



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวอุปกรณ์ทางการแพทย์ด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์

The Analysis of Type and Quantity of Microorganisms found on the Surface of Medical Devices by Computer Program

ผศ.ดร. สรินพร วิสูลัทธิพงศ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากทุนพัฒนานักวิจัยใหม่
กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประจำปีงบประมาณ 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิว
อุปกรณ์ทางการแพทย์ด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์

The Analysis of Type and Quantity of Microorganisms found on
the Surface of Medical Devices by Computer Program

ผศ.ดร. สรณพร วิสิษฐธาทพงศ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากทุนพัฒนานักวิจัยใหม่
กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประจำปีงบประมาณ 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย).การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวอุปกรณ์ทางการแพทย์ด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์

ชื่อโครงการ(ภาษาอังกฤษ The Analysis of Type and Quantity of Microorganisms found on the Surface of Medical Devices by Computer Program.....

แหล่งเงิน....กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.....

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561.....จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน.....480,000.....บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย...1... ปี 10 เดือน ตั้งแต่ 1 มกราคม 2561 ถึง.....31 ตุลาคม 2562.....

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร. สรินพร วิสิฐสัทธพงศ์

หน่วยงานต้นสังกัด คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันการนับจำนวนและการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียมีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสามารถปนเปื้อนอยู่ในสิ่งต่าง ๆ รอบตัวของมนุษย์ ตัวอย่างเช่น อาหาร น้ำ รวมถึงอากาศ ซึ่งแบคทีเรียบางชนิดสามารถนำไปสู่โรคหรืออาการผิดปกติได้ โดยในปัจจุบันวิธีการในการนับจำนวนของเชื้อแบคทีเรียสามารถนับได้โดยใช้ตาเปล่าเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียไม่หนาแน่นมาก โดยสามารถมองเห็นเป็นโคโลนีเดี่ยวได้ รวมถึงการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจำเป็นจะต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการตรวจนับและวิเคราะห์ ทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง และผู้เชี่ยวชาญต้องทำการนับและวิเคราะห์เป็นเวลานาน ซึ่งในงานวิจัยนี้ออกแบบโปรแกรมที่ใช้สำหรับนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เทคนิคในการประมวลผลภาพในการตรวจนับ และอัลกอริทึมของ Machine Learning (Machine Learning) ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella enterica* โดยเริ่มแรกใช้เทคนิคการจิ้ม (Stab technique) เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดลงบนจานที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Luria-Bertani agar (LB agar) เพื่อง่ายต่อการตรวจจบบนภาพ โดยมีการใช้เทคนิคประมวลผลภาพในการแยกส่วนของภาพสำหรับบางโคโลนีที่อยู่ติดกันหรือใกล้กัน เพื่อตรวจจบบโคโลนีของแบคทีเรียและนับจำนวนของแบคทีเรีย จากนั้นจะนำภาพโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดเทรน (train) ในอัลกอริทึม Machine Learning จำนวนประมาณ 800 ภาพ ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้โดยใช้เทคนิคการจิ้มมีประสิทธิภาพในนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย 98.75% และสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ 98.12% และได้มีการทดลองนำรูปที่ได้จากเทคนิคกระจายเชื้อ (Spread plate technique) มาทดสอบอัลกอริทึมนี้พบว่ามีประสิทธิภาพในการนับจำนวนของแบคทีเรีย 33.61% และสามารถคัดแยกเชื้อทั้งสองชนิดได้ 41.73%

คำสำคัญ: การนับจำนวนแบคทีเรีย, การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*

enterica, เทคนิคการจิ้มเชื้อแบคทีเรีย, การประมวลผลภาพ, อัลกอริทึม Machine Learning , เทคนิคการกระจาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: The Analysis of Type and Quantity of Microorganisms found on the Surface of Medical Devices by Computer Program.....

Researcher:.....Asst. Prof. Dr. Sarinporn.....Visitsattapongse.....

Faculty: Engineering.....**Department:**.....Biomedical Engineering.....

ABSTRACT

Discrimination of bacteria is necessary because bacteria are remarkably crucial as they can contaminate in many possible ways such as food, water, air or environment, and lead to pathogenesis. In recent times, the technique of discrimination and counting bacteria are not only have a large expenditure of time and funds, but the discrimination method also required an expert in field. According to above, this research introduces an algorithm for solve those problems by using *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* as a pilot study. The stab technique, to inoculated bacteria in Luria-Bertani agar (LB agar) plates, was used for providing a good detection. In addition, the image segmentation technique was invited to train the separate colony of each bacterium for Machine Learning algorithm. It took approximately 800 images of bacteria for training process. The algorithm had resulted in 98.75 % of accuracy in bacteria's colony counted and 98.12% in discriminated between *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* from stab technique. The algorithm had resulted in 33.61 % of accuracy in bacteria's colony counted and 41.73% in discriminated between *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* from spread technique

Keywords: Bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, webcam camera, Machine Learning algorithm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้จากความช่วยเหลือของหลายฝ่ายทั้งทางตรงและทางอ้อม ซึ่งงานวิจัยนี้จะสำเร็จลงไม่ได้หากปราศจากความช่วยเหลือของคณะอาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งได้สนับสนุนด้านคำแนะนำปรึกษา การจัดหาอุปกรณ์สำหรับการวิจัย และสถานที่ในการทำงานวิจัย โดยการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2561



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....	i
ABSTRACT	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
สารบัญ.....	iv
สารบัญภาพ.....	vii
สารบัญตาราง.....	ix
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 แบคทีเรีย (Bacteria).....	4
2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial culture medium).....	7
2.3 วิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	8
2.4 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	14
2.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Preparation of the Culture Media)	16
2.6 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย (Maintenance of Bacteria)	18
2.7 การประมวลผลภาพดิจิทัล [6], [7]	19
2.8 Circular Hough Transform [9].....	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.9 Edge Detection	27
2.10 Watershed Transform	29
2.11 Machine Learning (Machine Learning)	30
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	34
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	34
3.2 ขั้นตอนการออกแบบและสร้างเครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น	35
3.3 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับการจุ่มเชื้อและการกระจายเชื้อเจือจางตัวอย่างเริ่มต้น	36
3.4 ขั้นตอนการออกแบบโปรแกรมการแสดงผลในการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย	39
3.5 ขั้นตอนการแยกชนิดของแบคทีเรีย	44
บทที่ 4 ผลการวิจัย	47
4.1 ผลการออกแบบเครื่องตรวจนับโคโลนี	47
4.2 ผลการจุ่มเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	47
4.3 ผลการทำ Ten-fold Serial dilution	48
4.4 ผลการทำ Circular Hough transform ในการตรวจนับโคโลนี	51
4.5 ผลการทำ Watershed segmentation ในการแยกโคโลนี	51
4.6 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนี	52
4.7 การตรวจนับโคโลนีด้วยโปรแกรมเทียบกับนับด้วยตาเปล่า	54
4.8 การแยกชนิดของแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> กับ <i>Salmonella enterica</i> โดยใช้ Machine Learning	54
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.1 สรุปผลการทดลอง	57
5.2 ปัญหาและแนวทางการแก้ไข	57
บทที่ 6 สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย	58
เอกสารอ้างอิง	59
ภาคผนวก ก	62
ภาคผนวก ข	73
ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย	78



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 รูปร่างของแบคทีเรียประเภทต่าง ๆ [3].....	4
รูปที่ 2.2 การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Streak Plate).....	9
รูปที่ 2.3 การทำให้เชื้อกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Spread Plate).....	9
รูปที่ 2.4 วิธีการเจือจางเชื้อแบคทีเรีย (Ten-fold Dilution).....	10
รูปที่ 2.5 วิธีการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (Pour-plate Technique)	10
รูปที่ 2.6 ลักษณะการเจริญกระจายตัวของแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ	11
รูปที่ 2.7 ลักษณะกราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย.....	11
รูปที่ 2.8 พิกัดของระบบภาพดิจิทัล	19
รูปที่ 2.9 ระบบสีRGB	20
รูปที่ 2.10 ระบบสี Gray scale	20
รูปที่ 2.11 ภาพในระบบสี Grayscale	21
รูปที่ 2.12 รูปที่แบ่ง threshold.....	21
รูปที่ 2.13 Centroid ของ Region ที่มีรูปร่างต่างๆ.....	22
รูปที่ 2.14 Area ของ Region เท่ากับ 9 pixel.....	22
รูปที่ 2.15 Perimeter ของ Region เท่ากับ 8 pixel	23
รูปที่ 2.16 Major Axis และ Minor Axis	23
รูปที่ 2.17 Compactness ของ Region.....	24
รูปที่ 2.18 Bounding Box และ Minimal Bounding Box ของ Region.....	24
รูปที่ 2.19 ตัวอย่างการตรวจจับวัตถุรูปวงกลม	26
รูปที่ 2.20 ตัวอย่างการตรวจจับของภาพแบบ Prewitt	28
รูปที่ 2.21 ประมวลผลภาพเกรย์สเกลจะใช้ในการแบ่งแยกวัตถุในภาพ.....	29
รูปที่ 2.22 ภาพเมื่อกำหนดให้ค่าสูงขึ้นก็จะคลุมพื้นที่ได้มากขึ้น	30
รูปที่ 2.23 ขั้นตอนการเรียนรู้ของ Machine Learning [12].....	31
รูปที่ 2.24 แผนผังการใส่ข้อมูลใหม่เข้าไปเพื่อทดสอบความแม่นยำของโมเดล [12]	31
รูปที่ 3.1 แสดงลำดับการดำเนินงานวิจัย	34
รูปที่ 3.2 ต้นแบบของเครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น	35
รูปที่ 3.3 วิธีการ Sterile technique	36
รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (LB broth).....	37
รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการจิ้มเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Stab technique).....	37
รูปที่ 3.6 ขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น (Dilution technique).....	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 3.7 ขั้นตอนการนำเชื้อมากระจายบนผิวของอาหารแข็ง (spread technique).....	38
รูปที่ 3.8 การบ่มเชื้อแบคทีเรียในตู้บ่มเชื้อ	39
รูปที่ 3.9 บล็อกไดอะแกรมของโปรแกรมในการตรวจนับจำนวนโคโลนี	40
รูปที่ 3.10 ตัวอย่างภาพโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโต	40
รูปที่ 3.11 รูปที่ได้จากการบันทึกภาพ.....	41
รูปที่ 3.12 ภาพRGB	41
รูปที่ 3.13 ภาพ Grayscale.....	42
รูปที่ 3.14 ภาพแปลงภาพระดับสีเทาให้เป็นขาว-ดำ	42
รูปที่ 3.15 ภาพผลลัพธ์ที่ได้จากการตรวจนับโคโลนี	43
รูปที่ 3.16 การแบ่งส่วนของภาพ watershed.....	43
รูปที่ 3.17 ภาพผลลัพธ์ที่ได้จากกระบวนการ Watershed Transform.....	44
รูปที่ 3.18 ภาพที่ได้จากการเพาะเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคการฉีดยา (Stab technique).....	44
รูปที่ 3.19 แสดงผลลัพธ์ของการจับภาพโคโลนีของแบคทีเรีย <i>Staphylococcus aureus</i> กับเชื้อแบคทีเรีย <i>Salmonella enterica</i>	45
รูปที่ 3.20 แสดงตัวอย่างภาพที่ใช้ในการเทรนเครื่องสำหรับการแยกชนิดของแบคทีเรีย	46
รูปที่ 4.1 ส่วนประกอบของเครื่องตรวจนับโคโลนี	47
รูปที่ 4.2 ผลการฉีดยาแบคทีเรีย (Stab technique).....	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 4. 1 ผลการทำ Ten fold Serial dilution	48
ตารางที่ 4. 2 ผลการทำ Watershed segmentation ในการตรวจจับโคโลนี.....	51
ตารางที่ 4. 3 ผลการทำ Watershed segmentation ในการแยกโคโลนี	52
ตารางที่ 4. 4 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีในโปรแกรม Python.....	53
ตารางที่ 4. 5 ผลการตรวจนับโคโลนีด้วยโปรแกรมเทียบกับนับด้วยตาเปล่า.....	54
ตารางที่ 4. 6 แสดงผลการแยกชนิดของแบคทีเรีย	54



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันการคำนวณหาปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (การการนับจำนวนของแบคทีเรีย) และการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียมีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสามารถปนเปื้อนอยู่ในสิ่งต่าง ๆ รอบตัวของมนุษย์ ตัวอย่างเช่น อาหาร น้ำ รวมถึงอากาศ ซึ่งแบคทีเรียบางชนิดสามารถนำไปสู่โรคหรืออาการผิดปกติได้ ซึ่งจะเรียกว่า แบคทีเรียก่อโรค [1] โดยมีผู้ป่วยในที่มีสาเหตุการป่วยของโรคจากเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในปี 2546-2555 มีอัตราการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยในที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ 59.55% ภายใน 10 ปี [2] โดยในปัจจุบันวิธีการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียและการคัดแยกเชื่อนั้นจำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ได้จากการเจือจางตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียจนสามารถมองเห็นเป็นโคโลนีเดียว ๆ ได้ ผู้เชี่ยวชาญจำเป็นต้องนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่มองเห็นบนอาหารในจานเพาะเชื้อด้วยตาเปล่า และการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีของแบคทีเรียยังจำเป็นต้องอาศัยความเชี่ยวชาญของผู้ทำงานในด้านนี้ ทำให้การที่จะนับจำนวนและการจำแนกเชื่อนั้นจำเป็นต้องใช้เวลานาน และต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการทำงานเป็นระยะเวลานานซึ่งอาจเกิดความผิดพลาดขึ้นเมื่อผู้เชี่ยวชาญนั้นเกิดการล้าจากการทำงาน

จากปัญหาดังกล่าวจึงเป็นจุดเริ่มต้นของโครงการวิจัยนี้ในการออกแบบอุปกรณ์เก็บภาพจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และออกแบบระบบการประมวลผลภาพในนับจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงการใช้อัลกอริทึม Machine Learning ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย โดยในโครงการนี้ได้ใช้แบคทีเรียจำนวน 2 ชนิดในการคัดแยกเชื้อคือ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella enterica* เพื่อเป็นต้นแบบในการสร้างอุปกรณ์ที่สามารถนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียและสามารถจำแนกเชื้อแบคทีเรียได้ว่าเป็นชนิดใด โดยอุปกรณ์นี้จะสามารถลดระยะเวลาในการทำงานของผู้เชี่ยวชาญได้ และสามารถพัฒนาเป็นอุปกรณ์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้นในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 สร้างอุปกรณ์เก็บภาพ และระบบในการนับจำนวนโคโลนี รวมถึงคัดแยกชนิดของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.2 เพื่อลดเวลาในการทำงานของผู้เชี่ยวชาญรวมถึงเพิ่มประสิทธิภาพของการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียให้มากยิ่งขึ้น

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ระบบที่จัดทำขึ้นสามารถนับจำนวนและคัดแยกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย

Staphylococcus aureus และ *Salmonella enterica* ได้ โดยในตอนเริ่มต้นจะใช้วิธีการจุ่มเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ Luria-Bertani agar (LB agar) ทำการถ่ายรูปเชื้อโคโลนีของแบคทีเรียโดยใช้กล้องเว็บแคม ใช้เทคนิคการหาขอบของภาพในการตีกรอบและนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย และอัลกอริทึมของ Machine Learning ที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียใช้เป็น Classification algorithm ใช้ภาพตัวอย่างจำนวน 800 ภาพในการเทรน

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานในช่วงเริ่มต้นจะเป็นการศึกษาการทำงานต่าง ๆ รวมทั้งจัดหาอุปกรณ์สำหรับทำการวิจัย จากนั้นจึงเริ่มทดลองออกแบบอุปกรณ์ และจัดทำส่วนต่าง ๆ สุดท้ายเป็นการทดสอบและแก้ไข โดยมีกระบวนการเป็นลำดับขั้นดังนี้

1.4.1 ศึกษาข้อมูลรูปร่างของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella enterica* เพื่อระบุลักษณะเฉพาะโคโลนีของแบคทีเรียทั้งสองชนิดที่มีความแตกต่างหรือเหมือนกันอย่างไร

1.4.2 ศึกษาและออกแบบอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการถ่ายรูปโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย

1.4.3 ศึกษาวิธีการประมวลผลภาพ และการใช้ Machine Learning

1.4.4 จัดทำอุปกรณ์สำหรับจัดเก็บภาพโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย

1.4.5 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่จะใช้เป็นตัวอย่างในการเทรน โดยใช้เทคนิคการจุ่มเชื้อ และเทคนิคการกระจายเชื้อ

1.4.6 เก็บภาพโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย

1.4.7 ออกแบบระบบประมวลผลภาพ

1.4.8 นำภาพโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ระบบประมวลผลภาพ และเทรนในอัลกอริทึม Machine Learning

1.4.9 ทดลองนำรูปที่ไม่ได้เทรนในอัลกอริทึม Machine Learning มาทดลองระบบ

1.4.10 ปรับปรุงแก้ไข และเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่เทรนในอัลกอริทึม Machine Learning

1.4.11 รวบรวมข้อมูลสำหรับการจัดทำรายงาน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ลดเวลาในการทำงานของผู้เชี่ยวชาญในการนับและคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5.2 ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียสูงขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรีย (Bacteria)

แบคทีเรีย [3] คือ จุลินทรีย์ที่เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่เป็นเซลล์แบบโปรแคริโอต (prokaryotic cell) พบทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ อากาศ แบคทีเรียมีบทบาทสำคัญต่ออาหารและการผลิตอาหารเพราะแบคทีเรียเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (microbial spoilage) และทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้นการถนอมอาหาร (food preservation) ทุกวิธีเป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อทำลายหรือควบคุมสภาวะแวดล้อมเพื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียแม้มีโทษกับอาหาร แต่แบคทีเรียบางชนิด เช่น lactic acid bacteria สามารถนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากในการหมักอาหาร (fermentation) และการบำบัดของเสีย เช่น การกำจัดน้ำเสีย (waste water treatment) แบคทีเรียมีขนาด 0.5-10 ไมครอน (micron) มีรูปร่างหลายแบบดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 รูปร่างของแบคทีเรียประเภทต่าง ๆ [3]

- บาซิลลัส (*bacillus*) มีรูปร่าง เป็นท่อน หรือเป็นแท่งเช่น *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*
 - สเตรปโทบาซิลลัส (*Streptobacillus*) เมื่อแบ่งเซลล์แล้วเรียงตัวต่อเป็นสายยาว
 - ท่อนโค้ง (*curverod*) เช่น *Vibrio*
- ทรงกลมหรือค็อกคัส (*coccus*) เช่น
 - ไมโครค็อกคัส (*Micrococcus*) เป็นแบคทีเรีย เซลล์เดี่ยวขนาดเล็ก
 - ดิพโคค็อกคัส (*Diplococcus*) เมื่อแบ่งเซลล์แล้วติดกันเป็นคู่
 - สเตรปโทค็อกคัส (*Streptococcus*) แบ่งตัว เรียงตัวเป็นสายยาว เหมือนโซ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สเตรปโทค็อกคัส (*Staphylococcus*) เป็นลักษณะของ เซลล์ทรงกลมแบ่งตัวหลายระนาบ อยู่ติดกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น เช่น *Staphylococcus aureus*
- สไปโรคีท (*Spirochete*) รูปร่างบิดเป็นเกลียว ผนังเซลล์ยืดหยุ่นได้ เช่น *Campylobacter jejuni*

การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย

แบคทีเรียขยายพันธุ์โดยการแบ่งตัวแบบทวิภาค (binary fission) คือแบ่งจากหนึ่งเป็นสอง เซลล์เท่า ๆ กัน ระยะเวลาการแบ่งเซลล์เรียกว่า generation time ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะใช้เวลาไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและสภาพแวดล้อม

1. cytoplasmic membrane (เยื่อหุ้มเซลล์) เป็นเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ละลายน้ำ (hydrophilic) ประกอบด้วยฟอสโฟลิปิด 20-30% โปรตีน 50-70% และคาร์โบไฮเดรตเล็กน้อย ส่วนของลิปิดและโปรตีนมีการเลื่อนไหลไปมาได้ (fluidity)
2. Cytoplasmic matrix มีลักษณะเป็นวุ้น ประกอบด้วย น้ำ 70% ประจุสารอนินทรีย์ตัวกลางต่าง ๆ ของกระบวนการเมตาโบลิซึม DNA granule (สะสมสารอาหาร โปรตีน) ไรโบโซม
3. Ribosomes เป็นเม็ดเล็ก ๆ ขนาด 15-20 nm กระจายทั่วปฏิกิริยาในเซลล์ประกอบด้วย RNA 60-90% โปรตีน 10-40% จำนวนขึ้นกับความต้องการสร้างโปรตีน
4. Nucleoid ประกอบด้วย DNA เส้นเดี่ยวหรือคู่ปลายสองข้างเชื่อมกัน ยาวประมาณ 500 เท่าของเซลล์ DNA ของแบคทีเรียอยู่ในนิวคลีออยด์หรือ bacterial chromosome
5. Cell wall (ผนังเซลล์) ผนังเซลล์เป็นส่วนประกอบเซลล์ที่อยู่ระหว่างแคปซูลและเยื่อหุ้มเซลล์ แบคทีเรียทุกชนิดยกเว้น mycoplasma มีโครงสร้างนี้ ซึ่งหน้าที่ที่สำคัญของผนังเซลล์ คือ ช่วยให้เซลล์คงรูปไว้ป้องกันและรักษา ความดันภายในเซลล์ เป็น precursor ในขบวนการสังเคราะห์สารต่าง ๆ เป็นต้น
6. Capsules ลักษณะเป็นฉนวนรูปร่างไม่แน่นอนไม่ติดสีแกรม ความหนาแตกต่างกันตามชนิดแบคทีเรีย
7. Pili ยาวกว่า fimbriae จำนวนน้อยกว่ามีส่วนร่วมในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในแบคทีเรีย โดยอาศัย F-pili (sex pili) ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของสารพันธุกรรมจาก donor ไป receptor และมีคุณสมบัติเป็น antigen ส่วน Fimbriae มีลักษณะเป็นขนละเอียดเล็ก ๆ จำนวนมาก ไม่มีหน้าที่ในการเคลื่อนที่แต่มีหลักฐานว่าช่วยให้แบคทีเรีย เกาะติดกับผิว
8. Flagella ลักษณะเป็นเส้นยาวคล้ายเส้นด้าย ความยาว 1-70 ไมโครเมตร ยื่นออกมาจากผนังเซลล์มีในแบคทีเรีย spiral เกือบทั้งหมด

2.1.1 แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [4] เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มี

รูปร่างเป็นทรงกลม โดยโคโลนีของแบคทีเรียชนิดนี้มีลักษณะกลมมน โคโลนีมีความวาวสีของโคโลนีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่อนข้างเป็นสีเหลือง ขนาดของโคโลนีอยู่ที่ 2-5 มิลลิเมตร โดยแบคทีเรียชนิดนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มีความสำคัญ โดยเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในร่างกายของคน โดยสามารถพบได้บริเวณผิวหนัง (skin flora) รวมถึงในรูจมูก (nasal carrier) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียตัวนี้มีปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงในการเกิดโรค (virulence) ดังนี้

2.1.1.1 โปรตีนที่ผนังเซลล์ (cell wall protein) คือ โปรตีนเอ (protein A) ซึ่งจะเกาะกับส่วน Fc ของอิมมูโนโกลบูลินชนิดที่ป้องกันการกลืนกินของเซลล์เม็ดเลือดขาว

2.1.1.2 สารพิษที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (exotoxin) ตัวอย่างเช่น staphylococcal enterotoxin เป็นสารพิษที่หลั่งออกมาจากเซลล์แบบทนความร้อน (heat-stable exotoxin) ซึ่งเป็นสาเหตุในการก่อโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) โดยสารพิษชนิดนี้สามารถทนความร้อน 100 องศาเซลเซียสได้นานถึง 30 นาที อีกทั้งทนต่อสภาพแวดล้อมในกระเพาะอาหาร ซึ่งมีสถานะเป็นกรด โดยผู้ที่ได้รับสารพิษชนิดนี้จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อุจจาระร่วง หลังจากได้รับสารพิษ 1-6 ชั่วโมง

2.1.1.3 เอนไซม์ ได้แก่ Hyaluronidase, Lipase, DNase, RNase, Phosphatase และ Fibrinolysin ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นตัวช่วยให้ *S. aureus* สามารถทำลายเซลล์ต่าง ๆ ได้ดียิ่งขึ้น

โรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจากเชื้อ *S. aureus* ได้แก่

