

革兰氏染色细菌显微图像深度学习分类与计数

董宇波¹, 王蕊¹, 赵慧娟², 张书景³

1. 烟台大学光电信息科学技术学院, 山东 烟台 264005; 2. 滨州医学院公共卫生与管理学院, 山东 烟台 264005; 3. 河北师范大学职业技术学院, 河北 石家庄 050000

【摘要】菌种和数量是研究菌群失调和疾病预测的重要参数,然而细菌分类和计数工作主要由人工完成,过程繁琐,极易出错,并且耗时费力。本研究提出一种基于图像深度学习的方法对显微图像中的革兰氏阳性杆菌、革兰氏阴性杆菌、革兰氏阳性球菌和革兰氏阴性球菌进行分类。整个算法过程包括分割和分类识别两部分,首先采用U-Net“渐进分割法”对细菌部分和背景部分进行分割;然后将分割后的细菌分别投入ResNet50模型和VGG19模型进行识别和计数。将经过再训练ResNet50模型和VGG19模型的计数结果与人工分类计数标准的结果进行比较,实验结果表明ResNet50模型可以达到人工分类和计数的准确率。

【关键词】革兰氏染色菌;分类计数;U-Net;ResNet;深度学习

【中图分类号】R318

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2021)01-0127-06

Classification and counting of Gram-stained bacteria by deeply learning in micro-image

DONG Yubo¹, WANG Rui¹, ZHAO Huijuan², ZHANG Shujing³

1. School of Opto-Electronic Information Science and Technology, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. School of Public Health and Management, Binzhou Medical College, Yantai 264005, China; 3. College of Career Technology of Hebei Normal University, Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Breeds and quantity of bacteria are important parameters for research of dysbacteriosis as well as disease prediction. However, the classification and counting of bacteria was a cumbersome task mainly done by humans, and the process is error-prone, time-consuming and laborious. In this paper, a method based on image deep learning was proposed to classify the four types of bacteria including Gram-positive bacilli, Gram-negative bacilli, Gram-positive cocci and Gram-negative cocci in the microscopic images. The method consists of two major procedures: one is segmentation and the other is classification and identification. First, U-Net "progressive segmentation" was used to segment the bacteria part and the background part. Second, the segmented bacteria were fed into ResNet50 model and VGG19 model for recognition and counting. Finally, the results from retrained ResNet50 model and retrained VGG19 model were compared with the manual classification counting standard, and the results from retrained ResNet50 model were shown to reach the accuracy of manual counting and classification.

Keywords: Gram-stained bacteria; classification & counting; U-Net; ResNet; deep learning

前言

细菌的分类和计数在生物工程、环境检测和医药学等领域都有十分重要的意义。传统的细菌计数方法有平板计数法^[1-3],这是一种间接培养计数法,由

于单个细菌难以观测,因此将分散的细菌在培养基上培养形成菌落,将菌落个数作为计数标准,这种方法需要花时间培养细菌,结果不稳定。流式细胞术是一种通过仪器分析细胞而完成计数的方法^[4-6],被荧光标记过的细菌以一定的速度流过流式细胞仪测定区域,荧光反应的信号强度能够检测细菌的组成和含量;然而流式细胞仪价格昂贵,对单个细菌的检测准确,对混合细菌分类效果不好。最大可能数(MPN)计数方法通过概率统计来估计细菌浓度^[7-8]。显微镜计数是一种常用的方法,显微镜可以放大细菌或染色细菌,以便于人们观察,对于单个视野中细菌分布不均匀且数量众多的显微镜计数工作量巨

【收稿日期】2020-07-25

【基金项目】国家自然科学基金(61701165, 61771181);山东省自然科学基金(ZR2017BF040)

