

Artigo Original

recebido: 28/06/2001 e aceito em 06/12/2001

**Sistema automático para
contagem de colônias
em placas de Petri**

*Automatic system for colonies
counting in Petri dishes*

Jefferson Osowsky, M. Sc.

Laboratório de Processamento Digital de Imagens
Professor do Departamento
Acadêmico de Informática – DAINF/CEFET-PR
e-mail: osowsky@cpgei.cefetpr.br

Humberto Remigio Gamba, Ph. D.

Laboratório de Processamento Digital de Imagens
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica
e Informática Industrial - CPGEI/CEFET-PR
Av. 7 de setembro 3165 - 80.230-901 - Curitiba-PR
e-mail: humberto@cefetpr.br

Resumo

Esse trabalho apresenta o projeto e os testes de um protótipo de um instrumento simples, compacto e de baixo custo, para a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) em placas de petri. O protótipo é composto por um sistema de iluminação, uma câmera CCD, uma placa de aquisição de vídeo e um microcomputador IBM/PC ou compatível. O sistema de iluminação com LEDs é inovador e possibilita a aquisição de imagens das placas de petri com excelente contraste entre as colônias e o *background*. Essa característica possibilitou o desenvolvimento de um algoritmo de processamento digital de imagens simples, rápido e eficaz. O programa adquire e calcula a média de vinte imagens de uma placa de petri e utiliza o método *background subtraction* para separar as colônias de bactérias do restante da imagem e atenuar pequenas diferenças de iluminação. A imagem é então limiarizada e as UFCs contadas com um algoritmo recursivo capaz de localizar e determinar a dimensão, em pixels, de cada uma das colônias. Os resultados dos vários testes realizados durante o desenvolvimento demonstraram que o instrumento é capaz de contar as UFCs com área superior a 0,8 mm², sendo que o coeficiente de correlação entre os resultados obtidos com o método de contagem convencional e a contagem feita pelo protótipo é superior a 0,99.

Palavras-chave: Contagem de UFCs, Placa de Petri, Qualidade do leite.

Abstract

This work presents the design, implementation and the tests of a new, simple, compact and low cost instrument to count bacteria colonies in petri dishes. The instrument makes use of an illumination system, a CCD video camera, frame grabber and a microcomputer. The use of LED as the lighting source for the illumination system is an innovation that allows it to acquire excellent high contrast images between the colonies and the background. This feature made it possible the implementation of a simple, fast and accurate algorithm for the digital image processing. To improve the SNR the implement algorithm calculates the average of twenty images of a petri dish and uses the background subtraction method to separate bacteria colonies from the remaining image and to attenuate small illumination differences in the image. The image is then segmented and the colonies counted using a recursive algorithm. The result is the number of colonies and their sizes in pixels. The results of the tests showed that the instrument is capable of counting the colonies that are bigger than 0.8mm². A correlation coefficient above 0.99 was found between the standard counting method and the new instrument.

Keywords: CFUs counting, Quality of the milk, Petri dish.

Extended Abstract

Introduction

Dairy products are highly consumed by population and thus a straight quality control is required. Among the methods to quantify the bacteria in a sample of milk, the most used is the standard plate counting. In this method a known volume of a liquid culture is spread over the surface of a petri dish and the number of colonies appearing is counted and expressed as the number of CFU (colony formation unit). The CFU enumeration is highly time consuming and tedious for the technician. Thus, a new instrument to count CFU in petri dishes is described in this work. The major features of this new instrument are: its simplicity and the low cost illumination technique employed.

Materials & Methods

The Automatic System for Colonies Counting (ASCC) uses a low cost, B&W, CCD (charge-couple device) camera (less than US\$100,00), model WAT-660D37, NTSC, made by Watec Inc., an illumination system with LEDs (light-emitting diodes), a frame grabber from Computer Eyes/PCI and a Pentium 166MHz microcomputer. The use of LEDs as the lighting source for the illumination of the petri dish during the image registration is one of the main innovations. The LED lighting source allows the instrument to acquire excellent high contrast images between the CFU and the background of the image.

To enumerate the CFUs a digital image processing (DIP) algorithm was developed in the C++ programming language. The DIP algorithm calculates the average of twenty images of the same petri dish, increasing the SNR (signal to noise ratio) of the image being processed. The image region of interest (ROI) is then selected through an AND logic operation between the averaged image and a pre-determined binary mask. To attenuate any inhomogeneity due to the illumination system a background subtraction algorithm is applied. During the tests performed in a local Food Quality

Centre Laboratory we observed that all the images of the petri dishes had always very similar histograms. This is probably due to the use of the same culture liquid and milk dilution. Therefore to simplify the algorithm and make it faster a constant threshold equal to 12 was used. Finally a recursive algorithm for labelling was used to enumerate the CFUs.

