

Cuantificación de actividad de crecimiento de enzimas en cajas de petri a partir de imágenes digitales

PÉREZ-TORRES, José Roberto*†, TORRES-MANCERA, María Teresa y PÉREZ-SÁNCHEZ, Grethell Georgina*

Tecnológico de Estudios Superiores de Coacalco

'Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, Departamento de Electrónica

Recibido Julio 5, 2017; Aceptado Septiembre 8, 2017

Resumen

La disponibilidad de dispositivos para capturar imágenes digitales ha crecido exponencialmente en las últimas 2 décadas, y actualmente existen un gran número de aplicaciones que permiten generar imágenes digitales de diversos tipos. Esta diversidad abarca desde imágenes de propósito general, como las generadas por las cámaras digitales convencionales, hasta aquellas especializadas, como los escaneos de imágenes de rayos X. Lo anterior ha propiciado el desarrollo de métodos que no solamente permitan almacenar e indexar las bases de datos, sino aquellas que permitan explotar su contenido en beneficio de las más diversas áreas de conocimiento del ser humano. El análisis y procesamiento de imágenes digitales permite la automatización de tareas que usualmente se llevarían a cabo de manera manual, como por ejemplo, el control de acceso a una oficina por medio de huella digital. El presente proyecto busca crear un modelo que, a través del análisis y procesamiento de imágenes digitales tomadas a cultivos, permita hacer una proyección de la producción de enzimas (específicamente metabolitos) que degraden polisacáridos, automatizando el proceso, además de buscar dar una caracterización cuantitativa. El modelo a desarrollar es específicamente de la bacteria *Escherichia coli*, y se planea hacer las adaptaciones necesarias para extenderlo a otras bacterias.

Segmentación, enzima, imagen digital, *Escherichia coli*

Abstract

The availability of devices to capture digital images has grown exponentially in the last 2 decades, and there are currently a large number of applications that allow the generation of digital images of various types. This diversity ranges from general purpose images, such as those generated by conventional digital cameras, to specialized ones, such as X-ray image scans. This has led to the development of methods that not only allow the storage and indexing of databases, but also those that allow the exploitation of its contents to benefit the most diverse areas of human knowledge. The analysis and processing of digital images allows the automation of tasks that would usually be performed manually, such as access control to an office by means of fingerprints. The present project seeks to create a model that, through the analysis and processing of digital images taken to bacterial cultures, allows a projection of the production of enzymes (specifically metabolites) that degrade polysaccharides, automating the process, as well as seeking to give a quantitative characterization. The model to be developed is specifically from *Escherichia coli* bacteria, and subsequent stages of the current research would aim to develop the model of other bacteria.

Segmentation, enzyme, digital image, *Escherichia coli*

Citación: PÉREZ-TORRES, José Roberto, TORRES-MANCERA, María Teresa y PÉREZ-SÁNCHEZ, Grethell Georgina. Cuantificación de actividad de crecimiento de enzimas en cajas de petri a partir de imágenes digitales. Revista de Cómputo Aplicado 2017, 1-3: 66-72

*Correspondencia al Autor:(Correo Electrónico: drrobertoperez@gmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

Extraer información de interés de una imagen es uno de los propósitos de la visión por computadora/análisis y procesamiento de imágenes. La segmentación, consiste en seleccionar una región de interés dentro de la imagen. Dicha región puede usarse después para diferentes tareas tales como la extracción de funciones, etiquetado, etc.

Dentro del área de la biotecnología existe la tarea de medir la actividad de enzimas despolimerizantes colocadas en cajas de Petri, y la mayoría de las técnicas actuales llevan a cabo esta tarea de manera cualitativa. Determinar la presencia de actividad de una enzima bajo determinados factores (tales como tiempo, temperatura, concentración de la enzima, etc), requiere llevar a cabo diferentes experimentos para medir las zonas de crecimiento y entonces crear patrones que predigan el comportamiento de la enzima.

Con la ayuda del análisis y procesamiento de imágenes, se puede dar un carácter cuantitativo a la tarea para medir la actividad enzimática.

