

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO – UNINOVE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFORMÁTICA E GESTÃO DO
CONHECIMENTO**

DIMITRIA THEOPHANIS BOUKOUVALAS

**ABORDAGEM DE VISÃO COMPUTACIONAL PARA CONTAGEM DE
UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE MICRO-ORGANISMOS**

São Paulo

2019

DIMITRIA THEOPHANIS BOUKOUVALAS

**ABORDAGEM DE VISÃO COMPUTACIONAL PARA CONTAGEM DE
UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE MICRO-ORGANISMOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Informática e Gestão do Conhecimento da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Informática e Gestão do Conhecimento.

Prof. Sidnei Alves de Araújo, Dr – Orientador

Ano de ingresso: 2017

Linha de pesquisa: LP2 – Sistemas Inteligentes (SIN)

São Paulo

2019

DIMITRIA THEOPHANIS BOUKOUVALAS

**ABORDAGEM DE VISÃO COMPUTACIONAL PARA CONTAGEM DE
UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE MICRO-ORGANISMOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Mestrado em
Informática e Gestão do
Conhecimento da Universidade
Nove de Julho - UNINOVE, para a
obtenção do grau de Mestre em
Informática e Gestão do
Conhecimento, pela Banca
Examinadora, formada por:

São Paulo, 05 de fevereiro de 2019.

Presidente: Prof. Sidnei A. de Araújo, Dr. – Orientador, UNINOVE

Membro: Prof. Tiago Figueiredo Vieira, Dr., UFAL

Membro: Prof. Renato Araújo Prates, Dr., UNINOVE

Membro: Prof. Alessandro Melo Deana, Dr., UNINOVE

Dedico este trabalho a meus pais que sempre me incentivaram a estudar e a alcançar meus sonhos e a todas as pessoas que direta ou indiretamente me apoiaram: minha família, orientador, professores e amigos.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos ao meu orientador pelo incentivo, paciência e orientação que certamente contribuíram para o meu aprendizado.

Ao Prof. Dr. Renato Araújo Prates e à M.e Cintia Raquel Lima Leal pela condução dos experimentos microbiológicos e captura de imagens, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

À Universidade Nove de Julho – UNINOVE pela oportunidade oferecida e pela bolsa de estudos.

À CAPES pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudos.

À minha família por compreender minha ausência e pelo grande incentivo.

Aos meus colegas de estudo, que me auxiliaram a transpor barreiras.

E, finalmente aos membros da banca pelo pronto atendimento ao convite.

RESUMO

A quantificação de unidades formadoras de colônias (UFCs) preparadas conforme a técnica padrão de espalhamento é uma rotina diária de laboratório que requer uma grande quantidade de recursos materiais, humanos e de tempo, uma vez que é executada manualmente em placas de Petri contendo uma única diluição da amostra. Por outro lado, a SP-SDS (*Single Plate Serial Dilution Spotting*, em tradução livre para o português: Diluição Serial em Placa Única) é uma técnica amplamente utilizada que permite grande redução no uso de recursos materiais e tempo, pois utiliza diversas diluições de uma amostra numa mesma placa de Petri. Existem diferentes abordagens na literatura para a automação da quantificação de UFCs que são baseadas em imagens de placas de Petri preparadas pela técnica padrão, em que há baixa variação das características das UFCs e que são capturadas sob condições de ambiente controlado, o que não é a realidade dos laboratórios. Em vista disso, nesta pesquisa foi proposta uma abordagem de visão computacional para quantificação automática de UFCs em imagens de placas de Petri preparadas pela técnica SP-SDS e adquiridas sob condições reais de laboratório, a qual é composta por três etapas: extração das regiões de interesse (diluições na placa de Petri), contagem de UFCs isoladas por meio de descritores de forma baseados em região, e contagem de UFCs em aglomerados por meio de granulometria por correlação cruzada. Nos experimentos realizados constatou-se que a abordagem proposta permite a quantificação de UFCs com acurácia de 99,5%, precisão de 99,7%, sensibilidade de 99,2% e especificidade de 98,3%. Esses resultados foram superiores aos resultados das abordagens Granul e OpenCFU, com as quais a abordagem proposta foi comparada. Em adição, a partir da abordagem proposta concebeu-se um *software* de fácil utilização para quantificação de UFCs.

Palavras-chave: contagem de colônias, diluição serial, granulometria por correlação cruzada, descritores de forma baseados em região, segmentação.

ABSTRACT

Quantification of colony forming units (CFU) on microbial cultures prepared according to the standard spread plate technique is a daily laboratory routine that requires a large amount of material, human and time resources, as it is performed manually in Petri dishes containing a single dilution of the sample. On the other hand, SP-SDS (Single Plate Serial Dilution Spotting) is a widely used technique that allows great reduction in the use of material resources and time, since it uses several dilutions of a sample in the same Petri dish. There are different approaches in the literature for automation of CFU quantification that are based on images of standard spread plate Petri dishes with low variation of CFU features and captured under controlled lighting conditions, which is not the actual situation of laboratories. In view of this, in this study, a computational vision approach was proposed for automated quantification of CFU in Petri dishes prepared by the SP-SDS technique and acquired under real laboratory conditions, which is composed of three steps: extraction of regions of interest (Petri dish dilutions), counting of isolated CFU by region-based shape descriptors, and counting of CFU in agglomerates by cross-correlation granulometry. In the experiments carried out, it was verified that the proposed approach allows the quantification of CFU with accuracy of 99.5%, precision of 99.7% sensitivity of 99.2% and specificity of 98.3%. These results were superior to the results of the Granul and OpenCFU approaches, with which the proposed approach was compared. In addition, a user-friendly software for the quantification of CFU was conceived from the proposed approach.

Keywords: colony count, serial dilution, cross-correlation granulometry, region-based shape descriptors, segmentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Técnicas para desenvolvimento de culturas de micro-organismos em placas de Petri.	27
Figura 2. Colônias de micro-organismos.	33
Figura 3. Colônias muito próximas à borda.	34
Figura 4. Aglomeração de colônias.	34
Figura 5. Semeadura em placa de Petri pela técnica SP-SDS.	36
Figura 6. Etapas de um sistema de processamento de imagens.	38
Figura 7. Janela K de ordem 5×5	40
Figura 8. Máscaras genéricas K_x e K_y	41
Figura 9. Exemplos de operações lógicas em imagens binárias.	43
Figura 10. Exemplo de histograma de uma imagem.	44
Figura 11. Conectividade de pixels.	46
Figura 12. Operações morfológicas de dilatação e erosão.	48
Figura 13. Operações morfológicas de abertura e fechamento.	48
Figura 14. Parâmetros da TH.	50
Figura 15. Exemplos de histogramas de projeção vertical e horizontal.	52
Figura 16. <i>Templates</i> τ_j de núcleos circulares.	54
Figura 17. Imagem colorida IRGB com 3888×2592 pixels.	60
Figura 18. Exemplo de ROI evidenciado pela linha vermelha.	61
Figura 19. Imagem em níveis de cinza G.	61
Figura 20. Imagem G após aplicação de filtro de mediana.	62
Figura 21. Detecção da borda interna da placa de Petri por TH.	62
Figura 22. Imagem da área interna da placa G_{circle}	63
Figura 23. Imagem binária B, resultado da limiarização adaptativa gaussiana.	63
Figura 24. Exemplos de imagens com diluições não alinhadas verticalmente.	64
Figura 25. Imagem B_{rot} com diluições alinhadas verticalmente.	64
Figura 26. Remoção das regiões externas da ROI.	65
Figura 27. Separação das diluições através da análise do histograma de projeções verticais.	65
Figura 28. Imagens das ROIs extraídas da imagem original I_{RGB}	66
Figura 29. Etapas do algoritmo de Bora (2017) adaptado para realce de bordas.	68

Figura 30. Segmentação de UFCs isoladas baseada em circularidade.....	69
Figura 31. Detalhes da imagem B_{ROI_i} apresentando UFCs detectadas corretamente pela correlação cruzada em vermelho.	70
Figura 32. Fluxograma do funcionamento das etapas da abordagem proposta.	71
Figura 33. Erros de detecção na primeira etapa de SC.....	73
Figura 34. Erros de detecção na segunda etapa de SC.	74
Figura 35. Comparação de contagens de MC, SC, GR e OP.....	76
Figura 36. Tela inicial.	87
Figura 37. Tela de processamento.....	88
Figura 38. Tela de resultados.....	89
Figura 39. UFCs assinaladas em vermelho.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias das contagens manuais.	58
Tabela 2. Acurácias (%) obtidas pela aplicação de SC.	72
Tabela 3. Acurácias (%) obtidas pela aplicação de GR.	75
Tabela 4. Acurácias (%) obtidas pela aplicação de OP.	76
Tabela 5. Análise comparativa da acurácia, precisão e sensibilidade das abordagens SC, GR e OP.	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Autores, resultados e métodos	20
---	----

LISTA DE SIGLAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAGR	<i>Compound Annual Growth Rate</i>
FN	Falsos Negativos
FP	Falsos Positivos
GR	Abordagem para contagem automática de UFCs denominada Granul
<i>k-means</i>	Método de análise de agrupamento de dados
LED	<i>Light-emitting Diode</i> (diodo emissor de luz)
MC	Contagem Manual
MSER	<i>Maximally Stable Extremal Regions</i>
NIR	<i>Near Infrared</i> (Porção do espectro infravermelho de luz)
OP	Abordagem para contagem automática de UFCs OpenCFU
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (solução salina fosfatada tamponada estéril)
RGB	<i>Red, Green and Blue</i> (sistema de cores)
ROI	<i>Region of Interest</i>
SC	Abordagem Proposta para contagem automática de UFCs (<i>Shape descriptor and Cross-Correlation approach</i>)
SP-SDS	<i>Single Plate Serial Dilution Spotting</i>
SVC	Sistema de Visão Computacional
TH	Transformada de Hough
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VC	Visão Computacional
VIS	<i>Visible</i> (Porção do espectro eletromagnético que é visível ao olho humano)
VN	Verdadeiros Negativos
VP	Verdadeiros Positivos

LISTA DE SÍMBOLOS

$argmax$	Argumento que maximiza uma função
A	Área de um componente conexo (ou objeto)
B	Blue (banda azul) no sistema de cores RGB
B	Imagem binária
B_{rot}	Imagem binária rotacionada
B_{ROI_i}	Imagem binária da ROI
c	Correlação cruzada
C	Máxima correlação obtida na correlação cruzada
dpi	<i>Dots per inch</i> , em português pontos por polegada (medida de densidade relacionada à composição de imagens)
\mathcal{D}	Domínio da imagem
G	Green (banda verde) no sistema de cores RGB
G	Imagem em níveis de cinza
G_{circle}	Imagem contendo apenas a parte interna da placa de Petri
H	Canal de matiz (<i>hue</i>) no sistema de cores HSV
i	Índice da imagem que representa a ROI
I	Imagem digital
I_{bin}	Imagem binária
I_{gray}	Imagem em níveis de cinza
I_{cor}	Imagem multibandas
I_{RGB}	Imagem multibandas no sistema de cores RGB
I_{RGB}	Imagem multibandas RGB no sistema de cores RGB
j	Índice do <i>template</i> de núcleo circular
\mathbb{K}	Subconjunto de números naturais
K	Janela genérica extraída de uma imagem
m	Dimensão de uma matriz (parâmetro usado na limiarização adaptativa)
M_i	Máscara usada na aplicação de operações lógicas em imagens
mm	Milímetros (unidade de medida de comprimento)
$nBits$	Número de <i>bits</i> para codificação dos níveis de cinza de uma imagem
$nBandas$	Número de bandas de uma imagem multibandas

$N_4(p)$	4-conexos de um pixel $p(x,y)$
$N_8(p)$	8-conexos de um pixel $p(x,y)$
NI	Número de UFCs isoladas detectadas
NA	Número de UFCs detectadas em aglomerados
O_i	Imagem ROI_HSV_i convertida para o espaço de cor RGB
p	Pixel
p, q	Pixéis genéricos
P	Perímetro de um componente conexo (ou objeto)
r	Raio do <i>template</i> de núcleo circular
r_{min}	Raio mínimo das UFCs detectadas
r_{max}	Raio máximo das UFCs detectadas
R	Red (banda vermelha) no sistema de cores <i>RGB</i>
R	Resposta de um filtro de média
ROI_RGB_i	Imagem RGB que representa a ROI
ROI_HSV	Imagem da ROI no espaço de cor HSV
S	Canal de saturação (<i>saturation</i>) no sistema de cores HSV
L	Limiar empregado no agrupamento dos níveis de cinzas de uma imagem
T	Conjunto de <i>templates</i> empregados na operação de granulometria
$Total_UFC$	Número total de UFCs
v	Vetor de acumulação da intensidade dos pixels
V	Conjunto de valores de tons de cinza
V	Canal de valor (<i>value</i>) no sistema de cores HSV
W	Janela gaussiana empregada na limiarização adaptativa
x	Coordenada horizontal do pixel
x_c, y_c	Coordenadas do centro da circunferência.
y	Coordenada vertical do pixel
\mathbb{Z}	Conjunto dos números inteiros
α	Taxa de intersecção entre UFCs (usada na operação de granulometria)
ε	Circularidade de um componente conexo (ou objeto)
$\eta(L)$	Razão da variância em relação à variância total (parâmetro usado na limiarização de Otsu)
θ	Ângulo

μ_L	Média global entre as classes (parâmetro usado na limiarização de Otsu)
ρ	Distância perpendicular ou raio (parâmetro usado no cálculo da TH)
ρ	Coeficiente de correlação
σ	Desvio padrão (parâmetro usado na limiarização adaptativa)
σ_L^2	Variância global entre as classes (parâmetro usado na limiarização de Otsu)
τ	<i>Template</i> empregado na operação de granulometria por correlação cruzada

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE SIGLAS	12
LISTA DE SÍMBOLOS.....	13
SUMÁRIO.....	16
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
1.2 JUSTIFICATIVA, LACUNAS E QUESTÃO DE PESQUISA.....	25
1.3 OBJETIVOS DA PESQUISA.....	29
1.3.1 Objetivo geral	29
1.3.2 Objetivos específicos.....	29
1.4 PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES	30
1.5 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	30
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	32
2.1 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS EM MICROBIOLOGIA.....	32
2.2 VISÃO COMPUTACIONAL.....	37
2.2.1 Filtragem	39
2.2.2 Operações lógicas e aritméticas	42
2.2.3 Limiarização.....	43
2.2.4 Componentes conexos	46
2.2.5 Morfologia matemática.....	47
2.2.6 Rotação	49
2.2.7 Transformada de Hough	49
2.2.8 Histogramas de projeções	51
2.2.9 Descritores de forma baseados em região.....	52
2.2.10 Granulometria por correlação cruzada	53
3 MÉTODOS E MATERIAIS	56

3.1	CARACTERIZAÇÃO METODOLÓGICA DA PESQUISA	56
3.2	PROCEDIMENTOS PARA O LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....	56
3.3	PROCEDIMENTOS EMPREGADOS NA CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS.....	57
3.4	MATERIAIS.....	59
3.4.1	Aquisição de imagens.....	59
3.4.2	Recursos empregados no desenvolvimento da abordagem proposta..	59
4	ABORDAGEM PROPOSTA.....	60
4.1	PRIMEIRA ETAPA – EXTRAÇÃO DAS ROIs	60
4.2	SEGUNDA ETAPA – SEGMENTAÇÃO E CONTAGEM DE UFCs ISOLADAS.....	66
4.3	TERCEIRA ETAPA – SEGMENTAÇÃO DE AGLOMERADOS E CONTAGEM DE UFCs	69
4.4	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS ETAPAS DA ABORDAGEM PROPOSTA.....	70
5	RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÕES	72
6	CONCLUSÕES.....	79
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE A - PUBLICAÇÕES RESULTANTES DESTE TRABALHO DE PESQUISA.....	86
	APÊNDICE B – INTERFACE DO SISTEMA DE VISÃO COMPUTACIONAL RESULTANTE DA ABORDAGEM PROPOSTA NESTE TRABALHO	87

1 INTRODUÇÃO

A contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) em placas de Petri é uma prática de laboratórios de microbiologia tradicionalmente realizada manualmente. Diariamente, microbiologistas preparam placas de Petri com culturas de microorganismos e, após um período de incubação, realizam a contagem de UFCs. Esta prática rotineira é demorada e cansativa para o especialista, especialmente quando há um grande número de amostras a serem analisadas (BARON et al., 2006). Além do mais, os resultados das contagens de UFCs realizadas entre diferentes especialistas variam muito, assim como entre diferentes laboratórios, sugerindo que a forma de identificar UFCs é a maior fonte de discrepâncias entre as contagens (LUMLEY et al., 1997).

A quantificação automática de UFCs através da utilização de diferentes abordagens, desde algoritmos ou *softwares* para utilização em imagens adquiridas de placas de Petri até sistemas compostos por *hardware* e *software* para aquisição de imagens e contagem, é uma solução para a redução do tempo gasto neste procedimento rotineiro, assim como permite que a identificação de UFCs seja padronizada.

A simplificação ou automatização do procedimento de contagem de UFCs tem sido alvo de pesquisas há bastante tempo. São exemplos as pesquisas de Mansberg (1957) e Ingels, Daughters e Burzio (1968), que desenvolveram mecanismos eletroeletrônicos para facilitar e automatizar a contagem de UFCs visando reduzir o tempo dispendido nesta tarefa. E, com o surgimento da tecnologia de imagem digital, vários autores, como por exemplo Mukherjee et al. (1995), Corkidi et al. (1998) e Barber, Vojnovic e Kelly (2000), passaram a utilizar técnicas de visão computacional (VC) no desenvolvimento de abordagens para a contagem automática de UFCs.

Nos últimos cinco anos, foram apresentados na literatura diversos trabalhos propondo o desenvolvimento de sistemas de visão computacional (SVC) para a identificação, segmentação e quantificação de UFCs.

Embora existam diversas abordagens para a contagem automática de UFCs na literatura ou sistemas disponíveis comercialmente, a automação deste procedimento ainda não é usual, provavelmente devido às abordagens serem

desconhecidas pelos especialistas, ou devido ao alto custo dos equipamentos comercializados (RHOADS; NOVAK; PANTANOWITZ, 2015).

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

A contagem automática de UFCs tem sido objeto de estudo de diversas pesquisas sendo possível encontrar na literatura diferentes abordagens para esta finalidade.

Os primeiros artigos, relatam o emprego de aparatos elétricos ou eletrônicos para realizar a contagem (INGELS; DAUGHTERS; BURZIO, 1968; MANSBERG, 1957). Porém, com o advento das imagens digitais, pesquisadores passaram a desenvolver algoritmos com base em técnicas de visão computacional para a contagem de UFCs, desenvolvendo, inclusive, aparatos para a captura de imagens padronizadas, mais adequadas ao processamento automático.

Dentre os primeiros estão Mukherjee et al (1995), que utilizaram a técnica de transformada da distância para detecção dos máximos locais, que representam as UFCs. Os resultados foram comparados com a contagem manual, considerada padrão, chegando a 95% de acerto.

Corkidi et al. (1998), também entre os primeiros, desenvolveram o método COVASIAM (*confluent and various sizes image analysis method*), referência na bibliografia devido a tratar a separação de aglomerações de UFCs pela primeira vez. O algoritmo emprega a limiarização multinível, detectando assim tanto as UFCs isoladas (detecção) como separando as aglomeradas (separação), com taxas de acerto entre 94,4% e 97,8% de acerto, mas, devido à remoção da área da borda, contabiliza apenas 87% da área da placa. Atualmente a maioria dos trabalhos tratam da detecção de UFCs e separação de aglomerações.

Os autores dos artigos resultantes da pesquisa bibliográfica, considerando o período de 2013 a março/2018 conforme apresentado na seção 3.2, apresentaram soluções que abrangem: aparatos para captura de imagem e algoritmos; algoritmos automáticos ou semiautomáticos; e aplicativos para *smartphones*. Estes artigos são comentados a seguir, em ordem cronológica e apresentados de forma resumida no Quadro 1.