【作者简介】董宇波,研究方向:人工智能和医学图像处理, E-mail: Shawndong98@gmail.com

【通信作者】王蕊,博士,讲师,研究方向:计算机视觉, E-mail: oucwan-grui@163.com

大,过程繁琐,并且极易出错^[9-11]。

针对以上问题,本研究提出一种基于深度学习的显微图像细菌计数方法,该方法能够将实际任务图像中的革兰氏阳性杆菌、革兰氏阴性杆菌、革兰氏阳性球菌和革兰氏阴性球菌进行分类识别和计数,图1显示了4种不同类型细菌的显微图像。该算法

过程流程模拟人眼观察,对4种细菌的分类计数过程为:“分割”→“分类器训练”→“识别”→“分类计数”。首先采用U-Net“渐进式分割”方法去除背景,分割出细菌部分;然后将分割后的细菌部分分别投入经过训练后的ResNet50模型和VGG19模型进行识别和计数。

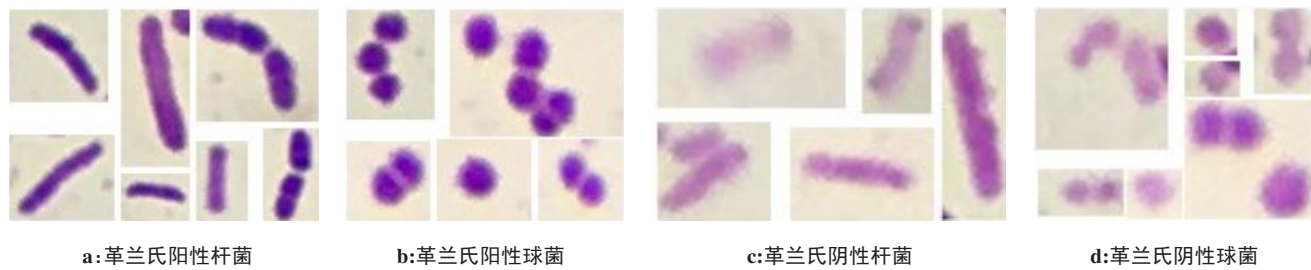


图1 4种革兰氏染色菌形态差异
Fig.1 Morphological differences among four kinds of Gram-stained bacteria

1 渐进分割

图像分割是将图像分成具有独特特征的特定区域,也是后续图像分析的预处理和关键准备^[12]。由于显微图像中的细菌尺寸小且存在黏连和边缘模糊的情况,以往的分割方法难以很好地将背景剔除。U-Net^[13-14]在医学图像分割方面有很好的表现,在2015年ISBI细胞追踪比赛中取得了优秀的表现。

U-Net网络结构如图2所示,它是一个编码器-解码器结构,左半边为编码器,与传统的分类网络结构类似,是“下采样阶段”,右半边为解码器,是“上采样阶段”,中间的灰色箭头为跳跃连接,将浅层的特征与深层的特征拼接,浅层通常可以抓取图像一些简单的特征,比如边界、颜色,深层的特征是高维特征,经过训练后记忆在网络参数中。

