

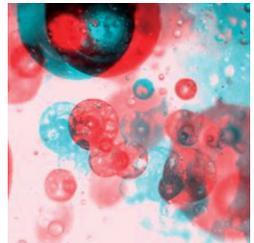
Viaje al interior de un biorreactor, imágenes y análisis

Gabriel Corkidi Blanco

Cuando tenía diez años, recuerdo haber visto una película que se llamaba *Viaje Fantástico*. Se trataba de una misión cuyo objetivo era salvarle la vida a un importante personaje, al cual se le había formado un coágulo en el cerebro. Así, una nave con cuatro tripulantes fueron miniaturizados para poder ser inyectados con una jeringa al torrente sanguíneo del personaje. Recuerdo que la nave viajaba entre glóbulos rojos y blancos, librando la barrera hemoencefálica, hasta llegar al coágulo que disolvieron con un rayo láser (los láseres eran entonces de ciencia-ficción).

Cuarenta años después me encuentro haciendo investigación en un tema llamado “visión por computadora”. Una de mis misiones es filmar y analizar burbujas de aire y gotas de aceite micrométricas que se generan en un tanque cuyo contenido se agita a altas velocidades mediante dispositivos llamados impulsores. A esta actividad me invitó a participar el Dr. Enrique Galindo, a quien le interesa entender cómo se generan y dispersan estas estructuras dentro del tanque. Este tanque se

llama biorreactor. En él se pueden cultivar microbios, incluyendo un hongo que produce sustancias que tienen importantes aplicaciones en la agricultura y en la industria farmacéutica y de alimentos. En la agricultura, los compuestos producidos por este hongo pueden usarse como fungicida biológico (no contaminante); en la industria farmacéutica, como antibiótico, y en la de alimentos como aromas frutales (de coco y durazno). Por esta razón, es muy importante poder producir a gran escala este hongo llamado *Trichoderma harzianum*.¹ Para producirlo, se necesita una especie de licuadora que agita constantemente la mezcla de nutrientes que deben llegar al hongo para reproducirse. Esta “licuadora” debe tener características muy especiales para poder controlar de manera óptima los factores que intervienen en el crecimiento del hongo. Uno de estos factores es el tamaño de las burbujas de aire que proveen de oxígeno al hongo, así como el tamaño de las gotas de aceite de ricino que lo proveen de nutrientes. Mientras más pequeña sea la gota y la burbuja, más eficiente será la transferencia



¹ E. Galindo, C. Peña y L. Serrano, “Domesticando microorganismos en un biorreactor: los retos del bioingeniero”, en Rebolledo y López-Munguía (eds.), *25 años del Instituto de Biotecnología*, México, UNAM, 2007.

de oxígeno y nutrientes, y por lo tanto, la reproducción del hongo. El tamaño de estas gotas y burbujas depende en gran medida del tipo de agitación producida (velocidad, forma de impulsores que agitan la mezcla, etc.).

El viaje al interior del biorreactor para filmar y analizar los eventos micrométricos que ocurren puede lograrse usando técnicas de visión por computadora, una rama de la inteligencia artificial que tiene por objetivo modelar matemáticamente los procesos de percepción visual en los seres vivos y generar programas que permitan simular por computadora estas capacidades visuales.² Desde sus inicios, la visión por computadora ha inspirado sus desarrollos en el estudio del sistema visual humano, el cual sugiere la existencia de diferentes tipos de tratamiento de la información visual dependiendo de metas u objetivos específicos; es decir, la información visual percibida es procesada en distintas formas con base en las características particulares de la tarea a realizar, por lo tanto, la visión por computadora propone varias técnicas que permiten obtener una representación del mundo a partir del análisis de imágenes obtenidas desde sensores de video. Sus antecedentes se remontan a los años veinte, cuando se mejoró la calidad de las imágenes digitalizadas de los periódicos, enviadas por cable submarino entre Londres y Nueva York.

De manera general, el proceso de visión por computadora puede subdividirse en cinco áreas principales. a) Adquisición: proceso de obtención digital de una imagen visual. b) Preprocesamiento: técnicas de reducción de ruido y enriquecimiento de detalles en la imagen. c) Segmentación: división de una imagen en objetos de interés y fondo. d) Descripción y reconocimiento: análisis de características útiles para diferenciar un tipo de objeto de otro y el proceso que identifica esos objetos. e) Interpretación: asigna un significado a un conjunto de

objetos reconocidos. A continuación se describe cómo se aplicaron algunos de los principales procesos de visión por computadora en nuestro viaje al interior del biorreactor.

Adquisición.

Esta etapa del proceso de visión por computadora es crucial ya que según la calidad de imágenes que logre obtenerse, las posibilidades de procesarlas de manera automática y de extraerles más información serán mayores. Al filmar gotas y burbujas, la adquisición de imágenes tiene retos especiales. De entrada podemos percibir dos complicaciones principales, una ligada al tamaño de los objetos que queremos medir (entre 100 y 500 micras), y otra a la alta velocidad a la que se están moviendo (el agitador del biorreactor gira a velocidades entre 200 y 500 revoluciones por minuto). Existe un tercer reto, tal vez el más complejo. Hay que recordar que las gotas y burbujas son objetos tridimensionales que además se mueven en trayectorias tridimensionales, por lo que, en el proceso de adquisición, se debe contemplar poder capturar esta información que permita posteriormente su procesamiento en tres dimensiones.

