

MSGRANUL: GRANULOMETRIA BASEADA EM CORRELAÇÃO E MSER APLICADA À CONTAGEM DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS

JOEL M. S. JUNIOR*, SIMONE C. BALIAN†, HAE YONG KIM*

**Escola Politécnica, Universidade de São Paulo
Av. Prof. Luciano Gualberto, tr. 3, 158, 05508-010
São Paulo, SP, Brasil.*

†*Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, 05508-000
São Paulo, SP, Brasil.*

Emails: joel.ms.junior@usp.br, balian@usp.br, hae@lps.usp.br

Abstract— Counting colonies of bacteria has wide application in the field of biological sciences. This practice can provide important information for different purposes, however, it is a repetitive and laborious task that requires skilled worker. Several researchers have tried to automatize this task. In this paper, a new approach is proposed to count colonies, called MSGranul. We will present its theory and foundation, evaluate its performance on a set of 19 images containing bacteria *Staphylococcus aureus* and compare its performance with OpenCFU, an open source software developed for this task.

Keywords— Bacterial colonies, granulometry, MSER, computer vision, pattern recognition, automatic counting.

Resumo— Contar colônias de bactérias tem vasta aplicação no campo das ciências biológicas. Esta prática pode fornecer importantes informações com diferentes finalidades, contudo, trata-se de uma tarefa repetitiva e trabalhosa que requer mão de obra especializada. Vários pesquisadores têm procurado automatizar essa tarefa. Neste artigo, será proposta uma nova abordagem para contar colônias, chamada de MSGranul. Apresentaremos sua teoria e fundamento, avaliaremos seu desempenho em 19 imagens contendo bactérias *Staphylococcus aureus* e compararemos o seu desempenho com o OpenCFU, um software de código aberto desenvolvido para essa tarefa.

Palavras-chave— Colônia de bactérias, granulometria, MSER, visão computacional, reconhecimento de padrões, contagem automática.

1 Introdução

Contar colônias de bactérias tem vasta aplicação no campo das ciências biológicas. Essa prática é capaz de fornecer importantes informações com diferentes finalidades. Por exemplo, através dessas contagens é possível estimar a contaminação microbiológica de um alimento e, conseqüentemente, determinar se está de acordo com os padrões de higiene impostos pela legislação. No entanto, essa tarefa exige pessoal técnico especializado e é uma atividade trabalhosa e exaustiva, comumente realizada manualmente, razão pela qual tem havido vários esforços para automatizar essa função. Geissmann (Geissmann, 2013) propôs um sistema chamado OpenCFU, que utiliza um algoritmo do tipo *watershed* similar a Mukherjee et al. (Mukherjee et al., 1995). Neste sistema, uma série de premissas empíricas relacionadas às áreas das colônias foram assumidas para separar as colônias de bactérias. Cai et al. (Cai et al., 2011) apresentaram o sistema ImageJ para contar colônias, utilizando *watershed* e filtragem de partículas.

Clarke et al. (Clarke et al., 2010) propuseram o *NIST's Integrated Colony Enumerator* (NICE) no qual uma combinação de limiares e transformada de mínimas estendidas são usados para criar um sistema de baixo custo para contar colônias.

Mais recentemente, Ferrari et al. (Ferrari

et al., 2015) utilizaram uma rede neural convolucional para tentar resolver o problema. Foi utilizado uma placa GPU de elevado custo, e o modelo foi treinado durante 5 horas usando um conjunto artificialmente criado com 17 mil imagens de colônias de bactérias. Contudo, chama atenção a baixa taxa de acerto quando as colônias estão agrupadas.

Yoon, Lawrence e Park (Yoon et al., 2015) desenvolveram um sistema que utiliza imagens multispectrais, sendo necessário um equipamento especial para adquirir imagens. Chiang et al. (Chiang et al., 2015) propôs um sistema que utiliza um filtro PCA para converter as imagens coloridas em níveis de cinzas e depois aplica diversos filtros para atenuar imperfeições e contar as colônias. Grande parte dos esforços reportados na literatura dedicam-se a solucionar como realizar a separação das colônias que se apresentam agrupadas.

Em 2013, Kim et al. propuseram uma nova técnica para localizar e contar poros de silício. Chamada pelos autores de granulometria baseada em correlação, essa técnica utiliza diversos modelos artificialmente gerados e calcula as correlações entre os modelos e a imagem. Essa técnica apresentou boas taxas de acerto na detecção dos poros de silício. Em 2015, foi reportado um outro uso para a técnica, relacionado à localiza-

ção e inspeção de qualidade de feijões (De Araújo et al., 2015), conseguindo individualizar feijões grudados uns nos outros.