The selection of the ROI using the logic operation is fast and simple to implement, the drawback is that it also eliminates some pixels and the bacteria near to the border of the petri dish image. The final processed area of the petri dish is 79% of its countable area. Empirical correction factors were determined to compensate the lost of area during the image processing.

Results

Figure 4 shows a photo of the developed instrument. A moveable support allows to adjust the image zoom, fitting the maximum field of view (FOV) of the CCD camera with the petri dish image. Figures 5(a) and (b) are the averaged image and the image profiles, respectively. Figures 6(a), (b) and (c) are the selected ROI, the result of the background subtraction algorithm, that shows the expected false border and the threshold image where the false border was eliminated, respectively. Figure 6(c) contains only 79% of the countable region of the petri dish. Fifty-seven experiments were performed in a local Food Quality Control Laboratory. Comparing the results of manual and ASCC counting there is a correlation factor above 0.99 (Figure 8).

Conclusion

A new instrument to enumerate CFUs in petri dishes was developed. The ASCC is as good as those ones described by others authors. The use of LEDs makes it possible to acquire excellent high contrast images. Therefore, a simple and fast DIP algorithm to segment and enumerate the CFUs was also developed. The main innovation is its simplicity, small size, and low cost illumination method which employs LEDs.

Introdução

O leite, por ser altamente consumido, representa um dos melhores modelos de alimentos sobre o ponto de vista de regulamentação (Pelczar *et al.* 1981). O exame bacteriológico para determinar a qualidade do leite, no que diz respeito à fabricação, condições de armazenamento e transporte, é denominado Contagem Padrão de Microrganismos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis: Mesófilos, Psicrótróficos e Termófilos (BRASIL/Portaria Ministerial, 1993). Neste exame, o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) por mililitro de amostra analisada determina quantos microrganismos foram capazes de se reproduzir, formando colônias, num dado meio de cultura.

O método padrão de contagem de bactérias em placas (técnica de *pour plate*) consiste na adição do meio de cultura em estado líquido e estabilizado à temperatura de $45^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ao inoculo da amostra diluída de leite em uma placa de petri. As placas de petri são então incubadas a $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 horas para que as bactérias de desenvolvam e formem as chamadas UFCs. Após o período de incubação, realiza-se a contagem das UFCs (Jay, 1992; Bier, 1985). As placas de petri devem ser de borossilicato (*pyrex*) ou de vidro neutro, com 100mm de diâmetro e 15mm de altura, ou de plástico não tóxico com 90mm de diâmetro e 15 mm de altura. A amostra de leite deve ser diluída, pois o total de UFCs é dado por 1 mililitro (1ml) da amostra. Em geral, faz-se várias diluições do leite com a finalidade de selecionar as placas correspondentes ao volume inoculado que tenham fornecido contagens entre 30 e 300 colônias. Após a contagem multiplica-se o resultado pelo inverso do volume inoculado na placa.

Dentre as várias etapas no processo de contagem padrão, uma das mais trabalhosas é a contagem das UFCs. Essa contagem é manual (visual) e, devido ao número de amostras para análise, consome várias horas do técnico responsável pela análise do leite. Além do tempo, a contagem manual acarreta outras desvantagens como a falta de reprodutibilidade dos resultados, dificuldade com o treinamento de pessoal e demora na leitura das placas.

Dessa forma, para auxiliar as atividades de laboratório desenvolveu-se o protótipo de um Sistema Automático para a Contagem de Colônias (SACC) (Osowsky, 1999, Osowsky e Gamba, 2000). O desenvolvimento de um instrumento para esta finalidade já foi objeto de outras pesquisas (Corkidi *et al.*, 1998; Mukherjee *et al.*, 1995). Entretanto, tratam-se de siste-

mas complexos onde a principal dificuldade é o sistema de iluminação que requer lâmpadas de alta potência e/ou lentes especiais para focalizar o feixe luminoso na placa de petri. Essa complexidade impede o desenvolvimento de um instrumento simples, robusto e fácil manuseio.

Neste trabalho descreve-se o projeto, a construção, os testes e os resultados obtidos com um protótipo do SACC em placas de petri. O protótipo desenvolvido utiliza técnicas de processamento digital de imagens (PDI) para enumerar as UFCs e uma das principais características inovadoras desse projeto é sua simplicidade em termos de iluminação, a qual permitiu o desenvolvimento de um protótipo de pequenas dimensões e de um algoritmo de processamento digital de imagem eficiente.

Materiais e Métodos

O SACC utiliza uma câmera de baixo custo (menos de US\$100,00) do tipo CCD (*charged-couple device*), modelo WAT-660D37, padrão NTSC, fabricada pela Watec Inc., um sistema de iluminação com LEDs (*light-emitting diodes*), uma placa de aquisição de vídeo modelo ComputerEyes/PCI, comercializada pela Digital Vision e um microcomputador Pentium IV (1,7 GHz, 256 MB RAM). O programa de PDI para captura e contagem das UFCs foi desenvolvido na linguagem C++, compilador Borland C++ Builder, para sistema operacional Windows 95 ou superior.