Para poder observar y filmar los eventos que ocurren dentro del biorreactor, lo primero que se hizo fue construir un modelo de tanque a escala en vidrio para poder observar a través de las paredes transparentes. Instalamos cerca de la pared del tanque un microscopio especial, llamado *estereomicroscopio*. La primera vez que acercamos el estereomicroscopio al biorreactor, no pudimos observar absolutamente nada. Era obvio que de entrada hacía falta luz para iluminar la escena que queríamos filmar. Pusimos focos muy potentes, pero las gotas y burbujas pasaban tan rápido frente a la lente, que lo único que se podía observar era una gran

² González, R. C. y R. E. Woods, *Digital Image Processing*, Addison-Wesley, 1993.

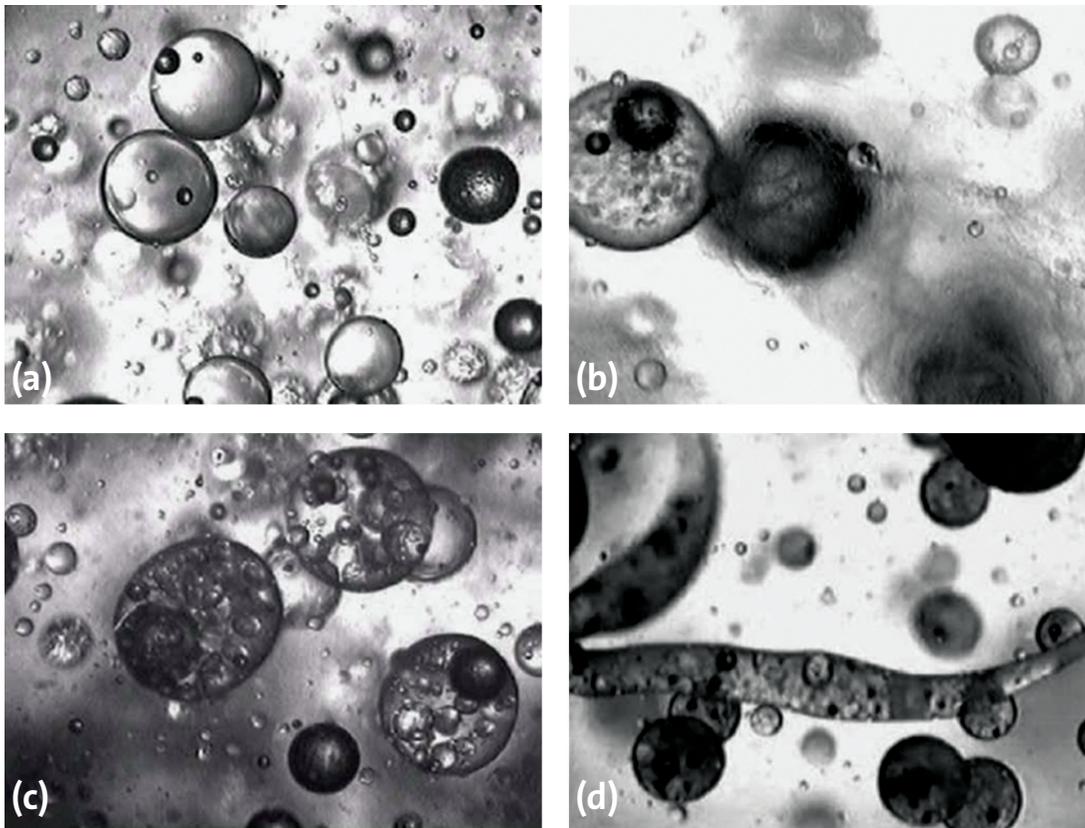


Figura 1.
Imágenes típicas de alta calidad (2 dimensiones) obtenidas con el sistema descrito: a) Gotas de aceite con superficie lisa, burbujas de aire libres y burbujas atrapadas en aceite. b) Interacción del micelio con gotas y burbujas. c) Estructuras complejas representativas de dispersiones múltiples. d) Estructuras no esféricas.

