

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
ESCOLA DE CIÊNCIAS EXATAS E DA COMPUTAÇÃO



**DETECÇÃO DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS UTILIZANDO VISÃO
COMPUTACIONAL**

LUCAS MOREIRA GUERRA SILVA

GOIÂNIA
2020

LUCAS MOREIRA GUERRA SILVA

**DETECÇÃO DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS UTILIZANDO VISÃO
COMPUTACIONAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Escola de Ciências Exatas e
da Computação, da Pontifícia Universidade
Católica de Goiás, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Bacharel em
Ciências da Computação.

Orientador(a): Prof. Dr. Arlindo Rodrigues
Galvão Filho

GOIÂNIA
2020

LUCAS MOREIRA GUERRA SILVA

**DETECÇÃO DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS UTILIZANDO VISÃO
COMPUTACIONAL**

Este Trabalho de Conclusão de Curso julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Ciências da Computação, e aprovado em sua forma final pela Escola de Ciências Exatas e da Computação, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, em __/__/____.

Ludmilla Reis Pinheiro dos Santos
Coordenador(a) de Trabalho de Conclusão de Curso

Banca examinadora:

Orientador(a): Prof. Dr. Arlindo Rodrigues Galvão Filho

Prof. Dr. Rafael Viana de Carvalho

Prof. Dr. Ricardo Augusto Pereira Franco

GOIÂNIA
2020

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus simplesmente por tudo, pela oportunidade, pelo esforço e disciplina que me abençoou para realizar este projeto e pelas pessoas que ele colocou no meu caminho para que isso se tornasse possível. Segundo pela minha família e amigos que me ajudaram neste projeto, e amigos que sempre estiveram ao meu lado torcendo pelo meu sucesso. Agradeço também ao IPTSP - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública por disponibilizar as amostras utilizadas no projeto.

EPÍGRAFE

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar a onde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz”.

Bill Gates

RESUMO

A contagem de colônias de bactérias é uma ferramenta essencial na área biomédica. É um importante processo para as pesquisas em laboratório para a análise da qualidade da água, da poluição, seleção de antibióticos e muitos outros. Esta contagem é feita manualmente, o que torna um trabalho tedioso e muitas vezes impreciso. Este projeto apresenta métodos para automatização da contagem de colônia de bactérias em placas de petri para melhorar a performance e produtividade. O processamento utiliza métodos de limiarização adaptativa utilizando estatísticas locais de primeira ordem (média) para segmentar as colônias do fundo, operações morfológicas para remoção de ruídos e a Transformada de Hough para círculos reconhecendo padrões circulares. Resultados satisfatórios para contagem de colônias foram concluídos para amostras com pequenas e médias quantidade de colônias e baixa precisão para amostras com muitas colônias devido à má formação de círculos após a limiarização.

Palavras-chaves: Automatização na contagem de colônias, imagem digital, análise de imagem digital, placa de petri.

ABSTRACT

Counting bacterial colonies is an essential tool in the biomedical field. It is an important process for laboratory research to analyze water quality, pollution, antibiotic selection and many others. This counting is manual, which makes work tedious and often inaccurate. This project presents methods for automating the colony counting of bacteria in petri dishes to improve performance and productivity. The processing uses adaptive thresholding methods using first-order (average) local statistics to segment the background colonies, morphological operations to remove noise and the Hough Transform for circles recognizing circular patterns. Satisfactory results for colony counting have been concluded for samples with small and medium number of colonies and low precision for samples with many colonies due to poor circle formation after thresholding.

Keywords: colony count automation, digital image, digital image analysis, petri dish.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
2.1 Transformada de Hough para círculos.....	11
2.2 Limiarização adaptativa utilizando estatísticas locais de primeira ordem..	12
2.3 Operação morfológica.....	13
2.3.1 <i>Elemento estruturante</i>	14
2.3.2 <i>Erosão e dilatação</i>	14
2.3.3 <i>Abertura e fechamento</i>	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Pré-processamento.....	17
3.2 Processamento.....	18
3.2.1 <i>Processamento para amostras amarelo claro</i>	20
3.2.2 <i>Processamento para amostras vermelhas</i>	20
3.2.3 <i>Processamento para o amostras amarelo escuro</i>	21
3.3 Pós-processamento.....	21
4 RESULTADOS.....	23
4.1 Metodologia de avaliação.....	23
5 CONCLUSÃO.....	29
5.1 Sugestões para trabalhos futuros.....	30
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

O crescimento de bactérias é um essencial indicador em muitos estudos na microbiologia como seleção de antibióticos, testes toxicológicos, análise da qualidade da água [1]. Isso envolve a contagem dessas colônias de forma unitária e manual podendo utilizar vários métodos para conhecer a viabilidade das bactérias.

Entretanto, realizar esta contagem de forma manual consome muito tempo e consequentemente reduz a produtividade do profissional. Por isso, unindo o poder da tecnologia com a microbiologia, surgiu a ideia de realizar este projeto, para tornar a vida do profissional mais eficaz e ter um maior rendimento quando se trata da contagem das colônias.

O método usado neste experimento é o de ágar (substância em gel que suporta e propicia o crescimento dos microrganismos [2]) na placa de Petri para formar um ambiente propício para o crescimento da bactéria.

[3] propôs um sistema com baixo custo e alto rendimento de contagem de colônias utilizando uma câmera digital ou scanner de documentos. O software, chamado de “NICE” (NIST’s Integrated Colony Enumerator), lê o padrão de formatos de imagem e, portanto, pode ser usado em conjunto com muitos sistemas de imagem.

[4] desenvolveu o Clono-Counter, que usa três parâmetros, ou seja, níveis de cinza, tamanho máximo de uma colônia e distribuição de nível de cinza dentro da colônia, para a contagem de colônias, mas os usuários precisam ter alguma experiência para encontrar parâmetros adequados.

[5] propuseram um sistema automático contador de colônias para enumeração de colônias bacterianas sem qualquer intervenção, que se provou ser mais precisa do que Clono-Counter [4]. Embora tenha alta precisão em imagens com mídia colorida, ele tem problemas com aqueles com mídia transparente.

Para diminuir as inconsistências, este projeto visa automatizar a contagem dessas colônias de bactérias utilizando métodos de processamento de imagens digitais.

Todo o projeto é dividido em: pré-processamento, processamento e pós-processamento. No pré-processamento é onde ocorre o redimensionamento da imagem, e também é realizada a segmentação ou separação entre a região de interesse (região das colônias) e o fundo, retirando diretamente os ruídos da imagem. No processamento ocorre a preparação para que fique fácil a fase final: detecção das colônias. E finalmente no pós-processamento ocorre a detecção e a contagem dessas colônias utilizando a Transformada de Hough para círculos.

As imagens são cromáticas, o que torna um desafio interessante para o processamento digital, devido à variação na intensidade de pixels em cada amostra. Sendo assim, o objetivo foi realizar um processamento para cada cor predominante nas amostras (amarelo claro, vermelho e amarelo escuro).

