

دستور العمل فنی

روش رنگ سنجی نوین با گوشی هوشمند همراه به منظور ردیابی مولکول‌های مهم در صنعت غذا و کشاورزی



نویسندگان

مریم موسیوند

مریم لایق حقیقی

المیرا تیزجنگ

رسالة محمد بن عبد الله



نوع نشریه: دستورالعمل فنی

نام نشریه: دستورالعمل روش رنگ‌سنجی نوین با گوشی هوشمند همراه به منظور ردیابی مولکول‌های مهم

در صنعت غذا و کشاورزی

نویسندگان: مریم موسیوند، مریم لایق حقیقی و المیرا تیزجنگ

ویراستار علمی:

ویراستاران ادبی:

تهیه شده در: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی

شمارگان:

نوبت انتشار: اول

سال انتشار:

مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است



شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی ۶۶۹۹۷ به تاریخ ۱۴۰۳/۱۲/۱۹ است



دستورالعمل روش رنگ سنجی نوین با گوشی هوشمند همراه به منظور ردیابی مولکول‌های مهم در صنعت غذا و کشاورزی

نویسندگان

مریم موسیوند

مریم لایق حقیقی

المیرا تیزجنگ

فهرست مطالب

۵	مقدمه
۷	اصول عملیاتی رنگ‌سنجی نوین در گوشی هوشمند
۸	مدل‌های رنگی
۱۳	ابزارهایی برای گرفتن تصویر
۱۳	شرایط نور
۱۵	اپلیکیشن‌های رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال و کمی‌سازی رنگ
۱۷	کابردهای روش رنگ‌سنجی دیجیتال با گوشی هوشمند
۲۴	پروتکل فنی اجرای روش رنگ‌سنجی نوین با گوشی هوشمند
۲۹	چشم‌انداز رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال با گوشی‌های هوشمند
۳۲	منابع

۱- مقدمه

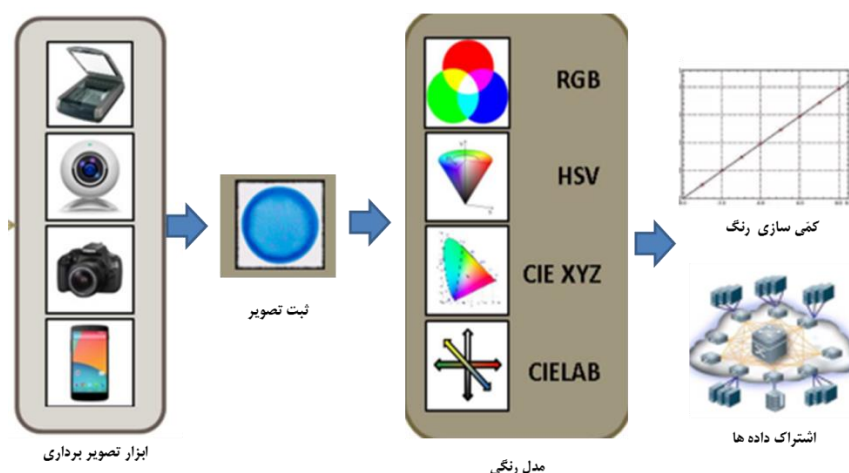
رنگ‌سنجی علم و فناوری است که برای تعیین کمیت و توصیف فیزیکی درک انسان از رنگ مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد. به طور سنتی، رنگ‌سنجی را می‌توان به رنگ‌سنجی بصری و فوتوالکتریک تقسیم کرد. رنگ‌سنجی بصری با مشاهده تغییر رنگ محلول مورد نظر با چشم غیر مسلح برای اندازه‌گیری غلظت آنالیت مورد نظر استفاده می‌شود. در رنگ‌سنجی فوتوالکتریک، دستگاه‌هایی مانند رنگ‌سنجی فوتوالکتریک و اسپکتروفوتومتر که دقت بیشتری در درک تغییرات رنگی و تعیین غلظت مولکول هدف دارند مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرند. تشخیص تفاوت‌های رنگی ظریف با چشم غیر مسلح دشوار است، بنابراین دقت اندازه‌گیری رنگ‌سنجی بصری کمتر از رنگ‌سنجی فوتوالکتریک است (Wu et al., 2017).

در جامعه مدرن امروزی، به دست آوردن و به اشتراک گذاری داده‌های تحلیلی در محل و در همان زمان بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. به همین دلیل رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال (DIC)^۱ به یک موضوع تحقیقاتی پرطرفدار تبدیل شده است. این روش در واقع به نوعی به تجزیه و تحلیل رنگی تصاویر دیجیتال که توسط ابزارهایی چون گوشی هوشمند، دوربین‌های دیجیتال، وب‌کم و اسنکر گرفته شده اند اشاره دارد. سبکی و قابل حمل بودن گوشی‌های هوشمند و دوربین‌های دیجیتال باعث شده تا این دو ابزار در DIC بسیار بیشتر از وب‌کم‌ها و اسکنرها مورد استفاده قرار گیرند. در مقایسه با دوربین‌های دیجیتال، گوشی‌های هوشمند به دلیل افزایش سریع و همگانی استفاده از آنها، بهبود قابل توجه در عملکردهای دوربین و استفاده گسترده از برنامه‌های کاربردی تلفن همراه (Apps) به طور گسترده‌ای به عنوان ابزارهای تصویربرداری در تکنولوژی رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال استفاده می‌شوند. در دهه گذشته، روش رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال برای ردیابی و تعیین ترکیبات خطرات در نمونه‌های بیولوژیکی و شیمیایی در پژوهش‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته و آسان، سریع و مقرون به صرفه بودن آن مورد تایید قرار گرفت (Kanchi et al., 2018).

¹ Digital Image Colorimetry

اجرای روش DIC در چند مرحله انجام می شود که دو مرحله دریافت تصویر با گوشی هوشمند و سپس تعیین کمیت رنگ با استفاده از نرم افزارهای خاص پردازش تصویر از قبیل Image J، Adobe Photoshop، Matlab، Pantone Studio و غیره) تحت فضای رنگی مناسب (شکل ۱) جزء مراحل اصلی فرایند مذکور به شمار می آیند. در ادامه تعیین رابطه بین داده های کمی تصاویر و غلظت آنالیت و خوانش نتایج با استفاده از برنامه های مربوطه در گوشی امکان پذیر بوده و به همین دلیل اجرای DIC در گوشی های هوشمند به طور فزاینده ای مورد توجه قرار گرفته است (Capitan-Vallvey et al., 2015).

رنگ سنجی تصویر دیجیتال با فراهم نمودن ارزیابی چشمی تغییرات رنگی تصویر دیجیتال در حال تبدیل شدن به ابزاری قدرتمند، سریع و کم هزینه برای تجزیه و تحلیل غلظت آنالیت هدف است. این استراتژی به ویژه برای کاربرانی که می خواهند با تلاش کم، هزینه پایین و مستقل از مکان آنالیزهای شیمیایی و مبتنی بر رنگ سنجی را عملیاتی کنند بسیار جذاب و کارآمد می باشد.



شکل ۱. شماتیک روش رنگ سنجی تصویر دیجیتال در گوشی های هوشمند (Capitán-Vallvey et al., 2015)

رنگ سنجی تصویر دیجیتال به عنوان یک روش سریع، دقیق و کم هزینه برای تعیین غلظت آنالیت ها می تواند در حوزه های مختلف علمی و صنعتی جایگزین روش های سنتی شود. با توسعه الگوریتم های پردازش تصویر و یادگیری ماشین، دقت و کارایی این روش بیش از پیش بهبود خواهد یافت. به دلیل توانمندی در حذف خطای

ذهنی مشاهده با چشم غیر مسلح، استفاده از تصاویر دیجیتال می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب جهت توصیف تفاوت های رنگی با چشم غیر مسلح شود. به منظور ارتقای استاندارد سیستم های آنالیز کننده رنگ تصاویر دیجیتال، از سیستم های رنگی مختلف برای تعریف فضای مختصات سه بعدی استفاده شده که در آنها هر رنگ با یک نقطه نشان داده می‌شود. فضاهاى رنگى رایج (مدل های رنگی) شامل RGB، CMYK، XYZ، $L^*a^*b^*$ ، HSV، مدل خاکستری و غیره بوده که در این میان RGB، HSV و مدل های خاکستری به عنوان پرکاربردترین سیستم های رنگی در نظر گرفته شده اند. علاوه بر این، از ابزارهای تحلیلی رنگ دیجیتال برای اندازه گیری داده های "رنگ‌ها" و تبدیل آنها به مقادیر عددی استفاده می‌شود. کمیت رنگ را می‌توان با استفاده از نرم افزارهای مختلف تجزیه و تحلیل تصاویر یا برنامه های تلفن همراه و بر اساس مدل های رنگی که پیشتر مورد اشاره قرار گرفت با داده های کمی اعلام نمود (Costa et al., 2015).

۲- اصول عملیاتی رنگ‌سنجی نوین در گوشی هوشمند

در روش رنگ‌سنجی تصاویر دیجیتال، ابتدا از نمونه‌های موردنظر تصویربرداری می‌شود. سپس این تصاویر توسط نرم‌افزارهای پردازش تصویر مورد تحلیل قرار می‌گیرند. معمولاً از مدل‌های رنگی مختلف مانند RGB (قرمز، سبز، آبی) و HSV^2 (فام، اشباع، ارزش رنگ) برای استخراج داده‌های عددی استفاده می‌شود. شدت رنگ در هر آیت می‌تواند به عنوان شاخصی برای تعیین غلظت آنالیت به کار رود. جهت کالیبراسیون، منحنی استاندارد از نمونه‌های با غلظت مشخص تهیه و رابطه میان مقدار رنگ و غلظت آنالیت تعیین می‌شود. اجزای اصلی در روش رنگ سنجی رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال شامل ابزارهایی برای ثبت تصویر، فضاهاى رنگى، شرایط نوری، برنامه های رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال و برنامه های کمی سازی رنگ ها می باشد. با هدف درک بیشتر روش مذکور، اجزای مختلف با جزییات بیشتری در زیر مورد بررسی قرار گرفته اند (Capitán-Vallvey et al., 2015).

