

การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *Escherichia coli* บนผักกาดหอมด้วยวิธีการประมวลผลภาพ Analysis of *Escherichia coli* Contamination on Lettuce Using Image Processing

ภัทรพงษ์ สุหนองบัว¹ จินตพร กลิ่นสุข¹ นัฐพิชชน บุตรี¹ สุวรรณ เอกรัมย์¹ จรูญศักดิ์ สมพงษ์¹ และ วีระศักดิ์ เลิศศิริโยธิน¹
Pattarapong Sunongbua¹, Jintaphorn Klinsuk¹, Natphichon Budtri¹, Suwan Aekrum¹, Charoonsak Somphong¹
and Weerasak Lertsiriyothin¹

Abstract

The contamination of pathogen on food and postharvest agricultural products often causes of danger for consumers. This research aims to develop a fast screening method for detection of pathogen contamination area on lettuce using image processing. Lettuce leaf surface was washed with surfactant and inoculated by drops of *Escherichia coli* (*E. coli*) solution (ca. 2.7×10^9 CFU.ml⁻¹). Each inoculation drop area contained a number of *E. coli* which was equivalent to 1.1×10^3 CFU.ml⁻¹. pixel⁻¹. All samples were stored at 8 °C. Then the production of biofilm or adhesion structure of microorganisms on the leaf surface was investigated based on image of the stained sample. Emissive light of the specific wavelength at 620 ± 10 nm as a result of PI fluorescence staining solution with *E. coli* was able to capture by a digital single-lens reflex (DSLR) camera fitted with a long pass filter at a wavelength of more than 530 nm. The reflectance spectra showed clearly absorption band at 620 ± 10 nm which responded for the biofilm of *E. coli* contamination. Moreover, it corresponded to results of confocal laser scanning microscope (CLSM) method. The image of contamination area on lettuce leaf was related to the incremental number of *E. coli* about 1.3×10^5 CFU.ml⁻¹ after it was inoculated for 5 days.

Keywords: *Escherichia coli*, contamination, image processing

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว หากบริโภคเข้าไปอาจส่งผลทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบการแพร่กระจายของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคบนผักกาดหอมด้วยวิธีการประมวลผลภาพถ่าย โดยนำใบผักกาดหอมล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวและหยดเชื้อ *E. coli* ปริมาณ 2.7×10^9 CFU.ml⁻¹ ลงบนใบผักกาดหอม โดยแต่ละฟลักเซลมีจำนวนเชื้อ *E. coli* 1.1×10^3 CFU.ml⁻¹.pixel⁻¹ และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ซึ่งก่อให้เกิดไบโอฟิล์มหรือโครงสร้างยึดเกาะกับพื้นผิวที่ถูกสร้างโดยกลุ่มของจุลินทรีย์ที่อยู่รวมกันบนใบผักกาดหอม จากนั้นจึงตรวจสอบโดยใช้ค่าสเปกตรัมของการสะท้อนภาพถ่ายสีภายใต้สภาวะความยาวคลื่นแสงที่กระตุ้นการตอบสนองของเชื้อที่ย้อมด้วยสารละลาย PI ด้วยการแปลงแสงออกมาที่ความยาวคลื่น 620 ± 10 นาโนเมตร โดยแสงที่แปลงออกมานั้นจะถูกถ่ายด้วยกล้อง DSLR ผ่านเลนส์ที่กรองด้วยฟิลเตอร์ในช่วงความยาวคลื่นสูงกว่า 530 นาโนเมตรสามารถผ่านได้ จึงทำให้ค่าของสเปกตรัมการสะท้อนที่ได้จากภาพถ่ายแต่ละฟลักเซลมีแถบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 ± 10 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นที่ไบโอฟิล์มของ *E. coli* เปล่งแสงสะท้อนช่วงเดียวกันกับการตรวจสอบด้วยวิธี CLSM และพบว่าพื้นที่การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* บนผักกาดหอมหลังจากการหยดเชื้อ 5 วัน เพิ่มขึ้นถึง 1.3×10^5 CFU.ml⁻¹