Sistema de iluminação

Os sistemas de iluminação utilizados em instrumentos para a contagem manual de UFCs, por exemplo o *BactoCounter*, e os descritos na literatura para contagem automática (Corkidi *et al.*, 1998; Mukherjee *et al.*, 1995) utilizam iluminação do tipo *back-light* (iluminação traseira) ou *front-light* (iluminação frontal) (Galbiati, 1990). No método de iluminação traseira a placa de petri é colocada entre uma fonte luminosa e uma câmera CCD. Em geral, para produzir uma iluminação mais uniforme, utiliza-se também uma placa acrílica branca entre a fonte luminosa e a placa de petri. Esse método gera imagens das silhuetas das UFCs com um alto contraste entre estas e o meio de cultura na placa. No método de iluminação frontal, descrito por Corkidi *et al.* (1998), um feixe de luz, produzido por uma lâmpada alógena, é focado e direcionado com o auxílio de lentes para a placa de petri. Parte do feixe incidente na placa é refletido e parte espalhado. A luz espalhada (ou difusa) é então utilizada para registrar a imagem da placa de petri

com a câmera CCD. Na prática observa-se que a iluminação difusa é muito mais homogênea em comparação com o método de iluminação do tipo traseira (Osowsky, 1999).

Os principais problemas de ambos os métodos acima descritos são: aquecimento da placa de petri, acelerando o desenvolvimento das colônias; alto consumo de energia; custo elevado, pois a iluminação difusa requer lâmpadas alógenas e lentes especiais para focalizar o feixe de luz; e, principalmente, impossibilidade de se criar um sistema de iluminação compacto.

Em virtude destes problemas desenvolveu-se um novo método de iluminação com o uso de LEDs vermelhos. A Figura 1 ilustra um esboço do sistema de iluminação implementado para o SACC. Nesse sistema encaixou-se 24 LEDs em torno de um anel de PVC (*Polyvinyl chloride*) com 4cm de altura e 14cm de diâmetro. A distância da base do anel ao centro dos LEDs é de 1,5cm.

Os LEDs vermelhos emitem ondas eletromagnéticas em uma pequena faixa do espectro de frequências (600 nm a 700 nm), região esta de maior sensibilidade da maioria das câmeras CCDs de baixo custo. Esta alteração na fonte luminosa além de reduzir consideravelmente o consumo de energia elétrica e a produção de calor, produz imagens com excelente contraste e homogeneidade. Outros aspectos relevantes em termos de instrumentação são: o custo reduzido dos LEDs, seu longo tempo de vida e, principalmente, suas pequenas dimensões (5mm de diâmetro) que permitem o desenvolvimento de um instrumento compacto.

Para evitar a interferência da iluminação externa projetou-se um bastidor para acondicionar os LEDs, a câmera CCD e a placa de petri. O bastidor, projetado em AutoCad, foi construído em material ABS (*Acrylo Nitrile-Butadine Sturene*) utilizando-se o sistema FDM (*Fused Deposition Modelling*), que foi então pintado de

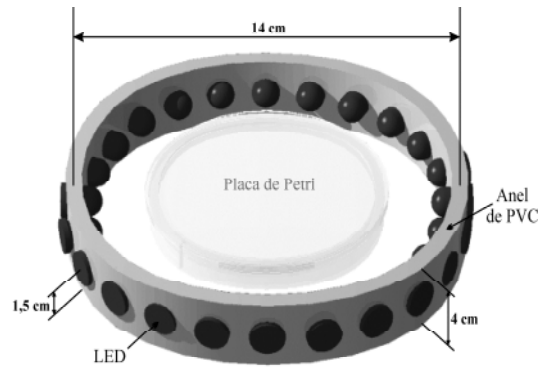


Figura 1. Esboço do método de iluminação do sistema de captura de imagens de placas de petri utilizado no SACC. Nesse sistema foram utilizados 24 LEDs vermelhos encaixados num anel de PVC com 14 cm de diâmetro. **Figure 1.** Sketch of the petri dish illumination system used in the ASCC. In this system 24 red LEDs were fixed in a circular plastic ring with 14 cm diameter.

preto para reduzir ainda mais a interferência da iluminação externa. A construção do bastidor permitiu um estudo minucioso da técnica de iluminação com LEDs e foi fundamental para o desenvolvimento de um algoritmo de processamento de imagem para contagem das UFCs eficiente e rápido.

Ressalta-se que a iluminação com LEDs não foi utilizada em nenhum dos trabalhos encontrados na literatura (Corkidi *et al.*, 1998; Mukherjee *et al.*, 1995; Galbiati, 1990), sendo uma característica inovadora deste trabalho (Depósito de Patente PI0101736-5).

