *Staphylococcus aureus*
- *Bacillus cereus*

Las características morfológicas más representativas de las bacterias Las características seleccionadas son las siguientes:

- Color
- Tamaño

Dentro del área de microbiología existen diferentes tipos de medios de cultivo para diferentes tipos de pruebas con distintos microorganismos.

Dichas características cambian según el medio de cultivo en el que se encuentra la bacteria por lo que éste es fundamental para realizar la simulación de manera exitosa, así que este simulador de colonias de bacterias sólo trabaja con dos tipos de medio de cultivo:

- **Medios Selectivos:** Contienen sustancias que impiden el desarrollo de algunos microorganismos, pero en una flora mixta permiten el aislamiento y recuperación del germen o grupo de gérmenes de interés
- **Medios diferenciales:** Contienen indicadores de ácido base, redox o sustancias que detectan cambios en el medio o en las características típicas de la colonia.

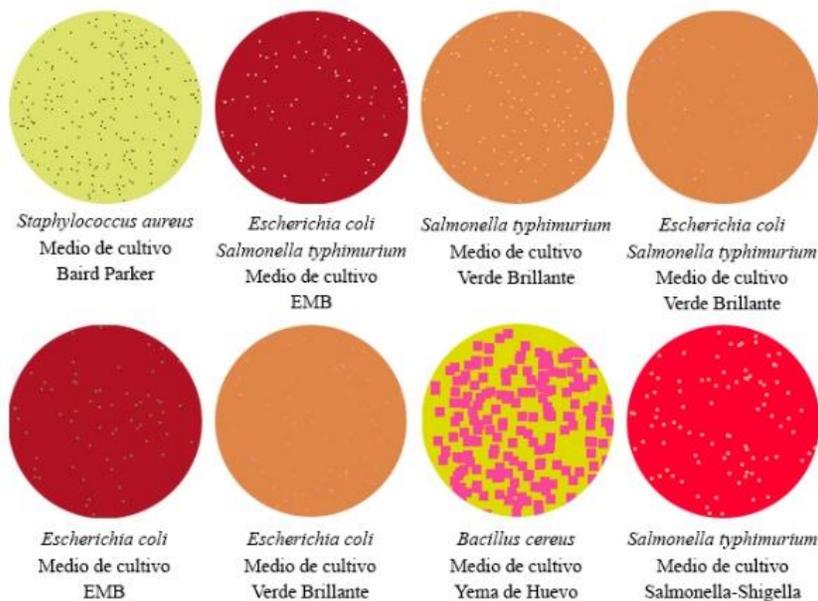


Figura 2. Diferentes tipos de muestras generadas con el simulador

En la figura 2 se observan diferentes muestras simuladas, las cuales son imágenes de 300x300 en formato PNG. Las colonias de bacterias se generan de manera aleatoria y verificando que éstas no se superpongan entre sí dentro de una elipse, simulando la caja Petri, esto con el fin de ayudar a la aplicación de conteo al momento de recortar la foto y obtener el número de UFC presentes en la muestra.

5. Estructura de la Aplicación de Conteo de UFC

La aplicación se puede ejecutar en dispositivos móviles con las siguientes características mínimas:

- Sistema operativo Android versión 4.1+
- Memoria RAM de 1Gb
- Procesador 1.2GHz

5.1 Esquema General de Funcionamiento

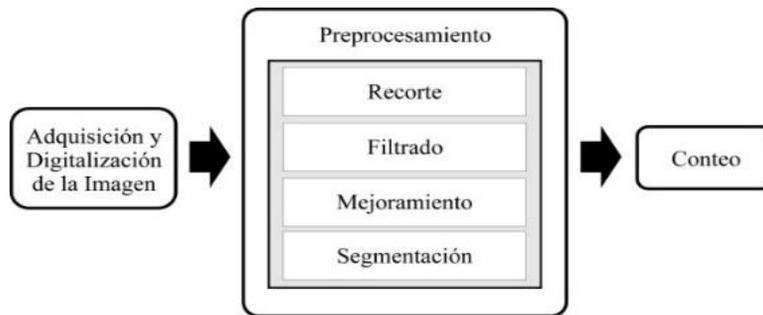


Figura 3. Esquema general secuencial de funcionamiento

5.2 Adquisición de la Imagen



Figura 4. Esquema del funcionamiento de la etapa de adquisición de datos

En la figura 4 se muestra el diagrama del proceso de adquisición de la imagen de la aplicación, donde se muestra cómo el dispositivo toma la imagen y la digitaliza en RGB para un futuro pre-procesamiento.

