

Segmentação e Identificação de Colônias de Bactérias em Placas Petri

Utilizando Processamento Digital de Imagens

Autores: Matheus Paulino¹, Jean-Jacques De Groote²

Colaboradores: Barbara Diogo³, Nicolas Scarpa⁴

^{1,2,3,4}Centro Universitário Barão de Mauá

¹*mathpaulinor@gmail.com (Ciência da Computação)*, ²*jean.georges@baraodemaua.br*

Resumo

A pesquisa apresenta processos voltados à segmentação e identificação de bactérias em placas de Petri, por meio da aplicação de técnicas de Processamento Digital de Imagens (PDI). O escopo principal do trabalho consiste em simplificar e otimizar a identificação e contagem de colônias bacterianas presentes nas placas. Mediante o emprego do PDI, mostramos que é possível extrair informações detalhadas, incluindo a localização precisa, o tamanho e a morfologia das colônias, o que viabiliza uma análise das espécies presentes na amostra. As operações de pré-processamento foram utilizadas para auxiliar a segmentação das colônias do fundo e demais estruturas, possibilitando a implementação do processo de contagem automatizada. Os resultados demonstram a viabilidade da técnica para identificação das colônias, com uma precisão de 64% na contagem automática em relação à contagem manual.

Introdução

Para automatizar e aprimorar a segmentação e identificação de bactérias em placas de Petri utilizamos técnicas de Processamento Digital de Imagens (PDI). O objetivo principal é simplificar e otimizar o processo de contagem e análise de colônias bacterianas, proporcionando uma visão detalhada das espécies presentes na amostra. Para isso, são aplicadas operações de pré-processamento e segmentação, seguidas pela contagem automatizada das colônias.

O uso do Processamento Digital de Imagens oferece uma abordagem para superar desafios associados à intervenção humana, proporcionando uma identificação uniforme e eficiente das colônias bacterianas. Ao liberar o tempo dos especialistas para análise em vez de tarefas repetitivas, essa metodologia contribui significativamente para a eficiência e precisão dos processos laboratoriais.

Na literatura científica, foram identificados estudos relevantes que empregam a combinação de placas de Petri com técnicas de visão computacional e processamento digital de imagens (PDI). Santos

(2022) utilizou o Aprendizado Profundo e Visão Computacional para a detecção e medição automática de halos em imagens digitais utilizando uma Rede Neural Convolutiva (RNC) e o método de disco-difusão (SANTOS, 2022) como pós-processamento. Embora focado na medição de halos, a abordagem destaca a eficácia da combinação de RNC e Visão Computacional na automação desse processo em placas de Petri. Meneses e Deus (2020) realizaram a contagem automática de colônias de bactérias a partir de imagens digitais, utilizando visão computacional para substituir a tradicional contagem manual. Os resultados indicam que a contagem automática é capaz de contar 71% das colônias de bactérias válidas presentes em uma placa de Petri. Essa abordagem oferece uma maneira de simplificar e otimizar o processo de análise bacteriana, reduzindo erros e custos de tempo associados à intervenção manual.

Os dois estudos exemplificam o uso eficaz de técnicas de Visão Computacional e PDI para propósitos diversos, destacando os progressos no campo interdisciplinar de identificação de elementos de interesse pertinentes a este projeto.

Objetivos

O objetivo deste trabalho é apresentar um processo de identificação de colônias de bactérias em placas Petri que seja apurado e eficiente, reduzindo a ocorrência de falhas inerentes à intervenção humana, e permita que o tempo de especialistas seja liberado para o processo de análise.

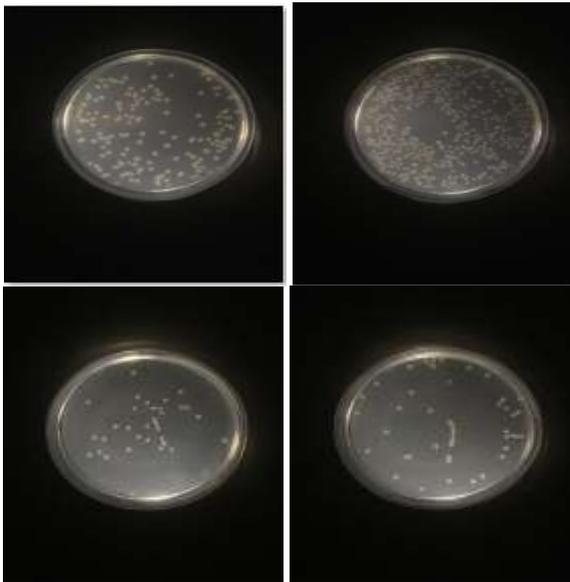
Materiais e Métodos

Nesta seção são apresentados a fonte dos dados utilizados, e os procedimentos adotados para obtenção dos resultados.