² Hue, Saturation, and Value

۱-۲- مدل های رنگی

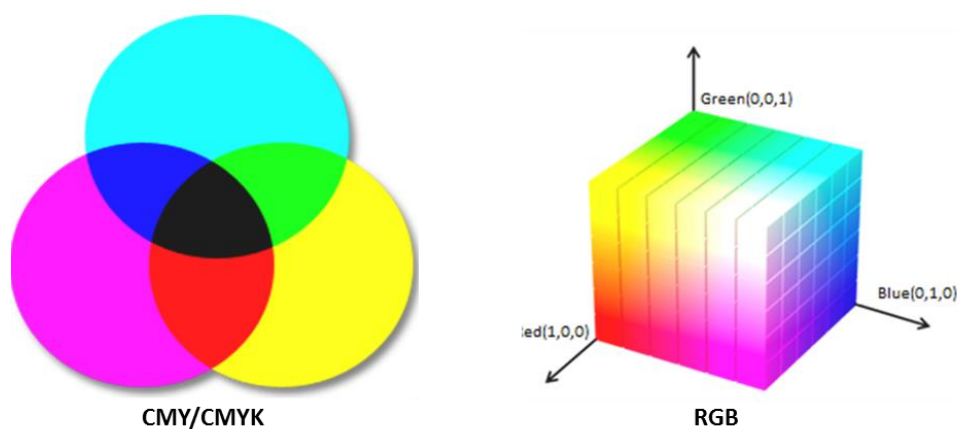
فضای رنگی که اصطلاحاً "پهنه رنگی"^۳ نیز نامیده می شود به مجموعه ای از رنگ ها اطلاق می شود که توسط انسان یا ابزار قابل مشاهده می باشد. پهنه رنگی یک نمایشگر ویدئویی، تنها رنگ هایی را ارسال می کند که توان نمایش آنها را دارد. چندین مدل یا فضای رنگی وجود دارد که از جمله آنها می توان به مدل RGB، CMYK، HSV/HSL، CIE XYZ، $L^*a^*b^*$ و YUV اشاره نمود که به کرات در رنگ سنجی تصاویر دیجیتال مورد استفاده قرار می گیرند. شایان ذکر است که تجزیه و تحلیل دقیق تر نتایج نیازمند انتخاب مناسب فضاهای رنگی، متناسب با درخواست های مختلف می باشد. فضاهای رنگی پر کاربرد به تفصیل در زیر معرفی شده اند.

1-2-1- مدل RGB

مدل RGB یک مدل رنگی است که بر اساس ترکیب سه رنگ اصلی نور (قرمز، سبز و آبی) برای ایجاد رنگ های مختلف کار می کند. این مدل به طور گسترده در صفحه نمایش های دیجیتال، دوربین ها، تلویزیون ها و پردازش تصویر استفاده می شود. هر رنگ در این مدل با ترکیب سه مؤلفه ی قرمز (R)، سبز (G) و آبی (B) ایجاد می شود. مقدار هر مؤلفه بین صفر تا ۲۵۵ متغیر است. فضای رنگی برای سیستم های نمایشگر مبتنی بر رایانه اغلب توسط یک مکعب واحد قابل مشاهده می شود. هر رنگ (قرمز، سبز و آبی) به یکی از سه محور مختصات متعامد در فضای سه بعدی اختصاص داده می شود. نمونه ای از چنین مکعبی در زیر به همراه چند رنگ کلیدی و مختصات آنها نشان داده شده است (شکل ۲). در امتداد هر یک از محورها مکعب رنگ، رنگ ها از محدوده عدم مشارکت آن جزء تا رنگ کاملاً اشباع شده متغیر هستند. این مکعب رنگ جامد است و هر نقطه (رنگ) درون مکعب با یک عدد سه گانه یعنی R، G و B مشخص می شود. خط مورب مکعب از

³ gamut

سیاه (۰، ۰، ۰) تا سفید (۱، ۱، ۱) نشان دهنده تمام خاکستری‌ها است و سه محور به ترتیب نشان دهنده تمام قرمز، سبز و آبی هستند. در عمل، ترکیب‌های مختلف سخت‌افزار/نرم‌افزار رایانه‌ها از طیف‌های مختلفی از رنگ‌ها استفاده می‌کنند که دامنه رایج ۰-۲۵۵ (هشت بیتی) و ۰-۶۵۵۳۵ (۱۶ بیتی با دقت بالا) برای هر جزء (رنگ اصلی) است. فضای رنگی RGB در فضای ادراکی ما قرار دارد، یعنی مکعب RGB رنگ‌های کمتری را نسبت به آنچه که ما می‌توانیم ببینیم نشان می‌دهد. مدل RGB اغلب در محصولات دیجیتال و به طور گسترده در تولیدات صنعتی استفاده می‌شود (Khairy et al., 2019).



شکل ۲. فضای رنگ RGB و فضای رنگی CMY/CMYK (Tkalcic et al., 2003).

1-2-2-2-2 CMYK

فضاهای رنگی CMY^۴ و CMYK اغلب در چاپ رنگی استفاده می‌شوند. رنگ‌های اصلی در فضای رنگی CMY فیروزه‌ای، سرخابی و زرد هستند. قرمز، سبز و آبی رنگ‌های فرعی هستند (شکل ۲). بر خلاف فضای RGB به عنوان یک مدل رنگ افزایشی، فضای رنگی CMY را یک مدل رنگ کاهشی می‌نامند یعنی هرچه رنگ بیشتری اضافه شود، نور بیشتری جذب (یا حذف) می‌شود و رنگ تیره‌تر می‌شود. بنابراین، سفید در (۰، ۰، ۰) و سیاه در (۱، ۱، ۱) است. فضای رنگی CMYK یک نسخه تغییر یافته بر اساس مدل CMY با افزودن

^۴ Cyan, Magenta, and Yellow

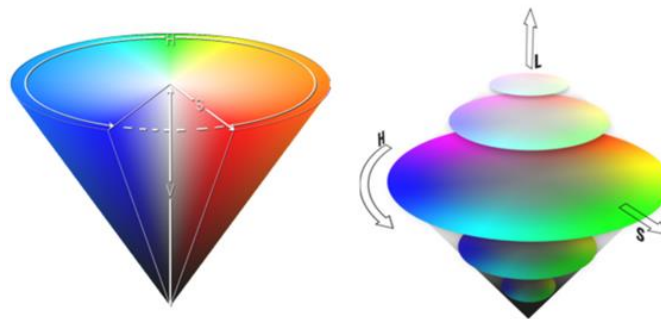
رنگ سیاه است. فضای رنگی CMYK شکاف بین تئوری و عمل را می‌بندد. در تئوری، جزء سیاه اضافی مورد نیاز نیست. با این حال، تمرین با انواع مختلف جوهر و کاغذ نشان داده است که وقتی مقادیر مساوی جوهر فیروزه‌ای، سرخابی و زرد مخلوط می‌شوند، نتیجه معمولاً قهوه‌ای تیره است، نه سیاه. افزودن جوهر سیاه به مخلوط این مشکل را حل می‌کند و هزینه جوهر را کاهش می‌دهد به عنوان مثال چاپ متن مشکی فقط از K (مشکی) استفاده می‌کند، نه ترکیب سه رنگ دیگر و به همین دلیل جوهر کمتری استفاده می‌شود (Tkalcic et al., 2003).

HSB/HSL مدل 3-2-1

مدل رنگی HSB^۵ یک فضای رنگی را بر حسب سه ترکیب (رنگ، اشباع و روشنایی) تعریف می‌کند. فام یکی از سه ویژگی رنگ است که جایگاه آن را در سلسله رنگی (از قرمز تا بنفش) مشخص می‌کند. فام در واقع نشان دهنده رنگ اصلی در بازه ۰ تا ۳۶۰ درجه است (هر مقدار مربوط به یک رنگ است: صفر نماینده قرمز، ۴۵ نماینده سایه نارنجی و ۵۵ نماینده سایه زرد است). اشباع (Saturation) شدت رنگ است که از صفر تا ۱۰۰٪ متغیر است (صفر به معنای بدون رنگ است، که سایه ای از خاکستری بین سیاه و سفید است و ۱۰۰٪ به معنای رنگ شدید است. روشنایی (Brightness/Value) نیز نشان دهنده میزان روشنایی رنگ است که از ۰ تا ۱۰۰٪ متغیر است (صفر همیشه سیاه است؛ اما بسته به میزان اشباع، ۱۰۰ ممکن است سفید یا یک رنگ کم و بیش اشباع شده باشد). مدل HSB به مدل HSV نیز معروف است (شکل ۳). این مدل یک تبدیل غیرخطی از فضای رنگی RGB است. به عبارت دیگر، در این مدل رنگ به عنوان یک ترکیب ساده (جمع/تفریق) از رنگ‌های اصلی تعریف نمی‌شود، بلکه به عنوان یک تبدیل ریاضی تعریف می‌شود (Woelk et al., 2005).

^۵ Hue, Saturation, and Brightness

در فضای رنگی $^{\circ}HSL$ که HLS یا HIS نیز نامیده می‌شود، فام همان نوع رنگی است که در بالا ذکر شد. اشباع، تغییر رنگ بسته به روشنایی از صفر تا ۱۰۰٪ (از مرکز محور سیاه و سفید) است. روشنایی نیز که تحت عنوان درخشندگی یا لومینانس معرفی می‌شود در محدوده صفر تا ۱۰۰٪ (از سیاه تا سفید) تعریف می‌شود. نمایش گرافیکی رایج این مدل در شکل ۳ نشان داده شده است. HSL مشابه HSB است با این تفاوت که HSL متقارن با روشنایی و تاریکی است اما HSL معمولاً تقریب رنگ دقیق تری نسبت به HSB ارائه می‌دهد (Woelk et al., 2005).



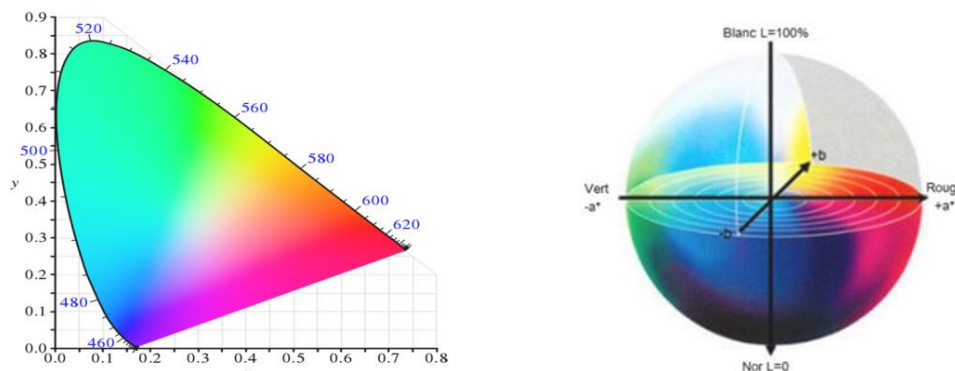
شکل ۳. فضاهای رنگی HSV (چپ) و HSL (راست) (Woelk et al., 2005).

