

# **ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD DE CULTIVOS DE MICROALGAS MEDIANTE EL TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES**

*ESTIMATION OF THE DENSITY OF MICROALGAE CROPS THROUGH THE DIGITAL TREATMENT OF IMAGES*

**Edgar Daniel Sánchez Nieto**

Universidad Autónoma de Baja California Sur  
*daniel.nieto.26@gmail.com*

**Guillermo Martínez Flores**

CICIMAR, Instituto Politécnico Nacional  
*gmflores@ipn.mx*

**Armando Monge Quevedo**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste SC  
*amonge04@cibnor.mx*

## **Resumen**

Se determinó de forma experimental el uso de técnicas de procesamiento digital de imágenes para estimar la densidad celular (cel mL<sup>-1</sup>) de microalgas *Nannochloropsis oculata* en un ambiente semi-controlado. Esto permitirá tomar decisiones oportunas en el seguimiento del cultivo de organismos acuáticos. Con un microscopio convencional (Carl Zeiss-Primo Star) se realizaron tres conteos diarios de células del cultivo por un periodo de 12 días y se tomaron fotografías de los matraces de cultivo con una cámara reflex (Canon Rebel T3i) y posteriormente en cada una de estas imágenes se seleccionó una región de interés (ROI) de 250x250 píxeles. La elección de las ROI se realizó con base en la interpretación del observador, eligiendo una región con menores alteraciones de iluminación y defectos en la superficie del matraz. El procesamiento de las imágenes resultantes incluyó la separación de las bandas rojo, verde, azul y la banda de intensidad (R, G, B, I), así como el cálculo del promedio de píxeles por columna de cada banda y el promedio por banda. Con lo anterior se determinaron correlaciones entre la concentración de las microalgas y los promedios por banda. Como resultado se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.66, por lo que el rendimiento del

procedimiento implementado para relacionar los niveles digitales extraídos de las ROI con la densidad celular del cultivo de *N. oculata* fue moderado. Logrando una correlación favorable para estimar el conteo celular del cultivo de *N. oculata* por medio del tratamiento digital.

**Palabra(s) Clave:** Densidad celular, Microalgas, Procesamiento de imágenes, Regresión lineal.

### **Abstract**

*The use of techniques of digital image processing was determined experimentally to calculate the cell density (cel mL<sup>-1</sup>) of Nannochloropsis oculata microalgae in semi-controlled environment. This will allow make timely decisions in the monitoring of cultivation of aquatic organisms. Using a conventional microscope (Carl Zeiss-Primo Star) three daily cell counts were performing for a period of 12 days and photographs were taken to the Erlenmeyer flasks with a digital reflex camera (Canon Rebel T3i) and later on each of these images, a region of interest (ROI) of 250x250 pixels was selected. The choice of this ROI was made based on the interpretation of the user, selecting a ROI with lower illumination alterations and defects in the flask's surface. The digital image processing included the separation of the red, green, blue and intensity bands (R, G, B and I) as well as the calculation of the average of pixels per column of each band and the average per band. As result was obtained a coefficient of determination of 0.66 so the performance of the implemented method for link the digital levels extracted from the ROI with the cell density of *N. oculata* was moderate, obtaining a favorable correlation to estimate the cellular count of the cultivation *N. oculata* through of digital processing..*

**Keywords:** Cell density, Image processing, Linear regression, Microalgae.

## **1. Introducción**

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO, 2003] menciona que la acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos e implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción. En México la acuicultura es una de las actividades que ha desarrollado mayor potencial

en los últimos años, generando beneficios económicos y sociales para cubrir una parte de la alimentación de la población con un alto valor nutricional y de bajo costo [Martínez, 2009]. La FAO [2005] menciona que estudios realizados por el Instituto Nacional de la Pesca (INAPESCA) muestran que, en México, del total de las pesquerías evaluadas un 27% se encuentra en deterioro, un 53% en un máximo aprovechamiento y un 20% tiene posibilidades de aumento de la producción. Tomando en cuenta los aspectos anteriores, la acuicultura representa una alternativa real para ampliar la oferta alimentaria en el país, contribuyendo a la seguridad alimentaria, generación de divisas y creación de fuentes permanentes de empleo, estimulando el desarrollo regional. La acuicultura participa en la producción pesquera nacional con poco más de 15.83% de la producción nacional [INIFAP, 2005].

