



ИЗСЛЕДВАНЕ НА АЛГОРИТЪМ ЗА БРОЕНЕ НА КОЛОНИИ ОТ БАКТЕРИИ

Татяна Динева, Геновева Милушева

Резюме: В статията е направен анализ на алгоритъм за изброяване на колонии от бактерии по цифрови изображения. Анализирано е влиянието на прага на бинаризацията T върху разпознаването и изброяването на колонии от бактерии. От направените изследвания се установи, че подходящи за отделяне на колониите от фона са цветовите компоненти B (RGB), S (HSV), b (Lab) и Y (CMYK), защото при използването им се получава грешка от класификация по-малка от 5%.

Ключови думи: Колонии от бактерии, Обработка на изображения, Кръгова Хаф трансформация

1. Увод

Много от съвременните промишлени производства са невъзможни без жизнената дейност на микроорганизмите. Хлебни и млечни продукти, спиртни напитки, антибиотици и други важни за живота продукти стават при непосредственото участие на определени полезни микроорганизми, които представлява търговски интерес за производството, се образуват от клетки [6,9,10]. Микроорганизмите могат да растат в широк диапазон от физични и химични показатели на средата, в която се намират. Техният растеж и другите прояви на физиологичната им активност по същество представляват реакция на физикохимичните условия на тази среда, която обитават.

Изброяването на колонии от бактерии с броячна камера зависи в значителна степен

INVESTIGATION OF A BACTERIA COLONIES COUNTING ALGORITHM

Tatyana Dineva, Genoveva Milusheva

Abstract: In the paper, an algorithm analysis was performed to enumerate colonies of bacteria in digital images. The effect of the Binary threshold T on the recognition and enumeration of bacterial colonies was analyzed. From the research it was found that the color components B (RGB), S (HSV), b (Lab) and Y (CMYK) are suitable for separating the columns from the background, because in their use a classification error is less than 5%.

Keywords: Bacteria colony, Image processing, Circular Hough Transform

1. Introduction

Many modern industrial processes are impossible without the viability of microorganisms. Bakery and dairy products, spirits, antibiotics and other products of vital importance are made by the direct involvement of certain useful microorganisms of commercial interest in production, formed by cells [6,9,10].

Micro-organisms can grow within a wide range of physical and chemical indicators of the environment in which they are located. Their growth and other manifestations of their physiological activity are essentially a reaction to the physicochemical conditions of this environment they inhabit.

от квалификацията и опита на оператора.

В съвременните лаборатории за микробиологичен анализ използването на автоматизирани системи е необходимост. Приложението на автоматизирани системи, използващи техники за получаване, обработка и анализ на изображения е основна тенденция, свързана с оптимизиране техниките на за броене на колонии от бактерии. Предимствата на автоматизираните системи несъмнено са много, като основно те притежават огромен потенциал, сравнително ниска цена, не голяма сложност на управление, бързина и висока продуктивност [2,3,7].

В световната мрежа Интернет са налични множество такива програмни приложения, реализиращи функции за автоматично изброяване на колонии от бактерии чрез анализ на изображения за различни операционни системи като Windows, Android, iOS, които се разпространяват безплатно. Налични са и публикувани алгоритми за броене на колонии [4,8].

Целта на статията е да се направи анализ на алгоритъм за броене на колонии от бактерии, който се разпространява безплатно в световната мрежа Интернет.

2. Материал и методи

Използвана е MRS – хранителна среда за изолиране на бактерии от род *Lactobacillus*, при разреждане 1:100.

Заснети са цветни цифрови изображения на тези колонии с резолюция 320x240 пиксела.

Използвана е броячна камера Воесо Colony Counter CC-1 (Boeckel + Co (GmbH + Co), Germany) за броене на колонии на бактерии. Тази камера е използвана като еталонен (референтен) метод на измерване. Паничката на петри се поставя върху чувствителна на допир координатна мрежа. Колониите от бактерии се наблюдават през

Enumeration of colonies of bacteria with a count camera depends to a large extent on the operator's qualification and experience.

