

Sistemas automáticos para la detección y análisis de bioaerosoles

Francisco Moya Fernández

Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM), Escuela de Ingeniería Industrial (Toledo)
Campus Fábrica de Armas, 45071 Toledo (Spain)
Francisco.Moya@uclm.es

La idea de construir un sistema automático, o semi automático, para determinar las concentraciones de bioaerosoles en el ambiente ha sido trabajada desde hace más de una década por diferentes grupos de investigación en diferentes países: Nueva Zelanda¹, Holanda², Alemania^{3,4}, Estados Unidos⁵ y en España^{6,7,8}. Los resultados obtenidos en estos trabajos varían en función del modo en el que se ha realizado la evaluación, el volumen de datos manejado y las clases de tipos polínicos o esporas que se pretende identificar. El estado de la técnica en la mayoría de los casos permite una automatización de partes del proceso y, por lo menos cuando los granos de polen están bien diferenciados y separados de otras impurezas, es posible su reconocimiento en un tiempo razonable⁹.

Más concretamente, la aplicación de técnicas de inteligencia artificial para la clasificación automática de granos de polen ha sido estudiada desde hace dos décadas. France et al.¹⁰ (2011) presentan un sistema de clasificación empleando imágenes monocromáticas de baja resolución utilizando una técnica de reconocimiento de patrones deformables mediante una red neuronal. Ronneberger et al.³ (2002) presentan un sistema de reconocimiento de granos de polen basado en SVM (*support vector machine*) con un extensivo tratamiento de imagen previo, con uso de imágenes a varias profundidades de campo (z-stack) y fluorescencia para el segmentado previo. Rodríguez-Damián et al.¹¹ (2006) presentan un método de extracción de características visuales y su clasificación usando SVM. Allen et al.¹² (2008) presentan un sistema de análisis de imagen automático para la clasificación de polen basado en una red neuronal. Travieso et al.¹³ (2011) utilizan *técnicas de identificación de polen basadas en HMM (hidden Markov model)* y de clasificación basadas en SVM. Lagerstrom et al.¹⁴ (2015) describen el sistema *Classifynder*, que automatiza la digitalización de la muestra y su clasificación usando redes neuronales. Gonçalves et al.¹⁵ (2016) comparan diversas técnicas de aprendizaje automático, obteniendo resultados cercanos al obtenido por los expertos. Daood et al.¹⁶ (2016) utilizan *técnicas de deep learning* para la clasificación de imágenes en z-stack. Sevillano y Aznarte¹⁷ (2018) analizan el uso de varias arquitecturas de redes convolucionales profundas para clasificación de granos de polen.

El proceso de automatizar completamente la toma de muestras está mucho menos trabajado en la literatura. Muy pocos diseños industriales¹⁸⁻²¹ logran automatizar

todo el proceso. En Oteros et al.¹⁸ (2015) se describe el sistema BAA500, comercializado actualmente por la empresa alemana Hund Wetzlar. Este sistema utiliza un impactador virtual para recoger muestras de partículas dentro de un rango controlado de tamaño. Las partículas se recogen sobre una placa cubierta con un gel. Un sistema robótico lleva la placa a una etapa de calentamiento que funde el gel para fijar las partículas y facilitar su análisis. Posteriormente se realizan fotografías digitales de forma aleatoria sobre un 30 % de la superficie. Las imágenes son entonces segmentadas y clasificadas, de acuerdo a un conjunto de características distintivas. Crouzy et al.¹⁹ (2016) describen el sistema PA-300, predecesor del sistema Rapid-E, comercializado actualmente por la empresa suiza Plair SA. El sistema PA-300 utiliza un mecanismo de fluorescencia inducida mediante láser (infrarrojo y ultravioleta) e identificación de los patrones de fluorescencia y de reflexión difusa en las partículas. La reflexión difusa (*scattering*) está directamente relacionada con el tamaño de las partículas. Un conjunto de características relacionadas con la morfología se unifica dentro de una medida de rugosidad (*peakedness*) que contribuye a discriminar entre distintos tipos de polen. Finalmente, existe un patrón de fluorescencia característico del polen o de determinadas esporas y pequeñas diferencias permiten distinguir distintas especies. El análisis final se realiza mediante SVM (*support vector machine*) con una precisión de entre el 80 % y el 97 % dependiendo de la especie de polen o espora. La versión actualizada, Rapid-E, mejora la sensibilidad con un nuevo sensor láser. Kaliszewski et al.²⁰ (2016) describen un sistema similar al PA-300, el sistema BARDet. Se trata de un sistema extremadamente compacto con tasas de acierto similares a las de PA-300. Kawashima et al.²¹ (2016) también describen un sistema basado en análisis de la reflexión difusa de luz láser, que se comercializa como KH-3000-01 por la empresa Yamatronics.