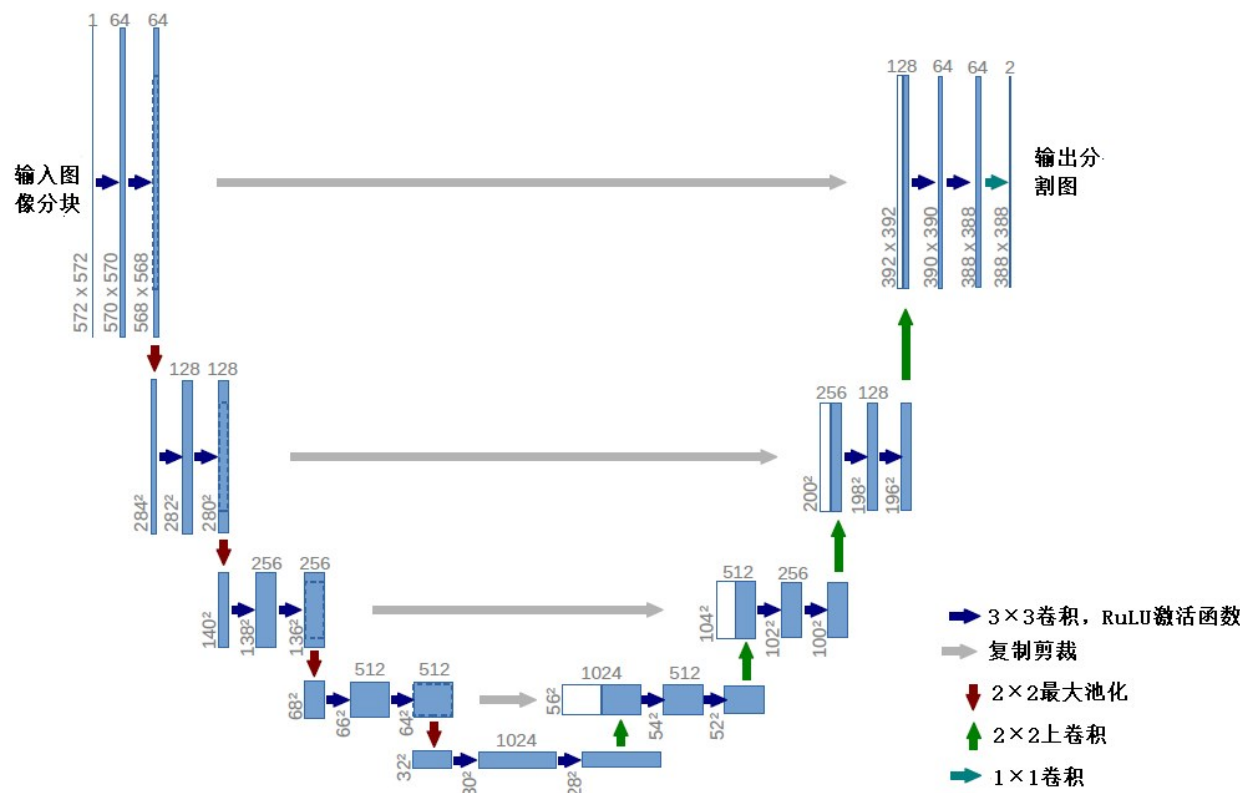


图2 U-Net模型结构
Fig.2 The U-Net model structure

1.1 训练 U-Net

细菌显微图像和医学图像有很多相同的特点, 例如图像颜色种类少、背景单调、噪声高、分辨率低; 不同的是细菌显微图像中微小细菌的数量十分巨大。因此, 首先将一幅细菌显微图像分割成若干个 30×30 像素的子块, 然后选取部分子块作标记, 对

U-Net 模型进行训练。每个子块进行分割之后, 将它们拼接起来作全局分割掩膜。掩膜为一个二值图像, 白色为细菌部分, 黑色为背景部分, 将掩膜与原图相乘即可得到分割后的细菌。图 3 显示了 U-Net 分割后的掩膜, 图 4 显示了子块合成掩膜的过程。