คำสำคัญ: *Escherichia coli* การปนเปื้อน การประมวลผลภาพ

คำนำ

ผักเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ เช่น วิตามิน ธาตุเหล็ก และเส้นใยต่างๆ เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันการบริโภคผักเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายในหมู่ผู้บริโภคโดยเฉพาะการบริโภคผักสด เช่น การบริโภคพร้อมสลัดหรือการบริโภคโดยตรง เป็นต้น ซึ่งผักสดที่ใช้ในการบริโภคนั้นไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจึงอาจส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของสารเคมีและจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ เช่น การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* เป็นต้น นอกจากนี้ในการส่งออกผักสดมีการตรวจพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผักสดโดยประเทศผู้นำเข้าที่มีค่าการปนเปื้อนเกินค่ามาตรฐานอาจส่งผลทำให้เกิด

¹สาขาวิชาวิศวกรรมเกษตร สำนักวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, จังหวัดนครราชสีมา, 30000

¹School of Agricultural Engineering, Institute of Engineering, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000

ปัญหาการส่งออกที่ชะงักงันได้ ดังนั้นเพื่อการบริโภคผักสดที่มีความสะอาดและปลอดภัย การตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและผลิตภัณฑ์เกษตรหลังการเก็บเกี่ยวจึงมีความสำคัญ เนื่องด้วยเทคนิคการประมวลผลภาพนั้นสามารถประเมินการปนเปื้อนของจุลินทรีย์บนผักได้ในบริเวณที่กว้าง ลดการสัมผัสกับตัวอย่างและมีความรวดเร็วในการประมวลผล ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อน *E. coli* บนผักกาดหอมและการตรวจสอบการแพร่กระจายของการปนเปื้อนด้วยเทคนิคการประมวลผลภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมผักกาดหอม

นำผักกาดหอมจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มาล้างทำความสะอาด จากนั้นจุ่มลงไปนในสารลดแรงตึงผิว (Latron CS-7 100 ความเข้มข้น 100 ppm) เพื่อลดแรงตึงผิวบนใบและเพิ่มประสิทธิภาพการยึดเกาะของจุลินทรีย์ จากนั้นหยด *E. coli* (*Escherichia Coli* TISTR 527 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) ปริมาณ 2.7×10^9 [CFU.ml⁻¹] ลงบนใบผัก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส บันทึกการเปลี่ยนแปลงทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน เพื่อประเมินระดับความเสียหายของผักอันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ จากนั้นเมื่อผักเกิดการเปลี่ยนแปลงอันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ นำมาล้างด้วยน้ำ DI sterile จำนวน 3 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อให้น้ำแห้ง และหยดสารย้อม PI (propidium iodide excitation/emission ที่ 533-617 nm) ลงไปบริเวณที่มีคราบ จำนวน 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องโดยห้ามไม่ให้โดนแสง จากนั้นเอียงใบเพื่อเอาสารย้อมที่ไม่ติดกับใบออก แล้วตัดใบให้มีขนาดเล็กเพื่อปิดแผ่นกระจกสไลด์ นำไปวัดด้วยเครื่อง CLSM

2. กระบวนการประมวลผลภาพ

2.1 กระบวนการถ่ายภาพผักกาดหอม

ภาพถ่ายผักกาดหอมที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้อง DSLR Nikon D7200 และเลนส์ 18-140 mm ผ่านฟิลเตอร์กรองแสงที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 530 นาโนเมตรไม่สามารถผ่านได้การใช้ฟิลเตอร์ โดยการถ่ายภาพภายใต้ระบบถ่ายภาพที่ปิดด้วยแผ่นรีเฟลคเตอร์สะท้อนแสง (สุวรรณและคณะ, 2559) และแหล่งกำเนิดแสง 2 ชนิด คือ แหล่งกำเนิดแสง daylight (D65) และแหล่งกำเนิดแสง green ซึ่งถ่ายภาพที่ตำแหน่งเดียวกันแบ่งออกเป็น 3 ภาพ คือ 1. ถ่ายไม่ผ่านฟิลเตอร์กรองแสงภายใต้แหล่งกำเนิดแสง D65 2. ถ่ายผ่านฟิลเตอร์กรองแสงภายใต้แหล่งกำเนิดแสง D65 และ 3. ถ่ายผ่านฟิลเตอร์กรองแสงภายใต้แหล่งกำเนิดแสง Green

