

Caracterización del crecimiento de colonias bacterianas utilizando segmentación de imágenes con K-means

Bacterial colony growth characterization using image segmentation with K-means

D. A. Alvarado-Ruiz ^{a,*}, K. Ordaz-Hernández ^a, G. L. Lara-Cadena ^b, L. Díaz-Jiménez. ^b, M. Castelán ^a

^aGrupo de Robótica y Manufactura Avanzada, CINVESTAV-Salttillo, 25900, Ramos Arizpe, Coahuila, México.

^bDepartamento de Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía, CINVESTAV-Salttillo, 25900, Ramos Arizpe, Coahuila, México.

Resumen

La caracterización bacteriana es un campo muy importante en microbiología, por eso es crucial que las aplicaciones orientadas a esta tarea faciliten y ayuden de forma sustancial a los laboratoristas que llevan a cabo esta actividad de forma manual sin perder información y considerando las diversas características que posee una colonia bacteriana. Teniendo en cuenta esta problemática, este artículo propone la aplicación del algoritmo K-means para el análisis y segmentación de imágenes de cultivos bacterianos de *Pseudomonas koreensis*, con un enfoque en la caracterización en lugar del conteo. El objetivo es detectar las diferentes morfologías existentes en el cultivo bacteriano de *P. koreensis* y determinar su porcentaje de ocupación en la imagen. Con esta información, se busca comprender la composición, el crecimiento y desarrollo de las colonias, sin importar si el usuario es un experto en la caracterización y detección de colonias bacterianas o no.

Palabras Clave: Caracterización bacteriana, Algoritmo K-means, Segmentación de imágenes, Morfologías bacterianas

Abstract

Bacterial characterization is a very important field in microbiology, which is why nowadays it is crucial for applications aimed at this task to facilitate and substantially help laboratory workers who continue to carry out this activity manually without losing information and considering the various characteristics that a bacterial colony possesses. Considering this problem, this article proposes the application of the K-means algorithm for the analysis and segmentation of images of bacterial cultures of *Pseudomonas koreensis* with a focus on characterization rather than counting. The purpose is to detect the different morphologies in the bacterial culture of *P. koreensis* and determine their occupancy percentage in the image. With this information, the aim is to understand the growth and development behavior of the colonies regardless of whether the user is an expert in bacterial colony characterization and detection.

Keywords: Bacterial characterization, K-means algorithm, Image Segmentation, Bacterial morphologies

1. Introducción

La caracterización en microbiología se refiere a la obtención de datos que describen las propiedades de un cultivo de bacterias. Tiene como objetivo comparar las muestras con algún ejemplo estándar (Trüper y Krämer, 1981) o, en el caso del crecimiento bacteriano, con ellas mismas en diferentes instantes de tiempo. Dichas comparaciones se realizan teniendo en cuenta características como la morfología, tamaño, pigmentación, textura, bordes, entre otras.

A continuación, se presenta una lista de algunas propiedades que se consideran para la caracterización del cultivo bacteriano (Vargas-Flores y Kuno-Vargas, 2014) (Prager *et al.*, 2001), el cual puede variar dependiendo del tipo de bacteria cultivada, condiciones ambientales, formulación del agar y otros factores.

- **Morfología:** Depende del borde y la forma en que se eleva sobre el medio de cultivo. Pueden ser circulares, puntiformes, irregulares, rizoides, mixtas, etc.

*Autor para correspondencia:

Correo electrónico: diana.alvarado@cinvestav.mx (Diana Alejandra Alvarado-Ruiz), kenya.ordaz@cinvestav.edu.mx (Kenya Ordaz-Hernández), grecia.lara@cinvestav.edu.mx (Grecia Leticia Lara-Cadena), lourdes.diaz@cinvestav.edu.mx (María de Lourdes Díaz-Jiménez), mario.castelan@cinvestav.edu.mx (Mario Castelán)

- **Pigmentación:** Se refiere al color que presentan. Puede ser en tonos verdes, amarillos o grisáceos.
- **Textura:** Puede ser lisa, arrugada, con curvas, etc.
- **Comportamiento óptico:** Se refiere a su comportamiento frente a la luz transmitida o reflejada. Ante la luz transmitida pueden ser opacas, translúcidas o transparentes. Frente a la luz reflejada, pueden ser brillantes u opacas.