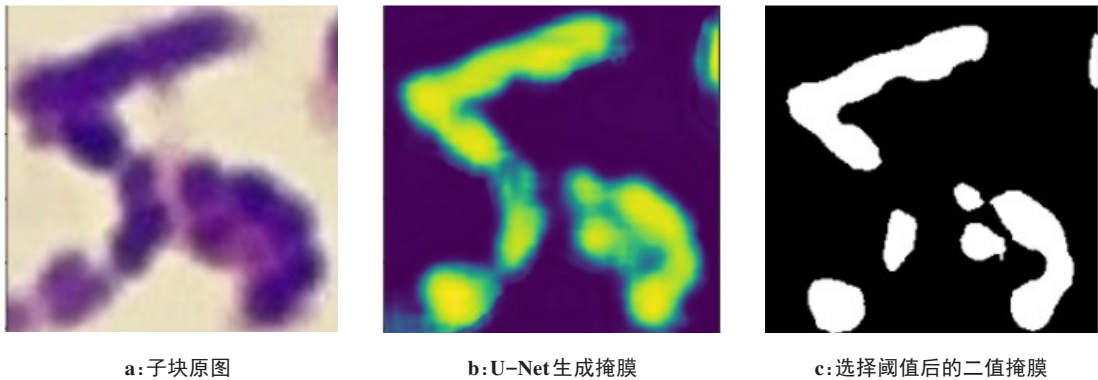


图 3 U-Net 子块分割掩膜

Fig.3 The mask of sub-blocks segmented by U-Net

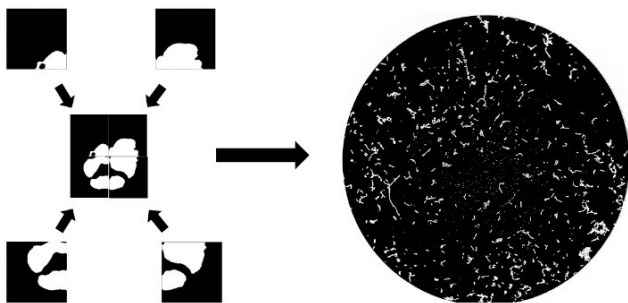


图 4 合成全局分割掩膜过程

Fig.4 The synthesis process of the whole mask segmented by U-Net

本文中使用的 U-Net 网络模型包括 19 次卷积运算和 4 次转置卷积运算, 4 次上采样和 4 次下采样, 最终输出由 Simoid 函数激活。先将图像分解成 30×30 像素的子块, 从中选择 50 个作标签, 用于 U-Net 模型的训练。该模型经过 500 次迭代, 取得了良好的分割效果。分割掩膜很难通过一次性阈值得到, 较高的阈值会导致部分细菌的丢失, 而较低的阈值则会导致细菌黏连不能完全分割。因此, 本研究采用渐进分割, 通过至少两次调整阈值, 可以完成几乎所有细菌轮廓分割。

1.2 渐进分割

由 U-Net 模型生成的掩膜的像素分布如图 5 所示。通过观察 U-Net 模型生成的掩膜的像素分布, 选择中点处约 0.500 5 作为首次分割阈值, 去除大部分背景。再选首次阈值和最大值之间中点处约 0.500 75 作为二次分割阈值。

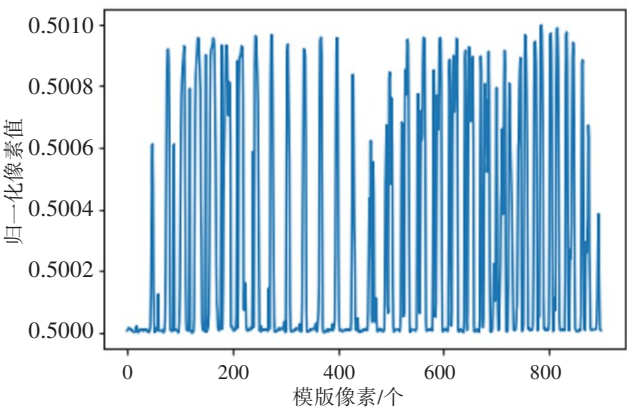


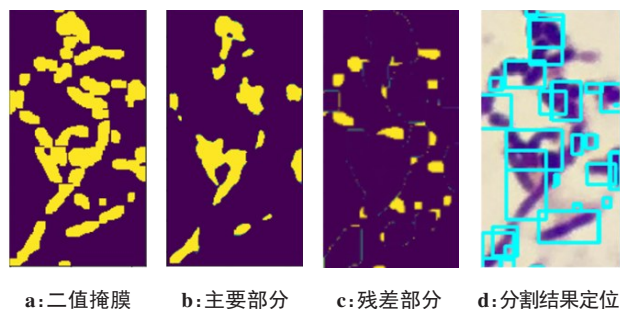
图 5 掩膜像素灰度值及分布情况

Fig.5 The pixel value and grey value of mask generated by U-Net and their distribution

