

手机拍照图像快速实现菌落计数

黄晓辉¹, 徐炜祯², 冯立国¹, 许东^{2*}

(1. 湖南省食用菌研究所, 长沙 410013; 2. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 长沙 410004)

摘要: **目的** 建立利用手机拍照, ImageJ 软件自动实现菌落计数的方法。**方法** 以大肠杆菌为测试菌, 按照 GB 4789.2—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》方法, 获得菌落平板, 手机拍照后, 用 ImageJ 软件计数。并以井水、酒店预制菜、麻辣鱼仔熟食为样本比较了人工计数与 ImageJ 软件计数的差异性。**结果** Image 软件能对拍照后的菌落平板快速计数; 人工计数和 ImageJ 软件计数结果无显著差异。**结论** 本方法可重复性高, 耗时短, 克服了人工计数的缺点, 保证检测溯源可查, 有希望成为未来食品安全大数据体系数据采集端口。

关键词: 菌落数量; 图像处理; ImageJ 软件; 食品安全

Research on quickly realizing colony counting with mobile phone photo images

HUANG Xiao-Hui¹, XU Wei-Zhen², FENG Li-Guo¹, XU Dong^{2*}

(1. Hunan Edible Fungi Institute, Changsha 410013, China; 2. Department of Food Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for taking pictures by mobile phone and to realize colony counting automatically by using ImageJ software. **Methods** *Escherichia coli* was used as the test bacteria, according to GB 4789.2-2016 *National food safety standard-Food microbiology inspection-Determination of total colony count*, colonies were obtained on the tablet and photographed on the phone, then were counted by ImageJ software. The differences between manual counting and ImageJ software counting were compared using well water, hotel prepared dishes, and spicy fish cooked food as samples. **Results** Image software could quickly count colony plates after taking pictures. There was no significant difference between the results of manual counting and ImageJ software ($P>0.05$). **Conclusion** The method has high repeatability and short time consumption, overcomes the shortcomings of manual counting. It ensures the traceability of the detection source, and is expected to become a data collection port for the future food safety big data system.

KEY WORDS: number of colonies; picture processing; ImageJ software; food safety

1 引言

细菌总数和大肠菌群是食品污染变质的重要检验指标之一, 是评价食品卫生质量必不可少的依据^[1]。菌落总

数的测定也是农业、食品、医学等行业中普遍需要进行检测的项目之一。我国菌落总数检测遵循国标 GB 4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[2]主要采用平板计数法, 平板计数法是统计物

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1604001)、国家自然科学基金项目(21505162、31571874)、湖南省自然科学基金项目(2016JJ3183)

Fund: Supported by National Key R & D Plan (2018YFC1604001), National Natural Science Foundation of China (21505162, 31571874), Natural Science Foundation of Hunan (2016JJ3183)

*通讯作者: 许东, 副教授, 主要研究方向为食品安全。E-mail: philip198349@gmail.com

*Corresponding author: XU Dong, Associate Professor, No. 498, Shaoshannan Road, Yuhua District, Changsha, 410004, China. E-mail: philip198349@gmail.com

品含菌数的有效方法,其优点是将待测样品稀释涂布到平板上,经过培养后,每一个单细胞能生长繁殖成肉眼可见的菌落,通过人为菌落数的统计,根据稀释倍数换算出样品中的含菌数,此操作简单方便、不需要高端仪器设备,对技术人员的专业化程度要求不高;其缺点是平板计数通过人工肉眼计数,当菌落数量较多时,这种人工计数的方法往往具有一定的主观性、测定效率低、误差较大、可重复性较差,复查难度大,原始数据不能保存等问题。