En México actualmente se cultivan 61 especies marinas de forma comercial como moluscos, peces y crustáceos, las cuales requieren alimentarse de fitoplancton (conocido como microalgas) durante toda su vida o en una etapa específica, por lo que su rol en el cultivo de las especies antes mencionadas es muy importante. Si bien existen una gran variedad de microalgas que se cultivan rutinariamente para ser usadas como alimento, estas también pueden tener otros usos, tal como la producción de combustibles.

En la acuicultura, se han domesticado diferentes especies, entre las cuales, *Isochrysis galbana* y *Nanochloropsis oculata* son sólo dos ejemplos de amplio uso, ya que representan un importante soporte trófico tanto cualitativamente como cuantitativamente [Cañavate, 2011].

Por otra parte, el campo del tratamiento digital de imágenes está en continua evolución. Durante los últimos años ha aumentado significativamente el interés en la morfología de imágenes, redes neuronales, el procesamiento de imágenes a color, la comprensión y reconocimiento de imágenes y los sistemas inteligentes de análisis de imágenes [González y Woods, 1996]. La presente investigación deriva del interés por aplicar técnicas de tratamiento de imágenes para la evaluación de cultivos de microalgas, en particular para estimar la densidad de células en un medio controlado.

## **2. Métodos**

El desarrollo experimental de este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) de La Paz, BCS. En donde se prepararon las muestras del cultivo mediante cuantificación celular por medio de un microscopio convencional marca Carl Zeiss-Primo Star ZES-415500-0051-000 realizando tres conteos para cada cultivo, con un total de 6 corridas diarias del 18 al 30 de junio de 2018. Posteriormente se tomaron las evidencias fotográficas al matraz del cultivo de la microalga *Nannochloropsis oculata* por medio de una cámara réflex (Canon Rebel T3i 1100D). El matraz utilizado fue un matraz Erlenmeyer de 2L y el área en donde se asentaban los cultivos fueron monitoreados bajo un control flexible de ambientación (humedad, temperatura e luminosidad) durante un periodo de doce días. Las fotografías tomadas al matraz con el cultivo de la microalga *N. oculata* se capturaron en un plano frontal a una distancia aproximada de un metro, con una resolución de 10Mp y con un enfoque hacia un ángulo de 90° con respecto al eje del objetivo, teniendo un margen abierto hasta 120° según lo descrito por Rodríguez *et al.*, [2005]. Estas fotografías se obtuvieron bajo cinco modos de disparo con los que dispone la cámara (automático, programado, AV, TV y manual).

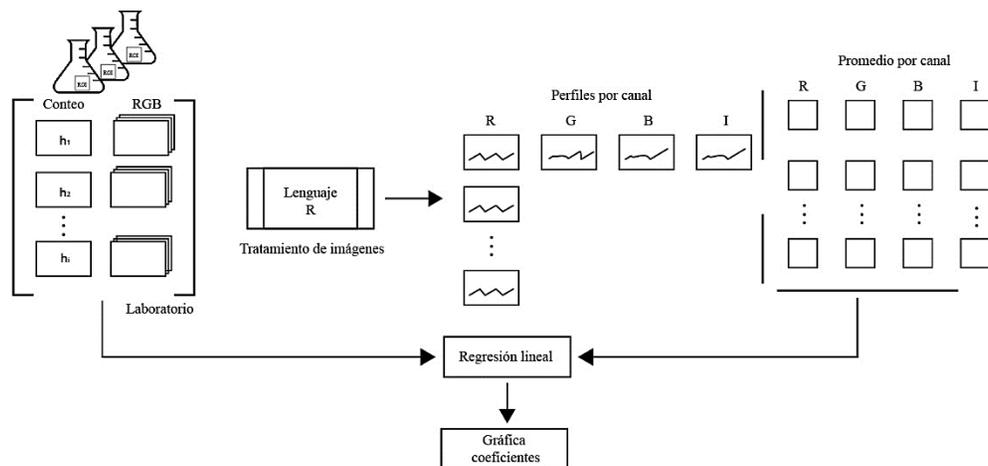
Posteriormente, en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN), las imágenes fueron preparadas para su procesamiento y análisis, eligiendo la muestra con el modo de disparo "programado" de la cámara para cada especie de microalga, con lo que se obtuvieron 24 imágenes. Éstas se sometieron a un análisis visual para seleccionar una región de interés (ROI) representativa de cada fotografía. La metodología utilizada para la implementación del procedimiento digital y facilitar la evaluación de las ROI fue propuesta en un trabajo previo por Mendoza-Manzano [2009], la cual se divide en cinco fases:

- Fase 1. Análisis y especificación del algoritmo.
- Fase 2. Diseño conceptual.
- Fase 3. Implementación paralela.
- Fase 4. Integración de componentes.

