

基于计算机视觉的食品中大肠杆菌快速定量检测

殷涌光, 丁 筠

(吉林大学 生物与农业工程学院, 长春 130022)

摘要:利用大肠杆菌能发酵乳糖产酸从而使伊红美兰混合液产生沉淀、溶液变色的特性,设计了一套基于颜色特征识别技术的食品中大肠杆菌快速定量检测系统,通过16 h培养后溶液颜色的变化程度来判断待测液中大肠杆菌的数目。系统自动提取发酵后溶液图像的H、I、S颜色分量作为输入向量,自动调用训练好的BP神经网络模型得到大肠杆菌数。试验结果表明:该方法的检测结果与传统方法的相关性好,检测时间在18 h以内,远少于传统方法的6天,有效提高了产品的销售品质。

关键词:食品机械;计算机视觉;大肠杆菌快速检测;人工神经网络;颜色特征识别

中图分类号:TS207.4;TP242.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-5497(2009)Sup.2-0344-05

Rapid method for enumeration of *Escherichia coli* in food based on computer vision

YIN Yong-guang, DING Yun

(College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China)

Abstract: The speciality that the *Escherichia coli* can ferment lactose to produce acid which can produce depositions and make the indicator's color changed was utilized, an automatic detection system for enumeration of *Escherichia coli* in food based on color feature recognition technology was designed and the color change degree after incubating for 16 h was used to judge the *Escherichia coli* counts in the detection samples. The system can automatically extract the H, I, S color vector to act as the input vector and transfer the trained BP neural network to get the *Escherichia coli* counts. The experiments indicate that comparisons of counts of *Escherichia coli* by the rapid automatic detection system and by the traditional method closed correlated. Moreover, by using this rapid detection system, the *Escherichia coli* in food accurately enumerate within 18 h, which is much shorter than the 6 days detection time by the traditional method, which will greatly improve the products sale quality.

Key words: food machinery; machine vision; escherichia coli rapid detection; artificial neural network; color feature recognition

大肠杆菌的数量常常作为一项重要指标来衡量待出厂食品是否达到食品卫生标准要求。近年来,在世界范围内因食用受到大肠杆菌污染的食品而引发的食物中毒事件越来越多^[1],因此大肠

收稿日期:2008-08-07.

基金项目:国家科技支撑计划项目(2007BAD55B06);吉林省科技发展计划项目(20060216).

作者简介:殷涌光(1949-),男,教授,博士生导师.研究方向:农产品加工及食品微生物快速检测.

E-mail:biofood@jlu.edu.cn

通信作者:丁筠(1982-),女,博士研究生.研究方向:食品微生物快速检测. E-mail:dingyun77@tom.com

杆菌的监测成为质检部门的一项重要工作。有关环境卫生、食品卫生中的大肠杆菌的检测采用传统的多管发酵法,对大肠杆菌的计数共需 6 天时间^[2],此时一些产品可能已经进入销售环节。有些食品保藏时间短,过长的检测时间必然会影响其销售品质。因此,近年来国内外对大肠杆菌的快速定量检测方法的研究越来越多^[3-8]。随着图像处理技术的专业化与计算机成本的下降和速度的提高,机器视觉技术已广泛地应用于各个领域^[9]。本文将基于 HIS 颜色特征识别技术的机器视觉技术应用于大肠杆菌的检测,提出了一种对大肠杆菌快速计数的新方法。

1 材料与方 法

1.1 试验原理

细菌分解糖类是依靠细菌细胞所产生的各种酶类的作用,细菌产生的分解糖的酶随细菌种类不同而异,可以此鉴别细菌。大肠杆菌能分解乳糖而产生酸,使培养基的 pH 值降低,在酸性条件下,细菌带正电荷而染上伊红,伊红与美蓝相结合形成紫黑色或紫红色的絮状沉淀从溶液中析出,从而使溶液颜色变浅。而在碱性环境中,伊红与美蓝不结合,例如,致病菌不分解乳糖,不产酸,故溶液保持原色。一般来说,产酸量与大肠杆菌的检出率呈正相关。由此可见,溶液中大肠杆菌的数目越多,形成的紫黑色或紫红色的絮状沉淀也越多,溶液颜色越浅。因此,本文采用伊红美兰混合液作为指示剂,加入到乳糖胆盐培养基中,用来指示大肠杆菌在乳糖发酵培养基中的产酸情况。此外,由于甲酸脱氢酶的作用,大肠杆菌细胞在酸性环境中还会使甲酸分解成 CO_2 和 H_2 ,试管中会有产气现象。

