

大腸菌濃度のリアルタイム計測におよぼす 振とう機動作の影響

田中 孝国^{*1}, 伊藤 康太^{*2}, 出川 強志^{*3}, 西原 悠輔^{*4}, 小林 康浩^{*5}

Effect of shaking movement to real-time measurement of E. coli concentration

Takakuni TANAKA, Kota ITOU, Tsuyoshi DEGAWA,
Yusuke NISHIHARA and Yasuhiro KOBAYASHI

As for the concentration of various cells, the turbidity measurement method by the spectrophotometer is used generally, but problem increase in the price of buying cost. In this report, growth of Escherichia coli with/without shaking unit was photographed by Raspberry Pi (with camera unit) and made data transmission by Wi-Fi and was considered about technique to carry out RGB analysis so far. As a result, when shaking unit was stopped, it was revealed between growth of Escherichia coli and RGB analysis result. The range of error was decreased and became accurately about RGB analysis.

KEYWORDS : Raspberry Pi, cell concentration, RGB, Image analysis

1. まえがき

簡易的な細菌濃度の測定手法として、分光光度計による濁度法や培養液を乾燥させて重量を測定する乾燥菌体法、寒天培地上に細菌を含んだ溶液を塗布し、後日コロニーを計測する手法などがある¹⁾。これらの手法は簡便である一方で、特定細菌の検出や正確な細菌数の計測が難しい、迅速性

に欠ける、オンライン計測が難しい(サンプリング時に人の手による無菌操作が必要)、測定に必須の分光光度計が高額になりつつある、という欠点がある。近年、迅速性および定量性に着目した手法として、複合細菌叢内の特定細菌が検出可能なリアルタイム PCR 法、溶液中の細菌の個数を計測できるフローサイトメトリー法などが開発された^{1,2)}。これらの手法はリアルタイムで定量性の高いデータが得ることが可能である。その一方で、測

*1 物質工学科(Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering), E-mail: tanakatakakuni@oyama-ct.ac.jp

*2 物質工学科 令和 2 年度卒業生 (Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering)

*3 技術室(Technical Office)

*4 電気電子創造工学科 令和 2 年度卒業生(Dept. of Innovative Electrical and Electronic Engineering)

*5 電気電子創造工学科 (Dept. of Innovative Electrical and Electronic Engineering)

定機器のある程度の習熟が必要なこと、必要な試薬・購入・維持経費が高価である、などの問題点が残されたままである¹²⁾。

現在我々は、安価・迅速・オンライン・簡便化する手法として、培養中の状態の画像を撮影し、画像解析を行う手法について検討している^{3,4)}。測定対象としては、振とう機に設置したフラスコであり、フラスコ内の細菌を時間ごとに取り出さずに(サンプリングせずに)、定量的に濃度を把握する装置の作製を目指している。まず、装置の動作を制御する小型PCとしてRaspberry Piを導入した撮影装置を考案した。振とう機にカメラを取り付け、大腸菌を入れたフラスコを下部から撮影することで培養中の画像を得る手法である。続いて、撮影した増殖中の大腸菌画像の解析法について検討した。画像の色調の変化を定量的に把握する手法としてRGBによる解析法がある。この手法は、撮影で得られたカラー画像をGray値及びRGB(Red, Green, Blue)値に数値変換し、各要素の濃度を0-255の範囲で輝度として数値化する手法である⁵⁾。そのため、画像データを取得できれば、分析機器等は必要なく、画像データの変化を定量的に示すことが期待されることから採用した。これまでの結果より、装置作製のコストの面では、PC及びWi-Fi環境下であれば、本測定装置は総額10,000円程度で作製可能であること、また増殖画像をリアルタイムにRGB法による解析を実施することにより、大腸菌の増殖傾向が追跡可能であることが判明した³⁾。その一方で、振とう機が動作中そのまま培養画像を撮影したことから、フラスコの揺れが原因と考えられる不鮮明な画像を得ることがあった。この不鮮明な画像はRGB解析を実施すると誤差範囲を大きくするという問題を示していた⁴⁾。

本報告では、撮影時に振とう機を一時停止させることでフラスコ内部の揺れを抑制し、鮮明な画像を得ることを目的として装置の改良を実施した。そして、揺れがある場合と無い場合について、RGB解析の比較を行い、誤差範囲におよぼす揺れの影響について知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2.1 撮影装置概要

