

Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais

Processamento de Imagens Digitais

Prof. Dr. Antonio Cesar Germano Martins

**Identificação e quantificação de algas unicelulares em imagens
com alto grau de ruído através de processamento de imagens
digitais**

Discente: Ana Lúcia Fermino de Oliveira Arine

Sorocaba, Novembro de 2015

RESUMO

A contagem de organismos unicelulares é uma ferramenta importante em ecologia e microbiologia. A quantificação visual, no entanto, é um método exaustivo e sujeito a erro humano, principalmente na determinação de grandes quantidades e amostras dessas células. Esse trabalho avaliou três métodos de identificação e quantificação de algas unicelulares (*Raphidocelis subcapitata*) a partir de imagens de câmera digital com alto grau de ruído de fundo. Foram desenvolvidos três algoritmos, sendo abordados o crescimento de regiões, a média de tamanho de células e a Transformada de Hough, devido ao formato circular que este organismo apresenta. Os resultados foram comparados com o método manual de contagem para as 25 imagens, utilizando-se o método estatístico do coeficiente de correlação de Pearson. O método de contagem por Transformada de Hough foi o que apresentou maior coeficiente de correlação de Pearson ($r = 0,98$) e uma média de erro de $4 \pm 3,6$ unidades da contagem manual. O método que utilizou crescimento de regiões para contabilizar as células apresentou $r = 0,97$ e média de erro de $1,4 \pm 1,7$. O resultado menos significativo foi apresentado pela média do tamanho celular, com $r = 0,90$ e média de erro de $5 \pm 4,1$ células. Os métodos utilizando Transformada de Hough e crescimento de regiões apresentaram potencial para aplicação em contagem automática de unidades de *Raphidocelis subcapitata*.

Palavras-chave: processamento de imagens digitais; contagem celular automática; microalga; *Raphidocelis subcapitata*; crescimento de regiões; Transformada de Hough.

1. Introdução

A contagem celular é uma atividade laboratorial realizada para diversas finalidades. As células sanguíneas, como hemárias ou eritrócitos, as plaquetas, por exemplo, são contabilizados para avaliação de saúde. A contagem de células somáticas no leite é feita para indicar infecção no organismo, uma vez que essas são células de defesa do animal e se multiplicam para combater diversos patógenos. No controle de qualidade de leite de vaca, faz-se a contagem total de bactérias, cujo valor numérico é expressado em unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro de leite, indicando as condições gerais de higiene na produção (EMBRAPA, 2015). Em ecologia, algas unicelulares ou fitoplâncton são quantificados para indicar densidade de população aquática e também qualidade ambiental, em unidade de número de células por volume. Em estudos toxicológicos, é comum o cultivo e contagem de algas unicelulares tanto como parâmetro de análise ecotoxicológica, em que o organismo-teste é a alga, como para servir de alimento controlado a outros organismos-teste.

Normalmente, quando não há uma frequência intensa, a contagem de células é realizada utilizando-se câmaras de contagem em microscópio óptico, as quais podem apresentar superfície quadriculada de dimensões conhecidas. A figura 1 ilustra o método de contagem de células utilizado em laboratório, em que se faz uma varredura em cada quadriculado da câmara ou em pontos amostrais com média, contabilizando-se visualmente as células presentes na sequência indicada.

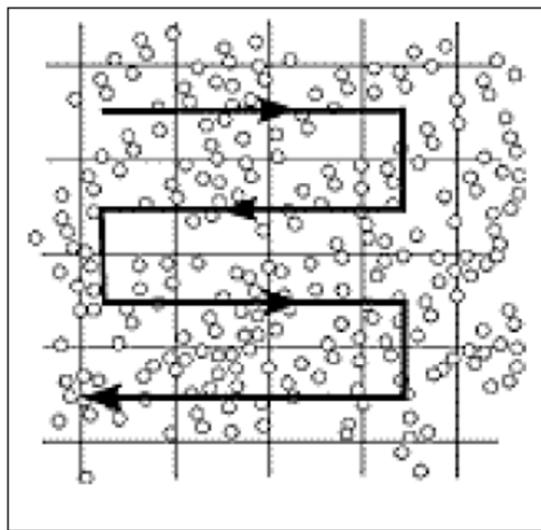


Figura 1. Esquema de contagem celular manual em câmara de contagem.

Contudo, a contagem manual de células é uma tarefa exaustiva, que requer atenção e cuidado por parte do operador, além de ser um método sujeito a erros significativos e consumir bastante tempo considerando que análises estatísticas requerem uma grande amostragem (Barber et al., 2001; Rodrigues et al., 2011).

Dessa forma, outros métodos para quantificação de células foram desenvolvidos, sendo a contagem visual utilizada em alguns casos apenas para confirmação do resultado adquirido por determinado método. A espectrofotometria, por exemplo, tem sido utilizada em casos apropriados para estimar a densidade de algas unicelulares, através de valores de absorbância conhecidos (Rodrigues et al., 2011). A elaboração de um método automático de contagem torna-se importante devido à economia de tempo, além da objetividade na determinação quando se trabalha com grandes quantias de amostras e elementos a serem quantificados. Esse recurso pode permitir bons resultados estatísticos e minimizar os erros entre experimentos de comparação (Barber et al., 2001).

O uso de imagem digital é uma abordagem que permite a enumeração automática e análise de amostras (Selinummi et al., 2005). Porém, programas de quantificação disponíveis comercialmente geralmente são caros e de difícil entendimento e uso, especialmente para não profissionais (Benali et al., 2003).

De acordo com Carpenter et al. (2006), a segmentação no processamento de imagens digitais é, provavelmente, o passo mais crítico para a seleção dos objetos de estudo na imagem, sendo um problema central em diversos estudos de análise celular. A determinação automática de limiar é normalmente baseada em análise estatística global ou local na imagem, de acordo com as intensidades do histograma. Contudo, na prática, a hipótese fundamental é muitas vezes violada, e o limiar sozinho produz resultados pobres de segmentação (Meijering, 2012). Brown et al. (1989) destacaram que até essa data, o uso de processamento de imagens digitais não era explorado para contagem celular, sendo a contagem manual muito empregada. Os autores desenvolveram um algoritmo para contagem, de modo que uma célula foi definida como um grupo de pixels conectados que estão abaixo de um dado limiar dos níveis de cinza.

A técnica de crescimento de regiões para contagem de células é um novo modelo apresentado nesse trabalho, até nosso conhecimento. Trata-se de algoritmo que encontra elementos dentro de uma imagem binarizada, após determinação de um limiar e eliminação de possíveis ruídos. Cada região é iterativamente crescida através da comparação de todos os pixels vizinhos não atribuídos à região. O processo de crescimento para quando a diferença de intensidade entre a média da região e o novo pixel se torna maior que o determinado limite (*threshold*).

