

Segmentación en imágenes microscópicas

José A. Márquez¹, Beatriz A. Sabino¹, Jesús M. Campos¹ y Manuel I. Martín²

¹Universidad de la Cañada, Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México
{albertomarquez, beatriz_sabino, campos}@unca.edu.mx

²Benemérita Universidad Autónoma de Puebla-FCC, Puebla, México
mmartin@cs.buap.mx

Paper received on 11/07/12, Accepted on 05/09/12.

Resumen. En este documento se presenta un método de segmentación usando la librería OpenCV para imágenes microscópicas de diferentes células, el proceso se realiza mediante un conjunto de funciones llamado batería. Se observó que la batería propuesta proporciona un mejor resultado en objetos con relleno no uniforme, como es el caso de las muestras que se analizaron, mismas que son de importancia en el área de la Microbiología, Biotecnología, entre otras. Este trabajo es parte de un proyecto de investigación que se realiza en la Universidad de la Cañada, el cual pretende realizar un sistema que contabilice la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a través de una imagen.

Palabras Clave: Procesamiento de Imágenes, Segmentación, Microbiología, *Saccharomyces cerevisiae*.

1 Introducción

El manejo de las imágenes digitales se ha convertido en estos años en un tema de interés en las diferentes áreas de las ciencias naturales, ciencias médicas, en las aplicaciones tecnológicas, entre otras. En la actualidad es posible explotar plataformas de bajo costo y obtener resultados de gran calidad y con ello, crear aplicaciones de gran utilidad, versátiles y flexibles, así como aplicaciones de software de propósito específico para atender las necesidades del usuario y/o especialistas. Algunas áreas donde el procesamiento digital de imágenes (PDI) ayuda a analizar, deducir y tomar decisiones, están las siguientes: Medicina, Biología, Fisiología, Biometría, Astronomía, Ciencias Ambientales, Robótica, Metalurgia, Física, Electrónica y Microbiología.

Dentro de la Microbiología es común hablar de conteo celular, esto se lleva a cabo por diferentes métodos, uno de ellos es utilizando una cámara de Newbauer, éste se relaciona con la exactitud y la velocidad, ya que depende de la experiencia de la persona que examina la muestra debido a que se efectúa de forma manual, resul-

tando largo y cansado (visualmente hablando) al efectuar múltiples conteos, cabe señalar que esto se realiza sin ningún tipo de software que pueda auxiliar al técnico, ya que es el que realiza el seguimiento del crecimiento celular. Además, se consideran otros parámetros, en el caso de la fermentación se toma en cuenta la viabilidad celular y la contaminación bacteriana [1-3].

El análisis automático o semiautomático de imágenes plantea varios retos técnicos respecto al procesamiento requerido debido a factores como:

1. Iluminación no homogénea.
2. Oclusión de objetos.
3. Variación en la forma, el tamaño y la orientación de los objetos.
4. Variación de intensidades.

Debido a estas características, los sistemas de análisis de imágenes de microscopía generalmente plantean enfoques híbridos en el área de segmentación de imágenes y Reconocimiento de Patrones (RP) para resolver el problema particular que enfrentan. La mayoría de los casos el esquema general de trabajo para analizar una imagen es el siguiente:

- Realizar un preprocesamiento a la imagen para disminuir el ruido y suavizar los bordes de los objetos buscados.
- Realizar una clasificación de la imagen, detectando diferencias de manera aproximada los distintos objetos de la imagen.
- Identificar bordes o contornos de los objetos de interés.
- Segmentar los objetos usando la información obtenida.

Debido a la particularidad de cada problema, los métodos usados en cada fase difieren considerablemente, pasando por aplicaciones de teoría de conjuntos, filtros de imágenes métodos de segmentación, métodos de aprendizaje computacional, entre otras.

Ahora bien, existe software que facilita en gran manera el aprendizaje e implementación de diferentes técnicas de visión por computadora, tal es el caso de OpenCV (*Open Computer Vision Library*) que es una librería cuyas funciones están principalmente dirigidas a las técnicas del procesamiento de imágenes, además de ser código abierto, dicha librería proporciona funciones de alto nivel para el procesamiento de imágenes como: operaciones básicas de apertura, creación, acceso a píxeles, filtrado, reducción mediante muestreo, cambio de espacio de color, entre otras [4 y 5].