1.2 试验材料

乳糖胆盐培养基:取 45 g 乳酸胆盐培养基粉末(北京奥博星生物技术有限公司)溶于 1000 mL 的蒸馏水中,煮沸,用锡纸封口,灭菌后待用。

伊红美兰混合指示液:20 mL 伊红(上海山浦化工有限公司)(2%)水溶液与 13 mL 美蓝(上海山浦化工有限公司)(0.5%)水溶液混和,制成伊红美兰混和指示液,灭菌后待用。

试验用检测样品主要来自当地超市,包括蔬菜、水果、香辛料、焙烤食品等。

1.3 试验设备

试验设备采用基于机器视觉技术自制的大肠

杆菌快速检测系统,该系统由普通生物显微镜(XSP-8CA),尼康 DS-5M 型彩色数字 CCD 摄像机,2 台海顿 4k-05-027 型步进电机,2 个 DCM4010 型步进电机驱动器,单片机 AT89S51 芯片以及一台个人计算机组成。硬件系统的组成和连接方式如图 1 所示。以上所有组件都封装在带有散热片的密闭机箱内,机箱表面装有液晶显示屏和一个位于载物台的正前方用于送入待检样的小门,在检测时关闭小门,无外界光线进入。

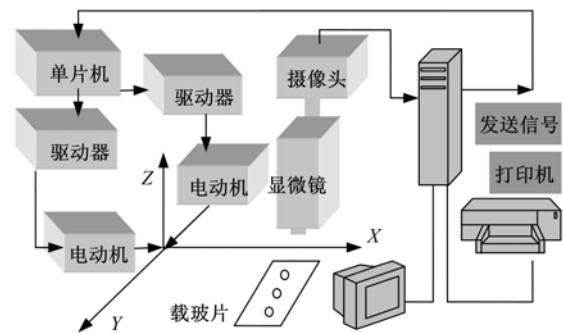


图 1 快速检测系统硬件组成示意图

Fig. 1 Hardware organization and design of the rapid detection system

1.4 试验方法

以无菌操作取样 25 g,粉碎后放入装有 225 mL 无菌生理盐水的灭菌玻璃瓶中,混合均匀,制成 1:10 的样品匀液。用移液管移取 10 mL 乳糖胆盐培养基于试管中,加入样品匀液 1 mL 后,加入 600 μL 的伊红美兰混合指示液,混匀,用胶塞封口后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 16 h。取出后若发现试管中有紫黑色或紫红色的絮状沉淀,并且用手指弹击试管发现有小气泡上升,则证明该管中的检测样品中含有大肠杆菌,需要对其进一步计数。图 2(a)为含有大肠杆菌的试管培养后的照片,其试管底部和边缘存在紫黑色沉淀,且溶液颜色变浅;图 2(b)为不含有大肠杆菌的试管培养后的照片,溶液颜色没有变化,且没有沉淀产生。对需要计数的试管,将其溶液用滤纸过滤后,移取 8 mL 于透明聚乙烯盒(0.5 cm \times 7 cm \times 4 cm)内,放于载物台上进行拍照,拍照时显微镜下照明灯亮度保持恒定。图 2(c)、(d)、(e)为拍摄的 RGB 图片,(c)为培养前的溶液得到的图片,(d)、(e)分别为大肠杆菌含量为 9×10^1 、 4.6×10^2 MPN/mL 时发酵后采集的图片。

