

การนับจำนวนประชากรสาหร่าย *Chlorella* sp. ด้วยการประมวลผลภาพดิจิทัล

Counting of *Chlorella* sp. Population Using Digital Image Processing

อัจฉรรัตน์ ชัยมณี (Atchararat Chaimanee)* จีรยุทธ ไชยจารุวนิช (Jeerayut Chaijaruwanich)**

ยุวดี พีรพรพิศาล (Yuwadee Peerapornpisal) *** นที ทองศิริ (Natee Tongsi) ****

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้ได้เสนอการนับประชากรสาหร่าย *Chlorella* sp. เพื่อวัดอัตราการเติบโตของสาหร่ายชนิดนี้ โดยใช้กระบวนการทางภาพ (image processing) วิเคราะห์การเติบโตจากชุดภาพถ่ายดิจิทัลของประชากรสาหร่ายในสไลด์ ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางสีของภาพเพื่อแยกกลุ่มที่ต้องสงสัยว่าเป็นสาหร่ายออกจากพื้นหลัง จากนั้นวิเคราะห์คุณลักษณะทางรูปร่างและขอบเขตโดยพิจารณาพื้นที่และความกลม เพื่อตรวจหาตัวสาหร่ายแล้วส่งค่าเป็นจำนวนสาหร่ายที่นับได้ หาค่าต่างระหว่างค่าจริงที่ได้จากการนับของผู้เชี่ยวชาญกับการประมวลผลภาพ (Mean – Magnitude of Relative Error: MMRE) มีเพียง 8.41% ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าวิธีการที่นำเสนอมีความสามารถใกล้เคียงกับการนับจำนวนของผู้เชี่ยวชาญ นั่นคือการนับจำนวนสาหร่ายด้วยการประมวลผลภาพมีประสิทธิภาพในระดับที่ดี

ABSTRACT

In this research, *Chlorella* sp. Population was counted using image processing analysis. The growth of the algae was assessed from sets of digital photographs of slide taken under microscope. The color properties of images were analysed to differentiate algal cells from the background. Shape analysis based on region, area and roundness was used to seek for algal cells. Mean – Magnitude of Relative Error: MMRE was 8.41 % .The results showed that counting based on image processing analysis offer the ability to close from specialists observation.

คำสำคัญ : สาหร่าย *Chlorella*, การประมวลผลภาพ การนับจำนวน

Key Words : *Chlorella*, Counting, Image Processing

*มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี สาขาวิทยาศาสตร์คอมพิวเตอร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**รองศาสตราจารย์ สาขาวิทยาการคอมพิวเตอร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

***รองศาสตราจารย์ สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

****อาจารย์ สาขาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทนำ

ในปัจจุบันสาหร่าย *Chlorella* sp. ได้รับความสนใจจากผู้บริโภคมากขึ้นเพราะเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ อันยอดเยี่ยมจากธรรมชาติ ประโยชน์ของสาหร่ายชนิดนี้คือ เป็นอาหารเสริมที่มีคุณค่าทางโภชนาการและมีคุณสมบัติทางยาสูง ซึ่งองค์การนาซาได้เลือกนำไปเพาะเลี้ยงไว้บนสถานีอวกาศแล้ว (Shery, 2008) รวมไปถึงประโยชน์ทางด้านพลังงานทางเลือกและได้รับความสนใจจากนักวิจัยทางด้านสาหร่ายมากขึ้น และยังพบว่าสาหร่ายพันธุ์ *Chlorella* sp. มีปริมาณไขมันสะสมภายในเซลล์เท่ากับ 28 – 32 เปอร์เซ็นต์อาจนำมาใช้เป็นแหล่งของสารตั้งต้น ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลได้ (ซิโนรสและคณะ, 2551) จึงมีการศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่ายและติดตามการเติบโตอย่างต่อเนื่อง ซึ่งวิธีการดังกล่าวเป็นส่วนสำคัญที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงปริมาณผลผลิตและระยะเวลาที่เหมาะสมแก่การเก็บเกี่ยว (พันธุ์วงศ์, 2548) โดยทั่วไปแล้วการติดตามการเติบโตของสาหร่ายหรือการวัดอัตราการเติบโตดังกล่าวนี้ ทำได้โดยการวัดการเติบโตได้แก่ การวัดโดยตรงจากการทำ Wet mount ในสไลด์โดยการนับทั้งสไลด์ (whole count) หรือใช้สไลด์สำหรับนับจำนวน (haemocytometer) ซึ่งทั้ง 2 วิธีใช้สายตาของผู้เชี่ยวชาญในการนับจำนวนประชากรสาหร่ายการวัดทางอ้อมโดยใช้การวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) โดยใช้ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (ยวดีและฉมาภรณ์, 2546)

ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการค้นคว้าวิจัยสาหร่ายนั้น ได้แก่ การเฝ้าติดตามการเติบโตของสาหร่าย โดยวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้นยังมีข้อด้อยเกี่ยวกับความสะดวก ความถูกต้อง แม่นยำ เนื่องจากต้องอาศัยสายตาของมนุษย์และความเชี่ยวชาญซึ่งเป็นงานที่ใช้เวลานานและน่าเบื่อหน่าย การนำเทคโนโลยีทางการประมวลผลภาพดิจิทัล (digital image processing) (J.R. Parker, 1997) ซึ่งเป็นวิธีการประมวลผลภาพทางคอมพิวเตอร์

โดยใช้กระบวนการทางคณิตศาสตร์ช่วยในการวิเคราะห์และสังเคราะห์รูปภาพ (พันธุ์วงศ์, 2548) นำมาประยุกต์ใช้เพื่ออำนวยความสะดวกจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาวิธีการบ่งชี้การเติบโตแบบใหม่ที่จะช่วยในการติดตามการเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. ได้และเป็นประโยชน์แก่การศึกษาวิจัยสาหร่ายในเชิงพาณิชย์ทั้งระดับท้องถิ่นและระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจการสร้างงานวิจัยแบบบูรณาการ ซึ่งต้องใช้ทักษะทางการเขียนโปรแกรมคอมพิวเตอร์ผสานเข้ากับความรู้ทางด้านชีววิทยาและด้านการทำงานเกี่ยวกับการประมวลผลภาพการสร้างอัลกอริทึมให้คอมพิวเตอร์เข้าใจโครงสร้างของสาหร่ายเพื่อช่วยในการติดตามการเติบโตของสาหร่ายชนิดนี้ ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีโปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อประมวลผลภาพให้เลือกใช้ และมีผู้วิจัยด้านการประมวลผลภาพมาแล้วแต่โปรแกรมและงานวิจัยดังกล่าวไม่ได้ผลิตและวิจัยสำหรับงานที่มีความเฉพาะเจาะจง อาจทำให้ไม่สามารถตอบสนองความต้องการของผู้ใช้งานเฉพาะทางอย่างเช่นผู้วิจัยทางด้านสาหร่าย เพื่อเป็นทางเลือกใหม่สำหรับนักศึกษาและผู้วิจัย ซึ่งอาจทดแทนวิธีการวัดการอัตราการเติบโตของสาหร่ายแบบเดิมที่ใช้วิธีการนับโดยอาศัยสายตาตามมนุษย์ ที่ใช้เวลานานและเป็นที่เบื่อหน่ายเป็นอย่างยิ่งและเพื่อลดค่าใช้จ่ายในการซื้อโปรแกรมสำเร็จรูปที่มีราคาสูงอีกด้วย

วัตถุประสงค์

พัฒนาเครื่องมือนับจำนวนประชากรสาหร่าย *Chlorella* sp. เพื่อวัดอัตราการเติบโตโดยใช้เทคนิคประมวลผลภาพ ดิจิทัลที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

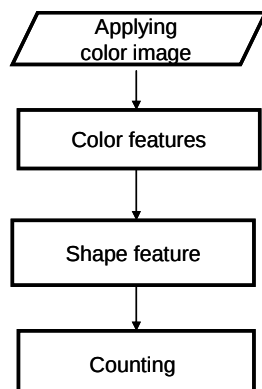
ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Chlorella* sp. ด้วยอาหารสูตร Jaworski's medium โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ปริมาณอาหาร 100 มิลลิลิตร ณ อุณหภูมิห้อง ทำการเขย่าด้วยความเร็ว 120 rpm ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ เป็นเวลา 15 วัน

