

การพัฒนาระบบ ABICS สำหรับการนับโคโลนีของ *Escherichia coli*
และ *Enterobacter aerogenes* อัตโนมัติจากภาพถ่ายสมาร์ทโฟน
Development of an ABICS System for Automatic Colony Counting of
Escherichia coli and *Enterobacter aerogenes* from Smartphone Photographs

พงศธร ต่ายทอง และ นิธิรุจน์ พงศ์สิริเมธิ*

Phongsatorn Taithong and Nitirut Phongsirimethi*

สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Institute of Engineering, Suranaree University of Technology

Email: nitirut@g.sut.ac.th

Received : February 12, 2025

Revised : April 16, 2025

Accepted : May 15, 2025

บทคัดย่อ

การนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Escherichia coli* ATCC25922 (ECA) และ *Enterobacter aerogenes* DMST2720 (EAD) เป็นขั้นตอนสำคัญในการประเมินคุณภาพอาหารหรือน้ำนมดิบ ซึ่งการนับด้วยมือใช้เวลาประมาณ 2 - 5 นาทีต่อจานเพาะเชื้อ การศึกษานี้นำเสนอ "ระบบนับโคโลนีแบบที่เรียด้วยภาพผ่านแอนดรอยด์" (Android Bacteria Image Counting System: ABICS) ที่ใช้เทคนิคการประมวลผลภาพ Projection Profile, Circle Hough Transform และ Power Law Transformation เพื่อเพิ่มความคมชัดของภาพ และนับจำนวนโคโลนีอย่างแม่นยำ จากการทดลองกับภาพถ่ายจานเพาะเชื้อจำนวน 84 ภาพ พบว่า ระบบ ABICS มีค่าเฉลี่ยความแม่นยำในการนับร้อยละ 90.77 เมื่อเทียบกับการนับด้วยมือ ซึ่งมีความคลาดเคลื่อนโดยทั่วไปอยู่ที่ร้อยละ 5 - 10 ที่สำคัญคือ ABICS ใช้เวลาในการนับจำนวนโคโลนีเพียง 3 - 5 วินาทีต่อจาน ซึ่งเร็วกว่าการนับด้วยมืออย่างน้อย 24 เท่า (โดยเฉลี่ยเร็วกว่า 35 - 100 เท่า) นอกจากนี้ ABICS ยังช่วยลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ผลได้อย่างมาก ทำให้เป็นเครื่องมือที่มีศักยภาพในการเพิ่มประสิทธิภาพ และลดภาระงานในการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

คำสำคัญ: การนับโคโลนี การนับแบคทีเรีย การนับอัตโนมัติ แอปพลิเคชันโทรศัพท์แอนดรอยด์
การประมวลผลภาพ

ABSTRACT

Counting colonies of *Escherichia coli* ATCC25922 (ECA) and *Enterobacter aerogenes* DMST2720 (EAD) is a crucial step in assessing the quality of food or raw milk. Manual counting typically takes approximately 2 - 5 minutes per Petri dish, depending on the colony density. This study presents an "Android Bacteria Image Counting System" (ABICS) that employs Projection Profile, Circle Hough Transform, and Power Law Transformation image processing techniques to enhance image clarity and accurately count colonies. In experiments using 84 Petri dish images, ABICS demonstrated an average counting accuracy of 90.77% when compared to manual counting, which generally exhibits an error rate of 5 - 10%. Significantly, ABICS required only 3 - 5 seconds per dish for colony counting, which is at least 24 times faster (averaging 35 - 100 times faster) than manual counting. Furthermore, ABICS significantly reduces the analysis time, making it a potentially valuable tool for enhancing efficiency and reducing workload in microbiological analysis.

Keywords: Standard plate counts, Bacterial count, Automatic counting, Android phone application, Image-based

บทนำ

แบคทีเรียโคลิฟอร์มเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และในสัตว์เลือดอุ่นรวมถึงมนุษย์ นอกจากนี้แบคทีเรียโคลิฟอร์มยังสามารถพบได้ในอาหาร และน้ำดื่ม แบคทีเรียเหล่านี้ถูกใช้เป็นตัวชี้วัดสำคัญสำหรับการควบคุมคุณภาพอาหาร (Badalyan et al., 2018: 74 - 83) การพบแบคทีเรีย

โคลิฟอร์มในปริมาณมากแสดงว่า อาหารนั้นมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย และไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค ซึ่ง ECA และ EAD เป็นแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Wouters et al., 2002, 91 - 109)

สำนักงานคณะกรรมการอาหาร และยา (อย.) กระทรวงสาธารณสุขประเทศไทยได้กำหนดมาตรฐานด้านจุลินทรีย์ในอาหารหลายประเภท (Pisuttilap et al., 2001: 95 - 101) เช่น อาหารทะเล จะต้องไม่พบแบคทีเรียโคลิฟอร์มเกิน 20 CFU/g. สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตร และอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตร (Pisuttilap et al., 2001: 95 - 101) และสหกรณ์ประเทศไทยก็ได้กำหนดมาตรฐานด้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น น้ํามดบจะต้องพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มไม่เกิน 104 CFU/ml.(Sever, 2020)

วิธีนับโคโลนีแบคทีเรียมาตรฐาน (Standard Petri Count: SPC) เป็นวิธีทั่วไปในการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ ที่มีการเติบโตที่ใหญ่เพียงพอที่จะมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าหรือแว่นขยาย SPC สามารถใช้ทดสอบคุณภาพสินค้าเกษตรได้โดยการเจือจางตัวอย่างสินค้าเกษตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นกระจายลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เมื่อจานเพาะเชื้อได้รับการกระจายเชื้อ และเริ่มบ่ม เชื้อแบคทีเรียจะปรากฏให้เห็นเป็นโคโลนี และพร้อมสำหรับการนับในเวลาประมาณ 24 - 48 ชั่วโมงต่อมา (Sophie et al., 2015) การพบโคโลนีของแบคทีเรียที่เป็นอันตรายจำนวนมากแสดงว่า อาหารไม่ปลอดภัยสำหรับการบริโภค การนับโคโลนีต้องใช้สายตา และประสบการณ์ในการนับซึ่งขึ้นอยู่กับผู้ที่ทำการนับ เพราะโคโลนีมีขนาดเล็ก และจำนวนมาก (Sophie et al., 2015) ผู้ที่มีประสบการณ์สามารถนับโคโลนีในจานเพาะเชื้อหนึ่งจานโดยใช้เวลาประมาณ 2 - 5 นาที ขึ้นอยู่กับจำนวนโคโลนีในจานนั้น

การศึกษารุ่นนี้ ได้นำเสนอวิธีใหม่ในการนับโคโลนีของแบคทีเรีย โดยการถ่ายภาพจานเพาะเชื้อที่ต้องการจะนับ จากนั้นภาพจะถูกนำมาประมวลผลด้วยเทคนิคการประมวลผลภาพหลายขั้นตอน เช่น Projection Profile, Circle Hough Transform และ Power Law Transformation ซึ่งจะช่วยให้ปรับปรุงคุณภาพของภาพให้สามารถนับโคโลนีโดยอัตโนมัติได้แม่นยำขึ้น เทคนิคเหล่านี้ถูกรวมเข้าในแอปพลิเคชันบนโทรศัพท์ Android ที่เรียกว่า Application Bacteria Image Counting System (ABICS) ซึ่งลดเวลาการนับโคโลนีของแบคทีเรียลงไปอย่างมากเมื่อเทียบกับการนับด้วยมือ