1. การติดเชื้อบริเวณผิวหนังและบริเวณบาดแผล ตัวอย่างเช่น ฝี ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อบริเวณรูขุมขน ทำให้เกิดการอักเสบ บวมแดงและเป็นหนอง และยังมีอาการอื่น ๆ อีกเช่น ฝีฝีกั้ว กุ้งยิง รวมถึงการติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด
2. โรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เป็นเชื้อปนเข้าไปทำให้เกิดอาการอาการเป็นพิษ
3. กลุ่มอาการผิวหนังกำพร้าหลุดลอกที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* ซึ่งพบได้ในเด็กแรกเกิด และเด็กเล็ก สาเหตุมาจากเอกซโฟลิเอทีฟ ทอกซินของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*
4. กลุ่มอาการช็อกที่เกิดจากสารพิษ เกิดจากการที่ร่างกายดูดซึมสารพิษ TSST-1 เข้าไปส่วนมากพบในผู้หญิงที่มีการใช้ผ้าอนามัยแบบสอด จะมีส่วนกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้หลั่งสารพิษออกมา ผู้ป่วยที่มีการดูดซึมสารพิษเข้าไปจะมีอาการไข้สูง เป็นผื่น เจ็บคอ มีภาวะขาดน้ำ คลื่นไส้ อาเจียน ตับ ไต วาย จนไปถึงช็อก
5. การติดเชื้ออื่น ๆ เช่น โรคปอดบวม โรคติดเชื้อในกระแสโลหิต ภาวะไขกระดูกอักเสบ และไขข้ออักเสบ

2.1.2 แบคทีเรีย *Salmonella enterica* (*S. enterica*) [4] เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod-shaped) โคโลนีของแบคทีเรียชนิดนี้มีความกลมมน วาว และสีค่อนข้างเป็นสีขาว ขนาดของโคโลนีอยู่ที่ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ลักษณะโดยทั่วไปเชื้อชนิดนี้สามารถโตได้ดีบนเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปในช่วง pH 4.5-9.0 สามารถทนอุณหภูมิต่ำได้ดี เชื้อชนิดนี้ส่วนมากพบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก รวมถึงสัตว์เลื้อยคลาน แบคทีเรียชนิดนี้ก่อให้เกิดโรค salmonellosis เมื่อได้รับแบคทีเรียเป็นจำนวน 10^6 - 10^8 เซลล์ ส่วนที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคได้แก่ การเกาะติดกับเยื่อผนังเซลล์ของลำไส้ได้ดี รวมถึงความสามารถในการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ เนื้อเยื่อ ทนต่อความเป็นกรด มีเอนโดทอกซินและเอกโซทอกซิน รวมถึงสามารถอาศัยอยู่ในเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ ทำให้เชื้อชนิดนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่ออยู่ในร่างกาย โดยสามารถแบ่งอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ดังนี้

1. โรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ โดยอาการนี้ร้อยละ 70 เกิดจาก *Salmonella* ทุกซีโรไทป์ ระยะการฝังตัวประมาณ 6-48 ชั่วโมงหลังได้รับอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อน ทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อุจจาระร่วง รวมถึงมีไข้เล็กน้อย ในคนปกติจะสามารถหายได้เองในช่วง 2-7 วัน แต่ในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือเด็กแรกเกิดอาจเกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิตและเสียชีวิตได้
2. ใช้เอนเทอริก เป็นอาการไข้สูงที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ ใช้ไทฟอยด์ และพาราไทฟอยด์ โรคนี้เกิดเฉพาะในคน ระยะฝังตัวประมาณ 1-3 สัปดาห์ หลังจากการได้รับเชื้อ เชื้อจะเข้าสู่กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ต่อมมีน้ำเหลืองและเข้าสู่เลือด เชื้อสามารถกระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ ได้ แต่อีกส่วนจะถูกขับออกมาทางปัสสาวะและอุจจาระ ในสัปดาห์ที่ 2 ผู้ป่วยมีอาการไข้สูงลอย ปวดศีรษะ ปวดเมื่อย เบื่ออาหาร ท้องผูกในผู้ใหญ่ ถ่ายเหลวในเด็ก ตับม้ามโต ตรวจพบเชื้อในเลือด และในอุจจาระ และปัสสาวะตามลำดับ อาจมีจุดแดงบริเวณหน้าอก หรือหน้าท้อง กรณีที่มีการทำลายเยื่อลำไส้แบบรุนแรงอาจทำให้ลำไส้ทะลุ ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้
3. โโลหิตเป็นพิษ เป็นการติดเชื้อแบคทีเรียโดยไม่มีอาการของอุจจาระร่วงร่วมด้วย ผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูง หนาวสั่น อ่อนเพลีย ตับและม้ามโต รวมถึงมีการติดเชื้อที่อวัยวะอื่นร่วมด้วย

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial culture medium)

ในการศึกษาเรื่องแบคทีเรียทางห้องปฏิบัติการมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียภายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้น โดยมีการควบคุมสภาวะของการเพาะเลี้ยงให้เป็นไปตามธรรมชาติของแบคทีเรียแต่ละชนิดให้มากที่สุด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเรียนรู้ความต้องการต่าง ๆ ของแบคทีเรียตามธรรมชาติ และนำมาศึกษาถึงวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียภายในห้องปฏิบัติการ ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรีย แบคทีเรียต้องการสารอาหารเพื่อให้ในการเจริญเติบโต ดังต่อไปนี้

2.2.1 พลังงาน (Energy) แหล่งพลังงานจากแสง แบคทีเรียที่ได้พลังงานจากแสงเรียกว่า Phototroph และแหล่งพลังงานจากกระบวนการออกซิเดชัน (Oxidation) ของสารเคมีแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากกระบวนการออกซิเดชันเรียก Chemotroph

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 แหล่งคาร์บอน (Carbon Sources) แหล่งคาร์บอนอยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์ และสารอินทรีย์แบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารในรูปของสารอินทรีย์ สามารถเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์เป็นคาร์โบไฮเดรต เรียกว่า Autotroph ถ้าได้พลังงานจากแสงอาทิตย์ด้วย เรียกว่า Photoautotroph ถ้าได้พลังงานจากการออกซิเดชันของสารเคมีด้วย เรียกว่า Chemoautotroph ส่วนแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารในรูปของ สารอินทรีย์ เรียกว่า Heterotroph

2.2.3 แหล่งของอิเล็กตรอน (Electron Sources) แบคทีเรียต้องการอิเล็กตรอนเพื่อใช้ใน กระบวนการเมตาบอลิซึม พวกที่ใช่อินทรีย์เป็นแหล่งอิเล็กตรอน เรียกว่า Lithotroph ส่วนพวก ที่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอิเล็กตรอน เรียกว่า Organotroph

2.2.4 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen sources) มีทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ แหล่งที่เป็น สารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ โปรตีน แหล่งที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น แกลูตามีน ไนเตรต หรือ แอมโมเนียม

2.2.5 แหล่งของออกซิเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส ออกซิเจนได้จากหลายแหล่งเช่น น้ำ และสารอาหาร แหล่งของซัลเฟอร์อาจอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ ซัลเฟอร์มีความ จำเป็น ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด แหล่งของฟอสเฟตอาจอยู่ในรูปของฟอสเฟตที่เป็นองค์ ประกอบของกรด นิวคลีอิก นิวคลีโอไทด์ ฟอสโฟลิปิด กรดไขมัน โคเอนไซม์ และสารอื่น ๆ

2.2.6 ไอออนของโลหะหนัก ไอออนของโลหะหนักมีความจำเป็นต่อการเจริญตามปกติ ของแบคทีเรีย เช่น K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} เป็นต้น ซึ่งบางชนิดจัดเป็น Cofactor ที่สำคัญของ เอนไซม์ต่าง ๆ

2.2.7 วิตามิน แบคทีเรียต้องการวิตามินในปริมาณน้อย แต่วิตามินมีความจำเป็นต่อการ ดำรงชีวิตและการเจริญเติบโตมาก โดยทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่าง ๆ แบคทีเรียบางชนิด สามารถ สังเคราะห์วิตามินได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ

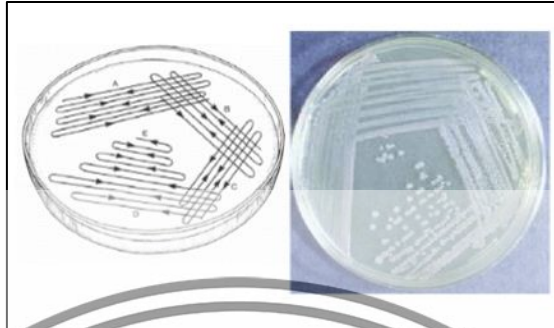
2.3 วิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ [5] ส่วนใหญ่ทำเพื่อต้องการแยกเชื้อ ให้บริสุทธิ์ เรียกว่า Pure Culture ซึ่งหมายถึงกลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ หรืออาจทำเพื่อต้องการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (Colony count) ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

2.3.1 การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Streak Plate) คือ การทำให้เชื้อที่มีปริมาณมากค่อย ๆ

กระจายออกจนแยกเป็นโคโลนี (Colony) เดี่ยว ๆ ซึ่งแต่ละโคโลนีจะเจริญมาจากเซลล์เดี่ยวจนถึง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเชื้อที่บริสุทธิ์โดยไขห่วงเชี่ยเชื้อ (loop) ลงไฟจนร้อนแดงและทิ้งตัวให้เย็นจากนั้นแตะที่เชื้อแบคทีเรียที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ โดยนำมาขีดบนอาหารวุ้นแข็ง ลากเป็นแนว 4 ทิศ เชื้อแบคทีเรียจะเกิดการแยกกันของเซลล์จากปริมาณหนาแน่นจะเหลือน้อยลงจนสามารถแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ



รูปที่ 2.2 การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Streak Plate)

(ที่มา : www.micro.vet.chula.ac.th)

2.3.2 การทำให้เชื้อกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Spread Plate) คือ การใช้แท่งแก้วที่ทำทำการ ขูดเชื้อด้วยวิธีเผาไฟแล้ว เกลี่ยเชื้อที่ทำเป็นสารละลายในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นการทำให้เซลล์แยกออกจากกัน หลังจากนั้นไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เชื้อจะแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ทำให้เชื้อแยกเป็นโคโลนีที่บริสุทธิ์เพื่อการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย

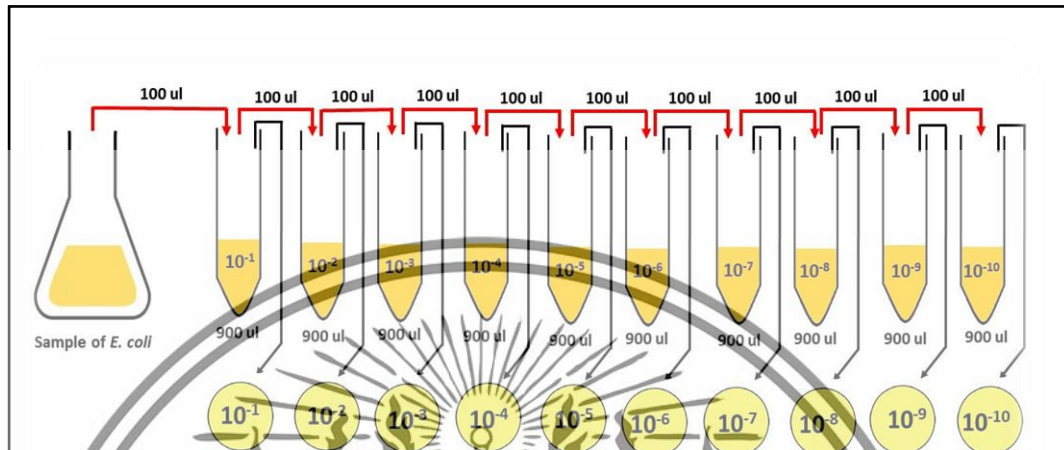


รูปที่ 2.3 การทำให้เชื้อกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Spread Plate)

(ที่มา : www.micro.vet.chula.ac.th)

2.3.1 การทำให้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์โดยวิธีเทเพลท (Pour-plate Technique) คือ การเทอาหาร วุ้นที่หลอมเหลวแล้วผสมเข้ากับเชื้อในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้อาหารแข็งที่อุณหภูมิประมาณ 45 °C เชื้อที่จะนำมาผสมจะต้องทำการละลายในสารละลาย แล้วทำให้เจือจางลงตามลำดับ (Serial dilution) ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการเจือจางที่เรียกว่า Ten-fold Dilution จากนั้นนำเอกลำดับนี้เป็นเอกลำดับที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อที่ละลายแล้วจากแต่ละหลอดมาผสม เขากับอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อและแกว่งจานเพาะเชื้อเบาๆ เพื่อให้เชื้อกระจายตัวแล้วรอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งดีแล้วจึงนำไปบ่ม (Incubate) ที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมวิธีนี้ส่วนใหญ่เพื่อต้องการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียชนิดเดียวกันกับวิธี Spread plate



รูปที่ 2.4 วิธีการเจือจางเชื้อแบคทีเรีย (Ten-fold Dilution)



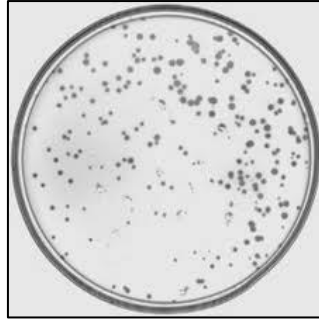
รูปที่ 2.5 วิธีการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (Pour-plate Technique)

(ที่มา: www.microvet.chula.ac.th)

2.4 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

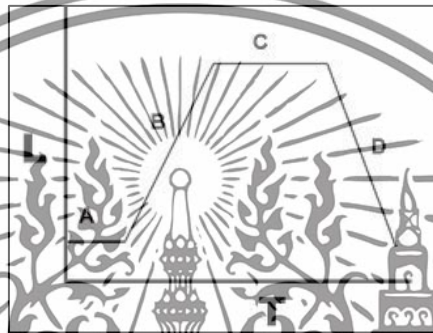
เมื่อนำแบคทีเรียใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจะมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นโดยเมื่อนำจำนวนแบคทีเรียที่ได้ในระยะเวลาต่างๆ นำมาเขียนกราฟโดยเทียบกับระยะเวลายังจะสามารถได้กราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แบ่งเป็น 4 ระยะ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 ลักษณะการเจริญกระจายตัวของแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

(ที่มา: <http://www.thaieditorial.com/บทความวิชาการ>)



รูปที่ 2.7 ลักษณะกราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

(ที่มา: <http://www.thaieditorial.com/บทความวิชาการ>)

1. **Lag phase (A)** เป็นระยะที่ใส่แบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นระยะที่แบคทีเรียจะปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ จำนวนแบคทีเรียยังไม่เพิ่มขึ้นเพราะยังไม่มี การแบ่งเซลล์ แต่เซลล์จะมีความว่องไวและสังเคราะห์ไพโรไฟอสเฟตใหม่ รวมทั้งเอนไซม์ โคเอนไซม์ DNA RNA เพื่อให้เพียงพอต่อกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ เป็นช่วงที่แบคทีเรียมีกิจกรรมทางสรีรวิทยาสูง ขนาดของเซลล์จะเพิ่มขึ้น ส่วนใหญ่เป็นการเพิ่มความยาวและมีการเพิ่มโปรตีนและน้ำหนักรวมด้วย ตอนปลายของระยะนี้แบคทีเรียจะแบ่งตัว แต่เนื่องจากแบคทีเรียทุกตัวไม่ได้มีการแบ่งตัวพร้อมกัน ดังนั้นจำนวนประชากรจะค่อยๆเพิ่มขึ้น ความยาวของระยะ lag phase จะยาวนานเพียงใดขึ้นกับสภาพแวดล้อมและชนิดของเชื้อแบคทีเรีย เช่น ถ้านำแบคทีเรียที่เลี้ยงอาหารชนิดหนึ่งไปเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเดิมระยะ lagphase จะสั้น แต่ถ้าเชื่อนั้นมีความผิดปกติหรือเป็นเชื้อที่เก็บไว้นาน จะต้องใช้ระยะเวลาในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่

2. **Logarithmic phase หรือ Exponential phase หรือระยะ Log phase (B)** เป็นระยะที่แบคทีเรียมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ คือ การแบ่งเซลล์แต่ละครั้งจะใช้เวลาเท่าๆกัน โดยระยะนี้จะมีอัตราการเจริญมากที่สุด เซลล์มีความว่องไวที่สุด สารอาหารจะถูกนำไปใช้อย่างมากและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวดเร็ว การแบ่งเซลล์จะสัมพันธ์กับการสังเคราะห์โพรโทพลาสซึมและกิจกรรมทางเคมีของแบคทีเรีย จำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า จึงทำให้ลักษณะของ curve เป็น exponential

3. Stationary phase (C) เป็นระยะที่แบคทีเรียมีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวน กล่าวคือถึงแม้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นแต่จะเท่ากับอัตราการตาย ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารมีจำนวนไม่เพียงพอและอาจมีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย

4. Death phase หรือ Decline phase (D) เป็นระยะที่แบคทีเรียมีอัตราการตายอย่างรวดเร็วและตายมากขึ้นจนสม่ำเสมอเป็น exponential หรือ logarithm สาเหตุการตายของแบคทีเรียเนื่องจากสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์หมดไปและเกิดการสะสมของเสียและสารพิษที่เกิดจากระบวนการเมแทบอลิซึม แบคทีเรียจะมีอัตราการตายที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย

2.5 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Bacteria Culture Media Components)

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Basic nutrient Media)

1. Peptones คือโปรตีนซึ่งถูกย่อยแล้วเป็น Amino acid และ Simple Nitrogenous compounds โดยใช้กรด-ด่างหรือเอ็นไซม์ คุณสมบัติของ peptones จะขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของคุณภาพโปรตีนที่ใช้และวิธีการย่อยโปรตีน (ด้วยกรด-ด่างหรือเอ็นไซม์) การย่อยด้วยกรดหรือด่างจะทำลายวิตามินและ Amino acids บางส่วนไปโปรตีนไป ซึ่งผิดกับการย่อยด้วยเอ็นไซม์โปรตีนซึ่งใช้ในการผลิต Peptones มีหลายชนิดเช่น Casein (โปรตีนในน้ำนม) Gelatin (โปรตีนในเนื้อ ถั่วเหลือง) และ Yeast cells เป็นต้น Peptones เป็นส่วนประกอบหลักใหญ่ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียต้องการมากสำหรับการเจริญเติบโต

2. Infusion และ Extracts เป็นสารสกัดจากเซลล์ต่างๆ ทั้งจากจุลินทรีย์ (เช่น Yeast Extract ซึ่งความเป็จริงถือว่าเป็น Peptone ชนิดหนึ่ง) เนื้อเยื่อจากพืช เช่น Malt Extract และจากสัตว์ เช่น Beef Extract Brain- Heart infusion เป็นสิ่งที่ใช้แทน Peptones ก่อนที่จะมีการคิดค้นการผลิต Peptones ขึ้นมาใช้งานซึ่งในปัจจุบันก็ยังคงใช้อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด Infusion และ extract นี้เป็นสารสกัดซึ่งมีส่วนประกอบไม่แน่นอนและไม่ชัดเจนโดยเป็นสารผสมระหว่างโปรตีน Polypeptides, amino acids คาร์โบไฮเดรต รวมถึงวิตามิน และ Growth factors หลายชนิด

3. Solidifying agents เป็นสารซึ่งใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้อาหารชนิดนั้นๆ แข็งตัวและกลายเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งสารพวกนี้ได้แก่ วุ้น (Agar), Gelatin, Silica gel และ Polyacrylic เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Rhodophyceae) โดยวิธีที่ตีควรรสะอาดและปราศจากฝุ่นผงต่างๆ ละลายที่ 80 °C เมื่อเตรียมวุ้น ความเข้มข้น 2% ในน้ำ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วทิ้งให้แข็งตัวสิ่งที่ได้ควรรจะใสหรือหากขุ่นก็เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

4. Indicators ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมักจะมี Indicators 2 ประเภทคือ

- Indicators เพื่อบอกสภาวะความเป็นกรดด่าง(pH)ของอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ Phenol red, Bromothymol Blue, Bromocresol Purple, Neutral red, litmus, andrade's indicator เป็นต้น
- Indicators เพื่อบอกสภาวะOxidation- reduction potential (Eh) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Methylene Blue และ Resazurin เป็นต้น

5. เกลือ (NaCl) ใช้เติมลงไปเพื่อปรับปริมาณ Osmotic pressure ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น Isotonic สำหรับเซลล์แบคทีเรียหรือเพื่อปรับความเข้มข้นของเกลือของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นไปตามที่แบคทีเรียต้องการ

6. Dextrose ใช้เพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานแก่แบคทีเรีย

7. น้ำ ใช้เพื่อทำให้ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในรูปของสารละลายที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้โดยส่วนใหญ่น้ำกลั่น (distilled water)

8. Selective agent เป็นสารเคมีที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้แบคทีเรียบางชนิด สามารถเจริญเติบโตได้เท่านั้นโดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆจะถูกยับยั้งไม่ให้เจริญการใส่ selective agent ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้จะมีประโยชน์ในการแยกเชื้อซึ่งบางตัวก่อโรคออกจากเชื้อที่ไม่ก่อโรค selective agents ที่ใช้กันมีหลายชนิดได้แก่ สีย้อมบางชนิด เช่น crystal violet และ brilliant green (ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพวกแกรมบวก) sodium chloride (ใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ นอกเหนือจาก Staphylococcus spp. เนื่องจากไม่สามารถทนเกลือได้ในปริมาณสูงๆ เหมือน Staphylococcus spp.), sodium azide, sodium citrate , sodium tellurite, sodium lauryl sulfate, sodium Selenite, iodine, phenylethanol และยาปฏิชีวนะต่างๆ เป็นต้น นอกจากนั้นการปรับความเป็นกรดหรือด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ต่ำกว่าปกติ (เช่น pH 5.6 ใน abouraud dextrose agar) หรือสูงกว่าปกติ (เช่น pH 8.8-9.0 ใน alkaline peptone water สำหรับแยกเชื้อ Vibrio cholerae) ก็สามารถให้เป็น Selective Character ของอาหารเลี้ยงเชื้อได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. Reducing agent เป็นสารเคมีซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยส่งเสริมให้เกิดภาวะไร้ออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดียิ่งขึ้นสารเหล่านี้ได้แก่ ascorbic acid, sodium thioglycolate, sodium formaldehyde sulfoxylate, thiomalic acid, sodium hydrosulfite, และ cysteine

10. เลือด ไข่ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อพวก Enriched Media เลือดที่นิยมใช้มี 4 ชนิด คือ

- เลือดแกะซึ่งเอา Fibrin ออกแล้ว (defibrinated sheep blood) เป็นเลือดที่ดีที่สุดเพราะให้ hemolysis ได้ถูกต้องชัดเจนโดยเฉพาะ hemolysis ที่เกิดจาก Streptococci spp.
- เลือดกระต่าย ซึ่งเอา Fibrin ออกแล้วคุณภาพรองจากเลือดแกะและให้ hemolysis ได้ถูกต้อง
- เลือดม้า ซึ่งเอา fibrin ออกแล้วให้ hemolysis ไม่ถูกต้องโดยเฉพาะจาก Streptococci แต่มีประโยชน์ในการใช้ใส่ใน Mueller Hinton media เพื่อการทดสอบความไวของ แบคทีเรียที่ยาต้านจุลชีพโดยใส่ในรูปของเลือดม้าที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (lysed horse blood)
- เลือดคน ซึ่งหมดอายุแล้วจากคลังเลือดเป็นเลือดที่ใช้มากที่สุดเพราะหาง่าย ราคาถูก แต่อาจมีผลเสียจาก citrate, antimicrobial agents และสารอื่นๆ ที่อยู่ในเลือดซึ่งอาจทำให้แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญได้หรือให้ปฏิกิริยา hemolysis ที่ผิดจากความแท้จริง

2.4 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบ่งตามลักษณะทางกายภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารแข็ง (Solid Media) คือ อาหารที่มีการเติมผงวุ้น (Agar) 1.5 – 2% ขึ้นไป

1.2 อาหารเหลว (Liquid Media or Broth) คือ อาหารที่ไม่มีการเติมผงวุ้นลงไปหรืออาจมีปริมาณที่น้อยมาก คือ น้อยกว่า 0.1%

1.3 อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Semisolid Media) คือ อาหารที่มีการเติมวุ้นปริมาณน้อยลงไปประมาณ 0.5 % เพื่อประโยชน์บางอย่าง เช่น ประโยชน์ในการทดสอบคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