Quadro 1. Autores, resultados e métodos

Autores	Tipo	Res. %	Segmentação de UFCs	Segmentação de aglomerações
Austerjost et al. (2017)	app auto	86,8	Algoritmo de classificação	TH
Barbedo (2013)	alg semi	99,0	Componentes conexos	Operação de abertura
Boukouvalas e Araújo (2017)	alg auto	99,4	Componentes conexos	-
Chiang et al. (2015)	cap auto	99,0	Elemento estruturante	<i>Watershed</i>
Ferrari et al. (2017)	alg auto	92,8	Redes neurais convolucionais	Redes neurais convolucionais
Geissmann (2013)	alg semi	97,4	Componentes conexos	<i>Watershed</i>
Jagga e Singh (2018)	alg auto	100,0	<i>Watershed</i>	<i>Watershed</i>
Junior, Balian e Kim (2016)	alg semi	99,0	Granulometria baseada em correlação e MSER	K-means
Maretic e Lackovic (2017)	alg auto	75,7	Descritor de forma por circularidade	-
Martinez-Espinosa et al. (2016)	cap auto	98,2	Transformada da distância por morfologia	Transformada da distância por morfologia
Matić et al. (2016)	cap auto	97,0	TH	TH
Sánchez-Femat et al. (2017)	app auto	74,0	Componentes conexos	-
Siqueira e Carvalho (2017)	alg semi	98,8	TH e <i>template matching</i>	TH e <i>template matching</i>
Wong, Yeo e Gan (2016)	app semi	90,3	Não informado	<i>Watershed</i>
Yoon, Lawrence e Park (2015)	alg auto	99,5	Busca exaustiva dos máximos locais	Busca do vizinho mais próximo

alg: algoritmo; cap: aparato de captura; app: para *smartphone*; auto: automático; semi: semiautomático; TH: transformada de Hough

Fonte: autor

Barbedo (2013) propôs um algoritmo semiautomático no qual o usuário deve identificar a maior e a menor UFC. O algoritmo utiliza cinco métodos diferentes de detecção de bordas das UFCs e submete os resultados ao usuário para escolha do resultado ideal, e, para separação de aglomerações, compara as áreas das UFCs encontradas com as áreas da menor e maior UFCs através de elemento estruturante. Para que os elementos sejam classificados como aglomerações e sejam separados, é necessário que sejam aproximadamente convexos e a área de contato entre

elementos não seja muito grande. Os resultados foram de 99% de acerto, no entanto, quando a quantidade de aglomerações de UFCs aumenta, e quando o contraste entre UFCs e fundo da placa é baixo, os resultados caem.

Geissmann (2013) desenvolveu o *OpenCFU*, software livre de código aberto que detecta UFC através de limiarização com contagem de componentes conexos e separa as aglomerações através de uma variante de *watershed*. Os resultados apresentaram 97,4% de acerto pois há super-segmentação, não detecção e eliminação de UFCs. Para melhorar esta performance, disponibiliza diversos filtros para o usuário numa etapa de pós-processamento.

O trabalho de Chiang et al. (2015) relata o desenvolvimento de um aparato para captura de imagem constituído por câmara montada dentro de caixa fechada com iluminação por luz de fundo. O algoritmo automático proposto cria duas imagens - uma da área central (dentro da borda), uma da área da borda. Para cada área, detecta UFCs através de elemento estruturante e separa aglomerações de UFCs por *watershed*. Os resultados foram de 99% de acerto devido a super-segmentação, remoção de UFCs na área da borda da placa e eliminação de UFCs durante a limiarização.

Yoon, Lawrence e Park (2015) desenvolveram um algoritmo automático para análise de imagens capturadas através de câmara hiperespectral Vis-NIR (24 bandas do visível ao infravermelho próximo). O algoritmo escolhe a banda com o maior contraste entre objetos e fundo através da análise dos componentes principais, e detecta UFCs por busca exaustiva dos máximos locais, técnica com custo computacional muito alto. Para a separação de aglomerações utiliza algoritmo de busca do vizinho mais próximo. Os autores apontam que a escolha da banda ideal influenciou positivamente a contagem, com 99,5% de acerto, porém o algoritmo falhou em separar adequadamente as aglomerações e eliminou UFCs pequenas.

Ferrari et al. (2015) e Ferrari Lombardi e Signoroni (2017) utilizaram redes neurais convolucionais para classificação de UFCs em sete classes – de uma UFC isolada a seis UFCs aglomeradas e uma classe com elementos considerados ruídos. Foram utilizadas cerca de 17.000 imagens de UFCs de um mesmo micro-organismo para o treinamento, separadas pelas classes já mencionadas, o que se configura numa das desvantagens deste método além da acurácia chegar a apenas 92,8 %.

O MSGRANUL, desenvolvido por Junior, Balian e Kim (2016) é um algoritmo semiautomático que une granulometria baseada em correlação cruzada com *template*

matching conforme proposto por Maruta (2011), que detecta todos os objetos e separa aglomerações, e MSER (*Maximally Stable Extremal Regions*) (MATAS et al., 2002), que obtém as regiões maximamente estáveis. A razão entre a área de interseção dos dois métodos e a área de união, quando próxima de um (1), determina as UFCs a contar. Para melhorar a performance, o resultado é submetido a um pós-processamento com intervenção do usuário, utilizando método de classificação k-means, chegando a resultados acima de 99% de acurácia.

Martinez-Espinosa et al. (2016) desenvolveram um aparato para captura de imagem digital com controle da quantidade de lux (unidade de iluminação). O algoritmo automático utiliza transformada da distância por morfologia matemática para detecção e determinação da posição do centroide de cada UFC. Esta técnica permite a separação de algumas aglomerações de UFCs, porém, quando as aglomerações são muito concentradas ou estão próximas à borda da placa, a técnica não apresenta bons resultados. Os resultados foram de 98,2% de acerto quando a iluminação utilizada para a captura da imagem foi de 85 lux.

Matić et al. (2016) desenvolveram um aparato de captura de imagem com iluminação por luz de fundo. O algoritmo semiautomático detecta UFCs e separa aglomerações por TH. Os resultados chegaram a 97% de acerto pois não consegue separar adequadamente as aglomerações, contabiliza UFCs falsas e deixa de detectar algumas UFCs.

Wong, Yeo e Gan (2016) desenvolveram um aplicativo semiautomático para *smartphone* chamado *APD Colony Counter*. O aplicativo permite a captura da imagem da placa de Petri através da câmera do *smartphone* ou utilização de arquivo de imagem pré-capturada. A técnica para detecção de UFCs não é informada, porém separa aglomerações usando a transformada de *watershed*. Os resultados apresentados são de 90,3% de acerto com relação à contagem manual, quando não há intervenção na contagem pelo usuário.

Sánchez-Femat et al.(2017) também desenvolveram um aplicativo automático para *smartphone* chamado CA-BACT que faz a captura da imagem através da câmera do *smartphone*. A detecção de UFCs é feita por limiarização e componentes conexos, porém não separa aglomerações. Os resultados da contagem foram de 98% de acerto para imagens simuladas de UFCs, no entanto, para imagens reais, os resultados foram de 74% de acerto.

Outro aplicativo automático para smartphone chamado *TCI Colony Counter* foi desenvolvido por Austerjost et al. (2017) que utiliza limiarização adaptativa e algoritmo de classificação para detectar UFCs e identificar aglomerações, e para separar aglomerações utiliza TH. Numa etapa final, encontra UFCs não detectadas anteriormente comparando as características destas com as das já encontradas e realiza a contagem. A acurácia foi de 86,76% pois não detecta todas as UFCs além de reconhecer outros objetos presentes na imagem como UFCs. Além do mais, o aplicativo precisa de conexão com o servidor para realizar a contagem e só detecta colônias circulares.

Maretic e Lackovic (2017) desenvolveram um algoritmo automático que detecta UFC através de descritor de forma por circularidade. Como aglomerações não são circulares, estas são descartadas. Os resultados foram de 76% de acerto pois o algoritmo não contabilizou nem separou as aglomerações, e nem as UFCs muito próximas à borda da placa.

Siqueira e Carvalho (2017) desenvolveram um algoritmo semiautomático chamado *MicroCount* que utiliza TH e *Template matching* para detecção de UFCs e separação de aglomerações. Os resultados foram de 98,8% de acerto pois não consegue contar todas as colônias (não informa os motivos).

Boukouvalas e Araújo (2017) desenvolveram um algoritmo automático que utiliza limiarização e contagem de elementos conexos, mas não efetua a separação de aglomerações. Para testar o algoritmo, os autores utilizaram uma coleção de imagens do *OpenCFU* (GEISSMANN, 2013) denominada *S. aureus* com resultados de 99,4% de acerto.

Jagga e Singh (2018) desenvolveram um algoritmo automático que utiliza a transformada watershed na etapa de segmentação. O algoritmo desenvolvido apresentou 100% de acerto com relação à contagem manual, porém os autores utilizaram imagens simuladas de partes do interior de placas de Petri, com baixa aglomeração e sem ruídos.

O aumento do contraste entre UFCs e fundo se mostrou efetivo na redução de ruídos como reflexos e sombras, na delimitação da região de interesse e na melhor segmentação das UFCs. Este efeito é melhor conseguido com a utilização de aparatos para captura de imagens, como nos trabalhos de Chiang et al.(2015), Martinez-Espinosa et al. (2016) e Matic et al. (2016), padronizando a iluminação e qualidade das imagens, e assim, aumentando a acurácia dos algoritmos desenvolvidos. Este é

um recurso muito utilizado nos equipamentos comercializados para contagem automática.

Em contrapartida, os trabalhos sem aparatos de captura, precisaram se utilizar de técnicas de filtragem, limiarização, e seleção de bandas com maior contraste, uma vez que as imagens necessitam de maior pré-processamento. No caso de aplicativos para smartphones, como Austerjost et al. (2017), Sánchez-Femat et al. (2017) e Wong, Yeo e Gan (2016), que obtiveram as imagens utilizando as próprias câmeras dos smartphones, percebem-se resultados inferiores aos demais devido à baixa qualidade da imagem.

Alguns autores, como Barbedo (BARBEDO, 2013), Geissmann (2013), Junior, Balian e Kim (2016), Siqueira e Carvalho (2017) e Wong, Yeo e Gan (2016), optaram por adicionar etapas manuais, de forma a auxiliar na melhora da imagem, para auxiliar na determinação de parâmetros para a abordagem ou até para alteração da contagem. Esta pode ser uma solução para os casos de grande variação nos tipos de micro-organismos analisados, muitas aglomerações, e muito ruído presente nas imagens.

A segmentação de aglomerações de UFCs, por sua vez, visa aumentar a acurácia da contagem. Os métodos mais utilizados nos artigos selecionados foram a transformada de watershed – quatro trabalhos, seguido por transformada de Hough – três trabalhos. No entanto, cada um deles apresenta suas limitações. A transformada de watershed, segundo Meyer (2012), tem como uma de suas maiores vantagens produzir contornos fechados para cada região segmentada, porém, como desvantagem, a técnica apresenta super-segmentação, resultando em contagens de falsos positivos. Já a transformada de Hough, segundo Pratt (2001), tem como uma de suas vantagens a detecção de elementos com características específicas, como os círculos que representam uma grande gama de UFCs, no entanto, deixa de detectar outros tipos de formação de UFCs, como as formas irregular ou filamentosa, e também não consegue segmentar aglomerações complexas.

Dentre as demais técnicas utilizadas, duas apresentaram resultados mais expressivos: Yoon, Lawrence e Park (2015) que utilizaram busca exaustiva dos máximos locais e busca do vizinho mais próximo, que, no entanto, apresenta como desvantagem um alto custo computacional; e Junior, Balian e Kim (2016) que utilizaram granulometria por correlação cruzada normalizada e MSER.

A técnica de granulometria por correlação cruzada proposta por Maruta (2011) tem sido utilizada com sucesso em aplicações voltadas a segmentação de grãos “grudados” durante a inspeção visual automática, das quais podemos citar as pesquisas de Araújo, Pessota e Kim (2015) e Belan et al. (2018) sendo, portanto, uma técnica que mostra bons resultados na segmentação de aglomerações e, portanto selecionada para comparação de resultados com a abordagem proposta.

Na literatura recente existem diversos trabalhos utilizando técnicas de visão computacional e inteligência artificial para segmentação e quantificação de UFCs isoladas e de UFCs aglomeradas a partir de imagens de placas de Petri, devido a ser uma rotina de laboratório extensivamente utilizada em diversos setores em todo o mundo.

A análise dos diversos artigos encontrados na literatura mostra que as abordagens desenvolvidas falham na etapa de segmentação de aglomerações de UFCs, desta forma, as pesquisas mais recentes têm se dedicado especialmente a esta etapa visando aumentar a acurácia na quantificação.

Estes trabalhos, no entanto, realizam a contagem de UFCs em placas de Petri nas quais há apenas uma única diluição da cultura de micro-organismos, impedindo sua utilização em placas que utilizam o método SP-SDS, com exceção do OpenCFU (GEISSMANN, 2013), que permite a delimitação de áreas independentes, sendo por este motivo selecionado para comparações de resultados com a abordagem proposta nesta pesquisa.

É importante mencionar que, no intuito de superar a limitação das abordagens quanto à contagem em diluições distintas, realizou-se a segmentação das diluições em imagens separadas e verificou-se que, ainda assim, as abordagens não foram capazes de realizar contagens.

1.2 JUSTIFICATIVA, LACUNAS E QUESTÃO DE PESQUISA

A automatização das rotinas de laboratório é uma realidade cada vez mais presente (RHOADS; NOVAK; PANTANOWITZ, 2015). Se considerarmos o cenário da Indústria 4.0, ou mais especificamente do Laboratório 4.0, que envolve digitalização, automação e troca de dados, a automação do processo de quantificação de UFCs é

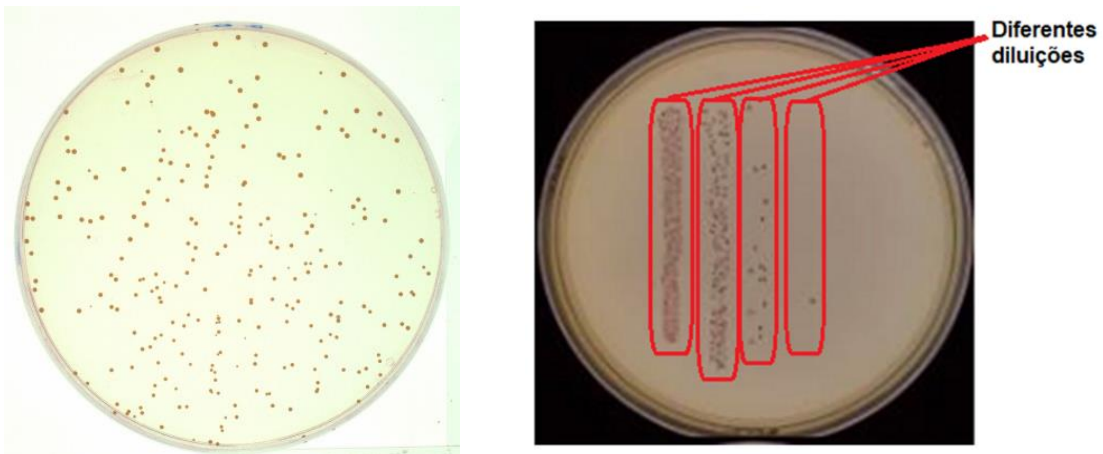
um passo nesta direção, uma vez que reduz significativamente o trabalho realizado manualmente e o tempo gasto por especialistas humanos no procedimento, substituindo as rotinas manuais por processos automatizados (RHOADS; NOVAK; PANTANOWITZ, 2015).

Segundo empresa de pesquisa de mercado *Research and Markets* (2018), o mercado global de contadores automatizados de colônias foi estimado em US \$ 310,0 milhões no ano de 2016 e espera-se que atinja aproximadamente US \$ 450,3 milhões até 2024 com um crescimento do mercado global a um CAGR (*Compound Annual Growth Rate*) de mais de 7,0% entre 2017 e 2024. Estas estimativas demonstram que a automação de laboratórios ainda não é um padrão e que ainda há muito a ser desenvolvido, testado e validado neste campo. Ainda segundo a empresa, o principal fator que impulsiona o crescimento do mercado de contadores automatizados de colônias é o aumento da automação de laboratório globalmente. A comercialização de projetos de pesquisa está aumentando o volume geral de processamento de amostras em cada projeto e, como resultado, a demanda por sistemas clínicos automatizados está aumentando rapidamente para manter a uniformidade e reduzir os erros humanos associados ao processamento manual.

Além da automatização, outro fator importante para os laboratórios é a sustentabilidade, na qual se busca substituir processos que utilizam muitos recursos por outros que reduzam o uso de materiais e, portanto, causem menor impacto ambiental (ULIANI et al., 2011).

A técnica padrão utilizada para desenvolvimento e análise de culturas de micro-organismos em placas de Petri é a técnica de espalhamento de diluição única, ilustrada na Figura 1 (a), que envolve uma grande quantidade de recursos materiais, tempo e mão de obra. Devido a isto, pesquisadores passaram a buscar alternativas para redução e uma técnica desenvolvida neste sentido é a diluição seriada em placa única (*Single Plate Serial Dilution Spotting*, ou SP-SDS) (JETT et al., 1997; THOMAS et al., 2015), ilustrada na Figura 1 (b), que vêm sendo utilizada em laboratórios. Ambas as técnicas são abordadas na seção 2.1.

Figura 1. Técnicas para desenvolvimento de culturas de micro-organismos em placas de Petri.



(a) Técnica padrão com diluição única

(b) Técnica SP-SDS com realce das diferentes diluições

Fonte: (a) <http://opencfu.sourceforge.net/samples.php> (b) Adaptado de Frost et al. (2016)

Assim sendo, a utilização da técnica SP-SDS e a contagem de UFCs por sistemas computacionais vêm ao encontro das metas de redução de custos, automatização e sustentabilidade em laboratórios. No entanto, as pesquisas encontradas na literatura até o presente momento apresentam estudos de abordagens computacionais que realizam a contagem de UFCs em placa de Petri na qual há apenas uma única diluição de cultura de micro-organismos, impedindo sua utilização em placas que utilizam a técnica SP-SDS, que considera múltiplas diluições por placa.

É importante observar que a contagem automática em SP-SDS difere da contagem em placa com diluição única. Numa placa preparada com a técnica SP-SDS existem áreas (ou regiões) que devem ser segmentadas (diferentes diluições) para a contagem de UFCs por diluição, conforme pode ser observado na Figura 1 (b).

Desta forma, um problema encontrado é que as abordagens encontradas na literatura estão voltadas a quantificação em imagens de placas de Petri contendo uma única diluição de cultura de micro-organismos, não havendo abordagens desenvolvidas para a técnica SD-SDS, que vem sendo mais utilizada devido às vantagens que apresenta. Portanto, percebe-se a necessidade de desenvolvimento de abordagens que possibilitem a quantificação de UFCs nas diferentes diluições em placas preparadas com a técnica SP-SDS. Ressalta-se ainda que não há banco de imagens disponível considerando essa técnica.

A quantificação de UFCs é uma tarefa que pode ser realizada usando técnicas de VC, especialmente as de segmentação. A literatura dos últimos cinco anos mostra que os pesquisadores têm utilizado diferentes técnicas para a segmentação e chegado a resultados de acurácia que variam entre 74 e 99,5%, sendo que um dos desafios enfrentados pelos pesquisadores na obtenção de uma maior acurácia tem sido a separação de aglomerados de UFCs, caracterizados por colônias que crescem muito próximas umas às outras e se sobrepõem parcialmente, e que impõem severas dificuldades às técnicas de segmentação (AUSTERJOST et al., 2017; BARBEDO, 2013; CHIANG et al., 2015; FERRARI et al., 2015; GEISSMANN, 2013; JAGGA; SINGH, 2018; JUNIOR; BALIAN; KIM, 2016; MARTINEZ-ESPINOSA et al., 2016; MATIĆ et al., 2016; SIQUEIRA; CARVALHO, 2017; WONG; YEO; GAN, 2016; YOON; LAWRENCE; PARK, 2015). Desta forma, a separação de aglomerações também se apresenta como um problema encontrado nas abordagens propostas, uma vez que as técnicas utilizadas podem levar a super-segmentação ou a não segmentação dos aglomerados, causando grande variação nas contagens e reduzindo a acurácia. Assim, apesar de haver diversas abordagens, muitas não lidam com a segmentação de aglomerados de UFCs. Isto mostra a necessidade de investigação de métodos e/ou técnicas que permitam uma melhor segmentação.

Há ainda outras lacunas na literatura relativas à quantificação de UFCs. O processo de captura de imagem de placa de Petri, por exemplo, é geralmente realizado em ambiente controlado de iluminação, eliminando sombras, reflexos e outras interferências que são comuns nas imagens adquiridas em ambientes sem controle ambiente. Lidar com imagens mais realistas, que representem o cotidiano de um laboratório de microbiologia, é um quesito importante para uma abordagem computacional a ser utilizada na prática. No entanto, não há sequer banco de imagens adquiridas em ambientes não controlados disponível na literatura.

Em resumo, percebe-se que há uma necessidade de implementação de métodos automatizados e sustentáveis de contagem de UFC nos laboratórios, tendo em vista que muitos laboratórios continuam realizando a contagem manualmente (MARTINEZ-ESPINOSA et al., 2016; MATIĆ et al., 2016; SIQUEIRA; CARVALHO, 2017; YOON; LAWRENCE; PARK, 2015), provavelmente devido a muitas das ferramentas disponíveis serem de alto custo (GEISSMANN, 2013; WONG; YEO; GAN, 2016); que as abordagens propostas na literatura utilizam imagens adquiridas em condições controladas, o que não é a realidade dos laboratórios; e que não há

abordagens na literatura desenvolvidas especificamente para a contagem de UFC em placas com múltiplas diluições. Estas premissas se apresentam como justificativa para a presente pesquisa.