- Fase 5. Evaluación del algoritmo.

Sin embargo, para la implementación de este procedimiento sólo se consideró la fase 1, la fase 2 y la fase 5, ya que en este trabajo no se consideran modificaciones de componentes físicos para mejorar la captura o análisis de las ROI. La elección de las ROI (250x250 píxeles) se realizó con base en la interpretación del observador considerando el nivel de ruido (áreas con iluminación excesiva o pobre, ralladuras de la superficie del matraz, efectos de la reflexión de la luz en el matraz de interés), eligiendo una región con menor influencia de estos efectos. Las ROI fueron procesadas utilizando el lenguaje de programación R para extraer los perfiles en cada canal (R, G, B, I) de la imagen. Se calculó el promedio de los píxeles columna de cada canal, así como los niveles digitales promedio por banda. Posteriormente, con el promedio de los niveles digitales de cada perfil se obtuvo un valor único de referencia para cada imagen generada.

El coeficiente de determinación fue de 0.66 utilizando los promedios de la banda verde y 0.63 para los promedios de la banda roja. Para convertir las bandas R, G, B, a la banda de intensidad se utilizó la función *grayscale* del paquete “*imager*” para el lenguaje de programación R. La metodología general se integra en un diagrama conceptual mostrado en la figura 1, que incluye el conteo celular, selección de las ROI, tratamiento de las imágenes, aplicación de regresión lineal, en la cual se muestran los procedimientos en cada etapa implementada en este trabajo.



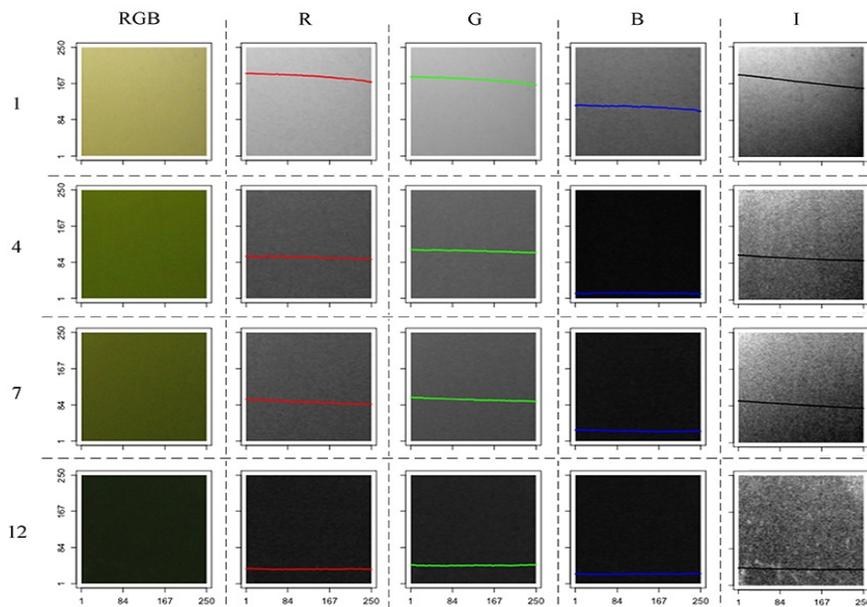
Fuente: Elaboración propia.

Figura 1 Diagrama metodológico general.

Estas incluyen la toma de las fotografías al matraz del cultivo, la extracción de la ROI, cálculo de los perfiles (promedio de píxeles-columna) para cada canal (RGB) e intensidad (I), promedio por canal (RGB, I) y regresión entre estos últimos (niveles digitales) y el conteo del cultivo (cel mL<sup>-1</sup>) realizado en el laboratorio.

### 3. Resultados

El tratamiento de cada una de las imágenes permitió realizar un pronóstico relacionado con su nivel digital promedio (NDP) y la fecha en la que fue tomada la fotografía del cultivo, tratamiento que demuestra que, a un mayor número de días del cultivo, el NDP tiene a decrecer. El análisis de este desempeño permitió integrar un factor inverso al del comportamiento anterior y relacionarlo con el conteo directo del cultivo. En la figura 2 se muestra una secuencia de 4 de las 12 ROI procesadas. Las ROIs corresponden a los días 1, 4, 7 y 12 del cultivo.