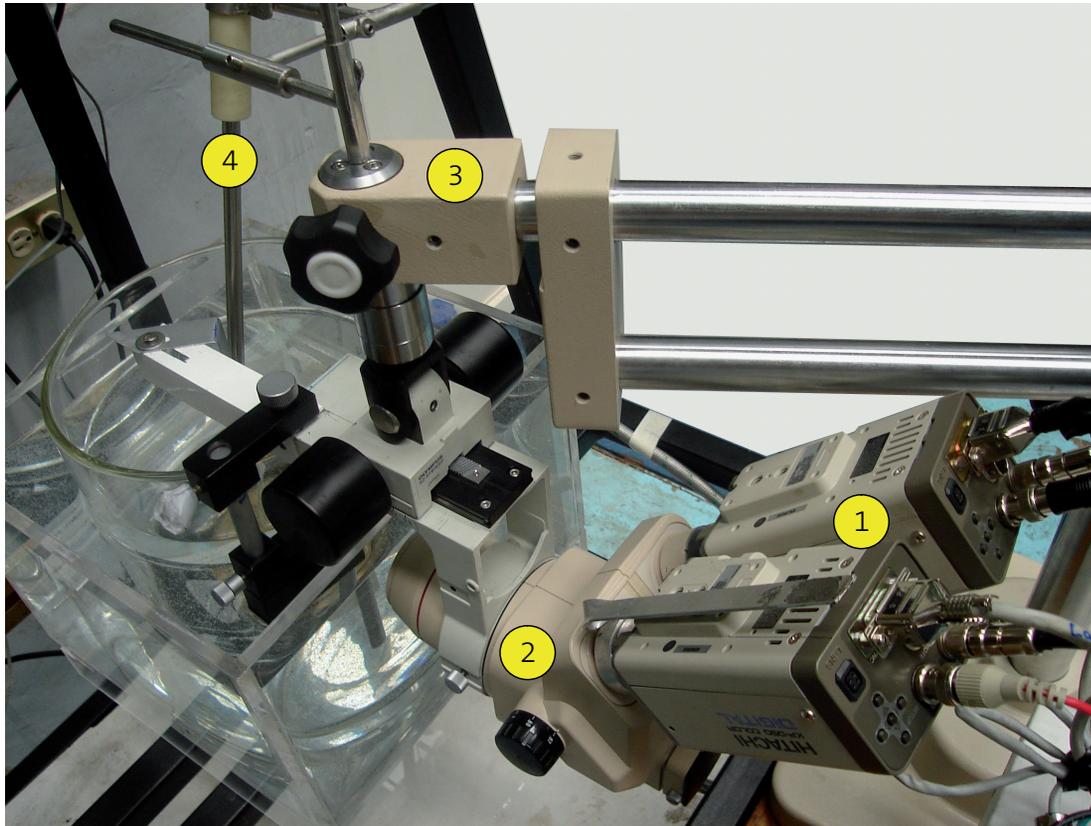


Figura 2. Sistema de adquisición de imágenes en 3 dimensiones, configuración para analizar zonas cercanas a la pared del tanque. 1) Adaptación a 2 cámaras de TV para análisis en 3D. 2) Estereomicroscopio. 3) Soporte. 4) Guía de luz de fibra óptica proveniente del estroboscopio.

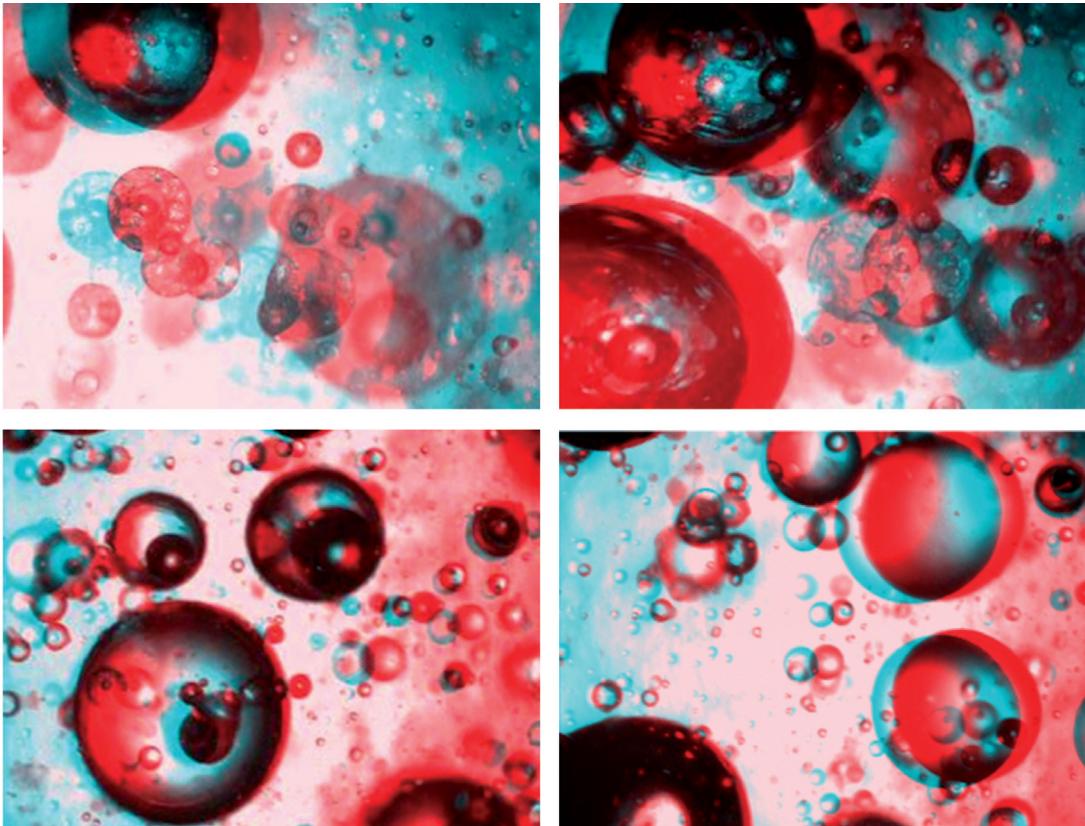


Figura 3.
Imágenes estereoscópicas adquiridas. El efecto tridimensional se muestra al verse con lentes estereoscópicas.