2. แบ่งตามคุณสมบัติของคุณค่าทางอาหารและ Selective Agents ที่เติมลงไป แบ่งได้เป็น

2.1 Chemical Defined Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งทราบชนิดและปริมาณที่แน่นอนของสารเคมีที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นๆ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ไม่เป็นที่นิยมใช้ในงานทั่วไป แต่มักใช้ในงานวิจัยที่ต้องการความละเอียดแน่นอนมากเป็นพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 Plain Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารมากพอสมควรสามารถใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียส่วนมากได้ ซึ่งรวมถึงแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้ได้แก่ Nutrient Broth, Nutrient agar เป็นต้น

2.3 Enriched Media เป็นอาหารที่ใช้เฉพาะกับแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงยาก (Fastidious bacteria) เนื่องจากไม่เจริญในอาหารธรรมดาเลยหรือเจริญยากอาหารชนิดนี้ต้องเติมสารอาหารพิเศษหรือ Growth Factor บางอย่างลงไป เช่น เลือด ซีรัม ไขน้ำจากช่องท้อง (Ascitic Fluid) หรือ สารที่สกัดจากเนื้อเนื้อของสัตว์ เป็นต้น เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น Blood Agar และ Chocolate Agar เป็นต้น

2.4 Enrichment Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ใช้ช่วยในการเจริญของแบคทีเรีย ชนิดหนึ่งชนิดใดโดยเฉพาะ(ซึ่งมักจะเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค) ให้เจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ปะปนมาในตัวอย่าง เช่น Selenite broth, tetrathionate broth เป็นต้น

2.5 Selective Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อแยกจุลินทรีย์ที่ต้องการออกจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและปะปนอยู่โดยการเติมสารเคมีบางอย่างซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการโดยไม่ผลเสียต่อแบคทีเรียที่ต้องการ เช่น การเติมสี Crystal Violet Brilliant Green และเกลือน้ำดี (bile salt) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบหรือการเติมยาปฏิชีวนะบางชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ ตัวอย่างของ Selective Media เช่น Brilliant green agar, Salmonella – Shigella agar (SS Agar) Bismuth sulfite agar และ MacConkey agar เป็นต้น

2.6 Differential Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้บอกความแตกต่างของเชื้อแต่ละชนิดโดยดูจากความแตกต่างของลักษณะโคโลนีหรือปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical Reaction) เช่น Blood agar media เป็นอาหารที่เติมเลือดถ้าแบคทีเรียนั้นย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ (Hemolysis) จะเกิดบริเวณใส (Clear Zone) ขึ้นรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรีย Lactose broth ใช้แยก

2.7 Differential และ Selective media มีอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นทั้ง Differential media และ Selective Media คือยอมให้แบคทีเรียบางชนิดเจริญได้แต่ไม่ยอมให้แบคทีเรียชนิดอื่นๆ เจริญและในขณะเดียวกันก็ยังสามารถแยกชนิดของแบคทีเรียที่เจริญอยู่ นั้นได้ด้วย เช่น Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) agar ซึ่งยอมให้แบคทีเรียพวก Vibrio เท่านั้นที่เจริญได้และยังสามารถแยก Vibrio ชนิดที่ใช้ Sucrose และไม่ใช้ Sucrose ออกจากกันได้

โดยดูจากสีของโคโลนีหรือ Xylose lysine Dextrocholate Agar (XLD) ที่ใช้แยกแบคทีเรียแกรมลบ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่สามารถใช้และไม่ใช่แลคโตสออกจากกันได้ โดยถ้าแบคทีเรียใช้แลคโตสได้โคโลนีจะมีสีเหลือง ถ้าใช้แลคโตสไม่ได้โคโลนีจะมีสีชมพู และถ้าเป็นแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Salmonella* จะมีลักษณะเฉพาะบน XLD คือ โคโลนีจะมีสีชมพูใสและมีจุดสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H₂S) อยู่ตรงกลาง เป็นต้น

2.8 อาหารที่ใช้วิเคราะห์ (Assay Media) เป็นอาหารที่มีองค์ประกอบพิเศษเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณของวิตามิน กรดอะมิโนและสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ (Disinfectant) ด้วย

2.9 อาหารที่ใช้ตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย (Media for enumeration of bacteria) เป็นอาหารที่ใช้ในการตรวจนับแบคทีเรียบางชนิด เช่น จุลินทรีย์ในน้ำหรือน้ำนม ซึ่งองค์ประกอบของอาหารจะเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียเหล่านั้น ตัวอย่างเช่น Plate count agar และ Marine agar เป็นต้น

2.10 อาหารที่ใช้ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรีย (Media for characterization of bacteria) ใช้ตรวจสอบคุณสมบัติในการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งคุณสมบัติที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physical and Biochemical test) เช่น Triple sugar iron agar, Urease test medium, citrate agar, lysine decarboxylase test medium เป็นต้น

2.11 อาหารที่ใช้เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ (Maintenance Media) ใช้เพื่อเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียไว้นานที่สุดโดยเชื้อยังมีคุณสมบัติเหมือนเดิม จึงมีการลดองค์ประกอบบางอย่างในอาหารเพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตลดลงและปลดปล่อยของเสียออกมาน้อยลง เช่น ลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสให้น้อยลง เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทำให้สร้างกรดได้มากและทำให้เชื้อตายเร็วไม่มีการไปไฮโดรไลซ์หรือโปรตีน แต่จะประกอบด้วยเกลือแร่ต่างๆ หลายชนิดเพื่อรักษาความเป็นกรด – ด่าง ตลอดจน Oxidation Reduction Potential และความชื้นให้คงที่ เช่น Stuart's transport medium, Cary – Blair transport medium เป็นต้น Transport Media นิยมใช้ในกรณีที่ไม่สามารถนำสิ่งส่งตรวจจากสัตว์ป่วยมาเพาะเลี้ยงเพื่อแยกเชื้อได้ทันที

2.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Preparation of the Culture Media)

1. ใช้เครื่องแก้ว (Glassware) ที่สะอาดผ่านการล้างมาเป็นอย่างดีโดยไม่ใช้สารซักฟอก (Detergent) หรือสารเคมีอื่น ๆ

2. ชั่งน้ำหนัก (Dehydrated media) ตามสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด นำไปใส่ใน Flask หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น (Distilled Water) ลงไปตามปริมาณที่กำหนดไว้ในสูตรควรใช้น้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากเป็นน้ำที่ปราศจากคลอรีน (Chlorine) สารเคมีและไอออนของโลหะหนักต่างๆ (Heavy metal ions) ที่อาจยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อควรเตรียมในภาชนะที่มีปริมาตรมากกว่าปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการเตรียมประมาณ 2 เท่า เพื่อความสะดวกในการผสมและป้องกันฟองที่เกิดจากการต้มอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. ทำให้ Dehydrated media ละลายถ้าเป็น Dehydrated media ที่ผสมจนมาด้วยทำให้ละลายได้โดยการนำไปต้มและคนด้วยแท่งแก้วตลอดเวลาหรืออาจใช้วิธีวางไว้บน Hot plate ที่เป็นระบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer system) โดยใช้แท่งแม่เหล็กลงไปใน Flask ด้วยแต่ถ้าเป็น Dehydrated media ที่ไม่ผสมจนลงไป อาจทำให้ละลายได้ด้วยการคนเบาๆก็เพียงพอ

5. หลังจากทำให้ละลายเสร็จ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (Sterilized) ใน Autoclave หรือ Pressure cooker ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที อย่างไรก็ตามมีอาหารเลี้ยงเชื้อบางประเภทที่ไม่สามารถทนความร้อนสูงเช่นนี้ได้บริษัทผู้ผลิตอาจแนะนำให้นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118°C หรือ 115°C ที่เวลา 15 นาทีหรือนานกว่านี้เล็กน้อย Selective Media บางชนิด เช่น Brilliant green agar, TCBS และ XLD สามารถฆ่าเชื้อได้โดยการนำไปต้ม

6. หลังจากฆ่าเชื้อเสร็จเรียบร้อยแล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 50 – 56°C ใน Water bath ก่อนนำไปเทลง Plate หรือ Tube อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม Agar จะแข็งตัวที่ 42°C อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร สามารถนำไปเทลง Plate ได้ประมาณ 70 x 100 Plates

7. สารบางชนิดที่จะต้องเติมลงไปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ จะไม่สามารถทนความร้อนในการต้มหรือการ Autoclave ได้ ดังนั้นจะต้องเติมสารเหล่านั้นในขั้นตอนหลังจากนี้โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงประมาณ 50–56 °C ก่อน แต่สารเหล่านี้จะต้องเป็นสารที่ปราศจากเชื้อ เช่น ถ้าเป็นเลือดก็ต้องเป็นเลือดที่เก็บมาโดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique)

8. ตรวจสอบความเป็นกรด – ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เย็นแล้ว (50 - 56 °C) โดยการใช pH meter หรือ pH strips ถ้าความเป็นกรด – ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เป็นไปตามที่กำหนดในสูตร (ปกติจะกำหนดให้อยู่ในช่วง 6.8 – 7.2) ให้เติม 1-N หรือ 0.1 –N NaOH หรือ HCl ที่ละหยดและปรับจนกว่าจะได้ pH ตามที่กำหนด

9. นำไปเทลงใน Plate หรือ Tube

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. หลังจากเทลง Plate หรือ Tube แล้ว รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือ 37 °C ประมาณ 2 – 3 ชั่วโมง ต้องแน่ใจว่าไม่มีไอน้ำเกาะอยู่ที่ฝา Plate เพราะอาจทำให้เกิดการ Contamination ได้ หลังจากนั้นนำ Plate ที่ยังไม่ไขเก็บใส่ถุงพลาสติก มัดปากถุงให้เรียบร้อยแล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C อาจนำไปทดสอบการปราศจากเชื้อโดยการนำไปบ่ม (Incubation) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 12 – 14 ชั่วโมง

2.6 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย (Maintenance of Bacteria)

เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์มักมีการเก็บรักษาไว้เพื่อให้มีชีวิตอยู่นานๆ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาวิจัย

การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์มีหลายวิธี ได้แก่

1. การถายเชื้อสู่อาหารใหม่ (Subculturing Method) คือ เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์จะเก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Maintenance media ระยะเวลาหนึ่ง แล้วจึงเปลี่ยนอาหารใหม่ ระยะเวลาในการเปลี่ยนอาหารขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ซึ่งอาจเก็บไว้ได้หลายสัปดาห์หรือหลายเดือน นอกจากนี้ยังเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำเพื่อให้เชื้อหยุดการเจริญเติบโต การเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีการถายเชื้อใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เรื่อยๆ นี้มีข้อเสีย คือ อาจทำให้เชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสายพันธุ์ได้ คือ เกิดการกลายพันธุ์หรือการพาเหลา

2. การปิดทับด้วยน้ำมัน คือ การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ขึ้นอยู่บนอาหารวุ้นเอียง (Agar slant Media) โดยการเทน้ำมัน เช่น พาราฟิน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหนาประมาณครึ่งนิ้วทับลงไป สามารถเก็บรักษาเชื้อได้ เป็นปี

- การทำให้แห้งและเย็นเยือกแข็ง (Lyophilization) คือ การทำให้เชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ส่วนใหญ่ใช้ Skim milk) แห้งโดยเร็วในสภาวะที่เย็นจัดจนแข็ง (Freeze-dry) อุณหภูมิประมาณ - 60 °C ถึง - 78 °C ในหลอดแก้วขนาดเล็ก และทำให้เกิดสภาวะสูญญากาศภายในหลอด แล้วปิดปากหลอดโดยการลนไฟ วิธีนี้สามารถเก็บเชื้อแบคทีเรียไว้ได้นานมากโดยคุณสมบัติของเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง แต่เสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง

- การเก็บรักษาเชื้อไวที่อุณหภูมิต่ำ คือ การเก็บเชื้อไว้ในที่ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น ไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ - 196 °C โดยนำเชื้อที่ใส่ในสารละลายที่สามารถปกป้องเชื้อจากการเปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บด้วยวิธีนี้ (จากผลิตภัณฑ์น้ำแข็ง) เช่น กลีเซอรอลหรือ Dimethyl sulfoxide, DMSO แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลววิธีนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ได้นานมาก ประมาณ 10 – 30 ปี โดยไม่มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติและยังสามารถเก็บรักษาเชื้อที่ไม่สามารถทำการเก็บด้วยวิธี Lyophilization ได้ด้วยแต่จะเสียค่าใช้จ่ายมากเนื่องจากต้องมีการเติมไนโตรเจนเหลวเป็นระยะ ๆ

2.7 การประมวลผลภาพดิจิทัล [6], [7]

การประมวลผลภาพดิจิทัลเกี่ยวข้องกับการแปลงข้อมูลภาพให้อยู่ในรูปแบบข้อมูลดิจิทัล เพื่อที่จะนำเอาข้อมูลนี้ไปผ่านกระบวนการต่างๆด้วยคอมพิวเตอร์ได้ ซึ่งการทำงานของคอมพิวเตอร์ ระบบการรับข้อมูลเข้า-ออกจะอยู่ในรูปแบบดิจิทัลเท่านั้น เมื่อระบบได้รับข้อมูลภาพเข้าไปแล้วจะทำการคำนวณและส่งออกมาเป็นข้อมูลที่ใช้แทนข้อมูลภาพดิจิทัลเหล่านั้น การเก็บข้อมูลภาพลงหน่วยความทรงจำของคอมพิวเตอร์สามารถทำได้โดยการจองหน่วยความจำของเครื่องไว้ในรูปของตัวแปร array ดังรูปที่ 2.13 โดยค่าในแต่ละช่องจะแสดงถึงคุณสมบัติของจุดภาพ (pixel) และตำแหน่งของช่อง array เป็นตัวกำหนดตำแหน่งของจุดภาพ



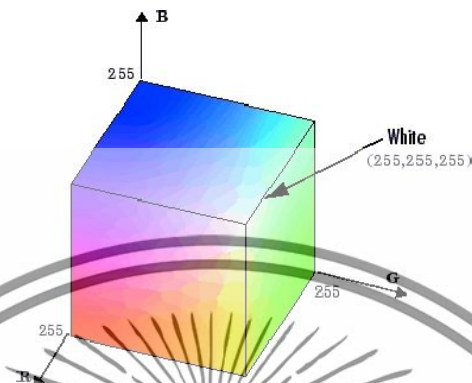
รูปที่ 2.8 พิกัดของระบบภาพดิจิทัล
(ที่มา: <http://www.ecpe.nu.ac.th/pandokkhaew/imagepro.pdf/ch01.pdf>)

การแปลงภาพเป็นภาพขาวดำมีขั้นตอนคือ แปลงภาพสี RGB เป็น Gray scale แล้วแปลงภาพ Gray scale เป็นภาพขาวดำ BW label โดยการแปลงภาพ Gray scale เป็นภาพขาวดำ BW label นั้น จำเป็นต้องกำหนดค่า Threshold เพื่อให้ได้ภาพขาวดำที่เหมาะสม โดยค่า Threshold มีไว้สำหรับกำหนดว่าค่าความสว่างของรูปในแต่ละ Pixel เมื่อแปลงเป็นภาพขาวดำแล้ว Pixel ดังกล่าวจะเป็น สีดำหรือสีขาว ตัวอย่างเช่น เรากำหนดค่า Threshold ไว้ที่ 128 แล้วอ่านค่าความสว่างใน Pixel แรกของรูปได้ 200 ดังนั้นเมื่อทำการแปลงเป็นภาพขาวดำแล้ว Pixel แรกนี้จะต้องเป็นสีขาว เป็นต้น โดยผู้เรียนหลายคนอาจจะเข้าใจผิดว่าภาพ Gray scale เป็นภาพขาวดำ แต่ความจริงแล้วไม่ใช่ กล่าวคือภาพ Gray scale เป็นรูปที่มีระดับของความสว่างอยู่ โดยทั่วไปจะอยู่ที่ 0-255 ภาพ

Gray scale คือรูปที่มีค่าสี R,G,B เท่ากันหมด ส่วนภาพขาวดำมีแค่ 0 กับ 1 เท่านั้น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.1 ระบบสี RGB

ระบบสี RGB คือระบบที่มีค่าของสีแดง สีเขียว และ สีน้ำเงิน ค่าใดค่าหนึ่งหรือหลายๆค่า รวมกันโดยแต่ละสีจะมีค่าตั้งแต่ 0-255 ดังรูป 2.16



รูปที่ 2.9 ระบบสี RGB

(ที่มา: <http://www.ecpeind.ac.th/panomkhaww/imagepro/pdf/ch01.pdf>)

2.10.2 ระบบสี Gray scale

ระบบสี Grayscale คือระบบที่มีค่าของสีแดง สีเขียว และ สีน้ำเงินเท่ากัน ภาพจึงออกมาในโทนสีขาวดำ



รูปที่ 2.10 ระบบสี Gray scale

(ที่มา: <http://www.ecps.nu.ac.th/panomkhaww/imagepro/pdf/ch01.pdf>)

2.10.3 การแปลงระบบสี RGB เป็นระบบสี Grayscale

การแปลงระบบสี RGB เป็นระบบสี Grayscale นั้นจะทำการคิดคำนวณค่าในแต่ละจุดสีโดยแทนค่า RGB ทั้งสามค่าใหม่ตามสูตร เมื่อค่าของสีแดง สีเขียวและสีน้ำเงินเท่ากันหมดแล้วจึงได้เป็นสีแบบ Grayscale

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$0.2989 * R + 0.5870 * G + 0.1140 * B \quad (2.1)$$

2.10.4 Threshold

Threshold เป็นการแปลงภาพระบบ Grayscale ดังรูปที่ 2.18 ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0-255 ให้เป็นรูปที่มีค่าเพียงสองระดับ (Binary Image) ดังรูปที่ 2.19 โดยมีเงื่อนไขว่า ถ้าความเข้มแสงของจุดภาพใดมีค่าต่ำกว่าหรือเท่ากับค่า threshold ให้จุดภาพนั้นมีค่าเป็น 0 หรือเป็นสีดำ และจุดภาพใดที่มีค่าสูงกว่าค่า threshold ให้จุดภาพนั้นมีค่าเป็น 1 หรือสีขาว Threshold เป็นการหาค่าของฟังก์ชันที่มีค่าเพียง 2 สถานะคือขาวและดำ มีสูตรดังนี้



รูปที่ 2.11 ภาพในระบบสี Grayscale

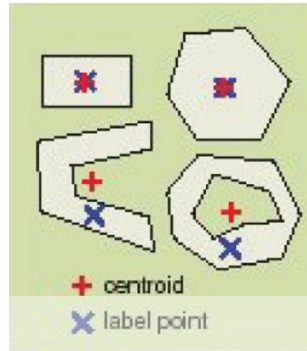
รูปที่ 2.12 รูปที่แบ่ง threshold

(ที่มา: <http://www.ecpe.nu.ac.th/panomkhawn/imagepro/pdf/ch01.pdf>)

2.10.5 จุด Centroid

Centroid [8] คือ จุดศูนย์กลางของมวลของ Region หรือวัตถุใดๆ ซึ่งมีการนิยามมาจาก Centroid ในเชิงคณิตศาสตร์หรือเชิงกายภาพและมีความสำคัญในการรังวัดระยะของวัตถุต่อวัตถุใน Image โดยเราสามารถคำนวณที่สามารถรายละเอียดดังต่อไปนี้และแสดงในรูปที่ 2.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.13 Centroid ของ Region ที่มีรูปร่างต่างๆ
(ที่มา: <http://www.ajmanut.com/attachments/article>)

โดยในการคำนวณ Centroid จะต้องหา Moment ของ Region แล้วต้องมาจึงคำนวณหา Centroid ดังสมการต่อไปนี้

Simple moments:

$$m_{pq} = \sum_{\text{Relevant pixels}} (x^p y^q) (f(x,y) - \text{background})$$

Relevant pixels

$$\sum_{\text{Relevant pixels}} x^p y^q \text{ for binary bitmaps}$$

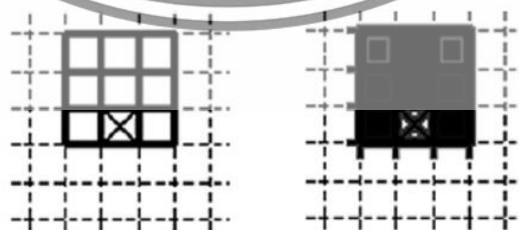
Relevant pixels

$m_{0,0}$ is the Graytone volume or area

$\begin{pmatrix} m_{1,0} & m_{0,1} \\ m_{0,0} & m_{0,0} \end{pmatrix}$ is the centre-of-mass coordinate

(23)

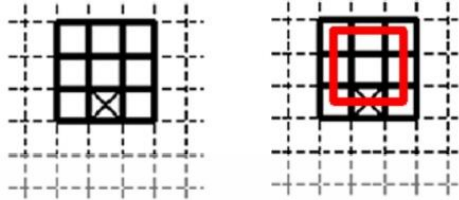
Area คือ จำนวนจริงของ Pixel ใน Shape ของ Region โดยทั่วไปจะพิจารณาเป็น Net Area หรือ พื้นที่สุทธิ



รูปที่ 2.14 Area ของ Region เท่ากับ 9 pixel
(ที่มา: <http://www.ajmanut.com/attachments/article>)

Perimeter คือ จำนวนจริงของ Pixel ที่บนขอบของ Region ใดๆ
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{perimeter} = \sum_{i=1}^{N-1} d_i = \sum_{i=1}^{N-1} |x_i - x_{i+1}| \quad (2.4)$$



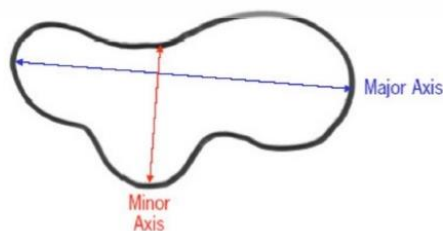
รูปที่ 2.15 Perimeter ของ Region เท่ากับ 8 pixel
(ที่มา: <http://www.ajmanut.com/attachments/article>)

Major Axis คือ จุดจบสองจุด (Ending Point) ที่สามารถวาดเส้นที่ยาวที่สุดใน Region อีกทั้งสามารถคำนวณระยะและมุม

$$\begin{aligned} \text{major-axis length} &= \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2} \\ \text{major-axis angle} &= \tan^{-1} \left(\frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \right) \end{aligned} \quad (2.5)$$

Minor Axis คือ จุดจบสองจุด (Ending Point) ที่สามารถวาดเส้นที่ยาวที่สุดและต้องตั้งฉากกับ Major Axis

$$\text{minor-axis length} = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2} \quad (2.6)$$

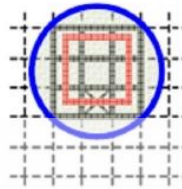


รูปที่ 2.16 Major Axis และ Minor Axis

(ที่มา: <http://www.ajmanut.com/attachments/article>)
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Compactness คือ อัตราส่วนของพื้นที่ต่อพื้นที่ของวงกลมที่ Perimeter เดียว

$$\text{compactness} = \frac{4\pi \cdot \text{area}}{(\text{perimeter})^2} \quad (2.7)$$



รูปที่ 2.17 Compactness ของ Region

(ที่มา: <http://www.wjmanut.com/attachments/article>)

Bounding Box คือ สี่เหลี่ยมที่สามารถบรรจุ Region นั้นๆได้ ซึ่งโดยทั่วไปจะนิยมใช้สี่เหลี่ยมที่สามารถบรรจุ Region ที่มีขนาดเล็กที่สุด ที่เรียกว่า Minimal Bounding Box

รูปที่ 2.18 Bounding Box และ Minimal Bounding Box ของ Region

(ที่มา: <http://www.wjmanut.com/attachments/article>)

2.8 Circular Hough Transform [9]

วงกลมถูกแสดงทางคณิตศาสตร์คือ $(X-X_{\text{ศก}})^2 + (Y-Y_{\text{ศก}})^2 = r^2$ โดยที่ $(X_{\text{ศก}}, Y_{\text{ศก}})$ เป็นจุดศูนย์กลางของวงกลม และ r คือรัศมีของวงกลม จากสมการข้างต้นจะเห็น 3 ตัวแปร คือต้องใช้ 3 มิติ สำหรับ Hough Transform ดังนั้น Open CV จะใช้ทฤษฎีมาช่วย เช่น Hough Gradient Method โดยการใช้การไล่ระดับสีของ Edges โดยฟังก์ชันที่เราใช้คือฟังก์ชัน `cv2.HoughCircles()`.