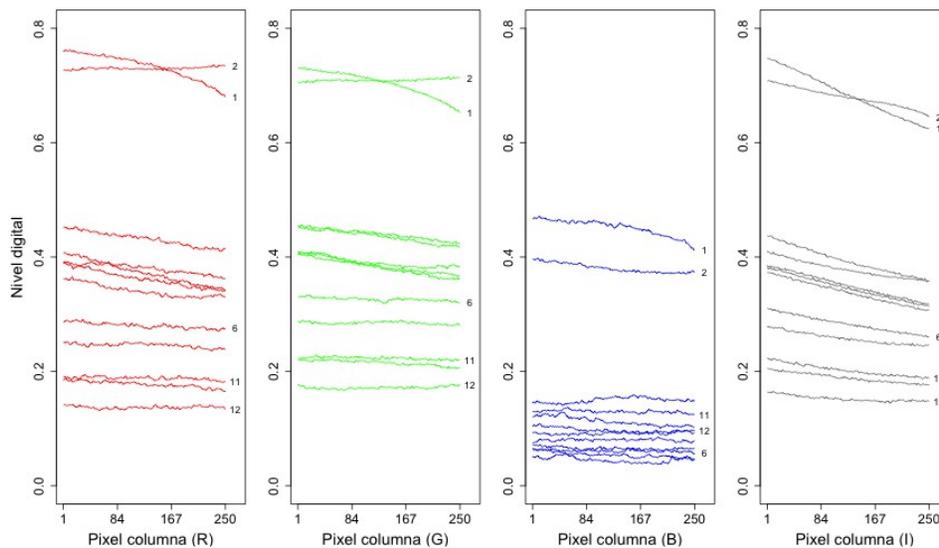
Fuente: Elaboración propia.

Figura 2 Representación gráfica de las ROI y su descomposición R, G, B e I con los perfiles del nivel digital promedio (NDP).

En la primera columna se han dispuesto las ROI (R, G, B) originales y en las subsecuentes, cada banda (R, G, B por separado y la banda de intensidad) con sus correspondientes perfiles de nivel digital promedio (NDP). Se observa que los

niveles digitales (ND) bajan (las bandas van tornándose más oscuras) conforme aumenta la densidad de células por mililitro del cultivo dentro del matraz. El NDP disminuye de 100% el primer día, hasta el 24% aproximadamente el último día del conteo, con respecto al primer día.

La tendencia decreciente del ND en el rango de 0 a 1 para cada pixel-columna de los perfiles generados es evidente para las bandas R, G y para la banda de intensidad (I). Sin embargo, la tasa de disminución es muy distinta en la banda B (figura 3) y no genera una relación directa con el comportamiento esperado, por lo que no se considera esta banda en la regresión.



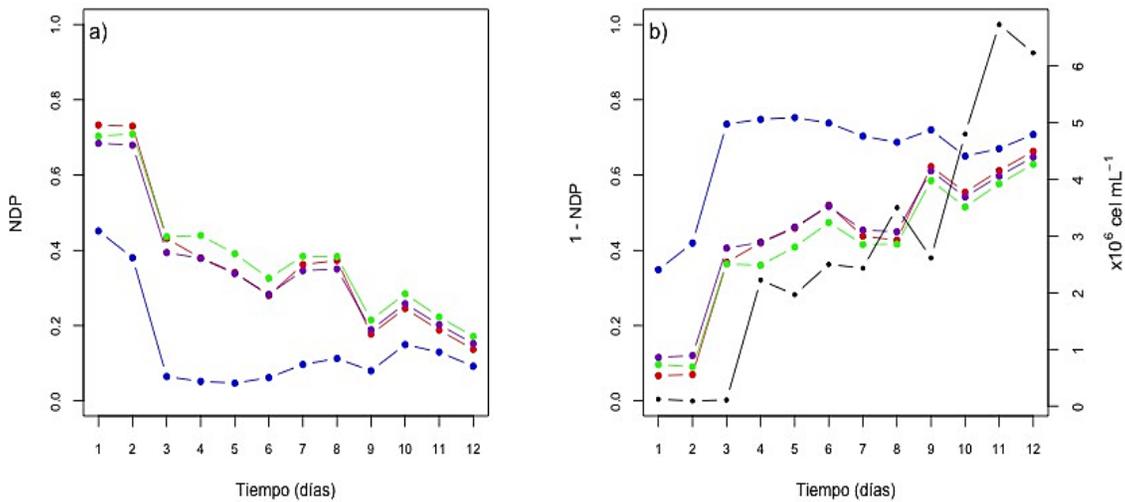
Fuente: Elaboración propia.

