

Procesado de Imágenes de Microorganismos

Josué AlvarezBorrego¹, Cristian Gallardo-Escárate^{1,2}, Miguel Angel del Río - Portilla², Vitaly Kober³, M. Amparo Rodríguez-Santiago^{1,5}, Rosa Reyna Mouriño-Pérez⁴, Ernestina Castro-Longoria⁴, Mario A. Bueno-Ibarra^{1,6}, M. Cristina Chávez-Sánchez⁷, Emma J. Fájera-Ávila⁷

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

¹Depto. de Óptica, División de Física Aplicada

²Depto. de Acuicultura, División de Oceanología

³Depto. de Ciencias de la Computación, División de Física Aplicada

⁴Depto. de Microbiología, División de Biología Experimental y Aplicada

Km. 107, Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, B. C., C. P. 22880, México.

⁵Facultad de Ciencias Marinas de la UABC, Km. 103, Carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, B. C., México.

⁶CITEDI-IPN, 2498 Roll Dr. 757, Otay Mesa, San Diego CA, USA.

⁷Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental, Sábalo Cerritos S/N, Apdo. Postal 711, Estero del Yugo, Mazatlán, Sinaloa, C.P. 82010, México.

<http://optica.cicese.mx/~josue/>

Resumen

Debido a la diversidad de formas y tamaños que presentan tanto organismos vivientes como objetos inertes, ha surgido la importante necesidad de buscar sistemas automatizados de identificación. Dichos sistemas han sido utilizados en diversas aplicaciones, tanto en la industria como en el quehacer científico. El interés en desarrollar y utilizar nuevos sistemas ópticos y algoritmos digitales para el reconocimiento de organismos, independientemente de su escala, rotación y translación dentro una imagen, ha permitido la identificación de algunas especies de fitoplancton, zooplancton, bacterias (tuberculosis y *Vibrio cholerae* 01), cuerpos de inclusión de virus en imágenes de tejido de camarón (IHHN y WS), cromosomas del abulón rojo, azul y amarillo y parásitos de peces.

Además, el problema de la captura de las imágenes en un sistema de identificación y clasificación automática de partículas biogénicas se circunscribe a dos aspectos fundamentales. El primero de ellos consiste en la localización automática de las partículas a identificar y segundo reside en la obtención del mejor plano focal de entre un conjunto de imágenes candidatas. Para lograr este último propósito, una posible solución al problema consiste en la aplicación de técnicas de fusión de imágenes, por medio de las cuales la imagen fusionada permita mostrar aquellas características ornamentales que

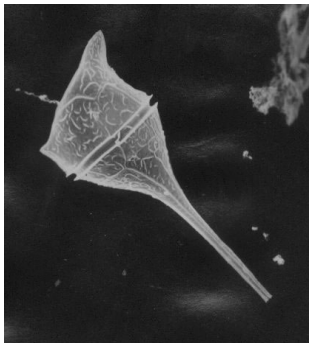
se encuentran a diferentes planos focales y que permiten caracterizar las diferentes *partículas biogénicas*.

Otra aplicación de sistemas ópticos-digitales, es el estudio de superficies marinas reales a partir de imágenes remotas. Cuando se tienen superficies con variaciones de altura y detalle lateral mucho mayor que la longitud de onda, la óptica geométrica es aplicable, siempre y cuando los efectos de esparcimiento múltiple sean despreciables, de esta forma a través de la utilización de nuevos algoritmos es posible describir el comportamiento de la superficie del mar, con aplicaciones en el ámbito costero.

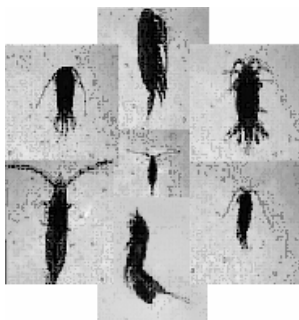
INTRODUCCION

Aplicaciones de identificación de partículas biogénicas

La fantástica diversidad de formas en los organismos del plancton (fito y zooplancton) ha sido un atractivo para los estudiosos por más de un siglo. La diversidad de la morfología son factores directamente relacionados a su suspensión en la columna de agua (Smayda, 1970). La identificación y conteo de organismos es indispensable para poder realizar estudios de diversidad, estructura de poblaciones y trama trófica, entre otros.



