



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE ELÉCTRICA Y ELECTRÓNICA

**CARRERA DE INGENIERÍA EN ELECTRÓNICA,
AUTOMATIZACIÓN Y CONTROL**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO ELECTRÓNICO, AUTOMATIZACIÓN Y
CONTROL**

**TEMA: DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA PARA
LA CONTABILIZACIÓN AUTOMÁTICA DE UNIDADES
FORMADORAS DE COLONIAS BACTERIANAS:
COLIFORMES, MESÓFILOS AEROBIOS, BACILOS,
ESTAFILOCOS Y LEVADURAS USANDO TÉCNICAS DE
VISIÓN ARTIFICIAL**

AUTOR: NARANJO SILVA JORGE LUIS

DIRECTOR: ING. LARCO JULIO.

SANGOLQUÍ

2016



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE ELÉCTRICA Y ELECTRÓNICA
CARRERA: ELECTRONICA EN AUTOMATIZACIÓN Y CONTROL

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación "DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA CONTABILIZACIÓN AUTOMÁTICA DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS BACTERIANAS: COLIFORMES, MESÓFILOS AEROBIOS, BACILOS, ESTAFILOCOS Y LEVADURAS USANDO TÉCNICAS DE VISIÓN ARTIFICIAL", realizado por el señor Jorge Luis Naranjo Silva, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor Jorge Luis Naranjo Silva para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, julio 2016

Atentamente.

Ing. Julio Larco MSc
DIRECTOR



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE ELÉCTRICA Y ELECTRÓNICA
CARRERA: ELECTRÓNICA EN AUTOMATIZACIÓN Y CONTROL

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Jorge Luis Naranjo Silva, con cédula de identidad N° 0603443748, declaro que este trabajo de titulación "DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA CONTABILIZACIÓN AUTOMÁTICA DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS BACTERIANAS: COLIFORMES, MESÓFILOS AEROBIOS, BACILOS, ESTAFILOCOS Y LEVADURAS USANDO TÉCNICAS DE VISIÓN ARTIFICIAL", ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, julio 2016

Atentamente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jorge Luis Naranjo Silva', written over a horizontal line.

Jorge Luis Naranjo Silva

C.C. 0603443748



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE ELÉCTRICA Y ELECTRÓNICA
CARRERA: ELECTRÓNICA EN AUTOMATIZACIÓN Y CONTROL

AUTORIZACIÓN

Yo, Jorge Luis Naranjo Silva, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la Institución el presente trabajo de titulación "DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA CONTABILIZACIÓN AUTOMÁTICA DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS BACTERIANAS: COLIFORMES, MESÓFILOS AEROBIOS, BACILOS, ESTAFILOCOS Y LEVADURAS USANDO TÉCNICAS DE VISIÓN ARTIFICIAL", cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, julio 2016

Atentamente.

Jorge Luis Naranjo Silva

C.C. 0603443748

DEDICATORIA

A mi familia,
los pilares en mi vida,
quienes han sido motor
de mi trabajo día a día.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar quisiera agradecer a Dios, por bendecirme y poder concluir una etapa más del camino, porque ahora este sueño ya se ha hecho realidad.

A mis padres, Beto y Ney, por ser el soporte de mi vida, por formar mi carácter y ser ejemplo para mis pasos, gracias por su cariño y comprensión en todo momento.

A mis hermanos, Carlos y Sebastián, gracias por apoyarme en cada momento, y por brindarme un refugio de alegría siempre que lo necesito.

También agradecer a una persona especial, Mumita, un ser de luz que llegó a mi vida en el momento preciso, gracias por el apoyo en todo momento, esto no sería posible sin ti.

A mis amigos y compañeros de la universidad, gracias a ustedes por tantos años de amistad y de lucha día a día en las aulas y fuera de ellas, hemos formado una familia también fuera de nuestros hogares.

A mi director de tesis, Ing. Julio Larco, un agradecimiento especial, por darme la confianza necesaria para triunfar en la vida y transmitir sabiduría para mi formación profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|------|
| PORTADA..... | i |
| CERTIFICACIÓN..... | ii |
| AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD..... | iii |
| AUTORIZACIÓN..... | iv |
| DEDICATORIA..... | v |
| AGRADECIMIENTO | vi |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS | x |
| RESUMEN..... | xii |
| ABSTRACT..... | xiii |
| INTRODUCCIÓN..... | xiv |
| CAPITULO I..... | 1 |
| ASPECTOS GENERALES | 1 |
| 1.1. Antecedentes | 1 |
| 1.2. Justificación e Importancia | 2 |
| 1.3. Objetivos. | 3 |
| 1.3.1. General. | 3 |
| 1.3.2. Específicos..... | 3 |
| CAPÍTULO II..... | 5 |
| ESTADO DEL ARTE..... | 5 |
| 2.1. Introducción..... | 5 |
| 2.2. Colonias bacterianas..... | 5 |
| 2.3. Morfología de las bacterias. | 6 |
| 2.3.1. Coliformes | 8 |
| 2.3.2. Mesófilos aerobios | 8 |
| 2.3.3. Bacilos..... | 9 |
| 2.3.4. Estafilococos | 9 |
| 2.3.5. Levaduras | 10 |
| 2.4. Principios y fundamentos de la siembra y contabilización de UFC. . | 10 |
| 2.4.1. Siembra..... | 10 |
| 2.4.2. Medios de siembra..... | 11 |

| | |
|--|------|
| | viii |
| 2.4.3. Métodos de siembra..... | 12 |
| 2.4.4. Contabilización..... | 13 |
| 2.5. Procesamiento digital de Imágenes | 15 |
| 2.5.1. Imagen digital..... | 15 |
| 2.5.2. Estudio de la iluminación de la muestra | 18 |
| 2.5.3. Estudio de la óptica..... | 24 |
| 2.6. Operaciones Morfológicas..... | 27 |
| 2.6.1. Erosión..... | 27 |
| 2.6.2. Slicing..... | 28 |
| 2.6.3. Umbralización..... | 29 |
| 2.6.4. Binarización..... | 30 |
| 2.7. LabView (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench) ... | 30 |
| 2.7.1. Visión artificial en Labview..... | 31 |
| CAPÍTULO III..... | 33 |
| DISEÑO DEL PROTOTIPO | 33 |
| 3.1. Diseño de Hardware..... | 33 |
| 3.1.1. Iluminación | 34 |
| 3.1.2. Sistema de movimiento para mejorar el contraste | 36 |
| 3.1.3. Cámara Fotográfica..... | 36 |
| 3.2. Diseño de Software..... | 38 |
| 3.2.1. Adquisición de la imagen | 38 |
| 3.2.2. Tratamiento de la imagen..... | 39 |
| CAPÍTULO IV..... | 49 |
| RESULTADOS..... | 49 |
| 4.1. Obtención de la muestra..... | 49 |
| 4.2. Análisis..... | 50 |
| 4.3. Conclusiones..... | 53 |
| 4.4. Recomendaciones..... | 54 |
| 4.5. Trabajos futuros..... | 54 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Comparativa entre contabilización manual y automática de las UFC..... | 50 |
|---|----|

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1 | Tipos de bacterias por su morfología..... | 7 |
| Figura 2. | Siembra por extensión utilizando la espátula de Driglasky, en caja Petri a partir de diluciones y volúmenes conocidos. | 13 |
| Figura 3. | Contador Coulter | 14 |
| Figura 4. | Contador digital Scan 500 de Interscience | 15 |
| Figura 5. | Estructura básica de un foto sensor | 16 |
| Figura 6. | Proceso de adquisición de una imagen digital..... | 17 |
| Figura 7. | Iluminación trasera difusa..... | 19 |
| Figura 8. | Iluminación frontal..... | 20 |
| Figura 9. | Iluminación axial difusa..... | 21 |
| Figura 10. | Iluminación lateral..... | 22 |
| Figura 11. | Iluminación difusa tipo domo | 23 |
| Figura 12. | Iluminación tipo campo oscuro. | 24 |
| Figura 13. | Imagen enfocada a través de la óptica | 24 |
| Figura 14. | Fotografías a una distancia de 1.20m con objetivos de diferente distancia focal: a) 35mm. b) 50mm. c) 100mm. d) 200mm..... | 26 |
| Figura 15. | Ejemplos de fotografías de cultivos bacterianos en caja Petri con diferentes aperturas de diafragma. | 27 |
| Figura 16. | a) Imagen original, b) elemento estructural, c) imagen erosionada..... | 28 |
| Figura 17. | Elementos estructurales: a) N4, b) N8..... | 28 |
| Figura 18. | Resultado de aplicar slicing a los píxeles de una imagen a) corrimiento con cero b) corrimiento respetando su valor original | 29 |
| Figura 19. | Hardware del sistema de contabilización automática | 34 |
| Figura 20. | Iluminación múltiple. a) trasera difusa, b) campo oscuro, c) frontal..... | 35 |
| Figura 21. | Hardware del prototipo con cubierta instalada..... | 35 |

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 22. | Sistema de movimiento para mejorar el contraste..... | 36 |
| Figura 23. | Medida de las distancias desde el sensor hasta la muestra. | 37 |
| Figura 24. | Proceso de tratamiento de la información..... | 38 |
| Figura 25 | Pantalla principal de digiCamControl versión 2.0. | 39 |
| Figura 26 | Diagrama de bloques del tratamiento de la imagen..... | 39 |
| Figura 27 | Selección de la imagen y delimitación del ROI. | 40 |
| Figura 28 | a) Imagen en escala de grises delimitada por el ROI, b) Imagen después de aplicar la máscara. | 40 |
| Figura 29 | Histograma generado de la imagen de trabajo. | 41 |
| Figura 30 | Límites del histograma..... | 42 |
| Figura 31 | Histograma de la ecualización de la imagen..... | 42 |
| Figura 32 | Histograma de imagen con baja luminancia | 43 |
| Figura 33 | Imagen con baja luminancia a) imagen original a colores b) imagen en escala de grises con ROI y mascara c) Imagen binarizada. | 45 |
| Figura 34 | Histograma de imagen con alta luminancia | 45 |
| Figura 35 | Imagen con alta luminancia a) imagen original a colores b) imagen en escala de grises con ROI y mascara c) Imagen binarizada. | 46 |
| Figura 36. | Presentación de UFC contabilizadas a) Imagen original b) Imagen con UFC marcadas. | 48 |
| Figura 37. | Interfaz en la que se presentan los resultados de la contabilización de las UFC | 48 |
| Figura 38. | Porcentaje de aproximación de pruebas..... | 52 |

RESUMEN

El presente trabajo de titulación con el tema “Diseño e implementación de un sistema para la contabilización automática de unidades formadoras de colonias bacterianas: coliformes, mesófilos aerobios, bacilos, estafilocos y levaduras usando técnicas de visión artificial”, muestra la creación de un prototipo, hardware y software, para obtener precisión y disminuir considerablemente el tiempo de recuento de colonias bacterianas en caja Petri en el laboratorio de Microbiología de Biotecnología en la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). El mismo está conformado de dos secciones, una destinada a la creación del hardware y otra a la programación del software. En el marco teórico se definen conceptos necesarios para el entendimiento del desarrollo de las dos secciones. En la sección del hardware se expone el diseño del prototipo, se explica el tipo de iluminación, la cámara utilizada y el sistema de movimiento para el mejoramiento del contraste. Mientras que en la sección del software se muestra la utilización de NI Vision Development del programa Labview de National Instruments para el proceso de tratamiento de imágenes, describiendo la manera en la cual el software procesa la información, contabiliza las bacterias y emite los resultados. Al final se describen los resultados obtenidos de la prueba de contabilización manual y automática, las conclusiones a las que se llegaron durante la realización del proyecto y finalmente las recomendaciones para futuros estudios y proyectos.

PALABRAS CLAVE:

- **AUTOMATIZACIÓN**
- **CONTADOR**
- **LABVIEW**
- **VISION ARTIFICIAL**
- **CONTROL**

ABSTRACT

This dissertation entitled “Design and implementation of a system for the recognition and counting of colony forming units (CFU): coliforms, mesophilic aerobic, bacilli, staphylococci and yeasts using digital image processing techniques” presents the design of a prototype, hardware and software. This prototype was designed to obtain more precise data and to reduce the amount of time spent analyzing and counting bacterial colonies on agar plate in the Microbiology laboratory of Biotechnology at Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). The project is divided in two sections, the first one is the hardware creation and the second is the software programming. The literature review defines concepts needed to understand the development of these two sections. The hardware section shows camera the lighting type used, as well as the motion system implemented for contrast enhancement. The software section explains the use of the NI Vision Development of National Instruments Labview program for image processing. It describes how the software processes the information, counts bacterial and displays the results. At the end of the dissertation, the results of the manual and automatic counting bacterial test are described to finish with conclusions and recommendations for further projects and studies.

KEYWORDS:

- **AUTOMATION**
- **COUNTER**
- **LABVIEW**
- **ARTIFICIAL VISION**
- **CONTROL**

INTRODUCCIÓN

El diseño de un prototipo, hardware y software, que utiliza técnicas de visión artificial con LabView de National Instruments para realizar la contabilización automática de unidades formadoras de colonias bacterianas se contextualiza dentro de la necesidad de obtener precisión y disminuir considerablemente el tiempo de análisis.

El Primer Capítulo, trata sobre el problema del cual surge la necesidad de la creación del prototipo, se describen los antecedentes, se presenta la justificación e importancia del proyecto y se determinan los objetivos para su desarrollo.

El Segundo Capítulo, constituido por el estado del arte, hace referencia a los conceptos básicos sobre las colonias bacterianas, la morfología de bacterias, los principios y fundamentos de la siembra y contabilización de colonias bacterianas. Así mismo, se describe en detalle el procesamiento digital de imágenes y el programa Labview.

El Tercer Capítulo, muestra el diseño y elaboración del prototipo. En la primera parte se describe la elaboración del diseño y la construcción del hardware. Mientras que en la segunda se expone el proceso de tratamiento de imágenes, describiendo como el software procesa la información, contabiliza las bacterias y presenta los resultados.

El Cuarto Capítulo presenta el análisis de resultados de la prueba de contabilización manual y automática, las conclusiones a las que se llegaron durante la realización del proyecto y las recomendaciones para futuros estudios y proyectos.

CAPITULO I

ASPECTOS GENERALES

2.1. Antecedentes

El proceso para la contabilización de colonias bacterianas se basa en el concepto de replicación bacteriana en el cual cada colonia surge de una simple célula y crece de manera exponencial. La siembra de las bacterias se da en volúmenes conocidos, en cajas de Petri utilizando agar como medio sólido donde se realiza el cultivo. Las bacterias sembradas son expuestas a temperaturas adecuadas de incubación y después de un tiempo de crecimiento se puede realizar el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clarck, 2009).