2. การเก็บตัวอย่างภาพ

เก็บข้อมูลภาพสาหร่าย *Chlorella* sp. ขนาด 1024 x 768 จุดภาพ (pixel) โดยการดูดสาหร่ายปริมาตร 0.02 มิลลิลิตรวางบนสไลด์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ขนาด 22x22 มิลลิเมตร แล้วส่องถ่ายภาพสาหร่ายของช่วงอายุการเติบโต ได้แก่ 0, 3, 6, 9, 12, 15 วัน ช่วงอายุละ 100 ภาพ จากกล้องจุลทรรศน์ที่มีการติดตั้งกล้องดิจิทัลภายใต้ขอบเขตของกระจกปิดสไลด์

3. การประมวลผลภาพ (image processing)

สำหรับหัวข้อนี้เป็นการนำเสนออัลกอริทึมที่จำเป็นต่องานวิจัยเกี่ยวกับการวัดอัตราการเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. หรือการนับจำนวนเซลล์ (cell count) ด้วยเทคนิคการประมวลผลภาพในโปรแกรม MATLAB โดยจะกล่าวเป็นลำดับตามขั้นตอนวิจัยดังนี้



ภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ภาพเพื่อบันทึกจำนวน

3.1 คุณลักษณะทางสี (color features)

เนื่องจากภาพถ่ายสาหร่าย *Chlorella* sp. ในงานวิจัยนี้เป็นภาพสี (RGB image) ที่ประกอบด้วยกลุ่มที่ต้องสงสัยว่าเป็นสาหร่าย *Chlorella* sp. และพื้นหลังสไลด์ แต่กลุ่มที่ต้องสงสัยมีคุณลักษณะทางสีค่อนข้างใกล้เคียงกับสีของพื้นหลัง (ภาพที่ 2 ก.) จึงทำการวิเคราะห์สีที่เป็นพื้นหลัง (background color) ของภาพ เพื่อแยกกลุ่มที่ต้องสงสัยว่าเป็นสาหร่ายออกโดยประมวลผลแยกเป็น 3 กลุ่ม คือ สีแดง (red) สีเขียว (green) และสีน้ำเงิน (blue) เนื่องจากระดับความเข้มสีของพื้นหลังแต่ละจุดภาพไม่สม่ำเสมอจากการทดลองจึงได้ค่าเป็นช่วง (range) ของแต่ละสีดังนี้ ค่าสีแดงมีมากกว่า 150 มีค่าสีเขียวอยู่ระหว่างช่วง 150-200 และค่าสีน้ำเงินมีมากกว่า 150 ใช้ค่าดังกล่าวในการแบ่งส่วนภาพกลุ่มที่ต้องสงสัยว่าเป็นสาหร่าย และพื้นหลังสไลด์ออกจากกัน (ภาพที่ 1 ข.)

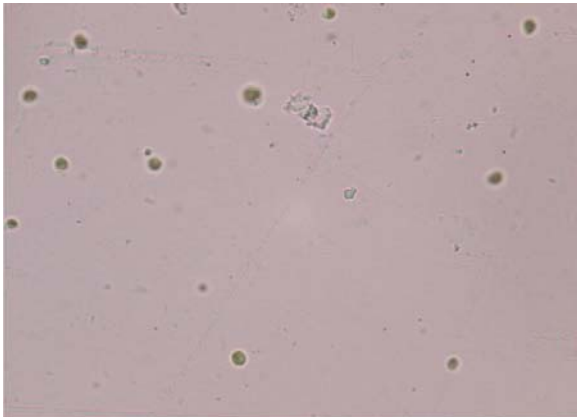
3.2 คุณลักษณะทางรูปร่าง (shape features)

ทำการแปลงเป็นภาพสองระดับ (binarization) กำจัดสัญญาณรบกวน (noise) เช่น ฟองอากาศ สิ่งแปลกปลอมต่างๆ ที่มีขนาดเล็กกว่ากลุ่มที่ต้องสงสัย โดยเทคนิค Morphologically open binary image และเปรียบเทียบขนาดของกลุ่มที่ต้องสงสัยว่าเป็นสาหร่ายที่อยู่ในช่วงพื้นที่ (area) ที่ได้จากการทดลอง คือ ต่ำสุดไม่เกิน 200 จุดภาพ (pixel) และสูงสุดไม่เกิน 1000 จุดภาพ (ภาพที่ 2 ก.) ขั้นตอนต่อไปจะทำการตรวจหาตัวสาหร่ายโดยพิจารณาลักษณะรูปร่างความกลม (roundness of an object) จากสัดส่วนของเส้นรอบรูป (perimeter) และพื้นที่ (area) ดังนี้