Figura 3 Variación de los perfiles del ND en el transcurso de los doce días del cultivo para las bandas R, G, B e I.

El NDP de los perfiles R, G e I decaen en la misma proporción en el transcurso de los días de cultivo y genera una vinculación directa con el conteo del cultivo realizado en el laboratorio al realizar la función inversa del NDP. Estas bandas (R, G, I) tienen comportamiento ascendente del día 6 al 8 y del 9 al 10 debido a las características del cultivo y de la imagen (mayor concentración en el cultivo, menores ND en estas bandas). La banda B tiene un comportamiento ascendente a partir del tercer día, a excepción del día 9, 11 y 12. La banda I, se incorpora como referencia tomando en cuenta el valor de la intensidad, método utilizado por

[Córdoba M., et al., 2010] el cual refleja un comportamiento muy similar al de las bandas R, G.

En la figura 4 se observan las gráficas con la variación de los promedios de las bandas R, G, B e I en el transcurso de los días de cultivo (figura 4a) y el resultado del inverso del ND en las mismas bandas (figura 4b) y el conteo en laboratorio, marcado con la línea en negro.

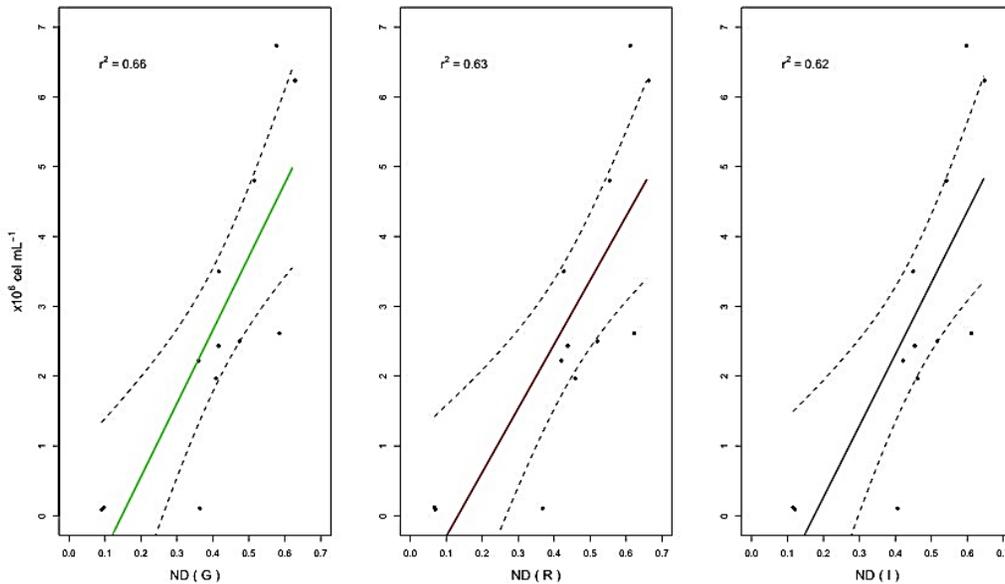


Fuente: Elaboración propia.

Figura 4 Variación de los promedios de las bandas R, G, B e I, y del Inverso del ND.

Los ND que se obtuvieron de las bandas se relacionaron con el conteo de las microalgas mediante una regresión lineal, para así determinar la correlación que existen entre ambos datos. Los coeficientes de la correlación lineal mostrados en la figura 5 corresponden a cada uno de los perfiles digitales (R, G, I) que mejor nivel de confianza consiguieron tomando en cuenta la relación entre el ND y el conteo del cultivo. De tal manera que el coeficiente de determinación de la banda verde muestra una relación más fuerte y se vincula linealmente entre ambas variables.

El tratamiento de imágenes propuesto aplicado a las ROI del cultivo de *Nannochloropsis oculata* demostró ser efectivo para apoyar el conteo específico de la densidad celular en el matraz. El coeficiente de determinación fue moderado (0.66, 0.63, 0.62 para los ND verde, rojo y de intensidad respectivamente), incorporando parámetros de correlación con la maduración del cultivo y el NDP.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 5 Correlación lineal entre los ND (R, G, I) y el conteo del cultivo en el laboratorio.