1.5 多管发酵法对照

采用多管发酵法检验计数的准确性。以无菌

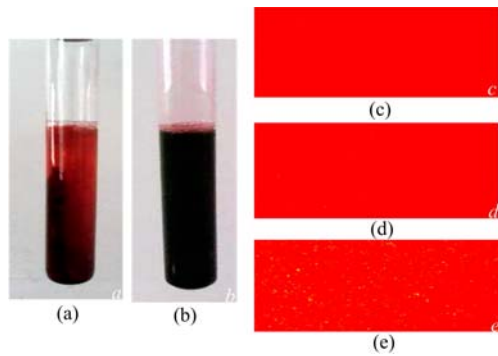


图 2 试验结果示意图

Fig. 2 Sketch map of the experimental results

操作取样 25 g 放入装有 225 mL 无菌生理盐水的灭菌玻璃瓶,混合均匀,制成 1 : 10 的样品匀液。稀释样品匀液根据对样品污染情况的估计,用无菌生理盐水将样品匀液制成一系列十倍递增的样品稀释液。按照出口食品国家标准(SN 0169-92)^[2]中的大肠杆菌 MPN 计数方法进行培养和计数。

2 图像处理与神经网络预测

图像处理程序采用 C++ 语言编写,程序可以实现自动读取和处理图像,自动获取图片上所有像素点的 R、G、B 值并求其平均值,转换成 HSI 颜色空间的 H、S、I 颜色值,对神经网络进行训练并进行预测。基于 HIS 颜色特征识别的大肠杆菌计数方法流程如图 3 所示。

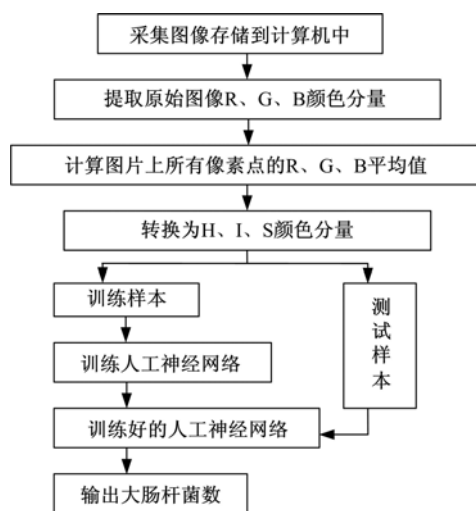


图 3 大肠杆菌计数方法流程图

Fig. 3 Flowchart of enumeration method of E. coli

2.1 RGB 与 HIS 彩色空间之间的转换

通常从 CCD 数字摄像机获取的图像信息是

由 R(红)、G(绿)、B(蓝)分量表示的,但是由于 R、G、B 这三个参数具有较高的相关性等优点,很少将其用于图像处理及分析过程。而由色度学建立的多种颜色模型^[10]中,HIS 模型是基于视觉原理的模型,定义了 3 个互不相关、容易预测的颜色属性:用 H 色调(Hue)、S 色饱和度(Saturation)和 I 亮度(Intensity)来描述色彩。在图像处理和计算机视觉中大量算法都可在 HIS 色彩空间中方便地使用,它们可以分开处理而且是相互独立的。RGB(先将 R、G、B 的值归一化,使其变化范围在 0~1 之间)与 HIS 的坐标转换关系为

$$I = \frac{R + G + B}{3} \quad (1)$$

$$S = 1 - \frac{\min(R, G, B)}{I} \quad (2)$$

$$H = \arccos \frac{(R - G) + (R - B)}{2 [(R - G)^2 + (R - G)(G - B)]^{1/2}} \quad (3)$$

当 $G \geq B$ 时,式(3)可换算出 $[0^\circ, 180^\circ]$ 之间的 H 值。当 $G < B$ 时,H 值大于 180° ,此时

$$H = 360^\circ -$$

$$\arccos \frac{(R - G) + (R - B)}{2 [(R - G)^2 + (R - G)(G - B)]^{1/2}}$$

本文采用 HIS 颜色模型,将获得的 RGB 信息转换成 HIS 信息。根据本研究的图片色彩分布比较均匀的特点,首先求出采集图片上的所有像素点的 R、G、B 三个参数的平均值,把求取的均值转换为 I、H、S 值,则每一幅图片对应一个 I、H、S 值。这 3 种颜色基本特性可以用一个三维空间的立体图全部表示出来,如图 4 所示。垂直轴代表亮度 I 的变化,从底端的黑色(0)变化到顶端的白色(1);色调 H 由水平面的圆周表示,圆周

