

RGB 画像解析法による大腸菌濃度の迅速定量法の開発

小山工業高等専門学校 物質工学科 反応工学研究室 5年

太田 結月(おおた ゆづき)

【概要】本研究は、振とう培養中の大腸菌(K-12 株)の増殖を安価・リアルタイム・定量的に計測する装置の開発を行っている。この装置は、一定の照度条件下で振とう培養中の大腸菌のフラスコ底部から定期的に撮影し、Wi-Fi で画像データ転送後に自動解析することが可能である。本発表では、増殖中の大腸菌の画像から得られた RGB 値の解析結果と濁度との相関性について報告する。

【栃木を元気にするには】本研究で作製した装置は、溶液中の細菌含有溶液を撮影後、迅速に RGB 法で画像解析を行い、濃度把握が可能なシステムである。この装置の利点は、小型・安価でありリアルタイムで溶液中の細菌濃度の定量的な計測を行うことが可能である。従って、県内の河川や水道水中の細菌(大腸菌群など)数の調査に貢献できる技術である。

1. はじめに

細菌の濃度を測定する手法は様々な方法がある。一般にオフライン型は測定が簡便であるが、手間や時間を要する。オンライン型は迅速かつ定量性が高いが、機器が高価であるという問題がある。オフライン型の代表的な例である濁度法は、細胞が増殖するにつれて濁度を増す培養液を分光光度計に入れ、その散乱度によって濃度を相対的に把握する方法である。この方法は測定装置(やや高価)が簡便であるため多用されているが、細菌数を直接示す値ではなく、相対値であるため定量性を得るには測定する菌株の細胞数と濁度の関係を示す検量線をあらかじめ作成しておく必要がある。続いてオンライン測定法の代表例としてフローサイトメトリーがある。フローサイトメトリー法は、細胞を水流に乗せて1個ごとに測定できる蛍光測光法である。迅速的、定量的な測定が可能であるが、装置が非常に高額であるという欠点も存在する。おもに、DNA 量の測定による細胞周期解析と抗体による細胞表面マーカー解析に用いられている。本研究ではこれらの問題を解決するため小型コンピューターである Raspberry Pi を用いた画像撮影により、安価かつ簡便なオンライン型細菌濃度測定法の開発を目的とした。

2. 実験方法

本研究ではモデル細菌として大腸菌 (*Escherichia coli* K-12 株) を使用した。培地は LB 培地を使用し、画像撮影時は、500mL の三角フラスコを用いた。作製・改良中の装置を図1に示した。撮影のタイミングなどの制御には、安価なシングルボードコンピューターである Raspberry Pi (Raspberry Pi 3 Model B Rev 1.2)を使用した。我々の使用した Raspberry Pi は、OS として無料 OS である Ubuntu 18.04.5 LTS armv7l をインストール後、実行環境として Python 3.8.0 (パイソン) を設定している。振とう中のフラスコを底部から撮影するカメラとして、Raspberry Pi Camera Module V2.1 を使い、30分ごとに培養液の画像を撮影する設定である。また、撮影した画像は学内の Wi-Fi を通じ、画像保存用 PC (Mac OS 10.15.6) にデータを転送した後に RGB 解析を実施している。撮影時には光量を一定にする必要があるため、装置全てをブラックボックス内に入れ、明るさを一定にするため、LED ビデオライト(amaran200x)による光の供

給, 更に光拡散布(Neewer 社製, ナイロン製, シルクホワイト色, 撮影時に光を拡散/軟化し, 反射や影を排除する布)を用いた。更に撮影時の画像のブレを防ぐために、サーボモータ(SG90)による電源制御を外部のコンセント部分に導入し、Raspberry Pi に新たに撮影を行う 10 秒前にサーボモータを作動させる内容を設定した。