A transformada de Hough é um método de detecção de curvas, em que explora a dualidade entre pontos em uma curva e os parâmetros da curva (Ballard, 1980). Para imagens que contenham traços e formas circulares, esse método pode ser aplicado para detectar determinado padrão. Barber et al. (2001) desenvolveram um novo método de contagem de colônias celulares a partir de processamento de imagens digitais envolvendo a transformada de Hough modificada, em que obtiveram resultados consistentes comparados à contagem manual.

A microalga *Raphidocelis subcapitata* é uma importante espécie internacionalmente empregada em testes ecotoxicológicos, pois possui biologia bem estudada e conhecida, é de fácil manuseio e cultivo, e é sensível a uma grande abrangência de substâncias, apresentando respostas de toxicidade em relação ao seu crescimento (U.S.EPA, 2012). Por ser um organismo primário

muito utilizado em ensaios de laboratório, em que sua toxicidade é medida através da contagem de organismos expostos a agente químico em comparação ao meio controle, é de grande importância a consolidação de um método automático de contagem, que contenha alto grau de confiabilidade, tendo em vista a alta quantidade de amostras que geralmente são geradas em testes toxicológicos, e que a contagem manual é um trabalho passivo de erros e subjetividades.

Em alguns casos de contagem celular, o profissional pode recorrer ao uso de softwares como o código aberto ImageJ, que realiza o processamento de imagens de forma relativamente simples (Ebenezer et al. 2012; Nancharaiah et al. 2007; McGivney 2013). Porém, esse recurso exige que a imagem apresente certo padrão de qualidade, com baixo grau de ruídos.

Imagens geradas a partir de microscópios ópticos podem apresentar ruídos diversos e baixa resolução devido à limitação no aumento, sendo que costuma-se acoplar câmera digital com zoom máximo ao microscópio para a captação da imagem. Os ruídos podem ser provenientes de poeira ou fungos nas lentes do microscópio, microbolhas de ar ou impurezas na solução contida na lâmina, e até mesmo impurezas e riscos na lâmina e lamínula.

O objetivo deste projeto foi criar um método de identificação e quantificação de algas unicelulares (*Raphidocelis subcapitata*) a partir de imagens de câmera digital acoplada a microscópio óptico. Com isso, esse trabalho descreve três métodos de contagem de algas: um novo método, levando em consideração a eliminação de ruído para aplicação do crescimento de regiões, e também para a aplicação da média do tamanho das algas, além do método da Transformada de Hough, sendo o resultado de cada método comparado com a contagem manual através do método estatístico do coeficiente de correlação de Pearson.

2. Materiais e Métodos

2.1. Organismo e preparo de lâminas

A microalga *R. subcapitata*, proveniente do laboratório de Microbiologia da UNESP – Sorocaba, foi cultivada em meio contendo micronutrientes, sob

constante iluminação e temperatura controlada, de acordo com o guia U.S.EPA (2012). Esse organismo chega a medir 10 µm de diâmetro, apresentando um formato arredondado, tipo meia-lua (figura 2). Por possuir formato de meio círculo, o método de Hough foi testado para esse organismo.



Figura 2. Microalga *R. subcapitata* vista sob microscopia eletrônica.
(Fonte: Algal web index - <http://algalweb.net/index-t-s.htm>)

Com uma pipeta de Pasteur, foi coletada uma pequena amostra da cultura de algas, a qual é geralmente concentrada na ordem de $1,5 \times 10^7$ células / mL , e disposta em frasco estéril com a mesma quantia aproximada de água deionizada. Foram acrescentadas 2 gotas de lugol, o qual auxilia na decantação das algas para facilitar sua visualização em microscópio. O frasco foi agitado para que a solução fosse homogeneizada. Com outra pipeta, foi coletada uma amostra da solução homogênea, dispondo-a sobre uma lâmina limpa de vidro, sendo recoberta com lamínula. Foram preparadas 10 lâminas para testar a visualização e disposição das algas.

Após 10 minutos, tempo necessário para a decantação das algas, cada lâmina foi levada ao microscópio óptico Zeiss® Axio Scope.A1 em lente objetiva com ampliação de 40x.

2.2. Aquisição e processamento de imagens

As imagens foram obtidas usando câmera digital acoplada ao microscópio, sendo a Olympus® Stylus XZ-10. Foram adquiridas 70 imagens,

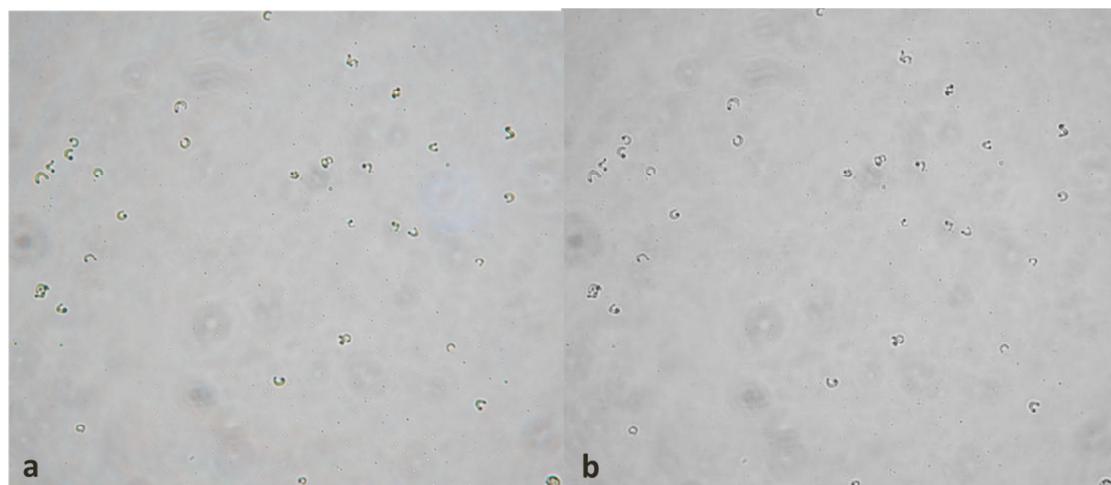
das quais puderam ser aproveitadas 25 devido à disposição das algas que, em muitos casos, se mostravam aglomeradas. As imagens foram reduzidas a 25% de resolução devido ao tamanho e dificuldade de processamento no tamanho original.