安価なシングルボードコンピュータであるRaspberry Pi (Raspberry Pi 3 Model B Rev 1.2)を使用した⁶⁾。また、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)⁷⁾を設定した。振とう中の大腸菌(E. coli K12株, LB培地)を使用, 100 rpmで使用溶液の入った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を用い、1時間ごとに培養液の画像を撮影した。撮影した画像は、学内のWi-Fiを通じて、画像保存用PC(Mac OS 10.15.6)にデータを転送した後、RGB解析を実施した。また、撮影時の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、LED光源による光の供給を実施した(図1)。また、光拡散布(Newer社製、ナイロン製、シルクホワイト色、撮影時にこの布を通すことで光を拡散・軟化し、撮影画像に写りこむ反射や影を排除する)を用いた(図2)^{3,4)}。

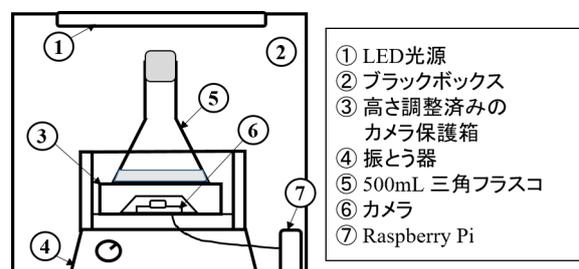


図1 振とう機及びカメラ部分のイメージ図

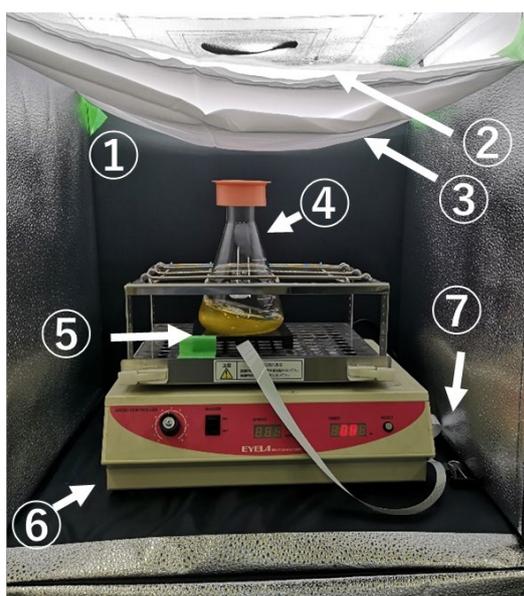


図2 振とう機及び撮影装置

図中の光拡散布は、見やすくするために弛ませてあるが、通常使用時はLED電球を隠すように張っている状態である。

① 撮影ボックス、② LED電球、③ 光拡散布、④ 大腸菌溶液の入った500mLの三角フラスコ、⑤ カメラモジュール、⑥ 振とう機、⑦ Raspberry Pi

2. 2 サーボモータによる振とうの自動制御

振とうの揺れによる撮影画像への影響を調査するため、振とう機のON/OFFを自動で切り替えることを目的にサーボモータ(SG90、位置/速度を制御)を導入した。振とう機をOFFにする場合、撮影を行う10秒前にサーボモータを動作させ、振とう機を停止させた。尚、設定した10秒は振とう機を停止させてから液面が安定するのに要する時間である。撮影後は再び振とう機を動作させ、振とう培養を再開した。そして、サーボモータを使用しない結果と比較して関係性について調査した。図3に振とう機の電源および取り付けたサーボモータ(矢印の装置がサーボモータであり、一定の角度だけ回転することで電源のON/OFFを切り替える)を示した。

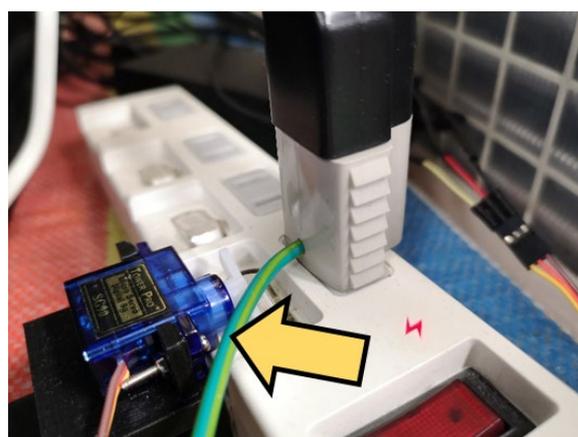


図3 サーボモータ

2. 3 撮影画像の転送および解析法

前述した通り、Webカメラにより撮影された画像は、Raspberry Piから学内Wi-Fiを通じることでサーバーに撮影ごとに送られる。また、サーバーに送られた画像は169px×342pxのサイズで画像の全画素を読み出し、RGB値およびGray値の解析を行った。尚、RGB値はカラー画像、Gray値は白黒画像から得られるもので、撮影されたカラー画像をグレースケール画像へ変換することで得ている。それぞれ0~255の256段階で評価した(輝度)。白黒画像は値が大きいくほど白、値が小さいほど黒が強い結果となる⁸⁾。