CIE 1931-XYZ مدل 4-2-1

این مدل بر اساس نحوه درک رنگ توسط چشم انسان توسط کمیسیون بین‌المللی روشنایی (CIE) در سال ۱۹۳۱ توسعه داده شده است و از سه مؤلفه تشکیل شده است. X : نمایش‌دهنده ترکیبی از تحریکات نوری سه مخروط چشمی و به شدت تحت تأثیر رنگ‌های قرمز و سبز است. Y : مرتبط با درخشندگی (Luminance) و حساسیت چشم انسان به روشنایی را نشان می‌دهد. Z : نشان‌دهنده میزان حساسیت به نور آبی است. مدل CIE 1931-XYZ پایه و اساس بسیاری از مدل‌های رنگی دیگر است و در بسیاری از کاربردهای علمی و صنعتی مانند کالیبراسیون نمایشگرها و تصویربرداری دقیق رنگ استفاده می‌شود. این اولین روشی بود که به

⁶ Hue, Lightness, and Saturation

طور گسترده به عنوان یک روش استاندارد بین المللی برای تعریف رنگ پذیرفته شد و امروزه هنوز "استاندارد طلایی" است (Kuehni, 2003) (شکل 4).



شکل ۴. مدل رنگی CIE XYZ (سمت چپ) و مدل $L^*a^*b^*$ (سمت راست). (Kuehni, 2003)

Lab-5-2-1 مدل

معمولاً از فضای Lab برای مشخص کردن رنگ غذاها استفاده می شود. فضای Lab یک استاندارد بین المللی برای اندازه گیری رنگ است که توسط CIE در سال ۱۹۷۶ پذیرفته شد (شکل ۴). L جزء روشنایی است که از ۰ تا ۱۰۰ متغیر است و پارامترهای a (از سبز تا قرمز) و b (از آبی تا زرد) دو جزء رنگی هستند که از ۱۲۰- تا ۱۲۰+ متغیر است [۱۴، ۱۵]. فضای Lab از نظر ادراکی یکنواخت است، یعنی فاصله اقلیدسی بین دو رنگ مختلف تقریباً با تفاوت رنگ درک شده توسط چشم انسان مطابقت دارد. برای انجام توصیف دقیق تصویر یک ماده غذایی و ارزیابی دقیق تر کیفیت آن، لازم است ارزش رنگ هر پیکسل از سطح آن را بدانید. با این حال، رنگ سنج‌های تجاری موجود در حال حاضر Lab را تنها در چند سانتی متر مربع اندازه گیری می کنند و بنابراین اندازه گیری‌های آن‌ها در مواد ناهمگن مانند بیشتر اقلام غذایی نمی تواند کاندید مناسبی برای همه سطح باشد. در تبدیل رنگ بین مدل‌های مختلف، Lab معمولاً به عنوان یک مرحله میانی استفاده می شود تا رنگ‌ها دقیق تر باشند (Papadakis et al., 2000).

۲-۲- ابزارهایی برای گرفتن تصویر

داده‌های تصویر دیجیتال اغلب از یک اسکنر، یک دوربین دیجیتال، یک وب‌کم و یا یک تلفن همراه به دست می‌آیند. بدیهی است که دریافت تصاویر با تجهیزات مختلف منجر به کیفیت تصویر متفاوت می‌شود به همین دلیل تلاش می‌شود تا از تجهیزات مشابه برای جمع‌آوری تصاویر در کل فرآیند تجزیه و تحلیل استفاده شود تا خطاهای ابزاری به حداقل برسد. تجهیزات تصویربرداری، رنگ را از طریق حسگرهای تصویر می‌گیرند، خطوط نوری رنگ اصلی قرمز، سبز و آبی دریافتی را کمی می‌کنند و با استفاده از برخی حسگرهای تصویر، تبدیل و خروجی سیگنال نوری و سیگنال الکتریکی را تکمیل می‌کنند. با این حال اسکنر، دوربین و دوربین دیجیتال نمی‌تواند اطلاعات تصویر را به طور مستقل مدیریت کنند و باید به کامپیوتر برای مدیریت اطلاعات تصویر متصل شوند. در حالیکه گوشی هوشمند می‌تواند از برنامه‌های توسعه‌یافته خود برای تعیین کمیت تصویر بلافاصله پس از دریافت تصاویر باکیفیت استفاده کند. بنابراین، در میان بسیاری از ابزارها برای ثبت تصاویر، گوشی‌های هوشمند به دلیل کیفیت تصویربرداری برتر، پردازنده‌های پرسرعت و استفاده گسترده از برنامه‌های تلفن همراه، می‌توانند به عنوان ابزارهای ترجیحی برای گرفتن تصویر در نظر گرفته شوند. به عنوان دستگاه نهایی خوانش نتایج، اپلیکیشن‌های گوشی هوشمند به میزان قابل توجهی حجم سیستم اندازه‌گیری را کاهش داده و حساسیت تحلیل را بهبود بخشیده‌اند. گوشی‌های هوشمند علاوه بر اینکه یک ابزار دریافت تصویر هستند می‌توانند به یک دستگاه تشخیص دستی یکپارچه تبدیل شوند که قادر به اندازه‌گیری طیف جذب رنگ‌سنجی، طیف نشر فلورسانس و طیف انعکاس تشدید از یک کارتریج میکروفلوئیدی قرار گرفته در مسیر نوری اندازه‌گیری باشند (Long et al., 2017).

۲-۳- شرایط نور

بسته به شرایط، رنگ ظاهر شده در تصاویر می‌تواند تحت تأثیر چندین عامل قرار گیرد، از جمله ترکیب یکنواخت امواج نوری منبع نور، شدت و هندسه انتشار نور، زبری سطح جسم، یکنواختی و شدت رنگ. شرایط نوری بهتر

لزوماً به معنای کیفیت بهتر تصاویر نیست. در حالت ایده‌آل، آنالیت (ماده مورد تجزیه و تحلیل) باید تحت شرایط نوری یکسان عکسبرداری شود. هنگام ثبت تصاویر با گوشی‌های هوشمند، شرایط مختلف روشنایی تأثیر زیادی بر تصویربرداری خواهد داشت و مستقیماً بر نتایج تجزیه و تحلیل تأثیر می‌گذارد. برای حل این مشکل، محققان سعی کردند به ترتیب نرم افزار الگوریتم و سخت افزار منبع نور را بهبود بخشند. شن و همکاران (Shen et al., 2012) در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که از طریق الگوریتم نقشه برداری می‌توان مقادیر رنگ به دست آمده تحت شدت‌های مختلف نور را به ثابت خاصی تبدیل کرد. الگوریتم مذکور یکسان سازی رنگ‌ها را در شدت‌های مختلف نور متوجه می‌شود و انحراف بزرگ نتایج تجزیه و تحلیل ناشی از روشنایی‌های مختلف را حل می‌کند. پس از آن، هونگ و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش دادند که پس از اعمال الگوریتم تصحیح رنگ، می‌توان یک تصویر رنگی یکسان را از تصاویر گرفته‌شده در شدت‌های نوری مختلف، مانند فلورسانس، نور خورشید و شدت نور کم، به دست آورد. این الگوریتم همچنین مشکل انحراف رنگ ناشی از تفاوت در شرایط نوری را حل می‌کند (Hong et al., 2014). متدهای ذکر شده در بالا، چه به صورت الگوریتم‌های نرم‌افزاری و چه در مسیر نوری منبع نور سخت‌افزاری، می‌توانند مشکل اعوجاج رنگ ناشی از روشنایی نامتوازن در محیط را حل کنند. با این حال، جمع‌آوری تصاویر با کیفیت به دلیل سایه‌ها که به طور اجتناب‌ناپذیری به دلیل قرارگیری نامناسب منبع نور منفرد ایجاد می‌شوند دشوار است. وجود یک دستگاه کمکی مناسب مانند (اتاقک نورپردازی) که قادر باشد روشنایی ثابت و فاصله مشخصی را بین دوربین و آنالیت فراهم کند، برای رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال در گوشی‌های هوشمند بسیار مهم است، زیرا شرایط نورپردازی و فاصله به طور مستقیم بر کیفیت تصاویر و نتایج تحلیل‌های بعدی تأثیر می‌گذارند. به طور خلاصه، برای دستیابی به تصاویر با کیفیت بالا، پایداری شرایط نورپردازی باید بهبود یابد (Sumriddetchkajorn et al., 2014).

۲-۴- اپلیکیشن‌های رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال و کمی‌سازی رنگ

اپلیکیشن‌های رنگ‌سنجی دیجیتال روشی سریع، کم‌هزینه و دقیق برای اندازه‌گیری و کمی‌سازی رنگ‌ها بوده و در زمینه‌هایی مانند پزشکی، کشاورزی، کنترل کیفیت و تحقیقات علمی، کاربرد گسترده‌ای دارند. کمی‌سازی رنگ به استفاده از نرم‌افزارهای تحلیل تصویر برای تبدیل اطلاعات رنگ به سیگنال دیجیتال تحت یک مدل رنگی خاص اشاره داشته و منجر به ارائه رابطه بین سیگنال تصویر دیجیتال کمی‌شده و غلظت آنالیت مورد بررسی می‌گردد. انتخاب اپلیکیشن مناسب بسته به نیاز و نوع تحلیل رنگی اهمیت دارد. همانطور که قبلاً ذکر شد از جمله نرم‌افزارهای تحلیل تصویر که به طور معمول مورد استفاده محققان این حوزه قرار می‌گیرد می‌توان به Adobe Photoshop CC، Matlab، Pantone Studio، Digital Colorimeter، ImageJ، Color Grab، Color Pilot و ... اشاره نمود که به طور مختصر در زیر مورد اشاره قرار گرفته‌اند.

Color Grab: یک اپلیکیشن قدرتمند برای شناسایی و استخراج رنگ‌ها از تصاویر است که می‌تواند در پروژه‌های طراحی گرافیک، طراحی وب، دکوراسیون، عکاسی و سایر زمینه‌های مرتبط با رنگ مورد استفاده قرار گیرد. Color Grab از مدل‌های رنگی مختلفی مانند RGB، HEX، CMYK، HSV، HSL، LAB، XYZ، RAL و Pantone پشتیبانی می‌کند تا رنگ‌ها را در قالب‌های دقیق برای طراحی دیجیتال، چاپ و کاربردهای مختلف شناسایی کند.

Adobe Photoshop CC: یک نرم‌افزار پردازش تصویر چندسیستمی است که اطلاعات رنگ را به مقادیر R، G و B تبدیل می‌کند.

Matlab: یک محیط برنامه‌نویسی برای توسعه الگوریتم، تحلیل داده، تجسم و محاسبات عددی است که توسط MathWorks در ایالات متحده توسعه یافته است.

Pantone Studio: یک اپلیکیشن iOS^۷ است که بیش از ۱۰,۰۰۰ رنگ دارد و به راحتی امکان استخراج رنگ تصویر از گوشی هوشمند را فراهم می‌کند و اطلاعات مربوط به نوع رنگ و اطلاعات مرتبط را فراهم می‌کند.