Os algoritmos de manipulação das imagens e contagem de células foram implementados no software Matlab R2011a. O resultado de cada sistema foi comparado com a contagem manual de cada imagem, de modo a atestar a eficiência estatística de acertos do algoritmo.

A seguir, estão apresentadas as sequências de operação para cada método a ser abordado.

2.2.1. Quantificação através de crescimento de regiões

A partir da imagem em RGB, alguns espaços de cor foram usados para analisar seus canais individualmente. Essa primeira avaliação se faz necessária para a escolha do canal adequado a ser utilizado no processamento da imagem, uma vez que as imagens apresentam alto grau de ruído e se buscou a forma que as algas mais se destacavam dessas impurezas. A figura 3 ilustra a imagem original em RGB, decomposta nos canais do espaço HSV e LAB.



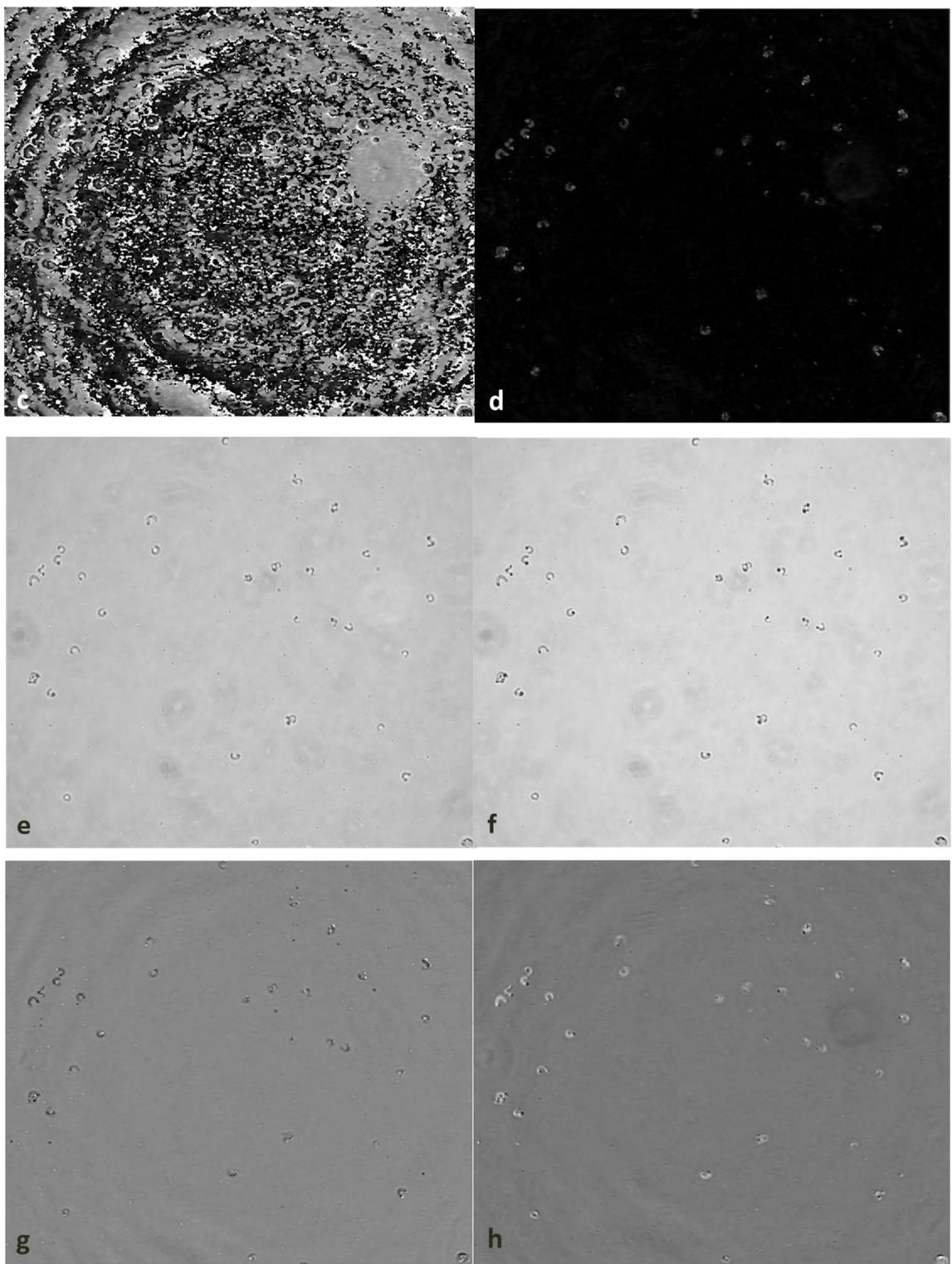


Figura 3. Exemplo de imagem decomposta nos canais: a) RGB (original); b) verde (G); c) matiz; d) saturação; e) valor; f) Iluminação (L); g) A (LAB); h) B (LAB).

Uma linha da imagem contendo tanto pixels referentes a alga quanto impurezas foi escolhida para gerar um gráfico de intensidade de pixels, sendo

uma forma de escolher numericamente o melhor canal de decomposição de imagens para o prosseguimento do processamento (figura 4).

