

# Technická zpráva



Akademie věd České republiky  
Ústav teorie informace a automatizace AV ČR, v.v.i.

## Automatická detekce a odhad počtu kolonií kvasinek v Petriho miskách

Bohumil Kovář

[kovar@utia.cas.cz](mailto:kovar@utia.cas.cz), +420-2-6605 2502

Centrum Aplikované Kybernetiky  
1M0567

Department of Signal Processing  
<http://sp.utia.cz>

### Obsah

1	Úvod	1
2	Algoritmus	1
2.1	Předzpracování obrazu	2
2.2	Detekce zóny zájmu v obraze	2
2.3	Detekce shluků (Blobs)	3
2.4	Filtrování a výpočet výsledků	4
3	Implementace	4
4	Popis software	5
5	Experimenty a výsledky	6
6	Závěr	7
7	Výpis CDROM	8

### Revize

Revize	Datum	Autor	Popis změn v dokumentu
0	27.7.2009	B.K.	Vytvoření dokumentu
1			
2			
3			

# 1 Úvod

Tento dokument popisuje algoritmus a výsledný software pro určení plochy porostu a celkového počtu kolonií kvasinek (ev. jiných organismů) rostoucích v Petriho miskách na základě analýzy jejich obrazu. Tato měření jsou součástí kvantitativní analýzy kolonií a používají se při experimentech, jejichž cílem je zjistit, jaký vliv má testovaná látka, přidaná do kultivačního média, na jejich růst. Petriho misky jsou uchovávány v kultivačních boxech a měření je v čase několikrát opakováno.

Dosavadní obvyklou praxí bylo ruční vyhodnocování těchto experimentů, které je velmi pracné a časově náročné. Cílem výzkumu bylo ověřit, zda je možné parametry růstu kolonií měřit automatizovaně s použitím algoritmů pro zpracování obrazu, to znamená s minimální účastí operátora.

Testovací obrazová data použitá při výzkumu a přiložená k tomuto demo programu byla pořízena Katedrou genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty UK v Praze. Vlastní software vznikl za spolupráce s touto katedrou.

## 2 Algoritmus

Vstupní data pro algoritmus odhadu počtu kolonií v Petriho miskách jsou získávána v laboratorních podmínkách, vždy za téměř shodných podmínek (Obrázek 1). Při snímání obrazových dat se poloha Petriho misky, fotoaparátu a zdrojů osvětlení téměř nemění. Miska je vždy podkládána tmavou matnou látkou (černý samet), který zamezí odleskům a zároveň vytvoří vysoký kontrast mezi pozadím (miska) a popředím (kolonie kvasinek). Vlastní poloha misky v obraze se může měnit, stejně tak její relativní velikost. Tyto apriorní informace, které jsou dány laboratorním snímáním obrazu, nám usnadní tvorbu vhodného algoritmu.



Obrázek 1: Laboratorní pracoviště pro snímání obrazu Petriho misek

Nyní již můžeme definovat požadavky na vstupní data:

1. stejné rozlišení obrazu u všech snímků,
2. monochromatický vstupní obraz,

3. obraz obsahuje pouze jednu Petriho misku.

Vlastní algoritmus můžeme rozdělit do několika částí. Jeho diagram je pak zobrazen na obrázku 2.



Obrázek 2: Algoritmus

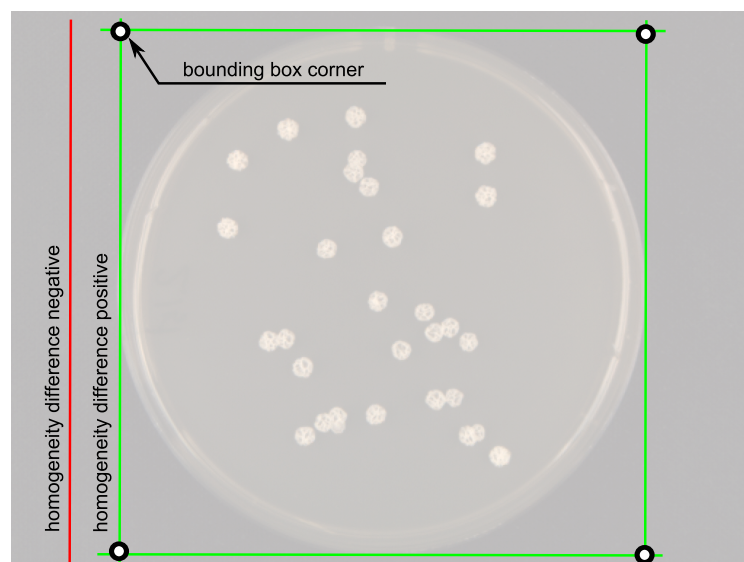
## 2.1 Předzpracování obrazu

Vzhledem k požadavkům kladeným na vstupní data je při předzpracování pouze převeden barevný obraz  $I$  na monochromatický  $g$ .