การสร้างแอปพลิเคชัน ABICS บนแพลตฟอร์ม Android ทำให้วิธีการนับโคโลนีอัตโนมัตินี้สามารถเข้าถึง และใช้งานได้ง่ายบนอุปกรณ์พกพา ซึ่งอาจแตกต่างจากงานวิจัยอื่น ๆ ที่อาจนำเสนอวิธีการบนคอมพิวเตอร์ หรือ แพลตฟอร์มอื่น ๆ การพัฒนาเป็นแอปพลิเคชันบนสมาร์ตโฟนช่วยเพิ่มความสะดวกในการใช้งานภาคสนาม หรือ ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กที่ไม่ต้องการเครื่องมือราคาแพง

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. พัฒนาแอปพลิเคชันบนโทรศัพท์ Android ที่นับโคลน ECA และ EAD อัตโนมัติ
2. ลดเวลาในการนับโคลน ECA และ EAD

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาก่อนหน้านี้ ได้พยายามพัฒนาวิธีการนับโคลนบนงานเพาะเชื้อโดยใช้ภาพถ่าย (Zhu et al., 2018) ได้พัฒนาวิธีการประมวลผลภาพที่ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ได้แก่ การกำจัดสัญญาณรบกวนทางสายตาจากแสงภายนอกงานเพาะเชื้อ การลบขอบของงานเพาะเชื้อ การแยกโคลนที่อยู่ติดกันและการนับโคลน การแปลงระยะทาง (Distance Transform) และการแปลงวอเตอร์เชด (Watershed Transform) ถูกใช้ในการแยกโคลนที่ติดกัน ระบบนี้มีความแม่นยำที่ร้อยละ 82 (Zhu et al., 2018: 66 - 73) อย่างไรก็ตามข้อเสียอย่างหนึ่งคือกระบวนการนี้ไม่เป็นอัตโนมัติ ผู้ใช้ต้องเลือกพื้นที่ที่ต้องการนับโคลนด้วยตนเอง

Albaradei et al. (2020) ได้พัฒนาระบบโดยใช้การเรียนรู้เชิงลึกแบบถ่ายโอน (Deep Transfer Learning: DTL) ซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของการเรียนรู้เชิงลึก (Deep Learning) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการเรียนรู้ของเครื่องจักร (Machine Learning) พวกเขาใช้ไฟล์ภาพจำนวน 164 ไฟล์ ซึ่งไม่เพียงพอสำหรับการเรียนรู้เชิงลึก ดังนั้น พวกเขาจึงใช้ DTL ในการนับจำนวนโคลน ระบบของพวกเขามีอัตราความผิดพลาดที่ร้อยละ 22.38 และไม่สามารถระบุตำแหน่งของโคลนที่ถูกนับในภาพได้ การเรียนรู้เชิงลึก และการเรียนรู้ของเครื่องจักรทำงานได้ดีเมื่อมีข้อมูลจำนวนมาก แต่ทำงานได้ไม่ดีกับข้อมูลที่มีจำนวนน้อย แต่ในการศึกษาของเรามีภาพเพียง 84 ภาพสำหรับการศึกษาเพื่อนับโคลน (Albaradei et al., 2020: 164340 - 164346) ดังนั้น การพัฒนาเครื่องมือที่ใช้เทคนิคการประมวลผลภาพ ABICS จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับกรณีที่มีจำนวนข้อมูลจำกัด และยังสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางสำหรับงานวิจัย หรือ การตรวจวิเคราะห์ที่มีภาพถ่ายจำนวนไม่มาก ซึ่งจะช่วยลดภาระของการนับด้วยมือได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ณัฐพงษ์ สังข์สอน (2565) ได้พัฒนาแอปพลิเคชันบนมือถือเพื่อสนับสนุนการดำเนินงานนำเข้าสินค้าของบริษัท ดีดี 1971 จำกัด และบริษัทในเครือ โดยมีกลุ่มตัวอย่างเป็นผู้ปฏิบัติงานขององค์กรในเครือบริษัท ผลการวิจัยพบว่า แอปพลิเคชันนี้มีประสิทธิภาพในการดำเนินงานอยู่ในระดับมากที่สุด และผู้ใช้มีความพึงพอใจในระดับมากที่สุด นอกจากนี้แอปพลิเคชันยังช่วยลดเวลาในการดำเนินงานนำเข้าสินค้าได้ถึง 56.07% (ณัฐพงษ์ สังข์สอน, 2565)

วิธีการดำเนินการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

จานเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC25922 (ECA) จำนวน 24 จาน

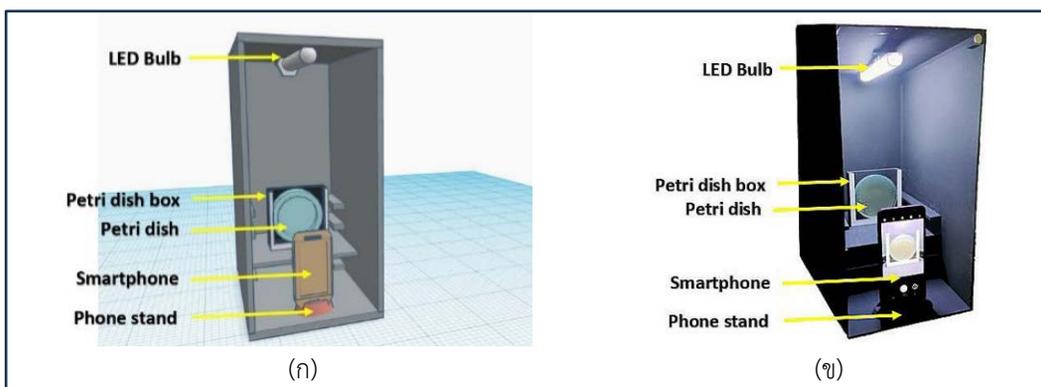
จานเพาะเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter aerogenes* DMST2720 (EAD) จำนวน 60 จาน

เครื่องมือการวิจัย

การพัฒนา ABICS ใช้ซอฟต์แวร์ 3 ซอฟต์แวร์ ได้แก่ (1) ซอฟต์แวร์ Python 7.2 สำหรับทดสอบเทคนิคการประมวลผลภาพ (2) www.tinkercad.com สำหรับออกแบบโมเดลเพื่อปรี้น 3D กล่องใส่จานเพาะเชื้อ ขาดังโทรศัพท์ เป็นต้น และ (3) ซอฟต์แวร์ Android Studio 4.2 สำหรับพัฒนาแอปพลิเคชัน ABICS บนโทรศัพท์มือถือ Android

