

JOEL MARCOS DA SILVA JUNIOR

**APLICAÇÃO DE GRANULOMETRIA POR CORRELAÇÃO PARA CONTAGEM DE  
COLÔNIAS DE BACTÉRIAS E DE MICROESFERAS DE VIDRO**

Dissertação apresentada à Escola  
Politécnica da Universidade de  
São Paulo para obtenção do  
título de Mestre em Ciências



São Paulo  
2020

JOEL MARCOS DA SILVA JUNIOR

**APLICAÇÃO DE GRANULOMETRIA POR CORRELAÇÃO PARA CONTAGEM DE  
COLÔNIAS DE BACTÉRIAS E DE MICROESFERAS DE VIDRO**

Dissertação apresentada à Escola  
Politécnica da Universidade de  
São Paulo para obtenção do  
título de Mestre em Ciências

Área de concentração  
Engenharia da Computação

Orientador:  
Prof. Dr. Hae Yong Kim

São Paulo  
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura do autor: \_\_\_\_\_

Assinatura do orientador: \_\_\_\_\_

#### Catálogo-na-publicação

Silva, Joel Marcos Junior  
APLICAÇÃO DE GRANULOMETRIA POR CORRELAÇÃO PARA  
CONTAGEM DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS E DE MICROESFERAS DE  
VIDRO / J. M. J. Silva -- versão corr. -- São Paulo, 2019.  
56 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos.

1.Granulometria 2.Processamento digital de imagens 3.Reconhecimento de padrões 4.Visão computacional I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos II.t.

# Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram durante a pesquisa, em especial meu professor orientador Hae Yong Kim, professora Simone de Carvalho Balian, professora Liedi Legi Bariani Bernucci e à pesquisadora Laura Nascimento Mazzoni.

Ao meu companheiro Gabriel, por estar ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço aos meus pais, Marilda e Joel, e meus irmãos, Denise e Jean, pelo apoio incondicional às escolhas que fiz, pelo incentivo interminável e por todo o carinho.

Aos meus amigos queridos que me acompanharam nessa trajetória.

Obrigado pela paciência, compreensão e dedicação ao longo desses 4 anos. Sem vocês nada disso teria sido possível.



*We did not ask for this room or this music.*

*We were invited in.*

*Therefore, because the dark surrounds us, let us turn our faces to the light.*

*Let us endure hardship to be grateful for plenty.*

*We have been given pain to be astounded by joy.*

*We have been given life to deny death.*

*We did not ask for this room or this music.*

*But because we are here, let us dance.*

Stephen King

# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Contexto e Justificativa . . . . .	1
1.2	Objetivos . . . . .	5
1.3	Principais Contribuições . . . . .	5
1.4	Organização do texto . . . . .	6
<b>2</b>	<b>Referencial Teórico</b>	<b>7</b>
2.1	Granulometria . . . . .	7
2.2	Granulometria baseada em morfologia . . . . .	9
2.3	Granulometria baseada em correlação . . . . .	12
2.4	<i>Maximally Stable Extremal Regions</i> (MSER) . . . . .	16
2.5	<i>K-means</i> . . . . .	18
2.6	Rede Neural Convolutacional U-Net . . . . .	19
<b>3</b>	<b>Granulometria Aplicada a Contagem de Bactérias</b>	<b>23</b>
3.1	Trabalhos relacionados . . . . .	25
3.2	Materiais e Métodos . . . . .	27
3.3	MSGranul . . . . .	32
3.4	Discussões e resultados . . . . .	36
<b>4</b>	<b>Granulometria Aplicada a Contagem de Microesferas de vidro</b>	<b>41</b>
4.1	Trabalhos relacionados . . . . .	42
4.2	Materiais e Métodos . . . . .	43
4.3	Discussões e resultados preliminares . . . . .	48
<b>5</b>	<b>Conclusão</b>	<b>50</b>

# Lista de Figuras

1.1	imagem segmentada em diferentes domínios de interesse. Fonte: Cremers (2012) . . . . .	2
1.2	(a) pedras. (b) material poroso. (c) microesferas de vidro . . . . .	3
1.3	exemplo de grãos de diferentes tamanhos. . . . .	4
2.1	Elementos estruturantes com raio variando entre 1 e 11 píxeis. . . . .	11
2.2	Kernels gerados para uso de granulometria baseada na correlação, píxeis pretos tem valor negativo, brancos são positivos e cinza são zeros. . . . .	13
2.3	Relação de intersecção entre os círculo. (a) tem aproximadamente $\gamma = 0.4$ e (b-c) $\gamma = 0$ . . . . .	15
2.4	Visão intuitiva para MSER. Fonte: Nistér e Stewénus (2008) . . . . .	17
2.5	Diferentes estágios do algoritmo MSER. A primeira imagem é a que desejamos aplicar MSER. Pode-se perceber que a água sobe até que o nível preencha quase toda a imagem. Além disso, verifica-se que a região A está contida em B que por sua vez está contida em C. A essa estrutura em que algumas regiões estão contidas em outras, denomina-se regiões aninhadas. . . . .	18
2.6	Rede U-Net proposta por Ronneberger, Fischer e Brox (2015). . . . .	20
2.7	(a) imagem contendo microesferas de vidro para segmentação, fornecida como entrada para uma U-Net já treinada. (b) saída produzida pela U-Net. . . . .	21
3.1	Diferentes níveis de diluição da amostra. Fonte: Geissmann (2013). . . . .	24
3.2	Diferenças entre uma bolha de ar (seta vermelha) e uma colônia verdadeira de bactérias (seta azul). . . . .	28
3.3	Os 11 kernels utilizados, tendo o primeiro 30 píxeis de diâmetro e o ultimo 9 píxeis. . . . .	29

3.4	(a) mostra a imagem colorida, onde a marcação azul é claramente distinguível, (b) em níveis de cinza a marcação em azul fica ambígua em relação a uma colônia verdadeira, (c) granulometria baseada na correlação identificando a região de alto contraste como colônia. . . . .	30
3.5	Cinco janelas mostrando os grãos mais representativos de determinado centroide. A janela de meio na primeira linha claramente não é uma colônia, logo passível de ser excluído da contagem final, enquanto todas as demais são claramente bactérias. . . . .	31
3.6	(a) mostra a imagem colorida que queremos aplicar MSGranul, (b) saída de MSER, (c) Saída de granulometria baseada em correlação, (d) cálculo da área de intersecção entre os dois. . . . .	34
3.7	(a) imagem colorida sobre a qual queremos aplicar MSGranul, (b) saída de MSER, (c) Saída de granulometria baseada na correlação. . .	35
3.8	(a) objeto localizado por granulometria, (b) primeira região encontrada por MSER, (c - e) demais regiões encontradas por MSER na mesma localização da imagem. . . . .	36
3.9	Visão geral de MSGranul. . . . .	37
3.10	Resultado de OpenCFU (a) com k-médias, (b) sem k-médias. . . . .	40
4.1	Modelos utilizados pela granulometria baseada em correlação para localizar as microesferas de vidro. . . . .	43
4.2	Arquitetura da rede U-Net utilizada no experimento. . . . .	44
4.3	(a) Imagem recortada de entrada para o treino de U-Net. (b) Imagem fornecida como alvo para o treino. (c) Exemplo de imagem para avaliar o sistema. (d) Mapa de segmentação produzida por U-Net. (e) Resultado final ao aplicar granulometria por correlação no mapa de segmentação. . . . .	45
4.4	Visão geral da arquitetura do sistema . . . . .	45
4.5	Comparação entre as microesferas e a tampa de uma caneta. . . . .	46

# Lista de Tabelas

3.1	Taxas de erros dos métodos avaliados. . . . .	38
4.1	Resultados obtidos para cada uma das 10 imagens utilizadas para avaliar o sistema. O valor real é a quantidade de microesferas contabilizadas pelo operador. . . . .	48

# Lista de Símbolos

*	Correlação cruzada (CC)
$R_{mcc}$	Correlação cruzada ajustada pela média
$M$	Número de amostras deslocadas em uma operação de correlação
$N$	Tamanho de um vetor de amostras
$T$	Template
$\tau$	Correlação mínima aceita
$\gamma$	Quantidade máxima de intersecção
$\circ$	Operador Abertura
$\ominus$	Operação de Erosão
$\oplus$	Operação de Dilatação

# Lista de Abreviaturas e Siglas

Cekeikon	Biblioteca com rotinas de visão computacional e processamento de imagens.
<i>K-means</i>	<i>K</i> -médias
<i>K-NN</i>	( <i>K-Nearest Neighbor</i> ) <i>K</i> -Vizinho mais próximo
MSER	<i>Maximally Stable Extremal Regions</i>
MSGranul	MSer e Granulometria baseada na correlação, abordagem desenvolvida durante os experimentos em contagem de colônias
OpenCFU	( <i>Open Counting Forming Unit</i> ) Sistema de código aberto utilizado na contagem de colônia da bactérias
Open-CV	( <i>Open Computer Vision</i> ) Biblioteca de código aberto com rotinas para processamento de imagens, visão computacional e aprendizado de máquina
PS	( <i>Pattern Spectrum</i> ) Padrão obtido por meio de sucessivas aberturas com elementos estruturantes crescentes
TEA	Taxa de Erro Absoluta
U-Net	Rede neural que emprega convoluções e apresenta formato em U
VP	Verdadeiro Positivo
FP	Falso Positivo
FN	Falso Negativo

# Resumo

Contabilizar pequenos objetos em imagens, que estão presentes aos milhares, é uma tarefa trabalhosa e requer atenção para ser finalizada. Além disso, agrupar a quantidade desses objetos por características físicas é importante para diversas aplicações. Essa análise de distribuição dos grãos/partículas é conhecida pelo nome de granulometria.

Neste trabalho aplicamos granulometria baseada em correlação em dois casos: contabilizar colônias de bactérias e microesferas de vidro. A contagem de colônias de bactérias tem vasta aplicação nas ciências biológicas, fornecendo importantes informações com as mais diversas finalidades. Para essa contagem propomos uma abordagem que utiliza granulometria baseada em correlação cruzada e *Maximally Stable Extremal Regions* (MSER) para contar colônias em imagens com diferentes quantidades de colônias *Staphylococcus aureus*. Chamamos essa abordagem de MSGranul e compararemos seu desempenho com abordagens anteriores. Os resultados dessa comparação mostram que MSGranul alcança taxa de erro média inferior a tais abordagens. Portanto, MSGranul pode ser usado efetivamente para a contagem de colônias.

A segunda aplicação é a contagem de microesferas de vidro. A sinalização em pavimentos rodoviários é um importante elemento de segurança para os motoristas e sua visibilidade noturna está relacionada ao nível de retrorrefletividade. A quantidade de microesferas que é depositada na tinta fresca da sinalização está positivamente correlacionada ao nível de retrorrefletividade. Para contabilizar as microesferas de vidro utilizamos a granulometria por correlação combinada com pré-processamento por rede neural convolucional U-Net.

**Palavras-chave:** Processamento de imagem. Granulometria. Contagem de grãos. Aplicações de visão computacional.



# Abstract

Counting small objects in images, which are present in the thousands, is a laborious task and requires attention for being finalized. In addition, aggregating the number of these objects by physical characteristics is important for many applications. This grain/particle distribution analysis is known by the name of granulometry.

In this work, we apply granulometry based on correlation in two cases: counting colonies of bacteria and glass microspheres. The count of bacterial colonies has wide application in the biological sciences, providing important information for the most diverse purposes. For this task, we propose an approach that uses granulometry based on cross-correlation and *Maximally Stable Extremal Regions* (MSER) for counting colonies in images that have different amounts of *Staphylococcus aureus* colonies. We call this approach MSGranul and compare its performance with previous approaches. The results of this comparison show that MSGranul reaches an average error rate lower than other approaches. Therefore, it can be effective for counting colonies.

The second application is the counting of glass microspheres. Markings over road pavements are important safety elements for drivers and their night visibility is assessed by retroreflectivity level. The amount of microspheres that is deposited in the fresh ink is positively correlated to the retroreflectivity level. In order to count the glass microspheres we used the granulometry combined with pre-processing by convolutional neural network U-Net.

**Keywords:** Image processing. Granulometry. Grain counting. Computer vision applications.

# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Contexto e Justificativa

Seja pela necessidade de automatizar tarefas em que a visão humana desempenha um importante papel ou simplesmente pela curiosidade sobre o funcionamento desse importante sentido, fato é que o interesse pela área de visão computacional e pelo processamento de imagens tem crescido de forma consistente ao longo do tempo, traduzindo-se em diversas soluções de automatização para tarefas cotidianamente realizadas por seres humanos. Tais soluções são desenvolvidas por pesquisadores da área utilizando noções de cálculo, álgebra, estatística, geometria e otimização numérica (PARAGIOS, 2016).

Contudo, tarefas como: reconhecimento de padrões, localização de objetos em imagens e reconstrução de cenas 3D, que são facilmente resolvidas pela visão humana, são difíceis de serem resolvidas pelos computadores (SZELISKI, 2011). Uma dessas tarefas triviais para seres humanos é a segmentação da imagem que consiste em identificar partes específicas dentro de uma imagem que pertençam a um dado domínio de interesse (PARKER, 1996). Por exemplo, a Figura 1.1 foi segmentada em diversos domínios de interesses: pessoa, céu, árvore e grama, e cada um desses domínios foi representado por uma cor diferente.

O presente trabalho aborda um subconjunto dos casos de localização de objetos que consiste na localização de pequenos objetos dentro de imagens, por exemplo: localizar grãos de feijão. Esta tarefa é desafiadora, pois envolve em um primeiro mo-



Figura 1.1: imagem segmentada em diferentes domínios de interesse. Fonte: Cremers (2012)

mento segmentar a imagem e, posteriormente, reconhecer quais desses segmentos são de fato grãos e/ou partículas. Com os segmentos verdadeiros identificados conseguimos conhecer a localização exata dos pequenos objetos na imagem e, a partir disso, contabilizá-los e separá-los de acordo com suas características físicas (formas, dimensões, excentricidades etc.). A literatura científica apresenta diversos processos em que a simples contagem e separação por características é fundamental. Exemplos são vistos na agricultura (ARAÚJO; PESSOTA; KIM, 2015; COSTA; YANG, 2009), microbiologia (SILVA; BALIAN; KIM, 2016), saúde pública (MELLO et al., 2008), física (BEAN; JACOBS, 1956), mineração (MAERZ; PALANGIO; FRANKLIN, 1996) e química (KIM et al., 2013), fazendo com que muitas aplicações práticas do nosso cotidiano dependam de contabilizar esses pequenos objetos.

Contabilizar pequenos objetos em imagens traz consigo um outro desafio: geralmente pequenos objetos como grãos e partículas estão presentes às centenas ou mesmo milhares na imagem, vide Figura 1.2. Mesmo para seres humanos essa tarefa é trabalhosa, toma muito tempo e requer atenção para ser finalizada. Esse desafio não é comumente visto com objetos maiores, como: cachorros, gatos ou bicicletas, pois nesse caso a quantidade desses objetos na imagem tende a ser menor e, portanto, é possível fazer uma contagem rápida.

Nas imagens que apresentam grãos/partículas em grande quantidade, mas com diferentes características físicas (grãos maiores, menores, mais esféricos, menos esféricos etc.), é importante conhecer suas distribuições, ou seja, a quantidade existente de grãos/partículas para cada uma das características físicas. Essa análise de distri-

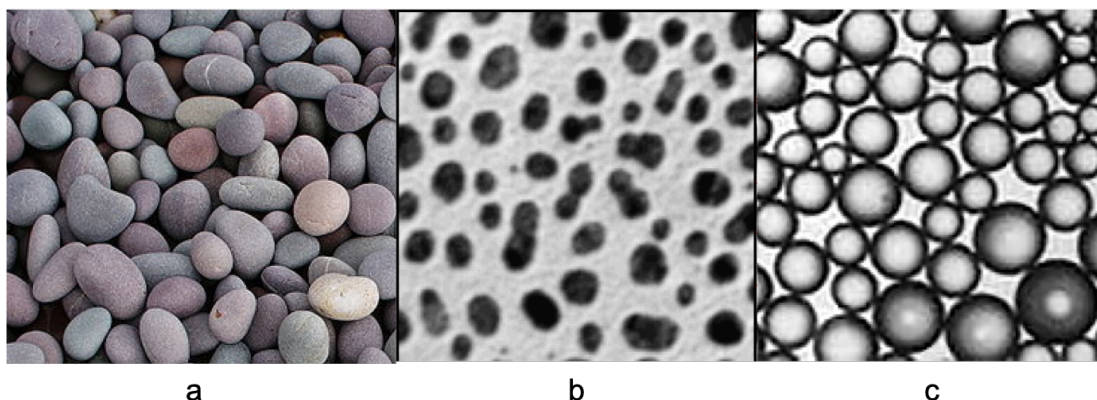


Figura 1.2: (a) pedras. (b) material poroso. (c) microesferas de vidro

buição dos grãos/partículas é conhecida pelo nome de granulometria, e existe grande interesse no desenvolvimento de métodos que rapidamente façam essa contagem de grãos/partículas agrupados por formas, tamanhos e excentricidades. Embora granulometria seja utilizada em outras áreas (AZEMA et al., 2002; BEAN; JACOBS, 1956), nosso interesse se mantém exclusivamente na área de processamento de imagens e visão computacional.