Este projeto apresenta o desenvolvimento de métodos de processamento digital de imagens e está estruturado em 5 capítulos: o capítulo 2 trata-se da fundamentação teórica, onde haverá com mais detalhes de como alguns métodos utilizados funcionam. O capítulo 3 apresenta os materiais utilizados, o software que

foi usado para o desenvolvimento, dados sobre as imagens, os métodos utilizados e brevemente explicados para o entendimento sobre o desenvolvimento do projeto. O capítulo 4 apresenta os resultados obtidos. O capítulo 5 apresenta a conclusão do projeto e propostas de trabalhos futuros, e por fim o capítulo 6, onde trata-se das referências bibliográficas, apresentando as fontes das informações retiradas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo é apresentado uma breve definição do que é uma imagem digital e em seguida, todos os métodos utilizados durante a implementação do projeto detalhados de como funciona.

Uma imagem pode ser definida como uma função bidimensional, $f(x, y)$, em que x e y são coordenadas espaciais (plano), e a amplitude de f em qualquer par de coordenadas (x, y) é chamada de intensidade ou nível de cinza da imagem nesse ponto. Quando (x, y) e os valores de intensidade de f são quantidades finitas e discretas ou quantitativas, é chamado de imagem digital [6]. A imagem digital é composta por um número finito de elementos que possuem uma posição e valor, chamada de pixel (*picture element*) que é responsável justamente por representar todos esses elementos de uma imagem digital [6].

2.1 Transformada de Hough para círculos

A transformada de Hough é um dos métodos mais utilizados para a detecção de objetos que podem ser parametrizados (linhas, círculos, elipses, entre outras) e será utilizado no projeto para detectar as colônias pois possuem um formato circular. O método requer que se conheça a localização das bordas dos objetos de interesse, a fim de que sejam consideradas apenas os pixel de fronteira. Além disso, pode ser aplicado no reconhecimento de padrões de curvas desde que as mesmas possam ser descritas na forma paramétrica [7].

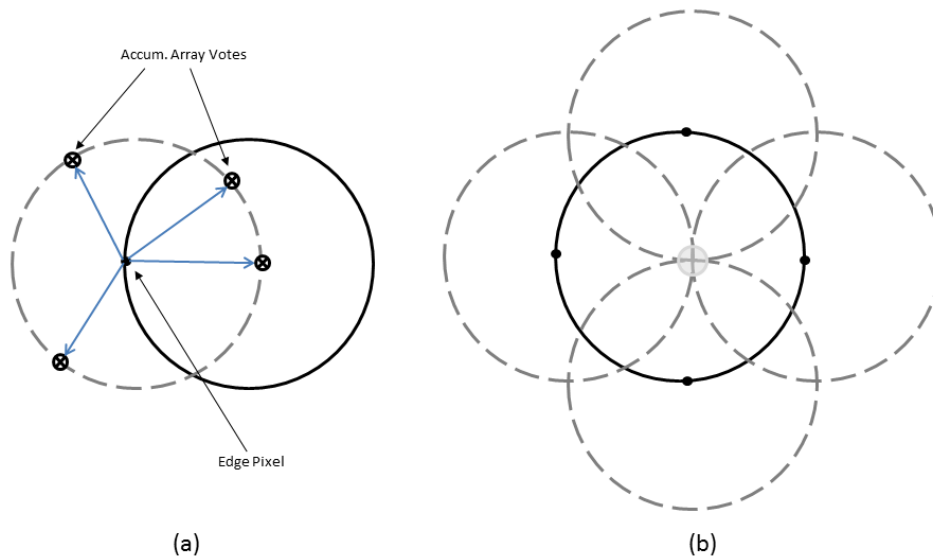
Para padrões circulares, é sugerido a utilização da transformada de Hough adaptado para circunferências. Já que a circunferência tem uma equação paramétrica, e assim, a transformada de Hough pode ser utilizada [6]. A equação da circunferência é dada por:

$$r^2 = (x - a)^2 + (y - b)^2$$

onde a e b são as coordenadas do centro da circunferência e r o seu raio [8]. Para circunferências com raio fixo, aplicando esta equação em todos os pixels do plano da imagem, cada ponto da imagem, gerará uma circunferência no espaço de parâmetros. Aplicando a transformada de Hough para padrões circulares, é gerado um espaço onde os pontos da imagem representam as circunferências no espaço de parâmetros. Assim, os pontos (a, b) , são armazenados em uma matriz acumuladora. A cada intersecção das circunferências traçadas no plano de parâmetro a matriz acumuladora incrementa o valor (a, b) . Ao final, os maiores valores definem as coordenadas do centro da circunferência [8].

A figura 1(a) mostra a matriz acumuladora armazenando as novas posições (a, b) geradas a cada iteração na borda e na figura 1(b) mostra a coordenada definida do centro da circunferência.

Figura 1 - Transformada de Hough



Fonte: [9]

2.2 Limiarização adaptativa utilizando estatísticas locais de primeira ordem

A limiarização consiste na identificação, em uma imagem, de um limiar de intensidade em que o objeto melhor se diferencie do fundo [10] e será utilizado para diferenciar as colônias do fundo da imagem para facilitar a detecção das colônias.

O método global de limiarização funciona definindo um limiar fixo e para todo pixel da imagem é comparado a intensidade do pixel com o limiar definido, e se a intensidade do pixel for maior que o limiar definido, este pixel irá fazer parte do primeiro plano (*foreground*), enquanto que se for menor, o pixel fará parte do fundo (*background*). O problema é que algumas imagens possuem sombras e outras muita iluminação, o que pode ser fatores que afetam diretamente a limiarização. Por isso foi adotado o método de limiarização adaptativa local. Este método calcula o limiar dinamicamente baseado na intensidade média local (estatísticas de primeira ordem) da vizinhança de cada pixel [11].

Este método utiliza estatísticas de primeira ordem (média) em uma grande vizinhança, e se a intensidade do pixel for maior que o limiar do filtro de média, então é definido um pixel de primeiro plano (branco), se for menor, é definido como fundo (preto) [11].