In modern microbiological analysis laboratories the use of automated systems is a necessity. The use of automated systems using image acquisition and processing techniques is a major trend in optimizing bacterial colonies counting techniques. The advantages of automated systems are undoubtedly many, as they have a huge potential, a relatively low price, a lack of complexity of management, speed and high productivity [2,3,7].

Multiple such program applications are available on the Internet, which performs automatic bacteria colonies counting features by analyzing images for different operating systems such as Windows, Android, iOS, which are distributed free of charge. Algorithms for colony counting are also available [4,8].

The aim of the article is to analyze a bacterial counting algorithm that is distributed free of charge on the Internet.

2. Material and methods

MRS agar was used to isolate bacteria of the genus *Lactobacillus* at a dilution of 1:100.

Color digital images of these colonies are captured at a resolution of 320x240 pixels.

A Boeco Colony Counter CC-1 counting chamber (Boeckel + Co (GmbH + Co), Germany) was used to count colonies of bacteria. This camera is used as a reference measurement method. The Petri dish is placed on the pan on a touch-

лупата и посредством писалката се маркират. При всяко натискане на писалката върху съда се увеличава стойността на дисплея и по този начин се изброяват колониите.

Използван е основен алгоритъм, представен от Alves и Cruvinel [1]. Този алгоритъм работи в следната последователност:

- ✓ Заснемане на изображението;
- ✓ Дефиниране на праг на бинаризация с филтър на Otsu;
- ✓ Прилагане на филтър на Лаплас;
- ✓ Създава се акумулатор на пикселите като подготвителна операция за Хаф трансформация;
- ✓ Прилагане на кръгова Хаф трансформация;
- ✓ Изброяване на разпознатите колонии от бактерии;
- ✓ Визуализация на резултатите;
- ✓ Съхранение на получените резултати в масив от данни.

Представеният алгоритъм използва кръгова Хаф трансформация като основна функция за разпознаване на колониите от бактерии. При кръговата Хаф трансформация се променя алгоритъма за откриване вместо на линии, на кръгови форми. Създава се акумулаторно пространство, което се състои от клетка за всеки пиксел. Първоначално всяка клетка е зададена със стойност 0. За всяка крайна точка (i, j) на изображението се увеличават всички клетки, които според уравнението на кръга с радиус "r":

$$(i - a)^2 + (j - b)^2 = r^2 \quad (1)$$

може да бъдат център на кръг. Тези клетки се представят с „a“ в уравнението.

За всяка възможна стойност на „a“, намерена в предходната стъпка, се откриват всички възможни стойности на „b“, които отговарят на уравнението.

Търсят се локални максимуми в

sensitive grid. Colonies of bacteria are observed through the magnifying glass and are marked with the pen. Each time the pen is pressed on the container, the value of the display is increased, and colonies are listed.

A basic algorithm presented by Alves and Cruvinel [1] was used. This algorithm works in the following order:

- ✓ Capture the image
- ✓ Defining an Otsu filter binary threshold;
- ✓ Apply a Laplace filter;
- ✓ A pixel accumulator is created as a preparatory operation for Hough transformation;
- ✓ Apply a circular Hough transform;
- ✓ Enumeration of recognized colonies of bacteria;
- ✓ Preview the results
- ✓ Storing the results in a data set.

The present algorithm uses a circular Hough transformation as a major function for recognizing colonies of bacteria.

The circular Hough transformation changes the algorithm for detection rather than lines, in circular shapes.

An accumulated space is created, which consists of a cell for each pixel. Initially, each cell is set to 0.

For each ending point (i, j) of the image, all cells that, according to the equation of the radius "r":

may be the center of a circle. These cells are represented by "a" in the equation.

For each possible value of "a" found in the previous step, all possible values of "b" corresponding to the equation are found.

пространството на акумулатора. Тези клетки представляват кръгове, които са били открити от алгоритъма.