No processamento de imagens podemos dividir os algoritmos para o cálculo da granulometria em dois principais grupos: os algoritmos baseados em morfologia matemática e os algoritmos baseados em detecção de limites (MAERZ; PALANGIO; FRANKLIN, 1996). Em 2013, Kim et al. (2013) propuseram um novo tipo de granulometria baseada em similaridade que é utilizado neste trabalho.

Na aplicação de granulometria em problemas reais, existem os casos que a localização exata dos grãos não é importante, mas apenas o valor agregado, por exemplo na Figura 1.3 seria importante apenas saber que existem 8 grãos pequenos e 2 médios. Em outros casos é de fundamental importância saber a localização precisa dos grãos (ARAÚJO; PESSOTA; KIM, 2015; SILVA; BALIAN; KIM, 2016); a importância de conhecer a localização precisa do grão decorre da possibilidade de extrair outras informações relevantes: a cor e a textura, por exemplo. Ao identificarmos onde cada grão está na imagem podemos obter mais informações para a análise. O que difere entre a granulometria baseada em correlação e a de morfologia matemática é que a primeira é capaz de fornecer a localização dos grãos individualmente.

Para explicar granulometria por correlação, vamos considerar uma suposta “gra-

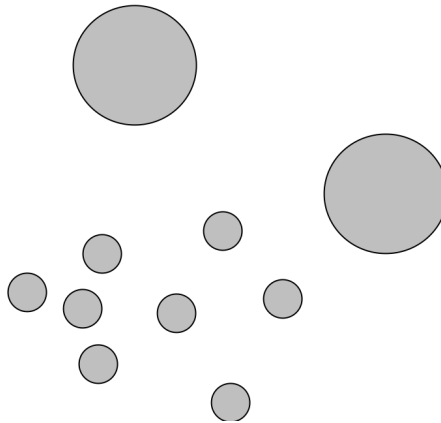


Figura 1.3: exemplo de grãos de diferentes tamanhos.

nulometria por similaridade”. Em um primeiro momento, criamos diversas formas de grãos que queremos buscar. O próximo passo é calcular a similaridade entre cada uma das formas e regiões da imagem. Nesse processo, a forma “passeia” pela imagem computando sua similaridade com aquela parte da imagem. O resultado desse processo é um mapa onde cada coordenada  $(x, y)$  da imagem de entrada recebe um valor da similaridade com a forma centralizada naquele ponto. Várias medidas de similaridade podem ser usadas, contudo decidimos por correlação cruzada não normalizada devido aos resultados reportados na literatura (KIM et al., 2013) e porque esta pode ser calculada rapidamente através da transformada rápida de Fourier (FFT). Os picos do mapa de similaridade são onde as formas podem aparecer. Por último, o usuário define alguns parâmetros que serão usados para filtrar os picos de similaridade. Não existe uma forma automática para a escolha desses parâmetros, por isso o usuário deve selecionar manualmente os parâmetros a fim de obter o resultado desejado. Pelo fato de utilizarmos correlação cruzada não normalizada, chamaremos esta técnica de granulometria baseada em correlação.

No trabalho utilizamos granulometria baseada em correlação e outras técnicas de processamento de imagens e aprendizado de máquinas para contabilizar colônias de bactérias e microesferas de vidro. No caso das colônias de bactérias integramos granulometria e um algoritmo de limiarização por níveis de cinza, isso permitiu descartar falsos positivos. Para contabilizar as microesferas de vidro, utilizamos um pré-processamento por aprendizado profundo antes de aplicar granulometria, objetivando manter na imagem apenas as microesferas.

## 1.2 Objetivos

O principal objetivo desse trabalho é propor o uso de granulometria baseada em correlação na contagem de colônias de bactérias e microesferas de vidro, além de abordar alguns aspectos gerais, vantagens e desvantagens do algoritmo.

### 1.2.1 Objetivos Específicos

- Contar colônias de bactérias;
- Propor um algoritmo que apresenta solução para o problema onde partes da imagem apresentam alto contraste o que leva a super estimação dos objetos contados numa imagem;
- Contar microesferas de vidro;
- Utilizar pré-processamento por aprendizado profundo e granulometria;
- Discutir aspectos sobre granulometria baseada em correlação;

## 1.3 Principais Contribuições

A primeira contribuição deste trabalho é o uso de granulometria baseada em correlação e *Maximally Stable Extremal Regions* (MSER), algoritmo que usa diferentes níveis de cinza para segmentar regiões na imagem. Denominamos esta abordagem de MSGranul e foi proposta para a aplicação em contagem de colônias de bactérias.

A segunda contribuição é o uso de pré-processamento por aprendizado profundo para granulometria por correlação na contagem de microesferas de vidro.

Além disso, o conteúdo desta dissertação deu origem as seguintes publicações:

- O artigo *MSGRANUL: Granulometria Baseada em Correlação e MSER Aplicado à Contagem de Colônias de Bactérias* (SILVA; BALIAN; KIM, 2016), publicado no XXI Congresso Brasileiro de Automática (CBA 2016).

- O artigo *Quantificação de Microesferas de Vidro para Sinalização Horizontal pela Granulometria por Correlação com Pré-Processamento por Rede Convolutiva* (SILVA et al., 2019), publicado no XXXVII Simpósio Brasileiro de Telecomunicações e Processamento de Sinais (SBrT 2019).

## 1.4 Organização do texto

A organização do trabalho segue a seguinte estrutura: no capítulo 2 será apresentado o referencial teórico do trabalho, abordando as diferentes granulometrias, bem como o contexto de técnicas, métodos e algoritmos importantes para o entendimento dos demais capítulos.

No capítulo 3 abordaremos o experimento realizado com contagem de colônias de bactérias, apresentaremos como foram executados os experimentos, além de explicitar a abordagem de MSGranul que foi criada em resposta à questão de detecção de partes indesejadas de alto contraste na imagem.

No capítulo 4 abordaremos o experimento realizado para contabilizar o quantidade de microesferas de vidro em imagens, utilizamos a rede neural convolutiva U-Net para pré-processar a imagem obtendo um mapa de segmentação que será fornecido como entrada para granulometria.

No capítulo 5 apresentaremos as conclusões e trabalhos futuros.

# Capítulo 2

## Referencial Teórico

Este capítulo apresenta conteúdos teóricos que servem como suporte para a pesquisa realizada neste trabalho. Portanto, são trazidos conceitos relacionados as granulometrias, MSER, *K-means*, dentre outros conceitos importantes.

### 2.1 Granulometria

Granulometria é frequentemente referenciada como a medição da distribuição de tamanhos de pequenos objetos ou grãos/partículas (MATHERON; SERRA, 2002). A análise da distribuição dos tamanhos das partículas pode se dar utilizando diferentes propriedades físicas (AZEMA et al., 2002; BEAN; JACOBS, 1956). Contudo, nosso interesse se restringe a contar/estimar essa distribuição de tamanhos apenas em imagens.

A análise dessa distribuição, conhecida também como análise granulométrica, é realizada por meio da aplicação de algum algoritmo que produza como resultado um histograma da quantidade de grãos em função de suas dimensões. Esse histograma recebe o nome de curva granulométrica (MARAGOS, 1989).

O primeiro a propor um algoritmo de granulometria foi Matheron (1975) que, utilizando imagens binárias e morfologia matemática, extraiu informações sobre a distribuição de partículas numa dada imagem. O algoritmo proposto por ele se assemelha ao processo de peneirar, em que uma partícula, ao passar por várias peneiras de diferentes diâmetros e/ou formatos ficará retida naquela onde os buracos apresentam diâmetro



menor do que ela (DOUGHERTY; LOTUFO, 2003). Para alcançar esse resultado o algoritmo emprega elementos estruturantes de tamanho crescente e operadores (dilação, erosão e abertura) a fim de reproduzir o processo de peneiramento em uma imagem. Além de MATHERON, Serra (1983) também produziu uma vasta literatura sobre granulometria de morfologia em imagens binárias.

Em 1992, DOUGHERTY; NEWELL; PELZ propuseram um algoritmo popular para granulometria de morfologia em que por meio de momentos granulométricos locais, um conjunto de características era extraído e usado para classificar a verossimilhança entre píxeis de diferentes texturas. Entretanto, o enfoque ainda residia em imagens binárias.

O primeiro a propor um algoritmo de morfologia para computar granulometria em imagens de níveis de cinza foi Vincent (1994). O algoritmo proposto por ele tinha a vantagem de ser aplicável em níveis de cinza e era mais rápido que qualquer outro algoritmo disponível para granulometria. Para alcançar esse resultado ele utilizou uma estrutura de dados chamada árvore de abertura que provê uma compacta representação de sucessivas aberturas. Em 2000, VINCENT; LIZARDTECH propuseram melhorias ao algoritmo a fim de aumentar os tipos de problemas que podem ser abordados utilizando granulometria.

Tanto em níveis de cinza quanto em imagens binárias, para a granulometria morfológica todos píxeis dentro do grão são mais escuros (ou mais claros) que o fundo em que estão inseridos e dependendo da aplicação essa premissa não se sustenta (KIM et al., 2013).

Além disso, os algoritmos de granulometria morfológica conseguem computar a distribuição dos tamanhos, mas eles não conseguem identificar as formas ou orientações de grãos individuais nas imagens. Esses tipos de informações são obtidos empregando algum tipo de pré-processamento na imagem (LJUNGQVIST et al., 2011). Entretanto, em algumas aplicações, a identificação individual pode não ser necessária e portanto o pré-processamento pode ser dispensado.

Maerz, Palangio e Franklin (1996) apresentaram um outro tipo de granulometria, com o objetivo de superar a limitação de não conseguir localizar os grãos individualmente. Utilizando análise dos limites de rochas fragmentadas, este algoritmo deu

origem ao programa WipFrag (MAERZ; PALANGIO; FRANKLIN, 1996). Contudo, existe pouco trabalho utilizando este tipo de granulometria, o que levanta a hipótese de que granulometria baseada em limites depende de heurística e/ou implementações *ad-hoc*. No próprio artigo apenas uma visão geral do método é apresentada sem qualquer aprofundamento.

Kim et al. (2013) propuseram um outro tipo de granulometria que inicialmente foi aplicada na caracterização de silício poroso. A ideia consiste em gerar formatos circulares e retangulares de diferentes tamanhos e orientação e por meio de correlação cruzada, estas formas são buscadas dentro da imagem. Isto produz vários picos de correlação que são selecionados por parâmetros de correlação mínima e área de intersecção máxima aceitas. Além de silício poroso, granulometria baseada em correlação foi aplicada no desenvolvimento de um sistema para classificação de lotes de feijões (ARAÚJO; PESSOTA; KIM, 2015).

Nas próximas seções apresentaremos aspectos gerais de granulometria baseada em morfologia e granulometria baseada em correlação.

## 2.2 Granulometria baseada em morfologia

Uma imagem binária  $I$  pode ser considerada como uma função  $I : D \subset \mathbb{Z}^2 \rightarrow \{0, 1\}$  ou como um subconjunto do domínio  $I \subset D \subset \mathbb{Z}^2$ . No primeiro caso, a função  $I$  possui o valor 1 nas coordenadas onde algum objeto está presente e possui o valor 0 nas coordenadas onde não existe objeto. No segundo caso, as coordenadas onde algum objeto está presente pertencem ao conjunto  $I$  e as coordenadas onde não existe objeto não pertencem ao conjunto.

Na visão intuitiva da granulometria morfológica, nós gostaríamos de separar os objetos dentro de uma imagem binária de acordo com o seu tamanho e formato utilizando diferentes “peneiras”. Um objeto consegue passar por uma “peneira” se seu tamanho/formato couber nos buracos da malha da peneira.

Matheron, em 1967, propôs usar dois operadores básicos da morfologia matemática para essa finalidade: dilatação e erosão. Quando estes dois operadores são aplicados em sequência, resulta num terceiro operador conhecido como abertura. A abertura,

ao ser aplicada numa imagem granular, tem como efeito algo similar ao peneiramento.

Na morfologia matemática, um elemento estruturante é um formato que usamos para explorar ou interagir com uma imagem para identificar quais formas estão presentes nela. Na Figura 2.1 podemos observar 11 exemplos de elementos estruturantes de formato circular, com raio variando entre 1 e 11. Um elemento estruturante também é uma imagem binária.

A dilatação de uma imagem  $I$  por um elemento estruturante  $E$  é definida como:

$$I \oplus E = \bigcup_{a \in I} (E)_a \quad (2.1)$$

onde  $(E)_a$  é o elemento estruturante transladado por  $a$ . Supondo uma imagem binária  $I = \{(3, 3)(3, 4)(4, 3)(4, 4)\}$  e elemento estruturante  $E = \{(0, 0)(0, 1)\}$ . A dilatação  $I \oplus E$  é:

$$I \oplus E = \{(3, 3)(3, 4)(4, 3)(4, 4)(3, 5)(4, 5)\}.$$

Enquanto a dilatação adiciona píxeis à imagem, tornando-a maior, a erosão diminui removendo suas camadas mais externas. Este operador pode ser definido como:

$$I \ominus E = \{c \in D \mid (E)_c \subset I\}. \quad (2.2)$$

Considere os mesmos conjuntos  $I$  e  $E$  de parágrafos anteriores. Então,  $I \ominus E = \{(3, 3)(4, 3)\}$ , pois  $(E)_{(3,3)} = \{(3, 3)(3, 4)\}$  e  $(E)_{(4,3)} = \{(4, 4)(4, 4)\}$ , sendo esses dois subconjuntos de  $I$ .

A abertura é a aplicação sequencial dos dois operadores anteriores. Primeiro aplica-se erosão na imagem  $I$  usando  $E$  e depois aplica-se dilatação usando o mesmo elemento estruturante:

$$I \circ E = (I \ominus E) \oplus E \quad (2.3)$$

Podemos imaginar a abertura como o método que eliminará objetos da imagem que são menores que o elemento  $E$ , ou seja, se um objeto couber inteiramente em  $E$  ele desaparecerá no final da abertura. Isso porque o resultado da erosão de um objeto menor que  $E$  produz um conjunto vazio e ao dilatar tal conjunto, o resultado continua sendo vazio. No caso de objetos maiores, a erosão não os elimina e, portanto, ao



Figura 2.1: Elementos estruturantes com raio variando entre 1 e 11 píxeis.

dilatá-los retomam (aproximadamente) o tamanho original. Podemos assim aludir que  $E$  comportou-se como uma peneira permitindo que objetos menores passem ao mesmo tempo que retém objetos maiores.

Uma abordagem para analisar a distribuição dos tamanhos de objetos em uma imagem binária sem nos preocuparmos com a localização de cada grão individualmente é utilizar a curva de intensidade da abertura. Definindo  $M[K]$  como a somatória da intensidade dos píxeis de uma imagem binária  $K$ , ou seja, a soma do números de píxeis de  $K$  com valor 1, e considerando um conjunto de elementos estruturantes de tamanho crescente  $\{E_1, \dots, E_n\}$ , onde  $E_1 \subset E_i \subset E_n$ . Ao aplicarmos aberturas usando esses elementos estruturantes, temos  $K_i = I \ominus E_i$ , e calculando  $M[K_i]$  para cada  $K_i$ , obteremos uma curva de intensidade da abertura, onde no eixo  $y$  temos o valor  $M[K_i]$  e no eixo  $x$  o índice  $i$ .

Numa curva de intensidade da abertura, conforme os elementos estruturantes se tornam maiores o valor da somatória da intensidade decresce. Pois, quanto maior for o elemento estruturante, menor é a quantidade de objetos que fica retido na “peneira”.

Outra ferramenta útil para analisar os resultados de granulometria morfológica é o *Pattern Spectrum* (PS):

$$PS(n, E) = \frac{M[I \circ E_n] - M[I \circ E_{n+1}]}{M[I]} \quad (2.4)$$

Em outras palavras, PS é a diferença entre a intensidade de sucessivas aberturas dividido pela intensidade da imagem original. Portanto, PS equivale à derivada negativa da intensidade, normalizada pelo total de píxeis na imagem de entrada  $I$ .

Uma desvantagem desse tipo de granulometria é o fato de não poder localizar individualmente os grãos. Contudo, utilizando a curva de intensidade e o PS, consegue-se estimar mudanças de quantidade de objetos de tamanhos diferentes numa imagem.

## 2.3 Granulometria baseada em correlação

A granulometria baseada em correlação se apoia na simples ideia de criar formatos geométricos bidimensionais para representar os objetos (ou grãos) e buscá-los na imagem analisada. Esse processo de busca é realizado definindo uma medida de similaridade que possa ser computada entre  $T$ , o modelo artificialmente criado, e  $I$ , a imagem. Nesse sentido, a medida de similaridade utilizada será correlação cruzada como proposto por Kim et al. (2013). Desse modo, o algoritmo de granulometria baseada na correlação assemelha-se ao bem conhecido *template matching*.

A correlação cruzada discreta entre duas imagens  $I$  e  $T$  é definida pela equação:

$$R_{corr}(x, y) = I(x, y) * T(x, y) = \sum_n \sum_m I(n + x, m + y)T(m, n) \quad (2.5)$$

O cálculo da correlação cruzada pode ser sensivelmente acelerado utilizando FFT (*Fast Fourier Transform*) (GONZALEZ; WOODS, 2006), que na prática já acontece na biblioteca OpenCV.