$$g(x, y) = 0.3I_R(x, y) + 0.59I_G(x, y) + 0.11I_B(x, y)$$

## 2.2 Detekce zóny zájmu v obraze

Zónou zájmu v obraze rozumíme to místo, které obsahuje pouze objekty relevantní pro další zpracování. V našem případě Petriho misku. Vzhledem k předpokladům, že vstupní obraz obsahuje pouze jednu Petriho misku a pozadí obrazu je homogenní, je algoritmus pro stanovení zóny zájmu snadný. Předpokládáme, že miska bude umístěna přibližně uprostřed obrazu. Nejprve si spočítáme průměr-



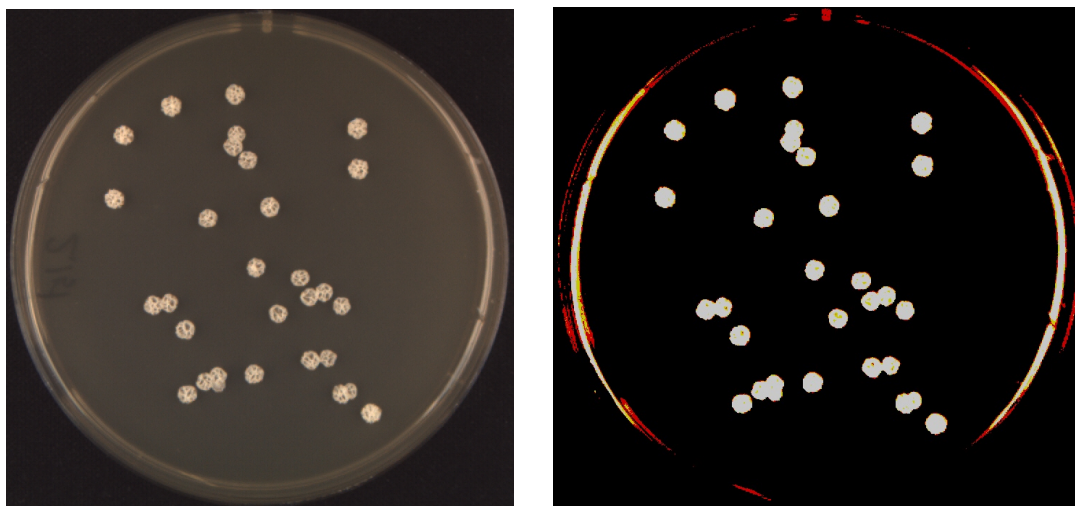
Obrázek 3: Stanovení zóny zájmu v obraze

nou intenzitu obrazové funkce odpovídající homogennímu pozadí  $\bar{g}_a$ . Vzhledem k nasvícení Petriho misky při snímání, je intenzita obrazové funkce  $g(x, y)$  v místech okraje misky dostatečně odlišná od průměrné intenzity pozadí  $\bar{g}_a$  tak, aby bylo možné určit čtvercový obal misky (Obrázek 3). Nyní můžeme spočítat parametry zóny zájmu, které budeme potřebovat pro další výpočty:

1. souřadnice čtvercového obalu (v pixelech)
2. souřadnice středu Petriho misky (v pixelech)
3. vnější poloměr Petriho misky (v pixelech)
4. poloměr dna Petriho misky (v pixelech)

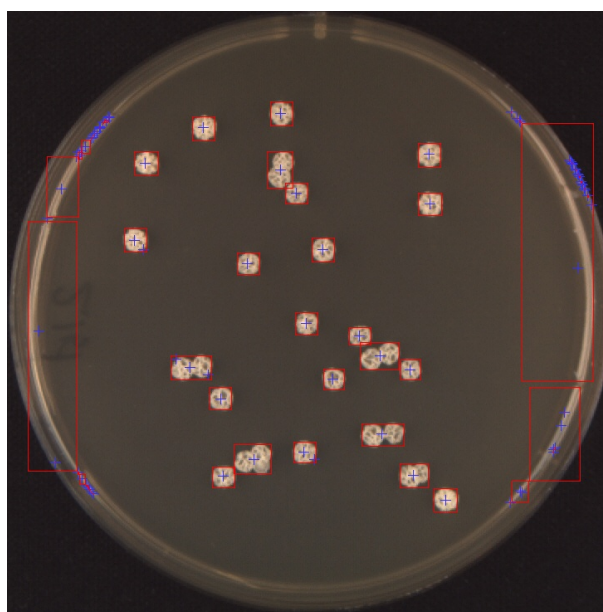
## 2.3 Detekce shluků (Blobs)