Digital Colorimeter: یک نرم‌افزار مبتنی بر سیستم عامل مکینتاش است که توسط شرکت اپل توسعه یافته و قادر به نمایش مدل‌های رنگی مانند RGB، sRGB، Adobe RGB، *Lab و غیره است. در این نرم‌افزار با حرکت ماوس، به راحتی می‌توان مقدار رنگ هر نقطه‌ای از مکان‌نما را به دست آورد.

ImageJ: یک نرم‌افزاری چند پلت فرمی است که بر اساس زبان جاوا توسط مؤسسه ملی بهداشت روان توسعه یافته و دارای افزونه‌هایی است که می‌توانند تصاویر را در فرمت‌های مختلف ویرایش و پردازش کنند.

Color Pilot: یک برنامه تصحیح رنگ در ویندوز است که انحرافات رنگ غیرعادی را تصحیح کرده و مقادیر R، G و B را استخراج می‌کند. نرم‌افزار مذکور به‌ویژه برای دوربین‌های دیجیتال و اسکنرها برای به دست آوردن رنگ‌های زنده مناسب است.

محققان می‌توانند یکی از این نرم‌افزارها را بسته به هدف تحقیق و مدل رنگ استفاده شده انتخاب کنند. با استفاده از نرم‌افزارهای کمی‌سازی رنگ تصاویر دیجیتال می‌توان ارزش رنگی^۸ تصویر گرفته شده با گوشی هوشمند را استخراج و رابطه بین ارزش کروماتیک یا عملکرد آن‌ها و غلظت آنالیت را مورد بررسی قرار داد. در یک محدوده خاص از غلظت آنالیت، میزان رنگی بودن^۹ ماده رنگی به صورت خطی یا غیرخطی به غلظت آن مرتبط بوده و نمونه می‌تواند پس از ایجاد منحنی استاندارد مورد تحلیل قرار گیرد. با ترسیم منحنی استاندارد

^۷ iPhone Operating System

^۸ Chromatic value

^۹ chromaticity

برای هر نمونه، امکان خوانش مستقیم غلظت آنالیت هدف و به اشتراک گذاری نتایج تحلیل به صورت آنلاین از طریق گوشی هوشمند فراهم می‌گردد (Fan et al., 2020).

تاکنون اپلیکیشن‌های فراوانی برای تجزیه و تحلیل آنالیت‌های مختلف توسعه یافته‌اند تا امکان خوانش مستقیم غلظت آنالیت مورد نظر در نمونه‌ها را بر روی صفحه نمایش گوشی هوشمند فراهم کنند. توسعه موفقیت آمیز یک اپلیکیشن گوشی هوشمند مبتنی بر نوار تست بیومتریک رنگ‌سنجی برای گرفتن تصویر نوار تست و بررسی حضور ویروس pH1N1 از جمله اپلیکیشن‌های طراحی شده در این زمینه است (Son et al., 2019). طراحی اپلیکیشن گوشی هوشمند مبتنی بر نوار تست/پلی اتیلن ترفتالات، از دیگر اپلیکیشن‌های توسعه یافته برای محاسبه غلظت SO_2 است که از تجزیه و تحلیل رنگ‌های RGB تصاویر با وضوح بالا استفاده می‌کند (Fu et al., 2019). به طور کلی، هر اپلیکیشن توسعه یافته برای تجزیه و تحلیل داده‌های رنگی تصاویر دیجیتال در گوشی هوشمند باید شامل حداقل ۳ ویژگی زیر باشد:

(۱) وجود مدل پاسخ رنگ (نوع و شدت) - غلظت آنالیت؛

(۲) خوانش مستقیم غلظت آنالیت در نمونه؛

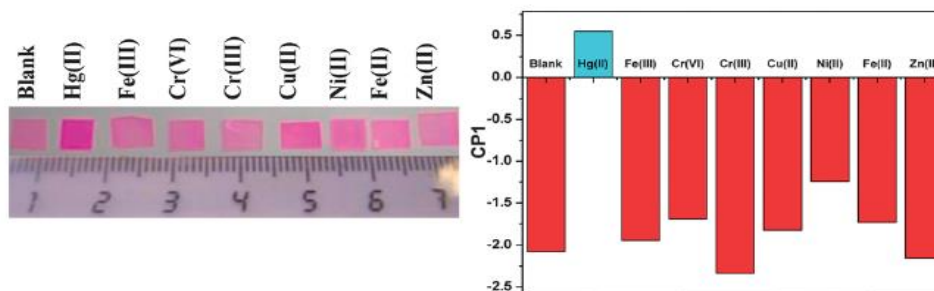
(۳) ذخیره‌سازی داده‌های تجزیه و تحلیل و بارگذاری آنها؛

3- کاربردهای روش رنگ‌سنجی دیجیتال با گوشی هوشمند

پیشرفت‌های اخیر در تصویربرداری دیجیتال، تولید عکس با وضوح بالا از دوربین دیجیتال گوشی هوشمند را مقرون به صرفه و راحت‌تر کرده است. استفاده گسترده از تصاویر دیجیتال فرصت بی‌نظیری را برای توسعه آنالیزهای سریع و کم‌هزینه رنگ‌سنجی این تصاویر در گوشی‌های هوشمند فراهم نموده است که در غربالگری‌ها، آنالیزهای نیمه کمی و کمی فلزات/فلزات سنگین، علف‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، شاخص‌های بیوشیمیایی، ترکیبات طبیعی و باکتری‌ها/ویروس‌ها می‌تواند مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

۳-۱- ردیابی فلزات و فلزات سنگین

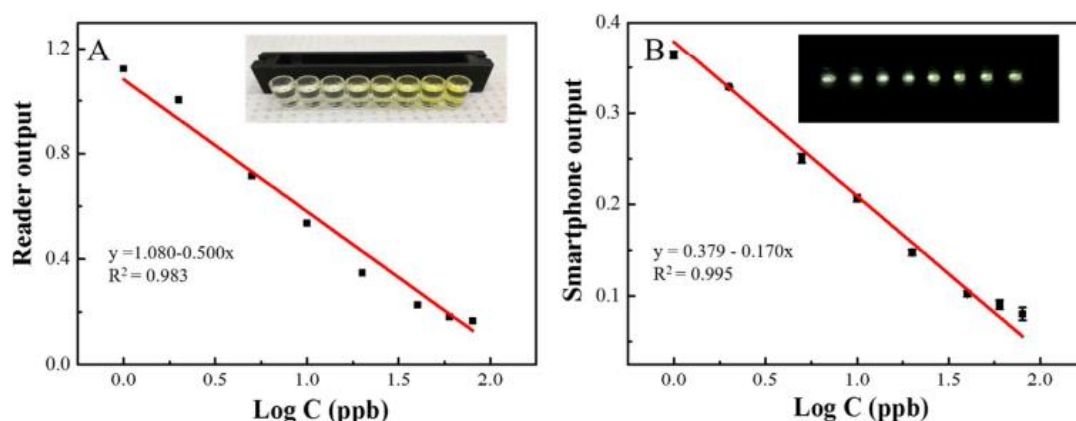
فلزات سنگین به فلزاتی اطلاق می‌شود که دارای چگالی بالاتر از ۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب هستند و بسیاری از آنها اثرات سمی و زیان‌آوری در سطوح پایین دارند. این فلزات در بسیاری از صنایع مختلف به کار رفته و به دلیل اثرات منفی بر محیط زیست و سلامت انسان‌ها نیازمند نظارت و مدیریت دقیق در استفاده و دفع هستند. با این حال، بیشتر روش‌های تحلیلی برای فلزات سنگین نیاز به تجهیزات گران‌قیمت و عملیات پیچیده دارند و تنها در آزمایشگاه‌های پیشرفته قابل انجام است. استفاده از روش رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال در گوشی هوشمند برای شناسایی فلزات سنگین به ویژه برای انجام تحلیل‌های سریع در محل می‌تواند یک گزینه جایگزین مناسب و مقرون صرفه باشد. تاکنون چندین پژوهش موفق و مبتنی بر رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال با گوشی هوشمند همراه برای ردیابی فلزات سنگین و مهمی چون جیوه (Kaoutit et al., 2013)، سرب (Wongthanyakram et al., 2019)، کرم (Firdaus et al., 2014)، مس (Kumar et al., 2020) و آهن (Choodum et al., 2019) انجام شده است. در یک بررسی از آنالیز تصاویر دیجیتال غشاهای حسگری رنگ‌سنجی برای ردیابی و تعیین غلظت یون جیوه در محیط‌های آبی استفاده شد (شکل ۵). پس از تصویر برداری از غشاهای غوطه‌ور شده در آب حاوی غلظت‌های مختلف یون جیوه و تحلیل اطلاعات دیجیتال تصاویر گرفته شده، غلظت‌های یون جیوه در محدوده میلی‌مولار تا نانومولار کمی‌سازی شد (Kaoutit et al., 2013).



شکل ۵. تصویر غشای حسگری پس از غوطه ورسازی در غلظت 10^{-5} M یون‌های فلزی مختلف (سمت چپ) و پارامترهای RGB تصاویر غشاها پس از استاندارد سازی پارامترها و آنالیز مولفه‌های اصلی (PCA) (Kaoutit et al., 2013).

۳-۲- ردیابی آفت‌کش‌ها

علف‌کش‌ها به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان برای محافظت از محصولات کشاورزی در برابر رقابت نامطلوب از سوی علف‌های هرز استفاده می‌شوند. با این حال، علف‌کش‌ها یا متابولیت‌های آنها می‌توانند از طریق زنجیره غذایی وارد بدن انسان شوند و خطرات بالقوه‌ای برای سلامت انسان ایجاد کنند. بنابراین، شناسایی سریع علف‌کش‌ها در نمونه‌های غذایی اهمیت زیادی دارد. ۲، ۴-دی‌کلروبنزونیل استیک اسید (توفوردی) یک علف‌کش رایج است که برای کنترل انتخابی گیاهان پهن‌برگ استفاده شده و با توجه به تأثیرات مخرب زیست‌محیطی و خطرات بالقوه برای سلامت عمومی، پایش و تشخیص این علف‌کش در منابع آب آشامیدنی از اهمیت بالایی برخوردار است. در یک بررسی یک دستگاه رنگ‌سنجی پرتابل نواری مبتنی بر گوشی هوشمند و اپلیکیشن Yamera توسعه یافت که با ابعاد کوچک ($50 \times 100 \times 160 \text{ mm}^3$) و قیمت پایین (۱۰ دلار) و دو رنگ مختلف متیلن بلو و رودامین B قادر بود علف‌کش توفوردی را در محدوده غلظت یک تا ۸۰ ppb در ۸ نمونه در مقیاس میکرولیتری ردیابی نماید (شکل ۶). نتایج این پلتفرم در ردیابی علف‌کش مذکور در نمونه‌هایی چون آب لوله‌کشی، پلاسمای موش و سرم انسانی قابل مقایسه با میکروپلیت‌خوان تجاری بود و برای تشخیص سریع، ارزان و در محل علف‌کش‌ها در ارزیابی محیط زیست و پایش زیستی یک گزینه مناسب می‌باشد (Wang et al., 2017).