Ако предварително не е известен радиусът на окръжността, която се търси, може да се използва тримерно пространство за акумулаторите, с цел да се намерят кръгове с произволен радиус. Естествено, това изисква по-голямо изчислително време.

Този метод може също така да открива кръгове, които са частично извън пространството на акумулатора, доколкото в него все още има достатъчно площ от кръга [5].

Тези характеристики на алгоритъма за кръгова Хаф трансформация го правят подходящ за приложение в броенето на колонии на бактерии, тъй като при деленето на колониите се получават форми във вид на два частични припокриващи се кръга.

На фигура 1а) е показан пример за пиксел, разположен върху действителен кръг и класическия модел за търсене (пунктирните кръгове) за пиксела, който може да бъде част от този кръг.

Фигура 1б) представя пример за пиксели, разположени върху действителен кръг и техните модели (пунктирните кръгове), които съвпадат в центъра на действителния кръг.

Local maximums are searched for in the accumulator compartment. These cells are circles that have been detected by the algorithm.

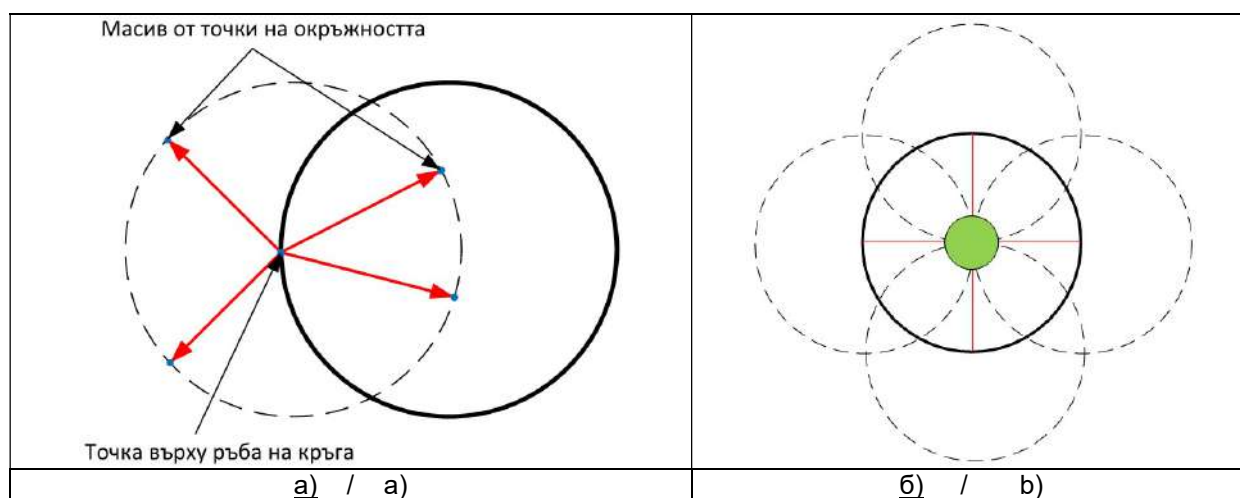
If the radius of the circle being searched is not known in advance, three-dimensional space for the accumulators can be used to find circles of any radius. Naturally, this requires more computational time.

This method can also detect circles that are partly out of accumulator space, as long as there is still enough area in the circle [5].

These characteristics of the algorithm for circular Hough transformation make it suitable for use in counting colonies of bacteria because divisions of the colonies result in forms in the form of two partial overlapping circles.

Figure 1a) shows an example of an actual circle pixel and the classic search pattern (dotted circles) for pixels that may be part of this circle.

Figure 1b) shows an example of pixels located on an actual circle and their patterns (dashed circles) that match the center of the actual circle.



Фиг.1. Принцип на кръгова Хаф трансформация

На базата на представеният алгоритъм

Fig. 1. Circle Hough Transform principle

On the basis of the presented algorithm, a software application was

е създадено програмно приложение в Matlab среда за броене на колонии на бактерии. Вместо директно преминаване към бинарно изображение е приложена функция за преминаване от цветови модел към бинарно изображение. За брой на колониите се приема броя на центровете на окръжности, които са получени чрез кръгова Хаф трансформация.

