

振とう培養中の大腸菌画像の RGB 解析におよぼす 色温度の影響

田中 孝国^{1*}, 太田 結月¹, 小林 康浩²

¹ 小山工業高等専門学校 物質工学科 (〒323-0806 小山市中久喜 771)

*tanakatakuni@oyama-ct.ac.jp

² 小山工業高等専門学校 電気電子創造工学科 (同上)

Effect of color temperature on RGB analysis of images of *Escherichia coli* in shaking culture

Takakuni TANAKA, Yuzuki Ohta and Yasuhiro Kobayashi

National Institute of Technology, Oyama College

(771 Nakakuki, Oyama City, Tochigi 323-0806, JAPAN)

(Received December 31, 2024; Accepted February 7, 2025)

In this report, we focus on color temperature [K] and investigate the effects of color temperature conditions on captured images. The illuminance conditions were set at 10000, 20000, and 30000 [lx], and the color temperature conditions were set at 2700, 4600, and 6500 [K]. *E. coli* (strain K-12) was selected as a model bacterium, and liquid shaking culture was conducted using LB medium. Images were taken every 30 minutes from the bottom of the flasks during incubation, and RGB analysis was performed after the images were taken. As a result, it was found that the growth of *E. coli* can be observed with the change to blue and, for image analysis, it is best to take images at a color temperature of 2700 [K] and an illuminance of 20000 [lx].

Key words: Raspberry Pi / cell concentration / RGB / image analysis / color temperature

1. 背景

培養中の細菌や細胞の濃度をリアルタイム・オンライン・定量的に把握する装置は高性能であると同時にコストも高いことが問題点となっている[1]。この問題点を解決するために、我々は安価な測定装置の開発を実施している。これまでに、大腸菌(*E. coli* K-12 株, 以降大腸菌)をフラスコで振とう培養中に、フラスコの底部に設置した web カメラで培養液を撮影し、その画像を解析することで濃度測定が可能な装置について製作を実施してきた

[2]。この測定装置は、安価な小型コンピュータである Raspberry Pi と Web カメラを用い構成されている。撮影データは、校内 Wi-Fi でサーバーに転送後、撮影データの RGB 解析を行い、大腸菌の増殖を定量的に把握できる。これまで得られた結果として、大腸菌の対数増殖期と RGB 値の 1 つである Blue 値の減少には相関が確認されること、この Blue の解析値の減少はヤング・ヘルムホルツの 3 原色説から培養液の示す黄色の割合の増加が示唆されること[3]、撮影 10 秒前に振とう機を停止させると鮮明な画像が撮影可能であること[4]、20,000[lx] の照

度条件が適していることが判明している[5]。

本研究では、撮影条件として色温度に注目した。色温度は、光の色を表す尺度の一つであり、ある程度の黒体が放射する光の色と対応させて決められ、色温度が高いほど青白く(昼光色)、真ん中は白色であり、低くなるとオレンジ(電球色)になる。単位はケルビン[K]で表される[6]。尚、本研究で光源として用いた LED ビデオライト(amaran200x)は、照度を 0~100%の 101 段階で設定でき、色温度は 2,700~6,500 [K] で調節可能である。本報告では、異なる色温度条件が及ぼす大腸菌画像への影響について実験を実施した。

2. 実験

2.1 撮影装置について

撮影装置を制御する小型 PC として、Raspberry Pi (Raspberry Pi 3 Model B Rev 1.2)を使用した。Raspberry Pi は、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) を設定した。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 を用い、30 分ごとに培養液の画像を撮影する設定とした。撮影後の画像は、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 解析を行うよう設定した。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、LED ビデオライトによる光の供給、光拡散布 (NeeWER 社製、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。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、新たに撮影を行う 10 秒前にサーボモータを作動させるよう設定した (Fig. 1)。

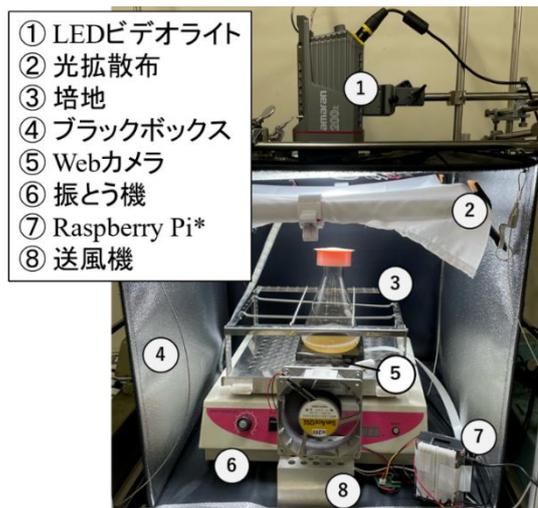


Fig. 1 実験装置全体の写真

2-2 光源の出力、色温度、照度の関係

まず、LED ビデオライトの出力 100%時の色温度と照度を測定した。その結果、色温度を変更すると照度も変化することが判明した(Table 1)。そのため、この2つのパラメータを交互に固定し実験を行った。

