เครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น
An Automated colony counter for serial-dilution culture method

นภัสวรรณ วงษ์มณี
Naphatsawan Vongmanee
อรจิรา บุญมาก
Aonjira Bunmak

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์
คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

เครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น

An Automated Colony Counter for Serial-Dilution Culture Method

นภัสวรรณ วงษ์มณี

Naphatsawan Vongmanee

อรจิรา บุญมาก

Aonjira Bunmak

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์

คณะวิศวกรรมศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2560

เครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น

An Automated Colony Counter for Serial-Dilution Culture Method

โดย

นภัสวรรณ วงษ์มณี
อรจิรา บุญมาก

อาจารย์ที่ปรึกษา
ดร. สรินพร วิสิฐสัทธาพงศ์

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์
คณะวิศวกรรมศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

ปริญญานิพนธ์	ปีการศึกษา 2560
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวการแพทย์
คณะ	วิศวกรรมศาสตร์
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เรื่อง	เครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น
	An Automated Colony Counter for Serial-Dilution Culture Method
ผู้จัดทำ	นางสาวนภัสวรรณ วงษ์มณี รหัสประจำตัว 57010658
	นางสาวอรจิรา บุญมาก รหัสประจำตัว 57011490

รายงานนี้ผ่านการตรวจโดยอาจารย์ที่ปรึกษาแล้ว

ลงชื่อ_____

(ดร. สรินพร วิสิฐสัทธาพงศ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ปริญญานิพนธ์	เครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น
นักศึกษา	นางสาวนภัสวรรณ วงษ์มณี รหัสประจำตัว 57010658
	นางสาวอรจิรา บุญมาก รหัสประจำตัว 57011490
ปริญญา	วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมชีวการแพทย์
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์	ดร. สรินพร วิสิฐสัทธาพงศ์

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการตรวจนับโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการเจือจางตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น สามารถตรวจนับได้โดยผู้เชี่ยวชาญหรือผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับด้านสาขาจุลชีววิทยา โดยสามารถตรวจนับได้จากการนับจำนวนโคโลนีด้วยตาเปล่าเฉพาะที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียไม่หนาแน่นที่สามารถมองแยกเห็นเป็นโคโลนีเดี่ยวได้ ทำให้บางครั้งผู้ปฏิบัติการเกิดอาการล้าของสายตาเนื่องจากใช้สายตาเป็นเวลานานในการนับจำนวนโคโลนี ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดอันตรายต่อดวงตาได้ ดังนั้นปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเทคนิคการประมวลผลภาพเพื่อทำการตรวจนับโคโลนีหลังจากทำการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น โดยทำการคิดค้นออกแบบโปรแกรมในการตรวจนับจำนวนโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เทคนิคการประมวลผลภาพในการตรวจนับ ซึ่งสามารถทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีได้ตั้งแต่ระดับความเข้มข้นสูงที่สามารถมองเห็นเป็นโคโลนีที่มีการเชื่อมต่อติดกันจนถึงระดับความเข้มข้นต่ำที่สามารถมองเห็นแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวได้ โดยโปรแกรมที่ทำการออกแบบจะสามารถมีความถูกต้อง แม่นยำ มากที่สุดในช่วงกำลังของระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียที่สามารถเห็นแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวได้ด้วยตาเปล่า โดยใช้หลักการในการตรวจนับวงกลมโดยกำหนดรัศมีสูงสุดและรัศมีต่ำสุดในการตรวจนับโคโลนี และในส่วนของโคโลนีที่มีลักษณะเชื่อมต่อติดกันจะใช้เทคนิคการประมวลผลภาพในการแยกส่วนของภาพเพื่อทำการแยกส่วนของโคโลนีที่อยู่ติดกัน ทำให้โปรแกรมสามารถตรวจนับจำนวนโคโลนีได้ทั้งในส่วนของโคโลนีเดี่ยวและโคโลนีที่มีการเชื่อมต่อติดกันกันที่ปะปนอยู่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้มีความสะดวก รวดเร็ว และสามารถนับจำนวนโคโลนีได้ในความเข้มข้นที่สูงขึ้น ทำให้ประหยัดเวลาในการทำงานและช่วยลดอาการล้าสายตาในการตรวจนับจำนวนโคโลนีต่อผู้ใช้งานได้

Project Title	An Automated colony counter for serial-dilution culture method
Student	Miss Naphatsawan Vongmanee Student ID 57010658
	Miss Aonjira Bunmak Student ID 57011490
Degree	Bachelor of Engineering
Program	Biomedical Engineering
Year	2017
Thesis Advisor	Dr. Sarinporn Visitsattapongse

Abstracts

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. This thesis designs the portable device for evaluating number of bacterial colonies on solid culture media. For software system, this portable device has an analytical program based on digital image processing. First process the captured image by using webcam camera is converted to binary image by using automatic thresholding technique. The circular Hough transform is applied to determine the region of interest of the colony on the culture media. Image labeling is then used to detect the unconnected colonies which are then further counted to determine the number of microorganism colonies. For the connected colonies, a watershed segmentation schemes are proposed to detect the boundaries of the each colony in the connected colonies. The image processing is performed on the Python with Raspberry Pi for processing with capturing, thresholding, circular Hough transform, watershed segmentation and displaying results number of colonies on culture media.

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.สรินพร วิสิฐสัทธาพงศ์ และ รศ.ดร.ชูชาติ ปิณฑวิรุจน์ ซึ่งเป็นผู้ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในการทำปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้ ซึ่งท่านทั้งสองได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆที่เป็นประโยชน์ในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นอย่างยิ่ง อีกทั้งยังช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างการดำเนินงาน และขอขอบคุณคณาจารย์และบุคลากรในภาควิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์ทุกท่านที่ช่วยสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทำปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้ และขอขอบคุณรุ่นพี่วิศวกรรมชีวการแพทย์รุ่นที่ 2 เพื่อน วิศวกรรมชีวการแพทย์รุ่นที่ 3 ที่ช่วยให้คำแนะนำให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือในการทำปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ซึ่งเปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาในภาควิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์แห่งนี้ ตลอดจนคอยช่วยเหลือและให้กำลังใจผู้เรียนเสมอมาและขอขอบพระคุณสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะวิศวกรรมศาสตร์ สาขาวิศวกรรมชีวการแพทย์ที่ได้ให้โอกาสศึกษาหาความรู้ในการจัดทำปริญญานิพนธ์เล่มนี้ได้อย่างประสบความสำเร็จ

คณะผู้จัดทำ

นภัสวรรณ วงษ์มณี

อรจิรา บุญมาก

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ I

กิตติกรรมประกาศ II

สารบัญ III

สารบัญตาราง VI

สารบัญรูป VII

บทที่1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 1

1.3 ขอบเขตการวิจัย 1

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

1.5 แผนการดำเนินงาน 2

บทที่2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 จุลชีววิทยา 4

2.2 แบคทีเรีย 6

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 8

2.4 วิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 9

2.5 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 11

2.6 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 13

2.7 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 15

2.8 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 16

2.9 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย 18

2.10 การประมวลผลภาพดิจิตอล 18

2.10.1 ระบบสี RGB 19

2.10.2 ระบบสี Gray scale 20

2.10.3 การแปลงระบบสี RGB เป็นระบบสี Gray scale 20

2.10.4 Threshold 20

2.10.5 จุด centroid 21

2.11 Circular Hough Transform 23

2.12 Edge Detection 26

2.13 Watershed Transform 27
2.14 Raspberry Pi 29
บทที่3 การออกแบบและการดำเนินงาน 33
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ 33
3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการ 33
3.1.2 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการสร้างเครื่องตรวจนับโคโลนี 34
3.2 ขั้นตอนวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น 34
3.2.1 ทำการความสะอาดและฆ่าเชื้อของอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ 34
3.2.2 เก็บเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม 35
3.2.3 การเพิ่มจำนวนของเชื้อด้วยวิธี Inoculation 35
3.2.4 การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ 35
3.2.5 การเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น 36
3.2.6 การนำเชื้อมากระจายบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ 36
3.2.7 การบ่มเชื้อจุลินทรีย์ 37
3.3 ขั้นตอนการออกแบบโปรแกรมการแสดงผล 37
3.3.1 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ 38
3.3.2 ออกแบบโปรแกรมตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น 38
3.4 ขั้นตอนการออกแบบและสร้างเครื่องเครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือ จางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น 41
3.4.1 การออกแบบโครงสร้าง 41
บทที่4 ผลการทดลอง 42
4.1 ผลการเก็บเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม 42
4.2 ผลการขีดเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 42
4.3 ผลการทำ Ten-fold Serial dilution 43
4.4 ผลการทำ Circular Hough transform ในการตรวจจับโคโลนี 45
4.5 ผลการทำ Watershed segmentation ในการแยกโคโลนี 45
4.6 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนี 46
4.7 ตารางแสดงผลการตรวจนับโคโลนีด้วยโปรแกรมเทียบกับนับด้วยตาเปล่า 48
4.8 ผลการออกแบบเครื่องตรวจนับโคโลนีอย่างง่าย 48
บทที่5 สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง 49
5.1 สรุปผลการทดลอง 49
5.2 ปัญหาและแนวทางการแก้ไข 49

5.3 แนวทางการพัฒนา.....50
บรรณานุกรม 51
ภาคผนวก.....52

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 แผนการดำเนินงาน....2
4.1 ผลการทำ Ten fold Serial dilution....43
4.1 ผลการทำ Ten fold Serial dilution(ต่อ)....44
4.2 ผลการทำ Watershed segmentation ในการตรวจจับโคโลนี....45
4.3 ผลการทำ Watershed segmentation ในการแยกโคโลนี....45
4.3 ผลการทำ Watershed segmentation ในการแยกโคโลนี(ต่อ)....46
4.4 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีในโปรแกรม Python....46
4.4 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีในโปรแกรม Python(ต่อ)....47
4.5 ผลการตรวจนับโคโลนีด้วยโปรแกรมเทียบกับนับด้วยตาเปล่า....48

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แบคทีเรีย 4
2.2 ยีสต์ 4
2.3 รา 5
2.4 สาหร่าย 5
2.5 โพรโตซัว 5
2.6 โครงสร้างของไวรัส 6
2.7 รูปร่างของแบคทีเรียประเภทต่างๆ 6
2.8 โครงสร้างของแบคทีเรีย 7
2.9 การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ 10
2.10 การทำให้เชื้อกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 10
2.11 วิธีการเจือจางเชื้อจุลินทรีย์ 11
2.12 วิธีการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ 11
2.13 ลักษณะการเจริญกระจายตัวของแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 11
2.14 ลักษณะกราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 12
2.15 พิกัดของระบบภาพดิจิตัล 19
2.16 ระบบสีRGB 19
2.17 ระบบสี Gray scale 20
2.18 ภาพในระบบสี Grayscale 20
2.19 ภาพที่แบ่ง threshold 20
2.20 Centroid ของ Region ที่มีรูปร่างต่างๆ 21
2.21 Area ของ Region เท่ากับ 9 pixel 21
2.22 Perimeter ของ Region เท่ากับ 8 pixel 22
2.23 Major Axis และ Minor Axis 22
2.24 Compactness ของ Region 23
2.25 Bounding Box และ Minimal Bounding Box ของ Region 23
2.26 ตัวอย่างการตรวจจับวัตถุรูปวงกลม 25
2.27 ตัวอย่างการตรวจจับของภาพแบบ Prewitt 27
2.28 การประมวลผลภาพเกรย์สเกลจะใช้ในการแบ่งแยกวัตถุในภาพโดยใช้หลักการเดียวกับอ่างเก็บน้ำ 28

2.29 ภาพเมื่อกำหนดให้ค่าสูงขึ้นก็จะคลุมพื้นที่ได้มากขึ้นและจะใช้แบ่งแต่ละพื้นที่ออกจากกัน28
2.30 อุปกรณ์ที่ใช้ในการติดตั้ง Raspberry Pi 29
2.31 ภาพดาวห์โหลด NOOBS Image File 30
2.32 ภาพดาวห์โหลด NOOBS แบบ Network Install only 30
2.33 ภาพดาวห์โหลด SDFormatter 31
2.34 หน้าต่างที่ได้จาการ Format 31
2.35 หน้าต่างที่ได้จาการแตกไฟล์ NOOBS 32
3.1 แสดงบล็อกไดอะแกรมของเครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น ..33
3.2 วิธีการ Sterile technique 34
3.3 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (LB broth) 35
3.4 ขั้นตอนการขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ 35
3.5 ขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น 36
3.6 ขั้นตอนการนำเชื้อมากระจายบนผิวของอาหารแข็ง 36
3.7 การบ่มเชื้อจุลินทรีย์ในตู้บ่มเชื้อ 37
3.8 บล็อกไดอะแกรมของโปรแกรมในการตรวจนับจำนวนโคโลนี 37
3.9 ตัวอย่างภาพโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโต 38
3.10 ภาพที่ได้จากการบันทึกภาพ 38
3.11 ภาพRGB 39
3.12 ภาพ Grayscale 39
3.13 ภาพแปลงภาพระดับสีเทาให้เป็นขาว-ดำ 39
3.14 ภาพผลลัพธ์ที่ได้จากการตรวจจับโคโลนี 40
3.15 หลักการแบ่งส่วนของภาพ watershed 40
3.16 ภาพผลลัพธ์ที่ได้จากกระบวนการ Watershed Transform 40
3.17 ต้นแบบของเครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น 41
4.1 ผลการเก็บเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม 42
4.2 ผลการขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ 42
4.3 ส่วนประกอบของเครื่องตรวจนับโคโลนีอย่างง่าย 48

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์หลังจากการทำการเจือจางตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น สามารถตรวจนับได้ด้วยวิธีการทางห้องปฏิบัติการ (Microbiology) โดยผู้ปฏิบัติการจะต้องมีความรู้ ความเชี่ยวชาญ เป็นอย่างมากเพื่อทำการนับจำนวนโคโลนีได้อย่างแม่นยำ หากผู้ปฏิบัติการไม่มีความรู้ความเชี่ยวชาญทางชีววิทยามากพอ อาจทำให้การนับจำนวนโคโลนีมีผลผิดพลาดได้ นอกจากนั้นในการให้ผู้ปฏิบัติการหรือบุคลากรในองค์กรทำการตรวจนับโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยตาเปล่า อาจทำให้เกิดความล่าช้าในการดำเนินการได้ อีกทั้งยังก่อให้เกิดอาการล้าของสายตา ทำให้มีอาการปวดตาเมื่อทำการตรวจนับโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยตาเปล่าเป็นเวลานาน ซึ่งสามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อดวงตาได้และการใช้คนทำอาจจะเกิดerrorได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดในการออกแบบโปรแกรมในการตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย โดยใช้กระบวนการประมวลผลภาพในการตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงทำการออกแบบเครื่องตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่ายให้เหมาะสมต่อการใช้งานของผู้ใช้งาน ทำให้ผู้ใช้งานสามารถทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีได้รวดเร็วมากยิ่งขึ้นด้วยโปรแกรมตรวจนับโคโลนีที่ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบเพื่อช่วยลดอาการเมื่อยล้าสายตาของผู้ปฏิบัติการจากการนับจำนวนโคโลนีด้วยตาเปล่าได้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ออกแบบโปรแกรมในการตรวจนับจำนวนโคโลนีด้วยวิธีการประมวลผลภาพ

1.2.2 ออกแบบเครื่องตรวจนับจำนวนโคโลนีอย่างง่ายให้เหมาะสมต่อผู้ใช้งาน

1.3 ขอบเขตการวิจัย

เครื่องตรวจนับจำนวนโคโลนีที่สามารถทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยทำการถ่ายภาพแบบ Real time จากกล้องเว็บแคม และนำภาพมาการประมวลผลภาพเพื่อนับจำนวนโคโลนีและแสดงผลผ่านหน้าจอ Raspberry pi และทำการออกแบบหน้าต่างผู้ใช้งานอย่างง่ายให้เหมาะสมต่อการใช้งานเครื่องตรวจนับโคโลนี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ความรู้เกี่ยวกับโปรแกรมและขั้นตอนในการกระบวนการประมวลผลการทำงานของโปรแกรมการตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์

1.4.2 ความรู้ความสามารถเกี่ยวกับวิธีการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการเจือจางจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นในห้องปฏิบัติการ

1.4.3 เครื่องตรวจนับโคโลนีใช้งานได้จริงในห้องปฏิบัติการทางชีววิทยา

1.5 แผนการดำเนินงาน

การดำเนินงานเริ่มต้นจากช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ.2560 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ.2561 โดยแผนการดำเนินงานแสดงในตารางที่1.1 แผนการดำเนินงาน

ตารางที่ 1.1 แผนการดำเนินงาน

แผนการดำเนินงาน	สิงหาคม				กันยายน				ตุลาคม				พฤศจิกายน			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1. ศึกษาข้อมูลพื้นฐานงานวิจัย 1.1 วิธีการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ 1.2 การประมวลผลเชื้อจุลินทรีย์โดยกระบวนการ Image processing																
2. ออกแบบโปรแกรมการตรวจจับเชื้อจุลินทรีย์ ส่วนของซอฟแวร์และฮาร์ดแวร์ และจัดซื้ออุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย																
3. ติดตั้งโปรแกรม ส่วนของซอฟแวร์																
4. ทำเครื่องตรวจจับเชื้อจุลินทรีย์																
5. ทดลองเขียนโปรแกรมใช้งาน																
6. ศึกษาวิธีการใช้งานเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการ																
7. ทำอาหารเลี้ยงเชื้อ																
8. ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อนำมาเป็นตัวอย่างในการนำมาประมวลผล																