Pode-se entender melhor a correlação cruzada considerando o cálculo efetuado com a janela fixa numa posição  $(x, y)$ . Seja  $t$  o vetor obtido copiando os valores de  $T$ , e  $i$  o vetor obtido pela cópia de  $I$  dentro do domínio de  $T$  transladado pelo pixel  $(x, y)$ . Neste caso, podemos reescrever a correlação cruzada como segue:

$$R_{corr}(x, y) = t \cdot i(x, y), \quad (2.6)$$

onde  $\cdot$  é o produto escalar entre dois vetores. Para buscar  $t$  em  $i$ , é necessário corrigir o vetor  $t$  subtraindo a sua própria média, ou seja  $\tilde{t} = t - \bar{t}$ , onde  $\bar{t}$  é a média dos valores em níveis de cinza do vetor  $t$ . A correlação cruzada corrigida pela média é:

$$R_{mcc}(x, y) = \tilde{t} \cdot i(x, y) \quad (2.7)$$

Utilizando  $R_{mcc}$  temos invariância a brilho mas não a contraste. Isto significa que partes com alto contraste na imagem apresentarão picos altos de correlação, desse modo granulometria consegue distinguir facilmente os objetos de elevado contraste, dos mais fracos, de baixo contraste.

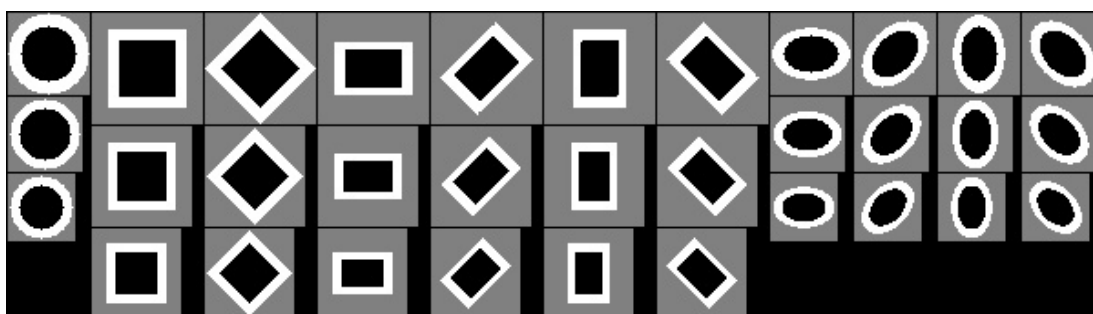


Figura 2.2: Kernels gerados para uso de granulometria baseada na correlação, píxeis pretos tem valor negativo, brancos são positivos e cinza são zeros.

A ideia de granulometria é produzir diversos modelos  $T_1, \dots, T_n$ , também conhecidos por *kernels*, e calcular  $R_{mcc}$  entre eles e a imagem  $I$ . Um dado  $T_i$  pode ter qualquer forma, desde que composto por 3 partes: a primeira é a que representa a própria forma a ser buscada, ela deve ter valores negativos. A segunda parte circunda a primeira e deve ter valores positivos. E a terceira parte nada mais é do que o preenchimento da imagem com zeros, a fim de que o domínio de  $T_i$  resida em uma janela retangular.

Embora qualquer forma possa ser utilizada, nosso programa implementa apenas formas simples, como: círculos, quadrados, retângulos e elipses, mostradas na Figura 2.2. Os *kernels* entre as escalas mínima e máxima serão gerados em progressão geométrica utilizando  $n$  escala por oitavas, onde  $n$  é um parâmetro escolhido pelo usuário, Tipicamente,  $n$  é um valor entre 5 e 10 por oitava. Com isso, obtemos certa invariância a escala.

A invariância a rotação é obtida rotacionando os *kernels*. O passo de rotação pode ser escolhido pelo usuário e é, por exemplo, de  $15^\circ$  em  $15^\circ$ . O intervalo de rotação depende da simetria do kernel. Evidentemente, não faz sentido rotacionar círculo. O quadrado deve ser rotacionado de 0 a 90 graus. Retângulos e elipses devem ser rotacionados de 0 a 180 graus.

Nossa implementação normaliza a soma dos píxeis pretos em  $-1.0$  e a dos brancos em  $+1.0$  do *kernel*. Com isso, ao mapear os níveis de cinza, de 0 até 255, de uma dada imagem  $I$  para o intervalo entre 0 e 1, garantimos que o valor de  $R_{mcc}$  estará contido entre  $-1$  e  $+1$ .

Sejam  $n$  modelos  $T_1, \dots, T_n$ . Calcula-se a correlação entre a imagem  $I$  e cada um

dos modelos, resultando em imagens de correlação  $c_1, \dots, c_n$ , onde:

$$c_i(x, y) = \tilde{T}_i(x, y) * I(x, y) \quad (2.8)$$

Vamos definir a imagem de correlação máxima como:

$$C(x, y) = MAX_{i=1}^n [c_i(x, y)] \quad (2.9)$$

O objeto detectado (junto com a sua escala e a sua rotação) corresponde ao índice que fez resultar na maior correlação:

$$G(x, y) = ARGMAX_{i=1}^n [c_i(x, y)] \quad (2.10)$$

Se num dado ponto  $(x, y)$ ,  $C(x, y)$  for maior que os valores dos seus vizinhos, temos um pico de correlação. Se num pico de correlação  $(x, y)$ ,  $C(x, y) > 0$ , temos que naquela posição em  $I$  os píxeis internos, representados pela parte preta do *kernel*, são em média mais escuros que seu entorno, a parte branca. Controlamos a correlação mínima utilizando o parâmetro  $\tau$ ,  $0 \leq \tau \leq 1$ . Picos com correlação menor que  $\tau$  serão desconsiderados. Por estar definido entre 0 e 1, todos os picos negativos (onde, o nível médio de cinza externo é maior que o interno) são automaticamente descartados. Granulometria não oferece um jeito de automaticamente encontrar um valor adequado para  $\tau$  cabendo ao usuário definir um valor ótimo para ele.

Podemos imaginar que um pico de correlação é na verdade o centro de um grão e que seu formato é a parte preta do núcleo. O resultado deste processo gera uma quantidade enorme de picos de correlação, onde nem todos correspondem aos objetos verdadeiros. É preciso filtrar os falsos picos. Para isso, todos os picos de correlação são ordenados em ordem decrescente. O primeiro pico da lista ordenada é considerada um pico verdadeiro. Os seguintes, podem ser picos verdadeiros ou falsos. Para distinguir os dois casos, calculamos a área que o pico de índice  $i$  na lista ordenada compartilha com as áreas dos picos que já foram classificados como objetos verdadeiros:

$$área[O_k \cap W(O_k)] \leq \gamma \cdot área[O_k], \quad (2.11)$$

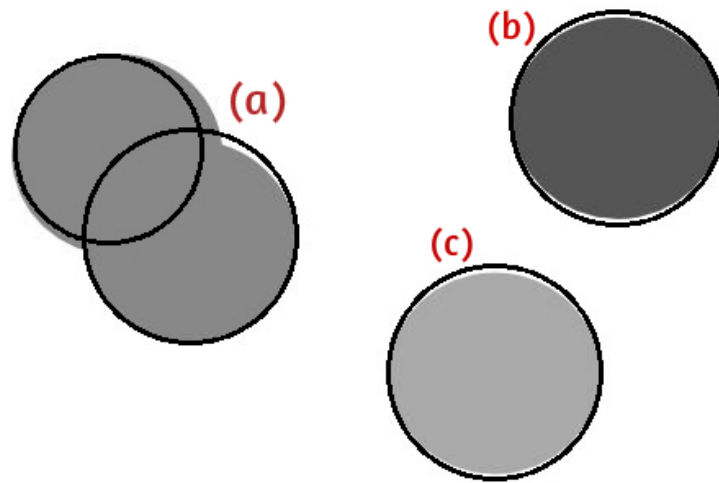


Figura 2.3: Relação de intersecção entre os círculo. (a) tem aproximadamente  $\gamma = 0.4$  e (b-c)  $\gamma = 0$

onde  $O_k$  é o grão que desejamos verificar se é válido e  $W(O_k)$  é conjunto de todos os objetos já considerados válidos (com correlação maior que o de  $O_k$ ). O parâmetro  $\gamma$  controla a quantidade máxima de área que um novo grão pode ter em comum com grãos já existentes.

Na Figura 2.3(a) temos a representação de dois círculos que possuem aproximadamente  $\gamma = 0.4$  e outros dois em que  $\gamma = 0$ .

A implementação original do algoritmo pode ser encontrada na internet<sup>1</sup>. Ele foi implementado usando bibliotecas Cekeikon/OpenCV. Reimplementamos usando apenas o OpenCV e esta implementação está disponível no GitHub<sup>2</sup>.

Granulometria baseada em correlação foi aplicada inicialmente na análise de silício poroso (KIM et al., 2013).

Durante o processo de anodização do silício poroso, os buracos tendem a crescer ao longo do tempo, isto é, enquanto que no início do processo os buracos assemelham-se a pequenos círculos, ao final da anodização eles se parecem com retângulos maiores. Conhecendo essa mudança de círculo para retângulo, os autores propuseram utilizar granulometria baseada na correlação em imagens de microscópio eletrônico. Para os experimentos foram criados *kernels* na forma de círculos e retângulos a fim de compu-

<sup>1</sup><<http://www.lps.usp.br/hae/granul/index.html>>

<sup>2</sup><<http://github.com/joeljuni05/MGranul>>



tarem a distribuição desses objetos durante um processo de 8 horas de anodização. A conclusão dos autores é que o método de granulometria empregado foi capaz de produzir resultados quantitativos sobre a bolacha de silício e, portanto, foi possível extrair informações sobre o comportamento elétrico do material.

Outra aplicação reportada na literatura foi para a contagem e classificação de feijões (ARAÚJO; PESSOTA; KIM, 2015). Os autores desenvolveram uma máquina que movia grãos por uma esteira e tinha como objetivo classificá-los de acordo com o seu tipo.

Primeiramente uma câmera posicionada acima da esteira capturava fotos dos grãos de feijões que eram movidos por ela. Essas fotos eram convertidas para níveis de cinza por meio de um mapeamento baseado em kNN (*K-Nearest Neighbor*, ou *K-Vizinho mais próximo*), em que as cores típicas de feijões eram mapeadas para 0, cores típicas de fundo eram mapeadas para 1 e alguns píxeis que não podiam ser determinados com precisão atribuíam-se um valor entre 0 e 1 baseado na distância euclidiana deste pixel em relação ao conjunto de píxeis típicos de feijões ou típicos de fundo. Essa nova imagem em níveis de cinza era usada como entrada para granulometria a fim de extrair a localização dos grãos, bem como para contar a quantidade existente na imagem.

Com os grãos devidamente localizados podia-se extrair a textura daquela parte da imagem e, utilizando k-médias, os grãos eram rotulados em seu tipo correspondente. Foram utilizados 30,000 feijões, atingindo acurácia de 99,8%, apenas com um simples classificador baseado em k-médias. Utilizando os dados da quantidade de feijões e os tipos presentes em uma imagem, o sistema era capaz de informar se um lote estava, ou não, em conformidade com a legislação requerida pelo Ministério da Agricultura do Brasil.

## **2.4 *Maximally Stable Extremal Regions (MSER)***

O algoritmo MSER foi proposto por Matas et al. (2004) para a detecção de regiões-chaves invariantes a transformada afim, baseado em linhas de níveis. Sendo um dos algoritmos mais usados na detecção de regiões-chaves.

Seja  $I : D \subset \mathbb{Z} \rightarrow S$  uma imagem, com  $S = \{0, 1, \dots, 255\}$ , e seja  $R$  um subcon-

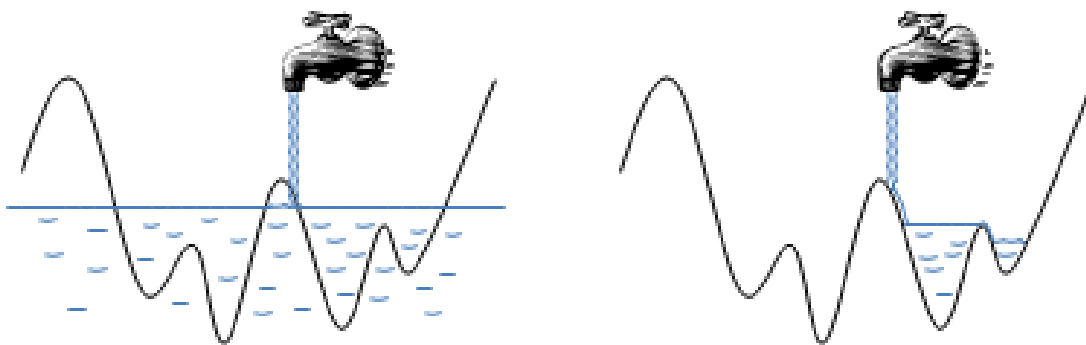


Figura 2.4: Visão intuitiva para MSER. Fonte: Nistér e Stewénius (2008)

junto contíguo de  $D$ , e seja o conjunto  $\partial R$  a região de fronteira da região  $R$ , isto é, os píxeis que são adjacentes a um píxel de  $R$  mas que não pertencem a  $R$ . Uma região  $R$  é extrema máxima se, e somente se, para todo  $p \in R, q \in \partial R : I(p) > I(q)$ , ou extrema mínima se  $I(p) < I(q)$ .

Sejam  $R_1, \dots, R_{i-1}, R_i, \dots$  uma sequência de regiões extremas aninhadas, tal que  $R_i \subset R_{i+1}$ . A região extrema  $R_k$  é maximamente estável se, e somente se

$$q(k) = \frac{|R_{k+\Delta} \setminus R_{k-\Delta}|}{|R_k|} \quad (2.12)$$

tiver um mínimo local em  $k$ . O valor de  $\Delta$  é um parâmetro do método.

O MSER possui grande semelhança com *Watershed*, um outro algoritmo bem-conhecido em processamento de imagens. A única diferença é o formato da saída: no *Watershed* a saída é um particionamento de  $D$ , enquanto que o MSER produz ao final um conjunto de regiões chaves.

Uma visão intuitiva para o algoritmo é imaginar uma torneira aberta em que a água escorre para os níveis mais baixos primeiro, sendo essas as primeiras regiões encontradas por MSER e conforme o nível vai subindo, duas regiões vão se conectando e assim produzindo uma terceira região de modo que as duas regiões anteriores estão aninhadas nesta macrorregião, Figura 2.4.

Nesse trabalho, utilizamos a implementação de MSER da biblioteca OpenCV que utiliza a variante de MSER proposto por Nistér e Stewénius (2008) tendo esse último a vantagem de ter complexidade linear no tempo. Na Figura 2.5 mostramos os diferentes estágios de MSER, quando aplicado na imagem com a placa Petri. Para um

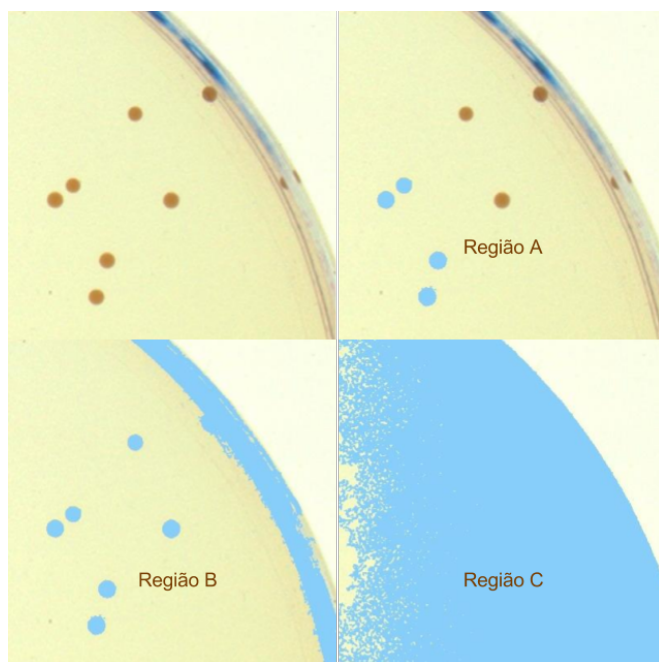


Figura 2.5: Diferentes estágios do algoritmo MSER. A primeira imagem é a que desejamos aplicar MSER. Pode-se perceber que a água sobe até que o nível preencha quase toda a imagem. Além disso, verifica-se que a região A está contida em B que por sua vez está contida em C. A essa estrutura em que algumas regiões estão contidas em outras, denomina-se regiões aninhadas.

entendimento em detalhes sobre o algoritmo recomendamos a leitura de Matas et al. (2004).

## 2.5 *K-means*

*K-means*, ou k-médias, é um método largamente utilizado para o problema de agrupamento. Embora não tenha garantia de obter resultado acurado, sua forte adoção se deve ao fato de ser simples e rápido.