El conteo de colonias bacterianas es utilizado para diversos propósitos, como por ejemplo, en el análisis de alimentos, de agua, de productos farmacéuticos o del medio ambiente entre otros. La implementación de sistemas de visión artificial para el conteo de colonias bacterianas ha incrementado en los últimos años. Por ejemplo, el trabajo de Calderón, Ornelas, Ornelas, Bucio, & Rocha, (2007) titulado “Implementación de un Sistema de Visión Artificial para el Conteo de Colonias Bacterianas como Apoyo al Análisis del Grado de Contaminación de Alimentos” plantea una metodología basada en un procedimiento digital enfocado en la automatización del conteo de colonias bacterianas (conteo en placa). La técnica propuesta se basa en la aplicación de la Morfología Matemática, principalmente de la erosión sobre imágenes digitales binarizadas con dos niveles de umbralización (Calderón, Ornelas, Ornelas, Bucio, & Rocha, 2007).

De la misma forma Peña, Peña, & Moreno (2010), en su artículo “Sistema de visión artificial para el reconocimiento y el conteo de unidades formadores de colonias (UFC)”, presenta un sistema automático para el reconocimiento y conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) utilizando técnicas de

tratamiento digital de imágenes con el fin de realizar un control sanitario en el proceso de producción de leche de alta calidad (Peña, Peña, & Moreno, 2010). Estos trabajos coinciden con Pérez (2007) la importancia del uso de un sistema de visión artificial para el conteo de colonias bacterianas para satisfacer la necesidad de hacer el conteo más rápido, preciso y automático (Pérez, 2007).

Este proyecto está relacionado con los trabajos aquí presentados, ya que utiliza técnicas de visión artificial con LabView de National Instruments para realizar la contabilización automática de unidades formadores de colonias bacterianas, específicamente para las bacterias coliformes, mesófilos aerobios, bacilos, estafilococos y levaduras.

2.2. Justificación e Importancia

El laboratorio de Investigación de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE “promueven la investigación, educación y transferencia de tecnología para aplicaciones de la biotecnología en beneficio del medio ambiente, la agricultura y la salud humana acorde con los adelantos científicos, tecnológicos y pedagógicos que la educación superior requiere” (ESPE, 2016).

Dentro del laboratorio de Investigación de Biotecnología se encuentra el laboratorio de Microbiología, el cual tiene como “finalidad dar al estudiante herramientas básicas para el manejo y aprovechamiento de microorganismos aplicados en las áreas biotecnológica, clínica, agrícola, ambiental e industrial” (ESPE, 2016). Este laboratorio cuenta con personal altamente capacitado en investigación académica, quienes desarrollan actividades sujetas a las normas o especificaciones técnicas dentro del marco legal vigente. Debido a lo cual la universidad fomenta la investigación de alta calidad, beneficiando tanto a estudiantes como a docentes e investigadores (ESPE, 2016).

El laboratorio cuenta con tres contadores manuales de colonias bacterianas ya que se trabaja periódicamente con siembra de bacterias en caja Petri. La precisión en el conteo de colonias bacterianas depende estrictamente de la concentración y visibilidad del operario. Por ello, existe la

posibilidad de que las mediciones, en ocasiones, puedan ser proclives a errores. Adicionalmente, en el laboratorio no se utilizan otros métodos de conteo u otras técnicas existentes en el mercado debido al alto costo que representan.

Por las razones presentadas, este proyecto centra su interés en proporcionar al laboratorio de Microbiología el estudio, diseño y elaboración del hardware y software de un prototipo para el conteo automático de colonias bacterianas. Con la implementación de este proyecto de fin de carrera, se logrará la optimización del proceso de conteo de las unidades formadoras de colonias con la finalidad de obtener precisión y disminuir considerablemente el tiempo de análisis. Además, las imágenes obtenidas en cada análisis podrán ser almacenadas para su uso en posteriores estudios. El alcance de este proyecto beneficiará tanto a docentes, alumnos e investigadores del laboratorio como a la comunidad universitaria. Si bien este proyecto se realizó partiendo de las necesidades encontradas en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, para su utilización dentro de la institución, esta debe adquirir la licencia de uso de *Labview* de *National Instruments*.

2.3. Objetivos.

2.3.1. General.

Diseñar y elaborar el software y hardware de un prototipo para la automatización del proceso de contabilización de unidades formadoras de colonias basado en técnicas de visión artificial utilizando *LabView* de *National Instruments*.

2.3.2. Específicos.

1. Investigar los principios y conceptos fundamentales de la contabilización de unidades formadoras de colonias.

2. Diseñar y construir el hardware que se adapte a las necesidades del proyecto.
3. Desarrollar el software necesario para la automatización del proceso de contabilización de bacterias.
4. Analizar los beneficios de la implementación de un sistema automático para la contabilización de UFC en el laboratorio de Microbiología de la ESPE.

CAPÍTULO II

ESTADO DEL ARTE

2.4. Introducción.

Este capítulo se divide en dos partes en las que se revisan conceptos teóricos importantes. La primera muestra conceptos básicos de colonias bacterianas y la morfología de bacterias. Se describe las características básicas de los cinco tipos de bacterias a contabilizar: coliformes, mesófilos aerobios, bacilos, estafilococos y levaduras para finalizar con los principios y fundamentos de la siembra y contabilización de colonias bacterianas. La segunda parte del capítulo muestra un detalle del procesamiento digital de imágenes. Se empieza con conceptos básicos de imagen digital para continuar con el estudio del sensor de la cámara, la iluminación de la muestra, el estudio de óptica y se concluye revisando conceptos de operaciones morfológicas, *slicing*, umbralización, binarización y el programa *Labview*.

2.5. Colonias bacterianas.

Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta y se los puede encontrar en el aire, la tierra, el agua, las plantas e incluso en los seres humanos. Estudios han comprobado que algunas bacterias pueden sobrevivir en condiciones extremas del espacio exterior como por ejemplo en manantiales calientes de los lagos antárticos. La boca humana es hogar de más de 500 especies de bacteria y en una cucharada de tierra vegetal se puede encontrar más de mil millones de bacterias (Microbiology, 2016).

Desde el inicio de la utilización del microscopio óptico se ha podido clasificar a las células según su estructura en dos grupos; los organismos procariotas y los eucariotas. Las células eucariotas pueden guardar su ADN (Ácido desoxirribonucleico) en un compartimiento intercelular delimitado por una membrana llamada núcleo. A su vez, poseen un citoesqueleto, que es un

sistema de proteínas filamentosas. El citoesqueleto junto con la gran cantidad de proteínas que a las que se unen, más un sistema de motores y rodillos le dan a las células su tensión mecánica, controlan su forma y dirigen y guían sus movimientos (Alberts, Johnson, Raff, Roberts, & Walter, 2010).

Al contrario de las células eucariotas, las células procariotas no muestran un compartimiento nuclear diferenciado para almacenar su ADN y, en cuanto a su apariencia externa, son células pequeñas y simples con forma esférica o de bastoncillo. Las células eucariotas se pueden encontrar en las plantas, los hongos y los animales. Existen dos grupos de procariotas que se denominan bacterias o eubacterias y arqueas o arqueobacterias (Alberts, Johnson, Raff, Roberts, & Walter, 2010).

El primer grupo de procariota denominado bacterias suelen ser organismos unicelulares que en su mayoría poseen paredes celulares que contienen la molécula estructural peptidoglicano. A pesar de que algunas bacterias pueden causar enfermedades, otras cumplen un papel beneficioso como la *Cyanobacteria* que produce cantidades significantes de oxígeno a través de la fotosíntesis (Willey, 2008). Así mismo, las bacterias cumplen funciones muy importantes en los procesos biogeoquímicos, es decir que son parte fundamental en la descomposición de materia. En el cuerpo humano la mayoría de carga bacteriana se encuentra en la piel y en el tracto digestivo, hay aproximadamente diez veces células bacterianas como células humanas en todo el cuerpo (Sears, 2005).

Las arqueas son el segundo grupo de procariotas, éstas se diferencian de las bacterias en varias características pero la más notable es su secuencia única de ácido ribonucleico ribosómico (ARN). Algunas arqueas tienen características metabólicas inusuales tales como la arquea metanógena que genera el gas metano (Willey, 2008).

2.6. Morfología de las bacterias.

Las células bacterianas tienen tamaños pequeños de menos de una micra hasta 10 micras de longitud y de 0.2 a una micra de anchura. Muchas bacterias se desplazan gracias a sus prolongaciones celulares llamadas

flagelos. Adicionalmente, casi todas las bacterias están provistas de una cápsula viscosa fuera de la pared celular que sirve como una capa protectora. Las bacterias se clasifican principalmente por sus características fisiológicas y bioquímicas ya que pueden tener formas y estructuras diferentes. Sin embargo, por sus características morfológicas se pueden distinguir los siguientes tipos (ver **Figura 1**):

- **Bacilos:** estas bacterias pueden presentarse como bastones aislados o como largas cadenas de bastones aislados entre sí.
- **Cocos:** estas bacterias presentan formas esféricas que pueden estar aisladas en algunas especies. Por ejemplo, los diplococos se encuentran en grupos de dos, los estreptococos en cadenas largas y los estafilococos en acúmulos irregulares o en racimo de uvas.
- **Helicoidales:** las formas espirales o helicoidales tienen dos formas; los espirilos que a veces se pueden parecer a una coma y tienen pocas espiras y los espiroquetas que tienen muchas vueltas a modo de sacacorchos (Villem, 1996).

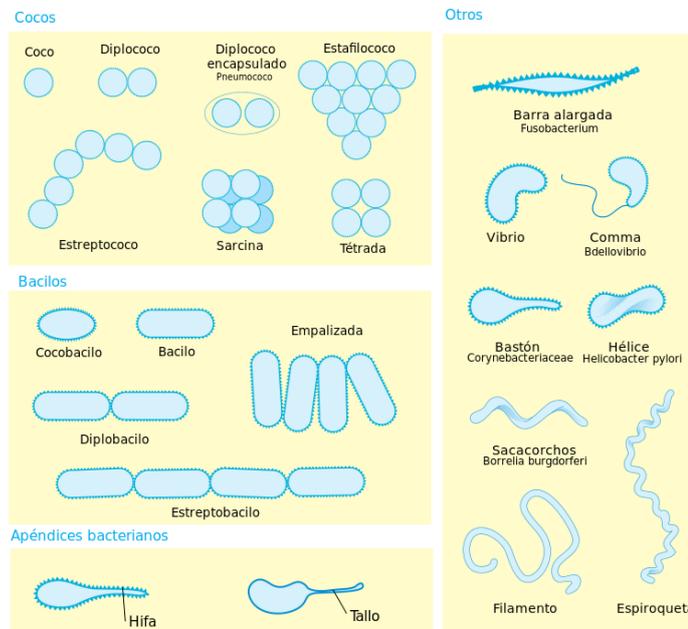


Figura 1. Tipos de bacterias por su morfología.

Fuente: Ruiz, 2006

Para el propósito de este proyecto se analizarán específicamente cinco tipos de bacterias: coliformes, mesófilos aerobios, bacilos, estafilococos y levaduras, los cuales son descritos a continuación.

2.6.1. Coliformes

Los microorganismos coliformes son “bacilos anaeróbicos facultativos, gramnegativos, no formadores de endoesporas, que fermentan la lactosa con producción de gas a las 48 horas en una incubación a 36°C” (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clarck, 2009). Estos microorganismos son a la vez indicadores útiles de sanidad de alimentos y agua, debido a que muchos de ellos habitan en grandes cantidades en el tracto intestinal del hombre y otros animales. Dentro de este grupo de organismos se encuentran el *Enterobacter* que es normalmente inocuo, el *Escherichia coli* que es el organismo intestinal más frecuente que ocasionalmente es patógeno y el *Klebsiella pneumoniae* que es el patógeno menos frecuente que habita en el intestino (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clarck, 2009).

2.6.2. Mesófilos aerobios

Los mesófilos tienen temperaturas óptimas moderadas y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se los encuentra en animales de sangre caliente y en medios acuáticos y terrestres de latitudes templadas o tropicales. Estos organismos crecen mejor a temperaturas entre 20°C y 45°C (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clarck, 2009).

El conteo de bacterias más viable se basa comúnmente en el número de colonias que se desarrollan en placas de agar nutritivo, siendo el recuento de bacterias aerobias mesófilas el más comúnmente utilizado para indicar la cantidad sanitaria de alimentos. Por ejemplo, un recuento elevado de esta bacteria en productos crudos o no tratados indica una alteración incipiente del alimento, más no un peligro para la salud del consumidor (Campos Diaz, 2000).

2.6.3. Bacilos

Los bacilos presentan una forma cilíndrica alargada como la de un pequeño bastón y crecen en medios definidos que contienen una serie determinada de fuentes de carbono. Dentro de los bacilos Gram positivos, se encuentran las bacterias que son capaces de esporular. Por ejemplo, las bacterias *Clostridium* spp. y *Bacillus* spp. pueden sobrevivir en medios hostiles gracias a la formación de una estructura resistente llamada endospora. Muchas de estas especies forman parte de la flora normal del cuerpo humano y se encuentran distribuidas en el ambiente (Macedo & Vola, 2006).

Por otra parte, los bacilos Gram negativos son elementos comunes de la flora que se encuentra en todo el cuerpo. Estos bacilos actúan como patógenos secundarios y son los anaeróbicos más comúnmente encontrados en infecciones, incluyendo dentro del grupo también algunas de las especies más resistente a los antibióticos (Baron & Finegold, 1996).

2.6.4. Estafilococos

Los estafilococos son Gram-positivas que generalmente se observan en racimos. Estas bacterias crecen fácilmente en agar, sangre y otros medios convencionales. Los estafilococos se encuentran presentes en las fosas nasales de un 20-30% de la población, encontrándose las tasas más altas en personas con diabetes y usuarios de drogas inyectables (Cosgrove & Auwaerter, 2015).

El genoma de estafilococo tiene un cromosoma circular con *prophages*, plasmias y transpones. Los genes que regulan la resistencia a los antibióticos son transferidos entre las cepas de estafilococos, entre las especies bacterianas gram positivas o a través de los elementos cromosómicos adicionales (Lowy, 1998). Un ejemplo de este tipo de bacteria es el estafilococo dorado es un agente que causa enfermedades que producen lesiones inflamatorias con contenido purulento y que tiene la capacidad de producir toxinas (Echeverria & Iglesias, 2003).

2.6.5. Levaduras

Las levaduras son el modelo eucariota más pequeño que se puede dividir indefinidamente en su estado haploide o en su estado diploide dependiendo de sus condiciones de temperatura. Las levaduras tienen la característica especial de ser organismos extraordinariamente adecuados para estudios genéticos debido a que su genoma es extremadamente pequeño (Alberts, Johnson, Raff, Roberts, & Walter, 2010).

Las levaduras, al igual que casi todas las bacterias, obtienen sus nutrientes al absorber sustancias nutritivas de forma directa por medio de la membrana celular. Las levaduras solo necesitan sales orgánicas, oxígeno y alguna clase de azúcar para obtener energía y poder sintetizar las demás sustancias necesarias para la vida como por ejemplo las proteínas, ácidos nucleicos, grasas, vitaminas, etc. (Viljee, 1996).