9. ทดสอบการใช้งานของโปรแกรมในการการประมวลผลภาพของเชื้อจุลินทรีย์																
10. เก็บผลการทดสอบการใช้งานของโปรแกรมในการการประมวลผลภาพของเชื้อจุลินทรีย์																
11. ปรับปรุงข้อผิดพลาดในโปรแกรม																
12. ทำรูปเล่มรายงานการวิจัยบทที่ 1-3																

แผนการดำเนินงาน	มกราคม				กุมภาพันธ์				มีนาคม				เมษายน			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
14. เขียนโปรแกรมเพื่อให้นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์กระบวนการ Image processing																
16. ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ																
17. เก็บภาพเชื้อจุลินทรีย์เพื่อนำมาประมวลผล																
18. ทดสอบการใช้โปรแกรม																
19. ปรับปรุงแก้ไขข้อผิดพลาดในโปรแกรม																
20.ปรับปรุงโครงสร้างของเครื่องตรวจจับเชื้อให้เหมาะสมกับการใช้งาน																
21. เก็บผลการทดสอบการใช้งานของโปรแกรมในการการประมวลผลภาพของเชื้อจุลินทรีย์																
22. ทำรูปเล่มรายงานการวิจัยบทที่ 4-5																

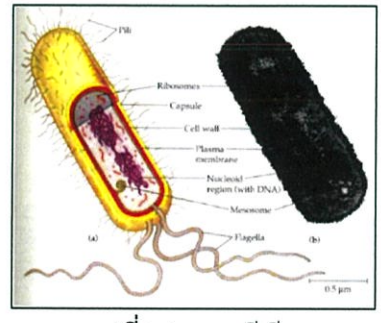
บทที่ 2

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 จุลชีววิทยา (Microbiology) [1]

คือ การศึกษาเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถมองไม่เห็นได้ด้วยตาเปล่าซึ่งเรียกว่าจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย โปรโตซัว ไวรัส เชื้อรา ยีสต์ และสาหร่าย เป็นต้น ประเภทของจุลินทรีย์ มีอยู่ 5 ประเภท ได้แก่

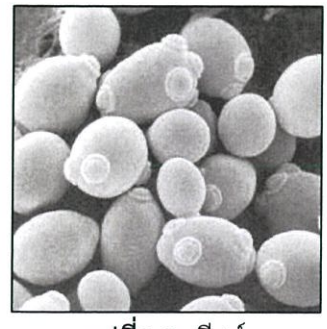
1. แบคทีเรีย (Bacteria) คือ จุลินทรีย์ที่เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว ที่เป็นเซลล์แบบโปรแคริโอต (prokaryotic cell) พบทั่วไปในธรรมชาติ ดิน น้ำ อากาศ (ฝุ่นละออง)



รูปที่2.1 แบคทีเรีย

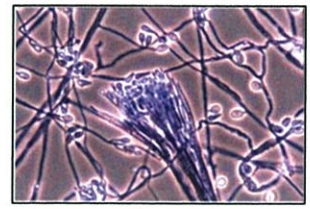
(ที่มา : http://anonmicrobiology.blogspot.com,2556)

2. ฟังไจ (Fungi) ประกอบด้วย รา (mold) เห็ด (Mushroom) และยีสต์ (Yeast) ลักษณะเซลล์เป็นแบบ Eukaryotic cell มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ไม่มีคลอโรฟิลล์ ดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เน่าเปื่อย ผนังเซลล์เป็นสารไคตินกับเซลลูโลส มีทั้งเซลล์เดียวและเป็นเส้นใยเล็ก เรียกว่า ไฮฟา (Hypha) รวมกลุ่ม เรียกว่าขยุ้มรา (mycelium)



รูปที่2.2 ยีสต์

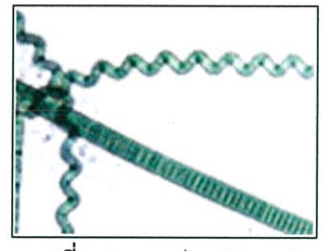
(ที่มา : http://anonmicrobiology.blogspot.com,2556)



รูปที่2.3 รา

(ที่มา : http://anonmicrobiology.blogspot.com,2556)

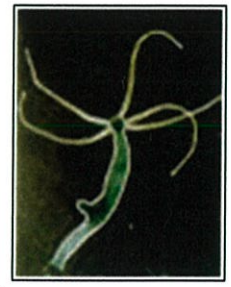
3. สาหร่าย หมายถึง พืชชั้นต่ำที่มีคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) มีขนาดเล็กมากตั้งแต่เซลล์เดียว ต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จนถึงขนาดใหญ่มีลักษณะคล้ายกับพืชชั้นสูงแต่ไม่มีส่วนของราก ลำต้น ใบ ที่แท้จริง



รูปที่2.4 สาหร่าย(algae)

(ที่มา : http://anonmicrobiology.blogspot.com,2556)

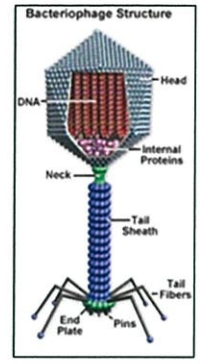
4. โพรโตซัว (Protozoa) เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวขนาดเล็กที่จัดได้ว่ามีความสำคัญมากในระบบนิเวศ สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งน้ำจืด และน้ำเค็ม รวมทั้งบริเวณที่ชื้นแฉะ ยังพบว่าอาศัยอยู่ในร่างกายของสัตว์บกอีกหลายชนิด มีทั้งที่เป็นโทษและมีประโยชน์ โพรโทซัวนั้นมีทั้งที่สามารถสร้างอาหารได้เอง เช่น พวกที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้ซึ่งมักจะสีเขียวของคลอโรฟิลล์ และพวกไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ การเพิ่มขึ้นของโพรโทซัวอย่างรวดเร็วจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ red tide ซึ่งเป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำบริเวณนั้น ความเป็นพิษเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม และถูกขับออกมาละลายอยู่ในน้ำ โดยพิษจะมีผลให้สัตว์น้ำเป็นอัมพาต



รูปที่2.5 โพรโตซัว(Protozoa)

(ที่มา : http://anonmicrobiology.blogspot.com,2556)

5. ไวรัส (Virus) เป็นอนุภาคขนาดเล็กมากไม่มีองค์ประกอบของเซลล์ สามารถมองเห็นได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนประกอบไปด้วยโปรตีนและสารพันธุกรรม เพิ่มจำนวนได้ในสิ่งมีชีวิตเท่านั้น

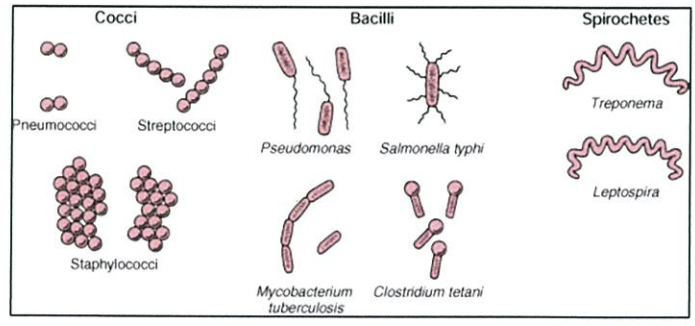


รูปที่ 2.6 โครงสร้างของไวรัส(virus)

(ที่มา : http://anonmicrobiology.blogspot.com,2556)

2.2 แบคทีเรีย (Bacteria)

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



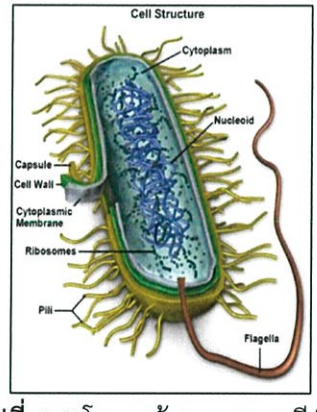
รูปที่ 2.7 รูปร่างของแบคทีเรียประเภทต่างๆ

(ที่มา : http://www.foodnetworksolution.com, ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.นิธิยา รัตนาปนนท์)

- บาซิลลัส (bacillus) มีรูปร่าง เป็นท่อน หรือเป็นแท่ง
  เช่น Bacillus, Clostridium, Pseudomonas , Salmonella
- สเตรปโทบาซิลลัส(Streptobacillus) เมื่อแบ่งเซลล์แล้วเรียงตัวต่อเป็นสายยาว
- ท่อนโค้ง (curverod) เช่น Vibrio
- ทรงกลมหรือค็อกคัส (cocus) เช่น
- ไมโครค็อกคัส (Micrococcus) เป็นแบคทีเรีย เซลล์เดี่ยวขนาดเล็ก
- ดิโพค็อกคัส (Diplococcus) เมื่อแบ่งเซลล์แล้วติดกันเป็นคู่
- สเตรปโทค็อกคัส (Streptococcus) แบ่งตัว เรียงตัวเป็นสายยาว เหมือนโซ่
- สเตรฟิโลค็อกคัส (Staphylococcus) เป็นลักษณะของ เซลทรงกลมแบ่งตัวหลายระนาบอยู่ติดกัน เป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น เช่น *Staphylococcus aureus*
- สไปโรคีท (Spirochete) รูปร่างบิดเป็นเกลียว ผนังเซลล์ยืดหยุ่นได้ เช่น *Campylobacter jejuni*

การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย

แบคทีเรียขยายพันธุ์โดยการแบ่งตัวแบบทวิภาค (binary fission) คือแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเซลล์เท่าๆกัน ระยะเวลาการแบ่งเซลล์เรียกว่า generation time ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะใช้เวลาไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและสภาพแวดล้อม



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของแบคทีเรีย

(ที่มา : http://anonmicrobiology.blogspot.com,2556)

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% ประจุสารอนินทรีย์ตัวกลางต่างๆของกระบวนการเมตาโบลิสซึ่ม DNA granule (สะสมสารอาหาร โปรตีน) ไรโบโซม

3. Ribosomes เป็นเม็ดเล็กๆขนาด 15-20 nm กระจายทั่วไปอิสระในเซลล์ประกอบด้วย RNA 60-90% โปรตีน 10-40% จำนวนขึ้นกับความต้องการสร้างโปรตีน

4. Nucleoid ประกอบด้วย DNA เส้นเดี่ยวหรือคู่ปลายสองข้างเชื่อมกัน ยาวประมาณ 500 เท่าของเซลล์ DNA ของแบคทีเรียอยู่ในนิวคลีออยด์หรือ bacterial chromosome

5. Cell wall (ผนังเซลล์) ผนังเซลล์เป็นส่วนประกอบเซลล์ที่อยู่ระหว่างแคปซูลและเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียทุกชนิดยกเว้น mycoplasma มีโครงสร้างนี้ ซึ่งหน้าที่ที่สำคัญของผนังเซลล์ คือ ช่วยให้เซลล์คงรูปไว้ป้องกันและรักษา ความดันภายในเซลล์ เป็น precursor ในขบวนการสังเคราะห์สารต่างๆ เป็นต้น

6. Capsules ลักษณะเป็นวุ้นรูปร่างไม่แน่นอนไม่ติดสีแกรม ความหนาแตกต่างกันตามชนิดแบคทีเรีย

7. Pili ยาวกว่า fimbriae จำนวนน้อยกว่ามีส่วนร่วมในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในแบคทีเรีย โดยอาศัย F-pili (sex pili) ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของสารพันธุกรรมจาก donor ไป receptor และมีคุณสมบัติเป็น antigen ส่วน Fimbriae มีลักษณะเป็นขนละเอียดเล็กๆ จำนวนมาก ไม่มีหน้าที่ในการเคลื่อนที่แต่มีหลักฐานว่าช่วยให้แบคทีเรีย เกาะติดกับผิว

8. Flagella ลักษณะเป็นเส้นยาวคล้ายเส้นด้าย ความยาว 1-70 ไมโครเมตร ยื่นออกมานอกผนังเซลล์มีในแบคทีเรีย spiral เกือบทั้งหมด

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial culture medium)

ในการศึกษาเรื่องแบคทีเรียทางห้องปฏิบัติการมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียภายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้น โดยมีการควบคุมสภาวะของการเพาะเลี้ยงให้เป็นไปตามธรรมชาติของแบคทีเรียแต่ละชนิดให้มากที่สุดดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเรียนรู้ความต้องการต่างๆของแบคทีเรียตามธรรมชาติ และนำมาศึกษาถึงวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียภายในห้องปฏิบัติการ ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรีย แบคทีเรียต้องการสารอาหารเพื่อให้ในการเจริญเติบโตดังต่อไปนี้

1.พลังงาน (Energy)

- แหล่งพลังงานจากแสง แบคทีเรียที่ได้พลังงานจากแสงเรียกว่า Phototroph
- แหล่งพลังงานจากกระบวนการออกซิเดชั่น (Oxidation) ของสารเคมีแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากกระบวนการออกซิเดชั่นเรียก Chemotroph

2. แหล่งคาร์บอน (Carbon Sources) แหล่งคาร์บอนอยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และสารอินทรีย์แบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารในรูปของสารอนินทรีย์ สามารถเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์เป็น

คาร์โบไฮเดรต เรียกว่า Autotroph ถ้าได้พลังงานจากแสงอาทิตย์ด้วย เรียกว่า Photoautotroph ถ้าได้พลังงานจากการออกซิเดชั่นของสารเคมีด้วย เรียกว่า Chemoautotroph ส่วนแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารในรูปของ สารอินทรีย์ เรียกว่า Heterotroph

3. แหล่งของอิเล็กตรอน (Electron Sources) แบคทีเรียต้องการอิเล็กตรอนเพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม พวกที่ใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งอิเล็กตรอน เรียกว่า Lithotroph ส่วนพวกที่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอิเล็กตรอน เรียกว่า Organotroph

4. แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen sources) มีทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ แหล่งที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ โปรตีน แหล่งที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น เกลือไนไตรท์ ไนเตรต หรือแอมโมเนียม

5. แหล่งของออกซิเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส ออกซิเจนได้มาจากหลายแหล่ง เช่น น้ำ และสารอาหาร แหล่งของซัลเฟอร์อาจอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ ซัลเฟอร์มีความจำเป็นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด แหล่งของฟอสเฟตอาจอยู่ในรูปของฟอสเฟตที่เป็นองค์ประกอบของกรด นิวคลีอิค นิวคลีโอไทด์ ฟอสโฟลิปิด กรดไทโคอิก และสารอื่น ๆ

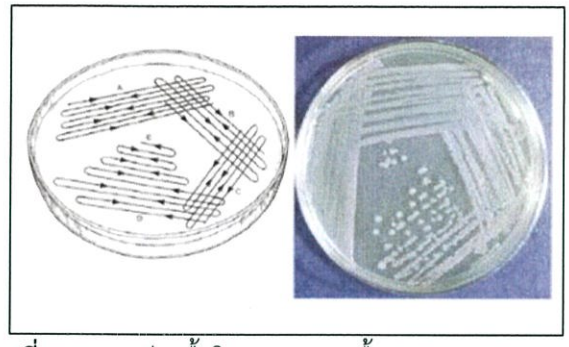
6. ไอออนของโลหะหนัก ไอออนของโลหะหนักมีความจำเป็นต่อการเจริญตามปรกติของแบคทีเรีย เช่น K+, Mg2+, Ca2+, Fe 2+ เป็นต้น ซึ่งบางชนิดจัดเป็น Co facter ที่สำคัญของเอนไซม์ต่าง ๆ

7. วิตามิน แบคทีเรียต้องการวิตามินในปริมาณน้อย แต่วิตามินมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตและการเจริญเติบโตมาก โดยทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่างๆ แบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.4 วิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่ทำเพื่อต้องการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เรียกว่า Pure Culture ซึ่งหมายถึงกลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ หรืออาจทำเพื่อต้องการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (Colony count) ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

1. การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Streak Plate) คือ การทำให้เชื้อที่มีปริมาณมากค่อยๆ กระจายออกจนแยกเป็นโคโลนี (Colony) เดี่ยวๆ ซึ่งแต่ละโคโลนีจะเจริญมาจากเซลล์เดี่ยวจึงถือเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ลนไฟจนร้อนแดงและทิ้งตัวให้เย็นจากนั้นแตะที่เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ โดยนำมาขีดบนอาหารวุ้นแข็ง ลากเป็นแนว 4 ทิศ เชื้อจุลินทรีย์จะเกิดการแยกกันของเซลล์จากปริมาณหนาแน่นจะเหลือน้อยละจนสามารถแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆได้

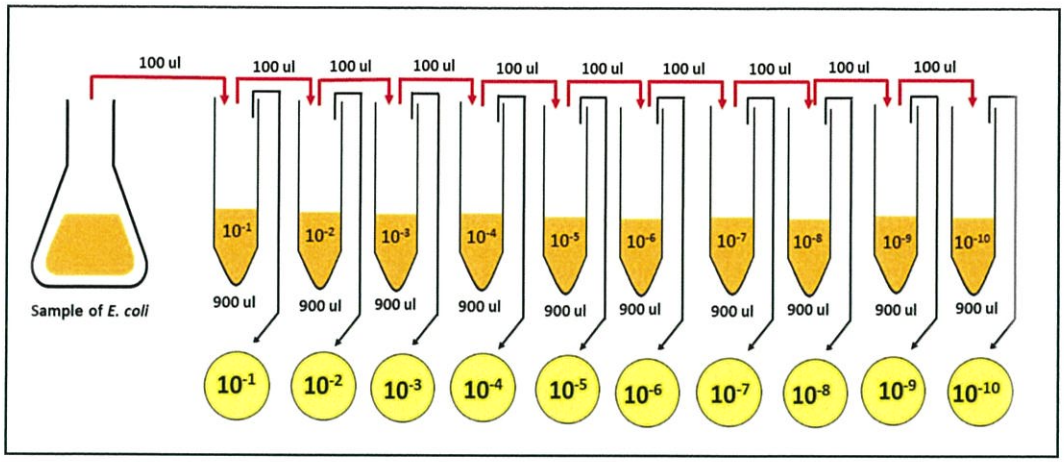


รูปที่ 2.9 การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Streak Plate)
(ที่มา : www.micro.vet.chula.ac.th)

