Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 8, Number 2 (07-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Investigate the feasibility of using image processing method for the count of bacteria and comparison with Colony Counter

Javad Akbarian Mymand[1], Samaneh Faraji Kafshgari[1] .Alireza Sadeghi Mahounak[1], Syeyed Abdollah Hoseini Sharghi [1], Mehdi Vatankhah[2]

1. Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resource university of Gorgan, Gorgan, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University of Sabzevar, Sabzevar.Iran

Article Information

Article history:
Received:2014/01/16
Accepted:2014/07/10
Available online:2014/07/20

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 1393; 8(2): P 8-13

Corresponding author at:

Mrs. Samaneh Faraji Kafshgari

Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resource university of Gorgan, Gorgan, Iran.

Email:
samanefaraji_90@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Considering the importance of quality and bacterial contamination in food products, a rapid, accurate and able method to deliver consistent results for counting bacteria is an essential. Application of image processing in the measurement of quality is one of important research topics. This method is very accurate and non-destructive with constant results. The aim of this study was the use of image processing in bacterial count (Quail flora, sourdough and drinks kefir) and comparison with Colony Counter method.

Materials and Methods: First, of intestinal microbial flora Quail, sourdough and drink kefir, Dilutions were prepared from 10^{-1} to 10^{-9}. Then respectively in plate count agar, YGC agar and MRS agar were cultured surface (Quail flora and lactic acid bacteria in drink kefir at 37 ° C and yeast in sourdough at 25 °C). After 24 hours, colonies grown by Colony Counter and Image J software were counted in triplicate.

Results: The results showed that in dilutions of 10^{-5} to 10^{-9}, don't difference between the numbers reported by the two methods but in dilutions of 10^{-1} to 10^{-4}, there were significant difference between the numbers reported by the two methods.

Conclusions: According to the results of this research can be introduced image processing an accurate and rapid method for bacterial count.

Key Words: image processing, Bacterial Colony, colony counter, Image J.

Copyright © 2014 Iranian journal of medical microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Akbarian Mymand M, Farji Kafshgari S, Sadeghi Mahounak A, Hoseyni Sharghi S, Vatan Khah M. Investigate the feasibility of using image processing method for the count of bacteria and comparison with Colony Counter. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (2) :8-13

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۸ – شماره ۲ – تابستان ۱۳۹۳

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی امکان استفاده از روش پردازش تصویر در شمارش کلنی باکتری‌ها و مقایسه آن با روش کلنی کانتر

محمدجواد اکبریان میمند[۱]، سمانه فرجی کفشگری[۱]، علیرضا صادقی ماهونک[۱]، سید عبدالله حسینی شرقی[۱]، مهدی وطن‌خواه[۲]

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،گرگان ، ایران

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، سبزوار، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۳/۰۳/۱۵

پذیرش:۱۳۹۳/۰۵/۲۰

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۵/۲۶

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM 1392; 8(2): P 8-13

نویسنده مسئول:

سمانه فرجی کفشگری

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،گرگان ، ایران

تلفن: ۰۹۳۹۸۲۰۷۷۰۴

پست الکترونیک:

samanefaraji_90@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: شمارش کلنی‌های باکتری یک امر پیچیده برای میکروبیولوژیست‌ها می‌باشد. شمارش دقیق کلنی‌ها در اندازه‌های زیاد، به توانایی دیدن دقیق کلنی‌ها بستگی دارد. در این پژوهش، یک روش شمارش کلنی‌ها با نتایج دقیق‌تر، کارایی بیشتر و موثرتر نسبت به سیستم‌های قدیمی پیشنهاد می‌کنیم که در ظرف چند دقیقه کلنی‌ها را شمرده و موجب صرفه‌جویی در زمان می‌شود. پردازش تصویر روش بسیار دقیقی بوده و در عین غیر مخرب بودن، نتایج ثابتی را ارائه می‌دهد. هدف از این پژوهش، استفاده از روش پردازش تصویر با نرم افزار ایمیج جی جهت شمارش کلنی باکتری‌ها و مقایسه آن با روش قدیمی کلنی‌کانتر بود.