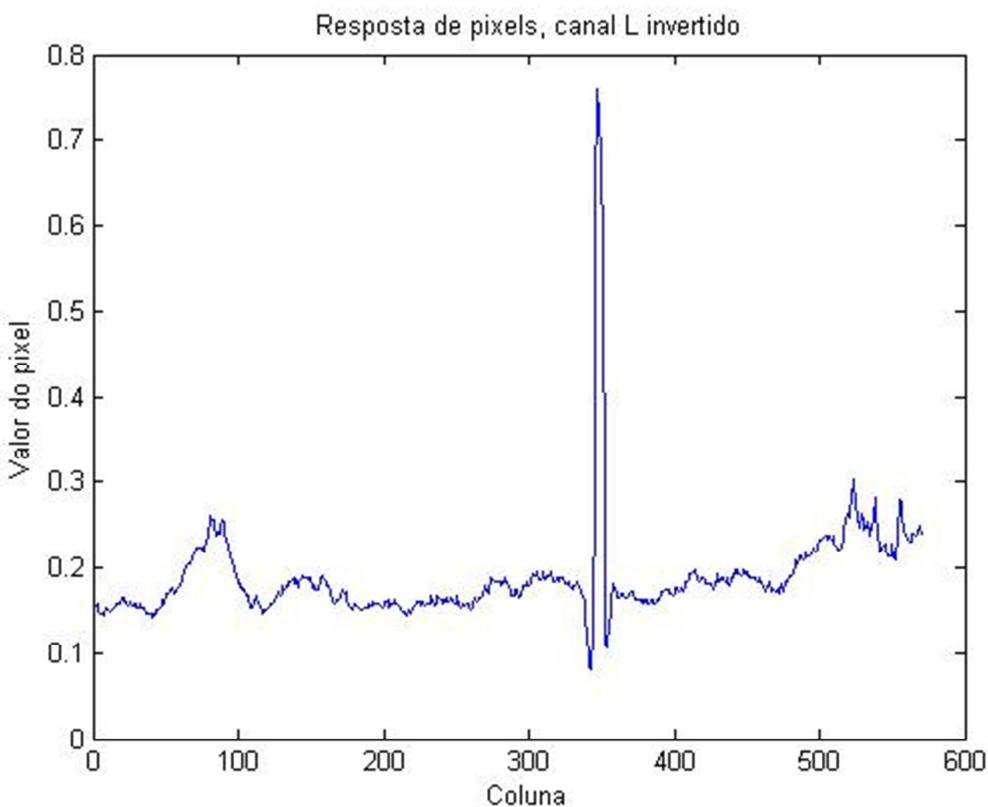


Figura 4. Exemplo de gráfico com valores de pixel em escala de cinza escalonados de 0 a 1 para canal L invertido de uma linha escolhida da imagem do exemplo anterior. Nota-se um pico distinto de valor acima de 0.7, o qual representa pixels referentes a uma unidade de alga.

Dessa forma, após escolher o canal que melhor distinguisse os pixels relativos a algas dos relativos a ruído, foi empregado algoritmo de agrupamento (*clustering*) por *k-means*, que é um método de quantização vetorial, originado do processamento de sinais. O método partitiona n observações em k agrupamentos, nos quais cada observação pertence ao cluster com a média mais próxima, que serve como um protótipo de agrupamento (Wagstaff et al. 2001). A figura 5 mostra um exemplo de agrupamento por *k-means*, em que utiliza 3 agrupamentos.

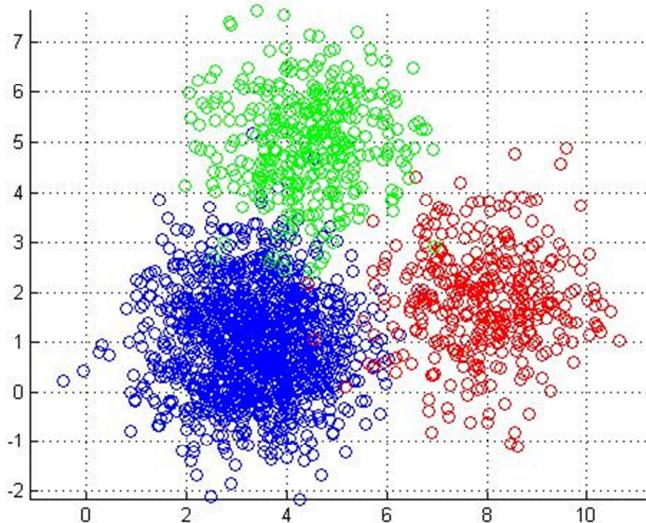


Figura 4. Ilustração de *clustering* por *k-means* com 3 agrupamentos.
 (Fonte: MatLab Central - <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/24616-kmeans-clustering>)

Anteriormente, o método do limiar de Otsu foi empregado, porém não apresentou resultados consistentes de segmentação. Após a determinação do número ótimo de agrupamentos, a imagem foi binarizada de acordo com o limiar adotado através de *k-means*. A operação de dilatação com uma matriz 3x3 foi aplicada, de forma que possíveis descontinuidades em uma célula fossem preenchidas, unindo os pixels do “corpo” que estivesse separado por pixels de fundo. Com isso, foi descrita a operação de quantificação por crescimento de regiões, com limites mínimo e máximo de pixels para as células quantificadas, sendo que acima do valor máximo o contador determinou duas ou mais células.

2.2.2. Quantificação através da média dos tamanhos

O algoritmo inicial foi utilizado assim como no passo anterior (crescimento de regiões), utilizando-se o mesmo canal de cor (iluminação) e segmentação por *k-means*. Foram escolhidas 5 imagens aleatórias para que o programa somasse o total de pixels referentes a algas de cada uma delas. Com isso, o tamanho total de algas em pixels foi dividido pela quantidade de

algas presentes em cada imagem (contadas manualmente), obtendo-se uma média de tamanho em pixels referente a uma única célula. Após obtido o valor médio do tamanho de uma célula, tal valor foi inserido no algoritmo, sendo o divisor da soma do total de pixels de cada imagem.

Kothari et al. (2009) realizaram contagem de células de tecido através de imagens digitais com processamento das imagens, utilizando a média do tamanho das células, de modo a se delimitar um intervalo para esse tamanho, sendo que tamanhos pequenos foram considerados ruído e tamanhos grandes considerados aglomerado de células. Essa mesma lógica foi aplicada nesse método, uma vez que a soma dos pixels pode ser considerada como um aglomerado de células.

2.2.3. Quantificação através da Transformada de Hough

Da mesma forma como nos passos anteriores, o canal escolhido para trabalhar com Transformada de Hough foi da iluminação (L) e segmentação através de *k-means*. Foi aplicada a matriz de dilatação e máscara de Canny para detecção de bordas. O intervalo de tamanho de raio foi definido para a Transformada de Hough, e a quantificação foi feita de acordo com a contagem de círculos encontrados na imagem binarizada.

Esse método é utilizado em diversos trabalhos devido à sua robustez na presença de ruídos, oclusão e iluminação variável.

A Transformada Circular de Hough (*Circular Hough Transform*) não é um algoritmo especificado rigorosamente, e há uma série de diferentes abordagens que podem ser tomadas em sua implementação. No entanto, de modo geral, existem três passos essenciais que são comuns a todas abordagens:

- a) Computação da disposição do acumulador;
- b) Estimativa do centro;
- c) Estimativa do raio.

3. Resultados e Discussão

3.1. Geração das imagens finais

Diversos canais foram avaliados para processamento das imagens, para que apresentassem a melhor neutralização do ruído de fundo (figura 3). Outra maneira de contornar a problemática do ruído de fundo poderia ser dado pela aquisição de imagem da lâmina vazia, de forma que fosse fácil reconhecer o padrão do ruído e eliminá-lo da imagem de interesse, como foi avaliado em um dos métodos testados por Barber et al. (2001).

Após uma análise visual das imagens e através do gráfico com a intensidade de valor de pixels referentes a células e a ruídos, pode-se escolher o canal que melhor distinguiu esses dois parâmetros, sendo o canal da iluminação (L).