5.3 Pre-procesamiento

Con el afán de contribuir a que la aplicación logre resultados satisfactorios en la etapa de conteo de colonia de bacterias, se diseña e implementa una etapa de pre-procesado de las imágenes, el objetivo principal es generar un acondicionamiento para reducir el nivel de ruido y aumentar las posibilidades de un conteo exitoso. Por otra parte, una desventaja clara es la variedad de capacidades de procesamiento que presentan hoy en día los dispositivos móviles, es por eso que el procesamiento tiene que ser diseñado de la mejor manera para que pueda ser ejecutado por la mayoría de los dispositivos.

Dicha etapa consiste en la aplicación ordenada de algoritmos de filtrado y mejoramiento de imágenes existentes, donde cada uno de ellos cuenta con un objetivo bien definido.

Descripción del Pre-procesado de la imagen.

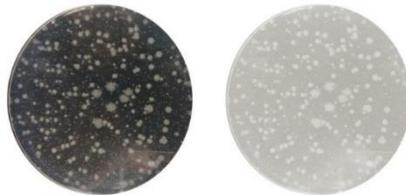
El acondicionamiento de la imagen es realizado en 4 etapas: recorte, filtrado, mejoramiento y segmentación. En la Tabla 1 se explica cómo se realiza cada una de las etapas

Etapa	Descripción	Resultado
Recorte	El conteo de colonias de bacterias se concentra solo en el contenido del recipiente, por lo tanto, las áreas referentes al exterior no son de utilidad y tienen que ser excluidas para evitar que aporte información de no interés en la etapa de conteo.	Figura 5
Filtrado	Dentro de la captura y digitalización de las imágenes las muestras son almacenadas en modelo de color RGB (L. Saphiro, 2001), la información almacenada en los distintos canales de color Rojo, Verde y Azul no es necesario utilizarla en su totalidad ya que se puede traducir en procesamiento excesivo. En esta etapa de filtrado se propone un cambio de escala en los valores de cada pixel, convertir de una representación RGB a Escala de Grises. Todo esto ayuda a reducir la cantidad de información a procesar a futuro y facilita la etapa de segmentación.	Figura 6
Mejoramiento	Dentro de esta etapa nos enfocamos en el mejoramiento del contraste con el fin de aumentar la diferencia entre las colonias de bacterias y el fondo del recipiente, podríamos esperar la generación de una buena etapa de segmentación a raíz de aplicación de una mejora del contraste. La técnica implementada fue Expansión Lineal del Histograma (L. Deligiannidis, 2015), dicho proceso se basa en una transformación en los niveles de color de gris, se realiza una distribución lineal de los valores que se encuentren dentro del rango de 0 a 255.	Figura 7 y Figura 8
Segmentación	Previamente al conteo es necesario resaltar completamente las colonias de bacterias con respecto al fondo de la caja Petri, para esto, se aplica la técnica de binarización automática de Nobuyuki Otsu (Nobuyuki, 1979) a la imagen obtenida en la etapa de mejoramiento, el objetivo principal es poder generar una discriminación suficiente para detectar y segmentar a las colonias.	Figura 9
Conteo	Para contabilizar el número de colonias de bacterias en la imagen se utiliza el método de Euler (Fuente López, 2012), donde, la imagen segmentada, se invierte y etiqueta. En el proceso de inversión, las colonias que estaban en negro se transforman a blanco. Luego en la fase de etiquetado, se asignan etiquetas a todos los objetos encontrados en la imagen inversa. Estos nuevos objetos serán ahora las colonias de bacterias. El fondo de la imagen no se etiquetará como colonia de bacterias porque tendrá un color diferente, en este caso blanco. Por tanto, el número de colonias de bacterias será igual al número de etiquetas obtenidas.	Figura 10

Tabla 1. Descripción de las etapas de pre-procesamiento de la imagen



Figura 5. Imagen capturada por el dispositivo móvil (izquierda) e imagen



resultante en la etapa de recorte (derecha)

Figura 6. Imagen original (izquierda) en formato RGB e imagen resultante en escala de grises (derecha)

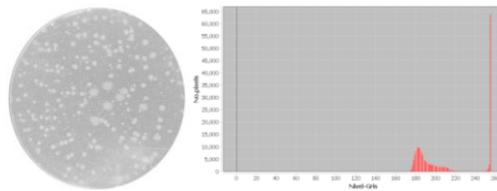


Figura 7. Imagen original (izquierda) y su histograma de niveles de colores de grises (derecha)

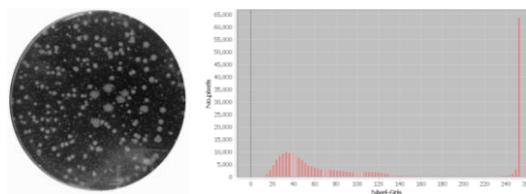


Figura 8. Imagen resultante después de aplicar expansión lineal del histograma (izquierda) y su histograma de niveles de colores de grises (derecha)