El presente artículo presenta el trabajo desarrollado durante la experimentación con cajas de Petri con agar para medir la actividad enzimática usando análisis y procesamiento de imágenes, comparando los resultados contra el método cualitativo.

Éste trabajo busca mejorar un método que, actualmente mide la actividad enzimática, además de desarrollar un método de testeo preciso para la medición de la bacteria. Esto puede lograrse mediante el análisis y procesamiento de imágenes para segmentar las regiones de interés, tarea que no se ha reportado en alguna otra literatura hasta donde tenemos conocimiento.

Primero se lleva a cabo la segmentación sobre fotografías de cajas de Petri en diferentes etapas de actividad enzimática. Una vez que las regiones de interés se han determinado, se hace la medición. Después dicha información es comparada con el actual método cualitativo.

Antecedentes

Diariamente se generan en el mundo grandes cantidades de desperdicio orgánico, por lo tanto, existe un gran interés en contar con métodos que permitan el manejo adecuado de dichos desperdicios.

México, además de ser un gran consumidor, es un fuerte productor de café, estando dentro de los 10 productores más grandes del planeta. La cantidad de desperdicio generado a través del procesamiento del grano de café es alto, por lo tanto, métodos que permitan aprovechar los restos del café contribuirían no solamente a la preservación del medio ambiente, sino se podría generar beneficio económico mediante la extracción y reuso de compuestos

Una investigación previa se enfocó en la caracterización del comportamiento en el desarrollo de enzimas para determinar su habilidad para degradar el desperdicio orgánico, tal como el del grano del café, variando factores como la temperatura y la concentración de la enzima, midiendo la actividad enzimática en diferentes etapas.

El estudio mencionado se centra en el desarrollo de una técnica sencilla para medir cualitativamente la presencia y actividad enzimática en cajas de Petri, buscando el desarrollo subsecuente de técnicas para degradar el desperdicio y extraer compuestos, específicamente de desperdicio del grano de café. Los experimentos permitirían contruir una curva estándar de la actividad enzimática.

Método anterior

Medios de cultivo se prepararon usando 15 g/L de agar con 2 g/L de pectinasa, xilanasa o celulosa. La solución fue preparada disolviendo 130 U/ml de pectinasa, xilanasa y celulosa en un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 5.

Luego 3 μ l de cada disolución se colocó en el centro de la caja de Petri, dejándolo reposar durante 10 minutos bajo condiciones estériles. Después las cajas de Petri se incubaron a 30° y 40°C durante 24, 48 y 72 horas.

Después de que los cultivos estuvieron listos, las áreas de crecimiento se midieron estimando el diámetro de la región donde la enzima se desarrolló, ya que la región de interés parece ser circular. La figura 1 muestra un ejemplo de los cultivos.



Figura 1 Muestra de cultivo

A simple vista la región de actividad enzimática parece ser circular, pero usando procesamiento de imágenes la región de interés se extrajo del fondo. Ver la figura 2.



Figura 2 Región de actividad enzimática usando segmentación en imágenes de cultivos

Aunque la región de actividad parece circular, en la mayoría de casos no es un círculo perfecto, por lo tanto dependiendo de dónde se estima el diámetro del área de interés, la medición podría incluir regiones donde la enzima no se desarrolló (ver Figura 3), o descartar regiones donde la enzima se desarrolló (ver Figura 4).



Figura 3 Selección de actividad enzimática usando un diámetro horizontal. Se colocó un círculo perfecto en color rojo sobre la región de interés



Figura 4 Selección de actividad enzimática usando un diámetro vertical. Se colocó un círculo perfecto en color rojo sobre la región de interés

Método de medición mediante segmentación

La Figura 5 muestra el diagrama de flujo considerando los pasos generales que se tomaron para el desarrollo del método cuantitativo. Cada paso será explicado más a detalle en esta sección.



Figura 5 Diagrama de flujo indicando los pasos generales para hacer el método de medición cuantitativo

Usando Matlab las imágenes de las enzimas se procesaron. Las imágenes se tomaron con una cámara SONY DSC-S950 en formato JPG. Primero la imagen se presenta al usuario para que seleccione una región dentro de la imagen que contenga parcialmente áreas de actividad enzimática. La figura 6 muestra un ejemplo del área seleccionada por el usuario.