近几年,随着计算机与图像分析技术的发展,计算机视觉技术在食品品质检测领域的范围逐渐扩大,也提高了食品品质检测的工作效率。计算机视觉技术以图像处理技术为核心,利用相机达到再现或模拟人类视觉获取图像,再用电脑识别和分析目标物体^[3],在不同领域目标体自动计数的应用都取得了较好的效果。如李季等^[4]利用计算机视觉技术对枸杞虫害计数方法进行研究,准确率达到92.3%;曹旨昊等^[5]开发了基于Android的粘虫板害虫计数系统,该系统统计结果与人工统计结果相比,相对误差率在-6.7%~4.1%。王文静等^[6]设计了一种基于计算机视觉的鱼苗自动计数系统,该系统能够对水中幼苗总量进行测定的相对误差控制在15%以内,具有较高的精度。

ImageJ 软件是一款由美国国立卫生研究院开发的基于java 的公共图像处理软件,已经在生物学单分子领域获得广泛应用^[7-9]。Özer 等^[10]利用 ImageJ 自动量化经过荧光标记或荧光抗体染色的囊泡结构,省时且高效。Michael 等^[11]利用基于 ImageJ 宏开发的 MyelinJ 软件对 2D 髓鞘荧光显微照片进行高通量分析,结果表明 MyelinJ 软件可以分析单个图像或在多种条件下进行的试验。但关于手机拍照技术与 ImageJ 软件结合应用于菌落总数的计算研究相对较少。

本研究使用手机对埃希大肠杆菌菌落进行拍照,通过 ImageJ 软件对图像处理和分析,能够获得埃希大肠杆菌的总菌落数量等参数。并对人工肉眼统计和 ImageJ 软件统计进行了对比分析,证明了 ImageJ 软件统计在菌落的外观品质相关特征量和菌落总数的测定上具有方便、快捷、数据准确的优点,减少大量不必要的人工劳动。该方法可重复性高,耗时短,克服了人工计数的缺点,保证检测溯源可查,为今后微生物菌落总数的测定提供新思路。

2 材料与方 法

2.1 试剂、仪器与材料

埃希大肠杆菌、红四唑琼脂(triphenyl-2H-tetrazolium chloride, TTC)(广东环凯微生物科技有限公司);磷酸盐缓冲液(pH 7.2)、无菌生理盐水(0.85%)(国药集团);蒸馏水(实验室自制)。

GXZ-0450 智能生化培养箱(台湾斯特仪器设备有限公司);XS105DU 天平(精度 0.0001 g,瑞士梅特勒-托利多公司);Iphone7 手机(实际上具有拍照功能即可,美国苹果公司)。

水、酒店预制菜(炒酸菜)、麻辣鱼仔熟食均为本地随机采集。

2.2 细菌培养

本研究将埃希大肠杆菌作为检测菌落种类。参照国标菌落总数测定方法^[2]及蔡爱君^[12]研究中采用的 TTC 培养琼脂进行平板菌落的培养。首先将不同稀释倍数的样品溶液匀液于无菌琼脂培养皿中,及时倒入冷却至 46 °C 的 TTC 培养基 20 mL,同时用磷酸盐缓冲液作为对照组,在 37 °C 条件下培养 48 h。

2.3 图像采集

在日常光照下,避免出现阴影,将完成培养的培养皿倒扣放置于黑色实验桌面上,用手机支架将其固定,置于培养皿正上方 20 cm 处进行拍照。

2.4 图像处理

将手机拍照后的图像传入电脑后,用 ImageJ.exe 软件打开图片,设定图像标尺、调节图像对比度和调整图像临界值,使用 Analyze particles 插件自动给出埃希大肠杆菌总菌落数量的参数。将数值导入 Origin 中对数据结果统计分析。

2.5 结果对比

2.5.1 人工计数方法

选取菌落数在 30~300 CFU 之间的平板作为菌落总数测定,同时采用 2 个相同稀释度平板的平均数作为最后结果。在测量时菌落连成片状则平板弃之不用,如有链状菌落时,一条链可视为一个菌落^[13]。