Los organismos del fitoplancton son de gran importancia ecológica ya que comprenden la mayor porción de productores primarios en el mar y pueden ser usados para identificar regiones naturales de los océanos. Estas regiones pueden ser caracterizadas por una especie típica o por un conjunto de especies endémicas. El trabajo de biogeografía de las comunidades del plancton, ha concluido que los organismos del fitoplancton son buenos indicadores de regiones naturales, las cuales están definidas por la latitud y por los procesos dinámicos de los océanos (Braarud et al. 1953; Smayda, 1958). De tal manera que estos organismos son utilizados para encontrar la relación existente entre las condiciones particulares de cada región y para conocer los cambios que generan las alteraciones globales atmosféricas que está experimentando nuestro planeta en un tiempo geológico, utilizando información de la micropaleontología de un cierto lugar (Funnell y Riedel, 1971).

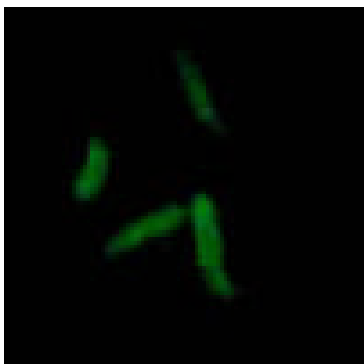


Respecto al zooplancton, los miembros más numerosos son los grandes crustáceos herbívoros como los copépodos, eufásidos y los carnívoros queetognatos. Particularmente, los copépodos son los organismos zooplantónicos más abundantes en el mar, cerca del 90% de los zooplantontes son capturados en una muestra, y constituyen la principal ruta del flujo de energía entre los productores primarios (fitoplancton) y los niveles tróficos superiores: son las "vacas del mar". Este grupo de organismos destaca por su gran diversidad, se han descrito cerca de 11500 especies (Humes,

1994) y el número va en aumento ya que recientemente se han reportado especies de copépodos de regiones que antes eran inaccesibles como las cuevas anquihalinas (Fosshagen y Lliffe, 1991) y las chimeneas hidrotermales (Humes, 1991).

Los sistemas de analizadores de imágenes usados en organismos de plancton son los siguientes, por citar solo unos cuantos: el realizado por Uhlmann et al. (1978), que trabajaron en un sistema que utiliza las mediciones de las formas de los organismos como son el área, ancho, largo y largo-ancho; Jeffries et al. (1980; 1984) trabajaron con un sistema analizador de imágenes que fue capaz de realizar análisis discriminantes entre las variables de largo, ancho y área de cada organismo analizado, los organismos utilizados fueron ocho grupos taxonómicos de zooplancton.

Con respecto al análisis de imágenes mediante sus patrones de difracción tenemos los trabajos de Rodier y Rodier (1987) en análisis de interferogramas con base a patrones de difracción de imágenes; Zavala-Hamz (1990) aplicado a organismos del zooplancton entre otros. Trabajos recientes en ésta línea de investigación son los de Zavala-Hamz et al. (1996) que demostraron que es más fácil identificar una especie de zooplancton a partir de su patrón de difracción que a partir de su misma imagen y Zavala-Hamz et al. (1997) mediante filtros armónicos circulares pudieron identificar por primera vez a nivel sexo algunas especies de copépodos. Castro-Longoria et al. (2001) obtuvieron un nuevo modelo de reconocimiento para copépodos calanoideos invariante a posición y rotación y Pech-Pacheco et al. (2001) sentaron las bases para la toma automática de microorganismos en un microscopio óptico. Álvarez-Borrego y Castro-Longoria (2003) identificaron especies de *Acartia* a nivel sexo y Castro-Longoria et al. (2003) identificaron tres distintas especies de copépodos que anteriormente se pensaba eran la misma especie.