1.2.1 首次分割 在得到图 3 所示的首次全局分割掩膜后, 我们通过分水岭算法找到连通域^[15]。这些连通域中有的包含多个细菌, 通过简单比较连通域与最大单个细菌面积, 挑选出包含多个细菌的连通域进行二次分割。

1.2.2 二次分割 选择更高的阈值为 U-Net 输出二值掩膜, 称之为“主要部分”。在得到更加细致的分割掩膜的同时, 也丢失了部分包含细菌的部分。为了找回其余部分的细菌, 我们将首次分割结果进行开运算, 将得到的结果和首次分割结果相减得到的结果称之为“残差部分”, 经过开运算后得到的“残差部分”可以减少两部分相减造成的边缘轮廓和毛刺。然后再次分别搜索“主要部分”和“残差部分”中的连

通域,这两部分的连通域几乎覆盖了所有且独立的细菌位置。图6显示了二次分割的过程和分割后的细菌位置定位,图7显示了黏连严重的细菌经过渐进分割后得到的结果。



a:二值掩膜 b:主要部分 c:残差部分 d:分割结果定位

图6 渐进分割过程

Fig.6 The progressive segmentation

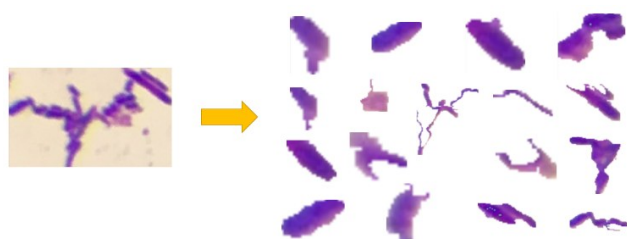


图7 黏连细菌分割结果

Fig.7 Segmentation of adhesive bacteria

2 分类和计数

为了比较结果的准确性,我们选择了两种深度卷积神经网络进行分类和计数。

2.1 深度卷积神经网络

VGGNet模型^[16]:VGGNet使用 3×3 卷积核和 3×3 池化核,通过不断深化网络结构来提高性能。堆叠式小卷积核优于大卷积核,因为多非线性层可以增加网络深度以保证更复杂模式的学习,而且代价相对较小(参数较少)。

ResNet模型^[17]:当神经网络层数增多时,由于存在梯度消失问题,训练困难。ResNet模型主要使用 3×3 的卷积核。模型的核心内容是残差,如图8所示,其学习特性表示为 $H(x)$ 。当输入为 x 时,残差是 $F(x) = H(x) - x$,那么原始学习特性应该为: $H(x) = F(x) + x$,残差的学习结构称为跳跃连接,可以从网络的一层激活,然后快速反馈到另一层甚至更深层的神经网络。这也使卷积层能够根据输入特征学习新的特征,从而获得更好的性能。

2.2 数据源

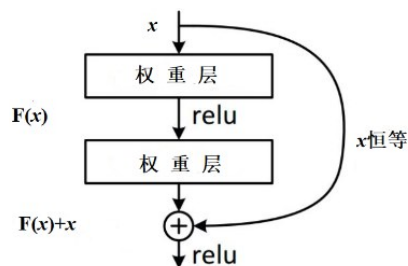


图8 ResNet 模型

Fig.8 The ResNet model

实验中的显微图像为滨州医学院公共卫生与管理学院实验室采集的革兰氏染色菌显微图像,并对用以U-Net模型、ResNet50模型和VGG19模型所使用分割后的训练子图进行标注。标签将革兰氏染色细菌分为阳性杆菌、阳性球菌、阴性杆菌和阴性球菌4类。最后,总共有600个细菌图像被标记为训练集,100个细菌图像被标记为测试集。然后,通过水平翻转、垂直翻转、水平垂直翻转和转置等操作,将训练集扩大到3 000个,测试集扩大到500个。