شکل ۶. رابطه خطی بین خروجی دستگاه خوانش میکروپلیت و لگاریتم غلظت توفوردی. (سمت چپ) و رابطه خطی بین خروجی گوشی هوشمند و لگاریتم غلظت توفوردی (سمت راست) (Wang et al., 2017).

آفت‌کش‌ها به‌طور گسترده‌ای در کشاورزی برای کشتن آفات یا حشرات به‌منظور افزایش عملکرد محصولات استفاده می‌شوند. استفاده بیش از حد از آفت‌کش‌ها باعث آلودگی گسترده مواد غذایی می‌شود و بیماری‌هایی که به‌دلیل انباشت بیش از حد باقی‌مانده‌های آفت‌کش‌ها به وجود می‌آیند، سالانه خسارات و مرگ‌های زیادی را به همراه دارند. بنابراین، ایجاد روش‌های تحلیلی سریع با حساسیت و انتخاب‌پذیری بالاتر برای تجزیه و تحلیل باقی‌مانده‌های آفت‌کش‌ها جهت تضمین ایمنی مواد غذایی و سلامت انسان ضروری است. گوشی‌های هوشمند دستگاه‌های محبوبی هستند که معمولاً قابلیت مجهز شدن به حسگرهای حساس با قابلیت محاسباتی بالا را دارا می‌باشند.

ردیابی و تعیین غلظت آفت‌کش‌های ارگانوفسفره (Sicard et al., 2015) و متیل پاراتیون (Guo et al., 2015) با روش رنگ‌سنجی نوین مبتنی بر گوشی هوشمند همراه از جمله مطالعات موفق انجام شده در این زمینه است که به ترتیب مبتنی بر مدل رنگی RGB و CMYK بودند. سیکارد و همکاران (۲۰۱۵) ترکیبی از حسگرهای مبتنی بر کاغذ و یک اپلیکیشن نوآورانه برای آنالیز کمی آفت‌کش‌های ارگانوفسفره در آب با استفاده از خوانش‌های رنگ‌سنجی در محل با گوشی هوشمند طراحی کردند. دستگاه تحلیلی مبتنی بر کاغذ

(μ PAD) قادر بود حضور آفت‌کش‌های ارگانوفسفره در آب را بر اساس اثر مهارى آنها بر روى استیل‌کولین استراز تثبیت شده شناسایی کند. گوشی هوشمند همچنین قابلیت انتقال نتایج به یک وب‌سایت خاص و نمایش موقعیت نمونه‌های آب ارزیابی شده را روی نقشه با نشان‌گذاری موقعیت تست از طریق GPS دارا بود (Sicard et al., 2015).

گائو و همکاران (۲۰۱۵) از بارکدهای قابل خواندن توسط گوشی هوشمند برای تجزیه و تحلیل کیفی باقی‌مانده‌های متیل پاراتیون استفاده کردند. اصل تشخیص بر اساس مهار غیرقابل برگشت فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز (AChE) توسط متیل‌پاراتیون است. AChE به‌طور کاتالیتیکی استیل‌تیوکولین یدید را به تیوکولین هیدرولیز می‌کند که به نوبه خود دی‌تیوبیس-نیتروبنزوات را تجزیه کرده و یک محصول زردرنگ (تیو-نیتروبنزوات دی‌پروتونه‌شده) تولید می‌کند. شدت رنگ زرد محصول به‌طور معکوس وابسته به غلظت آفت‌کش است. اپلیکیشن اسکن بارکد QuickMark در گوشی هوشمند بارکد متیل پاراتیون را می‌خواند و آیتم Y را تحت مدل رنگی CMYK تجزیه و تحلیل می‌کند تا غلظت مربوطه را به‌دست آورد (Guo et al., 2015).

۳-۳- ردیابی باکتری‌های بیماریزا

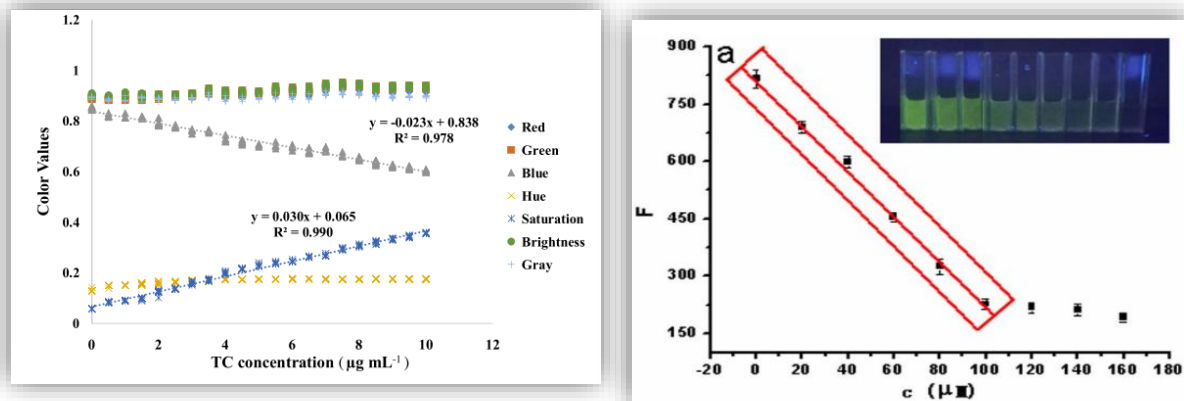
روش‌های مرسوم برای تشخیص عوامل بیماری‌زا شامل کشت میکروبی، آزمون‌های ایمنولوژیک و روش‌های مولکولی و میکروسکوپی هستند. اگر چه هر کدام از این روش‌ها از دقت و حساسیت خاصی برای ردیابی و شناسایی عوامل میکروبی برخوردار بوده اما نیاز به تجهیزات پیشرفته و گران قیمت، نیروی متخصص و زمان بر بودن فرایند تشخیص مانع از کاربرد گسترده آنها و بویژه استفاده آنها در محل می‌گردد. سنسورهای شیمیایی مبتنی بر رنگ‌سنجی به دلیل سادگی، قابلیت اطمینان و تطبیق‌پذیری بالا به‌طور گسترده برای تشخیص بصری آنالیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. در یک بررسی از نانوذرات طلای نشان دار شده با ۴-مرکاپتوفنیل بورونیک اسید برای توسعه یک استراتژی تشخیص رنگ‌سنجی به منظور شناسایی سلول باکتری‌های آلاینده آب (E.

(*coli*) استفاده شد. نانو ذرات فعال شده با اتصال بر سطح باکتری مانع از تجمع نانوذرات در حضور نمک می شدند. میزان تجمع نانوذرات با غلظت باکتری رابطه معکوس داشته و با تغییر رنگ از قرمز به ارغوانی قابل تشخیص بود. رابطه‌ای خطی بین شدت رنگ و جمعیت باکتری‌ها به کمک روش رنگ‌سنجی مبتنی بر گوشی آیفون و مدل رنگی RGB در محدوده 10^4 CFU/ml 10^7 بدست آمد که می تواند به عنوان یک راه حل مقرون به صرفه برای کنترل کیفیت آب آشامیدنی لحاظ گردد (Huang et al., 2019).

۳-۴- ردیابی آنتی بیوتیک‌ها

ردیابی سریع باقی مانده‌های آنتی بیوتیک برای ایمنی مواد غذایی در زندگی روزمره بسیار مهم است. به منظور ردیابی و تعیین غلظت آنتی بیوتیک به طور آبی و بصری، برخی روش‌ها با استفاده از روش رنگ‌سنجی مبتنی بر گوشی هوشمند توسعه داده شده‌اند که از جمله آنها می توان به ردیابی کمی آنتی بیوتیک تترا سایکلین (Masawat et al., 2015)، سولفونامید (Ait Errayess et al., 2018) و استرپتومایسین (Lin et al., 2018) مبتنی بر مدل رنگی RGB اشاره نمود. در یک بررسی یک روش رنگ‌سنجی دیجیتال مبتنی بر آیفون به عنوان یک ابزار قابل حمل برای پایش تتراسایکلین در شیر گاو طراحی شد که قادر بود با اپلیکیشن ColorConc و استفاده از الگوریتم تطبیق تصویر، غلظت آنتی بیوتیک را در یک محلول تعیین می کند. در این روش، مقادیر رنگی شامل قرمز (R)، سبز (G)، آبی (B)، فام (H)، اشباع (S)، روشنایی (V) و خاکستری (Gr) از تصاویر محلول‌های استاندارد تتراسایکلین اندازه گیری شدند. سپس غلظت محلول آنتی بیوتیک استخراج شده از نمونه‌های شیر با مقایسه مقادیر رنگی مربوط به داده‌های محلول استاندارد تخمین زده شد (Masawat et al., 2015). در بررسی دیگری از روش رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال مبتنی بر گوشی آیفون برای ردیابی آنتی بیوتیک استرپتومایسین به کمک آپتامر اختصاصی آن استفاده شد. آپتامر استرپتومایسین به طور اختصاصی آنالیت را شناسایی کرده و مقدار اضافی آپتامر با DNA مکمل ترکیب شد تا DNA دو رشته‌ای تشکیل شود. سایر گرین (SYBR Green I) به dsDNA متصل و فلورسانس سبز واضحی منتشر می کند.

با افزایش غلظت استرپتومایسین، شدت فلورسانس کاهش می‌یابد. دوربین گوشی هوشمند تصاویر فلورسانس نمونه‌ها را ثبت کرده و اپلیکیشن Touch Color که روی گوشی نصب شده بود، مقادیر RGB را از تصاویر استخراج کرد. براساس نتایج، بین مقدار G (سبز) و غلظت استرپتومایسین در محدوده ۰٫۱ تا ۱۰۰ میکرومولار رابطه‌ای خطی مشاهده شد (شکل ۷) (Lin et al., 2018).



شکل ۷. ارتباط بین غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک‌هایی تتراسایکلین (سمت چپ) و اجزای مدل رنگی RGB و HSV و ارتباط کمی میزان شدت فلئورسنت و غلظت استرپتومایسین (سمت راست) (Lin et al., 2018).