วัสดุที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วย กล่องถ่ายภาพ กล่องใส่จานเพาะเชื้อ สมาร์ทโฟน Android (OPPO Reno 2 พร้อมกล้องความละเอียด 48 เมกะพิกเซล) ขาดังโทรศัพท์ และจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนี ECA หรือ EAD

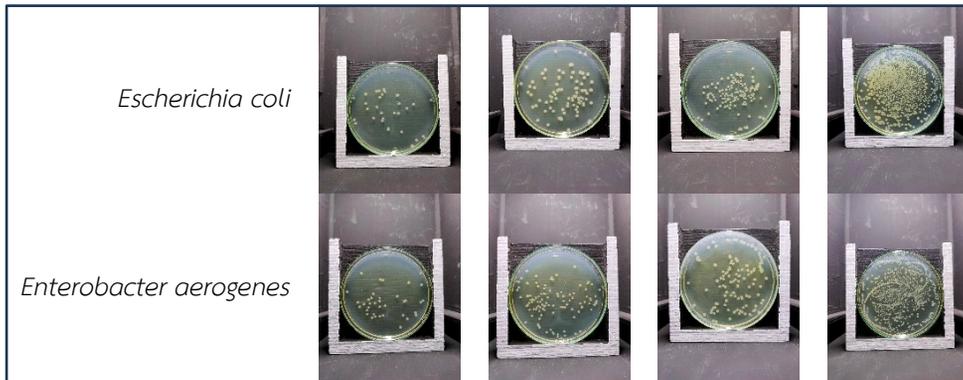
กล่องถ่ายภาพ กล่องใส่จานเพาะเชื้อ และขาดังโทรศัพท์ถูกออกแบบโดยใช้ TinkerCAD.com และสร้างด้วยเครื่องพิมพ์ 3 มิติ (Flashforge Finder 2.0; Flashforge; เมืองจินหัว มณฑลเจ้อเจียง ประเทศจีน) กล่องถ่ายภาพทำจากอะคริลิก (สูง 40 ซม. กว้าง 20 ซม. และ ยาว 30 ซม.) ส่วนกล่องจานเพาะเชื้อทำจากพลาสติก PLA (สูง 100 มม. กว้าง 28 มม. และ ยาว 100 มม.) แสดงดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 (ก) ภาพจำลองการจัดวางกล่องถ่ายภาพ และ (ข) ภาพถ่ายจริงของการจัดวางกล่องถ่ายภาพ

การเก็บรวบรวมข้อมูล

งานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีของ ECA หรือ EAD ถูกเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาโดยผู้เชี่ยวชาญ จากนั้นจึงถ่ายภาพของงานเพาะเชื้อเหล่านี้ในกล่องถ่ายภาพ แสดงในภาพประกอบ 2 โดยในภาพแสดงให้เห็นว่า โคโลนีของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ มีสี รูปร่าง และขนาดที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะว่า ทั้งคู่เป็นแบคทีเรียโคลิฟอร์ม จากนั้นให้ผู้เชี่ยวชาญ 3 หรือ 4 คนในการนับจำนวนโคโลนีแต่ละงานเพื่อหาค่าฐานนิยม (กรณีไม่มีค่าฐานนิยมจะใช้ค่าเฉลี่ย)

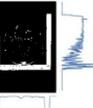
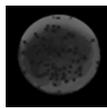
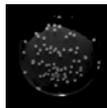


ภาพประกอบ 2 ภาพตัวอย่างของโคโลนี ECA หรือ EAD ในงานเพาะเชื้อ โดยมีจำนวนโคโลนีต่างกันในแต่ละงานเพาะเชื้อ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ภาพจะผ่านขั้นตอนการประมวลผลภาพจำนวน 10 ขั้นตอน ทุกขั้นตอนยกเว้นขั้นตอนแรกเป็นเทคนิคการประมวลผลภาพที่แตกต่างกัน เพื่อเตรียมภาพงานเพาะเชื้อให้พร้อมสำหรับการนับโคโลนีอัตโนมัติ ซึ่งแสดงในตารางที่ 1 วัตถุประสงค์ของการประมวลผลภาพคือ การแยกโคโลนีออกจากพื้นหลังเพื่อทำให้การนับโคโลนีอัตโนมัติถูกต้องมากขึ้น ชื่อเทคนิคการประมวลผลเรียงลำดับดังนี้: Color transformation, Thresholding, Projection profile, Detection point referencing, Circle hough transform, Value layer (HSV), Power-Law Transform และ Adaptive thresholding

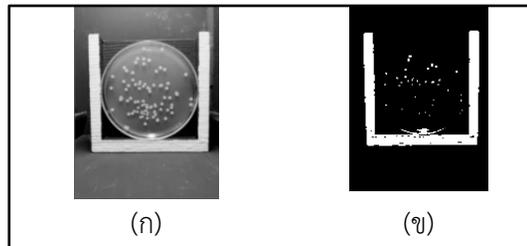
ตารางที่ 1 ขั้นตอนในการประมวลผลของ ABICS

ลำดับ	ตัวอย่างภาพ	เทคนิค	วัตถุประสงค์
1		-	โหลดภาพเพื่อประมวลผล
2		Color transformation	แปลงภาพสีเป็นภาพระดับสีเทา
3		Thresholding	แปลงภาพสีเทาเป็นภาพขาวดำ
4		Projection profile	ผลรวมของพิกเซลสีขาวในแต่ละแกน
5		Detection of reference points	เอาทุกอย่างออกจากกล่องเพาะเชื้อ
6		Circle hough transformation	เอาทุกอย่างออกจากจานเพาะเชื้อ
7		Value layer of HSV color model	ลบแสงสะท้อน
8		Power-Law transformation	ลดความขุ่น
9		Adaptive thresholding	แยกโคโลนีออกจากพื้นหลัง
10		Circle hough transformation	นับจำนวนโคโลนี

การประมวลผลภาพเริ่มต้นด้วยการแปลงสี เนื่องจากการตรวจจับขอบกล่องใส่จานเพาะเชื้อในขั้นตอนถัดไปต้องใช้ภาพขาวดำ ก่อนที่ภาพจะถูกแปลงเป็นภาพขาวดำ จะต้องเป็นภาพระดับสีเทาก่อน ภาพที่ถูกป้อนเข้ามาเป็นภาพสีซึ่งมีสามเลเยอร์สี คือ สีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน (RGB) การแปลงภาพสีเป็นภาพระดับเทาจะใช้เทคนิค Luminosity ซึ่งดีกว่าเทคนิค Average Brightness เนื่องจากเทคนิค Luminosity (เรียกอีกอย่างว่าเทคนิคการถ่วงน้ำหนัก) จะคำนึงถึงความยาวคลื่นสีที่ต่างกันของแต่ละเลเยอร์สี จึงมีค่าถ่วงน้ำหนักของแต่ละเลเยอร์สีเพื่อให้ใกล้เคียงสายตามนุษย์ (Gonzalez et al., 2008) มากที่สุด ซึ่งไม่สามารถแก้ไขได้ด้วยเทคนิค Average Brightness ค่าพิกเซลในแต่ละเลเยอร์ของภาพสีอยู่ในช่วง 0 - 255 ซึ่งแสดงถึงความเข้มของสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงินตามเลเยอร์นั้น ๆ หลังจากการแปลงภาพสี แต่ละพิกเซลในภาพระดับสีเทาจะมีเลเยอร์เดียวอยู่ในช่วง 0 - 255 โดย 0 คือสีดำ 255 คือ สีขาว และแต่ละจำนวนเต็มระหว่างนั้นแทนเฉดสีเทา