2.7. Principios y fundamentos de la siembra y contabilización de UFC.

2.7.1. Siembra

En términos microbiológicos, se llama siembra al proceso en el cual se lleva una porción de una población de microorganismos de una muestra a un medio de cultivo nutritivo, donde se crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. Debido a que la diversidad metabólica de los microorganismos es muy amplia, no existe un medio de cultivo universal adecuado para todos, por lo que existe una variedad de tipos (García Valdés, 2009)

Cuando el cultivo se da en medios sólidos, las células son inmovilizadas permitiéndolas crecer y formar colonias. Estas colonias bacterianas pueden ser de forma y tamaño variable dependiendo del organismo, de las condiciones del cultivo, del suministro de nutrientes y de otros parámetros fisiológicos. La utilización de la placa de Petri se ha venido haciendo por más de un siglo para el recuento. Para preparar el medio sólido igual que el medio

líquido se debe añadir agar como agente gelificante, normalmente al 1,5%, antes de esterilizar los medios (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clarck, 2009).

2.7.2. Medios de siembra.

Debido a la existencia de microorganismo en el medio ambiente, los medios de cultivo deben ser esterilizados antes de empezar con el proceso de siembra. Normalmente la esterilización de los cultivos se hace mediante calor húmedo en un recipiente de presión, a lo que se le denomina autoclave. “Cuando se ha preparado un medio de cultivo estéril, este puede recibir un inóculo de un cultivo crecido previamente y empezar de nuevo el proceso de crecimiento” (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clarck, 2009) para lo que requiere el uso de técnicas asépticas. Esta técnica implica una serie de procedimientos para evitar la contaminación de los cultivos durante la manipulación de los mismos (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clarck, 2009).

Las muestras se transfieren a una superficie de placas con agar donde se desarrollarán colonias como resultado del crecimiento y división de las células aisladas que fueron sembradas.

Otro método de siembra fue descubierto por Robert Koch quien fue el primero en cultivar bacterias en medios de cultivo sólidos aprovechando el hecho de que las bacterias solo se pueden desplazar en distancias cortas en un medio sólido. (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clarck, 2009). “Una gota de heces o esputo se mezcla con agar (extraído de una alga marina) líquido caliente, que está a punto de solidificarse” (Villem, 1996). Esta mezcla se extiende sobre una cápsula de vidrio con tapa y se deja enfriar para que el medio se solidifique dejando las bacterias en la posición inicial.

Cuando las bacterias se multiplican, las células hijas (descendientes de una sola bacteria inicial) quedan atrapadas en una pequeña área formando colonias que constituyen un cultivo puro. Para incubar otra colonia, se transfiere algo de la colonia original a otra placa de agar usando un asa de platino estéril (Villem, 1996).

El descubrimiento del uso del agar, en vez de gelatina, como agente solidificante para medios de cultivo seco se debe a Walter Hesse (1884). El agar es un polisacárido derivado de las algas rojas que en el siglo XIX se utilizaba como agente gelificante. La característica más importante del agar como agente solidificante es que permanece sólido a 37°C y después de fundirse durante el proceso de esterilización se mantiene líquido hasta los 45°C lo que le permite ser vertido en recipientes estériles.

Además, el agar permite que muchos medios sólidos sean transparentes facilitando la diferenciación de colonias bacterianas (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clarck, 2009). Para la siembra en seco se utiliza el agar PCA conocido en inglés (*Plate Count Agar*). Este tipo de agar es un medio de crecimiento microbiológico usado para el recuento en placa de bacterias en agua, alimentos, aguas residuales y muestras clínicas (Himedia, 2011).

2.7.3. Métodos de siembra.

Siembra volumétrica:

Esta siembra se la puede realizar en medios de cultivo sólido y líquido. El volumen de las muestras líquidas pueden ser predeterminados en algunos casos y en otros no. Por ejemplo, en las muestras de exudado vaginal tomadas con pipetas de Pasteur no se puede determinar el volumen, pero en una muestra de sangre para hemocultivo si se lo puede hacer ya que se utiliza una jeringuilla para la medición (Gonzalez & Barrial, 2004).

Siembra por extensión

Al igual que la siembra volumétrica, la siembra por extensión se la puede realizar en medios de cultivo sólido y líquido. Para realizar este tipo de siembra se puede utilizar la espátula de Driglaski. Cuando se siembra una gota de muestra líquida en un cultivo sólido esparce la muestra con la espátula realizando un movimiento espiral (ver Figura 2). Por otra parte, la siembra por extensión se puede realizar con un hisopo grueso embebido de un cultivo

líquido deslizándolo sobre toda la superficie de una placa de agar (Gonzalez & Barrial, 2004). Una vez que la suspensión se absorbe en el agar, las células bacterianas quedan sobre la superficie. La siembra por extensión presenta la ventaja de que permite obtener un mayor número de colonias aisladas lo que facilita el recuento de las bacterias (Centro de Bachillerato Tecnológico e Industrial, 2015).

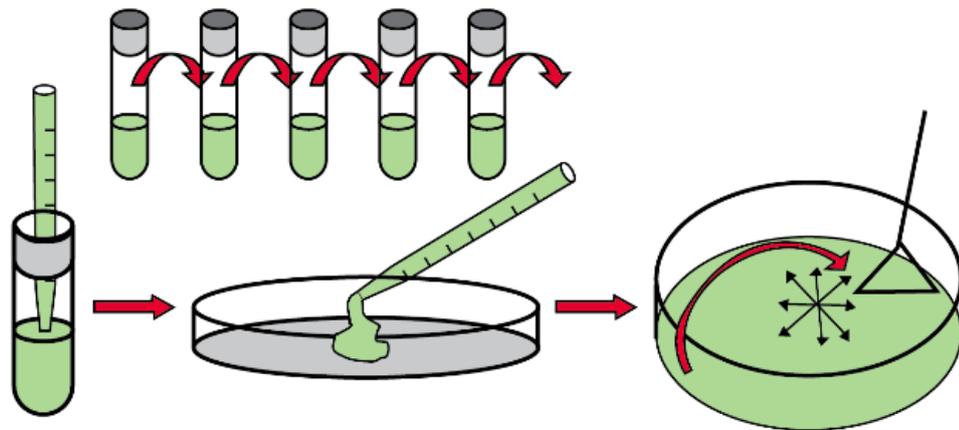


Figura 2. Siembra por extensión utilizando la espátula de Drigalsky, en caja Petri a partir de diluciones y volúmenes conocidos.

Fuente: Gonzalez & Barrial,2014

2.7.4. Contabilización.

Existen varias técnicas para medir y contabilizar el crecimiento microbiano, la elección de la técnica más apropiada dependerá de los objetivos de la situación experimental. La técnica más comúnmente utilizada es la técnica de conteo directo en cámara de Petroff-Hausser. El uso de esta técnica además de ser fácil de realizar, baja en costos y relativamente rápida, también proporciona información sobre el tamaño y la morfología de los microorganismos (Willey, 2008).

Los métodos tradicionales de conteo directo no distinguen células vivas de las células muertas. Sin embargo, en la actualidad, algunos kits comerciales utilizan reactivos fluorescentes para teñir las células vivas y muertas de

distintos colores facilitando su conteo en una muestra (Willey, 2008). El conteo de muestras también se puede hacer electrónicamente con una máquina; por ejemplo el Contador Coulter (ver Figura 3) registra cada célula a medida que pasan a través de un pequeño orificio. Debido a que algunas bacterias son pequeñas y difíciles de ver y otras a menudo se agrupan en cadenas, el reporte del conteo de colonias bacterianas puede mostrar un número menor de bacterias al número real de la muestra (TMCC, 2013).



Figura 3. Contador Coulter

Fuente: (Beckmancoulter, 2016)

Los contadores digitales utilizan visión artificial como fundamento y están constituidos por cámaras fotográficas de alta velocidad y de gran resolución. El proceso empieza con la toma de una fotografía de la caja Petri para posteriormente con el empleo de un software arrojar automáticamente el número de bacterias. Para que este proceso se dé es necesario la utilización de una computadora. Los rangos estadísticamente confiables de número de colonias bacterianas dentro del rango de sensibilidad de la cuenta en placa de bacterias es de entre 30 y 300 UFC por placa (Camacho, y otros, 2009).

Cada fabricante desarrolla la programación del equipo para el conteo, configurando ciertos parámetros para lograr la mejor automatización del proceso. Algunos equipos son capaces de detectar bacterias de hasta de 0.1

mm de diámetro (Interscience, 2016). La desventaja de este tipo de contadores es el elevado costo que representan para un laboratorio, un ejemplo es el contador Scan 500 de la marca Interscience (ver Figura 4).



Figura 4. Contador digital Scan 500 de Interscience

Fuente: (Interscience, www.interscience.com, 2016)

2.8. Procesamiento digital de Imágenes

2.8.1. Imagen digital

Una imagen es una representación hecha por medio de dibujos, imágenes, pinturas o fotografías que contiene información descriptiva acerca del objeto que representa. Esta puede ser definida como una función $f(x, y)$; en la cual x y y representan las coordenadas de un plano y la amplitud de la función f el nivel de gris en ese punto para el caso de imágenes en escala de grises. La palabra digital se relaciona con el cálculo por métodos numéricos o por unidades discretas. Es por ello que una imagen digital es definida como la representación numérica de un objeto. Una imagen se puede representar de manera digital en una computadora cuando los valores de (x, y) y el valor de

la amplitud de f de una imagen son cantidades finitas y discretas (Gonzalez & Woods, 2002).

Las imágenes digitales contienen píxeles, que son cada uno de los elementos finitos de una imagen con su particular localidad y amplitud. El procesamiento digital de imágenes se refiere al procesamiento de una imagen digital mediante el uso de una computadora. En el mecanismo utilizado para la captura de una imagen digital, la energía (luz) que llega al sensor se transforma en un valor de voltaje, esto se consigue con un flujo de corriente y el material del sensor. La señal de salida del sensor es la respuesta a las variaciones de energía de entrada en cada punto del mismo (ver Figura 5) (Gonzalez & Woods, 2002).

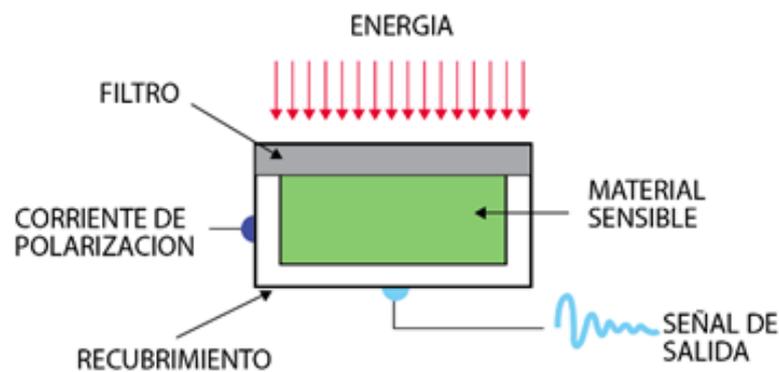


Figura 5. Estructura básica de un foto sensor

Fuente: Gonzalez & Woods, 2002

Los sensores se encuentran en básicamente en arreglos en forma de matriz. Un sensor muy común en las cámaras fotográficas es el tipo CCD, por sus siglas en inglés (*Charge Coupled Device*), que puede estar construido con arreglos de 4000 x 4000 elementos o más. La señal de salida de un sensor es proporcional a la energía de luz que es absorbida por la superficie del mismo (Gonzalez & Woods, 2002).

El proceso de adquisición de imágenes se encuentra representado en la Figura 6, en donde se puede observar que la energía es reflejada por la superficie del objeto en escena, enfocadas a través de una lente. La información es recogida por el arreglo de sensores y transformada en una

imagen análoga, que luego en otra sección del sistema es transformada en una imagen digital (Gonzalez & Woods, 2002).

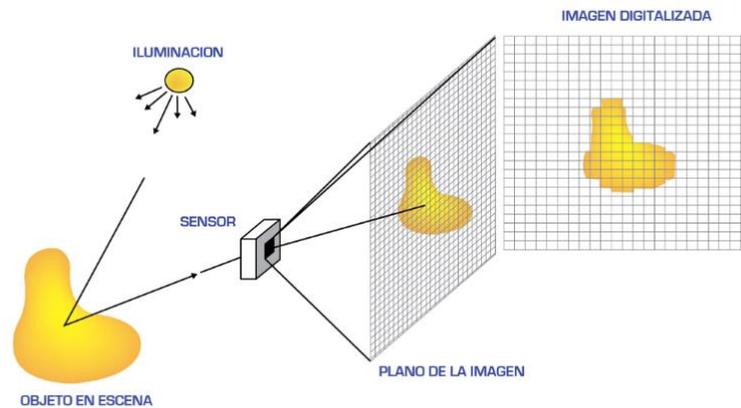


Figura 6. Proceso de adquisición de una imagen digital

Fuente: (Gonzalez & Woods, 2002)

El sensor es el elemento sobre el cual se proyecta la luz que pasa a través de la lente y como respuesta genera una imagen digital. Es decir, el sensor convierte los fotones en carga eléctrica y los transforma en una imagen (Ministerio de Educación del Gobierno de España [MECD] y Fondo Social Europeo [FSE], 2012). A pesar de que se siguen actualizando y elaborando mejores tipos de sensores, los más comercializados son los sensores CCD y CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*). Esto se debe a que los últimos sensores consumen menos energía y permiten un procesamiento de la imagen más rápido. Los sensores CMOS tiene un rango dinámico de 120dB, a diferencia de los sensores CCD que tienen 70dB, lo que significa que tiene una mejor adaptación del sensor al brillo del entorno (García & Avilés, 2008).

Los sensores se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo a su arquitectura: sensores lineales y sensores de área. Los sensores lineales, también llamados de barrido, se basan en una línea de fotodiodos que se desplazan mientras leen la imagen, alcanzando resoluciones de hasta 1x6000 píxeles, normalmente son empleados en escáneres. Mientras que los sensores de área alcanzan resoluciones de 1024x1024 píxeles y son empleados en la mayoría de cámaras digitales (García & Avilés, 2008).

2.8.2. Estudio de la iluminación de la muestra

En el desarrollo de cualquier proyecto de visión artificial, la iluminación es una parte fundamental en la adquisición de las imágenes. Existe una gran variedad de maneras de iluminar el objetivo, cada una aprovecha las propiedades reflectivas o de absorción de la luz del objeto (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012).

El propósito de la iluminación es controlar la forma en la que la cámara ve el objeto para determinar si cumple con las especificaciones requeridas. Los objetivos de la iluminación son optimizar el contraste, normalizar variaciones de iluminación del ambiente y con ello simplificar el post procesado de la imagen. Dentro de los tipos de iluminación más utilizados se encuentran: la iluminación trasera difusa, iluminación frontal, iluminación axial difusa, iluminación lateral, iluminación difusa tipo domo, iluminación tipo campo oscuro (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012).

Iluminación trasera difusa

La iluminación trasera difusa es también conocida como luz de fondo o *back light* (ver Figura 7). En este tipo de disposición de luz, la cámara se dirige directamente a la fuente de luz que tiene que ser uniforme en toda la superficie, así la cámara observa una superficie totalmente blanca. El objeto se coloca entre la fuente de luz y la cámara, de manera que se producirá una sombra que será reconocida sobre el fondo blanco, obteniendo así el máximo contraste posible. Comúnmente se aplica este tipo de iluminación cuando se requiere observar el perfil de los objetos (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012).