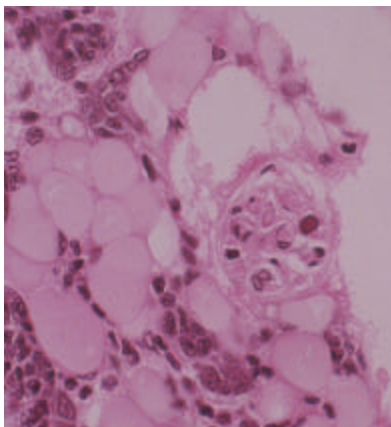
Dentro de nuestro grupo de procesado siempre hemos buscado la solución de problemas de gran impacto donde pueda verse la importancia de la aplicación de los sistemas ópticos por la comunidad que nos rodea. Por esta razón también nos estamos enfocando a la identificación del *Vibrio cholerae* 01 en el agua de mar mediante sistemas ópticos que además de utilizar información de escala, rotación y posición, tengan información de color. El cólera es una infección intestinal aguda, grave, que se caracteriza por diarrea producida por la enterotoxina del *Vibrio cholerae*; este padecimiento de aparición súbita puede llevar a los individuos susceptibles a la deshidratación severa, a alteraciones vasculares e incluso a la muerte en menos de 24 horas de no ser tratado adecuadamente (Fernández de Castro, 1991; Giono-Cerezo et al. 1991). Esta enfermedad representa para la humanidad uno de los problemas de salud pública más importantes en la actualidad, no solo por sus repercusiones a nivel individual, sino también por el gran número de personas que afecta alrededor del mundo (Fernández de Castro, 1991). Este microorganismo ha sido responsable de casi ocho pandemias a partir de 1817,

en que se registró por primera vez, las siete primeras fueron producidas exclusivamente por el *V. cholerae* O1 y la octava, que aún se encuentra en discusión, por el grupo O139, que son los únicos de los más de 130 serogrupos, que hasta el momento se han detectado como productores de toxinas enteropatógenas (Cholera working group, 1993; Kaper et al. 1993; Sweerdlow y Ries. 1993).

Así, una alternativa al respecto pueden ser los sistemas ópticos que se han desarrollado para la identificación de diversos objetos a partir de su patrón de difracción. En este caso en particular aplicaremos lo que se llama en procesamiento de imágenes: correlación a color. Recientemente Álvarez-Borrego et al. (2002) desarrollaron un modelo digital de reconocimiento invariante aplicado a la identificación de la bacteria de *Vibrio cholerae* O1 tanto para muestras en agua dulce como muestras de agua de mar.

Aplicaciones en procesos productivos marinos

La acuicultura actualmente se practica en muchos países del mundo. Se considera como una actividad que se está desarrollando como complemento de la captura de organismos marinos y de agua dulce. En la actualidad, ésta actividad contribuye con más del 27.3% de la producción total mundial (FAO, word shrimp farming, 1996). La camaronicultura en México es una actividad que data de los años 70's. La principal especie de camarón que se produce por los diversos métodos de acuicultura es: *Penaeus vannamei* (camarón blanco), sin embargo, recientemente por problemas de enfermedades virales con esta especie, se está retomando el cultivo de *Penaeus stylirostris* (camarón azul). El desarrollo más importante de la camaronicultura se localiza en el estado de Sinaloa. Actualmente se encuentran operando siete laboratorios de producción de larvas y 154 granjas de camarón, las cuales representan un poco más de 7,458 hectáreas de cultivo, que para el ciclo de verano de 1994 reportó 10,368 toneladas de camarón. Sin embargo, enfermedades virales como del síndrome de Taura a mediados de 1995 causó pérdidas económicas en la industria camaronícola en los estados de Sonora, Sinaloa, Guerrero (Lightner, 1996), Chiapas y Yucatán (Chávez, 1996) donde se cultiva camarón blanco, ya que esta especie resultó ser susceptible a este virus.