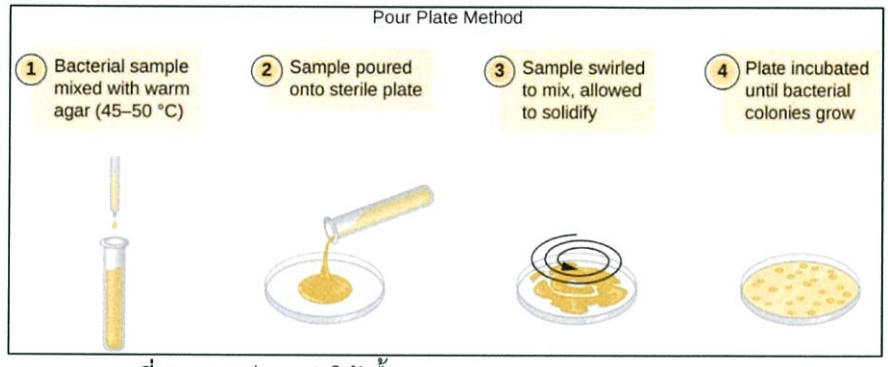
2. การทำให้เชื้อกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Spread Plate) คือ การใช้แท่งแก้วงอที่ทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธีเผาไฟแล้ว เกลี่ยเชื้อที่ทำเป็นสารละลายใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นการทำให้เซลล์แยกออกจากกัน หลังจากนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาสเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เชื้อจะแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ทำให้เชื้อแยกเป็นโคโลนีที่บริสุทธิ์เพื่อการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย

รูปที่ 2.10 การทำให้เชื้อกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Spread Plate)
(ที่มา : www.micro.vet.chula.ac.th)

3. การทำให้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์โดยวิธีเทเพลท (Pour-plate Technique) คือ การเทอาหารวุ้นที่หลอมเหลวแล้วผสมเข้ากับเชื้อในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้อาหารแข็งที่อุณหภูมิประมาณ 45 °C เชื้อที่จะนำมาผสมจะต้องทำการละลายในสารละลาย แล้วทำให้เจือจางลงตามลำดับ (Serial dilution) ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการเจือจางที่เรียกว่า Ten-fold Dilution จากนั้นนำเชื้อที่ละลายแล้วจากแต่ละหลอดมาเทผสม เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อและแกว่งจานเพาะเชื้อเบาๆ เพื่อให้เชื้อกระจายตัวแล้วรอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งดีแล้วจึงนำไปบ่ม (Incubate) ที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมวิธีนี้ส่วนใหญ่เพื่อต้องการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียเช่นเดียวกันกับวิธี Spread plate



รูปที่ 2.11 วิธีการเจือจางเชื้อจุลินทรีย์ (Ten-fold Dilution)

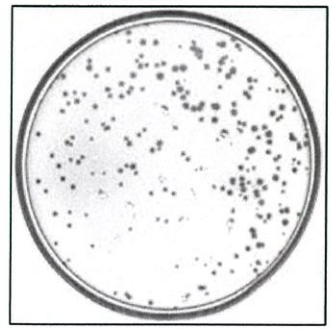


รูปที่ 2.12 วิธีการทำให้เชื้อบริสุทธิ (Pour-plate Technique)

(ที่มา : www.micro.vet.chula.ac.th)

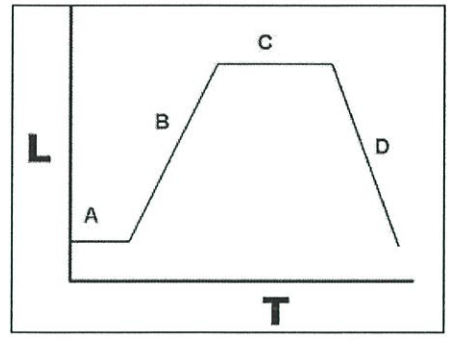
2.5 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำแบคทีเรียใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจะมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นโดยเมื่อนำจำนวนแบคทีเรียที่ได้ในระยะเวลาต่างๆ นำมาเขียนกราฟโดยเทียบกับระยะเวลาจะสามารถได้กราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แบ่งเป็น 4 ระยะ ดังนี้



รูปที่ 2.13 ลักษณะการเจริญกระจายตัวของแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

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



รูปที่ 2.14 ลักษณะกราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย
(ที่มา:http://www.thaieditorial.com/บทความวิชาการ)

1. Lag phase (A) เป็นระยะที่ใส่แบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นระยะที่แบคทีเรียจะปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ จำนวนแบคทีเรียยังไม่เพิ่มขึ้นเพราะยังไม่มีการแบ่งเซลล์ แต่เซลล์จะมีความว่องไวและสังเคราะห์โพรโทพลาซึมใหม่ รวมทั้งเอนไซม์ โคเอนไซม์ DNA RNA เพื่อให้เพียงพอต่อกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ เป็นช่วงที่แบคทีเรียมีกิจกรรมทางสรีรวิทยาสูง ขนาดของเซลล์จะเพิ่มขึ้น ส่วนใหญ่เป็นการเพิ่มความยาวและมีการเพิ่มโปรตีนและน้ำหนักแห้งด้วย ตอนปลายของระยะนี้แบคทีเรียจะแบ่งตัว แต่เนื่องจากแบคทีเรียทุกตัวไม่ได้มีการแบ่งตัวพร้อมกัน ดังนั้นจำนวนประชากรจะค่อยๆเพิ่มขึ้น ความยาวของระยะ lag phase จะยาวนานเพียงใดขึ้นกับสภาพแวดล้อมและชนิดของเชื้อแบคทีเรีย เช่น ถ้านำแบคทีเรียที่เลี้ยงอาหารชนิดหนึ่งไปเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเดิม ระยะ lagphase จะสั้น แต่ถ้าเชื้อนั้นมีความผิดปกติหรือเป็นเชื้อที่เก็บไว้นาน จะต้องใช้ระยะเวลานานในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่

2. Logarithmic phase หรือ Exponential phase หรือระยะ Log phase (B) เป็นระยะที่แบคทีเรียมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ คือ การแบ่งเซลล์แต่ละครั้งจะใช้เวลาเท่าๆกัน โดยระยะนี้จะมีอัตราการเจริญมากที่สุด เซลล์มีความว่องไวที่สุด สารอาหารจะถูกนำไปใช้อย่างมากและรวดเร็ว การแบ่งเซลล์จะสัมพันธ์กับการสังเคราะห์โพรโทพลาซึมและกิจกรรมทางเคมีของแบคทีเรีย จำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า จึงทำให้ลักษณะของ curve เป็น exponential

3. Stationary phase (C) เป็นระยะที่แบคทีเรียมีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวน กล่าวคือคือ ถึงแม้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นแต่จะเท่ากับอัตราการตาย ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารมีจำนวนไม่เพียงพอและอาจมีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย

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

2.6 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Bacteria Culture Media Components)

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบธรรมดา (Basic nutrient Media)

1. Peptones คือโปรตีนซึ่งถูกย่อยแล้วเป็น Amino acid และ Simple Nitrogenous conpounds โดยใช้กรด-ด่างหรือเอ็นไซม์ คุณสมบัติของ peptones จะขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของคุณภาพโปรตีนที่ใช้และวิธีการย่อยโปรตีน (ด้วยกรด-ด่างหรือเอ็นไซม์) การย่อยด้วยกรดหรือด่างจะทำลายวิตามินและ Amino acids บางส่วนในโปรตีนไป ซึ่งผิดกับการย่อยด้วยเอ็นไซม์โปรตีนซึ่งใช้ในการผลิต Peptones มีหลายชนิด เช่น Casein (โปรตีนในน้ำนม) Gelatin (โปรตีนในเนื้อ ถั่วเหลือง) และYeast cells เป็นต้น Peptones เป็นส่วนประกอบหลักใหญ่ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียต้องการมากสำหรับการเจริญเติบโต

2. Infusion และ Extracts เป็นสารสะกัดจากเซลล์ต่างๆ ทั้งจากจุลชีพ (เช่น Yeast Extract ซึ่งความเป็นจริงถือว่าเป็น Peptone ชนิดหนึ่ง) เนื้อเยื่อจากพืช เช่น Malt Extract และจากสตว์ เช่น Beef Extract Brain- Heart infusion เป็นสิ่งที่ใช้แทน Peptones ก่อนที่จะมีการคิดค้นการผลิต Peptones ขึ้นมาใช้งานซึ่งในปัจจุบันก็ยังคงใช้อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด Infusion และ extract นี้เป็นสารสกัดซึ่งมีส่วนประกอบไม่แน่นอนและไม่ชัดเจนโดยเป็นสารผสมระหว่างโปรตีน Polypeptides, aminoacids คาร์โบไฮเดรต รวมถึงวิตามิน และ Growth factors หลายชนิด

3. Solidifying agents เป็นสารซึ่งใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้อาหารชนิดนั้นๆ แข็งตัวและกลายเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งสารพวกนี้ได้แก่ วุ้น (Agar), Gelatin, Silica gel และ Polyacrylic (Rhodophyceae) โดยวุ้นที่ดีควรสะอาดและปราศจากฝุ่นผงต่างๆ ละลายที่ 80 °C เมื่อเตรียมวุ้นความเข้มข้น 2% ในน้ำ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วทิ้งให้แข็งตัวสิ่งที่ได้ควรจะใสหรือหากขุ่นก็เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

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 ใช้เพื่อทำให้ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในรูปของสารละลายที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้โดยส่วนใหญ่จะใช้น้ำกลั่น (distilled water)

8. Selective agent เป็นสารเคมีที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้แบคทีเรียบางชนิด สามารถเจริญเติบโตได้เท่านั้นโดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆจะถูกยับยั้งไม่ให้เจริญการใส่ selective agent ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้จะมีประโยชน์ในการแยกเชื้อซึ่งเป็นตัวก่อโรคออกจากเชื้อที่ไม่ก่อโรค 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) ก็สามารถใช้เป็น Selective Character ของอาหารเลี้ยงเชื้อได้

9. Reducing agent เป็นสารเคมีซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยส่งเสริมให้เกิดภาวะไร้ออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีขึ้นสารเหล่านี้ได้แก่ ascobic acid, sodium thioglycolate, sodium formaldehyde sulfoxylate, thiomalic acid, sodium hydrosulfite, และcysteine

10. เลือด ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อพวกEnriched 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 แบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพโดยใส่ในรูปของเลือดม้าที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (lysed horse blood)
- เลือดคน ซึ่งหมดอายุแล้วจากคลังเลือดเป็นเลือดที่ใช้มากที่สุดเพราะหาง่าย ราคาถูก แต่อาจมีผลเสียจากcitrate, antimicrobial agents และสารอื่นๆ ที่อยู่ในเลือดซึ่งอาจทำให้แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญได้หรือให้ปฏิกิริยา hemolysis ที่ผิดจากความเป็นจริง

2.7 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 อาหารที่มีการเติมวุ้นปริมาณน้อยลงไป ประมาณ 0.5 % เพื่อประโยชน์บางอย่าง เช่น ประโยชน์ในการทดสอบคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย

2.แบ่งตามคุณสมบัติของคุณค่าทางอาหารและ Selective Agents ที่เติมลงไป แบ่งได้เป็น

2.1 Chemical Defined Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งทราบชนิดและปริมาณที่แน่นอนของสารเคมีที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นๆ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ไม่เป็นที่นิยมใช้ในงานทั่วไป แต่มักใช้ในงานวิจัยที่ ต้องการความละเอียดแน่นอนมากเป็นพิเศษ

2.2 Plain Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารมากพอสมควรสามารถใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียส่วนมากได้ ซึ่งรวมถึงแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้ได้แก่ Nutrient Broth, Nutrient agar เป็นต้น

2.3 Enriched Media เป็นอาหารที่ใช้เฉพาะกับแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงยาก (Fastidious bacteria) เนื่องจากไม่เจริญในอาหารธรรมดาเลยหรือเจริญยากอาหารชนิดนี้ต้องเติมสารอาหารพิเศษหรือ Growth Facter บางอย่างลงไป เช่น เลือด ซีรั่ม ไข่น้ำจากช่องท้อง (Ascitic Fluid) หรือสารที่สกัดจากเนื้อเนื่องของสัตว์ เป็นต้น เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น Blood Agar และ Chocolate Agar เป็นต้น

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

2.5 Selective Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อแยกจุลินทรีย์ที่ต้องการออกจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและปะปนอยู่โดยการเติมสารเคมีบางอย่างซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการโดยไม่มีผลเสียต่อแบคทีเรียที่ต้องการ เช่น การเติมสี Crystal Violet Brilliant Greenและเกลือน้ำดี (bile salt) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบหรือการเติมยาปฏิชีวนะบางชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการตัวอย่างของSelective 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 เป็นอาหารวุ้นที่เติมเลือดถ้าแบคทีเรียนั้นย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ (Hemolysis) จะเกิดบริเวณใส (Clear Zone) ขึ้นรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรียLactose broth ใช้แยก

2.7 Differentialและ Selective media มีอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นทั้ง Differential mediaและSelective Media คือยอมให้แบคทีเรียบางชนิดเจริญได้แต่ไม่ยอมให้แบคทีเรียชนิดอื่นๆเจริญและในขณะเดียวกันก็ยังสามารถแยกชนิดของแบคทีเรียที่เจริญอยู่นั้นได้

ด้วย เช่น Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) agar ซึ่งยอมให้แบคทีเรียพวก Vibrio เท่านั้นที่เจริญได้และยังสามารถแยก Vibrio ชนิดที่ใช้ Sucrose และไม่ใช้ Sucrose ออกจากกันได้ โดยดูจากสีของโคโลนีหรือ Xylose lysine Dexoxycholate Agar(XLD) ที่ใช้แยกแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถใช้และไม่ใช้แลคโตสออกจากกันได้ โดยถ้าแบคทีเรียใช้แลคโตสได้โคโลนีจะมีสีเหลือง ถ้าใช้แลคโตสไม่ได้โคโลนีจะมีสีชมพู และถ้าเป็นแบคทีเรียบางชนิด เช่น Salmonella จะมีลักษณะเฉพาะบน XLD คือ โคโลนีจะมีสีชมพูใสและมจมีจุดสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H2S) อยู่ตรงกลาง เป็นต้น

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

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

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

2.11 อาหารที่ใช้เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ (Maintenance Media) ใช้เพื่อเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียไว้ให้นานที่สุดโดยเชื้อยังมีคุณสมบัติเหมือนเดิม จึงมีการลดองค์ประกอบบางอย่างในอาหารเพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตน้อยลงและปลดปล่อยของเสียออกมาน้อยลง เช่น ลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสให้น้อยลง เนื่องจากนน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทำให้สร้างกรดได้มากและทำให้เชื้อตายเร็วไม่มีคาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีน แต่จะประกอบด้วยเกลือแร่ต่างๆ หลายชนิดเพื่อรักษาความเป็นกรด – ด่าง ตลอดจน Oxidation Reduction Potential และความชื้นให้คงที่ เช่น Stuart's transport medium, Cary – Blair transport medium เป็นต้น Transport Media นิยมใช้ในกรณีที่ไม่สามารถนำสิ่งส่งตรวจจากสัตว์ป่วยมาเพาะเลี้ยงเพื่อแยกเชื้อได้ทันที

2.8 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Preparation of the Culture Media)

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

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

เนื่องจากเป็นน้ำที่ปราศจากคลอรีน (Chlorine) สารเคมีและไอออนของโลหะหนักต่างๆ (Heavy metal ions) ที่อาจยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อควรเตรียมในภาชนะที่มีปริมาตรมากกว่าปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการเตรียมประมาณ 2 เท่า เพื่อความสะดวกในการผสมและป้องกันฟองที่เกิดจากการต้มอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. ทำให้ Dehydrated media ละลายถ้าเป็น Dehydrated media ที่ผสมวุ้นมาด้วยทำให้ละลายได้โดยการนำไปต้มและคนด้วยแท่งแก้วตลอดเวลาหรืออาจใช้วิธีวางไว้บน Hot plate ที่เป็นระบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer system) โดยใส่แท่งแม่เหล็กลงไปใน Flask ด้วยแต่ถ้าเป็น Dehydrated media ที่ไม่ผสมวุ้นลงไป 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. หลังจากฆ่าเชื้อเสร็จเรียบร้อยนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 50 – 56°C ใน Water bath ก่อนนำไปเทลง Plate หรือ Tube อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม Agar จะแข็งตัวที่ 42°C อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร สามารถนำไปเทลง Plate ได้ประมาณ 70 – 100 Plates

7. สารบางชนิดที่จะต้องเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะไม่สามารถทนความร้อนในการต้มหรือการ Autoclave ได้ ดังนั้นจะต้องเติมสารเหล่านั้นในขั้นตอนหลังจากนี้ โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงประมาณ 50–56 °C ก่อน แต่สารเหล่านี้จะต้องเป็นสารที่ปราศจากเชื้อ เช่น ถ้าเป็นเลือดก็ต้องเป็นเลือดที่เก็บมาโดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique)

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

9. นำไปเทลงใน Plate หรือ Tube

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

2.9 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย (Maintenance of Bacteria)

เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์มักมีการเก็บรักษาไว้เพื่อให้มีชีวิตอยู่นานๆ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาวิจัย การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์มีหลายวิธี ได้แก่

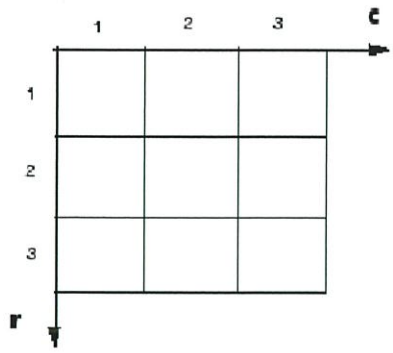
1. การถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่ (Subculturing Method) คือ เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์จะเก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Maintenance media ระยะเวลาหนึ่ง แล้วจึงเปลี่ยนอาหารใหม่ ระยะเวลาในการเปลี่ยนอาหารขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ซึ่งอาจเก็บไว้ได้หลายสัปดาห์หรือหลายเดือน นอกจากนี้ยังเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำเพื่อให้เชื้อหยุดการเจริญเติบโต การเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีการถ่ายเชื้อใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เรื่อยๆนี้มีข้อเสีย คือ อาจทำให้เชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสายพันธุ์ได้ คือ เกิดการกลายพันธุ์หรือการผ่าเหล่า

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

- การทำให้แห้งและเย็นเยือกแข็ง (Lyophilization) คือ การทำให้เชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ส่วนใหญ่ใช้ Skim milk) แห้งโดยเร็วในสภาพที่เย็นจัดจนแข็ง (Freeze - dry) อุณหภูมิประมาณ – 60 ° C ถึง –78 ° C ในหลอดแก้วขนาดเล็ก และทำให้เกิดสภาพสูญญากาศภายในหลอด แล้วปิดปากหลอดโดยการลนไฟ วิธีการนี้สามารถเก็บเชื้อแบคทีเรียไว้ได้นานมากโดยคุณสมบัติของเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง แต่เสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง
- การเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำ คือ การเก็บเชื้อไว้ในที่ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น ในไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ –196 ° C โดยนำเชื้อที่ใส่ในสารละลายที่สามารถปกป้องเชื้อจากการเปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บด้วยวิธีนี้ (จากผลึกน้ำแข็ง) เช่น กลีเซอรอลหรือDimethyl sulfoxide, DMSO แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลววิธีนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ได้นานมาก ประมาณ 10 – 30 ปี โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติและยังสามารถเก็บรักษาเชื้อที่ไม่สามารถทำการเก็บด้วยวิธี Lyophilization ได้ด้วยแต่จะเสียค่าใช้จ่ายมากเนื่องจากต้องมีการเติมไนโตรเจนเหลวเป็นระยะ ๆ

2.10 การประมวลผลภาพดิจิตอล [2]

การประมวลผลภาพดิจิตอลเกี่ยวข้องกับการแปลงข้อมูลภาพให้อยู่ในรูปแบบข้อมูลดิจิตอล เพื่อที่จะนำเอาข้อมูลนี้ไปผ่านกระบวนการต่างๆด้วยคอมพิวเตอร์ได้ ซึ่งการทำงานของคอมพิวเตอร์ระบบการรับข้อมูลเข้า-ออกจะอยู่ในรูปแบบดิจิตอลเท่านั้น เมื่อระบบได้รับข้อมูลภาพเข้าไปแล้วจะทำการคำนวณและส่งออกมาเป็นข้อมูลที่ใช้แทนข้อมูลภาพดิจิตอลเหล่านั้น การเก็บข้อมูลภาพลงหน่วยความทรงจำของคอมพิวเตอร์สามารถทำได้โดยการจองหน่วยความจำของเครื่องไว้ในรูปของตัวแปรarray ดังรูปที่2.13 โดยค่าในแต่ละช่องจะแสดงถึงคุณสมบัติของจุดภาพ (pixel) และตำแหน่งของช่อง array เป็นตัวกำหนดตำแหน่งของจุดภาพ



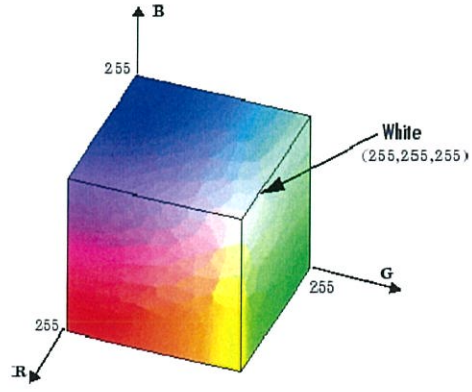
รูปที่ 2.15 พิกัดของระบบภาพดิจิตัล

(ที่มา: http://www.ecpe.nu.ac.th/panomkhawn/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 เป็นภาพที่มีระดับของความสว่างอยู่ โดยทั่วไปจะอยู่ที่ 0-255 ภาพ Gray scale คือภาพที่มีค่าสี R,G,B เท่ากันหมด ส่วนภาพขาวดำมีแค่ 0 กับ 1 เท่านั้น

2.10.1 ระบบสี RGB

ระบบสี RGB คือระบบที่มีค่าของสีแดง สีเขียว และ สีน้ำเงิน ค่าใดค่าหนึ่งหรือหลายๆค่ารวมกันโดยแต่ละสีจะมีค่าตั้งแต่ 0-255 ดังรูป 2.16

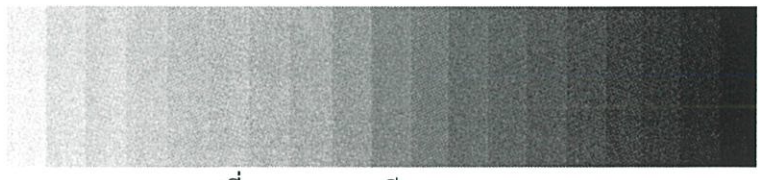


รูปที่ 2.16 ระบบสีRGB

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

2.10.2 ระบบสี Gray scale

ระบบสี Grayscale คือระบบที มีค่าของสีแดง สีเขียว และ สีน้ำเงินเท่ากัน ภาพจึงออกมาในโทนสีขาวดำ



รูปที่ 2.17 ระบบสี Gray scale

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

2.10.3 การแปลงระบบสี RGB เป็นระบบสี Grayscale

การแปลงระบบสีRGB เป็นระบบสีGrayscale นั้นจะทำการคิดคำนวณค่าในแต่ละจุดสีโดยแทนค่า RGB ทั้งสามค่าใหม่ตามสูตร เมื่อค่าของสีแดง สีเขียวและสีน้ำเงินเท่ากันหมดแล้วจึงได้เป็นสีแบบ Grayscale

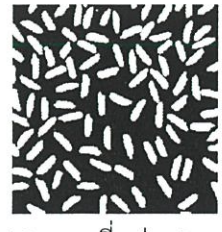
$$0.2989 * R + 0.5870 * G + 0.1140 * B \qquad (2.1)$$

2.10.4 Threshold

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

$$\text{grayscale} = \begin{cases} 255 & \text{; if grayscale} > 127 \\ 0 & \text{; else} \end{cases} \qquad (2.2)$$

รูปที่ 2.18 ภาพในระบบสี Grayscale

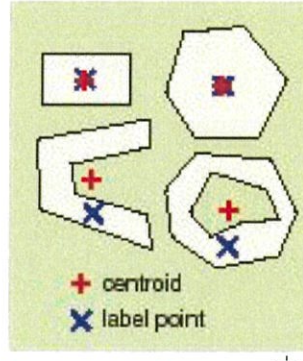


รูปที่ 2.19 ภาพที่แบ่ง threshold

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

2.10.5 จุด Centroid

Centroid คือ จุดศูนย์กลางของมวลของ Region หรือวัตถุใดๆซึ ่งมีการนิยามมาจาก Centroid ในเชิงคณิตศาสตร์หรือเชิงกายภาพและมีความสำคัญในการรังวัดระยะของวัตถุต่อวัตถุใน Image โดยเราสามารถคำนวณที่สามารถรายละเอียดดังต่อไปนี้และแสดงในรูปที่ 2.20



รูปที่ 2.20 Centroid ของ Region ที่มีรูปร่างต่างๆ
(ที่มา: http://www.ajmanut.com/attachments/article)

โดยในการคำนวณ Centroid จะต้องหา Moment ของ Region แล้วต้องมาจึงคำนวณหา Centroid ดังสมการต่อไปนี้

Simple moments:

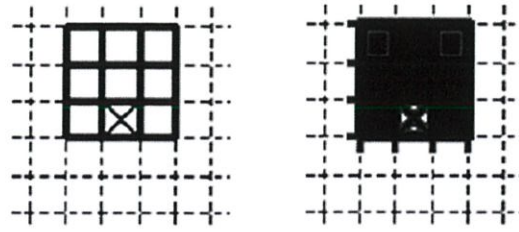
$$m_{p,q} = \sum_{\text{Relevant pixels}} (f(x,y) - f_{\text{background}}) x^p y^q$$

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

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

$(\frac{m_{1,0}}{m_{0,0}}, \frac{m_{0,1}}{m_{0,0}})$ is the centre-of-mass coordinate (2.3)

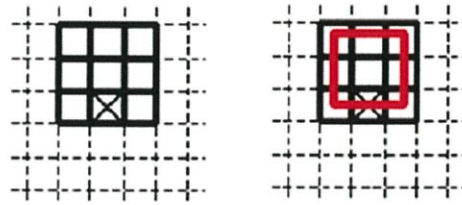
Area คือ จำนวนจริงของ Pixel ใน Shapeของ Region โดยทั ่วไปจะพิจารณาเป็น Net Area หรือพื้นที่สุทธิ



รูปที่ 2.21 Area ของ Region เท่ากับ 9 pixel
(ที่มา: http://www.ajmanut.com/attachments/article)

Perimeter คือ จำนวนจริงของ Pixe lที่บนขอบของ Region ใดๆ

$$\text{perimeter} = \sum_{i=1}^{N-1} d_i = \sum_{i=1}^{N-1} \left| x_i - x_{i+1} \right| \tag{2.4}$$



รูปที่ 2.22 Perimeter ของ Region เท่ากับ 8 pixel
(ที่มา: http://www.ajmanut.com/attachments/article)

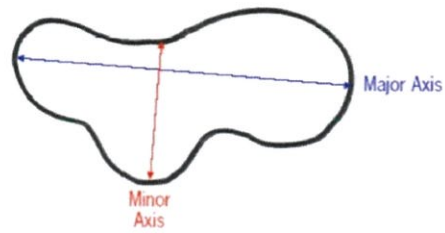
Major Axis คือ จุดจบสองจุด (Ending Point) ที่สามารถวาดเส้นทียาวที่สุดใน Region อีกทั้งสามารถคำนวณระยะและมุม

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

$$\text{major-axis angle} = \tan^{-1}\left(\frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \right) \tag{2.5}$$

Minor Axis คือ จุดจบสองจุด (Ending Point) ที่สามารถวาดเส้นทียาวที่สุดและต้องตั้งฉากกับ Major Axis

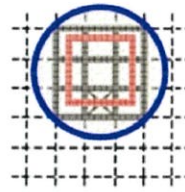
$$\text{minor-axis length} = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2} \tag{2.6}$$



รูปที่ 2.23 Major Axis และ Minor Axis
(ที่มา: http://www.ajmanut.com/attachments/article)

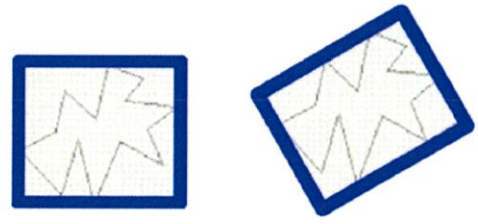
Compactness คือ อัตราส่วนของพื้นที่ต่อพื้นที่ของวงกลมที่ Perimeter เดียว

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



รูปที่ 2.24 Compactness ของ Region
(ที่มา: http://www.ajmanut.com/attachments/article)

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



รูปที่ 2.25 Bounding Box และ Minimal Bounding Box ของ Region
(ที่มา: http://www.ajmanut.com/attachments/article)

2.11 Circular Hough Transform

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

ตัวอย่างการใช้งาน

```
import cv2
#import library cv2
import numpy as np
```

#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 มาทำการเบลอภาพ เพื่อให้ความคมชัดน้อยลงและสามารถจับภาพใกล้เคียงวงกลมได้ง่ายขึ้น โดยองค์ประกอบของฟังก์ชันคือ cv2.medianBlur (ไฟล์ภาพที่ต้องการนำมาเบลอ, เปอร์เซนต์ที่ต้องการทำให้ภาพเบลอ)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 = รูปภาพที่ต้องการ

method = เทคนิคที่ใช้ในการจับวัตถุทรงกลมซึ่งนิยม CV_HOUGH_GRADIENT มากที่สุด

dp = ส่วนกลับอัตราส่วนความละเอียดของภาพ เช่น dpเท่ากับ1 คือความละเอียดของภาพจะเท่ากับภาพเริ่มต้นที่เราเลือก ถ้า dp = 2 ภาพจะมีขนาดเล็กลงครึ่งหนึ่ง

minDist = ระยะทางที่สั้นที่สุดระหว่างจุดศูนย์กลางของวงกลมที่ต้องการตรวจจับ ถ้า minDist มีขนาดเล็กเกินไป จะทำให้วงกลมบางวงไม่ถูกตรวจจับ แต่ถ้า minDist มีขนาดมากเกินไปจะทำให้วงกลมบางวงจับไม่ได้(รัศมีกว้างมากเกินไปบังวงอื่น)

param 1 = พารามิเตอร์เฉพาะตัวที่หนึ่งใช้ในการตรวจจับขอบของวงกลมโดยอาศัยการมองโทนสีของวงกลม

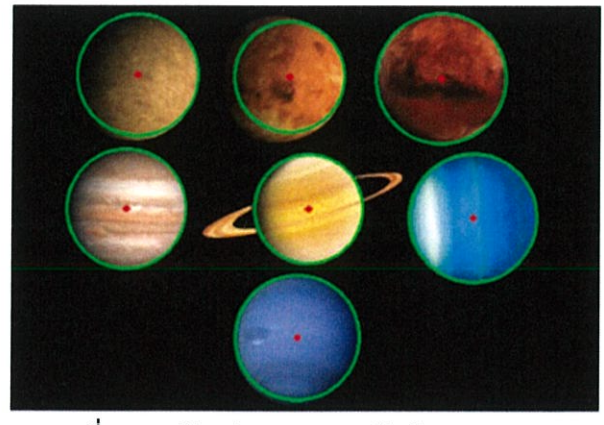
param2 = ค่าเริ่มต้นสำหรับวิธีการ cv2.HOUGH_GRADIENT ค่าเริ่มต้นที่น้อยเกินไปจะทำให้สามารถจับภาพวงกลมได้มากขึ้น(รวมถึงภาพที่ไม่ได้เป็นวงกลมด้วย) ค่าเริ่มต้นที่มากเกินไปก็จะทำให้วงกลมหลายๆวงที่อาจจะเกิดขึ้นจะถูกส่งกลับ

minRadius = ขนาดรัศมีที่ต่ำที่สุดของวงกลม

maxRadius = ขนาดรัศมีที่สูงที่สุดของทรงกลม

circles = np.uint16(np.around(circles))

```
for i in circles [0,:] :
cv2.circle(planets,(i[0],i[1]),i[2],(0,255,0),2)
#เป็นฟังก์ชันที่ใช้ในการวาดวงกลม องค์ประกอบของฟังก์ชันดังนี้
cv2.circle(รูปภาพที่สนใจ,จุดศูนย์กลางวงกลม,รัศมีวงกลม,สีที่ต้องการในการวาดเส้น,ความหนาของเส้น)
cv2.circle(planets,(i[0],i[1]),2,(0,0,255),3)
#เป็นฟังก์ชันที่ใช้ในการวาดจุดศูนย์กลางของวงกลม องค์ประกอบของฟังก์ชันดังนี้
cv2.circle(รูปภาพที่สนใจ,จุดศูนย์กลางวงกลม,รัศมีของจุดศูนย์กลาง(หน่วยเป็น pixel),สีที่ต้องการในการวาดเส้น,ความหนาของจุดศูนย์กลางวงกลม(ถ้าใช้ความหนาเป็น -1 คือจุดศูนย์กลางของวงกลมจะถูกระบายทึบทั้งวง))
cv2.imwrite("planets_circles.jpg",planets)
#เป็นฟังก์ชันที่ใช้ในการบันทึกรูปภาพที่ต้องการ องค์ประกอบของฟังก์ชันคือ
cv2.imwrite("ชื่อไฟล์ที่ต้องการบันทึก",รูปภาพที่ต้องการบันทึก)
cv2.imshow("HoughCircles",planets)
#เป็นฟังก์ชันที่ใช้ในการแสดงรูปภาพทางหน้าจอ องค์ประกอบของฟังก์ชันคือ
cv2.imshow("ชื่อวินโดว์ที่ต้องการแสดงภาพ",ภาพที่ต้องการนำมาแสดงทางหน้าจอ)
cv2.waitkey(0)
#เป็นฟังก์ชันที่ใช้ในการรอคำสั่งจากคีย์บอร์ดซึ่งจะมีหน่วยเป็น millisecond ถ้าใส่ waitkey(0) คือรูปจะเปิดตลอดเวลาจนกระทั่งมีการกดปุ่มใดๆบนคีย์บอร์ด แต่ถ้าใช้ waitkey(5) คือรูปภาพจะถูกเปิดเป็นเวลา 5ms จากนั้นจะถูกปิดโดยอัตโนมัติ
cv2.destroyAllWindows()
#เป็นฟังก์ชันที่ใช้ในการปิดหน้าต่างทั้งหมดหลังจากจบการแสดง
```