Algoritmo para a contagem das UFCs

A Figura 2 apresenta o diagrama em blocos do algoritmo desenvolvido para a contagem das UFCs, o qual está dividido em 5 etapas.

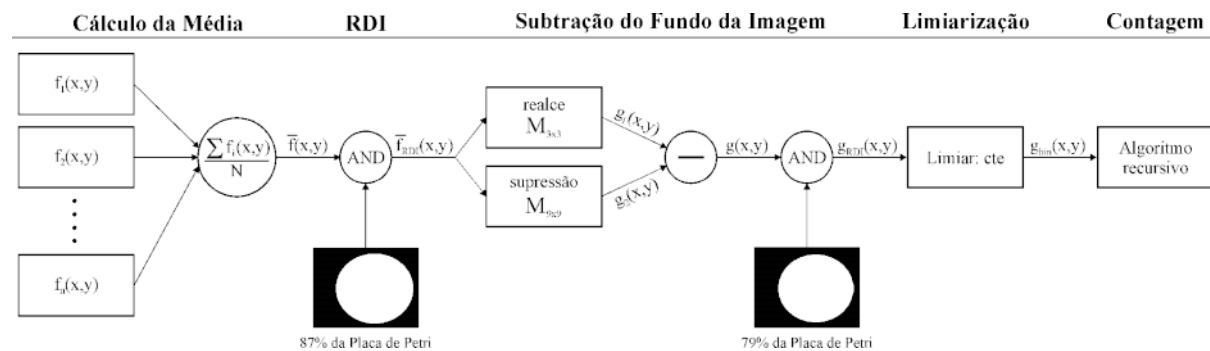


Figura 2. Diagrama em blocos do algoritmo de PDI desenvolvido para a contagem de UFCs em placas de petri.

Figure 2. Block diagram of the digital image processing algorithm to count the CFUs in petri dish images.

Embora o sistema de iluminação com LEDs propicie uma imagem com um baixíssimo nível de ruído, existe na imagem digitalizada pequenas variações de intensidade decorrente do ruído térmico (Millman e Halkias, 1972) o qual é intrínseco ao CCD da câmera de vídeo. Para reduzir o ruído térmico calcula-se a média aritmética de 20 imagens da mesma placa de petri, isso reduz o ruído intrínseco ao CCD e garante uma imagem com uma melhor relação sinal-ruído (SNR- *signal to noise ratio*).

Na segunda etapa, seleciona-se a Região de Interesse (RDI) através de uma operação lógica do tipo *AND* entre a imagem resultante da média e uma máscara de referência. Esse procedimento de seleção automática da RDI só é possível porque construiu-se no bastidor um rebaixo de 1 mm para encaixar a placa de petri sempre na mesma posição do campo de visão da câmera CCD. É importante ressaltar que é impossível selecionar 100% da área da placa de petri, ou seja, as regiões próximas às bordas são eliminadas na operação *AND*. Isso ocorre devido a dois fatores: imprecisão do próprio sistema mecânico de posicionamento da placa de petri e a necessidade de se eliminar os reflexos de luz na borda da placa (Figura 3a). Dessa forma, a RDI selecionada corresponde a 87% da área manualmente contável da placa de petri.

O algoritmo de *background subtraction* (subtração de fundo), terceira etapa, é utilizado para remover o nível de cinza que corresponde a imagem do meio de cultura. O algoritmo de subtração de fundo aumenta o contraste da imagem uma vez que não altera o tom de cinza das UFCs e reduz para próximo de zero a cor de fundo. A técnica implementada é descrita por (Nishikawa *et al.*, 1995). Este algoritmo produz uma falsa borda na imagem resultante, que é eliminada aplicando-se uma segunda máscara de referência. Novamente, esse processo resulta em uma pequena perda de 6% da área da placa, ou seja, no final desse processo tem-se 79% da área manualmente contável da placa de petri.

A quarta etapa é a de limiarização. Vários métodos automáticos foram implementados e testados (Parker, 1997; Tseng e Huang, 1993; Otsu, 1979), sendo que nenhum deles alcançou um resultado satisfatório. Contudo, durante os vários testes observou-se que as imagens das várias placas de petri, após a subtração de fundo, apresentavam sempre histogramas muito similares, independentemente da quantidade de UFCs. Essa similaridade nos histogramas ocorre pois utilizou-se sempre o mesmo meio de cultura e processo de diluição das amostras de leite. Esse pro-

cedimento garante que a cor do meio de cultura, a qual define a cor de fundo (*background*) na imagem da placa de petri, seja sempre a mesma. Além disso, os LEDs, por possuírem um longo tempo de vida, mantêm sempre o mesmo nível de iluminação. Isso tudo garante imagens muito similares em termos de brilho e contraste, podendo-se estipular empiricamente um limiar constante igual ao nível de cinza 12 (preto:0; branco: 255). Com este limiar, colônias com área superior à 0,8 mm² foram selecionadas.