ตัวอย่างการใช้งาน

```
import cv2
```

```
#import library cv2
```

```
import numpy as np
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```

import library numpy โดยใช้ตัวย่อเป็น np
planets = cv2.imread('planet_glow.jpg')
#นำรูปที่ต้องการมาเก็บไว้ในตัวแปร planets
gray_img = cv2.cvtColor(planets, cv2.COLOR_BGR2GRAY)
#นำไฟล์ภาพในตัวแปร planets มาเปลี่ยนระบบสีจาก BGR เป็น GRAY แล้วเก็บไว้ในตัวแปร
gray_img
img = cv2.medianBlur(gray_img, 5)
#นำไฟล์ภาพในตัวแปร gray_img มาทำการเบลลอภาพ เพื่อให้ความคมชัดน้อยลงและสามารถจับภาพ
ใกล้เคียงวงกลมได้ง่ายขึ้น โดยองค์ประกอบของฟังก์ชันคือ cv2.medianBlur (ไฟล์รูปที่ต้องการนำมา
เบลล, เปรอร์เซนต์ที่ต้องการทำให้ภาพเบลล)นำมาเก็บในตัวแปร img
cimg = cv2.cvtColor(img, cv2.COLOR_GRAY2BGR)
#นำไฟล์ภาพในตัวแปร img มาเปลี่ยนระบบสีจาก GRAY เป็น BGR แล้วเก็บไว้ในตัวแปร cimg
circles = cv2.HoughCircles(img, cv2.HOUGH_GRADIENT, 1, 120, param1=100,
param2=30, minRadius=0, maxRadius=0)
#ฟังก์ชันนี้จะใช้ในการจับภาพวงกลมในรูปภาพ องค์ประกอบของฟังก์ชันดังนี้
cv2.HoughCircles (image, method, dp, minDist , param1, param2, minRadius,
maxRadius)
image = รูปที่ต้องการ
method = เทคนิคที่ใช้ในการจับภาพวงกลมซึ่งนิยม CV_HOUGH_GRADIENT มากที่สุด
dp = ส่วนกลับอัตราส่วนความละเอียดของภาพ เช่น dpเท่ากับ1 คือความละเอียดของภาพจะเท่ากับ
ภาพเริ่มต้นที่เราเลือก ถ้า dp = 2 ภาพจะมีขนาดเล็กลงครึ่งหนึ่ง
minDist = ระยะทางที่สั้นที่สุดระหว่างจุดศูนย์กลางของวงกลมที่ต้องการตรวจจับ ถ้า minDist มี
ขนาดเล็กเกินไป จะทำให้วงกลมบางวงไม่ถูกตรวจจับ แต่ถ้า minDist มีขนาดมากเกินไปจะทำให้
วงกลมบางวงจับไม่ได้(รัศมีกว้างมากเกินไปบ้างอื่น)
param 1 = พารามิเตอร์เฉพาะตัวที่หนึ่งใช้ในการตรวจจับขอบของวงกลมโดยอาศัยการมองโทนสีของ
วงกลม
param2 = ค่าเริ่มต้นสำหรับวิธีการ cv2.HOUGH_GRADIENT ค่าเริ่มต้นที่น้อยเกินไปจะทำให้
สามารถจับภาพวงกลมได้มากขึ้น(รวมถึงรูปที่ไม่ได้เป็นวงกลมด้วย) ค่าเริ่มต้นที่มากเกินไปจะทำให้
วงกลมหลายๆวงที่อาจจะเกิดขึ้นจะถูกส่งกลับ
minRadius = ขนาดรัศมีที่ต่ำที่สุดของวงกลม
maxRadius = ขนาดรัศมีที่สูงที่สุดของวงกลม
circles = np.uint16(np.around(circles))

```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

for i in circles [0,:]:

cv2.circle(planets,i[0],i[1],i[2],(0,255,0),2)

#เป็นฟังก์ชันที่ใช้ในการวาดวงกลม องค์ประกอบของฟังก์ชันดังนี้

cv2.circle(รูปรูปที่สนใจ,จุดศูนย์กลางวงกลม,รัศมีวงกลม,สีที่ต้องการในการวาดเส้น,ความหนาของเส้น)

cv2.circle(planets,i[0],i[1],2,(0,0,255),3)

#เป็นฟังก์ชันที่ใช้ในการวาดจุดศูนย์กลางของวงกลม องค์ประกอบของฟังก์ชันดังนี้

cv2.circle(รูปรูปที่สนใจ,จุดศูนย์กลางวงกลม,รัศมีของจุดศูนย์กลาง(หน่วยเป็น pixel),สีที่ต้องการในการวาดเส้น,ความหนาของจุดศูนย์กลางวงกลม(ถ้าใช้ความหนาเป็น -1 คือจุดศูนย์กลางของวงกลมจะถูกระบายทึบทั้งวง))

cv2.imwrite("planets_circles.jpg",planets)

#เป็นฟังก์ชันที่ใช้ในการบันทึกรูปที่ต้องการ องค์ประกอบของฟังก์ชันคือ

cv2.imwrite("ชื่อไฟล์ที่ต้องการบันทึก",รูปที่ต้องการบันทึก)

cv2.imshow("HoughCircles",planets)

#เป็นฟังก์ชันที่ใช้ในการแสดงรูปภาพทางหน้าจอ องค์ประกอบของฟังก์ชันคือ

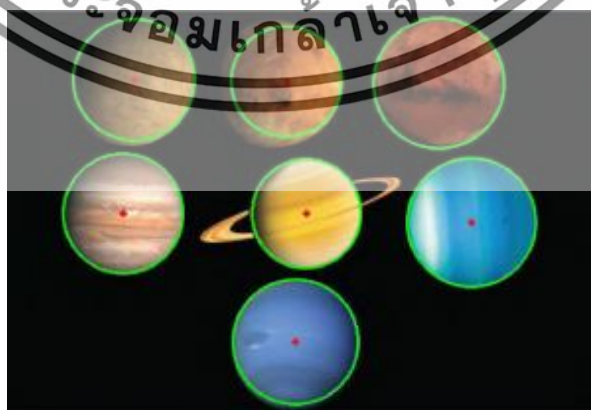
cv2.imshow("ชื่อวินโดว์ที่ต้องการแสดงภาพ",รูปที่ต้องการนำมาแสดงทางหน้าจอ)

cv2.waitKey(0)

#เป็นฟังก์ชันที่ใช้ในการรอคำสั่งจากคีย์บอร์ดซึ่งจะมีหน่วยเป็น millisecond ถ้าใส่ waitkey(0) คือรูปจะเปิดตลอดเวลาจนกระทั่งมีการกดปุ่มใดๆบนคีย์บอร์ด แต่ถ้าใช้ waitkey(5) คือรูปจะเปิดเป็นเวลา 5ms จากนั้นจะถูกปิดโดยอัตโนมัติ

cv2.destroyAllWindows()

#เป็นฟังก์ชันที่ใช้ในการปิดหน้าต่างทั้งหมดหลังจากจบการแสดงผล



รูปที่ 2.19 ตัวอย่างการตรวจจับวัตถุรูปวงกลม

(ที่มา: <http://projectlab.co.th/2017/06/04/opencv-hough-circle-transform>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 Edge Detection

ขอบภาพหรือขอบเขตภาพ [10] คือ เส้นที่แบ่งระหว่างวัตถุกับพื้นหลังหรือแยกวัตถุสองวัตถุออกจากกัน ทำให้เห็นลักษณะรูปร่างและรายละเอียดที่ชัดเจนยิ่งขึ้นจากพื้นหลัง การหาขอบภาพจะเป็นการประมวลผลจากพิกเซลข้างเคียง โดยวัดจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มแสงที่เกิดขึ้น กล่าวคือ ขอบภาพจะเห็นได้ชัดถ้าค่าการเปลี่ยนแปลงของความเข้มแสง หรือ Intensity มีค่ามาก ในทางตรงกันข้าม หากค่าการเปลี่ยนแปลงของความเข้มแสง หรือ Intensity มีค่าน้อย ขอบภาพก็จะเห็นได้ไม่ชัดเจน

การหาขอบภาพ เราจะใช้หลักการหาความชันของความเข้มสี หรือ intensity เนื่องจากที่ขอบรูปจะเป็นบริเวณมีความแตกต่างของสีมาก ซึ่งหากเราหาความชันของค่า intensity ก็จะได้ความชันมาก แต่หากรูปนั้นไม่มีขอบค่า intensity บริเวณนั้นจะใกล้เคียงกันหรือเท่ากัน ทำให้ไม่มีความชัน โดยเราสามารถหาความชันได้โดยการใช้ derivative ตามสูตรดังนี้

$$f'(x) = \frac{df}{dx}(x) \quad (2.8)$$

แต่ต้องหาความชันในแบบ discrete เนื่องจากค่า intensity ไม่เป็นแบบ continuous จึงใช้สมการดังนี้

$$\frac{df}{dx} \approx \frac{f(u+1) - f(u-1)}{(u+1) - (u-1)} = \frac{f(u+1) - f(u-1)}{2} \quad (2.9)$$

ซึ่งนำหลักการนี้มาทำเป็น filter เพื่อหาขอบได้ คือ Prewitt and Sobel

หลักการ PREWITT

หลักการ : ใช้ความชันรอบๆ จุดนั้นโดยคิดทั้งในแนวแกน x และแนวแกน y จากนั้นจึงนำมาหาขนาด

$$H_x^P = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad \text{and} \quad H_y^P = \begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (2.10)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเห็นได้ว่าการใช้ค่า intensity ตัวก่อนลบกับตัวหลัง เพื่อหาความแตกต่างของ intensity หรือ ความชันนั่นเอง

$$D_x = H_x * I \quad \text{and} \quad D_y = H_y * I. \quad (2.11)$$

นำ filter มา convolution กับรูปภาพ ทั้งแกน x และ y

$$E(u, v) = \sqrt{(D_x(u, v))^2 + (D_y(u, v))^2}. \quad (2.12)$$

จากนั้นนำมาหาขนาด ซึ่งหากยังมีความชันทั้งแกน x และ y มากขอบภาพจะยิ่งชัดขึ้น ส่วนรูปที่สีเหมือนกันจะไม่ได้แสดงเนื่องจากกลายเป็น 0



หลักการ SOBEL

หลักการ : คล้ายกับ Prewitt แต่จะมีการ weight จุดที่ใกล้กับ pixel นั้นมากกว่าจุดอื่นดังนี้

$$H_x^S = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad \text{and} \quad H_y^S = \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix} \quad (2.13)$$

จากนั้นทำตามขั้นตอนอื่นๆเหมือนกับ Prewitt

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 Watershed Transform

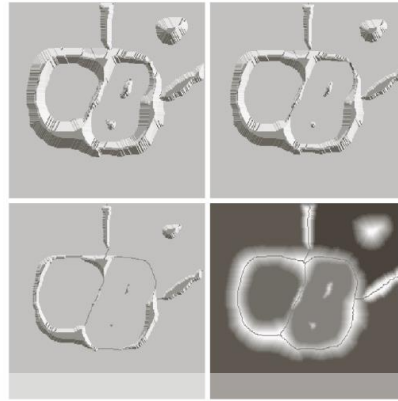
เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกส่วนของภาพออกเป็นส่วน ๆ โดยใช้หลักการวิเคราะห์ เริ่มจากการคำนวณระยะทางด้วย Euclidian distance map (EDM) และหาจุด Ultimate eroded points (UEPs) ซึ่งเป็นจุดศูนย์กลางของวัตถุแต่ละกลุ่มเพื่อใช้เป็นจุดเริ่มต้น หรือจุดที่อยู่ศูนย์กลางที่คาดว่าจะ เป็นชุดข้อมูลที่มีความแตกต่างกันออกจากกัน หลังจากได้จุดศูนย์กลางของข้อมูลแล้วก็จะหาพื้นที่ รอบจุดศูนย์กลางโดยการขยายขนาดออกไปเรื่อยๆ จนกว่าไปสัมผัสกับกลุ่มข้อมูลชุดอื่นๆ จุดตำแหน่งที่มี การสัมผัสกันจะเป็นส่วนที่ใช้ในการแบ่งแยกด้วยการสร้างเส้นแบ่งข้อมูลออกเป็นแต่ละ กลุ่ม เช่นเดียวกับในทางภูมิศาสตร์ watershed เป็นสันปันน้ำที่แยกอ่างน้ำในแต่ละแหล่ง โดยแนวคิด ของ Watershed transform ที่ใช้ในการประมวลผลภาพเกรย์สเกลจะใช้ในการแบ่งแยกวัตถุในภาพ โดยใช้หลักการเดียวกับ อ่างเก็บน้ำ

รูปที่ 2.21 ประมวลผลภาพเกรย์สเกลจะใช้ในการแบ่งแยกวัตถุในภาพโดยใช้หลักการเดียวกับอ่างเก็บน้ำ

(ที่มา: <http://staff.csis.wisc.edu/sathit/344-671/Image%20Segmentation.pdf>)

จากภาพเมื่อระดับน้ำในอ่างเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จะสามารถเห็นเฉพาะขอบของอ่างเก็บน้ำ โดยเมื่อ เทียบกับภาพเกรย์สเกล ค่าความเข้มในแต่ละพื้นที่จะไม่เท่ากัน ส่วนที่เป็นที่ลุ่ม คือพื้นที่ที่มีค่าความ เข้มน้อย ส่วนที่เป็นพื้นที่น้ำจะเปรียบได้กับระดับค่าเทรลโฮลด์ เมื่อกำหนดให้ค่าสูงขึ้นก็จะคลุมพื้นที่ ได้มากขึ้นและจะใช้แบ่งแต่ละ พื้นที่ออกจากกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



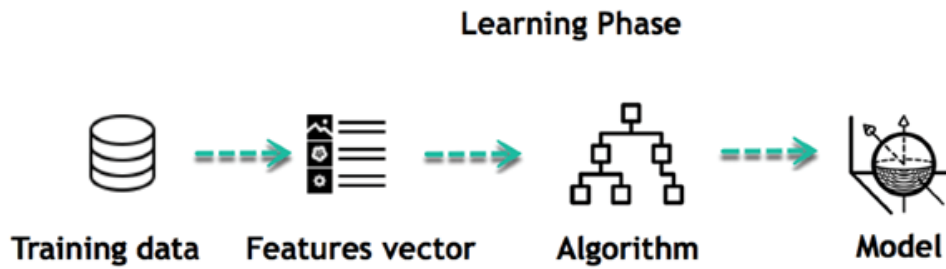
รูปที่ 2.22 ภาพเมื่อกำหนดให้ค่าสูงขึ้นก็จะคลุมพื้นที่ได้มากขึ้นและจะใช้แบ่งแต่ละ พื้นที่ออกจากกัน
(ที่มา: <http://staff.cs.psu.ac.th/sathit/344-671/Image%20Segmentation.pdf>)

2.11 Machine Learning (Machine Learning)

Machine Learning [12] คือ ระบบที่เรียนรู้ได้จากตัวอย่างที่ป้อนเข้าไปโดยไม่ต้องการคำสั่งที่โปรแกรมเมอร์เขียนขึ้น Machine Learning ประกอบด้วยข้อมูลทางสถิติเพื่อการทำนายผลลัพธ์ออกมา การทำให้ระบบคอมพิวเตอร์เรียนรู้ได้ด้วยตัวเองโดยใช้ข้อมูล ต้องอาศัยข้อมูลจำนวนมาก โดยความแม่นยำของอัลกอริทึมที่เกิดขึ้นจากข้อมูลที่ใส่ไปขึ้นอยู่กับจำนวนข้อมูล ยิ่งข้อมูลมาก ความแม่นยำในการทำนายผลก็จะมากขึ้น โดย Machine Learning กับการเขียนโปรแกรมแบบเดิมมีความต่างกันคือ การเขียนโปรแกรมแบบเดิมโค้ดทั้งหมดจะถูกกำหนดแนวทางไว้อย่างชัดเจนอยู่แล้ว โดยผู้เชี่ยวชาญที่เขียนโปรแกรมขึ้นมาเพียงคนเดียว และคำสั่งต่าง ๆ ที่เขียนขึ้นถ้าระบบมีความซับซ้อนมากก็จะมีคำสั่งมาก ทำให้ระบบอาจเกิดการไม่เสถียรได้ แต่ Machine Learning จะเรียนรู้ข้อมูลที่เข้าไป และผลลัพธ์ที่ควรที่จะออกมา แล้วเครื่องจะเขียนคำสั่งขึ้นมา โดยที่โปรแกรมเมอร์ไม่ต้องเขียนกฎใหม่ทุกครั้งที่มีข้อมูลใหม่เข้ามา โดยอัลกอริทึมที่จะปรับให้เข้ากับข้อมูลใหม่ที่เข้ามา และจะปรับปรุงประสิทธิภาพให้เพิ่มขึ้นจากตัวอย่างของข้อมูลที่ได้เรียนรู้เข้าไป

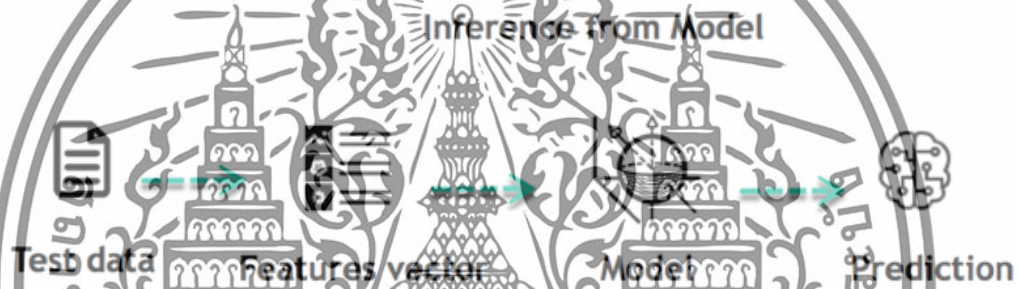
วัตถุประสงค์หลักของ Machine Learning คือการเรียนรู้ (Learning) และการอนุมาน (Inference) ขั้นตอนแรกที่เหมาะสมเรียนรู้คือรูปแบบซ้ำ ๆ โดยต้องมีข้อมูล (Data) ให้เครื่องเรียนรู้ โดยในการเลือกข้อมูลจำเป็นต้องเลือกข้อมูลอย่างรอบคอบว่าข้อมูลใดสนับสนุนกับเครื่อง คุณสมบัติที่ถูกใช้แก้ปัญหาจะเรียกว่า feature vector โดยจะเป็นเหมือนส่วนย่อยของข้อมูลทั้งหมดที่ถูกใช้ในการแก้ปัญหา โดยแมชชีนจะใช้อัลกอริทึมบางอย่างเพื่อให้ง่ายต่อการใช้ในชีวิตจริงและดัดแปลงสิ่งที่ค้นพบให้กลายเป็นโมเดล (Model) ดังนั้น ขั้นตอนของการเรียนรู้ (Learning stage) จะถูกใช้เพื่ออธิบายเกี่ยวกับข้อมูลและรวบรวมให้กลายเป็นโมเดล โดยสามารถเขียนเป็นแผนผังได้ดังรูปที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.23 ขั้นตอนการเรียนรู้ของ Machine Learning [12]

เมื่อโมเดลถูกสร้างขึ้นมา จะต้องมีการทดสอบความถูกต้องแม่นยำของโมเดลที่สร้างขึ้นมา โดยการป้อนข้อมูลที่โมเดลไม่เคยเรียนรู้มาก่อน โดยข้อมูลที่โมเดลไม่เคยเรียนรู้มาก่อนจะถูกแปลงให้กลายเป็น feature vector แล้วถูกรวบรวมให้กลายเป็นโมเดล และทำนายผลออกมาได้ โดยไม่ต้องเพิ่มคำสั่งเข้าไป โดยสามารถเขียนเป็นแผนผังได้ดังรูปที่



รูปที่ 2.24 แผนผังการใส่ข้อมูลใหม่เข้าไปเพื่อทดสอบความแม่นยำของโมเดล [12]

ขั้นตอนของโปรแกรม Machine Learning สามารถสรุปขั้นตอนได้ดังนี้

- 1) นิยามคำถาม (Define a question)
- 2) เก็บข้อมูล (Collect data)
- 3) แสดงผลของข้อมูล (Visualize data)
- 4) ฝึก/ขัดเกลาอัลกอริทึม (Train algorithm)
- 5) ทดสอบอัลกอริทึม (Test algorithm)
- 6) เก็บข้อมูลข้อเสนอแนะ (Collect feedback)
- 7) ปรับปรุงอัลกอริทึม (Refine the algorithm)
- 8) ทำข้อ 4.-7. จนไปจนกระทั่งได้ผลลัพธ์ที่พึงพอใจ (Loop 4-7 until the results are satisfying)
- 9) ใช้ model ในการทำนายผล (Use the model to make a prediction)

โดย Machine Learning สามารถแบ่งได้ 3 แบบคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11.1 Supervised Learning [13]

เป็นการสร้างอัลกอริทึมโดยการสอนให้โปรแกรมรู้จักกับข้อมูลที่ใส่เข้าไปและผลลัพธ์ควรจะเป็นอะไรเพื่อเป็นข้อมูลตัวอย่าง โดยจะมีรูปแบบการประเมินชัดเจนในการทำงานแล้ว ผลลัพธ์ที่ได้ออกมานั้นถูกหรือผิดโดยการอ้างอิงจากข้อมูลที่สอนไป โดยเรียกผลลัพธ์ของตัว ข้อมูลตัวอย่างในการสอนว่า label โดยส่วนใหญ่การทำงานแบบนี้จะนำไปใช้กับงานที่ต้องทำซ้ำ ๆ เพื่อลดเวลาในการทำงาน โดยในการวิจัยนี้ใช้ Machine Learning แบบ Supervised Learning ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1) Classification [14] เป็นการแบ่งกลุ่มของข้อมูลออกเป็นประเภทต่าง ๆ ตามที่ผู้เขียนโปรแกรมกำหนดไว้ โดยผลลัพธ์ที่ออกมาจะอยู่ในกลุ่มที่ได้กำหนดไว้ตอนแรกเท่านั้น ไม่สามารถให้ผลลัพธ์ออกมาเป็นตัวเลย หรืออย่างอื่นที่นอกเหนือจากกลุ่มที่กำหนดเอาไว้ตอนแรกได้

2) Regression [14] ผลลัพธ์ที่ได้เป็น Continuous values (ค่าต่อเนื่อง) คือ ผลที่ได้จากโมเดลประเภทนี้ จะต้องออกมาเป็น “ค่าตัวเลข” ที่ต้องการทำนาย

2.11.2 Unsupervised Learning

เป็นการสร้างอัลกอริทึมโดยไม่มี label หรือการสอนอย่างชัดเจนให้โปรแกรมรู้ว่าข้อมูลเป็นอะไรและผลลัพธ์เป็นอะไร ผลที่ได้ถูกหรือผิด แต่เป็นการจัดกลุ่มข้อมูลข้อมูลออกเป็นกลุ่ม ๆ แล้วแต่ผู้ใช้งานกำหนด เพื่อให้ผู้ใช้งานระบุเองว่ากลุ่มนี้คืออะไร

2.11.3 Reinforcement Learning

เป็นการสร้างอัลกอริทึมที่ซับซ้อนมากกว่า 2 กลุ่มแรกโดยโปรแกรมจะเรียนรู้และเปลี่ยนไปตามสิ่งแวดล้อม โดย Machine Learning ชนิดนี้จะในรูปแบบของการประมวลผล action ในทุก ๆ การเคลื่อนไหวของคอมพิวเตอร์ ตัวอย่างเช่น alphago ที่มีการคำนวณทางเลือกในแต่ละครั้งที่เดินหมาก base จากข้อมูลที่เคยเรียนรู้มา โดยตามหลักของ reinforcement learning จะมีการกำหนดเป้าหมายและรางวัลของคอมพิวเตอร์เอาไว้ว่าเราต้องการจะให้คอมพิวเตอร์ตัวนี้ทำงานอะไร หรือแต่ละเป้าหมายที่เรามีรางวัลเท่าไรจากนั้นก็ให้คอมพิวเตอร์เรียนรู้ตามสภาพแวดล้อมโดยใช้เซ็นเซอร์หรืออินพุตอื่น ๆ ในรูปแบบต่างๆ ถ้าเกิดอินพุตแบบนี้เข้ามาแล้วเราเลือก action แบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นี้จะทำให้เราเข้าใจสเป้าหมาย หรือได้รับรางวัลเท่าไรเพื่อหา base choice ของ action ตามสถานการณ์นั้น ๆ