مواد و روش کار: ابتدا با استفاده از محلول سرم فیزیولوژی (۸/۵ گرم کلرید سدیم در لیتر) از فلورهای میکروبی روده بلدرچین، خمیر نانوایی و نوشیدنی کفیر، رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-9} تهیه شد. سپس به‌ترتیب در محیط کشت‌های پلیت کانت آگار، YGC آگار و MRS آگار، کشت سطحی داده و در انکوباتور گرمخانه گذاری شدند. کلنی‌های رشد کرده توسط کلنی‌کانتر و نرم افزار ایمیج جی در سه تکرار شمارش شدند.

یافته‌ها: در رقت‌های 10^{-5} تا 10^{-9}، بین اعداد گزارش شده توسط دو روش شمارش کلنی‌کانتر و پردازش تصویر، تفاوتی دیده نشد، اما در رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-4} تفاوت قابل توجهی وجود داشت که با تکرار آزمون‌ها به صحت عدد گزارش شده توسط پردازش تصویر پی برده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این پژوهش، می‌توان روش پردازش تصویر را به‌عنوان یک روش دقیق و سریع در شمارش کلنی باکتری‌ها معرفی نمود.

کلمات کلیدی : پردازش تصویر، کلنی کانتر، کلنی باکتری، ایمیج جی.

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

در روش‌های سنتی، کلنی‌ها با استفاده از دست یا کلنی کانتر دستی شمارش می‌شدند. شمارش دستی فرآیندی پر زحمت و زمان‌بر بوده و به علت خستگی چشم بسیار مستعد خطاست (۱).

پردازش تصویر دانش جدیدی است که سابقه آن به پس از اختراع رایانه‌های رقمی برمی‌گردد، با این حال، این علم نوپا در چند دهه اخیر از هر دو جنبه نظری و عملی پیشرفت‌های چشم‌گیری داشته است. با توجه به اهمیت کیفیت ظاهری در درجه‌بندی محصولات غذایی و کشاورزی و تأثیر عواملی چون مساحت، محیط، قطر، یکنواختی و عیوب مختلف بر محصول و همچنین توانایی تشخیص این ویژگی‌ها با هزینه‌های خیلی پایین توسط ماشین بینایی(Computer Vision)، به نظر می‌رسد که ماشین

بینایی (پردازش تصویر) از بین سایر روش‌های غیرمخرب، بهترین روش باشد (۲). ماشین بینایی، تکنولوژی تهیه و آنالیز تصاویر یک صحنه واقعی به‌وسیله کامپیوتر در راستای کسب اطلاعات یا کنترل یک فرایند است (۳). تکنیک پردازش تصویر کاربردهای فراوانی در پزشکی، صنایع غذایی و کنترل کیفیت مواد دارد. در پردازش تصویر با استفاده از بعضی عملیات ریاضی نظیر تشخیص لبه به‌وسیله گرادیان و یا اعمال فیلترهای مناسب ویژگی‌های تصویر نظیر لبه‌ها، خطوط انحناها، گوشه‌ها و مرزها را می‌توان استخراج کرد. استخراج این ویژگی‌ها، نمایش و تحلیل صحنه‌های تصویر را آسان‌تر می‌سازد. یک تصویر از لحظه ورود به سیستم پردازش تصویر تا تولید تصویر خروجی، به‌ترتیب مراحل زیر را طی می‌کند:

مرحله اول دریافت تصویر ورودی می‌باشد که در این مرحله تصویر از ورودی خوانده شده وارد سیستم می‌گردد. تصویر ورودی می‌تواند بر روی ابزار ذخیره‌سازی بوده و یا از یک دوربین گرفته شود. در مرحله بعد تصویر پیش‌پردازش می‌شود، یعنی تصویر ارتقاء می‌یابد و مولفه‌های غیر ضروری از تصویر حذف می‌گردد. مرحله بعدی همان پردازش تصویر است که هدف کلی در این مرحله شناسایی ویژگی‌های تصویر مانند نقاط ویژه و انحناها است که از آن‌ها بتوان برای کاربرد مورد نظر خود استفاده کرد. در مرحله بعد تصویر، با استفاده از ویژگی‌های استخراج شده از آن با روش‌هایی مانند استفاده از شبکه‌های عصبی مصنوعی آنالیز می‌گردد (۴).

