

Ensayos

Segmentación de Células de la Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Resumen

En este trabajo se presenta un método de segmentación de imágenes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, inicialmente se realizó un preprocesamiento que consistió en aplicar una serie de filtros a la imagen original, del resultado obtenido se utilizó un algoritmo de etiquetado de píxeles para obtener todos los objetos contenidos en la imagen (células, agentes contaminantes, entre otros), además se muestra una serie de pruebas que permite observar los resultados.

Abstract

This paper presents an images segmentation method of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, First the initial image was preprocessed with some filters or functions, then the labeling algorithm was applied to resulting image to obtain all objects in the image (cell, pollutants, and others), also shows tests and final results.

Résumé

Ce travail présente une méthode de segmentation des images de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Au départ, on a effectué un prétraitement qui consiste à appliquer une série de filtres à l'image originale. Avec le résultat obtenu, on a utilisé un algorithme d'étiquetage de pixels pour obtenir tous les objets contenus dans l'image (cellules, agents contaminants, entre autres). En plus, on montre une série de preuves qui permet d'observer les résultats.

* Beatriz A. Sabino, José A. Márquez y Jesús M. Campos

Palabras clave:

Procesamiento de Imágenes, segmentación, preprocesamiento, *Saccharomyces cerevisiae*.

Introducción

El creciente desarrollo de las tecnologías, y en especial, de la informática hace que cada día sea más frecuente su uso en el tratamiento de imágenes en las áreas de: Biofísica, Instrumentación Médica, Fenómenos Fisiológicos y Microbiología.

En el área de la Microbiología es común hablar del conteo de células y la fermentación alcohólica es un ejemplo claro de ello, durante este proceso es necesario contabilizar continuamente a través de métodos directos, como es el caso de la densidad óptica. Sin embargo, la desventaja de éste es la turbidez, debido a que la concentración de azúcar y etanol varían de forma significativa, afectando la lectura de la concentración celular.

Otro método directo es de forma manual; éste se lleva a cabo con la ayuda de la cámara de Neubauer y microscopio, la exactitud y la velocidad con que se obtienen los resultados de estos conteos dependen en parte, de la experiencia del técnico que examina la muestra, lo cual resulta larga y cansada (visualmente) al realizar múltiples conteos.

Dentro del Procesamiento Digital de Imágenes (PDI), son importantes ciertos datos como: cantidad de objetos diferentes, su forma, vialidad

* Universidad de la Cañada

	Imagen original, tomada desde un microscopio.
	Función Sigmoide Senoidal $z' = z - \beta \text{sen} \left(\frac{2\pi z}{\Lambda} \right), \beta > 0, \Lambda = 255. \quad (1)$ Función Seno $z' = \Lambda \text{sen} \left(\frac{\pi z}{2\Lambda} \right), \Lambda = 255. \quad (2)$
	Plano Azul $R = 0, G = 0, B = C. \quad (3)$
	Escala de Grises $G = \frac{Rr + Gg + Bb}{3}. \quad (4)$
	Función Binaria $z' = \begin{cases} 0 & z < a \\ \Lambda & z \geq a \end{cases} \Lambda = 255. \quad (5)$

TABLA 1. GENERACIÓN DE IMÁGENES A PARTIR DE LA APLICACIÓN DE LAS FUNCIONES, MEJORANDO ASÍ LA BÚSQUEDA DE LOS OBJETOS, CABE MENCIONAR QUE EL ORDEN DE LA APLICACIÓN DE ESTAS FUNCIONES GENERA UNA IMAGEN DIFERENTE.

celular (células vivas o muertas), entre otros. Para el análisis automático o semiautomático de imágenes se debe tener un preprocesamiento para obtener solamente la información de los objetos buscados, para ello se requiere aplicar una serie de filtros.