mancha gris. Entonces, instalamos una cámara de televisión en una entrada del microscopio, y además sumergimos en el líquido una guía de luz de fibra óptica que colocamos justo enfrente de la lente del microscopio para poder iluminar los objetos que pasaban entre esta guía y la lente. Empezamos a ver cosas que aparecían en la pantalla del monitor, pero estos objetos aparecían movidos, es decir, borrosos y deformados, como una foto de un coche a alta velocidad. Entonces, en vez de los focos potentes, conectamos un estroboscopio que emite ráfagas de luz *flash* muy potentes, pero de duración ultra corta (unos 9 microsegundos), por lo que la escena se iluminó en períodos tan cortos que se lograba congelar las imágenes de las gotas y burbujas que se movían a altas velocidades (como en las discotecas, cuando la imagen de las personas parece congelarse por instantes, a pesar de que están moviéndose rápidamente).

Con este equipo logramos por fin adquirir y observar imágenes muy impresionantes de los fenómenos que estaban ocurriendo dentro del tanque. En la **figura 1** podemos ver gotas de aceite (semi-transparentes) y burbujas de aire (en color negro). La primera pregunta fue: ¿por qué las burbujas se ven negras? La respuesta tiene que ver con la diferencia de índices de refracción entre el agua y el aire, que es mucho mayor que entre el aire y el aceite. Los rayos de luz se refractan mucho más entre la interfaz agua-aire, provocando este efecto.

En la imagen de la figura 1c podemos observar otros fenómenos muy interesantes, como pequeñas gotas o burbujas que aparecen aparentemente en el interior de las gotas de aceite. ¿Por qué es interesante este fenómeno? Estas gotas son las que proveen de nutrientes al hongo que queremos cultivar. La superficie externa de la gota es la que se pone en contacto con el hongo para transferirle los nutrientes, por lo que el tamaño de esta superficie estará relacionado con la eficiencia de esta transferencia. Asimismo, las burbujas que se encuentran dentro del aceite, no podrán transferir oxígeno al cultivo por estar capturadas en el interior del aceite.

Pero, ¿cómo podemos estar seguros que este fenómeno es real y no se trata de una ilusión óptica? Al observar estas imágenes, uno puede preguntarse si lo que se ve adentro realmente lo está, o se trata de una superposición de planos focales; en otras palabras, ¿cómo podemos realmente saber si estas aparentes gotas están adentro, adelante o atrás de la gota de aceite? Para entender mejor este problema, uno puede hacer una prueba cerrando un ojo y estirando los dos brazos lateralmente, y luego tratar de unir los dedos índice de cada mano, moviendo los brazos rápidamente. Seguramente las puntas de los dedos no alcanzaron a tocarse en varias ocasiones. Hacerlo con los dos ojos prueba que un solo ojo no puede percibir con precisión la información de posición tridimensional de lo que nos rodea. La confusión que puede provocar este aspecto en los cálculos de transferencia de nutrientes, si no se toma en cuenta la información de la posición tridimensional de gotas y burbujas, nos puede llevar sin duda a resultados radicalmente diferentes en cuanto a las hipótesis que se han planteado. Por estas razones, llegamos a la conclusión de la necesidad de poder adquirir la información tridimensional de la posición espacial de las gotas y burbujas, de manera que sea posible analizar con certeza su posición en el espacio.

Para lograr esto, decidimos aprovechar características especiales que nos brinda el estereomicroscopio. Este aparato permite observar objetos desde dos ángulos de vista diferentes, así como los ojos observan un mismo objeto desde dos puntos de vista espacialmente diferentes. Esto permite, por triangulación, tener la información de la profundidad a la que se encuentra cada punto que forman cada gota y cada burbuja (y por lo tanto su ubicación en el espacio tridimensional en que se mueven).

Puesto que los estereomicroscopios no vienen equipados para poder instalar dos cámaras de TV, realizamos algunas modificaciones de tipo mecánico (**figura 2**), que nos permitieron instalar una cámara de TV en cada ocular del microscopio, y así poder adquirir pares de imágenes estereoscópicas,