Com base no que foi apresentado, surge a seguinte questão de pesquisa: Como desenvolver uma abordagem computacional capaz de encontrar e segmentar as áreas de diferentes diluições presentes em imagens de placas de Petri, preparadas com a técnica SP-SDS, para posterior contagem das UFCs isoladas e aquelas pertencentes aos aglomerados, com acurácia igual ou superior às relatadas na literatura?

1.3 OBJETIVOS DA PESQUISA

1.3.1 Objetivo geral

Desenvolver uma abordagem de visão computacional para quantificação de UFCs em imagens de placas de Petri preparadas conforme a técnica SP-SDS e adquiridas em situações reais de laboratório com acurácia igual ou superior às relatadas na literatura.

1.3.2 Objetivos específicos

- Investigar as técnicas de VC utilizadas para contagem automática de UFCs nos estudos encontrados na literatura.
- Compor uma base de imagens para ser usada nos experimentos e disponibilizá-la de forma que outros pesquisadores possam testar e validar seus métodos.
- Desenvolver uma abordagem capaz de separar as diferentes diluições.
- Desenvolver uma abordagem para segmentar UFCs isoladas e aglomerados de UFCs com acurácia igual ou superior àquelas relatadas na literatura.

- Conceber um *software* de fácil utilização a partir da abordagem desenvolvida.

1.4 PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES

As principais contribuições desta pesquisa são:

- Realce de bordas: Na segunda etapa da abordagem proposta é realizado o realce das bordas, tanto das UFCs isoladas como dos aglomerados de UFCs, o que melhora a segmentação na segunda e terceira etapas, uma vez que as bordas dos objetos ficam melhor definidas.
- Melhoria de performance: Na segunda etapa, é medido o raio das UFCs isoladas e esta informação é utilizada na etapa seguinte. Uma vez que os aglomerados de UFCs são formados por UFCs com raios semelhantes aos das UFCs isoladas, isto permite que o algoritmo defina uma escala mais adequada de modelos ou *templates*, melhorando a performance da granulometria por correlação cruzada.
- Banco de imagens: Os experimentos produziram um banco de imagens que, diferentemente dos bancos disponíveis na literatura, permite que pesquisadores avaliem algoritmos voltados para segmentação e contagem de UFCs em imagens de placas de Petri usando a técnica SP-SDS adquiridas em condições reais de laboratório.
- *Software*: Foi concebido um software a partir da abordagem desenvolvida.

As contribuições aqui apresentadas estão relatadas em artigos com coautoria da autora desta dissertação relacionados no APÊNDICE A.

1.5 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

No capítulo 2 são apresentados os fundamentos teóricos acerca de microbiologia e de técnicas de VC empregadas na abordagem proposta.

No capítulo 3 são descritos os métodos e materiais utilizados na pesquisa e no capítulo 4 mostra-se a abordagem computacional desenvolvida.

No capítulo 5 os resultados experimentais são exibidos e discutidos e, finalmente, no capítulo 6 são apresentadas as conclusões e as propostas para trabalhos futuros.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os tópicos relacionados ao desenvolvimento teórico desta dissertação são discutidos neste capítulo. Inicialmente, são apresentadas as técnicas para preparo de culturas de micro-organismos em placas de Petri, assim como os conceitos básicos relacionados a procedimentos laboratoriais em microbiologia. A seguir, são apresentadas as técnicas de visão computacional empregadas na abordagem proposta e, na sequência, os trabalhos encontrados na literatura sobre contagem automática de UFCs considerando o período de 2013 a março/2018.

2.1 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS EM MICROBIOLOGIA

Em microbiologia, muitos procedimentos laboratoriais dependem da obtenção de populações puras de micro-organismos que são cultivadas em meios de cultura sem a presença de outras formas de vida, assim chamadas de culturas puras. Para se obter uma cultura pura, realiza-se a semeadura dos micro-organismos na superfície de meios de cultura sólidos em placas de Petri e incuba-se em temperatura adequada, permitindo a formação de colônias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Colônias de micro-organismos são populações isoladas que crescem na superfície de meios de cultura a partir, em geral, de um organismo, chamado de unidade formadora de colônia (UFC) viável, ou seja, um organismo vivo que pode se reproduzir (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012), como pode ser observado na Figura 2. É preciso observar que uma UFC pode representar mais de um organismo, principalmente devido ao fato de muitas bactérias não existirem naturalmente como uma célula única (SANDLE, 2018).

Figura 2. Colônias de micro-organismos.



Fonte: Programa de Pós-graduação em Biofotônica Aplicada a Ciências da Saúde – UNINOVE.

Para que estas colônias se desenvolvam, é necessário que o meio de cultura tenha nutrientes apropriados ao seu desenvolvimento, assim como condições físicas ou ambientais favoráveis (BORZANI et al., 2001). Para tanto, existem vários meios de cultura de micro-organismos para placas de Petri que variam em função do meio nutricional mais adequado a cada tipo de micro-organismo, capacidade de visualização e classificação das colônias formadas. Da mesma forma, existem diversos tipos de micro-organismos, que possuem uma morfologia de colônia característica, por vezes em forma circular, por outras espiralada, por exemplo. Em função disto, um método de detecção e contagem de UFCs pode não ser adequado para a leitura de meios de cultura diferentes, ou de colônias de micro-organismos diferentes (BORZANI et al., 2001).

Devido a contagem manual de UFC ser um processo cansativo que exige muita atenção e acuidade visual, as contagens podem apresentar erros entre contagens realizadas pelos mesmos operadores ou entre laboratórios. É importante notar que em ensaios com baixas quantidades de colônias, pequenos erros têm efeitos significativos. Segundo Sutton (2011), há diversos motivos para erros na contagem de UFCs:

- A contagem de UFCs, por ser repetitiva, pode levar a erros e, assim, a problemas de integridade de dados.
- A superlotação de UFCs numa placa pode levar a resultados falsos.
- A alta densidade de UFCs dificulta a interpretação.

- Dificuldade de interpretação de UFCs perto da borda de placa, como no exemplo da Figura 3.
- Existência de sobreposição (aglomerados) onde UFCs são difíceis de distinguir, exemplificado na Figura 4.

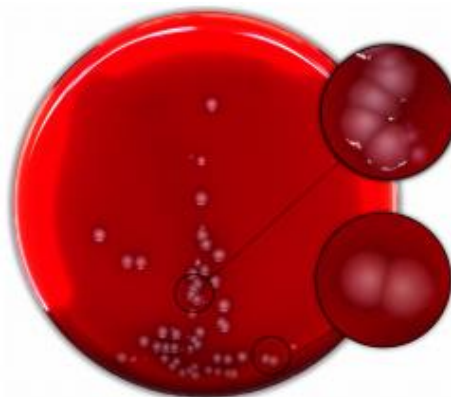
Figura 3. Colônias muito próximas à borda.



Fonte: Sandle (2018)

Uma das maiores dificuldades de interpretação na contagem de UFCs são os aglomerados de UFCs. Durante o crescimento, algumas UFCs acabam se desenvolvendo muito próximas a outras, o que leva ao aparecimento de aglomerações, como pode ser observado na Figura 4. Por padrão, no procedimento manual, a contagem de UFCs destas aglomerações depende especificamente da possibilidade de separação a olho nu e, quando esta separação não é possível, a aglomeração é contada como uma única UFC.

Figura 4. Aglomeração de colônias.



Fonte: Ferrari et al.(2015)

A detecção e contagem de colônias de micro-organismos é uma prática de laboratório bastante utilizada em diversos setores como alimentício, médico, e farmacológico, que consiste na contagem de UFCs viáveis numa amostra (YOON; LAWRENCE; PARK, 2015). Para o desenvolvimento de amostras, são realizadas sementeiras do meio de cultura, a partir de uma suspensão de micro-organismos, em diversas diluições, em geral diluições entre 10^{-1} e 10^{-7} , em placas de Petri separadas que são incubadas a temperatura controlada, permitindo o crescimento de colônias, procedimento que é considerado uma técnica padrão para sementeira de culturas (MADIGAN et al., 2017).

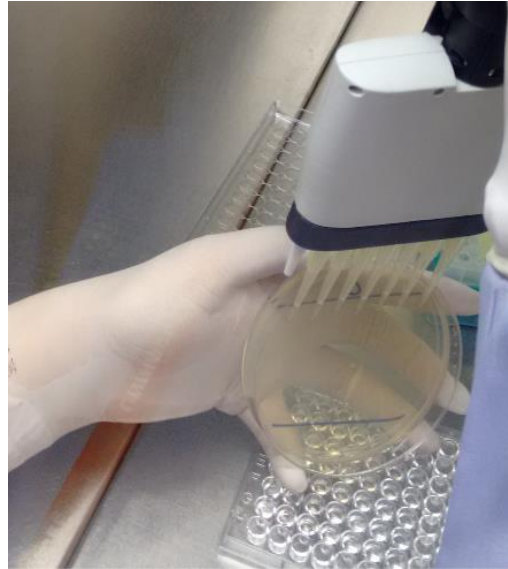
Esta técnica padrão de sementeira de culturas de micro-organismos leva em consideração o fato de que não se sabe qual diluição permitirá a contagem conforme a regra padrão, ou seja, a partir de qual diluição serão obtidas entre 30 e 300 UFCs que estarão isoladas o suficiente para serem contadas (YOON; LAWRENCE; PARK, 2015). Estes valores são determinados devido aos seguintes fatos: números de UFCs acima de 300 podem facilmente resultar em subestimação, uma vez que colônias individuais não podem ser discriminadas quando há muitas UFCs presentes, e números abaixo de 30 resultam em altos desvios-padrão de contagem pois, considerando que a contagem de CFU segue a distribuição de Poisson, o erro da estimativa equivale à raiz quadrada da média, assim, quando o número de UFC/placa cai abaixo da faixa contável, o erro como porcentagem da média aumenta consideravelmente (SIEUWERTS et al., 2008).

A ASTM *Internacional* (antiga ASTM - *American Society for Testing and Materials*) sugere intervalos contáveis de 20-80 UFC/membrana, 20-200 para placas de inoculação por superfície e 30-300 para placas de inoculação por profundidade. Já o *Bacteriological Analytical Manual* da *Food and Drug Administration* dos EUA recomenda 25-250 UFC/placa como um intervalo contável (SUTTON, 2011). Para contagem em placas com múltiplas diluições ainda não há um padrão estabelecido ou recomendação de intervalo contável.

É preciso notar que a técnica padrão gera o desenvolvimento de culturas em sete placas de Petri, ou seja, sete diluições para cada amostra que se deseja analisar. Além do mais, é preciso preparar ao menos duas réplicas de cada diluição para validação estatística, resultando num total de 21 placas preparadas, levando a desperdício considerável de recursos como tempo, mão de obra e materiais.

A técnica SP-SDS, por sua vez, permite a semeadura de mais de uma diluição numa mesma placa utilizando pipeta multicanal, na qual todas as diluições são semeadas no meio de cultura ao mesmo tempo em uma única placa, conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 5. Semeadura em placa de Petri pela técnica SP-SDS.



Fonte: Programa de Pós-graduação em Biofotônica Aplicada a Ciências da Saúde – UNINOVE.

Pesquisas realizadas mostram que, estatisticamente, não há diferenças substanciais entre as contagens realizadas pela técnica padrão em placas com uma diluição e contagens pela técnica SP-SDS em placas com diversas diluições (BARON et al., 2006; JETT et al., 1997; THOMAS et al., 2015). Contudo, pela técnica SP-SDS, preparando apenas uma placa com mais duas réplicas para validação estatística resultam apenas três (3) placas, o que demonstra economia considerável de recursos como tempo, mão de obra e materiais.

Apesar das vantagens apresentadas e do aumento na utilização da técnica SP-SDS, ainda não há estudos suficientes e regulamentação pelos órgãos competentes para que esta seja utilizada como técnica padrão.

2.2 VISÃO COMPUTACIONAL

A principal função das aplicações em VC é de extrair características importantes a partir dos elementos de uma imagem, visando a descrição e interpretação de uma cena; ou então, de fornecer dados a serem utilizados por outras técnicas de processamento de imagens (GONZALEZ; WOODS, 2011).

A representação e manipulação de uma imagem requer a definição de um modelo matemático adequado da mesma (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008). Uma imagem digital I pode ser representada por uma função bidimensional $I: \mathcal{D} \rightarrow \mathbb{K}$, sendo $\mathcal{D} \subseteq \mathbb{Z}^2$, e um conjunto de pixels p representados pelas coordenadas $(p_x, p_y) \in \mathcal{D}$, com valores $\mathbb{K} = \{0, 1, \dots, 2^{nBits} - 1\}^{nBandas}$, sendo $nBits$ o número de *bits* utilizado na quantização da imagem e $nBandas$ o número de bandas de cor da imagem (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).

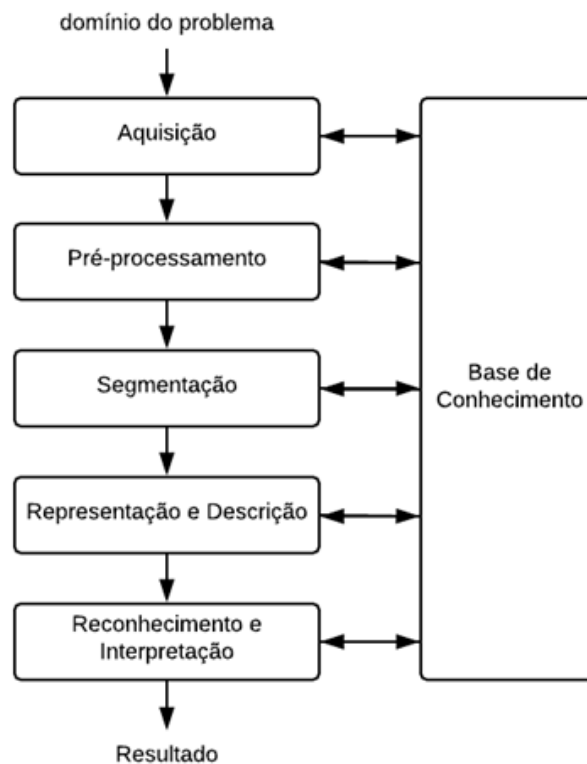
Uma imagem é chamada de binária quando temos $nBits = 1$ e $nBandas = 1$. Neste caso, cada pixel pode assumir o valor 0 ou 1, denotando-se esta imagem por $I_{bin}: \mathcal{D} \subseteq \mathbb{Z}^2 \rightarrow \mathbb{K} = \{0, 1\}$ (GONZALEZ; WOODS, 2011)

Para uma imagem em níveis de cinza, temos $nBits > 1$ e $nBandas = 1$, sendo que os pixels assumem valores que variam de 0 a $2^{nBits} - 1$, denotando-se a imagem por $I_{gray}: \mathcal{D} \subseteq \mathbb{Z}^2 \rightarrow \mathbb{K} = \{0, 1, \dots, 2^{nBits} - 1\}$, com 0 representando o nível mais escuro de cinza (preto), $2^{nBits} - 1$ representando o nível mais claro (branco) e, por conseguinte, os valores intermediários representando diferentes níveis de cinza (GONZALEZ; WOODS, 2011)

Uma imagem é denominada multibandas quando $nBits > 1$ e $nBandas > 1$, denotando-se por $I_{cor}: \mathcal{D} \subseteq \mathbb{Z}^2 \rightarrow \mathbb{K} = \{0, 1, \dots, 2^{bits} - 1\}^{nBandas}$. Cita-se como exemplo uma imagem no sistema de cores *RGB* (*Red, Green, Blue*) em que cada pixel é representado por três valores, respectivamente, a intensidade de vermelho (R), a intensidade de verde (G) e a intensidade de azul (B). Uma imagem RGB pode ser denotada por $I_{RGB}: \mathcal{D} \subseteq \mathbb{Z}^2 \rightarrow \mathbb{K} = \{0, 1, \dots, 2^{bits} - 1\}^3$. É importante observar que uma imagem multibandas pode ser decomposta em um vetor de imagens de níveis de cinza, isto é, $I_{RGB} = (I_R, I_G, I_B)$, sendo I_R , I_G e I_B as imagens com intensidade de vermelho, verde e azul de I_{RGB} (GONZALEZ; WOODS, 2011).

Um sistema de processamento digital de imagens é um conjunto de etapas capazes de produzir um resultado a partir do domínio do problema (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008), como ilustrado na Figura 6.

Figura 6. Etapas de um sistema de processamento de imagens.



Fonte: (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008, p. 4)

As etapas apresentadas na Figura 6, segundo Pedrini e Schwartz (2008), podem ser descritas da seguinte maneira:

- **Aquisição:** trata-se da forma pela qual a imagem é capturada por um dispositivo sensor, seja uma câmera ou scanner, e convertida em uma representação adequada para o processamento digital. Os aspectos envolvidos nesta etapa são a escolha do sensor, as condições de iluminação, a resolução e o número de níveis de cinza ou cores da imagem digitalizada.
- **Pré-processamento:** visa melhorar a qualidade da imagem, que pode apresentar imperfeições ou degradações, por meio da aplicação de técnicas específicas, podendo-se citar a conversão de imagem RGB para níveis de cinza e a utilização de filtros para a atenuação de ruído ou realce de bordas.

- Segmentação: realiza a extração e identificação de regiões de interesse contidas na imagem, como por exemplo a separação de cada diluição presente na placa de Petri.
- Representação e descrição: os dados obtidos na etapa de segmentação devem ser representados por estruturas adequadas de forma a manipular e armazenar as regiões de interesse. Já as características ou propriedades dessas regiões devem ser descritas por atributos numéricos de forma a auxiliar na diferenciação das mesmas.
- Reconhecimento e interpretação: o reconhecimento é um processo que atribui um identificador ou rótulo às regiões de interesse da imagem com base nas características dos seus descritores. Já a interpretação consiste em dar um significado ao conjunto de objetos reconhecidos. Dessa forma, é possível, por exemplo, identificar cada diluição.
- Base de conhecimento: contém o conhecimento adquirido e armazenado sobre o problema. Pode-se citar como exemplo a informação prévia da quantidade de diluições presentes em uma placa de Petri.

Na abordagem proposta, as etapas citadas anteriormente são utilizadas diversas vezes durante o processamento, uma vez que é necessário segmentar as diluições, segmentar as UFCs isoladas e segmentar os aglomerados de UFCs. Em cada uma das referidas segmentações há a extração de informações que são utilizadas para apresentação dos resultados de contagem de UFCs por diluição.

As técnicas e métodos de VC existentes na literatura constituem um amplo universo, portanto, nas subseções 2.2.1 a 2.2.9 são apresentados apenas aqueles empregados na abordagem desenvolvida nesta pesquisa.

2.2.1 Filtragem

O objetivo de uma operação de filtragem é melhorar a qualidade da imagem através de suavização ou acentuação de determinadas características podendo ocorrer no domínio do espaço ou no domínio da frequência. O domínio do espaço se refere ao próprio plano da imagem, ou seja, ao conjunto de pixels que compõem uma

imagem, e o domínio da frequência se refere ao comportamento periódico em uma imagem (GONZALEZ; WOODS, 2011).

A filtragem no domínio do espaço é uma transformação da imagem pixel a pixel que depende do valor do nível de cinza de um determinado pixel e dos valores dos níveis de cinza dos pixels vizinhos, e é realizada através da utilização de matrizes denominadas janelas ou máscaras que são aplicadas sobre a imagem (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008). Esta transformação é também conhecida como uma operação de convolução.

Os filtros podem ser classificados em três categorias: passa-baixas, passa-altas e passa-faixa. Na abordagem proposta empregam-se apenas os dois primeiros.

Os filtros passa-baixas atenuam as altas frequências relacionadas com informações de detalhes da imagem; os passa-altas realçam as altas frequências; e os passa-faixa selecionam um intervalo ou faixa de frequência para ser realçado (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

O efeito de um filtro passa-baixas é o de suavização da imagem, em que as transições abruptas entre níveis de cinza são atenuadas, minimizando o efeito de ruído e, devido ao borro causado pela passagem do filtro, permite a remoção de detalhes finos, como sombras e reflexos (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

Seja, por exemplo, uma janela genérica K de ordem 5×5 , conforme a Figura 7:

Figura 7. Janela K de ordem 5×5 .

k_1	k_2	k_3	k_4	k_5
k_6	k_7	k_8	k_9	k_{10}
k_{11}	k_{12}	k_{13}	k_{14}	k_{15}
k_{16}	k_{17}	k_{18}	k_{19}	k_{20}
k_{21}	k_{22}	k_{23}	k_{24}	k_{25}

Denotando-se os níveis de cinza sob a janela, centrada em qualquer ponto da imagem, por k_1, k_2, \dots, k_{25} , obtém-se a resposta R de um filtro de média:

$$R = (k_1 + k_2 + \dots + k_{25})/25 \quad (1)$$

Se o centro da janela estiver numa posição (x, y) da imagem, o pixel desta posição será substituído por R . A janela é movida para a próxima posição, repetindo-se o processo até que toda a imagem tenha sido percorrida. É importante destacar que os valores R são armazenados em uma nova imagem, evitando-se que eles sejam usados no cálculo dos valores subsequentes ao invés dos valores originais da imagem que está sendo filtrada (GONZALEZ; WOODS, 2011).