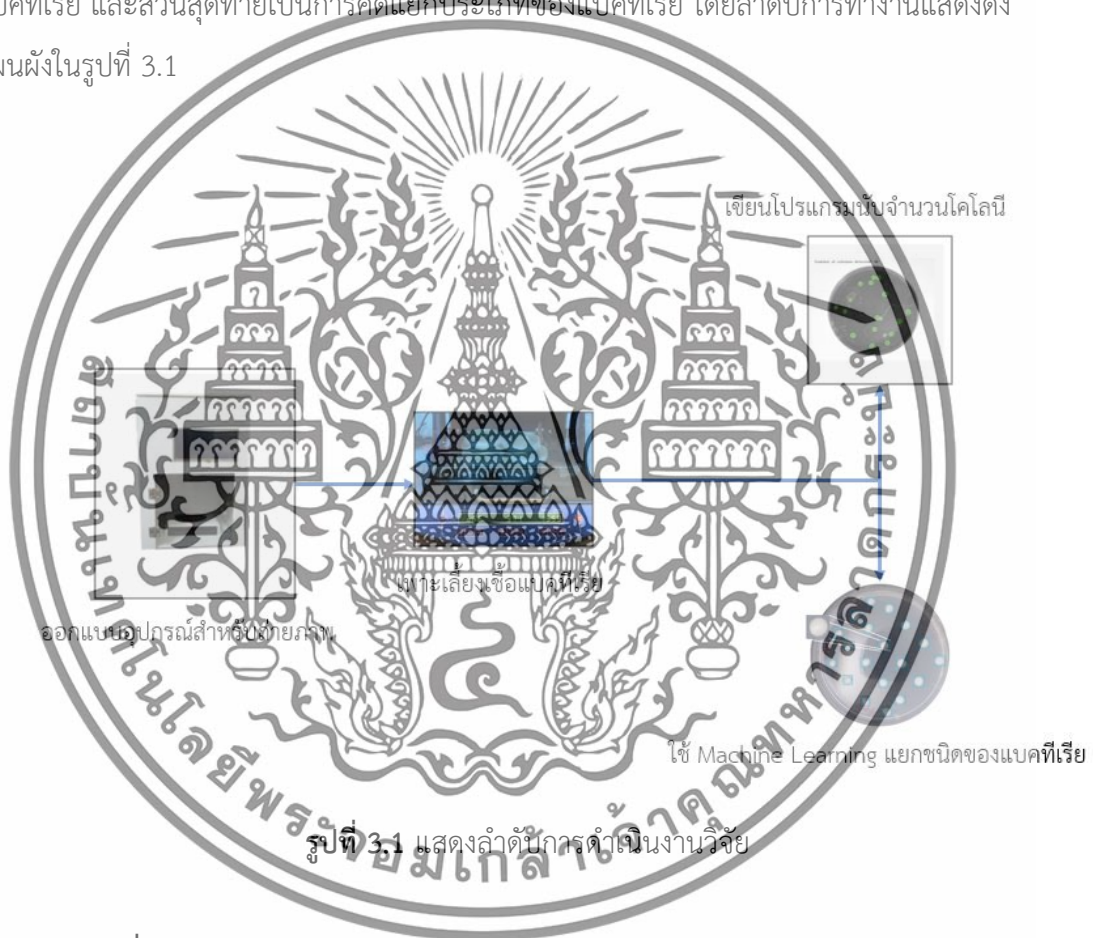


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการแบ่งออกเป็น 4 ส่วนในส่วนแรกเป็นการออกแบบอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ เพื่อกำหนดระยะ และความสว่างของรูปที่จะถ่ายจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนที่ 2 เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่มีผลต่อร่างกายของคนเมื่อได้รับปริมาณที่มาก นั่นก็คือ เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรีย *Salmonella enterica* ส่วนที่ 3 เป็นการออกแบบการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย และส่วนสุดท้ายเป็นการคัดแยกประเภทของแบคทีเรีย โดยลำดับการทำงานแสดงดังแผนผังในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงลำดับการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับทำอุปกรณ์ถ่ายภาพ

1. แผ่นพลาสติก
2. หม้อแปลงไฟ 220 โวลต์ เป็น 12 โวลต์
3. ไฟ LED strip
4. กล้องเว็บแคม

เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการเจือจางเชื้อและการเพาะเชื้อ

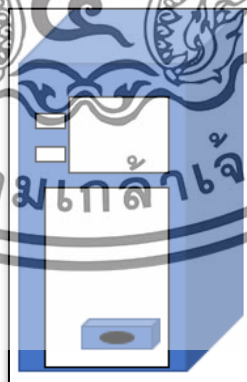
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อ
2. ห่วงเชี่ยเชื้อ
3. แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. จานเพาะเชื้อ
6. ไมโครปิเปต
7. หลอดเลี้ยงเชื้อ
8. ตู้ปลอดเชื้อ
9. ตู้ป่นเชื้อ
10. ตู้เย็น

3.2 ขั้นตอนการออกแบบและสร้างเครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น

3.2.1 การออกแบบโครงสร้าง ศึกษาการทำงานของกล้องเพื่อใช้ในการบันทึกภาพให้ได้ระยะที่เหมาะสมที่สามารถตรวจนับโคโลนีได้ควบคุมทั้งเพลาอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเริ่มจากทำการวาดต้นแบบของเครื่องบนกระดาษและกำหนดระยะและขนาดส่วนต่างๆของเครื่อง แบบออกมาดังรูปที่

3.2



รูปที่ 3.2 ต้นแบบของเครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น

โดยวัสดุที่ใช้ในการทำเครื่องทำจากแผ่นพลาสติกการออกแบบมีลักษณะทรงสี่เหลี่ยมมีขนาดกว้าง 20

เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตรทั้ง 4 ด้าน กำหนดระยะห่างจากกล้องกับระยะของเพลาอาหารเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแบคทีเรียการติดตั้งกล้องในระยะความสูงที่ 20 เซนติเมตรเป็นระยะที่กล้องสามารถบันทึกภาพควบคุมพื้นที่ของเพลนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียให้สามารถตรวจนับได้ทั้งหมด มีการออกแบบฐานสำหรับไว้ใช้งานเพลนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งอ้างอิงขนาดของเพลน อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่เป็นขนาดมาตรฐาน โดยฐานเพลนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ออกแบบด้วยโดยใช้โปรแกรม Autodesk Inventor เนื่องจากเพลนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะกลม การใช้โปรแกรม Autodesk Inventor จึงง่ายต่อการสร้างชิ้นงาน จากนั้นจึงประกอบโครงสร้างชิ้นงาน ทำการติดตั้งจอ Raspberry Pi เพื่อการใช้สำหรับการใช้งานและประมวลผลสำหรับการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย

3.3 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับการจุ่มเชื้อและการกระจายเชื้อเชื้อจากตัวอย่างเริ่มต้น

3.3.1 ทำการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อของอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ (Aseptic technique) การเก็บเชื้อแบคทีเรียสำหรับการเชื้อจากตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นโดยในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพ สามารถแยกเชื้อได้อย่างแม่นยำ จะต้องทำการฆ่าเชื้อเพื่อให้อุปกรณ์สะอาดที่สุดตลอดการปฏิบัติการทางชีววิทยาเพื่อป้องกันสิ่งปนเปื้อนจากภายนอก ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อเชื้อแบคทีเรียที่ทำการเลี้ยงได้

Autoclave เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้ไอน้ำร้อนและแรงดันสูง ทำให้ของที่ผ่านการนึ่งแล้วอยู่ในสภาพปราศจากเชื้อ จึงมักใช้เครื่องนี้ในการนึ่งฆ่าเชื้อของเสียทางชีวภาพเพื่อกำจัดและป้องกันการปนเปื้อน และนอกจากจะใช้น้องกันการปนเปื้อนแล้ว เครื่อง Autoclave ยังสามารถใช้ฆ่าเชื้อตัวอย่างก่อนจะนำมาใช้ในการทดลองได้ อุปกรณ์ที่นำไปฆ่าเชื้อดังรูปที่ 3.3

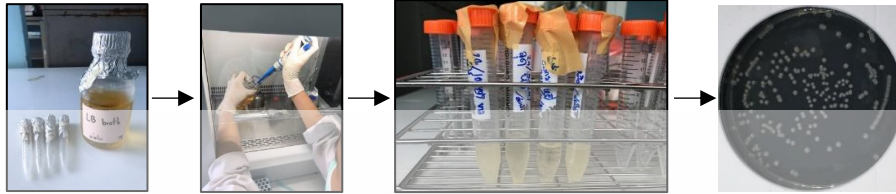


รูปที่ 3.3 วิธีการ Sterile technique

3.3.2 การเพิ่มจำนวนของเชื้อด้วยวิธี Inoculation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Inoculation คือการเพาะเชื้อหรือการเพิ่มจำนวนของเชื้อโดยการ cấyเชื้อมา 1 โคลนิจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำมาจุ่มเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (LB broth) เพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย ดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (LB broth)

3.3.3 การจุ่มเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Stab technique)

การจุ่มเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Stab technique) เป็นวิธีการนำไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อมาจุ่มในเชื้อตัวอย่าง โดยให้เชื้อแบคทีเรียติดอยู่ที่ปลายแหลมของไม้จิ้มฟัน จากนั้นจุ่มลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเบาๆ ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตเป็นโคโลนีเดียว ๆ ได้ สำหรับการเก็บภาพโคโลนีของเชื้อตัวอย่างได้ชัดเจน ดังรูปที่ 3.5



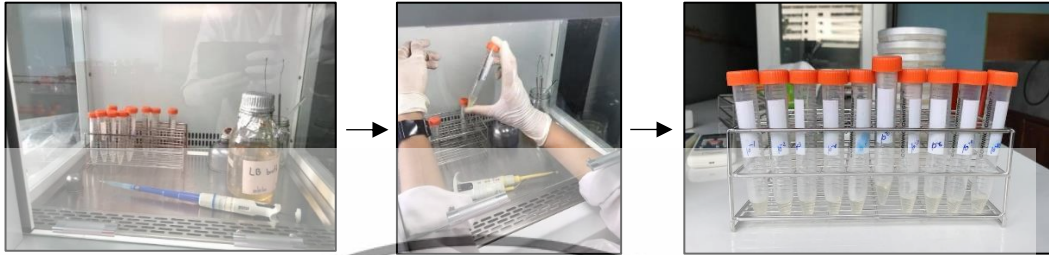
รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการจุ่มเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Stab technique)

3.3.4 การเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น (Dilution technique)

Serial dilution คือ การเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นเพื่อการนับจำนวนแบคทีเรีย (microbial population count) ให้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีจำนวนเซลล์ระหว่าง 25-250 เซลล์ ไม่มากหรือน้อยเกินไป โดยทั่วไปทำเป็นลำดับๆ ละ 10 เท่า โดยทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบน้ำใส่ลงในหลอดทดลอง (Tube) หลอดละ 900 ไมโครลิตร จากนั้นใช้หัวเข็มเย็บเย็บเชื้อโคโลนีจากเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อมา 1 โคลนิจและทำการจุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบน้ำในหลอดที่ 1 ซึ่งหลอดแรกที่ทำการจุ่มเชื่อนี้จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-1} จากนั้นทำการปิเปตจากหลอดที่มีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 10^{-1} มาจำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดที่ 2 ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-2} จากนั้นปิเปตต่อไปเรื่อยๆจนถึงหลอดที่ 10 ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-10} ดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 ขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น (Dilution technique)

3.3.5 การนำเชื้อมากระจายบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (spread technique)

คือการนำเชื้อที่ทำให้เชื้อแสงแล้วมากระจายบนผิวของอาหารแข็ง โดยใช้แท่งแก้ว Spreader สเปรดเป็นสามเหลี่ยมแล้วหมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวงกลม ซึ่งจะทำให้เชื้อสามารถกระจายไปทั่วบริเวณของจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยวิธีนี้สามารถหาจำนวนโดยประมาณของแบคทีเรียได้เช่นกัน โดยทำการปิเปตเชื้อในแต่ละหลอดที่เราทำการ Dilution จำนวน 200 ไมโครลิตร นำมาวางลงตรงกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่แบบวุ้นแข็งแยกกันในแต่ละจาน จากนั้นนำแท่งแก้ว spreader ลงไปและทิ้งตัวให้เย็น จากนั้นทำการสเปรดเป็นสามเหลี่ยมแล้วหมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวงกลม จะทำให้เชื้อแบคทีเรียกระจายอยู่ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 ขั้นตอนการนำเชื้อมากระจายบนผิวของอาหารแข็ง (spread technique)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 การบ่มเชื้อแบคทีเรีย (Incubation)

เมื่อเรามีการเก็บเชื้อแบคทีเรียในงานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นแข็งหรืออาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวแล้ว จากนั้นจะนำไปใส่ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง ดังรูปที่ 3.8 เนื่องจากที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต และที่บ่มเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่ไม่น้อยและไม่มากจนเกินไป สามารถที่จะเห็นเชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตได้อย่างชัดเจน

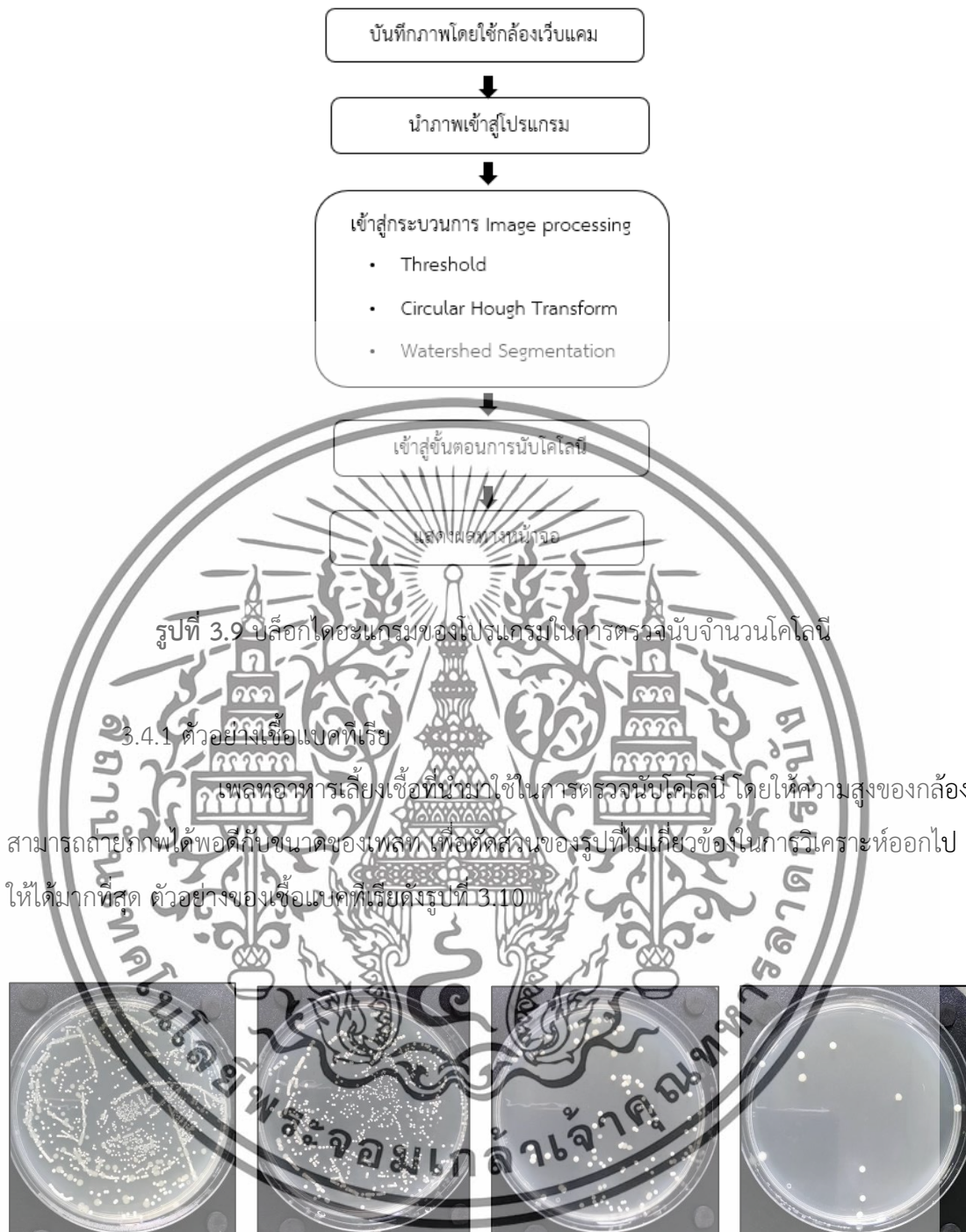


รูปที่ 3.8 การบ่มเชื้อแบคทีเรียในตู้บ่มเชื้อ

3.4 ขั้นตอนการออกแบบโปรแกรมการแสดงผลในการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย

เมื่อเราได้เชื้อแบคทีเรียที่มีการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมงแล้ว จากนั้นนำอาหารของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นที่ทำการบันทึกภาพ เพื่อนำไปประมวลผลภาพโดยโปรแกรมที่ออกแบบมีขั้นตอนของกระบวนการทาง Image processing ในการนับและแยกจำนวนโคโลนีที่มีอยู่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีขั้นตอนตามบล็อกไดอะแกรม ดังรูปที่ 3.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.10 ตัวอย่างภาพโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเติบโต

3.4.2 ออกแบบโปรแกรมตรวณับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น

ในการออกแบบโปรแกรมให้สามารถนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียในเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์อธิบายโดยขั้นตอนกระบวนการการทำงานของโปรแกรกดังนี้

3.4.2.1 ขั้นตอนที่ 1 การถ่ายภาพจากกล้องเว็บแคม ทำการบันทึกภาพเพื่อที่จะ

นำไปใช้ในการตรวณับโคโลนีแสดงดังรูปที่ 3.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.11 รูปที่ได้จากการบันทึกภาพ

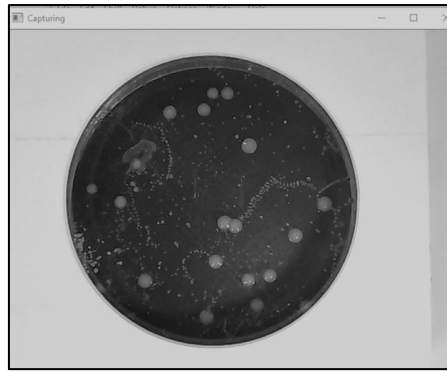
3.4.2.2 ขั้นตอนที่ 2 เป็นการนำรูปที่ได้จากการบันทึกภาพจากกล้องเว็บแคมนำไปวิเคราะห์เพื่อการตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียในเพลทอาหารโดยกระบวนการ Image processing ดังนี้

1. การแปลงภาพสี RGB ให้เป็นภาพระดับเทา (RGB to Gray) รูปที่รับเข้ามาในขั้นตอนแรกเป็นรูปที่อยู่ในระบบสีแบบ RGB ดังรูปที่ 3.12 ดังนั้นแต่ละพิกัด ของภาพจะประกอบด้วยค่าของเซตที่แสดงถึง ค่าของ R ค่าของ G และค่าของ B ระบบจะทำการ เปลี่ยนให้เป็นภาพระดับสีเทา (Grayscale) เพื่อทำให้สามารถวิเคราะห์ภาพได้ง่ายขึ้นเพราะเมื่อแปลงภาพเป็นระดับสีเทาแล้วจะทำให้แต่ละจุดภาพของภาพจะเหลือเพียงค่าความเข้มของสีมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 255 เมื่อแปลงจากภาพสีเป็นภาพระดับสีเทาจะได้ดังรูปที่ 3.13



รูปที่ 3.12 ภาพRGB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.13 ภาพ Grayscale

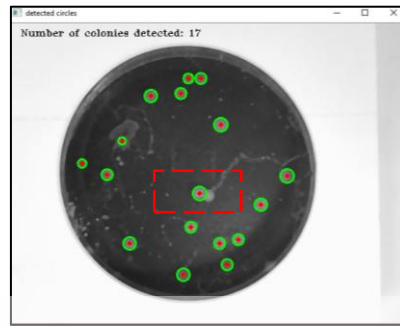
2. แปลงภาพระดับสีเทาให้เป็นภาพขาว-ดำ แปลงภาพระดับสีเทาให้เป็นภาพขาว-ดำ หมายถึง รูปที่ประกอบด้วยสีขาวและสีดำเป็นหลัก ในทางดิจิทัลหมายความว่ามีความเป็นไปได้เพียง 2 สถานะ คือ 0 และ 1 ถ้าพิกเซลใดมีค่าเป็น 0 หมายความว่าพิกเซลนั้นมีสีดำพิกเซลใดมีค่าเป็น 1 หมายความว่าพิกเซลนั้นมีสีขาวการแปลงภาพระดับสีเทาให้เป็นภาพขาว-ดำ ดังรูปที่ 3.14 จะต้องกำหนดค่าความเข้มที่ต้องการอ้างอิงหรือค่าขีดแบ่ง (Threshold Value) โดยผู้ใช้งานสามารถกำหนดได้เองหรือใช้อัลกอริทึมในการหาค่า



รูปที่ 3.14 ภาพแปลงภาพระดับสีเทาให้เป็นขาว-ดำ

3. Circular Hough Transform เพื่อค้นหาวงในภาพซึ่งเป็นลักษณะของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย วงกลมจะแสดงทางคณิตศาสตร์เป็น $(x-xcenter)^2+(y-ycenter)^2=r^2$ where $(xcenter,ycenter)$ เป็นศูนย์กลางของวงกลม และ r คือรัศมีของวงกลมจากสมการจะเห็นว่ามี 3 พารามิเตอร์ดังนั้นจำเป็นต้องมีตัวเก็บประจุ 3 มิติสำหรับการแปลงโหนดซึ่งจะไม่ได้ผลอย่างมาก ดังนั้น OpenCV จึงใช้วิธีการที่ซับซ้อนมากขึ้นวิธีการไล่ระดับสี Hough ซึ่งใช้ข้อมูลการไล่

ระดับสีของขอบ ผลลัพธ์ที่ได้จากการตรวจจับโคโลนีแสดงในรูปที่ 3.15 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.15 ภาพผลลัพธ์ที่ได้จากการตรวจจับโคโลนี

ในกรณีที่โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ติดกันโปรแกรมไม่สามารถตรวจนับได้ จึงมีวิธีการแยกโคโลนีเพื่อการนับของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียโดยกระบวนการ Watershed Transform

4. Watershed Transform เนื่องจากในการตรวจนับโคโลนีจะมีเชื้อที่อยู่ติดกันหรือใกล้เคียงกัน โปรแกรมไม่สามารถตรวจนับจำนวนโคโลนีนั้นได้จึงมีการใช้กระบวนการ Watershed Transform ดังรูปที่ 3.16 ซึ่งเป็นวิธีการประมวลผลภาพวิธีหนึ่งที่ใช้สำหรับการตัดแยกวัตถุดังกล่าวให้ขาดออกจากกันได้ แยกเพื่อการตรวจนับจำนวนโคโลนีบนแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย โดยผลลัพธ์ที่ได้จากกระบวนการ Watershed Transform แสดงในรูปที่ 3.17



รูปที่ 3.16 การแบ่งส่วนของภาพ watershed

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.17 ภาพผลลัพธ์ที่ได้จากกระบวนการ Watershed Transform

3.5 ขั้นตอนการแยกชนิดของแบคทีเรีย

ในขั้นตอนการแยกชนิดของแบคทีเรีย จะนำรูปที่ได้จากเทคนิคการจิ้มเชื้อ ดังรูปที่ 3.18 เนื่องจากเป็นรูปที่เห็นโคโลนีของแบคทีเรียอย่างชัดเจน โดยสามารถนำไปเป็นข้อมูลสำหรับอัลกอริทึมใน Machine Learning ได้ โดยในงานวิจัยนี้ทำการจิ้มเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* กับเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* ในการแยกชนิดของแบคทีเรีย



รูปที่ 3.18 ภาพที่ได้จากการเพาะเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคการจิ้มเชื้อ (Stab technique)

ในงานวิจัยนี้ใช้ Machine Learning แบบ Classification สำหรับการแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งอยู่ในกลุ่มอัลกอริทึมของ Supervised learning algorithm ซึ่งเป็น Machine Learning ที่จำเป็นต้องมีการป้อนข้อมูลตัวอย่างและผลลัพธ์ที่ควรจะเป็นให้กับเครื่อง โดยมีลำดับขั้นตอนดังนี้

3.5.1 กำหนดกลุ่มของข้อมูลที่จะให้เครื่องเรียนรู้ ในงานวิจัยนี้แบ่งข้อมูลที่ต้องการคัดแยกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* กับเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