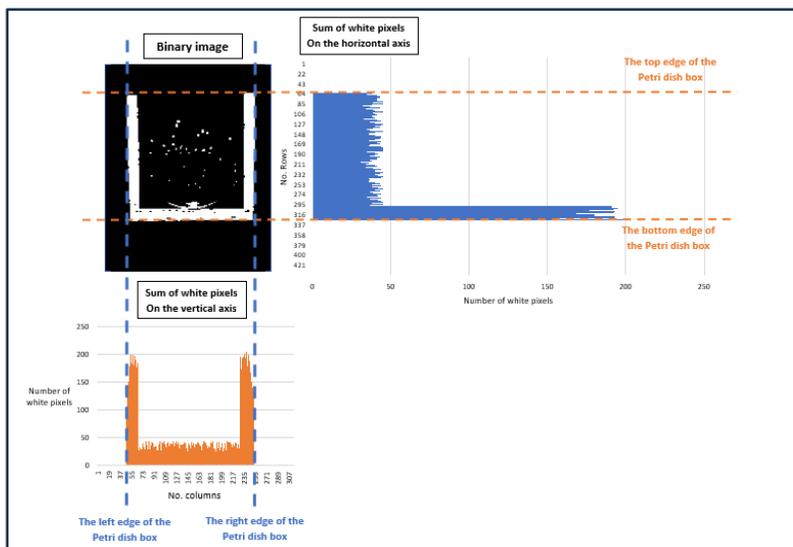
เทคนิค Thresholding ถูกนำมาใช้เพื่อเตรียมภาพสำหรับเทคนิค Projection Profile ในขั้นตอนถัดไปซึ่งต้องใช้ภาพขาวดำ เทคนิค Thresholding ใช้เพื่อแปลงภาพระดับเทาให้เป็นภาพขาวดำโดยการกำหนดค่าพิกเซลทั้งหมดเป็น 0 (สีดำ) หรือ 1 (สีขาว) หากค่าพิกเซลระดับเทาที่ต่ำกว่าค่า

Threshold ที่ตั้งไว้ พิกเซลนั้นจะถูกกำหนดให้เป็น 0 แต่หากค่าพิกเซลระดับเทาเท่ากับ หรือ สูงกว่าค่า Threshold พิกเซลนั้นจะถูกกำหนดให้เป็น 1 แสดงดังภาพประกอบ 3



ภาพประกอบ 3 ตัวอย่างภาพจานเพาะเชื้อที่แปลงจากภาพระดับสีเทา (ก) เป็นภาพขาวดำ (ข)

เทคนิค Projection Profile คือการแสดงผลรวมของพิกเซลที่สนใจตามแกนแนวนอน หรือแนวตั้งของภาพ ตัวอย่าง Projection Profile แนวนอน และแนวตั้งของภาพจานเพาะเชื้อจะแสดงในภาพประกอบ 4 ข้อมูลจาก Projection Profile ที่ได้จะถูกใช้ในขั้นตอนการประมวลผลถัดไปเพื่อกำหนดจุดอ้างอิงที่สำคัญสำหรับการตรวจจับกล่องใส่จานเพาะเชื้อ ซึ่งจะทำให้สามารถตัดภาพเพื่อลบพื้นที่ที่ไม่เกี่ยวข้องนอกกล่องใส่จานเพาะเชื้อออกไปได้



ภาพประกอบ 4 ตัวอย่าง Projection Profile แนวนอนและแนวตั้งของภาพจากจานเพาะเชื้อ

Projection Profile ของภาพกล้องใส่งานเพาะเชื้อ แสดงในภาพประกอบ 4 ถูกใช้เพื่อกำหนดจุดอ้างอิงที่บ่งบอกขอบด้านนอกของกล้องงานเพาะเชื้อดังนี้ ผลรวมของพิกเซลสีขาวบนแกนแนวนอน ใช้กำหนดขอบด้านบน และด้านล่างของกล้องใส่งานเพาะเชื้อ และผลรวมของพิกเซลสีขาวบนแกนแนวตั้ง ใช้กำหนดขอบด้านซ้าย และขวาของกล้องใส่งานเพาะเชื้อ แกนแนวนอน ขอบด้านบนของกล้องใส่งานเพาะเชื้อคือแถวสุดท้ายจากด้านบนที่ผลรวมของพิกเซลสีขาวยังคงเป็นศูนย์ และขอบด้านล่างของกล้องงานเพาะเชื้อ คือแถวสุดท้ายจากด้านล่างที่ผลรวมของพิกเซลสีขาวยังคงเป็นศูนย์ ในทำนองเดียวกัน แกนแนวตั้งขอบด้านซ้ายของกล้องใส่งานเพาะเชื้อคือคอลัมน์สุดท้าย จากด้านซ้ายที่ผลรวมของพิกเซลสีขาวยังคงเป็นศูนย์ และขอบด้านขวาของกล้องใส่งานเพาะเชื้อคือคอลัมน์สุดท้ายจากด้านขวาที่ผลรวมของพิกเซลสีขาวยังคงเป็นศูนย์ การใช้จุดอ้างอิง 4 จุดนี้ ภาพจะถูกตัดเพื่อลบทุกสิ่งที่อยู่นอกกล้องงานเพาะเชื้อออกไป ดังที่แสดงในภาพประกอบ 5



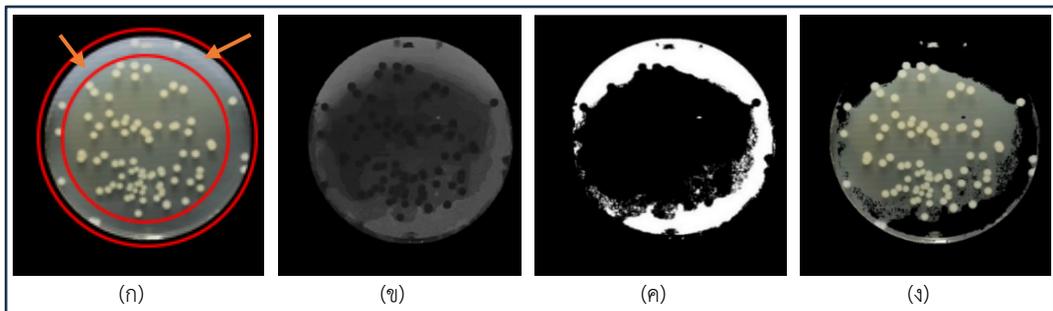
ภาพประกอบ 5 ภาพที่ถูกตัดหลังจากใช้ Projection profile