Table 1 各色温度における最大照度

| 色温度 [K] | 照度 [lx] |
|---------|---------|
| 2,700 | 34,000 |
| 3,500 | 48,000 |
| 4,600 | 52,000 |
| 5,500 | 57,000 |
| 6,500 | 58,000 |

最初にこれまでに得た最適な照度条件 20,000 [lx] 下[5]、色温度 2,700, 4,600, 6,500 [K] のそれぞれの条件で撮影及び解析を行った。続いて、色温度を 2,700 [K] に固定し、照度 10,000, 20,000, 30,000 [lx] で測定を行った。そして、大腸菌の増殖に適した色温度及び照度条件を求めた。

2.3 大腸菌の培養と増殖画像の撮影

撮影のモデル細菌として大腸菌を用いた。培地は市販の調合済み LB 培地(Difco LB Broth Miller,富士フィルム和光社)を使用した。滅菌した PYREX 製の 500mL 三角フラ

スコに、前培養した大腸菌の培養液 0.2 [mL] (O.D.660 = 1.20)と滅菌後の LB 培地 100 [mL] を入れ、振とう速度 100 [rpm] の条件で Fig. 1 の⑥の振とう機で培養を行った。大腸菌の撮影は、フラスコの下側に設置した Web カメラで 1 時間ごとに培養液の画像を撮影した。撮影画像は、データ転送後に RGB 解析を行った。尚、RGB 値はカラー画像の 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 Red, Green, Blue の値をもとに式 (1)を用いて 0~255 の 256 段階で表現した値である。

$$\text{Gray} = 0.3 \times \text{Red} + 0.6 \times \text{Green} + 0.1 \times \text{Blue} \quad (1)$$

生菌数は平板混釈培養法を用い、コロニー数を計測することで求めた[7]。生菌数の単位は、[CFU / mL] (コロニー形成単位 Colony Forming Unit) を用いた。

3. 結果のまとめ

3.1 照度条件 20,000 [lx] 下、色温度 2,700, 4,600, 6,500 [K] における撮影及び RGB 解析結果

Fig.2~4 より、どの条件においても、大腸菌の増殖が進行すると全ての色の輝度が減少傾向を示すことが判明した。特に、Blue 値の減少量が大きく見られた。この減少は、ヤング・ヘルムホルツの法則 [8] により、大腸菌の増殖による培養液の黄色味の増加が示唆される。

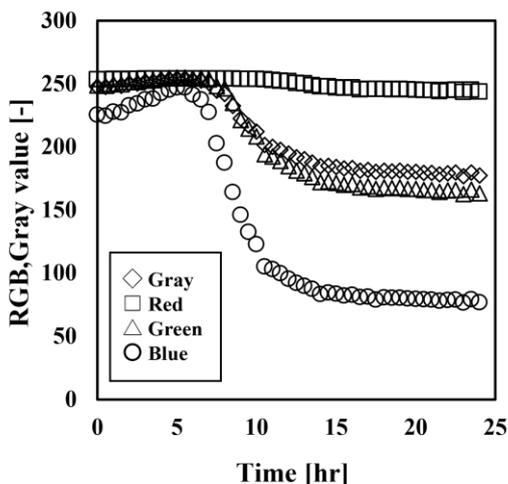


Fig. 2 照度 20,000 [lx], 色温度 2,700 [K]

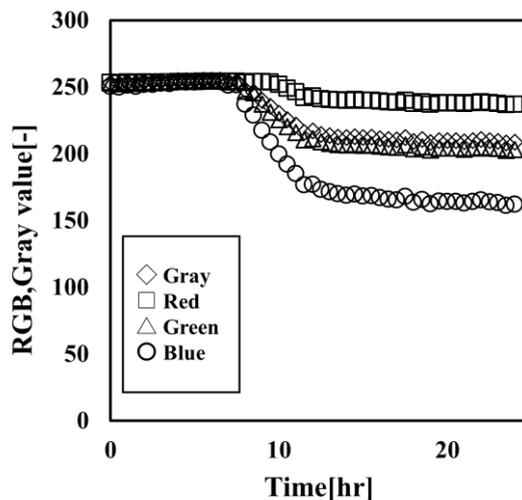


Fig. 3 照度 20,000 [lx], 色温度 4,600 [K]