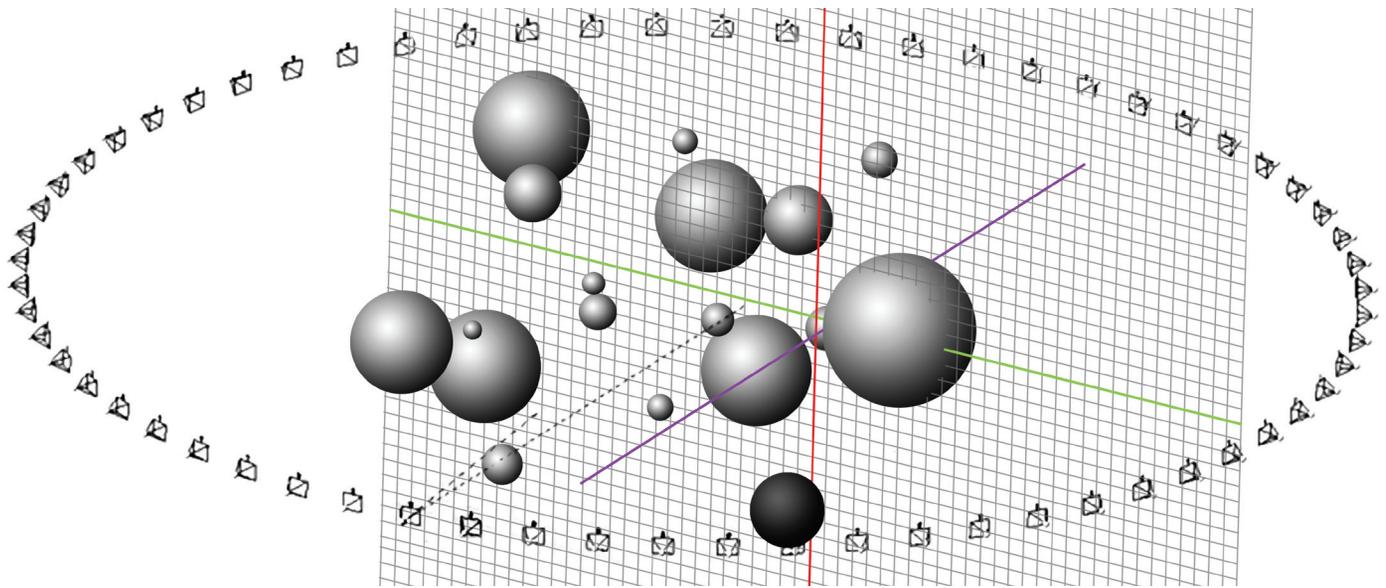


Figura 4.
Reconstrucción tridimensional de una escena de gotas y burbujas a partir de los datos obtenidos de los pares estereoscópicos. Este modelo puede girar 360 grados y mostrar en detalle la posición relativa entre gotas y burbujas.

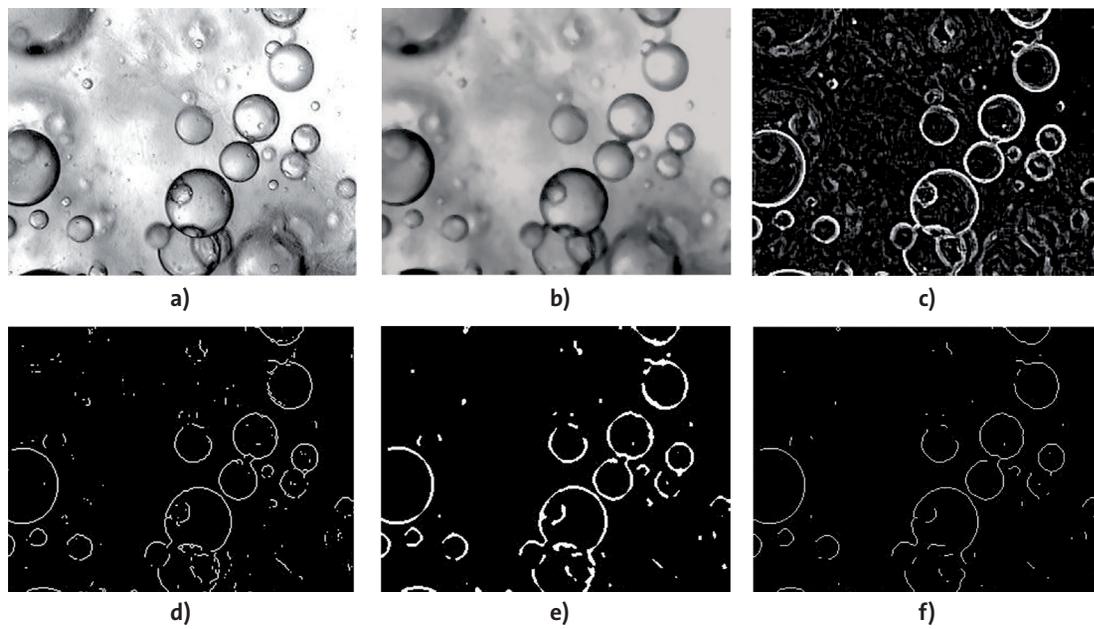


Figura 5. Proceso de filtrado para el mejoramiento de la segmentación. a) Imagen original. b) Filtro *flatten* aplicado a la imagen de la figura 5a para homogeneizar el fondo. c) Convolución de la figura 5b con un kernel *well* para detectar la mayor cantidad de bordes. d) Adelgazamiento de la figura 5c. e) Dilatación de la figura 5d. f) Adelgazamiento de la figura 5e, imagen binaria resultante reducida en artefactos.