En microbiología, existen diversos métodos de caracterización (Ramirez, 2009), siendo el conteo de colonias una de las herramientas tradicionales más utilizadas para obtener información general sobre la comunidad bacteriana en conjunto (Spiegelman *et al.*, 2005). El conteo de colonias, o enumeración de bacterias, consiste en cuantificar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Inés *et al.*, 2000), con el propósito de analizar el desarrollo y crecimiento de las agrupaciones bacterianas a lo largo del tiempo.

Es importante destacar que el concepto de "conteo" no aplica a todas las morfologías, ya que algunas de ellas no pueden ser caracterizadas mediante ese método. En estos casos, la caracterización dependerá de las variaciones de ocupación bacteriana a lo largo del tiempo. De esta manera, se puede comprender el desarrollo y crecimiento de colonias con morfologías complejas (por ejemplo, irregulares y mixtas) de manera integral y secuencial.

Actualmente existen aplicaciones para computadoras o teléfonos celulares que realizan el conteo de colonias bacterianas de forma automática o semiautomática. Sin embargo, estas herramientas tienen limitaciones en cuanto a costos (Martín *et al.*, 2022), capacitación, precisión, validación, hardware y tipos de morfología analizables. En consecuencia, existen laboratoristas optan por realizar el conteo manualmente, a pesar de ser un trabajo tedioso (Marotz *et al.*, 2001), tardado (Maurya, 2017), y que puede causar fatiga, frustración, errores numéricos y problemas oculares derivados del estrés visual (Grossi *et al.*, 2019).

A partir de esta problemática, en este trabajo se propone el uso del algoritmo K-means para la caracterización del crecimiento de colonias bacterianas, considerando su diversidad morfológica, y el porcentaje de ocupación como unidad de medición. Siendo esta propuesta la principal contribución, ya que, con base en la literatura consultada, no se detectaron trabajos con este enfoque.

La estructura del artículo es la siguiente: en la sección 2 se describe K-means y sus aplicaciones en la segmentación de imágenes y microbiología. En la sección 3 se describe el procedimiento y los parámetros utilizados en los experimentos. En la sección 4 se analizan y discuten los resultados experimentales obtenidos. Por último, en la sección 5 se evalúa la aplicación de K-means en la caracterización de colonias y se plantean futuras direcciones de investigación.

2. Marco teórico

2.1. K-means

K-means es un algoritmo para la creación de clusters (K) o agrupaciones de datos por medio del cálculo de centroides, los cuales son actualizados utilizando el promedio (means) de

estos mismos. K-means comienza con un número K de clusters y posteriormente ubica los centroides de manera aleatoria en un espacio multidimensional. Después, en función de la distancia euclidiana de los puntos y los centroides, asigna el punto al cluster más cercano. El proceso de asignación y actualización se repite varias veces, hasta que se alcanza un estado de convergencia (Burney y Tariq, 2014).

2.2. K-means aplicado a segmentación de imágenes

El algoritmo K-means puede ser aplicado a imágenes para agrupar píxeles que compartan información (color y tonalidad), donde cada píxel puede ser representado como un vector en el espacio multidimensional y cada dimensión representa un valor en canal de color, el cual dependerá en el espacio de color con el que se trabaje. En este caso, el resultado será una imagen segmentada, donde cada píxel está etiquetado con la asignación del cluster al que pertenece.

La aplicación de K-means para el procesamiento de imágenes es de gran utilidad: puede servir para la eliminación de ruido, compresión de imágenes, detección de bordes o extracción de características.

2.3. Sintonización de clusters de K-means mediante el método del codo

La sintonización por el método del codo se utiliza para encontrar un número óptimo de agrupaciones, y se realiza por medio de la suma de las distancias al cuadrado (Sum of Squared Errors o SSE) entre los puntos y el centroide de cada cluster; dicha operación se realiza de forma iterativa para diferentes valores de K; luego, se traza un gráfico de los SSE obtenidos en función del número de agrupaciones y se busca el punto de inflexión donde la curva converge. Esto indica que agregar más clusters no mejorará la calidad de la segmentación de forma significativa. A este punto de inflexión se le conoce como codo y es la razón de su nombre. Finalmente, se corre de nuevo el algoritmo de K-means con el valor óptimo de clusters y se verifica la calidad de segmentación. Es importante mencionar que el método del codo puede no funcionar en todos los casos, ya que es un método heurístico, por lo que es necesario revisar la calidad de la segmentación.