O tamanho do filtro utilizado neste projeto foi o padrão da função *imbinarize*, que utiliza uma matriz quadrada com o tamanho calculado como $\frac{1}{8}$ da menor dimensão da imagem com arredondamento para baixo. Este tamanho é apenas uma regra heurística que funciona bem para uma boa variedade de imagens [11]. O cálculo da intensidade média pode ser visto na equação (2) [10].

$$\underline{x} = \frac{\sum_{i=1}^L \sum_{j=1}^C g_{ij}}{L \times C} \quad (2)$$

Determinando:

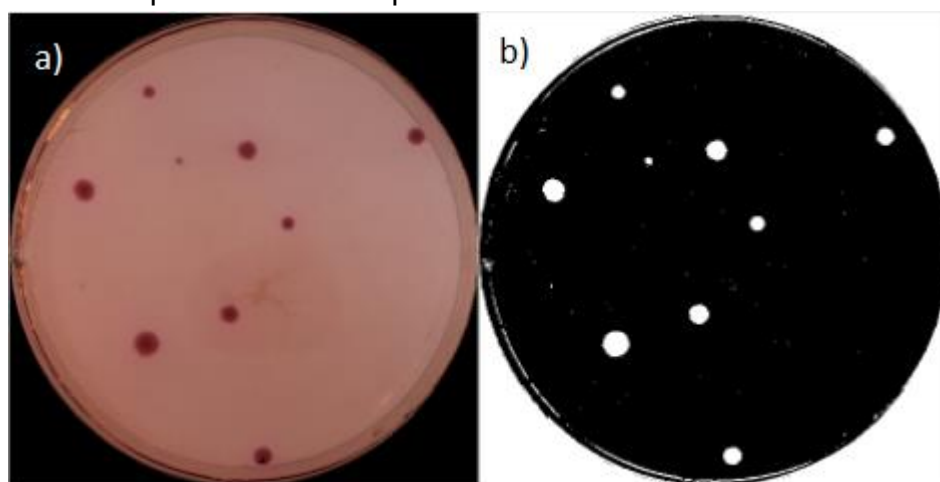
L como a quantidade de linhas da janela.

C como a quantidade de colunas da janela.

g_{ij} representa a intensidade do pixel da imagem.

$\underline{x}$ como a intensidade média local.

Figura 2 - Exemplo de limiarização adaptativa utilizando estatísticas locais de primeira ordem aplicado a uma amostra



Fonte: Autoria própria

Na figura 2(a) a imagem original, e na figura 2(b) resultado após ocorrer o processo de limiarização adaptativa local utilizando estatísticas de primeira ordem aplicado na figura 2(a).

2.3 Operação morfológica

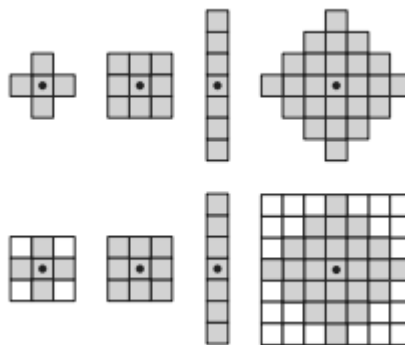
A linguagem da morfologia matemática é a teoria dos conjuntos. Como tal, a morfologia oferece uma abordagem unificada e poderosa para vários problemas de processamento de imagens. Os conjuntos em morfologia matemática representam os objetos encontrados em uma imagem [6]. As operações morfológicas serão utilizadas para a limpeza de ruído na imagem.

Por exemplo, o conjunto de todos os pixels brancos em uma imagem binária é uma descrição morfológica completa da imagem. Em imagens binárias, os conjuntos em questão são membros do espaço 2-D de números inteiros $\mathbf{Z}^2$ em que cada elemento de um conjunto é um vetor bidimensional, cujas coordenadas são (x, y) de um pixel branco (ou preto, dependendo da convenção) de uma imagem [6].

2.3.1 Elemento estruturante

O elemento estruturante é uma matriz binária bem definida, previamente conhecida e menor que a imagem a ser processada. Seu centro varre cada elemento da imagem e sua vizinhança é responsável pela manutenção da operação morfológica em si [12]. São matrizes bi-dimensionais binárias (possuem somente 0's e 1's), onde o pixel central (origem) identifica o pixel de interesse e os pixels que contém 1 definem a vizinhança [12]. É pelo formato do elemento estruturante que irá controlar as operações morfológicas.

Figura 3 - Elementos estruturantes

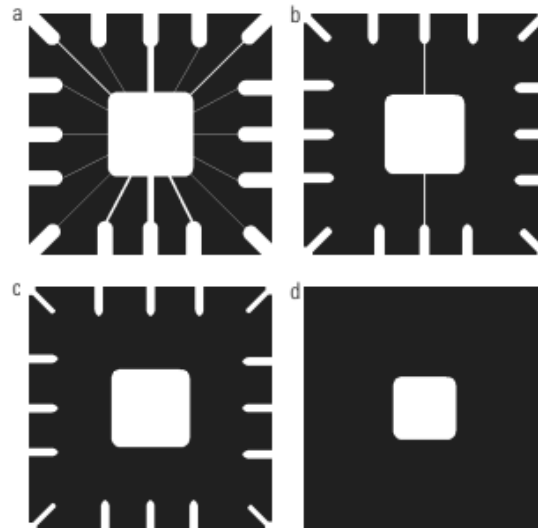


Fonte: [5]

2.3.2 Erosão e dilatação

A erosão e dilatação são operações básicas na morfologia matemática. A operação morfológica de erosão diminui ou afina os objetos em uma imagem binária. Com isso, percebe-se que é uma operação de filtragem morfológica em que os detalhes da imagem menores que o elemento estruturantes são filtrados (removidos) da imagem [6]. A figura 4 apresenta um exemplo de erosão, onde são aplicados variados tamanhos de um elemento estruturante quadrado.

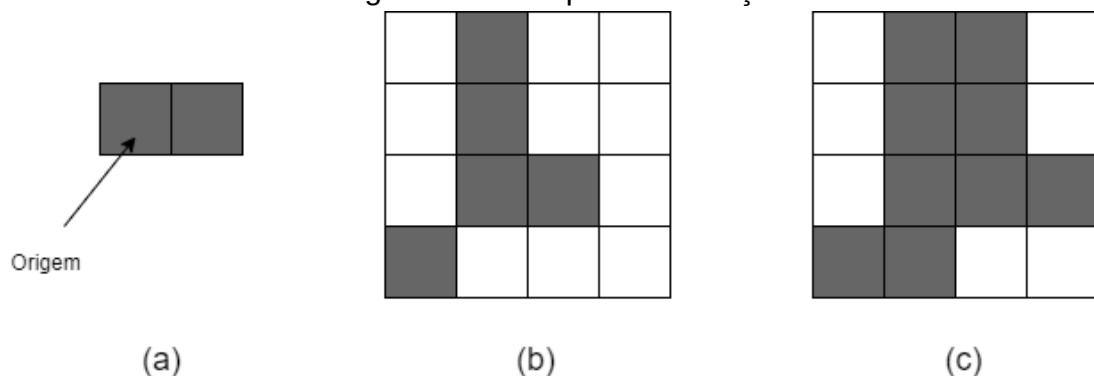
Figura 4 - Exemplo de erosão em uma imagem digital



Fonte: [6]. (a) imagem original. (b) a (d) imagem erodida utilizando elementos estruturantes quadrados de tamanhos 11×11 , 15×15 e 45×45 .