Existen diversas técnicas de segmentación, cada una aplicada a diferentes áreas como son: imágenes de histología utilizando la segmentación

y reconocimiento de patrones (Rojas, 2006), segmentación de imágenes cerebrales de resonancia magnética (Ballarin), segmentación de cabezas de espermatozoides de Verraco (González, 2008), imágenes de ultrasonido utilizando un sistema neuro-difuso intervalo-valorado (Bustince, 2008),

En este trabajo se presenta un método de segmentación de imágenes de la levadura



FIG. 1. LA IMAGEN RESULTANTE NO MUESTRA TODA LA INFORMACIÓN DE LOS BORDES.

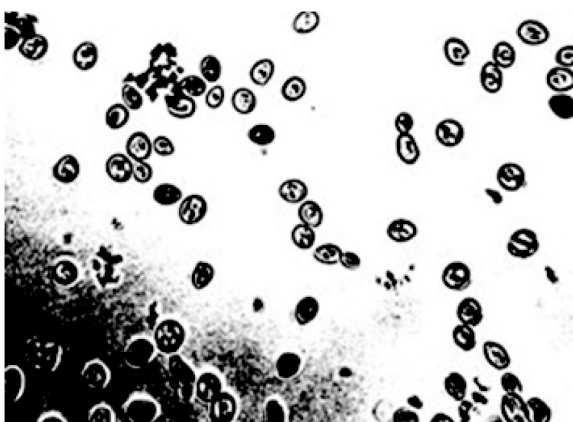


FIG. 2. LA IMAGEN RESULTANTE MUESTRA RUIDO JUNTO CON LOS OBJETOS DE INTERÉS.

Saccharomyces cerevisiae utilizando una mejora de la técnica de etiquetado de píxeles (Luzardo), así como la serie de filtros que se utilizaron para detectar los objetos de estudio (preprocesamiento). Posterior a la segmentación se realizará la extracción de características y clasificación de objetos de estudio (células y agentes contaminantes).

Preprocesamiento de imágenes

El preprocesamiento de la imagen consiste en reducir la información que no es de interés para el problema.

En las imágenes *Saccharomyces cerevisiae* se aplicaron un conjunto ordenado de filtros o funciones de tal manera que el resultado final fuera una imagen binaria (blanco y negro), dicho conjunto de funciones (batería de filtros) permite obtener la información solamente de los objetos de estudio contenidos en la imagen, mismo que facilita la segmentación, como se observa en la tabla 1.

Para conseguir este conjunto final se utilizaron varios filtros puntuales, regionales y morfológicos, de esta manera se obtuvo la batería final con la que se trabajó, ya que cubrió las necesidades requeridas para la segmentación sin utilizar un número excesivo de funciones y con ello se realizó el procesamiento de imágenes en el menor tiempo posible. Anteriormente se probó con otros conjuntos de filtros los cuales no proporcionaron resultados idóneos para la segmentación (fig. 1 y fig. 2).

El conjunto de filtros para el reprocesamiento de las imágenes de *Saccharomyces cerevisiae* se presenta en la figura 3.

Después de que se realizó el preprocesamiento se continuó con la segmentación, el método que se utilizó en este trabajo se describe en el siguiente apartado.

Segmentación

La segmentación, es un proceso en el cual una imagen es sub-dividida en las regiones u objetos que la componen, la segmentación concluye cuando los objetos de interés han sido aislados (Quiroz). Un elemento que se usa actualmente es el etiquetado, que representa un objeto o región determinada y en consecuencia agiliza el proceso de identificación.



FIG. 3. EL PRE-PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, UTILIZANDO DIVERSOS FILTROS PARA OBTENER SOLAMENTE LOS OBJETOS DE ESTUDIO.

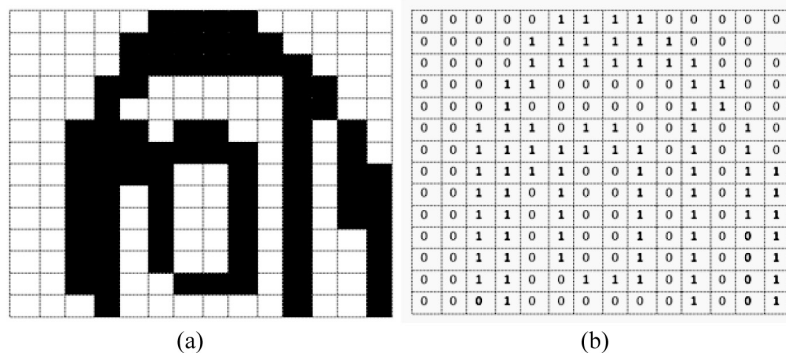


FIG. 4. DATOS DE ENTRADA EN LA CUAL SE TIENEN LOS PUNTOS QUE IDENTIFICAN A LA LEVADURA (A), IMAGEN OBTENIDA AL APLICAR LA SEGMENTACIÓN (B).