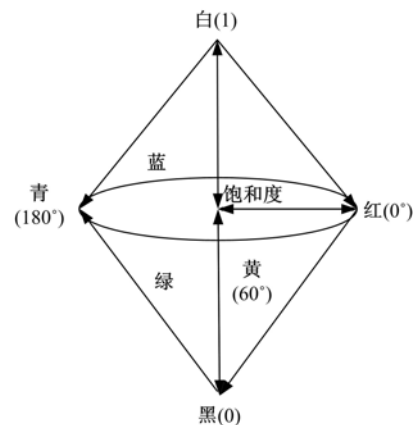


图 4 HIS 颜色模型

Fig. 4 HIS color space

上各点(0°~360°)代表光谱上各种不同的色调;从圆心向圆周过渡表示颜色饱和度 S 逐步提高。

在本文中,待测液体中大肠杆菌数越多,其发酵乳糖产酸越多,则产生沉淀越多,溶液的颜色越浅,其图像的饱和度就越小,同时反射系数增大造成亮度增大。对于色调 H 来说,大肠杆菌含量越多的溶液发酵后越靠近黄色,其值越远离 0°(红),靠近 60°(黄)。本文的部分试验结果如表 1 所示。试验结果表明,所得数据基本符合上述规律,但大肠杆菌数并不是简单地与单个变量呈线性关系,而是 3 个变量共同作用的结果。

2.2 人工神经网络

本文采用 BP 神经网络的主要原因是,它可以同时考察 I、H、S 三个颜色分量的共同作用效果,而且在不知道这三个分量与大肠杆菌数之间存在何种关系的情况下,采用神经网络的方法是较好的选择。

BP 神经网络的结构参数设定:包括输入/输出向量、隐层个数、隐层神经元数目以及各层传递

函数的确定。不同的大肠杆菌数量对应不同的 I、H、S 值,输入层有 3 个神经元,输入向量 $\mathbf{X}=(I, H, S)^T$ 。隐层一般采用单层就可以逼近任意非线性函数,因此,隐层选用的单层含有 16 个神经元,神经元的传递函数为对数 S 形函数,即 $y=\text{logsig}(x)$ 。输出层含一个神经元,传递函数为线性函数,即 $y=\text{purelin}(x)$,输出是大肠杆菌的数目。网络的样本训练函数是 `traingdx`,它将自适应修改学习率算法和动量批梯度下降算法有机地结合起来,使网络的训练速度更快更稳定。

试验选用含有各个数量级大肠杆菌的样本作为训练和测试样本,共 300 个,其中 75 个为测试样本,225 个为训练样本,网络经过 3000 次的学习后,训练集的累计样本误差为 0.010 967 7。表 1 为部分试验数据和结果。

从表 1 可以看出,BP 神经网络的计算结果与真实值的偏差比较小。检测样本结果证实训练完成后确立的神经网络模型是正确的。

表 1 部分试验数据

Table 1 Part of the experimental data

项 目	训练样本							测试样本	
I 值	0.2947	0.2916	0.5169	0.5242	0.6026	0.5264	0.2739	0.5136	0.6322
H 值/(°)	10.4546	12.3171	9.5563	8.6082	18.2363	25.6385	7.0001	21.8539	22.4709
S 值	0.6978	0.7183	0.5903	0.5687	0.5178	0.8157	0.6911	0.8026	0.4994
神经网络法/(MPN·g ⁻¹)	3.3	3.5	93.5	96.7	601	463	1.6	443	656.1
多管发酵法(MPN·g ⁻¹)	3	3.6	95	93	610	440	<3	430	640
网络法误差(MPN·g ⁻¹)	0.3	-0.1	-1.5	3.7	-9	23	0	13	16.1

3 对比试验分析

3.1 相关性分析

选取 70 个不同的样品作为对比试验的检验样品,其中包括蔬菜、水果、香辛料、焙烤食品等。分别采用本文快速检测方法和多管发酵法进行检测。两组检测结果的相关性分析见图 5。

由图 5 可以看出,使用两种方法检测结果的相关性为 0.9955,说明快速检测系统检测结果与多管发酵法检测结果无显著性差别。

3.2 独立样本 t 检验

采用 SPSS 13.0 软件对上述两组数据进行独立样本 t 检验,分析结果如表 2、表 3 所示。

由表 3 可知,Levene 方差齐性检验 $F=0.018, P=0.892 > 0.05$,认为两样本方差相等。进行方差齐性时的 t 检验,得 $t=0.090, df=138$,双侧 $P=0.928 > 0.05$,说明用两种方法检测结果