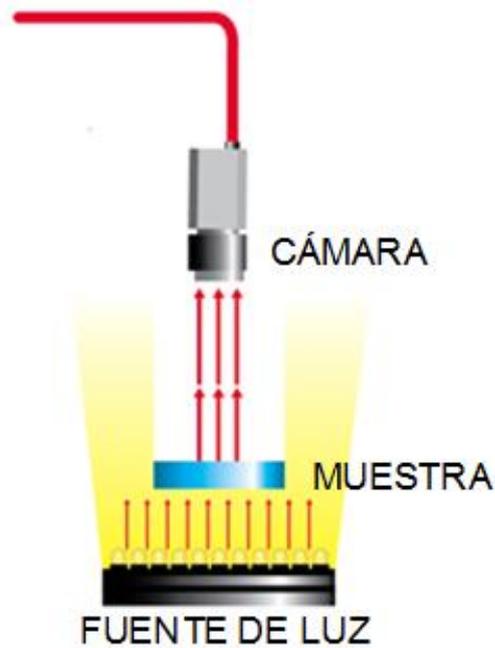


Figura 7. Iluminación trasera difusa.

Fuente: (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012)

Iluminación frontal

La iluminación frontal se la conoce también como luz radial difusa o *front light*. La cámara se ubica mirando al objeto en la misma dirección de la fuente de luz, así se reducen las sombras ya que la iluminación proviene de todo el perímetro del eje de la cámara (ver Figura 8). También ayuda a suavizar las texturas y minimiza polvo e imperfecciones que pueda tener el objeto inspeccionado. Para esta iluminación se utilizan anillos de luz. Se usa mayormente en condiciones donde la muestra posee una superficie con poco reflejo, para aplicaciones que requieren la detección de diferentes colores o cambios de colores. Entre las ventajas de la técnica se encuentran la eliminación de sombras y permite trabajar a mayor distancia entre la cámara y el objeto. Los inconvenientes se dan en muestras que tengan superficies reflectantes (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012).

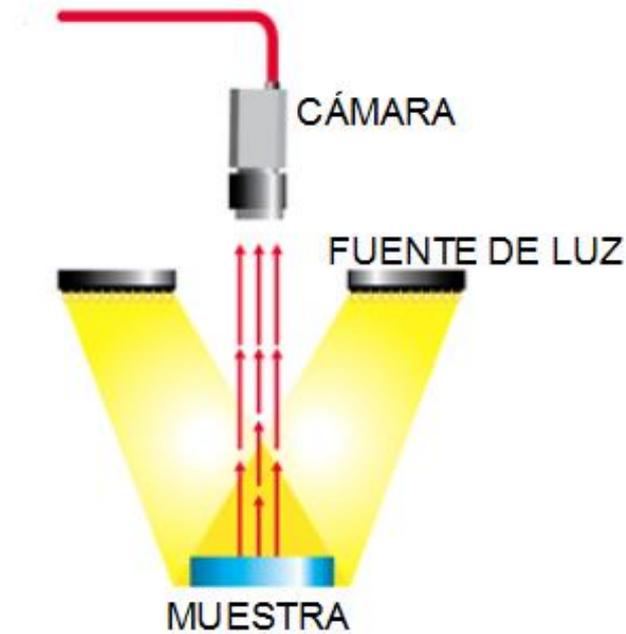


Figura 8. Iluminación frontal.

Fuente: (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012)

Iluminación axial difusa.

Cuando se trabaja con iluminación axial difusa, la fuente de luz se coloca lateralmente a 90° de la dirección de la cámara fotográfica (ver Figura 9). La luz es reflejada por un espejo semitransparente que se encuentra entre la cámara y el objetivo, de esta manera se consigue una luz difusa homogénea. Este tipo de iluminación generalmente aplica para la detección de marcas en superficies altamente reflectantes, pero no permite reconocer relieves en el objeto (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012).

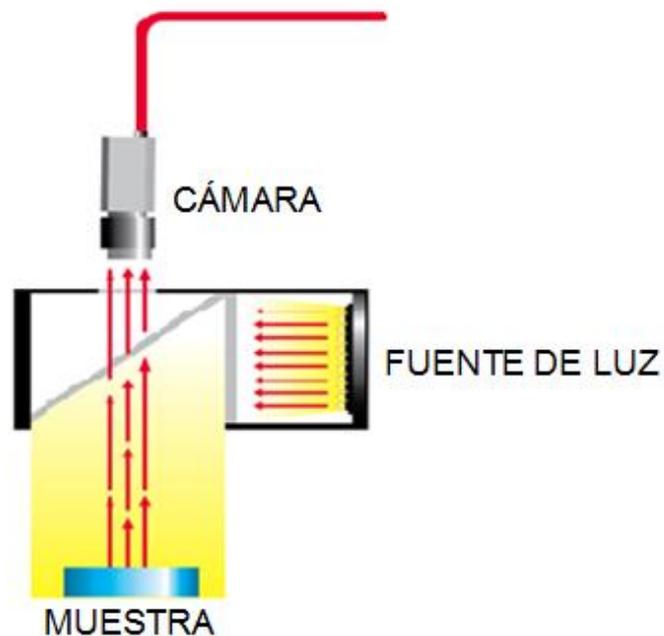


Figura 9. Iluminación axial difusa.

Fuente: (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012)

Iluminación lateral.

Para la iluminación lateral, la cámara se posiciona directamente mirando a la muestra, mientras que la fuente de luz se coloca de manera lateral en dirección a la muestra (ver Figura 10). El ángulo de inclinación que se utilice influirá en el grado de detección de resalte de los relieves. La disposición es útil en aplicaciones donde se requiere detectar fisuras, rayas o deformaciones en objetos que tengan superficies reflectantes y planas (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012).

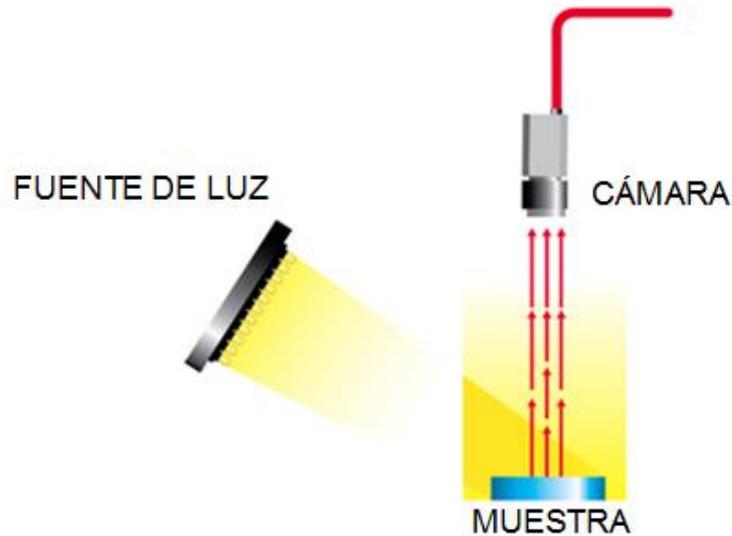


Figura 10. Iluminación lateral.

Fuente: (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012)

Iluminación difusa tipo domo.

A la iluminación difusa tipo domo también se la conoce como día nublado ya que no produce sombras en ninguna dirección. En esta configuración la luz es reflejada en una cúpula de manera frontal y la cámara está directamente frente al objetivo, así se consigue una luz difusa en todas las direcciones (ver Figura 11). Se recomienda para aplicaciones en superficies metálicas o plásticas reflectantes. Su desventaja es el alto costo de fabricación (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012).

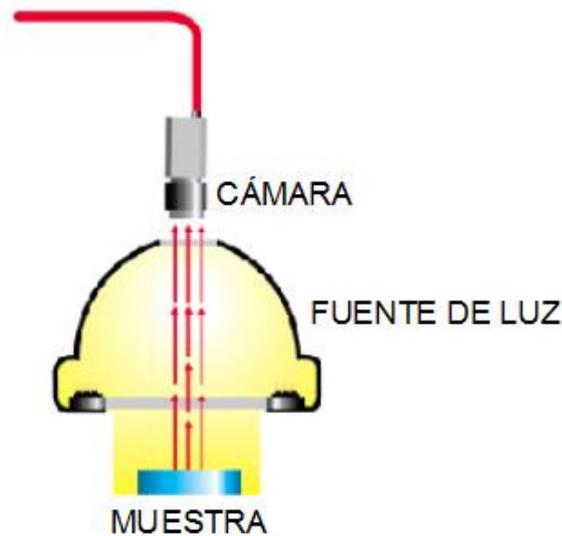


Figura 11. Iluminación difusa tipo domo

Fuente: (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012)

Iluminación tipo campo oscuro.

En la iluminación tipo campo oscuro, la luz es emitida lateralmente en todas las direcciones por un anillo y la cámara es colocada frente al objetivo. Detrás del objetivo se puede colocar una base que absorba la luz para generar mayor contraste en la imagen (ver Figura 12). Se logra destacar los detalles en muestras con muy poco contraste. La configuración no es recomendable en muestras que absorben la luz (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012).

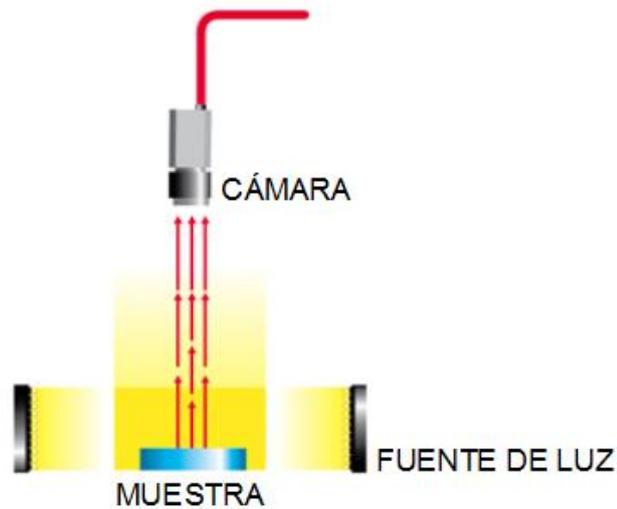


Figura 12. Iluminación tipo campo oscuro.

Fuente: (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012)

2.8.3. Estudio de la óptica.

Las ópticas se utilizan como medios para transmitir de forma controlada la luz hacia el sensor de la cámara fotográfica y obtener una imagen enfocada (ver Figura 13).

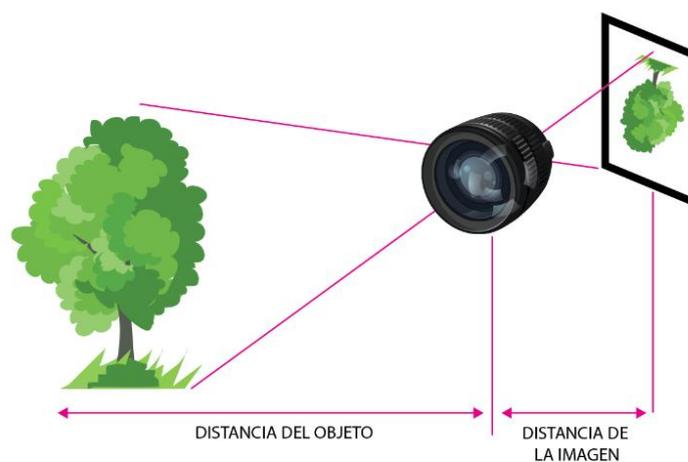


Figura 13. Imagen enfocada a través de la óptica

Fuente: (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012)

Para determinar la óptica correcta para la cámara se debe aplicar una fórmula matemática según (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012):

$$f = \frac{b \cdot D}{B} \cdot c \quad (1)$$

Donde:

f = Distancia focal [mm]

b = Ancho del sensor [mm]

B = Ancho del objeto [mm]

D = Distancia de trabajo [mm]

c = Factor de conversión del tamaño del sensor

Entre los conceptos más importantes dentro del estudio de la óptica se encuentran la distancia focal, la profundidad de campo y la apertura de diafragma descritos a continuación.

Distancia Focal.

Según el Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo (2012), se define distancia focal como la distancia relativa entre la lente y el sensor de la cámara fotográfica, expresada en mm. Por la distancia focal se tiene dos tipos de lentes: variables o también llamados zoom, y de distancia focal fija. Al fotografiar un objeto desde una misma distancia usando lentes de diferentes distancias focales, se pueden obtener imágenes distintas en las que el objeto parece tener tamaños diferentes (ver Figura 14) (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012).



Figura 14. Fotografías a una distancia de 1.20m con objetivos de diferente distancia focal: a) 35mm. b) 50mm. c) 100mm. d) 200mm.

Elaborado por: Naranjo, 2016

Profundidad de campo

La profundidad de campo es la distancia en la que los objetos aparecen enfocados, a menor apertura de diafragma mayor es la profundidad de campo. Una imagen más nítida en toda su extensión normalmente se dice que tiene una amplia profundidad de campo, esto se puede observar en fotografías de paisajes. En fotografías donde se requiere que solo el objeto a fotografiar sea enfocado mientras que todo a su entorno aparezca borroso, se utiliza una profundidad de campo reducida (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012).

Apertura de diafragma.

El diafragma es una pieza de la óptica en forma de cortina que restringe la cantidad de luz que pasa hasta el sensor, comparándolo con la visión humana, cumple la función del iris en el ojo (ver Figura 15) (Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo, 2012). El diafragma se mide en números f. Bajo condiciones similares de tiempo de exposición, nivel de luz, distancia focal, al variar la apertura de diafragma se tiene una imagen más

expuesta con un diafragma muy abierto, y una imagen subexpuesta con un diafragma más cerrado.

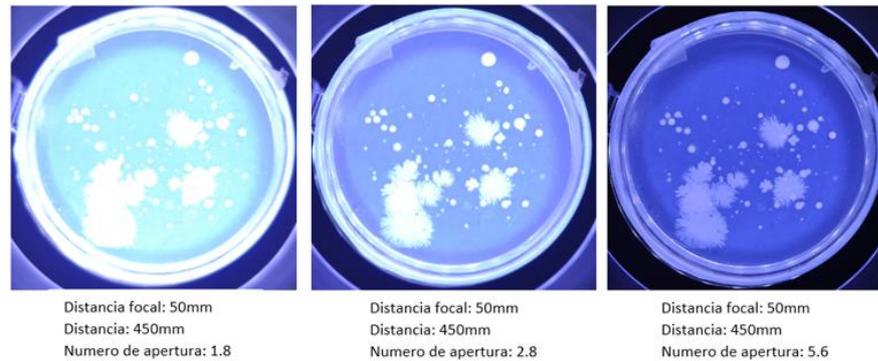


Figura 15. Ejemplos de fotografías de cultivos bacterianos en caja Petri con diferentes aperturas de diafragma.