2.5.2 ImageJ 软件计数

按照 2.4 步骤进行图像采集后,用 ImageJ 软件自动计数。

2.6 2 种计数方式的比较

对井水、酒店预制菜(炒酸菜)、麻辣鱼仔熟食按照国标 GB /4789.2-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》进行菌落总数测定的方法进行平板准备,对平板分别采用人工和 ImageJ 软件计数,用 SPSS22 进行单因素差异显著性检验。

3 结果与分析

3.1 ImageJ 计数

拍照效果如图 1 所示。将图片导入电脑中,用 ImageJ 软件将图片打开,调节图像对比度和临界值,用于区分菌落和背景。先通过软件命令:Image→Type→8bit,将图像转变为黑白图,然后通过 Image→Ajust→Brightness/Contrast→Auto 打开窗口后自动调节对比度,最后通过 Image→Ajust→Threshold 调整临界值。结果如图 2 所示,经过调节后菌落为红色,背景为灰白色。同时我们也看到,培养皿的边缘,由于照明原因,也有部分呈现红色。

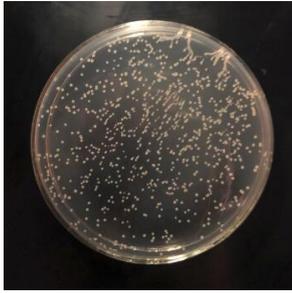


图 1 菌落总数计数培养皿

Fig.1 Petri dish for total colony counting

点击命令自动给出数据结果。打开 Analyze→Analyze particles 设置窗口, 将待测尺寸范围设置为 2-Infinity, 点击 OK, 得到所有菌落的尺寸数据。需要指出的是, 设定待测范围大于 2 个像素, 是为了进一步与背景噪音分开。

计算后也给出了所有的菌落的面积、周长、直径及总菌落数量等参数, 如表 1 所示。最大序号即为总菌落数。

3.2 不同方式菌落计数情况

从表 2 的结果可以看出, 在 3 种样品中人工计数和 ImageJ 软件计数的菌落总数均无显著差异, 说明我们提出的手机拍照进行菌落计数的方法可以达到手工计数方法的效果, 但是理论上 ImageJ 软件计数准确性要明显优于人工计数的准确性。人工计数时, 由于测试人员具有一定的主观性、测定

效率低, 而且人工计数的结果是多次测量取平均值, 有可能在计数时漏计或者重复计数, 导致测试结果可重复性较差, 误差较大; 而 ImageJ 软件计数是利用相机拍照后由电脑自动计算出, 避免了人为的主观因素和误差。对于平板内菌落总数超过 800 的样本, 5 位实验人员平均耗时 2.4 min/样本, 而拍照只需 15 s, 进一步表明本研究的技术优势。

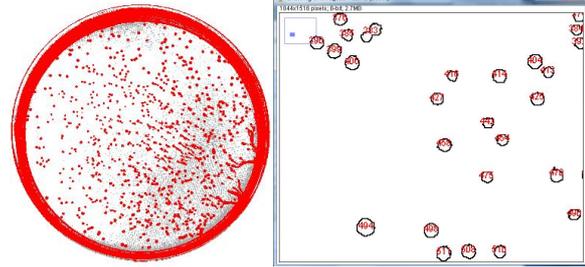


图 2 调整临界值后的图片

Fig.2 Pictures after adjusting threshold

4 结论

通过手机拍照结合 ImageJ 软件自动计数, 本研究提供了一种便捷、高效、准确、低成本的测定方法。测定结果明显优于人工检测, 方法简单方便, 使用成本低, 快速省时, 便于进一步推广, 在手机 app 开发后可以在相关企业和检测机构获得广泛的应用。

表 1 菌落计数数据结果(只列出部分)

Table 1 Results of bacterial colony counting (only partially listed)