۳-۵- ردیابی ترکیبات طبیعی

از روش رنگ‌سنجی مبتنی بر گوشی‌های هوشمند در ردیابی طیف وسیعی از ترکیبات طبیعی بهره‌برداری شده است که از جمله آنها می‌توان به تعیین غلظت کمی آلکالین فسفاتاز (ALP) به منظور کنترل کیفیت شیر خام (Mahato et al., 2019)، ارزیابی فعالیت مهارتی تیروزیناز^{۱۰} در عصاره‌های سالاک (Salacca zalacca) (Moonrungssee et al., 2018)، تعیین غلظت اتانول (Bock et al., 2018)، تعیین پروفایل هورمون استروئیدی تولیدمثل در زنان (Ogirala et al., 2017)، تعیین فعالیت بوتیریل کولین استراز^{۱۱} (Pohanka et al., 2015)، تعیین کمی آلبومین ادراری (Mathaweensansurn et al., 2017)، تخمین

¹⁰ Tyrosinase

¹¹ Butyrylcholinesterase

سن لکه خون (Choi et al., 2019)، تعیین اسید آسکوربیک در آبمیوه‌ها (Porto et al., 2019)، غلظت فورفورال^{۱۲} در محلول شکر نیشکر (Franco et al., 2017) و سنجش میزان قند خون (Devadhasan et al., 2015) اشاره نمود.

۴- پروتکل فنی اجرای روش رنگ‌سنجی نوین با گوشی هوشمند

به منظور طراحی یک روش رنگ‌سنجی دیجیتالی به کمک گوشی هوشمند همراه با هدف توسعه روش‌های ساده و قابل اجرا در محل، مراحل کلی انجام این فرایند در قالب یک مطالعه انجام شده در این زمینه با جزییات بیشتر شرح داده می‌شود. در این بررسی روش رنگ‌سنجی نوین با هدف غربال کمی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن به کمک روش رنگ‌سنجی نوین با موفقیت عملیاتی شده بود. ضرورت توسعه روش رنگ‌سنجی نوین برای این گروه از باکتری‌ها به دلیل پیچیدگی روش‌های آزمایشگاهی مرسوم در غربال سویه‌های باکتریایی تثبیت‌کننده نیتروژن یک ضرورت به شمار می‌آید. شایان ذکر است که تلاش برای کاهش مصرف کودهای شیمیایی نیتروژن‌دار باهدف توسعه کشاورزی پایدار منجر به اختصاص سهم ۷۰ درصدی کودهای زیستی تثبیت‌کننده نیتروژن در بازار جهانی کودهای میکروبی شده است اما پیچیدگی و هزینه بالای روش‌های مرسوم اندازه‌گیری تثبیت زیستی نیتروژن یکی از چالش‌های مهم در غربال سویه‌های باکتریایی دیازوتروف بوده که بویژه در کشور ما مانع از غربال سریع میکروارگانیسم‌های کاندید شده و متعاقباً منجر به کند شدن روند توسعه این قبیل کودهای زیستی شده است. غربال سویه‌های میکروبی تثبیت‌کننده نیتروژن به روش‌های مختلفی چون سنجش احیای استیلن، استفاده از ایزوتوپ نشان‌دار N¹⁵، روش کج‌دال^{۱۳} و کشت در محیط‌های عاری از نیتروژن انجام می‌شود. اگرچه روش‌های مذکور از دقت و حساسیت بالایی برخوردار هستند، اما نیاز به تجهیزات پیشرفته، نیروی متخصص و زمان بر بودن مراحل اجرای آزمایش مانع از کاربرد تکنیک‌های

¹² furfural

¹³ Kjeldahl

مذکور در سطح گسترده و در آزمایشگاه‌های مختلف و بویژه در محل شده است (Cordova-Rodriguez et al., 2022).

برای توسعه روش رنگ‌سنجی به منظور ردیابی و تعیین غلظت آنالیت مورد نظر، اولین مرحله انتخاب روش رنگ‌سنجی برای ردیابی مولکول هدف است. پس از استاندارد سازی روش مذکور در مقیاس آزمایشگاهی، منحنی استاندارد بر اساس غلظت آنالیت و شدت رنگ ترسیم می‌گردد. در مرحله بعد از محلول‌های استاندارد مربوط به غلظت‌های مختلف با شدت‌های رنگی مختلف به کمک گوشی هوشمند همراه عکسبرداری می‌شود. بسته به مدل رنگی مد نظر که به طور غالب RGB می‌باشد نرم افزار کمی سازی را بر روی گوشی هوشمند نصب کرده و شدت‌های رنگی به مقادیر کمی تبدیل می‌گردد. در آخرین مرحله، ترسیم منحنی استاندارد بر اساس بهترین آیت‌م مدل رنگی (R, G یا B) انجام و معادله خط حاصله مبنای محاسبه کمی/نیمه کمی غلظت مولکول هدف قرار می‌گیرد. مراحل ذکر شده با جزئیات بیشتر و با هدف غربال کمی باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن در زیر مورد اشاره قرار گرفته است.

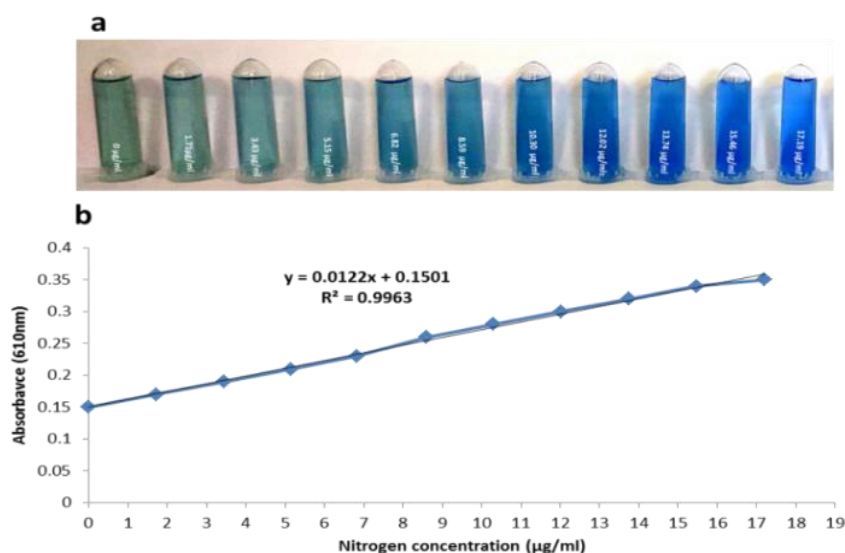
۴-۱- انتخاب روش رنگ‌سنجی برای غربال سویه‌های باکتریایی دیازوتروف

کشت سویه‌های باکتریایی در محیط‌های کشت عاری از نیتروژن (NFB) و حاوی معرف‌های رنگی چون برموتیمول بلو از جمله روش‌های آزمایشگاهی برای غربال سریع تعداد زیادی از سویه‌های باکتریایی دیازوتروف به شمار آمده که مبتنی بر تغییر رنگ این محیط‌ها از سبز به آبی می‌باشد. در این روش تجمع یون‌های آمونیوم به‌عنوان شاخص توانایی تثبیت نیتروژن منجر به تغییر pH و متعاقباً تغییر رنگ محیط کشت می‌گردد (Baldani et al., 2014). اخیراً از ویژگی تغییر رنگ محیط کشت عاری از نیتروژن برای توسعه یک روش ساده و دقیق به کمک اسپکتروفتومتری با هدف غربال سریع سویه‌های باکتریایی دیازوتروف استفاده شده است (Cordova-Rodriguez et al., 2022). با این وجود به دلیل نیاز به دستگاه اسپکتروفتومتر و کارشناس متخصص امکان بهره‌برداری از این روش طیف‌سنجی، برای بسیاری از آزمایشگاه‌ها و در محل مقرون به صرفه

نیست. باهدف یافتن جایگزین مناسب، کاربردی و کم‌هزینه از نتایج اسپکتروفتومتری برای توسعه یک روش‌های رنگ‌سنجی مبتنی بر گوشتی هوشمند استفاده گردید.

۴-۲- ترسیم منحنی استاندارد برای تخمین میزان کمی تثبیت نیتروژن

باهدف تعیین میزان کمی تثبیت نیتروژن در سویه باکتریایی از روش اسپکتروفتومتری و ارزیابی تغییرات میزان جذب محیط کشت NFB در غلظت‌های مختلف یون آمونیوم استفاده شد. به‌منظور ترسیم نمودار استاندارد (شکل ۸)، حجم‌های مختلفی از محلول هیدروکسید آمونیوم به هر لوله آزمایش اضافه و حجم نهایی توسط محیط کشت NFB به سه میلی‌لیتر رسانده شد به گونه‌ای که غلظت نهایی هیدروکسید آمونیوم در محدوده صفر تا ۱۲۳۰ میکرو مول قرار گرفت. سپس از هر لوله به میزان ۲۰۰ μl داخل چاهک ریخته و میزان جذب در ۶۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانش و pH هر لوله اندازه‌گیری شد (Cordova- Rodriguez et al., 2022).

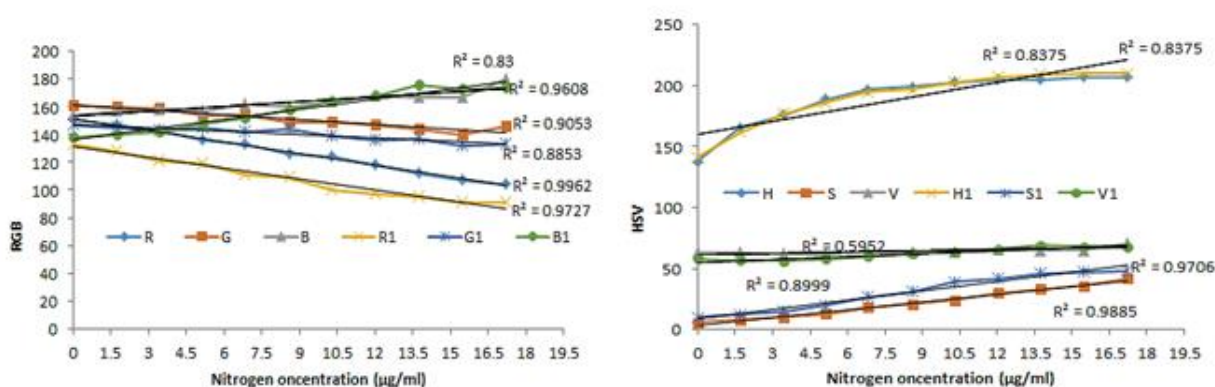


شکل ۸- تغییر رنگ محیط کشت NFB از سبز به آبی با افزایش تدریجی غلظت هیدروکسید آمونیوم (صفر تا ۱۲۳۰ میکرو مول) (a) ، منحنی استاندارد تثبیت کمی نیتروژن بر اساس غلظت نیتروژن ($\mu\text{g/ml}$) در برابر میزان جذب در طول موج ۶۱۰ نانومتر (b) (منبع: یافته‌های پروژه پژوهشی).