Ao contrário da erosão, que é uma operação de diminuição ou afinamento, a dilatação “aumenta” ou “engrossa” os objetos em uma imagem binária. A forma específica e a extensão desse espessamento são controladas pelo formato do elemento estruturante utilizado [6]. A figura 5 mostra o processo de uma operação morfológica de dilatação.

Figura 5 - Exemplo de dilatação



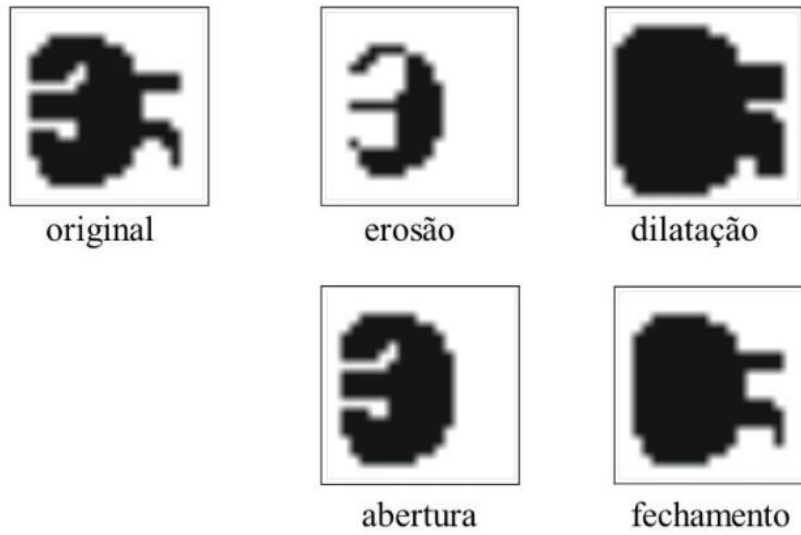
Fonte: Autoria própria. (a) elemento estruturante. (b) a imagem original. (c) a imagem após o processo de dilatação.

2.3.3 Abertura e fechamento

A abertura geralmente suaviza o contorno de um objeto e elimina as saliências finas. O fechamento também tende a suavizar contornos, mas, ao contrário da abertura, geralmente funde as descontinuidades estreitas e alonga os golfos finos, elimina pequenos buracos e preenche as lacunas em um contorno [6].

Na operação morfológica de abertura, primeiramente ocorre o processo de erosão e em seguida a dilatação. No fechamento ocorre o contrário, primeiro a dilatação, em seguida a erosão.

Figura 6 - Exemplos de diferentes operações morfológicas

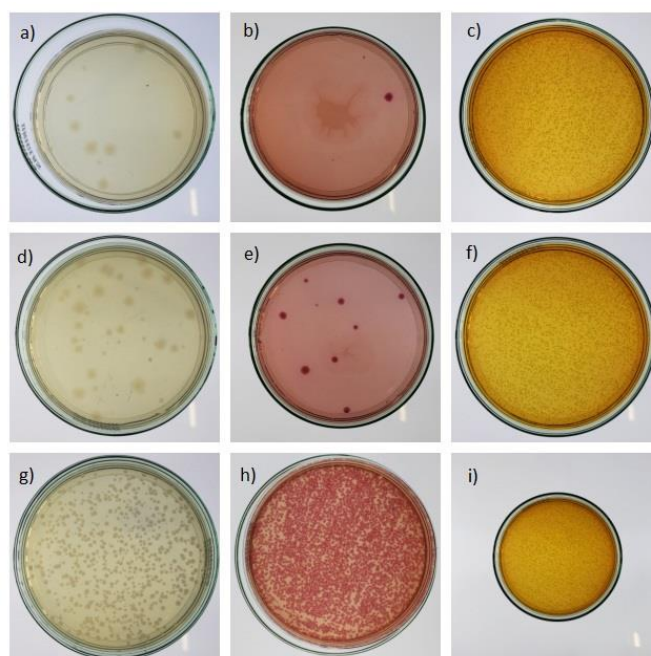


Fonte: <https://slideplayer.com.br/slide/362321/>

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Uma base de dados contendo 33 imagens foi disponibilizada pelo IPTSP (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública) da UFG (Universidade Federal de Goiás), instituição nacional e internacional de ensino e pesquisa em doenças tropicais [13]. As imagens foram obtidas por uma câmera convencional de celular e as etapas deste projeto estão divididas em: pré-processamento, processamento e pós-processamento. A figura 7 mostra algumas das amostras utilizadas no projeto.

Figura 7 - Banco de imagens



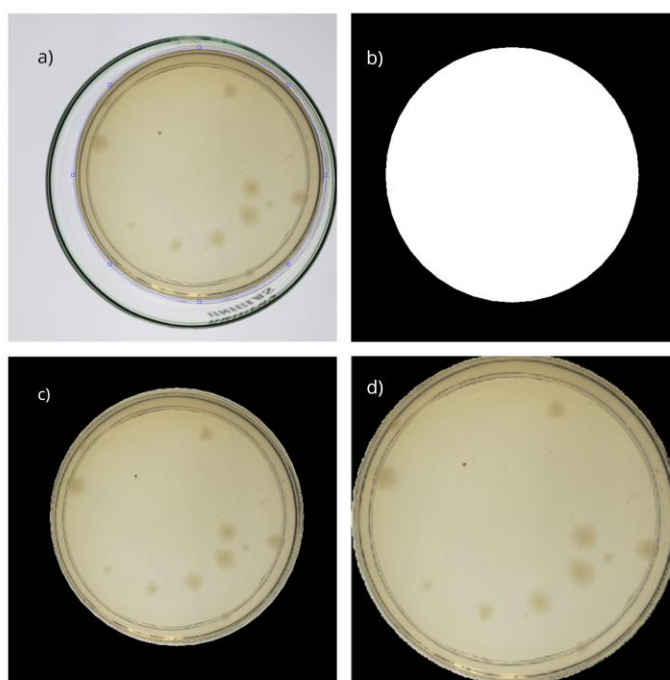
Fonte: Autoria própria.

3.1 Pré-processamento

No pré-processamento é realizado a preparação da imagem para que todas sigam um padrão básico de tamanho e seja realizada uma segmentação para eliminar o fundo da imagem com a finalidade de obter somente a região que será aplicado o processamento, evitando assim, bastante ruído que possa atrapalhar o processamento [6].

Primeiramente a imagem sofre 20% (valor obtido empiricamente com base em [14]) da redução da dimensão, em seguida a imagem é segmentada na região de interesse através do desenho de um elipse, removendo vários ruídos que podem ser encontrados fora da região de interesse, como mostra a figura 8(a). Em seguida, é gerada uma imagem binária (Figura 8(b)), onde a região de interesse é branca (pixels com valores igual a 1) e o fundo preto (pixels com valores igual a 0). Essa imagem será a máscara para que, ao realizar a multiplicação com a imagem original, fique somente a região das colônias e o fundo preto (Figura 8(c)). Por fim, a imagem é cortada para que fique somente a região segmentada, removendo o excesso do fundo, como apresentado na figura 8(d).