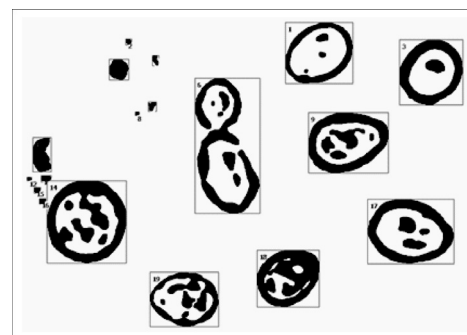


FIG. 5. SE PROPORCIONA UNA FORMA RECTANGULAR QUE IDENTIFIQUE EL OBJETO ENCONTRADO.

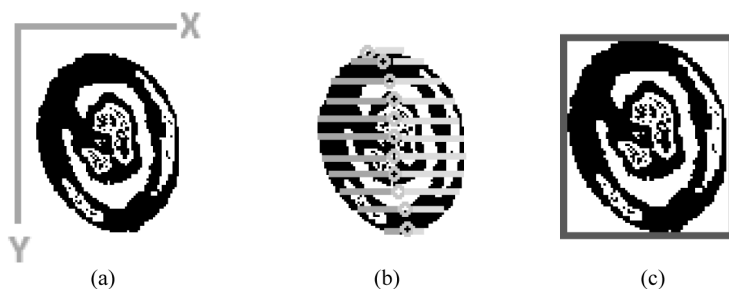


FIG. 6. PROCEDIMIENTO PARA ETIQUETAR UN OBJETO, DADO QUE NO SE ENCUENTRA CON UN RELLENO UNIFORME.

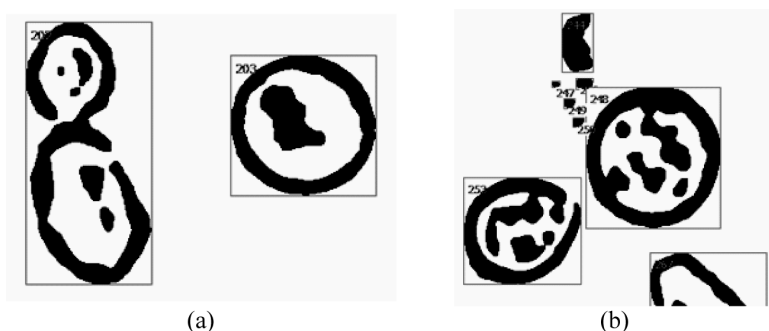


FIG. 7. PROCEDIMIENTO PARA ETIQUETAR OBJETOS.

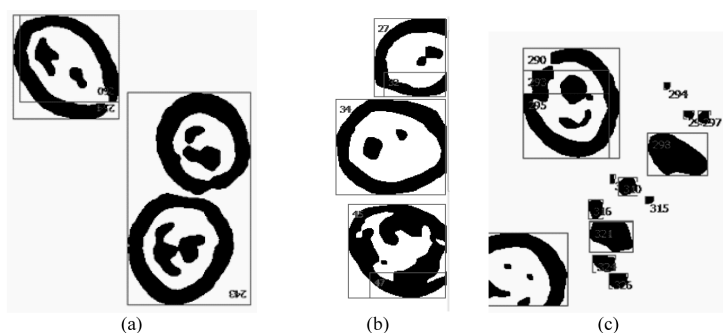


FIG. 8. CASOS ESPECIALES DEL PROCEDIMIENTO PARA ETIQUETAR OBJETOS, QUE TIENEN MÁS DE UNA SEGMENTACIÓN POR OBJETO.