۴-۳- طیف‌سنجی با گوشی هوشمند مبتنی بر نرم‌افزار رنگ‌سنجی

به‌منظور تبدیل داده‌های حاصل از طیف‌سنجی با اسپکتروفتومتری متناسب با غلظت‌های مختلف نیتروژن، از نرم‌افزار رنگ‌سنجی و رایگان (Color Grab (Version 3.9.2 (C) 2021 Loomatix Ltd استفاده شد. در این برنامه از مدل‌های رنگی RGB (Red, Green, blue و HSV (Hue, saturation, brightness) استفاده می‌شود. پس از عکس‌برداری و تبدیل پیکسل‌های تصویر توسط برنامه به هرکدام از مدل‌های رنگی، از بهترین مدل خطی برای نوشتن معادله و تجزیه و تحلیل نتایج استفاده شد. برای تصویربرداری دیجیتال از دو سیستم باز و بسته استفاده شد. در سیستم باز فقط از تلفن همراه سامسونگ A73 مدل SM-A736B/DS، برای تصویربرداری استفاده گردید. مدل پردازنده گوشی مورد استفاده Qualcomm Snapdragon 778G 5G بود. حافظه داخلی و RAM گوشی همراه به ترتیب ۲۵۶ و ۸ گیگابایت و سایز صفحه نمایش ۶/۷ اینچ بود. گوشی مورد استفاده در این بررسی مجهز به چهار دوربین (۱۰۸ مگا پیکسل، ۱۲ مگا پیکسل، ۵ مگا پیکسل و ۵۰ مگا پیکسل) بود. در سیستم بسته برای تصویربرداری یک جعبه مقوایی مستطیل شکل به ابعاد $10 \times 17 \times 28$ (cm) ساخته و متناسب با اندازه گوشی جایگاه دوربین بر روی جعبه تعیین و سپس تصویربرداری انجام شد. میزان شدت نور با نرم افزار Lux Light Meter اندازه‌گیری شد و معادل ۲ برآورد گردید. فاصله دوربین از نمونه‌ها ۲۸ سانتی متر و منبع تامین نور در فضای بسته فلاشر نرم افزار Color Grab بود. داده‌های حاصل از نرم افزار میانگین داده‌های حاصل از سطح نمونه بود. پس از تصویربرداری از ویال‌های حاوی غلظت‌های مختلف هیدروکسید آمونیوم (در محدوده صفر تا ۱۲۳۰ میکرو مول)، شاخص‌های RGB و HSV برای غلظت‌های مختلف در دو سیستم باز و بسته اندازه‌گیری و منحنی استاندارد برای هر شاخص مبتنی بر غلظت نیتروژن در محیط کشت NFB ($\mu\text{g/ml}$) ترسیم شد. بررسی شیب نمودار در دو فضای باز و بسته برای شش شاخص مورد بررسی (R, G, B, H, S و V) نشان داد که در مقایسه با سایر آیتم‌ها شاخص S به دلیل دارا بودن مقادیر قابل قبولی

از R^2 در هر دو فضای باز و بسته (≥ 0.97) و مثبت بودن شیب منحنی می‌تواند کاندیدای مناسبی برای ترسیم منحنی استاندارد باشد. لذا آیتم مذکور به‌عنوان شاخص مناسب برای تخمین میزان کمی تثبیت نیتروژن معرفی شد. همچنین بر اساس نتایج، انجام ارزیابی در فضای بسته منتج به نتایج قابل قبول‌تر و منحنی استاندارد مناسب‌تری گردید که ناشی از حذف اثرات جانبی فاکتورهای محیطی تأثیرگذار است. باین‌حال در این پژوهش اندازه‌گیری آیتم‌های RGB و HSV در فضای باز نیز نتایج تقریباً مشابهی داشت که برای سهولت کاربری قابل توصیه است (شکل ۹).



شکل ۹- نمودار استاندارد حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های RGB (Red, green, و HSV (Hue, Saturation, Value) با نرم‌افزار Color grab. شاخص‌های Blue در دو فضای بسته و باز در برابر غلظت‌های مختلف نیتروژن ($\mu\text{g/ml}$) با نرم‌افزار Color grab. شاخص‌های اندازه‌گیری شده در فضای باز با اندیس یک مشخص شده‌اند (منبع: یافته‌های پروژه پژوهشی).

۴-۱- اعتبار سنجی رنگ‌سنجی نوین در غربال نیمه کمی سویه‌های باکتریایی دیازوتروف

به منظور تایید صحت و دقت روش رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال مبتنی بر گوشی هوشمند، از جدایه باکتریایی دیازوتروف *Azotobacter chroococcum* CCSM-B00475 به عنوان سویه استاندارد استفاده شد. سویه مذکور با توان تثبیت نیتروژن از کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور دریافت و در این بررسی مورد استفاده قرار گرفت. باهدف ارزیابی توان تولید آمونیوم و تثبیت نیتروژن از روش کشت در محیط

کشت NFB حاوی معرف رنگی برموتیمول بلو استفاده شد. به این منظور ۱۰۰ میکرو لیتر از کشت ۲۴ ساعته سویه باکتریایی در محیط Nutrient Broth (OD600nm=0.4) به محیط کشت NFB تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و دور 180 rpm نگهداری شد. سپس سوسپانسیون باکتری با دور 5000 rpm سانتریفیوژ و میزان جذب مایع رویی در ۶۱۰ نانومتر خوانش شد (Baldani et al., 2014). همچنین با استفاده از نرم افزار Color Grab، آیتم S برای تصویر دیجیتالی ثبت شده از محیط کشت سویه باکتریایی مورد ارزیابی، اندازه گیری گردید. میزان تثبیت نیتروژن در سویه استاندارد با دو روش طیف سنجی و رنگ‌سنجی نوین به ترتیب معادل ۵/۸۳ و ۵/۳۳ $\mu\text{g/ml}$ تخمین زده شد که موید صحت و دقت بالای روش توسعه یافته برای غربال نیمه کمی باکتری های دیازوتروف بود.

۵- چشم‌انداز رنگ‌سنجی تصویر دیجیتالی با گوشی‌های هوشمند

تشخیص و اندازه‌گیری غلظت ترکیبات شیمیایی هدف، از چالش‌های کلیدی در تحقیقات شیمی به شمار آمده و این مسئله هنگام نیاز به توسعه روش‌های ساده، سریع و ارزان برای تشخیص آلاینده‌های زیست محیطی و مرتبط با سلامت انسان بیشتر خودنمایی می‌کند (Butler et al., 2006).

آزمایش در محل^{۱۴} به عنوان یک روش سریع و ساده برای تشخیص آنالیت مورد نظر در نمونه‌ها با استفاده از یک دستگاه قابل حمل در مکان نمونه‌گیری شناخته می‌شود که به دلیل انجام آزمایشات در محل، زمان و هزینه آزمایش به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. بنابراین، این روش در زمینه‌های مختلف مانند تشخیص بالینی، ایمنی مواد غذایی، آزمایشات محیطی و غیره توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در میان روش‌های مختلف که برای انجام آزمایش در محل توسعه یافته‌اند، رایج‌ترین روش، رنگ‌سنجی بصری سنتی است (Kim et al., 2017) که در آن نمونه‌ها با چشم و از طریق مقایسه شدت رنگ تشخیص داده می‌شوند. اگر چه سادگی و عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته از جمله مزایای این روش به شمار می‌آید اما به دلیل وابستگی

¹⁴ On site detection

به تشخیص رنگ با چشم انسان، این روش دقت و حساسیت پایینی دارد. اخیراً، رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال به عنوان یک روش جدید در رنگ‌سنجی مطرح شده است که شامل دو فرآیند دریافت تصویر و خوانش رنگ به کمک اپلیکیشن‌های رنگ‌سنجی است. از آنجا که داده‌ها در رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال توسط نرم‌افزار پردازش تصویر ارائه می‌شوند، تأثیر تشخیص با چشم غیرمسلح کاهش یافته و دقت نتایج تشخیص به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. به دلیل عملکرد عالی در عکسبرداری، وجود نرم‌افزارهای مختلف پردازش تصویر و قابلیت حمل بالا، گوشی هوشمند به عنوان بهترین ابزار برای دریافت تصاویر در نظر گرفته می‌شود. تحلیل تصویر در رنگ‌سنجی تصویر دیجیتال عمدتاً بر اساس فضای رنگی RGB انجام می‌شود که به نظر می‌رسد با کاربرد گسترده فضای RGB در محصولات دیجیتال و تولیدات صنعتی مرتبط باشد (Mei et al., 2016).

استفاده گسترده از گوشی‌های هوشمند، توان پردازشی بالای آن‌ها و فراگیری آن‌ها در میان مردم، موجب پیشرفت قابل توجهی در توسعه رنگ‌سنجی تصاویر دیجیتال مبتنی بر گوشی‌های هوشمند شده است. در این میان قابلیت ارتباط نتایج حاصل از تشخیص‌های مبتنی بر کاغذ (مانند نوارهای تست کاغذی) و تراشه‌های میکروفلوئیدیک¹⁵ با نرم‌افزارهای رنگ‌سنجی در گوشی‌های هوشمند به‌طور فزاینده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند که به توسعه این تست‌ها جهت کاربرد در محل و اشتراک گذاری نتایج کمک شایانی نموده است (Porto et al., 2019).

در کنار همه مزایای تکنیک رنگ‌سنجی تصاویر دیجیتال بر روی گوشی‌های هوشمند، بیشتر مطالعات منتشرشده در حال حاضر نشان داده‌اند که روش مذکور همچنان نیازمند بهبود هستند تا به یک ابزار تحلیلی قوی و قابل اعتماد تبدیل شود. با هدف افزایش قدرت رقابت اپلیکیشن‌های گوشی هوشمند با دستگاه‌های کالیبره‌شده مجهز به منابع نوری استاندارد و پایدار لازم است کیفیت اجزای اپتیکی دوربین‌های تعبیه‌شده در گوشی‌های هوشمند بهبود یابد تا ثبات شرایط برای ثبت تصویر افزایش یابد. علاوه بر این، اجزای اپتیکی

¹⁵ Microfluidics

مانند لنزهای ماکرو، فیلترها و فیبرهای نوری معمولاً برای بیشتر گوشی‌های هوشمند موجود نیستند و در صورت نیاز باید برای هر هدف خاص تولید شوند. همچنین ضرورت دارد تا یکسان بودن میزان نور برای یکنواختی رنگ کنترل شود چرا که نورپردازی یکی از عوامل کلیدی برای یک فرایند تحلیلی قابل اعتماد است. در حال حاضر، بسیاری از تحقیقات منتشر شده گزارش داده‌اند که نورپردازی کنترل شده می‌تواند با استفاده از یک اتاق کنترل شده در گوشی‌های جدید به دست آید. علاوه بر این، در مورد دوربین گوشی هوشمند، کاربر می‌تواند دوربین را از طریق برخی از پارامترها مانند شدت نور، روشنایی، فیلترها و غیره کنترل کند تا شرایط نوری برای ثبت تصاویر بهینه شود. نورپردازی یکسان با هندسه کنترل شده و منابع نوری مناسب می‌تواند رنگ‌سنجی تصاویر دیجیتال بر روی گوشی هوشمند را به یک فرایند تحلیلی قوی و قابل اعتماد تبدیل کند. از دیگر موارد مهم در این زمینه انتخاب معرف رنگی مناسب برای ردیابی و تعیین دقیق غلظت آنالیت مورد نظر می‌باشد. برای دستیابی به نتایج قابل اعتماد، نه تنها به دستگاه‌های پیشرفته و با ثبات برای ثبت تصاویر نیاز است، بلکه معرف‌های کروموژنتیک باید تکرارپذیر، پایدار، حساس و کم‌هزینه باشند. زمانی که آنالیت با معرف کروموژنتیک انتخاب شده واکنش می‌دهد، محصولات واکنش باید به طور یکنواخت در ناحیه تشخیص پخش شوند تا انتخاب‌پذیری را افزایش داده و حساسیت را بهبود ببخشند (Fan et al., 2020).