Грешката при изброяване на колониите от бактерии е определена по:

$$e = \frac{N_c - N_r}{N_r} \cdot 100, \% \quad (2)$$

където N_c е броя колонии, определен с алгоритъм; N_r – брой колонии, определени по референтен метод.

Оценката на работата на използваните класификатори и направена чрез обща грешка на класификация, която се описва с формулата:

$$e_0 = \frac{\sum_{i=1}^n (\sum_{k=1}^n y_{ik} - y_{ii})}{\sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^n y_{ik}} \cdot 100, \% \quad (3)$$

където y_{ik} е брой проби от клас i , класифицирани от класификатора в клас k ; y_{ii} – брой правилно разпознати проби; $k=1\dots n$ – брой неправилно отнесени в даден клас i спрямо общият брой проби; n – брой класове.

3. Резултати и дискусия

На фигура 2 е представен пример за влиянието на прага на бинаризация T върху разпознаването и изброяването на колонии от бактерии. Вижда се, че различните стойности на прага на бинаризация оказват влияние върху визуализацията на колониите в бинарното изображение.

developed in the Matlab environment for bacteria colony counting. Instead of a direct transition to a binary image, a transition from a color model to a binary image is applied. For the number of colonies, the number of centers of circles that are obtained by a circular Hough transformation is assumed.

The error of bacteria colony counts is determined by:

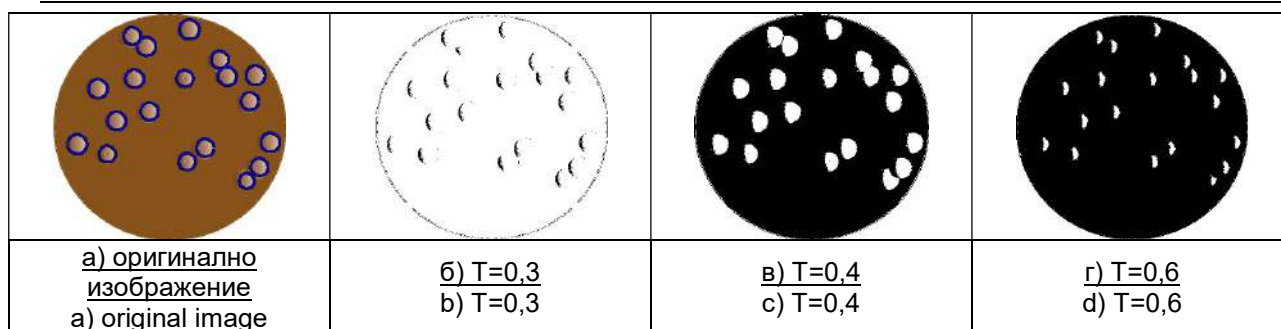
where N_c is the number of colonies determined by an algorithm; N_r – number of colonies determined by the reference method.

The evaluation of the performance of the classifiers used and made by a general classification error, which is described by the formula:

where y_{ik} is the number of class i samples classified by classifier in class k ; y_{ii} - number of correctly recognized samples; $k=1\dots n$ - number incorrectly assigned to a class i relative to the total number of samples; n - number of classes.

3. Results and discussion

Figure 2 shows an example of the effect of the Binary B threshold on the recognition and enumeration of bacterial colonies. It can be seen that the different values of the binary threshold have an effect on the visualization of the colonies in the binary image.



Фиг.2. Изображения на колонии от бактерии по G (RGB) цвeтова компонента при различен праг на бинаризация T

Fig.2. Images of G (RGB) color component of bacteria colonies at different binary threshold T

Направена е оценка на използването на цвeтови компоненти от четири цвeтови модела – RGB, HSV, Lab и CMYK при откриването и изброяване на колонии от бактерии с използвания алгоритъм. В таблица 1 са нанесени резултатите от определяне на грешка при изброяване на колонии от бактерии по референтен метод и с използвания алгоритъм. Резултатите показват, че с грешка до 5% колонии могат да се откриват и изброяват чрез цвeтовите компоненти от RGB, HSV и CMYK цвeтовите модели.