کلیه سیستم‌های کنترل اتوماتیک، اساساً از یک دوربین، کامپیوتر و سیستم نوردهی تشکیل می‌شوند. چنین سیستمی، ماشین بینایی نامیده می‌شود که در اندازه‌گیری و بررسی محصولات کشاورزی و مواد غذایی موفق عمل کرده است. روش‌های سنتی ارزیابی ظاهری در تعیین کیفیت مواد غذایی کاربرد زیادی دارند، ولی این روش‌ها زمان بر و پر هزینه هستند. این عوامل سبب ایجاد انگیزه‌ای در توسعه روش‌های جایگزین شده‌اند که بتوانند در زمان کمتر و با دقت بیشتر، ویژگی‌های محصول را ارزیابی نمایند. یکی از این روش‌های جایگزین، پردازش تصویر است که نمونه بارز کاربرد آن درصنعت غذا است. صرفه اقتصادی، دائم بودن، سرعت بالا، دقت و غیر مخرب بودن از دلایل اصلی استفاده از پردازش تصویر در این صنعت است (۳). عناصر اصلی پردازش تصویر، اندازه گیری بصری و توصیف محصولات غذایی در تصاویر است که می‌توان از خصوصیات تصاویر، ویژگی‌های کیفی محصول را استخراج و به‌عنوان شاخص کیفیت مطرح کرد. در روش پردازش تصویر، مرحله اول، دریافت تصویر ورودی است که در این مرحله تصویر از ورودی خوانده شده و وارد سیستم می‌گردد. تصویر ورودی می‌تواند روی ابزار ذخیره‌سازی بوده و یا از دوربین یا وبکم گرفته شود. این مرحله شامل دریافت تصویر و پردازش مقدماتی آن است. دریافت تصویر در واقع تبدیل سیگنال الکترونیکی قسمت حس‌گر(مشاهده‌گر) به شکل عددی است. دریافت یا رقمی نمودن (Digitizing) توسط صفحهٔ‌پردازش‌گر تصویر (Frame Grraber) انجام می‌شود. رقمی کردن تصویر با تقسیم یک ناحیه به تعداد مقتضی پیکسل صورت می‌گیرد. طبیعی است ارزش هر پیکسل صفر یا یک است و در صورتی‌که بخواهیم محدوده‌ای از روشنایی را بیان کنیم، به‌صورت عددی بین صفر و یک بیان می‌کنیم. البته در مورد تصاویر رنگی، برای تعریف هر رنگ اصلی در هر پیکسل، روند کمی پیچیده‌تر می‌شود. هموار کردن تصویر و پردازش مقدماتی آن به معنی حذف انحرافات شدید درتصویر ورودی است. پردازش اولیه با تصحیح تغییرات ناخواستهٔ هندسی، حذف پارازیت، تصحیح سطح خاکستری، تصحیح تیرگی و تشدید ویژگی‌های مهم مورد نظر در داده‌های خام تصاویر اولیه، به بهبود کیفیت تصاویر اولیه کمک می‌کند (۵-۴). با توجه به دقت و سرعت پردازش تصویر، این تحقیق به دنبال استفاده از این تکنولوژی در شمارش میکروارگانیسم‌هاست. بدین منظور از نرم افزار ایمیج جی (Image J) در جهت شمارش فلور میکروبی بلدرچین، خمیر نانوایی و نوشیدنی کفیر استفاده و در نهایت نتایج حاصل با نتایج حاصل از کلنی کانتر مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

روش کشت

ابتدا از نمونه‌ها (فلور میکروبی روده بلدرچین، خمیر نانوایی و نوشیدنی کفیر) با استفاده از محلول سرم فیزیولوژی (۸/۵ گرم کلرید سدیم در لیتر) رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-9} تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از رقت‌های تهیه شده از فلور میکروبی روده بلدرچین، خمیر نانوایی و نوشیدنی کفیر، به‌صورت سطحی روی محیط کشت‌های پلیت کانت آگار، YGC آگار و MRS آگار (ساخت شرکت مرک آلمان) به ترتیب کشت داده و در انکوباتور (بایندر- آمریکا) گرم‌خانه‌گذاری شدند (فلور میکروبی موجود در روده بلدرچین و باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در نوشیدنی کفیر در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و مخمر نانوایی موجود در خمیر نانوایی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس). پس از ۲۴ ساعت،