Finalmente, a última etapa do processamento do SACC corresponde à contagem das UFCs. Para isso implementou-se um algoritmo recursivo de etiquetagem para enumerar objetos brancos contidos em uma imagem binária (Gonzalez e Woods, 1993).

As placas de petri utilizadas nos testes de desempenho do protótipo do SACC foram fornecidas pelo Laboratório de Apoio Animal de Curitiba (LAPA). As imagens das placas de petri foram capturadas em no

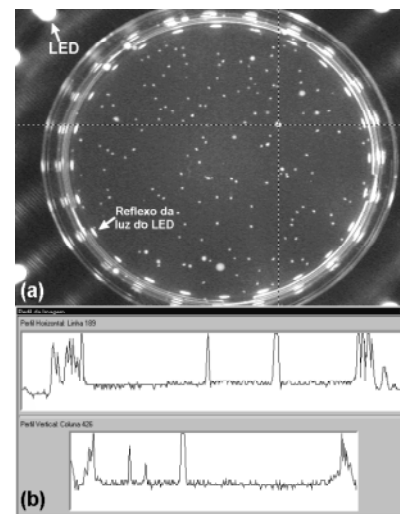


Figura 3. (a) Imagem de uma placa de petri com dimensões 640x480 pixels e 256 tons de cinza. Os pontos brancos na região central correspondem às UFCs. As linhas tracejadas representam os perfis mostrados na Figura (b); (b) Perfis horizontal, linha 189 (acima) e vertical, coluna 426 (abaixo) da Figura 4a. Os picos na região central do perfil representam os pontos onde existem UFCs. **Figure 3.** (a) petri dish image, resolution 640x480 pixels and 256 grey colours. The white spots in the central region are the CFUs. The hash lines are the profiles shown in figures (b); (b) Horizontal, row 189 (top) and vertical, column 426 (bottom) profiles of figure 4a. The spikes in the central region of the profiles are the points where there are UFCs.

máximo uma hora após terem sido retiradas da estufa e contadas pelos técnicos do laboratório. Esse procedimento evita o aparecimento de novas e/ou o aumento do tamanho das colônias existentes.

Resultados

A Figura 4 apresenta uma foto da vista frontal do bastidor com a tampa aberta desenvolvido para o SACC. Observa-se nesta Figura os LEDs posicionados ao redor da placa de petri e a câmera CCD colocada a aproximadamente 23cm acima da placa de petri. A câmera CCD com lente de 8mm é fixada em um suporte móvel de forma a permitir um ajuste fino da sua posição em relação à placa de petri. Esse ajuste possibilita maximizar a área do campo de visão da câmera CCD ocupada pela imagem da placa de petri. O projeto do bastidor foi desenvolvido de forma a propiciar uma fácil acomodação da placa de petri no centro do anel de LEDs e impedir a entrada de luz externa.

A Figura 3a apresenta a imagem de uma placa de petri capturada pelo SACC, onde os pontos brancos correspondem às UFCs. A Figura 3b apresenta, na forma de um gráfico, a intensidade de brilho ao longo dos perfis vertical e horizontal indicados na Figura 3a pelas linhas tracejadas. Nesses gráficos observa-se que

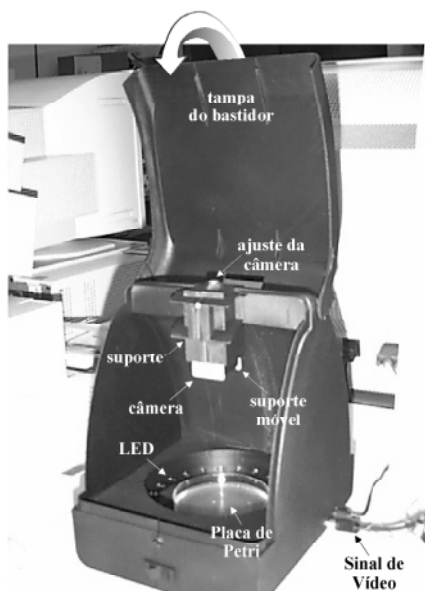


Figura 4. Vista frontal do gabinete onde é possível visualizar o suporte móvel da câmera CCD, os LEDs e uma placa de petri. **Figure 4.** Photo of the developed ASCC and its components: adjustable support for the CCD, LEDs and a petri dish.

a iluminação da placa de petri é bastante uniforme ao longo de toda placa. As pequenas variações ao longo da linha de base são causadas pelo ruído térmico inerente à câmera de vídeo. Já os picos maiores correspondem as variações de intensidade produzidas pela presença das UFCs.