Dado um  $k \in \mathbb{N}$ ,  $k \geq 1$  e um conjunto de  $n$  pontos no espaço  $X \subset \mathbb{R}^d$ . O problema de k-médias pode ser definido como encontrar o conjunto  $C = c_1, \dots, c_k$  de centroides, que minimize a função:

$$\phi = \sum_{x \in X} \min_{c_i \in C} \|x - c_i\|^2 \quad (2.13)$$

Em linhas gerais, estamos tentando encontrar os centroides que possuem a menor distância quadrática média em relação ao conjunto de pontos fornecidos.

O algoritmo utilizado neste trabalho é o que está implementado em OpenCV, proposto por Arthur e Vassilvitskii (2007), e que tem como melhoria a escolha dos centroides iniciais baseado na distribuição de probabilidade dos pontos de  $X$ .

Para um maior aprofundamento no tema recomendamos a leitura de Arthur e Vassilvitskii (2007).

## 2.6 Rede Neural Convolucional U-Net

Nos últimos anos, redes neurais convolucionais (CNN) têm se estabelecido como o estado da arte em diferentes tarefas de visão computacional. Embora já existam há algum tempo (LECUN et al., 1989), as CNNs estavam limitadas pela quantidade de dados disponível para treino, bem como pela falta de dispositivos computacionais mais poderosos que permitissem treinar CNNs com muitas camadas e parâmetros. O grande momento das CNNs aconteceu em 2012 quando Krizhevsky, Sutskever e Hinton (2012) conseguiram treinar uma rede neural com 8 camadas e milhões de parâmetros utilizando o banco de imagens ImageNet que conta com 1 milhão de imagens rotuladas.

Redes neurais artificiais (ANN) são algoritmos de aprendizado de máquina que utilizam neurônios artificiais para transformar dados de entrada em outras formas de representação. ANNs são, até certo ponto, inspiradas no funcionamento do cérebro humano (GOODFELLOW; BENGIO; COURVILLE, 2016). Em termos matemáticos um neurônio artificial pode ser definido como:

$$y = f \left( \sum_i w_i x_i + b \right), \quad (2.14)$$

onde  $w_i$  são os pesos que serão linearmente combinados as entradas  $x_i$ , e por último é adicionado um *bias*  $b$ . O resultado dessas operações lineares é fornecido para uma função de ativação  $f$ . A função de ativação tipicamente é não linear, como por exemplo:  $f(x) = \frac{1}{(1+\exp(-x))}$ , função sigmoide, e  $f(x) = \max(0, x)$ , função retificadora.

Uma rede neural artificial é formada por um conjunto de camadas  $\{l_i\}$  e cada camada contém um conjunto de neurônios  $\{y_{ij}\}$ , sendo  $y_{ij}$  a saída do neurônio  $j$  na camada  $i$ .

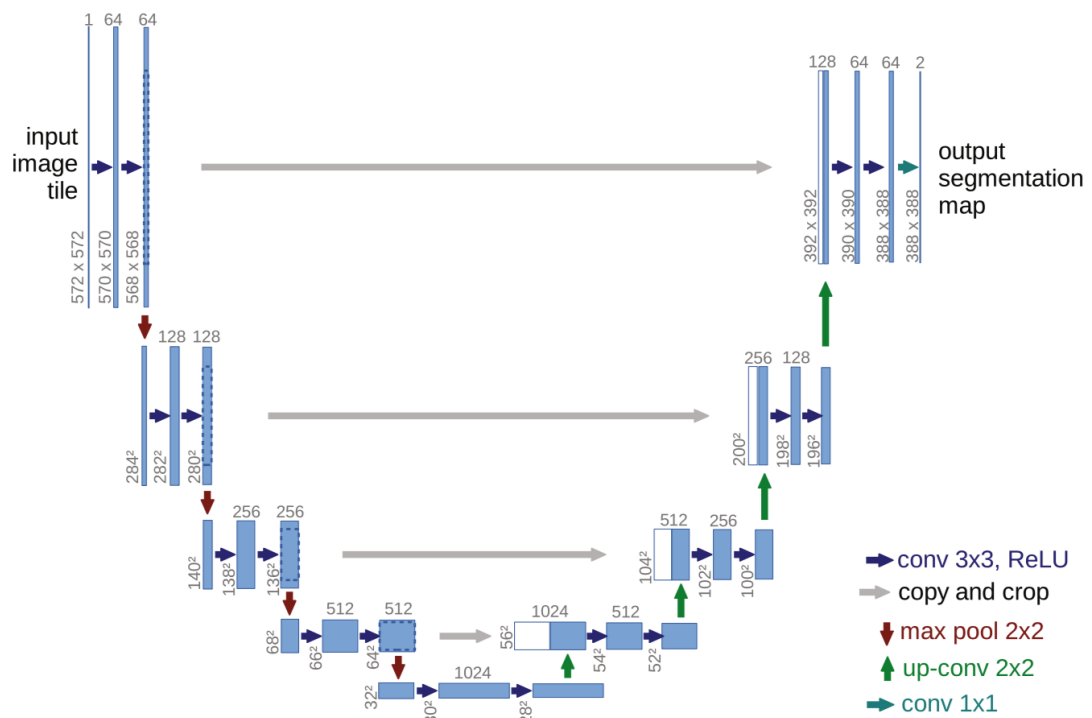


Figura 2.6: Rede U-Net proposta por Ronneberger, Fischer e Brox (2015).

Além disso, uma rede neural é treinada ajustando os pesos  $w_{ij}$  de todos os neurônios em todas as camadas. Para isso, a saída produzida pela rede é comparada com a saída esperada, o erro dessa comparação é retropropagado para que a rede ajuste seus pesos internos tentando se aproximar da saída esperada.

As CNNs são um tipo especializado de rede neural para processamento de dados bidimensionais, como por exemplo imagens, as CNNs empregam a operação matemática chamada de convolução em substituição a multiplicação de todas as entradas por todos os pesos que acontece em uma dada camada de uma ANN. O uso da convolução diminui a quantidade de parâmetros que precisam ser treinados e portanto o tempo de treinamento da rede neural. Para um entendimento em detalhes sobre o funcionamento das CNNs recomendamos Goodfellow, Bengio e Courville (2016).

U-Net é uma rede neural convolucional em que existem duas operações de transformação da imagem, sendo uma operação de contração e outra de expansão. Tais transformações irão produzir uma imagem ao final com a probabilidade de um dado píxel  $(x, y)$  na imagem de entrada pertencer a uma dada classe de objeto. A operação de contração de U-Net é uma inspiração no trabalho de Long, Shelhamer e Darrell

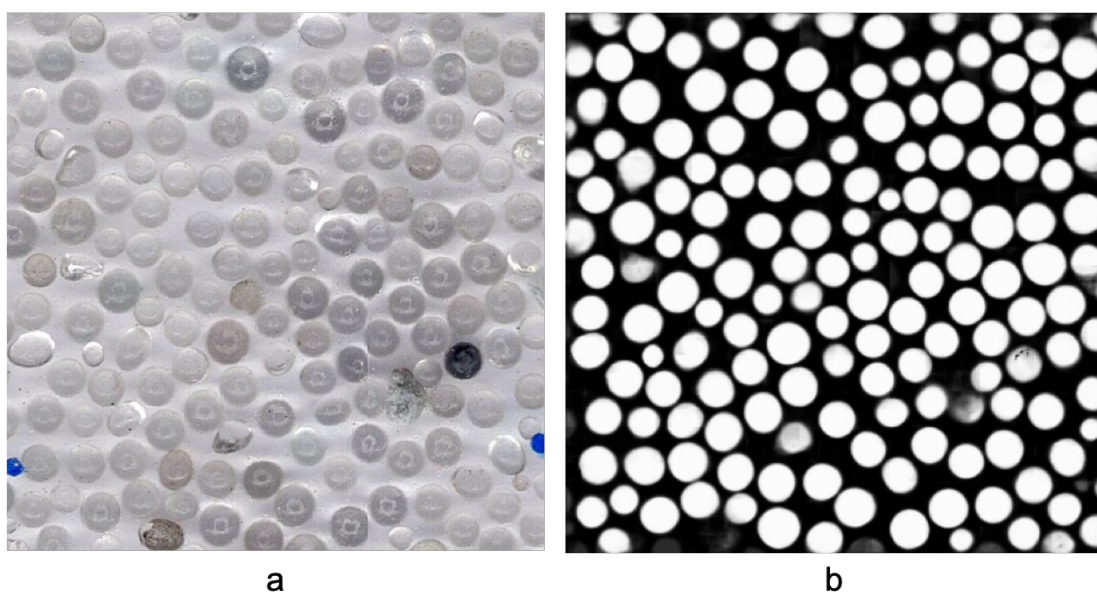


Figura 2.7: (a) imagem contendo microesferas de vidro para segmentação, fornecida como entrada para uma U-Net já treinada. (b) saída produzida pela U-Net.

(2015) que propuseram uma rede neural totalmente convolucional para a tarefa de segmentação. Embora U-Net tenha as operações de contração e expansão, podemos dizer que ela também é uma rede neural totalmente convolucional para segmentação, pois todas as suas camadas empregam o uso de convolução.

U-Net foi originalmente utilizada para segmentação de imagens de material biológico (RONNEBERGER; FISCHER; BROX, 2015) e foi com essa arquitetura que os autores venceram o desafio de rastreamento celular ISBI 2015 em que era preciso segmentar diferentes células nervosas. Como o material disponível para o treinamento de redes neurais é normalmente escasso nesse tipo de aplicação biológica (RONNEBERGER; FISCHER; BROX, 2015), é preciso fazer uso intensivo de distorções nas imagens de entrada para que o conjunto de treinamento seja efetivamente bem maior do que o inicialmente coletado.

Na Figura 2.6 vemos a arquitetura proposta em Ronneberger, Fischer e Brox (2015). Nota-se que na parte de contração, não existem diferenças com relação a uma rede convolucional típica, a principal diferença está nas camadas de expansão que recebe a saída das camadas de contração e aumenta o tamanho do mapa de atributos ao passo que reduz a dimensionalidade. Além disso, para cada fase de expansão concatenam-se os parâmetros localizados ao mesmo nível da operação de contração. Desse modo, in-

formações de alto nível produzidas na contração (cores, texturas, formas), que indicam a presença do objeto, serão fundidas com as informações de baixo nível (a localização ou não do objeto numa região da imagem original). Na Figura 2.7(b) vemos um exemplo de saída de U-Net. Como a contração e a expansão apresentam mesmo número de níveis a rede adquire a forma de um "U", advindo daí seu nome U-Net.

Outra aplicação reportada na literatura foi na localização de crateras lunares por Silburt et al. (2019), os autores treinaram uma rede U-Net para gerar o mapa de segmentação das crateras e então usaram *template matching* para procurar por círculos. Essa abordagem permitiu aos autores encontrarem diversas novas crateras.

## Capítulo 3

# Granulometria Aplicada a Contagem de Bactérias

A contagem de colônias de bactérias tem vasta aplicação no campo das ciências biológicas e seu propósito é estimar o nível de contaminação microbiológica presente em uma amostra (GOLDMAN; GREEN, 2008). Quando o nível de contaminação é conhecido pode-se extrair, por exemplo, a importante informação sobre se um ambiente ou alimento está de acordo com os padrões de higiene impostos pela legislação.

Entretanto a contagem é o último passo de um processo maior que se inicia com a coleta de amostras microbiológicas. Essas amostras são coletadas por meio de hastes flexíveis de algodão que transferem as bactérias do ambiente para a placa Petri que contém um rico caldo de nutrientes. O próximo passo é diluir a amostra em vários níveis por meio da transferência de parte do conteúdo de uma placa já contaminada para uma sem contaminação, ao repetir esse passo por várias vezes é possível alcançar diferentes níveis de diluição. Finalizada a etapa de diluições as placas devem ser guardadas em condições ideais de temperatura, tempo e nutrientes. Com isso, as bactérias se proliferam permitindo posteriormente serem contadas. Na Figura 3.1 vemos exemplo de uma amostra de *Staphylococcus aureus* que passou por diferentes níveis de diluição e como isso influencia o número final de colônias a serem contadas.

Todo esse processo exige pessoal técnico especializado para ser executado. Contudo, nosso objetivo neste capítulo é propor solução para a última etapa do processo que é a contagem da colônias de bactérias. Tal etapa é comumente realizada de modo



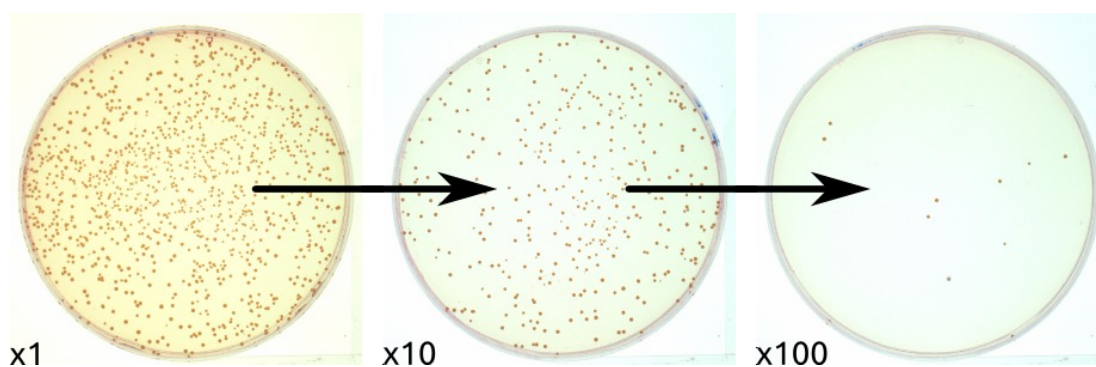


Figura 3.1: Diferentes níveis de diluição da amostra. Fonte: Geissmann (2013).

manual o que pode gerar imprecisões sobre a real quantidade de colônias (BREED; DOTERRER, 1916). Na literatura encontramos diversos esforços com o objetivo de automatizar a tarefa de contagem, um deles é o programa de computador OpenCFU (OPENCFU, 2016), o mesmo utilizado como comparativo nos nossos experimentos.

O algoritmo que OpenCFU usa para realizar essa contagem assume diversas premissas, tais como que todas as colônias são sempre circulares, que a relação entre perímetro ao quadrado dividido pela área multiplicado por  $4\pi$  não é maior que 1,6, etc. Isso limita o uso de OpenCFU apenas para essa tarefa, bem diferente da nossa abordagem que ao se basear em modelos fornecidos pelo usuário consegue buscar diferentes formas na imagem e não apenas as circulares.

Esses modelos são conhecidos por *kernels* e são utilizados por granulometria baseada em correlação para computar a semelhança entre eles e a imagem. Nós optamos por granulometria devido aos resultados reportados quando da contagem de feijões (ARAÚJO; PESSOTA; KIM, 2015), além disso, os feijões possuem coloração uniforme e dependendo do fundo podem ser facilmente distinguíveis, tal qual as colônias. Esta facilidade de distinção decorre do alto contraste que é criado entre a coloração do fundo e a das bactérias.

Granulometria se aproveita desse alto contraste para produzir altos picos de correlação. Contudo, avarias e marcações que estão na placa e foram capturadas nas imagens também possuem esse alto contraste o que prejudica os resultados de granulometria no conjunto de testes. Por exemplo, quando aplicado somente granulometria a taxa de erro foi de 6,18%.

Esse resultado decorre do fato de que granulometria está contabilizando essas ava-

rias e marcações como colônias válidas, e portanto superestimando a quantidade de colônias verdadeiras na imagem, contribuindo para uma taxa de erro mais elevada se comparado a OpenCFU(2,69%). Para superar essa limitação iremos propor uma abordagem que valida a saída de granulometria por meio do algoritmo MSER, nomeamos tal abordagem de MSGranul.

MSGranul atingiu taxa de erro absoluto de 2,47% se equiparando a OpenCFU e superando granulometria baseada em correlação. Além disso, percebemos que essa taxa de erro podia ser ainda menor, pois MSGranul e granulometria não utilizam a informação de cores que estão presentes na imagem.

Portanto adicionamos um pós-processamento baseado em *k-means* a fim de validar se a parte da imagem identificada como colônia por MSGranul ou granulometria de fato é uma colônia com base na sua cor, desse modo as taxas de erro médio caíram para: 1,42% e 0,89%, sendo: granulometria e MSGranul, respectivamente.

### **3.1 Trabalhos relacionados**

A contagem de colônias de bactérias é uma tarefa trabalhosa, exaustiva e suscetível a erros, portanto vários esforços para sua automatização têm sido reportados na literatura.

Mansberg et al. (1957) já apontavam para a necessidade do desenvolvimento de uma solução para a contagem automatizada de bactérias, que segundo os autores é uma das tarefas mais tediosas de se executar nos laboratórios de bacteriologia. Eles também apresentaram que certas inconsistências na contagem do número de colônias decorriam de falhas humanas.

Em 1995, MUKHERJEE et al. propuseram um algoritmo baseado em transformada de distância para a segmentação de colônias em filtros de membranas que são utilizados na filtragem de água não potável para potável. O objetivo dessa contagem era determinar a qualidade da amostra de água. Os autores reportaram que no caso com a maior quantidade de colônias contadas manualmente, total de 420, eles conseguiram contabilizar 398. Segundo eles, talvez fosse possível contabilizar um valor mais perto do verdadeiro por meio de ajustes finos de parâmetros.