Elaborado por: Naranjo, 2016

2.9. Operaciones Morfológicas.

La morfología matemática se basa en la geometría y forma de los objetos. Estas operaciones sirven para simplificar las imágenes conservando las principales características de forma de los objetos. Se fundamenta en operaciones de la teoría de conjuntos. Según García & Avilés (2008), las operaciones morfológicas que se pueden aplicar a imágenes binarias y en escala de grises son: dilatación, erosión, apertura y cierre (García & Avilés, 2008). Al aplicar estas operaciones se puede realizar la extracción de fronteras, relleno de regiones, adelgazamiento, engrosamiento, esqueleto, poda y descripción de objetos (área, perímetro, etc.).

2.9.1. Erosión.

La erosión hace más pequeña a la imagen y extrae los elementos que están más alejados del centro del objeto. Según García & Avilés (2008), la erosión combina dos conjuntos por medio de la resta vectorial, es decir que son los píxeles de A para los que todas las traslaciones definidas por B

también están en A (ver Figura 16). B también es llamado elemento estructural (García & Avilés, 2008).

$$A \ominus B = \bigcup_{\beta \in B} (A - B) \quad (2)$$

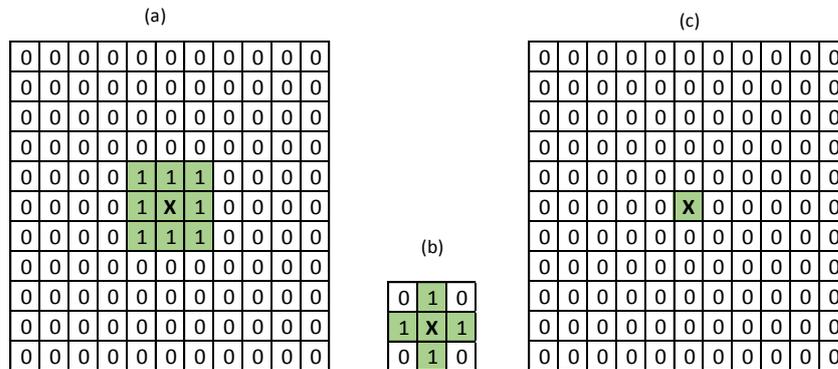


Figura 16. a) Imagen original, b) elemento estructural, c) imagen erosionada

Fuente: (García & Avilés, 2008)

Los elementos estructurales más comunes son aquellos que se encuentran 4-conectados (N4), y los 8-conectados (N8) (ver Figura 17).

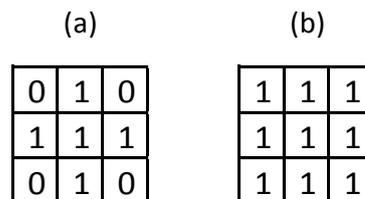


Figura 17. Elementos estructurales: a) N4, b) N8

Fuente: (García & Avilés, 2008)

2.9.2. Slicing

La función *Slicing* es utilizada para eliminar el fondo de una imagen. Para realizar esta función se obtiene una franja determinada de niveles de gris, a la que se la deja a un valor, mientras que a los valores de luminosidad

restantes los pone en cero, o los deja con su valor, dependiendo lo que la aplicación requiera (Marcos, y otros, 2006).

Dada una imagen de dos dimensiones $M \times N$ de 256 niveles de grises, donde 0 es el negro total y 255 es el blanco nieve, cada punto está especificado por su posición i y j con origen en la esquina inferior izquierda (Marcos, y otros, 2006).

$$IMA(i, j) \quad (3)$$

Las funciones elementales como el *slicing* se consiguen mediante una función de transformación $h(x)$ para obtener una imagen de la forma:

$$IMB(i, j) = h(IMA(i, j)) \quad (4)$$

A continuación se muestran dos tipos de corrimiento, en la Figura 18a se representa el corrimiento con cero, donde se dejan los valores restantes en cero, y en la Figura 18b donde se dejan los valores restantes con su mismo valor original.

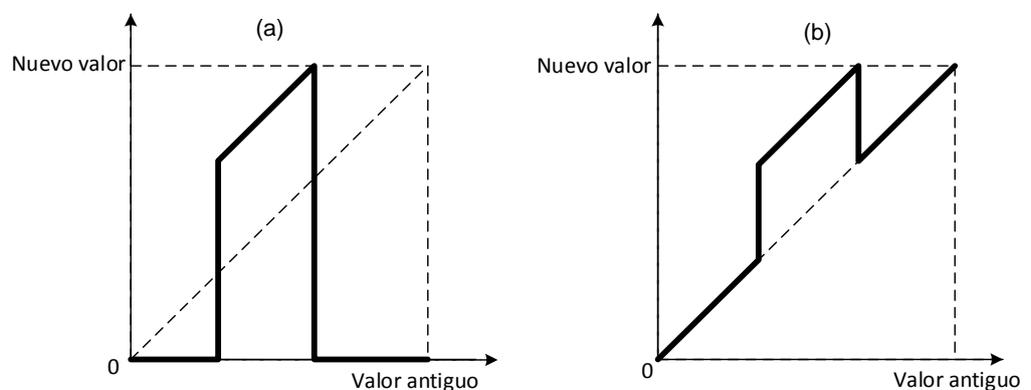


Figura 18. Resultado de aplicar *slicing* a los píxeles de una imagen a) corrimiento con cero b) corrimiento respetando su valor original

Fuente: (Marcos, y otros, 2006)

2.9.3. Umbralización.

La técnica de umbralización convierte a cero los valores de los píxeles superiores o inferiores a un valor llamado umbral (Marcos, y otros, 2006).

$$IMB(i, j) = IMA(i, j) \cdot (IMA(i, j) \geq umbral) \quad (5)$$

Un caso especial de esta técnica es el *clipping*, que convierte los niveles píxeles superiores val_{max} a un valor fijo k_{max} y los niveles inferiores val_{min} a otro valor fijo k_{min} (Marcos, y otros, 2006). Se puede expresar como:

$$IMB(i, j) = \begin{cases} k_{min} & \text{si } IMA(i, j) < val_{min} \\ IMA(i, j) & \text{si } val_{min} \leq IMA(i, j) \leq val_{max} \\ k_{max} & \text{si } IMA(i, j) > val_{max} \end{cases} \quad (6)$$

Esta función se la utiliza con frecuencia cuando se tiene un fondo con valores de píxeles menores a 40, con el fin de convertir todos los valores a cero para eliminar información innecesaria (Marcos, y otros, 2006).

2.9.4. Binarización.

La binarización es un caso de umbralización, en el que los valores de los píxeles superiores a un umbral toman el valor de uno (en este caso 255 en la escala de luminancia del pixel), y los valores menores al umbral toman el valor de cero (Marcos, y otros, 2006). La ecuación está definida por:

$$IMB(i, j) = (IMA(i, j) \geq umbral) \quad (7)$$

El resultado se lo expresa como:

$$IMB(i, j) = \begin{cases} 1 & \text{si } IMA(i, j) \geq umbral \\ 0 & \text{si } IMA(i, j) < umbral \end{cases} \quad (8)$$

2.10. LabView (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench)

LabView es una plataforma y entorno de desarrollo de programación en lenguaje gráfico para el diseño y control de aplicaciones. Fue creado en 1976 y lanzado al mercado en 1986 por National Instruments. Un programa que se crea con LabView se denomina instrumento virtual. Por sus siglas en inglés es conocido como *VI (Virtual Instrument)* (National Instruments, 2004).

Labview permite disminuir el tiempo que se utiliza en el desarrollo de las aplicaciones al incorporar la informática al diseño y control de procesos, de esta manera se puede trabajar en la interface al mismo tiempo que se trabaja en la programación del VI. Labview cuenta con módulos y herramientas especializados que tienen distintos VIs dependiendo de la aplicación (National Instruments, 2004). En el desarrollo de este proyecto se trabajará con el módulo de *NI Vision Development*.

2.10.1. Visión artificial en Labview.

Para el desarrollo de proyectos de visión artificial, Labview cuenta con un módulo llamado *Labview NI Vision Development*. Dentro de este módulo se presentan varios algoritmos y funciones de visión artificial enfocados al procesamiento y mejoramiento de imágenes, con los cuales se puede identificar objetos, medir partes, contar piezas y detectar bordes, etc. (National Instruments, 2004).

Una de las librerías que se utilizarán es la *IMAQ Vision*, que incluye funciones que se pueden utilizar para desarrollar la visión artificial y aplicaciones de imágenes científicas.

Las funciones de *IMAQ Vision* se las puede dividir en tres categorías:

- **Funciones de utilitarios de visión:** permiten crear y manipular imágenes para satisfacer las necesidades de aplicaciones.
- **Funciones de procesamiento de imágenes:** permiten analizar, filtrar y procesar imágenes.
- **Funciones de Machine Visión:** permiten realizar tareas de inspección, incluyendo ausencia o presencia de partes en una imagen y medición de partes (National Instruments, 2004).

CAPÍTULO III

DISEÑO DEL PROTOTIPO

Este capítulo muestra el diseño y construcción del prototipo de sistema de visión artificial para la contabilización de colonias bacterianas. Este capítulo se divide en dos partes: la primera se enfoca directamente en el diseño y construcción del hardware, se realiza una explicación del tipo de iluminación, cámara utilizada así como el sistema de movimiento para el mejorar el contraste. La segunda parte detalla el software del prototipo y como se procesa la información, se contabiliza las colonias bacterianas y se presenta los resultados.

2.11.3.1. Diseño de Hardware.

El diseño y construcción de este prototipo nace de la necesidad que tiene el laboratorio de Microbiología de obtener precisión y disminuir considerablemente el tiempo de análisis en el conteo de colonias bacterianas. El laboratorio actual cuenta con tres contadores manuales de colonias bacterianas, donde se trabaja periódicamente con siembra de bacterias en cajas Petri de 10 cm de diámetro. El tiempo y la precisión en el conteo de las colonias bacterianas dependen estrictamente de la concentración y visibilidad del operario. Sin embargo, existen otros factores que influyen en el proceso de contabilización como son el nivel de contaminación que presentan las cajas Petri, el método de siembra que se utiliza y la falta de iluminación para obtener un mejor contraste. El diseño y elaboración del hardware y software de este prototipo satisfacen las necesidades que tiene el laboratorio de realizar un conteo automático de colonias bacterianas.

El diseño del equipo facilita la toma de fotografías de las muestras en caja Petri que se analizan posteriormente. Como se puede observar en la Figura 19, el equipo está diseñado de forma semicilíndrica y fue construida en acero inoxidable. El equipo cuenta con tres divisiones horizontales: en la parte superior se ubica la cámara fotográfica y el sistema de movimiento que mejora

el contraste de la imagen, en la parte intermedia se encuentra un fondo negro con un anillo de luz led que ilumina la muestra y en la parte inferior el sistema eléctrico.

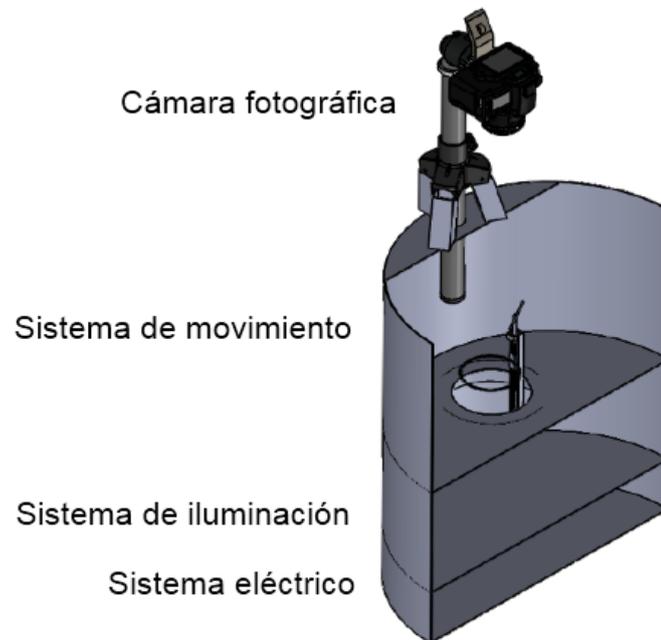


Figura 19. Hardware del sistema de contabilización automática

Elaborado por: Naranjo, 2016

3.1.1. Iluminación

Después de realizar varias pruebas de iluminación, para el propósito del proyecto se optó por escoger una configuración múltiple donde se combinan: el campo oscuro, el frontal y la luz trasera difusa. La elección de una configuración múltiple de iluminación se da gracias al sistema de movimiento incorporado en el equipo, permite posicionar la muestra en diferentes alturas para encontrar la mejor ubicación y tener un mayor contraste en la imagen (ver Figura 20).

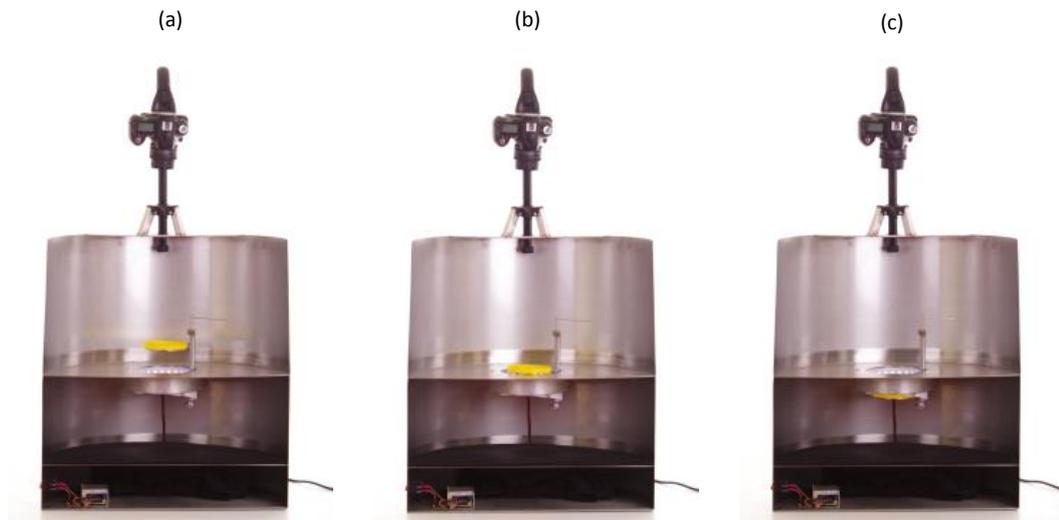


Figura 20. Iluminación múltiple. a) trasera difusa, b) campo oscuro, c) frontal.

Elaborado por: Naranjo, 2016

Además, fue necesario encontrar un color de fondo que produzca contraste para resaltar las colonias de bacterias, se escogió el color negro ya que presentó los mejores resultados durante las pruebas realizadas. Debido a que el diámetro de las cajas que contienen las muestras es de 10 cm., se diseñó el sistema con un anillo de luz led blanca de 17cm de diámetro interno, para que la caja Petri se coloque en la mitad de la circunferencia y la iluminación sea uniforme, aplicando las tres técnicas de iluminación antes mencionadas. El anillo se encuentra instalado en la parte superior del compartimento central y la muestra se desplaza por el centro del mismo.



Figura 21. Hardware del prototipo con cubierta instalada.