Partindo desses bons resultados experimentais, optamos por aplicar granulometria baseada na correlação na localização de colônias de bactérias. Inicialmente, alcançamos uma taxa de erro de 6,23%. Ao analisar onde o método errava, percebemos que era possível atingir uma taxa de erro menor. De fato, quando comparado ao OpenCFU (taxa de erro 2,38%), já havia a percepção de que seria possível melhorar. Os erros que a granulometria cometia com maior frequência estavam relacionados com imperfeições ou avarias na placa Petri, sendo que essas imperfeições eram interpretadas como colônias grudadas. Portanto, a contagem superestimava o número verdadeiro de colônias. Para resolver esse problema, elaboramos uma nova técnica que une granulometria baseada em correlação e MSER - *Maximally Stable Extremal Regions* (Matas et al., 2004).

Passamos a chamar a nova técnica de MS-Granul e em nossos testes foi possível alcançar a taxa de erro de 2,32%, melhorando sensivelmente a taxa do uso isolado da granulometria baseada em correlação. Não é possível utilizar somente MSER neste caso, pois MSER aninha diversas regiões, dificultando localizar quais regiões são válidas.

Por se tratar de um método que funciona em níveis de cinzas, adicionamos ao MSGranul um pós-processamento baseado em *k-means*, agrupando colônias de cores semelhantes. Apesar de não constituir o MSGranul propriamente dito, esse passo adicional diminuiu significativamente a taxa de erro. O OpenCFU possui também um pós-processamento (possivelmente baseado em *k-means*). Assim, foi possível fazer uma comparação entre MSGranul e OpenCFU, com e sem pós-processamento.

Uma das vantagens de MSGranul é sua capacidade de localizar diversos formatos de objetos, tais como elipses, retângulos e triângulos. OpenCFU, por exemplo, é capaz de localizar apenas objetos circulares. Além disso, OpenCFU está baseado em premissas empíricas, usando mais de 16 equações para decidir se um objeto detectado deve ser considerado ou não uma colônia de bactérias.

Uma relevante vantagem do MSGranul é não depender de equipamentos caros ou de difícil acesso, podendo utilizar imagens obtidas de dispositivos facilmente encontráveis, tais como câmeras digitais e celulares. Além de não ser necessário conjunto grande de imagens de treinamento, também não requer nenhum equipamento de computação mais poderoso.

Organizamos este artigo em 6 seções, considerando esta, a introdução. Na seção 2, faremos uma explicação dos algoritmos que são utilizados por MSGranul. Na seção 3, será apresentado o

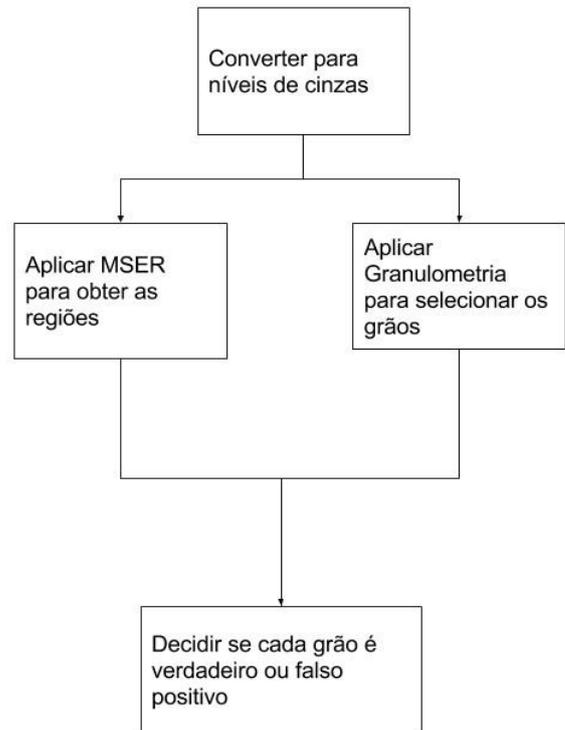


Figura 1: Visão geral do sistema.

algoritmo MSGranul em duas partes, uma explicação intuitiva seguida de formalização matemática. Na seção 4, reportaremos os resultados preliminares atingidos, discutiremos as questões encontradas durante a execução dos experimentos e faremos uma comparação com OpenCFU. E por fim, abordaremos as conclusões e perspectivas de futuros trabalhos.