2.4. K-means aplicado a microbiología

En el campo de la microbiología, el uso de K-means ha experimentado un notable aumento en su aplicación. Esta técnica se ha convertido en una herramienta fundamental para el análisis de datos obtenidos en estudios microbiológicos e incluso en el procesamiento de imágenes (Dhanachandra *et al.*, 2015). Sin embargo, su aplicación en la caracterización del crecimiento bacteriano ha sido limitada hasta el momento. En esta área, se han utilizado métodos orientados a la detección de formas definidas, como la identificación de círculos u otras figuras geométricas (Rodrigues *et al.*, 2022), (Hogekamp *et al.*, 2020), (Stolze *et al.*, 2019), lo cual ha dejado de lado el análisis de muestras que exhiben una morfología compleja.

La técnica de K-means se presenta como un enfoque robusto y versátil para la caracterización bacteriana. Esta metodología es capaz de detectar y agrupar elementos que comparten características comunes, incluso diferencias casi imperceptibles

para el ojo humano. Su aplicación en la caracterización del crecimiento bacteriano ofrece numerosas ventajas, ya que no requiere modificar el proceso de cultivo existente. Además, proporciona una visualización sencilla e interpretable de las bacterias, compatible con diversos tipos de gráficos. La información obtenida a través de K-means permite el procesamiento individual de los datos y la obtención de resultados integrales a lo largo del tiempo para una misma muestra, brindando así una perspectiva completa y precisa del comportamiento bacteriano.

3. Experimentación

La experimentación se dividió en tres etapas principales, las cuales están representadas en el siguiente diagrama:

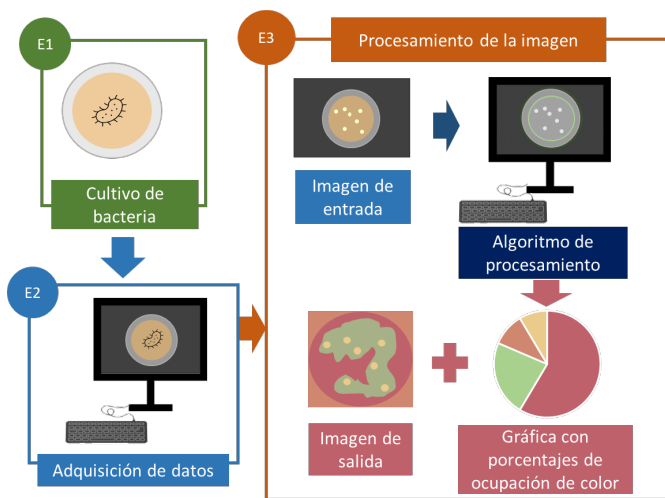


Figura 1: Diagrama de las etapas realizadas para la experimentación

La primera etapa del proceso consistió en cultivar la bacteria *P. koreensis* en una caja de Petri de 60 x 15 mm utilizando agar cetrimida, siguiendo los protocolos descritos en (Becton Dickinson, 2013) y (Torres *et al.*, 2019). Este agar proporciona las condiciones óptimas para el crecimiento de la bacteria. En la siguiente etapa, se llevó a cabo la captura de imágenes utilizando una plataforma de adquisición de imágenes (ver Figura 2). Esta plataforma se diseñó de manera estratégica en el Laboratorio de Revaloración de Residuos del Posgrado de Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía del CINVESTAV Unidad Saltillo, donde se encontraban las cajas de Petri cultivadas en la incubadora. Esto con el objetivo de minimizar la manipulación y el transporte prolongado de las muestras. La plataforma de adquisición consistió en una configuración que incluyó una Pi Camera V3 conectada y montada a una Raspberry Pi 1.3, la cual se aseguró a un brazo de madera y se orientó hacia el dispositivo Contador de Colonias. Esta Raspberry Pi, a su vez, se conecta a un teclado para la captura de datos y a una pantalla para la visualización. El brazo de madera utilizado es un prototipo inicial, considerado para futuras mejoras y posible automatización de la toma de datos. Las imágenes capturadas en esta plataforma tienen un tamaño de 2592×1944 píxeles. Para asegurar condiciones óptimas de iluminación, se realizaron las capturas en momentos en los que la luz solar directa no