序号	标签	面积	平均值 (像素 光强)	标准差 (像素 光强)	模式	最 小 值	最 大 值	X坐标 (菌斑 质心)	Y坐标 (菌斑 质心)	主轴长	次轴长	角度	光强 (菌斑)	原始 光强	张
1	IMG_6804-1.JPG	20	17.050	32.085	0	0	85	503.700	1376.050	5.500	4.630	171.420	341	341	1
2	IMG_6804-1.JPG	36	9.472	25.153	0	0	85	493.111	1372.500	8.722	5.255	5.635	341	341	1
3	IMG_6804-1.JPG	37	11.514	27.735	0	0	85	476.554	1368.122	12.477	3.776	13.849	426	426	1
4	IMG_6804-1.JPG	149	5, 711	20.773	0	0	85	714.581	1310.748	14.293	13.273	160.047	851	851	1
5	IMG_6804-1.JPG	194	3.289	16.148	0	0	85	822.191	1293.062	16.712	15.274	4.607	638	638	1
6	IMG_6804-1.JPG	169	5.036	19.585	0	0	85	542.719	1287.754	15.034	14.313	177.607	851	851	1
7	IMG_6804-1.JPG	158	5.652	20.972	0	0	85	492.291	1273.987	14.410	13.960	141.509	893	893	1
8	IMG_6804-1.JPG	203	5.448	20.437	0	0	85	684.180	1265.667	16.671	15.504	163.503	1106	1106	1
9	IMG_6804-1.JPG	209	4.072	17.713	0	0	85	924.510	1266.950	16.960	15.690	160.932	851	851	1
10	IMG_6804-1.JPG	187	0.455	6.126	0	0	85	879.329	1260.420	15.473	15.388	2.665	85	85	1
11	IMG_6804-1.JPG	341	4.117	17.834	0	0	85	547.523	1253.770	27.765	15.638	133.330	1404	1404	1
12	IMG_6804-1.JPG	204	6.044	21.695	0	0	85	580.946	1248.819	16.579	15.667	127.954	1233	1233	1
13	IMG_6804-1.JPG	191	5.120	20.042	0	0	85	483.961	1248.332	16.307	14.913	147.722	978	978	1
14	IMG_6804-1.JPG	125	3.400	16.724	0	0	85	901.620	1234.996	12.778	12.455	148.885	425	425	1
15	IMG_6804-1.JPG	499	3.325	16.162	0	0	85	820.035	1221.480	40.874	15.544	46.654	1659	1659	1
16	IMG_6804-1.JPG	82	3.634	16.645	0	0	85	526.890	1233.561	11.046	9.451	163.619	298	298	1
17	IMG_6804-1.JPG	175	5.349	20.192	0	0	85	628.060	1229.054	15.096	14.760	177.235	936	936	1
18	IMG_6804-1.JPG	269	6.955	23.052	0	0	85	425.017	1224.667	25.534	13.414	1.360	1871	1871	1
19	IMG_6804-1.JPG	157	7.038	23.500	0	0	85	728.150	1225.105	14.634	13.660	40.980	1105	1105	1
20	IMG_6804-1.JPG	226	1.319	10.139	0	0	85	956.429	1220.792	17.351	16.585	164.454	298	298	1

表 2 人工计数和软件计数对比
Table 2 Comparison between manual and software counting

样品	人工计数/(CFU/g)	ImageJ 软件计数/(CFU/g)
井水	28.6±1.1 A	28.4±0.5 A
酒店预制菜(炒酸菜)	291.8±4.3 A	302.4±5.2 A
麻辣鱼仔熟食	(19.6±2.6)×10 ² A	(18.8±1.6)×10 ² A