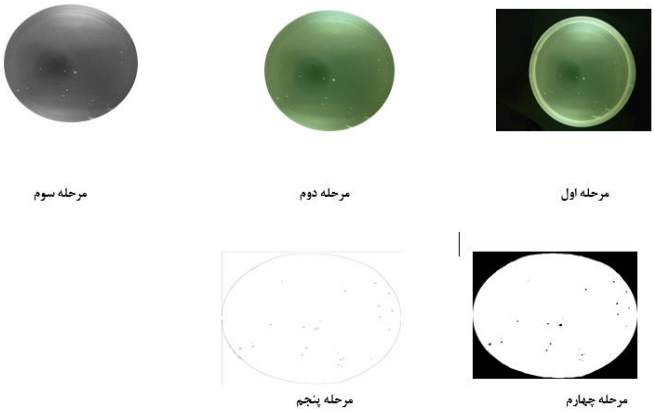
کلنی‌های رشد کرده به وسیله کلنی کانتر (ساخت شرکت فن آزما گستر) و نرم افزار ایمیج جی (1,43 u) در سه تکرار شمارش شدند (۶-۸).

روش استفاده از دستگاه کلنی کانتر جهت شمارش میکروارگانیسم‌ها:

جهت شمارش، پلیت‌ها روی دستگاه کلنی کانتر قرار داده و با ماژیک روی کلنی‌ها علامت گذاشته و سپس شمارش شدند (۶).

روش استفاده از نرم افزار ایمیج جی جهت شمارش میکروارگانیسم‌ها:

ابتدا عکس مورد نظر را در نرم افزار ایمیج جی باز کرده و سپس قسمت مورد نظر برش داده شد. پس از آن، از قسمت منوی Image، عکس را به 8-bit تبدیل کرده و با استفاده از پلاگین ITCN و قسمت Result موجود در پلاگین، تعداد سلول-ها شمرده شد (۹).



شکل ۱- مراحل شمارش باکتری به‌وسیله نرم‌افزار ایمیج جی

یافته‌ها

نتایج مربوط به شمارش فلور میکروبی روده بلدرچین با دو روش کلنی کانتر و پردازش تصویر در جدول شماره ۱ آمده است. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در رقت‌های 10^{-7} تا 10^{-9}، بین نتایج شمارش دو روش کلنی کانتر و نرم افزار ایمیج جی تفاوت ناچیزی وجود داشت و در سایر رقت‌ها تفاوت مشاهده شده، قابل توجه بود که این تفاوت بیشتر ناشی از تراکم در کلنی‌هاست، که نرم افزار ایمیج جی قادر به تفکیک این کلنی-های متراکم از هم بوده است. در واقع از نظر اعتبار آماری، فقط نتایج شمارش صفحه‌هایی که بین ۳۰۰-۳۰ پرگنه دارند، ثبت می‌گردند (۱۰). همان‌طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می-شود در رقت‌های 10^{-2} و 10^{-3} تعداد کلنی‌های شمارش شده به وسیله کلنی کانتر در محدوده ۳۰۰-۳۰ هستند در صورتی که تعداد کلنی‌های شمارش شده به وسیله نرم افزار ایمیج جی در خارج از محدوده ۳۰۰-۳۰ هستند. در نمونه‌هایی که اختلاف وجود داشت شمارش کلنی‌ها با دقت بالاتری شمارش شد که عدد گزارش شده مشابه عدد مربوط به نرم افزار ایمیج جی بود. این آزمون در سه تکرار انجام گرفت و نتایج حاصل از شمارش با کلنی کانتر به علت خطای چشمی دارای نتایج یکسانی نبود، ولی نتایج حاصل از نرم افزار ایمیج جی دارای نتایج یکسانی بود.