Todos los sistemas descritos anteriormente poseen un coste muy elevado y son relativamente cerrados, enfocados a una aplicación específica. Los sistemas basados en análisis de la reflexión difusa de luz láser no utilizan ningún tipo de microscopía, sino que realizan un análisis de espectros de emisión y reflexión. Esto hace que sean especialmente robustos desde el punto de vista físico, pero dificulta el análisis de interferencias y la validación posterior de los datos generados. Aunque el espectro de fluorescencia es ciertamente característico de cada especie de polen, sería mucho más rica en información la imagen de fluorescencia. Rapid-E, la

versión actual de PA-300 permite además la captura de muestras en filtros intercambiables. Por otro lado, el sistema BAA500 utiliza una aproximación más tradicional, con microscopía de muestras previamente preparadas. Aunque la sensibilidad es menor, se facilita la validación y la consulta de las imágenes capturadas.

El alto coste de todos estos equipos plantea un serio obstáculo para el análisis de gradientes de partículas, como en el caso de las esporas, puesto que requiere replicar equipamiento costoso. En otros trabajos se han desarrollado nuevos sistemas de captación móviles cuya eficiencia está, con respecto a los sistemas de captación fijos empleados en el muestreo aerobiológico²². La probabilidad de detección de determinadas partículas aerotransportadas como son las esporas de hongos fitopatógenos puede variar dependiendo de la estrategia y altura de captación en un gradiente de pocos metros respecto al suelo²³⁻²⁴. Autores como West y Kimber²⁵ (2015) han manifestado las ventajas que puede aportar el uso de muestreadores móviles de partículas biológicas de interés favoreciendo la flexibilidad de los muestreos y detectando variaciones locales de las concentraciones de bioaerosoles en la escala espacial (tanto horizontal como altitudinal) y, por tanto, constituyendo un interesante complemento de las mediciones tradicionales en captadores fijos que registran el espectro biológico de amplios territorios. Este tipo de mediciones empleando muestreadores sobre superficies móviles como son drones se utilizado de manera exitosa también para el muestreo del material particulado total y gases en el aire²⁶. En el caso concreto de hongos y esporas también se han utilizado aeronaves para evaluar diferencias en la concentración de partículas a grandes altitudes²⁷.