Para este trabajo se utilizó la librería antes mencionada, las pruebas incluyen imágenes microscópicas de: 2 cepas de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), la primera fue aislada en la Región de la Cañada Oaxaqueña con aplicación biotecnológica para la producción de etanol (UCT1), y la segunda es una levadura comercial usada para la panificación (LC2). Ambas cepa se llevaron a cabo en un cultivo por lote en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de medio sintético (Glucosa 70g/L, KH_2PO_4 5g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4g/L y extracto de levadura 1 g/L) a 30°C y 200 rpm, la muestra fue obtenida a las 10 horas donde la levadura alcanza su máxima velocidad de crecimiento; otra de las imágenes se obtuvo de una muestra de pulque de la Región de la Cañada Oaxaqueña, el cual se observó la presencia de levaduras, bacterias (bacilos y cocos) y filamentos de hongos (UCP3). Esto fue investigada con la finalidad de poder utilizar cualquier muestra que contenga

levadura y poder reconocer a *Saccharomyces spp.* Además se incluyó una muestra de sangre enfocando a los glóbulos rojos (MS4).

En este trabajo se presenta un método de segmentación en imágenes microscópicas usando la librería de OpenCV, proporcionando una serie de filtros que sirvieron para detectar los objetos de estudio.

2 Segmentación

La segmentación de una imagen, es un proceso por el cual una imagen digital se subdivide en partes, zonas u objetos disyuntos que la constituyen; es decir, se agrupan los píxeles en función del nivel de intensidad luminosa, el nivel al que se lleva a cabo la subdivisión depende del problema a resolver. Muchas de las veces es necesario separar en una imagen el fondo del objeto para obtener información; por ejemplo, en el análisis de la imagen de un documento se requiere extraer caracteres y líneas del fondo del papel, a este proceso se le llama binarización, puesto que clasifica cada píxel de la imagen en dos clases [6].

La librería OpenCV contiene una diversidad de funciones que permiten el PDI, para este trabajo, se utilizaron un conjunto de filtros que permiten segmentar la imagen separando los objetos de interés, en este caso las células de las diversas muestras.

2.1 Filtros

La aplicación de filtros o funciones permite obtener la información solamente de los objetos de estudio contenidos en la imagen, mismo que facilita la segmentación [7], la serie de filtros conforma una batería final con la cual se trabaja y compara los resultados obtenidos.

El filtrado es una técnica para modificar o mejorar una imagen, éste puede resaltar o atenuar algunas características. A continuación se describen algunos filtros para la segmentación de microorganismos en una muestra de pulque de la Región de la Cañada Oaxaqueña (UCP3), ya que la librería de OpenCV ofrece diferentes funciones, sólo se mostrarán las que proporcionaron mejores resultados para la segmentación.

Umbralización. Es el más sencillo de los filtros implementados, es conocido como umbralización fija (*threshold*) [8]. En su forma más simple, la imagen binaria resultante $B(i, j)$ se define a partir de la versión en escala de grises de la imagen digital original $I(i, j)$, en función de un valor U que corresponde al umbral de separación seleccionado.

$$B(i, j) = \begin{cases} 0, & \text{si } I(i, j) \geq U \\ 1, & \text{si } I(i, j) \leq U \end{cases} \quad (1)$$

En dicha fórmula el 0 indica el color blanco y 1 el color negro, la función de umbralización de OpenCV agrega un segundo valor de umbral, de manera que se consideran blancos aquellos píxeles cuyo nivel de gris encuentre dentro del rango

definido por los dos valores del umbral U_1 , y U_2 . En la Fig. 1 se presenta la muestra de pulque de la Región de la Cañada.