Banco de imagens

As imagens de colônias de microrganismos em placas de Petri utilizadas foram obtidas de bancos de imagens públicas da Universidade Católica de Portugal. Exemplos podem ser observados na figura 1.

Figura 1 - Imagens do banco de dados



Fonte: Database of Petri plate. Disponível em:
<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.20109377.v2>,
Acesso em 20 mar. 2024.

Plataforma de desenvolvimento

Utilizamos o ambiente de desenvolvimento Google Colab (Fig. 2), uma plataforma em nuvem baseada em notebooks Jupyter, que permite a execução remota de códigos Python. O Google Colab oferece acesso gratuito a uma infraestrutura de GPUs e TPUs. Além disso, o Colab facilitou também o compartilhamento e a colaboração nos códigos ao longo do projeto.

Figura 2 - Plataforma Google Colab.



Fonte: Conheça o Colab. Disponível em:
<https://colab.research.google.com>. Acesso em 23 mar.
2024.

Linguagem de Programação e Bibliotecas

O projeto foi realizado com a linguagem de programação Python na sua versão 3.8, aproveitando de sua sintaxe simples, seu poder computacional e suas bibliotecas já consolidadas em aplicações do segmento de PDI. Neste projeto foram utilizadas as bibliotecas NumPy v1.23, OpenCV v4.8, Pillow v9.3.0 e Scikit-image (Skimage) v1.1.

Numpy é utilizado para a manipulação eficiente de arrays multidimensionais, sendo útil no contexto de PDI, visto que as imagens são processadas como sendo uma matriz bidimensional.

OpenCV, Pillow e Scikit-image são amplamente utilizadas em Processamento Digital de Imagens em Python, fornecendo funções para a manipulação das imagens e a implementação de técnicas avançadas de PDI.

Técnicas de Processamento Digital de Imagens

Sobre o banco de imagens obtido, foram utilizadas técnicas de Processamento Digital de Imagens para a preparação da imagem e para sua posterior extração de dados. A pesquisa envolveu o uso de histogramas de cores para extrair dados úteis para o processamento, técnicas de segmentação dos objetos de interesse, como o método de binarização de Otsu e a triangularização, operações de morfologia matemática para aprimorar a imagem binarizada, e, por fim, algoritmos de contagem e determinação de coordenadas das colônias na imagem de maneira automática, baseados no uso de flood fill para preencher áreas de interesse (GONZALEZ, 2010).

Histogramas de Cores

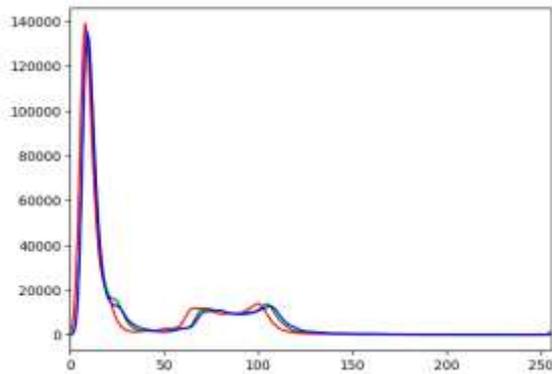
Inicialmente, foram gerados histogramas de cores para a imagem da figura 3, permitindo a análise da distribuição das intensidades de cores nos canais RGB. O uso do histograma de cores foi necessário como etapa inicial no processamento da imagem de placa de Petri contendo colônias de microrganismos. Essa análise promoveu uma melhor compreensão da composição da imagem em termos de cores nos canais RGB, fornecendo informações para os próximos processos de segmentação, identificação e contagem das colônias, como mostra os histogramas (Figs. 4, 5). Com base nos dados extraídos do histograma, foi possível realizar a segmentação da imagem utilizando os métodos de Otsu e a triangularização para o processo de contagem e determinação dos centros de massa de cada colônia.