ingresaba al laboratorio y se tomaron precauciones adicionales, como apagar todas las luces, para evitar reflejos en la lupa del Contador de Colonias. Para los experimentos realizados, se utilizaron las imágenes mostradas en la figura 3, las cuales se eligieron de forma aleatoria para evitar posibles sesgos.

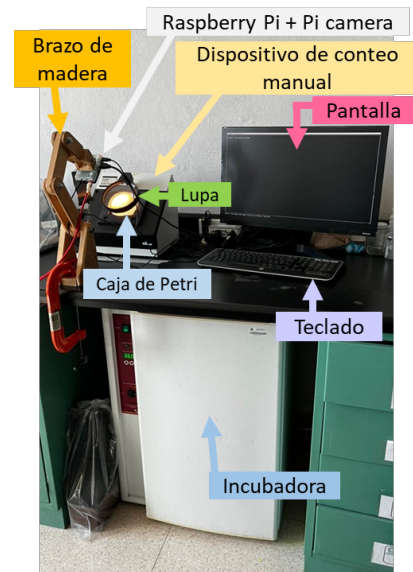


Figura 2: Plataforma de adquisición de imágenes, instalada en el laboratorio de revaloración de residuos, CINVESTAV Saltillo

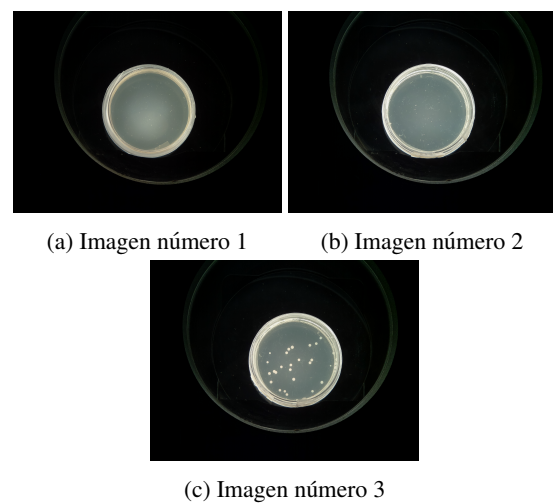


Figura 3: Imágenes originales utilizadas para los experimentos

En la tercera etapa, se realizó y utilizó un programa de procesamiento desarrollado en Python 3.9.12 junto con las bibliotecas de OpenCV, NumPy, Mayavi y Matplotlib para el procesamiento y visualización de los datos. Los pasos que componen esta etapa son los siguientes:

1. Detección de la caja de Petri mediante la transformada de Hough. Esta transformada se implementa a través de un comando disponible en la biblioteca OpenCV. Los parámetros utilizados son los siguientes:
 - image: Imagen de entrada en escala de grises donde se detectarán los círculos.

- **method:** Método utilizado para la detección de círculos, que puede ser HOUGH_GRADIENT o HOUGH_GRADIENT_ALT.
- **dp:** Relación inversa de la resolución del acumulador en la detección de círculos (valor por defecto: 1).
- **minDist:** Distancia mínima entre los centros de dos círculos detectados. Valores muy pequeños pueden resultar en la detección de círculos duplicados, mientras que valores muy grandes pueden llevar a perder círculos pequeños.
- **param1:** Valor más alto de los umbrales de detección de bordes utilizado en la detección de círculos (valor por defecto: 100).
- **param2:** Valor umbral para la detección del centro de los círculos (valor por defecto: 100).
- **minRadius:** Radio mínimo del círculo detectado (valor por defecto: 0).
- **maxRadius:** Radio máximo del círculo detectado (valor por defecto: 0).

Para los experimentos, se utilizaron los valores de parámetros que se muestran en el cuadro 1.

