تخمین میزان تولید کلاولانیک اسید با استفاده از ویژگیهای ساختاری و رنگی باکتری Streptomyses Clavuligerus

مریم نورمحمدی[۱]، نوشین جعفری فشارکی[۱]، حسین پورقاسم[۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف‌آباد

[۲] استادیار دانشکده برق، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف‌آباد

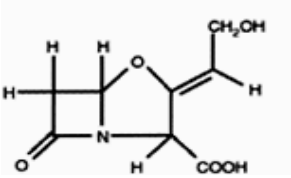
[2] h_pourghasem@iaun.ac.ir

چکیده - امروزه تولید کلاولانیک اسید توسط *Streptomyces Clavuligerus* به عنوان یکی از مهمترین ترکیبات آنتی بیوتیکها، اهمیت خاصی پیدا کرده است. در این مقاله بجای سنجش تجربی میزان تولید، الگوریتم خودکاری با استفاده از ویژگیهای استخراج شده از رشد باکتریها در محیطهای کشت مختلف شامل منابع کربنی چون گلیسرول، مالت، نشاسته و آرد گندم، ارائه می‌شود. در این الگوریتم با تعریف ویژگی های ساختاری و رنگی همچون تعداد جوانه ها، ضخامت و رنگپذیری هیفها، تراکم باکتری و میزان *PH* محیط مبتنی بر یافته ها و مشاهدات متخصصان میکروبیولوژیست، میزان تقریبی تولید کلاولانیک اسید بدست می آید و با نتایج مشاهدات کارشناس مقایسه و ارزیابی می‌گردد. در ساختار پیشنهادی از یک طبقه بند یا به عبارتی یک تخمین زننده مبتنی بر شبکه عصبی پرسپترون استفاده شده است. در نهایت کارایی الگوریتم پیشنهادی برای استفاده متخصصان نشان داده می‌شود.

کلید واژه- کلاولانیک اسید، ویژگیهای ساختاری و رنگی، هیف، تخمین میزان تولید.

۱-مقدمه

به طور کلی بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های مهم صنعتی با تخمیر قارچ ها و یا باکتریها بدست می‌آیند که عمده ترین باکتری های تولید کننده آنتی‌بیوتیک، متعلق به دسته Actinomycete و به ویژه Streptomyces میباشند. یکی از مهمترین گونه‌های Streptomyces ، Streptomyces clavuliger (S.C) است که از تخمیر آن کلاولانیک اسید حاصل میشود[۱]. این اسید یک بازدارنده قوی β-لاکتامازی بااستفاده بالینی بوده که مصرف بالینی آن از سال ۱۹۸۱ شروع شده است. اسید کلاولانیک بااتصالی غیر قابل بازگشت میتواند از عمل آنزیم جلوگیری کرده و در نتیجه از آنتی بیوتیک β-لاکتام در مقابل هیدرولیز آنزیمی محافظت نماید. علاوه بر فعالیت مهار کنندگی، کلاولانیک اسید باافزایش قدرت ایمنی موجب از بین رفتن پاتوژنها نیز میشود[۲]. اسید کلاولانیک از هسته کلاوام تشکیل شده و شبیه پنی‌سیلین



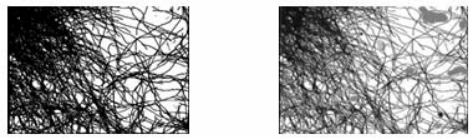
شکل ۱:کلاولانیک اسید

است با این تفاوت که در حلقه ی پنج عضوی بجای عنصر گوگرد، اکسیژن قرار گرفته و فاقد زنجیره جانبی آسیل-آمینو پنی‌سیلین می باشد (شکل ۱) .

این اسید به تنهایی دارای فعالیت ضد باکتریایی کمی بوده و با بسیاری از پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها مانند پنی‌سیلینG، آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، مزلوسیلین، سفالوریدین، سفاماندول، تیکارسیلین و... فعالیت سینرژیتیک دارد ولی در استفاده به صورت بالینی، تنها در ترکیب باآموکسی‌سیلین و تیکارسیلین و بخصوص آموکسی سیلین که تحت عنوان تجاری Augmentin یا کوآموکسی‌کلاو شناخته می‌شود، مورد استفاده