Como esperado, o principal desafio para a implementação do algoritmo de quantificação foi a etapa de segmentação, já que as imagens apresentavam cor de fundo (*background*) ou iluminação muito próxima à das células, ocasionando em baixo contraste e impossibilitando a aplicação direta do limiar de Otsu. A segmentação utilizando *k-means* apresentou boa performance com 4 canais de segmentação, sendo que as algas foram determinadas pela média dos valores dos dois mais iluminados. A figura 5 ilustra a segmentação das algas em relação ao ruído e ao fundo.

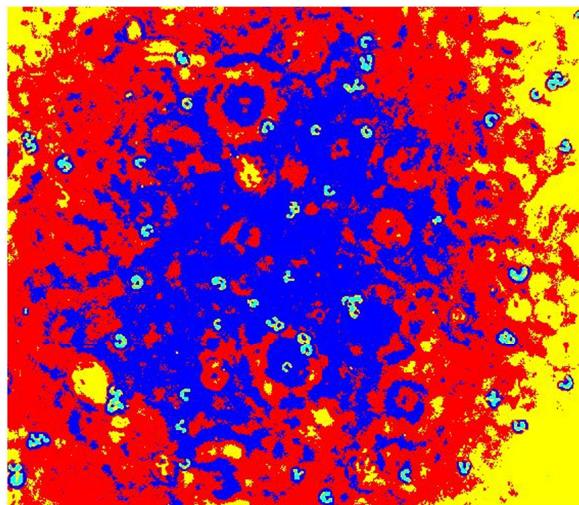


Figura 5. Segmentação de imagem por *k-means* utilizando 4 canais de clustering.

O resultado final da imagem para crescimento de regiões e média dos tamanhos está apresentado na figura 6, em que utilizou-se segmentação por *k-means* no canal da iluminação (LAB). Nota-se que a imagem original é dotada de significativos ruídos de fundo, os quais não foram eliminados com a aplicação de limiar de Otsu na banda da saturação.

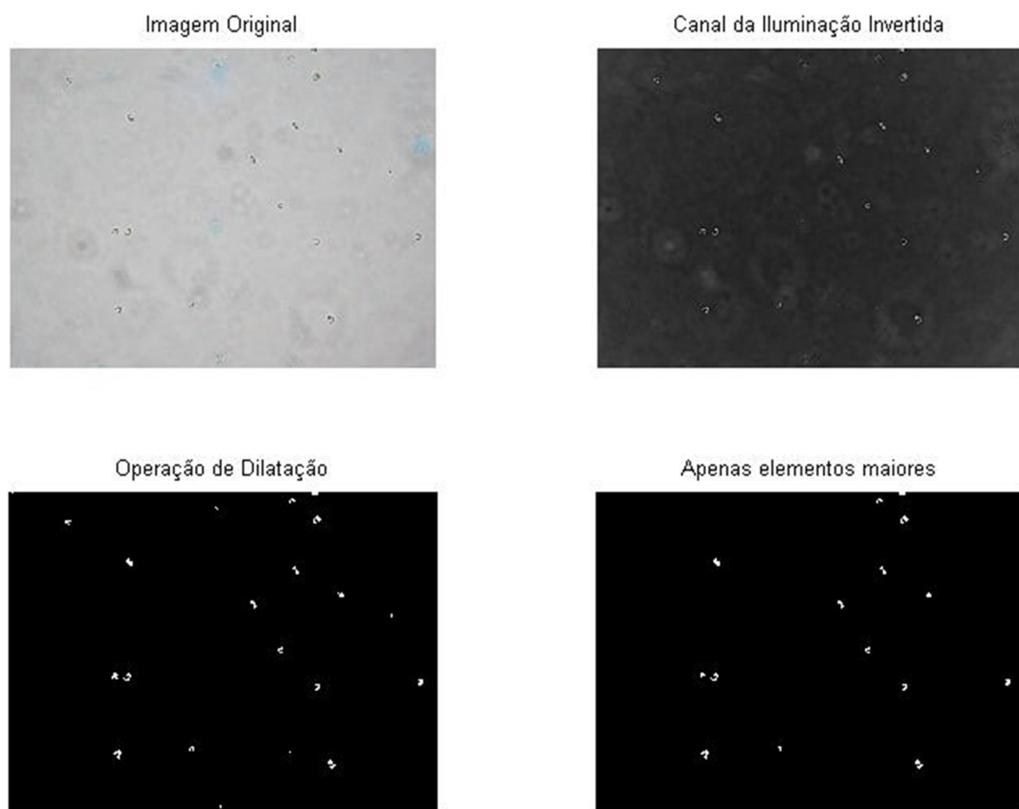


Figura 6. Segmentação de algas em imagem com alto grau de ruído. Imagem original em RGB (superior à esquerda), canal da iluminação invertida (superior à direita), imagem após aplicação da operação de dilatação (inferior à esquerda) e imagem final contendo apenas elementos maiores que 45 pixels (inferior à direita).

O valor médio de pixels referentes a uma célula, para a aplicação do método do tamanho médio, foi determinado usando 5 imagens e somando o total de pixels referentes às algas segmentadas em cada imagem (soma de pixels). Esse total foi dividido pela quantidade de algas em cada imagem, tanto determinada pelo método manual quanto pela contagem automática de crescimento de regiões. O valor médio para ambas as divisões resultou em 98 pixels, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Determinação do valor médio de pixels referente a uma alga para aplicação na quantificação automática por tamanho médio.

Figura	Soma de pixels	Contagem manual	Pixels por alga (manual)	Pixels por alga (automático)
1	3612	36	100	92.6
2	3322	37	90	94.9
3	1792	23	78	77.9
4	4666	43	109	108.5
5	5471	48	114	116.4
Média		98	98.06	

Para o método da transformada de Hough, a aplicação de máscara de detecção de borda de Sobel não apresentou acertos expressivos para detecção de todas as formas circulares. O filtro de Canny foi o mais adequado e detectou com mais precisão as algas dispostas nas imagens, conforme ilustra a figura 7.