Na abordagem proposta, emprega-se o filtro de mediana para redução de ruído. Neste filtro, os valores de intensidade dos pixels da janela K são ordenados de forma crescente em um vetor v , atribuindo-se para R o elemento central de v (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

Já o efeito de um filtro passa-altas é o de realce da imagem, em que as transições abruptas entre níveis de cinza são acentuadas, realçando as bordas dos objetos, porém com o inconveniente de realçar também os ruídos (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).

Na abordagem proposta é utilizado o filtro de Sobel bidirecional para realce de bordas. De forma simplificada, seu processamento fornece a direção do aumento de intensidade e a taxa de alteração nesta direção através do cálculo da aproximação do gradiente da função de intensidade da imagem. Para isto, calculam-se as derivadas parciais nas direções horizontal e vertical (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).

Sejam as janelas genéricas K_x e K_y de dimensão ímpar, conforme a Figura 8:

Figura 8. Máscaras genéricas K_x e K_y .

-1	0	+1
-2	0	+2
-1	0	+1

K_x

-1	-2	-1
0	0	0
+1	+2	+1

K_y

As transições horizontais e verticais são computadas pela convolução entre a imagem em níveis de cinza G e as janelas K_x e K_y , conforme as equações 2 e 3 a seguir.

$$K_x = K_x * G \quad (2)$$

$$K_y = K_y * G \quad (3)$$

Em cada ponto da imagem, calcula-se uma aproximação do gradiente nesse ponto combinando os resultados das convoluções conforme a equação 4.

$$K = \sqrt{K_x^2 + K_y^2} \quad (4)$$

Ou, calcula-se a aproximação do gradiente nesse ponto pela equação 5, que tem custo computacional inferior.

$$|K| = |K_x| + |K_y| \quad (5)$$

O ângulo de orientação da borda que dá origem ao gradiente espacial é dado pela equação 6:

$$\theta = \arctg(K_x/K_y) \quad (6)$$

em que θ indica a direção do gradiente.

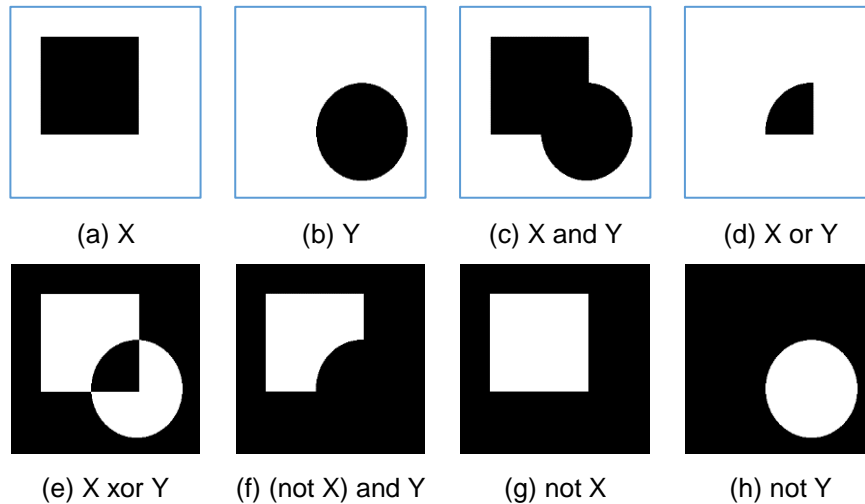
2.2.2 Operações lógicas e aritméticas

As operações lógicas e aritméticas podem ser utilizadas para modificar imagens, como, por exemplo, para extrair a região de interesse (ROI) e informações indesejadas da imagem.

Uma abordagem muito utilizada para a segmentação de objetos do fundo da imagem é a subtração de fundo. Para tal, cria-se uma imagem chamada de máscara de mesma dimensão que a imagem da qual se deseja extrair a ROI, de forma que os valores dos pixels sejam tais que, quando realizada a operação pixel a pixel o resultado seja apenas a ROI.

Algumas operações lógicas comumente utilizadas são AND, OR, XOR e NOT podendo serem combinadas entre si para formar qualquer outra operação lógica. Os resultados destas operações lógicas entre duas imagens binárias são apresentados na Figura 9.

Figura 9. Exemplos de operações lógicas em imagens binárias.



Fonte: (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999, p. 32 adaptado)

2.2.3 Limiarização

A detecção e reconhecimento de um objeto numa imagem digital é um dos problemas mais comuns encontrados no processamento de imagens e depende da escolha da técnica mais adequada para isolar/separar objetos uns dos outros, além de separá-los do fundo. As técnicas comumente empregadas realizam operações de simplificação da imagem através da detecção e realce dos limites dos objetos, num processo conhecido como segmentação de imagens. Em outras palavras, as técnicas de segmentação se referem ao processo de particionamento de uma imagem em vários segmentos, com o objetivo de simplificar e/ou mudar a representação de uma imagem para facilitar a sua análise (SHAPIRO; STOCKMAN, 2001).

A limiarização é um processo de segmentação de imagens que se baseia na diferença dos níveis de cinza que compõe diferentes objetos contidos em uma imagem. Para isto, utiliza-se um limiar estabelecido de acordo com as características dos objetos que se quer isolar, segmentando a imagem em dois grupos: o grupo de

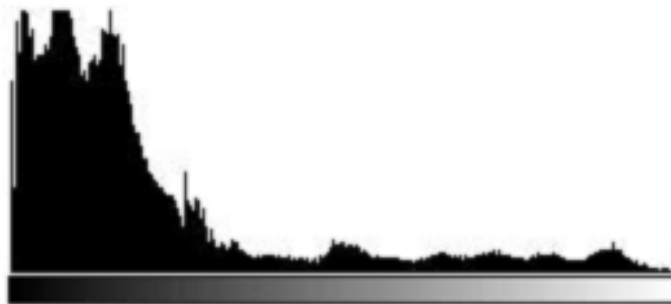
pixels com níveis de cinza do limiar e abaixo deste e o grupo de pixels com níveis de cinza acima do limiar (GONZALEZ; WOODS, 2011; PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

O caso mais comum de limiarização é a binarização que consiste em separar as regiões de uma imagem em níveis de cinza G em duas classes - fundo e objetos, gerando uma imagem binária B (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

Na limiarização global normalmente se define um limiar L com base no histograma de uma imagem G , que representa a distribuição dos seus níveis de cinzas, conforme ilustrado na Figura 10, para então realizar a separação dos pixels em duas classes da seguinte maneira:

$$B(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{se } G(x, y) > L \\ 0 & \text{se } G(x, y) \leq L \end{cases} \quad (7)$$

Figura 10. Exemplo de histograma de uma imagem.



Fonte: (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999, p. 57)

A limiarização global é eficiente quando os objetos têm níveis de cinza bem comportados, o que não ocorre quando as imagens apresentam luminosidade irregular (GONZALEZ; WOODS, 2011), como é o caso das imagens processadas pela abordagem proposta neste trabalho.

Um método de limiarização global amplamente utilizado é o método de Otsu que se baseia no fato de que o histograma de uma imagem é composto por diferentes intensidades de cinza que sinalizam duas classes: os pixels do objeto e os pixels do fundo, e cada classe possui características próprias de média e desvio padrão (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

O método de Otsu calcula a variância $\sigma_{L_i}^2$ e a média μ_{L_i} globais e procura maximizar a razão $\eta(L_i)$ da variância entre as classes em relação à variância total para todos os valores possíveis limiares L_i ($i = 0, 1, \dots, 2^{nBits} - 1$). Assim, o limiar ótimo pode ser determinado por $L^* = \text{argmax } \eta(L_i)$. Este método apresenta bom desempenho quando a imagem apresenta maior variância de intensidade e também pode ser utilizado para limiarização multinível. (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

A limiarização adaptativa ou limiarização local, por sua vez, seleciona um limiar individual para cada pixel, baseado na intensidade estimada em uma vizinhança local, para definir se determinado pixel será considerado preto (0) ou branco (1) na imagem binária. Neste caso, a imagem original é dividida em regiões e para cada região é determinado um limiar independente (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

Existem diversos métodos de limiarização adaptativa, neste trabalho foi utilizada a limiarização adaptativa gaussiana. Nela, o limiar $L(x, y)$ é determinado pela média das intensidades dos pixels dentro de uma região delimitada por uma janela gaussiana W de dimensões $m \times m$, como descrito nas equações 8 a 10:

$$B(x, y) = \begin{cases} 1 & \text{se } G_circle > L(x, y) \\ 0 & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (8)$$

O valor do limiar $L(x, y)$ é a soma ponderada da janela gaussiana W , dada pela equação 9, com uma região de mesma dimensão centrada no ponto (x, y) menos uma constante (BRADSKI, 2000).

$$W(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}} \quad (9)$$

O desvio padrão σ é dado pela equação 10:

$$\sigma = 0.3 * ((m - 1) * 0.5 - 1) + 0.8 \quad (10)$$

2.2.4 Componentes conexos

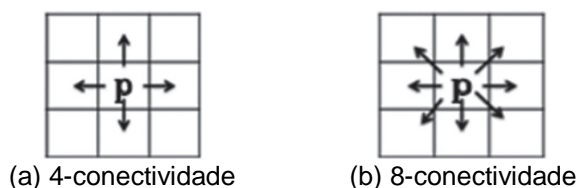
A conectividade entre pixels é um conceito usado na determinação de limites de objetos e componentes de regiões em uma imagem (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).

Para determinar se dois pixels são conexos, é necessário definir o critério de vizinhança e verificar se seus níveis de cinza obedecem a algum critério de similaridade. Tomando-se em consideração imagens binárias, que contêm apenas dois níveis de cinza (0 e 1), dois pixels vizinhos estão conectados se eles possuem o mesmo nível de cinza, obedecendo assim ao critério de similaridade (GONZALEZ; WOODS, 2011; PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

Seja V o conjunto de valores de tons de cinza utilizados para se definir a conectividade, numa imagem binária poderia se adotar $V = \{1\}$ para a conexão de pixels com valor 1 ou, numa imagem em tons de cinza, definir $V = \{32, 33, \dots, 63, 64\}$ para a conexão de pixels com valores de intensidade na faixa de 32 a 64. As duas formas mais comuns de vizinhança empregadas na análise de conectividade de pixels em imagens bidimensionais são: 4-conectividade e 8-conectividade, ilustradas na Figura 11, e definidas da seguinte forma:

- 4-conectividade $[N_4(p)]$: são 4-conexos de um pixel $p(x,y)$ todos os pixels localizados nas posições $(x+1, y)$; $(x-1, y)$; $(x, y+1)$ e $(x, y-1)$, com nível de cinza contidos em V (GONZALEZ; WOODS, 2011).
- 8-conectividade $[N_8(p)]$: são 8-conexos de um pixel $p(x,y)$ todos os pixels localizados nas posições $(x+1, y)$; $(x-1, y)$; $(x, y+1)$; $(x, y-1)$; $(x-1, y-1)$; $(x-1, y+1)$; $(x+1, y-1)$; $(x+1, y+1)$, com nível de cinza contidos em V (GONZALEZ; WOODS, 2011).

Figura 11. Conectividade de pixels.



Fonte:(BELAN; ARAÚJO; LIBRANTZ, 2012)

2.2.5 Morfologia matemática

A morfologia matemática aplicada a imagens digitais se refere ao estudo da estrutura geométrica das entidades presentes em uma imagem, sendo aplicada com objetivos distintos como, por exemplo, realce, filtragem, segmentação e detecção de bordas (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).

O princípio básico da morfologia matemática é uma operação entre conjuntos que consiste em se extrair uma informação relativa à geometria e à topologia de um conjunto desconhecido utilizando um outro conjunto definido chamado de elemento estruturante. Desta forma, percorre-se uma imagem com um elemento estruturante e se dimensiona como este se encaixa em determinadas regiões da imagem (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).

Normalmente, o elemento estruturante é formado por uma janela de dimensões iguais e ímpares com sua origem no pixel central do elemento. Quando a origem do elemento é deslocada sobre uma imagem, pixel a pixel, seus elementos são comparados com o conjunto dos pixels subjacentes. Se os dois conjuntos de elementos corresponderem à condição definida pela operação, o pixel sob a origem do elemento estruturante receberá um valor pré-definido (0 ou 1 para imagens binárias) (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

As operações morfológicas são usualmente aplicadas a imagens binárias, no entanto há técnicas disponíveis para imagens em tons de cinza. Dentre as operações mais fundamentais e mais utilizadas estão a dilatação e a erosão, das quais outras operações podem ser concebidas (GONZALEZ; WOODS, 2011).

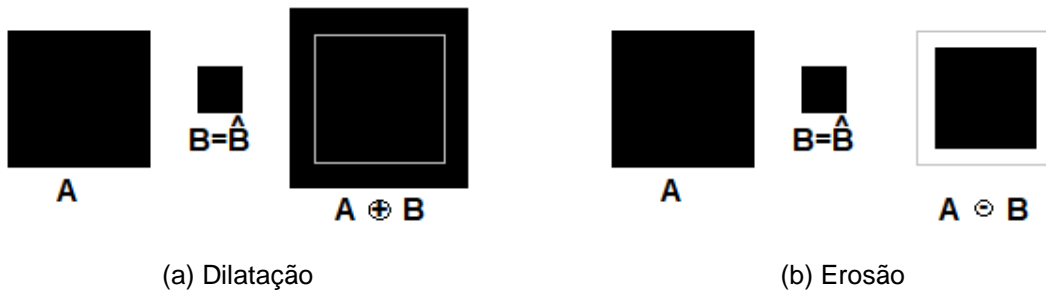
Sejam A o conjunto de pixels da imagem e B o conjunto de pixels do elemento estruturante, ambos no espaço \mathbb{Z}^2 , e seja \emptyset o conjunto vazio, a dilatação de A por B , denotada $A \oplus B$, é definida pela equação 11 e pode ser exemplificada através da Figura 12 (a).

$$A \oplus B = \{x | (\hat{B})_x \cap A \neq \emptyset\} \quad (11)$$

A erosão de A por B , denotada $A \ominus B$, é definida pela equação 12 e pode ser exemplificada através da Figura 12 (b):

$$A \ominus B = \{x | (\hat{B})_x \subseteq A\}$$

Figura 12. Operações morfológicas de dilatação e erosão (a delimitação em cinza serve apenas para demonstrar os limites anteriores da imagem original).



Fonte: (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999, p. 142, 143 adaptado)

Desta forma, a dilatação expande uma imagem enquanto a erosão a encolhe.

As operações de abertura e fechamento são operações que unem a erosão e a dilatação. A operação de abertura consiste na erosão de A por B seguida da dilatação do resultado por B ., conforme representado pela equação 13:

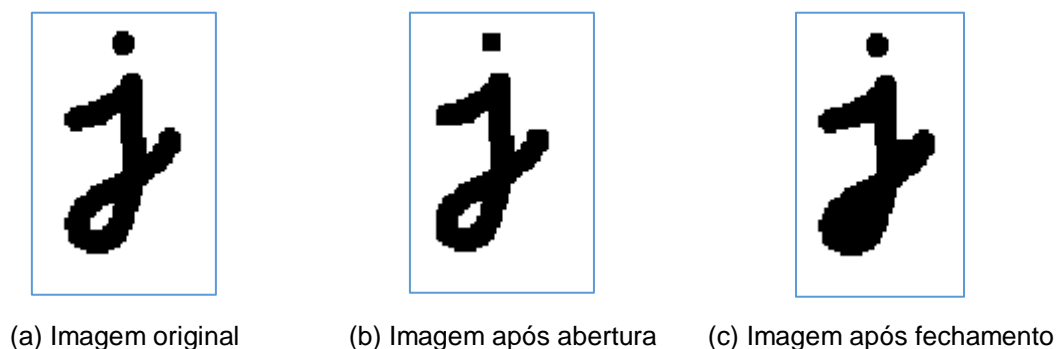
$$A \circ B = (A \ominus B) \oplus B \quad (13)$$

Já a operação de fechamento consiste na dilatação de A por B seguida da erosão do resultado por B . conforme representado pela equação 14:

$$A \bullet B = (A \oplus B) \ominus B \quad (14)$$

Os resultados da aplicação das operações de abertura e fechamento podem ser observados na Figura 13.

Figura 13. Operações morfológicas de abertura e fechamento.



Fonte: (SZELISKI, 2011, p. 127 adaptado)

Na operação de abertura há um nivelamento dos contornos pelo interior; separação das partículas, e eliminação das pequenas partículas com tamanho inferior em relação ao elemento estruturante. Na operação de fechamento há um preenchimento de regiões com tamanho inferior em relação ao elemento estruturante, como se pode observar na Figura 13 (c), e partículas próximas podem ser unidas ao conjunto (GONZALEZ; WOODS, 2011).

2.2.6 Rotação

A rotação é uma transformação geométrica aplicada a cada ponto (x, y) de uma imagem considerando um ângulo arbitrário θ mapeando este ponto para localidade de coordenadas (x', y') , onde x' e y' são calculadas pelas equações 15 e 16 (MARQUES FILHO; VIEIRA NETO, 1999).

$$x' = x \cos \theta + y \sin \theta \quad (15)$$

$$y' = y \cos \theta - x \sin \theta \quad (16)$$

nas quais *sen* e *cos* são, respectivamente, as operações de seno e cosseno.

A rotação ocorre em sentido horário quando $\theta > 0$ e anti-horário quando $\theta < 0$.

A operação de rotação foi empregada na abordagem proposta para correção da inclinação ou alinhamento da imagem visando facilitar a segmentação das ROIs relativas às diluições, como é explicado mais adiante na seção 4.1.

2.2.7 Transformada de Hough

As imagens utilizadas nesta pesquisa apresentam placas de Petri com fundo escuro e apenas a região referente ao interior dessas placas é considerada como ROI, a partir das quais se extraem a área referente a cada diluição.

Uma vez que a ROI é uma área delimitada por uma circunferência, optou-se por utilizar a técnica da transformada de Hough (TH), método matemático aplicável à

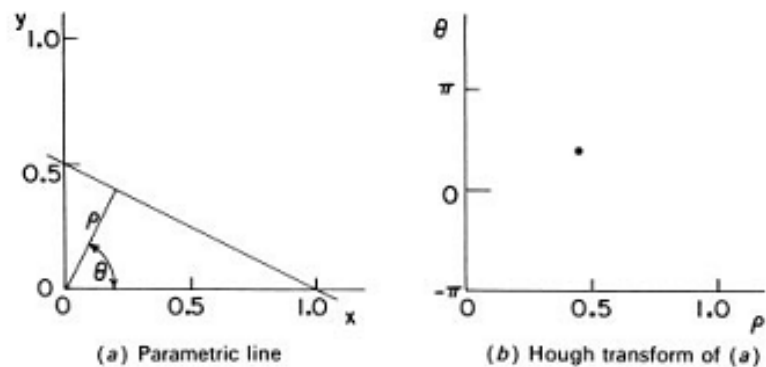
extração de características para detecção de retas, círculos, elipses e outras formas de fácil parametrização em imagens digitais.

A TH é uma técnica que foi proposta inicialmente para detecção de retas, e tem como princípio básico aplicar uma transformação em uma imagem de forma que todos os pontos pertencentes a uma mesma reta sejam mapeados para um único ponto que contém as informações dos parâmetros daquela reta, dadas pela equação 17:

$$(\theta, \rho): x \cos(\theta) + y \sin(\theta) = \rho \quad (17)$$

Em que ρ é a distância perpendicular da origem $(0,0)$ à reta e θ é o ângulo formado entre a reta perpendicular e o eixo x , como ilustrado no exemplo da Figura 14 (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

Figura 14. Parâmetros da TH.



Fonte: (PRATT, 2001, p. 571)

A TH para círculos funciona de maneira similar à TH para retas porém, enquanto na transformada para retas são necessários dois parâmetros, θ , ρ , na transformada para círculos são necessários três parâmetros x_c , y_c , ρ , em que x_c , y_c representam as coordenadas do centro da circunferência. No entanto, um terceiro parâmetro impossibilita a representação num espaço bidimensional, aumentando consideravelmente o custo computacional (PRATT, 2001).

Um círculo com raio ρ e centro (x_c, y_c) pode ser descrito pela equação 18.

$$\rho^2 = (x - x_c)^2 + (y - y_c)^2 \quad (18)$$

A representação paramétrica deste círculo sendo determinada pelas equações 19 e 20.

$$x = x_c + \rho \cdot \cos(\theta) \quad (19)$$

$$y = y_c + \rho \cdot \text{sen}(\theta) \quad (20)$$

Desta forma, é possível gerar uma matriz tridimensional contendo informações sobre as ocorrências das circunferências sobre a imagem, na qual os maiores números de repetições representam as coordenadas dos centros dos círculos detectados na imagem enquanto a profundidade indica o raio (PRATT, 2001).