2.2 วิธีการประมวลผลภาพ

ภาพถ่ายผักกาดหอมที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.1 ทั้ง 3 ภาพที่ตำแหน่งเดียวกันถูกนำมาประมวลผลภาพโดยใช้โปรแกรม MATLAB โดยกระบวนการประมวลผลภาพเริ่มจากการนำค่า RGB ของภาพถ่ายทั้ง 3 ภาพแปลงค่าให้อยู่ในระบบ Standard RGB (sRGB) หรือ r, g และ b ด้วยสมการที่ 1 (ASTM, 2001) เมื่อได้ค่า sRGB จากนั้นแปลงค่า sRGB ไปสู่ปริภูมิ XYZ ด้วยสมการที่ 2 (ASTM E308-01)

$$r, g, b = \begin{cases} (((R, G, B/255) + 0.055)/1.055)^{2.4}, & R, G, B/255 > 0.04045 \\ (R, G, B/255)/12.92, & R, G, B/255 \leq 0.04045 \end{cases} \quad (1)$$

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = 100 \times \begin{bmatrix} 0.4124564 & 0.3575761 & 0.1804375 \\ 0.2126729 & 0.7151522 & 0.0721750 \\ 0.0193339 & 0.1191920 & 0.9503041 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} r \\ g \\ b \end{bmatrix} \quad (2)$$

เมื่อได้ค่า XYZ จากนั้นทำการคำนวณค่า reflectance spectrum ($R(\lambda)$) ของภาพถ่ายที่ถ่ายผ่านฟิลเตอร์กรองแสงภายใต้แหล่งกำเนิดแสง Green ด้วยฟังก์ชัน Fsolve ของ MATLAB ในการประมาณค่า $R(\lambda)$ จากสมการที่ 3 (ASTM E308-01) โดยมีค่า $R(\lambda)$ ของภาพถ่ายผ่านฟิลเตอร์ภายใต้แหล่งกำเนิดแสง D65 เป็นค่าเริ่มต้นของการประมาณค่า

$$X = \sum_{400}^{700} W_x R(\lambda) \Delta \lambda, \quad Y = \sum_{400}^{700} W_y R(\lambda) \Delta \lambda \quad \text{และ} \quad Z = \sum_{400}^{700} W_z R(\lambda) \Delta \lambda \quad (3)$$

โดย W_x , W_y และ W_z คือ ค่า weight factor ตามมาตรฐานการส่องสว่างของ CIE

2.3 การคำนวณบริเวณการปนเปื้อน

การคำนวณบริเวณในการปนเปื้อนด้วยการวิเคราะห์ค่า $R(\lambda)$ แต่ละพิกเซลของภาพถ่ายที่ได้จากขั้นตอนการประมวลผลภาพขั้นตอนที่ 2.2 โดยให้พิกเซลที่มีจุดเด่นที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ซึ่งอ้างอิงจากการวัดด้วย Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) คือ บริเวณพิกเซลที่ปนเปื้อน จากนั้นคำนวณหาค่าประมาณการปนเปื้อนต่อพิกเซล [CFU.ml⁻¹.pixel⁻¹] บนผักกาดหอมจากสมการที่ 4

$$\text{จำนวน CFU/Pixel} = \frac{N_0}{\text{pixel}} \left[\frac{C F U}{m l . p i x e l} \right] \tag{4}$$

โดย N_0 คือ จำนวน *E. coli* ที่หยดลงบนใบผักกาดหอม [CFU.ml⁻¹]

จากนั้นเมื่อได้ค่าการปนเปื้อน *E. coli* ต่อพิกเซล จึงสามารถคำนวณหาค่าประมาณการการเปลี่ยนแปลงของการปนเปื้อน *E. coli* บนผักกาดหอมได้จากสมการที่ 5

$$\text{จำนวน CFU} = \text{จำนวน pixel} \times \text{จำนวน CFU / pixel} \left[\frac{C F U}{m l} \right] \tag{5}$$

ผล

1. ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนด้วยวิธี CLSM

เมื่อทำการเตรียมตัวอย่างจากนั้นนำไปวัดด้วย CLSM พบว่าสเปกตรัมมีแถบการดูดกลืนแสงชัดเจนที่ช่วงความยาวคลื่น คือ 610.17-628.14 nm และ 680.30-688.31 nm (Figure 1)