El contar con herramientas de diagnóstico e investigación de enfermedades de organismos acuáticos rápidas y precisas coadyuvarán a una sana acuicultura. Recientemente Álvarez-Borrego y Chávez-Sánchez (2001) presentaron una metodología digital para el reconocimiento de cuerpos de inclusión de virus IHHN en muestras de tejido de camarón y Pacheco-Marges (2004) ha profundizado más en este algoritmo al implementar filtros compuestos para la detección de cuerpos de inclusión del virus Mancha Blanca en muestras de tejido de

camarón.

Con respecto al estudio de parásitos de peces sabemos que la producción acuícola de peces está dominada por tres grupos de especies: carpas, tilapias y ciprínidos. La tilapia y otros cíclidos son el tercer grupo de mayor importancia con una producción anual de 1'264,719 toneladas en 2000 (FAO). Las tilapias han sido introducidas para la acuicultura y con propósitos pesqueros en la mayoría de los países tropicales alrededor del mundo. El cultivo de tilapia se inició en México desde 1964 y en la actualidad se ha convertido en un importante recurso en un tiempo relativamente corto. Además, con el transcurso de los años se corroboró su gran resistencia y adaptabilidad al medio, que ha hecho que este recurso sea considerado como uno de los más importantes de la piscicultura mexicana. En su ambiente natural los peces presentan poca susceptibilidad a las enfermedades. Sin embargo, bajo cultivo estas especies se ven afectadas debido a que los organismos están sometidos a cambios repentinos en la calidad del agua y estrés causados por el manejo (Kabata, 1985).



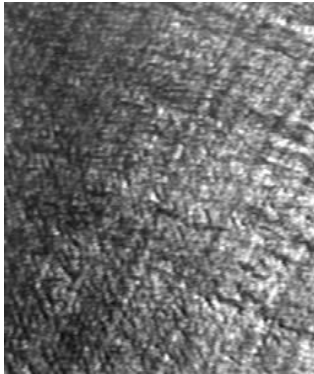
Al mismo tiempo y con la finalidad de contar con un método altamente eficaz que facilite el trabajo de los técnicos que laboran en sanidad acuícola e investigadores que requieren del conocimiento de la especie de parásito a estudiar de forma rápida y segura, se ha desarrollado un algoritmo de reconocimiento de imágenes dentro de un procesado de correlación a color con filtros de fase compuestos para el reconocimiento de diferentes

especies del género *Trichodina* previamente estudiadas por técnicas convencionales (Rodríguez-Santiago, 2002).

Otro tipo de aproximación, es la utilización de análisis de imágenes en estudios cromosómicos o citogenéticos en distintas especies acuícola de importancia comercial. En este sentido, la utilización de algoritmos de identificación para estudiar distintos aspectos citogenéticos, permite reducir el error ocasionado por las mediciones manuales, al permitir realizar aproximaciones más cuantitativas y detalladas de la naturaleza morfológica de los cromosomas (Schrock et al., 1998). En este sentido, recientemente hemos aplicado dicha metodología en el estudio citogenético el abulón rojo del Pacífico *Haliotis rufescens* (Gallardo et al. 2004).



Aplicaciones en estudios de oleaje



Por otro lado, la costa oeste de la Península de Baja California está expuesta al movimiento del oleaje el cual ocasiona múltiples daños. En aguas profundas, el oleaje puede afectar plataformas marinas y, en aguas someras, construcciones costeras y zonas recreativas. Para estudiar el oleaje de manera cuantitativa, se ha intentado emplear tanto imágenes de radar como fotografías aéreas. La dinámica de la superficie marina es muy importante, ya que nos permite determinar su influencia sobre la capa superficial de mezcla y las líneas de costa.