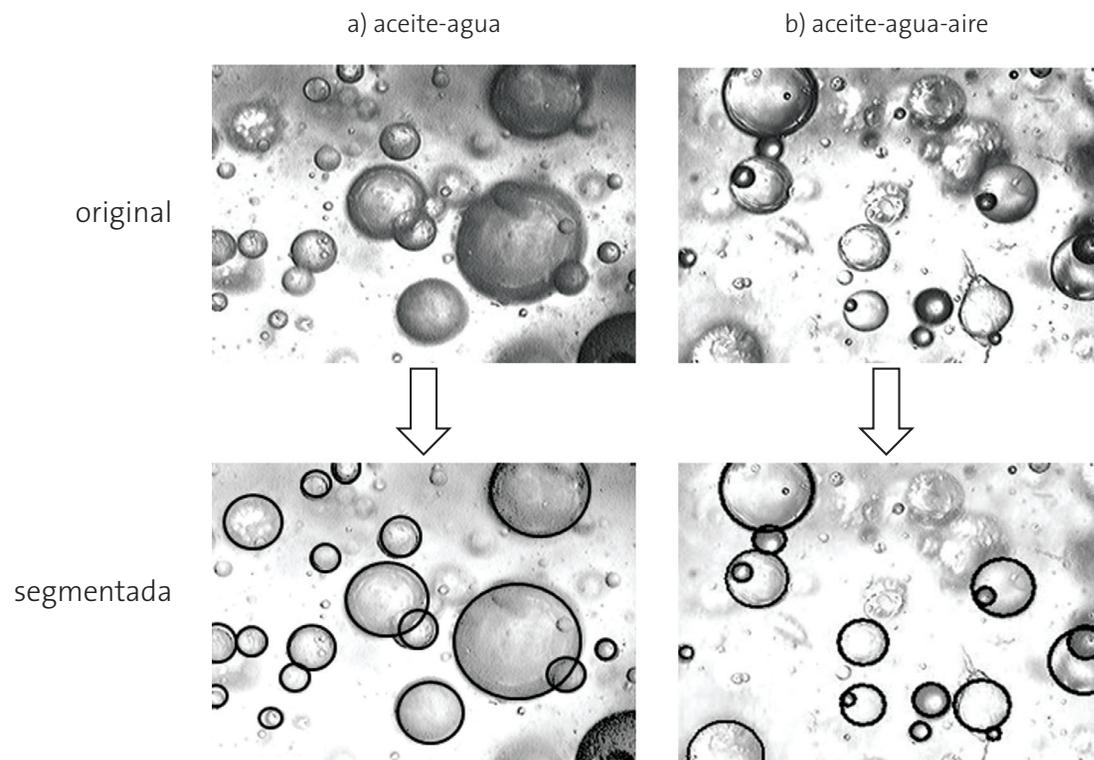


Figura 6. Ejemplos de imágenes adquiridas y segmentadas: a) gotas de aceite en agua y b) gotas de aceite y burbujas de aire en agua.

como las que se muestran en la **figura 3**. Si se observan estas imágenes con lentes estereoscópicos (un lado rojo y el otro cyan —mezcla de verde y azul), podrá apreciarse cómo ciertas microgotas que aparentemente se encuentran dentro de las gotas de aceite no lo están y viceversa. Claro que sería impráctico y muy cansado usar estos lentes para analizar estas imágenes, pero lo importante es que con esta información tridimensional, podemos ya entrenar a la computadora para que realice estos cálculos de manera automática, sin tener que usar los lentes, como se muestra en la **figura 4**.

Con esto, el problema de adquisición está resuelto y podemos pasar a la siguiente etapa del proceso.

Preprocesamiento y segmentación.

Puesto que queremos que la computadora haga la mayor parte del trabajo tedioso y repetitivo (como contar y medir tamaños de gotas y burbujas), es necesario proveerla con la información adecuada para realizar los procesos de manera automatizada. Una imagen digital contiene muchísima información; de hecho, el problema principal del análisis automático es quitarle a una imagen “lo que le sobra”, como afirmara el gran Miguel Ángel sobre la escultura: “la obra está incluida en la piedra, sólo hay que quitarle lo que sobra”. Parte de este proceso lo realiza el preprocesamiento de la imagen, que consiste en aplicar diversos filtros digitales cuya tarea es eliminar la información de la imagen que no sólo no se requiere, sino que produciría resultados imprecisos. Claro que el riesgo de filtrar una imagen es quitarle “de más”, dejando tal vez sin brazos a una famosa escultura. Por ejemplo, la figura 5 muestra una serie de procesos que se le aplican a la imagen original, con el fin de extraer la parte de información más útil para automatizar el proceso

de segmentación, a partir del cual los elementos de interés pueden ser posteriormente analizados individualmente para determinar sus características de forma, tamaño, color, etc. Un buen preproceso y una buena segmentación lograrán una detección eficiente de los elementos de interés, en este caso gotas y burbujas, y permitirá eliminar de manera relativamente más sencilla todos los artefactos o basuras que aparecen en la imagen, causantes de medidas erróneas.

La **figura 5f** muestra la imagen original esculpida hasta dejar los elementos que nos servirán para detectar gotas y burbujas, en este caso, segmentos de arco de pocos *pixeles* (y por lo mismo, más fáciles de procesar), a partir de los cuales podemos suponer que circunscriben a una circunferencia perteneciente a una probable gota o burbuja. De lo que se trata ahora, es de completar o resanar nuestra escultura, la cual fue devastada por los filtros digitales. Claro que si hubiéramos filtrado de manera menos severa la imagen, habría mayores desventajas que provocarían la sobre-detección de falsas gotas y burbujas, introduciendo imprecisión importante en el proceso de análisis.