Nyní v algoritmu přistupme k vlastní detekci kolonií. Předpokládejme, že pro detekci jsou primárně důležité ty kolonie, které se nedotýkají okraje Petriho misky. Vzhledem k požadavkům, které jsme v úvodu kladli na vstupní data, je intenzita obrazové funkce odpovídající povrchu kolonií výrazně rozdílná od dna misky, případně od pozadí. To nám umožní detekovat kolonie prostým prahováním (Obrázek 4). Vhodný práh byl stanoven experimentálně analýzou histogramů testovacích obrázků.



Obrázek 4: Detekce kolonií kvasinek prahováním

Pro další analýzu potřebujeme v obraze lokalizovat jednotlivé detekované kolonie. K tomu použijeme funkce z OpenCV Blob Extraction knihovny. Z obrázku 5 je zřejmé, že bylo identifikováno i velké



Obrázek 5: Identifikované objekty s vyznačeným těžištěm

množství objektů, které neodpovídají koloniím. To je dáno tím, že odprahovaný obraz (Obrázek 4) nebyl dále zpracováván. Nebyly tedy odstraněny objekty, které odpovídají odleskům na hrdlu Petriho misky, případně další, většinou velmi drobné objekty.

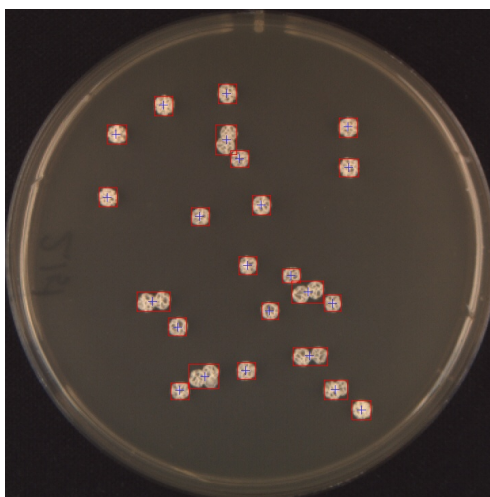


## 2.4 Filtrování a výpočet výsledků

V důsledku bude mnohem snazší (a výpočetně efektivnější) odstranit ze seznamu identifikovaných objektů ty, které s velkou pravděpodobností neodpovídají koloniím, než před vlastní detekcí shluků obraz dále předzpracovávat. Použijme k tomu dvě pravidla. Za objekt, který odpovídá kolonii budeme považovat ten, který

- má plochu větší než stanovená minimální plocha kolonie a zároveň plochu menší než stanovená maximální plocha kolonie,
- všechny rohy čtvercového obalu objektu leží uvnitř Petriho misky.

Zavedením těchto dvou pravidel získáme množinu objektů, které s velkou pravděpodobností odpovídají koloniím.



Obrázek 6: Identifikované objekty s vyznačeným těžištěm po provedené filtraci

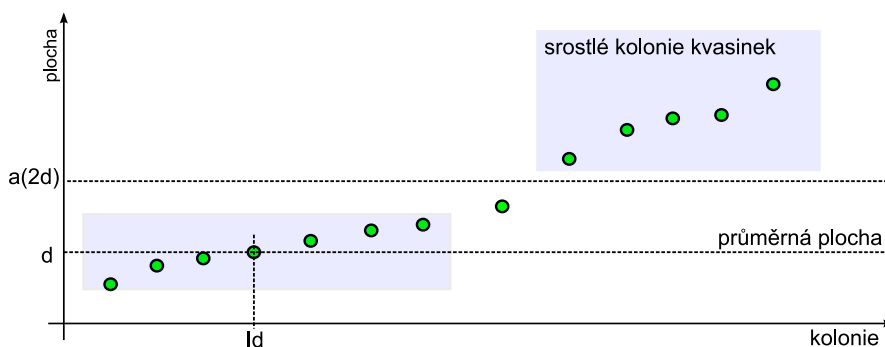
Výstupem z algoritmu je

1. celkový počet detekovaných objektů,
2. celková plocha detekovaných kolonií,
3. podíl plochy detekovaných kolonií z plochy dna Petriho misky.