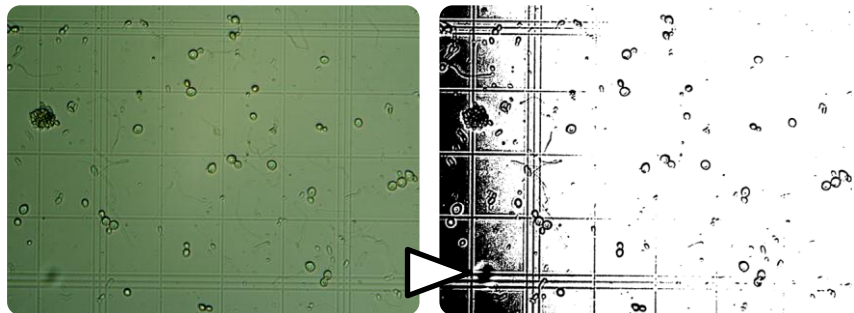

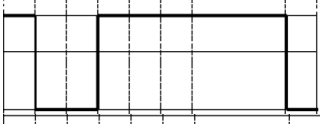
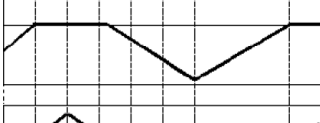

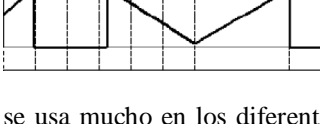


Figura 1. Muestra original (imagen izquierda); aplicación de la Función de la Umbralización (imagen derecha).

Existen diferentes funciones de umbralización que la librería de OpenCV proporciona, ver Tabla 1.

Tabla 1. Presentación de los tipos de Umbralización.

Imagen Original	Tipos
	Binario
	Binario invertido
	Truncar
	Umbral a Cero
	Umbral a Cero invertido

Ésta función se usa mucho en los diferentes ámbitos de segmentación, realizar dicha operación resulta útil, en tanto que la mayoría de los problemas buscan distinguir dos objetos diferentes en la imagen: el objeto de interés y el fondo [9]. El valor

del umbral debe ser escogido de acuerdo a un criterio particular, no sólo a las variaciones en la tinción o en la iluminación de la muestra.

Erosión. Provoca en las imágenes el afinado de las regiones de píxeles negros. Esto es de utilidad para adelgazar los trazos de un dibujo. Dicha función toma como parámetro la imagen a erosionar I y un elemento estructural B , que determina la forma de un entorno de píxeles, del cual el mínimo es elegido y colocado en el lugar del píxel procesado:

$$C(x, y) = \min\{I(x + s, y + t) | (s, t) \in B\} \quad (2)$$

En caso de no especificarse el elemento estructural (como es en éste), la función utiliza una matriz por defecto de 3x3. El efecto de erosión se puede aplicar cierta cantidad de veces, que se especifica como parámetro de la función (ver Fig. 2).

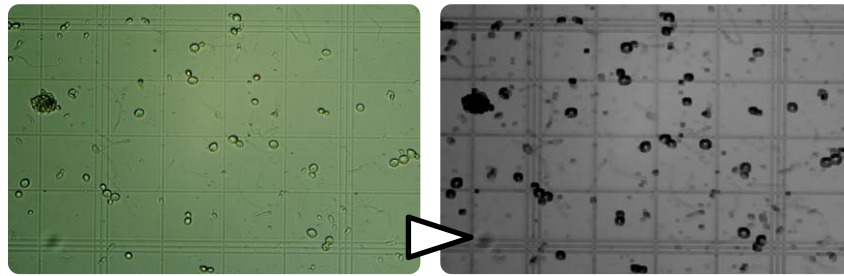


Figura 2. Muestra original (imagen izquierda); aplicación de la Función Erosión (imagen derecha).

Si bien, las herramientas que provee OpenCV son varias, se debe tener en cuenta los puntos antes mencionados para realizar la segmentación de microorganismos, por ello se llevaron a cabo una serie de pruebas con los diferentes filtros que proporciona la librería para obtener así un solo conjunto de filtros.

2.2 Batería o conjunto de filtros

Consiste de un conjunto de filtros que permite obtener la información de interés de una imagen, en este caso la batería que se presenta realiza la segmentación de diferentes imágenes microscopias, generando como resultado final una imagen binaria (blanco y negro).

Para este trabajo, se propusieron una serie de baterías, dentro de éstas se seleccionó una, que proporcionó los mejores resultados, ver Fig. 3. Cabe mencionar que el orden de los filtros da un resultado distinto.

Para conseguir este conjunto final se utilizaron varias funciones que proporciona la librería de OpenCV, la batería final con la que se trabajó cubrió las necesidades requeridas para la segmentación sin utilizar un número excesivo de funciones.