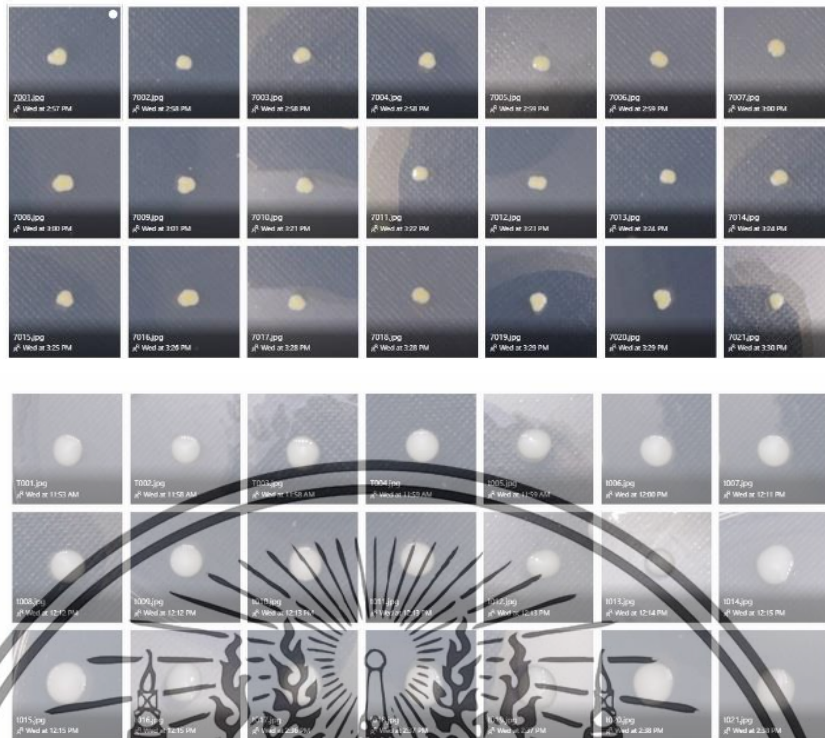
3.5.2 ทำการเก็บข้อมูล โดยการเก็บภาพจากอุปกรณ์ในการถ่ายภาพที่สร้างขึ้น ให้มีสัดส่วนเดียวกันทั้งหมด และมีความชัดเจนโดยให้เห็นรายละเอียดของโคโลนีได้มากที่สุด เพื่อให้โปรแกรมสามารถแยกรายละเอียดของแต่ละโคโลนีได้

3.5.3 นำภาพที่ได้เข้าสู่โปรแกรมในการแยกชนิดของแบคทีเรีย โปรแกรมจะทำการ Image segmentation ภาพที่ได้มา โดยใช้ edge detection และทำการตีกรอบโคโลนี ทำให้สามารถจับภาพโคโลนีของแบคทีเรียเดี่ยว ๆ ได้ ผลที่ได้ดังรูปที่ 3.19 โดยรูปที่ 3.19 (a) คือผลลัพธ์ที่ได้ของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และรูปที่ 3.19 (b)) คือผลลัพธ์ที่ได้ของแบคทีเรีย *Salmonella enterica*



รูปที่ 3.19 แสดงผลลัพธ์ของการจับภาพโคโลนีของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* กับเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica*

3.5.4 นำภาพของแบคทีเรียในโปรแกรมมาเทรน (Train) ให้กับอัลกอริทึมของเครื่อง โดยแยกเทรนระหว่าง เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* กับเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* ในการเทรนจะนำภาพของแบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ ให้เครื่องได้เรียนรู้ที่ละโคโลนี โดยในการเทรนใช้โคโลนีของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ทั้งหมด 784 ตัวอย่าง และ เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* ทั้งหมด 810 ตัวอย่าง ตัวอย่างของรูปที่ใช้ในการเทรนดังรูปที่ 3.20 เมื่อทำการเทรนเสร็จแล้ว เราจะได้โมเดลในการคัดแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด



รูปที่ 3.20 แสดงตัวอย่างภาพที่ใช้ในการเทรนเครื่องสำหรับกรแยกชนิดของแบคทีเรีย

3.5.5 ทดสอบโมเดลที่ได้มาโดยการนำภาพโคลนนิ่งของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดที่ไม่ได้ทำการเทรนลงในเครื่องมาทดสอบว่าโมเดลสามารถแยกชนิดของแบคทีเรียได้มีประสิทธิภาพหรือความแม่นยำเท่าใด หากความแม่นยำยังไม่สูงพอตามที่ตั้งไว้ก็ต้องเพิ่มตัวอย่างของข้อมูล หรือเทรนตัวอย่างเพิ่ม เพื่อให้โมเดลที่ได้มีประสิทธิภาพมากพอที่จะนำไปใช้งานได้จริง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการออกแบบเครื่องตรวจนับโคโลนี

หลังจากการประกอบชิ้นส่วนต่าง ๆ ตามที่ออกแบบไว้แล้ว ผลที่ได้ดังรูปที่ 4.1 ได้ดูสำหรับการถ่ายภาพและประมวลผลจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดขึ้น และส่งภาพถ่ายไปประมวลผลเพื่อแยกชนิดของแบคทีเรีย



รูปที่ 4.1 ส่วนประกอบของเครื่องตรวจนับโคโลนี

โดยอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่อยู่ในเครื่องตรวจนับโคโลนีมีหน้าที่ดังนี้

- Raspberry pi Board ทำหน้าที่ในการประมวลผลการทำงานของโปรแกรม
- Webcam camera ทำหน้าที่ถ่ายภาพโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อนำภาพเข้าสู่โปรแกรม
- LED strip ทำหน้าที่เป็นแสงสว่างให้กับตัวเครื่องเพื่อให้ได้ภาพโคโลนีที่ชัดเจน
- Switching เป็นตัวแปลงไฟฟ้าจากไฟฟ้าบ้าน 220 V เป็นไฟ 12 V
- Petri Dish Block เป็นบล็อกใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการถ่ายภาพโคโลนี

4.2 ผลการจุ่มเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ในการจุ่มเชื้อแบคทีเรียจะให้เกิดโคโลนีของแบคทีเรียประมาณ 15 – 25 โคโลนี โดยผลจากการใช้เทคนิคนี้แสดงตัวอย่างดังรูปที่ 4.2 เป็นโคโลนีของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 19 โคโลนีใน 1 เพลาอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ผลการจิ้มเชื้อแบคทีเรีย (Stab technique)

4.3 ผลการทำ Ten-fold Serial dilution

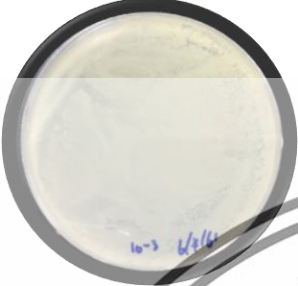
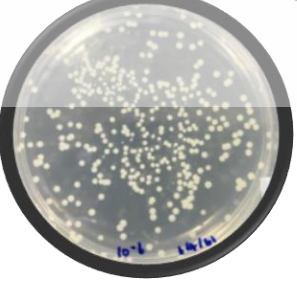
ในการทำ Ten-fold Serial dilution จะเจือจางเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า โดยทดลองจนถึงที่ความเข้มข้น 10^{-10} ผลจากการทำการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4. 1 ผลการทำ Ten fold Serial dilution

รูปแสดงการทำ serial dilution	ผลการทดลอง
	ความเข้มข้น 10^{-1} มีปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรียในปริมาณมาก เนื่องจากเป็นการนำเชื้อตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียให้มากขึ้น จึงไม่สามารถมองเห็นแยกเป็นโคโลนีได้
	ความเข้มข้น 10^{-2} มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียจางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-1} แต่ยังคงมีความเข้มข้นของแบคทีเรียในปริมาณมาก จึงไม่สามารถมองเห็นแยกเป็นโคโลนีได้

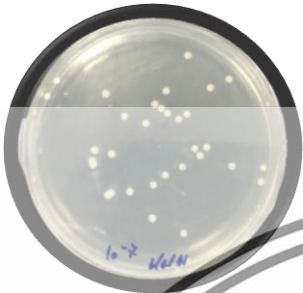
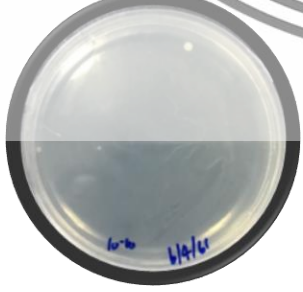
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการทำ Ten-fold Serial dilution(ต่อ)

รูปแสดงการทำ serial dilution	ผลการทดลอง
	ความเข้มข้น 10^{-3} มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียจางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-2} เริ่มเห็นลักษณะของแบคทีเรียเป็นริ้วเส้น แต่ยังมีบางบริเวณที่มีความเข้มข้นของแบคทีเรียในปริมาณมาก จึงไม่สามารถมองเห็นแยกเป็นโคโลนีได้ชัดเจน
	ความเข้มข้น 10^{-4} มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียจางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-3} เริ่มเห็นลักษณะของแบคทีเรียเป็นริ้วเส้นน้อยลง บางบริเวณสามารถเห็นจำนวนโคโลนีได้แต่ยังไม่ชัดเจน เนื่องจากยังมีความเข้มข้นของแบคทีเรียมาก
	ความเข้มข้น 10^{-5} มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียจางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-4} สามารถเห็นจำนวนโคโลนีได้ชัดเจนขึ้น มีเพียงบางบริเวณเท่านั้นที่เห็นแบคทีเรียเกาะกลุ่มกันเป็นริ้วเส้น
	ความเข้มข้น 10^{-6} มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียจางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-5} สามารถเห็นจำนวนโคโลนีได้ชัดเจนขึ้น แบคทีเรียเกาะกันเป็นริ้วเส้นสั้นลง โคโลนีเริ่มมีการกระจายตัวเนื่องจากความเข้มข้นของแบคทีเรียลดน้อยลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการทำ Ten fold Serial dilution(ต่อ)

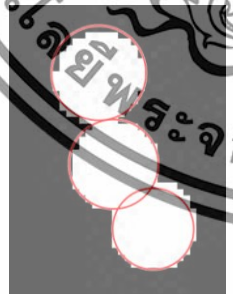
รูปแสดงการทำ serial dilution	ผลการทดลอง
	ความเข้มข้น 10^{-7} มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียจางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-6} สามารถเห็นจำนวนโคโลนีได้ชัดเจนขึ้น จำนวนโคโลนีลดน้อยลงและกระจายตัวกัน เนื่องจากความเข้มข้นของแบคทีเรียมีปริมาณที่เจือจางลง
	ความเข้มข้น 10^{-8} มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียจางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-7} สามารถเห็นจำนวนโคโลนีได้ โดยจำนวนโคโลนีมีเพียงไม่กี่ตัว เนื่องจากความเข้มข้นของแบคทีเรียมีปริมาณที่น้อยมาก
	ความเข้มข้น 10^{-9} มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียจางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-8} สามารถเห็นจำนวนโคโลนีได้ โดยจำนวนโคโลนีมีเพียงไม่กี่ตัว เนื่องจากความเข้มข้นของแบคทีเรียมีปริมาณที่น้อยมาก
	ความเข้มข้น 10^{-10} มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียจางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-9} สามารถเห็นเห็นเพียง 1 โคโลนีเท่านั้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากความเข้มข้นของแบคทีเรียมีปริมาณที่น้อยมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการทำ Circular Hough transform ในการตรวจจับโคลน

ในการทำ Circular Hough transform ในการตรวจจับโคลนจะสามารถแยกโคลนที่อยู่ติดกันได้ โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4. 2 ผลการทำ Watershed segmentation ในการตรวจจับโคลน

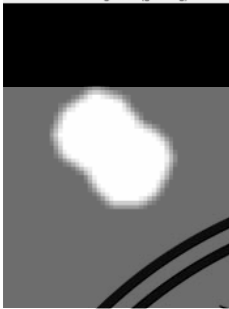
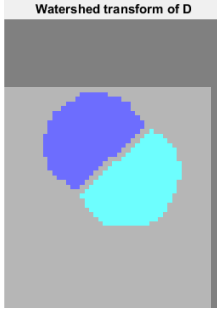
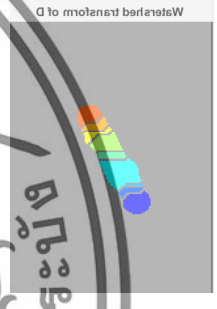
ตัวอย่างภาพโคลนที่ใช้ในการตรวจจับ	จำนวนโคลนที่ตรวจจับได้
	สามารถตรวจจับโคลนเดี่ยวได้จำนวน 12 โคลน
	สามารถแยกโคลนที่อยู่ติดกันได้จำนวน 2 โคลน
	สามารถแยกโคลนที่อยู่ติดกันได้จำนวน 3 โคลน

4.5 ผลการทำ Watershed segmentation ในการแยกโคลน

ในการทำ Watershed segmentation ในการตรวจจับโคลนจะสามารถแยกโคลนที่อยู่ติดกันเป็นสายยาวได้ โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4. 3 ผลการทำ Watershed segmentation ในการแยกโคลน

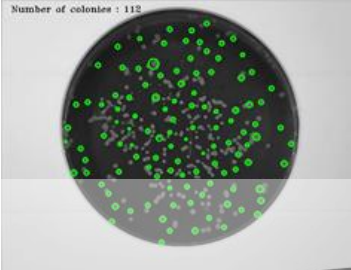
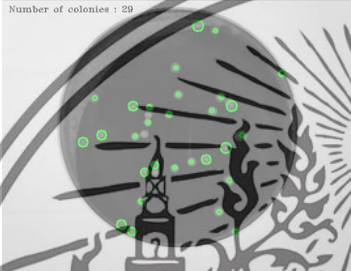
ตัวอย่างภาพแสดงส่วนที่โคลนติดกัน	หาจุดเซนทรอยด์	Watershed segmentation
		
		
		

4.6 ผลการตรวจนับจำนวนโคลน

จากผลของการทำ Ten-fold serial dilution ได้นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นที่ 10^{-6} ถึง 10^{-10} นำมาทดสอบตรวจนับจำนวนโคลนในโปรแกรมที่ทำการออกแบบ เนื่องจากเป็นช่วงความเข้มข้นที่สามารถมองเห็นลักษณะของโคลนได้ จึงสามารถใช้กระบวนการประมวลผลภาพในการตรวจนับจำนวนโคลน ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4. 4 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีในโปรแกรม Python

รูปแสดงการตรวจนับโคโลนี	คำอธิบายผลการทดลอง
	ความเข้มข้น 10^{-6} ออกแบบให้กรอบวงกลมสีเขียวคือรัศมีในการตรวจนับของแต่ละโคโลนี จากผลการทดลองโปรแกรม พบว่าสามารถตรวจนับโคโลนีได้ 112 โคโลนี
	ความเข้มข้น 10^{-7} ออกแบบให้กรอบวงกลมสีเขียวคือรัศมีในการตรวจนับของแต่ละโคโลนี จากผลการทดลองโปรแกรม พบว่าสามารถตรวจนับโคโลนีได้ 29 โคโลนี
	ความเข้มข้น 10^{-8} ออกแบบให้กรอบวงกลมสีเขียวคือรัศมีในการตรวจนับของแต่ละโคโลนี จากผลการทดลองโปรแกรม พบว่าสามารถตรวจนับโคโลนีได้ 10 โคโลนี
	ความเข้มข้น 10^{-9} ออกแบบให้กรอบวงกลมสีเขียวคือรัศมีในการตรวจนับของแต่ละโคโลนี จากผลการทดลองโปรแกรม พบว่าสามารถตรวจนับโคโลนีได้ 4 โคโลนี
	ความเข้มข้น 10^{-10} ออกแบบให้กรอบวงกลมสีเขียวคือรัศมีในการตรวจนับของแต่ละโคโลนี จากผลการทดลองโปรแกรม พบว่าสามารถตรวจนับโคโลนีได้ 1 โคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 การตรวจนับโคโลนีด้วยโปรแกรมเทียบกับนับด้วยตาเปล่า

ผลที่ได้จากการนับจำนวนโคโลนีด้วยโปรแกรมที่ออกแบบขึ้น มีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 4. 5 ผลการตรวจนับโคโลนีด้วยโปรแกรมเทียบกับนับด้วยตาเปล่า

ความเข้มข้น	จำนวนโคโลนีที่นับด้วยตาเปล่า	จำนวนโคโลนีที่โปรแกรมตรวจนับ
10^{-6}	168	112
10^{-7}	31	29
10^{-8}	10	10
10^{-9}	4	4
10^{-10}	1	1

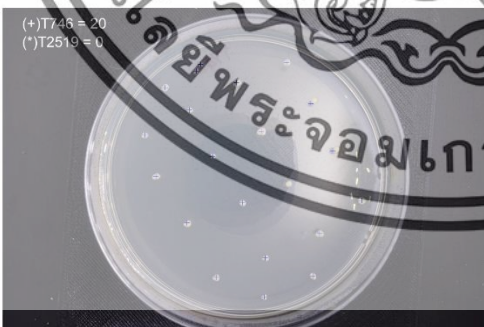
4.8 การแยกชนิดของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* กับ *Salmonella enterica*

โดยใช้ Machine Learning

ผลในการแยกชนิดของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* กับ *Salmonella enterica*

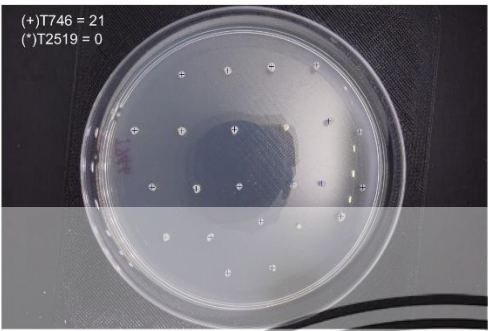
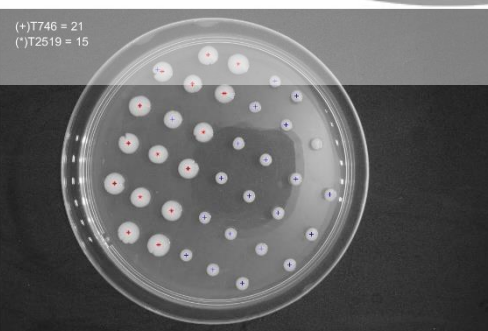
โดยในอัลกอริทึม Machine Learning ใช้โค้ด T746 แทน *Staphylococcus aureus* และ T2519 แทน *Salmonella enterica* แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4. 6 แสดงผลการแยกชนิดของแบคทีเรีย

รูปแสดงการแยกชนิดของแบคทีเรีย	คำอธิบายผลการทดลอง
	Machine Learning สามารถนับโคโลนีของ - T746 ได้ 20 โคโลนี - T2519 ได้ 0 โคโลนี - นับด้วยตาเปล่า - T746 ได้ 21 โคโลนี - T2519 ได้ 0 โคโลนี

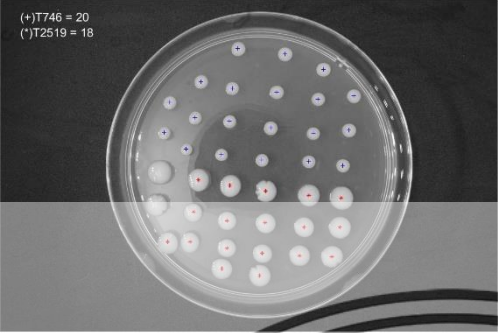
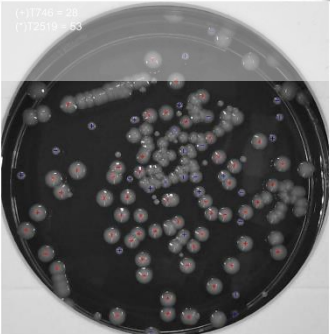
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการแยกชนิดของแบคทีเรีย (ต่อ)

รูปแสดงการแยกชนิดของแบคทีเรีย	คำอธิบายผลการทดลอง
	- Machine Learning สามารถนับโคโลนีของ T746 ได้ 21 โคโลนี T2519 ได้ 0 โคโลนี - นับด้วยตาเปล่า T746 ได้ 24 โคโลนี T2519 ได้ 0 โคโลนี
	- Machine Learning สามารถนับโคโลนีของ T746 ได้ 0 โคโลนี T2519 ได้ 29 โคโลนี - นับด้วยตาเปล่า T746 ได้ 0 โคโลนี T2519 ได้ 29 โคโลนี
	- Machine Learning สามารถนับโคโลนีของ T746 ได้ 20 โคโลนี T2519 ได้ 17 โคโลนี - นับด้วยตาเปล่า T746 ได้ 22 โคโลนี T2519 ได้ 17 โคโลนี
	- Machine Learning สามารถนับโคโลนีของ T746 ได้ 21 โคโลนี T2519 ได้ 15 โคโลนี - นับด้วยตาเปล่า T746 ได้ 20 โคโลนี T2519 ได้ 16 โคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการแยกชนิดของแบคทีเรีย (ต่อ)

รูปแสดงการแยกชนิดของแบคทีเรีย	คำอธิบายผลการทดลอง
	- Machine Learning สามารถนับโคโลนีของ T746 ได้ 20 โคโลนี T2519 ได้ 18 โคโลนี - นับด้วยตาเปล่า T746 ได้ 20 โคโลนี T2519 ได้ 20 โคโลนี
	- Machine Learning สามารถนับโคโลนีของ T746 ได้ 23 โคโลนี T2519 ได้ 22 โคโลนี - นับด้วยตาเปล่า T746 ได้ 24 โคโลนี T2519 ได้ 22 โคโลนี
	- Machine Learning สามารถนับโคโลนีของ T746 ได้ 21 โคโลนี T2519 ได้ 19 โคโลนี - นับด้วยตาเปล่า T746 ได้ 23 โคโลนี T2519 ได้ 19 โคโลนี
	- Machine Learning สามารถนับโคโลนีของ T746 ได้ 28 โคโลนี T2519 ได้ 53 โคโลนี - นับด้วยตาเปล่า T746 ได้ 33 โคโลนี T2519 ได้ 127 โคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

5.1 สรุปผลการทดลอง

โครงการวิจัยนี้ได้จัดทำอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพโคโลนีของแบคทีเรีย และออกแบบระบบในการนับจำนวนของแบคทีเรีย รวมถึงคัดแยกแบคทีเรีย เพื่อลดเวลาในการวิเคราะห์แบคทีเรียของผู้ปฏิบัติงาน หรือผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย ผลที่ได้จากงานวิจัยคือ ระบบในการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียสำหรับนำไปคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย 2 เชื้อคือ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella enterica* ได้ โดยจากการทดลองโดยใช้ภาพโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้จากเทคนิคการจุ่มเชื้อมาทดสอบในระบบพบว่า มีความแม่นยำในการนับจำนวนโคโลนีที่ 98.75% และสามารถคัดแยกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียมีความแม่นยำที่ 98.12% ส่วนในการทดลองโดยใช้ภาพโคโลนีที่ได้จากเทคนิคการกระจายเชื้อ (spread plate) มีความแม่นยำในการนับจำนวนโคโลนี 33.61% และสามารถคัดแยกโคโลนีของแบคทีเรียที่ความแม่นยำ 41.73%

5.2 ปัญหาและแนวทางการแก้ไข

5.2.1 ความแม่นยำของการนับจำนวนโคโลนีจากรูปที่ได้จากเทคนิคการกระจายเชื้อ

ปัญหา โคโลนีของแบคทีเรียที่ได้มีลักษณะต่อกันเป็นทางยาว ทำให้โปรแกรมไม่สามารถแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ ได้

แนวทางการแก้ไข เติมน้ำเชื้อแบคทีเรียให้มีปริมาณที่น้อยลง และปรับปรุงระบบประมวลผลภาพในส่วนของการแยกภาพ ให้สามารถหาจุดศูนย์กลางของโคโลนีที่อยู่ติดกันได้ และทำการแยกโคโลนีที่อยู่ติดกัน จากนั้นจึงทำการนับจำนวนโคโลนี

5.2.2 ความแม่นยำของการคัดแยกโคโลนีของแบคทีเรียจากรูปที่ได้จากเทคนิคการกระจายเชื้อ

ปัญหา เนื่องจากโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้มีลักษณะต่อกันเป็นทางยาว และขนาดของโคโลนีที่ได้เล็กกว่ารูปที่ได้จากเทคนิคการจุ่มเชื้อ ทำให้รูปที่ได้ไม่ชัดพอที่จะทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

แนวทางการแก้ไข เปลี่ยนกล้องที่ใช้สำหรับเก็บภาพโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อให้รูปที่ได้มีความคมชัดขึ้น และเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่เทรนในอัลกอริทึม Machine Learning เพื่อให้มีตัวอย่างเพียงพอที่จะแยกโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละชนิดออกจากกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