Vzhledem k tomu, že se kolonie mohou během růstu dotknout a tím vytvářet shluky, které jsou identifikovány jako jednotlivé objekty, neodpovídá počet identifikovaných objektů počtu kolonií v Petriho misce. Tento počet bude odhadnut. Odhad počtu kolonií spočteme jako podíl plochy všech detekovaných objektů a průměrné plochy osamocených kolonií. Princip výpočtu průměrné plochy osamocené kolonie je na obrázku 7.

## 3 Implementace

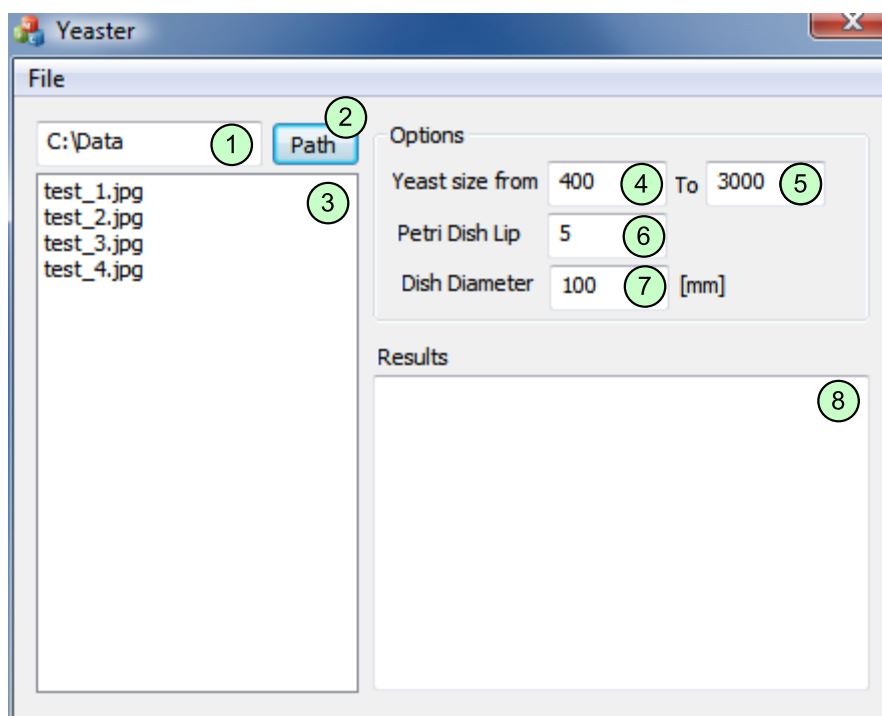
Algoritmus pro automatickou detekci a odhad počtu kolonií kvasinek v Petriho miskách byl implementován v jazyce C++ ve vývojovém prostředí Microsoft Visual Studio .NET 2008. Při implementaci byla použita open source knihovna pro zpracování obrazu a počítačové vidění – OpenCV ve verzi 1.1pre1 (October 2008). Runtime knihovny OpenCV jsou nezbytné pro spuštění programu a jsou přiloženy na CD-ROM. Stejně tak je nutné nainstalovat Microsoft Visual C++ 2008 Redistributable Package (vc redistrib\_x86.exe), dostupný na webových stránkách firmy Microsoft.



Obrázek 7: Výpočet průměrné plochy osamocené kolonie.

## 4 Popis software

Popisovaný software je stále ve fázi vývoje. Některé funkce, jako například export výsledků ve formátu akceptovatelném tabulkovým procesorem, případně robustnější konfigurace parametrů detekčního algoritmu, ještě nejsou plně implementované. Přesto již tato verze programu demonstruje detekční možnosti algoritmu a tím i přínos programu pro poloautomatické vyhodnocení mikrobiologických experimentů. Spuštěný program je zobrazen na obrázku 8. Jedná se o hlavní dialog, kterým se řídí chod celého programu. Z menu **File** je možné zvolit inicializaci programu do stavu po spuštění (**New**) a tím