Já Putman, Burton e Nahm (2005) não apresentaram um novo algoritmo, em vez disso, eles procuraram abordar a questão dos custos envolvidos na contagem eletrônica, pois os equipamentos poderiam ser caros para serem adquiridos e por isso deveriam ser utilizados da forma mais racional possível. Com o intuito de reduzir tal custo eles propuseram um sistema de compartilhamento de equipamento de contagem, em que vários laboratórios poderiam enviar suas imagens para um servidor central e obter uma estimativa da quantidade de colônias existentes na imagem.

Uma abordagem utilizando *template matching* foi proposta por Kachouie, Kang e Khademhosseini (2009) que utilizando células vivas como modelos, o algoritmo, buscava em outras imagens por correspondências dessas células. O sistema recebeu o nome de ArrayCounter e segundo os autores conseguiu atingir bons resultados quando comparados a contagem manual.

Em 2010, CAI et al. apresentaram uma macro para o programa ImageJ, em que são requeridos do usuário ajustes em apenas dois parâmetros, o que simplifica a utilização do mesmo. Segundo os autores os resultados do sistema proposto superaram a contagem manual, que em termos gerais utilizava uma combinação de filtragem de partículas, diferentes níveis de limiarização e *watershed*. Desse modo, os autores foram capazes não apenas de contabilizar as bactérias como também segmentá-las. Clarke et al. (2010) também propuseram um sistema em que é utilizado uma combinação de diferentes níveis de limiarização e transformadas mínimas estendidas, ao qual chamaram de *NIST's Integrated Colony Enumerator* (NICE). Uma das vantagens desse último é que a manipulação do sistema era mais intuitiva, haja vista que não era requerido um bom entendimento de como macros do ImageJ funcionavam.

Geissmann (2013) também propôs um sistema de baixo custo, em que são requeridos um computador de mesa para realizar o processamento, além de uma câmera portátil para aquisição das imagens. Chamado pelo autor de OpenCFU (*Open Counting Forming Unit*), o programa utiliza limiarizações e algumas premissas, tais como a de que os objetos contados são circulares. As vantagens são: sua interface gráfica amigável ao usuário e estar disponível na internet sob uma licença de código aberto o que ajuda na manutenção do programa, mesmo se o autor não estiver mais envolvido diretamente com ele.

Mais recentemente, Ferrari, Lombardi e Signoroni (2015) utilizaram uma rede neural convolucional a fim de contabilizar bactérias. Nos testes eram fornecidas imagens contendo de 1 à 6 colônias por imagem, ou uma imagem sem a presença de qualquer colônia. Para realizar o treinamento da rede foram utilizados um conjunto massivo de imagens, como é comum em algoritmos de aprendizagem profunda, que continham aproximadamente 17 mil imagens. Embora em uma placa seja possível encontrar mais de mil colônias, rotulá-las pode ser uma tarefa complicada, por isso os autores criaram este conjunto artificialmente. Tanto o treinamento, quanto os testes foram realizados em uma placa GPU Nvidia Titan Black e precisou de aproximadamente 3 horas de processamento para o treinamento do modelo. Contudo, chama atenção a baixa taxa de acerto quando as colônias estão agrupadas, ou seja, quando o número de colônias presentes nas imagens é maior que 1.

Diferente das outras abordagens Yoon, Lawrence e Park (2015) desenvolveram um sistema que utiliza imagens multiespectrais. Os autores salientam que embora muitos sistemas tenham sido propostos, as contagens em laboratórios menores ainda continuam sendo realizadas manualmente. O método proposto por eles utiliza-se do fato que as colônias absorvem diferentes faixas de onda e, portanto, é possível obter a localização, bem como a classificação, de uma colônia. Vale ressaltar a necessidade de equipamento especial para adquirir tais imagens, que devido ao preço pode ser de difícil aquisição.

Ainda em 2015, CHIANG et al. propuseram um módulo para o programa Analysis Pro 3.0 que utiliza uma série de filtros para converter as imagens coloridas em níveis de cinzas e então extrair as características que possam discriminar as colônias.

Foi possível notar que grande parte dos esforços reportados na literatura dedicam-se a superar o problema da contagem das colônias quando estas estão grudadas.

## **3.2 Materiais e Métodos**

Nesta seção apresentaremos as metodologias e materiais que utilizamos nos experimentos de contagem de colônias de bactérias.

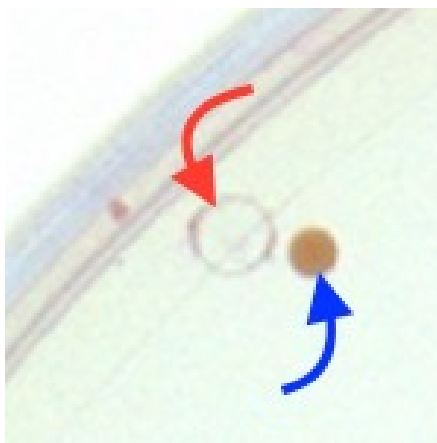


Figura 3.2: Diferenças entre uma bolha de ar (seta vermelha) e uma colônia verdadeira de bactérias (seta azul).

### 3.2.1 Conjunto de dados

Geissmann (2013) produziu um conjunto que contém 19 imagens de alta resolução com colônias de *Staphylococcus aureus*. Nós utilizamos esse conjunto de imagens por ser de fácil acesso, já que está disponível no sítio do OpenCFU (2016), e porque poderíamos utilizá-lo como comparação direta entre o nosso método e o reportado por Geissmann. Cada imagem corresponde a uma placa Petri individual e a quantidade presente em cada uma delas varia entre 10 e 1000 colônias, aproximadamente.

Para a confecção destas placas um meio Luria-Bertani suplementado com 1,5% de ágar foi depositado em 19 placas padrão de 90 mm. Então uma cultura de *Staphylococcus aureus* foi diluída e 100 $\mu$ L foram plaqueados. As bactérias foram cultivadas durante a noite a uma temperatura de 37 graus.

Para serem contadas manualmente, as placas foram entregues, aleatoriamente, a sete técnicos, que contaram sem conhecer o resultado um do outro. Cada placa recebeu o número médio contado por eles. Geissmann computou, ainda, o tempo total que os técnicos gastaram para realizar a contagem excluindo o tempo de transcrição dos resultados. Eles gastaram em média 39.3 (desvio padrão=6.1) minutos.

A fim de criar imperfeições na placa, foi adicionado entre 0,5 mL e 1 mL de ar. Na Figura 3.2 é possível visualizar uma colônia ao lado de uma bolha de ar.

Utilizando esse conjunto de imagens iremos comparar os resultados de granulometria baseada em correlação, MSGranul e OpenCFU.

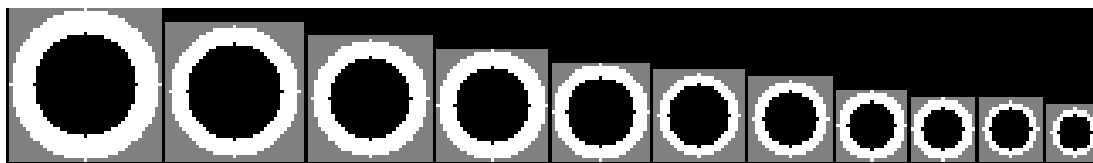


Figura 3.3: Os 11 kernels utilizados, tendo o primeiro 30 píxeis de diâmetro e o ultimo 9 píxeis.

### 3.2.2 Processamento de imagem

Inicialmente utilizamos apenas granulometria e tentamos manualmente ajustar os parâmetros para obter a menor taxa de erro possível. Durante essa fase, concluímos que a geração de 11 *kernels* circulares com diâmetro mínimo de 9 e máximo de 30, e uma diferença de 6 oitavas entre eles era suficiente para localizar as colônias com precisão. Os *kernels* gerados podem ser vistos na Figura 3.3.

Entretanto, não conseguimos diminuir a taxa de erro para menos de 6% e ao analisar onde a granulometria estava cometendo mais erros percebemos que as regiões que possuíam algum tipo de marcação eram contadas como colônias (Figura 3.4), o que na prática sobrestimava a quantidade de colônias na placa. Essas avarias/marcações, embora não apresentem a forma que estávamos buscando, possuem alto contraste e com isso altos picos de correlação que em alguns casos são mais elevados do que os de colônias verdadeiras.

A fim de lidar com esse problema, propusemos a abordagem de MSGranul em que utilizamos MSER e granulometria para ignorar essas indesejadas partes da imagem. Em seções posteriores iremos explicar, em maiores detalhes, tal abordagem.

Embora MSGranul alcance resultados comparáveis a OpenCFU, percebemos que caso empregássemos algum tipo de pós-processamento poderíamos atingir taxas de erros ainda mais baixas. Pois até então a informação da cor era desprezada.

### 3.2.3 Pós-processamento baseado em *k-means*

Granulometria funciona essencialmente em imagens em níveis de cinzas. Todavia, algumas marcações, claramente distinguíveis de colônias nas imagens coloridas, apresentavam enorme ambiguidade ao serem convertidas para níveis de cinzas (Figura 3.4(b)). Por isso utilizar algum tipo de pós-processamento poderia melhorar os re-

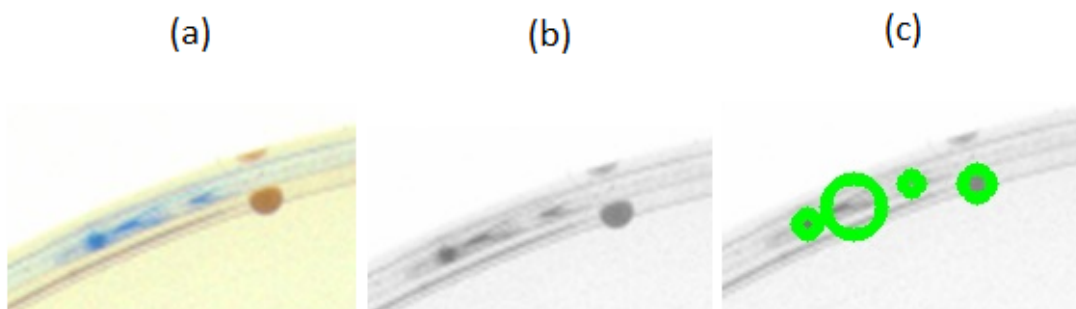


Figura 3.4: (a) mostra a imagem colorida, onde a marcação azul é claramente distinguível, (b) em níveis de cinza a marcação em azul fica ambígua em relação a uma colônia verdadeira, (c) granulometria baseada na correlação identificando a região de alto contraste como colônia.

sultados. Optamos por *k-means* devido a sua simplicidade e por estar incorporado nativamente a OpenCV.

Começamos convertendo uma dada imagem colorida para níveis de cinzas, executamos MSGranul para que possamos localizar as colônias. Conhecendo as localizações precisas, iremos extrair os píxeis dessas colônias na imagem colorida original. Esses píxeis são fornecidos ao algoritmo de *k-means*. Baseado nos nossos experimentos  $k = 5$  mostrou-se suficiente para fazer uma correta distinção entre as colônias e outras marcações na placa.

Dessa forma 5 centroides serão encontrados e devemos procurar no conjunto de colônias que foram previamente encontradas com MSGranul as 5 colônias mais parecidas com cada um dos centroides.

Essa similaridade entre a colônia encontrada por MSGranul e um determinado centroide é feita computando um histograma de quantos píxeis dentro de uma colônia pertencem a cada um dos centroides. Então, selecionamos a colônia que tem a maior quantidade de píxeis de determinado centroide.

Note que embora estejamos tratando tudo o que foi identificado por MSGranul como colônias, de fato alguns desses objetos são avarias/marcações, mas foram contadas como colônias por MSGranul.

Com as cinco colônias mais representativas encontradas, o programa mostra ao usuário, para cada uma das cinco colônias, um recorte da imagem original onde aquela colônia foi localizada. O usuário pode escolher se aquele recorte de fato contém uma

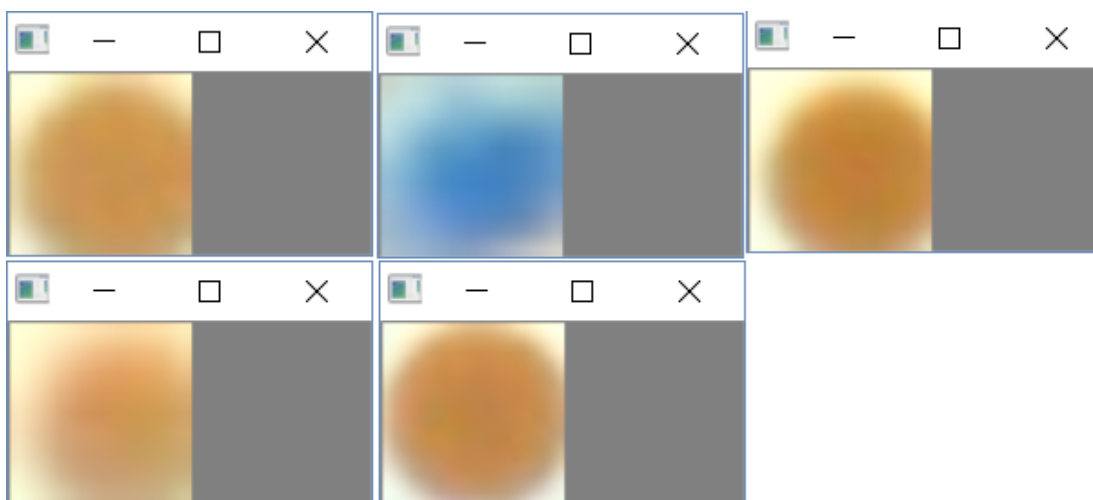


Figura 3.5: Cinco janelas mostrando os grãos mais representativos de determinado centroide. A janela de meio na primeira linha claramente não é uma colônia, logo passível de ser excluído da contagem final, enquanto todas as demais são claramente bactérias.

colônia apertando a tecla "S", ou apertar qualquer outra tecla e assim desconsiderar aquele colônia e por consequência o centroide. Na Figura 3.5 vemos cinco janelas que foram mostradas ao usuário e cabendo a ele decidir quais centroides de fato representam colônias.

Ao validar um centroide qualquer, todas as colônias identificadas por MSGranul e que tenham o pico no histograma de centroides localizada nesse centroide, será considerada válida e com isso será contabilizada. Dessa forma o usuário consegue interagir com o sistema melhorando sua acurácia e apontando quais colônias são verdadeiros positivos.

### 3.2.4 Avaliação dos erros

O funcionamento exclusivo de MSGranul em níveis de cinza impõe restrição em relação a avaliação dos resultados, pois só conseguimos aceitar, ou rejeitar, uma determinada colônia baseando-se unicamente no seu pico de correlação e área de intersecção. Logo, colônias acima do limiar dos parâmetros definidos pelo usuário são consideradas válidas.

Portanto, a fim de avaliar em termos estatístico MSGranul, utilizamos a Taxa de Erro Absoluto (TEA), tal como:



$$TEA = \frac{|N_v - N_e|}{N_v}, \quad (3.1)$$

onde  $N_v$  é o número verdadeiro de colônias em uma dada placa Petri e  $N_e$  é o número estimado por alguma das abordagens utilizadas (granulometria, MSGranul e OpenCFU). Portanto, quanto menor o valor da TEA, mais acurada é a abordagem.

Desse modo serão produzidos 19 TEA, uma para cada uma das imagens analisadas. Como gostaríamos de analisar o total dos erros que uma abordagem comete, utilizamos a TEA média para cada uma das abordagens. Logo, a TEA média é a soma da TEA de cada uma das imagens dividido por 19.

### 3.2.5 Equipamento

Realizamos todos os experimentos num computador portátil com processador Intel Core i7 de 2 núcleos com 16 gigabytes de memória RAM. A implementação é serial, sem utilizar paralelismo e nem GPU.

A primeira versão do programa foi compilada em Windows 10, utilizando a biblioteca Cekeikon 5 e compilador GCC 6. Posteriormente, o programa foi portada para Opencv 2.4, dessa forma, foi possível compilá-lo e executá-lo em Ubuntu Linux 16.04 LTS (GCC 5.4) e MacOS Sierra (LLVM 3.8). O código-fonte encontra-se disponível no GitHub do autor <sup>1</sup>.

## 3.3 MSGranul

MSGranul recebe esse nome pois utiliza MSER para validar a saída produzida por granulometria baseada em correlação. Tal abordagem origina-se como solução ao problema de diferenciar partes da imagem com avarias/marcações que apresentam alto contraste.

A fim de introduzir MSGranul, abordaremos sua definição com dois diferentes enfoques, primeiramente um intuitivo e em seguida a formalização em termos matemáticos.

---

<sup>1</sup><<http://github.com/joeljuni05/MGranul>>

### 3.3.1 Visão intuitiva

Granulometria baseada em correlação utiliza correlação não normalizada para detectar objetos por meio do contraste desses em relação ao fundo.

Incorre que tal contraste pode aparecer também em partes da imagem que na verdade são defeitos sem importância para uma análise granulométrica. Esse problema apareceu quando tentamos aplicar granulometria na contagem de colônias de bactérias em que algumas marcações utilizadas para identificar a placa e/ou defeitos de fabricação na mesma são contabilizadas como colônias verdadeiras.