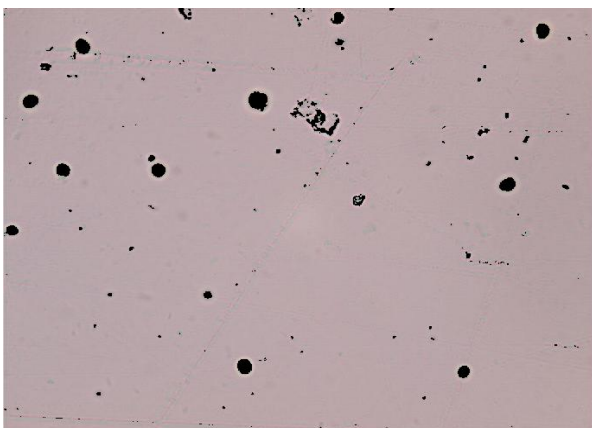
$$\text{Roundness} = \frac{4\pi \cdot \text{area}}{(\text{perimeter})^2} \quad (1)$$

และตั้งสมมุติฐานว่าตัวสาหร่าย *Chlorella* sp. มีลักษณะค่อนข้างกลมแต่ไม่ใช่วงกลมที่สมบูรณ์

จากนั้นทำการพิจารณาเพื่อแยกแยะหาตัวสาหร่ายทำได้โดยการตั้งค่าขีดเริ่มเปลี่ยน (threshold) จากการทดลองทำให้ได้ค่าที่เหมาะสมจากนั้นทำการเปรียบเทียบถ้าวัตถุที่ด้องสงสัยมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับค่าเริ่มเปลี่ยนแสดงว่าเป็นตัวสาหร่าย (ภาพที่ 2 ข) จึงทำการนับจำนวนสาหร่ายทั้งหมดในภาพต่อไป



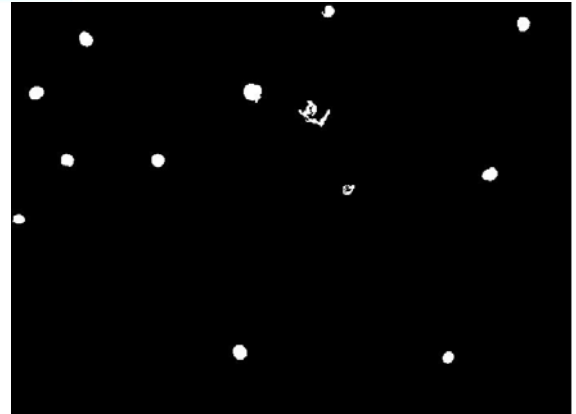
ก) ภาพถ่ายสาหร่าย *Chlorella* sp. จากกล้องจุลทรรศน์



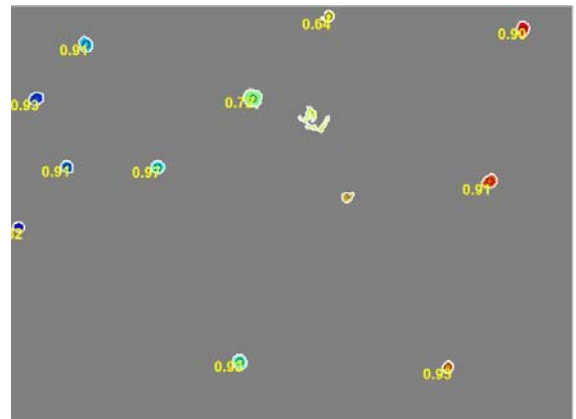
ข) การแยกภาพกลุ่มที่ด้องสงสัยว่าเป็นสาหร่ายและพื้นหลังสไลด์ออกจากกัน

ภาพที่ 1 การใช้คุณลักษณะทางสีแยกกลุ่มที่ด้องสงสัยว่าเป็นสาหร่ายออกจากพื้นหลัง

BMP1-4



ก) การสร้างภาพสองระดับและกำจัดสัญญาณรบกวน (noise)



ข) เปรียบเทียบลักษณะความกลมของสาหร่ายด้วยค่าขีดเริ่มเปลี่ยน (threshold)

ภาพที่ 2 การใช้คุณลักษณะทางรูปร่างตรวจหาตัวสาหร่าย *Chlorella* sp.

