

微生物培養の菌液塗抹の定量化を目的とした動作の可視化

Visualization of Movement for Quantification of Bacterial-Liquid Smear in Microbial Culture

○吉田翔¹, 坂本裕紀², 岩淵範之⁴, 内木場文男³, 金子美泉³*Kakeru Yoshida¹, Hiroki Sakamoto², Noriyuki Iwabuchi⁴, Fumio Uchikoba³, Minami Kaneko³

Abstract: This paper presents a motion analysis aimed at quantifying the trajectory of the spreader during the smear operation. Conventionally, in the microbial culture, the smearing of the bacterial-liquid is done manually. Therefore, cases of variability in results between operators have been reported. To prevent this, it is required to quantify the smear operation. Therefore, a visualization program of the operation to investigate the influence of the spreader trajectory on the smear result was developed. The developed program was able to track the specified colors, visualize the tracking results and display the coordinates of the location information.

1. はじめに

培養とは、目的のサンプルが生育しやすい培地に対して菌液を塗り広げ、培地に含まれる栄養素を餌にして増殖、スクリーニングを行うことを指す。微生物は様々な環境に存在しており、中には火山地帯や深海など採取に危険を伴う微生物もいる。そこで、培養技術により増殖させることにより、危険を冒さず、低コストで特定のサンプルを入手できる。また、特定の微生物を研究することにより、特性を知ることができ、その特性を生かした新薬の開発^[1]や栄養素の分解を利用した微生物発電^[2]などに応用できる。

培養の際には、スプレッダーと呼ばれる棒状の器具が一般的に使用されている。この器具を使い、菌液を培地に塗り広げる。この動作は手作業で行われており、作業者の熟練度や経験に左右され、同一の菌液を用いても目的のサンプルが増殖しない、不均一性により微生物のスクリーニングが困難になるなどの事例が存在する。このことから、個人の技量に影響されず、個人差を抑えた培養が可能なデバイスが必要であると考えられる。また、培養の工程がすべて自動化されると、宇宙空間などの特殊な環境下での作業が可能となり、未知の微生物を発見する可能性もある。そこで、塗抹工程を自動化するにあたり、以下の3つが塗抹作業のばらつきにつながっているのではないかと考えた。

- ・スプレッダーの軌跡
- ・塗抹速度
- ・培地にかかる荷重

これまで我々は、荷重の変化が及ぼす影響に対して検討を行ってきた^[3]。また、スプレッダーの速度を調節できるデバイスの設計も行った^[4]。また、軌跡を可視化することができれば、機械化した際の動作を決定する要素となる。先行研究では色付きのスプレッダー

を使って追跡ができるまで確認できている^[4]。しかし、実際にシステムに組み込む際にはスプレッダーの位置情報の座標化が必要になる。

よって、本研究では熟練者による塗抹動作を解析し、トラッキングによる軌跡の可視化と位置情報の座標化を目的とする。

2. 塗抹方法

本研究では、平板塗抹法での培養を行う。本手法における一般的な培養工程を Figure 1 に示す。サンプルの餌となる栄養素を含んだ寒天をシャーレに流し込み、培地を生成する。その上に菌液を滴下し、スプレッダーを用いて塗抹する。本研究の動作解析では塗抹作業は熟練者が行うものとする。

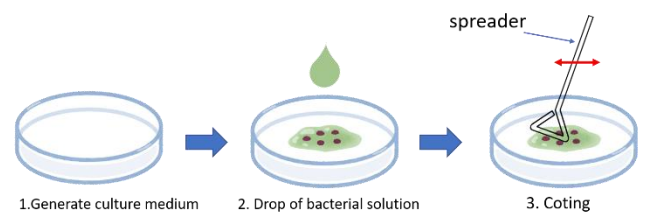


Figure 1. Bacterial culture

3. スプレッダー動作の可視化

本研究では動作解析を行うにあたり、以下の環境で開発を行った。

デバイス：Jetoson Nano Dev kit B01 (NVIDIA 製)

開発環境：Python 3.6.9

インテル社が発表しているライブラリ OpenCV を利用して軌跡の可視化を行う。スプレッダーの一部に赤いビニールテープを巻き付け、その箇所を追跡する。追跡にはカラートラッキング技術を用いる。撮影する場所やタイミングによって光の当たり方が変化し、動