Para abordar uma solução para esse problema estamos propondo o uso de MSER, um algoritmo que encontra várias regiões-chaves aninhadas, para validar se um grão localizado por granulometria deve ser considerado uma colônia válida, essa abordagem recebe o nome de MSGranul.

A ideia por trás de MSGranul é verificar se os grãos/colônias encontrados pela granulometria coincidem com as regiões detectadas por MSER e se sim, qual é esse grau de coincidência. Primeiramente, executamos granulometria para extrair a localização das colônias na imagem. Em paralelo executamos, também, MSER que produzirá várias regiões-chaves por meio de diferentes níveis de limiarização.

Os objetos de granulometria são ou colônias individuais ou aglomerados de colônias. Para cada objeto encontrado por granulometria iremos computar a intersecção entre ele e as regiões-chaves de MSER. Além disso, computaremos também a união da área do objeto e da região-chave. Ao dividir intersecção pela união temos coeficiente  $c$  que nos informa um valor entre 0 e 1, fornecendo o grau de intersecção que um objeto de granulometria tem com uma região-chave de MSER. Note que várias regiões-chaves podem interseccionar com uma dada colônia ou aglomerado, pois MSER produz várias regiões aninhadas que na prática são várias regiões sobrepostas. Já granulometria irá encontrar um único objeto em uma dada parte da imagem.

Desse modo, MSGranul assumirá que um objeto qualquer só tem correspondência válida com uma, e apenas uma região-chave, sendo essa a com maior coeficiente  $c$ . Pois,  $c = 0$  significa que a área compartilhada na imagem por um objeto de granulometria não tem correspondência com qualquer região encontrada por MSER e  $c = 1$  indica que a área do objeto e da região-chave tem correspondência perfeita.

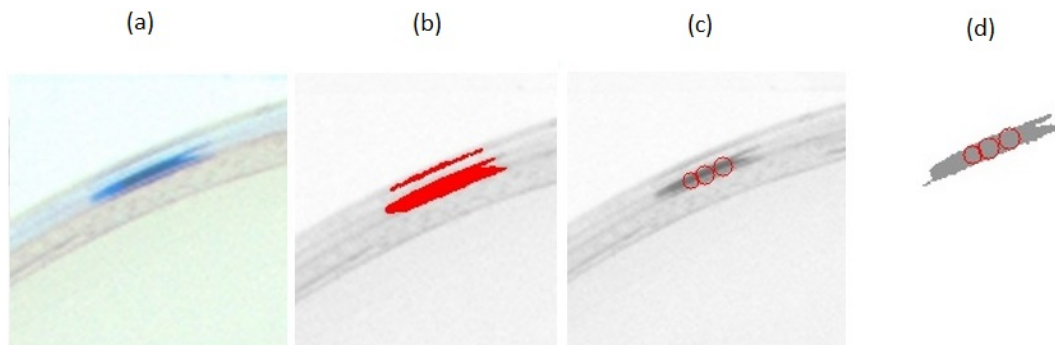


Figura 3.6: (a) mostra a imagem colorida que queremos aplicar MSGranul, (b) saída de MSER, (c) Saída de granulometria baseada em correlação, (d) cálculo da área de intersecção entre os dois.

Na Fig. 3.6 temos um exemplo dessa ideia. Em (a) temos a imagem original que será convertida em níveis de cinzas para que possamos aplicar granulometria e MSER. Em (b) temos regiões-chaves encontradas por MSER, (c) mostra a saída de granulometria.

Sobrepondo a saída de granulometria, círculos em vermelho, na saída de MSER, região em cinza, podemos calcular o coeficiente  $c$ . A Fig. 3.6 (d) mostra essa sobreposição. Nesse caso o coeficiente  $c$  deverá ser baixo, pois a área das 3 colônias somadas não chega a 55% da região-chave ( $c = 0.55$ ). Cabe ao usuário definir um valor mínimo  $l$  aceito para  $c$ , pois MSGranul não é capaz de tomar essa decisão por si mesmo. Todos os  $c < l$  serão descartados.

Na Figura 3.7 temos dois cenários, o primeiro à esquerda com objetos válidos e o segundo à direita com um aglomerado inválido. Isso porque ao escolher um valor mínimo adequado todos os objetos do primeiro caso serão mantidos, pois têm  $c$  mais alto que o do segundo. Portanto, MSGranul descartaria os objetos da imagem à direita enquanto manteria os objetos à esquerda.

Mesmo com o uso de MSER para validar a saída de granulometria, a capacidade de granulometria por correlação de buscar formatos diversos ficará inalterada. Logo, podemos afirmar que MSGranul melhora a detecção de granulometria sem perder sua capacidade de generalização.

Além disso, ao implementar o algoritmo, deve-se tomar cuidado para que uma colônia de bactérias, ou um aglomerado delas, não seja contada duas ou mais vezes.

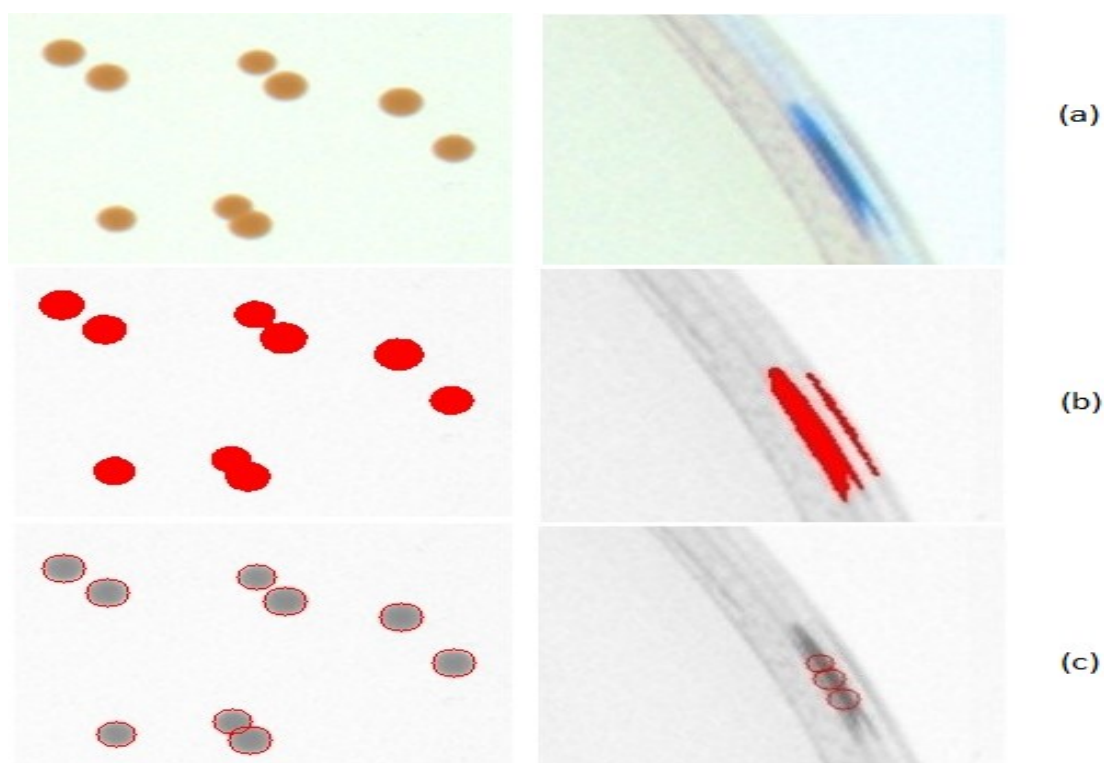


Figura 3.7: (a) imagem colorida sobre a qual queremos aplicar MSGranul, (b) saída de MSER, (c) Saída de granulometria baseada na correlação.

Pois como MSER encontra diversas regiões-chaves para a mesma localização na imagem isso pode fazer com que uma colônia seja contada mais vezes. Na Figura 3.8 por exemplo, deve-se contabilizar 1 colônia, mesmo que várias regiões aninhadas de MSER coincidam com o mesmo conjunto de grãos encontrados.

### 3.3.2 Definição matemática

Seja uma imagem  $I : D \subset \mathbb{Z} \rightarrow \{0, 1, \dots, 255\}$  com um conjunto de regiões  $M \subset P(D)$  detectadas por MSER e o conjunto de objetos  $G \subset P(D)$  encontrados pela granulometria, onde  $P(D)$  é o conjunto de todos os subconjuntos de  $D$ . Para cada  $m \in M$ , deseja-se encontrar um subconjunto  $S \subset G$  tal que quase todos os pixels de  $m$  e de  $S$  coincidam (isto é, tal que poucos pixels de  $m$  não pertençam a  $S$  e poucos pixels de  $S$  não pertençam a  $m$ ). Se existir tal subconjunto  $S = \{s_1, \dots, s_n\}$ , então os objetos de granulometria  $\{s_1, \dots, s_n\}$  serão considerados como verdadeiros positivos. Caso contrário, esses objetos serão descartados como falsos positivos. Para isso, calculamos

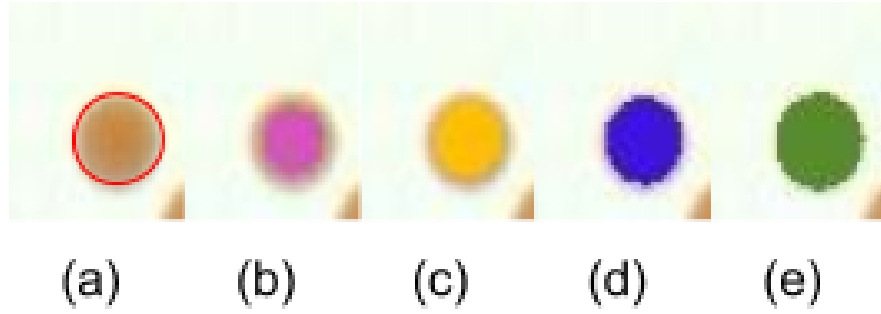


Figura 3.8: (a) objeto localizado por granulometria, (b) primeira região encontrada por MSER, (c - e) demais regiões encontradas por MSER na mesma localização da imagem.

o coeficiente  $c$ :

$$c(m, S) = \frac{\text{area}[m \cap (\bigcup_{i=1}^n s_i)]}{\text{area}[m \cup (\bigcup_{i=1}^n s_i)]} \quad (3.2)$$

Um objeto  $s$  detectado pela granulometria é considerado como verdadeiro positivo se existirem  $m \in M$  e  $S \subset G$  tais que  $s \in S$  e  $c(m, S) > l$ , onde  $l$  é um limiar especificado pelo usuário.

Devido ao modo como o MSER funciona, diversas regiões MSER aninhadas podem estar localizadas numa posição da imagem. Portanto, deve-se tomar cuidado para que um objeto  $s$  não seja contado mais de uma vez.

### 3.4 Discussões e resultados

Durante os experimentos, nós testamos diversos parâmetros tanto para granulometria quanto para MSGranul. Com isso, selecionamos os parâmetros que minimizaram a TEA média no conjunto de imagens, a saber:  $\tau = 0.15$  e  $\gamma = 0.4$ , por parte de granulometria e  $l = 0.71$ , em MSGranul.

Todos esses experimentos para a escolha dos parâmetros foram feitos em lote, ou seja, definíamos manualmente um conjunto de parâmetros e computávamos a TEA média para cada uma das abordagens. E repetíamos esse processo até constatar que a TEA média não diminuía mais. A execução em lote facilitou o trabalho de repetir várias vezes o processo e por meio disso definimos qual o conjunto de parâmetros eram os mais adequados.

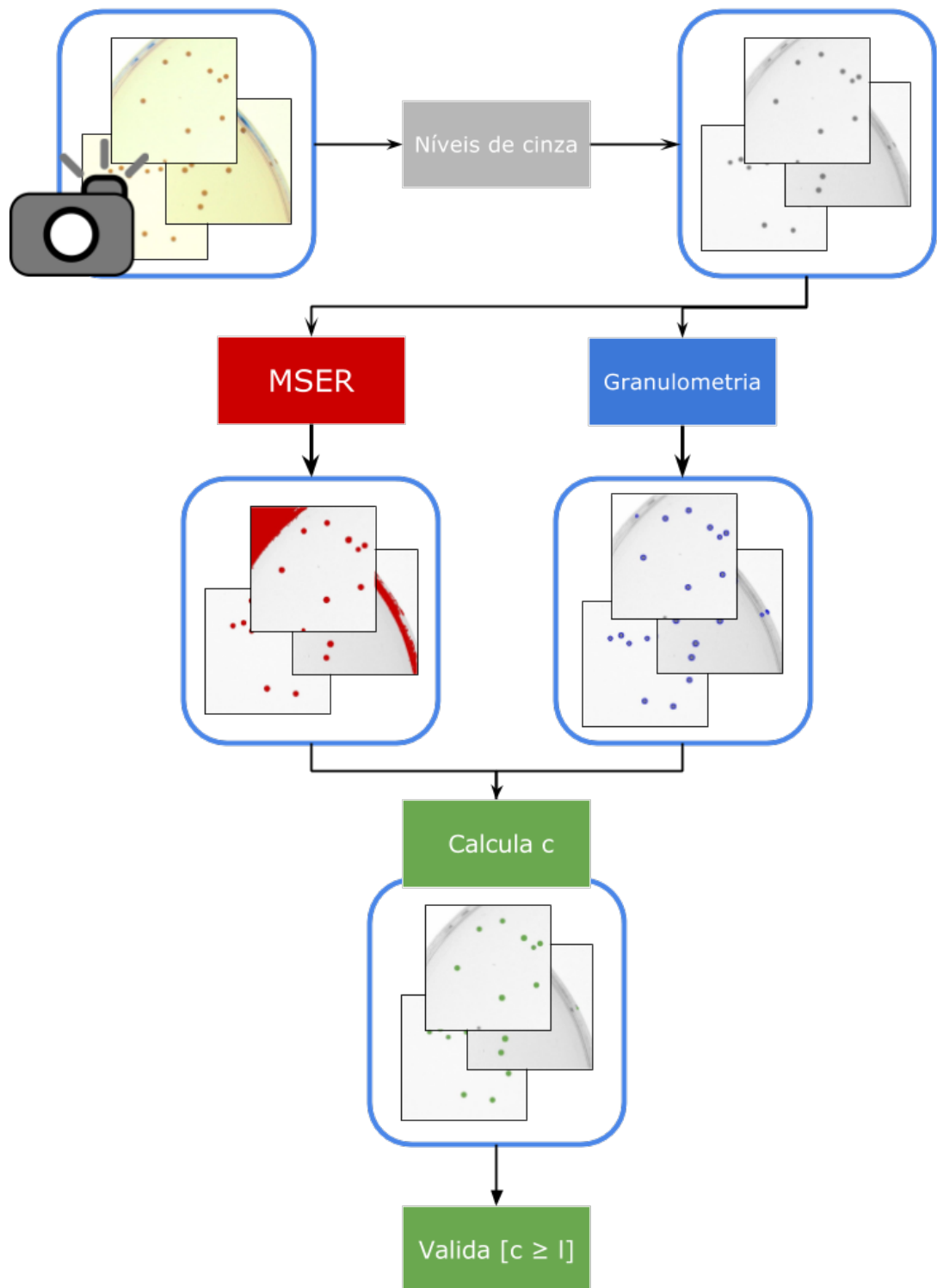


Figura 3.9: Visão geral de MSGranul.

Os parâmetros foram encontrados utilizando imagens em níveis de cinzas. Pois granulometria e MSER, as bases de MSGranul, funcionam com esse tipo de imagem.

<b>Abordagens</b>	<b>TEA média (%)</b>
Granul sem <i>k-means</i>	6,18
MSGranul sem <i>k-means</i>	2,47
OpenCFU (COR) sem pós-processamento	2,69
OpenCFU (CINZA) sem pós-processamento*	2,38
Granul com <i>k-means</i>	1,42
MSGranul com <i>k-means</i> *	0,89
OpenCFU (COR) com pós-processamento	2,37

Tabela 3.1: Taxas de erros dos métodos avaliados.

Para usar a informação disponível nas imagens coloridas utilizamos um processamento a posteriori usando *k-means* e como descrito anteriormente utilizamos *k-means* com  $k = 5$ , que em nossos testes foram suficientes, para melhorar a acurácia na detecção das colônias verdadeiras como podemos ver na Tabela 3.1, que sumariza as taxas de erros média na detecção das colônias para cada um dos algoritmos.

As quatro primeiras linhas da tabela apresentam os resultados para os algoritmos sem o uso do pós-processamento. Podemos notar que MSGranul comete menos erros (2,47%) do que o uso de apenas granulometria (6,18%). Esse resultado está intimamente relacionado ao fato de que granulometria tende a sobrestimar o número de colônias na placa, pois considera determinadas partes da imagem com alto contraste (marcação na placa, por exemplo) como aglomerado de colônias, a Figura 3.7, mostra um exemplo desse comportamento, as imagens à direita na Figura tem o total de 0 colônias. Enquanto MSGranul contará o resultado correto, 0, granulometria apontará a existência de 3 colônias.

Comparando esse resultado de MSGranul (2,47%) com OpenCFU, temos que os valores estão próximos (2,38%, OpenCFU).