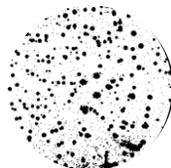


Figura 9. Resultado obtenido de la implementación de binarización automática



Figura 10. Resultado obtenido del proceso de inversión para realizar el conteo

6. Resultados

A continuación, se presentan los resultados de los conteos de colonias de bacterias a partir de muestras generadas en el simulador de colonias alcanzados con la aplicación propuesta y las siguientes dos aplicaciones de conteo seleccionadas en el mercado (Tabla 2):

Nombre	Tipo de Aplicación	Sistema Operativo	Área de Aplicación
CFU Scope Versión 1.5.0	Móvil	iOS	Microbiología
APD Colony Counter Lite Versión 1.0.0	Móvil	Android	Microbiología
Aplicación propuesta Versión 1.0.0	Móvil	Android	Microbiología

Tabla 2. Descripción de las aplicaciones seleccionadas

La Figura 11 muestra diez imágenes generadas con el simulador de colonias de bacterias de una muestra mixta de las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Las primeras cinco muestras son en medio de cultivo EMB y las restantes en medio de cultivo Verde Brillante.

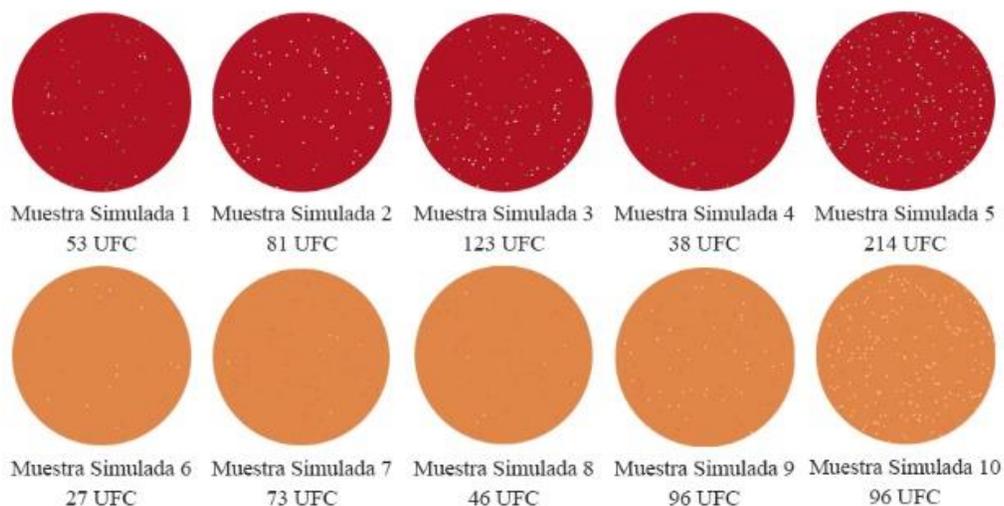


Figura 11. Muestras generadas con el simulador

Los resultados alcanzados al hacer los conteos automáticos con las aplicaciones mencionadas anteriormente se muestran en la Tabla 3:

Muestra	APD Colony Counter	CFU Scope	Aplicación Propuesta
53 UFC Simuladas	48	50	53
81 UFC Simuladas	72	77	81
123 UFC Simuladas	113	98	122
38 UFC Simuladas	21	38	38
214 UFC Simuladas	165	210	213
27 UFC Simuladas	0	26	27
73 UFC Simuladas	12	70	72
46 UFC Simuladas	0	43	46
96 UFC Simuladas	42	89	95
222 UFC Simuladas	154	229	220

Tabla 3. Resultados del conteo automático a partir de imágenes generadas en el Simulador

Se pueden observar en la Tabla 3 los resultados del conteo de las aplicaciones de los cuales se obtuvo el porcentaje de eficiencia en los conteos para cada una de ellas de la siguiente manera:

Porcentaje de Eficiencia

$$= \frac{\sum_{1..n} \text{Porcentaje de Perdida UFC}}{n}$$

Donde:

n es el número de muestras seleccionadas

Porcentaje de Perdida de UFC

$$= \frac{(UFC \text{ Simuladas} - \text{Conteo Automático de UFC}) * 100}{UFC \text{ Simuladas}}$$

Teniendo que la aplicación propuesta tiene un porcentaje de efectividad de conteo del 98%, la aplicación APD Colony Counter del 32% y la CFU Scope del 46%.

Lo que permite establecer que la aplicación propuesta obtiene el mejor resultado de efectividad, por lo que el procesamiento de la imagen y el algoritmo de conteo de la aplicación propuesta es eficiente.

7. Conclusiones

Un buen pre-procesamiento en la imagen funge un papel muy importante dentro de la aplicación, ya que este ayuda a tener mejores resultados que si se procesara la imagen tal y como se obtiene en la etapa de adquisición.

