

Microbial Contamination Assessment of Lettuce using NIR Hyperspectral Imaging: Case Study on *Escherichia coli*

SAHAR RAHIL, HOSSEIN MOBLI^{1*}, BAHAREH JAMSHIDI², ASLAN AZIZI², MOHAMMAD SHARIFI¹

1. Department of Agricultural Machinery Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

2. Agricultural Engineering Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

(Received: March. 1, 2020- Revised: May. 20, 2020- Accepted: June. 9, 2020)

ABSTRACT

Development of non-destructive detection methods to rapidly assess the safety of agricultural products in terms of microbial contamination due to the increasing demand for safe ones is very important. In this research, a non-destructive optical method based on NIR hyperspectral imaging with (PLS-DA) method for rapid detection of microbial contaminated lettuce class (contaminated with *Escherichia coli*) from control class (with no contamination) was developed. To this end, dimensionality reduction (Spatial preprocessing) and spectral preprocessing were performed using (PCA) and Standard Normal Variate (SNV) with Mean Centering (MC) methods. The results of PLS-DA analysis showed the good ability in classification of control class and contaminated ones with different microbial population with high accuracy of 90% and class error of 0.008. Besides, the spectral region of 1400 to 1500 nm and the wavelength of 1200 nm were selected as the most important wavelengths that provide the most information for target identification and group classification using Variable Importance in Projection (VIP) score of the loading plot for PLS-DA. In general, the result showed that the NIR hyperspectral imaging method with PLS-DA analysis could be a fast and accurate method for real-time and non-destructive detection of microbial contamination in lettuce samples and classification of different classes (safe and contaminated).

Keywords: Microbial Contamination, Partial Least Square Discriminant Analysis, Hyperspectral Imaging, Chemo metrics.

فناوری تصویربرداری ابرطیفی فروسرخ نزدیک برای شناسایی آلودگی میکروبی: مطالعه موردی اشرفیاشکلی در کاهو

سحر راهی^۱، حسین مبلی^{۱*}، بهاره جمشیدی^۲، اصلان عزیزی^۲، محمد شریفی^۱

۱. گروه مهندسی ماشینهای کشاورزی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه

تهران، کرج، ایران

۲. عضو هیات علمی (دانشیار)، موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۱ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۲/۳۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۳/۲۰)

چکیده

با افزایش تقاضا برای محصولات کشاورزی سالم، توسعه روش‌های تشخیص غیر مخرب برای ارزیابی سریع ایمنی محصولات کشاورزی از نظر آلودگی میکروبی بسیار حائز اهمیت است. هدف از این پژوهش توسعه یک روش اپتیکی غیر مخرب مبتنی بر تصویربرداری ابرطیفی در ناحیه فروسرخ نزدیک به همراه روش تفکیک کمترین مربعات جزئی برای تشخیص سریع کاهوی برگی آلوده به میکروب اشرفیاشکلی از نمونه‌های کنترل (فاقد آلودگی) بود. برای این منظور، پیش‌پردازش مکانی با روش تجزیه مولفه‌های اصلی و پیش‌پردازش طیفی بر پایه توزیع نرمال استاندارد به همراه میانگین‌گیری مرکزی انجام شدند. نتایج تحلیل با روش تفکیک کمترین مربعات جزئی نشان داد که ۴ گروه متفاوت با دقت بیش از ۹۰ درصد و خطای کمتر از ۰/۰۰۸ قابل طبقه‌بندی هستند. هم‌چنین، با استفاده از بردار اهمیت متغیر، ناحیه طیفی ۱۴۰۰ تا ۱۵۰۰ و ۱۲۰۰ نانومتر به عنوان طول موج‌هایی که بیشترین اطلاعات را برای تشخیص هدف در اختیار می‌گذارند، انتخاب شدند.

واژه‌های کلیدی: آلودگی میکروبی، آنالیز تفکیک حداقل مربعات جزئی، تصویربرداری ابرطیفی، کمومتریکس.

مقدمه

محصولات تازه در سراسر جهان مورد پسند مردم هستند زیرا به عنوان منبع مهم مواد مغذی، ویتامین‌ها و فیبر شناخته می‌شوند. در عین حال طغیان بیماری‌های منتقله از غذا نیز در نتیجه مصرف چنین محصولاتی روند افزایشی نشان می‌دهد. به عنوان مثال در سال ۲۰۰۶ طغیان اشرفیاشکلی^۱ O157:H7 در ایالات متحده آمریکا به واسطه مصرف اسفناج رخ داد که ۲۰۰ مورد بیماری و ۳ مورد مرگ در پی داشت. از آنجا که بیشتر محصولات تازه به میزان کم فراوری می‌شوند و اغلب به صورت خام مورد استفاده قرار می‌گیرند، آلودگی آن‌ها به پاتوژن^۲ می‌تواند خطری جدی به حساب آید. عوامل بیماری‌زایی که اغلب با سبزیجات برگی همراه هستند

شامل باکتری‌ها (سالمونلا^۳، اشرفیاشکلی، یرسینیا پستیس^۴، شیگلا^۵ و لیستریا منوسایتوژنز^۶) و ویروس‌ها (نروویروس^۷، وروس هیپاتیت A^۸) و پارازیت‌ها (کریپتوسپوریدیوم^۹، سیکلوسپورا^{۱۰}) هستند (Jackson et al., 2013; Jung et al., 2014). متداول‌ترین و قدیمی‌ترین وارسته^{۱۱} کاهوی مورد کشت در ایران رومی^{۱۲} بوده و بخش اعظمی از سطح زیرکشت کاهو در کشور ما را در بر گرفته است، این وارسته با نام علمی *Lactuca sativa L. var. longifolia* از انواع کاهو است که در یک سر، بلند برگ‌های درشت با گوشت محکمی زیر مرکز آن‌ها رشد می‌کند. کاهو یکی از مهمترین سبزی‌های برگی است که عمدتاً برای مصارف تازه-خوری و سالادی استفاده می‌شود. گرچه برخی گونه‌های آن به صورت پخته هم قابل استفاده هستند (Ravikans et al., 2016).

* نویسنده مسئول: hmobli@ut.ac.ir

1. Escherichia Coli
2. Pathogen
3. Salmonella
4. Yersinia pestis
5. Shigella
6. Listeria Monocytogenes
7. Norovirus
8. Hepatite A Virus
9. Cryptosporidium
10. Cyclospora
11. Variety
12. Romaine

استفاده از این روش غیرمخرب همراه با تکنیک‌های کمومترکیس^{۱۰} (روش‌های پیشرفته ریاضی-آماری-کامپیوتری جهت طراحی آزمایش‌های بهینه‌سازی، برقراری ارتباط بین نتایج آزمایش با متغیرهای آزمایشی و هم‌چنین استخراج اطلاعات از سیستم‌های شیمیایی) منجر به ایجاد ابزاری موثر در تعیین ویژگی‌های متنوعی از نمونه مورد بررسی در بسیاری از زمینه‌ها، به ویژه به منظور ارزیابی کیفیت درونی میوه‌ها و سبزی‌ها شده است. اطلاعات حاصله از این تکنولوژی شامل اندازه‌گیری شدت بازتاب نور از نمونه در یک یا چند طول موج است که اطلاعات طیفی و مکانی شیء را در یک زمان در اختیار می‌گذارد (Kamruzzaman *et al*, 2012). همان‌گونه که بیان شد، مصرف محصولات تازه در دو دهه اخیر به دلیل توجه بیشتر به سلامتی و تغذیه صحیح، افزایش یافته است (Olaïmat & Holley, 2012). در عین حال طغیان بیماری‌های منتقله از غذا نیز در نتیجه مصرف چنین محصولاتی روند افزایشی نشان می‌دهد (Beuchat, 2007; Zhang *et al*, 1996). در سال ۲۰۱۲ پتانسیل استفاده از روش تصویربرداری ابرطیفی برای تشخیص آلودگی میکروبی ماهی سالمون بررسی شد. با استفاده از روش آنالیز مولفه‌های اصلی^{۱۱} (PCA) طیف‌های NIR طبقه‌بندی خوبی بین ماهی‌های سالمون تازه و آن تعداد که به مدت ۹ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شده بودند، نشان داد و آلودگی میکروبی آن‌ها تشخیص داده شد. هم‌چنین با استفاده از روش رگرسیون کمترین مربعات جزئی^{۱۲} (PLS) برای پیش‌بینی مدل به منظور شمارش کلی مزوفیل‌های ماهی‌های تازه و پیش‌بینی تعداد باکتری‌ها پس از ۹ روز استفاده شد. نتایج با ضریب تبیین^{۱۳} $R^2 = 0/95$ و ریشه میانگین مربعات خطای^{۱۴} $RMSE = 0/12 \log cfu/g$ نشان داد که با توسعه مدل‌های بیشتر در آینده، استفاده از این روش برای پیش‌بینی تعداد باکتری‌ها و در نتیجه کنترل عمر قفسه‌بندی ماهی سالمون و دیگر غذاهای دریایی امکان‌پذیر است (Tito *et al*, 2012). در سال ۲۰۱۵، استفاده از تصویربرداری ابرطیفی برای تشخیص دو گونه مختلف از کپک آسپرژیلوس فلاووس^{۱۵} در پسته تحلیل شد. در این مطالعه از دو روش تحلیل تفکیک خطی^{۱۶} (LDA) و تحلیل تفکیک درجه دوم^{۱۷} (QDA) استفاده و نتایج طبقه‌بندی میان نمونه‌های سالم و آلوده با دقت بالای ۹۱/۷