قرار می‌گیرد. حضور این ترکیب، آموکسی‌سیلین را در مقابل بسیاری از باکتری های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک محافظت می‌کند[۵،۴،۳]. تولید کلاولانیک اسید توسط S.C به شرایط فرآیند تولید و ترکیب محیط کشت بویژه منابع کربن و نیتروژن و هم چنین به میزان تراکم باکتری تولیدی بستگی دارد، پس بایستی شرایط غذایی به طور جداگانه بصورتی تنظیم گردد که هم برای رشد سلولی و هم تولید آنتی بیوتیک مناسب باشد. در اغلب موارد محیط کشت به گونه‌ای طراحی می شود که طی یک تخمیر دو فازی، در فاز اول تکثیر سریع سلولی بدون تولید صورت گرفته و پس ازآن شرایط بهینه برای بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فراهم گردد[۶]. تولید آنتی بیوتیک توسط مسیرهای بیوسنتزی خاص در زمان خاصی از چرخه رشد باکتری صورت می گیرد که این مرحله به شدت تحت تاثیر عوامل محدود کننده رشد نظیر منبع نیتروژن، کربن یا فسفات است. به عنوان یک عامل اصلی و تعیین کننده محیط کشت، تغییر منابع کربنی همچون گلیسرول، مالت، نشاسته و آرد گندم در غلظت های مختلف بر میزان تولید بررسی شده است. روند کار بدین صورت میباشد که سه روز بعد از تلقیح اسپور باکتری در محیط های متفاوت و سپس رنگ آمیزی توده هیف حاصل، عکس برداری میکروسکوپی از سویه مولد انجام شده و در ادامه میزان تولید کلاولانیک اسید برای آن محیط محاسبه می‌شود. در این روش، استفاده از روابط آماری پیچیده و همچنین صرف مدت زمانی نسبتا طولانی جهت گزارش میزان تولید اسید کلاولانیک، نیاز کارشناس را به الگوریتمی سریع برای حصول نتیجه نهایی به وجود می آورد. اما با توجه به تحقیقات و بررسی های انجام شده در این راستا مشخص گردید که تاکنون الگوریتمی ارائه نشده است.

مطالعه بر روی نتایج یافته ها و مشاهدات متخصصان میکروبیولوژیست نشان می دهد که مورفولوژی هیفهای رویشی، میزان رنگ پذیری آنها به رنگ گرم یا نمایش آبی-بنفش در محیط، تعداد جوانه های منشعب شده از هیفهای رویشی[۷]، تراکم مناسب باکتری و همچنین PH محیط رابطه مستقیمی با میزان تولید داشته و در واقع نشان دهنده وضعیت فیزیولوزیکی باکتری به عنوان واحدهای تولید کننده آنتی بیوتیک میباشند. بااستناد به این نتایج، در بخش اول مقاله، ویژگی های ساختاری و رنگی باکتریها اعم از تعداد جوانه ها، ضخامت هیفها، میزان تراکم باکتری و محدوده رنگ‌پذیری آنها با استفاده از روشهای موجود در



(الف) (ب)

شکل۲: (الف)تصویراصلی، (ب)تصویر پردازش شده.

پردازش تصویر و در نهایت PH محیط که توسط بیولوژیست ارائه می‌شود، استخراج شده اند که در ادامه به عنوان ورودی شبکه عصبی پرسپترون در نظر گرفته می شوند. در مرحله بعد با آموزش شبکه، خروجی آن به عنوان تخمینی از میزان تولید اسید کلاولانیک در ازای عکس مورد نظر به میکروبیولوژیست گزارش داده می شود.

۲-ویژگی های ساختاری و رنگی

در این بخش دو مرحله شامل اجرای پردازش های اولیه روی تصاویر جهت ارتقا کیفیت و همچنین روشهای مورد استفاده در استخراج ویژگیها روی تصاویر بهبود یافته ارائه می‌شود.

۲-۱-پیش پردازش

شرایطی چون کثیفی لنز دوربین، لرزش دوربین هنگام عکس‌برداری، نور پردازی غیریکنواخت وعدم دقت در رنگ آمیزی سبب می شود که تصاویر از کیفیت مطلوبی برخوردار نباشند شکل ۲-الف. در نتیجه برای استخراج ویژگی ها بایستی پردازش اولیه ای روی تصاویر در جهت بهبود کیفیت آنها صورت گیرد؛ بدین ترتیب که ابتدا توسط یک فیلتر لاپلاسین وضوح تصویر افزایش یافته و سپس با آستانه گذاری روی شدت روشنایی بر اساس اطلاعات مبتنی بر نمودار هیستوگرام، به طور تقریبی میزان نویز موجود کاهش می یابد. درادامه با پیاده سازی یک فیلتر هموارساز روی تصویر، نتیجه بهتری حاصل می‌شود [۸]شکل۲-ب. ضمنا در طول مقاله تنها یک نمونه از کل عکسها در نظر گرفته شده و نتیجهء هر مرحله پردازش روی ان نمایش داده می‌شود.