Adicionalmente, a busca pode ser reduzida a um espaço bidimensional, se o raio ρ da circunferência a ser detectada for conhecido. Neste caso, o centro da circunferência detectada, representado pelas coordenadas (x_c, y_c) , será o ponto comum a todos os círculos detectados com estes parâmetros (SZELISKI, 2011).

Na abordagem proposta, como o raio da circunferência da placa de Petri é conhecido e semelhante para todas as imagens do banco de imagens utilizado, a busca pode ser reduzida a um espaço bidimensional, reduzindo o custo computacional da TH.

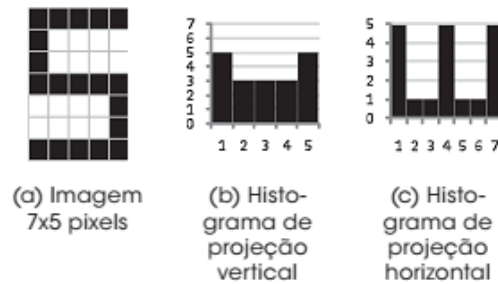
2.2.8 Histogramas de projeções

Dentre os métodos para determinação da inclinação das ROIs, optou-se por utilizar também os histogramas de projeções. Segundo Pedrini e Schwartz (2008), as projeções horizontais e verticais de uma imagem binária consistem, respectivamente, na soma dos pixels em cada linha e em cada coluna da imagem.

Trata-se de um método que utiliza a projeção da imagem em uma determinada direção, sendo as mais comuns as direções vertical e horizontal. Associa-se um vetor para cada direção no qual se armazena o número de pixels com uma determinada tonalidade de cinza que compõem o objeto que se deseja representar ou descrever (PEDRINI; SCHWARTZ, 2007). Desta forma, um histograma de projeção vertical, por exemplo, representa as quantidades de pixels pertencentes ao objeto em cada coluna,

enquanto um histograma de projeção horizontal representa as quantidades de pixels pertencentes ao objeto de cada linha (BELAN; ARAÚJO; LIBRANTZ, 2012), conforme pode ser observado na Figura 15. .

Figura 15. Exemplos de histogramas de projeção vertical e horizontal.



Fonte: (BELAN; ARAÚJO; LIBRANTZ, 2012)

Na abordagem proposta, utiliza-se a projeção vertical, pois as diluições estão alinhadas verticalmente.

2.2.9 Descritores de forma baseados em região

Após a segmentação de uma imagem em regiões ou objetos, os agrupamentos de pixels resultantes podem ser representados e descritos em formato apropriado para que possa ser reconhecido (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

Um objeto pode ser representado em termos de suas características externas, como as bordas, ou internas, como a quantidade de pixels que compõem o objeto. Assim, diversos descritores podem ser utilizados para representação das características de um objeto (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

A forma do objeto é uma informação que representa uma característica básica baseada em propriedades geométricas de suas bordas do objeto. Na abordagem proposta, a maior parte dos objetos de interesse são as UFCs isoladas, que se apresentam na forma circular. Assim, eles podem ser segmentados levando em conta a propriedade geométrica de circularidade. Já os aglomerados de UFCs não apresentam as mesmas características, e necessitam de outro tipo de processamento para segmentação.

O descritor de circularidade ε de uma região que representa um objeto ou UFC pode ser definido pelo perímetro P e área A da região, medidos em pixel, através da equação 21:

$$\varepsilon = \frac{P^2}{A} \quad (21)$$

O perímetro P representa o comprimento da borda do objeto e pode ser obtido pela contagem dos pixels ao longo da borda e a área A pode ser expressa como o número de pixels que representam o objeto (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

De acordo com este descritor, um círculo possui o maior valor de circularidade, em que $\varepsilon = 4\pi$, desta forma, quanto mais próximo deste valor, maior a circularidade do objeto (PEDRINI; SCHWARTZ, 2008).

2.2.10 Granulometria por correlação cruzada

A correlação cruzada é um processo de casamento de padrões e refere-se à comparação de duas matrizes em que se determina a correspondência entre elas através de uma medida de similaridade (GONZALEZ; WOODS, 2011).

Na correlação cruzada, utiliza-se um padrão (ou *template*) do qual se deseja detectar a ocorrência numa imagem. Para isto, desloca-se o padrão para todas as posições possíveis na imagem, e mede-se, em cada posição, o grau de semelhança entre o padrão e a imagem, na área em que se sobrepõem. Este grau de semelhança quando expresso pela taxa de correlação, indica que quanto mais próximo de 1 maior o grau de similaridade.

Na abordagem proposta, optou-se por utilizar granulometria por correlação cruzada, proposta por Maruta (2011) para a caracterização de nanoestruturas de silício, para a determinação da quantidade de UFCs presentes em aglomerados de UFCs.

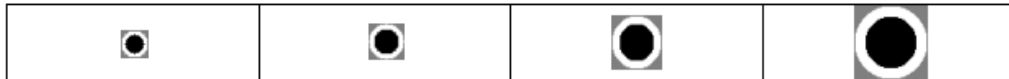
A correlação cruzada discreta entre uma imagem B e um modelo ou *template* τ , dada pela equação 22, é usada para encontrar o modelo τ na imagem B através

da operação de correspondência de modelos, ou *template matching*, , levando em conta a imagem do *template* τ corrigida pela média dos seus níveis de cinzas $\bar{\tau}$ ($\tilde{\tau} = \tau - \bar{\tau}$) subtraindo o nível de cinza médio $\bar{\tau}$ de cada pixel da imagem τ , e calculando a correlação cruzada $c(x, y) = \tilde{\tau}(x, y) \circ B(x, y)$. Desta forma, os picos da imagem c correspondem às ocorrências de τ em B (MARUTA, 2011).

$$\tau(m, n) \circ B = \sum_m \sum_n \tau(m, n) B(x + m, y + n) \quad (22)$$

Em seu trabalho, Maruta (2011) propôs realizar correlações cruzadas entre B e *templates* de núcleos circulares $\tau_j \in T$, em que T é o conjunto de templates, como os ilustrados na Figura 16., com diferentes raios r_j incrementados em progressão geométrica.

Figura 16. *Templates* τ_j de núcleos circulares.



Fonte: (MARUTA, 2011, p. 44)

Quanto ao valor dos pixels em cada *template*, a soma de todos os pixels negativos é -0,5, e a soma de todos os pixels positivos é +0,5. Assim, se os níveis de cinza da imagem B variam de 0 (preto) a 1 (branco), a imagem resultante da correlação variará de -1 a +1.

Maruta (2011) define que cinco (5) núcleos por oitava são suficientes para obter a invariância de escala. Sendo que uma oitava é um intervalo de escalas onde a escala final é duas vezes maior que a escala inicial.

Computando as correlações cruzadas entre a imagem B e os diferentes *templates* $\tau_j \in T$, ou seja, $c_i = \tilde{\tau}_j(x, y) \circ B(x, y)$, obtém-se as ocorrências de τ_j na imagem B como segue:

$$C(x, y) = \text{MAX}_{i=1}^n [c_i(x, y)] \quad (23)$$

Um pico em $C(x, y)$ corresponde a um objeto com características circulares semelhantes a τ_j em B .

3 MÉTODOS E MATERIAIS

3.1 CARACTERIZAÇÃO METODOLÓGICA DA PESQUISA

Do ponto de vista de sua natureza, a presente pesquisa pode ser caracterizada como aplicada, uma vez que objetiva gerar conhecimentos para aplicação prática dirigidos à solução de um problema específico.

A abordagem utilizada na pesquisa é quantitativa-qualitativa, pois visa quantificar o número de UFCs ao mesmo tempo que pretende analisar a qualidade da quantificação frente a outros métodos.

Já do ponto de vista do método, trata-se de uma pesquisa de delineamento experimental, pois consiste da determinação de um objeto de estudo, da seleção de variáveis capazes de influenciá-lo e da definição das formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto (GIL, 2002).

3.2 PROCEDIMENTOS PARA O LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Visando verificar os trabalhos realizados sobre contagem automática de UFCs nos últimos anos, foi realizado um levantamento bibliográfico levando em conta o período de 2013 a março/2018 nas bases de dados IEEE, *Nature*, *PubMed*, *SciELO*, *Science Direct*, *Scopus*, *Springer*, *Web of Science* e *Wiley*. Utilizaram-se as palavras-chave “contador automático” e “contagem de colônias”, e as palavras-chave em inglês, “*automatic counter*” e “*colony counter*”. Esta pesquisa resultou em artigos oriundos de congressos e periódicos relevantes nas áreas de computação e saúde.

Dentre os inúmeros artigos retornados pelas bases de dados, foram excluídos os que não se referiam a contagem automática de UFCs utilizando algoritmos que empregam técnicas e métodos de visão computacional para a realização da contagem, resultando numa seleção de 15 artigos relatados no Quadro 1.

3.3 PROCEDIMENTOS EMPREGADOS NA CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

Para condução dos experimentos dos quais se obteve a base de imagens foi utilizada cepa da bactéria *Streptococcus mutans* cultivada aerobicamente em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion*), incubada a 37°C por um período de 48 horas, e suspensão em solução salina fosfatada tamponada estéril (PBS - *phosphate buffered saline*) em pH 7,2.

Foram realizados 6 (seis) experimentos para *Streptococcus mutans* com azul de metileno e três repetições para cada experimento, divididos em controle (C), fluorescente (FS), LED 5 min (L), LED 5 min e 3s (0.3s), LED 6 min (1), e LED 7 min (2), totalizando 18 placas de Petri. Cada experimento foi preparado conforme a técnica SP-SDS, contendo sete (7) diluições.

Para determinação dos valores de referência da contagem foram efetuadas três contagens manuais para cada uma das 18 placas de Petri e individualmente para cada diluição. Como as diluições 1 e 2 apresentaram UFCs muito aglomeradas, não foi possível realizar contagem manual e, portanto, não foram contabilizadas, conforme a regra estabelecida para contagem. As médias aritméticas dos resultados são apresentadas na Tabela 1.

É importante observar que alguns experimentos exibem erros de diluição, apresentando um número de UFCs superior ao esperado. Apesar das imagens obtidas nestes experimentos apresentarem erros de procedimento microbiológico, elas foram utilizadas nesta pesquisa para efeito de análise da performance da abordagem proposta.

Tabela 1. Médias das contagens manuais.

	Imagem	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7		Imagem	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7
	img_0801	81	4	1	0	0		img_0810	116	55	36	12	35
C	img_0802	84	13	0	1	1	0.3s	img_0811	120	49	25	30	15
	img_0803	75	6	5	3	0		img_0812	121	47	26	22	29
	img_0804	84	15	3	3	5		img_0813	113	23	12	3	6
FS	img_0805	92	14	4	3	2	1	img_0814	135	33	5	7	15
	img_0806	67	17	2	1	2		img_0815	71	22	13	11	8
	img_0807	235	68	36	34	20		img_0816	68	14	5	2	8
L	img_0808	227	40	28	27	22	2	img_0817	83	25	5	3	2
	img_0809	218	60	27	32	23		img_0818	121	20	14	5	5

Para análise do desempenho da abordagem proposta, foram empregadas as medidas de acurácia (equação 24), precisão (equação 25), especificidade (equação 26) e sensibilidade (equação 27), levando em conta a contagem manual da Tabela 1.

$$acurácia = \frac{VP+VN}{VP+PF+FN+VN} \quad (24)$$

$$precisão = \frac{VP}{VP+PF} \quad (25)$$

$$especificidade = \frac{VN}{VN+FP} \quad (26)$$

$$sensibilidade = \frac{VP}{VP+FN} \quad (27)$$

em que VP são os verdadeiros positivos, VN são os verdadeiros negativos, FP são os falsos positivos, e FN são os falsos negativos.

3.4 MATERIAIS

3.4.1 Aquisição de imagens

A aquisição das imagens foi realizada com as placas posicionadas sobre fundo preto usando uma câmera Canon EOS DIGITAL REBEL XS, velocidade ISO-100, montada em pedestal, com distância focal de 48 mm e sem flash.

Além da iluminação ambiente, empregou-se lâmpada LED circular (50 mm) posicionada a 50 mm do lado direito da placa.

Não houve controle sobre as imagens adquiridas visando a obtenção de imagens reais do cotidiano de ensaios de laboratório, o que inclui a existência de sombras e reflexos, bolhas e contaminações no ágar, e experimentos com resultados falhos ou inesperados.

As imagens adquiridas estão disponíveis em www.saraujo.pro.br/cfu

3.4.2 Recursos empregados no desenvolvimento da abordagem proposta

A abordagem desenvolvida foi implementada em linguagem C/C++, uma vez que parte da abordagem (granulometria por correlação cruzada) já se encontrava desenvolvida nesta linguagem. Soma-se à isso a facilidade de implementação, utilizando o compilador DevC++ e a biblioteca OpenCV [31] devido à imensa quantidade de rotinas de visão computacional disponíveis. A interface com o usuário, por sua vez, foi implementada através do ambiente de desenvolvimento Microsoft Visual Studio 2017.

4 ABORDAGEM PROPOSTA

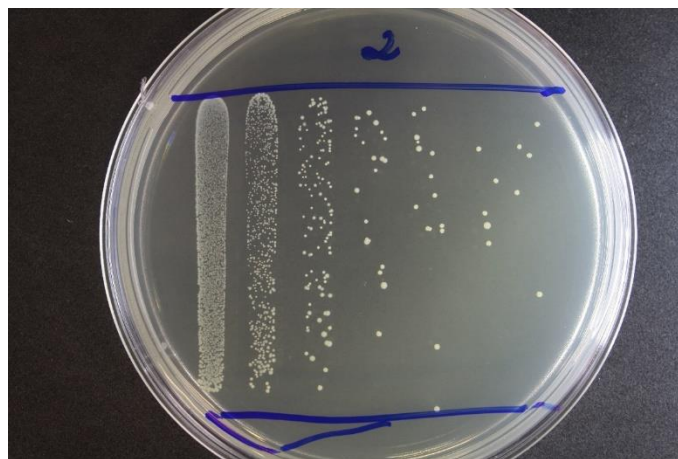
A abordagem desenvolvida é composta por três etapas principais: (i) processamento da imagem para obtenção das ROIs correspondentes às estrias das diluições presentes na imagem; (ii) segmentação e contagem de UFCs isoladas em cada diluição por meio de descritores de forma baseados em região; e (iii) segmentação de aglomerados e contagem de UFCs utilizando granulometria por correlação cruzada.

É importante notar que a primeira etapa é executada na imagem da placa de Petri e as etapas seguintes são executadas em cada ROI sequencialmente.

4.1 PRIMEIRA ETAPA – EXTRAÇÃO DAS ROIs

A abordagem proposta tem como entrada uma imagem colorida com 3888×2592 pixels, semelhante à imagem apresentada na Figura 17., denotada por $I_{RGB} = (I_R, I_G, I_B)$, sendo I_R, I_G, I_B , respectivamente, as bandas R, G e B, como explicado na seção 2.2.

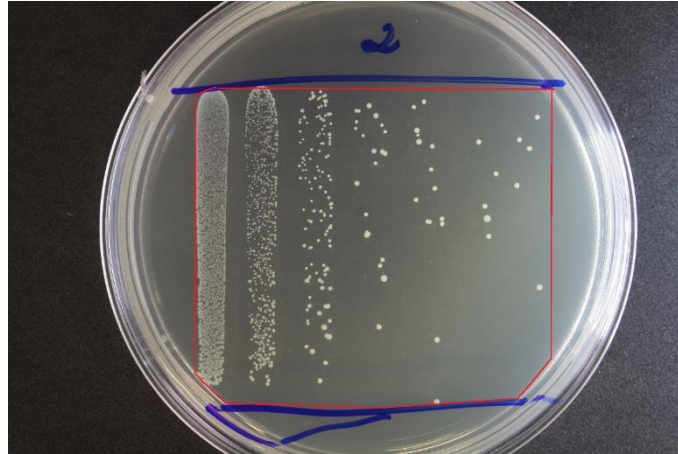
Figura 17. Imagem colorida I_{RGB} com 3888×2592 pixels.



É preciso mencionar que a região de interesse na primeira etapa do processamento é a aquela contida dentro da área circular denotada pela borda interna

da placa de Petri e entre as duas linhas delimitadoras azuis, conforme pode ser observado na Figura 18.

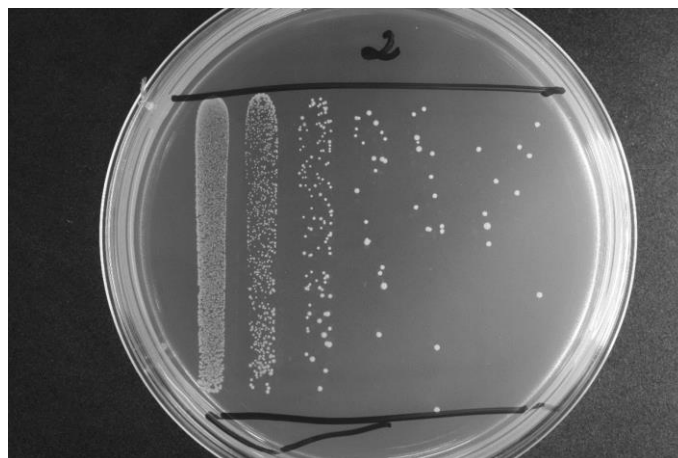
Figura 18. Exemplo de ROI evidenciado pela linha vermelha.



Inicialmente, I_{RGB} é convertida para níveis de cinza gerando a imagem G , ilustrada na Figura 19., conforme a equação 28.

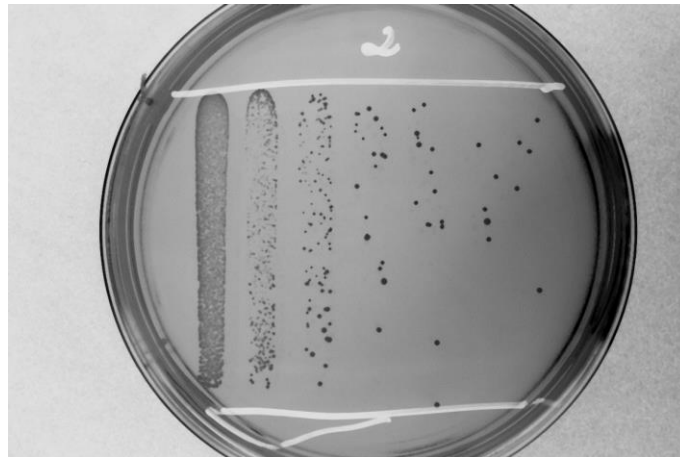
$$G(x, y) = 0,299 \times I_R(x, y) + 0,587 \times I_G(x, y) + 0,114 \times I_B(x, y) \quad (28)$$

Figura 19. Imagem em níveis de cinza G .



A seguir, visando a redução de ruído, é aplicado filtro de mediana em G usando uma janela 5×5 , resultando na imagem ilustrada na Figura 20. .

Figura 20. Imagem *G* após aplicação de filtro de mediana.



Para obtenção da parte interna da placa de Petri, utilizou-se TH para detectar a região de interesse, evidenciada em verde na Figura 21, da qual se obteve a imagem *G_circle*, mostrada na Figura 22.

Figura 21. Detecção da borda interna da placa de Petri por TH, evidenciada em verde.

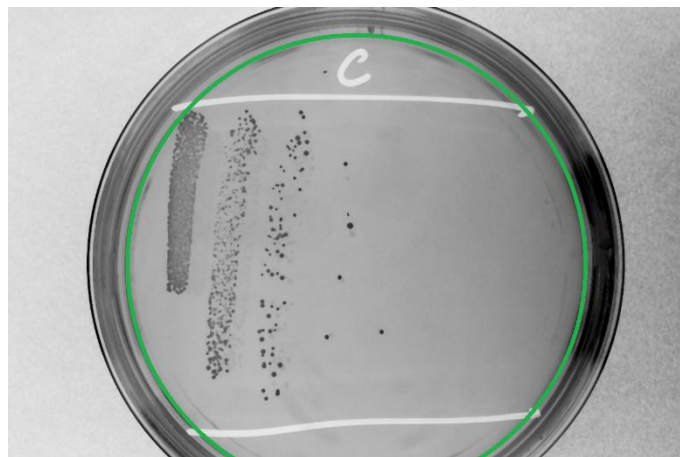
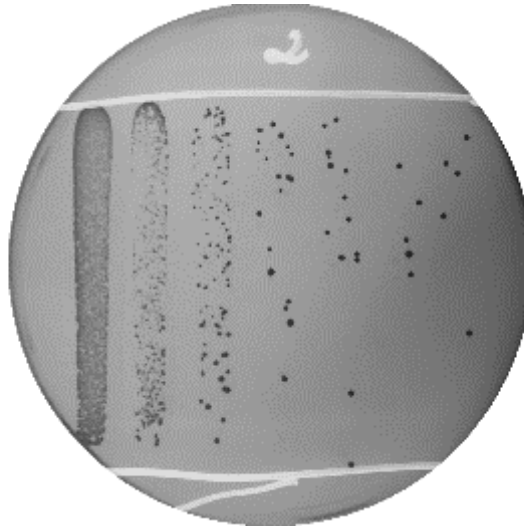
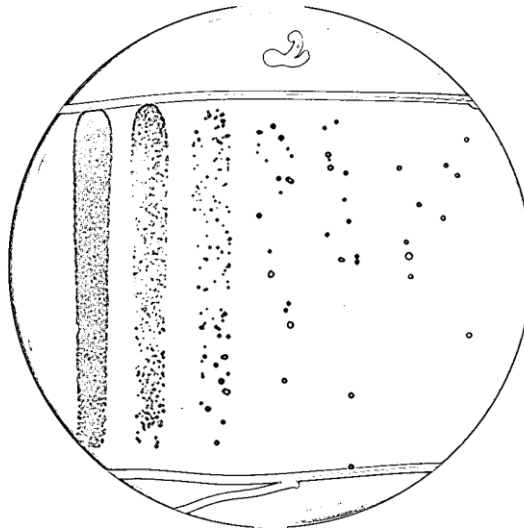


Figura 22. Imagem da área interna da placa *G_circle*.