ภาพทรงกลมของงานเพาะเชื้อ ทำให้เหมาะสำหรับการใช้เทคนิค Circle Hough Transformation (CHT) ซึ่งสามารถตรวจจับวงกลมในภาพได้ (Reddy, 2021: 577 - 582) เทคนิค CHT จะรับช่วงรัศมีที่กำหนดจากผู้ใช้ จากนั้นจะสแกนภาพเพื่อหาวงกลมที่มีรัศมีอยู่ในช่วงที่กำหนด ดังนั้น CHT จะทำงานเฉพาะกับวงกลมที่มีรัศมีที่กำหนด ในการศึกษาครั้งนี้ กำหนดช่วงรัศมีที่ใช้ค้นหาไว้ที่ 150 - 200 พิกเซล ซึ่งสอดคล้องกับรัศมีของงานเพาะเชื้อ เมื่อพบวงกลมของงานเพาะเชื้อพิกเซลทั้งหมดนอกวงกลมจะถูกตั้งค่าเป็น 0 (สีดำ) เพื่อแยกภาพของงาน ดังที่แสดงในภาพประกอบ 6



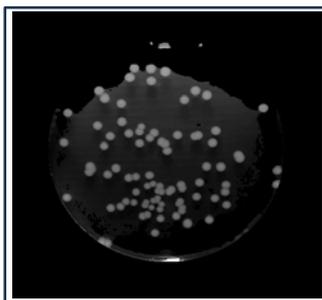
ภาพประกอบ 6 ภาพที่ถูกตัดหลังจากใช้ Projection profile

ในภาพงานเพาะเชื้อแต่ละภาพ ขอบโค้งของจานทำให้เกิดแสงสะท้อนขึ้น ดังที่ภาพประกอบ 7(ก) หากไม่ได้รับการแก้ไข บริเวณที่มีแสงสะท้อนนี้จะทำให้เกิดข้อผิดพลาดในขั้นตอนการประมวลผลภาพ ภายหลัง เพราะแสงสะท้อนทำให้แยกโคโลนีแบคทีเรียออกจากพื้นหลังได้ยากขึ้น ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้ โดยใช้แบบจำลองสี HSV ซึ่งประกอบด้วย 3 เลเยอร์ เคนสี (H), ความอิ่มตัว (S), และค่า (V) เลเยอร์ V มีประโยชน์เพราะมันแสดงถึงระดับความสว่างของพิกเซล ตั้งแต่ 0 ถึง 255 โดยที่ 0 คือสีดำและ 255 คือสีขาว เลเยอร์ V ถูกใช้ Thresholding เพื่อสร้างภาพขาวดำที่คล้ายกับก่อนหน้านี้ พิกเซลสีขาวที่เกิดจาก Thresholding จะถูกกำหนดเป็นสีดำในภาพต้นฉบับเพื่อกำจัดแสงสะท้อนออกไป แสดงในภาพประกอบ 7



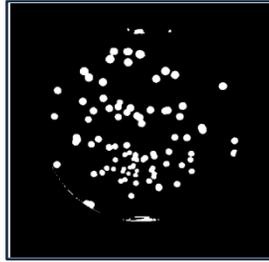
ภาพประกอบ 7 การลบแสงสะท้อนที่ขอบจานเพาะเชื้อ: (ก) พื้นที่ที่มีแสงสะท้อน (ข) เลเยอร์ V ของภาพก่อนหน้า (ค) ภาพขาวดำจากเลเยอร์ V และ (ง) ภาพหลังจากการลบพื้นที่ที่มีแสงสะท้อน

ความหลากหลายของสารเคมีในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลต่อความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อแน่นอนว่าทำให้เกิดความขุ่น ตัวอย่างนี้สามารถเห็นได้ในภาพประกอบ 7(ง) ซึ่งบริเวณตรงกลางของจานเพาะเชื้อมีความขุ่นอย่างมาก ความขุ่นนี้ก็ทำให้แยกโคโลนีออกจากพื้นหลังได้ยากขึ้นเช่นกัน ดังนั้นเทคนิค Power-Law Transformation จึงถูกใช้เพื่อลดความขุ่นโดยการเพิ่มความคมชัดของภาพ ดังที่แสดงในภาพประกอบ 8



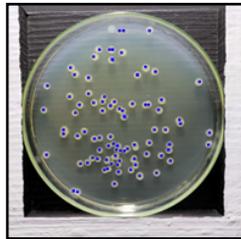
ภาพประกอบ 8 ภาพลดของความขุ่นหลังจาก Power-Law Transformation

เพื่ออำนวยความสะดวกในการนับโคโลนีในขั้นตอนสุดท้าย ต้องแยกโคโลนีออกจากพื้นหลัง อย่างไรก็ตาม ในขณะที่ Thresholding ใช้งานได้ดีกับขั้นตอนก่อนหน้านี้เพื่อเตรียม Projection profile แต่ในขั้นตอนนี้ Thresholding ส่งผลให้เกิดสัญญาณรบกวนมากเกินไป ดังนั้น Adaptive Thresholding จะถูกใช้ในขั้นตอนปัจจุบันเพื่อแยกโคโลนีออกจากพื้นหลัง Adaptive Thresholding (AT) ไม่มีค่า threshold เดียว แต่ค่า Threshold จะเป็นพลวัต และเปลี่ยนแปลงเพื่อปรับให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ตามความสว่างที่แตกต่างกันในส่วนต่าง ๆ ของภาพ ซึ่งทำให้ AT เป็นวิธีที่ดีเมื่อความสว่างไม่สม่ำเสมอทั่วทั้งภาพ AT ทำงานโดยที่พิกเซลทุกตัวในภาพจะถูกประมวลผลทีละกลุ่ม โดยจะมีการสร้างบล็อกสี่เหลี่ยมจัตุรัสของพิกเซล โดยที่พิกเซลเป้าหมายอยู่ตรงกลาง เมื่อคำนวณความสว่างเฉลี่ยของบล็อก จากนั้นค่า Threshold จะถูกปรับโดยอัตโนมัติ ค่าความสว่างเฉลี่ยของบล็อกจะถูกกำหนดเป็นค่า Threshold เพื่อพิกเซลเป้าหมายจะถูกกำหนดเป็นสีดำ หรือ สีขาว เมื่อพิกเซลเป้าหมายอยู่ใกล้ขอบภาพส่วนที่หายไปของบล็อกที่ตามทฤษฎีจะขยายออกไปนอกภาพ และจะถูกกำหนดเป็น 0 โดยอัตโนมัติ ความสว่างเฉลี่ยจะคำนวณจากส่วนที่เหลือของบล็อกในการศึกษานี้ ขนาดบล็อกถูกตั้งค่าไว้ที่ 111×111 พิกเซล



ภาพประกอบ 9 ภาพจานเพาะเชื้อหลังจากผ่าน Adaptive Thresholding เพื่อให้โคโลนีโดดเด่นขึ้นจากพื้นหลัง