Elaborado por: Naranjo, 2016

La parte superior del equipo está cubierta completamente para que no exista incidencia de luz exterior en la muestra, ya que esto produce reflejos no deseados que pueden influir posteriormente en el procesamiento de la imagen (ver Figura 21).

3.1.2. Sistema de movimiento para mejorar el contraste

El soporte sobre el cual se coloca la muestra tiene un diámetro de 10cm y se encuentra conectado a un sistema de movimiento para mejorar el contraste (ver Figura 22). Se encuentra ubicado en la circunferencia del anillo de iluminación y permite un desplazamiento vertical de 16cm de la muestra, de esta manera, dependiendo de la propiedad reflectiva de cada tipo de bacterias se puede mover el sistema para mejorar el contraste y la iluminación.

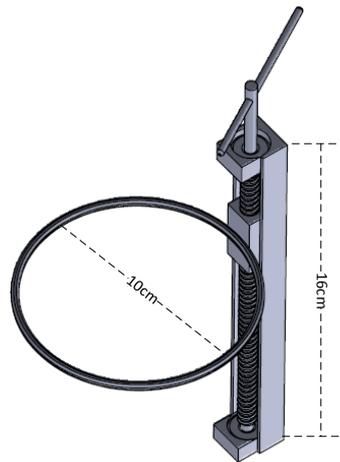


Figura 22. Sistema de movimiento para mejorar el contraste.

Elaborado por: Naranjo, 2016

3.1.3. Cámara Fotográfica.

Se requiere que las imágenes obtenidas tengan la mayor resolución posible para tener mayor cantidad de píxeles; es decir, obtener la mayor cantidad de información para procesar.

El precio de las cámaras fotográficas en el mercado depende del tamaño del sensor. Para el desarrollo de este proyecto se seleccionó una cámara marca Nikon modelo D90; la cual tiene un sensor APS-C (*Advanced Photo System type C Classic*) de dimensiones 23.6 x 15.8 mm, con una resolución efectiva de 12.3 megapíxeles, siendo su resolución máxima de 4288 x 2848 píxeles.

Utilizando los conceptos básicos sobre las ópticas descritos en el Capítulo II, las medidas del prototipo (ver Figura 23) y la ecuación (1) se procedió a determinar el lente adecuado para este proyecto.

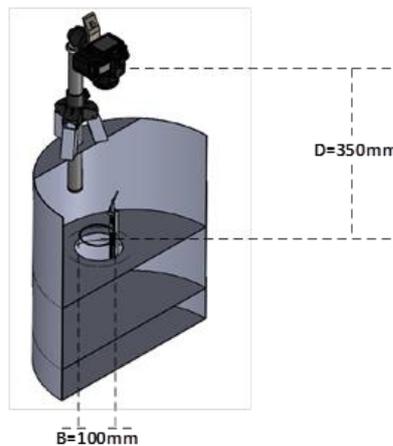


Figura 23. Medida de las distancias desde el sensor hasta la muestra.

Elaborado por: Naranjo, 2016

La cámara Nikon D90 tiene un sensor de formato DX, el factor de multiplicación para la óptica es de 1.5x y es inversamente proporcional al factor de conversión del tamaño del sensor.

$$f = \frac{b \cdot D}{B} \cdot c \quad (1)$$

$$f = \frac{23.6mm \cdot 350mm}{100mm} \cdot 0.66$$

$$f = 54.52$$

Entonces en valores comerciales de lente sería de 50mm de distancia focal.

3.2. Diseño de Software

El software de este prototipo se encuentra diseñado con el fin de que una vez capturada la imagen por el software de control de la cámara fotográfica, se procese la imagen para permitir la contabilización y posteriormente la presentación de resultados en unidades requeridas por el laboratorio como lo muestra la Figura 24.

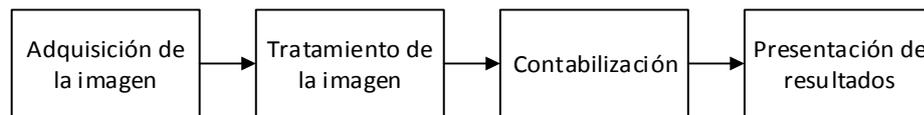


Figura 24. Proceso de tratamiento de la información.

Elaborado por: Naranjo, 2016

3.2.1. Adquisición de la imagen

El sistema se encuentra diseñado para adquirir la imagen desde una carpeta específica. En este proyecto se utilizó el software digiCamControl versión 2.0 con el fin de capturar las imágenes de las muestras y guardarlas en la carpeta que está enlazada con el software. El programa de código abierto (ver anexo 1 para permiso de uso) nos permite controlar los valores de tiempo de exposición, apertura del diafragma y enfoque de la cámara Nikon D90 en vivo. A pesar de que este proyecto utilizó el software digiCamControl versión 2.0, el sistema no se limita a la utilización del mismo ya que el usuario puede cargar imágenes directamente desde un dispositivo de almacenamiento o desde cualquier carpeta en el ordenador.

A continuación se muestra la pantalla principal del software digiCamControl versión 2.0, donde se puede observar la información con los valores de apertura de diafragma, tiempo de exposición y lente utilizado en la captura de cada fotografía.

Para este proyecto, el área de análisis es la circunferencia de la caja de Petri. Es muy importante que en la imagen de la muestra se obtenga un fondo uniforme y que las UFC resalten en el agar con colores más claros (ver Figura 27).



Figura 27. Selección de la imagen y delimitación del ROI.

Elaborado por: Naranjo, 2016

Una vez que se tiene la imagen delimitada y seleccionada, el software la transforma a escala de grises (ver Figura 28a). A continuación se coloca la máscara sobre la imagen para asegurar que se considere la información importante dentro de la región de interés, para ello el software permite variar el diámetro, posición vertical y horizontal de la máscara (ver Figura 28b).

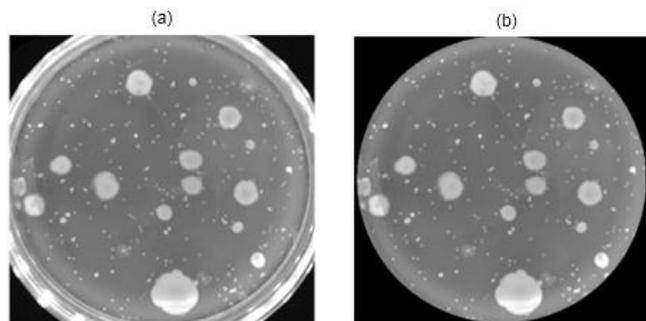


Figura 28. a) Imagen en escala de grises delimitada por el ROI, b) Imagen después de aplicar la máscara.

Elaborado por: Naranjo, 2016

Posteriormente, se obtiene el histograma y se parte de la hipótesis de que el color del agar de fondo estará cercano al valor de la media del histograma,

ya que es el tono de gris que prevalece en la mayor parte de la muestra. Las UFC serán píxeles más claros que resaltarán sobre el fondo, cada pixel tendrá un valor de entre 0 y 255, el pixel con un valor de 0 significa que es un color negro total y 255 significa que es blanco total.

El análisis del histograma de la Figura 28 (b) se asemeja a una campana de Gauss (ver Figura 29), en la cual la media representa el fondo de la muestra donde se agrupa la mayor cantidad de píxeles. En la misma figura se observan claramente tres segmentos: el segmento (a) que representa la información de los píxeles más oscuros, el segmento (b) que muestra la información más representativa y que se utiliza para el análisis, y el segmento (c) que muestra la cantidad de píxeles más claros.

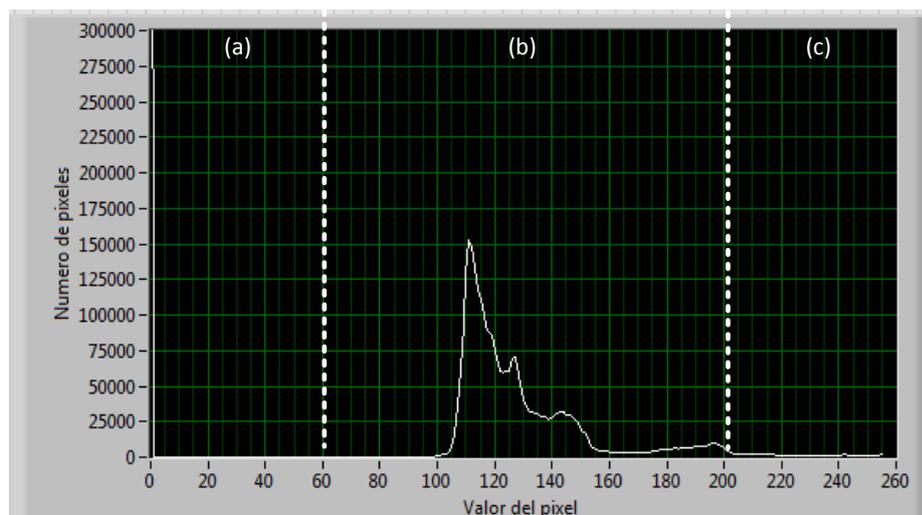


Figura 29. Histograma generado de la imagen de trabajo.

Elaborado por: Naranjo, 2016

Con la información del segmento (b) se procede a realizar la ecualización del histograma, con la que se pretende obtener una distribución uniforme de la imagen, es decir, repartir los píxeles en todo el rango de valores de 0 a 255 y mejorar el contraste y la luminancia de la imagen.

En el desarrollo de este proyecto, se realizaron varias pruebas variando los límites del *slicing* y se comprobó experimentalmente que el rango óptimo

de los datos es entre $\sigma/2$ y $3\sigma/2$ alrededor de la media como se muestra en la Figura 30 para realizar la ecualización del histograma. En este ejemplo el valor de la media es $\mu = 97.67$ y de la desviación estándar es $\sigma = 60.56$.

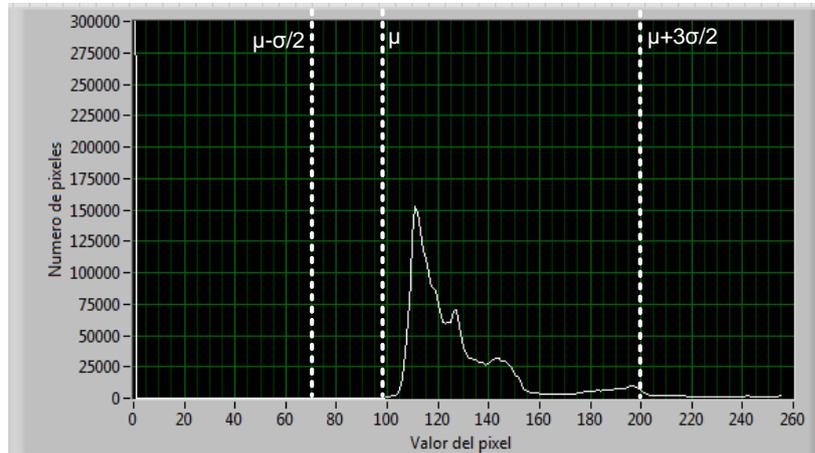


Figura 30. Límites del histograma.

Elaborado por: Naranjo, 2016

Una vez determinados estos límites, se ecualiza el histograma, distribuyendo uniformemente los pixeles sobre todo el rango de 0 a 255, de esta manera se obtiene la siguiente imagen (ver Figura 31), donde el valor de la media es $\mu = 103.61$

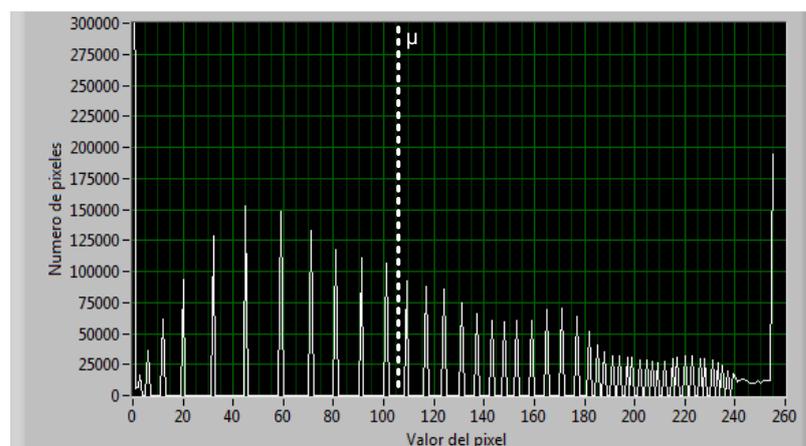


Figura 31. Histograma de la ecualización de la imagen.

Elaborado por: Naranjo, 2016

Como resultado de la ecualización, se obtiene una imagen con mejor contraste y mayor luminancia (ver

Figura 33. **Imagen con baja luminancia a) imagen original a colores b) imagen en escala de grises con ROI y mascara c) Imagen binarizada.**

b). Para este proyecto es importante que la muestra tenga una iluminación uniforme ya que cualquier reflejo no deseado puede amplificarse y llegar a confundirse con información relevante.