۲-۲-استخراج ویژگی

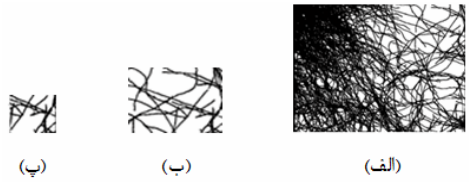
مطالعات نشان می‌دهند که تولید محصول با ۲ فاکتور اساسی شامل PH محیط و تراکم باکتری رابطه مستقیم دارد. PH کمتر محیط علاوه بر ایجاد شرایط مناسب برای رشد باکتری، سبب

حفظ و پایداری بیشتر کلاولانیک اسید ترشح شده در محیط می شود و تراکم مناسب باکتری نیز افزایش تولید آنتی بیوتیک در طی مدت زمان فرمانتاسیون را به دنبال خواهد داشت. همچنین وضعیت فیزیولوژیکی باکتری وابسته به مورفولوژی هیفهای رویشی است[۹] به طوری که ضخامت بیشتر آنها نشان دهنده فاز مناسب رشد باکتری در تولید کلاولانیک اسید و توانمندی بیشتر باکتری در تحمل استرسهای محیطی نظیر محدود شدن منابع غذایی و میزان اکسیژن محلول به صورت آنی می‌باشد. جوانه های در حال رویش از هیفهای رویشی نیز به عنوان فاکتور مهم دیگر در نظر گرفته می‌شوند. تعداد جوانه ها ی بیشتر در واقع نشان دهنده جوان بودن هیفها و توانمندی بالای متابولیسمی آنها در تولید آنتی بیوتیک می‌باشد. علاوه بر این، میزان رنگ پذیری باکتری به رنگ گرم یا نمایش رنگ آبی-بنفش در محیط نیز نشان دهنده وضعیت مناسبتر باکتری برای تولید بیشتر است. به عبارتی S.C در فازهای اولیه رشد، گرم مثبت بوده و با گذشت زمان و نزدیک شدن به پایان سیکل رویشی توان نگهداری رنگ گرم کمتری داشته و بیشتر به رنگ قرمز نشان داده می شود.

با توجه به موارد فوق، در ادامه روشهای محاسبه مقدار متوسط ضخامت هیفها، تعداد جوانه ها، رنگ پذیری باکتری و تراکم آنها جهت طراحی شبکه عصبی بحث می شوند. PH محیط نیز به عنوان یک ویژگی تجربی ارائه شده توسط کارشناس مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۲-۲-۱- ضخامت هیف ها

انجام پردازشهای اولیه با هدف افزایش کیفیت تصاویر، شکستگی هایی روی باکتری بوجود می آورد که جهت تصحیح این شکستگی ها، پیکسل های موجود در همسایگی هر پیکسل با حداقل فاصله اقلیدسی از آن به یکدیگر متصل می شوند. نتایج با فاصله های اقلیدسی ۲،۳و۴ پیکسل مورد بررسی قرار گرفته و بهترین نتیجه برای فاصله اقلیدسی ۳ با توجه به حداقل خطا بدست آمد شکل ۳-الف.حاصل یک تصویر باینری اصلاح شده می‌باشد. نکته قابل توجه دیگر آن است که به خاطر عدم یکنواختی تراکم توده باکتری، هر تصویر به زیرتصویرهای نه گانه تقسیم می‌گردد و دراین بین زیرتصویر با کمترین تراکم جهت کاهش خطا در محاسبه ضخامت در نظر گرفته می‌شود شکل۳-ب. همچنین انجام آزمایش های مختلف مشخص نمود که تقسیم زیرتصویر بدست آمده به چهار ناحیه و انتخاب ناحیه با بیشترین



شکل۳:(الف)تصویر پردازش شده با اتصال شکستگی های موجود روی باکتریها ،(ب)۱/۹ تصویر الف ،(پ)۱/۴ تصویر ب.