An evaluation of the use of color components of four color models - RGB, HSV, Lab and CMYK was made in the detection and enumeration of bacterial colonies with the algorithm used. Table 1 lists the results of error determination by enumeration of colonies of bacteria by a reference method and by the algorithm used. The results show that with error up to 5% the colonies can be detected and enumerated using the color components of the RGB, HSV and CMYK color models.

Таблица 1.

Table 1.

Резултати от анализа за влиянието на праг на бинаризация – грешка e, %

Results of the binarization threshold analysis - error e, %

Threshold Color component	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
R	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	100%	100%
G	100%	100%	100%	11%	0%	0%	100%	100%	100%
B	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	100%
H	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
S	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%
V	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	100%	100%
L	100%	100%	100%	42%	5%	0%	5%	100%	100%
a	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
b	100%	100%	100%	100%	100%	0%	100%	100%	100%
C	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
M	100%	100%	0%	0%	5%	100%	100%	100%	100%
Y	100%	100%	95%	0%	0%	5%	0%	0%	0%
K	100%	5%	5%	0%	11%	100%	100%	100%	100%

Направена е проверка за отделимостта на колонии от бактерии от фона в изображението. Използвани са линейни

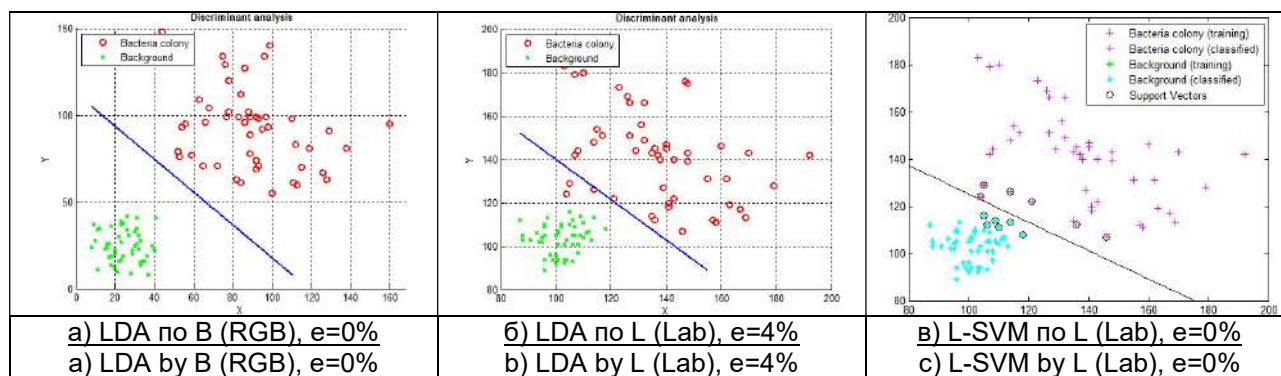
An examination is made of severability of colonies of bacteria from the background image. Linear

варианти на класификаторите дискриминантен анализ и метод на опорните вектори.

На фигура 3 са представени примери за класификация с линейен дискриминантен анализ на обектни области с колонии от бактерии и фон. Вижда се, че при използване на метод на опорните вектори при еднакви други условия, отделянето на колониите от фона е с по-малка грешка спрямо линейния дискриминантен анализ.

variants of the discriminant analysis (LDA) and support vector machines (L-SVM) classifiers were used.

Figure 3 presents examples of classification with LDA and L-SVM of bacterial colonies and background. It can be seen that using the support vectors method under the same other conditions, the separation of the colonies from the background have less error than the linear discriminant analysis.