Tabla 1: Parámetros para la sintonización de la transformada de Hough para la detección de la caja de Petri

Parámetro	Valor
image	gray
method	cv.HOUGH_GRADIENT_ALT
dp	10.0
minDist	1
param1	300
param2	0.94
minRadius	100
maxRadius	-1

A través del primer paso, se identifica y obtiene la primera Región de Interés (ROI, por sus siglas en inglés), como se muestra en las imágenes de la figura 4.

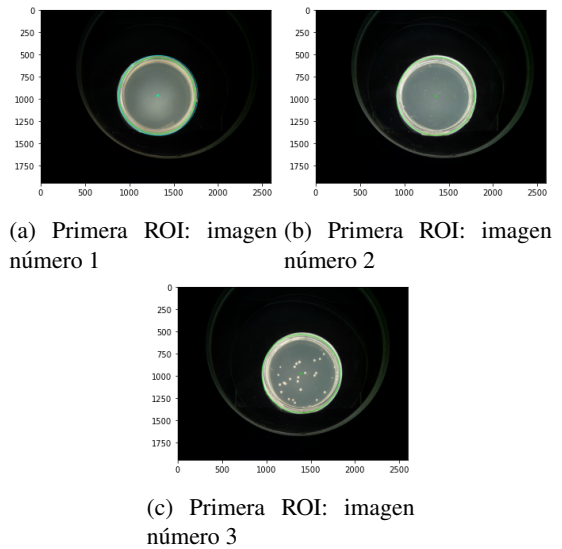
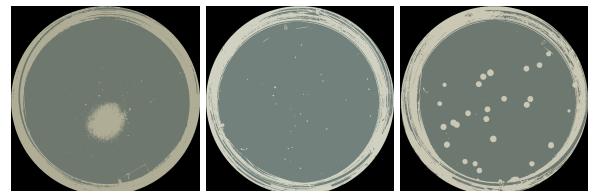


Figura 4: Primeras regiones de interés

2. El segundo paso implica la creación de una máscara utilizando la ROI y su aplicación a la imagen original. Esto tiene como objetivo reducir el área de trabajo y enfocarse en la caja de Petri.
3. En el tercer paso, se genera una segunda región de interés aplicando el algoritmo K-means con un bajo número de clusters ($K = 3$). Esto se realiza con el propósito de resaltar y separar el borde de la caja de Petri del agar y las bacterias.
4. En este paso, se repite el proceso descrito en el segundo paso utilizando la nueva región de interés.



(a) Imagen número 1 segmentada (b) Imagen número 2 segmentada (c) Imagen número 3 segmentada

Figura 5: Primera aplicación de K-means. $K = 3$

5. Una vez reducida el área de interés, se procede al quinto paso, que consiste en aplicar nuevamente el algoritmo K-means. En esta ocasión, se utiliza la técnica de sintonización de clusters mediante el método del codo para determinar el número óptimo de agrupaciones, asegurando así que no se pierda información. Esta sintonización dio como resultado $K = 4$.
6. Finalmente, en el sexto paso, se obtienen dos resultados principales. En primer lugar, se genera una imagen segmentada en la que los diferentes grupos se muestran con colores distintos a los originales, lo cual permite una separación e identificación visual más clara. En segundo lugar, se muestra una gráfica de pastel que representa el porcentaje de distribución de colores en la imagen segmentada.

4. Resultados y discusiones

Para este apartado, los resultados fueron analizados, discutidos y validados por una experta en crecimiento bacteriano del CINVESTAV, Unidad Saltillo.

A través del proceso descrito anteriormente, se generaron las siguientes imágenes resultantes. Estas imágenes constan de tres componentes principales. En primer lugar, se presenta la imagen original a la izquierda, seguida de la imagen segmentada utilizando el algoritmo K-means con cuatro clusters en el centro. Por último, a la derecha se muestra una gráfica de pastel que ilustra la distribución porcentual de los colores en la imagen segmentada. Como se mencionó al final del capítulo anterior, se optó por una paleta de colores llamativos y distintos a los colores originales con el fin de mejorar la visualización y apreciación de los detalles.