A Figura 5a apresenta o resultado da média de 20 imagens de uma mesma placa de petri. Nos perfis apresentados na Figura 5b nota-se que em comparação a Figura 3b houve uma sensível redução do nível de ruído térmico inerente à câmera CCD. O aumento da SNR na imagem é fundamental para que o algoritmo de subtração de fundo apresente bons resultados.

A Figura 6a apresenta o resultado da seleção da RDI com a operação lógica AND entre a máscara predefinida e a imagem processada. A Figura 6b apresenta a imagem da placa de petri após a aplicação do algoritmo de subtração de fundo. Observa-se nessa Figura a presença da falsa borda produzida pela aplicação desse algoritmo. A Figura 6c mostra o resultado do

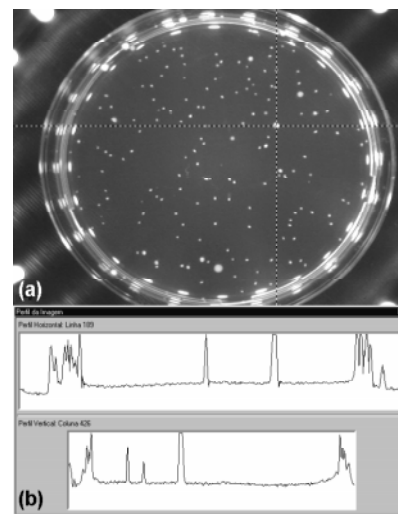


Figura 5. (a) Resultado da média de 20 imagens da mesma placa de petri com dimensões 640x480 pixels e 256 tons de cinza. As linhas tracejadas representam os perfis mostrados na Figura (b); (b) Perfis horizontal, linha 189 (acima) e vertical, coluna 426 (abaixo) da Figura 5(a). Os picos na região central do perfil representam os pontos onde existem UFCs. **Figure 5.** (a) Averaging result of 20 images of the same petri dish, resolution 640x480 and 256 grey colours. The hash lines are the profiles shown in figures (b); (b) Horizontal, row 189 (top) and Vertical, column 426 (bottom) profiles of figure 5(a). The spikes in the central region of the profiles are the points where there are UFCs.

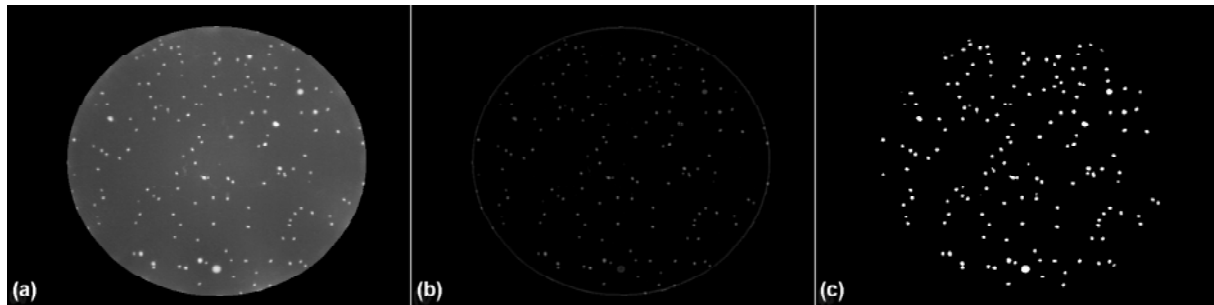


Figura 6. **a)** Imagem da RDI obtida após a aplicação de uma máscara sobre a imagem da Figura 5(a); **b)** Imagem resultante da aplicação do algoritmo de subtração de fundo na imagem da Figura 6(a); **c)** Resultado após o processo de limiarização (nível de limiar igual a 12) e remoção da falsa borda gerada pela etapa anterior. **Figure 6.** **a)** Result of the selected ROI after the mask application; **b)** result of the background subtraction algorithm, **c)** threshold image where the false border in (b) was eliminated.

algoritmo de limiarização, tendo como nível de limiar o valor 12, após a remoção da falsa borda.

É importante ressaltar que devido ao processamento da imagem, a área final de contagem das UFCs é cerca de 79% da área total da placa de petri, ou seja, as UFCs situadas próximas as bordas da placa de petri são perdidas durante o processamento da imagem.

Inicialmente 34 placas de petri foram agrupadas em função do número de UFCs, conforme a Tabela 1. O grupo A é formado pelas placas que possuem no máximo 10 UFCs, o grupo B de 11 a 100 UFCs e o grupo C mais que 100 UFCs. Os grupos A, B e C possuem 14, 17 e 3 placas de petri, respectivamente. Esse procedimento permitiu estabelecer fatores empíricos para correção da contagem devido a perda de área resultante do processamento das imagens. Cumpre ressaltar que os fatores de correção só são necessários caso conte-se 100% da área da placa de petri. Esse não é um procedimento usual, já que, em geral, conta-se apenas algumas regiões das placas e extrapola-se o resultado obtido (BRASIL/Portaria Ministerial, 1993).