(Lundaï *et al.*, 2012). مطابق مطالعات و بررسی‌های صورت گرفته در سال ۲۰۱۷، سطح زیر کشت کاهو در دنیا حدود ۱۱۸ درصدی افزایش داشته و از این نظر کاهو، پس از ذرت، سیب زمینی، برنج و گوجه فرنگی، در رتبه پنجم قرار دارد (Mo *et al.*, 2017). متاسفانه طی چند دهه گذشته، کاهو با شیوع بیماری‌های ناشی از غذا از جمله اشرشیاکلی، سالمونلا و شیگلا در ارتباط بوده است. طبق گزارش‌های ارائه شده، طی ۱۵ سال گذشته موارد متعدد شیوع بیماری ناشی از مصرف غذا وجود داشته است که سبزیجات برگ‌پهن از جمله کاهو و اسفناج در آن‌ها دخیل بوده‌اند (Olaïmat & Holley, 2012). کاهو در برابر باکتری آسیب‌پذیر است زیرا رطوبت را در خود نگاه می‌دارد، نزدیک زمین رشد می‌کند (در این موارد به احتمال زیاد کاهوها به علت تماس با مدفوع حیوانات آلوده می‌شوند) و معمولا به صورت خام مصرف می‌شود. احتمال بالایی از نفوذ اشرشیاکلی در بافت‌های سبزیجات برگی مانند کاهو و اسفناج نیز وجود دارد که با شستشوی سطحی قابل رفع نیست (Niêmira, 2007). انواع بیماری‌زای آن نیز باعث عفونت‌های روده‌ای و خارج روده‌ای مانند گاستروانتریت^۱، عفونت دستگاه ادراری، مننژیت^۲، پریتونیت^۳ و سپتیسیم^۴ سمی می‌شوند (Tauxe *et al.*, 1997). در حال حاضر از روش‌های مرسوم آزمایشگاهی برای تشخیص آلودگی میکروبی استفاده می‌شود. علاوه بر زمان‌بر بودن، مشکلاتی چون تلفات اقتصادی ناشی از تخریب نمونه، کاربرد دشوار و پرهزینه بودن از دیگر مشکلات این روش‌های مخرب هستند. در دهه‌های اخیر، پیشرفت علم و تکنولوژی، روش‌های مختلفی مانند تکنیک به کارگیری اشعه X، روش‌های نوری، فراصوت (آلتراسونیک)^۵، اسپکتروسکوپی فرسرخ نزدیک^۶ (NIRS) و تصویربرداری ابرطیفی^۷ را برای تشخیص آلودگی میکروبی محصولات مختلف معرفی کرده است (Rahi *et al.*, 2018).

تکنولوژی تصویربرداری ابرطیفی تکنولوژی نوینی است که با تلفیق تصویربرداری و اسپکتروسکوپی^۸، اطلاعاتی درباره خواص مکانی و طیفی محصول مورد نظر ارائه می‌دهد (Mahesh *et al*, 2015). تصاویر دریافت شده سه‌بعدی هستند و ابرمکعب^۹ نامیده می‌شوند، به طوری که یک بعد مربوط به اطلاعات طیفی و دو بعد دیگر مربوط به اطلاعات مکانی هستند (Jamshidi, 2018).

11 . Principal Component Analysis
12 . Partial Least Square Analysis
13 . Coefficient of Determination
14 . Root Mean Square Error
15 . Aspergillus Flavus
16 . Linear Discriminant Analysis
17 . Quadratic Discriminant Analysis

1 . Gastroenteritis
2 . Meningitis
3 . Peritonitis
4 . Septicemia
5 . Ultrasonic
6 . Near Infrared Spectroscopy
7 . Hyperspectral Imaging
8 . Spectroscopy
9 . Hypercube
10 . Chemometrics

آلودگی کود دامی روی یک طرف و دو طرف کاهوهای رومی و بیبی اسفناج به کار گرفته شد. آزمون همبستگی برای انتخاب معنی‌دارترین جفت موج در نسبت هر دو باند و تمایز میان برگ-های سالم کاهو و بیبی اسفناج از برگ‌های آلوده، استفاده شد. باند موثر ۶۶۵/۶ تا ۶۸۰/۰ نانومتر برای کاهو و پهنای باند بین ۶۶۰/۸ تا ۶۸۰/۰ نانومتر برای بیبی اسفناج در تشخیص نقاط آلوده انتخاب شد. پیک‌های انتشار فلورسانس برای ماده مدفوع حیواناتی که مواد گیاهی سبز را مصرف می‌کنند و برای کلروفیل a در نزدیکی منطقه طیف قرمز رخ می‌دهد. در نتیجه، برای تصویربرداری چند-طیفی^۶ با این نسبت دو باند برای اجرای برخط، یک قدرت تفکیک طیفی بالا برای شناسایی آلودگی مدفوع گاو روی سبزیجات برگی مانند کاهو رومی و بیبی اسفناج ضروری است (Lee et al, 2014).

مرور منابع نشان داد، پیشنهاد و به‌کارگیری روش تصویربرداری ابرطیفی و معرفی مدل‌های تدوین شده، به ویژه در حوزه سبزی‌ها و آلودگی میکروبی که پژوهش‌های کمی صورت گرفته است، نیاز به انجام تحقیقات بیش‌تر دارد. از این رو، در این پژوهش امکان‌سنجی این روش برای تشخیص موردی میکروب اشریشیاکلی در محصول کاهو با توجه به ضرورت بررسی آلودگی-های میکروبی در این محصول انجام شد.

مواد و روش‌ها

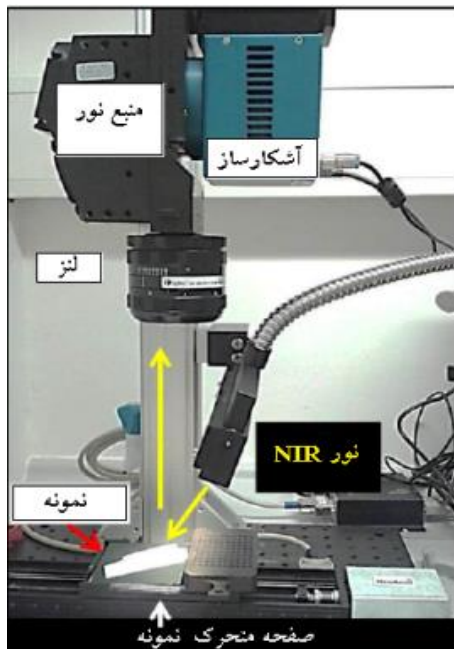
تعداد ۱۰۰ کاهو رومی به عنوان نمونه‌های آزمایشی در روز آزمایش از فروشگاه محلی واقع در شهر کونینهاگ، کشور دانمارک خریداری و در دمای ± 5 درجه تا زمان استفاده نگهداری شد. با توجه به هدف تحقیق، ۴ دسته نمونه شامل: نمونه‌های کنترل (فاقد آلودگی) و نمونه‌هایی با غلظت‌های مختلف آلودگی (سه گروه مختلف با حروف A1, A2, A3 معرفی شدند) آماده شدند. اشریشیاکلی (سویه^۷ K-12) در محیط لوریا برتانی آگار^۸ (LB) کشت داده شده و به مدت ۸ ساعت در انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۸ درجه سلسیوس قرارداد شد. پس از کشت، تعلیق^۹ از محلول حاصله از طریق تعلیق در بافر فسفات^{۱۰} به دست آمد. از این رسوب به عنوان منبع برای آلوده کردن نمونه-ها استفاده شد. تمامی مراحل آنالیز میکروبی در آزمایشگاه گروه میکروبیولوژی و تخمیر واقع در دانشگاه کپنهاگ انجام شد. به منظور آماده‌سازی، ابتدا برگ‌های معیوب سطحی از کاهو