تراکم، دقت محاسبات را افزایش خواهد داد شکل۳-پ. در ادامه، ضخامت هیف بر اساس الگوریتم مبتنی بر کنترل شیب بدست می آید که پیش از اجرای آن بایستی نقطه شروع (بذر)در زیر تصویر حاصله تعیین شود. از آنجا که حضور همزمان باکتریهای جوان و پیر در محیط کشت موجب پیدایش ضخامت های مختلفی گردیده، برای رسیدن به بهترین نتیجه با انتخاب چندین بذر در قسمت های مختلف زیر تصویر به صورت تصادفی روی پیکسلهای سفید زمینه، الگوریتم پیش می رود. اساس الگوریتم مبتنی بر کنترل شیب بدین صورت است که در آن شعاع دایره به مرکز بذر تا رسیدن به اولین پیکسل سیاه (مرز اولیه هیف) افزایش یافته، سپس در همان امتداد پیش می رود تا به اولین پیکسل سفید(مرز ثانویه هیف)برسد؛ اختلاف بین دو شعاع نمایانگر ضخامت شاخه خواهد بود. چنانچه S نقطه شروع و X زیر تصویر حاصله در نظر گرفته شوند، آنگاه روابط (۱) کلیات معادلات حاکم بر الگوریتم فوق را نشان می‌دهد بطوری که در آن (i,j)،(a,b)و(p,k) به ترتیب مختصات مکانی بذر، پیکسل واقع بر مرز اولیه ی هیف و پیکسل واقع بر مرز ثانویه ی هیف می‌باشند.

$$
\begin{aligned}
&S(i,j)=1, X(a,b)=0, X(p,k)=1\\
&((i-a)\hat{}2)+((j-b)\hat{}2)=U\hat{}2\\
&((i-p)\hat{}2)+((j-k)\hat{}2)=V\hat{}2\\
&if\ \frac{(j-b)}{(i-a)}=\frac{(j-k)}{(i-p)}\Rightarrow D=V-U
\end{aligned}
\qquad (۱)
$$

که در رابطه فوق D ضخامت هیف تعریف می‌شود. در نهایت متوسط ضخامتهای حاصله از چند بذر به عنوان ضخامت هیف معرفی می گردد.

۲-۲-۲- تعداد جوانه ها

برای یافتن تعداد جوانه ها علاوه بر تصحیح شکستگی های بوجود آمده از طریق اتصال پیکسلهای قرار گرفته در همسایگی هر پیکسل با حداقل فاصله اقلیدسی از آن، باید در مرحله بعد

شاخه های ناپیوسته از تصویر حذف شوند شکل ۴-الف؛ همچنین جهت استخراج جوانه ها لازم است که ضخامت شاخه های هیف برابر با یک پیکسل در نظر گرفته شود. از این رو با بکارگیری ابزارهای پردازش تصویر هم چون عملگرهای تغییر شکل، ضخامت شاخه های هیف تا یک پیکسل کاهش داده می‌شود شکل۴-ب.

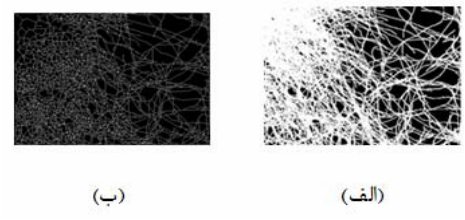
روش کار جهت محاسبه تعداد جوانه ها بر این اساس است که در ابتدا با این ایده که محل شروع جوانه ها در تصویر بشکل سه راهی می‌باشد، تصویر نهایی F برای یافتن کلیه سه راهی ها توسط ماسک ۳×۳ واحد W با استفاده از رابطهء (۲) اسکن می‌شود:

$$\sum_{s=-1}^{1}\sum_{t=-1}^{1} W(s,t)F(x+s,y+t) \qquad (۲)$$

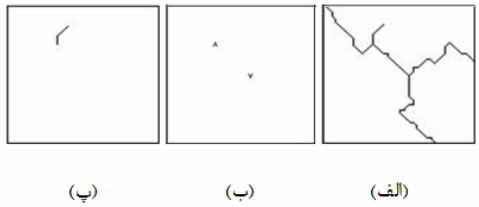
شکل ۵-الف برای نمایش روند فوق انتخاب شده است. از طرفی هر یک از شاخه های سه راهی می تواند یک جوانه باشد؛ درنتیجه پس از شناسایی سه راهی ها شکل ۵-ب، از مرکزی کردن یک ماسک ۳×۳ روی مرکز سه راهی و حرکت آن در امتداد هر شاخه به عنوان مسیر احتمالی جوانه استفاده می‌شود. البته شرط پیشروی الگوریتم در هر گام این است که مرکز ماسک قبلی به رنگ زمینه درآمده و تنها یک پیکسل سیاه در همسایگی مرکز ماسک وجود داشته باشد. با تفاسیر فوق، جوانه در صورتی تشخیص داده می‌شود که تمام پیکسل های موجود در همسایگی ماسک سفید باشند شکل ۵-پ. در ادامه مراحل اجرای الگوریتم محاسبه تعداد جوانه ها در شکل ۶ نشان داده می‌شود.

۲-۲-۳- رنگ پذیری باکتری

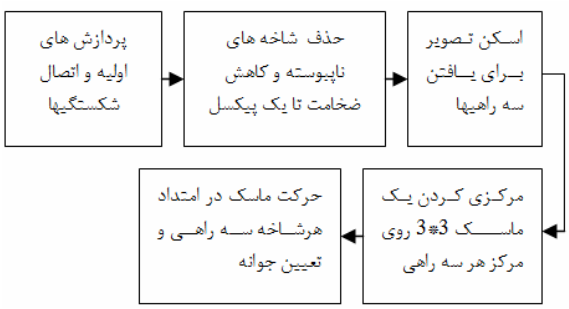
جهت یافتن محدوده رنگ پذیری باکتری، فضای سه بعدی حاصل از ماتریسهای R ، G وB به چند ناحیه تقسیم شده که با استناد به نتایج بدست آمده با تعداد نواحی مختلف، بهترین نتیجه با ۶۴ بلوک بدست می‌آید. در مرحله بعد با شمارش تعداد پیکسل های قرار گرفته در هر ناحیه رنگی، بلوکی که بیشترین پیکسل را دارد، مشخص کننده محدوده رنگ پذیری غالب باکتری می باشد. با پیاده سازی روند فوق روی نمونه عکس مورد نظر بلوک بیستم با محدوده رنگی ۱۲۷ >R >۶۳،۶۴ >G >۰ و ۲۵۵> B >۱۹۲، ۷۴ درصد کل پیکسلها را در خود جای داده



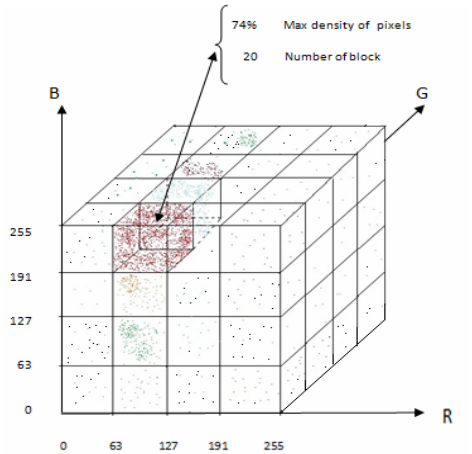
شکل۴:(الف)تصویر حاصل از حذف شاخه های ناپیوسته،(ب)تصویر شاخه های هیف با ضخامت یک پیکسل.



شکل۵:(الف)تصویر شاخه ی دلخواهی از هیف، (ب)نمایش سه راهیهای موجود در تصویر الف ،(پ)جوانه ی شناسایی شده.



شکل۶: بلوک دیاگرام روش تعیین جوانه



شکل ۷:شمای کلی تقسیم بندی فضای سه بعدی RGB و انتخاب بلوک بیستم با اختصاص ۷۴ درصد کل پیکسل ها برای عکس مورد نظر.

که به عنوان بلوک غالب در نظر گرفته می‌شود شکل ۷.

۲-۲-۴- تراکم باکتری

در محاسبه میزان تراکم پس از جداسازی باکتری از زمینه با استفاده از باینری کردن تصویر پردازش شده و شمارش پیکسل های اختصاص یافته به توده هیف، عدد حاصل به صورت درصدی از کل پیکسل ها بیان می شود.