Figura 6 Región seleccionada por el usuario

Después, el color promedio de la región seleccionada anteriormente se calcula. Subsecuentemente la imagen entera es procesada para seleccionar las regiones con píxeles cuyo color se encuentra a cierta distancia euclídeana del promedio calculado previamente. La figura 7 muestra las regiones seleccionadas en color negro para distancias euclídeanas de 10, 35, 50 y 70 (superior izquierda, superior derecha, inferior izquierda e inferior derecha, respectivamente).

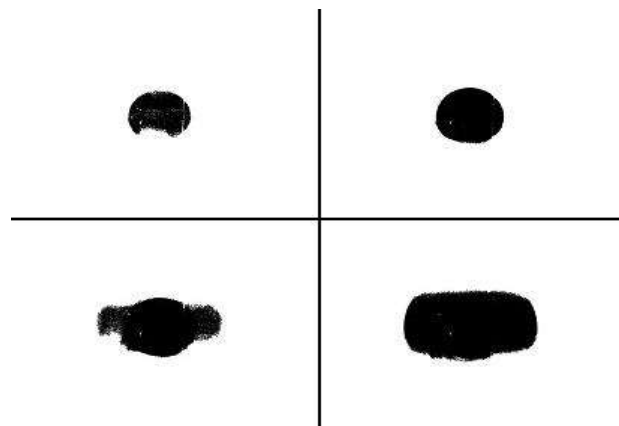


Figura 7 Segmentación aplicada usando distancias euclídeanas de 10, 35, 50 y 70 respecto al color promedio de la región seleccionada por el usuario

Se probó la segmentación con las siguientes distancias Euclídeanas: 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 50, 60, 70. Entonces, dentro de las 10 regiones segmentadas con diferentes distancias Euclídeanas, manualmente se seleccionó la que mejor representaba la región de interés.

Se debe notar que las imágenes generadas en la investigación anterior se crearon bajo condiciones no controladas. Como trabajo futuro se incluirá el desarrollo del ambiente para generar imágenes con condiciones controladas (luz y distancia respecto a la cámara).

Considerando lo anterior, el siguiente reto consistió en establecer la forma de determinar cuántos píxeles representa una unidad de medida (por ejemplo mm, cm), de tal manera que las regiones segmentadas pudieran transformarse en áreas medidas de tamaño estándar.

Sabiendo que el diámetro de las cajas de Petri es de medida estándar (las cajas de Petri de 5 cm se usaron durante la experimentación), para cada imagen procesada, el diámetro se calculó considerando los bordes más alejados en ambas direcciones, vertical y horizontal. La mayoría de las mediciones tuvieron una variación de tan solo 1 o 2 píxeles entre ambas direcciones, horizontal y vertical).

Posteriormente, la conversión entre cuántos píxeles representa un centímetro fue hecha para cada imagen procesada. El paso final consistió en establecer cuantos píxeles cubre la región segmentada para cada imagen, y calcular cuantos cm^2 son cubiertos por la región de actividad usando la conversión descrita previamente en esta sección.

Resultados

La mejor relación entre la región de interés y las regiones segmentadas para las 10 distancias Euclídeanas se encontró entre distancias de 25 y 35.

El área de actividad enzimática se calculó usando las regiones segmentadas para cada imagen. Después, las medidas se compararon contra aquellas del método cualitativo. La Tabla 1 presenta los resultados de dicha comparación.

Imagen	Metodo Cualitativo	Metodo con segmentación
1	4.15	3.99
2	3.98	4.15
3	3.46	3.19
4	2.84	2.65
5	6.16	5.94
6	5.31	5.59
7	4.34	4.02

Tabla 1 Comparación de ambos métodos de medición, cualitativo y cuantitativo (el último a través de segmentación de imágenes)

Cabe mencionar que la variación entre mediciones en ambos métodos es pequeña, causada por la pérdida y agregación de regiones de actividad enzimática del método cualitativo como se muestra en las Figuras 3 y 4.