Uma diferença entre OpenCFU e MSGranul é que o primeiro aceita como entrada

imagens coloridas. Contudo, executando o programa com esse tipo de entrada, percebemos que OpenCFU comete mais erros do que quando a mesma imagem era convertida em níveis de cinzas antes de ser inserida nele.

Porém é possível habilitar um recurso em OpenCFU que usando um algoritmo semelhante a *k-means* é possível aproveitar melhor a informação da cor. Entretanto, não conhecemos o exato funcionamento desse pós-processamento, pois o mesmo foi adicionado em um lançamento posterior a publicação do artigo que deu origem ao programa (GEISSMANN, 2013).

Mesmo desconhecendo o seu exato funcionamento, a existência de tal pós-processamento foi útil para que pudéssemos comparar com MSGranul e Granulometria também utilizando *k-means*.

O modo como utilizamos *k-means* está descrito em subseções anteriores e foi empregado da mesma forma tanto para granulometria baseada em correlação quanto para MSGranul. Com isso, granulometria obteve 1,42% de erro médio, bem abaixo dos 6,18%, sem o uso desse. MSGranul obteve 0,89% de erro, sendo o valor mais baixo obtido dentre todas as abordagens. Tais valores são inferiores à taxa de erro obtido com OpenCFU que obteve 2,37% também utilizando pós-processamento. Esse valor é apenas marginalmente melhor do que sem nenhum pós-processamento.

Podemos justificar a melhora observada, de granulometria e MSGranul usando pós-processamento, relacionando com o fato de que quando as imagens são convertidas para níveis de cinzas, algumas imperfeições, ou marcações, são extremamente difíceis de avaliar se são ou não colônias de bactérias. Na Figura 3.4(b) vemos essa ambiguidade onde o ponto azul que na imagem colorida é facilmente distinguível quando convertida para níveis de cinza, torna-se impossível distingui-lo de um colônia verdadeira. Com isso, esse ponto será erroneamente contado como colônia tanto por granulometria e por MSGranul. No entanto, após o uso de *k-means*, ele passa a ser claramente distinguível e desconsiderado na contagem final. Essa é a justificativa para a melhora observada na taxa de erro de MSGranul com (0,89%) e sem (2,47%) *k-means*. Bem como para granulometria; com (1,42%) e sem (6,18%) *k-means*.

Já OpenCFU não apresentou ganho com *k-means*. A Figura 3.10 mostra um caso em que o pós-processamento do OpenCFU descarta uma colônia que havia sido cor-



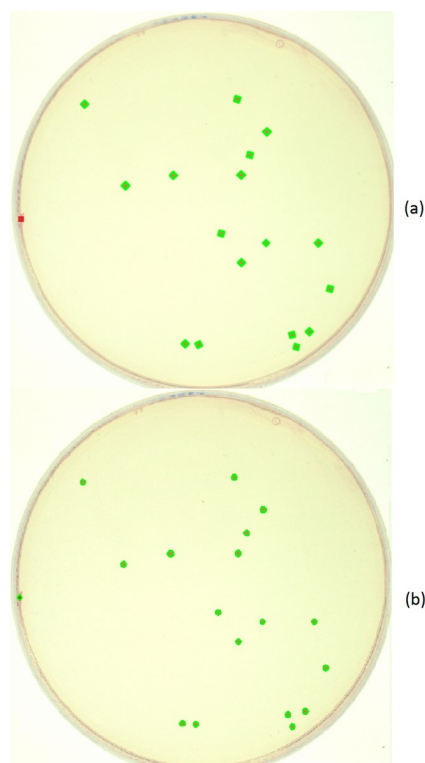


Figura 3.10: Resultado de OpenCFU (a) com k-médias, (b) sem k-médias.

retamente detectada. Esse é um indicativo do porquê a melhora com o uso de pós-processamento foi inexpressiva no OpenCFU.

O tempo de processamento do MSGranul, para o pior caso (uma placa com mais de 1000 colônias), foi de aproximadamente 8 segundos. E para a execução das 19 imagens, o tempo total foi de aproximadamente 79 segundos. O que o torna não adequado para tarefas que exijam processamento em tempo real.

Contudo MSGranul apresentou tempos muito menores em comparação a contagem manual, haja vista que os técnicos gastaram aproximadamente 2 horas na contagem manual das colônias presentes nas 19 placas.

Desse modo, os experimentos demonstram que MSGranul é adequado para a contagem de colônias de bactérias e se sai melhor do que uso isolado de granulometria baseada em correlação.

## Capítulo 4

# Granulometria Aplicada a Contagem de Microesferas de vidro

A sinalização horizontal em pavimentos rodoviários são dispositivos de controle de tráfego (DONNELL; RADO, 2011), e tem como função alertar os motoristas sobre as condições adequadas de utilização da via (DNIT, 2010). Atualmente, o material mais usado para a sinalização horizontal são as tintas a base de água (MIGLETZ; GRAHAM, 2002). A sua aplicação consiste em jatear a tinta sobre o pavimento e, com a tinta ainda fresca, aplicar microesferas de vidro, que têm como função refletirem as luzes provenientes dos faróis dos veículos.

A retrorrefletividade da sinalização horizontal permite que a mesma seja visível no período noturno. Além disso, sinalização horizontal com maiores valores de retrorrefletividade correlaciona-se positivamente com a percepção do condutor sobre a sinalização horizontal (LEE; DONNELL, 2007).

Salles et al. (SALLES et al., 2015) analisaram vários estudos sobre a interação do condutor com maiores valores de retrorrefletividade apresentados pela sinalização rodoviária. As evidências empíricas apontam que uma maior retrorrefletividade da sinalização auxilia na visibilidade dos motoristas, bem como na capacidade dos motoristas perceberem e interpretarem as distâncias durante a noite. Estradas demarcadas com elevados valores de retrorrefletividade apresentam dirigibilidade mais adequada, o que contribui para reduções de acidentes noturnos.

Além disso, valores maiores de retrorrefletividade estão diretamente relacionados à

quantidade de microesferas depositadas na pintura ainda fresca (ZHANG; HUMMER; RASDORF, 2009). Entretanto, existe uma quantidade máxima de microesferas possíveis de serem depositadas. Além dessa quantidade, as microesferas não irão aderir na tinta. Assim, há o interesse de desenvolver métodos que possam contar as microesferas para avaliar a quantidade correta que deve ser aplicada. E, mesmo depois de inicialmente depositada a quantidade adequada, o desgaste natural e a passagem de veículos removem microesferas, fazendo com que o valor de retrorefletividade caia e seja necessário repintar a demarcação.

Neste trabalho utilizamos a granulometria baseada em correlação para contabilizar as microesferas de vidro. Para que granulometria por correlação seja efetiva é preciso que os grãos a serem detectados sejam sempre mais escuros (ou mais claros) do que o fundo. Isto não ocorre nas imagens de microesferas devido à transparência, reflexos e sombras (Figura 4.3(a)). Para abordar esse problema, pré-processamos as imagens utilizando a rede neural convolucional do tipo U-Net. Nosso objetivo foi produzir um mapa de segmentação em que as microesferas sempre são mais claras do que o fundo. Acreditamos que esta técnica (pré-processar a imagem com U-Net antes de aplicar granulometria por correlação) possa ser aplicada em muitos outros problemas semelhantes. No total avaliamos 10 imagens contendo 1468 microesferas, com resultados promissores atingindo taxa média de acerto de 0.9334.

## **4.1 Trabalhos relacionados**

Zhang, Hummer e Rasdorf (2009) abordaram o impacto da densidade de microesferas de vidro na retrorefletividade da marcação do pavimento. Os autores coletaram dados de retrorefletividade e imagens de esferas de vidro em 40 segmentos de duas faixas. Além disso, foi proposto uma nova abordagem assistida por computador para realizar a contagem, isso permitiu analisarem 108 imagens e conduzir uma análise entre a retrorefletividade da marcação do pavimento e a densidade das microesferas de vidro. As descobertas do estudo mostram que os valores de densidade das microesferas têm uma correlação positiva com as leituras de retroreflectividade de marcação; maior densidade de esferas leva a maior retrorefletividade. Além disso, marcações de tinta

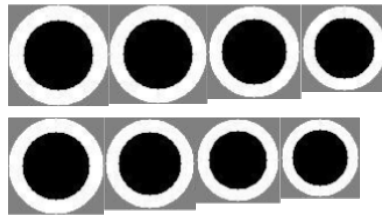


Figura 4.1: Modelos utilizados pela granulometria baseada em correlação para localizar as microesferas de vidro.

branca têm valores maiores de retrorrefletividade do que as amarelas quando os valores de densidade das microesferas são os mesmos.

Donnell e Rado (2011) exploraram a aplicação do processamento de imagens para estimar a retrorrefletividade da marcação do pavimento. Uma amostra de marcas de pavimento de tinta branca, à base de água, foi aplicada em um pavimento de asfalto e o processo de aplicação foi registrado usando uma câmera de vídeo de alta velocidade acoplada ao caminhão de pintura. Vários descritores cinemáticos de esferas de vidro foram coletados durante este processo, e verificou-se que o ângulo de impacto e os componentes horizontal e vertical da velocidade da microesfera foram associados à retrorrefletividade da marcação do pavimento. Além disso, amostras de placas de teste das marcas do pavimento foram preparadas durante o processo de aplicação. Estas amostras foram deixadas no tempo por um ano e submetidas a mais de um milhão de passes de tráfego acelerados. Verificou-se que a cobertura das microesferas estava associada à retrorrefletividade da marcação do pavimento e nas amostras de testes.

## 4.2 Materiais e Métodos

### 4.2.1 Granulometria baseada em correlação

Para localizar e contabilizar as microesferas optamos por utilizar granulometria baseada em correlação. A Figura 4.1 mostra as formas utilizadas para localizar as microesferas de vidro. Neste trabalho utilizamos apenas formas circulares de diversos tamanhos como *kernels*, pois as microesferas, via de regra, aparecem como círculos na imagem.

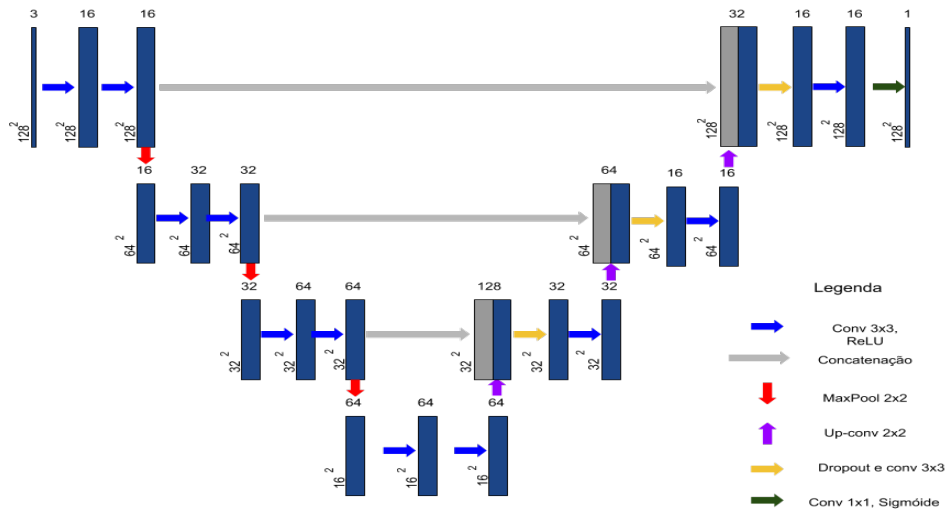


Figura 4.2: Arquitetura da rede U-Net utilizada no experimento.

## 4.2.2 Pré-processamento por U-Net

A imagem colorida das microesferas foi pré-processada utilizando uma rede convolucional U-Net para produzir uma imagem em níveis de cinza adequada para granulometria por correlação. Na Figura 4.3(d) vemos um exemplo de saída de U-Net para uma imagem contendo microesferas.

A Figura 4.2 ilustra a arquitetura da U-Net utilizada. No artigo original de U-Net a entrada  $572 \times 572$ , optamos por reduzir esse tamanho para  $128 \times 128$  para diminuir o número de parâmetros para serem treinados e o tempo gasto na fase de treino. Entretanto, como a imagem das microesferas tem tamanho de  $480 \times 480$  e a entrada de U-Net  $128 \times 128$ , é necessário "passar" pela imagem, amostrando janelas  $128 \times 128$ . Regiões das imagens de saída sobrepostas por mais de uma janela são normalizadas pelo média das predições.

Diferente de Ronneberger, Fischer e Brox (2015), adicionamos bordas pretas de 64 pixels na imagem de entrada quando da fase de avaliar as 10 imagens, desse modo o tamanho das imagens passou de  $480 \times 480$  para  $544 \times 544$ . Com isso, mesmo as microesferas que aparecem parcialmente na imagem aparecem no mapa de segmentação.

Uma visão geral do sistema é mostrada na Figura 4.4.

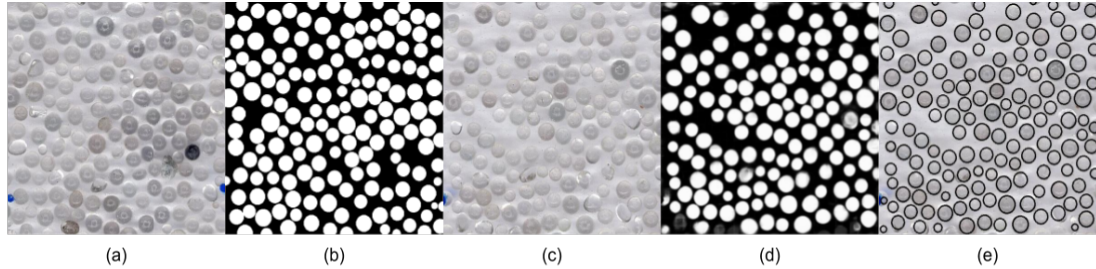


Figura 4.3: (a) Imagem recortada de entrada para o treino de U-Net. (b) Imagem fornecida como alvo para o treino. (c) Exemplo de imagem para avaliar o sistema. (d) Mapa de segmentação produzida por U-Net. (e) Resultado final ao aplicar granulometria por correlação no mapa de segmentação.

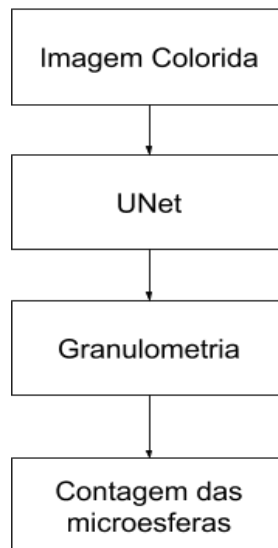


Figura 4.4: Visão geral da arquitetura do sistema

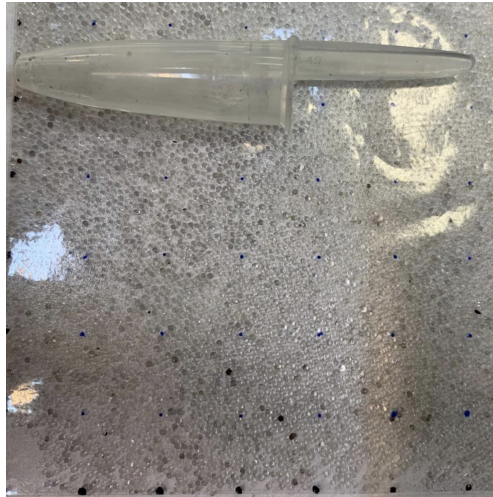


Figura 4.5: Comparação entre as microesferas e a tampa de uma caneta.

### 4.2.3 Aquisição e preparação das imagens

O material usado para a aquisição de imagens foram microesferas de vidros para sinalização horizontal viária. Elas atendem aos requisitos prescritos na norma brasileira ABNT NBR 16184:2013 para o tipo IIC.

A amostra foi preparada despejando 10g de microesferas em um pedaço de plástico adesivo transparente de 10cm  $\times$  10cm. No lado liso foram feitas marcações de 1cm  $\times$  1cm, que na Figura 4.5 aparecem como pontos azuis. As marcações foram inseridas como referências para as dimensões das partículas na imagem.

Após a preparação da amostra, realizou-se a aquisição de imagens com um *scanner* de mesa Epson V19, na resolução de 1200 dpi. A amostra foi posicionada com o lado liso para baixo, em contato direto com o vidro do *scanner*. Na parte de cima da amostra, colocou-se uma folha branca de papel sulfite A4 para tornar o fundo da imagem branco. A tampa do *scanner* ficou fechada durante a aquisição da imagem.

Nessa configuração, 1cm  $\times$  1cm equivale aproximadamente a uma imagem com 480  $\times$  480 píxeis. Um operador selecionou 15 imagens desse tamanho e, usando um programa desenvolvido pelos autores, pintou manualmente um círculo branco em cada microesfera (de forma que o círculo cubra toda a esfera). Denominamos de máscara esta imagem de círculos brancos sobre fundo preto. Como subproduto deste processamento para criar máscaras, obteve-se a posição e o raio de cada microesfera, juntamente com o número total de esferas em cada imagem recortada. Microesferas cujos

centros estavam fora da imagem recortada foram desconsideradas na contagem. Além disso, desconsideraram-se também os centros que estavam até a distância de 10 píxeis da borda, menor diâmetro identificado pelo operador.