注: 相同字母代表无显著性差异。

参考文献

- [1] 田霞, 王春林. 分析微生物检验在食品检验中的重要性[J]. 食品安全导刊, 2017, (17): 72.
Tian X, Wang CL. Analyze the importance of microbiological testing in food inspection [J]. Chin Food Saf Mag, 2017, (17): 72.
- [2] 马群飞. GB 4789.15-2016《食品安全国家标准食品微生物学检验霉菌和酵母计数》标准解读[J]. 中国卫生标准管理, 2018, (5): 1-3.
Ma QF. Interpretation for GB 4789.15-2016 National food safety standard-Food microbiological examination-Enumeration of moulds and yeasts [J]. Chin Health Stand Manag, 2018, (5): 1-3.
- [3] 崔然. 浅析计算机视觉技术在农产品检测及分级中的应用[J]. 电子测试, 2013, (9): 274-275.
Cui R. Shallow of computer vision technology in the application of the agricultural products detection and classification [J]. Electron Test, 2013, (9): 274-275.
- [4] 李季, 杨淑婷, 马菁. 基于计算机视觉的枸杞虫害计数方法研究[J]. 宁夏农林科技, 2018, 59(10): 50-52.
Li J, Yang ST, Ma J. Counting method of wolf berry pests based on computer vision [J]. Ningxia J Agric Fores Sci Technol, 2018, 59(10): 50-52.
- [5] 曹旨昊, 牟少敏, 孙肖肖, 等. 基于 Android 的粘虫板害虫计数系统研究与实现[J]. 河南农业科学, 2018, 47(10): 154-159.
Cao ZH, Mou SM, Sun XX, et al. Research and implementation of sticky board pest counting system based on android [J]. J Henan Agric Sci, 2018, 47(10): 154-159.
- [6] 王文静, 杜秋菊, 徐建瑜. 基于计算机视觉的鱼苗自动计数系统研究[J]. 渔业现代化, 2016, 43(3): 34-38.
Wang WJ, Du QJ, Xu JY. Research automatic fry counting system based on computer vision [J]. Fishery Mod, 2016, 43(3): 34-38.
- [7] 钟永达, 周燕玲, 李彦强, 等. 基于 ImageJ 软件的香樟千粒重的测量及其应用[J]. 安徽农学通报, 2018, (10): 88-91.
Zhong YD, Zhou YL, Li YQ, et al. Application of ImageJ analysis software in measuring 1000-seed weight of *Cinnamomum camphora* [J]. Anhui Agric Sci Bull, 2018, (10): 88-91.
- [8] Galotto G, Bibeau JP, Vidali L. Automated image acquisition and morphological analysis of cell growth mutants in *Physcomitrella patens* [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1992: 307-322.
- [9] Maggavi R, Pujari S, Vijaykumar C. Motility analysis with morphology: Study related to human sperm [J]. Proceed Comput Sci, 2019, 152: 179-185.
- [10] Özer E, Marion L, Olivier H, et al. ImageJ SurfCut: A user-friendly pipeline for high-throughput extraction of cell contours from 3D image stacks [J]. BMC Biol, 2019, 17(38): 2-12.
- [11] Michael JW, George AM, Hugh JW, et al. MyelinJ: An ImageJ macro for high throughput analysis of myelinating cultures [J]. Bioinformatics, 2019, 35(21): 4528-4530.
- [12] 蔡爱君. TP、CAP 与 TTC 对食品微生物菌落总数的测定效果[J]. 食品安全导刊, 2018, 218(27): 112-113.
Cai AJ. Effect of TP, CAP and TTC on the total number of food microbial colonies [J]. Chin Food Saf Mag, 2018, 218(27): 112-113.
- [13] 王菊丛, 赖陈洁. 2010 食品安全国家标准中大肠菌群计数方法的研究和探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, (1): 116-117.
Wang JC, Lai CJ. Research and discussion on coliform count method in national food safety standard 2010 [J]. Chin J Food Hyg, 2011, (1): 116-117.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



黄晓辉, 副研究员, 主要研究方向为食用菌产业副产物循环利用及农业微生态。
E-mail: 38534098@qq.com



许东, 副教授, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: philip198349@gmail.com