Figura 3 - Imagem utilizada no processamento



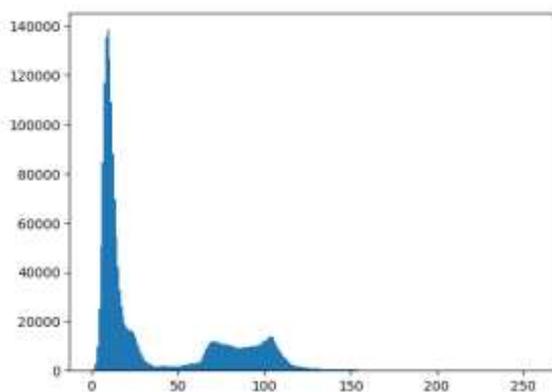
Fonte: Database of Petri plate. Disponível em: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.20109377.v2>. Acesso em 20 mar. 2024.

Figura 4 - Histograma da imagem em RGB.



Fonte: Autoria própria

Figura 5 - Histograma da imagem em escala de cinza.



Fonte: Autoria própria.

Segmentação com Método de Binarização de Otsu e Máscaras Binárias

Com os dados extraídos do histograma, foi aplicado o método de Otsu para calcular automaticamente o valor limite (*threshold*) para

cada imagem. O método de binarização de Otsu é uma técnica de binarização automática. Ele calcula o valor do limiar ótimo para separar os pixels da imagem em duas partes: uma parte que representa as colônias de microrganismos e outra que representa o restante da imagem. Esse valor é encontrado ao minimizar a diferença de intensidades de cores dentro das colônias de microrganismos e ao maximizar a diferença entre as colônias e o fundo da imagem.

Com base nesse valor limite calculado pelo método de binarização de Otsu, foram criadas máscaras binárias para a segmentação das regiões de interesse da imagem. A aplicação do método de Otsu permitiu um avanço na separação das colônias bacterianas do restante da imagem, conforme está exibido na figura 6.

Figura 6 - Imagem segmentada pelo método de binarização de Otsu



Fonte: Autoria própria

Segmentação com Triangularização

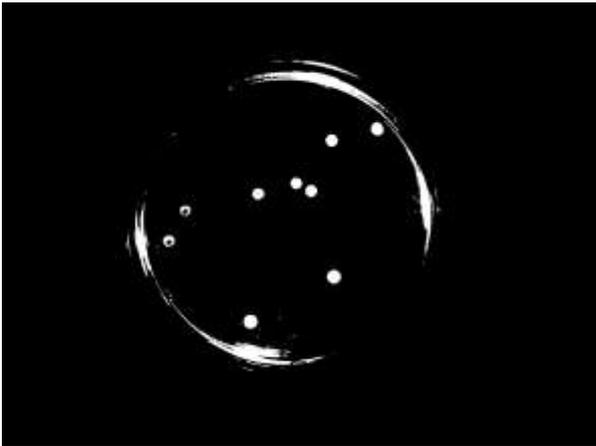
A triangularização é uma técnica de segmentação de imagens que calcula um valor limiar para cada pixel localmente, com base nos dados extraídos do histograma da imagem. Ao contrário de usar um único valor limiar para toda a imagem, a triangularização ajusta dinamicamente o critério de segmentação para cada região da imagem. Essa abordagem adaptativa auxilia na segmentação das regiões de interesse de forma mais eficiente, provendo mais precisão e detalhamento.

Esse método de segmentação foi utilizado para determinar os objetos de interesse na imagem, como pode ser observado na figura 7, identificando as regiões que correspondem às colônias de microrganismos nas placas de Petri. Essa técnica é útil em imagens com variações de iluminação ou contraste local, onde diferentes partes da imagem

requerem diferentes valores de limiar para uma melhor segmentação.

A utilização das máscaras binárias, somada com a etapa posterior de refinamento da binarização, permitiu a implementação das próximas etapas de processamento, tais como o processo de contagem e determinação dos centros de massa dos objetos de interesse.

Figura 7 - Imagem após aplicação da Triangularização.



Fonte: Autoria própria.

Remoção de Ruídos com Técnicas de Morfologia Matemática

Para eliminar pequenas regiões com ruídos remanescentes da etapa de binarização, foram aplicadas técnicas de morfologia matemática na imagem, sendo elas a erosão e a convolução (GONZALEZ, 2010). As técnicas de morfologia matemática consistem em percorrer a matriz da imagem original processando-a pixel a pixel utilizando de um elemento estruturante (*Kernel*), que é uma matriz pequena de valores, e operações matemáticas entre essas matrizes, resultando em uma nova imagem.