Figura 8 - Exemplo de um pré-processamento aplicado em uma amostra.



Fonte: Autoria própria. (a) imagem original com a região marcada para a segmentação, (b) imagem binarizada após o recorte (máscara), (c) imagem somente com a região de interesse, (d) imagem com a remoção excessiva do fundo

3.2 Processamento

No processamento ocorre todo o tratamento necessário para gerar a imagem binária que será usada para a contagem das colônias.

Como podemos ver na figura 7, algumas amostras apresentam diferentes predominâncias de cores (amarelo claro, vermelho e amarelo escuro). Por serem imagens cromáticas, foi realizado um processamento para cada cor diferente.

As imagens foram ordenadas por cor, com o objetivo de facilitar a obtenção da média da intensidade dos pixels das imagens. As 12 primeiras possuem predominância na cor amarelo claro, as próximas 18 imagens são vermelhas e as últimas 3 amarelo escuro. Primeiramente, foi obtido a quantidade de pixels brancos ao obter a máscara (Figura 8(b)), em seguida cada imagem foi separada nos canais RGB e para cada canal, realizou-se a soma da intensidade de pixels para mais tarde realizar o cálculo da média. Assim que a quantidade total de pixels na região de interesse e média da intensidade dos pixels em cada canal de cor for obtida, é possível realizar o cálculo de média:

$$mediaR = \frac{SomaR}{TotalP} \quad (3)$$

$$mediaG = \frac{SomaG}{TotalP} \quad (4)$$

$$\mathbf{mediaB} = \frac{\mathbf{SomaB}}{\mathbf{TotalP}} \quad (5)$$

Onde **mediaR**, **mediaG** e **mediaB** é a média total do canal vermelho, verde e azul e **SomaR**, **SomaG** e **SomaB** é a soma da intensidade dos pixels do canal vermelho, verde e azul, respectivamente e **TotalP** é a quantidade de pixels da região.

Realizando os cálculos (3), (4) e (5) para todas amostras em cada cor diferente, obtém-se um alcance de valor mínimo de média e um valor máximo de média. Se a imagem a ser processada estiver dentro do alcance dos valores da cor amarelo claro, será realizado o processamento preparado para imagem de cor amarelo claro, e assim acontece o mesmo com as outras cores.

Tabela 1 - Valores mínimos de média obtido

	Amostra amarelo claro	Amostra vermelha	Amostra amarelo escuro
Canal vermelho	168	140	177
Canal verde	160	78	125
Canal azul	116	58	10

Fonte: Autoria própria

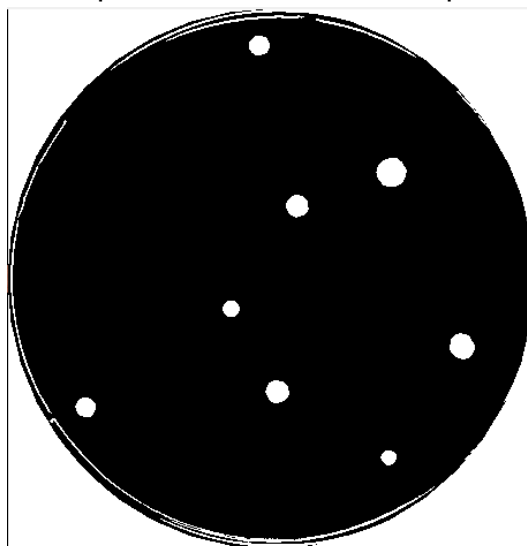
Tabela 2 - Valores de média máxima obtido

	Amostra amarelo claro	Amostra vermelha	Amostra amarelo escuro
Canal vermelho	190	184	189
Canal verde	183	145	138
Canal azul	159	127	26

Fonte: Autoria própria.

A Figura 9 mostra o resultado final de um processamento para uma amostra com predominância na cor vermelha como exemplo.

Figura 9 - Exemplo de resultado final do processamento.



Fonte: Autoria própria.

3.2.1 Processamento para amostras amarelo claro

As amostras amarelo claro (Figura 7(a,d e g)) possuem o problema da cor da colônia ser muito semelhante com o fundo, dificultando bastante a segmentação. Para que houvesse um maior destaque da colônia do fundo, foi utilizado um método para ajustar o contraste da imagem para que fique mais escura.

Em seguida é necessário que a imagem seja transformada para escala de cinza para que seja realizada a limiarização. Logo foi utilizado o método de limiarização adaptativa local para realizar a segmentação da colônia do fundo (mais detalhes na seção 2.2). Para este método foi passado uma sensibilidade de limiarização fora do padrão (0.5) [15] e foi definido 0.64 por empirismo, pois retornou o melhor resultado.

Após realizar o complemento da imagem (pixels 0 viram 1 e vice-versa), a imagem binarizada ainda possui muitos ruídos e o objetivo é deixar somente círculos para a Transformada de Hough não detectar ruído como círculo. Para remover os ruídos, é aplicado uma operação morfológica de abertura (mais detalhes na seção 2.3.3) com um elemento estrutural no formato de esfera com 5 pixels de raio [14], em seguida é aplicado um filtro mediano para diminuir o ruído que restou e preservar as bordas.

3.2.2 Processamento para amostras vermelhas

Diferentemente das amostras amarelo claro (Figura 7 (a,d,g)), as amostras vermelhas mostraram uma maior diferenciação das colônias com o fundo, como mostra as figuras 7(b,e,h). Em seguida, a imagem foi transformada para escala de cinza para que ocorresse a limiarização. Assim como amostras amarelo claro, o método de limiarização foi o mesmo para as vermelhas, porém com valor da sensibilidade padrão 0.5 [15] e definindo que o primeiro plano é escuro para que ao

realizar a limiarização local, os pixels mais escuros sejam as colônias (mais escuras). Em seguida é realizado o complemento da imagem para inverter a intensidade dos pixels deixando o fundo preto e as colônias (primeiro plano) brancas e utilizar o método para remover regiões menores que 50 pixels.

3.2.2 Processamento para amostras amarelo escuro

Assim como o processamento das outras 2 cores, a imagem é transformada para a escala de cinza e em seguida ocorre a limiarização adaptativa local com sensibilidade igual a 0.62 (valor obtido empiricamente com base no valor padrão [15]), especificando a cor do primeiro plano como escuro e realizando o complemento da imagem.