Para avaliar o SACC e os fatores de correção adquiriu-se imagens de outras 23 placas de petri, que também foram agrupadas conforme a Tabela 1. A Tabela 2 apresenta o segundo conjunto de placas utilizadas na avaliação. O número reduzido de placas pertencentes ao grupo C deve-se ao baixo número de amostras de leite que possuíam contaminação por bactérias, conseqüentemente impróprias para o consumo humano.

A Figura 7 apresenta o gráfico comparativo entre a contagem manual realizada pelos técnicos do LAPA e pelo SACC, utilizando as 57 imagens capturadas. Na contagem realizada pelo SACC foi utilizado o fator de correção para se obter o valor real das UFCs dentro da placa de petri.

Discussão e Conclusão

Neste trabalho apresentou-se o projeto, construção, testes e os resultados obtidos com o protótipo de um novo instrumento para contagem de unidades formadoras de colônias em placas de petri. A compara-

Tabela 1: Fatores empíricos para correção da contagem feita pelo SACC

Grupo	Número de UFCs	Número de placas analisadas	Fator de correção
A	até 10	14	1,00
B	de 11 a 100	17	1,24
C	acima de 100	3	1,34

Tabela 2: Classificação das placas de petri utilizadas na avaliação do SACC

Grupo	Número de UFCs	Número de placas processadas
A	até 10	11
B	de 11 a 100	10
C	acima de 100	2

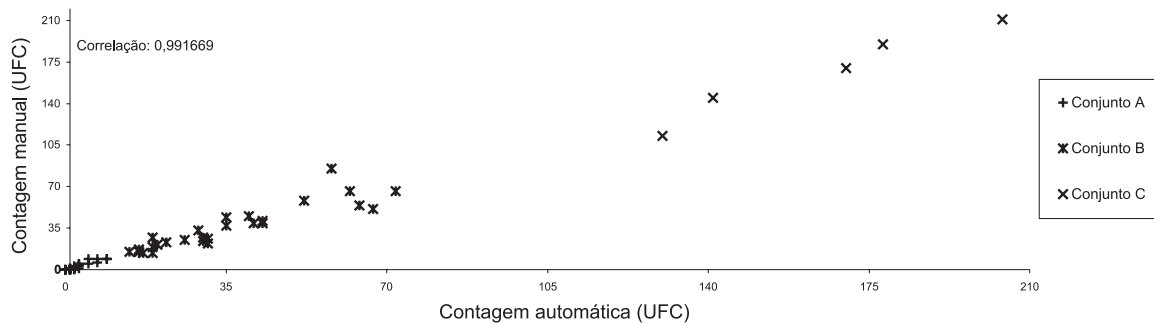


Figura 7. Comparação entre a contagem realizada pelos técnicos do LAPA e pelo SACC. No total 57 placas de petri foram analisadas pelo SACC. **Figure 7.** Cross correlation graphic between the counting made by the LAPA technicians and those made by the ASCC. A total of 57 petri dish images were used.

ção dos resultados mostrou que o protótipo do SACC é tão eficiente quanto o sistema descrito por Corkidi, *et al.* (1998), com a vantagem de utilizar um sistema de iluminação muito mais simples.

A iluminação com LEDs é inovadora e foi fundamental para os excelentes resultados alcançados com o algoritmo de PDI. Este método de iluminação propiciou um sistema compacto e com consumo de energia 45 vezes inferior ao sistema usado por Corkidi *et al.* (1998).

O alto fator de correlação entre a contagem feita pelo SACC e pelos técnicos do LAPA, acima de 0,99, demonstra que o protótipo é realmente capaz de contar as UFCs. Os fatores de correção obtidos estão coerentes pois, em geral, observou-se que para um número pequeno de colônias as mesmas tendem a se desenvolver no centro da placa de petri. Por outro lado, a distribuição se torna aproximadamente uniforme quando existe um grande número de colônias. Portanto, para poucas colônias, 100% das UFCs são contadas, conseqüentemente o fator de correção é igual a 1. Contudo, é importante frisar que o uso dos fatores de correções só é necessário quando todas as UFCs são contadas. Esse procedimento não é usual já que, em geral, o técnico escolhe algumas áreas pré-determinadas para a contagem e extrapola o resultado para a área total da placa de petri (Brasil/Portaria Ministerial, 1993). Assim, considerando que a formação das UFCs na placa de petri é aleatória, a enumeração com um sistema automático é muito mais realista que no método de extrapolação.