درصد برای روش QDA به دست آمد (Kheiralipour et al, 2015). در پژوهشی دیگر، رابطه خوبی میان طیف‌های به دست آمده و مقدار کل میکروارگانیزم‌های شمارش شده (TVC) با R^2 برابر ۰/۸ به دست آمد که پتانسیل خوب برای ارزیابی آلودگی میکروبی گوشت‌های خرد شده را نشان داد (Ammor et al, 2009). نتایج مشابهی توسط Yoshimura et al., (2014) که از طیف فلورسانس در ناحیه ۲۰۰ تا ۹۰۰ نانومتر به منظور شمارش تعداد کل میکروبی‌های هوازی^۱ در سطح گوشت گاو استفاده کردند، به دست آمد (Yushimora et al, 2014). به‌علاوه روش PLS (Ait-Kaddour et al, 2011) و برخی روش‌های کموتریکسی دیگر مانند ماشین بردار پشتیبان^۲ (SVM) (Argyri et al, 2013) و شبکه عصبی مصنوعی^۳ (ANN) (Argyri et al, 2010; Kodogiannis et al, 2014; Panagou et al, 2011) برای رابطه میان طیف‌های به دست آمده و آلودگی میکروبی گوشت قرمز در سال‌های اخیر استفاده شده است. Tao et al., (2014) روش نوینی بر پایه توزیع گومپرتز^۴ اصلاح شده برای استخراج خصوصیات پخش شده در گوشت خوک از اطلاعات طیفی و مکانی تصاویر ابر طیفی برای تشخیص آلودگی و ارزیابی حسایت گوشت خوک ارائه کردند. در مجموع ۳۱ نمونه در محدوده ۱۱۰۰-۴۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. پارامترهای α , β , ε , δ از تابع گومپت خصوصیات اپتیکی مختلفی را در نتیجه قرار دادن منحنی تابع بر منحنی داده‌های اصلی پخش نشان می‌دهند. ضریب تطبیق برای تمام داده‌ها بین ۴۷۰ تا ۹۶۰ نانومتر ۰/۹۹ بود که تاثیر مثبت به کار بردن تابع گومپرتز را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد در میان پارامترهای مستقل، پارامتر δ در مقایسه با باقی آن‌ها بیشترین تاثیر را در تشخیص اشریشیاکلی و حسایت گوشت خوک داشت. در مقایسه با کاربرد پارامترهای مستقل و یکپارچه، پارامترهای یکپارچه پیشرو بود. نتایج اعتبارسنجی متقاطع^۵ در استفاده از پارامترهای یکپارچه برای تشخیص اشریشیاکلی ($R_{cv} = 0.939$) و برای تشخیص حساسیت گوشت ($R_{cv} = 0.949$) محاسبه شد. بنابراین استفاده از تصویربرداری ابرطیفی همراه با به کار بردن تابع گومپرتز به عنوان ابزاری قابل اطمینان و موثر به منظور تشخیص آلودگی گوشت خوک به اشریشیاکلی و همچنین حساسیت گوشت پیشنهاد شد. تصویربرداری ابرطیفی فلورسانس همراه با اشعه ماورا بنفش با استفاده از الگوریتم‌های فلورسانس دو موجی برای تشخیص

7 . Strain
8 . Luria-Bertani Agar
9 . Suspension
10 . Butterfiled's Phosphate Buffer

1 . Aerobic Plate Count
2 . Support Vector Machine
3 . Artificial Neural Network
4 . Gompertz Distribution
5 . Cross Validation
6 . Multispectral

نهایی با کمک سیستم رمزگذاری دوربین با نرخ ۱۴ بیتی انجام شد. دوربین با استفاده از پنل مرجع اسپکترون^۹ کالیبره و هم چنین مقادیر ابرمکعبها با استفاده از طیف تصاویر مرجع سفید و سیاه تصحیح شدند. طیفها در مد بازتاب از نمونههای تمامی گروهها اندازه گیری شدند.



شکل ۱- اجزای اصلی سامانه تصویربرداری ابرطیفی استفاده شده در پژوهش

پردازش تصویر

پردازش اولیه تصاویر ذخیره شده، از طریق تصحیح مقادیر بازتاب نسبی با استفاده از رابطه (۱) صورت گرفت:

$$\rho(x, y, \lambda) = \rho^{\text{Ref}}(\lambda) \frac{R(x, y, \lambda) - R_{\text{black}}(x, y, \lambda)}{R_{\text{white}}(x, y, \lambda) - R_{\text{black}}(x, y, \lambda)} \quad (1)$$

که در آن $\rho^{\text{Ref}}(\lambda)$ بازتاب استاندارد از مرجع جسم سفید (۹۹ درصد)، $R(x, y, \lambda)$ بازتاب از سطح نمونه، $R_{\text{white}}(x, y, \lambda)$ بازتاب ذخیره شده توسط CCD از جسم سفید و $R_{\text{black}}(x, y, \lambda)$ بازتاب گرفته شده توسط CCD از جسم سیاه هستند (Lara *et al.*, 2013).

به منظور کاهش زمان محاسبات و ابعاد دادهها، تصاویر برش داده شد و برای حذف پس زمینه از تصویر اصلی از روش خوشه بندی k-mean استفاده شد. هدف این الگوریتم پیدا کردن تعداد ثابتی از خوشهها براساس نزدیکی نقاط دادهها به هم است. به این ترتیب، طیفهای بازتاب نسبی از تمامی پیکسلهای تصاویر هر نمونه استخراج شد. شکل (۲) مراحل کلی آنالیز تصاویر را در این پژوهش نشان می دهد.

جدا و سعی شد که نمونهها از لحاظ خصوصیات ظاهری کاملاً نزدیک به یکدیگر باشند. قبل از آماده سازی نمونهها تمامی کاهوها چندین بار به دقت شستشو و خشک شدند. پس از آن، یک برگ کاهو به صورت تصادفی از میان شاخه کاهو انتخاب و با نهایت دقت تلاش شد کاهوهای هر گروه به طور یکنواخت مورد آلودگی قرار گیرند. سپس نمونهها در کیسههایی از جنس پلی اتیلن قرار داده و مهر و موم شدند. نمونهها به منظور رشد باکتری های اشریشیاکلی در انکوباتور^۱ به مدت ۴۸ ساعت با دمای ۱۰ درجه سلسیوس گرمگذاری^۲ شدند. نمونههای گروه کنترل نیز با محلول استریل فسفات بافر^۳ (فاقد هرگونه جمعیت میکروبی) مورد تیمار قرار گرفت. شمارش کلنی میکروبی روی تمام کیسهها انجام شد. برای این منظور نمونهها به دقت از بستهها خارج شدند و در بافر فسفات قرار گرفتند. برای حذف میکروبها از سطح برگها، نمونهها به مدت ۱ دقیقه در مخلوطکن آزمایشگاه^۴ مخلوط شدند. سپس، رقتهای متوالی از تعلیق به دست آمده در مراحل قبل تهیه و ظروف کشت میکروب با رقتهایی که انتظار می رفت کلنی های قابل شمارش داشته باشد، تلقیح شد. ماده تلقیحی از هر رقت متوالی در پلیتهای شمارش کلنی 3M Petrifilm E. coli (3M; ST, Paul, MN, USA) حاوی محیط کشت نوترینت ویولت رد بایل آگار^۵ به عنوان شاخص فعالیت آنزیم گلوکورونیداز^۶ برای میکروب اشریشیاکلی، قرار گرفت. تمام پلیت-ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمگذاری شدند. کلنیها با استفاده از دستگاه شمارش کلنی و براساس واحد کلی فرم بر گرم (CFU/gr) شمارش و ذخیره شدند.