Una vez que se tiene la imagen resultante de la ecualización del histograma se procede a binarizarla para obtener una imagen binaria compuesta por pixeles blancos y negros únicamente. Para ello, se determina la media y la varianza del histograma ecualizado y con estos valores se ponen límites de umbralización. Se determinaron dos casos para la binarización en los que el valor del umbral se encontró experimentalmente:

El primer caso se da cuando la media de la imagen original (con ROI seleccionada y colocada la máscara) es inferior a 40 (ver **Figura 32**), entonces se asume que es una fotografía oscura, con poca luminancia. En este caso el valor del umbral es la media del histograma ecualizado más cinco veces la desviación estándar del histograma ecualizado, ya que al realizar pruebas con otros valores de umbral, se pueden observar que las UFC no se encuentran bien delimitadas cuando se binariza la imagen.

$$\text{Si } \mu_{original} < 40, \text{ entonces } k_{umbral} = \mu_{ecualizado} + 5\sigma_{ecualizado} \quad (9)$$

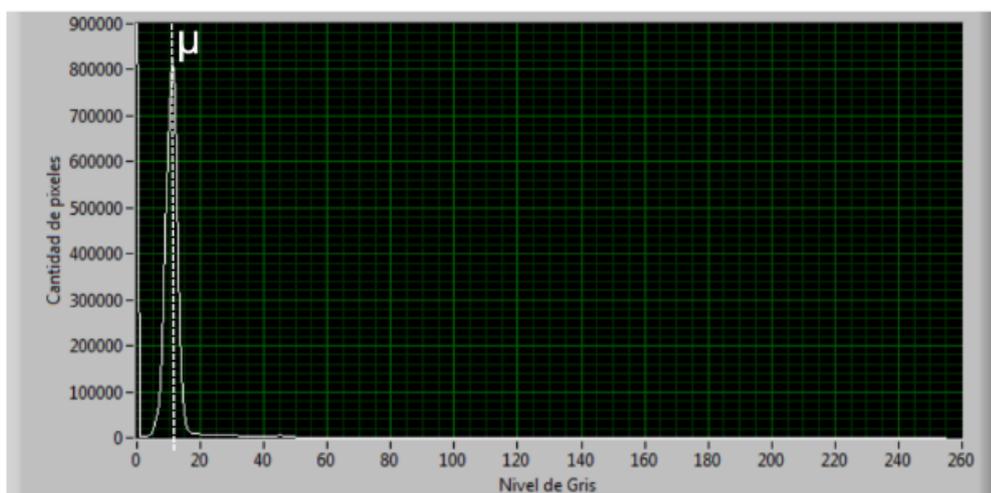


Figura 32. Histograma de imagen con baja luminancia

Elaborado por: Naranjo, 2016

Entonces para la binarización de la imagen, aplicando la ecuación (6) del capítulo II, los valores inferiores al umbral toman el valor de cero, y los superiores o iguales al umbral toman el valor de 255.

$$IMA_{binarizada} = \begin{cases} 0 & \text{si } IMA_{original} < k_{umbral} \\ 255 & \text{si } IMA_{original} > k_{umbral} \end{cases} \quad (10)$$

Cuando el valor de $k_{umbral} > 255$, todos los valores menores a 254 se transforman en cero, el software aplica la siguiente ecuación:

$$\text{Si } k_{umbral} > 255 \text{ entonces } IMA_{binarizada} = \begin{cases} 0 & \text{si } IMA_{original} < 254 \\ 255 & \text{si } IMA_{original} = 255 \end{cases} \quad (11)$$

En el caso del ejemplo, la media del histograma de la imagen original es $\mu_{original}=9.22$ (ver **Figura 32**), mientras que en el histograma ecualizado la media es $\mu_{ecualizado}=117.93$ y la desviación es $\sigma_{ecualizado}=91.71$. Por lo tanto aplicando la ecuación (9) obtenemos que:

$$\begin{aligned} k_{umbral} &= \mu_{ecualizado} + 5\sigma_{ecualizado} \\ k_{umbral} &= 117.93 + 5(91.71) \\ k_{umbral} &= 117.93 + 458.55 \\ k_{umbral} &= 576.48 \end{aligned}$$

En este caso se aplica la condición que $k_{umbral} > 255$ por lo tanto se aplica la ecuación (11) y se obtienen los resultados que se muestran en la **Figura 33. Imagen con baja luminancia a) imagen original a colores b) imagen en escala de grises con ROI y mascara c) Imagen binarizada.**

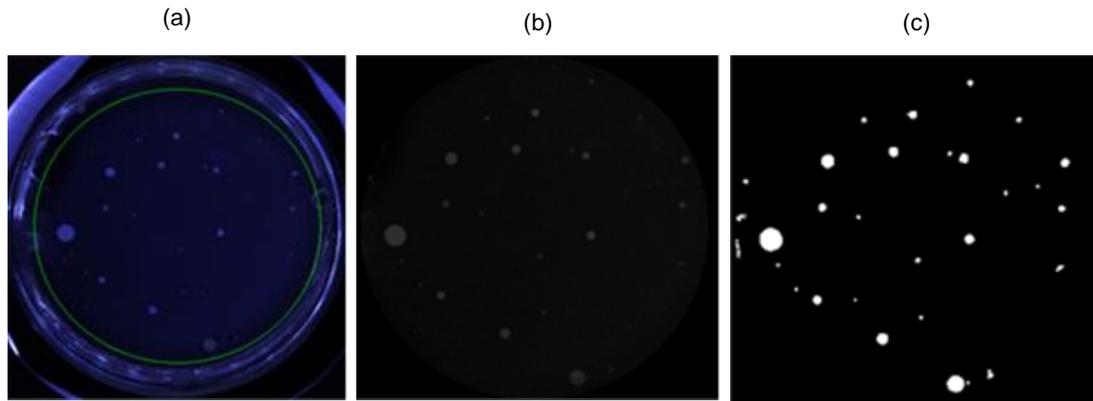


Figura 33. Imagen con baja luminancia a) imagen original a colores b) imagen en escala de grises con ROI y mascara c) Imagen binarizada.

Elaborado por: Naranjo, 2016

El segundo caso se da cuando la media de la imagen original (con ROI seleccionada y colocada la máscara) es mayor a 40 (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), aquí se entiende que la fotografía fue tomada con mayor luminancia, entonces el valor del umbral es la media del histograma ecualizado más la desviación estándar del histograma ecualizado.

$$\text{Si } \mu_{original} > 40, \text{ entonces } k_{umbral} = \mu_{ecualizado} + \sigma_{ecualizado} \quad (12)$$

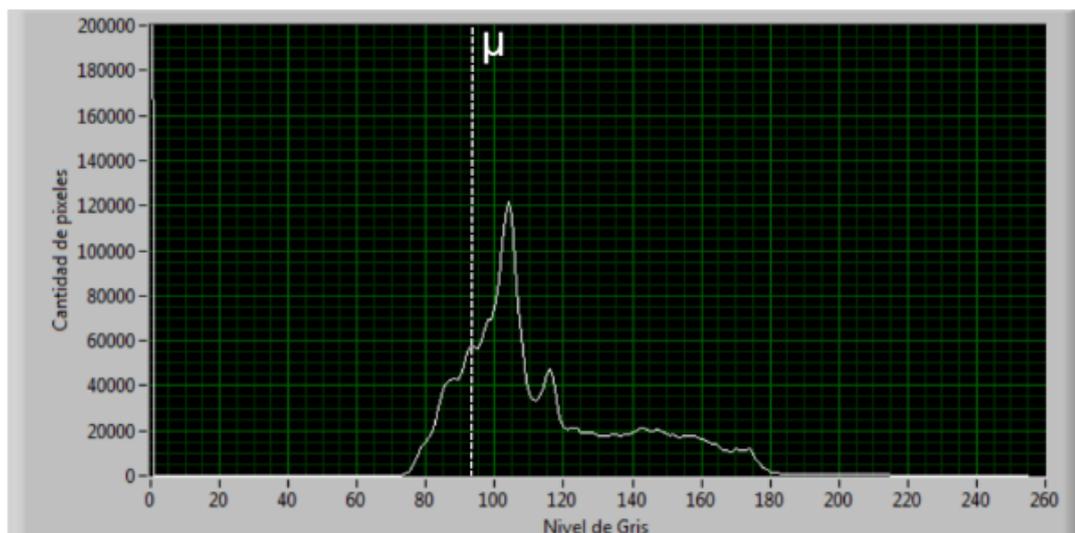


Figura 34. Histograma de imagen con alta luminancia

Elaborado por: Naranjo, 2016

En el caso de este ejemplo, la media del histograma de la imagen original es $\mu_{original}=95.71$ (ver ¡**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), mientras que en el histograma ecualizado la media es $\mu_{ecualizado}=111.13$ y la desviación es $\sigma_{ecualizado}=85.37$. Por lo tanto aplicando la ecuación (12) obtenemos que:

$$k_{umbral} = \mu_{ecualizado} + \sigma_{ecualizado}$$

$$k_{umbral} = 111.13 + 85.37$$

$$k_{umbral} = 196.50$$

Entonces aplicamos la ecuación (10) y obtenemos el siguiente resultado:

$$IMA_{binarizada} = \begin{cases} 0 & \text{si } IMA_{original} \leq 196.50 \\ 255 & \text{si } IMA_{original} > 196.5 \end{cases}$$

La imagen binarizada se muestra a continuación en la Figura 35:

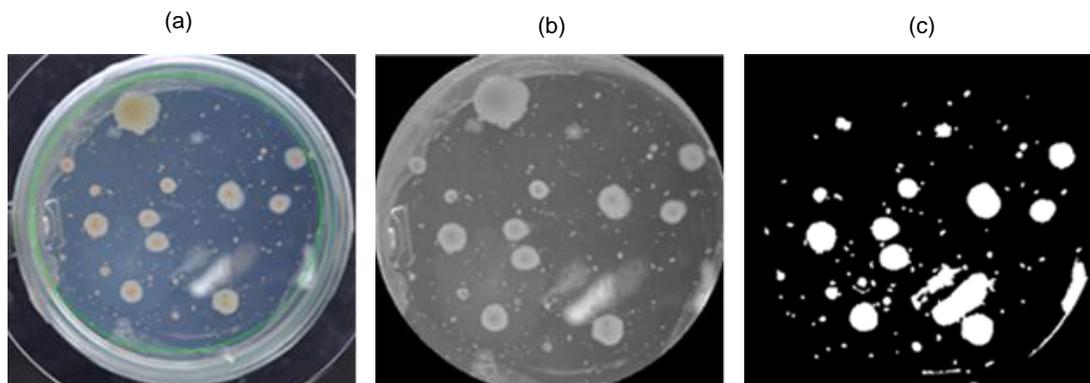


Figura 35. Imagen con alta luminancia a) imagen original a colores b) imagen en escala de grises con ROI y mascara c) Imagen binarizada.

Elaborado por: Naranjo, 2016

En este proceso de binarización posteriormente se aplica también la reducción de bordes por erosión de las partículas para eliminar los datos que no son útiles en el conteo, para ello, se fija un valor para la erosión. Durante el proceso experimental, se trabajó con tres variables de erosión (3-4-5) aplicadas a 20 muestras con el fin de determinar el valor de erosión que proyecte los resultados más cercanos a los del conteo manual. Como resultado se fijó el valor de erosión de cinco ya que con este valor se reduce

o elimina información que no es de interés y la contabilización total se acerca al conteo manual, además se procedió a eliminar el borde de la muestra para realizar el conteo de partículas debido a que en el procesamiento de la imagen, las bacterias que se encuentran junto al borde se unen y se toman en cuenta como un solo elemento, lo cual es erróneo para la contabilización.

Una vez que la imagen se encuentra binarizada, se utiliza la herramienta IMAQ Particle Analysis Report. Este VI utiliza se basa en la técnica de procesamiento de imagen más conocida como “Análisis de Partículas” a menudo referida como *Blob Analysis* en inglés. Un *blob* es un grupo de píxeles conectados, por lo tanto cuando se habla de *blob analysis* se entiende que es el proceso de detección y análisis de distintas formas de dos dimensiones dentro de una región de interés de una imagen que ha sido manipulada a través de la aplicación de las operaciones morfológicas. El procesamiento y análisis de imágenes opera sobre los *blobs* para calcular su perímetro, área, o para contar el número de *blobs* que se pueden distinguir.

Para realizar la contabilización, en primer lugar se realiza la extracción de los *blobs* utilizando la conectividad que nos indica si dos píxeles son vecinos o no, se tiene dos tipos de conectividad N4 o N8 como se explica en el capítulo anterior. Por defecto el VI utiliza la conectividad N8 ya que es más precisa a pesar de que conlleva mayor tiempo de procesamiento. A continuación los *blobs* se analizan utilizando el *recursive Grass-fire algorithm*, el mismo que empieza el análisis con el píxel de la esquina superior izquierda de la imagen binarizada, y escanea la imagen de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. (Hanks, 1997)

Finalmente se realiza la operación matemática OR entre la imagen original en escala de grises con máscara y la imagen después de la binarización, de esta manera se superponen las UFC contabilizadas para una mejor apreciación del analista (ver Figura 36). Los valores obtenidos de la cantidad de UFC son procesados matemáticamente para expresarlos en UFC/ml (Unidades Formadoras de colonias por mililitro de muestra), estas unidades son las que se trabajan en los laboratorios y se utilizan para expresar la cantidad de UFC por cantidad de muestra.

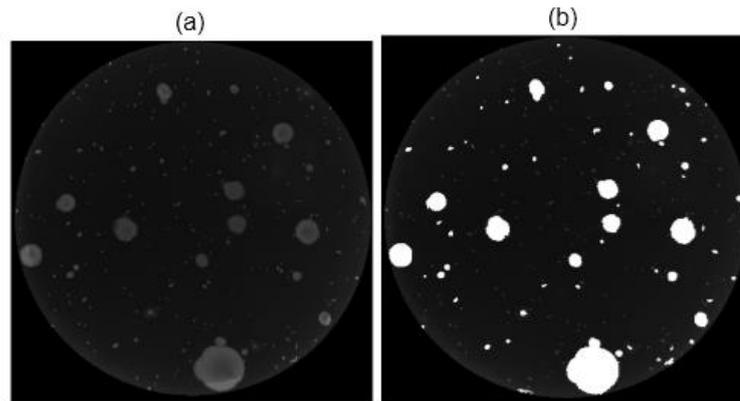


Figura 36. Presentación de UFC contabilizadas a) Imagen original b) Imagen con UFC marcadas.

Elaborado por: Naranjo, 2016

En la imagen final obtenida (ver Figura 36 b) se nota que las UFC encontradas se encuentran marcadas. Esta imagen permite que la contabilización sea más precisa y clara en comparación con la foto original. La Figura 37 muestra como el programa presenta la cantidad de UFC obtenidas después de su conteo.



Figura 37. Interfaz en la que se presentan los resultados de la contabilización de las UFC

Elaborado por: Naranjo, 2016

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Este capítulo presenta el proceso de obtención de muestras, el análisis de las pruebas de contabilización manual y automática de colonias bacterianas, las conclusiones y recomendaciones a considerarse en futuros estudios y proyectos.

2.12.4.1. Obtención de la muestra.

Para la obtención de las muestras utilizadas en el análisis de conteo manual y automático de colonias bacterianas se siguió el siguiente procedimiento. Se sembraron cinco bacterias (coliformes, mesófilos aerobios, bacilos, estafilococos, levaduras) utilizando el método de siembra por extensión en agar tipo sangre y agar PCA con un tiempo de incubación de 48 horas. El sembrado se lo realizó en dos ocasiones, la primera fue una siembra experimental donde se sembraron 16 UFC en cajas de Petri.

De las 16 muestras obtenidas solo dos se consideraron como óptimas para realizar el conteo automático. Entre los problemas que se encontraron con el resto de muestras están el crecimiento masivo de bacterias en los bordes y el nivel de contaminación que presentaban las cajas de Petri. Se notó que el software del prototipo confunde las manchas de suciedad con bacterias y las incluye en el conteo. Otro problema que se encontró en la siembra es que el agar tipo sangre no permite que se dé el contraste necesario entre las bacterias y el fondo negro al momento de tomar la fotografía.

Para la segunda siembra se solucionaron los problemas anteriormente mencionados y se sembraron UFC en 60 cajas de Petri con diferentes grados de dilución y de las cuales veinte resultaron óptimas para el conteo después de 48 horas de incubación. Para el análisis final se decidió solo utilizar las 20 muestras obtenidas durante la segunda siembra.

2.13.4.2. Análisis.

Dado que el objetivo de este proyecto es automatizar el proceso de contabilización de colonias bacterias utilizando técnicas de visión artificial, se consideró necesario analizar la variación de resultados obtenidos durante el conteo manual y automático de colonias bacterianas. Se utilizó las 20 muestras que se consideraron óptimas para el análisis, en el conteo automático se utilizó una erosión de 5 como constante. Para asegurar la fiabilidad del conteo manual se pidió a un analista del laboratorio que realizara el conteo de colonias bacterianas de las 20 muestras. Para el análisis se toma como base la contabilización manual ya que es la que se ha utilizado comúnmente como el estándar para el conteo. La tabla 1 muestra a continuación el resultado de los conteos.