A erosão é um processo morfológico que reduz os objetos da imagem, especialmente os objetos menores que o elemento estruturante utilizado. Na erosão, o elemento estruturante é percorrido sobre a imagem, e para cada posição em que ele se encontra, verifica-se se todos os pixels vizinhos, definidos por este *kernel* são brancos. Caso sejam, o pixel central do *kernel* se mantém branco, caso contrário, é transformado em preto, ou seja, é “erodido”.

A convolução é uma operação morfológica que aplica um filtro à imagem para realçar e suavizar suas características. O processo de convolução envolve também a utilização do *kernel* para

percorrer toda a imagem. Para cada iteração, os valores que compõem o *kernel* são multiplicados pelos valores dos pixels correspondentes na imagem. Em seguida, os resultados da multiplicação são somados para obter o valor do pixel na posição central do *kernel* na imagem de saída, gerando uma nova imagem processada. A utilização da convolução promove melhorias na qualidade da imagem, como suavização de bordas bruscas de pixels, o que reduz o impacto de pequenos ruídos na imagem.

Tais recursos de morfologia matemática permitiram a remoção de pequenos ruídos na imagem, bem como a segregação dos objetos de interesse muito próximos e uma melhora da qualidade da imagem para os processamentos posteriores, como mostra a figura 8.

Figura 8 - Imagem segmentada aprimorada com Morfologia Matemática



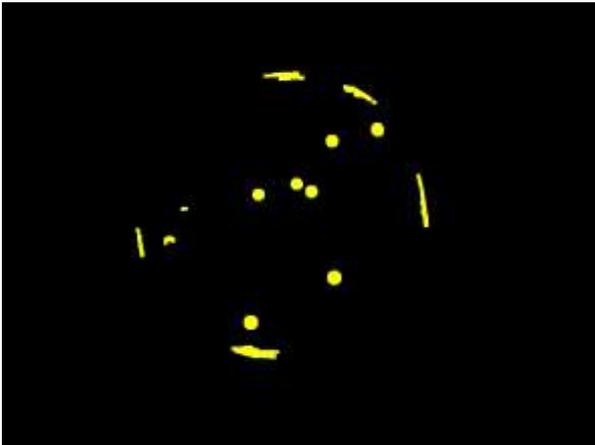
Fonte: Autoria própria.

Algoritmos para Automação da Contagem das Colônias e Determinação dos Centros de Massa

O algoritmo do processo de contagem automática utiliza a técnica Floodfill. Essa técnica consiste em preencher uma região conectada na imagem com uma cor específica. Neste algoritmo, para preencher a região referente aos objetos de interesse, foi utilizado amarelo, conforme mostra a figura 9.

A contagem automática nesse algoritmo se dá por percorrer toda a imagem procurando pelas regiões brancas. Assim que uma é encontrada, então essa região sofre o processo de Floodfill, se tornando uma região amarela agora. Ao mesmo passo, o contador de incidências do objeto de interesse é incrementado.

Figura 9 - Imagem após processo de contagem

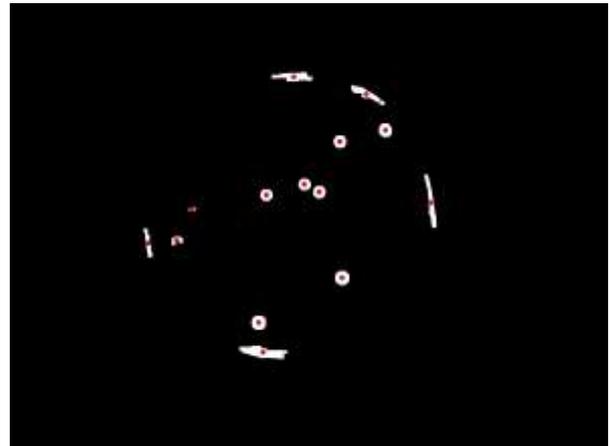


Fonte: Autoria própria

O último processo aplicado às imagens para extração de dados foi a determinação dos centros de massa de cada colônia de microrganismo presente na placa de Petri. Esse processo fornece informações sobre a distribuição das colônias na placa, sendo fundamental para a pesquisa em microbiologia.

O centro de massa de um objeto na Visão Computacional é o ponto médio do aglomerado de pixels que compõem o objeto de interesse, que nesse caso são as colônias de microrganismos. O ponto médio é calculado através da média aritmética das coordenadas dos pixels que compõem o objeto de interesse. Para determinar todos os centros de massa, a imagem foi percorrida buscando pelas colônias de microrganismos, ou seja, os aglomerados de pixel branco e aplicando em cada um deles esse cálculo. Os centros de massa encontrados foram armazenados em uma estrutura de dados, para serem utilizados posteriormente, por exemplo, para demarcar, neste caso em vermelho, onde se localiza cada centro de massa na imagem, como mostra a figura 10.