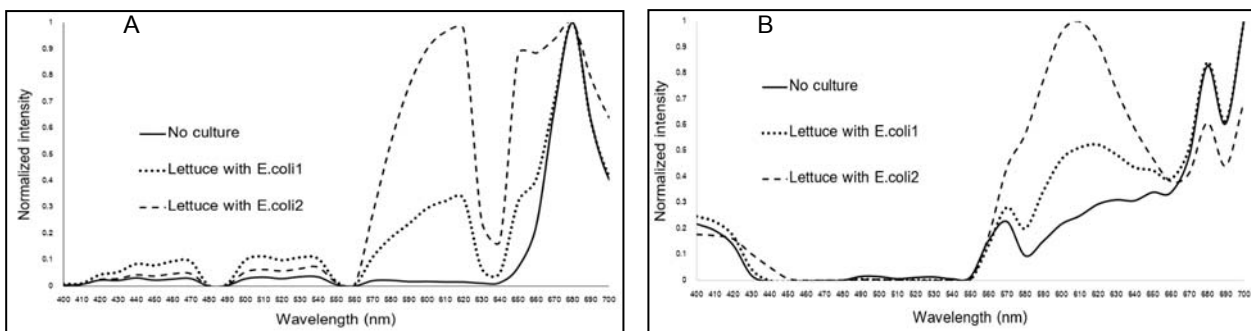


Figure 1 The emission spectrum of *E. coli* contamination and autofluorescence from (A) confocal laser scanning microscope (CLSM) and (B) image processing.

2. ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนด้วยวิธี image processing

ผลของการถ่ายภาพผักกาดหอมในระบบถ่ายภาพภายใต้แหล่งกำเนิดแสง D65 และ green แสดงใน Figure 2A และ 2B ตามลำดับ จากนั้นถ่ายภาพโดยใช้ฟิลเตอร์กรองแสงและภายใต้แหล่งกำเนิดแสง green (2C) พบว่าสามารถแยกบริเวณที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* และบริเวณที่ไม่มีเชื้อ *E. coli* บนใบผักกาดหอมได้อย่างชัดเจน (Figure 2D and 2E) ตามลำดับ

เมื่อได้ภาพถ่ายผักกาดหอมจากการถ่ายภาพ จากนั้นนำภาพถ่ายเข้าสู่กระบวนการประมวลผลภาพโดยผลของการประมวลผลค่าสเปกตรัมที่ได้จากการประมวลผลภาพแสดงแถบการดูดกลืนแสงของบริเวณที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ที่ความยาวคลื่น 620±10 nm ซึ่งมีค่าเฉลี่ย normalized intensity เท่ากับ 0.5±0.02 และบริเวณที่ไม่มีเชื้อ *E. coli* มีค่าเฉลี่ย normalized intensity เท่ากับ 0.29±0.07 หรืออาจไม่แสดงแถบการเปล่งแสงที่ความยาวคลื่นนี้ (Figure 1B)

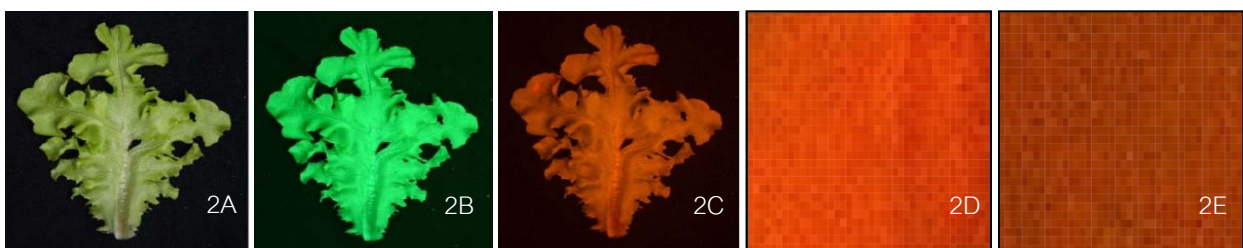


Figure 2 The image of Lettuce in (2A) D65, (2B) Green illuminant without filter, (2C) Green illuminant without filter with filter. The image of (2D) Contamination area and (2E) Non-Contamination area on Lettuce leaf.