#### 4. Discusión

Los perfiles generados mediante el tratamiento de las ROI obtenidas para el cultivo de *Isochrysis galbana* no consiguieron la misma tendencia que los perfiles obtenidos del cultivo de la microalga *Nannochloropsis oculata*. Las gráficas del ND respecto a los días de cultivo de *I. galbana* no muestran una tendencia clara en comparación con los resultados de los perfiles de la microalga *N. oculata* los cuales tienen una evidente tendencia decreciente. Aunque ambos cultivos estuvieron sometidos al mismo control ambientación, no tuvieron el mismo comportamiento, esto se debe a que las imágenes originales del cultivo no se obtuvieron en condiciones de luminosidad, controladas estrictamente, además el ángulo de disparo de la cámara tuvo variaciones entre la toma de una muestra y otra, y por la coloración específica de cada especie se obtuvieron perfiles de ND de cada especie muy diferentes entre una microalga y otra, Estas situaciones incorporaron un alto nivel de ruido en las fotografías, lo que impidió obtener coeficientes de correlación aceptables para vincular el ND y el conteo celular del cultivo de la microalga *I. galbana*.

Otro factor que afectó el cultivo de *I. galbana* fue el uso (en la fase inicial del cultivo) de un inóculo diferente al que normalmente se usa para cultivar estos

microorganismos. Además, la demanda de estas microalgas para atender actividades comerciales o internas afectó el volumen original del matraz del cultivo. Para correlacionar los ND con el conteo específico de cada especie se puede lograr mediante la elección de las bandas R, G e I ya que tienen un comportamiento similar (decreciente) conforme transcurre el tiempo de cultivo. El tratamiento de imágenes aplicado a las ROI del cultivo *N. oculata* propuesto en este trabajo demostró ser efectivo para apoyar el conteo específico de la densidad celular en el matraz de esta especie mostrando un comportamiento cuasilineal, el cual puede ser directamente relacionado con el conteo del cultivo y utilizado por medio de una función inversa para estimar la densidad de células (cel mL<sup>-1</sup>) mediante el procedimiento propuesto. En la fase inicial de este trabajo, las condiciones ambientales no estuvieron bajo un régimen de control estricto. Por lo que este método no se adecuó correctamente a las características del cultivo de la microalga *I. galbana*. Esto ocasionó que las variaciones de los ND fueran erráticas durante los días de cultivo, teniendo una efectividad poco confiable para esta especie. Se pretende realizar corridas adicionales (conteo en laboratorio y adquisición de nuevos conjuntos de fotografías), bajo condiciones controladas para efectuar más evaluaciones de este procedimiento con la finalidad de determinar el grado en que el nivel de ruido en la imagen afecta la correlación entre los ND y el conteo.

En esta primera fase de experimentación se logró crear un método capaz de estimar con un nivel de confianza moderado ( $R^2=0.66$ ) la cantidad de células por ml en el cultivo de la especie de *N. oculata*. Se espera que, en futuras corridas experimentales contempladas para realizarse durante el presente año, se apliquen regímenes más estrictos para los parámetros de ambientación y con ello poder hacer más eficiente (que el ND de las ROIs tenga una tendencia decreciente conforme pasan los días del cultivo) el procedimiento para *N. oculata*, así como adecuarlo para utilizarlo eficazmente con la especie de microalga *I. galbana*.

## **5. Bibliografía y Referencias**

- [1] González R. y Woods R. (1996). Tratamiento Digital de Imágenes. Addison. Massachusetts, EUA.

- [2] Canavate-Hors, J. (2011). Funciones microalgas en acuicultura. 193-205.
- [3] Córdoba-Matson M, Gutiérrez J, Porta-Gándara M (2010). Evaluation of Isochrysis galbana (clone T-ISO) cell numbers by digital image analysis of colour intensity. *J Appl Phycol* 22: 427-434
- [4] Martínez-Córdova L. R, Martínez-Porchas M, Cortés-Jacinto E (2009). Camaronicultura mexicana y mundial: ¿Actividad sustentable o industria contaminante? *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 25: 181-196.
- [5] Mendoza, M. A. (2009). Procesamiento y análisis digital de imágenes mediante dispositivos lógicos programables. Tesis de Grado no publicada. Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México.
- [6] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. [FAO]. (2003). Aquaculture topics and activities. Acuicultura. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO: <http://www.fao.org/fishery/>.
- [7] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. [FAO]. (2005). Visión General del Sector Acuícola Nacional. D.F., México: Editorial: [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_mexico/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/es).
- [8] Rodríguez E., Gamboa M., Hernández F. y García J. (2005). Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio. San José, Costa Rica.