2 Algoritmos

Nesta seção, abordaremos rapidamente os algoritmos de granulometria baseada em correlação e MSER, que são as bases de MSGranul. Também há uma rápida explicação sobre *k-means*, utilizado no pós-processamento. É possível ter uma visão geral do sistema na Figura 1.

2.1 Granulometria baseada em correlação

Granulometria é o processo de medir a distribuição de objetos ou grãos de diferentes tamanhos de um material granular. Usualmente, a granulometria é baseada em morfologia matemática (Dougherty et al., 1992) ou na detecção de bordas (Maerz et al., 1996). No primeiro caso, não é possível localizar individualmente cada objeto. No segundo caso, o algoritmo falhará quando as bordas dos objetos não estão claramente definidas, como nas colônias de bactérias aglomeradas.

Desse modo, foi proposta uma abordagem di-



Figura 2: Modelos utilizados pela granulometria baseada em correlação para localizar objetos em forma de elipse.

ferente para a granulometria. Kim et al. (Kim et al., 2013) propuseram calcular a correlação com vários modelos, gerados artificialmente, que representam formas, excentricidades, orientações e tamanhos dos objetos. A Figura 2 mostra os modelos usados para detectar objetos elípticos, como feijões. Essa operação pode ser sensivelmente acelerada utilizando a transformada rápida de Fourier. Os picos de correlação representam a localização provável dos objetos. Infelizmente, essa abordagem resulta em muitos falsos positivos (detecta objeto onde não há).

Para filtrar esses falsos positivos, foram definidos dois parâmetros. O primeiro parâmetro $\tau : 0 \leq \tau \leq 1$ é o parâmetro de limiar da correlação. Os picos de correlações com valor menor que τ serão desconsiderados. O segundo parâmetro $\gamma : 0 \leq \gamma \leq 1$ controla a área de intersecção aceita entre dois objetos. O algoritmo ordena os picos de correlação em ordem decrescente de correlação e primeiro descarta os picos com correlação menor que τ . Depois, descarta um objeto O_j se o conjunto de objetos com correlação maior que o do O_j esconder mais de γ da área do objeto O_j :

$$area[O_j \cap W(O_j)] > \gamma * area[O_j] \quad (1)$$

onde $W(O_j)$ é a união de todos os objetos com correlação maior que o de O_j .

2.2 Maximally Stable Extremal Region (MSER)

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

Seja uma imagem $I : D \subset \mathbb{Z} \rightarrow S$, sendo $S = \{0, 1, \dots, 255\}$, uma região R é um subconjunto contíguo de D , o conjunto OR é a região de fronteira da região R , isto é, os pixels que são adjacentes a um pixel de R mas que não pertencem a R . Uma região R é extrema máxima se e somente se para todo $p \in R, q \in OR : I(p) > I(q)$, 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

$$q(k) = \frac{|R_{k+\Delta} \setminus R_{k-\Delta}|}{|R_k|} \quad (2)$$

tiver um mínimo local em k . O valor de Δ 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.

Neste trabalho, utilizamos a implementação de MSER da biblioteca OpenCV, que utiliza a variante de MSER proposto por Nistér e Stewénus (Nistér and Stewénus, 2008).

2.3 K-means

Um dos algoritmos mais utilizados para agrupamento de dados é o *k-means*. Esse algoritmo agrupa os dados em k grupos, com k definido pelo usuário. Utilizamos esse algoritmo no pós-processamento, para agrupar as colônias detectadas pela cor. Para maiores informações recomendamos a leitura de Arthur e Vassilvitskii (Arthur and Vassilvitskii, 2007), base da implementação do *k-means* da biblioteca OpenCV.

3 MSGranul

Apresentaremos MSGranul em duas etapas. Primeiro faremos uma apresentação intuitiva e depois formalizaremos matematicamente.

3.1 Visão intuitiva

Granulometria baseada em correlação utiliza correlação não normalizada para detectar objetos e, portanto, pode gerar falsos positivos em locais de alto contraste. Esse problema foi percebido ao executar a granulometria para contar colônias de bactérias em placa Petri. Para solucionar esse problema, propomos utilizar MSER para validar a saída de granulometria.