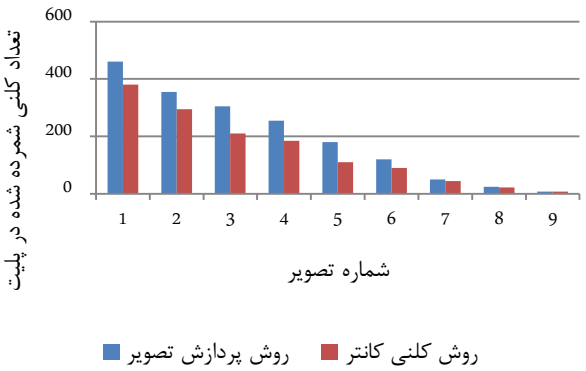
جدول ۱، تعداد باکتری‌های شمارش شده در فلور میکروبی روده بلدرچین

ردیف	رقت	تصویر	تعداد باکتری (۱)	تعداد باکتری (۲)
۱	10^{-1}	۱	۳۸۰	۴۶۰
۲	10^{-2}	۲	۲۹۵	۳۵۵
۳	10^{-3}	۳	۲۱۰	۳۰۵
۴	10^{-4}	۴	۱۸۵	۲۵۵
۵	10^{-5}	۵	۱۱۰	۱۸۰
۶	10^{-6}	۶	۹۰	۱۲۰
۷	10^{-7}	۷	۴۵	۵۰
۸	10^{-8}	۸	۲۳	۲۵
۹	10^{-9}	۹	۸	۸

* هر کدام از رقت ها سه بار شمارش و عدد میانگین ثبت شد.

(۱): تعداد باکتری های شمارش شده با کلنی کانتر.

(۲): تعداد باکتری های شمارش شده با استفاده از نرم افزار ایمیج جی



شکل ۲: مقایسه تعداد کلنی شمرده شده با پردازش تصویر و کلنی کانتر

نتایج مربوط به شمارش تعداد مخمر در خمیر نانوایی نیز در جدول شماره ۲ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در رقت‌های 10^{-7} تا 10^{-9} بین نتایج حاصل از کلنی کانتر و نرم افزار ایمیج جی تفاوت کمی وجود دارد اما در رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-7} تفاوت مشاهده شده قابل توجه بود که پس از بررسی و شمارش دقیق عدد ثبت شده مشابه عدد نرم افزار بود. همان‌طور که در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود در رقت 10^{-1} تعداد کلنی‌های شمارش شده به وسیله کلنی کانتر در محدوده ۳۰۰-۳۰ هستند در صورتی که تعداد کلنی‌های شمارش شده به وسیله نرم افزار ایمیج جی در خارج از محدوده ۳۰۰-۳۰ هستند. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود با افزایش رقت و کاهش تراکم و تعداد باکتری‌ها اختلاف عدد ثبت شده برای هر دو روش کم می‌شود.

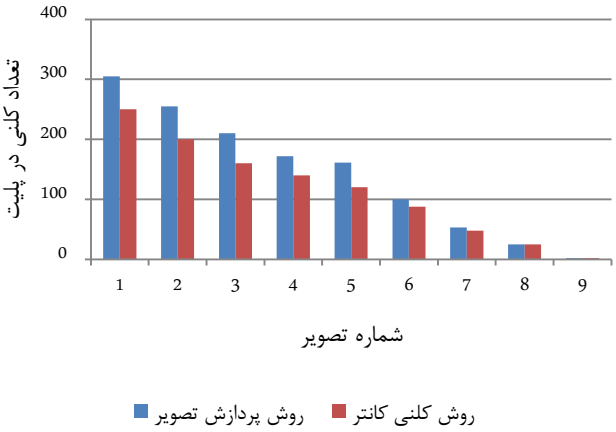
جدول ۲: تعداد باکتری‌های شمارش شده در خمیرنانوایی

ردیف	رقت	شماره تصویر	تعداد باکتری‌ها	تعداد باکتری‌ها
۱	10^{-1}	۱	۲۵۰	۳۰۵
۲	10^{-2}	۲	۲۰۰	۲۵۵
۳	10^{-3}	۳	۱۶۰	۲۱۰
۴	10^{-4}	۴	۱۴۰	۱۷۲
۵	10^{-5}	۵	۱۲۰	۱۶۱
۶	10^{-6}	۶	۸۸	۱۰۰
۷	10^{-7}	۷	۴۸	۵۳
۸	10^{-8}	۸	۲۵	۲۵
۹	10^{-9}	۹	۲	۲

* هر کدام از رقت ها سه بار شمارش و عدد میانگین ثبت شد.