3.3 Pós-processamento

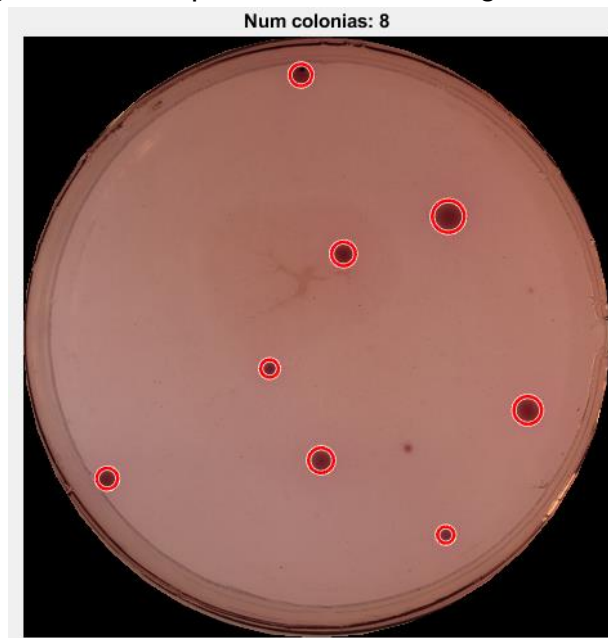
Para todas as amostras foi realizado o mesmo processo de detecção utilizando a transformada de Hough para círculos. Único parâmetro que todos possuem em comum é a polaridade dos objetos de primeiro plano que são definidos como “claro” pois todos são realizados o complemento da imagem durante o processamento, o que deixa as colônias com valores igual 1 (primeiro plano) e o fundo com valores igual a 0 (preto). As diferenças foram os outros parâmetros e valores do alcance de raio dos círculos a serem encontrados para cada cor.

Há a opção de aumentar a sensibilidade de detecção dos círculos passando como parâmetro na função *imfindcircles* do matlab, no qual aumenta a sensibilidade da matriz acumuladora, assim detectando mais círculos, incluindo os parcialmente obscuros [9].

Para o amostras amarelo claro, foi definido um alcance de raio entre 7 e 23 pixels, e sensibilidade padrão de 0.85. Já as amostras vermelhas, foi definido um alcance de raio entre 4 e 20 pixels e sensibilidade de detecção também padrão de 0,85 e para as amostras amarelo escuro, por possuir grande quantidade de colônias e áreas muito pequenas, o alcance do raio foi menor, entre 2 e 6 pixels de diâmetro, e sensibilidade de detecção como 0,9. Todos os valores citados (alcance do raio e de sensibilidade) foram obtidos empiricamente baseado nos valores padrões da função *imfindcircles* [9].

Apesar do algoritmo da transformada de Hough para círculos diminuir a acurácia para alcance mínimos inferiores a 5 pixels [9], foi necessário para as amostras amarelo escuro, pois as colônias estavam muito pequenas desde a aquisição da imagem. A função *imfindcircles* do MatLab, retorna os centros e os raios dos círculos detectados, o que torna fácil a contagem de círculos [9]. Para obter a contagem, apenas foi necessário obter a quantidade de centros retornados da função da transformada de Hough. A figura 10 apresenta o resultado obtido de um pós-processamento da figura 9.

Figura 10 - Pós-processamento da figura 9



Fonte: Autoria própria.

4 RESULTADOS

Neste capítulo é apresentado os resultados obtidos do processamento geral da detecção de colônias em placas de Petri utilizando fundamentos do processamento de imagens digitais através de uma matriz de confusão.

Para realizar o pré-processamento, as segmentações das regiões de interesse foram selecionadas precisamente a fim de selecionar somente a região que contém as colônias (Figura 8).

4.1 Metodologia de avaliação

Para classificar os resultados obtidos foi utilizado o método da matriz de confusão. Uma matriz de confusão é uma tabela que indica os erros e acertos do modelo, comparando com o resultado esperado [16]. A partir destes dados, é possível calcular uma variedade de métricas de avaliação para a classificação.

A tabela da matriz de confusão é composta por 4 métricas para a classificação: verdadeiro positivo, falso negativo, falso positivo e verdadeiro negativo.

Verdadeiro Positivo (VP): é contabilizado quando o modelo previu corretamente a classe a ser prevista [17]. Neste caso, é quando a colônia é detectada corretamente.

Falso Positivo (FP): ocorre quando no conjunto real, a classe a ser prevista previu incorretamente [18]. Neste caso, quando é detectado uma colônia onde não há colônia.

Verdadeiro negativo (VN): ocorre quando o modelo previu corretamente o que realmente não era de interesse [18]. Neste caso, Quando não circula nenhuma bactéria em uma amostra onde não existem bactérias.

Falso negativo (FN): é contabilizado quando o modelo previu como falsa uma amostra que era de interesse [17]. Neste caso, quando o modelo não circula uma bactéria de interesse.

A tabela 3 mostra como é um modelo de matriz de confusão.

Tabela 3 - Modelo de uma matriz de confusão.

		Valor predito	
		Colônia	Não-Colônia
Valor Real	Colônia	Verdadeiro Positivo (VP)	Falso Negativo (FN)
	Não-Colônia	Falso Positivo (FP)	Verdadeiro Negativo (VN)

Fonte: [17].

As predições corretas estão de verde (diagonal principal) e as erradas de vermelho (diagonal secundária).

Os valores obtidos de cada métrica da tabela 3 por amostra, é apresentado na tabela 4. O total de colônias é a soma dos verdadeiros positivos (colônias detectadas corretamente) com os falsos negativos (colônias não detectadas), pois os falsos positivos (detecção onde não há colônia) não são contabilizados como uma colônia da placa.

Tabela 4 - Resultados de todas as amostras (continua)

Amostras	VP	FP	FN	Total colônias
Amostra 1	10	0	0	10
Amostra 2	9	0	1	10
Amostra 3	7	0	3	10
Amostra 4	10	1	0	10
Amostra 5	32	0	6	38
Amostra 6	33	0	5	38
Amostra 7	20	0	18	38
Amostra 8	25	0	13	38
Amostra 9	117	6	381	504
Amostra 10	171	4	329	504
Amostra 11	0	0	504	504
Amostra 12	36	2	466	504
Amostra 13	1	0	0	1
Amostra 14	1	0	0	1
Amostra 15	1	0	0	1
Amostra 16	1	0	0	1
Amostra 17	8	1	1	9
Amostra 18	8	1	1	9
Amostra 19	8	0	1	9
Amostra 20	8	1	1	9
Amostras	VP	FP	FN	Total colônias
Amostra 21	322	9	537	868
Amostra 22	332	0	536	868
Amostra 23	133	0	735	868
Amostra 24	156	0	712	868
Amostra 25	223	25	3596	3844
Amostra 26	289	0	3555	3844
Amostra 27	105	0	3739	3844
Amostra 28	265	0	3579	3844
Amostra 29	244	0	3600	3844

Amostra 30	124	0	3720	3844
Amostra 31	560	22	2430	3012
Amostra 32	580	30	2402	3012
Amostra 33	189	4	2819	3012

Fonte: Autoria própria.

Percebe-se na tabela 4 que os verdadeiros negativos não foram contabilizados, pois não foi possível um caso em que não há colônias na amostra para verificar se o modelo realmente não detectaria colônias. Para os cálculos, este dado será considerada como 0 (zero).