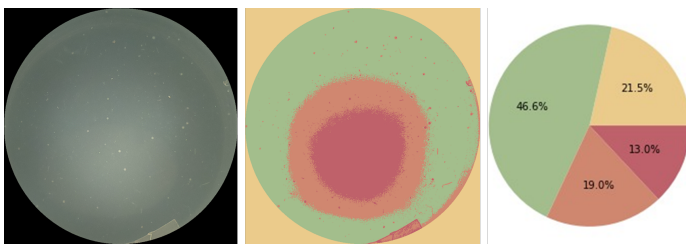


Figura 6: Segunda aplicación de K-means ($K = 4$), imagen 1 original, segmentada y gráfica porcentual de distribución de colores

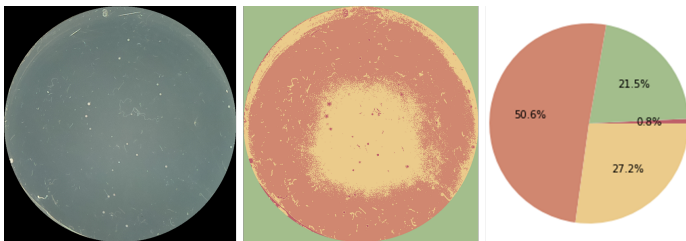


Figura 7: Segunda aplicación de K-means ($K = 4$), imagen 2 original, segmentada y gráfica porcentual de distribución de colores

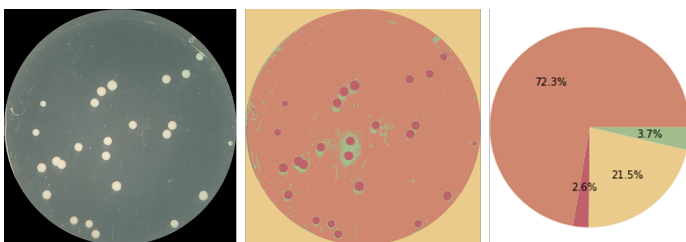


Figura 8: Segunda aplicación de K-means ($K = 4$), imagen 3 original, segmentada y gráfica porcentual de distribución de colores

En el primer conjunto de imágenes (Figura 6), se observa una mayor ocupación del color verde dentro del cultivo bacteriano, con un porcentaje del 46.6%. Le sigue el color naranja

con un 19% y finalmente el color rojo con un 13%. Estos resultados indican una mayor presencia de elementos verdes en la imagen. Sin embargo, los elementos rojos se encuentran más concentrados en el centro de la caja, lo que puede indicar una mayor concentración de bacterias en esa área. En cuanto a los cambios de tonos entre la imagen original y la segmentada con K-means, estos tonos no son tan evidentes en la imagen original y podrían pasar desapercibidos para alguien sin experiencia, lo que podría llevar a creer que solo hay una morfología presente en la muestra o que no ha habido crecimiento. Sin embargo, después de la segmentación, se pueden apreciar mejor las diferencias de tonos entre el agar y el crecimiento bacteriano, lo que brinda una visualización más clara en la imagen original.

En el segundo conjunto de imágenes (Figura 7), se pueden observar diferentes morfologías coexistiendo en la misma caja de Petri, como esmeriladas, puntiformes y rizoides. Estas formas pueden pasar desapercibidas a simple vista. Al igual que en el conjunto anterior, se aprecia una concentración significativa en el centro de la caja de Petri, en este caso representada por el color amarillo con un 27.2% de ocupación. El color naranja es el más presente en esta imagen, con un 50.6% de ocupación, mientras que el color rojo tiene una ocupación del 0.8%. En la imagen segmentada, se puede notar una mayor distribución de elementos de color amarillo, mientras que los elementos rojos son más notorios en la imagen original. Aunque la morfología puntiforme es evidente en la imagen original, el procesamiento y la comparación revelan que el cultivo presenta una morfología mixta, con bacterias filamentosas y áreas esmeriladas coexistiendo, lo cual solo podría ser percibido por un experto en caracterización de bacterias.