La Gráfica 1 muestra los resultados de ambos métodos, cualitativo y cuantitativo, para la actividad con celulosa a 30° después de 24 horas en diferentes concentraciones. Después, un modelo de regresión lineal (mostrados en las gráficas 1 y 2) se calculó para ambos métodos obteniendo una tendencia lineal con un error del 5%. La Gráfica 2 muestra el resultado de actividad enzimática a 30° después de 48 horas. Hay que notar que la pendiente de la línea se incrementa entre los 24 y 48 horas de actividad.

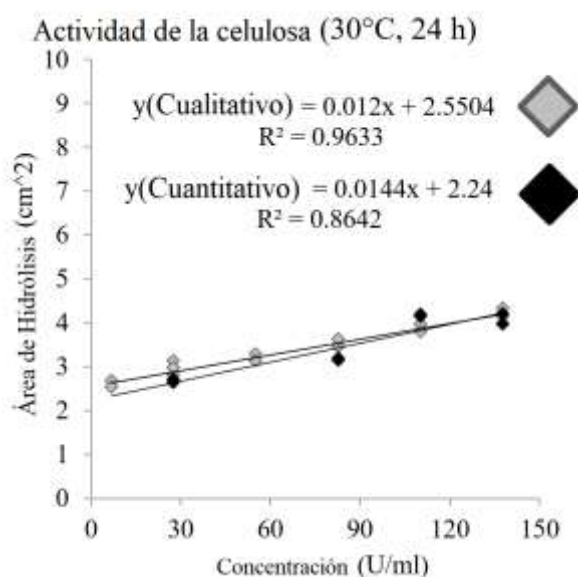


Gráfico 1 Actividad con celulosa a 30° después de 24 horas

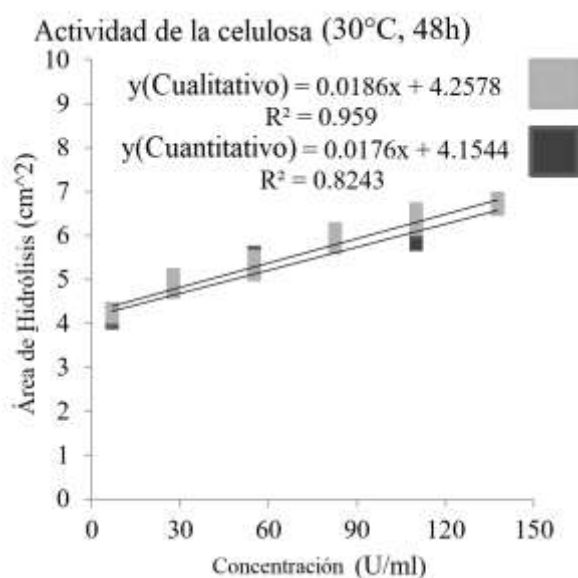


Gráfico 2 Actividad con celulosa a 30° después de 48 horas

Finalmente el coeficiente de determinación (R^2) se calculó usando las medidas de ambos métodos.

Después de 24 horas de actividad, R^2 es 0.96 y 0.86 para los métodos cualitativos y cuantitativos respectivamente. En el caso de 48 horas de actividad, R^2 fue de 0.95 y 0.82 para los métodos cualitativo y cuantitativo respectivamente. Se debe notar que en ambos casos R^2 se redujo para el método cuantitativo, probablemente porque refleja una conducta más certera de la actividad enzimática.

Agradecimientos

Agraecemos al Tecnológico Nacional de México (TecNM) y al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP, ITESCOAC-PTC-046) por su apoyo.

Conclusiones

Este artículo presenta los resultados experimentales para la cuantificación de regiones de actividad enzimática para la biodegradación de residuos orgánicos usando análisis y procesamiento de imágenes para segmentación, considerando la investigación previa desarrollada cuyos resultados son cualitativos. Esta tarea es alcanzada mediante la segmentación de actividad enzimática a través de la selección de áreas que caen dentro de cierta distancia Euclídeana comparado contra una región seleccionada por el usuario. Contrastado contra el método original, este trabajo presenta resultados consistentes y reproducibles que pueden posteriormente usarse para la caracterización de otras enzimas o bacterias.