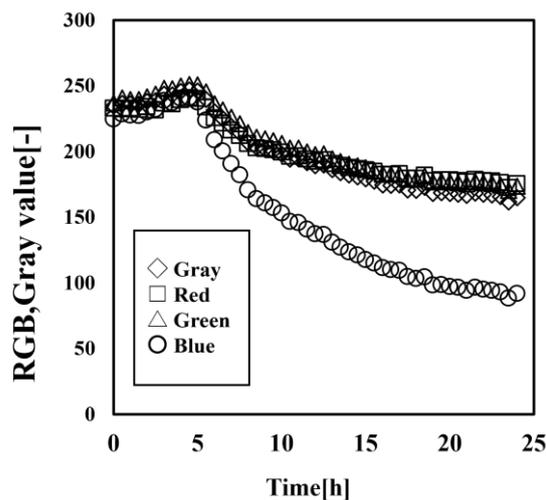


Fig. 4 照度 20,000 [lx], 色温度 6,500 [K]

色温度が 4,000 [K] 付近では、白色光の影響が出るため、照度が高い時と同様、白飛び(画像の表示・表現で、明るい部分の階調が失われ画像が真っ白になること)が生じていることが考えられた [6]。それ以上になると白飛びの影響は無くなり(青みが増す) Blue 値の変化量が再び増す傾向が見られたが、2,700 [K] 条件(黄色～赤みがある)下における変化量の幅が一番大きかったため、解析がしやすいと考え、20,000 [lx], 2,700 [K] が最適であると判断した。

3.2 色温度 2,700 [K] 下, 照度 10,000, 30,000 [lx] における撮影及び RGB 解析結果

Fig. 2,5,6 の結果より, 照度が 20,000 [lx] 以外の条件では, Blue 値の変化量の幅が減少することが判明した。この結果から, 色温度 2,700 [K] においても, 照度 20,000 [lx] が最適な照度条件であることが判明した。Fig. 6 は Fig. 2, 5 と傾向が異なり, 変化量が小さくなった。これは, 白飛びによるものと考えられる。一般に, 照度が高くなると RGB の各値も高くなるが, 30,000 [lx] 条件下では明暗差が激しくなったことにより, Web カメラが撮影できる明暗差の範囲を超えてしまったことにより白飛びが生じたと考えられた [6]。

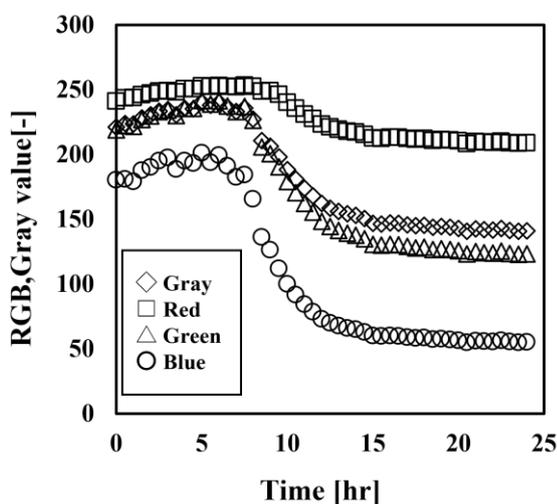


Fig. 5 照度 10,000 [lx], 色温度 2,700 [K]

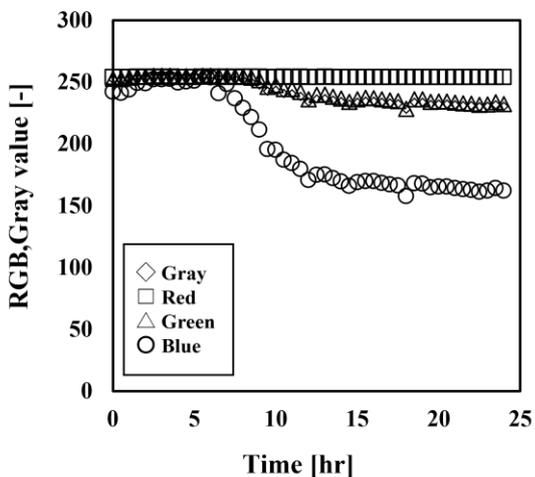


Fig. 6 照度 30,000 [lx], 色温度 2,700 [K]