En esta etapa se utilizó un algoritmo que realizó el etiquetado de píxeles, el cual consiste en colocar una etiqueta a aquellos píxeles que pertenecen a un objeto determinado (Luzardo). La entrada es una imagen en blanco y negro y la salida una matriz de etiquetas para cada uno de los píxeles de la imagen, como se ilustra en figura 4.

El algoritmo propuesto realizó el siguiente procedimiento: inicialmente busca horizontalmente (eje X o bien por filas de una matriz) en la imagen el primer punto (color negro) del objeto, una vez ubicado localiza a sus vecinos de forma horizontal y vertical, cuando ya encontró completamente el objeto, se etiqueta con un número, esto indica que ya fue revisado y se continua buscando la siguiente célula hasta recorrer toda la imagen (fig. 5).

A continuación se proporciona el procedimiento de etiquetado de un objeto:

Sea I la matriz que representa a la imagen binaria a segmentar, Pm el punto medio de los límites izquierdo y derecho en cada fila del objeto. Para cada fila de I, se recorre sobre el eje X hasta encontrar un punto P que cumpla con $I[x,y]=0$. Se establece P como

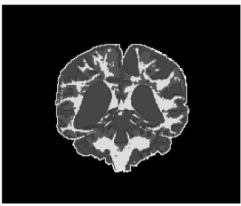
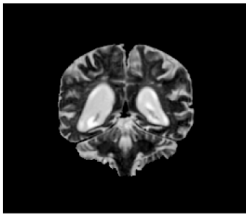
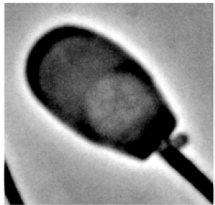
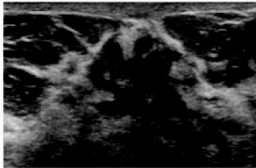
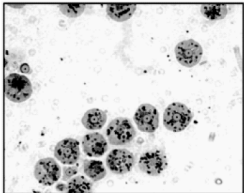
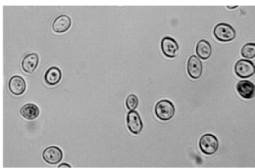
Imagen original	Imagen Preprocesada	Trabajos realizados con la segmentación
		Segmentación automática basada en la utilización de Redes Neuronales de Regresión Generalizada [2].
		Segmentación de imágenes de cabezas de de espermatozoides vivos y muertos, la segmentación se realizó sobre imágenes obtenidas en escala de grises [3].
		Sistema neuro difuso intervalo valorado para la segmentación de imágenes de ultrasonido [4].
		Utilización de dos algoritmos de segmentación y de dos principales operadores para detectar bordes en las imágenes [7].
		Segmentación proporcionada en este trabajo con objetos que no presentan un relleno uniforme.

TABLA 2. DIVERSAS APLICACIONES DE LA SEGMENTACIÓN, DONDE SE PRESENTAN OBJETOS CON RELLENO UNIFORME.

referencia para iniciar la búsqueda de los límites del objeto (fig. 6 (a)).

Se toma $P_m = P$, por cada fila del objeto se realiza un recorrido hacia los laterales para obtener los límites izquierdo y derecho, en cada iteración se actualiza el P_m y se etiquetan los puntos negros de la línea con un número determinado (fig. 6 (b)). Este proceso se realiza por cada línea hasta encontrar una en blanco.

La última línea que contenga tonos oscuros será el límite inferior y la primera (donde se encontró el punto de referencia P) es el límite superior, los límites laterales

son el máximo valor izquierdo y derecho encontrado en el recorrido sobre el eje Y como se ilustra en la figura 6 (c). Una vez etiquetados los objetos se prosigue con la clasificación de los mismos.

Pruebas y Resultados

Para las pruebas de la segmentación se tomó como entrada una imagen de células en sus diferentes etapas de crecimiento (Dickson, 2004).