El proceso que aplicamos para resanar los segmentos de arco con el fin de completar la circunferencia de la gota o burbuja que circunscriben es conocido como “la transformada de Hough”.³ La idea básica es mapear los *pixeles* de los segmentos detectados hacia un espacio transformado definido, de tal manera que los *pixeles* pertenecientes a la curva o borde de interés se proyecten sobre un mismo punto en ese espacio. Si en la imagen hay presentes muchos *pixeles* que pertenecen todos a la misma curva, ellos darán origen a un pico en el espacio de Hough. La transformada de Hough es utilizada para la detección de los contornos de las burbujas por medio de la búsqueda de sus circunferencias.

³ Hough, P. V. C., *Methods and means for recognizing complex patterns*, EUA, Patente 3069654, 1962.

La **figura 6** muestra algunos resultados obtenidos de segmentación automática. Los contornos detectados de gotas y burbujas están superpuestos a la imagen original para poder verificar la validez de la segmentación. Cabe mencionar que una vez detectadas estas circunferencias, la computadora puede calcular de manera muy sencilla los diámetros de cada elemento para poder graficar su distribución en un experimento dado e inferir la eficiencia en la transferencia de nutrientes y oxígeno al cultivo, y por lo tanto, la eficiencia en la producción del mismo.

Descripción, reconocimiento e interpretación.

Sin pretender entrar en mucho detalle en estas últimas etapas del proceso de análisis de la imagen, nos limitaremos a mencionar en qué consisten y su importancia. La descripción y reconocimiento trata con el análisis de características útiles para diferenciar un tipo de objeto de otro y el proceso que identifica esos objetos. En este caso, una vez que logramos segmentar los objetos de la imagen, podemos apreciar que dichos objetos segmentados pueden estar clasificados primero en dos grandes ramas: objetos de interés y artefactos. Los objetos de interés en este caso son las gotas de aceite y las burbujas de aire. Los artefactos son objetos detectados que no corresponden a estos objetos de interés, como pueden ser basuras u otro tipo de objeto virtual como un brillo reflejado en el fondo o manchas que se detectan como un objeto. Para poder discriminar entre estos objetos detectados y poderlos clasificar correctamente, se requiere describirlos matemáticamente. Es necesario encontrar aquellas características cuantitativas que hagan numéricamente diferentes a los tipos de objeto. Por ejemplo, la gran ventaja de nuestros objetos de interés es que,

en su mayoría, son casi perfectamente esféricos. De hecho, nuestro proceso de segmentación sólo genera circunferencias a partir de la transformada de Hough. Entonces, el proceso de descripción y reconocimiento se centra más en otras características, como pueden ser el color y textura de gotas y burbujas. De entrada podemos observar una gran diferencia de color entre ellas: las burbujas son prácticamente negras, mientras que las gotas tienen una gama de tonos intermedios en toda su estructura. Sin embargo, las burbujas presentan un brillo o reflejo en una cierta región, que puede producir confusión en las medidas fotométricas que se usarían para diferenciarlas, ya que este brillo aumenta el promedio de brillo total del objeto, por lo que podría asemejarse más a una gota oscura. Si la discriminación automática entre burbujas y gotas presenta varias dificultades, los artefactos representan un reto mayor, ya que el artefacto no sigue ninguna regla con respecto a su forma y color, pudiendo tener características muy parecidas a objetos reales de interés. Este problema de descripción y reconocimiento es un área muy importante de la visión por computadora, en donde se desarrollan cada día técnicas novedosas del área de la inteligencia artificial⁴, como clasificadores basados en redes neuronales —circuitos electrónicos capaces de reconocer patrones específicos con base a un entrenamiento, en este caso, para discriminar entre gotas y burbujas por ejemplo—, y los algoritmos genéticos —que hacen evolucionar una población (por ejemplo de gotas o burbujas) someténdola a acciones aleatorias semejantes a las que actúan en la evolución biológica (mutaciones y recombinación genética), así como también a una selección de acuerdo con algún criterio, en función del cual se decide cuáles son los individuos más adaptados, que sobreviven, y cuáles los menos aptos, que son descartados.

⁴ Duda, R. O., M. E. Hart y D. G. Stork, *Pattern classification* 2a. Ed., Wiley-Interscience, 2001.