REFERENCIAS

- Allen GP, Hodgson RM, Marsland SR, Arnold G, Flemmer RC, Flenley J, et al. Automatic Recognition of Light Microscope Pollen Images. *Image Vision and Computing*. 2006; 355-60.
- Chen C, Hendriks EA, Duin RPW, et al. Feasibility study on automated recognition of allergenic pollen: grass, birch and mugwort. *Aerobiologia*. 2006; 22(4): 275-84.
- Ronneberger O, Schultz E, Burkhardt H. General-purpose object recognition in 3D volume datasets using gray-scale invariants classification of airborne pollen grains recorded with a confocal laser-scanning microscope IEEE Computer Society. *Aerobiologia*. 2002a: 290-5.
- Ronneberger O, Schultz E, Burkhardt, H. Automated pollen recognition using 3D volume images from fluorescence microscopy. *Aerobiologia*. 2002b; 18:107-15.
- Ranzato M, Taylor PE, House JM, et al. Automatic recognition of biological particles in microscopic images. *Pattern Recognition Letters*. 2007; 28:31-9.
- Bonton P, Boucher A, Thonnat M, Tomczak R, et al. Colour image 2D and 3D microscopy for the automation of pollen rate measurement *Image Analysis & Stereology*. 2002; 21:25-30.
- Boucher A, Hidalgo PJ, Thonnat, et al. Development of a semi-automatic system for pollen recognition. *Aerobiologia*. 2002; 79:195-201.
- Díaz-López E, Rincón M, Rojo J, et al. Localisation of pollen grains in digitised real daily airborne samples. *Lecture Notes in Computer Science*. 2015; 9107.
- Holt KA, Bennett KD. Principles and methods for automated palynology. *New Phytologist*, 2014; 203(3):735-42.
- France I, Duller AWG, Duller GAT, Lamb HF. A new approach to automated pollen analysis. *Quaternary Science Reviews*. 2000; 19(6):537-46.
- Rodríguez-Damián M, Cernadas E, Formella A, et al. Automatic Detection and Classification of Grains of Pollen Bases on Shape and Texture *EEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics Part C: Applications and Reviews*. 2006; 36:531-42.
- Allen GP, Hodgson RM, Marsland SR, Flenley F. Machine vision for automated optical recognition and classification of pollen grains or other singulated microscopic objects 15th International Conference on Mechatronics and Machine Vision in Practice. 2008; 221-6.
- Travieso CM, Briceño JC, Ticay-Rivas J, Alonso JB. Pollen classification based on contour features. *INES 2011*; 17-21.
- Lagerstrom R, Holt K, Arzhaeva Y, et al. Pollen Image Classification Using the Classifynder System: Algorithm Comparison and a Case Study on New Zealand Honey. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015; 823.
- Gonçalves AB, Souza JS, Silva GGd, et al. Feature Extraction and Machine Learning for the Classification of Brazilian Savannah pollen grains *PLoS ONE*. 2016; 11(6).
- Daood A, Ribeiro E, Bush M. Pollen Grain Recognition Using Deep Learning *International Symposium on Visual Computing ISVC 2016 Lecture Notes in Computer Science*. 10072:321-30.
- Sevillano V, Aznarte JL. Improving classification of pollen grain images of the POLEN23E dataset through three different applications of deep learning convolutional neural networks. *PLoS ONE*. 2018; 13(9).
- Oteros J, García-Mozo H, Alcázar P, et al. A new method for determining the sources of airborne particles. *J. Environ. Management*. 2015; 155:212-18.
- Crouzy B, Stella M, Konzelmann T, et al. All-optical automatic pollen identification: towards an operational system *Atmospheric Environment*. 2016; 140:202-12.
- Kaliszewski M, Włodarski M, Młyńczak J, et al. A new real-time bio-aerosol fluorescence detector based on semiconductor CW excitation UV laser. *Journal of Aerosol Science*. 2016; 100:14-25.
- Kawashima S, Clot B, Fujita T, Takahashi Y, Nakamura K. An algorithm and a device for counting airborne pollen automatically using laser optics. *Atmos Environ*. 2007; 41(36):7987-93.
- Galán C, Smith M, Thibaudon M, et al. Pollen monitoring: minimum requirements and reproducibility of analysis. *Aerobiologia*, 2014; 30(4):385-95.
- Savage D, Barbetti MJ, MacLeod WJ, et al. Mobile traps are better than stationary traps for surveillance of airborne fungal spores. *Crop Protection*. 2012; 36: 23-30.

24. González F, Castro MP, Narayan et al. Development of an autonomous unmanned aerial system to collect time-stamped samples from the atmosphere and localize potential pathogen sources *Journal of Field Robotics*. 2011; 28(6):961-76.
25. West JS, Kimber RBE. Innovations in air sampling to detect plant pathogens. *Annals of Applied Biology*. 2015; 166(1):4-17.
26. Brady JM, Stokes MD, Bonnardel J, Bertram TH. Characterization of a quadrotor unmanned aircraft system for aerosol-particle-concentration measurements. *Environmental Science & Technology*. 2016; 50(3):1376-83.
27. Damialis A, Kaimakamis E, Konoglou M, et al. Estimating the abundance of airborne pollen and fungal spores at variable elevations using an aircraft: how high can they fly? *Scientific reports*, 2017; 7:44535.