ผลที่ได้รับจากโครงการวิจัยนี้ประกอบด้วยส่วนหลักดังนี้

1. อุปกรณ์สำหรับการถ่ายภาพโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย
2. ระบบประมวลผลภาพรวมถึงระบบอัลกอริทึม Machine Learning ที่ใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย
3. งานวิจัยนี้ได้นำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Proceedings of the 2018 10th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Technology (ICBBT' 18) จัดขึ้นที่เมือง Amsterdam ประเทศ Netherlands ระหว่างวันที่ 16-18 พฤษภาคม 2561 และได้ตีพิมพ์ในวารสาร AMC Conference Proceedings (ISBN: 978-1-4503-6366-2) ซึ่งอยู่ในลำดับ Q2 ของฐานข้อมูล SJR 2018 และงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 2019 International Conference on Advanced Bioinformatics and Biomedical Engineering (ICABB 2019) จัดขึ้นที่ Seoul ประเทศเกาหลีใต้ ระหว่างวันที่ 19-21 ธันวาคม 2562 และได้ตีพิมพ์ในวารสาร International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences 9(IJPMBS, ISSN: 2278-5221)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- [1] ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์, แหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร [Online], 12 กรกฎาคม 2562, แหล่งที่มา <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3222>.
- [2] สำนักงานสถิติแห่งชาติ, จำนวนผู้ป่วยในจำแนกตามกลุ่มสาเหตุโรค [Online], 2 กรกฎาคม 2562, แหล่งที่มา <http://service.nso.go.th/nso/web/statseries/statseries09.html>.
- [3] นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ สังกัด คณะวิทยาศาสตร์ มศว.ประสานมิตร และ ปรีชา สุวรรณพินิจ สังกัด คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2557. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 10. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [4] อธิยา จันทน์วิทยานุกิต และ วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, แบคทีเรียทางการแพทย์, พิมพ์ครั้งที่ 2, (กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2553).
- [5] ฉัตรชัยศรัชชัยและ พิมพ์พันธุ์ เลียงพิบูลย์ 2529. คู่มือปฏิบัติการวิชา Medical Bacteriology (MTMI 301) ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยมหิดล พิมพ์ครั้งที่ 1.
- [6] สมเกียรติ อุดมพรหมกุล. 2553. การประมวลผลภาพดิจิทัลเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [7] “การประมวลผลภาพดิจิทัล” [Online] Available: <http://www.ecpe.nu.ac.th/panomkhaww/imagepro/pdf/ch01.pdf>. 2561.
- [8] “จุด Centroid” [Online] Available: <http://www.ajmanut.com/attachments/article.2561>.
- [9] “Circular Hough Transform” [Online] Available: <http://projectlab.co.th/2017/06/04/opencv-hough-circle-transform.2561>.
- [10] “Edge Detection” [Online] Available: <https://candokamera.wordpress.com/edge-detection.2561>.
- [11] “Watershed Transform” [Online] Available: <http://staff.cs.psu.ac.th/sathit/344-671/Image%20Segmentation.pdf.2561>.
- [12] “การเรียนรู้ของเครื่อง (Machine Learning)” [Online] Available: <https://bit.ly/2KyK5ax.2562>
- [13] Isha Salian, “SuperVize Me: What’s the Difference Btwenn Supervised, Unsupervised, Semi Supervised and Reinforcement Learning, issue 12 July 2019, Available: <https://blogs.nvidia.com/blog/2018/08/02/supervised-unsupervised-learning/>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- [14] Dr.Michael J. Garbade, Regression Versus Classification Machine Learning : What's the Difference ?, issue 12 July 2019, Available: <https://medium.com/quick-code/regression-versus-classification-machine-learning-whats-the-difference-345c56dd15f7>
- [15] J. G. A. Barbedo, “A Review on Methods for Automatic Counting of Objects in Digital Images”, IEEE Latin America Transaction, volume: 10, Issue 5 Sep, 2012, pp. 2112-2124.
- [16] “Image Segmentation in Deep Learning: Methods and Application”, issue 20 July 2019, Available: <https://missinglink.ai/guides/neural-network-concepts/image-segmentation-deep-learning-methods-applications/>
- [17] “Training Data”, issue 20 July 2019, Available: <https://www.techopedia.com/definition/33181/training-data>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานวิจัยได้นำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Proceedings of the 2018 10th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Technology (ICBBT' 18) จัดขึ้นที่เมือง Amsterdam ประเทศ Netherlands ระหว่างวันที่ 16-18 พฤษภาคม 2561 และได้ตีพิมพ์ในวารสาร AMC Conference Proceedings (ISBN: 978-1-4503-6366-2) ซึ่งอยู่ในลำดับ Q2 ของฐานข้อมูล SJR 2018

An Automated Colony Counter for Serial-Dilution Culture Method

Naphatsawan Vongmanee
Department of Biomedical
Engineering Faculty of Engineering
King Mongkut's Institute of
Technology Ladkrabang Bangkok,
Thailand
+66840910604
naphatsawan.v@hotmail.com

Aonjira Burmak
Department of Biomedical
Engineering Faculty of Engineering
King Mongkut's Institute of
Technology Ladkrabang Bangkok,
Thailand
+66998280210
B.aonjira@hotmail.com

Sarinporn Visitsattapongse
Department of Biomedical
Engineering Faculty of Engineering
King Mongkut's Institute of
Technology Ladkrabang Bangkok,
Thailand
+66864036566
sarinporn.vi@kmitl.ac.th

ABSTRACT

Serial-dilution method is used for estimating the concentration of unknown sample by counting the number of bacterial colonies cultured and then backtracking the measured counts to the unknown concentration. This process is time-consuming, error prone and cause eye fatigue. This paper proposes an automated colony counter with captured image using webcam camera and uses Raspberry Pi for processing with capturing, thresholding, circular Hough transform, watershed segmentation and displaying results number of colonies on culture media.

CCS Concepts

Software and its engineering → Software design engineering;

Keywords Serial-dilution; Bacterial colony; Circular Hough transform; Watershed Segmentation.

1. INTRODUCTION

Digital image processing technology can enable integrated solutions for a wide variety of applications including biomedical image processing and consumer electronics.

In this article, we use the digital image processing technique for counting the number of colonies at each concentration from serial dilution method. Routinely, Serial-dilution method is used for estimating the concentration of unknown sample by counting the number of microorganism colonies cultured from serial dilutions of the sample, and then backtracking the measured counts to the unknown concentration. This process is time-consuming, error prone and cause eye fatigue.

Therefore, in this study aimed to design an automated colony counter. It has an analytical program based on digital image

Permission to make digital or hard copies of all or part of this work for personal or classroom use is granted without fee provided that copies are not made or distributed for profit or commercial advantage and that copies bear this notice and the full citation on the first page. Copyrights for components of this work owned by others than ACM must be honored. Abstracting with credit is permitted. To copy otherwise, or republish, to post on servers or to redistribute to lists, requires prior specific permission and/or a fee. Request permissions from Permissions@acm.org.

ICBBT '18, May 16–18, 2018, Amsterdam, Netherlands
© 2018 Association for Computing Machinery.
ACM ISBN 978-1-4503-6366-2/18/05...\$15.00
DOI: <https://doi.org/10.1145/3232059.3232074>

processing. First process, The captured image using webcam camera of the colony on the culture media is first preprocessed using Gaussian smoothing filter. The filtered image is then converted to binary image using automatic thresholding technique. [1] The circular Hough transform is applied to determine the region of interest (ROI) of the colony on the solid culture. [2] Morphological processing is then performed on the ROI to remove speckling noise. Image labeling is then used to detect the unconnected colonies which are then further counted to determine the number of microorganism colonies. [3] For the connected colonies, a watershed segmentation schemes are proposed to detect the boundaries of the each colony in the connected colonies. [4] The goal of segmentation is to simplify and change the representation of an image into something that is more meaningful and easier to analyze. Image segmentation is used to locate objects and boundaries of connecting colonies in images. [5]

In this paper, we propose a fully automatic colony counter with captured image using webcam camera of the colony on the culture media. Raspberry Pi for processing and displaying with graphic user interface for capturing, thresholding, counting and showing results number of colonies on culture medium. These results of our program are compared to visual inspection.

2. METHODOLOGY

2.1 Ten-fold serial-dilution methodology

A ten-fold serial dilution is a series of sequential dilutions used to reduce a dense culture of cells to a more usable concentration. Each dilution will reduce the concentration of bacteria by a specific amount. So, by calculating the total dilution over the entire series, it is possible to know how many bacteria you started with. The best way to fully grasp serial dilutions is to try out the procedure yourself. [6]

To start, we need 100 microliters (μl) of bacterial culture. Before we start diluting, we need to prepare several dilution blanks, which are tubes containing the diluting liquid in exact quantities. This work, we need ten dilutions, numbered 1-10. In each tube, we need exactly 900 μl of Luria-Bertani (LB) broth. All steps are gently shake or swirl the tube. This will ensure that your cells are evenly distributed in the master culture tube. (Fig.1)

Ten-fold serial dilutions protocol:

Step 1: Set up the sterilized test tubes in a rack. Label each tube clearly to indicate the dilution of its contents after the ten-fold serial dilution has been carried out. (For step 2 to 6 work on safety cabinet)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

two spatial coordinates versus gray levels. In such a “topographic” interpretation and consider three types of points:

- Points belonging to a regional minimum.
- Points at which a drop of water, if placed at the location of any of those points, would fall with certainty to a single minimum.
- Points at which water would be equally likely to fall to more than one such minimum. [7]

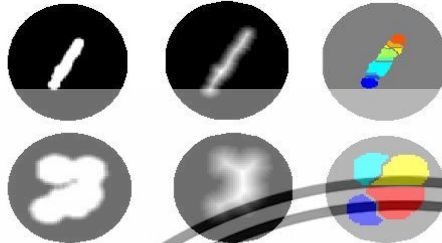


Fig.7 Watershed Technique for segmentation connecting colonies

Colony counter

- Raspberry pi Board for processing of program design
- Webcam camera for capturing image of colonies on culture medium
- LED strip for bright and clear to see detail of colonies
- Switching for adapting voltage 220V to 12V
- Petri Dish Block for placing plate of nutrient agar as a prototype (Fig.8)

Fig.8 Prototype of colony counter



Fig.9 Showing result on display

The number of actual colonies is estimated as the ratio of cluster area to an average colony area. The average colony area was automatically recognized by obtaining the size magnitude

corresponding to the most populated colony sizes, as suggested by the microbiologists. Integer division is applied one by one to all inseparable clusters to minimize error. The watershed segmentation algorithm based counting method. A case of watershed segmentation is illustrated in Fig.7 If the cluster consists of a few colonies, this algorithm usually produces plausible results. In order to better visualize the performance of the methods. [8]

3. EXPERIMENTAL AND RESULTS

In our experiments, we used images from serial-dilution at concentration 10^{-6} to 10^{-10} which were taken in different times using completely different consumer grade compact digital camera at resolutions of 1920×1080 pixels. All of agar plate included colonies grown from the E.coli bacteria (Fig.10). And we take plate at concentration 10^{-6} to 10^{-10} for counting colonies in our program because at these concentration can separate by visual inspection and can use image processing technique to count colonies on culture medium (Fig.9)

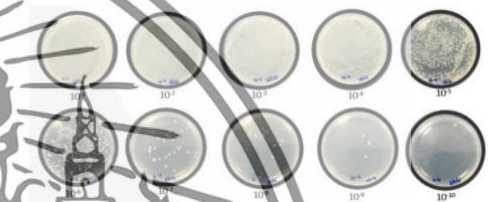
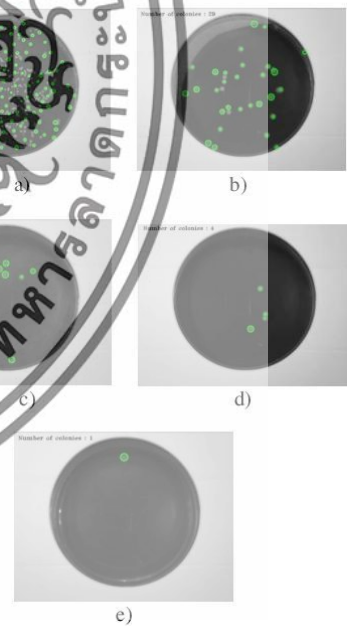


Fig.10 Result of ten-fold serial dilution

Program detection



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Step 2: Use a sterile micropipette to dispense 900 μ L LB broth to all the labeled sterile tubes.

Step 3: Use a sterile micropipette to transfer 100 μ L of the master culture tube to the first tube (10^{-1}) and gently mix. This is the first ten-fold dilution.

Step 4: Use a sterile micropipette with new sterile tip to carry out a second ten-fold dilution. Continue the series of ten-fold dilutions until the last tube.

Step 5: Take 100 μ L of each dilution (10^{-1} to 10^{-10}) spread evenly over the surface of LB agar plate using the sterile glass spreader. All the Culture plate (10^{-1} to 10^{-10}) incubate 37° for 16 hours.

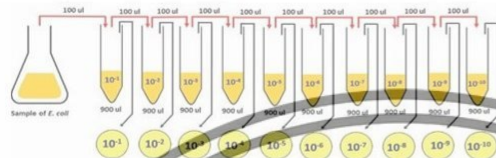


Fig.1. Step for ten-fold serial dilutions

The dilution plates are incubated at a temperature of 37° degrees Celsius for sixteen to eighteen hours (Fig.2) After incubation, the plates are examined to determine if bacterial expansion has occurred. The lowest concentration of antibiotics that stopped the spread of the bacteria is considered to be the minimum inhibitory concentration of that bacteria.

Fig.2 Incubate at 37°C for 16 hours

2.2. Program design



Fig.3 Block diagram for colony counter

- Images are collected using digital webcam camera. (Fig.4)
- The collected images are digitized on a computer utilizing a image processing software package that has programming capabilities.
- The digitized picture is processed using the multi-threshold segmentation procedures described to separate and detect the colonies present.
- The separated colonies are counted in a final processed image using a conventional single-threshold segmentation procedure.

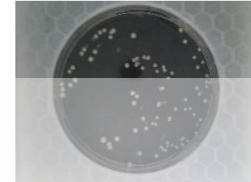


Fig.4 Capture image by webcam camera

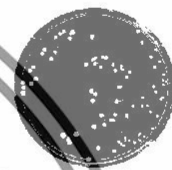


Fig.5 RGB to Black-White label

The image converts RGB color to gray scale and then converts gray scale to black and white and then adjust threshold for clearly detect microorganisms on agar plate. (Fig.5)

This process finds the number of colonies for two cases: If the final shape is small and circular, then the shape is assigned to a single colony. For larger and non-circular shapes, then the non-circular shape is assigned to a connecting colony. (Fig.3)

Circular Hough Transform

The circular Hough Transform (CHT) is a feature extraction technique for circle detection. It is a specialization of Hough Transform. The purpose of the technique is to find circles in imperfect image inputs.[8] The circular Hough Transform can separate of each colonies in a few of connecting colonies by set min radius and max radius to detect of each colonies.(Fig.6)



Fig.6 Circular Hough Transform detection

Watershed Transform

The Watershed Transform is a unique technique for segmenting digital images that uses a type of region growing method based on an image gradient. The concept of Watershed Transform is based on visualizing an image in three dimensions:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

a) concentration at 10^{-6} b) concentration at 10^{-7}
 c) concentration at 10^{-8} d) concentration at 10^{-9}
 e) concentration at 10^{-10}

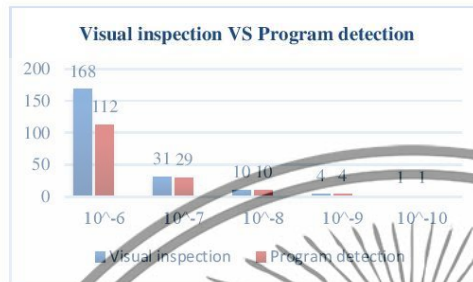


Fig.10 Bar chart of visual inspection compare with program detection

The colony number results of an automated colony counter are presented in Fig.10 compared with visual inspection. This table indicates that the proposed has some error from this program. May be caused by images with high density give less accurate count. Images with low density of bacteria give accurate or near to accurate count. The reason there of is that in case of high density of bacteria after thresholding shape of colony gets distorted which leads to appearance of high curvature points along the boundary. These high curvature points get accumulated in count result.

4. CONCLUSION AND FUTURE WORK

This paper proposes an automated colony counter for serial dilution culture method which used many image processing algorithms such as gray scaling, thresholding, filtering etc. to count these colonies efficiently. A new image processing-based method is proposed for efficient and automated counting of colonies on agar plate. The software system depends on the digital images produced by digital webcam camera. The proposed system can handle colonies with noise images and focus problems. The main problem of this work was at the high concentration that found some error. Because at high concentration there are long connecting colonies and high density of colonies existence clusters of colonies which cannot be visually split into individual colonies.

As a future work, full automation of the overall process including more accuracy at high concentration from serial dilution. It is also desired to detect and identify specific type of bacteria colony will be developed.

5. ACKNOWLEDGEMENT

We were acknowledged, and overwhelming supported by our respected professor and staff from Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMUTL). This work was supported by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Research Fund [grant number: KREF016012]

6. REFERENCES

- [1] N. Otsu, "A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms," IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Vol. 9, No. 1, 1979, pp. 62-66.
- [2] Hüseyin Ateş, "An Image-Processing Based Automated Bacteria Colony Counter", Department of Electrical and Electronics Engineering, Anadolu University, 26555 Eskisehir Turkey, September 14-16, 2009.
- [3] SHEN Wei-zheng, WU Ya-chun, ZHAO lie, ZHENG Hui, "Experimental Study for Automatic Colony Counting System Based on Image Processing", 2010 International Conference on Computer Application and System Modeling (ICCASM 2010).
- [4] Ms. Hemlata Sethi, "Bacterial Colony Counter : Manual Vs Automatic", IRACST Engineering Science and Technology An International Journal (ESTIJ)
- [5] Hong Men, Yujie Wu, Xiaoying Li, Zhen Kou, Shanrang Yang, "Counting Method of Heterotrophic Bacteria Based on Image Processing", IEEE 2008.
- [6] Meyer, Fernand, "Topographic distance and watershed lines," Signal Processing, Vol. 38, July 1994, pp. 113-125.
- [7] Shih-Hsuan Chiu, Jiun-Jian Liaw, "An effective voting method for circle detection," Pattern Recognition Letters, vol.26 no.2, pp.121-133.
- [8] J.M. Bowes, N. Suchowerska, D. R. McKenzie "Automated cell colony counting and analysis using the circular Hough image transform algorithm (CHITA)", Physics in Medicine and Biology 2008, vol. 53, no. 21, pp. 5991-6008.
- [9] Y.J. Zhang, "A survey on evaluation methods for image segmentation", Pattern Recognition 29 (8) (1996) 1335 - 1340

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Columns on Last Page Should Be Made As Close As

Possible to Equal Length

Authors' background

Your Name	Title*	Research Field	Personal website
Naphatsawan Vongmanee	Bachelor's degree	Image processing	-

*This form helps us to understand your paper better, **the form itself will not be published.**

*Title can be chosen from: master student, PhD candidate, assistant professor, lecturer, senior lecturer, associate professor, full professor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และได้นำเสนองานวิจัยในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 2019 International Conference on Advanced Bioinformatics and Biomedical Engineering (ICABB 2019) จัดขึ้นที่ Seoul ประเทศเกาหลีใต้ ระหว่างวันที่ 19-21 ธันวาคม 2562 และได้ตีพิมพ์ในวารสาร International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences 9IJPMB, ISSN: 2278-5221)

Discrimination colonies of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* by using Machine Learning

Manao Brinkum

Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Bangkok, Thailand
Email: 61601007@kmitl.ac.th

Sarinporn Vitsutapongse

Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Bangkok, Thailand
Email: sarinporn.vi@kmitl.ac.th

Abstract Discrimination of bacteria is necessary because bacteria are remarkably crucial as they can contaminate in many possible ways such as food, water, air or environment, and lead to pathogenesis. In recent times, the technique of discrimination and counting bacteria are not only have a large expenditure of time and funds, but the discrimination method also required an expert in field. According to above, this research introduces an algorithm to solve those problems by using *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* as a pilot study. The stab technique to inoculated bacteria in Luria-Bertani agar (LB agar) plates, was used for providing a good detection. In addition, the image segmentation technique was invited to train the separate colony of each bacterium for machine learning algorithm. It took approximately 300 images of bacteria for training process. The algorithm had resulted in 98.75 % of accuracy in bacteria's colony counted and 98.12% in discriminated between *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* from stab technique. The algorithm had resulted in 33.61 % of accuracy in bacteria's colony counted and 41.73% in discriminated between *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* from spread technique.

Index Terms— Bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, webcam camera, machine learning algorithm

I. INTRODUCTION

These days, Bacteria are widely found in environment and some of them have a role in human's daily life. The bacteria can contaminate in food, water, air or soil. Some types of bacteria are pathogenic bacteria that cause many illnesses or diseases. The secretion or blood is used to find the bacterial or the cause of the diseases[1]. This research is focused on 2 bacteria including *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Salmonella enterica* (*S. enterica*).

S. aureus is gram-positive cocci in cluster. The colonies of *S. aureus* are round, convex and rather golden in some colonies. *S. aureus* is bacteria in human body that

usually found on the skin (skin flora) and nasal carrier. *S. aureus* has cell wall protein A, which has function to protect cell from white blood cell destruction. *S. aureus* has fibrinogen-binding protein for cell fixation. *Staphylococcus sp.* groups can secrete many toxins such as staphylococcal enterotoxin, toxic shock syndrome toxin1 (TSST-1), exfoliative toxin, cytolytic toxin and other enzymes. These toxins are the causes of food poisoning, watery diarrhea, feverish and red blood cell, white blood cell and epidermal layer destruction.

S. enterica is a rod-shaped and gram-negative. The colonies of *S. enterica* are round, convex and rather white. *S. enterica* can be found in gastrointestinal tract of mammals, poultry and reptiles. This bacterium is the lead of causes *Salmonella gastroenteritis*, enteric fever and *Salmonella septicemia* [2].

The common methods for bacteria characterization are selective media, differential media and biochemical test, but these techniques take quite a long time and cost a lot. Moreover, these techniques must be done by specialist in the step of bacteria characterization and bacteria counting.

Machine learnings are divided in two sub-topics, which are Supervised machine learning and Unsupervised machine learning. Unsupervised learning algorithm has not a required to train the data input and output by human. This algorithm will analyze data by itself and automatically find structure in data by extracting useful features and analyzing its structure. On the other hand, Supervised learning algorithm has required the train data (input and output) by human. The supervised algorithm will learn the relationship between input and output. The training will have completed when the algorithm has a desired accuracy rate [3]. Supervised learning algorithm has two main types; Classification and Regression. The Regression algorithm estimates function from the input to

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

numerical or continuous output, while the Classification algorithm estimates the function from the input to discrete or categorical output. In the Figure 1 shows the difference between classification that category output and regression that has continuous output [4].

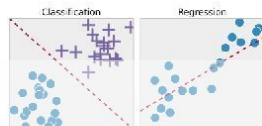


Figure 1. Show the difference between classification and Regression [4].

In this research, the samples of *S. aureus* and *S. enterica* on enriched media (Luria-Bertani; LB agar) plate were studied by using image segmentation and Classification algorithm of Machine Learning. The image segmentation is selected for detecting and counting colony of bacteria and Classification algorithm is chose for discrimination the bacteria colony on enriched media (Luria-Bertani; LB agar). For these reasons, this technic will decrease time spending on determination and bacteria counting.

II. METHODOLOGY

A. Bacteria

S. aureus and *S. enterica* were selected for the study in this research field. The colonies of both bacteria are round, convex and several color. The samples were inoculated on LB agar plate by using the stab technique to separate the single colony for clearly detection. Ten-fold serial-dilution methodology was used for determining the proper concentration of bacteria. The concentration between 10^8 to 10^{10} plaque forming unit (pfu) were counted by using image processing [5]. In this experiment, the concentration 10^7 were applied to spreading on LB agar plate because this concentration shows 30-50 bacterial colony on agar plate, by using visual inspection. All of the culture plates were cultivated at 37°C for 16 hours in incubator chamber. After that, the colonies result of *S. aureus* and *S. enterica* will appear on LB agar plate as show in Figure 2.