۳-نتایج آزمایشها

در روند طراحی الگوریتم پس از استخراج ویژگی های ساختاری و رنگی باکتری ها، اعداد بدست آمده به عنوان ورودی شبکه عصبی نرمالیزه می شوند. در این مقاله از ۲۹۹ عکس میکروسکوپی استفاده شده که از این بین، ۲۳۳ عدد از آنها برای آموزش شبکه و مابقی جهت آزمایش در نظر گرفته شده اند. شبکه مورد استفاده یک شبکه عصبی پرسپترون سه لایه مبتنی بر قاعده یادگیری پس انتشار خطا می باشد که خروجی آن میزان تقریبی کلاولانیک اسید تولیدی را نشان می‌دهد.با تعریف معیار خطای نسبی برای نمونه های آموزشی و آزمایشی طبق رابطه(۳)، جدول(۱) به ازای تعداد نرونهای مختلف و توابع فعالیت متفاوت تنظیم می شود.

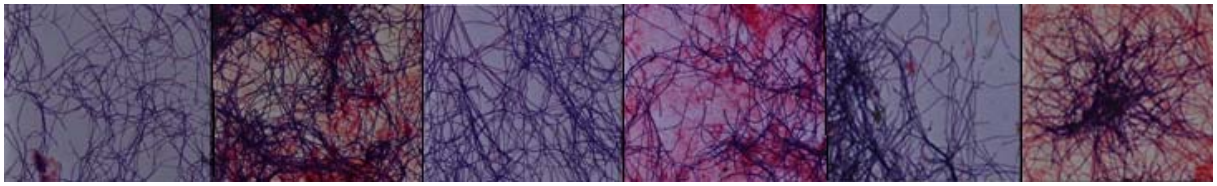
$$E = \frac{|T - Y|}{T} \times 100 \qquad (۳)$$

در رابطه(۳)، T نمایانگر میزان تولید مطلوب و Y میزان تولید بدست آمده می باشد که اختلاف بین دو مقدار حاصل، به صورت درصدی از میزان تولید مطلوب E را نتیجه می دهد.

در نهایت با توجه به اعداد گزارش شده در جدول حالتی انتخاب می‌شود که معیار خطای نسبی برای نمونه های آموزشی و آزمایشی کمترین مقدار ممکن باشد وضمنا اختلاف بین این دو مقدار هم تا حد ممکن کم باشد. آنطور که از جدول (۱) مشخص است شبکه با ۴۵ نورون در لایه اول و ۳۰ نورون در لایه دوم بهترین نتیجه را حاصل می‌کند. در آخر جهت ارزیابی الگوریتم ارائه شده، ۶ نمونه آزمایشی به صورت تصادفی از محیط های کشت مختلف با غلظت های متفاوت انتخاب شده اند شکل ۸. با مقایسه نتایج حاصله با مقادیر مطلوب گزارش شده مطابق با جدول (۲) و همچنین با توجه به این نکته که گزارش میزان تولید بدست آمده با الگوریتم مورد نظر تا ۲۰ درصد میزان تولید مطلوب برای کارشناس بیولوژیست قابل قبول است، کارایی الگوریتم پیشنهادی برای تخمین میزان تولید کلاولانیک اسید نشان داده می شود. ضمنا کلیه اعداد مربوط به میزان تولید و معیار های خطای نسبی واختلاف های آنها در دو جدول زیر بر حسب درصد می باشد.

جدول۱: شبکه های مختلف به ازای نورونهای مختلف و توابع فعالیت گوناگون

تعداد نورون			تابع فعالیت			معیار خطای نسبی نمونه های آموزشی	معیار خطای نسبی نمونه های تست	اختلاف معیار خطاها
لایه اول	لایه دوم	لایه سوم	لایه اول	لایه دوم	لایه سوم			
۲۵	۲۵	۱	logsig	tansig	purelin	۲۰	۲۲	۲
۲۳	۱۵	۱	logsig	tansig	purelin	۲۵	۲۱	۴
۳۸	۲۲	۱	logsig	logsig	purelin	۳۰	۲۶	۴
۵۲	۴۳	۱	logsig	tansig	purelin	۲۷	۱۸	۹
۱۸	۲۵	۱	logsig	tansig	purelin	۲۰	۱۹	۱
۱۹	۱۳	۱	logsig	tansig	purelin	۱۶	۱۶	۰
۵۰	۳۷	۱	logsig	logsig	purelin	۱۰	۱۴	۴
۴۵	۳۰	۱	logsig	logsig	purelin	۸	۱۲	۴