(۱): تعداد باکتری های شمارش شده با کلنی کانتر.

(۲): تعداد باکتری های شمارش شده با استفاده از نرم افزار ایمیج جی



شکل ۳: مقایسه تعداد کلنی شمرده شده با پردازش تصویر و کلنی کانتر

نتایج مربوط به شمارش تعداد اسید لاکتیک باکتری ها در نوشیدنی کفیر در جدول شماره ۳ آمده است. همانطور که مشاهده می شود تنها در رقت 10^{-9} بین نتایج حاصل از کلنی کانتر و نرم افزار ایمیج جی تفاوتی وجود نداشت. رقت‌های 10^{-1} و 10^{-2} به علت تراکم زیاد کلنی ها غیر قابل شمارش بودند و در سایر رقت‌ها پس از شمارش مجدد و دقیق تر با کلنی کانتر، عدد ثبت شده مشابه عدد نرم افزار بود که علت خطای کلنی کانتر مربوط به خطای چشمی و عدم تمرکز آزمایش‌گر بوده است. همان‌طور که در جدول شماره ۳ مشاهده می‌شود، در رقت‌های 10^{-4} و 10^{-5} تعداد کلنی‌های شمارش شده به وسیله کلنی کانتر در محدوده ۳۰۰-۳۰ هستند در صورتی که تعداد کلنی‌های شمارش شده به وسیله نرم افزار ایمیج جی در خارج از محدوده ۳۰۰-۳۰ هستند.

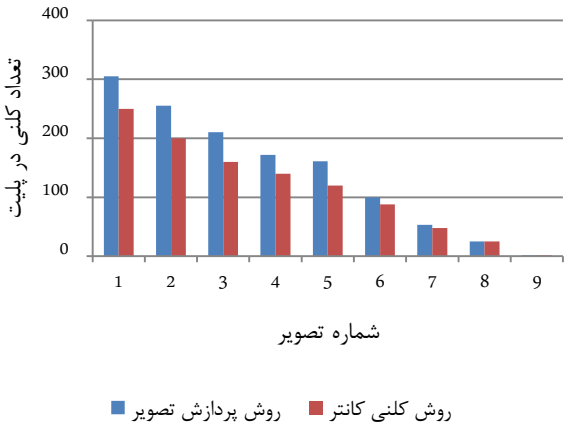
جدول ۲: تعداد باکتری های شمارش شده در نوشیدنی کفیر

ردیف	رقت	شماره تصویر	تعداد باکتری‌ها	تعداد باکتری‌ها
۱	10^{-1}	۱	۲۵۰	۳۰۵
۲	10^{-2}	۲	۲۰۰	۲۵۵
۳	10^{-3}	۳	۱۶۰	۲۱۰
۴	10^{-4}	۴	۱۴۰	۱۷۲
۵	10^{-5}	۵	۱۲۰	۱۶۱
۶	10^{-6}	۶	۸۸	۱۰۰
۷	10^{-7}	۷	۴۸	۵۳
۸	10^{-8}	۸	۲۵	۲۵
۹	10^{-9}	۹	۲	۲

* هر کدام از رقت ها سه بار شمارش و عدد میانگین ثبت شد.

(۱): تعداد باکتری های شمارش شده با کلنی کانتر.