قابلیت حمل و گسترش استفاده از گوشی‌های هوشمند، استفاده گسترده از تصاویر دیجیتال و توسعه اپلیکیشن‌های گوشی‌های هوشمند فرصت‌های جدیدی را برای توسعه روش‌های نوین رنگ‌سنجی فراهم نموده است که قابلیت آنالیز سریع، کم‌هزینه و در محل برای تحلیل‌های کیفی و کمی فلزات/فلزات سنگین، علف‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، نشانگرهای بیوشیمیایی، ترکیبات طبیعی و باکتری‌ها/ویروس‌ها فراهم کرده است. با توجه به روند رو به رشد این حوزه جدید و پرکاربرد در فناوری‌های زیستی ضرورت انجام پژوهش‌های بیشتر در داخل کشور با هدف توسعه این تکنولوژی در زمینه‌های مختلف پزشکی، کشاورزی، صنایع غذایی و محیط زیست بیش از پیش محرز می‌گردد.

- Ait Errayess S, Idrissi L and Amine A. 2018. Smartphone-based colorimetric determination of sulfadiazine and sulfasalazine in pharmaceutical and veterinary formulations. *Instrumentation Science & Technology* 46(6): 656-675.
- Baldani JI, Reis VM, Videira SS, Boddey LH and Baldani VL. 2014. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and soil* 384: 413-431.
- Bock FC, Helfer GA, da Costa AB, Dessuy MB and Ferrão MF. 2018. Rapid determination of ethanol in sugarcane spirit using partial least squares regression embedded in smartphone. *Food Analytical Methods* 11: 1951-1957.
- Capitán-Vallvey LF, Lopez-Ruiz N, Martinez-Olmos A, Erenas M M and Palma AJ. 2015. Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review. *Analytica Chimica Acta* 899: 23-56.
- Choi W, Shin J, Hyun KA, Song J and Jung HI. 2019. Highly sensitive and accurate estimation of bloodstain age using smartphone. *Biosensors and Bioelectronics* 130: 414-419.
- Choodum A, Kanatharana P, Wongniramaikul W and NicDaeid N. 2012. Rapid quantitative colourimetric tests for trinitrotoluene (TNT) in soil. *Forensic science international* 222(1-3): 340-345.
- Cordova-Rodriguez A, Rentería-Martínez M, López-Miranda C, Guzmán-Ortíz J and Moreno-Salazar S. 2022. Simple and sensitive spectrophotometric method for estimating the nitrogen-fixing capacity of bacterial cultures. *MethodsX* 9: 101917.
- Costa GB, Fernandes DDS, Almeida VE, Araújo TSP, Melo JP, Diniz PH and Vêras G. 2015. Digital image-based classification of biodiesel. *Talanta* 139: 50-55.
- Devadhasan JP, Oh H, Choi CS and Kim S. 2015. Whole blood glucose analysis based on smartphone camera module. *Journal of biomedical optics* 20(11): 117001-117001.
- Fan Y, Li J, Guo Y, Xie L, Zhang G. 2021. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. *Measurement* 171: 108829.
- Firdaus ML, Alwi W, Trinoveldi F, Rahayu I, Rahmidar L and Warsito K. 2014. Determination of chromium and iron using digital image-based colorimetry. *Procedia Environmental Sciences* 20: 298-304.
- Fu LM, Liu CC, Yang CE, Wang YN and Ko CH. 2019. A PET/paper chip platform for high resolution sulphur dioxide detection in foods. *Food chemistry* 286: 316-321.
- Guo J, Wong JX, Cui C, Li X and Yu HZ. 2015. A smartphone-readable barcode assay for the detection and quantitation of pesticide residues. *Analyst* 140(16): 5518-5525.
- Hong JI and Chang BY. 2014. Development of the smartphone-based colorimetry for multi-analyte sensing arrays. *Lab on a Chip* 14(10): 1725-1732.

Huang J, Sun J, Warden AR and Ding X. 2020. Colorimetric and photographic detection of bacteria in drinking water by using 4-mercaptophenylboronic acid functionalized AuNPs. *Food Control* 108: 106885.

Kanchi S, Sabela MI, Mdluli PS and Bisetty K. 2018. Smartphone based bioanalytical and diagnosis applications: A review. *Biosensors and Bioelectronics* 102: 136-149.

Kaoutit H, Estévez P, García FC, Serna F and García J. M. 2013. Sub-ppm quantification of Hg (II) in aqueous media using both the naked eye and digital information from pictures of a colorimetric sensory polymer membrane taken with the digital camera of a conventional mobile phone. *Analytical Methods* 5(1): 54-58.

Khairy GM and Duerkop A. 2019. Dipsticks and sensor microtiterplate for determination of copper (II) in drinking water using reflectometric RGB readout of digital images, fluorescence or eye-vision. *Sensors and Actuators B: Chemical* 281: 878-884.

Kuehni RG. 2003. *Color Space and Its Divisions*.

Kumar A, Bera A and Kumar S. 2020. A smartphone-assisted sensitive, selective and reversible recognition of copper ions in an aqueous medium. *ChemistrySelect* 5(3):1020-1028.

Lin B, Yu Y, Cao Y, Guo M, Zhu D, Dai J and Zheng M. 2018. Point-of-care testing for streptomycin based on aptamer recognizing and digital image colorimetry by smartphone. *Biosensors and Bioelectronics* 100: 482-489.

Long KD, Woodburn EV, Le HM, Shah UK, Lumetta SS and Cunningham BT. 2017. Multimode smartphone biosensing: the transmission, reflection, and intensity spectral (TRI)-analyzer. *Lab on a Chip* 17(19): 3246-3257.

Mahato K and Chandra P. 2019. based miniaturized immunosensor for naked eye ALP detection based on digital image colorimetry integrated with smartphone. *Biosensors and Bioelectronics* 128: 9-16.

Masawat P, Harfield A and Namwong A. 2015. An iPhone-based digital image colorimeter for detecting tetracycline in milk. *Food chemistry* 184: 23-29.

Mathaweensurn A, Maneerat N and Choengchan N. 2017. A mobile phone-based analyzer for quantitative determination of urinary albumin using self-calibration approach. *Sensors and Actuators B: Chemical* 242: 476-483.

Mei S, Yuan X, Ji J, Zhang Y, Wan S and Du Q. 2017. Hyperspectral image spatial super-resolution via 3D full convolutional neural network. *Remote Sensing* 9(11): 1139.

Moonrungssee N, Peamaroon N, Boonmee A, Suwanchaoen S and Jakmunee J. 2018. Evaluation of tyrosinase inhibitory activity in Salak (*Salacca zalacca*) extracts using the digital image-based colorimetric method. *Chemical Papers* 72: 2729-2736.

Ogirala T, Eapen A, Salvante K G, Rapaport T, Nepomnaschy PA and Parameswaran AM. 2017. Smartphone-based colorimetric ELISA implementation for determination of women's reproductive steroid hormone profiles. *Medical & biological engineering & computing* 55: 1735-1741.

Papadakis SE, Abdul-Malek S, Kamdem RE and Yam KL. 2000. A versatile and inexpensive technique for measuring color of foods. *Food technology (Chicago)* 54(12): 48-51.

- Pohanka M, Zakova J and Sedlacek I. 2018. Digital camera-based lipase biosensor for the determination of paraoxon. *Sensors and Actuators B: Chemical* 273: 610-615.
- Porto IS, Neto JH S, dos Santos LO, Gomes AA and Ferreira SL. 2019. Determination of ascorbic acid in natural fruit juices using digital image colorimetry. *Microchemical Journal* 149: 104031.
- Shen L, Hagen JA and Papautsky I. 2012. Point-of-care colorimetric detection with a smartphone. *Lab on a Chip* 12(21): 4240-4243.
- Sicard C, Glen C, Aubie B, Wallace D, Jahanshahi-Anbuhi S, Pennings K and Filipe CD. 2015. Tools for water quality monitoring and mapping using paper-based sensors and cell phones. *Water research* 70: 360-369.
- Son SU, Seo SB, Jang S, Choi J, Lim JW, Lee DK and Lim EK. 2019. Naked-eye detection of pandemic influenza a (pH1N1) virus by polydiacetylene (PDA)-based paper sensor as a point-of-care diagnostic platform. *Sensors and Actuators B: Chemical* 291: 257-265.
- Sumriddetchkajorn S, Chaitavon K and Intaravanne Y. 2014. Mobile-platform based colorimeter for monitoring chlorine concentration in water. *Sensors and Actuators B: Chemical* 191: 561-566.
- Tkalcic M and Tasic JF. 2003. Colour spaces: perceptual, historical and applicational background (Vol. 1, pp. 304-308). IEEE.
- Wang Y, Zeinhom MM, Yang M, Sun R, Wang S, Smith JN and Du D. 2017. A 3D-printed, portable, optical-sensing platform for smartphones capable of detecting the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Analytical chemistry* 89(17): 9339-9346.
- Woelk F, Schiller I and Koch R. 2005. An airborne bayesian color tracking system. In *IEEE Proceedings. Intelligent Vehicles Symposium, 2005.* (pp. 67-72). IEEE.
- Wongthanyakram J and Masawat P. 2019. Rapid low-cost determination of lead (II) in cassava by an iPod-based digital imaging colorimeter. *Analytical Letters* 52(3): 550-561.
- Wu TH, Chang CC, Vaillant J, Bruyant A and Lin, C. W. 2016. DNA biosensor combining single-wavelength colorimetry and a digital lock-in amplifier within a smartphone. *Lab on a Chip* 16(23): 4527-4533.