O valor total das amostras que possuem muitas bactérias são uma estimativa, pois a contagem foi feita manualmente dividindo a placa de petri em um 4 quadrantes iguais e contabilizando apenas um quadrante. O valor total foi a quantidade de colônias contabilizadas do primeiro quadrante multiplicado por 4 (quantidade de quadrantes), pois havia uma enorme quantidade de colônias, assim simulando uma situação real.

Também houve casos em amostras com grande quantidade de colônias em que a Transformada de Hough detectou mais de 1 colônia como 1 colônia. Cada círculo desse tipo foi considerado como verdadeiro positivo, pois detectou pelo menos 1 colônia. Qualquer outra má interpretação do algoritmo, foi contabilizado como falso positivo.

A tabela 5 mostra a matriz de confusão preenchida com todos os dados da tabela 4 (as 33 amostras). Somando todos os verdadeiros positivos foram obtidas 4028 colônias detectadas, 33.802 colônias não detectadas (falsos negativos) e 106 falsos positivos.

Tabela 5 - Matriz de confusão preenchida com os resultados obtidos

		Valor predito	
		Colônia	Não-Colônia
Valor Real	Colônia	4028	33802
	Não-Colônia	106	-

Fonte: Autoria própria.

Percebe-se muitos falsos negativos obtidos para o resultado geral obtido (tabela 5), com base nisso, a tabela 6 mostra a matriz de confusão preenchida para as amostras que não possuem grandes quantidades de colônias para analisar os resultados sem grandes falsos negativos. Foram selecionadas as amostras 1 a 8 e as amostras 21 a 24 da tabela 4. Sendo

assim, foram obtidos 182 verdadeiros positivos, 50 falsos negativos e 4 falsos positivos.

Tabela 6 - Matriz de confusão para amostras com poucas colônias

		Valor predito	
		Colônia	Não-Colônia
Valor Real	Colônia	182	50
	Não-Colônia	4	-

Fonte: Autoria própria.

Com estes dados, é possível realizar cálculos para classificar os resultados obtidos, como acurácia, precisão, *recall* e o f1-score.

Acurácia: mostra quanto o modelo acertou das possíveis previsões [17].

$$\textbf{Acurácia} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} \quad (6)$$

Precisão: dentre todas as classificações de classe positivo que o modelo fez, quantas estão corretas [17].

$$\textbf{Precisão} = \frac{VP}{VP + FP} \quad (7)$$

Recall: dentre todas as situações de classe positiva como valor previsto, quantas estão corretas [17].

$$\textbf{Recall} = \frac{VP}{VP + FN} \quad (8)$$

F1-Score: mostra o balanço entre a precisão e o *recall* do modelo. É um indicativo de que ou a precisão ou o *recall* está baixo [17].

$$\textbf{F1 - Score} = 2 * \frac{\textbf{Precisão} * \textbf{recall}}{\textbf{Precisão} + \textbf{recall}} \quad (9)$$

Utilizando as fórmulas (6) a (9) com os dados da tabela 4, foram obtidos os resultados apresentados da tabela 7 a 12. A tabela 7 apresenta o resultado dos cálculos utilizando as amostras 1 a 33. A tabela 8 apresenta os resultados para as amostras 1 a 8 e a tabela 9 os resultados obtidos para as amostras 13 a 20. A tabela 13 apresenta os resultados obtidos utilizando os dados da tabela 6.

Tabela 7 - Resultado geral

	Resultado (%)
Acurácia	10,62
Precisão	97,43
Recall	10,64
F1 - Score	19,19

Fonte: Autoria Própria

Tabela 8 - Resultado geral para a amostra amarelo claro

	Resultado (%)
Acurácia	21,16
Precisão	97,30
Recall	21,28
F1-Score	34,93

Fonte: Autoria própria.

Tabela 9 - Resultados para o amostra amarelo claro sem grandes quantidades de colônias

	Resultado (%)
Acurácia	75,64
Precisão	99,31
Recall	76,04
F1-Score	86,13

Fonte: Autoria própria.

Tabela 10 - Resultado geral para amostra vermelha

	Resultado (%)
Acurácia	8,37
Precisão	98,36
Recall	8,38
F1-Score	15,45

Fonte: Autoria própria.

Tabela 11 - Resultado para a amostra vermelha sem grandes quantidades de colônia

	Resultado (%)
Acurácia	83,72
Precisão	92,30
Recall	90,00
F1-Score	91,11

Fonte: Autoria própria.

Tabela 12 - Resultado geral para o amostras amarelo escuro

	Resultado (%)
Acurácia	14,61
Precisão	95,95
Recall	14,70
F1-Score	25,50

Fonte: Autoria própria.

Tabela 13 - Resultado para amostras com poucas colônias

	Resultado (%)
Acurácia	77,11
Precisão	97,84
Recall	78,44
F1-Score	87,08

Fonte: Autoria própria

5. CONCLUSÃO

Este trabalho propôs um sistema de automatização de contagem de colônias de bactérias. Baseado no formato das colônias (círculo), foi utilizado como detecção das colônias o método da transformada de Hough para círculos.

Os resultados foram separados por resultado geral (utilizando todos os dados da tabela 4) e por coloração predominante em cada amostra, já que cada cor passou por um processamento diferente. Dentro dos resultados de cores diferentes, também foi analisado o resultado das amostras sem muitas colônias, pois este modelo de processamento apresentou dificuldades para a detecção das colônias em amostras que tinham grandes quantidades, por isso é interessante dedicar uma análise de resultados excluindo estas amostras para discussão.

Analisando a tabela 7, a tabela dos resultados gerais, percebe-se que a acurácia é de aproximadamente 11%. Isso acontece pelo motivo do resultado incluir os dados das amostras com muitas colônias, que como já citado, apresentaram dificuldade quanto à detecção. A dificuldade desta detecção se deve ao motivo dessas amostras possuírem tanta colônia que muitas delas estão próximas umas das outras, fazendo assim com que ao binarizar a imagem, elas não formem círculos, e sim algum formato bem diferente, resultando com que o algoritmo para detecção padrão de círculos utilizado não conseguisse identificar de forma clara as colônias separadamente.

O tamanho das colônias também influenciam para o algoritmo da Transformada de Hough detectar de forma precisa a colônia e algumas amostras, pois quanto menor o raio dos círculos a serem detectados, mais falsos positivos aparecem, diminuindo ainda mais a acurácia. As amostras do ágar amarelo escuro, além de ocorrer o problema de muitas colônias próximas das outras, também possuíam colônias muito pequenas, que mesmo aumentando a imagem, não foi possível detectar corretamente.

Como podemos ver na tabela 9 e 11, os resultados que não possuem as amostras com muitas colônias de amarelo claro e vermelho, possuem 75% e 83% de acurácia com 99% e 92% de precisão respectivamente, mostrando que as amostras com pequena e média quantidade de colônias possuem um resultado muito melhor, pois apresentam características contrárias ao das apresentadas para as amostras com muitas colônias. Não há amostras de cor amarelo escuro com poucas colônias, por esse motivo não houve uma tabela específica para tal finalidade.