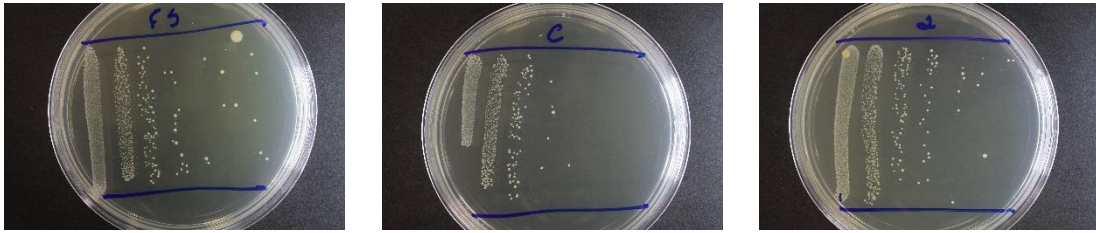
A seguir, aplicou-se limiarização adaptativa gaussiana usando uma janela 7×7 com $c = 4$ e $\sigma = 1.4$, resultando numa imagem binária B , ilustrada na Figura 23.

Figura 23. Imagem binária B , resultado da limiarização adaptativa gaussiana.



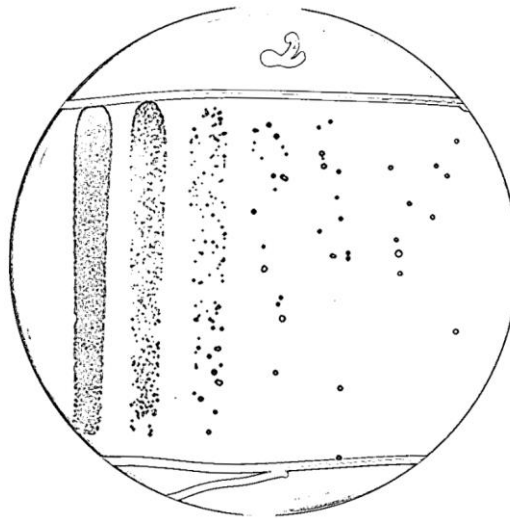
Como pode-se observar na Figura 24, percebe-se que as imagens apresentam diluições não alinhadas verticalmente, portanto, para facilitar a segmentação de cada diluição e evitar que UFCs de uma diluição sejam quantificadas em outra diluição, procedeu-se o alinhamento vertical das diluições para todas as imagens.

Figura 24. Exemplos de imagens com diluições não alinhadas verticalmente.



Para isso, utilizou-se a análise do histograma de projeções verticais de B , variando o ângulo de rotação θ da imagem de -15° a $+15^\circ$. O maior pico de projeção indica que as diluições estão em um ângulo de alinhamento de 90° , gerando a imagem B_{rot} , conforme ilustrado na Figura 25.

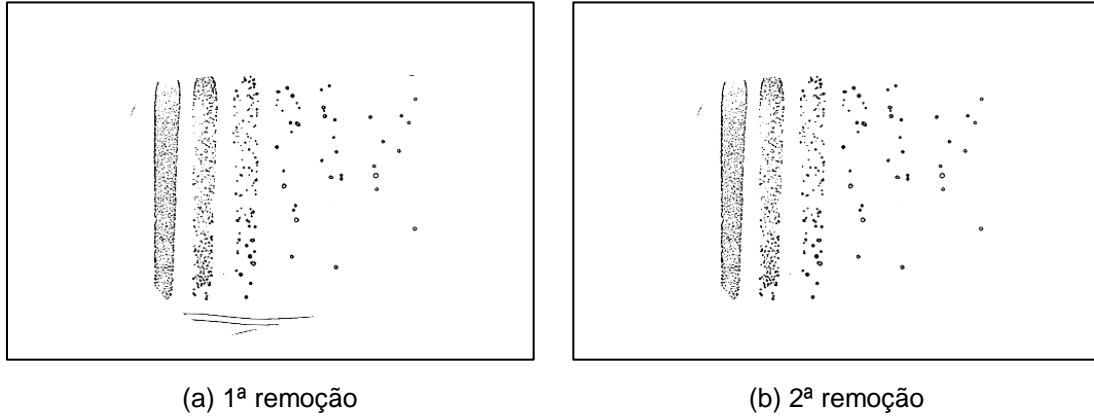
Figura 25. Imagem B_{rot} com diluições alinhadas verticalmente.



A seguir, visando obter apenas a região das diluições entre as duas linhas delimitadoras, removeram-se as regiões acima da linha delimitadora superior e abaixo da linha delimitadora inferior. Para tanto, utilizou-se TH para detecção das linhas delimitadoras, considerando-se uma faixa limitada de ângulos ($0^\circ \leq \theta \leq 15^\circ$ e $165^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$), e criaram-se máscaras adequadas de forma a eliminar a área externa à ROI. Também com o uso de máscaras, excluíram-se as linhas referentes à borda da circunferência. No entanto, como pode ser observado na Figura 26 (a), nem toda a linha delimitadora foi detectada e removida adequadamente. Isso ocorre quando a linha não está reta o suficiente ou quando há mais de uma linha, levando a falhas de detecção pela TH. Assim, o procedimento é realizado mais de uma vez de forma a

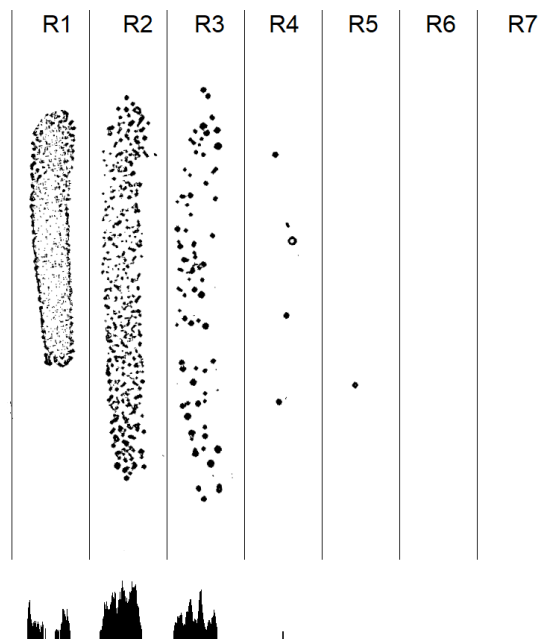
garantir que toda a região externa à ROI seja removida, como pode ser observado na Figura 26 (b).

Figura 26. Remoção das regiões externas da ROI.



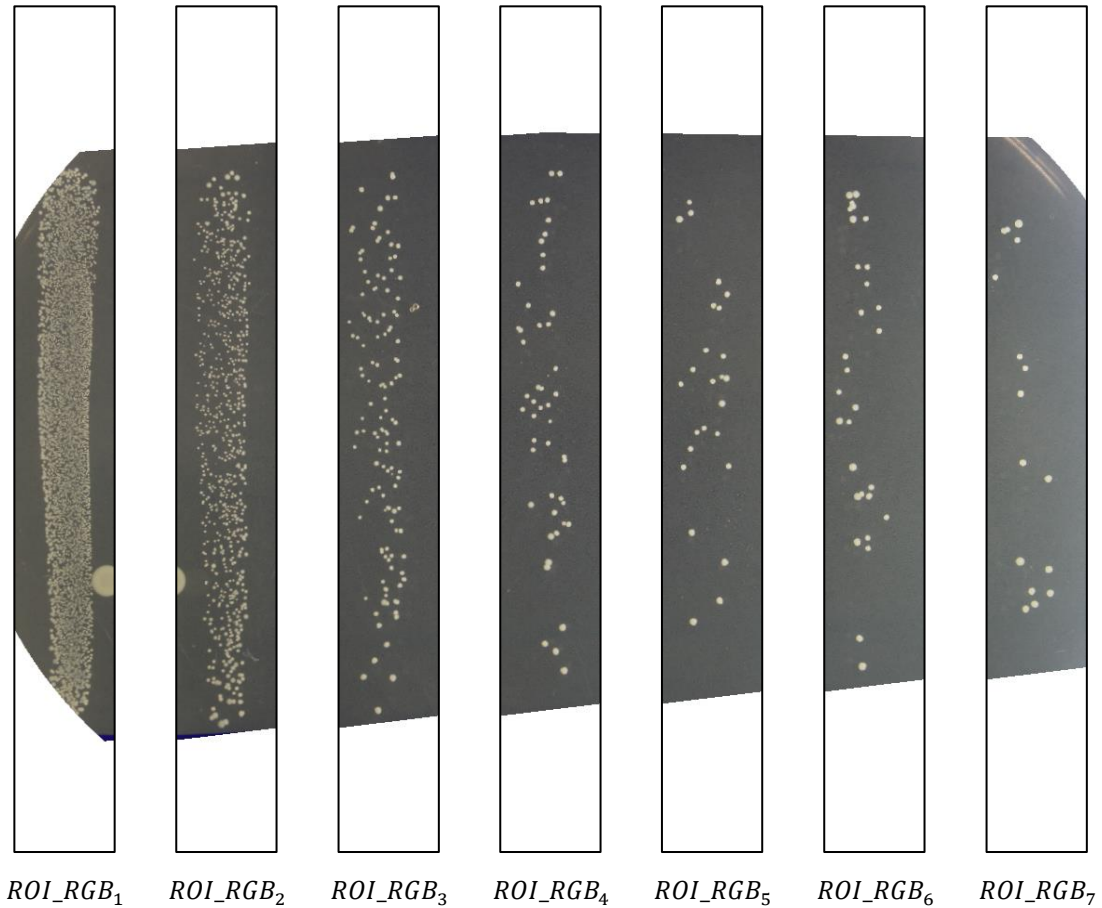
Para separar as diluições computa-se o histograma de projeções verticais a partir da imagem *B_rot*, como pode ser observado na Figura 27. Através dele, pode-se perceber que as grandes concentrações de pixels delimitam as diferentes diluições, permitindo a determinação das coordenadas que delimitam cada ROI.

Figura 27. Separação das diluições através da análise do histograma de projeções verticais.



Finalmente, utilizaram-se as coordenadas referentes a cada diluição para extrair as ROIs, criando imagens distintas a partir da imagem inicial I_{RGB} , resultando nas imagens ROI_{RGB_1} , ROI_{RGB_2} , ... , ROI_{RGB_7} , conforme ilustrado na Figura 28.

Figura 28. Imagens das ROIs extraídas da imagem original I_{RGB} .



Em resumo, o propósito de etapa 1 é de detectar as coordenadas referentes às diluições e extrair as ROIs a serem processadas nas etapas 2 e 3, que são responsáveis pela segmentação de UFCs isoladas e de aglomerados de UFCs, respectivamente.

4.2 SEGUNDA ETAPA – SEGMENTAÇÃO E CONTAGEM DE UFCs ISOLADAS

Esta etapa é aplicada individualmente a cada imagem ROI_{RGB_i} criada na etapa anterior. As imagens ROI_{RGB_1} e ROI_{RGB_2} , referentes respectivamente às diluições 1 e 2, não são submetidas a esta etapa, uma vez que o número de UFCs

presentes está acima de 300 e altamente aglomeradas, extrapolando os limites apresentados na seção 2.1.

O realce das bordas das UFCs é fundamental nesta etapa, melhorando a qualidade da imagem para a detecção das UFCs e a análise de suas características, como a circularidade.

Para melhorar a detecção de bordas após a limiarização, foi utilizada uma abordagem semelhante à proposta de Bora (2017), na qual se realiza realce de bordas em imagens coloridas usando filtro Sobel multidirecional no espaço de cor HSV. A justificativa para proposição da abordagem, segundo o autor, é que a imagem em tons de cinza tem menos informação do que a imagem colorida e, devido a isto, o processamento de imagens coloridas tem ganhado mais atenção e mais pesquisas têm sido realizadas neste campo. O algoritmo proposto por Bora (2017) consiste dos seguintes passos:

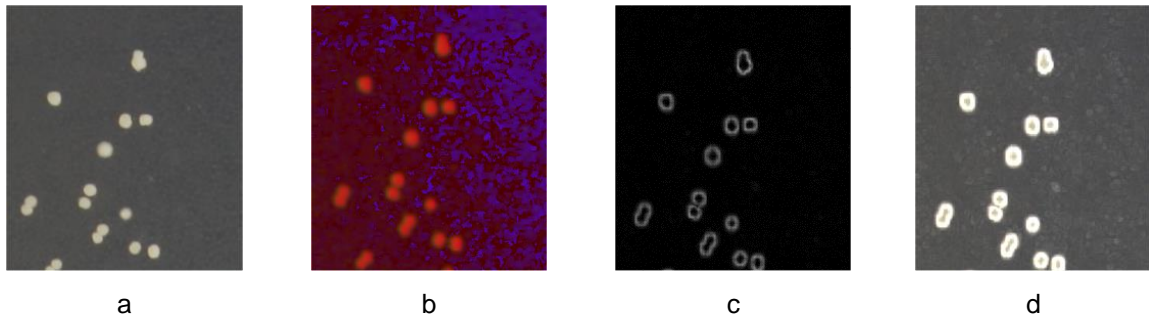
1. Carregar a imagem colorida em espaço de cor RGB;
2. Converter a imagem para o espaço de cor HSV;
3. Extrair o canal V da imagem HSV;
4. Aplicar filtro Sobel multidirecional no canal V;
5. Substituir o canal V obtido após aplicação do filtro na imagem HSV;
6. Converter a imagem HSV para o espaço de cor RGB.

Diferentemente do algoritmo de Bora (2017) na abordagem aqui desenvolvida foi utilizado o filtro Sobel bidirecional e, para aumentar o realce das bordas das UFCs, foi incluído um passo adicional, como descrito a seguir:

1. Carregar a imagem ROI_RGB_i , Figura 29 (a);
2. Converter ROI_RGB_i para ROI_HSV_i , Figura 29 (b);
3. Extrair o canal V_i ;
4. Aplicar filtro Sobel bidirecional no canal V_i , Figura 29 (c);
5. Substituir o canal V_i obtido após aplicação do filtro em ROI_HSV_i ;
6. Converter ROI_HSV_i para o espaço de cor RGB gerando a imagem O_i ;
7. Realizar a operação de soma de imagens $ROI_RGB_i = 2O_i + ROI_RGB_i$, Figura 29 (d);

O passo 7 foi determinado experimentalmente com base no banco de imagens e nos resultados obtidos com a utilização do descritor de forma baseado em região, cuja utilização é descrita a seguir.

Figura 29. Etapas do algoritmo de Bora (2017) adaptado para realce de bordas. (a) Imagem ROI_RGB_i . (b) Imagem ROI_RGB_i convertida em ROI_HSV_i . (c) Canal V_i após aplicar o filtro Sobel bidirecional. (d) Imagem ROI_RGB_i após realce de bordas.

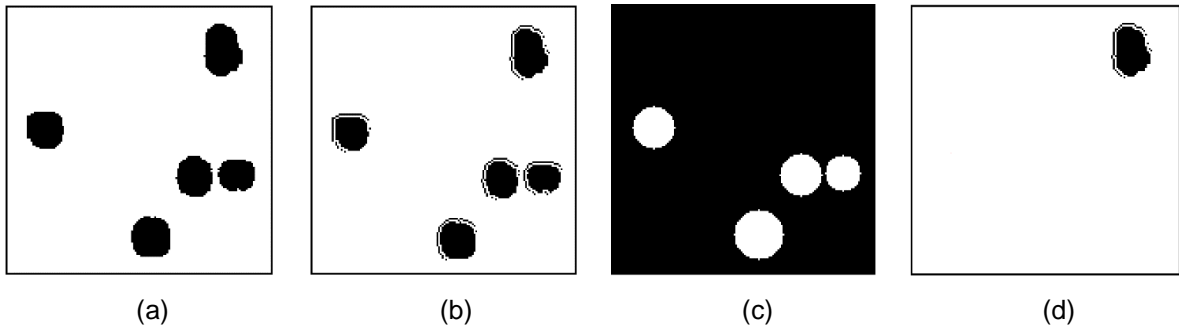


A seguir, aplica-se limiarização de Otsu à versão em escala de cinza da imagem aprimorada ROI_RGB_i obtendo uma imagem binária B_ROI_i , Figura 30 (a). Em seguida, utiliza-se gradiente morfológico, que é a diferença entre a dilatação e a erosão de uma imagem, para melhorar a detecção das bordas, gerando uma imagem semelhante à ilustrada na Figura 30 (b).

Para a segmentação de UFCs isoladas foi utilizado o algoritmo *SimpleBlobDetector*, que é um descritor de forma baseado em região disponível na biblioteca OpenCV(2000) para extrair *blobs* de uma imagem, onde um *blob* é um componente conexo. Como parâmetros do algoritmo, adotou-se o filtro por circularidade com coeficiente de circularidade mínimo de 0,55.

SimpleBlobDetector retorna o número de UFCs isoladas detectadas juntamente com as informações de seus respectivos raios e posições na imagem. Com estas informações, desenha-se uma máscara M_i com fundo preto apresentando as UFCs isoladas detectadas na cor branca, conforme ilustrado na Figura 30 (c) e, através da operação lógica $B_ROI_i \wedge M_i$, obtêm-se apenas os aglomerados de UFCs em B_ROI_i , como apresentado na Figura 30 (d).

Figura 30. Segmentação de UFCs isoladas baseada em circularidade. (a) Detalhe da imagem B_ROI_i após aplicar limiarização por Otsu. (b) Detalhe da imagem B_ROI_i depois de aplicar gradiente morfológico. (c) Detalhe mostrando UFCs isoladas na máscara M_i . (d) Detalhe da imagem B_ROI_i mostrando apenas os aglomerados de UFCs que permaneceram na imagem após a operação lógica $B_ROI_i \wedge M_i$.



Além da quantidade de UFCs isoladas detectadas, os raios mínimos e máximos $(r_{min}, r_{max})_i$ obtidos pelo algoritmo *SimpleBlobDetector* em cada diluição são passados como parâmetros para a terceira etapa.

4.3 TERCEIRA ETAPA – SEGMENTAÇÃO DE AGLOMERADOS E CONTAGEM DE UFCs

Para a determinação da quantidade de UFCs presentes na forma de aglomerados em cada diluição, utilizou-se granulometria por correlação cruzada conforme proposto por Maruta (2011) que, diferentemente da transformada de watershed, não incorre em super-segmentação.

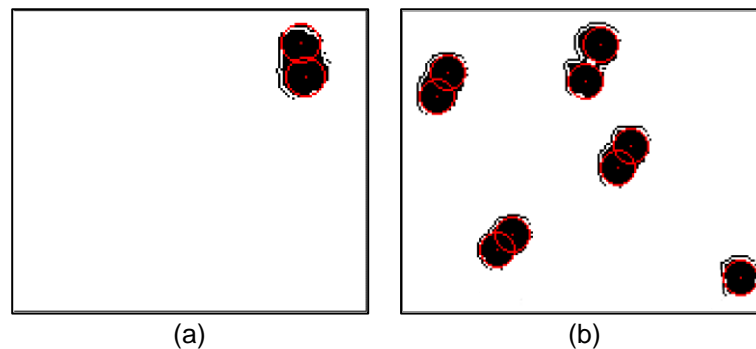
Na presente abordagem, a correlação cruzada é computada para diferentes *templates* $T = (\tau_1, \dots, \tau_j)$ cujo raio varia de r_{min} a r_{max} das UFCs detectadas em cada diluição na etapa 2.

Os picos de correlação são classificados em ordem decrescente e um pico que indica a detecção de uma célula é descartado quando esta célula intercepta outra célula (representada por outro pico) com uma taxa de interseção maior do que $\alpha = 95\%$ (definida experimentalmente) levando em conta a área circular de τ , permitindo

a detecção de UFCs que se sobrepõem parcialmente. Um coeficiente de correlação mínimo $\rho = 0,18$ foi determinado experimentalmente.