3.ประสิทธิภาพการตรวจสอบการปนเปื้อน

จากการประมวลผลภาพถ่าย พบว่าบริเวณที่มีการหยดเชื้อลงทั้งบริเวณบนใบผักกาดหอม เมื่อทำการประมวลผลภาพออกมาให้ผลเฉลี่ยของบริเวณที่มีการปนเปื้อนร้อยละ 85.25 (Figure 3) ซึ่งเป็นบริเวณของการปนเปื้อนทั้งหมดโดยบริเวณสีแดง คือ บริเวณที่ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนได้



Figure 3 The contamination area was detected by image processing.

วิจารณ์ผล

ผลของการวัดสเปกตรัมของบริเวณที่มีการปนเปื้อนและไม่มีการปนเปื้อน *E. coli* ด้วย CLSM พบว่าสเปกตรัมมีแถบการดูดกลืนแสงชัดเจนในช่วงความยาวคลื่น 680.30-688.31 nm คือ การตอบสนองของคลอโรฟิลล์หรือ chloroplast autofluorescence ที่ความยาวคลื่น 680 nm (Kodama, 2016) และในช่วงความยาวคลื่น 610.17-628.14 nm พบเฉพาะในบริเวณที่มีการปนเปื้อนเท่านั้น นั่นคือ การตอบสนองของไบโอฟิล์ม *E. coli* เมื่อประมวลผลภาพถ่ายของบริเวณที่มีการปนเปื้อนและไม่มีการปนเปื้อน *E. coli* พบว่าสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวให้ผลที่สอดคล้องกับผลของ CLSM โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.95 ดังนั้นการแยกบริเวณที่มีการปนเปื้อนและไม่มีการปนเปื้อน *E. coli* จึงสามารถแยกได้โดยการใช้ค่า normalized intensity ที่ 620 ± 10 nm เท่ากับ 0.5 ± 0.02 คือ บริเวณที่มีการปนเปื้อน *E. coli*

ผลของการคำนวณบริเวณการปนเปื้อน *E. coli* บนผักกาดหอมโดยการนับพิกเซลของภาพถ่ายและใช้สมการที่ 5 ในการคำนวณบริเวณของการปนเปื้อนในรูปของ CFU.ml⁻¹ เมื่อทำการเตรียมเชื้อ *E. coli* ปริมาณ 2.7×10^9 [CFU.ml⁻¹] แล้วหยดลงบนใบผักกาดหอม จากนั้นทำการประมวลผลภาพถ่าย และนำจำนวนของพิกเซลที่มีการปนเปื้อนมาคำนวณหาจำนวนเชื้อด้วยสมการที่ 4 พบว่าบริเวณที่ทำการหยดเชื้อลงบนใบผักกาดหอมมีจำนวนเชื้อ 1.1×10^3 [CFU.ml⁻¹.pixel⁻¹] และติดตามผลของการเพิ่มขึ้นของเชื้อหลังจากการปรมตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน เมื่อนำมาคำนวณบริเวณการปนเปื้อนจากการประมวลผลภาพถ่ายจากสมการที่ 5 พบว่ามีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นถึง 1.3×10^5 CFU.ml⁻¹

สรุปผล

วิธีการประมวลผลภาพสามารถแยกบริเวณที่มีการปนเปื้อนและไม่มีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* บนผักกาดหอม โดยการใช้สเปกตรัมความยาวคลื่น 620 ± 10 nm และสามารถคำนวณบริเวณของการปนเปื้อนเมื่อเวลาผ่านไปได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่สนับสนุนทุนวิจัยและสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ทำการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- สุวรรณ เอกภมย์, จินตพร กลิ่นสุข และ วีระศักดิ์ เลิศสิริโยธิน. 2559. การวัดสีผักกาดหอมพันธุ์กรีนไช้ด้วยเทคนิคการประมวลผลภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 47(3 พิเศษ): 417-420.
- ASTM. 2001. Standard Practice for Computing the Colors of Objects by Using the CIE System. ASTM E308-01. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- Kodama, Y. 2016. Time Gating of Chloroplast Autofluorescence Allows Clearer Fluorescence Imaging In Planta. PLOS ONE11(3).