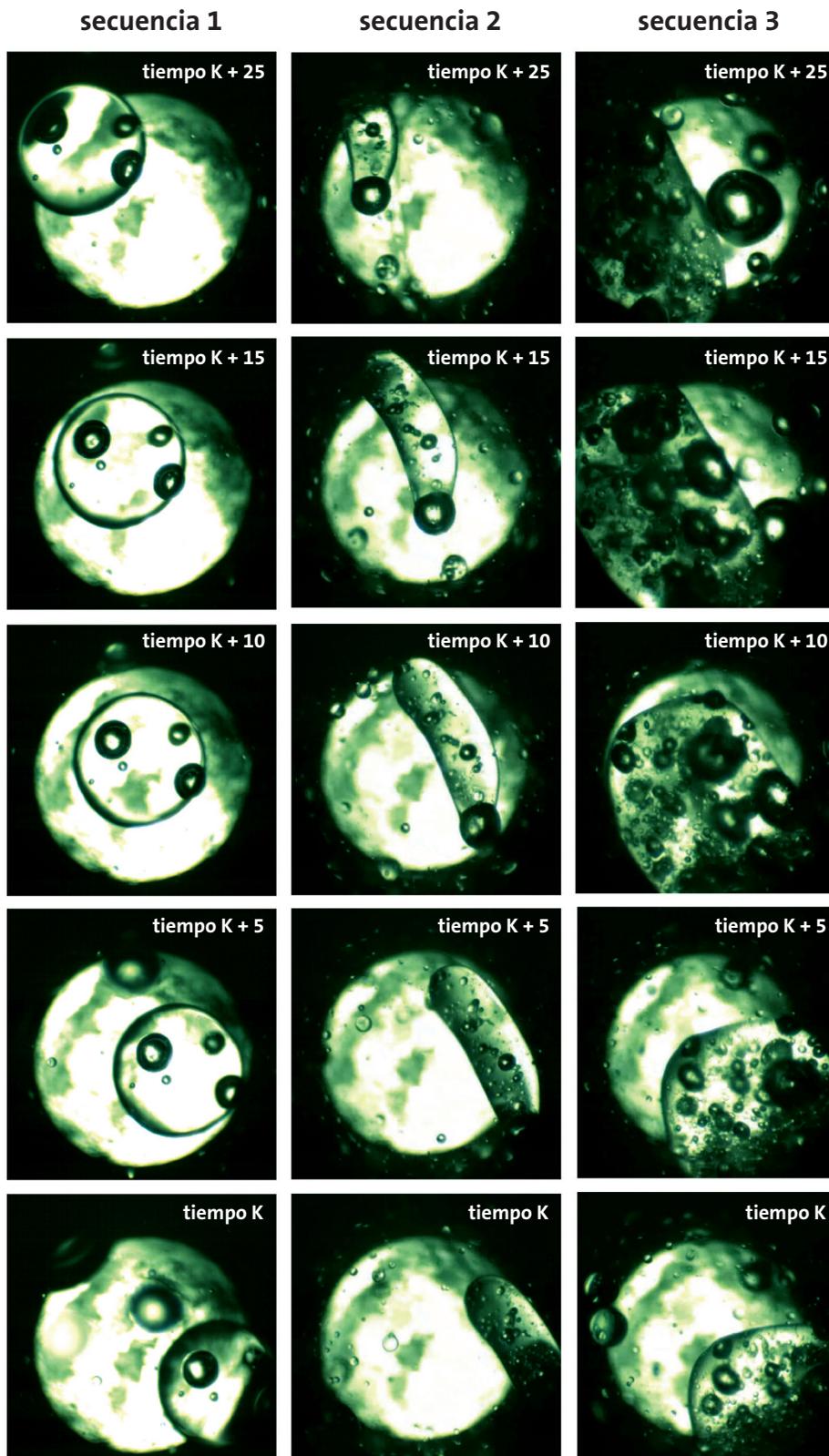


Figura 7.
Tres ejemplos de secuencias de estructuras complejas captadas mediante el uso del sistema de adquisición de cine de alta velocidad.

Filmación de cine de alta velocidad.

Para terminar este capítulo, me gustaría platicar sobre las últimas técnicas de visión por computadora que estamos utilizando para filmar secuencias de imágenes que nos permiten no sólo ver un instante (foto instantánea) de un proceso complejo de mezclado, sino un video-cine que permita mostrar los mecanismos que pueden intervenir en la formación de las gotas y burbujas, como podrían ser colisiones entre ellas o interacciones con los impulsores que mezclan, por ejemplo. La estrategia de adquisición debe de ser completamente diferente para este caso. Utilizamos un endoscopio industrial (llamado también boroscopio) el cual puede sumergirse en el tanque para ver los eventos que ocurren, pero esta vez, no sólo cerca de la pared del tanque, sino en zonas más cercanas a los impulsores de mezclado. El endoscopio es un dispositivo óptico conformado por un tubo de 10 mm de ancho, por 50 cm de largo. En la punta del endoscopio hay unas lentes que enfocan la imagen al extremo del tubo que está fuera del tanque. En este extremo se acopla una cámara de TV, pero esta vez no cualquier cámara, ya que los eventos que queremos filmar de forma secuencial —es decir, sin perder la trayectoria de las gotas y burbujas entre cuadros de video— ocurren a velocidades

tales que una cámara convencional sólo capturaría imágenes sueltas del proceso. Para poder filmar estos eventos, acoplamos al endoscopio una cámara digital de alta velocidad muy especial y de alto costo, que puede capturar más de 5000 imágenes por segundo. Con este sistema se logró la toma de secuencias de imágenes en diversas zonas del tanque, incluyendo las de mayor turbulencia. La alta velocidad de adquisición permitió visualizar de manera detallada las estructuras complejas que se forman en estas zonas, como las que se muestran en la **figura 7**.

Podemos concluir que este viaje al interior del biorreactor para poder filmar los eventos micrométricos que ocurren en su interior ha sido una aventura llena de retos. Esperamos que este viaje haya podido ilustrar de manera concreta la utilidad y potencial de las herramientas que provee la visión por computadora, y subrayar el valor del trabajo interdisciplinario que promueve la interacción de grupos de trabajo de diversas disciplinas, implicando el planteamiento y solución de problemas originales y relevantes. Quiero agradecer a mis colaboradoras Blanca Itzelt Taboada Ramírez y Leticia Vega Alvarado por su participación y apoyo en este proyecto. Más información sobre nuestro trabajo en www.ibt.unam.mx/labimage. ●