รูปที่ 2.26 ตัวอย่างการตรวจจับวัตถุรูปวงกลม

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

2.12 Edge Detection

ขอบภาพหรือขอบเขตภาพ 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

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

แต่ต้องหาความชันในแบบ discrete เนื่องจากค่า intensity ไม่เป็นแบบ continuous จึงใช้สมการดังนี้

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

ซึ่งนำหลักการนี้มาทำเป็น filter เพื่อหาขอบได้ คือ Prewitt and Sobel

หลักการ PREWITT

หลักการ : ใช้ความชันรอบๆ จุดนั้นโดยคิดทั้งในแนวแกน x และแนวแกน y จากนั้นจึงนำมามาหาขนาด

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

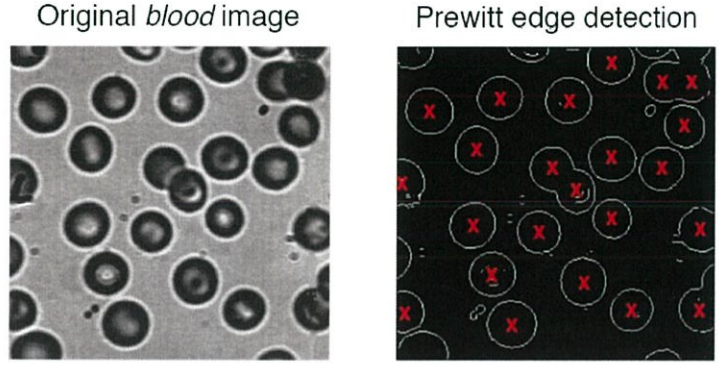
จะเห็นได้ว่ามีการใช้ค่า intensity ตัวก่อนลบกับตัวหลัง เพื่อหาความแตกต่างของ intensity หรือความชันนั้นเอง

$$D_x = H_x * I \qquad \text{and} \qquad D_y = H_y * I. \tag{2.11}$$

นำ filter มา convolution กับรูปภาพ ทั้งแกน x และ y

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

จากนั้นนำมาหาขนาด ซึ่งหากยิ่งมีความชันทั้งแกน x และ y มากขอบภาพจะยิ่งชัดขึ้น ส่วนภาพที่สีเหมือนกันจะไม่ได้แสดงเนื่องจากกลายเป็น 0



รูปที่ 2.27 ตัวอย่างการตรวจจับของภาพแบบ Prewitt
(ที่มา: https://candokamera.wordpress.com/edge-detection)

หลักการ SOBEL

หลักการ : คล้ายกับ Prewitt แต่จะมีการ weight จุดที่ใกล้กับ pixel นั้นมากกว่าจุดอื่นดังนี้

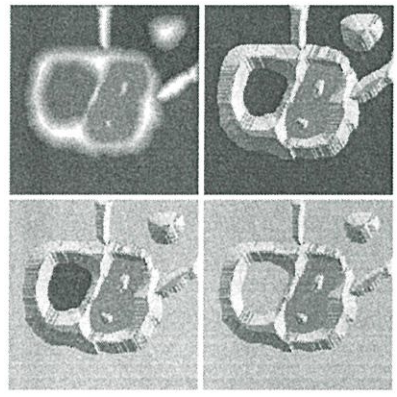
$$H_x^S = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & \mathbf{0} & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad \text{and} \quad H_y^S = \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & \mathbf{0} & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix} \tag{2.13}$$

จากนั้นทำตามขั้นตอนอื่นๆเหมือนกับ Prewitt

2.13 Watershed Transform

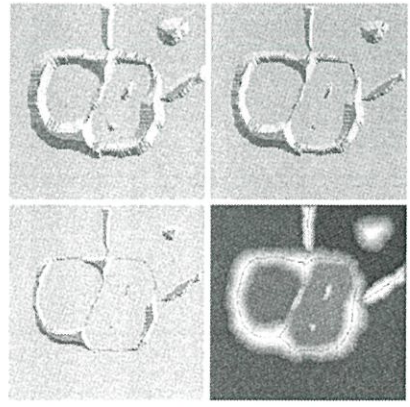
เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกส่วนของภาพออกเป็นส่วน ๆ โดยใช้หลักการวิเคราะห์ เริ่มจากการคำนวณระยะทางด้วย Euclidian distance map (EDM) และหาจุด Ultimate eroded points (UEPs) ซึ่งเป็นจุดศูนย์กลางของวัตถุแต่ละกลุ่มเพื่อใช้เป็นจุดเริ่มต้น หรือจุดที่อยู่ศูนย์กลางที่คาดว่าจะเป็นชุดข้อมูลที่มีความแตกต่างกันออกจากกัน หลังจากได้จุดศูนย์กลางของข้อมูลแล้วก็จะหาพื้นที่

รอบจุดศูนย์โดยการขยายขนาดออกไปเรื่อยๆ จนกว่าไปสัมผันกับกลุ่มข้อมูลชุดอื่นๆ จุดตำแหน่งที่มีการสัมผัสกันจะเป็นส่วนที่ใช้ในการแบ่งแยกด้วยการสร้างเส้นแบ่งข้อมูลออกเป็นแต่ละกลุ่ม เช่นเดียวกับในทางภูมิศาสตร์ watershed เป็นสันปันน้ำที่แยกอ่างน้ำในแต่ละแหล่ง โดยแนวคิดของ Watershed transform ที่ใช้ในการประมวลผลภาพเกรย์สเกลจะใช้ในการแบ่งแยกวัตถุในภาพโดยใช้หลักการเดียวกับ อ่างเก็บน้ำ



รูปที่ 2.28 ประมวลผลภาพเกรย์สเกลจะใช้ในการแบ่งแยกวัตถุในภาพโดยใช้หลักการเดียวกับอ่างเก็บน้ำ
(ที่มา: http://staff.cs.psu.ac.th/sathit/344-671/Image%20Segmentation.pdf)

จากภาพเมื่อระดับน้ำในอ่างเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จะสามารถเห็นเฉพาะขอบของอ่างเก็บน้ำ โดยเมื่อเทียบกับภาพเกรย์สเกล ค่าความเข้มในแต่ละพื้นที่จะไม่เท่ากัน ส่วนที่เป็นที่ลุ่ม คือพื้นที่ที่มีค่าความเข้มน้อย ส่วนที่เป็นพื้นที่น้ำจะเปรียบได้กับระดับค่าเทรสโฮลด์ เมื่อกำหนดให้ค่าสูงขึ้นก็จะคลุมพื้นที่ได้มากขึ้นและจะใช้แบ่งแต่ละ พื้นที่ออกจากกัน



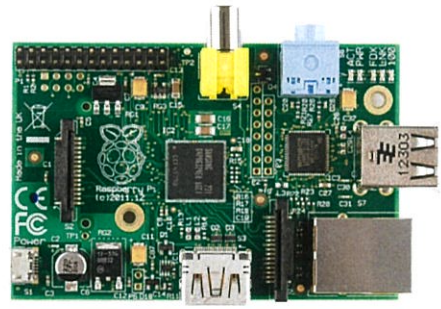
รูปที่ 2.29 ภาพเมื่อกำหนดให้ค่าสูงขึ้นก็จะคลุมพื้นที่ได้มากขึ้นและจะใช้แบ่งแต่ละ พื้นที่ออกจากกัน
(ที่มา: http://staff.cs.psu.ac.th/sathit/344-671/Image%20Segmentation.pdf)

2.14 Raspberry Pi

บอร์ดคอมพิวเตอร์ขนาดเล็กที่สามารถเชื่อมต่อกับจอมอนิเตอร์ คีย์บอร์ด และเมาส์ได้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทำโครงงานทางด้านอิเล็กทรอนิกส์ การเขียนโปรแกรม หรือเป็นเครื่องคอมพิวเตอร์ตั้งโต๊ะขนาดเล็ก ไม่ว่าจะเป็นการทำงาน Spreadsheet Word Processing ท่องอินเทอร์เน็ต ส่งอีเมล หรือเล่นเกมส์ อีกทั้งยังสามารถเล่นไฟล์วีดีโอความละเอียดสูง (High-Definition) ได้อีกด้วย

บอร์ด Raspberry Pi รองรับระบบปฏิบัติการลินุกซ์ (Linux Operating System) ได้หลายระบบ เช่น Raspbian (Debian) Pidora (Fedora) และ Arch Linux เป็นต้น โดยติดตั้งบน SD Card บอร์ด Raspberry Pi นี้ถูกออกแบบมาให้มี CPU GPU และ RAM อยู่ภายในชิปเดียวกัน มีจุดเชื่อมต่อ GPIO ให้ผู้ใช้สามารถนำไปใช้ร่วมกับอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์อื่นๆ ได้อีกด้วย

Raspbian เป็นระบบปฏิบัติการสำหรับติดตั้งใช้งานบนบอร์ดขนาดเล็กนาม Raspberry Pi พัฒนามาจากระบบ Debian Linux เหมาะสำหรับนำมาใช้ทำแล็ป และงานวิจัยเกี่ยวกับระบบคอมพิวเตอร์แบบฝังตัว (Embedded System) โดยที่ Raspbian มีแพ็กแกจให้ใช้งานกว่า 35,000 แพ็กเกจ กล่าวได้ว่าสามารถติดตั้งแพ็กเกจที่ใช้งานใน Debian Linux และ Ubuntu Linux ได้และมีความเหมาะสมต่อการใช้ทำงานวิจัยต่างๆ



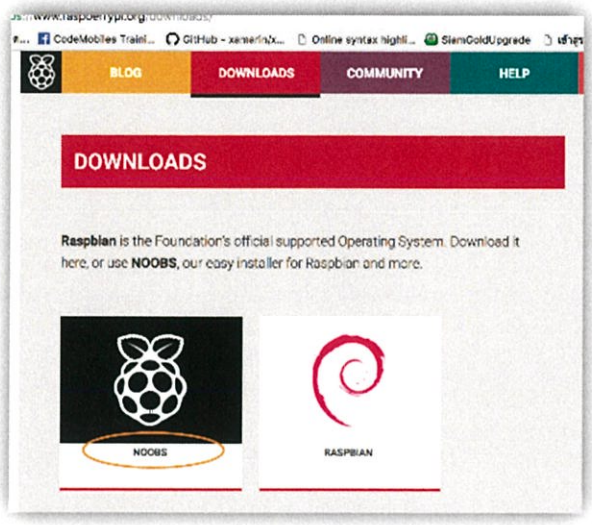
รูปที่ 2.30 อุปกรณ์ที่ใช้ในการติดตั้ง Raspberry Pi
(ที่มา:https://www.allaboutcircuits.com/uploads/articles/Raspberry-Pi-3-top-down-web.jpg,2560)

การติดตั้ง Raspbian แบบ NOOBS บน Raspberry Pi

1. เตรียมอุปกรณ์
2. ดาวห์โหลด NOOBS Image File

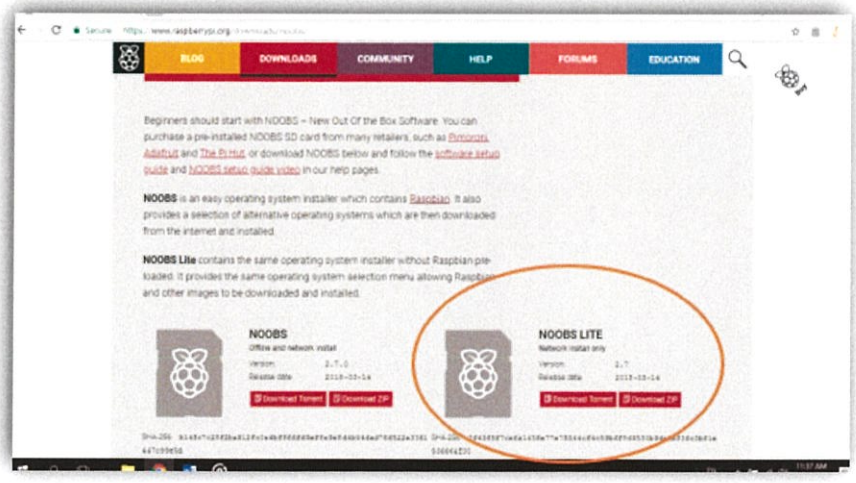
กดลิงค์นี้เพื่อเข้าหน้าดาวห์โหลดรวม https://www.raspberrypi.org/downloads/

2.1 ให้เลือกแบบ NOOBS



รูปที่ 2.31 ภาพดาวห์โหลด NOOBS Image File

2.2 ให้เลือแบบ Network Install only

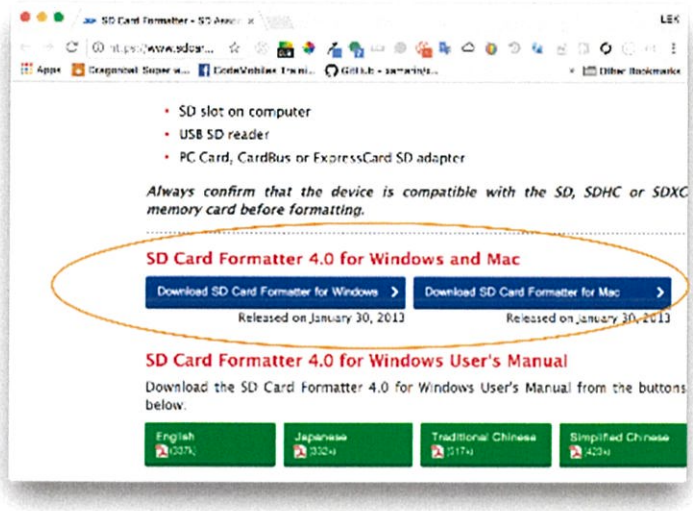


รูปที่ 2.32 ภาพดาวห์โหลด NOOBS แบบ Network Install only

3. ดาวห์โหลด SDFormatter และแตกไฟล์ (NOOBS) ที่ดาวห์โหลดมาลง SDCard

ดาวห์โหลด SDFormatter จากลิงค์นี้ https://www.sdcard.org/downloads/formatter_4/

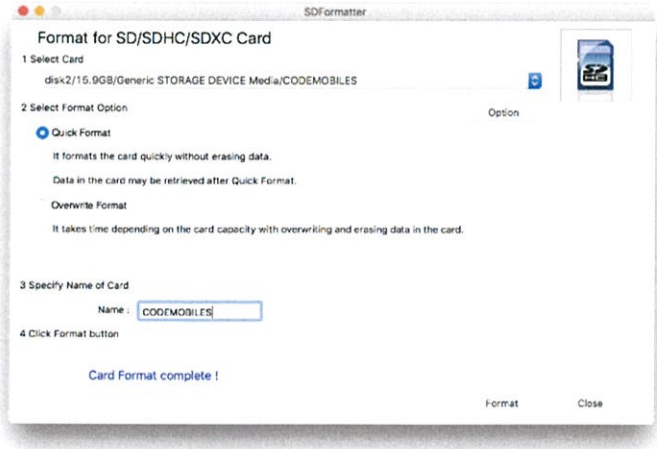
มีให้เลือกให้ทั้งแบบ Windows และ MacOS



รูปที่ 2.33 ภาพดาวห์โหลด SDFormatter

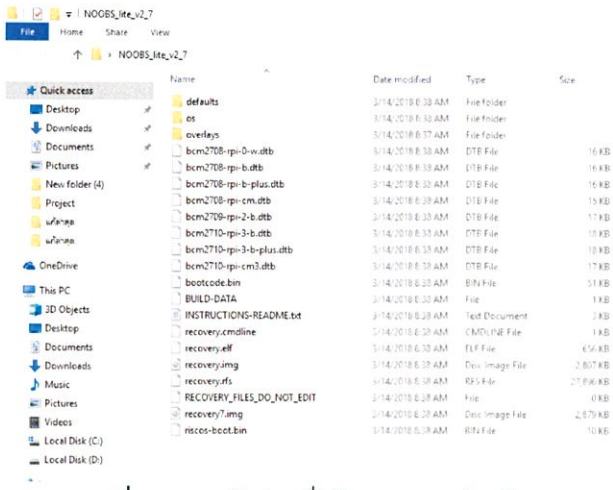
- เสียบ SDCard ที่จะ Format กับเครื่องคอมพิวเตอร์
- เปิดแอพ SDFormatter ขึ้นมา แอพจะทำการค้นหา SDCARD ให้เลือก SDCARD ที่เราต้องการ
- เลือก format option แบบ Overwrite Format เพื่อลบไฟล์เก่าที่มีอยู่ใน SDCard ออกให้ทั้งหมดก่อน (แต่ในกรณี SD Card ไม่มีไฟล์อะไรอยู่เลยเลือกเป็น Quick Format

หมายเหตุ: Micro SDCard ควรจะประมาณ 16 GB เป็นแบบ Class 10 เพื่อให้โปรแกรมทำงานรวดเร็ว



รูปที่ 2.34 หน้าต่างที่ได้จาการ Format

- แตกไฟล์ NOOBS ที่ดาวห์โหลดมา **NOOBS_v2_4_0.zip** ลง SDCard



รูปที่ 2.35 หน้าต่างที่ได้จากการแตกไฟล์ NOOBS

4. ติดตั้งระบบปฏิบัติการ

- เสียบ SDCard ลง Raspberry Pi แล้วต่อสาย Monitor, Keyboard และ Mouse จากนั้นเปิด Raspberry PI ด้วยการเสียบ USB Charging Adapter (5V 2A)

(หมายเหตุ* ถ้าจะเอาที่ชาจร์มือถือมาใช้ ต้องดูว่ากระแสไฟมันพอหรือเปล่าด้วย ส่วนใหญ่จะกระแสไม่ถึง 2A ทำให้ตอนเปิดเครื่อง จะไม่ภาพขึ้นจอ Monitor)