شکل۸: شش نمونه ی آزمایشی تصادفی

جدول۲:عملکرد شبکه برای ۶ نمونه آزمایشی

نمونه آزمایشی	نوع منبع کربن محیط کشت	غلظت منبع کربن محیط کشت	میزان تولید مطلوب	میزان تولید تقریبی	اختلاف میزان تولید
۱	گلیسیریل	۵gr	۴۲.۹	۴۶.۳	۳.۴
۲	مالت	۴۰gr	۶۵.۵	۶۵.۵۳	۰.۰۳
۳	گلیسیریل	۴۰gr	۲۱۰	۱۹۴.۱۲	۱۵.۸۸
۴	مالت	۱۰gr	۱۲۰.۳	۱۲۷.۸۴	۷.۵۴
۵	آردگندم	۲۰gr	۳۱۵.۴	۳۱۰.۶۵	۴.۷۵
۶	اردگندم	۵۰gr	۲۴۲.۶	۲۴۹.۸۱	۷.۲۱

۴- جمع‌بندی و نتیجه‌گیری

در این مقاله یک الگوریتم جهت تخمین تخمین میزان تولید کلاولانیک اسید با استفاده از ویژگیهای ساختاری و رنگی باکتری Streptomyses Clavuligerus پیشنهاد شد. نیاز به تخمین میزان رشد این اسید در فرآیند تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی، یک نیاز حیاتی متخصصان میکروبیولوژی است. هم اکنون، این متخصصان با ابزارهای تجربی و بدون استفاده از روشهای پردازش تصویری این نیاز را مرتفع می‌کنند. در صورتی که با استفاده از الگوریتم پیشنهادی این فرآیند بصورت خودکار و با دقت بالا انجام می‌گیرد. این الگوریتم جدید با استفاده و تعریف مناسب از ویژگی‌های ساختاری و رنگی موجود در دورانهای مختلف رشد باکتری Streptomyses Clavuligerus و یک شبکه عصبی پرسپترون چند لایه به عنوان یک تخمین زننده، میزان تولید کلاولانیک اسید تخمین زده می‌شود. نتایج حاصل از این الگوریتم، رضایت‌مندی متخصصان میکروبیولوژی را در این زمینه فراهم کرده است که این نکته کارایی روش را نشان می دهد. استفاده از تخمین زننده‌های قوی‌تر از شبکه عصبی و همچنین تعریف ویژگیهای دیگر را می‌توان به عنوان کارهای پیش رو در این زمینه تلقی کرد.

سپاسگزاری

در پایان تشکر وسپاس ویژه، از حضور جناب آقای امیر صالحی نجف آبادی دانشجوی دکترای میکروبیولوژی دانشگاه تهران نموده، که ما را در تهیه عکسهای مورد استفاده و پیشبرد این پژوهش یاری فرمودند.

مراجع

[1] Pinto L.S, Vieira L.M, Pons M.N, fonseca M.M.R, Menezes J.C, "Morphology and viability analysis of Streptomyces clavuligerus in industrial cultivation systems." Bioprocess Biosyst Eng 26:177-184, 2004

[2] Finaly J, Miller L, Poupard J.A. ''A review of the antimicrobial activity of clavulanate''.the journal of Antimicrobial Chemotherapy, pp.52,1,18-23,2003.

[3] Essack, S.Y , ''The Development of B-Lactam Antibiotics in Response to the Evolution of b-lactamases'',Pharmaceutical Research,18,10,1391-1399, 2001

[4] Siu, L.K, '' Action and Resistance in gram-negative bacteria'', Transe. Microbiol.Immumol.Infect, 35,1-11, 2002

[5] Bush K., ''B-lactamase inhibitors from laboratory to clinic'', Clin.Microbiol. Rev. 1, 109-123, 1988

[6] Brana A.F, Demain A.L, '' Involvement of aeration in carbon source regulation cephem antibiotic biosynthesis in Streptomyces clavuligerus ''Biotechnology Letters Vol. 5, No, 12,791-794, 1983

[7] Neves A.A, Vieira L.M, Menezes J.C, "Effects of preculture variability on clavulanic acid fermentation." Biotechnol Bioeng 72:628-633, 2001

[8] Li Xiaojuan, Chen Cunshe,Yv Ziyi. " A novel Bacteria classification scheme based on microscopic image, " Proc. Int. Conf. on Applied Comuter Science. China, pp.560-600, 2007

[9] Cox P.W, Paul G.C, Thomas C.R, A. " Image analysis of the morphology of filamentus micro-organisms, " Microbiology 144:817-827, 1999.