4. คำนวณค่าเฉลี่ยความผิดพลาดเชิงสัมพัทธ์ (Mean – Magnitude of Relative Error: MMRE)

ทำการตรวจนับจำนวนสาหร่าย *Chlorella* sp. โดยนำตัวอย่างภาพสาหร่ายที่บันทึกได้จากข้อ 2 ตรวจนับจำนวนสาหร่ายด้วยการประมวลผลภาพถือเป็นค่าประมาณการ (predict) และให้ผู้เชี่ยวชาญนับจากภาพด้วยสายตาซึ่งจะถือว่าเป็นค่าจริง (actual) นำจำนวนสาหร่าย

ที่นับได้จากทั้ง 2 วิธี คำนวณค่า MRE และ MMRE
จากสมการ (1) และ (2)

$$MRE = \frac{|Actual\ cost\ t_i - Predicted\ cost\ t_i|}{Actual\ cost\ t_i} \quad (1)$$

MRE = ค่าความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์
(Magnitude of Relative Error)

Actual cost(i) = ค่าปริมาณแท้จริงของตัวอย่างที่ใช้ในการ
ทดสอบลำดับที่ i

Predicted (i) = ค่าปริมาณจากการประมาณการตัวอย่างที่
ใช้ในการทดสอบลำดับที่ i

$$MMRE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left[\frac{|Actual\ cost\ t_i - Predicted\ cost\ t_i|}{Actual\ cost\ t_i} \right] \times 100 \quad (3)$$

หากค่าเฉลี่ยความคลาดเคลื่อนสัมพัทธ์ (Mean - MRE :MMRE) มีค่าสูง หมายถึง ร้อยละของความคลาดเคลื่อนสูง หากค่า MMRE = 0 หมายถึงค่าของการพยากรณ์เท่ากับค่าจริงทุก ๆ ค่า นั่นคือ MMRE น้อย หมายถึงมีความแม่นยำสูง จากนั้นหาค่าระดับร้อยละของการพยากรณ์ผิดพลาดไม่เกินเกณฑ์ในงานวิจัยนี้ใช้เกณฑ์เท่ากับ 20% หมายถึงอย่างน้อย 80% ของค่าประมาณห่างจากค่าจริง 20 % ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้

$$Pred(q) = K/N \quad (4)$$

โดยที่ 'q' หมายถึง ระดับร้อยละของการพยากรณ์
ผิดพลาดที่ไม่ต้องการให้เกิน เช่น 20%

K หมายถึง จำนวนตัวอย่างที่มีค่าพยากรณ์ภายใน
เกณฑ์ 'q'

N หมายถึง จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่นำมา
คำนวณ

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ผลการตรวจนับจำนวนสาหร่าย *Chlorella* sp. เมื่อเทียบกับการนับจากผู้เชี่ยวชาญ ได้ค่าความผิดพลาดเชิงสัมพัทธ์ (MRE) และค่าระดับร้อยละของการพยากรณ์ผิดพลาด (PRED(q)) แสดงดังตารางที่ 1 พบว่าในช่วงอายุ 9, 12, 15 วัน ค่าความผิดพลาดเชิงสัมพัทธ์ (MRE) มีเพียง 3-5 % แสดงว่ามีค่าผลต่างจากค่าจริงอยู่ในระดับต่ำและมีค่าใกล้เคียงกับค่าจริงที่นับจากผู้เชี่ยวชาญสูง นั่นคือการประมวลผลภาพมีความถูกต้องแม่นยำ ถึงแม้ช่วงอายุดังกล่าวจะมีจำนวนสาหร่ายที่เพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยความผิดพลาดเชิงสัมพัทธ์ (MMRE) มีเพียง 8.41 % นอกจากนั้นค่าระดับร้อยละของการพยากรณ์ผิดพลาด PRED(q) จากการประมาณการไม่เกิน 20 % มีค่า 85.67 % แสดงถึงการนับจำนวนสาหร่ายด้วยการประมวลผลภาพมีประสิทธิภาพพออยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 1 ผลการคำนวณค่า MMRE และ PRED(q)