A Figura 3 ilustra o funcionamento do algoritmo. Primeiro, uma imagem colorida (a) é transformada em níveis de cinza. Executamos MSER na imagem em níveis de cinza obtendo as regiões maximamente estáveis (b). Executamos o algoritmo de granulometria baseada em correlação, obtendo a saída (c). À esquerda da Figura 3c temos os verdadeiros positivos e à direita temos os falsos positivos. Como distinguir os verdadeiros positivos dos falsos? Os verdadeiros positivos coincidem com a saída de MSER, enquanto que os falsos positivos não coincidem. A ideia de MSGranul é verificar se os objetos encontrados pela granulometria coincidem com as regiões detectadas pelo MSER. Para isso, calculamos a área de intersecção dos dois métodos dividida pela área de união, denominando este valor de coeficiente c . Quando esse coeficiente for próximo de um, consideramos as detecções da granulometria como verdadeiros positivos. Se esse coeficiente for baixo, provavelmente temos um falso positivo.

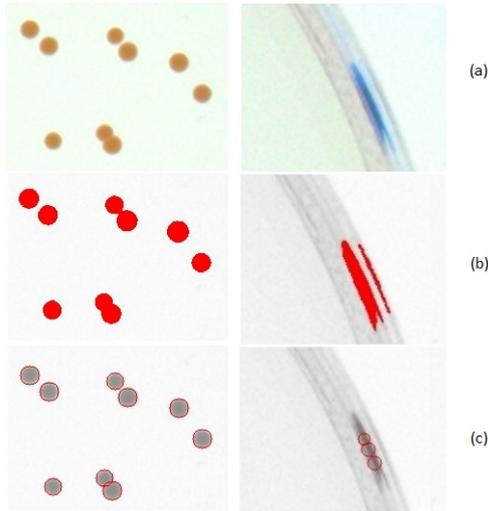


Figura 3: (a) Imagem original. (b) Em vermelho, as regiões encontradas pelo MSER. (c) Saída de granulometria baseada em correlação.

Figura 3c esquerda mostra 9 colônias de bactérias detectadas pela granulometria. Como são verdadeiros positivos, essas detecções coincidem com as regiões do MSER na Figura 3b esquerda. Figura 3c direita mostra três objetos detectados pela granulometria que claramente não são colônia de bactérias. Nesse caso, a saída do MSER não coincide com os objetos da granulometria. Em outras palavras, o coeficiente c nesse caso é baixo e MSGranul descarta os objetos. Cabe ao usuário definir um limiar adequado para o coeficiente c .

MSER pode encontrar várias regiões aninhadas uma dentro da outra. Assim, ao implementar o algoritmo, deve-se tomar cuidado para que uma colônia de bactérias não seja contada duas ou mais vezes. Na Figura 3c esquerda deve-se contabilizar 9 colônias, mesmo que essas colônias apareçam mais de uma vez dentro das regiões de MSER aninhadas.

A possibilidade de localizar objetos com diferentes formas fica mantida em MSGranul, pois tanto MSER quanto granulometria baseada em correlação podem encontrar objetos com diferentes formas.

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 verdadei-

ros positivos. Caso contrário, esses objetos serão descartados como falsos positivos. Para isso, calculamos o coeficiente c :

$$c(m, S) = \frac{\text{area}[m \cap (\bigcup_{i=1}^n s_i)]}{\text{area}[m \cup (\bigcup_{i=1}^n s_i)]} \quad (3)$$

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.

4 Discussões e resultados preliminares

Para compararmos a granulometria original baseada em correlação, MSGranul e OpenCFU, utilizamos o conjunto de imagens disponível no *website* do OpenCFU (OpenCFU, 2016). Esse conjunto consiste em 19 imagens em alta resolução de colônias bacterianas *Staphylococcus aureus*, junto com as contagens manuais, obtidas por especialistas. As quantidades de colônias nas imagens variam entre 10 e 1000, aproximadamente. Esse conjunto é o mesmo que Geissman (Geissmann, 2013) utilizou na avaliação de seu sistema de contagem de colônias.

Vários conjuntos de parâmetros foram testados e selecionamos o que apresentou a menor taxa de erro para cada um dos métodos avaliados. Utilizamos um conjunto único de parâmetros para cada um dos métodos utilizados. Isso permitiu que as execuções dos algoritmos fossem realizadas em lotes e facilitou o trabalho de executá-los diversas vezes.

| Algoritmos | Taxa de erro (%) |
|---------------------------------------|------------------|
| 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 1: Taxas de erros dos métodos avaliados.