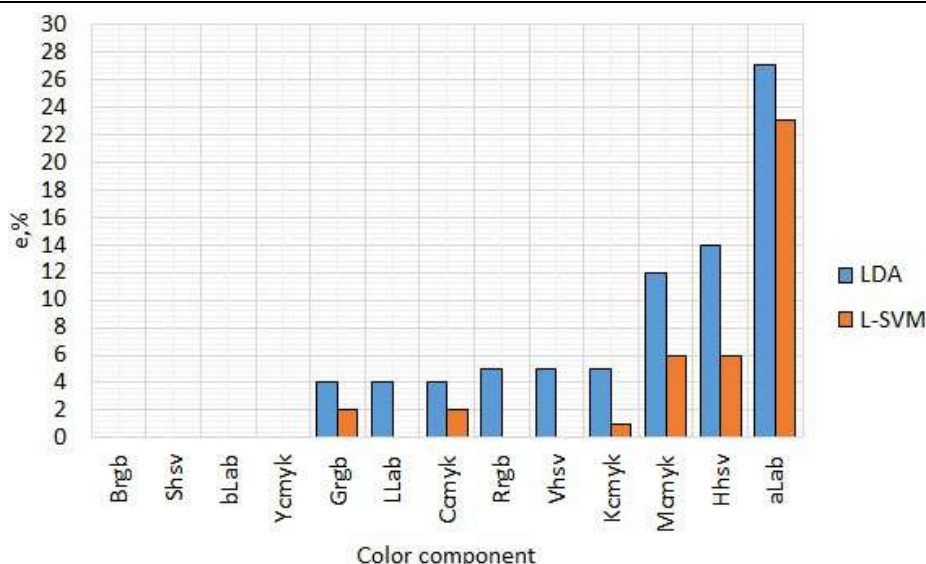


Фиг.3. Примери за класификация на колонии от бактерии и фон по цветови компоненти

Fig. 3. Examples of classification of bacteria colonies and background by color components

На фигура 4 са представени резултати от класификацията с линейни дискриминантен анализ и метод на опорните вектори. Подходящи за отделяне на колоните от фона са цветовете компоненти B (RGB), S (HSV), b (Lab) и Y (CMYK), защото при използването им се получава грешка от класификация по-малка от 5%. Най-голяма грешка, независимо от използвания класификатор се получава при използване на а (Lab) цветовата компонента. Получените резултати потвърждават тези, при определяне на цветова компонента и подходящ праг на бинаризация за откриване и изброяване на колонии от бактерии в цветно цифрово изображение.

Figure 4 presents the results of the linear discriminant analysis and the support vectors method. The color components B (RGB), S (HSV), b (Lab) and Y (CMYK) are suitable for separating the colonies from the background, because they use a less than 5% classification error. The higher error, regardless of the classifier are obtained using a (Lab) color component. The results obtained confirm these in determining the color component and the appropriate threshold of binarization to detect and enumerate colonies of bacteria in a color digital image.



Фиг.4. Резултати от класификация

Fig.4. Results from classification

4. Заключение

Общата тенденция в сферата микробиологичните технологии е насочена към внедряване на високопроизводителни системи за автоматичен анализ с изкуствен интелект.

При досега прилаганата технология за изброяване на колонии от бактерии за условията на Р.България, основана на приетите стандарти по БДС, този процес се извършват ръчно, чрез визуално наблюдение, като преди всичко се разчита на ритуната на оператора. Недостатъците са свързани с големия процент субективност в преценката, изискването за квалифицирани човешки ресурси.

Успешното приложение на оптичните техники за броене на колонии от бактерии по визуални изображения изисква предварителни анализи за разделимостта на обектните области с колонии и фон по цветови признаци. Липсата на такъв анализ би довело до увеличаване на грешките от измерване при прилагането на тези методи за бързо определяне на броя развити колонии в хранителна среда.

От направените изследвания се установи, че подходящи за отделяне на колониите от фона са цветовете

4. Conclusion

The general trend in the field of microbiological technologies is directed towards the introduction of high-performance automatic artificial intelligence analysis systems.