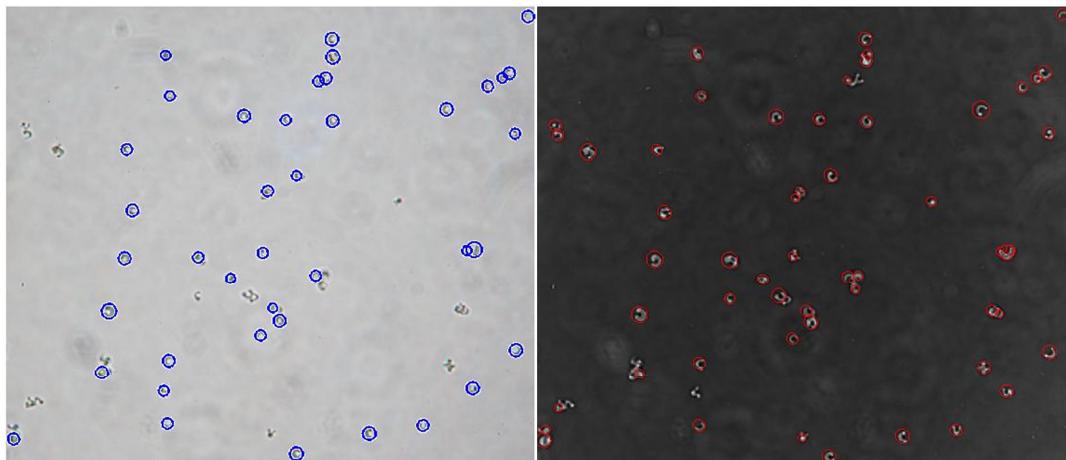


Figura 7. À direita, canal da saturação e filtro de Sobel; à esquerda, canal da iluminação e filtro de Canny. Nota-se que o segundo detectou formas circulares que representam as algas de forma mais expressiva do que o primeiro.

É importante ressaltar que para todos os métodos empregados, as condições das imagens adquiridas não necessariamente devem apresentar os mesmos padrões de iluminação e resolução. Apenas o estágio de desenvolvimento das algas é um fator determinante para se estipular o valor

mínimo e máximo de pixels que elas ocupam, assim como a faixa de raio de círculo que elas representam, no caso da aplicação do método de Hough.

3.2. Quantificação e análise estatística

A quantificação automática de cada método foi comparada com a contagem manual, conforme apresentado pela tabela 2. O erro refere-se ao módulo da diferença entre a contagem manual e a contagem automática de cada método. O método que utilizou crescimento de regiões para contabilizar as células apresentou média de erro de $1,4 \pm 1,7$, sendo o menor dentre os três métodos. A maior média de erro foi apontada pelo método de contagem pela média do tamanho celular, em que apresentou erro de $5 \pm 4,1$ células. Por fim, o método da Transformada de Hough apresentou média de erro de $4 \pm 3,6$ unidades.

Tabela 2. Valores de quantificação manual e automática pelos métodos de crescimento de regiões, média de tamanhos e Transformada de Hough e seus respectivos erros.

Imagen	Contagem manual	Crescimento de regiões (45 a 210 pixels)	Erro	Média de tamanhos (média de 98 px/célula)	Erro	Transformada de Hough	Erro
1	36	39	3	37	1	32	4
2	37	36	1	34	3	34	3
3	23	23	0	18	5	23	0
4	43	43	0	48	5	40	3
5	48	48	0	56	8	43	5
6	41	41	0	54	13	37	4
7	29	29	0	27	2	22	7
8	17	19	2	18	1	20	3
9	23	24	1	27	4	21	2
10	19	20	1	21	2	16	3
11	24	30	6	37	13	25	1
12	24	24	0	30	6	24	0
13	36	42	6	49	13	34	2
14	22	23	1	26	4	22	0
15	30	29	1	28	2	23	7
16	22	21	1	20	2	19	3
17	44	46	2	48	4	41	3
18	63	70	7	84	21	50	13
19	97	101	4	123	26	85	12
20	13	15	2	17	4	12	1
21	65	63	2	77	12	55	10
22	15	315	300	575	560	124	109
23	13	13	0	15	2	14	1
24	35	35	0	37	2	30	5
25	28	27	1	30	2	24	4

não foi inserido para estatística

As imagens de número 18, 19 e 22 apresentaram falha na segmentação. Mesmo após o processamento, não foi possível remover a mancha com os métodos apresentados (figura 8), sendo referente à falha na aquisição da imagem que resultou do mau posicionamento da câmera no suporte do microscópio. Por esse motivo, os resultados marcados em amarelo não foram computados no método estatístico, já que essas imagens não representam o padrão utilizado nesse trabalho.

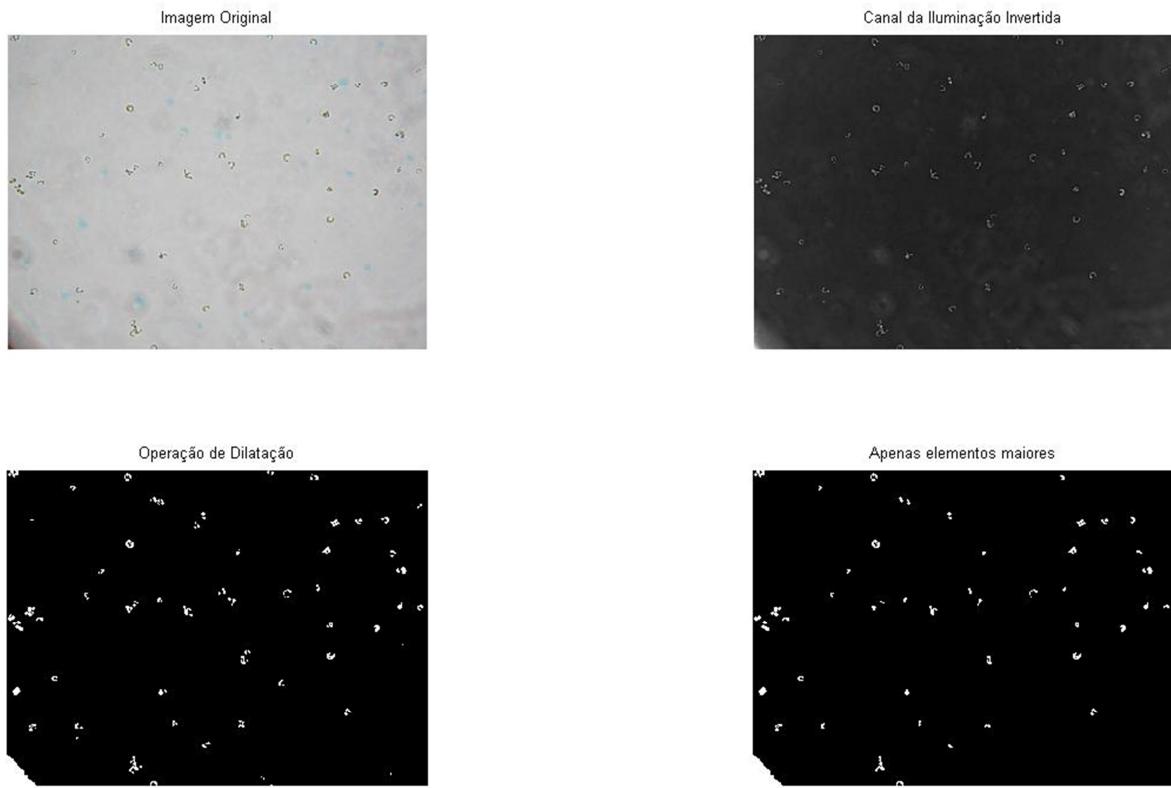


Figura 8. Falha na aquisição da imagem que comprometeu a segmentação das células em relação ao fundo.