Uma limitação do SACC é com relação a menor UFC detectável. No caso do sistema de captura das imagens das placas de petri implementado, a menor UFC está limitada em 0,8 mm². Esta limitação é decorrente dos filtros aplicados no processo de subtração do fundo da imagem e da resolução da placa de aqui-

sição de vídeo utilizada. Entretanto, esse não é um fator limitante pois um número muito pequeno de bactérias, em geral debilitadas durante o processo de pasteurização, não se desenvolvem a ponto de formarem uma UFC menor que 0,8 mm².

O estudo da influência do número de imagens utilizadas no cálculo da média no resultado da contagem demonstrou que a aquisição de mais de 10 imagens não altera o resultado final. Desta forma, a velocidade do algoritmo pode ser significativamente aumentada sem comprometer o seu desempenho. Para uma média de 10 imagens o tempo de contagem do SACC é menor que 10 segundos (Pentium IV 1,7 GHz, 256 MB RAM). Este intervalo de tempo é bem inferior ao tempo da contagem manual, que pode chegar a até 2 minutos, dependendo do número de UFCs. Entretanto, a principal vantagem do SACC é a sua reprodutibilidade, eliminando a subjetividade e a fadiga do técnico responsável pela análise.

Ressalta-se que, tratando-se de um projeto cujo objetivo é automatizar um processo manual, o perfeito funcionamento do protótipo está intimamente associado ao procedimento técnico com o qual a placa de petri é preparada. A presença de ondulações no meio de cultura e não uniformidade na distribuição da amostra do leite na placa de petri são fatores que interferem no desempenho do SACC. Portanto, para que o processo de contagem funcione é necessário que a distribuição do meio de cultura e da amostra na placa de petri seja realizada da forma mais uniforme possível.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Sr. Ronaldo Piazzalunga, diretor da empresa Laktron Industria Metalúrgica Ltda de Londrina-PR pelo apoio financeiro na compra dos equipamentos; à farmacobiocímica Heid Derksen, responsável pelo Laboratório de Apoio Animal de

Curitiba-PR, por fornecer as amostras de placas de petri; e a CAPES pela bolsa de mestrado. Os autores agradecem a especial colaboração da Dra Leonilda Correia dos Santos, responsável pelo Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional, pelas sugestões na redação do trabalho.

Referências

- Bier, O. (1992), *Microbiologia e Imunologia*, Ed. Melhoramentos.
- BRASIL/Portaria Ministerial (1993), "Portaria Ministerial N° 101 de 11 de agosto de 1993. Seção I. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária", *Diário Oficial N° 156 de 17 de agosto de 1993*, p. 11937-11960.
- Corkidi, G.; Diaz-Uribe, R.; Folch-Mallol, J. L.; Nieto-Soltelo, J. (1998), "COVASIAM: an Image Analysis Method that Allows Detection of Confluent Microbial Colonies and Colonies of Various Sizes for Automated Counting", *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 4, p. 1400-1404.
- Galbiati, L. J. (1990), *Machine Vision and Digital Image Processing Fundamentals*, Prentice-Hall.
- Gonzalez, R. C.; Woods, R. E. (1993), *Digital Image Processing*, Addison-Wesley.
- Jay, J. M. (1992), *Microbiologia Moderna de los Alimentos*, Espanha.
- Millman, S.; Halkias, C. C. (1972), *Integrated Electronics: Analog and Digital Circuits and Systems*, McGraw-Hill.
- Mukherjee, D. P.; Pal, A.; Sarma, S. E.; Majumder, D. D. (1995), "Bacterial Colony Counting Using Distance Transform", *International Journal of Biomedical Computing*, v. 38, n. 2, p. 131-140.
- Nishikawa, R. M.; Giger, M. L.; Doi, K.; Vyborby, C. J.; Schnidt, R. A. (1995), "Computer-aided Detection of Clustered Microcalcifications on Digital Mammograms", *Medical & Biological Engineering & Computing*, v. 33, n. 3, p. 174-178.
- Osowsky, J. (1999), *Sistema Automatizado para Contagem de Colônias Através de Processamento Digital de Imagem*, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, CPGEI/CEFET-PR, Curitiba-PR.
- Osowsky, J.; Gamba, H. R. (2000), "Sistema Automatizado para Contagem de Colônias em Placas de Petri", in: XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, Florianópolis, *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, v. 1, p. 1204-1208.
- Otsu, N. (1979), "A threshold Selection Method from Grey-level Histograms", *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, v. 9, n. 1, p. 377-393.
- Papoulis, A. (1965), *Probability, Random Variables and Stochastic Processes*, Mc Graw-Hill.
- Parker, J. R. (1997), *Algorithms for Image Processing and Computer Vision*, Wiley Computer.
- Pelczar, M.; Reid, R.; Chan, E. C. S. (1981), *Microbiologia*, v. 2, McGraw-Hill do Brasil.
- Tseng, D.; Huang, M. (1993), "Automatic Thresholding Based on Human Visual Perception", *Image and Vision Computing*, v. 11, n. 9, p. 539-548.