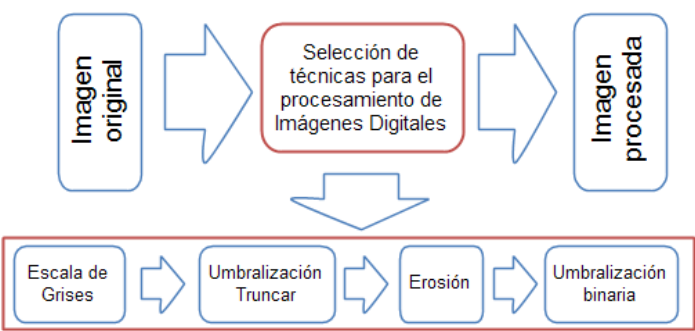
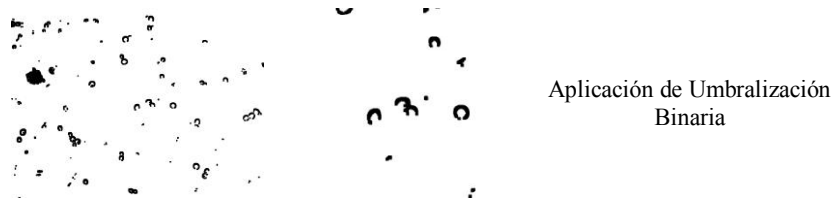


Figura 3. Selección de las funciones proporcionadas por OpenCV para el procesamiento de imágenes microscópicas.

En la Tabla 2 se muestra la aplicación de la batería a las muestra UCP3.

Tabla 2. Generación de imágenes a partir de la aplicación de las funciones, mejorando así la búsqueda de los objetos.

Imagen original	Sección de la muestra original	Descripción
		Muestra del pulque elaborada en la Región de la Cañada (UCP3)
		Imagen en escala de grises.
		Imagen con Umbralización Truncar
		Aplicación de Erosión



Cabe mencionar que las otras baterías se descartaron porque en las imágenes resultantes se obtuvo ruido y pérdida de los objetos de estudio. El resultado final que se obtiene, en este caso la imagen binaria, es necesario para un posterior uso.

3. Resultados

En esta sección se presenta la aplicación de la batería elegida con las diferentes imágenes microscópicas, cabe resaltar que los umbrales de todas las funciones para cada tipo de imagen son distintos, ver Tabla 3, debido a la variación de iluminación en la imagen, tamaño y forma de los objetos.

Tabla 3. Aplicación del conjunto de filtros a los diferentes.

Nom- bre	Imagen Original	Batería 1	Batería 2
(A) UCT1			
(B) LC2			
(C) UCP3			
(D) MS4			

La aplicación de los filtros en un orden diferente proporciona una imagen distinta, es por ello que se establece la serie de filtros agrupados en una batería. Además, la Batería 1 fue propuesta anteriormente, y a comparación de la Batería 2 que usa las funciones de OpenCV.

Los resultados obtenidos al aplicar la batería 1 en la muestra A (UCT1) reduce considerablemente el ruido en comparación de la batería 2 propuesta en [7], esto se percató en la esquina inferior izquierda de la imagen; con respecto a la muestra B (LC2) se obtuvo mejoras, entre ellas están la eliminación de ruido presente en la imagen (causado por la iluminación no uniforme del fondo de la misma) y los objetos de estudio con forma definida.

En la muestra C (UCP3) se observó diversos microorganismos de diferentes formas, por lo que al aplicar dicha batería se eliminaron los microorganismos bacterianos (cocos y bacilos), así como también los filamentos de los hongos, quedando de esta manera la información de interés (levadura).

Finalmente, en la muestra D (MS4), se percató que no es tan nítida (refiriéndose a los objetos de estudio), por lo cual al aplicar la batería 1 se pierde información, aunque con la batería 2 se obtuvieron mejores resultados.

Es importante señalar con respecto a las pruebas realizadas, aplicando la batería 1 se examinó en las muestras A, B, y C, que el objeto de estudio (levadura) está presente, sin embargo, no es el mismo resultado en la muestra D; por otro lado la batería 2 realizó la segmentación de manera correcta en las muestras A y D, excepto para la B y C.