دستگاه تصویر برداری ابرطیفی (NIR) مجهز به طیفسنج Headwall Photonics model 1002A-00371) در دامنه طیفی ۱۰۰۰-۱۶۰۰ نانومتر با آشکارساز سیلیکونی جفت کننده بار^۷ (CCD) و قدرت تفکیک طیفی ۴/۸۵ نانومتر (در مجموع ۱۴۲ باند) واقع در گروه شیمی سنجی و تکنولوژیهای تحلیلی دانشگاه کپنهاگ مورد استفاده قرار گرفت. شکل (۱) اجزای اصلی این سامانه تصویربرداری را نشان می دهد. دوربین در زاویه مستقیم نسبت به نمونه تنظیم و منبع نور هالوژن تنگستن کوآرتز^۸ (QTH) با زاویه ۴۵ درجه نسبت به نمونه و فاصله تقریبی ۲۵ سانتی متر از محل قرارگیری نمونه قرار گرفت. طیفسنجی با سیستم اسکن خطی با فاصله خطی ۳۲۰ پیکسل انجام شد. رزولوشن نهایی پیکسل ۳۰۰ میکرومتر بود و بازسازی تصویر

6 . Glucuronidase
7 . Charge Coupled Detector
8 . Quartz Tungsten Halogen
9 . Spectralon Plate

1 . Incubator
2 . Incubation
3 - Phosphate-buffered Saline
4 . Stomacher Lab Blender
5 . Violet Red Bile nutrient agar

آن بر روی یک مجموعه داده مستقل بدست می‌آید. در این پژوهش از اعتبارسنجی متقاطع k-fold که یکی از عمومی ترین انواع این روش در یادگیری ماشین است، استفاده شد (k برابر با ۱۰ انتخاب شد). همچنین مدل PLS-DA به دست آمده، با استفاده از معیارهای ضریب حساسیت^۶، ضریب تعیین^۷، خطای طبقه‌بندی^۸ و دقت^۹ بر اساس روابط (۲) تا (۵) سنجیده شد (Schröder et al., 2013).

(رابطه ۲)

$$\text{ضریب حساسیت} = \frac{TP}{TP + FN}$$

(رابطه ۳)

$$\text{ضریب تعیین} = \frac{TN}{TN + FN}$$

(رابطه ۴)

$$\text{خطا} = 1 - \left(\frac{\text{ضریب تعیین} + \text{ضریب حساسیت}}{2} \right)$$

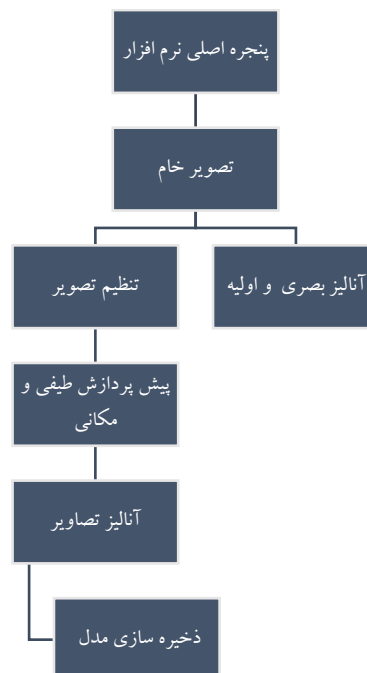
(رابطه ۵)

$$\text{دقت} (\%) = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$$

TP: تعداد رکوردهایی که روش طبقه‌بندی آن‌ها را به درستی به دسته‌ای که به آن تعلق دارند، تشخیص داده است.
 TN: تعداد رکوردهایی که روش طبقه‌بندی آن‌ها را به درستی به دسته‌ای که به آن تعلق ندارند، تشخیص داده است.
 FP: تعداد رکوردهایی که روش طبقه‌بندی آن‌ها را به نادرستی به دسته‌ای که به آن تعلق دارند، تشخیص داده است.
 FN: تعداد رکوردهایی که روش طبقه‌بندی آن‌ها را به نادرستی به دسته‌ای که به آن تعلق ندارند، تشخیص داده است.
 رابط گرافیکی کاربر (HYPER-Tools v.2.0) که به طور ویژه برای آنالیز تصاویر ابرطیفی و چندطیفی استفاده می‌شود، تحت محیط نرم افزاری متلب (The MathWorks, Inc. R2015a (MA, USA)) مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

شمارش میکروبی کل در نمونه‌های کاهو با واحد تشکیل کلنی بر گرم محاسبه شد. جمعیت میکروبی در هر دسته نمونه از ۵/۲ تا ۶/۷ لگاریتم کلنی فرم بر گرم تغییر کرد. به این ترتیب نمونه‌های کاهو با جمعیت میکروبی تقریبی ۵/۲ لگاریتم کلی فرم بر گرم در دسته A1، نمونه‌های کاهو با جمعیت میکروبی تقریبی ۶/۵ لگاریتم کلی فرم بر گرم در دسته A2 و نمونه‌های کاهو با جمعیت میکروبی تقریبی ۶/۷ لگاریتم کلی فرم بر گرم در دسته A3، قرار



شکل ۲- فلوجارت مراحل آنالیز تصاویر ابرطیفی در این پژوهش

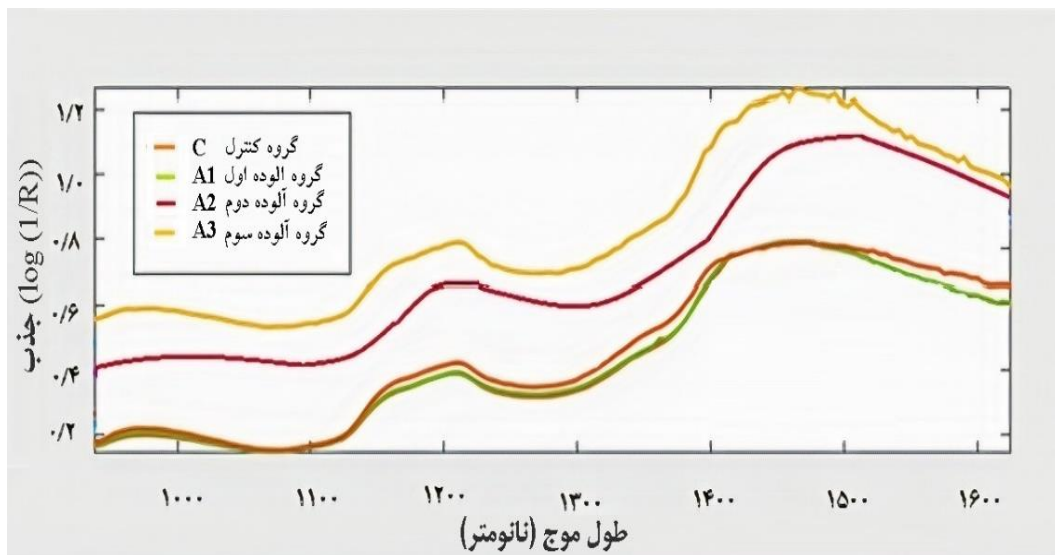
تجزیه مولفه‌های اصلی (PCA) در تعریف ریاضی، یک تبدیل خطی متعامد است که داده‌ها را به دستگاه مختصات جدید می‌برد که محورهای آن مولفه‌های اصلی (PCs) هستند. به گونه‌ای که بزرگ‌ترین واریانس داده روی نخستین مولفه اصلی (PC1) و دومین بزرگ‌ترین واریانس بر روی دومین مولفه اصلی (PC2) قرار می‌گیرد. (Yin, 2011). آنالیز تفکیک کمترین مربعات جزئی^۱ (PLS-DA) از جمله تکنیک‌های داده‌کاوی و طبقه‌بندی چند متغیره هستند که هدف آن یافتن مدل‌های ریاضی توانا در تشخیص گروهی از هر یک از نمونه‌ها با توجه به متغیرهای اندازه-گیری شده (در این پژوهش طیف‌های بازتابی و پیکسل‌های مربوط به هر گروه) است. در حقیقت، PLS-DA یک روش بازشناسی الگوی نظارت شده^۲ برای طبقه بندی خطی^۳ است که بر اساس رگرسیون کمترین مربعات جزئی بنا نهاده شده است. این روش به دنبال متغیرهای پنهانی است که بیشترین کوواریانس^۴ را با متغیرهایی دارند که عضویت نمونه‌ها در گروه-های مختلف (گروه کنترل و گروه‌های آلوده با جمعیت‌های مختلف میکروبی اش‌ریشباکلی) را نشان می‌دهد (Melikechi et al., 2008). داده‌ها به طور تصادفی به دو مجموعه تقسیم شد: ۷۵ درصد از نمونه‌ها برای مجموعه آموزش و اعتبارسنجی متقاطع و ۲۵ درصد باقی‌مانده برای اعتبارسنجی مستقل استفاده شد. با استفاده از اعتبارسنجی متقاطع کارایی مدل پیش از آزمون کارایی

6 . Specificity
 7 . Class Error
 8 . Accuracy

1 . Partial Least Square Discriminant Analysis
 2 . Supervised Pattern Recognition
 3 . Linear Classification Method
 4 . Covariance
 5 . Sensitivity

ماتریس‌های دوبعدی تجزیه شود. بنابراین، پس از تجزیه داده‌های ابرطیفی به ماتریس‌های دوبعدی، استانداردسازی روی داده‌های طیفی با استفاده از روش میانگین مرکزی^۱ صورت گرفت.