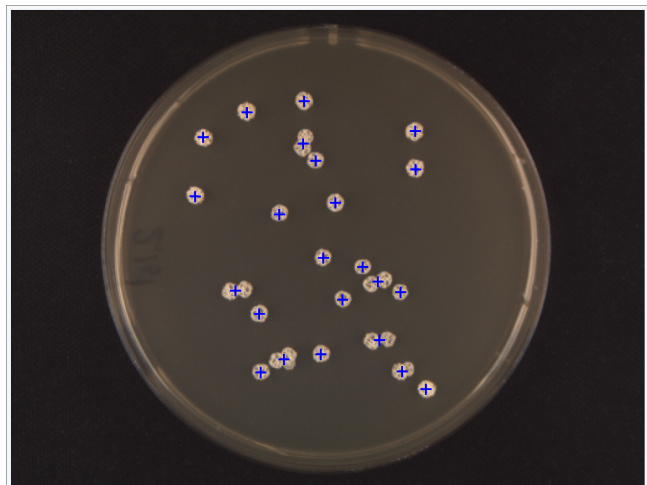
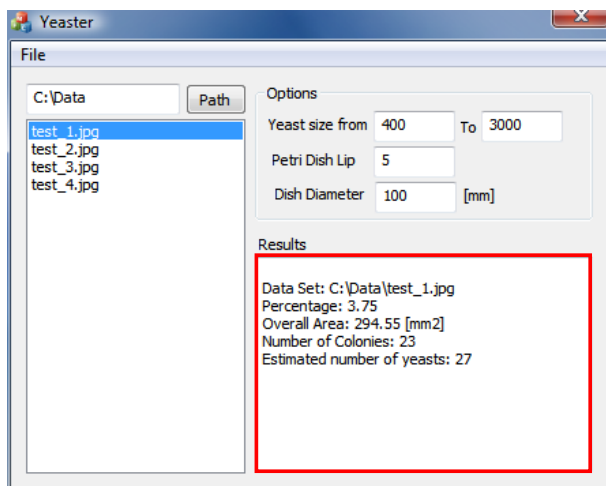


Obrázek 8: Software pro automatickou detekci kolonií kvasinek v Petriho miskách

ho připravit pro práci s novou datovou sadou, případně program ukončit (**Exit**). Parametry detekce se zadávají přímo do dialogového okna hlavního programu. Přednastavené parametry by měly být optimální pro většinu datových sad. Vlastní algoritmus se spouští označením jména souboru v okně (3). Jednotlivé ovládací prvky jsou popsány v tabulce 1. Po označení jména souboru v okně (3) je spuštěna vlastní detekce kolonií a jsou spočítány, případně odhadnuty jednotlivé parametry. Detekované kolonie jsou označeny a výsledky zobrazeny v okně (8).

Id.	Funkce	Poznámka
1	Data path	Cesta k adresáři s obrázky
2	Path	Volba adresáře s obrázky
3	List	Výpis obrázků v testovací sadě
4	Colony size	Minimální detekovaná plocha kvasinky (v pixelech)
5	Colony size	Maximální detekovaná plocha kvasinky (v pixelech)
6	Dish Lip	Šířka okraje Petriho misky (v pixelech)
7	Diameter	Průměr Petriho misky (v mm)
8	Results	Výsledky