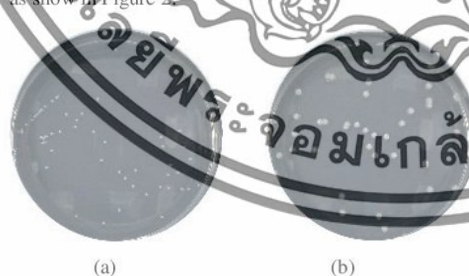


Figure 2. (a) Colonies of *S. aureus* concentration 10^7
(a) Colonies of *S. enterica* concentration 10^7

All of the culture plate samples were captured by using webcam camera, which has high quality glass lens, resolution 1920×1080 pixels and auto focus function. The distance between camera and plate must be fixed for the same size of image's colonies. The dark background was used for contradistinction with colonies of bacteria on culture plate.

B. Agar plate preparation

This research used the Luria-Bertani agar (LB agar) for culture bacteria. LB agar consists of 10 g. of peptone, 5 g. of yeast, 10 g. of sodium chloride, and 15 g. of agar powder for solution 1 Liter. The Erlenmeyer flask of mixed ingredient was set into autoclave for sterilization process. The plastic petri dish was prepared by aseptic technique in biosafety cabinet class II. The agar solution was poured in petri dish approximately 20 milliliters per plate then place the lid on the plate and left them to cooling for 30-60 minutes.

C. Image segmentation

The images of sample were detected by using edge detection feature. The feature edge detection was applied for finding the edge and frame of the colony. The feature edge detection consists of pixels with derivative values that exceed a certain threshold and measure the discontinuity of the grayscale [6].

The image segmentation was used with images of sample to simplify image analysis. The segment can represent the objects or part of objects, which contain a number of pixels. The image segmentation was sorted the pixels into larger components and cut-off the process of consider for each pixel as units of observation [3].

D. Training data

The images from the image segmentation part were gained in Classification algorithm of Machine Learning. The Classification algorithm was used with Logistic Regression Analysis (Binary Regression Analysis) for separate two groups of data. The trained data in algorithms called the training set. The training set is the material that the computer uses to learn how to process image or data. Machine learning algorithms is the same as the abilities of human brain to take many inputs and weigh them [8].

This research used the Classification for counting and discriminating bacteria. All sample of bacteria were trained in algorithm and defined the type of bacteria, then the model was exported from training.

III. EXPERIMENTAL AND RESULT

A. Sample of bacterial

First of all, stab *S. aureus* and *S. enterica* on LB agar 40 plates, each plate stab 15-20 times these are sample of controlling. Second, spread *S. aureus* and *S. enterica* concentration 10^7 on LB agar 20 plates, these are sample of testing. Next, all plates were incubated at 37°C for 16 hours. After 16 hours the colonies will appear on LB agar.

The result of stab technique shows the colonies of *S. aureus* are round, convex, golden, in the middle of colony,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and diameter about 3-4 millimeter as show in Figure 3 (a). The colonies of *S. enterica* are round, convex, white and diameter about 6-10 millimeter as show in Figure 3 (b).

The result of spread technique, the colonies of *S. aureus* are round, convex, rather light or dark yellow tone and 2 millimeter of diameter as show in Figure 3 (c). The colonies of *S. enterica* are round, convex, white and diameter about 5 millimeter as show in Figure 3 (d).

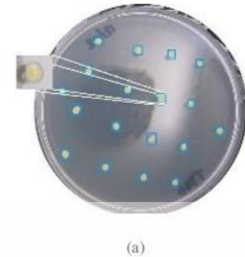


Figure 3. (a) show result of *S. aureus* controlling
(b) show result of *S. enterica* controlling
(c) show result of *S. aureus* testing
(d) show result of *S. enterica* testing

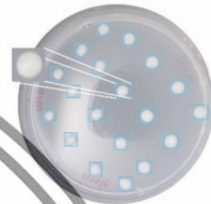
B. Image segmentation

After the image of bacteria has done in edge detection feature and image segmentation. The edge detection feature can detect edge of colonies and use image segmentation with the sample image of controlling.

The colonies of the stab technique sample *S. aureus* and *S. enterica* were detected by edge detection feature and frame by the image segmentation. The feature can detect all 18 colonies of *S. aureus* as show in Figure 4 (a), and the feature can detect all 19 colonies of *S. enterica* as show in Figure 4 (b).



(a)



(b)

Figure 4. (a) The result when use image segmentation with *S. aureus*
(b) The result when use image segmentation with *S. enterica*

C. Training data

The sample of controlling image of *S. aureus* and *S. enterica* from image segmentation was trained in machine learning algorithms. In this research used the keyword "T746" for *S. aureus* and "T2519" for *S. enterica*.

This research used the training set; 784 samples of *S. aureus* and 810 samples of *S. enterica* for training in algorithm. The example of the training set show in the Figure 5.



Figure 5. Show the training set of *S. aureus* and *S. enterica* that train in machine learning algorithm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

D. Evaluation

The untrained stab technique sample controlling image of *S. aureus* and *S. enterica* was captured for evaluate the accuracy of algorithm. The figure 6 (a) is the result of controlling image of *S. aureus* (T746). The algorithm can define type of bacteria and count the colonies of bacteria correctly. As the result, *S. aureus* (T746) sample, the algorithm-counted is 20 colonies while the eye-counted is 21 colonies, which can assume that the algorithm has a high accuracy performance.

The figure 6 (b) is the result of controlling image of the stab technique sample *S. enterica* (T2519) sample, there are 29 colonies by algorithm-counted while the eye-counted exist 29 colonies.



Figure 6. The result when test controlling image of *S. aureus* or T746 (a) and *S. enterica* or T2519 (b).

The algorithm can define type and count bacteria correctly when compare with human eye. The Figure 7 is the result of controlling image of the stab technique sample both of *S. aureus* and *S. enterica* in the same plate.

The Figure 7 (a) there are 23 colonies of *S. aureus* and 22 colonies of *S. enterica* by using this algorithm compare with 24 colonies of *S. aureus* and 22 colonies of *S. enterica* by using visibility of human eye.

The Figure 7 (b) there are 21 colonies of *S. aureus* and 19 colonies of *S. enterica* by using this algorithm compare with 21 colonies of *S. aureus* and 19 colonies of *S. enterica* by using visibility of human eye.

The Figure 7 (c) there are 20 colonies of *S. aureus* and 17 colonies of *S. enterica* by using this algorithm compare with 21 colonies of *S. aureus* and 17 colonies of *S. enterica* by using visibility of human eye.

The Figure 7 (d) there are 21 colonies of *S. aureus* and 15 colonies of *S. enterica* by using this algorithm compare with 20 colonies of *S. aureus* and 16 colonies of *S. enterica* by using visibility of human eye.



Figure 7. (a), (b), (c) and (d) are the results when test controlling image of *S. aureus* or T746 and *S. enterica* or T2519 in the same plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The evidence indicated that the accuracy of counting colony of bacteria is 98.75% and the types discrimination of bacteria is approximately 98.12%.

Alternatively, in practical, the captured of the spread technique sample images of *S. aureus* and *S. enterica* in the same plate for algorithm testing as shows in the figure 8. It illustrated the discriminates of two bacteria precisely. Nevertheless, in the counting process, there are 28 colonies of *S. aureus* and 53 colonies of *S. enterica*, whereas there are 33 colonies of *S. aureus* and 127 colonies of *S. enterica* by using visibility of human eye. Thus, the accuracy of algorithm in counted is 33.61 % and the discrimination accuracy is 41.73%.



Figure 8. The result when test using image of *S. aureus* of T746 and *S. enterica* of T2519 in the same plate.

IV. CONCLUSION AND DISCUSSION

The main aim of this research is to create algorithm that can discriminate the sample of bacteria (*S. aureus* and *S. enterica*) with a high accuracy. The outcome of this research can reduce time, for discrimination type of bacteria, and budget, for hiring the experts to analyse the bacteria result. The result in part of controlling image counted, the colonies of bacteria and has an accuracy at 98.75 %; also, the part of discriminating by using controlling image give an accuracy at 98.12 %. However, in testing, the testing image has low accuracy than the control. The accuracy of testing image for the Classification algorithm in counted is 33.61 % and discriminated is 41.73%. As a consequence, the error occurred because there has a lot of connecting colonies, low quality of image, for each picture has difference the concentration of light. For this reason, the improve of the aggregated and connecting colonies by dilute the solution concentration, or select an appropriate method to spread plate for more clearly single colony of bacteria are

planning for future work. Furthermore, the camera specification would be change for good quality of image, and select more accurate algorithm to apply in part segmentation image for the good detection colonies. Also, this research can be a prototype for another bacteria discrimination.

ACKNOWLEDGMENT

We were acknowledged, and overwhelming supported by our respected professor and Mr. Nuttanan Wantuk, staff from Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMUTL). This work was supported by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Research Fund [grant number: KREF016012]

REFERENCES

- [1] Asst. Prof. Dr. Pimphen Phonchalermpong et.al, "Sources of microorganisms contaminated in food", issue 12 July 2019, Available: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3222>
- [2] อิศรา อมาตยกุล และ วิชาญ พงษ์พานิช, 2553, "แบบฝึกหัดทางภาษา", Number of 1990 copies, Type 2, Bangkok, สำนักพิมพ์เนชั่นบุ๊คส์ จำกัด
- [3] Isha Sahian, "Super Vize Me: What's the Difference Between Supervised, Unsupervised, Semi Supervised and Reinforcement Learning", issue 12 July 2019, Available: <https://blogs.nvidia.com/blog/2018/08/02/supervised-unsupervised-learning/>
- [4] Dr. Michael J. Garbade, Regression Versus Classification Machine Learning, What's the Difference ?, issue 12 July 2019, Available: <https://medium.com/quick-code/regression-versus-classification-machine-learning-what's-the-difference-345c56dd1517>
- [5] Naphatsawan Vongpancee et al., "An Automated Colony Counter for Serial Dilution Culture Method," ICBBT '18 Proceedings of the 2018 10th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Technology, ACM New York, NY, USA, ©2018 ISBN: 978-1-4503-6366-2 doi>10.1145/3232059.3232074, pp. 42- 45.
- [6] J. G. A. Barbedo, "A Review on Methods for Automatic Counting of Objects in Digital Images", IEEE Latin America Transaction, volume: 10, Issue 5 Sep, 2012, pp. 2112-2124.
- [7] "Image Segmentation in Deep Learning: Methods and Application", issue 20 July 2019, Available: <https://missinglink.ai/guides/neural-network-concepts/image-segmentation-deep-learning-methods-applications/>
- [8] "Training Data", issue 20 July 2019, Available: <https://www.techopedia.com/definition/33181/training-data>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บันทึกการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเลขที่ KREF016012 ตั้งแต่วันที่ 1/01/61 ถึงวันที่ 31/10/62

แหล่งทุน: กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ : การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวอุปกรณ์ทางการแพทย์ด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์

ชื่อหัวหน้าโครงการ: ดร. สนิทพร วิบูลย์ธาทอง

ว/ด/ป	รายการ	เลขที่อ้างอิง	รายการรับ - จ่าย			รายการรับ	รายการจ่าย					รวมรายจ่าย	
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	ดอกเบี้ย	งบบุคลากร	งบดำเนินงาน					งบลงทุน
							ค่าจ้างชั่วคราว	ค่าตอบแทน	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ	ค่าสาธารณูปโภค	ค่าครุภัณฑ์	
	งบประมาณที่ได้รับอนุมัติ (ตามแผน)		480,000.00										
7 ก.พ. 18	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 1)		168,000.00										
28 ก.พ. 18	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 2)		168,000.00										
	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 3)		144,000.00										
	หัก ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 1)		161,020.12	6,979.88					88,700.00	70,020.12	2,300.00		161,020.12
	หัก ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 2)		175,816.55	(8,016.07)					129,500.00	45,726.55	500.00		175,816.55
	หัก ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 3)												
	งบประมาณคงเหลือ		480,000.00		143,163.33	0.00							-
	รายละเอียดค่าใช้จ่าย												-
ครั้งที่ 1													-
1 ก.พ. 18	ค่าเดินทางไปเก็บตัวอย่างเชื้อโรคนอกรั้วทาง การแพทย์ที่โรงพยาบาล								2,000.00				2,000.00
1 มี.ค. 18	ค่าจ้างเหมาในการเก็บตัวอย่างเชื้อโรคนอกรั้วทาง การแพทย์								5,200.00				5,200.00
6 พ.ค. 18	อุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการถ่ายภาพและเก็บข้อมูลภาพโคโสม เชื้อโรคชนิดต่างๆจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ	#18099600113								31,426.00			36,426.00
6 พ.ค. 18	อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการทำความสะอาดพื้นที่ของการ ปฏิบัติงานกับเชื้อโรคต่างๆ	#0902006747								355.00			36,781.00
10 พ.ค. 18	ค่าวิเคราะห์ข้อมูลทาง Physical test ของเชื้อโรค								10,000.00				46,781.00
18 พ.ค. 18	ค่าที่พักในการมาเสนอผลงานวิจัยที่งาน CBBT 2018								5,000.00				60,781.00
20 มิ.ย. 18	อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับเชื้อโรคชนิดต่างๆ	TH0102727								4,865.00			65,646.00
15 มิ.ย. 18	อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และวัสดุสำหรับจัดทำแผนการ ถ่ายภาพแบบปลอดเชื้อ									12,000.00			77,646.00
25 มิ.ย. 18	อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำอาหารเลี้ยงเชื้อ	#761-02-704								12,658.10			90,304.10
25 มิ.ย. 18	อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำอาหารเลี้ยงเชื้อ	VI61-17139								2,040.00			92,344.10
15 ก.ค. 18	ค่าจ้างในการเลี้ยงและดูแลเลี้ยงอาหารและจัดเก็บ จุลินทรีย์ตามตารางเวลา								5,000.00				97,344.10

บันทึกการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเลขที่ KREF016012 ตั้งแต่วันที่ 1/01/61 ถึงวันที่ 31/10/62

แหล่งทุน: กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ : การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวอุปกรณ์ทางการแพทย์ด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์

ชื่อหัวหน้าโครงการ: ดร. สันติพร วิไลสุทธาภางค์

ว/ด/ป	รายการ	เลขที่อ้างอิง	รายการรับ - จ่าย			รายการจ่าย					งบลงทุน	รวมรายการจ่าย
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	ดอกเบี้ย	งบบุคลากร	งบดำเนินงาน				
						ค่าจ้างชั่วคราว	ค่าตอบแทน	ค่าวัสดุ	ค่าสาธารณูปโภค	ค่าครุภัณฑ์		
20 ส.ค. 18	ค่าจ้างเหมาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆและวิเคราะห์คุณภาพด้วยวิธี Sterile technique							7,000.00				104,344.10
20 ส.ค. 18	ค่าจ้างในการวิเคราะห์ข้อมูลของเชื้อด้วยวิธี Dilution method และ Biochemical test							12,000.00				116,344.10
15 ก.ย. 18	ค่าจ้างในการถ่ายรูปเชื้อโรคด้วยเครื่องมือเฉพาะและใช้วิธี Aseptic technique							10,000.00				126,344.10
10 ต.ค. 18	ค่าสารเคมี	INV6102251						1,926.00				128,270.10
12 ต.ค. 18	ค่าสารเคมี	INV6102251						1,000.00				129,270.10
7 พ.ย. 18	ค่าอุปกรณ์สำนักงาน	SI1811026323						1,830.00				131,100.10
13 พ.ย. 18	ค่าสารเคมี	KS1811-0198						2,400.00				133,500.10
7 ธ.ค. 18	ค่าเดินทางด้วยรถยนต์ส่วนตัวไป-กลับ (ศาลายา-ลาดกระบัง) ในระยะเวลา 01/2561-12/2561							16,000.00				149,500.10
12 ธ.ค. 18	ค่าจ้างในการกำจัดขยะติดเชื้อ							3,500.00				153,000.10
20 ธ.ค. 18	ค่าจ้างจัดส่งเอกสารต่างๆทางไปรษณีย์								300.00			153,300.10
24 ธ.ค. 18	ค่าถ่ายเอกสารและค่าเช่าแฟ้ม								1,500.00			154,800.10
25 ธ.ค. 18	ค่าทำรายงาน							5,000.00				160,000.10
25 ธ.ค. 18	ค่าบำรุงรักษาอุปกรณ์ภายในห้องแลปรวมทั้งค่าทำความสะอาด							1,000.00				161,000.10
	รวมครั้งที่ 1							88,700.00	70,020.12	2,300.00	-	161,020.12
	ครั้งที่ 2											
11 ม.ค. 19	อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และวัสดุสำหรับจัดทำแผนการถ่ายภาพแบบปลอดเชื้อ							1,385.00				1,385.00
14 ม.ค. 19	อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และวัสดุสำหรับจัดทำแผนการถ่ายภาพแบบปลอดเชื้อ							1,680.00				3,065.00
2 ก.พ. 19	ค่าจ้างเหมาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆและวิเคราะห์คุณภาพด้วยวิธี Sterile technique							7,000.00				10,065.00
10 ก.พ. 19	ค่าอุปกรณ์, สารเคมี							11,122.65				21,187.65
21 ก.พ. 19	อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และวัสดุสำหรับจัดทำแผนการถ่ายภาพแบบปลอดเชื้อ							415.00				21,602.65

บันทึกการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเลขที่ KREF016012 ตั้งแต่วันที่ 1/01/61 ถึงวันที่ 31/10/62

แหล่งทุน: กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ : การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวอุปกรณ์ทางการแพทย์ด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์

ชื่อหัวหน้าโครงการ : ดร. สรณพร วิไลสุทธาพงศ์

ว/ด/ป	รายการ	เลขที่อ้างอิง	รายการรับ - จ่าย					รายการจ่าย					รวมรายการจ่าย
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	ดอกเบี้ย	งบบุคลากร	งบดำเนินงาน				งบลงทุน	
							ค่าจ้างชั่วคราว	ค่าตอบแทน	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ	ค่าสาธารณูปโภค	ค่าครุภัณฑ์	
15 มี.ค. 19	อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และวัสดุสำหรับจัดทำแผนการถ่ายภาพแบบปลอดเชื้อ									640.00			22,242.65
31 มี.ค. 19	อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และวัสดุสำหรับจัดทำแผนการถ่ายภาพแบบปลอดเชื้อ									1,605.00			23,847.65
7 เม.ย. 19	อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และวัสดุสำหรับจัดทำแผนการถ่ายภาพแบบปลอดเชื้อ									870.00			24,717.65
6 พ.ค. 19	ค่าจ้างพัฒนาการสร้าง software วิเคราะห์ภาพด้วยการทำ image processing								40,000.00				64,717.65
6 มิ.ย. 19	ค่าจ้างพัฒนาวิเคราะห์ข้อมูลเชื้อที่ได้ทางสถิติ								5,000.00				69,717.65
5 ก.ค. 19	ค่าจ้างพัฒนาวิเคราะห์ database								8,000.00				77,717.65
12 ก.ค. 19	ค่าอุปกรณ์, สารเคมี								7,955.45				85,673.10
15 ก.ค. 19	ค่าจ้างพัฒนาทำจัดขยะติดเชื้อ								2,000.00				87,673.10
14 ส.ค. 19	อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และวัสดุสำหรับจัดทำแผนการถ่ายภาพแบบปลอดเชื้อ									1,290.00			88,963.10
15 ส.ค. 19	ค่าบำรุงรักษาอุปกรณ์ภายในห้องแลปรวมทั้งค่าทำความสะอาด								1,000.00				89,963.10
20 ส.ค. 19	ค่าใช้จ่ายในการเข้าร่วมประชุมวิชาการนานาชาติ								30,000.00				119,963.10
27 ส.ค. 19	ค่าอุปกรณ์, สารเคมี									840.00			120,803.10
27 ส.ค. 19	ค่าจ้างในการถ่ายรูปเชื้อโรคด้วยเครื่องมือเฉพาะและใช้วิธี Aseptic technique								9,000.00				129,803.10
27 ส.ค. 19	อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และวัสดุสำหรับจัดทำแผนการถ่ายภาพแบบปลอดเชื้อ									1,250.00			131,053.10
29 ส.ค. 19	อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และวัสดุสำหรับจัดทำแผนการถ่ายภาพแบบปลอดเชื้อ									591.00			131,644.10
30 ส.ค. 19	อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และวัสดุสำหรับจัดทำแผนการถ่ายภาพแบบปลอดเชื้อ									975.45			132,619.55
6 ก.ย. 19	อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และวัสดุสำหรับจัดทำแผนการถ่ายภาพแบบปลอดเชื้อ									2,980.00			135,599.55

บันทึกการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเลขที่ KREF016012 ตั้งแต่วันที่ 1/01/61 ถึงวันที่ 31/10/62

แหล่งทุน: กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ : การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่พบบนพื้นผิวอุปกรณ์ทางการแพทย์ด้วยโปรแกรมทางคอมพิวเตอร์

ชื่อหัวหน้าโครงการ: ดร. สรณพร วิไลสุทธางค์

ว/ศ/ป	รายการ	เลขที่อ้างอิง	รายการรับ - จ่าย			รายการรับ	รายการจ่าย					รวมรายการจ่าย
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	ค่าตอบแทน	งบดำเนินงาน	งบลงทุน	งบดำเนินงาน	งบลงทุน	งบดำเนินงาน	
						ค่าจ้างชั่วคราว	ค่าตอบแทน	ค่าวัสดุ	ค่าวัสดุ	ค่าวัสดุ	ค่าวัสดุ	
27 ต.ค. 62	อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และวัสดุสำหรับจัดทำแผนการถ่ายภาพแบบปลอดเชื้อ							6,090.00				141,689.55
28 ต.ค. 19	อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์และวัสดุสำหรับจัดทำแผนการถ่ายภาพแบบปลอดเชื้อ							6,000.00				147,689.55
28 ต.ค. 19	ค่าอุปกรณ์สำนักงาน							127.00				147,816.55
30 ต.ค. 19	ค่าใช้จ่ายในการเข้าร่วมประชุมวิชาการนานาชาติ							7,000.00				154,816.55
30 ต.ค. 19	ค่าเดินทางไป กลับห้องแล็บที่สาขาสยา							16,000.00				170,816.55
30 ต.ค. 19	ค่าจัดส่งไปรษณีย์									500.00		171,316.55
30 ต.ค. 19	ค่าเอกสารและเช่าเล่ม							500.00				172,816.55
30 ต.ค. 19	ค่าจ้างทำรายงานเอกสาร							3,000.00				175,816.55
	รวมครั้งที่ 2							129,500.00	45,816.55	500.00		175,816.55

ลงชื่อหัวหน้าโครงการ

15/11/62

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล, ผศ.ดร. สรินพร วิสิฐสัทธาพงศ์.....

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	(Biology)	มหาวิทยาลัยมหิดล	2547
M.Sc.	(Molecular genetics and genetic engineering) (international program)	Mahidol university	2550
Ph.D.	(Medical technology) (international program)	Mahidol university	2557

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

.....Molecular biology, Genetic engineering, Microbiology, Medical technique, Protein structure.....

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2550	ทุนพัฒนาเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา	สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2560	ทุนวิจัยเริ่มต้นสำหรับอาจารย์ใหม่	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2561	ทุนวิจัยอาจารย์ใหม่	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2561	ทุนวิจัยเงินรายได้คณะวิศวกรรมศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2562	ทุนวิจัยเงินรายได้คณะวิศวกรรมศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

1. Single-reversal charge in the $\beta 10$ - $\beta 11$ receptor-binding loop of *Bacillus thuringiensis* Cry4Aa and Cry4Ba toxins reflects their different toxicity against *Culex* spp. Larvae, *Biochemical and biophysical research communications*, 450 (2014) 948-952
- 2 Smart wheelchair based on eye tracking. Wanluk N. Visitsattapongse, S. Juhong, A. Pintavirooj, C., *Biomedical Engineering International Conference 2016*, Laos.
3. Study of ECG variation in daily activity, Study of ECG variation in daily activity Samona Y.; Pintavirooj C. and Visitsattapongse S., 2017 10th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON2017), Hokkaido, Japan, August 31-Septempber 2, 2017
4. Dynamic foot plantar measurement platform using optical sensors, Nampeng J., Visitsattapongse S. and Pintavirooj C., 2017 10th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON2017), Hokkaido, Japan, August 31-Septempber 2, 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Embedded Photographic Tomography, Fong-on C., Visitsattapongse S. and Pintavirooj C., International Workshop on Advanced Image Technology (IWAIT 2018), Chiang Mai, Thailand, January 7-9, 2018.

6. An Automated colony counter for serial-dilution culture method, Vongmanee N., Bunmak A. and Visitsattapongse S., 10th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Technology (ICBBT 2018), Amsterdam, Netherlands, May 16-18, 2018.

7. Instructional media human anatomy and physiology using virtual, Euasukaree J. and Visitsattapongse S., Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 2018

การเสนอผลงานวิชาการ

ผลงานตีพิมพ์, สิ่งประดิษฐ์, งานสร้างสรรค์ (ศิลปะ หรือ อื่นๆ)

อื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้