Em contrapartida, esse tipo de imagem com falha devido à aquisição não impede a aplicação do método de Hough com relativo sucesso, observado pelas imagens 18 e 19. No geral, os erros foram superiores à media, porém o motivo foi a grande quantidade de células muito próximas umas das outras, o que dificultou a detecção de padrão circular para cada indivíduo.

A única imagem que não apresentou conformidade pelos três métodos automáticos de quantificação foi a de número 22, possivelmente por apresentar iluminação diferenciada das outras imagens, já que a segmentação não eliminou o ruído, que foi detectado para todos os métodos (figura 9).

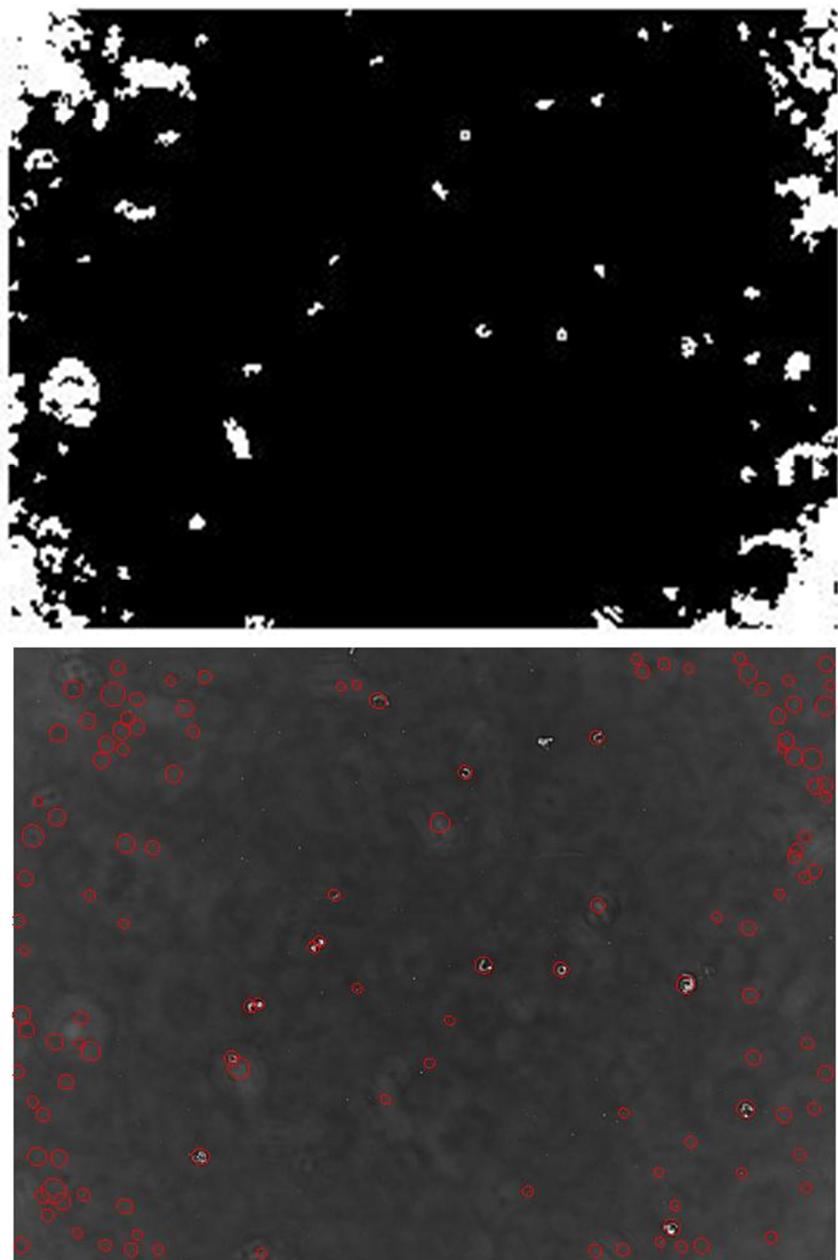


Figura 9. Resultado de segmentação de imagem com falha na aquisição (acima, crescimento de regiões; abaixo, Transformada de Hough). Nota-se que mesmo pelo método da Transformada de Hough foram encontrados padrões circulares referentes a ruído.

A figura 10 apresenta os valores de quantificação automática de cada método em relação à contagem manual, com seus respectivos coeficientes de correlação de Pearson.