As bordas das UFCs presentes nos aglomerados da imagem B_ROI_i são assinaladas em vermelho, conforme apresentado na Figura 31.

Figura 31. Detalhes da imagem B_ROI_i apresentando UFCs detectadas corretamente pela correlação cruzada em vermelho.



Finalmente, a quantidade de UFCs isoladas, quantificadas na etapa 2, e a quantidade de UFCs detectadas nos aglomerados de UFCs são somadas e apresentadas como resultado da análise por diluição.

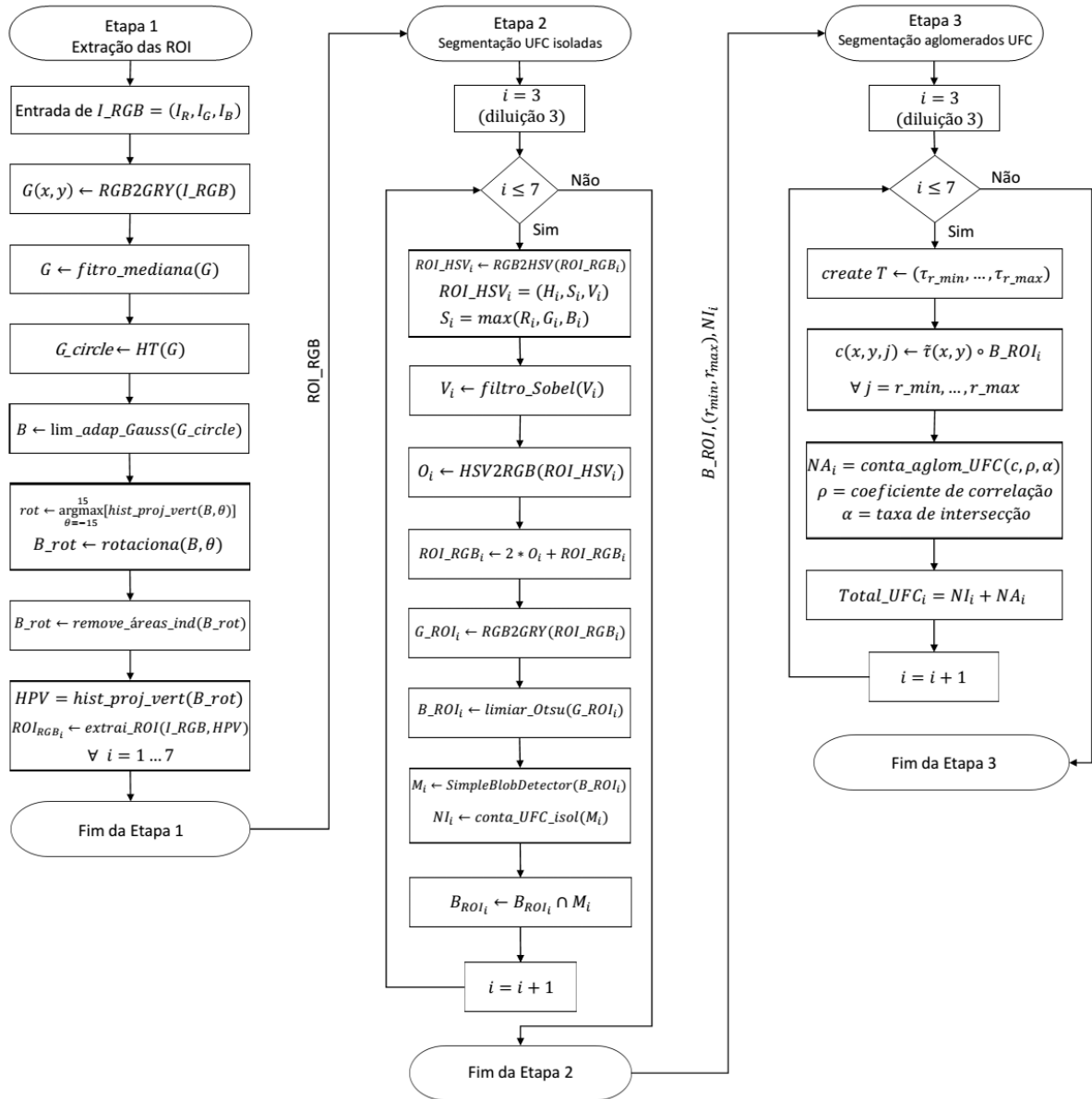
4.4 REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS ETAPAS DA ABORDAGEM PROPOSTA

As etapas utilizadas na abordagem e seus estágios intermediários estão apresentados no fluxograma ilustrado na Figura 32. Fluxograma do funcionamento das etapas da abordagem proposta.

Como se pode observar, a variável i (índice), empregada na segunda e terceira etapas, inicia com valor $i = 3$, uma vez que as diluições 1 e 2 não são processadas.

As imagens coloridas ROI_RGB geradas a partir das ROIs segmentadas na primeira etapa são passadas para a segunda etapa. A segunda etapa passa os parâmetros r_min e r_max , o número total de UFCs isoladas NI , e a imagem binária B_ROI para a terceira etapa.

Figura 32. Fluxograma do funcionamento das etapas da abordagem proposta.



A abordagem proposta resultou em um software a ser disponibilizado para a comunidade cujo funcionamento da versão preliminar para testes, em língua portuguesa, é apresentado no APÊNDICE B.

Seu funcionamento é simples, no qual o usuário utiliza ferramentas conhecidas da plataforma Windows® para acessar os arquivos de imagem. Além do mais, com o simples clicar de um botão, a imagem selecionada é analisada, a quantidade de UFCs é computada e os resultados são exibidos na tela e gravados num arquivo para posterior utilização do usuário.

5 RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÕES

Para avaliar o desempenho da abordagem proposta, que emprega descritor de forma baseado em região e granulometria por correlação cruzada, nomeada SC para simplificação, empregou-se o banco de imagens também proposto neste trabalho. Os resultados de SC, em termos das medidas de desempenho acurácia, precisão, sensibilidade e especificidade, foram comparados com os resultados de duas outras abordagens: Granul (MARUTA, 2011) e OpenCFU (GEISSMANN, 2013). Para facilitar a apresentação gráfica dos resultados, denominamos essas duas abordagens como GR e OP, respectivamente.

É importante lembrar que, como as abordagens GR e OP não foram concebidas para lidar com SP-SDS, foi necessário utilizar as imagens criadas na etapa 1 da abordagem SC na abordagem GR, e para a abordagem OP foi necessário segmentar manualmente cada diluição na própria abordagem.

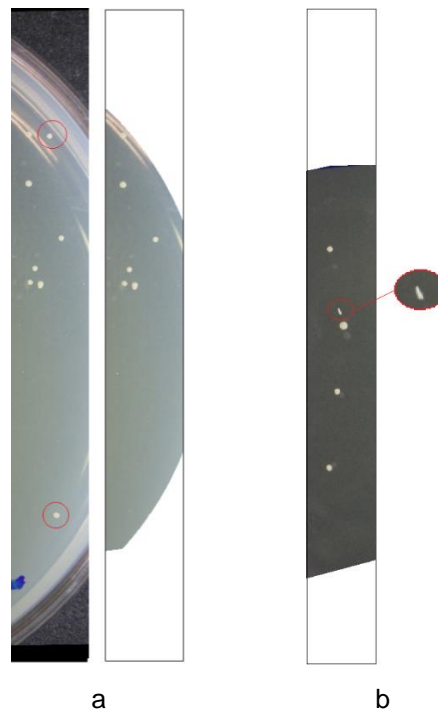
Nas tabelas 2, 3 e 4 são apresentadas, respectivamente, as acurácias obtidas pela aplicação das abordagens SC, GR e OP. Destaca-se que as medidas de desempenho foram computadas comparando-se as contagens realizadas pelas diferentes abordagens com a contagem manual (MC), apresentada na Tabela 1 (seção 3.3).

Tabela 2. Acurácias (%) obtidas pela aplicação de SC.

	Imagem	Dil3	Dil4	Dil5	Dil6	Dil7		Imagem	Dil3	Dil4	Dil5	Dil6	Dil7
	img_0801	98.8	80	100	100	100		img_0810	100	100	100	100	100
C	img_0802	100	100	100	100	100	0.3s	img_0811	100	100	100	100	100
	img_0803	100	100	100	100	100		img_0812	99.2	100	100	100	100
	img_0804	100	100	100	100	100		img_0813	100	100	100	100	83.3
FS	img_0805	98.9	100	100	100	100	1	img_0814	99.3	100	100	100	100
	img_0806	100	100	100	100	100		img_0815	98.6	100	100	100	100
	img_0807	99.6	100	100	100	100		img_0816	100	100	100	100	100
L	img_0808	99.62	100	100	100	100	2	img_0817	100	100	100	100	100
	img_0809	100	100	100	100	100		img_0818	100	100	100	100	100

A análise dos resultados obtidos pela abordagem SC apresentou apenas um resultado com acurácia inferior a 100% na quantificação de UFCs da diluição 7 (83,3% na imagem img_0813). Isso se deve à remoção de UFCs durante a extração da ROI pela transformada de Hough na primeira etapa, levando à ocorrência de falsos negativos (FN) conforme destacado na Figura 33 (a), sendo que este resultado também se repetiu nas abordagens GR e OP pelo mesmo motivo. Nas diluições 5 e 6 não se observaram erros de quantificação e na diluição 4 houve apenas um resultado abaixo de 100% (80% na imagem img_0801) devido ao reconhecimento de um ruído como se fosse UFC, gerando um falso positivo (FP) destacado na Figura 33 (b).

Figura 33. Erros de detecção na primeira etapa de SC (indicados por círculos vermelhos) (a) Detalhe de UFCs removidas indevidamente durante a primeira etapa (b) Detalhe de ruído reconhecido como UFC.

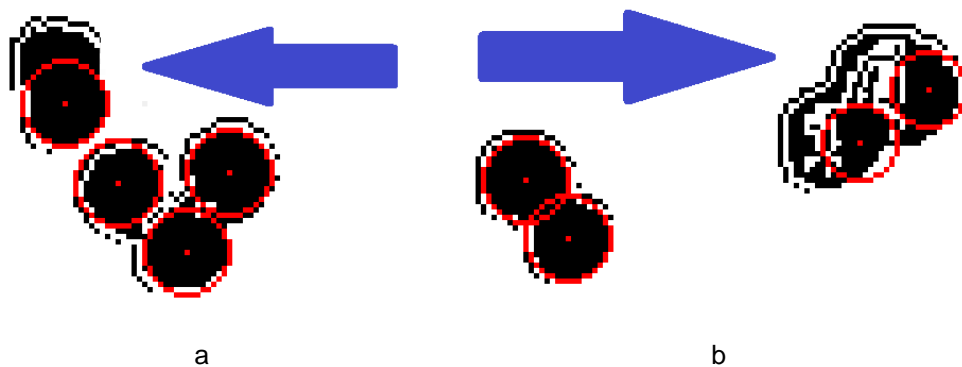


Os resultados observados nas três abordagens mostram que a diluição 3 foi a mais complexa no tocante à segmentação de aglomerados de UFCs. A abordagem SC não conseguiu segmentar corretamente alguns aglomerados de UFCs, especialmente quando estes aglomerados eram compostos por UFCs de raios pequenos e grandes num mesmo aglomerado, levando a erro de detecção. Pôde-se observar que, nestes casos, quando as UFCs pequenas eram corretamente segmentadas, as grandes eram super-segmentadas, levando a falsos positivos (FP),

e, quando as grandes eram corretamente segmentadas, as pequenas eram negligenciadas, gerando falsos negativos (FN).

Ao se observar os aglomerados de UFCs segmentados na Figura 34, nota-se que SC foi capaz de segmentar corretamente grande parte dos aglomerados. No entanto, em alguns poucos casos a segmentação não foi adequada, como pode ser observado na Figura 34 (a), ou foram reconhecidos ruídos, por exemplo uma bolha no ágar ilustrada na Figura 34 (b), como se fosse aglomerado de UFCs. É importante observar que a bolha apresentada na Figura 34 (b) foi a única presente em imagens que não foi excluída pelo algoritmo durante a segunda etapa, provavelmente devido às partes internas da mesma apresentarem componentes conexos em quantidade, formato e dimensão semelhantes aos *templates* utilizados na granulometria por correlação cruzada.

Figura 34. Erros de detecção na segunda etapa de SC (indicados pelas setas azuis). (a) Aglomerados de UFCs não segmentados corretamente. (b) Bolhas no ágar interpretadas erroneamente como UFC.



Além do mais, comparando os resultados obtidos pela abordagem SC e pela GR, é possível perceber que o realce das bordas das UFCs melhora a segmentação pela granulometria por correlação cruzada.

Tabela 3. Acurácias (%) obtidas pela aplicação de GR.

Image	Dil3	Dil4	Dil5	Dil6	Dil7	Image	Dil3	Dil4	Dil5	Dil6	Dil7
img_0801	100	100	100	100	100	img_0810	100	98.2	100	91.7	97.2
C img_0802	100	100	100	100	100	0.3s img_0811	92.5	93.9	96.0	93.3	93.3
img_0803	100	100	100	100	100	img_0812	83.5	93.6	100	100	96.6
img_0804	100	100	100	100	100	img_0813	93.8	73.9	100	100	83.3
FS img_0805	98.9	100	100	100	100	1 img_0814	97.8	90.9	100	100	80.0
img_0806	100	94.1	100	100	100	img_0815	98.6	95.5	92.3	100	100
img_0807	99.1	100	100	94.1	100	img_0816	100	100	100	100	100
L img_0808	97.4	97.5	100	100	100	2 img_0817	97.6	100	100	100	100
img_0809	100	98.3	100	100	100	img_0818	96.7	95.0	92.9	100	100

A abordagem GR falhou em segmentar os aglomerados de UFCs quando haviam UFCs pequenas e grandes formando um mesmo aglomerado, ou quando pequenas e grandes UFCs estavam distribuídas em quantidades semelhantes numa mesma diluição. Isto sugere que é necessário reduzir a variação dos raios das UFCs presentes numa mesma diluição para obter resultados melhores de segmentação por correlação cruzada.

Para a abordagem GR, a presença de ruídos, como UFC muito próximas às bordas que evitaram a remoção completa das bordas, ou como vestígios deixados pelas linhas delimitadoras azuis, interferiram na correlação cruzada levando a erro de interpretação, resultando em falsos positivos.

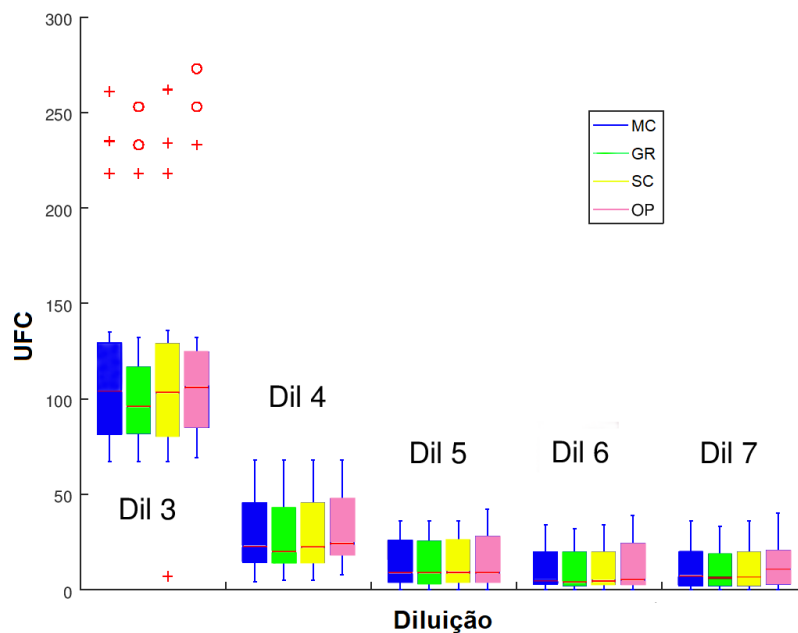
Assim, a comparação entre os resultados obtidos por GR e SC confirmam que a redução da variação dos raios das UFCs por toda a diluição leva a uma melhoria nos resultados da segmentação, o que foi realizado na abordagem SC através da segunda etapa.

Tabela 4. Acurácias (%) obtidas pela aplicação deOP.

Image	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7	Image	Dil 3	Dil 4	Dil 5	Dil 6	Dil 7
img_0801	95,3	50,0	100	100	100	img_0810	93,6	89,6	84,8	82,1	95,7
C img_0802	100	72,2	100	100	100	0.3 s img_0811	96,7	90,2	85,7	80,0	90,0
img_0803	100	60,0	71,4	100	100	img_0812	96,2	100	100	96,7	93,8
img_0804	96,7	71,4	75,0	60,0	83,3	img_0813	96,1	83,9	83,9	75,9	82,9
FS img_0805	96,8	73,7	80,0	100	66,7	1 img_0814	97,5	82,1	75,0	50,0	50,0
img_0806	93,1	94,4	100	100	100	img_0815	97,8	100	100	85,7	100
img_0807	86,1	100	94,7	97,1	95,5	img_0816	97,3	95,7	92,9	91,7	72,7
L img_0808	96,9	93,0	96,6	100	91,7	2 img_0817	98,6	77,8	45,5	100	80,0
img_0809	95,3	50,0	100	100	100	img_0818	95,4	100	100	75,0	66,7

A comparação entre as contagens obtidas por cada abordagem é apresentada no gráfico da Figura 35, no qual pode ser observado que, entre os resultados obtidos pelas abordagens SC e OP, a última não foi capaz de segmentar adequadamente tanto UFCs isoladas como aglomerados de UFCs.

Figura 35. Comparação de contagens de MC, SC, GR e OP. Os *outliers* representados por "o" são pontos que se encontram fora em 3 vezes o intervalo interquartil e *outliers* representados por "+" são pontos localizados fora entre 1,5 e 3 vezes do intervalo interquartil.



A análise das contagens obtidas pelas diferentes abordagens apresentadas no gráfico da Figura 35 indica que há uma grande variação entre as contagens de UFCs para a diluição 3 em relação às demais diluições.

Também, no gráfico da Figura 35, pode ser observado que a abordagem SC apresentou os melhores resultados tanto na comparação entre a dispersão das contagens de cada abordagem (intervalo interquartilico), representada pela altura das caixas, como na comparação entre a mediana de cada abordagem, representada pela linha vermelha no interior das caixas, para todas as diluições.

Se compararmos as alturas das caixas e posições dos limites inferior e superior das caixas para as abordagens MC e SC, podemos perceber que são semelhantes, assim como a posição da mediana para as mesmas abordagens, o que demonstra que tanto os intervalos de contagens como a mediana são semelhantes. Além disso, os valores atípicos (*outliers*) também são representados da mesma forma e na mesma posição para as abordagens MC e SC, mostrando que, para ambas, os dados são semelhantes e se encontram dentro do mesmo range, enquanto para as abordagens GR e OP os valores atípicos se apresentam em posições e formatos diferentes da abordagem MC, representando contagens diferentes do esperado.

Os valores médios de acurácia, precisão e sensibilidade das abordagens são apresentados na Tabela 5, na qual se pode observar que a abordagem SC apresenta os maiores valores de sensibilidade e acurácia, com precisão muito próxima à da abordagem GR que apresentou o maior valor.

Tabela 5. Análise comparativa da acurácia, precisão e sensibilidade das abordagens SC, GR e OP.

	SC	GR	OP
Acurácia	99,5	97,8	83,1
Precisão	99,8	99,9	89,8
Sensibilidade	99,8	97,9	96,3
Especificidade	98,3	99,4	93,4

Os indicadores apresentados na Tabela 5 mostram que a abordagem SC é eficaz em identificar corretamente as UFCs, apresentando os maiores valores de acurácia, precisão e sensibilidade dentre as três abordagens. Apenas a especificidade

se apresenta com valor inferior ao da abordagem GR, o que se deve ao fato desta última permitir a alteração das variáveis de correlação pelo usuário individualmente para cada diluição, evitando assim a interpretação de verdadeiros negativos (bolhas, contaminações) como UFC.

6 CONCLUSÕES

Nesta pesquisa foi proposta uma abordagem de visão computacional para quantificação automática de UFCs em imagens de placas de Petri preparadas pela técnica SP-SDS e adquiridas sob condições reais de laboratório, a qual é composta por três etapas: extração das regiões de interesse (diluições na placa de Petri), contagem de UFCs isoladas por meio de descritores de forma baseados em região, e contagem de UFCs em aglomerados por meio de granulometria por correlação cruzada.

A segmentação de aglomerados de UFCs ainda é uma tarefa desafiadora e o desempenho da abordagem proposta mostrou que o algoritmo de realce das bordas dos objetos proposto neste trabalho permite tanto ao descritor de forma baseado em região como a granulometria por correlação cruzada executar uma melhor segmentação. Além disso, a estratégia de segmentar primeiro as UFCs isoladas e analisar suas propriedades, propiciou a obtenção de melhores resultados na segmentação pela granulometria por correlação cruzada.