گرفتند. هر تصویر ابر طیفی متشکل از طیف‌های مختلف در موقعیت‌های مکانی مختلف نمونه است. به منظور استفاده از روش‌های کمومتریکس لازم است که داده‌های ابرطیفی به

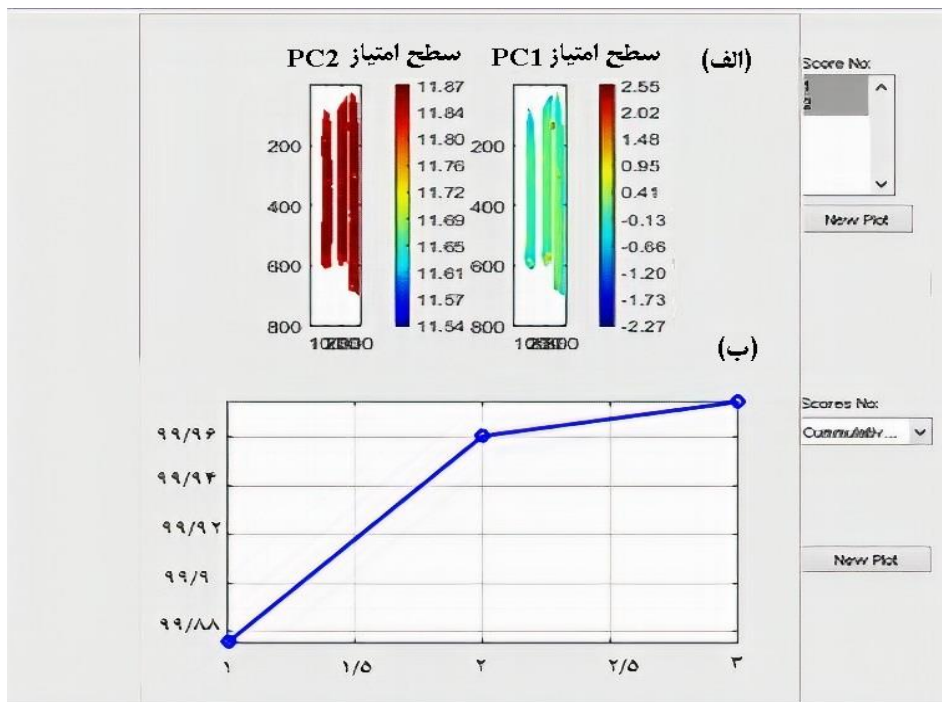


شکل ۳- متوسط طیف جذبی گروه‌های سالم و آلوده به اشربشیاکلی

(2011).

آنالیز مولفه‌های اصلی (PCA)، به عنوان آنالیز اولیه و به منظور کاهش ابعاد داده‌ها (پیش پردازش مکانی) میان نمونه‌های مختلف انجام شد. تصویر هر نمونه روی فضای جدید مولفه‌های اصلی حاصل از تجزیه و تحلیل PCA در شکل (۴) نشان داده شده است. نمودار امتیاز داده‌های اصلی را به دستگاه مختصاتی وارد می‌کند که ابعاد آن توسط مولفه‌های اصلی (PC1, PC2) تعریف شده است. رنگ‌های مختلف، تفاوت محتوای مواد تشکیل‌دهنده بیوشیمیایی گروه‌های مختلف را نمایش می‌دهد. همانطور که در شکل (۴ الف)) قابل مشاهده است، مقدار کل واریانس توضیح داده شده توسط دو مؤلفه اصلی اول و دوم (PC1 و PC2) بیش از ۹۵ درصد بود، که نشان می‌دهد تفاوت‌های اصلی در این دو مولفه اصلی ارائه شده است. بنابراین تفاوت میان گروه‌های مختلف مورد بررسی تنها با حضور دو مولفه اصلی امکان‌پذیر است. با توجه به نمودار واریانس تجمعی نیز تعداد انتخاب مولفه‌های اصلی دو است (شکل ۴ ب)). از آنجا که طیف هر ماده‌ای متناسب با خصوصیات فیزیکی-شیمیایی آن است، با توجه به درصد به دست آمده از مولفه‌های اول و دوم نمودار امتیاز، می‌توان امیدوار بود طبقه‌بندی نمونه‌های کاهو با روش‌های طبقه‌بندی در مراحل بعد براساس اطلاعات طیفی نمونه امکان‌پذیر و انتخاب مهم‌ترین طول موج‌های تاثیرگذار بر تمایز میان گروه‌ها در پیک‌ها و طول موج‌های مربوطه قابل استناد باشد.

قبل از انجام تجزیه تحلیل چند متغیره، تمامی طیف‌های بازتابی به منظور ارتباط میان غلظت مولکول و نور جذب شده، به طیف‌های جذبی تبدیل شدند. شکل (۳) متوسط طیف جذبی مربوط به نمونه‌های گروه کنترل و آلوده را نشان می‌دهد. در این شکل، جذب میانگین نمونه‌های کنترل از آلوده کاملاً قابل تشخیص است که می‌تواند به دلیل ترکیبات متابولیکی تولید شده توسط تلقیح اشربشیاکلی در حین گرماگذاری باشد. روش تصویربرداری ابرطیفی مکعب‌های داده را تولید می‌کند که از آن می‌توان اطلاعات کیفی و کمی مربوط را هنگام استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های بهینه استخراج کرد. داده‌های ابرمکعبی دارای دو مختصات مکانی و یک شاخص متغیر (مقدار طول موج) هستند که یک آرایه سه بعدی را ایجاد می‌کند. اگرچه طیف میانگین گروه‌های مختلف آلوده و کنترل از یک الگوی یکسان پیروی می‌کند اما تفاوت آشکاری در طول موج-های مشخصی قابل مشاهده است. از طرفی پیک وسیعی از ۱۴۰۰ نانومتر آغاز شده و در ناحیه مربوط به ۱۵۰۰ نانومتر ادامه پیدا می‌کند، که به اورتون‌های اول O-H نسبت داده می‌شود، دیده شد. در محدوده طیف سنجی فرسرخ نزدیک، طول موج‌های ۱۱۰۰ تا ۱۲۰۰ نانومتر به اورتون‌های دوم C-H نسبت داده می‌شود که به گروه‌های متیل و متیلن این ترکیبات مربوط است. از طرفی در گروه کنترل و گروه اول نمونه‌های آلوده اطراف ۹۰۰ نانومتر پیک خفیفی تشکیل شده است که مربوط به اورتون‌های سوم C-H است. (Yin,)



شکل ۴- نتایج تجزیه تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA): الف) سطح امتیاز مولفه‌های اصلی اول و دوم (PC1 و PC2)، ب) واریانس تجمعی مولفه‌های اصلی اول و دوم (PC1 و PC2).