2.3 训练

分别使用ResNet50模型和VGG19模型进行训练。为了防止过拟合,当训练集的准确度小于95%时,提前停止对测试集参数进行保存。经过100次迭代,最终选取在训练集和测试集均有最高准确率时的模型参数,VGG19模型在测试集中的准确率达到88%,ResNet50模型的准确率达到90%,两者在训练集中的准确率均达到95%。

2.4 识别和计数

由于细菌特征较少,我们将渐进分割后得到的细菌放在白色背景的矩阵中,以此减少噪声干扰,将细菌输入VGGNet模型和ResNet模型进行识别和计数。

3 实验结果

我们对多张革兰氏染色细菌显微图像进行实验,并分别记录两种深度学习模型识别计数的结果。图9显示了VGGNet模型和ResNet模型的结果。表1和表2分别列出了阳性及阴性菌和杆菌及球菌的混淆矩阵^[18]。混淆矩阵对应行代表实际情况,列代表深度学习判定的情况。实验结果表明,VGGNet模型和ResNet模型在阴性细菌和阳性细菌的分类中均有较好的表现。然而,在杆菌和球菌的分类上,ResNet模型优于VGGNet模型。另外,ResNet比VGGNet平均少花9%的时间,在图9所展示的3组图像结果中ResNet和VGGNet的计算时间分别为178.1、111.4、95.9 s和185.4、137.4、100.2 s。