Trabajos recientes elaborados en Cicese en los últimos diez años muestran que es posible obtener las estadísticas de primer y segundo orden de superficies rugosas aleatorias a partir de imágenes remotas. Más concretamente, es posible obtener la función de autocorrelación, o el espectro de energía de la superficie. Se han derivado algunos resultados analíticos y numéricos que relacionan la función de autocorrelación de las alturas de la superficie con la función de autocorrelación del patrón de intensidad que se forma en la imagen de ésta. También se han realizado experimentos para mostrar la aplicabilidad de ésta nueva técnica. Los resultados han mostrado que es posible estimar propiedades estadísticas de primer y segundo orden de las alturas de una superficie rugosa aleatoria con el modelo propuesto en Cicese (Álvarez-Borrego J., 1993a, 1993b, 1995a, 1995b, 1995c, 1995d, Marín-Hernández Mark y Álvarez-Borrego. 1999).

BIBLIOGRAFIA

- Álvarez-Borrego, J. 1995a. 1-d rough surfaces: glitter function for remote sensing. *Optics Communications*, 113, 353-356.
- Álvarez-Borrego, J. 1995b. Some statistical properties of surface heights via remote sensing. *Journal of Modern Optics*, 42 (2): 279-288.
- Álvarez-Borrego, J. 1995c. Función de brillo: superficies rugosas en una y dos dimensiones. *Revista mexicana de Física*, 41(4).
- Álvarez-Borrego, J. and A. Martínez-García. 1995d. Statistics of rough surfaces via remote sensing: an experiment. *Journal of Modern Optics*, Vol. 42(11): 2347-2355.
- Álvarez-Borrego, J. 1993a. Two dimensional glitter function in the study of rough surfaces via remote sensing. *Journal of Modern Optics*. 40(11): 2081-2086.
- Álvarez-Borrego, J. 1993b. Wave height spectrum from sun glint patterns: an inverse problem. *Journal Geophysical Research-Oceans*, 98(C6): 10245-10258.

- Álvarez-Borrego, J, and E. Castro-Longoria. 2003. Discrimination between *Acartia* (Copepoda: Calanoida) species using their diffraction pattern in a position, rotation invariant digital correlation. *Journal of Plankton Research*, 25(2): 229-233.
- Álvarez-Borrego Josué and María Cristina Chávez Sánchez. 2001. Detection of IHHN virus in shrimp tissue by digital color correlation. *Aquaculture*, 194(1-2):1-9.
- Alvarez Borrego, J, Mouriño Pérez, R., G. Cristóbal Pérez and J. Luis Pech Pacheco. 2002. Invariant recognition of polychromatic images of *Vibrio cholerae* O1. *Optical Engineering*, 41(4): 827-833.
- Braarud, T., K. Gaarder and J. Grontved. 1953. The phytoplankton of the North sea and adjacent waters in May 1948. *Rapp. P. V Reun. CIEM.*, 133:1-87.
- Castro-Longoria, E., J. Álvarez-Borrego and J. Pech-Pacheco. 2001. Identification of species of calanoid copepods using a new invariant correlation algorithm. *Crustaceana*, 74(10), pp. 1029-1039.
- Castro-Longoria, E., J. Alvarez-Borrego., A. Rocha-Olivarez, S. Gómez and V. Kober. 2003. The power of a multidisciplinary approach: using morphological, molecular and digital methods in the study of harpacticoid cryptic species". *Marine Ecology*, 249: 297-303.
- Cholera Working Group. 1993. Large epidemic of cholerae kile disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *Lancet* 342: 387-390.
- FAO (1970-1999) Fisheries Department, Fishery information data and statistic Unit. FISHSTAT Plus: Universal Sofwaré for fishery statistical time series. Version 2.3. 2000 Dataset: Aquaculture production.
- Fernández-Castro, J. 1991. El cólera. Un problema no resuelto. *Ciencias* 24:33-44.
- Fosshagen, A. and T. Liffé. 1991. A new genus of calanoid copepod from an anchialine cave in Belize. *Bull. Plankton Soc. Japan. Spec.* 1991:339-346.
- Gallardo, C., Álvarez-Borrego Josué, M. A. Del Río-Portilla., V. Kober, (2004). Karyotype of the red abalone *Haliotis rufescens* (Archaeogastropoda: Haliotidae), using image analysis. *Journal of Shellfish Research*, Vol. 23, No. 1, pp. 205-209, April
- Giono-Cerezo S, Gutiérrez-Cogco L, Hinojosa-Ahumanda AM. 1991. Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* O1. Publicación técnica del INDRE No. 10, México.
- Humes, A. 1991. Zoogeography of copepods at Hydrothermal vents in the Eastern Pacific Ocean. *Bull. Plankton Soc. Japan. Spec.* 1991:383-389.
- Humes, A. G. 1994. How many copepods?. In Ferrarri, F. D. & B. P. Bradley (Eds.). *Ecology and Morphology of Copepods. Hydrobiologia* 292/293:1-8.
- Jeffries, H., Berman, M., Poularikas, A., Katsinis, C., Melas, I., K. Sherman and L. Bivins. 1984. Automatic sizing, counting and identification of zooplankton by pattern recognition. *Mar. Biol.*, 78: 329-334.
- Jeffries, H., Sherman, K., R. Maurer and C. Katsinis. 1980. Computer processing of zooplankton samples. In: Kennedy, V. (ed.) *Estuarine perspectives*. Academic Press, New York, pp. 303-316.
- Kabata, Z. 1985. Parasites and diseases of fish cultured in the tropics. Pacific Biological Station Nanaimo, British Columbia, Canada. Taylor and Francis, London and Philadelphia, pp 62-35.