- เมือเปิดเครื่อง จะมีหน้าจอแสดง Option [x] ให้ Enable 2 อัน แนะนำให้ เลือกหมด

1. Raspberry (Recommended)
2. Data Partition (จะเพิ่มพื้นทีสำหรับเก็บข้อมูลต่างหากอีก)

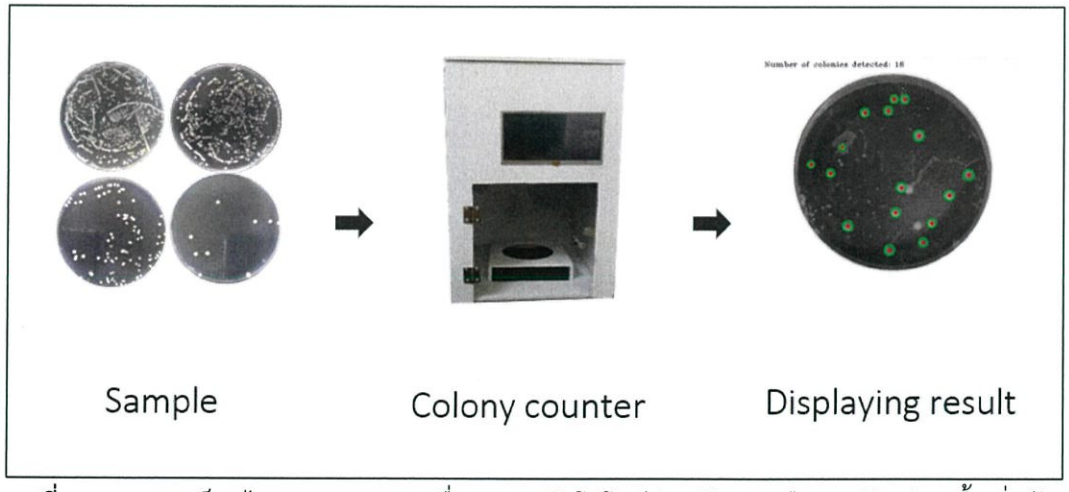
- Languge and Keyboard เป็นแบบ US (United State) เราสามารถเพิ่ม Keyboard layout แบบไทยได้ทีหลัง

5. รอติดตั้งเสร็จประมาณ 20-30 นาที แล้วกด Restart เพื่อพร้อมใช้งาน

บทที่ 3

การออกแบบและการดำเนินงาน

การดำเนินการในส่วนนี้เป็นการออกแบบเครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น (An Automated Colony Counter for Serial-Dilution Culture Method) ซึ่งแบ่งส่วนการทำงานเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่หนึ่งการรวบรวมเก็บข้อมูลเชื้อจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้ในการตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น ส่วนที่สองทำหน้าที่ประมวลข้อมูลโดยโปรแกรมเพื่อแสดงการตรวจนับโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ แสดงการตรวจนับและแสดงจำนวนตัวเลขที่สามารถตรวจนับได้ จากรูปที่ 3.1 แสดงบล็อกไดอะแกรมของเครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น โดยเริ่มจากในส่วนของการเตรียมห้องปฏิบัติการและทำความสะอาดอุปกรณ์ทางชีววิทยาเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และป้องกันการปนเปื้อน ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เก็บเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมและทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้เติบโต และทำการเจือจางตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น 10 เท่า จากนั้นนำภาพถ่ายโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่โปรแกรมที่เราออกแบบเพื่อนับจำนวนโคโลนี โดยใช้กระบวนการประมวลผลภาพในการนับจำนวนโคโลนี และใช้ราสเบอรีไพเป็นตัวประมวลผลซอฟแวร์และแสดงผลการนับจำนวนโคโลนีบนหน้าจอแสดงผล



รูปที่ 3.1 แสดงบล็อกไดอะแกรมของเครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการ ที่ใช้ในการเจือจางเชื้อจุลินทรีย์เพื่อนำมาเป็นตัวอย่างในการทดลองโปรแกรมเครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น

3.1.1 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการเจือจางเชื้อจุลินทรีย์สำหรับตัวอย่างเริ่มต้น

1. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Inoculating loop)

2. ตะเกียงแอลกอฮอล์

3. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

4.แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (Spreader)

5. หลอดเลี้ยงเชื้อ (Culture tube)

6. ไมโครปิเปต (Micropipette)

7.ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Clean Bench)

8. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

9. ตู้เย็น (Refrigerator)

3.1.2 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการสร้างเครื่องตรวจนับโคโลนี

1.แผ่นพลาสวูด

2.หม้อแปลงไฟ 220v เป็น 12v

3.ไฟ LED strip

4.Raspberry pi Board

5.จอ LCD Raspberry pi

3.2 ขั้นตอนวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น

3.2.1 ทำการความสะอาดและฆ่าเชื้อของอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ (Aseptic technique)

การเก็บเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นโดยในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพ สามารถแยกเชื้อได้อย่างแม่นยำ จะต้องทำการฆ่าเชื้อเพื่อให้อุปกรณ์สะอาดที่สุด ตลอดการปฏิบัติการทางชีววิทยาเพื่อป้องกันสิ่งปนเปื้อนจากภายนอก ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการเลี้ยงได้

Autoclave เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้ไอน้ำร้อนและแรงดันสูง ทำให้ของที่ผ่านการนึ่งแล้วอยู่ในสภาพปราศจากเชื้อ จึงมักใช้เครื่องนี้ในการนึ่งฆ่าเชื้อของเสียทางชีวภาพเพื่อกำจัดและป้องกันการปนเปื้อน และนอกจากจะใช้ป้องกันการปนเปื้อนแล้ว เครื่อง Autoclave ยังสามารถใช้ฆ่าเชื้อตัวอย่างก่อนจะนำมาใช้ในการทดลองได้

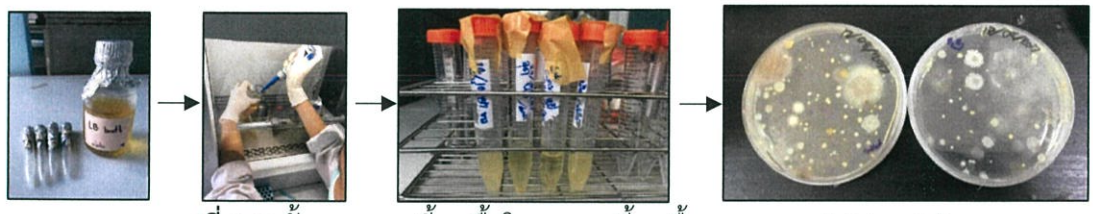
รูปที่ 3.2 วิธีการ Sterile technique

3.2.2 เก็บเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม (Microorganism samples)

ทำการเก็บเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม เพื่อนำมาใช้ในการทดลองโปรแกรมการตรวจนับโคโลนี สำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น แหล่งเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม ทำการเก็บเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมที่เราสนใจ เช่น บริเวณตึกภาคอิเล็กทรอนิกส์ บริเวณใต้ต้นไม้ แหล่งน้ำเสีย เป็นต้น โดยการวางเพลนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทิ้งไว้ตามแหล่งต่างๆ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์มาเกาะกินอาหารในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

3.2.3 การเพิ่มจำนวนของเชื้อด้วยวิธี Inoculation

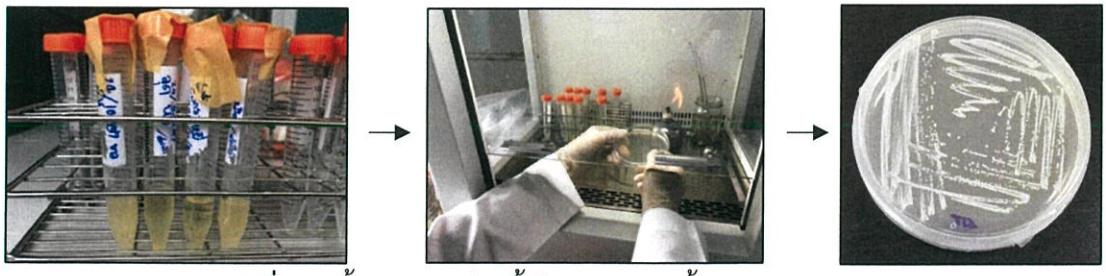
Inoculation คือการเพาะเชื้อหรือการเพิ่มจำนวนของเชื้อโดยการเขี่ยเชื้อมา 1 โคโลนีจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำมาจุ่มเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (LB broth) เพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (LB broth)

3.2.4 การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Streak technique)

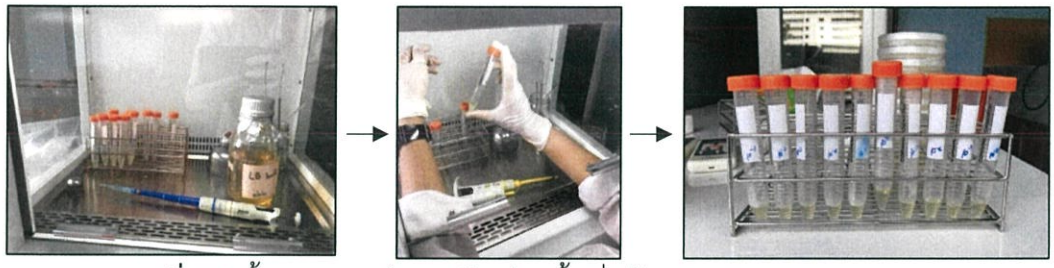
การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (streak plate) เป็นวิธีการที่ให้เชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นมากๆ ค่อยๆ กระจายตัวออกไปหรือมีความเจือจางพอทีจะทำให้เซลล์แต่ละเซลล์สามารถแยกออกจากกันโดยแต่ละเซลล์จะเจริญจนเป็นโคโลนีที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สามารถทำได้โดยการใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) ลนไฟจนร้อนแดงและทิ้งให้เย็น จากนั้นแตะที่เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ โดยนำมาขีดบนอาหารวุ้นแข็ง ลากเป็นแนวลงมา 4 ควอดรันต์ เชื้อจุลินทรีย์จะเกิดการแยกกันของเซลล์จากปริมาณหนาแน่น (ควอดรันต์ที่ 1) จะเหลือน้อยละจนสามารถแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆได้ (ควอดรันต์ที่ 4)



รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Streak plate)

3.2.5 การเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น (Dilution technique)

Serial dilution คือ การเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นเพื่อการนับจำนวนจุลินทรีย์ (microbial population count) ให้จำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีจำนวนเซลล์ระหว่าง 25-250 เซลล์ ไม่มากหรือน้อยเกินไป โดยทั่วไปทำเป็นลำดับๆ ละ 10 เท่า โดยทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบน้ำใส่ลงในหลอดทดลอง (Tube) หลอดละ 900 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีจากเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อมา 1 โคโลนีและทำการจุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบน้ำในหลอดที่ 1 ซึ่งหลอดแรกที่ทำการจุ่มเชื้อนี้จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-1} จากนั้นทำการปิเปตจากหลอดที่มีความเข้มข้น 10^{-1} มาจำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดที่ 2 ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-2} จากนั้นปิเปตต่อไปเรื่อยๆจนถึงหลอดที่ 10 ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-10}



รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น (Dilution technique)

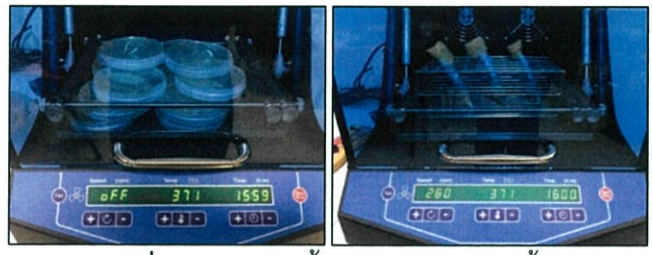
3.2.6 การนำเชื้อมากระจายบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (spread technique)

คือ การนำเชื้อที่ทำให้เจือจางแล้วมากระจายบนผิวของอาหารแข็ง โดยใช้แท่งแก้ว Spreader สเปรดเป็นสามเหลี่ยมแล้วหมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวงกลม ซึ่งจะทำให้เชื้อสามารถกระจายไปทั่วบริเวณของจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยวิธีนี้สามารถหาจำนวนโดยประมาณของจุลินทรีย์ได้เช่นกัน โดยทำการปิเปตเชื้อในแต่ละหลอดที่เราทำการ Dilution จำนวน 100 ไมโครลิตร นำมาวางลงตรงกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่แบบวุ้นแข็งแยกกันในแต่ละจาน จากนั้นนำแท่งแก้ว spreader ลนไฟและทิ้งตัวให้เย็น จากนั้นทำการสเปรดเป็นสามเหลี่ยมแล้วหมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นวงกลม จะทำให้เชื้อจุลินทรีย์กระจายอยู่ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้

รูปที่ 3.6 ขั้นตอนการนำเชื้อมากระจายบนผิวของอาหารแข็ง (spread technique)

3.2.7 การบ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Incubation)

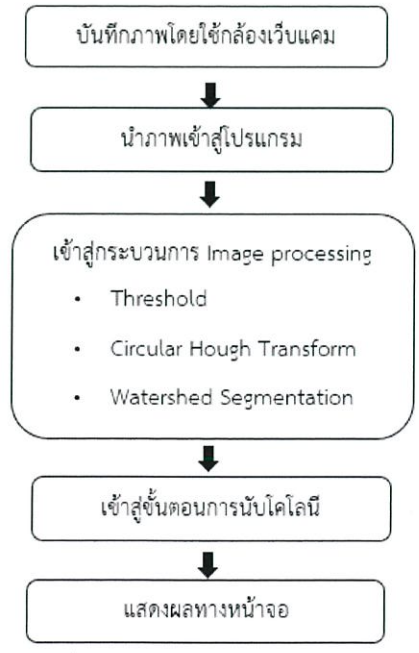
เมื่อเรามีการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นแข็งหรืออาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวแล้ว จากนั้นจะนำไปใส่ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง เนื่องจากที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต และที่บ่มเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่ไม่น้อยและไม่มากจนเกินไป สามารถที่จะเห็นเชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้อย่างชัดเจน



รูปที่ 3.7 การบ่มเชื้อจุลินทรีย์ในตู้บ่มเชื้อ

3.3 ขั้นตอนการออกแบบโปรแกรมการแสดงผล

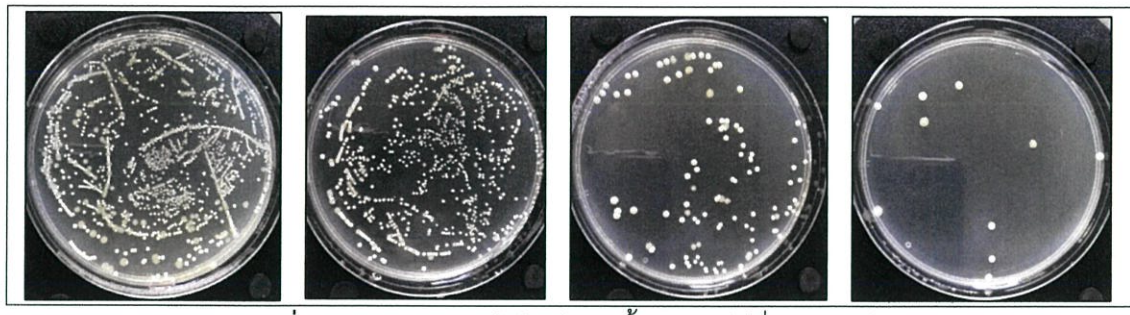
เมื่อเราได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมงแล้ว จากนั้นนำจานอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้นที่มาทำการบันทึกภาพ เพื่อนำไปประมวลผลภาพโดยโปรแกรมที่ออกแบบมีขั้นตอนของกระบวนการทาง Image processing ในการนับและแยกจำนวนโคโลนีที่มีอยู่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีขั้นตอนตามบล็อกไดอะแกรม ดังรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 บล็อกไดอะแกรมของโปรแกรมในการตรวจนับจำนวนโคโลนี

3.3.1 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์

เพลทอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้ในการตรวจนับโคโลนี โดยให้ความสูงของกล้องสามารถถ่ายภาพได้พอดีกับขนาดของเพลท เพื่อตัดส่วนของภาพที่ไม่เกี่ยวข้องในการวิเคราะห์ออกไปให้ได้มากที่สุด



รูปที่ 3.9 ตัวอย่างภาพโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโต

3.3.2 ออกแบบโปรแกรมตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น

ในการออกแบบโปรแกรมให้สามารถนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ในเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อจุนลินทรีย์อธิบายโดยขั้นตอนกระบวนการการทำงานของโปรแกรมดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การถ่ายภาพจากกล้องเว็บแคม ทำการบันทึกภาพเพื่อที่จะนำไปใช้ในการตรวจจับโคโลนี

รูปที่ 3.10 ภาพที่ได้จากการบันทึกภาพ

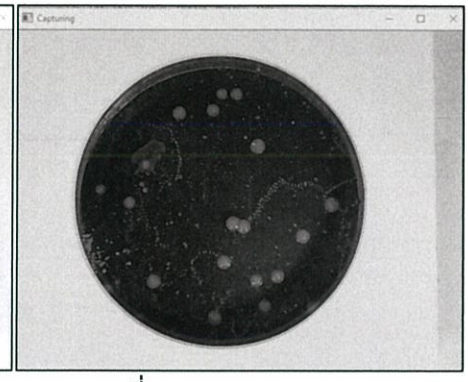
ขั้นตอนที่ 2 เป็นการนำภาพที่ได้จากการบันทึกภาพจากกล้องเว็บแคมนำไปวิเคราะห์เพื่อการตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ในเพลทอาหารโดยกระบวนการ Image processing ดังนี้