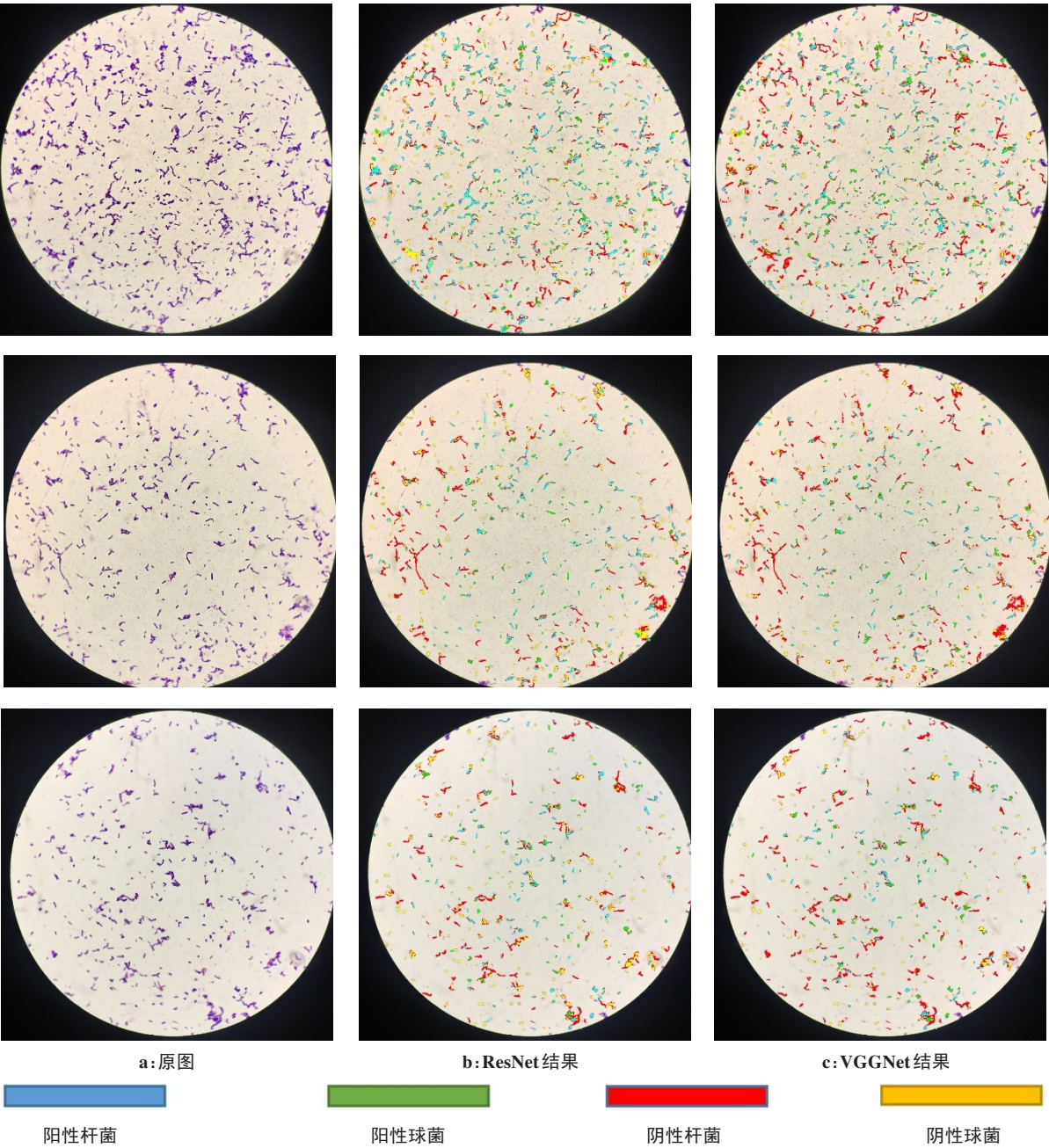


图9 识别分类结果(显微镜放大倍数为1 000倍)

Fig.9 Classification results (The microscope magnifies 1 000 times)

表1 阳性菌及阴性菌混淆矩阵
Tab.1 Positive-negative Confusion matrix

实际菌种类型	ResNet		VGGnet	
	阳性	阴性	阳性	阴性
阳性	0.973	0.027	0.948	0.052
阴性	0.026	0.974	0.040	0.960

表2 杆菌及球菌混淆矩阵
Tab.2 Bacilli and cocci Confusion matrix

实际菌种类型	ResNet		VGGnet	
	杆菌	球菌	杆菌	球菌
杆菌	0.947	0.053	0.877	0.123
球菌	0.073	0.927	0.126	0.874

4 结 语

使用深度学习算法进行细菌分类和计数,可以节省时间和人力,本文中的图片经比较,人眼计数与ResNet计数结果误差率不超过5%。与此同时,单幅

图片人工计数需要数个小时,而使用ResNet模型计数仅需要几分钟。一些分辨率低的黏连细菌目前仍旧难以分割,同样也难以进行人工识别。但随着深度学习模型的能力越来越强,计算机视觉将实现低