Figura 10 - Centros de massa dos objetos de interesse demarcados na imagem segmentada



Fonte: Autoria própria

Viabilização dos Resultados da Pesquisa na Nuvem

Os algoritmos de Processamento Digital de Imagens gerados ao longo da pesquisa foram integrados ao serviço AWS Lambda (AMAZON, 2014).

Essa integração viabiliza a aplicação prática dos resultados em ambientes do mundo real, integrando laboratórios de análise microbiológicas a infraestrutura de nuvem para análises mais ágeis, convenientes e escaláveis.

Resultados e Discussão

Os resultados abrangem o estudo e utilização de ferramentas de visão computacional focados em processamento digital de imagens, e a construção de algoritmos para a identificação e extração de dados de colônias de microrganismos em placas de Petri.

As etapas de análise e pré-processamento da imagem para segmentar os objetos de interesse de todo o restante determinou a precisão de acerto da aplicação. A segmentação por técnicas de binarização proporcionou um acerto de 64%, evidenciado pelo algoritmo de contagem automatizada, que contabilizou 100% das regiões de interesse segmentadas. A posição dos centros de massa de cada região foi determinada com 100% de precisão em relação o pixel central de cada área segmentada da imagem.

A contagem, sendo realizada de forma automatizada, sem a necessidade de intervenção humana, bem como a determinação dos centros de massa das colônias de microrganismos nas imagens de placas de Petri, consolidam a

relevância e conveniência dessa aplicação no dia a dia dos laboratórios de microbiologia em suas análises, contribuindo nos estudos e análises científicas na área da microbiologia.

Conclusões

Este trabalho apresenta um estudo de diferentes etapas de processamento de imagens de colônias de bactérias em placas de Petri. Os resultados mostram a viabilidade da técnica para identificação das colônias, assim como também mostra que o processo pode ser aplicado para trabalhos que utilizam redes neurais convolucionais, visando não apenas gerar um padrão de comparação, mas também melhorar a qualidade das imagens para aumentar a eficiência dos resultados de localização e classificação das redes. A contagem automática atingiu 64% de acerto em relação a contagem manual. Esse resultado sugere que a técnica desenvolvida tem potencial para ser aprimorada e otimizada, contribuindo para desenvolvimentos futuros na área de análise microbiológica utilizando placas de Petri.

Agradecimentos

Agradecemos o financiamento pelo Centro Universitário Barão de Mauá, com a concessão de bolsas do Programa de Iniciação Científica, PIC.

Referências

AMAZON. **AWS Lambda Documentation**.

Disponível em:

<https://docs.aws.amazon.com/lambda/>. Acesso em: 21 mar.2024.

DIOGO, B.; RIBEIRO, M. P.; SCARPA, N. F. **Segmentação e identificação de bactérias em placas de Petri**. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 31., 2023, Ribeirão Preto. **Anais** [...]. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 2023.

Google Colaboratory. Disponível em:

<https://colab.research.google.com/>. Acesso em: 23 mar. 2024.

GONZALEZ, Rafael C.; WOODS, Richard E. **Processamento digital de imagens**. Tradução Cristina Yamagami, Lonardo Piamonte. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010. 624 p.

MENÊSES, N. M. F., DEUS L. A., COELHO, C. J. 2020. **Classificação de Imagens Empregando Classificador Estatístico para Contagem de Colônias de Bactérias**. Recuperado em: <http://repositorio.aee.edu.br/jspui/handle/aee/17200>. Acesso em: 20 mar. 2024.

ROBERTS, E. F. S. **Petri dish**. Disponível em: <http://somatosphere.net/2014/petri-dish.html>. Acesso em: 11 set. 2023.

RODRIGUES, P. M.; LUIS, J.; TAVARIA, F. K. **Petri dishes digital images dataset of e.coli, s.aureus and p.aeruginosa.figshare**. 21 jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.20109377.v2>. Acesso em: 7 mar. 2024.

SANTOS, WILLGNNER F. **Detecção e medição automática de halos pelo método disco-difusão (Kirby-bauer) utilizando aprendizado profundo e visão computacional**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia da Computação) – Pontifícia Universidade Católica De Goiás, Goiânia, 2022.