ขั้นตอนทั้งหมดก่อนหน้านี้ เพื่อเตรียมภาพในภาพให้พร้อมสำหรับการนับโคโลนี ปัจจุบันโคโลนีปรากฏในภาพขาวดำเป็นกลุ่มของพิกเซลสีขาวกับพื้นหลังสีดำ ภาพทรงกลมของโคโลนีทำให้เหมาะสำหรับการใช้ CHT อีกครั้ง แทนที่จะมองหาวงกลมขนาดใหญ่ของจานเพาะเชื้อเหมือนขั้นตอนก่อนหน้านี้ ตอนนี้ CHT จะถูกใช้เพื่อค้นหาวงกลมที่มีรัศมีในช่วง 2 - 7 พิกเซล ซึ่งสอดคล้องกับรัศมีของโคโลนี แต่ละโคโลนีที่พบ และนับโดย CHT จะถูกทำเครื่องหมายด้วยจุดเพื่อระบุตำแหน่งแสดงในภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 ภาพการทำเครื่องหมายจุดสีน้ำเงินไว้สำหรับโคโลนีที่ถูกนับ

แอปพลิเคชัน ABICS ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อรวมขั้นตอนการประมวลผลภาพข้างต้นเข้าไว้ในเครื่องมือที่ใช้งานง่าย และสะดวกสำหรับการนับโคโลนี และแสดงตำแหน่งของโคโลนีที่นับได้ แอปพลิเคชัน ABICS ถูกพัฒนาขึ้นด้วย Android Studio (เวอร์ชัน 4.2.2) และ OpenCV library (เวอร์ชัน 3.4.14)(Shamshad, 2020) การใช้งานแอปพลิเคชัน ABICS แสดงในภาพประกอบ 11 แอปพลิเคชันจะเปิดขึ้นด้วย หน้าแรก [ภาพประกอบ 11(ก)] การกดปุ่มเริ่มจะนำผู้ใช้ไปยังหน้าการเลือกแบคทีเรีย [ภาพประกอบ 11(ข)] เมื่อเลือกแบคทีเรียที่ต้องการแล้วจะนำไปยังหน้าการถ่ายภาพจานเพาะเชื้อ

[ภาพประกอบ 11(ค)] เมื่อถ่ายภาพงานเพาะเชื้อแล้วจะนำไปยังหน้าการยืนยัน [ภาพประกอบ 11(ง)] ถ้ากดยอมรับภาพจะเริ่มกระบวนการนับโคโลนีโดยอัตโนมัติ และผู้ใช้จะถูกนำไปยังหน้าแสดงผล [ภาพประกอบ 11(จ)] ซึ่งแสดงจำนวนโคโลนีทั้งหมดในงาน และ ตำแหน่งของโคโลนีในภาพที่ถูกนับได้



ภาพประกอบ 11 ขั้นตอนการใช้แอปพลิเคชัน ABICS: (ก) หน้าแรก (ข) หน้าเลือกแบคทีเรีย
(ค) หน้าถ่ายภาพ (ง) หน้ายืนยันภาพถ่าย และ (จ) หน้าแสดงผลลัพท์การนับโคโลนี

ผลการวิจัย

การวิเคราะห์ที่ใช้ภาพ ECA จำนวน 24 ภาพ และภาพ EAD จำนวน 60 ภาพในการศึกษานี้ แอปพลิเคชัน ABICS สามารถนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียในงานเพาะเชื้อหนึ่งงานได้โดยเฉลี่ยในเวลา 3.36 วินาที (ต่ำสุด 3.00 วินาที สูงสุด 5.64 วินาที) ในขณะที่การนับด้วยมือมาตรฐาน ใช้เวลา 2 - 5 นาทีต่องาน ตารางที่ 2 แสดงผลการนับโคโลนีด้วย ABICS ของงานเพาะเชื้อทั้ง 84 งาน พร้อมกับการนับด้วยมือสำหรับการประเมินประสิทธิภาพ

ตารางที่ 2 ผลการนับจำนวนแบคทีเรียจาก ABICS เปรียบเทียบกับการนับด้วยมือแบบมาตรฐาน

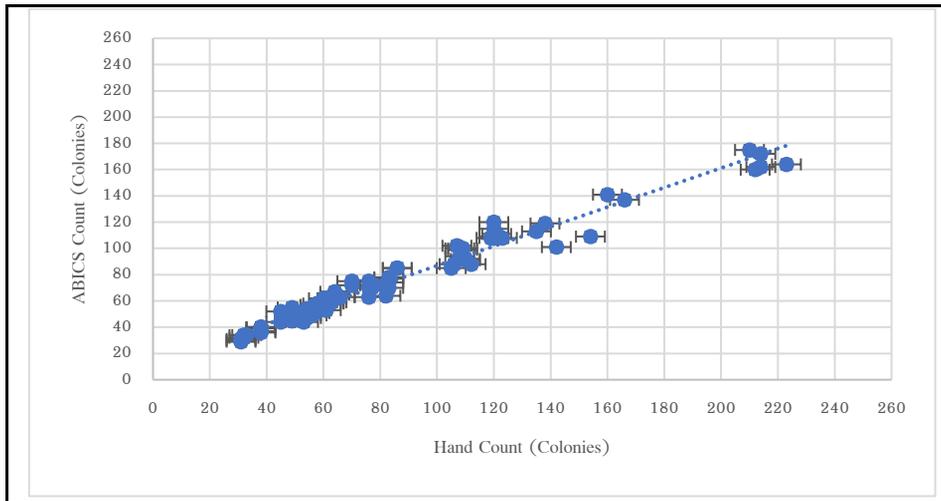
งานที่	ABICS นับ	คนนับ	ร้อยละความผิดพลาด	งานที่	ABICS นับ	คนนับ	ร้อยละความผิดพลาด
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922				43	47	54	12.963
1	29	31	6.452	44	49	54	9.259
2	31	31	0.000	45	58	61	4.918
3	34	33	3.030	46	58	62	6.452
4	34	32	6.250	47	62	60	3.333
5	32	32	0.000	48	59	62	4.839
6	30	31	3.226	49	53	61	13.115
7	44	45	2.222	50	63	66	4.545
8	52	45	15.556	51	65	64	1.563
9	50	51	1.961	52	62	63	1.587
10	51	52	1.923	53	59	63	6.349
11	58	58	0.000	54	67	64	4.688
12	57	57	0.000	55	70	76	7.895
13	72	70	2.857	56	63	76	17.105
14	75	70	7.143	57	70	77	9.091
15	85	86	1.163	58	75	76	1.316
16	85	86	1.163	59	72	78	7.692
17	111	121	8.264	60	77	83	7.229
18	108	119	9.244	61	64	82	21.951
19	119	138	13.768	62	70	83	15.663
20	113	135	16.296	63	74	83	10.843
21	109	154	29.221	64	78	83	6.024
22	101	142	28.873	65	102	107	4.673
23	137	166	17.470	66	100	108	7.407
24	141	160	11.875	67	88	106	16.981
<i>Enterobacter aerogenes</i> DMST2720				68	94	108	12.963
25	36	38	5.263	69	100	109	8.257
26	40	38	5.263	70	92	110	16.364
27	40	38	5.263	71	91	110	17.273
28	39	38	2.632	72	88	112	21.429
29	37	38	2.632	73	85	105	19.048

ตารางที่ 2 (ต่อ)

งานที่	ABICS นับ	คนนับ	ร้อยละความผิดพลาด
30	47	50	6.000
31	55	49	12.245
32	46	48	4.167
33	45	49	8.163
34	45	49	8.163
35	52	57	8.772
36	51	57	10.526
37	51	57	10.526
38	55	58	5.172
39	49	56	12.5
40	54	54	0
41	52	54	3.704
42	44	53	16.981