分辨率重建和更精确的分割。因此,细菌计数在未来将更加依赖于先进的人工智能技术。

【参考文献】

- [1] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 41-48
SHEN P, CHEN X D. Microbiology experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2007: 41-48.
- [2] 华晶忠, 于丽, 刘笑笑, 等. 发酵樱花中菌落总数平板计数结果不确定度的评定[J]. 东北农业科学, 2019, 44(3): 71-73.
HUA J Z, YU L, LIU X X, et al. Evaluation on uncertainty of plate counting results on colonies count in fermented lepidium sativum[J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2019, 44(3): 71-73.
- [3] 徐维昌, 陈波, 杨永春, 等. 平板涂布法在酱油菌落总数检验中的应用研究[J]. 食品安全导刊, 2017, 12: 115.
XU W C, CHEN B, YANG Y C, et al. Study on application of plate counting method in total number of soy sauce colony[J]. China Food Safety Magazine, 2017, 12: 115.
- [4] 耿慧霞, 王来, 王强. 流式细胞仪在生物学中的应用[J]. 生物学杂志, 2005, 22(4): 44-51.
GENG H X, WANG L, WANG Q. Application of flow cytometry in biology[J]. Journal of Biology, 2005, 22(4): 44-51.
- [5] YENTSCH C M, HORAN P K, MUIRHEAD K, et al. Flow cytometry and cell sorting: a technique for analysis and sorting of aquatic particles [J]. Limnol Oceanogr, 1983, 28(6): 1275-1280.
- [6] VAN NEVEL S, KOETZSCH S, PROCTOR C R, et al. Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring [J]. Water Res, 2017, 113: 191-206.
- [7] 陆苏颢. MPN法的原理与局限性分析[J]. 中国食品工业, 2004, 7: 58-59.
LU S B. MPN analysis[J]. China Food Industry, 2004, 7: 58-59.
- [8] 张炜煜, 王岙, 杨修军, 等. 生活饮用水中总大肠菌群MPN法的不确定度评定[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(21): 2600-2603.
ZHANG W Y, WANG A, YANG X J, et al. Evaluation of uncertainty measurement of total coliforms in drinking water by MPN counting method[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2019, 29(21): 2600-2603.
- [9] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2013.
QIAN C R, HUANG Y X. Experimental course on microbiology[M]. Beijing: Peking University Press, 2013.
- [10] 晏荣军, 尹平河, 林小涛. 荧光显微镜细菌计数方法研究[J]. 海洋技术, 2005, 24(1): 64-66.
YAN R J, YIN P H, LIN X T. Study on the counting method of bacteria in fluorescence microscope[J]. Journal of Ocean Technology, 2005, 24(1): 64-66.
- [11] 陈小美, 梁建嫦. 显微镜计数法复核血细胞分析仪计数PLT的临床价值分析[J]. 中国医药科学, 2018, 8(5): 155-157.
CHEN X M, LIANG J C. The clinical value of microscopical counting method to check blood cell analyzer in counting PLT [J]. China Medicine and Pharmacy, 2018, 8(5): 155-157.
- [12] 林瑶, 田捷. 医学图像分割方法综述[J]. 模式识别与人工智能, 2002, 15(2): 192-204.
LIN Y, TIAN J. Summary of medical image segmentation methods[J]. Pattern Recognition and Artificial Intelligence, 2002, 15(2): 192-204.
- [13] RONNEBERGER O, FISCHER P, BROX T. U-net: convolutional networks for biomedical image segmentation [C]//International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention. Springer, 2015: 234-241.
- [14] 潘沛克, 王艳, 罗勇, 等. 基于U-net模型的全自动鼻咽肿瘤MR图像分割[J]. 计算机应用, 2019, 39(4): 1183-1188.
PAN P K, WANG Y, LUO Y, et al. Automatic segmentation of nasopharyngeal neoplasm in MR image based on U-net model[J]. Journal of Computer Applications, 2019, 39(4): 1183-1188.
- [15] 丛培盛, 孙建忠. 分水岭算法分割显微图像中重叠细胞[J]. 中国图象图形学报, 2006, 11(12): 1781-1890.
CONG P S, SUN J Z. Segmentation of overlapped cells in microscopic images using watershed algorithm[J]. Journal of Image and Graphics, 2006, 11(12): 1781-1890.
- [16] SIMONYAN K, ZISSERMAN A. Very deep convolutional networks for large-scale image recognition[J]. arXiv preprint arXiv, 2014: 1409.
- [17] HE K, SUN J. Deep residual learning for image recognition[C]//IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. IEEE, 2016: 770-776.
- [18] 米爱中, 张盼. 一种基于混淆矩阵的分类器选择方法[J]. 河南理工大学学报(自然科学版), 2017, 36(2): 116-121.
MI A Z, ZHANG P. A method of classifier-selection based on confusion matrix [J]. Journal of Henan Polytechnic University (Natural Science), 2017, 36(2): 116-121.

(编辑:陈丽霞)