Como trabajo futuro se realizará la automatización del método debido a que actualmente se requiere de ayuda del usuario para la selección de las regiones de interés.

Referencias

- Aguilar C.N., Guitérrez-Sánchez G., Prado-Barragán L.A., Rodríguez-Herrera R., Martínez-Hernández J.L., Contreras-Esquivel J.C. (2008). *Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes* Am. J. Biochem. Biotechnol. 4:354-366.
- Alonso Hernández, L., Benítez Quecha, Claribel, Morales García O., Silva Martínez, D. (2016), *Análisis de algoritmos para reconocimiento de imágenes digitales*, ECORFAN Revista de Sistemas Computacionales y TIC's, Vol. 2 No. 5 p. 82-93.
- Ambriz-Colín, F., Aviléz-Ferrera, J. J., Cano-Ramírez, J., Florez-Pérez, J. M. (2015), *Desarrollo de Interfaz Gráfica para la Experimentación de la Detección de Células*, ECORFAN Revista de Sistemas Computacionales y TIC's, Vol. 1 No. 1 p. 70-74.
- Aranda Delgadillo M., Medina Muñoz L. A., Rodríguez Espinoza I., González López S. (2017), *Aplicación de Técnicas de Visión Artificial y Sistemas Expertos para la Determinación del Valor de Monedas* ECORFAN Revista de Prototipos Tecnológicos, Vol. 3 No.7 p.7-12.
- Bangham, J.A., Ruiz-Hidalgo J., Harvey R.W., Cawley G.C (1998). *The segmentation of images using scale-space trees*. British Machine Vision Conference (BMVC-98), 1, 33-43.
- Chen, J., Pappas, T. N., Mojsilovic, A., Rogowitz, B. E. (October 2005), *Adaptive Perceptual Color-Texture Image Segmentation*, IEEE Transactions on Image Processing, Vol. 14.
- Dass., R., Priyanka, Devi, S. (March 2012) *Image Segmentation Techniques*. The International Journal of Electronics & Communication Technology, 3(1). 66-70.
- Gonzalez, R. C., Woods, R. E. (2008). *Digital Image Processing*, Upper Saddle River, New Jersey: Pearson Education, Inc.
- Lárraga Altamirano, H. Piedad Rubio, A., Zapata Garay, N., Espinosa Guerra O., (2016), *Algoritmo para control de calidad mediante procesamiento de imágenes aplicado a la industria alimenticia*, ECORFAN Revista de Aplicación Científica y Técnica Vol. 2 No 3, p. 1-7.
- Malik, J., Belongie, S., Leung, T., Shi, J. (2001). *Contour and Texture Analysis for Image Segmentation*, International Journal of Computer Vision. 43(1), 7–27.
- Montoya-Aguilar, M., Cruz-Duarte, J. M., Aviña-Cervantes, J. G., (2015), *Multiumbral optimal segmentation through a metaheuristic optimization algorithm*, ECORFAN Journal – Democratic Republic of Congo, Vol. 1 No. 1 p. 31-37.
- Raof, R.A.A., Salleh, Z., Sahidan, S.I., Mashor, M.Y., Md Noor, S.S., Idris F. M., Hasan, H., (December 2008). *Color thresholding method for image segmentation algorithm of Ziehl-Neelsen sputum slide images*. Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control, 212-217.
- Torres-Mancera, M.T., Pérez-Torres, J.R., Lezama-Álvarez, S., Saucedo-Castañeda, G. (2016). *Estudio de la cuantificación de la actividad xilanasa, pectinasa y celulasa en cajas de Petri*. Proceedings of XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ, Puerto Vallarta, México.
- Torres-Mancera, M.T. (2013). *Obtención de ácido clorogénico de la pulpa de café a partir de extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio sólido*. (Doctoral dissertation).
- Yang V.W., Zhuang Z., Elegir G., Jeffries T.W. (1995). *Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic Bacillus sp isolated from kraft pulp*. J. Ind. Microbiol. Vol. 15, p. 434-441.