งานที่	ABICS นับ	คนนับ	ร้อยละความผิดพลาด
74	99	109	9.174
75	120	120	0.000
76	109	120	9.167
77	108	123	12.195
78	108	120	10.000
79	115	120	4.167
80	162	214	24.299
81	172	214	19.626
82	175	210	16.667
83	160	212	24.528
84	164	223	26.457
ค่าเฉลี่ยร้อยละความผิดพลาด			9.226
S.D. ร้อยละความผิดพลาด			7.16

จากตารางที่ 2 อัตราความผิดพลาดเฉลี่ยของ ABICS คือ ร้อยละ 9.23 ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราความผิดพลาดเฉลี่ยของการนับด้วยมือ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละความผิดพลาด คือ 7.16 (Jarvis, 2016) ภาพประกอบ 12 แสดงการเปรียบเทียบกันระหว่างจำนวนโคลนที่ถูกนับโดย ABICS และ จำนวนโคลนที่ถูกนับด้วยมือในงานเพาะเชื้อเดียวกัน ผลของวิธีการนับทั้งสองจะกระจายอยู่ใกล้กันตามมุม 45 องศา ซึ่งบ่งชี้ถึงความใกล้เคียงกันของผลการนับ



ภาพประกอบ 12 กราฟกระจาย (Scatter graph) แสดงความใกล้เคียงกันระหว่างจำนวนโคโลนีที่ถูกนับโดย ABICS และโคโลนีบนจานเดียวกันที่ถูกนับด้วยมือ

ตารางที่ 3 ผลการนับโดย ABICS ทั้ง 3 กรณี

กรณี		<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
กรณีการนับได้ถูกต้อง	จำนวนจานเพาะเชื้อ	3	2
	ร้อยละ	12.5	3.33
กรณีการนับได้น้อยกว่า	จำนวนจานเพาะเชื้อ	16	52
	ร้อยละ	66.66	86.66
กรณีการนับได้มากกว่า	จำนวนจานเพาะเชื้อ	5	6
	ร้อยละ	20.83	10.00

จากตารางที่ 3 ผลการนับโคโลนีถูกแบ่งออกเป็น 3 กรณี ได้แก่ กรณีการนับได้ถูกต้องกรณีการนับได้น้อยกว่าการนับด้วยมือ และกรณีการนับได้มากกว่าการนับด้วยมือ โดยกรณีการนับ ได้ผลน้อยกว่าการนับด้วยมือเป็นกรณีที่พบมากที่สุด และกรณีการนับได้ถูกต้องเป็นกรณีที่พบ น้อยที่สุด ตารางที่ 3 แสดงผลการนับโคโลนีทั้ง 3 กรณีของ ABICS จากจานเพาะเชื้อทั้งหมด 84 จาน

ผลการวิจัยชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่โดดเด่นของระบบ ABICS ในด้านความเร็ว และความแม่นยำ โดยสามารถวิเคราะห์ข้อมูลได้รวดเร็วกว่าการนับด้วยมือ พร้อมทั้งรักษาความแม่นยำในระดับที่น่าพอใจ (ร้อยละ 90.77 เมื่อเทียบกับการนับด้วยมือ) ศักยภาพในการประยุกต์ใช้ของระบบ ABICS

ยังเป็นอีกหนึ่งจุดแข็งที่สำคัญ ซึ่งบ่งชี้ถึงโอกาสในการนำเทคโนโลยีนี้ไปใช้ประโยชน์ในวงกว้าง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและลดภาระงานในหลากหลายอุตสาหกรรมอาหาร

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบระยะเวลาการนับโคโลนีด้วยมือและการนับด้วย ABCIS

จำนวน โคโลนี	เวลา		เร็วกว่า (เท่า)
	ด้วยมือ (min.)	ด้วย ABCIS (ms.)	
31	2.15	3120	41.35
31	2.03	3350	36.36
33	2.28	3010	45.45
32	2.1	3280	38.41
32	2.35	3490	40.37
31	2.08	3190	39.18
45	2.62	4150	37.81
45	2.45	3920	37.5
51	2.78	4310	38.72
52	2.55	4080	37.5
58	3.12	4250	44.12
57	3.05	4580	39.96
70	3.21	4110	46.71
70	3.38	4760	37.61
86	4.05	4220	51.9
86	3.4	4890	41.72
121	4.18	5000	50.16
119	4.05	4910	49.49
138	5.02	4730	58.56
135	4.48	4980	53.9
154	4.85	4650	62.58
142	4.7	4820	58.51
166	5.32	4500	65.6
160	5.28	4950	57.94
38	2.2	3210	41.12

จำนวน โคโลนี	เวลา		เร็วกว่า (เท่า)
	ด้วยมือ (min)	ด้วย ABCIS (ms.)	
54	3.2	4320	44.44
54	3.35	4610	37.09
61	3.1	4050	45.78
62	3.48	4380	40.87
60	3.28	4120	47.86
62	3.05	4450	41.01
61	3.12	4210	44.42
66	3.35	4000	50.25
64	3.22	4330	44.57
63	3	4660	38.63
63	3.18	4100	46.54
64	3.3	4400	45
76	3.15	4750	39.79
76	3.38	4270	47.54
77	3.02	4900	36.98
76	3.29	4190	47.02
78	3.45	4550	45.56
83	4.12	4380	51
82	3.55	4620	46.02
83	4.3	4200	54.29
83	4.08	4850	45.53
83	3.42	4480	45.71
107	4.25	4950	51.52
108	4.1	5000	49.2
106	4.32	4880	53.11

ตารางที่ 4 (ต่อ)

จำนวน โคโลนี	เวลา		เร็วกว่า (เท่า)
	ด้วยมือ (min.)	ด้วย ABICS (ms.)	
38	2.25	3080	43.7
50	2.58	4010	38.65
49	2.4	4280	33.64
48	3.08	3950	40.66
49	2.51	4190	35.94
49	3.2	3880	41.75
57	3.08	4420	41.63
57	3.45	4690	37.74
57	3.15	4290	44.06
58	3.01	4510	40.04
56	3.25	4350	44.83
54	2.9	4780	36.4
54	3.18	4180	45.55
53	3.03	4490	40.42

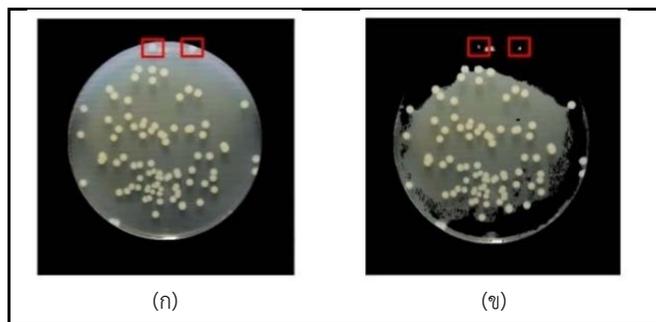
จำนวน โคโลนี	เวลา		เร็วกว่า (เท่า)
	ด้วยมือ (min)	ด้วย ABICS (ms.)	
110	4.45	4820	55.39
112	4	4680	51.28
105	4.3	4990	51.7
109	4.12	4710	52.57
120	4.28	4800	53.5
120	4.15	4930	50.61
123	4.4	4780	55.23
120	4.22	4900	51.67
120	4.35	4720	55.3
214	5.38	4550	64.31
214	5.25	4880	58.4
210	5.45	4600	64.67
212	5.4	4750	60.63
223	5.48	4520	66.04