En el tercer y último conjunto de imágenes, los elementos más notorios en la imagen original están coloreados de rojo, con una ocupación del 2.6%, siendo estos los menos frecuentes. Le siguen los elementos verdes, con un 3.7% de ocupación. Algunos elementos verdes rodean a los elementos rojos, indicando una concentración de bacterias esmeriladas o rizoides alrededor de las colonias puntiformes. Los elementos naranjas tienen la mayor ocupación, con un 72.3%. Sin embargo, es importante destacar que el color naranja no necesariamente implica la ausencia de bacterias con forma esmerilada, sino que pueden estar presentes en menor cantidad.

En todos los conjuntos de imágenes, se observa una constante ocupación del 21.5%, que representa el fondo o la ausencia de la caja de Petri. El hecho de que esta ocupación se mantenga constante es un buen indicador, ya que demuestra que el corte y la delimitación de las regiones de interés fueron consistentes.

Por último, el análisis de imágenes ofrece la ventaja de ser considerablemente más rápido que el conteo manual en cuestión de tiempo de proceso. El tiempo necesario para procesar las imágenes puede variar según el equipo utilizado. En promedio, en un sistema con procesador AMD Ryzen, 16 GB de RAM y tarjeta gráfica NVIDIA GeForce GTX 750 Ti, el tiempo de procesamiento osciló entre 0.5 y 5 segundos por imagen. Esta eficiencia en el tiempo de ejecución permite una mayor productividad en la caracterización de colonias bacterianas y agiliza el proceso de análisis en comparación con el conteo manual tradicional.

5. Conclusiones

El análisis de imágenes segmentadas mediante el algoritmo K-means revela información importante sobre la morfología y concentración bacteriana en las muestras estudiadas. Este enfoque se ha demostrado eficaz y destaca la relevancia de las herramientas de procesamiento de imágenes y técnicas de segmentación para resaltar detalles y patrones que no son fácilmente perceptibles. Al identificar cambios sutiles de tonalidad y descubrir morfologías mixtas, se logra un mayor nivel de comprensión que podría haber pasado desapercibido para un observador no experto.

Además, el uso del porcentaje de ocupación como medida de medición en el análisis de muestras bacterianas supera la metodología tradicional de contar Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Al considerar la morfología completa de las colonias, esta medida proporciona una evaluación más completa y diversa de las muestras, teniendo en cuenta las diferentes formas y tamaños de las colonias bacterianas. La finalidad futura de este método es aplicarlo a muestras en las que se pueda seguir su crecimiento a lo largo del tiempo, con el objetivo de obtener una comprensión más profunda de la morfología y distribución bacteriana a medida que evolucionan en el cultivo. Este enfoque permitiría identificar patrones y tendencias en el desarrollo bacteriano, así como realizar comparaciones entre diferentes etapas de crecimiento, abriendo nuevas perspectivas en la comprensión de las colonias bacterianas y en el desarrollo de enfoques más efectivos en diversos campos de investigación. Por ejemplo, en el ámbito de la creación de materiales antibacterianos, el conocimiento detallado de la morfología y concentración bacteriana es fundamental para el desarrollo de soluciones efectivas. Del mismo modo, en el contexto de las pruebas de medicamentos, comprender y caracterizar de manera adecuada las muestras bacterianas posibilita una evaluación más precisa de la eficacia de los tratamientos. Estos avances tienen un impacto significativo en el desarrollo de soluciones terapéuticas y en la mejora de la eficiencia en la lucha contra las infecciones bacterianas.

Cabe destacar que el algoritmo de segmentación también tiene un valor adicional en el contexto del aprendizaje y entrenamiento del laboratorista en el conteo manual de bacterias. Dado que al mejorar la visibilidad de las morfologías bacterianas y facilitar la detección y confirmación de las primeras observaciones a mano, este algoritmo brinda una oportunidad de entrenamiento y validación, permitiendo desarrollar habilidades y aumentar la precisión en el conteo manual de colonias bacterianas. Esta aplicación adicional promueve el aprendizaje continuo y la mejora en la caracterización bacteriana. En términos de futuras investigaciones, se sugiere explorar el uso de otros algoritmos de detección de contornos para la identificación de áreas de interés. Este enfoque permitiría utilizar diferentes tamaños de cajas de Petri sin perder compatibilidad ni información, lo que ahorraría tiempo y recursos computacionales, optimizando aún más el análisis. Adicionalmente, se plantea la idea de crear una interfaz intuitiva y amigable para el usuario. Una interfaz de este tipo permitiría realizar análisis a lo largo del tiempo y brindaría la opción de personalizar la paleta de colores utilizada. Esta mejora resultaría especialmente beneficiosa para personas con limitaciones visuales, como los daltónicos, garantizando así

una experiencia inclusiva en el análisis de las imágenes.