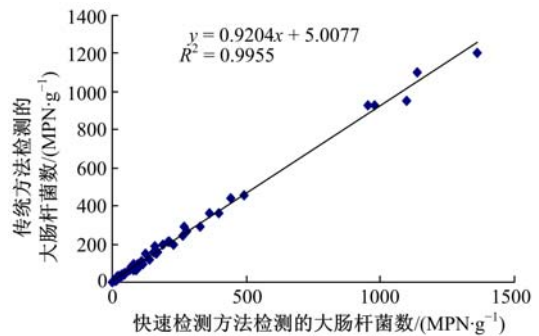


图 5 两种检测方法的相关性分析

Fig. 5 Correlation of E. coli counts determined by two methods

表 2 样本统计量

Table 2 Group statistics

组别	实验数	均数	标准差	标准误差
1	70	167.53	272.529	32.573
2	70	163.43	264.183	31.576

表 3 独立样本检验

Table 3 Independent samples test

假设条件	方差相等之 Levene 检验				均数相等 <i>t</i> 检验				
	F	概率	<i>t</i>	自由度	双侧概率	均数之差	标准误差	均数之 95% 可信区间	
								下限	上限
方差相等	0.018	0.892	0.090	138	0.928	4.100	45.366	-85.602	93.802
方差不等	0.018	0.892	0.090	137.867	0.928	4.100	45.366	-85.603	93.802

的平均数不存在显著差异。

4 结束语

本文对传统的培养计数方法进行了改进,利用大肠杆菌可以发酵乳糖产酸使伊红美兰混合液生成紫黑色沉淀,从而使溶液颜色变浅的特性,研究开发了一种大肠杆菌的快速计数方法。与传统的多管发酵法的检测结果比较,该方法相关性高($R^2 = 0.9955$),检测结果不存在显著差异(t 检验, $P > 0.05$);检测时间短,检测一个样品的时间不超过 18 h,远远少于传统培养计数方法的 6 天检测时间。将其应用于新鲜蔬菜、水果等保鲜时间较短的食品的大肠杆菌检测有着很好的前景。此外,本文基于机器视觉技术开发的大肠杆菌快速检测系统操作简单、自动化程度高、成本低且具有广泛的实用性。

参考文献:

[1] Anonymous. Risk profile on the microbiological contamination of fruits and vegetables eaten raw[R]. Scientific Committee on Food, Brussels, 2002.

[2] SN0169-92. 中华人民共和国国家进出口商品检验局中华人民共和国进出口商品检验行业标准——出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检验方法[S].

[3] González R D, Tamagnini L M, Olmos P D, et al. Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and Escherichia coli determination in ready-to-

eat foods[J]. Food Microbiology, 2003, 20 (5): 601-604.

[4] Ercole C, del Gallo M, Mosiello L, et al. Escherichia coli detection in vegetable food by a potentiometric biosensor[J]. Sensors and Actuators B, 2003 (1/3), 91: 163-168.

[5] Elizaquível P, Aznar R. A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella spp. and Staphylococcus aureus on fresh, minimally processed vegetables[J]. Food Microbiology, 2008, 25 (5): 705-713.

[6] Garcia-Armisen T, Servais P. Enumeration of viable E. coli in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 58 (2): 269-279.

[7] Tortorello M L, Reineke K F. Direct enumeration of Escherichia coli and enteric bacteria in water, beverages and sprouts by 16S rRNA in situ hybridization [J]. Food Microbiology, 2000, 17 (3): 305-313.

[8] 唐辉. 纳米电极的制备及其在快速检测水体中大肠杆菌的电分析化学研究[D]. 上海: 华东师范大学理工学院, 2006.

Tang Hui. Preparation of nano-meter electrode and its application for fast detection of escherichia coli in water[D]. Shanghai: College of Science and Engineering, East China Normal University, 2006.

[9] 崔屹. 数字图像处理技术与应用[M]. 北京: 电子工业出版社, 1997.

[10] 荆其诚, 焦书兰, 喻柏林, 等. 色度学[M]. 北京: 科学出版社, 1979.