2.1 การแปลงภาพสี RGB ให้เป็นภาพระดับเทา (RGB to Gray)

ภาพที่รับเข้ามาในขั้นตอนแรกเป็นภาพที่อยู่ในระบบสีแบบ RGB ดังนั้นแต่ละพิกัด ของภาพจะประกอบด้วยค่าของเซตที่แสดงถึง ค่าของ R ค่าของ G และค่าของ B ระบบจะทำการ เปลี่ยนให้เป็นภาพระดับสีเทา (Grayscale) เพื่อทำให้สามารถวิเคราะห์ภาพได้ ง่ายขึ้นเพราะเมื่อแปลงภาพเป็น

ระดับสีเทาแล้วจะทำให้แต่ละจุดภาพของภาพจะเหลือเพียงค่าความเข้มของสีมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 255 เมื่อแปลงจากภาพสีเป็นภาพระดับสีเทาจะได้ดังรูปที่ 3.12

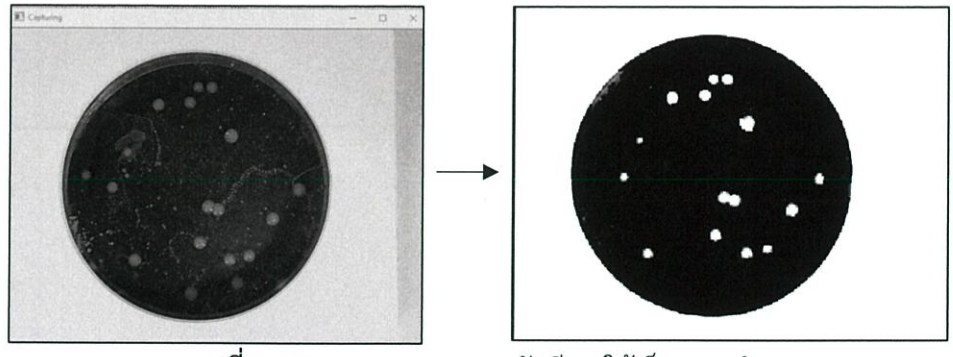
รูปที่ 3.11 ภาพRGB



รูปที่ 3.12 ภาพ Grayscale

2.2 แปลงภาพระดับสีเทาให้เป็นภาพขาว-ดำ

แปลงภาพระดับสีเทาให้เป็นภาพขาว-ดำ หมายถึง ภาพที่ประกอบด้วยสีขาวและสีดำเป็นหลัก ในทางดิจิทัลหมายความว่ามีเพียง 2 สถานะ คือ 0 และ 1 ถ้าพิกเซลใดมีค่าเป็ น 0 หมายความว่า พิกเซลนั้นมีสีดำพิกเซลใดมีค่าเป็น 1 หมายความว่าพิกเซลนั้นมีสีขาวการแปลงภาพระดับสีเทาให้เป็น ภาพขาว-ดำจะต้องกำหนดค่าความเข้มที่ต้องการอ้างอิงหรือค่าขีดแบ่ง (Threshold Value) โดยผู้ ใช้ สามารถกำหนดได้เองหรือใช้อัลกอริทึมในการหาค่า

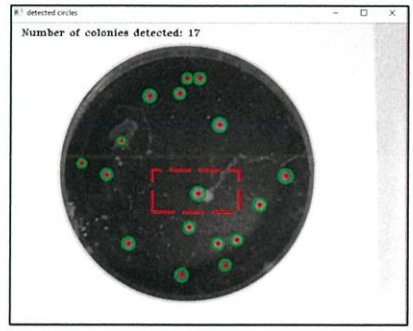


รูปที่ 3.13 ภาพแปลงภาพระดับสีเทาให้เป็นขาว-ดำ

2.3 Circlular Hough Transform

เพื่อค้นหาวงในภาพซึ่งเป็นลักษณะของโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ วงกลมจะแสดงทางคณิตศาสตร์ เป็น (x−xcenter)2+(y−ycenter)2=r2 where (xcenter,ycenter) เป็นศูนย์กลางของวงกลม และ r คือรัศมีของวงกลมจากสมการจะเห็นว่ามี 3 พารามิเตอร์ดังนั้นจำเป็นต้องมีตัวเก็บประจุ 3 มิติ

สำหรับการแปลงโหนดซึ่งจะไม่ได้ผลอย่างมาก ดังนั้น OpenCV จึงใช้วิธีการที่ซับซ้อนมากขึ้นวิธีการไล่ระดับสี Hough ซึ่งใช้ข้อมูลการไล่ระดับสีของขอบ

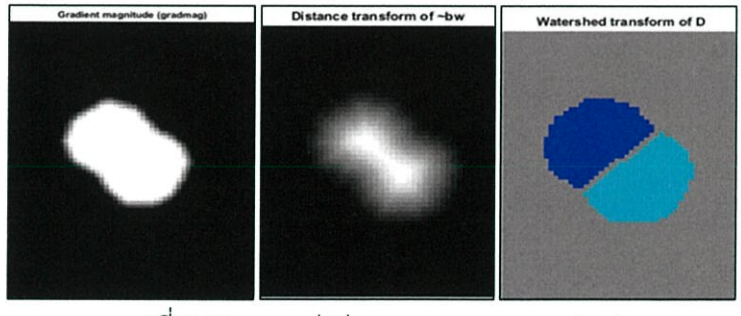


รูปที่ 3.14 ภาพผลลัพธ์ที่ได้จากการตรวจจับโคโลนี

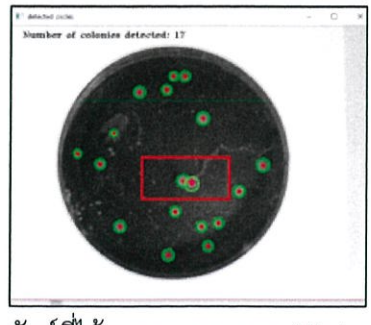
ในกรณีที่โคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ติดกันโปรแกรมไม่สามารถตรวจนับได้ จึงมีวิธีการแยกโคโลนีเพื่อการนับของโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์โดยกระบวนการ Watershed Transform

2.4 Watershed Transform

เนื่องจากในการตรวจนับโคโลนีจะมีเชื้อที่อยู่ติดกันหรือใกล้กันโปแกรมไม่สามารถตรวจนับจำนวนโคโลนีนั้นได้จึงมีการใช้กระบวนการ Watershed Transform เป็นวิธีการประมวลผลภาพวิธีหนึ่งที่ใช้สำหรับการตัดแยกวัตถุดังกล่าวให้ขาดออกจากกันได้ แยกเพื่อการตรวจนับจำนวนโคโลนีบนเพลนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์



รูปที่ 3.15 การแบ่งส่วนของภาพ watershed

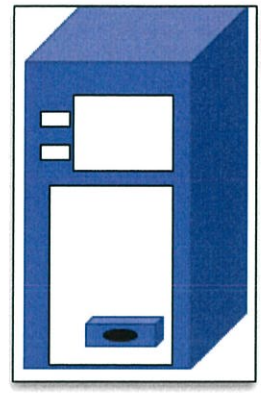


รูปที่ 3.16 ภาพผลลัพธ์ที่ได้จากกระบวนการ Watershed Transform

3.4 ขั้นตอนการออกแบบและสร้างเครื่องเครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น

3.4.1 การออกแบบโครงสร้าง ศึกษาการทำงานของกล้องเพื่อใช้ในการบันทึกภาพให้ได้ระยะที่เหมาะสมที่สามารถตรวจจับโคโลนีได้ควบคุมทั้งเพลนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1.1 ทำการวาดต้นแบบของเครื่องบนกระดาษและกำหนดระยะและขนาดส่วนต่างๆของเครื่อง



รูปที่ 3.17 ต้นแบบของเครื่องตรวจนับโคโลนีสำหรับการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น

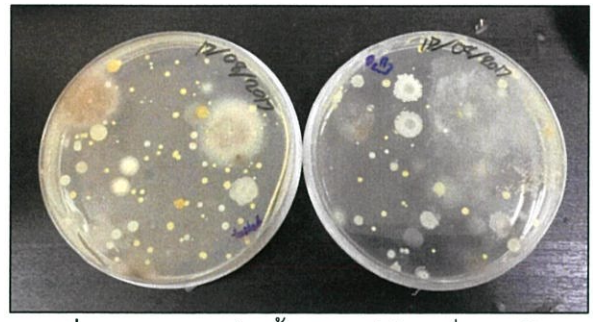
3.4.1.2 วัสดุที่ใช้ในการทำเครื่องทำจากแผ่นพลาสวูดการออกแบบมีลักษณะทรงสี่เหลี่ยมมีขนาดกว้าง 20 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตรทั้ง 4 ด้าน กำหนดระยะห่างจากกล้องกับระยะของเพลนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์การติดตั้งกล้องในระยะความสูงที่ 20 เซนติเมตรเป็นระยะที่กล้องสามารถบันทึกภาพควบคุมพื้นที่ของเพลนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้สามารถตรวจนับได้ทั้งหมด

3.4.1.3 ออกแบบฐานสำหรับไว้ใช้วางเพลนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอ้างอิงขนาดของเพลนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นขนาดมาตรฐาน โดยฐานเพลนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ออกแบบด้วยโดยใช้โปรแกรม Autodesk Inventor เนื่องจากเพลนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มีลักษณะกลม การใช้โปรแกรม Autodesk Inventor จึงง่ายต่อการสร้างชิ้นงาน

3.4.1.4 ประกอบโครงสร้างชิ้นงาน ทำการติดตั้งจอ Raspberry Pi เพื่อการใช้สำหรับการใช้งานและประมวลผล

บทที่ 4
ผลการทดลอง

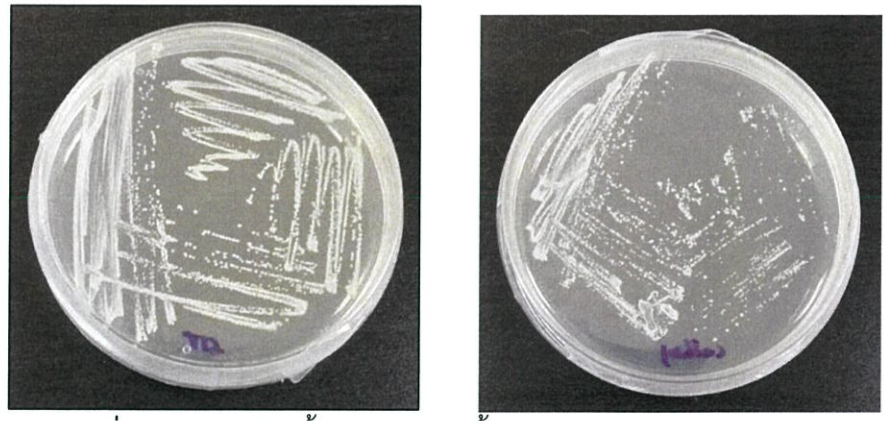
4.1 ผลการเก็บเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม



รูปที่ 4.1 ผลการเก็บเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม

จากการเก็บเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมต่างๆ พบว่าสามารถเห็นความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ปะปนอยู่มาก ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน

4.2 ผลการขีดเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

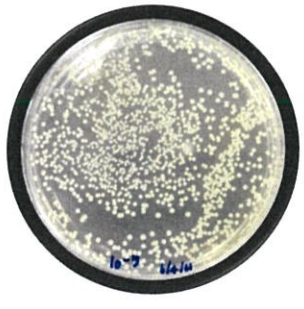


รูปที่ 4.2 ผลการขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Streak plate lechnique)

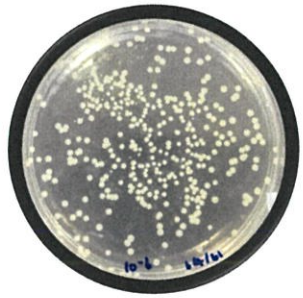
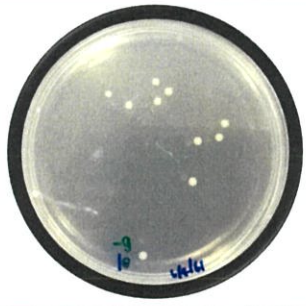
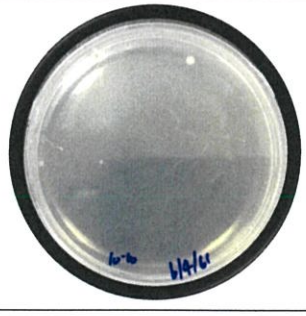
ผลจากการขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ จะเห็นได้ว่าการขีดเชื้อบนจานเพาะเชื้อจะทำให้แบคทีเรียที่มีความเข้มข้นมากๆ ค่อยๆ กระจายตัวออกไป หรือมีความเจือจางพอที ทำให้เซลล์แต่ละเซลล์สามารถแยกออกจากกันจนสามารถเห็นเป็นโคโลนีเดี่ยวได้ด้วยตาเปล่า โดยในควอดรันต์ที่ 1 จะมีปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรียมาก ไม่สามารถเห็นโคโลนีแยกออกจากกันได้ และในควอดรันต์ที่ 4 จะมีความเข้มข้นของแบคทีเรียน้อยที่สุด สามารถเริ่มเห็นโคโลนีแยกออกจากกันได้เป็นโคโลนีเดี่ยว

4.3 ผลการทำ Ten-fold Serial dilution

ตารางที่ 4.1 ผลการทำ Ten fold Serial dilution

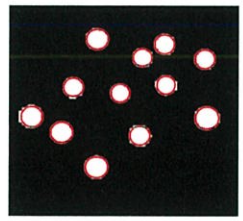
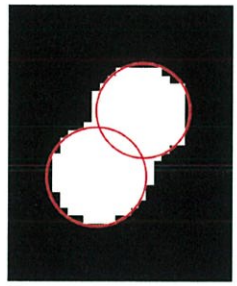
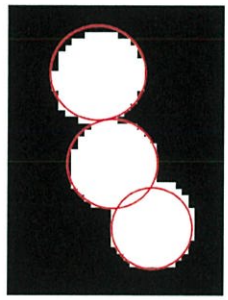
รูปแสดงการทำ serial dilution	ผลการทดลอง
	ความเข้มข้น 10^{-1} มีปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรียในปริมาณมาก เนื่องจากเป็นการนำเชื้อตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียให้มากขึ้น จึงไม่สามารถมองเห็นแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวได้
	ความเข้มข้น 10^{-2} มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์จางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-1} แต่ยังมีความเข้มข้นของแบคทีเรียในปริมาณมาก จึงไม่สามารถมองเห็นแยกเป็นโคโลนีได้
	ความเข้มข้น 10^{-3} มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์จางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-2} เริ่มเห็นลักษณะของแบคทีเรียเป็นริ้วเส้น แต่ยังมีบางบริเวณที่มีความเข้มข้นของแบคทีเรียในปริมาณมาก จึงไม่สามารถมองเห็นแยกเป็นโคโลนีได้ชัดเจน
	ความเข้มข้น 10^{-4} มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์จางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-3} เริ่มเห็นลักษณะของแบคทีเรียเป็นริ้วเส้นน้อยลง บางบริเวณสามารถเห็นจำนวนโคโลนีได้แต่ยังไม่ชัดเจน เนื่องจากยังมีความเข้มข้นของแบคทีเรียมาก
	**ความเข้มข้น 10^{-5}** มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์จางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-4} สามารถเห็นจำนวนโคโลนีได้ชัดเจนขึ้น มีเพียงบางบริเวณเท่านั้นที่เห็นแบคทีเรียเกาะกลุ่มกันเป็นริ้วเส้น

ตารางที่ 4.1 ผลการทำ Ten fold Serial dilution(ต่อ)

	**ความเข้มข้น 10^{-6}** มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์จางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-5} สามารถเห็นจำนวนโคโลนีได้ชัดเจนขึ้น แบคทีเรียเกาะกันเป็นริ้วเส้นสั้นลง โคโลนีเริ่มมีการกระจายตัวเนื่องจากความเข้มข้นของแบคทีเรียลดน้อยลง
	ความเข้มข้น 10^{-7} มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์จางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-6} สามารถเห็นจำนวนโคโลนีได้ชัดเจนขึ้น จำนวนโคโลนีลดน้อยลงและกระจายตัวกันเนื่องจากความเข้มข้นของแบคทีเรียมีปริมาณที่เจือจางลง
	**ความเข้มข้น 10^{-8}** มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์จางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-7} สามารถเห็นจำนวนโคโลนีได้ โดยจำนวนโคโลนีมีเพียงไม่กี่ตัว เนื่องจากความเข้มข้นของแบคทีเรียมีปริมาณที่น้อยมาก
	ความเข้มข้น 10^{-9} มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์จางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-8} สามารถเห็นจำนวนโคโลนีได้ โดยจำนวนโคโลนีมีเพียงไม่กี่ตัว เนื่องจากความเข้มข้นของแบคทีเรียมีปริมาณที่น้อยมาก
	**ความเข้มข้น 10^{-10}** มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์จางลงกว่าความเข้มข้น 10^{-9} สามารถเห็นเห็นเพียง 1 โคโลนีเท่านั้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากความเข้มข้นของแบคทีเรียมีปริมาณที่น้อยมาก