3.3 大腸菌の散乱度と生菌数の関係性

最適な照度条件として得られた 20,000 [lx] 及び 2,700 [K] における大腸菌の生菌数と濁度(O.D.660)の関係式を求めた。その結果, 式(2)が求められた($R^2=0.98$)。ただし以下の式(2)は, 培養液中に存在する死菌数については考慮していない。そのため, 死菌数が増える定常期以降における濁度からの生菌数換算は, 式(1)では正確に示されていないことが考えられる(3.4 に後述している)。尚, 式(2)中の A 値は -4×10^7 であったが A 値についても生菌数以外による影響があると考えられるが数値変動の要因については解析できていないため, 数値を記していない。

$$(\text{生菌数}) = (\text{濁度}) \times 10^9 - A \quad (2)$$

3.4 大腸菌の生菌数と Blue 値の関係性

最適な照度条件として得られた 20000 [lx] における Blue 値と生菌数の関係を Fig. 7 に示した。Fig. 7 より, 生菌数は Blue 値から式(2)で求めることができることが示唆された($R^2=0.90$)。尚, 式 (3)中の B 値 (今回は $+3 \times 10^9$ であった) についても生菌数以外による影響があると考えられるため, 数値を記していない。

Fig. 7 のプロットの傾きは 3 パターンの傾きが観察された。これは誘導期, 対数増殖期, 定常期に対応していることが考えられた。直線より外れたプロットについて解析を今後すすめる。

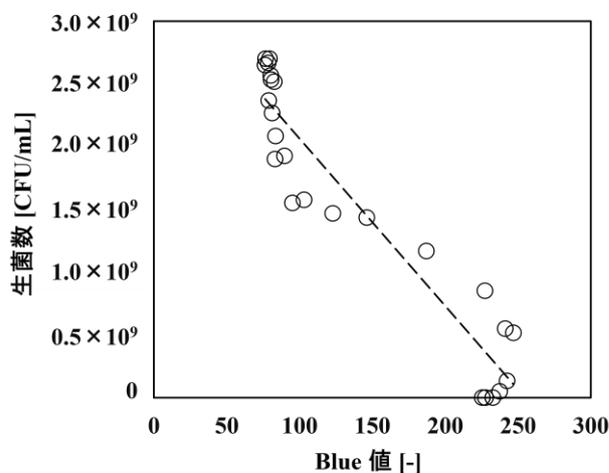


Fig. 7 Blue 値と生菌数の関係

$$(\text{生菌数}) = -1.0 \times 10^7 \times (\text{Blue 値}) + B \quad (3)$$

以上の結果から、Blue 値による生菌数が推測可能である一方で、生菌数が減少し始めると同時に死菌数が増加する定常期および定常期後期以降では、生菌数への換算は現在の Blue 値だけの判断だけでは困難であることが判明した[9]。また、機構や作用は不明であるが大腸菌が損傷を負った際に、可視光 (310~480 [nm]) で機能を回復するとの報告例[10] があることから、色温度や照度が大腸菌の増殖過程に影響を与えた可能性についても今後調査および実験が必要である。

4. まとめ

本報告では、大腸菌の増殖時の撮影に及ぼす色温度について検討した。その結果、照度 20,000 [lx] の条件下、2,700 [K] の色温度が適しており、大腸菌の増殖を Blue 値で推定可能であることが判明した。生菌数と Blue 値は、互いに相関性があり、Blue 値から生菌数が推算可能であることが判明した。

5. 今後の方針

今回の現在使用している LED ビデオライトによる最適な撮影条件が判明したが、Blue 値よりも変化量が小さい Gray, Red, Green 値が生菌数とどのような関連性を持つのか不明であるため、今後解析する。Gray 値は

また、Blue 値と生菌数の関係(Fig. 7) 中の傾きのパターンについて解析を進める。本実験で用いた LED ビデオライトでの色温度下限が 2700 [K] であったがその数値以下の色温度条件については知見が無い。そのため、LED ビデ

オライトの改良および装置自体の改良についても再検討する。

参考文献

- [1] 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, pp. 149-152 (2015)
- [2] 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)
- [3] 田中孝国 他: 光拡散布昇降装置を追加した細菌濃度推定装置による大腸菌(E. coli K-12)濃度の評価, 工業用水, No.674, pp.75-79 (2022.09)
- [4] 田中孝国 他: 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, 小山高専紀要, No.54, pp.47-51 (2021.12)
- [5] 田中孝国 他: 高照度条件下における細菌濃度推定装置による大腸菌(E. coli K-12)濃度の定量化の試み, 工業用水, No.678, pp.69-73 (2023.05)
- [6] 篠田博之 他: 色彩光学入門, 森北出版社, pp.149-150 (2009)
- [7] 杉山純多 他: 微生物学実験法, 講談社, pp.26-28 (2001)
- [8] 大田登: 色彩工学, 東京電機大学出版局, pp. 37-39 (2005)
- [9] R.Y.スタニエ 他: 微生物学入門編, 培風館, pp.97-98 (1997)
- [10] 細井山豊 他: 大腸菌の不活化と光回復を考慮した紫外発光ダイオード(UV-LED)の評価, 土木学会論文集 G (環境), Vol.73, No.7, III_337-III_343 (2017)