La aplicación móvil puede trabajar en cualquier laboratorio de microbiología gracias a que sigue las normas y estándares con las que se rigen los laboratorios al momento de trabajar con cultivos en placa.

Estas muestras simuladas no pretenden sustituir las muestras experimentales, ya que al momento de trabajar en un laboratorio de microbiología existen infinidad de variables que pueden afectar al comportamiento y crecimiento de los microorganismos.

Las simulaciones sólo se utilizaron para realizar las pruebas de efectividad de los algoritmos de la aplicación.

Referencias:

Alonso Nore, L. P. (2008). Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido.

Corral-Lugo, A. M.-G.-V.-C. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". Revista Colombiana de Biotecnología, 2.

Diario Oficial de la Federación. (1995). La NOM-065-SSA-1993 que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo.

Diario Oficial de la Federación. (1995). Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994.: Bienes y servicios. Método para la cuenta.

Fuente López, E. T. (2012). Visión artificial industrial. Secretariado de Publicaciones e Intercambio Editorial.

L. Deligiannidis, H. R. (2015). Emerging Trends in Image Processing, Computer Vision and Pattern Recognition. Elsevier.

L. Saphiro, G. S. (2001). Computer Vision. Prentice Hall.

Nobuyuki, O. (1979). A Treshold Selection Method from Gray-Level Histograms. IEEE Transactions On Systems, Man, And Cybernetics, SMC-9(1), 62-68.

Ortega Olgúin, I. (2014). Comparación de métodos de cuantificación de bacterias lácticas expuestas.

Notas biográficas:

Erika Sánchez Femat Estudiante de décimo semestre de Ingeniería en Sistemas Computacionales en la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Zacatecas UPIIZ-IPN, actualmente se encuentra realizando investigación dentro del área de visión por computadora aplicada a la microbiología. Ha desarrollado varios proyectos en el área de aplicaciones móviles, dentro y fuera de la UPIIZ-IPN. Sus áreas de interés son: Procesamiento de Imágenes, Reconocimiento de Patrones, Machine Learning, Desarrollo de Aplicaciones Móviles y Diseño UI/UX.

Dámaris Núñez Román Es estudiante de sexto semestre de Ingeniería Ambiental en la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Zacatecas UPIIZ-IPN, actualmente se encuentra realizando identificación morfológica bacteriana y cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) para un proyecto que se desarrolla en conjunto con el área de Sistemas Computacionales de la UPIIZ-IPN. Sus otras áreas de estudio de interés son: Manejo Integral del Agua y la Gestión Ambiental.

Roberto Cruz Leija A sus 29 años es Maestro en Ciencias de la Computación por el Instituto Tecnológico de León con especialidad en Inteligencia Artificial. Previamente egresado del Instituto Tecnológico de Zacatecas de la carrera de Licenciatura en Informática. Realizó estancia de investigación en el Centro de Investigación en Computación CIC del Instituto Politécnico Nacional donde desarrolló trabajos relacionados con Análisis de Imágenes y Reconocimiento de Patrones. Actualmente es miembro de la plantilla de docentes del programa de posgrado de la Universidad Interamericana para el Desarrollo UNID campus

Zacatecas donde imparte temas y desarrolla proyectos sobre Aplicaciones Móviles, Uso de las TIC en procesos Educativos y así como asesorías en diferentes trabajos de Tesis. Además, es docente investigador del Instituto Politécnico Nacional campus Zacatecas dentro de la Academia de Ciencias de la Computación, desarrollando proyectos en las áreas de Análisis y Procesamiento de Imágenes, Algoritmos de Optimización y Reconocimiento de Patrones. Otras de sus áreas de interés en donde imparte clases son Programación Avanzada, Programación Orientada a Objetos y Análisis de Algoritmos.

Mayra Torres Hernández Es Ingeniera en Sistemas Computacionales, egresada del Institución Tecnológico de Zacatecas (ITZ), con Maestría en Ciencias en Ciencias de la Computación por el Instituto Tecnológico de León. Docente de Tiempo completo en la Universidad Politécnica de Zacatecas (2007-2009), Docente de tiempo completo de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Zacatecas (UPIIZ) del Instituto Politécnico Nacional (2009-2017), Presidenta de la Academia de Ciencias de la Computación de la UPIIZ (2016).

Elsa Herrera Mayorga Es Maestra en Ciencias en Biotecnología Genómica por el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, y cuenta con una licenciatura en Químico Farmacéutico Biológico por la Universidad de Tamaulipas. Actualmente es docente investigador de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Zacatecas UPIIZ-IPN. Realiza investigación sobre control biológico de rotación de insecticidas y manejo de control de plagas.



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 2.5 México.