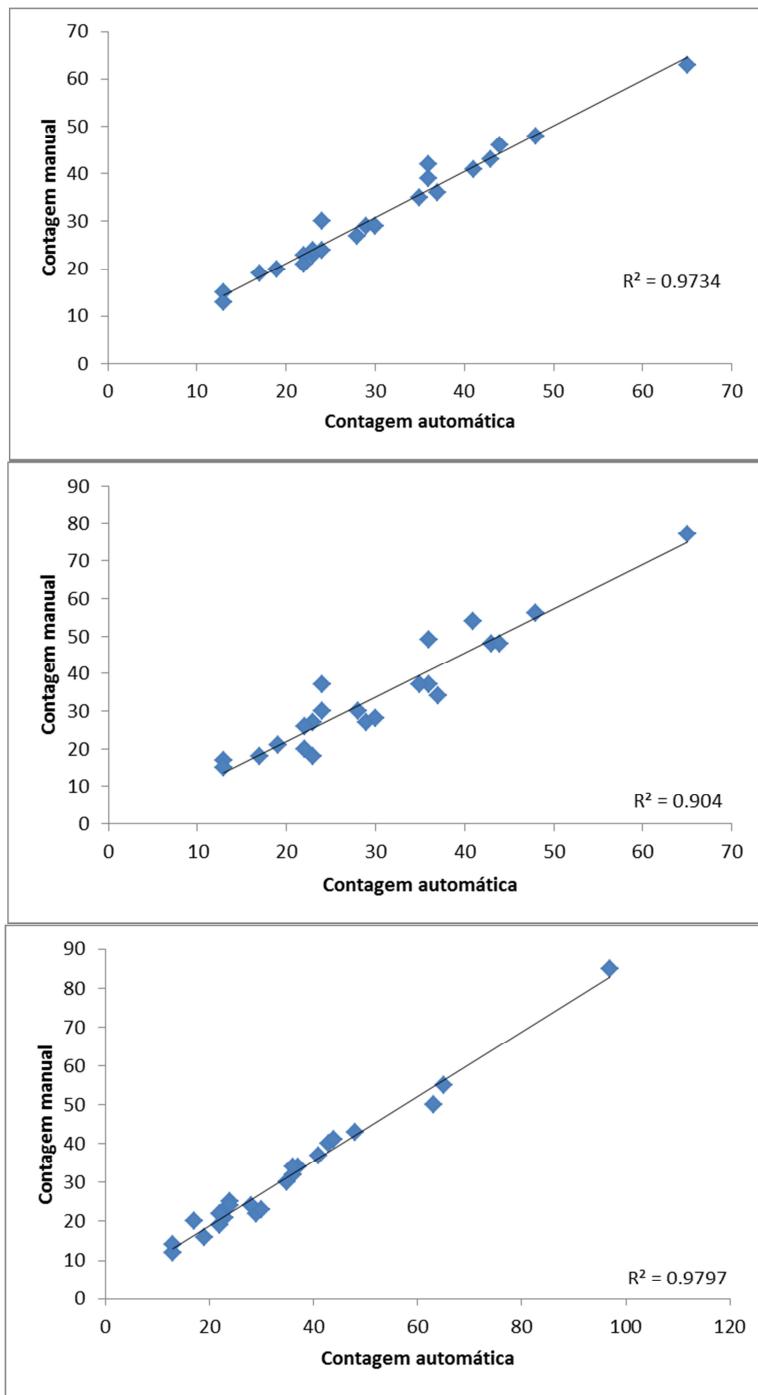


Figura 10. Coeficiente de correlação de Pearson para os métodos de contagem em relação à manual. De cima pra baixo, crescimento de regiões (45 a 210 pixels), média de tamanhos (média de 98 pixels por célula) e Transformada de Hough.

Nota-se que a contagem automática usando Transformada de Hough foi a que apresentou melhor coeficiente de correlação com a contagem manual ($r = 0,98$), mesmo envolvendo valores distintos de quantificação (referentes às

figuras 18 e 19). O resultado menos significativo foi apresentado pela média do tamanho celular, que ainda assim apresentou $r = 0,90$. O método de quantificação por crescimento de regiões apresentou $r = 0,97$.

Barber et al. (2001) desenvolveram dois métodos de quantificação de colônias de células, sendo um deles a Transformada de Hough modificada. Os autores compararam a média dos resultados de contagem automática em relação à manual, resultando em r entre 0,976 e 0,991. Dessa forma, pode-se mencionar que o método de quantificação automática apresentado nesse trabalho foi consistente e compatível com a literatura.

4. Conclusão

Os resultados de contagem automática apresentaram-se próximos aos valores manualmente obtidos, sendo também compatíveis com dados da literatura.

Os métodos utilizando Transformada de Hough e crescimento de regiões apresentaram resultados mais consistentes e têm, portanto, potencial para aplicação em contagem automática de unidades de *Raphidocelis subcapitata*. Esses métodos apresentaram menores taxas de erro e maior aproximação da quantidade real de algas em cada imagem.

Recomenda-se, ainda, a comparação dos resultados aqui obtidos com resultados de quantificação pelo software livre ImageJ com as mesmas imagens, desde que tal programa é amplamente utilizado por laboratórios e pesquisadores.

5. Referências

Paul R Barber, Borivoj Vojnovic, Jane Kelly, Catherine R Mayes, Peter Boulton, Michael Woodcock and Michael C Joiner. Automated counting of mammalian cell colonies. Physics in medicine and biology, 46 (2001) 63–76

Benali, A., I. Leefken, U.T. Eysel, and E. Weiler. 2003. A computerized image analysis system for quantitative analysis of cells in histological brain sections. J. Neurosci. Methods 125:33-43

Lewis M. Brown, Irene Gargantini, D. James Brown, Harvey J. Atkinson, J. Govindarajan and Gregory C. Vanlerberghe. Computer-based image analysis for the automated counting and morphological description of microalgae in culture. *Journal of Applied Phycology* 1: 211-225, 1989.

Anne E Carpenter, Thouis R Jones, Michael R Lamprecht, Colin Clarke, In Han Kang, Ola Friman, David A Guertin, Joo Han Chang, Robert A Lindquist, Jason Moffat, Polina Golland and David M Sabatini. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology* 2006, vol. 7, issue 10, R100

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Sistemas de produção de leite para diferentes regiões do Brasil. 2011 Disponível em <<http://www.cnpq.embrapa.br/sistemaproducao/>>

Kothari et al. (2009). Automated cell counting and cluster segmentation using concavity detection and ellipse fitting techniques. 978-1-4244-3932-4/09/\$25.00
©2009 IEEE

Vinitha Ebenezer, Y. Venkata Nancharaiah, V.P. Venugopalan (2012). Chlorination-induced cellular damage and recovery in marine microalga, *Chlorella salina*. *Chemosphere* 89 (2012) 1042–1047

Erik Meijering. Cell Segmentation: 50 Years Down the Road. *IEEE SIGNAL PROCESSING MAGAZINE, life SCIENCES* , p 140-145. set. 2012

McGivney, E (2007) “Comparison of UV-C and Vacuum-UV induced AOT on the acture mortality of microalgae” TRITA-LWR Degree Project 13:24, p. 31

Lúcia Helena Ribeiro Rodrigues, Alexandre Arenzon, Maria Teresa Raya-Rodriguez and Nelson Ferreira Fontoura. Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae

Pseudokirchneriella subcapitata. Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology Vol. 3(8), pp. 225-228, 2011.

Jyrki Selinummi, Jenni Seppälä, Olli Yli-Harja, and Jaakko A. Puhakka. Software for quantification of labeled bacteria from digital microscope images by automated image analysis. BioTechniques, v. 39, p. 859-863, 2005

U.S.EPA (2012) – United States Environmental Protection Agency. Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.4500: Algal Toxicity

Wagstaff, K., Cardie, C., Rogers, S., & Schrödl, S. (2001, June). Constrained k-means clustering with background knowledge. In ICML (Vol. 1, pp. 577-584).

Yarlagadda V . Nanchariah, Mohanraj Rajadurai, and Vayalam p. Venugopalan. Single Cell Level Microalgal Ecotoxicity Assessment by Confocal Microscopy and Digital Image Analysis. Environ. Sci. Technol. 2007, 41, 2617-2621