جدول ۱- معیارهای حساسیت، ضریب تعیین، خطا و دقت طبقه بندی نمونه‌های سالم و آلوده

Lvs	مجموعه	گروه	حساسیت	ضریب تعیین	خطا	دقت (/.)
۳	آموزش	C	۱	۱		
		A1	۰/۹۳	۰/۹۴	۰/۰۴	۹۶/۸
		A2	۰/۹۸	۰/۹۸		
	اعتبارسنجی متقاطع	A3	۱	۱		
		C	۰/۹۶	۰/۹۶		
		A1	۰/۸۷	۰/۸۹		
		A2	۰/۹۳	۰/۹۳	۰/۰۸	۹۰/۵۲
		A3	۰/۹۳	۰/۹۳		
		اعتبارسنجی جزء پیکسل	C	۰/۹۶	۰/۹۵	
A1	۰/۸۹		۰/۹۰			
A2	۰/۸۸		۰/۸۵	۰/۰۹	۸۸/۳	
	A3	۰/۹۲	۰/۹۴			
	اعتبارسنجی هدف	C	۰/۹۴	۰/۹۵		
		A1	۰/۹۱	۰/۹۳	۰/۰۵	۹۱/۵
A2		۰/۹۱	۰/۹۳			
	A3	۰/۹۴	۰/۹۵			

Lvs = متغیرهای نهان؛ C = گروه کنترل؛ A1 = نمونه‌های کاهو با جمعیت میکروبی تقریبی ۵/۲ لگاریتم کلی فرم بر گرم؛ A2 = نمونه‌های کاهو با جمعیت میکروبی تقریبی ۶/۷ لگاریتم کلی فرم بر گرم

میکروبی تقریبی ۶/۵ لگاریتم کلی فرم بر گرم؛ A3 = نمونه‌های کاهو با جمعیت میکروبی تقریبی ۶/۷ لگاریتم کلی فرم بر گرم

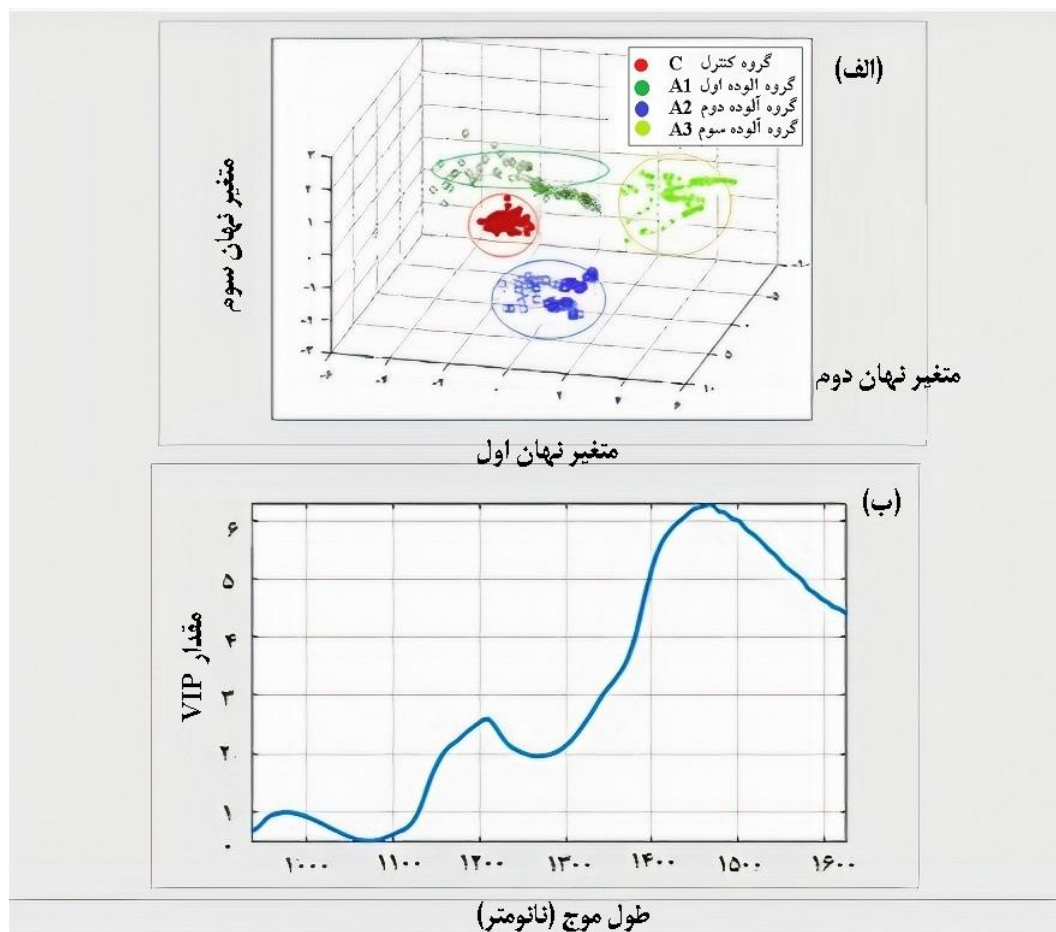
شد. پیش از تدوین مدل، روش پیش پردازش طیفی توزیع نرمال استاندارد^۱ برای حذف اثرهای افزاینده و جمعی پخش نور، اندازه نمونه و تغییر فاصله نمونه، در نظر گرفته شد. جدول یک نتایج

به منظور تمایز گروه نمونه‌های کنترل و آلوده از یکدیگر، روش PLS-DA با استفاده از طیف پیکسل‌های تک تک نمونه‌های مجموعه آموزش در محدوده طیفی ۱۰۰۰ تا ۱۶۰۰ نانومتر انجام

آلوده قبل از خروجی نهایی مدل بتواند با تعیین آستانه نقاطی که حداکثر احتمال حضور آلودگی میکروبی را دارند، شناسایی گردند. دقت طبقه بندی تک تک پیکسل‌هایی که به درستی در هر گروه تشخیص داده شدند، ۸۸/۳ درصد و مقدار خطا، ۰/۰۹ به دست آمد. در نهایت، در گروه اعتبارسنجی هدف، به منظور گروه‌بندی هر برگ کاهو (به عنوان یک نمونه کامل)، براساس اکثریت پیکسل‌های شناسایی شده، نتایج طبقه‌بندی هر نمونه به گروه مشخص خودش، با دقت بیش از ۹۰ درصد و خطای ۰/۰۵ به دست آمد. در شکل (۵)، نتایج طبقه‌بندی در روش PLS-DA با رنگ‌های مختلف نشان داده شده است. به همین ترتیب در نمودار امتیاز سه بعدی حاصل از متغیرهای نهان اول، دوم و سوم تمایز کاملاً آشکاری بین گروه‌های مختلف بود.

تفکیک گروه‌های کنترل و آلوده به اشریشیاکلی را براساس معیارهای تعریف شده در محدوده طیفی تعریف شده برای نمونه‌های کاهو نشان می‌دهد.

با اجرای روش اعتبارسنجی متقاطع 10-fold داده‌های آموزش به طور تصادفی به ۱۰ زیرنمونه با حجم یکسان تفکیک شدند، و در هر مرحله، ۹ عدد (k-1) از این لایه‌ها به عنوان مجموعه آموزش و یکی به عنوان مجموعه اعتبارسنجی در نظر گرفته شد. نتایج استفاده از روش PLS-DA در مجموعه اعتبارسنجی متقاطع نشان داد، تفکیک نمونه‌های کاهو در گروه‌های مختلف کنترل و آلودگی با دقت بیش از ۹۰ درصد و خطای ۰/۰۶ بود. در گروه اعتبارسنجی پیکسل، طیف مشخص شده برای هر پیکسل به عنوان ورودی در مدل ساخته شده در مرحله قبل، تعریف شد. این تحلیل امکان این را می‌دهد که تشخیص نمونه



شکل ۵- نتایج گرافیکی حاصل از آنالیز تفکیک- کمترین مربعات جزئی (PLS-DA)؛ الف) نمودار امتیاز مربوط به متغیرهای نهان اول، دوم و سوم برای طبقه بندی گروه‌های آلوده و سالم و ب) نمودار امتیازهای ویژه برای انتخاب مهم ترین طیف‌های تاثیرگذار بر طبقه‌بندی نمونه‌های سالم و آلوده

از مجموع وزنی مربع ضرایب همبستگی میان مولفه‌های حاصل از روش PLS-DA و متغیرهای اصلی محاسبه می‌شود. همانگونه که پیش از این در نمودار طیف‌های نمونه توضیح داده شد، مقدار

به عنوان یکی از نتایج حاصل از آنالیز PLS-DA، در بردار مقدار اهمیت متغیر^۱ (VIP)، متغیرهایی با مقدار VIP بالاتر سهم بیشتری در طبقه‌بندی گروه‌ها داشته‌اند. مقدار اهمیت یک متغیر