3. 結果および考察

3. 1 吸光度と経過時間の関係性

まず、画像解析による細菌濃度測定と比較対象として行った濁度法(O.D.660)の結果を図4に示した。図4より、本研究で実施した大腸菌の培養実験条件では、培養開始初期は増殖を示す吸光度の変化量が少なく、開始4時間以降に増殖を開始し、対数増殖期を示すことが判明した。尚、吸光度が0.6を超えた場合、測定値が0.2~0.6に入るように蒸留水で希釈を行ってから測定した²⁾。

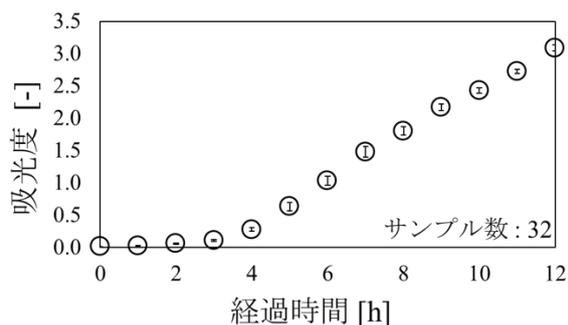


図4 分光光度計を用いて測定した大腸菌増殖の経時変化

3. 2 振とう機 ON/OFF 条件による画像の違い

続いて、画像撮影時の振とうの有無による画像の比較を行った。図5の画像より、振とう機 ON の場合は、中央のフラスコのゴム栓が不明瞭、振とう機 OFF の場合は、ゴム栓が明瞭に観察されることが判明した。一般に、画像解析に用いる画像は、明瞭であるほど精度が高いため、撮影時に振とう操作を止める手法は有効であることが示唆された。

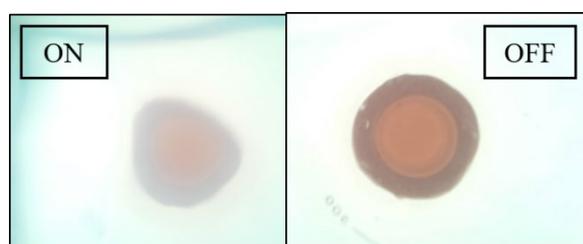


図5 撮影データ (ON:振とう機 ON で動作中に撮影、OFF:振とう機 OFF で停止させて撮影)

3. 3 吸光度と経過時間の関係性

サーボモータを用いて振とう機の電源を操作することで、撮影時の振とうの有無による画像解析結果の違いについて比較した。尚、本実験における RGB 値および Gray 値の各要素は同じ挙動を示すことが確認されているため^{3,4)}、本稿では RGB 値から得られる Gray 値(輝度)のみで評価を実施した。図6から図8に、光拡散布の各枚数における振とう有り無しの結果を示した。振とうした状態で撮影を行った(振とう機 ON) 結果に対して、振とうを停止させて撮影を行った(振とう機 OFF) 結果の方が、標準偏差が小さくなる傾向が培養開始初期で顕著に表れた。尚、照度を3段階

に変化させても同様の傾向が見られた。一般に、溶液に対して振とう操作を行うと、気泡の発生や揺れが生じ、溶液の量が異なる事象が発生する。この液量は輝度にも影響をおよぼす。これらの事由から、動作中のフラスコ内の溶液の高さを一様にし、撮影を行うことが必要である。今回、振とうを停止し、フラスコ内の液面を一定にして画像撮影を実施したことは有効な動作であったことが示唆された。

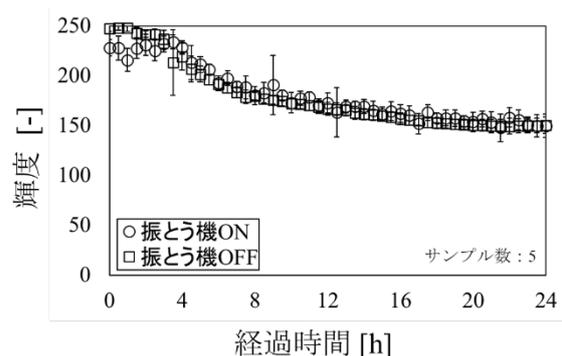


図6 振とう機の ON/OFF の違いによる輝度への影響 (8000ルクス時)