(۲): تعداد باکتری های شمارش شده با استفاده از نرم افزار ایمیج جی



شکل ۴:: مقایسه تعداد کلنی شمرده شده با پردازش تصویر و کلنی کانتر

بحث

کلنی باکتری‌ها در لغت ساده یک گروه یا خوشه‌ای از باکتری‌هایی است که از یک باکتری مشتق شده‌اند. در اندازه‌های زیاد، شمارش دقیق کلنی‌ها به توانایی دیدن دقیق کلنی‌ها بستگی دارد که با چشم غیر مسلح یا یک دستگاه اتوماتیک دیده شود. یک روش افزایش تمرکز در میکروبیولوژی استفاده از روش-های اتوماتیک است. در صنعت هزاران نمونه در روز تشکیل می-شوند و کلنی‌ها روی هر نمونه به شمارش می‌شوند که این‌کار موجب خطا و گذشت زمان زیاد می‌شود (**۱۱**). همان‌طور که نتایج نشان داد، در رقت‌های بالا اختلافی بین دو روش وجود نداشت ولی در رقت‌های پایین که تعداد کلنی‌ها زیاد شده و شمارش نیازمند تمرکز و دقت بالاتری بود، بین دو روش اختلاف وجود داشت. به‌طور کلی با توجه به جداول۱،۲ و ۳، بین نتایج حاصل از کلنی کانتر و پردازش تصویر با استفاده از نرم‌افزار ایمیج جی در رقت‌های 10^{-5} تا 10^{-9} اختلافی وجود نداشت و اختلاف در سایر رقت‌ها به تراکم در کلنی‌ها و خطای آزمایش‌گر مربوط بوده است. Gas و همکاران (۱۹۷۴) برای اولین بار از سیستم‌های اتوماتیک در شمارش کلنی‌ها استفاده نمودند. چنین سیستم‌هایی معمولاً یک اتاق تک منظوره با سیستم دوربین و روشنایی دارند که پلیت‌ها یکی یکی یا به‌صورت اتوماتیک نگه داشته می‌شوند. برنامه پردازش تصویر روی یک کامپیوتر راه‌اندازی شده و عملیات شمارش انجام می‌شود (**۱۲**). اما این تکنولوژی نیازمند دستگاه-های پیشرفته و اتاق مخصوص است.

شمارش کلی کلنی باکتری‌ها در روش‌های اتوماتیک با مشکلاتی مواجه است که برخی از این مشکلات، ناشی از هم-پوشانی کلنی ها، تماس داشتن لبه‌های کلنی‌ها با یکدیگر، تفاوت در شکل، رنگ و اندازه کلنی‌ها و عوامل مخل شمارش (noise) مانند اجزای محیط کشت که در خود پلیت وجود دارند، می‌باشد (**۱۳**). Nagial (۲۰۱۱) نیز از یک روش اتوماتیک جهت شمارش کلنی باکتری ها استفاده کرد. او برای کاهش مشکلات بیان شده، ابتدا باکتری‌ها را روی فیلتر به مدت ۲۴ ساعت رشد داد. سپس جهت شمارش کلنی باکتری‌ها از رنگ استفاده کرد که باکتری‌ها به‌صورت نقطه ظاهر شدند. سپس از پلیت‌ها عکس گرفته و محتوی عکس را استخراج کرد و در نهایت شمارش را انجام داد. نتایج تحقیق نشان داد که تصاویری با رنگ زمینه‌ای با کیفیت بالا، و تراکم متوسط یا پایین، شمارش دقیق یا نزدیک به شمارش دقیق (۹۹-۱۰۰ ٪) را ایجاد کردند ولی تصاویری با رنگ زمینه پایین و یا تراکم بالا شمارشی با دقت پایین تر (۹۵-۹۸ ٪) ایجاد کردند (**۱۴**). در این روش ما نیازمند رنگ آمیزی کلنی ها و رشد آن ها روی فیلتر هستیم.

Schier (۲۰۰۹) برای شمارش تعداد کلنی‌ها از نرم افزار متلب استفاده کرد. در این تحقیق با استفاده از الگوریتم انتقال شعاعی کلنی‌ها را شمارش کرد. از ویژگی‌های این روش این است که به صورت هم‌زمان تعداد زیادی عکس را آنالیز و تعداد کلنی را مشخص می‌کند همچنین میزان خطای آن بسیار کم است (**۱۵**)، اما استفاده از این روش نیازمند داشتن مهارت در نرم افزار متلب می‌باشد.