1. LED ビデオライト
2. 光拡散布
3. 三角フラスコ
4. ブラックボックス
5. Web カメラ
6. 振とう機
7. Raspberry Pi
8. 送風機

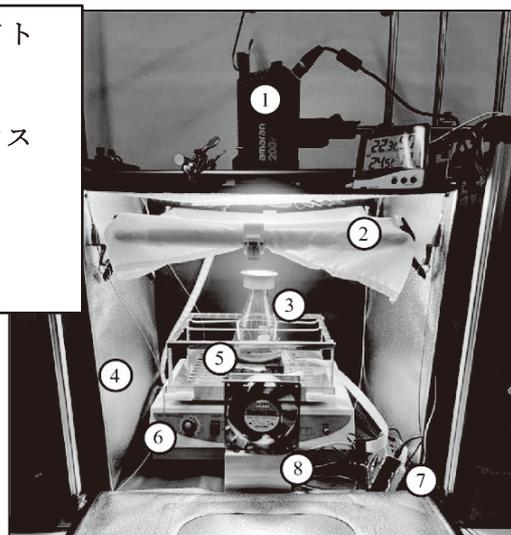


図 1 画像撮影装置
(撮影のため正面を開いている)

3. 現在までの結果

本研究では RGB 画像解析における撮影条件として、照度条件と色温度に焦点を当て実験を行なった。前年度までの結果として、最適な照度条件が 20000 [lx]であることが判明している。今年度はまず照度条件を最大の 56000 [lx]で固定し、色温度の条件として 2700K、3000K、3500K、4000K、4500K、4600K、5000K、5500K、6000K、6500K のパターンで実験を行なった。その結果、2700K で測定したものが最も輝度の変化が大きくなった。

図 2 に 169 [px] × 342 [px] のサイズで画像の全画素を読み出し、RGB 値及び Gray 値について画素の解析を行った時間経過による輝度の変化を示した。RGB 値はカラー画像中の Red、Green、Blue の 3 色の輝度をそれぞれ 0~255 の 256 段階で評価し、Gray 値は画像を白黒にした際の黒色から白色を同様に 0~255 の 256 段階で評価した値である。この図より、Blue 値の変化量が一番多かったことから、以後の解析には Blue 値を用いた。大腸菌は一般的に「誘導期、遅滞期 (菌数が一時的に減少する)」、「対数増殖期 (菌数が指数関数的に増殖する)」、「静止期(見かけ上菌数が一定になる)」、「死滅期(菌数が減少する)」の 4 つのパターンに分けられる。従って、これらのパターンについて、Blue 値で解析を実施したところ、以下の式(1)~(3)のように示された。その結果、細菌が誘導期において死滅すると輝度が一時的に上昇し、その後の対数増殖期では急激な輝度の減少が観察されることが判明した。尚、今回の実験では死滅期(おそらく 24 時間以降)については計測が実施できていなかったため、今後実験を行う。同時に、昨年度得られた最適な照度条件 20000 [lx] についても同様の実験を実施する。

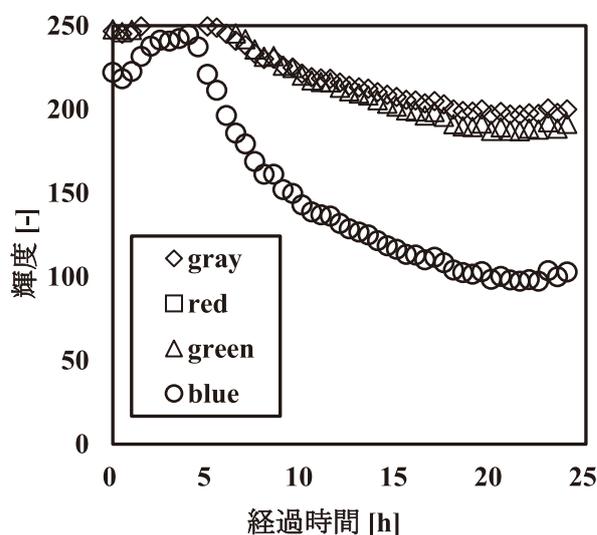


図 2 時間経過による輝度の変化

$$\text{誘導期}(0\sim 4 \text{ 時間}) : \text{輝度} = 7 \times \text{時間} + 218 \quad (1)$$

$$\text{対数増殖期}(4\sim 12 \text{ 時間}) : \text{輝度} = -14 \times \text{時間} + 285 \quad (2)$$

$$\text{静止期}(12\sim 24 \text{ 時間}) : \text{輝度} = -3 \times \text{時間} + 157 \quad (3)$$

【謝辞】本研究は、電気電子創造工学科の小林康浩教員のご協力を受けて実施されたものです。感謝いたします。