Tabulka 1: Ovládací prvky programu Yeaster



Obrázek 9: Výsledky detekce a odhadu počtu kolonií pro soubor test1.jpg

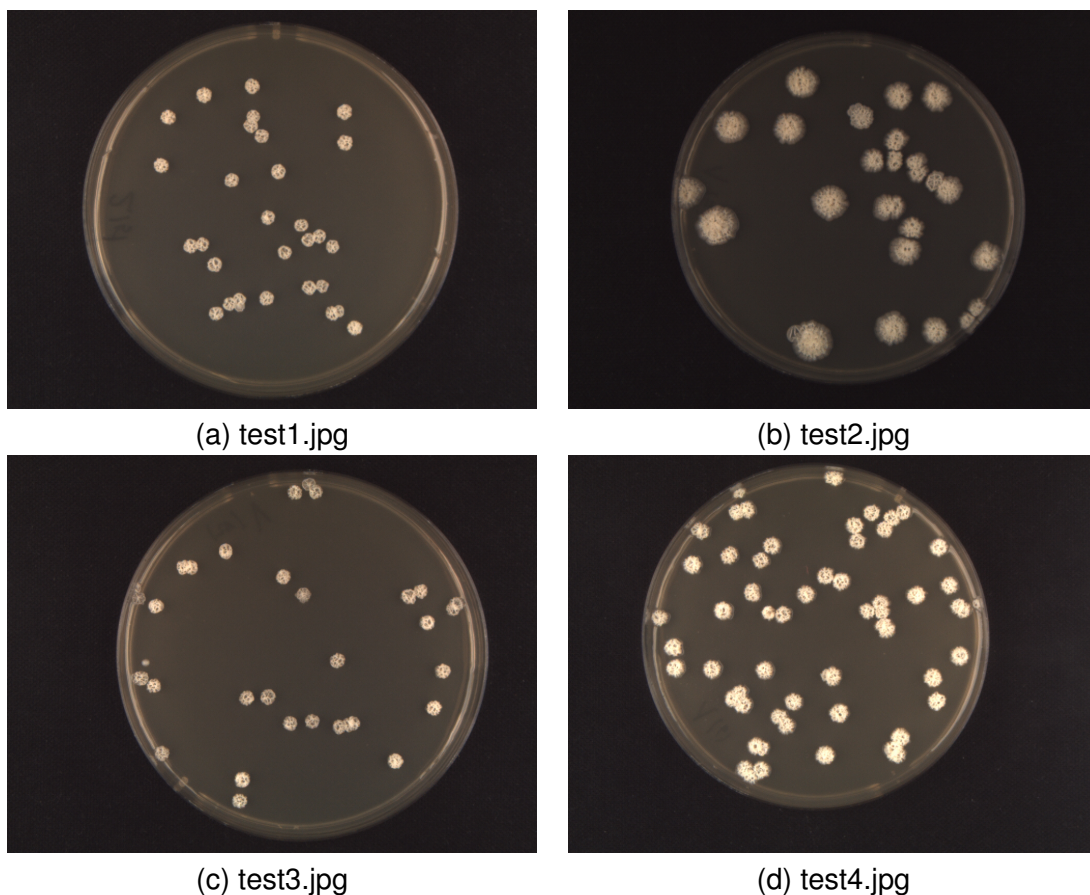
## 5 Experimenty a výsledky

Software Yeaster byl testován na datové sadě, která obsahovala obrázky kvasinek v Petriho miskách různého stáří. Stáří kvasinek ovlivňuje jejich velikost, strukturu povrchu a množství srůstů. Detekční algoritmus musí být tedy robustní zejména vůči těmto faktorům. Vzhledem k tomu, že obrázky jsou pořizovány v laboratorních podmínkách za přibližně stejných podmínek, nejsou ostatní parametry ovlivňující detekční algoritmus příliš podstatné.

Obrázek	Plocha [%]	Plocha [mm <sup>2</sup> ]	Detekováno	Odhad
test1.jpg	3.75	294.55	23	27
test2.jpg	5.06	397.40	19	27
test3.jpg	3.60	282.26	23	27
test4.jpg	12.15	953.93	37	49

Tabulka 2: Výsledky odhadu počtu kvasinek

Chyba odhadu počtu kolonií (do 10%) se může zdát být vysoká. Tato chyba je způsobena tím, že celkový počet kolonií není zjišťován analýzou obrazu srostlých shluků. Tento počet je odhadován pomocí jednoduché heuristiky, která celkový počet kolonií odhadne jako podíl celkové plochy, kterou kolonie v Petriho misce zabírají a průměrné plochy osamocené kolonie.



Obrázek 10: Testovaná data

Obrázek	Odhad	Skutečný počet	Chyba	Chyba [%]
test1.jpg	27	29	2	7.40
test2.jpg	27	27	0	0.00
test3.jpg	27	30	3	10.00
test4.jpg	49	53	4	7.50

Tabulka 3: Chyba odhadu počtu kolonií

## 6 Závěr

V první řadě je nutné znovu zdůraznit, že tento program pro automatickou detekci a odhad počtu kolonií v Petriho miskách je stále ve fázi vývoje a testování. Nicméně, již nyní bylo ukázáno, že automatické (resp. poloautomatické) vyhodnocování snímků kolonií na základě analýzy obrazu je možné. Při dalším vývoji tohoto software se zaměříme zejména na snížení chyby odhadu počtu kolonií důslednější analýzou obrazu srostlých kolonií a na přizpůsobení uživatelského rozhraní programu, vstupů a výstupů tak, aby vyhovovalo podmínkám používání v laboratořích.

**Tato zpráva vznikla za podpory grantu 1M0567 – Centrum Aplikované Kybernetiky.**

## 7 Výpis CDROM

CDROM:

```
DOC/  
    yeast.pdf  
IMG/  
    test_1.jpg  
    test_2.jpg  
    test_3.jpg  
    test_4.jpg  
EXE_LIB/  
    yeaster.exe
```