DAY	MRE
0	15.71
3	15.17
6	8.69
9	4.20
12	3.65
15	3.02
MMRE	0.08
%MMRE	8.41
%PRED(20)	85.67

สรุปผลการวิจัย

จากผลการคำนวณค่าเฉลี่ยความผิดพลาดเชิงสัมพัทธ์ (MMRE) มีเพียง 8.41 % และค่าระดับร้อยละของการพยากรณ์ผิดพลาด (PRED(q)) จากประมาณการไม่เกิน 20 % มีค่า 85.67% สามารถสรุปได้ว่าการนับจำนวนสาหร่ายด้วยการประมวลผลภาพมีประสิทธิภาพระดับหนึ่ง ทั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ใน

การวัดอัตราการเติบโตของสาหร่ายแทนการอาศัย
การนับด้วยสายตาของมนุษย์ซึ่งเป็นงานที่ใช้เวลามาก

ข้อเสนอแนะ

1. พัฒนาวิธีการประมวลผลภาพและอัลกอริทึมที่สามารถรองรับปัญหาแวดล้อมต่างๆ เช่น การซ้อนทับกันของสาหร่าย สิ่งแปลกปลอมที่มีสีและลักษณะใกล้เคียงกับตัวสาหร่าย *Chlorella* sp. อาจใช้โครงข่ายประสาทเทียมช่วยในการแยกคุณลักษณะ
2. พัฒนาให้เป็นชุดอุปกรณ์อัตโนมัติหรือกึ่งอัตโนมัติ สำหรับนับจำนวนสาหร่ายเพื่อการวัดการเติบโตให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น
3. ศึกษาประสิทธิภาพสูงสุดของการประมวลผลภาพและอัลกอริทึมที่ใช้ในงานวิจัยนี้ โดยวิเคราะห์ปริมาณการเติบโตของสาหร่าย *Chlorella* sp. ในสภาพการเพาะเลี้ยงเสมือนจริง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้มีอุปการคุณต่องานวิจัย สวท. โครงการส่งเสริมครูผู้มีความสามารถพิเศษทางด้านวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ที่ให้การศึกษาระดับปริญญาโทในครั้งนี้และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่สนับสนุนทุนวิจัย ขอบคุณคณะอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และคณะอาจารย์สาขาวิทยาศาสตร์คณิตศาสตร์บูรณาการทุกท่านเป็นอย่างสูงที่ให้คำปรึกษารวมถึงน้องๆ นักศึกษาปริญญาโทสาขาจุลชีววิทยาที่ให้คำปรึกษาและดูแลตลอดการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- ชินโรส ศรีศิริ, ยิงยศ ลับภู, ประสงค์ วงศ์วิชา และ
กันยารัตน์ โหละสุด. 2551. ศึกษาการ
หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมัน
ของสาหร่ายท้องถิ่นเซลล์เดียว. เอกสารการ
ประชุมวิชาการ, ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พันธุ์วงศ์ คุณชนะวัฒน์. 2548. รายงานการวิจัยเรื่อง
ค้นแบบซอฟต์แวร์วัดการเจริญเติบโต
ของสาหร่าย *Spirulina platensis*.
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- บุญชม ศรีสะอาด. 2541. พิมพ์ครั้งที่ 2. วิธีการทางสถิติ
สำหรับการวิจัย เล่ม 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์
สุวีริยาสาส์น. หน้า 113.
- ยุวดี พิรพรพิศาล และฉมาภรณ์ นิवासบุตร. 2546.
พิมพ์ครั้งที่ 5. คู่มือปฏิบัติการสาหร่ายวิทยา.
เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- J. R. Parker. Algorithm for Image Processing and
Computer Vision, Wiley Computer
Publishing, 1997.
- Shery. 2008. Detox Your Body with *Chlorella*.
Retrieval Systems. Retrieved November 20,
2009, <http://www.naturalnews.com/025104.html>.