ตารางที่ 4 แสดงให้เห็นระยะเวลาที่ใช้ในการนับโคโลนีลงอย่างมาก จากการข้อมูลพบว่า ABICS ใช้เวลาในการวิเคราะห์ และนับจำนวนโคโลนีต่อจานเพียง 3 ถึง 5 วินาที เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา 2 ถึง 5 นาทีของการนับด้วยมือ ABICS จึงมีความเร็วที่เหนือกว่าอย่างน้อย 35 เท่า และในบางกรณีอาจเร็วกว่าถึง 66 เท่า

อภิปรายผลการวิจัย

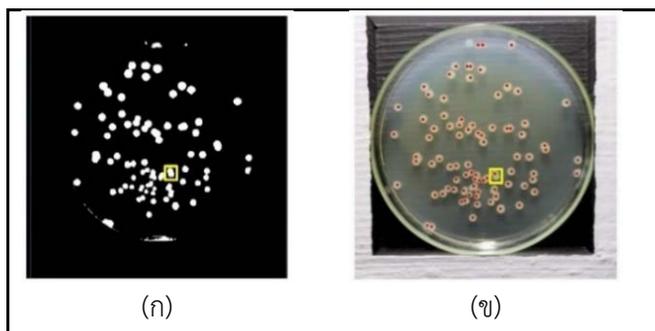
ข้อผิดพลาดในการนับโคโลนีเกิดจาก 2 กรณีคือการนับได้น้อยกว่า และการได้นับมากกว่าจาก ตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าการนับได้น้อยเกินไปเป็นปัญหาที่พบบ่อยที่สุด คิดเป็น ร้อยละ 95.96 ของข้อผิดพลาดทั้งหมด การนับได้น้อยเกินไปแต่ละครั้งเกิดจากสองสาเหตุ สาเหตุแรกคือการลบโคโลนีออกจากภาพโดยไม่ได้ตั้งใจในขั้นตอนการประมวลผลภาพประกอบ 6 ซึ่งเป็นขั้นตอน การลบแสงสะท้อนโดยใช้เลเซอร์ V ใน HSV บางครั้งความสว่างของพิกเซลของโคโลนีที่อยู่ใกล้ ขอบจานเพาะเชื้อ

จะใกล้เคียงกับความสว่างของแสงสะท้อน ซึ่งอาจทำให้โคโลนีถูกลบออกไปพร้อมกับพื้นที่ความสว่างสูง โดยไม่ได้ตั้งใจ เช่น ในงานเพาะเชื้อที่ 21, 22, 61, 72, 80 และ 84 เป็นต้น แสดงตัวอย่างในภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 13 แสดงโคโลนี 2 โคโลนีที่หายไปจากภาพโดยไม่ได้ตั้งใจ (ก) ก่อนการลบพื้นที่ความสว่างที่มาก และ (ข) หลังการลบพื้นที่ความสว่างที่มาก

สาเหตุที่สองของการนับได้น้อยกว่าคือโคโลนีที่ทับซ้อนกัน ซึ่งกลายเป็นปัญหาในขั้นตอนการประมวลผลสุดท้ายที่มีการนับโคโลนี โคโลนี 2 โคโลนีหรือมากกว่านั้นที่ทับซ้อนกันอาจถูกเข้าใจผิดและนับเป็นโคโลนีเดียว ดังที่แสดงในภาพประกอบ 14



ภาพประกอบ 14 แสดงโคโลนี 2 โคโลนีที่ทับซ้อนกัน (ก) ถูกนับผิดเป็นโคโลนีเดียว (ข)

การนับโคโลนีได้มากกว่าคิดเป็นร้อยละ 4.04 ของข้อผิดพลาด เกิดจากสัญญาณรบกวน ในภาพงานเพาะเชื้อ สัญญาณรบกวนเกิดขึ้นเมื่อไม่สามารถลบแสงสะท้อนออกไปได้อย่างสมบูรณ์ ในขั้นตอนการประมวลผลภาพประกอบ 7 เมื่อพิกเซลสีขาวบางส่วนยังคงอยู่ พวกมันอาจถูกเข้าใจผิดว่าเป็นโคโลนีได้ ในอนาคตอาจสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้โดยการใช้เซ็นเซอร์วัดแสง เพื่อปรับความสว่างของหลอดไฟ LED ในกล่องถ่ายภาพ

เอกสารอ้างอิง

- ณัฐพงษ์ สังข์สอน. (2565). *การพัฒนาแอปพลิเคชันมือถือเพื่อสนับสนุนการดำเนินงานนำเข้าสินค้ากรณีศึกษา บริษัท ดีดี 1971 จำกัด และเครือข่ายบริษัท*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- Albaradei, S. A., Napolitano, F., Uludag, M., Thafar, M., Napolitano, S., Essack, M., & Gao, X. (2020). Automated counting of colony forming units using deep transfer learning from a model for congested scenes analysis. *IEEE Access*, 8, 164340-164346. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2020.3021656>.
- Badalyan, G., Díaz, C., Bücking, M., & Lipski, A. (2018). Novel sensor platform for rapid detection and quantification of coliforms on food contact surfaces. *Journal of Microbiological Methods*, 153, 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.009>
- Gonzalez, R. C., & Woods, R. E. (2008). *Digital image processing (4th ed.)*. Pearson.
- Jarvis, B. (2016). *Statistical aspects of the microbiological examination of foods (3rd ed.)*. Elsevier.
- Pisuttilap, N., & Saengswetmaneengam, N. (2001). Study of Escherichia coli analysis in frozen seafood by MPN technique. *Bulletin of the Department of Medical Sciences (Thailand)*, 43(2), 95-101.
- Reddy, P. V. G. D. (2021). Blood vessel extraction in fundus images using Hessian eigenvalues and adaptive thresholding. *Evolutionary Intelligence*, 14(2), 577-582.
- Sever, B. (2020). *U.S. Food and Drug Administration (FDA)*. Salem Press.

- Shamshad, A. (2020). *Building Computer Vision Applications Using Artificial Neural Networks*. Berkeley, CA, USA: Apress.
- Sophie, E., Juliane, E., Valérie, E., Sylvie, E. L., & Anne, E. (2015). Bacterial colonies in solid media and foods: A review on their growth and interactions with the micro-environment. *Frontiers in Microbiology*, 6, Article 1284.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01284>.
- Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J., & Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 91-109.
[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00151-0).
- Zhu, G., Yan, B., Xing, M., & Tian, C. (2018). Automated counting of bacterial colonies on agar plates based on images captured at near-infrared light. *Journal of Microbiological Methods*, 153, 66-73.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.004>.