در این پژوهش برای رفع مشکلات بالا از نرم افزار Image J جهت شمارش کلنی‌ها استفاده شد. در این پژوهش، با استفاده از تکنیک‌های پردازش تصویر مانند فیلتراسیون و مقیاس خاکستری، می توان تصویری با کیفیت بالا ایجاد کرد و کلنی‌ها را با تمرکز و دقت بالا شمارش کرد. از ویژگی های این روش دقت بالا، سادگی، عدم نیاز به مهارت خاص، ابزار پیچیده و اتاقک های مخصوص می باشد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که روش ایمیج جی نسبت به روش کلنی کانتر روشی سریع‌تر، دقیق تر و همچنین با نتایج ثابت می‌باشد. با توجه به اهمیت کیفیت و میزان بار آلودگی در محصولات غذایی، وجود یک روش سریع، دقیق و دارای نتایج ثابت برای شمارش کلنی‌ها یک نیاز اساسی است. با

توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، روش پردازش تصویر را می-توان به‌عنوان یک روش سریع و دقیق در شمارش میکروارگانیسم ها معرفی نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمامی کسانی که ما را در این پژوهش یاری نمودند، تشکر و قدردانی می نمایند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان هیچ تعارضی وجود ندارد.

References

1. Loy G, Zelinsky A. Fast radial symmetry for detecting points of interest. Trans Acta Anal Mach Intel 2003; 8(25):959–973.
2. Abdullah MZ, Guan LC, Lim K.C, Karim A. The applications of computer vision systems and tomographic radar imaging for assessing physical properties of food. J Food Eng 2004 ;61(1):125-135.
3. Goyache F, Bahamonde A, Alonso J, Lopez S, Delcoz J, Quevedo JR, et al. The usefulness of artificial intelligence techniques to assess subjective quality of products in the food industry. Trends Food Sci Technol 2001;12, 370 – 381.
4. Safa R, Sheikholeslami Z, Salehi A. Application of image processing techniques in the evaluation of color and shell porosity Barbari bread mix (wheat - Sangynk). In: 2th National Conference on Food Science and Technology; 2013Apr 29-30; Ghouchan: Iran; P. 2-3. (Persian)
5. Ehtiati A, Mohebbi M, Shahidi F. Application of image processing in the colorimetric bread fortified with soy flour. 18th National Congress of Food Science and Technology; 2008 Oct 15-16; Mashhad: Iran; P. 1-2. (Persian)
6. Saeed M, Anjum FM, Zahoor T, Nawaz H, Rehman SU. Isolation and fermentation of sourdough. Int J Agri Biol 2009;11: 329-332.
7. Lacerda IC, Miranda A, Borelli RL, Nunnes BM, Nardi AC, Lachance RMD, et al. Lactice acid bacteria and yeast associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava strach in Brazil. Int J Food Microbial 2005; 105: 213-219.
8. Luanngsakul N, Keeratipibul S, Jindamorakot S, Tnanasupawat S. Lactic acid bacteria and yeasts isolated from the starter doughs for Chinese steamed buns in Thailand. J Food Sci Technol 2009; 42: 1404-1412.
9. Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein I. Textural features for image classification. IEEE Trans ASAE 1973; 2(2): 1995-2005.
10. Mortazavi SA, Kouchaki A. An Introduction to Industrial Microbiology. Ferdowsi University of Mashhad Press. 2011. (Persian)
11. Marotz J, Ubert C, Eisenbeiss W. Effective object recognition for automated counting of colonies in petri dishes (automated colony counting). Comput Methods Pro Biomed 2001; 66(2–3):183–198.
12. Goss WA, Michaud RN, Mcgrath MB. Evaluation of an automated colony counter. Appl Microbiol Biontechnol 1974; 27:264–267.
13. Shen W. Experimental Study for Automatic Colony Counting System Based on Image Processing. In: International Conference on Computer Application and System Modeling (ICCASM 2010); 2010 Oct 22-24; Taiyuan; P. 612-613.
14. Nagpal SH. An Automated Approach For Bacterial Colony Counter. Appl Comput Technol 2011; Vol 3 (2), 724-728.
15. Schier J. Counting of yeast colonies in petri dish images. Institute of Information Theory and Automation. 2009.