Tabla 1.
Comparativa entre contabilización manual y automática de las UFC

| NÚMERO DE PRUEBA | CONTABILIZACIÓN AUTOMÁTICA | CONTABILIZACIÓN MANUAL | % DE ERROR RELATIVO | % DE APROXIMACION |
|------------------|----------------------------|------------------------|---------------------|-------------------|
| 1 | 28 | 29 | 3.4 | 96.6 |
| 2 | 34 | 32 | 6.3 | 93.7 |
| 3 | 29 | 31 | 6.5 | 93.5 |
| 4 | 9 | 6 | 50.0 | 50.0 |
| 5 | 73 | 86 | 15.1 | 84.9 |
| 6 | 19 | 19 | 0.0 | 100.0 |
| 7 | 22 | 22 | 0.0 | 100.0 |
| 8 | 53 | 57 | 7.0 | 93.0 |
| 9 | 19 | 19 | 0.0 | 100.0 |
| 10 | 12 | 18 | 33.3 | 66.7 |

Continúa →

| | | | | |
|--------------|-----|------------------|------|-------|
| 11 | 31 | 48 | 35.4 | 64.6 |
| 12 | 67 | 51 | 31.4 | 68.6 |
| 13 | 10 | 14 | 28.6 | 71.4 |
| 14 | 130 | 130 | 0.0 | 100.0 |
| 15 | 13 | 18 | 27.8 | 72.2 |
| 16 | 15 | 18 | 16.7 | 83.3 |
| 17 | 28 | 32 | 12.5 | 87.5 |
| 18 | 35 | 59 | 40.7 | 59.3 |
| 19 | 19 | 26 | 26.9 | 73.1 |
| 20 | 73 | 75 | 2.7 | 97.3 |
| Suma: | 719 | 790 | | |
| | | Promedio: | 17.2 | 82.8 |

Como se observa en la Tabla 1, en el conteo general de las 20 muestras, el conteo manual encuentra 790 bacterias en total, mientras que el conteo automático encuentra 719 bacterias, arrojando una diferencia de 71 bacterias lo que representa un 9% de discrepancia en el conteo general. A su vez, el análisis de los mismos datos muestra que el promedio de aproximación entre el conteo manual y el automático es de 82.8% lo que arroja un error relativo de 17.2%.

La discrepancia encontrada entre el conteo manual y automático de colonias bacterianas en este proyecto se debe a dos razones fundamentales. Por un lado, cuando se selecciona el área de interés y se coloca la máscara se puede llegar a excluir algunas bacterias. Por otro lado, a pesar de que se tomen las debidas precauciones, algunas cajas de Petri se pueden encontrar sucias, provocando que durante el conteo se observen objetos no deseados en el fondo y el software los cuente como bacterias.

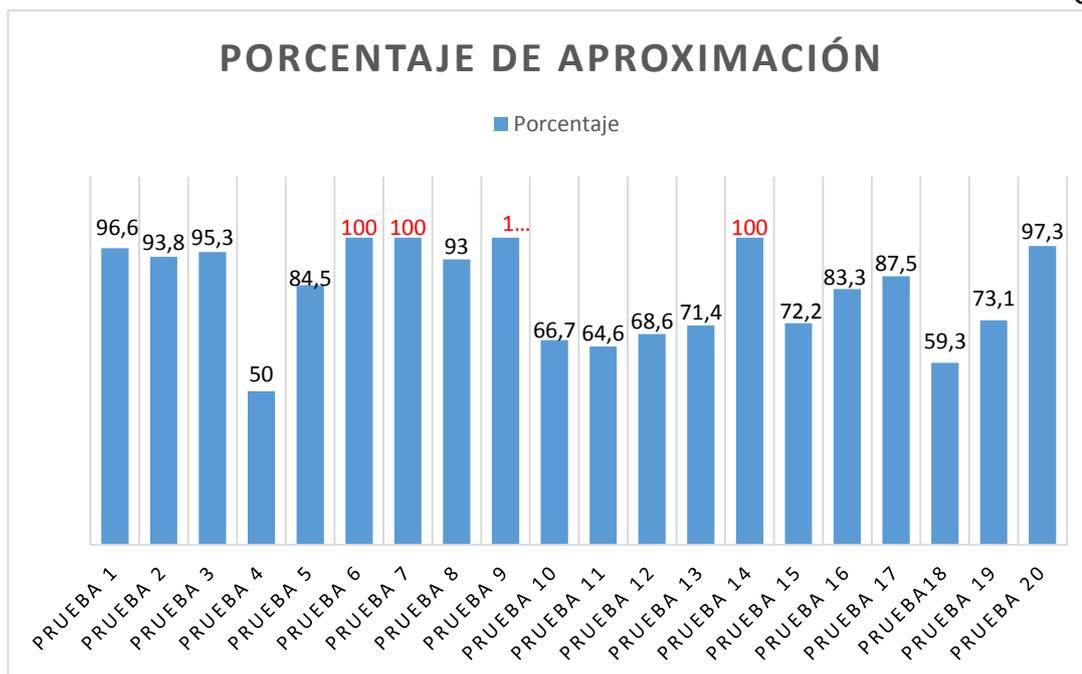


Figura 38. Porcentaje de aproximación de pruebas.

Elaborado por: Naranjo, 2016

La Figura 38 muestra los valores de la columna de aproximación de cada prueba, los mismos que tienen como moda el 100% de aproximación, con lo que se concluye que el 20% del total de muestras tiene un 0% de error.

Analizando la mediana de los valores de la columna de aproximación, se obtiene el valor de 86,4% lo que denota que la mitad de las muestras tienen una aproximación mayor a este valor, reflejando un porcentaje mayor de confiabilidad del sistema. La desviación estándar de los valores de la columna de aproximación indica que la medida de dispersión en la cual los valores se pueden alejar del promedio es de 15.3, dando un rango de aproximación de 67.5% a 98.1% concluyendo que el porcentaje de error es mínimo y los resultados arrojados son fiables.

El resultado experimental obtenido al utilizar el prototipo tuvo una aproximación promedio de 82.8% de precisión en el conteo, una moda del 100% de precisión, una mediana de 86.4% y una desviación estándar de 15.3. Con estos resultados estadísticos se reafirma el nivel de confianza del prototipo al momento de contar las colonias bacterianas. Igualmente, se debe tomar en cuenta las condiciones en las que se realizó el proceso de

contabilización, empezando desde la siembra de UFC. Por esta razón se considera que el objetivo de este proyecto se cumplió satisfactoriamente ya que se pudo realizar la contabilización automática de las colonias bacterianas alcanzando un alto nivel de confiabilidad.

2.14.4.3. Conclusiones

El proyecto de diseño y elaboración de software y hardware del prototipo para la automatización del proceso de contabilización de unidades formadoras de colonias bacterianas utilizando técnicas de visión artificial es viable y funcional ya que satisface las necesidades del laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

El prototipo tiene un el promedio de aproximación entre el conteo manual y el automático de 82.8% lo cual muestra un alto grado de nivel de confianza. Del mismo modo el prototipo disminuye el tiempo de conteo de colonias bacterianas con respecto al conteo manual realizado comúnmente por los analistas.

El tiempo que emplea el analista en el conteo manual de colonias bacterianas es en promedio 5 minutos, mientras que el proceso para contabilizar las UFC utilizando del software desarrollado en Labview toma en promedio 1 minuto, y disminuye la posibilidad de cometer errores de apreciación por parte del analista.

El prototipo permite la variación física de la altura de la muestra, cambio del color de fondo, selección de la apertura del diafragma, variación del tiempo de exposición; en el software se puede modificar el valor de la erosión y la posición de la máscara. Gracias a la posibilidad de realizar estos cambios, a futuro se pueden estudiar y desarrollar métodos de análisis con características específicas para cada tipo de UFC a analizar.

El diseño y elaboración de software y hardware del prototipo además de solucionar los problemas que existen en el laboratorio de Microbiología, marca la pauta para que futuros proyectos se puedan enfocar en incrementar la aproximación promedio de precisión en el conteo de un determinado tipo de células utilizando como base este proyecto.

El uso de Labview de National Instruments demostró ser de gran utilidad para la programación del software de este proyecto y el mismo está abierto a futuros cambios y adaptaciones.

2.15. 4.4. Recomendaciones

Las UFC deberán ser sembradas desde el centro hacia fuera utilizando el método de extensión con el triángulo de Driglasky para que se reproduzcan de manera homogénea sin llegar a los bordes de la caja, de esta manera se obtendrán mejores resultados en la contabilización.

Las cajas Petri donde son sembradas las UFC deberán tener su superficie limpia, sin residuos de pegamento, marcador o cualquier objeto que pueda interferir en la fotografía de las UFC.

Con el fin de asegurar la veracidad de los datos, el prototipo para contabilizar automáticamente las UFC debe ser utilizado por un analista de laboratorio que tenga el criterio adecuado para discernir los resultados.

El laboratorio de Microbiología necesita una persona capacitada en el manejo del software del prototipo para asegurar su correcto funcionamiento.

4.5. Trabajos futuros.

El sistema de este prototipo puede ser modificado para satisfacer las necesidades de futuros trabajos y estudios. El sistema se puede optimizar utilizando diferentes valores de erosión, una cámara con mejor resolución, modificando los parámetros de captura de imágenes y una mejora en la siembra de UFC.

Este prototipo está abierto a modificaciones en software para permitir variaciones en análisis y determinación de colonias bacterianas en futuros estudios

Para minimizar los problemas encontrados durante la siembra de UFC, este prototipo puede ser complementado con otro que sea capaz de automatizar la siembra en forma de espiral. Este prototipo permitirá que la

muestra sea sembrada uniformemente desde el centro hacia sus extremos sin llegar a los bordes.

REFERENCIAS

- Alberts, B., Johnson, A., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2010). *Biología molecular da célula*. Artmed.
- Baron, S., & Finegold, S. M. (1996). Anaerobic Gram-Negative Bacilli. En *Medical Microbiology*. Galveston, Tx.
- Beckmancoulter. (24 de 06 de 2016). *www.beckmancoulter.com*. Obtenido de www.beckmancoulter.com
- Calderón, A., Ornelas, M., Ornelas, F. J., Bucio, C. M., & Rocha, M. A. (2007). Implementación de un Sistema de Visión Artificial para el Conteo de Colonias Bacterianas como Apoyo al Análisis del Grado de Contaminación de Alimentos. Zacatecas, México.
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., & Velázquez, O. (2009). *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. México: UNAM. Facultad de Química. Recuperado el 18 de 01 de 2016, de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasic-Diluciones_6526.pdf
- Campos Diaz, J. (2000). *Estudio higiénico-sanitario de comedores escolares de la isla de Tenerife*. Tenerife. Recuperado el 20 de 02 de 2016, de <ftp://tesis.bbtk.ull.es/ccppytec/cp119.pdf>
- Centro de Bachillerato Tecnológico e Industrial. (2015). *Microbiología*. Recuperado el 25 de 03 de 2016, de Técnicas y tipos de sembrado en placa y tubo: <http://labdemicrobiologia.wix.com/scientist-site#!t-cnicas-y-tipos-de-sembrado/vivm4>
- Cosgrove, S., & Auwaerter, P. (2015). *Johns Hopkins Antibiotic (ABX) Guide*. Recuperado el 15 de 02 de 2016, de Staphylococcus aureus: http://www.hopkinsguides.com/hopkins/view/Johns_Hopkins_ABX_Guide/540518/all/Staphylococcus_aureus#7
- Echeverría, J., & Iglesias, D. (2003). Estafilococo Meticilino resistencia, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Revista Médica Herediana*, 195-203.

- ESPE. (16 de 02 de 2016). *Laboratorios de Biotecnología*. Obtenido de <http://biotecnologia.espe.edu.ec/laboratorios-investigacion/antecedentes/>
- García Valdés, E. (2009). *Prácticas de microbiología*. Recuperado el 22 de 01 de 2016, de Universitat de les Illes Balears: <http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/micro2/practicas.pdf>
- García, E., & Avilés, C. (2008). Tesis de maestría. *Detección y clasificación de objetos dentro de un salón de clases empleando técnicas de procesamiento digital de imágenes*. Mexico: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Gonzalez, J. G., & Barrial, R. (2004). *Laboratorio de Microbiología. Instrumentación y principios básicos*. La Habana: Ciencias Médicas.
- Gonzalez, R. C., & Woods, R. E. (2002). *Digital Image Processing*. Prentice Hall Press.
- Hanks, J. (1997). *Counting Particles or Cells Using IMAQ Vision*.
- Himedia. (2011). *Himedia Labs*. Recuperado el 22 de 01 de 2016, de Plate Count Agar (Standard Methods Agar): <http://himedialabs.com/TD/M091.pdf>
- Interscience. (13 de 02 de 2016). *Interscience para microbiología*. Obtenido de <http://www.interscience.com/es/productos/Contadores-de-colonias/contador-colonias-scan-500>
- Interscience. (25 de 06 de 2016). *www.interscience.com*. Obtenido de www.interscience.com
- Lowy, F. D. (1998). Staphylococcus aureus infections. En *The New England Journal of Medicine* (págs. 520-532).
- Macedo, M., & Vola, M. (2006). *Instituto de Higiene*. Recuperado el 17 de 01 de 2016, de Universidad de la Republica: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/grampositivosaerobios.pdf>
- Madigan, M. E., Martinko, J. M., Dunlap, J. M., & Clarck, D. P. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*.
- Marcos, A. G., De Pisón Ascacibar, F. J., Elias, F. A., Limas, M. C., Meré, J. B., & Gonzalez, E. P. (2006). *Técnicas y Algoritmos Básicos de Visión Artificial*.

- Microbiology, A. S. (12 de 02 de 2016). *Microbeworld*. Obtenido de Microbeworld: <http://www.microbeworld.org/>
- Ministerio de Educación del Gobierno de España; Fondo Social Europeo. (2012). Aplicación práctica de la visión artificial en el control de procesos industriales. *Conocimientos básicos de visión artificial*. España.
- National Instruments, . (2004). *National Instrumetns*. Recuperado el 15 de 01 de 2016, de Labview: <http://www.ni.com/es-cr.html>
- Peña, C. A., Peña, L. C., & Moreno, G. (2010). Sistema de visión artificial para el reconocimiento y el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). *Revista Colombiana de Tecnologías de Avanzada*.
- Pérez, J. D. (2007). *Contador de colonias de microorganismos por medio de visión artificial*. Obregón.
- Ruiz, M. (2006). *Basic morphological differences between bacteria*. Obtenido de https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/69/Bacterial_morphology_diagram.svg
- Sears, C. L. (2005). A dynamic partnership: Celebrating our gut flora. En C. L. Sears, *Anaerobe* (págs. 247-251). Elsevier Ltd.
- TMCC. (2013). *Online Microbiology Resource Center*. Recuperado el 17 de 01 de 2016, de <http://biolabs.tncc.edu/Micro%20Web/BacterialCounts.pdf>
- Villee, C. (1996). *Biología*. McGraw-Hill.
- Willey, J. M. (2008). *Prescott, Harley and Klein's Microbiology* (7th international ed.). (J. M. Willey, L. M. Sheerwood, & C. J. Woolverton, Edits.) New York: McGraw-Hill Higher Education.