Como se observó, los microorganismos presentan diferentes formas, relleno y vecindades [10]. Por ello es interesante e importante tratar con el PDI para la segmentación de muestras de microorganismos. Algunos de éstos están bien definidos y esto facilita la segmentación [10 - 14], en el caso de las imágenes propuestas en este trabajo no es de la misma manera, por esta razón, se hace una propuesta de ésta batería.

4 Conclusiones

El uso de las herramientas de librería de OpenCV facilita la implementación de código, mediante la cual se desarrolló la batería propuesta, además de haber efectuado diversas pruebas para obtener la batería final.

Es importante señalar, con respecto a las pruebas planteadas, la batería 1 realiza la segmentación de diferentes tipos de imágenes microscópicas y de esta forma se evita definir un nuevo conjunto para cada tipo de muestra. La Batería 2 solo lleva a cabo la correcta segmentación de la primera muestra y con las siguientes no se obtienen un buen resultado, esto podría atribuirse a la no uniformidad de iluminación.

En trabajos posteriores si se requiere contabilizar las bacterias, es necesario modificar esta batería por una que permita la segmentación de todos los microorganismos presentes en la imagen.

Dicho trabajo proporciona una utilidad en la Informática y en el área de Microbiología, como una herramienta de aplicación para el conteo celular. Debido que en la actualidad este conteo se realiza de forma manual además se pretende que la

herramienta realice la distinción de células vivas y muertas (Viabilidad celular) ya que es un parámetro muy importante dentro de la fermentación.

Además, uno de los propósitos de este trabajo es utilizar las herramientas proporcionadas con software libre, para facilitar el PDI, sin embargo, existen otras que no están implementadas y resulta necesario crear nuevas herramientas que faciliten el PDI.

A futuro se plantea que el sistema se automatice, es por ello que se realizan pruebas con diferentes imágenes para integrarlo.

Referencias

1. Chang, I.S., B. H. Kim, y P. K. Shin (1996). Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, (1), 1-6.
2. Campos J, Establecimiento de un proceso de producción de etanol a partir de jugo de caña y miel intermedia B con *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01. Tesis de Maestría, UNIDA-ITV, Mexico (2008).
3. Strehaiano, U. (1984). Phénomènes d'inhibition et fermentation alcoolique, These Dr. És Sciences. I.N.P Toulouse, Francia.
4. J.R. Parker, *Algorithms for Image Processing and Computer Vision*, Second Edition, Wiley Publishing Inc. 2011, ISBN: 978-0-470-64385-3.
5. Open Source Software. <http://opencvlibrary.sourceforge.net/>.
6. Oswaldo Rojas Camacho. 2000, "Segmentación de Imágenes usando Algoritmos Difusos", *Revista ECM* 6(1):51-63.
7. Beatriz A. Sabino; José A. Márquez; Jesús M. Campos. 2010. Segmentación de Células de la Levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 15(45):3-8.
8. Nicolás Sierra, Enrico Pizzorno, Juan Daniel Ferré. Desarrollo de una aplicación para trabajar con la técnica de "Stop Motion". Proyecto de Grado. Montevideo, Uruguay, 2004.
9. Javier Rojas. "Segmentación y reconocimiento de patrones en imágenes de histología", (2006).
10. Victor González, Enrique Alegre, Patricia Morala-Argüello, Sir Alexei Suárez Castañón. "Segmentación de cabezas de espermatozoides de Verraco mediante combinación de umbralización y transformada watershed".
11. Virginia L. Ballarin, Gustavo J. Meshino, Guillermo N. Abras y Lucia I. Passoni. "Segmentación de imágenes cerebrales de Resonancia Magnética basada en Redes Neuronales de Regresión Generalizada.
12. Humberto Bustince, Gerardo Artoln, Miguel Pagola, Edurne Barrenechea, Hamid Tizhoosh. "Sistema neuro-difuso intervalo-valorado aplicado a la segmentación de imágenes de ultrasonido". 2008.
13. Moreira Quiroz, José, Valencia Delgado, Vladimir, Chavez Burbano, Patricia "Implementación de un algoritmo para la detección y conteo de células en imágenes microscópicas".
14. Mariana Andrés Tribuj. Segmentación de imágenes texturizadas. Tesis de Licenciatura en Ciencias de la Computación, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Computación, Buenos Aires.