Percebe-se que nas tabelas 8, 10 e 12, (resultados somente das amostras de amarelo claro, vermelho e amarelo escuro respectivamente) quando as amostras com bastante ocorrência de colônias estão incluídas, a acurácia reduz bruscamente. Houve apenas 8% de acurácia para amostras vermelhas, pois havia 9 de 18 amostras com muitas colônias, sendo assim a cor que mais houve ocorrências deste tipo de amostra.

A tabela 13 mostra o resultado somente para as amostras que possuem poucas colônias, a fim de analisar o impacto obtido ao incluir as amostras que possuem grandes quantidades de colônias nos cálculos. Percebe-se então que a

acurácia subiu de 10,62% (tabela 7) para 77,11%, mostrando assim, um aumento significativo quando as amostras com muitas colônias são retiradas e concluindo na dificuldade do modelo na detecção em amostras com muitas colônias.

Podemos concluir então que para amostras de alta ocorrência de colônias nas placas de petri, o processamento não possui uma boa acurácia e funciona melhor para amostras com pequena e média quantidade de colônias, e que mesmo sem um padrão de aquisição de imagens, apresentou um bom resultado.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

Para trabalhos futuros, é sugerido justamente a apresentação de um material que melhore a acurácia para as imagens com pequenas e médias colônias, mas principalmente para as que possuem uma enorme quantidade de colônias, adicionando novos processamentos como a *watershed transform* [19] e reajustando parâmetros do processamento.

E o desenvolvimento de um aplicativo móvel tanto para android quanto para iOS capaz de realizar os processamentos implementados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ZHANG, C. et al. **An Automated Bacterial Colony Counting System**. Disponível em: <<https://cpb-us-w2.wpmucdn.com/sites.uab.edu/dist/3/66/files/2020/01/SNUTS2008.pdf>>. Acesso em 17 nov. 2020.
- [2] **Como os microrganismos se desenvolvem em um Meio de Cultura?**. KASVI. Paraná, 12 de maio de 2016. Disponível em: <<https://kasvi.com.br/como-os-microrganismos-se-desenvolvem-em-meio-de-cultura/#:~:text=%C3%81gar%20%E2%80%93%20subst%C3%A2ncia%20em%20gel%20colocada,propicia%20o%20crescimento%20dos%20microrganismos>>. Acesso em: 14 nov. 2020.
- [3] CLARKE, Matthew L. et al. **Low-Cost, High-Throughput, Automated Counting of Bacterial Colonies**. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2909336/>>. Acesso em: 22 nov 2020.
- [4] NIYAZI, Maximilian; NIYAZI, Ismat; BELKA, Claus. **Counting colonies of clonogenic assays by using densitometric software**. 2007. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/1748-717X-2-4>>. Acesso em: 06 dez 2020.
- [5] Chen, WB., Zhang, C. **An automated bacterial colony counting and classification system**. *Inf Syst Front* 11, 349–368 (2009). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10796-009-9149-0>>. Acesso em: 06 dez 2020.
- [6] WOODS, Richard; GONZALEZ, Rafael. **Processamento Digital de Imagens**. 3 ed. 2010.
- [7] SILVA, Diogo Soares da. **Aplicação de Transformadas de Hough na Detecção de Leveduras Viáveis e Inviáveis**. 12 jun 2010. Disponível em: <<http://www.gpec.ucdb.br/pistori/orientacoes/planos/diogo2010.pdf>>. Acesso em 17 nov. 2020.
- [8] YUEN, H.K., et al. **A comparative study of Hough Transform methods for circle finding**. Department of Electronics and Electrical Engineering University of Surrey, Guildford, GU2 5XH. U.K. Disponível em: <<http://www.bmva.org/bmvc/1989/avc-89-029.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2020.
- [9] MATLAB. **Mathworks**. Find circles using circular Hough transform. Disponível em: <<https://www.mathworks.com/help/images/ref/imfindcircles.html>>. Acesso em: 15 de nov. de 2020.
- [10] LOPES, Fabrício Martins. **Um modelo perceptivo de limiarização de imagens digitais**. 2003. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curso de pós-graduação em informática, Curitiba. Disponível em: <<http://paginapessoal.utfpr.edu.br/fabricio/fabricio-martins->

lopes/pesquisa/publicacoes/2003-dissertacao-ufpr-uem-fabricio-m-lopes.pdf>.
Acesso em: 16 nov. 2020.

[11] EDDINGS, Steve. **Adaptive thresholding for binarization**. 25 jul 2016.
Disponível em: <<https://laptrinhx.com/adaptive-thresholding-for-binarization-1414876881/>>. Acesso em: 18 nov. 2020.

[12] RESENDE, Damares C.O. De, et al. **A influência do elemento estruturante no processo de detecção de nuvens em imagens de sensoriamento remoto**.
Disponível em:
<<http://marte2.sid.inpe.br/col/dpi.inpe.br/marte2/2013/05.28.23.18.51/doc/p0333.pdf>>.
Acesso em: 19 nov. 2019.

[13] Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP. **Histórico**. Disponível em: <<https://iptsp.ufg.br/p/661-historico>>. UFG. Acesso em: 05 dez 2020.

[14] MATLAB. **Mathworks**. Resize image. Disponível em:
<<https://www.mathworks.com/help/images/ref/imresize.html>>. Acesso em: 06 dez 2020.

[15] MATLAB. **Mathworks**. Binarize 2-D grayscale image or 3-D volume by thresholding. Disponível em:
<<https://www.mathworks.com/help/images/ref/imbinarize.html>>. Acesso em: 06 dez 2020.

[16] MATLAB. **Mathworks**. Morphologically open image. Disponível em:
<<https://www.mathworks.com/help/images/ref/imopen.html>>. Acesso em: 06 dez 2020.

[17] RODRIGUES, Vitor. **Métricas de Avaliação: acurácia, precisão, recall... quais as diferenças?** 12 abril 2019. Disponível em:
<<https://medium.com/@vitorborbarodrigues/m%C3%A9tricas-de-avalia%C3%A7%C3%A3o-acur%C3%A1cia-precis%C3%A3o-recall-quais-as-diferen%C3%A7as-c8f05e0a513c>>. Acesso em: 19 nov. 2020.

[18] LIMA, Arnold Christian Veloso; TOME, Rafael Alessandro Alves; LAUREANO, Gustavo Teodoro. **Pesquisa e desenvolvimento de um sistema de detecção de placas licenciadas**, 2019. Instituto de Informática. Universidade Federal de Goiás - UFG.

[19] EDDINGS, Steve. **The Watershed Transform: Strategies for Image Segmentation**. Mathworks. Disponível em:
<<https://www.mathworks.com/company/newsletters/articles/the-watershed-transform-strategies-for-image-segmentation.html>>. Acesso em: 06 dez 2020.