Agradecimientos

La primera autora de este artículo agradece a CONACYT por el apoyo brindado dentro de su Programa Nacional de Becas (número de beca 800569), así mismo al Proyecto DAMA - Descubrimiento Acelerado De Materiales Antibioincrustantes (Proyecto de Ciencia de Frontera en la modalidad sinergias, con número 845101).

También agradece al grupo de Robótica y Manufactura Avanzada por la formación brindada y al departamento de Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía por la colaboración y la ayuda.

Referencias

- Becton Dickinson (2013). BD pseudose agar (cetrimide agar): Instrucciones de uso – medios en placa listos para usar. PA-254419.06, <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8794>. Visitado: 2023.03.16.
- Burney, S. M. y Tariq, H. (2014). K-means cluster analysis for image segmentation. *International Journal of Computer Applications*, 96(4):1–8.
- Dhanachandra, N., Manglem, K., y Chanu, Y. J. (2015). Image segmentation using k-means clustering algorithm and subtractive clustering algorithm. *Procedia Computer Science*, 54:764–771. Eleventh International Conference on Communication Networks, ICCN 2015, August 21–23, 2015, Bangalore, India Eleventh International Conference on Data Mining and Warehousing, ICDMW 2015, August 21–23, 2015, Bangalore, India Eleventh International Conference on Image and Signal Processing, ICISP 2015, August 21–23, 2015, Bangalore, India.
- Grossi, M., Parolin, C., Vitali, B., y Riccò, B. (2019). Computer vision approach for the determination of microbial concentration and growth kinetics using a low cost sensor system. *Sensors*, 19(24).
- Hogekamp, L., Hogekamp, S. H., y Stahl, M. R. (2020). Experimental setup and image processing method for automatic enumeration of bacterial colonies on agar plates. *PLOS ONE*, 15(6).
- Inés, A., Maite, O., e Isabel, B. (2000). 2. *Enumeración de microorganismos*.
- Marotz, J., Lübbert, C., y Eisenbeiß, W. (2001). Effective object recognition for automated counting of colonies in petri dishes (automated colony counting). *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 66(2-3):183–198.
- Martín, J. P., Capó, Y. A., Morales, R. O., Pichardo, T., y López, A. A. (2022). Conteo de bacterias y levaduras en imágenes digitales. *Medisur*, 20(2).
- Maurya, D. (2017). Colonycountj: A user-friendly image j add-on program for quantification of different colony parameters in clonogenic assay. *Journal of Clinical Toxicology*, 07.
- Prager, M. S. d., Torre, F. M. d. l., y Otero, N. B. (2001). *Microbiología: Aspectos Fundamentales*. Universidad Nacional de Colombia.
- Ramirez, Luz Stella Marin Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*.
- Rodrigues, P. M., Luís, J., y Tavaría, F. K. (2022). Image analysis semi-automatic system for colony-forming-unit counting. *Bioengineering*, 9(7):271.
- Spiegelman, D., Whissell, G., y Greer, C. W. (2005). A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(5):355–386.
- Stolze, N., Bader, C., Henning, C., Mastin, J., Holmes, A. E., y Sutlief, A. L. (2019). Automated image analysis with imagej of yeast colony forming units from cannabis flowers. *Journal of Microbiological Methods*, 164:105681.
- Torres, S. G., Hernández, S. C., y Jiménez, L. D. (2019). Bioadsorption of cr (vi) in aqueous solutions by pseudomonas korensis immobilized in alginate beads. *International Journal of Environmental Impacts: Management, Mitigation and Recovery*, 2(3):229–239.
- Trüper, H. G. y Krämer, J. (1981). *Principles of Characterization and Identification of Prokaryotes*, pp. 176–193. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Vargas-Flores, T. y Kuno-Vargas, A. (2014). Morfología bacteriana. *Rev. Act. Clin. Med*, 49(2304-3768).