Para cada imagem e cada algoritmo, calculou-se a diferença percentual entre a contagem manual e a contagem automática. A Tabela 1 mostra a média de erro para cada um dos métodos. Vamos analisar primeiro as taxas de erro obtidas

sem o pós-processamento. MSGranul comete menos erros (2,47%) do que a granulometria original (6,18%) e é comparável com os erros cometidos por OpenCFU. Interessantemente, OpenCFU comete mais erros processando imagem colorida do que a mesma imagem convertida em níveis de cinzas.

MSGranul funciona apenas com níveis de cinza, porém, é possível utilizar a informação de cor no processamento a posteriori usando *k-means*. Executamos *k-means* com $k = 5$, para agrupar os objetos encontrados por MSGranul em 5 classes de acordo com a cor predominante. Depois, apresentamos ao usuário 5 imagens típicas das 5 classes de objetos. O usuário pôde, então, avaliar se cada classe representa uma colônia de bactérias ou não. O OpenCFU também permite utilizar um algoritmo semelhante a *k-means* para avaliação a posteriori dos objetos detectados pela cor. Utilizando pós-processamento, a granulometria original cometeu 1,42% de erro, enquanto que MSGranul cometeu 0,89% de erro. Estes números são inferiores à taxa de erro obtido com OpenCFU com pós-processamento (2,37%).

Quando as imagens são convertidas para níveis de cinzas, algumas vezes torna-se difícil identificar se uma imperfeição deveria ser considerada ou não como colônia de bactérias. A Figura 4 mostra um desses exemplos em que um ponto azul é aceito erroneamente como uma colônia por MSGranul. No entanto, após o uso de *k-means*, ele passa a ser desconsiderado na contagem final. Isso justifica a melhora observada na taxa de erro de MSGranul com *k-means* (0,89%) em relação à versão sem *k-means* (2,47%).

Figura 5 mostra um caso onde o pós-processamento do OpenCFU (provavelmente *k-means*) descartou uma colônia que tinha sido corretamente detectada. Isto pode indicar por que a melhora com o uso de pós-processamento não foi expressiva no OpenCFU.

Todos os testes foram executados num computador portátil com processador Intel Core i7 de 2 núcleos com 16 gigabytes de memória RAM. A implementação é serial, sem utilizar paralelismo nem GPU. O tempo de processamento do MSGranul, para o pior caso (uma placa com mais de 1000 colônias), foi de aproximadamente 8 segundos.

5 Conclusão e trabalhos futuros

Neste trabalho, melhoramos a acuracidade da granulometria baseada em correlação com o uso do MSER. Aplicamos o método proposto na contagem de colônia de bactérias, atingindo taxa de acerto comparável à de OpenCFU. Com o pós-processamento usando *k-means* para agrupar os objetos pela cor, a taxa de acerto do nosso método supera a de OpenCFU.

Uma vantagem de MSGranul em relação ao

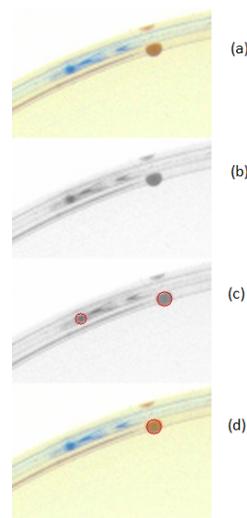


Figura 4: Exemplo onde, sem utilizar cor, é difícil decidir se um objeto é ou não uma colônia bacteriana. (a) Imagem original, (b) imagem em níveis de cinzas, (c) saída de MSGranul com um falso positivo e (d) saída de MSGranul filtrado por *k-means* sem erros.