شد، که در نمونه برداری تک پیکسلی با استفاده از روش PCA به همراه الگوریتم SVM توانستند به دقت ۱۰۰ درصد برای تفکیک سه واریته آلوده به قارچ دست پیدا کنند (Chu et al., 2020). همچنین، مطالعه‌ای که برای اندازه‌گیری و شمارش پاتوژن‌های باکتریایی بیماری‌زا (اشرشیاکلی 0157 و استافیلوکوک اورئوس^۴) در گوشت خوک با استفاده از تصویربرداری ابرطیفی VIS-NIR انجام شد، با نتایج ارائه شده در این پژوهش هم‌خوانی دارد. در این مطالعه، با استفاده از رگرسیون حداقل مربعات جزئی^۵ (PLSR) و انتخاب متغیرهای بهینه با الگوریتم ژنتیک، نقشه توزیع پاتوژن‌های مورد مطالعه در نمونه‌های گوشت خوک بدست آمد و موجب تصویرسازی دقیقی از آلودگی باکتریایی در هر پیکسل شد، که آن را به عنوان یک روش جدید برای ارزیابی آلودگی باکتریایی محصولات کشاورزی ارائه می‌دهد (Bonah et al., 2020). در مطالعه دیگری روش تصویربرداری ابرطیفی به عنوان روشی با قابلیت اطمینان و پتانسیل بالای تشخیص آلودگی در اسفناج، پیشنهاد شد. در این مطالعه، این روش به عنوان ابزاری موثر با استفاده از تحلیل همزمان داده‌های طیفی و اطلاعات مکانی تصویر معرفی شد که قادر به پیش‌بینی تعداد باکتری‌های اشرشیاکلی در نمونه است. همچنین روش PCA به عنوان روشی موفق برای کاهش ابعاد داده‌ها و حذف اطلاعات ناخواسته معرفی شد. در این مطالعه سیستم تصویربرداری ابرطیفی با پتانسیلی بالا به عنوان یک سیستم تشخیص ساده، و زمان واقعی جهت تشخیص آلودگی بیماری‌زا در اسفناج تازه بسته بندی شده با حداقل دستکاری نمونه، پیشنهاد شد که می‌تواند به ابزاری قدرتمند برای نظارت بر ایمنی سبزیجات تازه بسته بندی شده در صنایع غذایی تبدیل شود (Siripatrawan et al., 2011). آنچه که در پایان قابل ذکر است، مزیت قابل توجه این تکنیک، عدم نیاز به مواد شیمیایی و غیرمخرب بودن آن در کنار اطلاعات فراوان ارائه شده است، که امکان بررسی چندین ویژگی را با دقت بالا فراهم می‌آورد. اگرچه هزینه بودن دستگاه ممکن است به عنوان یک عامل پیش‌دارنده به نظر برسد، اما با ادامه نوآوری‌های فنی در ساخت و محاسبات، تصویربرداری ابرطیفی به عنوان روشی قابل اطمینان برای بازرسی آنلاین محصولات مختلف در تعداد وسیعی از آن‌ها پیش‌بینی شده است.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، پیش‌بینی و تشخیص نمونه‌های کاهوی آلوده به میکروباکتریایی از طریق تصویربرداری ابر طیفی NIR در

موثری از تغییرات که قابل شناسایی بود و می‌توانست دلیل اصلی بر جداسازی بین گروه کنترل و نمونه‌های گروه آلوده باشد، در پیک ۱۵۰۰ نانومتر دیده شد. تغییر در مقدار پیک‌ها در گروه‌های مختلف اطراف ۱۲۰۰ و ۱۵۰۰ دیده شد، که می‌تواند به دلیل ارتعاش‌های کششی ناشی از تغییرات در محتوای آب موجود در آن باشد که به ناحیه طیفی فرورسرخ نزدیک (NIR) در اطراف ۱۵۰۰ نانومتر نسبت داده شد. روش پیشنهادی فوق با استفاده از کاهش متغیرها و به کارگیری طول موج‌های انتخابی با هدف طراحی و ارزیابی یک مدل طبقه‌بندی در تعیین آلودگی میکروبی نمونه‌های کاهو انجام شد. مدل طبقه‌بندی طراحی شده در این پژوهش در تشخیص آلودگی نمونه‌های کاهو موفق بود به طوری که تمایز میان گروه‌هایی با درجات مختلف آلودگی از نمونه‌های کنترل با دقت قابل قبولی انجام شد.

این نتایج با نتایج به دست آمده با مطالعه Wei et al., (2017) هم‌خوانی داشت. در پژوهش آن‌ها، قارچ‌های تجاری با استفاده از طیف‌های ابرطیفی در محدوده طیفی Vis/NIR و رنج ۴۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر برای تشخیص آلودگی میکروبی سودومونوس تولاسی^۱ با استفاده از روش طبقه‌بندی PLS-DA مورد بررسی قرار گرفتند. قابل ذکر است مطالعه حال حاضر دارای دقت بالاتری نسبت به مطالعه پیشین است. هم چنین نتایج با مطالعه Foca et al., (2016) که در آن تشخیص دو گونه باکتری اسید لاکتیک در ژامبون با استفاده از روش اسکن میکروسکوپی ابرطیفی در محدوده طیف NIR انجام شده بود، هم‌خوانی داشت. در این مطالعه تجزیه و تحلیل داده‌های چند متغیره حاصل، به ویژه PCA، نشان داد که تکنیک‌های طیف‌سنجی و تصویربرداری مورد بررسی در آن پژوهش، توانست به عنوان یک ابزار موثر و حساس برای تشخیص آلودگی باکتری‌های سطحی در نمونه‌ها و به ویژه تشخیص گونه‌هایی که باکتری‌ها به آنها تعلق دارند، عمل کند. تصویربرداری ابرطیفی NIR برای مطالعه و تشخیص سه سویه از فوزاریوم^۲ روی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار^۳ صورت گرفت. تجزیه و تحلیل تصویر چند متغیره با انجام روش‌های PCA و PLS-DA صورت گرفت. نتایج پیش‌بینی PLS-DA نشان داد که تفکیک بین گونه‌ها با رقم بالای ۸۰ درصد به طور صحیح قابل پیش‌بینی است (Williams et al., 2012). برای تشخیص کپک قارچی محصول ذرت، از روش تصویربرداری ابر طیفی NIR در محدوده ۹۰۰ تا ۱۷۰۰ نانومتر استفاده شد. دو روش نمونه برداری براساس تک تک پیکسل‌ها و همچنین تمام نمونه در نظر گرفته

4 . Staphylococcus Aureus
5 . Partial Least Square Regression

1 . Pseudomonas Tollasii
2 . Fusarium
3 . Potato Dextrose Agar

اطلاعات را در زمینه تشخیص هدف و طبقه‌بندی گروه‌ها در اختیار می‌گذارد، انتخاب شدند. در نتیجه روش مورد بررسی در این پژوهش با قابلیت‌هایی همچون آنالیز غیرمخرب و پرتابل بودن می‌تواند در کنار روش‌های مخرب و مرسوم آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد. نتایج به دست آمده برای گروه آزمایش مورد نظر و مطالعه موردی بر روی میکروب اشرشیاکلی است و بدیهیست که برای توصیه این روش نیاز به جامعه آماری بزرگتر و پژوهش بر سبزیجات متنوع‌تر است.