#### 4.2.4 Treinamento e avaliação dos resultados

Das 15 imagens recortadas, 5 foram utilizadas como conjunto de treinamento da rede U-Net. Na fase de treinamento, a U-Net recebia imagens recortadas coloridas como amostras de entrada e as respectivas máscaras como amostras de saída. O treinamento durou 2 horas utilizando uma placa Nvidia K80 no Google Cloud Platform.

Para avaliar o sistema, foram utilizados os 10 recortes restantes. Nesta fase, cada imagem recortada foi inserida na rede para obter saída semelhante à máscara (Figura 4.3(d)). Nesta imagem, aplicou-se granulometria por correlação para encontrar a localização e o raio de cada uma das microesferas. Nas 10 imagens recortadas, a quantidade de microesferas variou entre 117 e 177 por imagem.

Consideramos que um grão  $g$  foi corretamente localizado quando as duas condições abaixo são satisfeitas:

- (a) Se a distância entre o centro verdadeiro do grão  $g$  e o centro do grão localizado pela granulometria diferem menos de 25% do raio verdadeiro do grão  $g$ .
- (b) Se o raio verdadeiro do grão  $g$  e o raio obtido pela granulometria diferem menos de 25% do raio verdadeiro.

O valor 25% escolhido é arbitrário – outros valores podem ser usados. A partir desta definição, calculou-se a quantidade de verdadeiros positivos (quando um grão  $g$  foi corretamente localizado pela granulometria), os falsos negativos (quando um grão  $g$  não foi localizado pela granulometria) e os falsos positivos (quando a granulometria localizou um grão inexistente). Note que neste problema, não existem verdadeiros negativos. Daí calcula-se a taxa de acerto  $T$  como:

$$T = \frac{VP}{VP + FP + FN} \quad (4.1)$$



Os parâmetros de correlação mínima e intersecção máxima de granulometria foram selecionados para maximizar a taxa de acerto média

Tabela 4.1: Resultados obtidos para cada uma das 10 imagens utilizadas para avaliar o sistema. O valor real é a quantidade de microesferas contabilizadas pelo operador.

Imagem	real	VP	FP	FN	$T$
1	157	155	1	2	0.9810
2	177	173	7	4	0.9402
3	150	139	11	11	0.8633
4	176	166	7	10	0.9071
5	145	142	2	3	0.9659
6	138	135	4	3	0.9507
7	138	132	12	6	0.88
8	117	115	2	2	0.9663
9	142	138	7	4	0.9261
10	128	124	2	4	0.9538
$T_{media}$					0.9334

### 4.3 Discussões e resultados preliminares

A Figura 4.3 mostra imagens em diferentes passos do sistema. (a) é uma das imagens recortadas de  $480 \times 480$  que foi utilizada como amostra de entrada de treino de U-Net. (b) é a máscara produzida manualmente pelo operador e que foi utilizada como imagem alvo na fase de treino. Depois de U-Net estar treinada, utilizaram-se imagens como (c) para avaliar o sistema. (d) mostra a predição feita por U-Net para a imagem (c). E, por fim, procurou-se pela microesferas utilizando granulometria por correlação na imagem (d), obtendo a imagem (e).

No total um conjunto com 10 recortes da imagem original foram avaliados, com 1468 microesferas, dos quais 1419 foram corretamente localizadas pelo sistema.

A Tabela 4.1 sumariza os resultados que foram obtidos pelo sistema. Nela é possível verificar a quantidade contabilizada pelo operador (*real*), a quantidade acertos que o sistema alcançou (*VP*), quantos erros que foram cometidos (*FP*, *FN*), bem como a taxa  $T$ . No pior caso, o sistema obteve 0,8633 de acerto, e no melhor caso, 0,9810. A média de acertos para os 10 recortes foi de 0,9334.

### 4.3.1 Código fonte e imagens

No repositório <sup>1</sup> é possível encontrar a imagem original, o código que gerou as imagens de treino, o código que treina a rede neural e o código que prediz o resultado final. Além disso, nesse mesmo repositório encontram-se recortes de  $480 \times 480$  pixel (aproximadamente  $1\text{cm}^2$ ) com suas correspondentes máscaras e distribuição de esferas.

As implementações de granulometria baseada na correlação e da rede U-Net foram feitas com o auxílio da biblioteca de processamento de imagem OpenCV (2.4.9) e da biblioteca de aprendizado profundo Keras (2.0.9).

---

<sup>1</sup><<https://github.com/joeljunior05/microspheres-sbrt>>

# Capítulo 5

## Conclusão

Nesse trabalho apresentamos duas aplicações para granulometria baseada em correlação: contagem de colônias de bactérias e de microesferas de vidro.

Durante o experimento com as colônias de bactérias propusemos MSGranul, uma abordagem que utiliza o algoritmo MSER para validar a saída de granulometria baseada em correlação. Ao aplicarmos MSGranul na contagem de colônia de bactérias, obtivemos taxa de erro média comparável ao programa de referência OpenCFU. Além disso, quando adicionamos pós-processamento baseado em *k-means* para agrupar as colônias de acordo com a sua cor, a taxa de erro média foi inferior a OpenCFU.

Quando comparamos esses resultados aos obtidos utilizando apenas granulometria baseada em correlação a diferença é ainda mais expressiva; 6,18% para granulometria contra 2,47% para MSGranul. Isso decorre do fato que granulometria localiza partes da imagem como colônias verdadeiras que na verdade são marcações ou avarias na placa Petri. Com isso, granulometria atribui uma contagem maior de colônias para a imagem do que de fato existe.

Embora MSGranul tenha se saído melhor do que granulometria, ele manteve a principal vantagem do algoritmo que é a capacidade de identificar vários formatos diferentes desde que fornecidos os devidos *kernels*. Tal vantagem contrasta com OpenCFU que só consegue identificar objetos circulares. Acreditamos que MSGranul soluciona uma limitação de granulometria baseada em correlação que identifica como válidas partes da imagem só por estas apresentarem alto contraste.

Durante o experimento com as microesferas de vidro, propusemos o uso da U-

Net para pré-processar as imagens, esse pré-processamento produziu uma imagem em que os píxeis mais claros representavam a probabilidade maior de ser pertencente a uma microesfera. Aplicamos granulometria baseada em correlação nessa imagem de saída. Essa abordagem permitiu localizar individualmente as microesferas, atingindo taxa de média de acerto de 0,9334. A dificuldade de localizar as microesferas está na sua característica física de transparência, que gera reflexo e sombras dificultando distingui-las do fundo.

A combinação de granulometria por correlação e pré-processamento por aprendizado profundo ao ser capaz de localizar objetos que devido a suas características óticas são difíceis de serem identificados, expande as possibilidades de aplicações da técnica.

Como trabalho futuro, acreditamos ser possível utilizar as abordagens desse trabalho para contabilizar objetos densamente presentes em imagens. Além disso, é possível explorar como utilizar MSGranul e aprendizado profundo para limitar ainda mais as formas dos objetos que estão na imagem.

## Referências Bibliográficas

ARAÚJO, S. A. d.; PESSOTA, J. H.; KIM, H. Y. Beans quality inspection using correlation-based granulometry. *Eng. Appl. Artif. Intell.*, Pergamon Press, Inc., Tarrytown, NY, USA, v. 40, n. C, p. 84–94, abr. 2015. ISSN 0952-1976. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.engappai.2015.01.004>>.

ARTHUR, D.; VASSILVITSKII, S. k-means++: The advantages of careful seeding. In: SOCIETY FOR INDUSTRIAL AND APPLIED MATHEMATICS. *Proceedings of the eighteenth annual ACM-SIAM symposium on Discrete algorithms*. [S.l.], 2007. p. 1027–1035.

AZEMA, N. et al. Wastewater suspended solids study by optical methods. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Elsevier, v. 204, n. 1, p. 131–140, 2002.

BEAN, C. P.; JACOBS, I. S. Magnetic granulometry and superparamagnetism. *Journal of Applied Physics*, v. 27, n. 12, p. 1448–1452, 1956. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1063/1.1722287>>.

BREED, R. S.; DOTERRER, W. The number of colonies allowable on satisfactory agar plates. *Journal of Bacteriology*, American Society for Microbiology (ASM), v. 1, n. 3, p. 321, 1916.

CAI, Z. et al. Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using imagej software and customized macros: comparison with manual counting. *International journal of radiation biology*, Taylor & Francis, v. 87, n. 11, p. 1135–1146, 2011.

CHIANG, P.-J. et al. Automated counting of bacterial colonies by image analysis. *Journal of microbiological methods*, Elsevier, v. 108, p. 74–82, 2015.

CLARKE, M. L. et al. Low-cost, high-throughput, automated counting of bacterial colonies. *Cytometry Part A*, Wiley Online Library, v. 77, n. 8, p. 790–797, 2010.

COSTA, C. M.; YANG, S. Counting pollen grains using readily available, free image processing and analysis software. *Annals of Botany*, v. 104, n. 5, p. 1005, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcp186>>.

CREMERS, D. Optimal solutions for semantic image decomposition. *Image and Vision Computing*, Elsevier, v. 30, n. 8, p. 476–477, 2012.

DNIT, D. N. de Infraestrutura e T. *Manual de Sinalização Viária*. [S.l.]: Instituto de Pesquisas Rodoviárias, 2010. 743 p.

- DONNELL, E. T.; RADO, Z. *Use of digital imaging methods to assess pavement marking retroreflectivity*. [S.l.], 2011.
- DOUGHERTY, E.; LOTUFO, R. *Hands-on Morphological Image Processing*. SPIE Optical Engineering Press, 2003. (Spie Press Series). ISBN 9780819447203. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=-ch3fZTh08EC>>.
- DOUGHERTY, E. R.; NEWELL, J. T.; PELZ, J. B. Morphological texture-based maximum-likelihood pixel classification based on local granulometric moments. *Pattern Recognition*, Elsevier, v. 25, n. 10, p. 1181–1198, 1992.
- FERRARI, A.; LOMBARDI, S.; SIGNORONI, A. Bacterial colony counting by convolutional neural networks. In: IEEE. *2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*. [S.l.], 2015. p. 7458–7461.
- GEISSMANN, Q. Opencfu, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects. *PloS one*, Public Library of Science, v. 8, n. 2, p. e54072, 2013.
- GOLDMAN, E.; GREEN, L. *Practical Handbook of Microbiology, Second Edition*. CRC Press, 2008. ISBN 9781420009330. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=qVyPr57Q2IUC>>.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. *Digital Image Processing (3rd Edition)*. Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice-Hall, Inc., 2006. ISBN 013168728X.
- GOODFELLOW, I.; BENGIO, Y.; COURVILLE, A. *Deep Learning*. [S.l.]: MIT Press, 2016. <<http://www.deeplearningbook.org>>.
- KACHOUIE, N. N.; KANG, L.; KHADEMHOSEINI, A. Arraycount, an algorithm for automatic cell counting in microwell arrays. *Biotechniques*, NIH Public Access, v. 47, n. 3, p. x, 2009.
- KIM, H. Y. et al. Correlation-based multi-shape granulometry with application in porous silicon nanomaterial characterization. *Journal of Porous Materials*, Springer, v. 20, n. 2, p. 375–385, 2013.
- KRIZHEVSKY, A.; SUTSKEVER, I.; HINTON, G. E. Imagenet classification with deep convolutional neural networks. In: *Advances in neural information processing systems*. [S.l.: s.n.], 2012. p. 1097–1105.
- LECUN, Y. et al. Backpropagation applied to handwritten zip code recognition. *Neural Computation*, v. 1, p. 541–551, 1989.
- LEE, D.; DONNELL, E. Analysis of pavement marking effects in nighttime driver behavior using fuzzy inference system. *Journal of Computing in Civil Engineering*, v. 21, n. 3, p. 200–210, 2007.

- LJUNGQVIST, M. G. et al. Image analysis of pellet size for a control system in industrial feed production. *PloS one*, Public Library of Science, v. 6, n. 10, p. e26492, 2011.
- LONG, J.; SHELHAMER, E.; DARRELL, T. Fully convolutional networks for semantic segmentation. In: *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*. [S.l.: s.n.], 2015. p. 3431–3440.
- MAERZ, N. H.; PALANGIO, T. C.; FRANKLIN, J. A. Wipfrag image based granulometry system. In: AA BALKEMA. *Proceedings of the FRAGBLAST 5 Workshop on Measurement of Blast Fragmentation, Montreal, Quebec, Canada*. [S.l.], 1996. p. 91–99.
- MANSBERG, H. et al. Automatic particle and bacterial colony counter. *Science (Washington)*, American Association for the Advancement of Science, v. 126, p. 823–7, 1957.
- MARAGOS, P. Pattern spectrum and multiscale shape representation. *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*, IEEE, v. 11, n. 7, p. 701–716, 1989.
- MATAS, J. et al. Robust wide-baseline stereo from maximally stable extremal regions. *Image and vision computing*, Elsevier, v. 22, n. 10, p. 761–767, 2004.
- MATHERON, G. *Random sets and integral geometry*. Wiley, 1975. (Wiley series in probability and mathematical statistics: Probability and mathematical statistics). ISBN 9780471576211. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=bgzvAAAAMAAJ>>.
- MATHERON, G.; SERRA, J. The birth of mathematical morphology. In: SYDNEY, AUSTRALIA. *Proc. 6th Intl. Symp. Mathematical Morphology*. [S.l.], 2002. p. 1–16.
- MELLO, C. A. B. et al. Image segmentation of ovitraps for automatic counting of aedes aegypti eggs. In: *2008 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. [S.l.: s.n.], 2008. p. 3103–3106. ISSN 1094-687X.
- MIGLETZ, J.; GRAHAM, J. L. *Long-term pavement marking practices: A synthesis of highway practice*. [S.l.]: Transportation Research Board, 2002. v. 306. 94 p.
- MUKHERJEE, D. P. et al. Bacterial colony counting using distance transform. *International journal of bio-medical computing*, Elsevier, v. 38, n. 2, p. 131–140, 1995.
- NISTÉR, D.; STEWÉNIUS, H. Linear time maximally stable extremal regions. In: SPRINGER. *European Conference on Computer Vision*. [S.l.], 2008. p. 183–196.
- OPENCPU. *OpenCFU – Count your Colonies*. 2016. <<http://www.opencpu.sourceforge.net/>>.

- PARAGIOS, N. Interviewed guest. *Computer Vision News*, RSIP Vision, v. 10, n. 8, p. 4–8, 2016.
- PARKER, J. R. *Algorithms for Image Processing and Computer Vision*. 1st. ed. New York, NY, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1996. ISBN 0471140562.
- PUTMAN, M.; BURTON, R.; NAHM, M. H. Simplified method to automatically count bacterial colony forming unit. *Journal of Immunological Methods*, Elsevier, v. 302, n. 1, p. 99–102, 2005.
- RONNEBERGER, O.; FISCHER, P.; BROX, T. U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation. In: SPRINGER. *International Conference on Medical image computing and computer-assisted intervention*. [S.l.], 2015. p. 234–241.
- SALLES, L. S. de et al. Avaliação retrorrefletiva de pintura de demarcação horizontal: peculiaridades e considerações sobre a norma e os requisitos mínimos nacionais. *TRANSPORTES*, v. 23, n. 3, p. 5–17, 2015.
- SERRA, J. *Image Analysis and Mathematical Morphology*. Orlando, FL, USA: Academic Press, Inc., 1983. ISBN 0126372403.
- SILBURT, A. et al. Lunar crater identification via deep learning. *Icarus*, Elsevier, v. 317, p. 27–38, 2019.
- SILVA, J. et al. Quantificação de microesferas de vidro para sinalização horizontal pela granulometria por correlação com Pré-Processamento por rede convolucional. In: *XXXVII Simpósio Brasileiro de Telecomunicações e Processamento de Sinais (SBrT 2019)* (SBrT 2019). Petrópolis, Brazil: [s.n.], 2019.
- SILVA, J. M. J.; BALIAN, S. C.; KIM, H. Y. Msgranul: Granulometria baseada em correlação e mser aplicado à contagem de colônias de bactérias. In: *XXI Congresso Brasileiro de Automática (CBA 2016)*. [s.n.], 2016. p. 2151–2156. Disponível em: <<https://ssl4799.websiteseuro.com/swge5/PROCEEDINGS/PDF/CBA2016-0607.pdf>>.
- SZELISKI, R. *Computer vision algorithms and applications*. London; New York: Springer, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/978-1-84882-935-0>>.
- VINCENT, L. Fast grayscale granulometry algorithms. In: *Mathematical morphology and its applications to image processing*. [S.l.]: Springer, 1994. p. 265–272.
- VINCENT, L.; LIZARDTECH, I. Fast granulometric methods for the extraction of global image information. In: *Proc. 11th Annual Symposium of the South African Pattern Recognition Association*. [S.l.: s.n.], 2000. p. 119–133.
- YOON, S.-C.; LAWRENCE, K. C.; PARK, B. Automatic counting and classification of bacterial colonies using hyperspectral imaging. *Food and Bioprocess Technology*, Springer, v. 8, n. 10, p. 2047–2065, 2015.



ZHANG, G.; HUMMER, J. E.; RASDORF, W. Impact of bead density on paint pavement marking retroreflectivity. *Journal of Transportation Engineering*, American Society of Civil Engineers, v. 136, n. 8, p. 773–781, 2009.