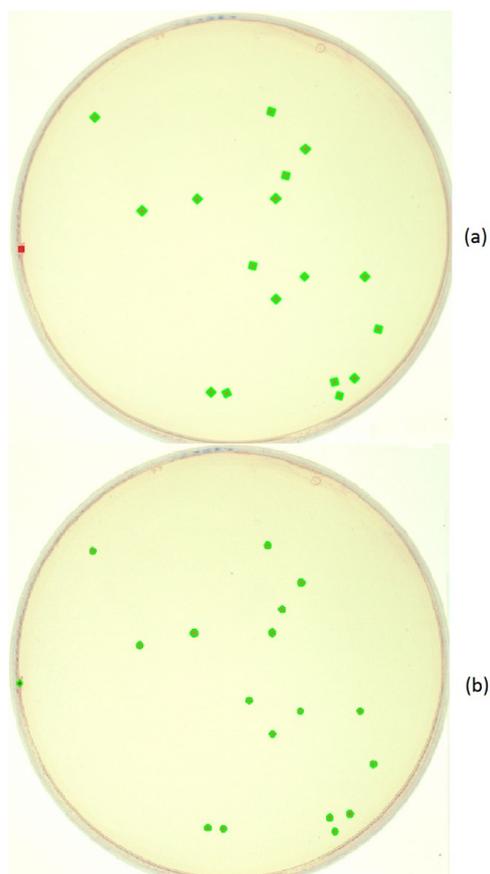


Figura 5: Localização de colônias bacterianas em placa de Petri. (a) Detecção do OpenCFU com pós-processamento (verde, contabiliza, vermelho, descarta), (b) Detecção das mesmas colônias utilizando MSGranul e *k-means*.

OpenCFU é sua capacidade de generalizar as formas que desejamos identificar. Enquanto MS-Granul pode reconhecer diferentes formas (círculos, quadrados, elipses, retângulos e triângulos), o OpenCFU localiza apenas objetos circulares. Desse modo, outras aplicações podem ser propostas para MSGranul, devido à sua capacidade de lidar com diversos formatos geométricos.

Como trabalho futuro, acreditamos que seja possível melhorar ainda mais o desempenho do nosso método usando o gradiente.

Referências

- Arthur, D. and Vassilvitskii, S. (2007). k-means++: The advantages of careful seeding, *Proceedings of the eighteenth annual ACM-SIAM symposium on Discrete algorithms*, Society for Industrial and Applied Mathematics, pp. 1027–1035.
- Cai, Z., Chattopadhyay, N., Liu, W. J., Chan, C., Pignol, J.-P. and Reilly, R. M. (2011). Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using imagej software and customized macros: comparison with manual counting, *International journal of radiation biology* **87**(11): 1135–1146.
- Chiang, P.-J., Tseng, M.-J., He, Z.-S. and Li, C.-H. (2015). Automated counting of bacterial colonies by image analysis, *Journal of microbiological methods* **108**: 74–82.
- Clarke, M. L., Burton, R. L., Hill, A. N., Litorja, M., Nahm, M. H. and Hwang, J. (2010). Low-cost, high-throughput, automated counting of bacterial colonies, *Cytometry Part A* **77**(8): 790–797.
- De Araújo, S. A., Pessota, J. H. and Kim, H. Y. (2015). Beans quality inspection using correlation-based granulometry, *Engineering Applications of Artificial Intelligence* **40**: 84–94.
- Dougherty, E. R., Newell, J. T. and Pelz, J. B. (1992). Morphological texture-based maximum-likelihood pixel classification based on local granulometric moments, *Pattern Recognition* **25**(10): 1181–1198.
- Ferrari, A., Lombardi, S. and Signoroni, A. (2015). Bacterial colony counting by convolutional neural networks, *2015 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, IEEE, pp. 7458–7461.
- Geissmann, Q. (2013). Openfcu, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects, *PloS one* **8**(2): e54072.
- Kim, H. Y., Maruta, R. H., Huanca, D. R. and Salcedo, W. J. (2013). Correlation-based multi-shape granulometry with application in porous silicon nanomaterial characterization, *Journal of Porous Materials* **20**(2): 375–385.
- Maerz, N. H., Palangio, T. C. and Franklin, J. A. (1996). Wipfrag image based granulometry system, *Proceedings of the FRAGBLAST 5 Workshop on Measurement of Blast Fragmentation, Montreal, Quebec, Canada*, AA Balkema, pp. 91–99.
- Matas, J., Chum, O., Urban, M. and Pajdla, T. (2004). Robust wide-baseline stereo from maximally stable extremal regions, *Image and vision computing* **22**(10): 761–767.
- Mukherjee, D. P., Pal, A., Sarma, S. E. and Majumder, D. D. (1995). Bacterial colony counting using distance transform, *International journal of bio-medical computing* **38**(2): 131–140.
- Nistér, D. and Stewénus, H. (2008). Linear time maximally stable extremal regions, *European Conference on Computer Vision*, Springer, pp. 183–196.
- OpenCFU (2016). Openfcu – count your colonies, <http://www.openfcu.sourceforge.net/>.
- Yoon, S.-C., Lawrence, K. C. and Park, B. (2015). Automatic counting and classification of bacterial colonies using hyperspectral imaging, *Food and Bioprocess Technology* **8**(10): 2047–2065.