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

- Ammor, M. S., Argyri, A., & Nychas, G.J.E. (2009). Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Journal of Meat Science*, 81, 507-514
- Ait-Kaddour, A., Boubellouta, T., & Chevallier, I. (2011). Development of a portable spectrofluorimeter for measuring the microbial spoilage of minced beef. *Journal of Meat Science*, 88, 675-681.
- Argyri, A.A., Panagou, E.Z., Tarantilis, P.A., Polysiou, M., & Nychas, G.J.E. (2010). Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 145, 146-154.
- Argyri, A.A., Jarvis, R.M., Wedge, D., Xu, Y., Panagou, E.Z., & Goodacre, R. (2013). A comparison of Raman and FT-IR spectroscopy for the prediction of meat spoilage. *Food Control*, 29, 461-470.
- Beuchat, L.R. (1996). Pathogenic microorganism associated with fresh product. *Journal of Food Protection*, 59, 204-216.
- Bonah, E., Huang, X., Aheto, J.H., Yi, R., Yu, S.H., & Tu, H. (2020). Comparison of Variable Selection Algorithms on Vis-NIR Hyperspectral Imaging Spectra for Quantitative Monitoring and Visualization of bacterial foodborne pathogens in Fresh Pork Muscles. *Infrared Physics & Technology*, In Press.
- Chu, X., Wang, W., Ni, X., Li, C., & Li, Y. (2020). Classifying maize kernels naturally infected by fungi using near-infrared hyperspectral imaging. *Infrared Physics & Technology*, 105, 103242.
- Foca, G., Ferrari, C., Ulrici, A., Sciutto, G., Prati, S., Morandi, S., Brasca, M., Lavermicocca, P., Lanteri, S., & Oliveri, P. (2016). The potential of spectral and hyperspectral-imaging techniques for bacterial detection in food: A case study on lactic acid bacteria. *Journal of Talanta*, 153, 111-9.
- Jamshidi, B. (2018). Rapid detection of pesticide-contaminated product using novel methods of NDT technology. *Journal of nondestructive technology*. 2(2), 58-65. (In Farsi)
- Jackson, C.R., Randolph, K.C., Osborn, S.L., & Tyler, H.L. (2013). Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. *BMC Microbiology*, 13, 274.
- Jung, Y., Jang, H., & Matthews, K.R. (2014). Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. *Microb Biotechnol*, 7:517-27.
- Kheiralipour, K., Ahmadi, H., Rajabipour, A., Rafiee, S., Javan-Nikkhah, M., Jayas, D.S., & Siliveu, K. (2015). Detection of fungal infection in pistachio kernel by long-wave near-infrared hyperspectral imaging technique. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 8 (1), 129 – 135.
- Kodogiannis, V.S., & Alshejari, A. (2014). An adaptive neuro-fuzzy identification model for the detection of meat spoilage. *Applied Soft Computing*, 23, 483-497.
- Kamruzzaman, M., ElMasry, G., Sun, D.W., & Allen, P. (2012). Non-destructive prediction and visualization of chemical composition in lamb meat using NIR hyperspectral imaging and multivariate regression. *Journal of Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 218-226
- Lee, H., Everard, C.D., Kang, S., Cho, B.K., Chao, K., Chan, D.E., & Kim, M.S. (2014). Multispectral fluorescence imaging for detection of bovine faeces on Romaine lettuce and baby spinach leaves. *Journal of Biosystems Engineering*, 127, 125-134
- Lara, M.A., Le, L., Diezma-Iglesias, B., Roger, J.M., & Ruiz-Altisent, M. (2013). Monitoring spinach shelf-life with hyperspectral image through packaging films. *Journal of Food Engineering*, 119, 353- 361.
- Lundaei, L., Diezma, B., Lie, L., Ruiz-Garcia, L., Cantalapiedra, S., & Ruiz-Altisent, M. (2012). Monitoring of fresh-cut spinach leaves through a multispectral vision system. *Postharvest Biology and Technology*, 63, 74-84.
- Mahesh, S., Jayas, D.S., Paliwal, J., & White, N.D.G. (2015). Hyperspectral imaging to classify and monitor quality of agricultural materials. *Journal of Stored Products Research*, 61, 17-26

محدوده ۱۰۰۰ تا ۱۶۰۰ نانومتر مورد سنجش واقع شد. کاهش ابعاد داده‌ها و پیش پردازش مکانی با استفاده از روش آنالیز مولفه-های اصلی (PCA) و پیش پردازش طیفی از طریق توزیع نرمال استاندارد به همراه میانگین‌گیری مرکزی انجام شدند. نتایج تحیل با روش آنالیز تفکیک-کمترین مربعات جزئی (PLS-DA) طبقه-بندی ۴ گروه نمونه‌های کنترل، و نمونه‌هایی با جمعیت میکروبی متفاوت را با دقت عالی (بیش از ۹۰ درصد) انجام داد. هم‌چنین ناحیه ۱۴۰۰ تا ۱۵۰۰ نانومتر و ۱۲۰۰ از طریق بردار مقدار اهمیت متغیر (VIP) به عنوان مهم‌ترین پیک‌هایی که حداکثر

- Melikechi, N., Ding, H., Rock, S., Marcano A., & Connolly, D. (2008). Laser-induced breakdown spectroscopy of whole blood and liquid organic compounds. *Journal of Optical Diagnostics and Sensing VIII*, 686300. Retrieved March 14, 2008, from <https://doi.org/10.1117/12.761901>.
- Mo, C., Kim, G., Kim, M., S., Lim, J., Lee, K., Lee, W.H., & Cho, B.K. (2017). On-line fresh-cut lettuce quality measurement system using hyperspectral imaging. *Biosystems Engineering*, 156, 38-50.
- Niemira, B.A. (2007). Relative efficacy of sodium hypochlorite wash versus irradiation to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 internalized in leaves of romaine lettuce and baby spinach. *Journal of Food Protection*, 70, 2526–2532.
- Olaimat, AN., & Holley, R.A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiol*, 32(1), 1-19.
- Panagou, E.Z., Mohareb, F.R., Argyri, A.A., Bessant, C.M., & Nychas, G.J.E. (2011). A comparison of artificial neural networks and partial least squares modelling for the rapid detection of the microbial spoilage of beef fillets based on Fourier transform infrared spectral fingerprints. *Food Microbiology*, 28, 782-790.
- Rahi, S., Mobli, H., & Jamshidi, B. (2018). Spectroscopy and spectral imaging techniques for non-destructive food microbial assessment. Proceedings of the 5th Iranian International NDT Conference November 4-5, Tehran IRNDT 2018. Available from: <https://www.ndt.net>.
- Ravikanth, L., Singh, C.B., Jayas, D.S., & White, N.D.G. (2016). Performance evaluation of a model for the classification of contaminants from wheat using near-infrared hyperspectral imaging. *Biosystems Engineering*, 147, 248-258.
- Schröder, S., Pavlov, S., Rauschenbach, I., Jessberger, E., & Hübers, H.W. (2013). Detection and identification of salts and frozen salt solutions combining laser-induced breakdown spectroscopy and multivariate analysis methods: A study for future martian exploration. *Journal of Icarus*, 223, 61-73.
- Siripatrawan, U., Makino, Y., Kawagoe, Y., & Oshita, S. (2011). Rapid detection of *Escherichia coli* contamination in packaged fresh spinach using hyperspectral imaging. *Talanta*, 85, 276–281
- Tauxe, R., Kruse, H., Hedberg, C., Potter, M., Madden, J., & Wachsmuth, K. (1997). Microbial hazards and emerging issues associated with produce. A preliminary report to the national advisory committee on microbiological criteria for foods. *Journal of Food Protection*, 60, 1400-1408.
- Tito, N.B., Rodemann, T., & Powell, S.M. (2012). Use of near infrared spectroscopy to predict microbial numbers on Atlantic salmon. *Food Microbiology*, 32, 431-436.
- Tao, F.F., & Peng, Y.K. (2014). A method for non-destructive prediction of pork meat quality and safety attributes by hyperspectral imaging technique. *Journal of Food Engineering*, 126, 98-106.
- Williams, P.J., Geladi, P., Britz, T.J., & Manley, M. (2012). Near-infrared (NIR) hyperspectral imaging and multivariate image analysis to study growth characteristics and differences between species and strains of members of the genus *Fusarium*. *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(6-7), 1759-69.
- Wei, M., Geladi, P., & Xiong, S. (2017). IR hyperspectral imaging and multivariate image analysis to characterize spent mushroom substrate: a preliminary study. *Journal of analytical and bioanalytical chemistry*, 409(9), 2449–2460.
- Yin, J. (2011). LogP prediction for blocked tripeptides with amino acids descriptors (HMLP) by multiple linear regression and support vector regression. *Procedia Environmental Sciences*, 8, 173–178.
- Yoshimura, M., Sugiyama, J., Tsuta, M., Fujita, K., Shibata, M., Kokawa, M., & Oto, N. (2014). Prediction of aerobic plate count on beef surface using fluorescence fingerprint. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1496-1504.
- Zhang, H., Paliwal, J., Jayas, D.S., & White, N.D.G. (2007). Classification of fungal infected wheat kernels using near-infrared reflectance hyperspectral imaging and support vector machine. *Journal of Transactions of the ASABE* 50(5), 1779-1785.