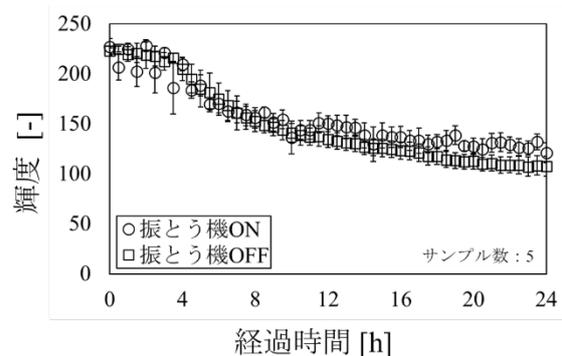


図7 振とう機の ON/OFF の違いによる輝度への影響 (6000ルクス時)

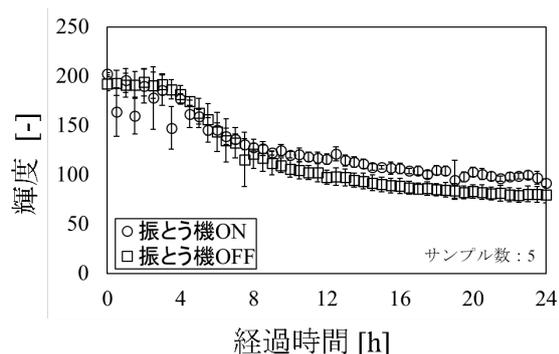


図8 振とう機のON/OFFの違いによる輝度への影響 (4000ルクス時)

振とうにより輝度がばらつく原因として、光が物体で反射される際の性質について考える必要がある。物体における反射は、正反射と拡散反射があり、表面が平らな場合、光は一定の方向へ反射される(本研究では振とう機 OFF 状態の液面と仮定した)。正反射する確率はフレネルの公式により、光の入射角度、偏光状態、媒質の屈折率に依存する。表面に凹凸がある場合の反射角(本研究では振とう機 ON 状態の液面と仮定)は、入射点の法線方向(曲線または表面上の位置に直行する、実際には存在しない線)を考慮する必要がある⁹⁾。更に溶液は光の内部拡散もあり、その拡散も考慮しなければいけない。そのため、今回振とう機を停止させたことで、内部拡散も抑制されたことから値のばらつきが改善されたと考えられた。

4. あとがき

細菌濃度を定量的に把握するにあたり、オンライン化や低コスト化などは重要事項である。本報告では、より定量的な把握を可能にするために、画像撮影時に振とう機を停止させて画像撮影・RGB解析を行った。その結果、振とう機の動作中に撮影した場合と比較して値のバラツキが改善されることが判明した。

参考文献

- 1) 日本生物工学会 編:「生物工学実験書」, 培風館, p.244-245 (2000.03)
- 2) 小西正郎, 堀内淳一: 細胞の増殖を捉える —計測法から比速度算出まで—, 生物工学会誌, Vol. 93, No. 3, p. 149-152 (2015)

- 3) 田中孝国 他: Raspberry Pi を利用した細菌濃度測定装置の試作, 工業用水, No.663, p.53-56, (2020.11)
- 4) 田中孝国 他: 光拡散布で照度調整した細菌濃度測定装置の評価, 工業用水, No.667, pp.71-75. (2021.07)
- 5) 松田充 他: 吸光度と RGB 値を用いた天然ゼオライト混和ポーラスコンクリートのメチレンブルー吸着特性の評価, セメント・コンクリート論文集, Vol. 66, p. 259-265 (2012)
- 6) 福井真二, 藤澤悠貴: Raspberry Pi を用いたプログラミング教育用教材の開発, 愛知教育大学研究報告 自然科学編, No. 69, p.23-27 (2020.03)
- 7) 宮寄敬: Python 言語による IoT 基礎技術につながる Raspberry Pi の教育プログラムと実践報告, 長野工業高等専門学校紀要, No. 54, p.2-2 (2020.06)
- 8) 大田登: 「色彩工学」, 東京電機大学出版局, p.38-40 (2009.05)
- 9) 篠田博之, 藤枝一郎: 「色彩工学入門」, 森北出版, 140-144 (2007.10)

[受理年月日 2021年8月16日]