Os resultados experimentais obtidos pela abordagem proposta (acurácia de 99,5%, precisão de 99,7%, sensibilidade de 99,2% e especificidade de 98,3%) foram, no geral, melhores que os resultados das abordagens encontradas na literatura recente (as duas utilizadas nas comparações e as demais citadas no Quadro 1). No entanto, é preciso considerar que as análises de acurácia das abordagens encontradas na literatura e citadas nesta pesquisa no Quadro 1 não utilizaram em suas análises imagens com poucas UFCs ou com muitos aglomerados de UFCs. Além disso, embora algumas abordagens da literatura, como por exemplo a desenvolvida por Yoon, Lawrence e Park (2015), apresentem precisões semelhantes, elas não são capazes de contar UFCs em imagens adquiridas de placas de Petri preparadas utilizando a técnica SP-SDS e sem controle de condições de luz ambiente.

É importante destacar que para efeito de comparação das abordagens foi necessário utilizar as imagens das ROIs (diluições) segmentadas na primeira etapa da abordagem SC para viabilizar a utilização de GR. Em adição, foi necessário realizar a segmentação manual das ROIs (diluições) para que a abordagem OP pudesse ser empregada nos experimentos comparativos.

O banco de imagens concebido neste trabalho, incluindo a documentação com as contagens manuais, será mantido disponível em um repositório público (<http://www.saraujo.pro.br/cfu/>) para que outros pesquisadores que desejarem investigar problemas relacionados à contagem automática de unidades formadoras de colônias (UFCs) possam testar seus métodos.

Por fim, o software concebido a partir da abordagem proposta encontra-se em uma versão preliminar para testes e será disponibilizado para a comunidade tão logo for finalizado.

Os próximos passos da pesquisa são a finalização do software com a realização de testes junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde (PPGB) da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) e seu registro em órgão competente.

Em trabalhos futuros pretende-se aprimorar a abordagem para utilização em imagens de micro-organismos desenvolvidos em outros meios de cultura, adaptar a abordagem para leitura de placas de Petri quadradas, adequar o software para utilização em plataforma embarcada, e investigar a aplicação da abordagem para quantificação de células cancerígenas, uma direção promissora para a pesquisa.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, S. A. De; PESSOTA, J. H.; KIM, H. Y. Beans quality inspection using correlation-based granulometry. **Engineering Applications of Artificial Intelligence**, [s. l.], v. 40, p. 84–94, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.engappai.2015.01.004>>

AUSTERJOST, J. et al. A smart device application for the automated determination of E. coli colonies on agar plates. **Engineering in Life Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 959–966, 2017.

BARBEDO, J. G. A. An Algorithm for Counting Microorganisms in Digital Images. **IEEE Latin America Transactions**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1354–1359, 2013. Disponível em: <<https://scholar-google-com-br.ez130.periodicos.capes.gov.br/scholar?hl=pt-BR&q=An+Algorithm+for+Counting+Microorganisms+in+Digital+Images.+IEEE+Latin+America+Transactions>>

BARBER, P.; VOJNOVIC, B.; KELLY, J. An automated colony counter utilising a compact Hough transform. **Proceedings of Medical Image Understanding and Analysis**, [s. l.], p. 41–44, 2000. Disponível em: <http://www.homepages.ucl.ac.uk/~regmprb/pdf/Barber_2000.pdf>

BARON, F. et al. Rapid and cost-effective method for micro-organism enumeration based on miniaturization of the conventional plate-counting technique. **Le Lait**, [s. l.], v. 86, n. 3, p. 251–257, 2006.

BELAN, P. A. et al. A Fast and Robust Approach for Touching Grains Segmentation. **Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)**, [s. l.], v. 10882 LNCS, p. 482–489, 2018. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-93000-8_54>. Acesso em: 23 ago. 2018.

BELAN, P. A.; ARAÚJO, S. A. De; LIBRANTZ, A. F. H. Técnicas de visão computacional aplicadas no processo de calibração de instrumentos de medição com display numérico digital sem interface de comunicação de dados. **Exacta**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 82–91, 2012. Disponível em: <<http://www4.uninove.br/ojs/index.php/exacta/article/view/3091>>

BORA, D. J. A Novel Approach for Color Image Edge Detection Using Multidirectional Sobel Filter on HSV Color Space. **INTERNATIONAL JOURNAL OF COMPUTER SCIENCES AND ENGINEERING**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 154–159, 2017.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial - Volume 1**. 1a. ed. [s.l.] : Blucher, E E, 2001.

BOUKOUVALAS, D. T.; ARAÚJO, S. A. De. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias de Microrganismos Através de Visão Computacional. In: SETII - SEMINÁRIO EM TECNOLOGIA DA INFORMAÇÃO INTELIGENTE 2017, São Paulo - SP. **Anais...** São Paulo - SP: UNINOVE, 2017. Disponível em: <<http://www.setii.net/2017/>>

BRADSKI, G. The OpenCV Library. **Dr Dobbs Journal of Software Tools**, [s. l.], p. 25, 2000.

CHIANG, P. J. et al. Automated counting of bacterial colonies by image analysis. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 108, p. 74–82, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.11.009>>

CORKIDI, G. et al. COVASIAM: An image analysis method that allows detection of confluent microbial colonies and colonies of various sizes for automated counting. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 1400–1404, 1998.

FERRARI, A. et al. Bacterial colony counting by convolutional neural networks. **37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)**, [s. l.], p. 7458–7461, 2015.

FERRARI, A.; LOMBARDI, S.; SIGNORONI, A. Bacterial colony counting with Convolutional Neural Networks in Digital Microbiology Imaging. **Pattern Recognition**, [s. l.], v. 61, n. July, p. 629–640, 2017.

GEISSMANN, Q. OpenCFU, a New Free and Open-Source Software to Count Cell Colonies and Other Circular Objects. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 1–10, 2013.

GIL, A. C. **Como Elaborar Projetos de Pesquisa**. 4. ed. São Paulo - SP: Editora Atlas S. A., 2002.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Digital Image Processing**. 3. ed. [s.l.] : Pearson Education, 2011.

INGELS, N. B.; DAUGHTERS, G. T.; BURZIO, A. New design for an automated bacterial colony counter. **Review of Scientific Instruments**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 115–120, 1968.

JAGGA, B.; SINGH, D. Image Processing Based Bacterial Colony Counter. **International Journal of Scientific Research in Computer Science, Engineering and Information Technology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 97–101, 2018.

JETT, B. D. et al. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. **BioTechniques**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 648–650, 1997.

JUNIOR, J. M. S.; BALIAN, S. C.; KIM, H. Y. MSGRANUL: Granulometria baseada em Correlação e MSER aplicada a contagem de colônias de bactérias. **Congresso Brasileiro de Automática**, [s. l.], p. 2151–2156, 2016.

LUMLEY, M. a et al. Colony Counting is a Major Source of Variation in CFU-GM Results Between Centres. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 481–4, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9163619>>

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. [s.l.] : Pearson, 2017.

MANSBERG, H. P. Automatic Particle and Bacterial Colony Counter. **Science, New Series**, [s. l.], v. 126, n. 3278, p. 823–827, 1957.

MARETIC, I. S.; LACKOVIC, I. Automated Colony Counting Based on Histogram Modeling Using Gaussian Mixture Models. **IFMBE**, [s. l.], v. 62, p. 548–553, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-4166-2>>

MARQUES FILHO, O.; VIEIRA NETO, H. **Processamento Digital de Imagens**. [s.l: s.n.]. v. 21/03

MARTINEZ-ESPINOSA, J. C. et al. Nondestructive technique for bacterial count based on image processing. **Biology, Engineering and Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–6, 2016. Disponível em: <<https://oatext.com/Nondestructive-technique-for-bacterial-count-based-on-image-processing.php>>

MARUTA, R. H. **Um novo algoritmo de granulometria com aplicação em caracterização de nanoestruturas de silício**. 2011. Universidade de São Paulo, [s. l.], 2011.

MATIĆ, T. et al. Semi-automatic prototype system for bacterial colony counting. **Proceedings of 2016 International Conference on Smart Systems and Technologies, SST 2016, IEEE**, [s. l.], p. 205–210, 2016.

MEYER, F. The watershed concept and its use in segmentation : a brief history. **CoRR**, [s. l.], p. 11, 2012. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/1202.0216>>

MUKHERJEE, D. P. et al. Bacterial colony counting using distance transform. **International Journal of Bio-Medical Computing**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 131–140, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002071019401043Z>>

PEDRINI, H.; SCHWARTZ, W. R. **Análise de imagens digitais: princípios, algoritmos e aplicações**. [s.l.] : THOMSON PIONEIRA, 2008.

PRATT, W. K. **Digital Image Processing: PIKS Inside**. 3. ed. Los Altos, CA: Wiley, 2001.

RESEARCH AND MARKETS. **Automated Colony Counter Market for Applications and End User : Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and forecast 2017 - 2024**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/research/njd2f5/automated_colony?w=4>.

SÁNCHEZ-FEMAT, E. et al. Mobile Application for Automatic Counting of Bacterial Colonies. **Trends and Applications in Software Engineering, Advances in Intelligent Systems and Computing**, [s. l.], v. 537, p. 221–230, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48523-2>>

SANDLE, T. Automated , Digital Colony Counting : Qualification and Data Integrity. **IVT Network**, [s. l.], 2018. Disponível em: <<http://www.ivtnetwork.com>>

SHAPIRO, L.; STOCKMAN, G. Computer Vision. **Computer Vision**, [s. l.], v. 9, n. March, 2001.

SIEUWERTS, S. et al. A simple and fast method for determining colony forming units. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 275–278, 2008.

SIQUEIRA, A. A.; CARVALHO, P. G. S. De. MicroCount: Free Software for Automated Microorganism Colony Counting by Computer. **IEEE Latin America Transactions**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 2006–2011, 2017. Disponível em: <<http://www.ewh.ieee.org/reg/9/etrans/ieee/issues/vol15/vol15issue10Oct.2017/Vol15issue10Oct.2017TLA.htm>>

SUTTON, S. Accuracy of Plate Counts. **Journal of Validation Technology**, [s. l.], v. Vol. 17, n. 3, p. 42–46, 2011.

SZELISKI, R. Computer vision: algorithms and applications. **Lib.TuDelft.Online**, [s. l.], p. 823, 2011.

THOMAS, P. et al. Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 8, p. 45–55, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.003>>

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. [s.l: s.n.].

WONG, C.-F.; YEO, J. Y.; GAN, S. K. APD Colony Counter App : Using Watershed Algorithm for improved colony counting. **Nature Methods Application Notes**, [s. l.], n. August, p. 1–3, 2016.

YOON, S. C.; LAWRENCE, K. C.; PARK, B. Automatic Counting and Classification of Bacterial Colonies Using Hyperspectral Imaging. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 2047–2065, 2015.

APÊNDICE A - Publicações resultantes deste trabalho de pesquisa.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. BOUKOUVALAS, D. T.; ARAÚJO, S. A. Contagem automática de unidades formadoras de colônias: uma revisão da literatura. In: III Seminário em Tecnologia da Informação Inteligente - SeTII 2018, 2018, São Paulo. Anais do SeTII 2018. São Paulo: UNINOVE, 2018. v. 1, p. 34-40.
2. BOUKOUVALAS, D. T.; ARAÚJO, S. A. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias de Microrganismos Através de Visão Computacional. In: II Seminário em Tecnologia da Informação Inteligente - SeTII 2017, 2017, São Paulo. Anais do SeTII 2017. São Paulo: UNINOVE, 2017. v. 1, p. 1-7.

Artigo completo aceito para publicação em periódico

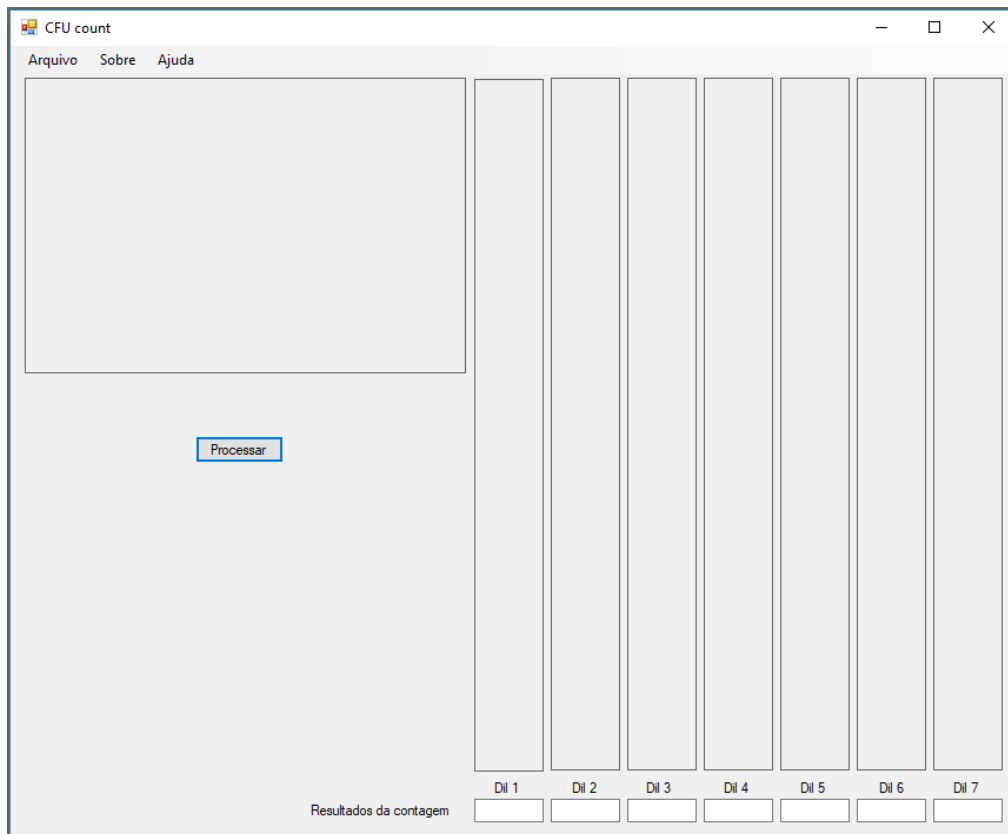
BOUKOUVALAS, D. T.; BELAN, P. A.; LEAL, C. R. L.; PRATES, R. A.; ARAÚJO, S. A. Automated Colony Counter for Single Plate Serial Dilution Spotting. Lecture Notes in Computer Science, LNCS 11401, pp. 1–9, 2019.

https://doi.org/10.1007/978-3-030-13469-3_48

APÊNDICE B – Interface do Sistema de Visão Computacional resultante da abordagem proposta neste trabalho

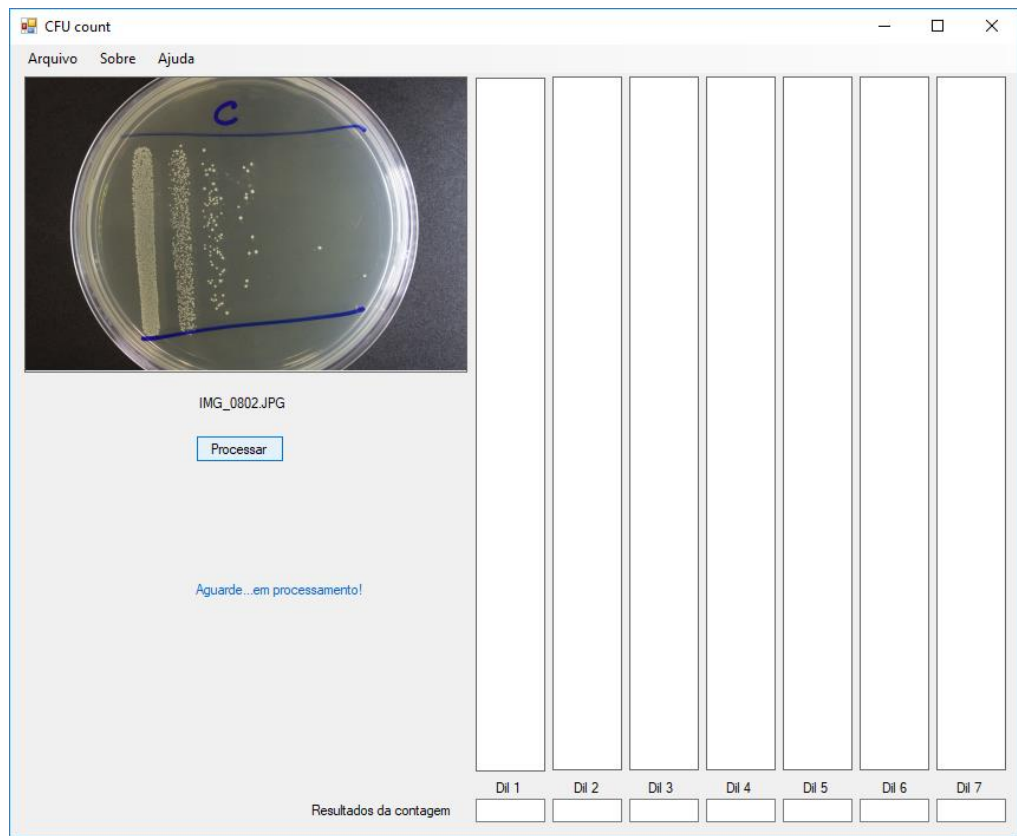
A interface do SVC com o usuário apresenta em sua tela inicial a opção para escolha do arquivo de imagem a ser analisado, conforme a Figura 36.

Figura 36. Tela inicial.



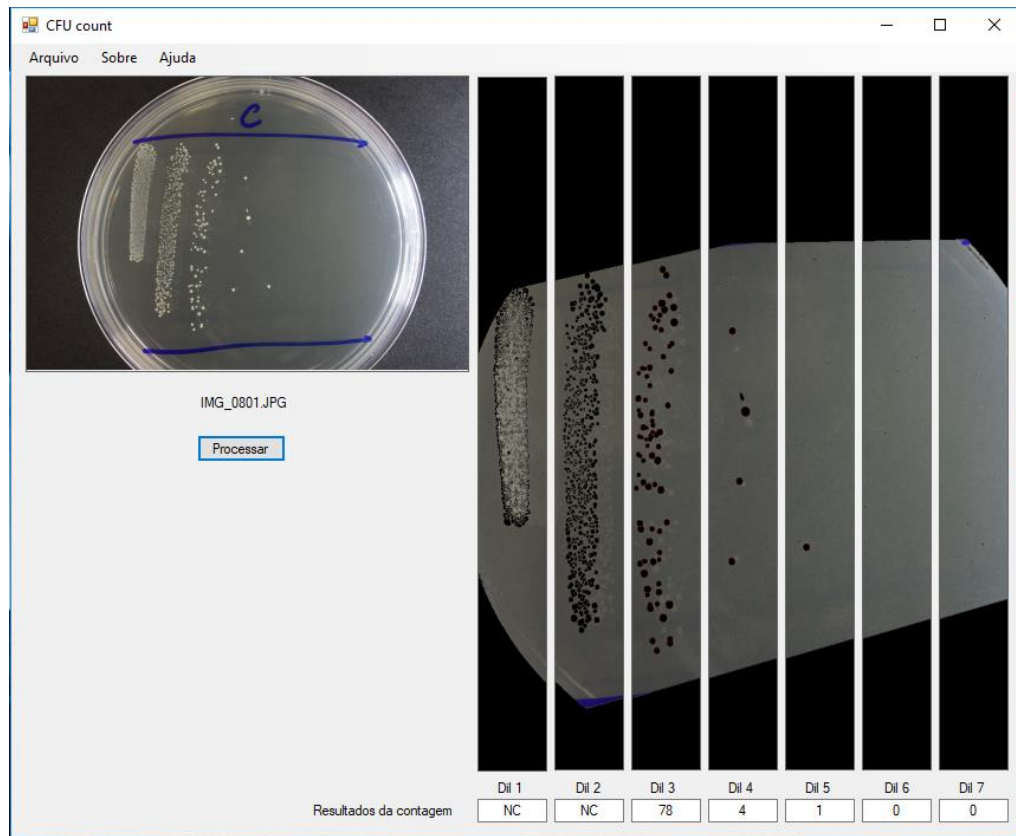
Após a seleção, a imagem é apresentada na tela. O usuário deve clicar no botão “Processar” para iniciar a contagem e, em seguida, será apresentada a informação “Aguarde...em processamento!”, conforme Figura 37.

Figura 37. Tela de processamento.



Ao final do processamento, será apresentada a tela com os resultados, conforme a Figura 38.

Figura 38. Tela de resultados.



Os resultados da contagem são gravados num arquivo texto com o mesmo nome da imagem, com a extensão “.txt”.

As UFCs segmentadas são assinaladas em vermelho, conforme Figura 39.

Figura 39. UFCs assinaladas em vermelho.