- Koper, J., Lockman, H., R. Colwell and S. Joseph. 1993. Ecology, serology and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:91-103.
- Marín-Hernández, M. and J. Álvarez-Borrego. 1999. First and second order statistics of rough random surfaces from remote sensing images considering a Gaussian glitter function. *Journal of Modern Optics*, 46(2):342-246.
- Pacheco Marges María del Rosario. "Procesamiento de imágenes policromáticas como método de diagnóstico del virus de la mancha blanca (WSSV) en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)". Tesis de Maestría, CIAD- Unidad Mazatlán, 20 de febrero del 2004.
- Pech-Pacheco J. L., Gabriel Cristóbal, Josué Álvarez-Borrego and Leon Cohen. 2001. "Automatic system for phytoplanktonic algae identification". *Limnetica*, 20(1): 143-158.
- Rodier, C. and F. Rodier. 1987. Interferogram analysis using Fourier transform techniques. *Applied Optics*, 26:1668-1673.
- Rodríguez-Santiago, M. 2002. Identificación de especies ectoparásitas del género *Trichodina* (Ciliophora: Peritrichida) en *Tilapia nilotica* mediante correlación invariante con filtros compuestos. Tesis, CIAD- Unidad Mazatlán.
- Smayda, T. 1958. Biogeographical studies of marine phytoplankton. *Oikos*, 9(2):158-191.
- Smayda, T. 1970. The suspension and sinking of phytoplankton in the sea. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 8:353-414.
- Swerdlow, D. and A. Ries. 1993. *Vibrio cholerae* non O1, the eighth pandemic? *Lancet*, 342:382-383.
- Uhlmann D, Schlimpert O, Uhlmann W. 1978. Automated phytoplankton analysis by a pattern recognition method. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.*, 63: 575-583.
- Zavala-Hamz, V. 1990 Análisis de los patrones de difracción de cuatro especies de copépodos calanoideos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Marinas de la UABC.
- Zavala-Hamz, V. and J. Álvarez-Borrego 1997 CH filters for the recognition of marine microorganisms. *Applied Optics*, 36(2): 484-489.
- Zavala-Hamz, V., J. Álvarez-Borrego and A. Trujillo-Ortíz. 1996. Diffraction patterns as a tool to recognize copepods. *Journal of Plankton Research*, 18(8): 1471-1484.