The technology used to enumerate colonies of bacteria for the conditions of the Republic of Bulgaria, based on the accepted BNS standards, is carried out manually, through visual observation, relying primarily on the operator ritual. Disadvantages are related to the high percentage of subjectivity in the assessment, the requirement for qualified human resources.

Successful application of optical techniques for counting colonies of bacteria by visual imaging requires preliminary analyzes of the colony and background color separations of the object areas. The absence of such an analysis would lead to an increase in measurement errors in the application of these methods to rapidly determine the number of colonies developed in a culture medium.

From the research it was found that the color components B (RGB), S (HSV), b (Lab) and Y (CMYK) are

компоненти B (RGB), S (HSV), b (Lab) и Y (CMYK), защото при използването им се получава грешка от класификация по-малка от 5%.

suitable for separating the bacteria colonies from background, because their use a classification error is less than 5%.

5. Литература

- [1] Alves, G., P. Cruvinel, Using Customized Computer Vision and Charge-Coupled Device (CCD) Sensor for the Recognition of Colony Formation and Counting of Live Bacteria in the Agricultural Industry, ALLSENSORS 2016 : The First International Conference on Advances in Sensors, Actuators, Metering and Sensing, ISBN: 978-1-61208-523-4, pp.51-58.
- [2] APD Colony Counter App Lite, <https://play.google.com/store/apps/details?id=com.apd.colonyapp> (available on 27.04.2017)
- [3] Baycheva, S. (2016). Application of devices of measurement of color in analysis of food products. Journal of Innovation and entrepreneurship, year IV, vol.4, ISSN 1314-9180, pp.43-59.
- [4] Colony Count BETA, <https://play.google.com/store/apps/details?id=com.ToolboxFactory.ColonyCountBETA> (available on 27.04.2017)
- [5] Find circles using circular Hough transform, <https://www.mathworks.com/help/images/ref/imfindcircles.html> (available on 27.04.2017)
- [6] Georgieva, A., I. Dimov. (2013). Qualitative indicators of wheat bread enriched with buckwheat flour, Food processing industry magazine, vol. 3, ISSN 1311-0179, pp.44-49.
- [7] Mladenov, M., S. Penchev, M. Deyanov. (2015). Complex assessment of food products quality using analysis of visual images, spectrophotometric and hyperspectral characteristics. International Journal of Engineering and Innovative Technology (IJEIT), Vol. 4, Iss.12, ISSN: 2277-3754, pp.23-32
- [8] OpenCFU, <http://opencfu.sourceforge.net/> (available on 27.04.2017)
- [9] Zhelyazkova M., I. Taneva. (2016). Statistical modeling of the process syneresis of the production of yogurt with water extract of Rosa canina. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, vol. 5, iss. 2, part C, ISSN 2278-4136, pp.204-206.
- [10] Zlatev, Z. (2014). Modeling of Color Changes in Bread Crust During Baking. Proc. Int. Conf. on Technics, Technologies and Education "ICTTE 2014", oct. 30-31, Yambol, Bulgaria, pp.680-685.

5. References

Контакти:

Татяна Динева

Тракийски университет – Стара Загора
Факултет „Техника и технологии“
ул. Граф Игнатиев No.38, 8602, Ямбол
България, e-mail: tatana826@gmail.com

Contacts:

Tatyana Dineva

Trakia University
Faculty of Technics and technologies
38 Graf Ignatiev str., 8602, Yambol
Bulgaria e-mail: tatana826@gmail.com

маг. инж. Геноева Милушева, докторант

Русенски университет
Факултет Електротехника, електроника и
автоматика
катедра Телекомуникации
гр. Русе 7017, ул. Студентска № 8
e-mail: g_milusheva@abv.bg

Genoveva Milusheva, M.Eng., PhD student

University of Ruse
Faculty of Electrical engineering, electronics
and automation
Department of Telecommunications
8 Studentska str., POB 7017, Ruse,
Bulgaria, e-mail: g_milusheva@abv.bg