En la figura 7 se muestra la salida de la aplicación encargada de la segmentación, en ella se encuentran los

objetos, la segmentación y el etiquetado. Puede notarse que la segmentación se realizó de manera exitosa por el algoritmo de etiquetado que se presenta en este trabajo.

En la figura 8 se muestran algunos casos de interés en los objetos de estudio. En la sección a (lado derecho) se encuentran dos objetos muy cercanos y que el algoritmo etiquetó como uno solo, en el objeto de la parte superior izquierda, tiene una doble segmentación sobre sí mismo, esto es debido a que su borde no está bien definido.

Se observó que la segmentación no se realizó de manera adecuada por las características antes mencionadas (fig. 8 b), esto se debe a que las células en las imágenes no tienen relleno uniforme, dificultando en algunos casos la segmentación.

Otras investigaciones (Rojas, 2006; Ballarin; González; Bustince, 2008; Rojas; Luzardo; Quiroz; Garzón, 2005) no tienen este tipo de inconvenientes, porque manejan objetos con relleno uniforme como se ilustra en la tabla 2, pero probando éste con las imágenes de las células (*Saccharomyces cerevisiae*) no funciona adecuadamente, ya que dichas células presentan huecos y discontinuidad en su perímetro.

Se propone un algoritmo de búsqueda de píxeles vecinos mediante recorridos sobre los ejes X, Y, y el manejo de umbrales para objetos (células) que no tienen relleno uniforme.

Conclusiones

En este trabajo se propuso una serie de filtros que permitió identificar a los objetos de estudio (*Saccharomyces cerevisiae*), aprovechando así la información que contienen dichas imágenes.

En los resultados obtenidos de las pruebas se observó, que el algoritmo de segmentación propuesto (etiquetado de píxeles) resulta efectivo, en condiciones donde los objetos de estudio están bien definidos y no muy juntos, por lo que se pretende mejorar el método para reducir el margen de error.

Finalmente este trabajo aporta un procedimiento para analizar imágenes de *Saccharomyces cerevisiae* que puede servir para el conteo de microorganismos unicelulares apoyados en el procesamiento de imágenes.

Trabajos a Futuro

La segmentación es una parte importante del proceso de reconocimiento de patrones, se extraerán las características que describen las células, para realizar

la clasificación de los objetos y de esta manera se puedan contabilizar el número de células vivas o muertas, así como agentes contaminantes. 

Referencias

- Ballarin Virginia L., Meshino Gustavo J., Abras Guillermo N. y Passoni Lucia I.
Segmentación de imágenes cerebrales de Resonancia Magnética basada en Redes Neuronales de Regresión Generalizada.
- Bustince Humberto, Artoln Gerardo, Pagola Miguel, Barrenechea Edurne, Tizhoosh Hamid.
2008 Sistema neuro-difuso intervalo-valorado aplicado a la segmentación de imágenes de ultrasonido.
- Dickson J. Richard, Michael Scheweizer.
2004 The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*, 2004, ERC Press, Second Edition, ISBN 0-415-29900-4.
- Garzón R. Bravo, Cortes García R., García M. Ascanio y Aguilar Uscanga G.
2005 Fundamentos y propuesta para la modernización diversificación, medio ambiente y sustentabilidad de la agroindustria de la caña de azúcar en el Estado de Veracruz. ATAM: 12, pp. 6-12.
- González Victor., Alegre Enrique, Morala-Argüello Patricia, Suárez Castrillón Sir Alexei.
Segmentación de cabezas de espermatozoides de Verraco mediante combinación de umbralización y transformada watershed.
- Luzardo M. Gonzalo.
Segmentación de Imágenes basado en la Etiquetación de Píxeles.
- Quiroz Moreira José, Delgado Valencia Vladimir, Chavez Burbano Patricia.
Implementación de un algoritmo para la detección y conteo de células en imágenes microscópicas.
- Rojas Javier
2006 Segmentación y reconocimiento de patrones en imágenes de histología.
- Rojas Camacho Oswaldo.
Segmentación de Imágenes usando Algoritmos Difusos.