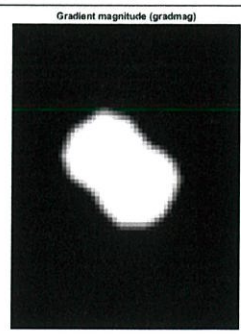
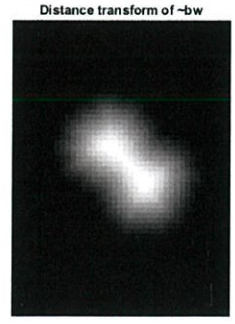
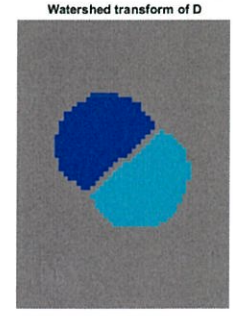
4.4 ผลการทำ Circular Hough transform ในการตรวจจับโคโลนี

ตารางที่ 4.2 ผลการทำ Watershed segmentation ในการตรวจจับโคโลนี

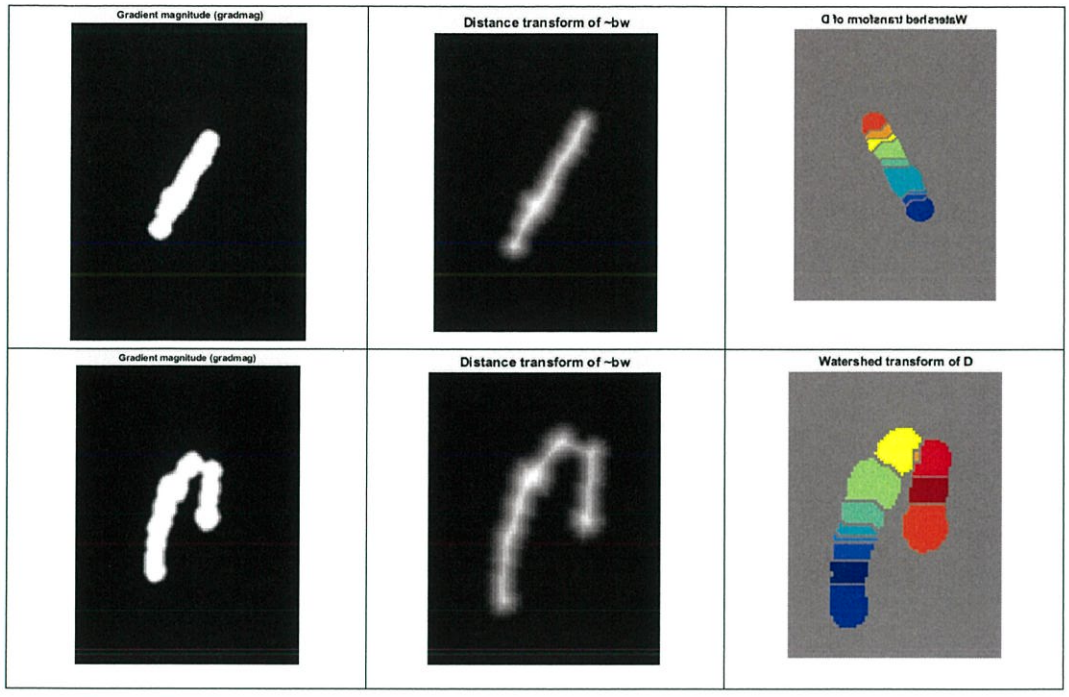
ตัวอย่างภาพโคโลนีที่ใช้ในการตรวจจับ	จำนวนโคโลนีที่ตรวจจับได้
	สามารถตรวจจับโคโลนีเดี่ยวได้ จำนวน 12 โคโลนี
	สามารถแยกโคโลนีที่อยู่ติดกันได้ จำนวน 2 โคโลนี
	สามารถแยกโคโลนีที่อยู่ติดกันได้ จำนวน 3 โคโลนี

4.5 ผลการทำ watershed segmentation ในการแยกโคโลนี

ตารางที่ 4.3 ผลการทำ Watershed segmentation ในการแยกโคโลนี

ตัวอย่างภาพแสดงส่วนที่โคโลนีติดกัน	หาจุดเซนทรอยด์	Watershed segmentation
		

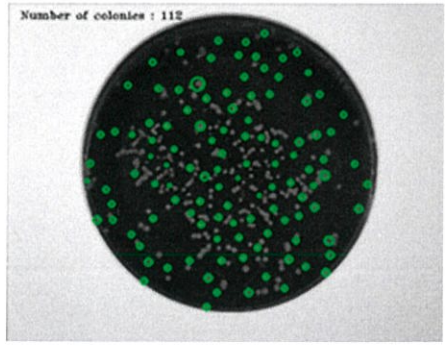
ตารางที่ 4.3 ผลการทำ Watershed segmentation ในการแยกโคโลนี(ต่อ)



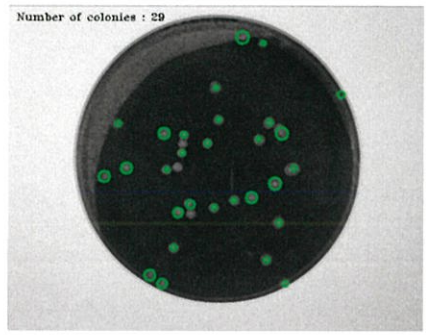
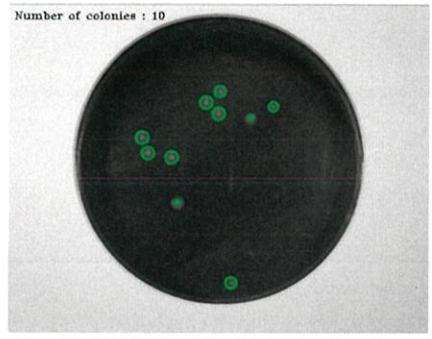
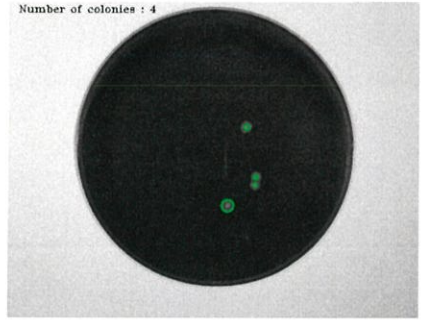
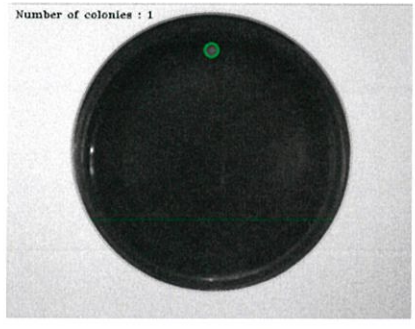
4.6 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนี

จากผลของการทำ Ten-fold serial dilution ได้นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นที่10^{-6} ถึง 10^{-10} นำมาทดสอบตรวจนับจำนวนโคโลนีในโปรแกรมที่ทำการออกแบบ เนื่องจากเป็นช่วงความเข้มข้นที่สามารถมองเห็นลักษณะของโคโลนีได้ จึงสามารถใช้กระบวนการประมวลผลภาพในการตรวจนับจำนวนโคโลนี ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีในโปรแกรม Python

รูปแสดงการตรวจนับโคโลนี	คำอธิบายผลการทดลอง
	**ความเข้มข้น 10^{-6}** ออกแบบให้กรอบวงกลมสีเขียวคือรัศมีในการตรวจจับของแต่ละโคโลนี จากผลการทดลองโปรแกรม พบว่าสามารถตรวจจับโคโลนีได้ 112 โคโลนี

ตารางที่ 4.4 ผลการตรวจนับจำนวนโคโลนีในโปรแกรม Python(ต่อ)

	**ความเข้มข้น** 10^{-7} ออกแบบให้กรอบวงกลมสีเขียวคือรัศมีในการตรวจจับของแต่ละโคโลนี จากผลการทดลองโปรแกรม พบว่าสามารถตรวจจับโคโลนีได้ 29 โคโลนี
	**ความเข้มข้น** 10^{-8} ออกแบบให้กรอบวงกลมสีเขียวคือรัศมีในการตรวจจับของแต่ละโคโลนี จากผลการทดลองโปรแกรม พบว่าสามารถตรวจจับโคโลนีได้ 10 โคโลนี
	**ความเข้มข้น** 10^{-9} ออกแบบให้กรอบวงกลมสีเขียวคือรัศมีในการตรวจจับของแต่ละโคโลนี จากผลการทดลองโปรแกรม พบว่าสามารถตรวจจับโคโลนีได้ 4 โคโลนี
	**ความเข้มข้น** 10^{-10} ออกแบบให้กรอบวงกลมสีเขียวคือรัศมีในการตรวจจับของแต่ละโคโลนี จากผลการทดลองโปรแกรม พบว่าสามารถตรวจจับโคโลนีได้ 1 โคโลนี

4.7 ตารางแสดงผลการตรวจนับโคโลนีด้วยโปรแกรมเทียบกับนับด้วยตาเปล่า

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 ผลการออกแบบเครื่องตรวจนับโคโลนีอย่างง่าย

ส่วนประกอบของเครื่องตรวจนับโคโลนี

รูปที่ 4.3 ส่วนประกอบของเครื่องตรวจนับโคโลนีอย่างง่าย

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

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและปัญหาที่เกิด

5.1 สรุปผลการทดลอง

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และทำการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น เพื่อนำมาเป็นตัวอย่างในการใช้โปรแกรมที่ออกแบบตรวจนับจำนวนโคโลนีงที่เกิดขึ้น โดยใช้เทคนิคการประมวลผลภาพในการตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการประดิษฐ์เครื่องตรวจนับจำนวนโคโลนีอย่างง่ายโดยใช้ Raspberry Pi เป็นตัวประมวลผลของโปรแกรมและแสดงผลการนับจำนวนโคโลนีทางหน้าจอ ซึ่งจากการทดสอบโปรแกรมในเครื่องตรวจนับโคโลนีอย่างง่ายพบว่าโปรแกรมมีความถูกต้องแม่นยำในการนับจำนวนโคโลนีที่ความเข้มข้นของแบคทีเรียที่มีปริมาณไม่หนาแน่นมากกว่าที่ความเข้มข้นของแบคทีเรียที่มีปริมาณหนาแน่น เนื่องจากที่ความเข้มข้นที่มีปริมาณแบคทีเรียมากมีลักษณะโคโลนีที่มีการเชื่อมต่อกันเป็นจำนวนมาก ทำให้เมื่อปรับจากภาพสีเป็นภาพขาวดำจะมีพื้นที่บางบริเวณที่ขาดหายไปหรือมีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้โปรแกรมไม่สามารถตรวจนับวงกลมโคโลนีหรือกำหนดจุดเซนเตอร์ของพื้นที่นั้นๆ เพื่อทำการนับจำนวนได้ จึงส่งผลให้โปรแกรมมีค่าความผิดพลาดมากที่ระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียสูงและโปรแกรมมีความถูกต้องแม่นยำที่ระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียต่ำ

5.2 ปัญหาที่เกิดขึ้นและแนวทางแก้ไข

ปัญหาที่เกิดขึ้นในส่วนของโปรแกรมการตรวจนับจำนวนโคโลนี พบว่ายังไม่สามารถตรวจนับจำนวนโคโลนีได้ถูกต้องแม่นยำในความเข้มข้นที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียสูง เนื่องจากความละเอียดของกล้องเว็บแค็มที่ใช้ถ่ายภาพโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออาจมีความคมชัดไม่ละเอียดมากพอ จึงทำให้เมื่อแปลงภาพสีเป็นภาพขาวดำแล้ว อาจทำให้เห็นรายละเอียดจำนวนโคโลนีไม่ครบถ้วนหรืออาจมีบางส่วนที่ขาดหายไป จึงส่งผลให้โปรแกรมไม่สามารถตรวจนับโคโลนีได้อย่างถูกต้องแม่นยำ อีกทั้งผู้ทดลองเองยังมีความรู้ความเชี่ยวชาญไม่มากพอในกระบวนการประมวลผลภาพขั้นสูง จึงอาจทำให้โปรแกรมที่ออกแบบยังมีความถูกต้องสมบูรณ์ไม่มากพอจึงทำให้นับจำนวนโคโลนีคลาดเคลื่อนได้ และในบางครั้งผลการตรวจนับจำนวนโคโลนี อาจจับบริเวณรอบๆ ขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อบางบริเวณ สามารถแก้ไขได้โดยกำหนดจุดศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อและกำหนดรัศมีในการตรวจนับจำนวนโคโลนีภายในรัศมีที่กำหนดเท่านั้น ซึ่งคาดว่าสามารถลดความผิดพลาดในการตรวจจับบริเวณส่วนของขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้

5.3 แนวทางการพัฒนา

ออกแบบโปรแกรมในการตรวจนับจำนวนโคโลนีให้สามารถตรวจนับจำนวนโคโลนีให้ได้ถูกต้องแม่นยำมากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้แล้ว จากนั้นสามารถทำการพัฒนาโปรแกรมให้สามารถตรวจคัดแยกลักษณะที่แตกต่างกันของโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ปะปนอยู่บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้โดยใช้กระบวนการประมวลผลภาพขั้นสูงเพื่อที่จะสามารถแยกชนิดที่แตกต่างกันของโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงทำการเก็บข้อมูลลักษณะที่แตกต่างกันของโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ประเภทต่างๆ เพื่อเป็นฐานข้อมูลให้กับโปรแกรมให้สามารถจดจำรายละเอียดลักษณะของของโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ได้มากยิ่งขึ้น และเมื่อใช้โปรแกรมนี้ในการตรวจจับชนิดของโคโลนีจะสามารถนับจำนวนและแยกประเภทของโคโลนีที่เกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้

บรรณานุกรม

[1] นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ สังกัด คณะวิทยาศาสตร์ มศว.ประสานมิตร และ ปรีชา สุวรรณพินิจ สังกัด คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2557. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 10. กรุงเทพ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

[2] สมเกียรติ อุดมหรรษากุล. 2553. การประมวลผลภาพดิจิตอลเบื้องต้น พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ฉัตรชัยศรชัยและ พิมพ์พันธุ์ เลียงพิบูลย์ 2529. คู่มือปฏิบัติการวิชา Medical Bacteriology (MTMI 301) ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยมหิดล พิมพ์ครั้งฐี่ 1.

"แบคทีเรีย" [Online]
Available: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0197/bacteria. 2561.

"จุลชีววิทยาทั่วไป" [Online] Available: http://anonmicrobiology.blogspot.com. 2561.

"การประมวลผลภาพดิจิตัล" [Online]
Available: http://www.ecpe.nu.ac.th/panomkhawn/imagepro/pdf/ch01.pdf. 2561.

"จุด Centroid" [Online] Available: http://www.ajmanut.com/attachments/article. 2561.

'Circular Hough Transform" [Online]
Available: http://projectlab.co.th/2017/06/04/opencv-hough-circle-transform. 2561.

"Edge Detection" [Online]
Available: https://candokamera.wordpress.com/edge-detection. 2561.

"Watershed Transform" [Online]
Available: http://staff.cs.psu.ac.th/sathit/344-671/Image%20Segmentation.pdf. 2561.

"บอร์ด Raspberry-Pi-3" [Online]
Available: https://www.allaboutcircuits.com/uploads/articles/Raspberry-Pi-3. 2561.

นิธิยา รัตนาปนนท์. "จุลชีววิทยาทั่วไป" [Online]
Available: http://www.foodnetworksolution.com. 2561.

Jack Bresenham. A linear algorithm for incremental digital display of circular arcs. Communications of the ACM February, Volume 20, Number 2, February 1977.

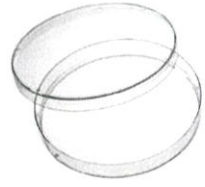
Chester F. Carlson. Lecture 10: Hough circle transform. Rochester Institute of Technology: Lecture Notes, October 11, 2005.

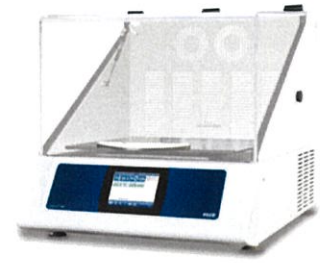
Rafael C. Gonzalez and Richard E. Woods. Digital Image Processing. Prentice Hall, 2007. ISBN 0-13-168728-x.

ภาคผนวก

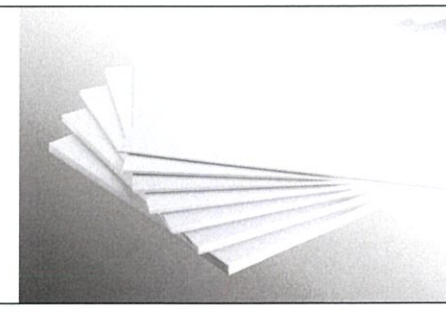
เครื่องมือและอุปกรณ์

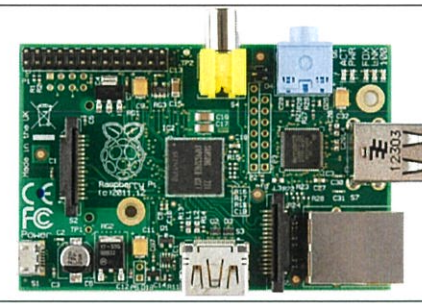
3.1.1 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการเจือจางเชื้อจุลินทรีย์สำหรับตัวอย่างเริ่มต้น

1. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Inoculating loop)	
2. ตะเกียงแอลกอฮอล์	
3. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)	
4.แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (Spreader)	
5. หลอดเลี้ยงเชื้อ (Culture tube)	

6. ไมโครปิเปต (Micropipette)	
7.ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Clean Bench)	
8. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	
9. ตู้เย็น (Refrigerator)	

3.1.2 เครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการสร้างเครื่องตรวจนับโคโลนี

1.แผ่นพลาสวูด	

2.หม้อแปลงไฟ 220v เป็น 12v	
3.ไฟ LED strip	
4.Raspberry pi Board	
5.จอ LCD Raspberry pi	