1：日大理工・学部・精機 2：日大理工・院（前）・精密 3：日大理工・教員・精機 4：日大生物資源科学部・教員

画上的色味が変化してしまうことがある。この時、RGBで色の指定を行うと正しく色を認識出来ない場合がある。そこで本研究ではHSV色空間という色相、彩度、明度の3つのパラメーターで色を表現する方法で色の指定を行った。

初めに Figure 2 で示した手法で塗抹動作を記録した。

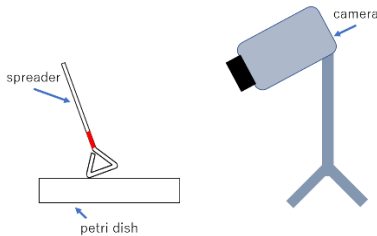


Figure 2. Recording Layout of Bacterial-liquid Smear

次に位置情報の座標化のために動画中のトラッキングした箇所（赤色）を白、それ以外を黒に変換する（Figure 3）。次に、白の箇所の輪郭を検出し、その箇所の重心座標を取得する。得られた座標点を1秒につき30回動画中にプロットすると同時に、座標を表計算ソフトを用いてグラフに変換する。

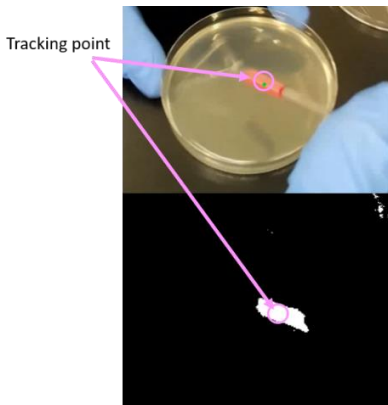


Figure 3. Binarized image

4. スプレッダーの追跡結果

塗抹動作中の15s間に描いた軌跡を追跡した結果を以下の Figure 4, Figure 5 に示す。Figure 5 の原点は Figure 4 の左上にあたる。

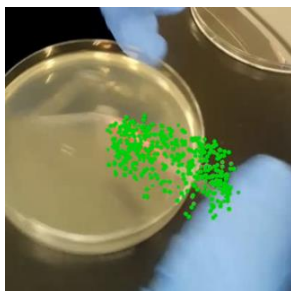


Figure 4. Central measurement

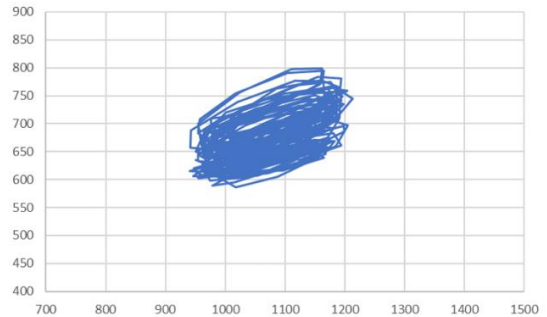


Figure 5. Graph of trajectory tracking

軌跡は楕円形をしており、上下方向にズレが生じている。これは塗り広げると同時にシャーレを回転させている影響が大きいと考えられる。よって今後はシャーレの位置を固定し、スプレッダーのみを動かすようにして計測を行っていく。また、得られた座標情報は単位がピクセルであるため、実際に位置情報として使うためには、mm単位に変換し、距離の導出が可能となるように改良を加えていく必要がある。また、座標には大きく外れた値は見られなかった。つまり、余計な色を検出しなかったということである。これは色指定に用いたHSVのしきい値の設定が正しく、正確に動画中の赤色を捉えることができたといえる。

5. まとめ

本研究では、熟練者の塗抹作業におけるスプレッダーの軌跡の可視化を行った。追跡結果から軌跡の形状は楕円を描いていることが分かった。

今後はさらなる軌跡のデータの収集をすると同時に、得られた座標をもとに軌跡の再現が可能なロボットアームの開発を目指す。

参考文献

- [1] 今中 宏：「新薬創成と微生物生成物」, MEDCHEM NEWS, Vol.5, No.4, pp.87, 1995.
- [2] 高妻 篤史：「微生物の発電」, 日本物理学会誌, Vol.71, No.5, pp. 296-301, 2016.
- [3] 赤坂 拓海：「微生物培養における塗布方法の機械化と定量化を満たす機器の設計開発」, 日本大学理工学部 学術講演会予稿集, 2019.
- [4] 坂本 裕紀：「微生物培養における塗布方法の機械化と定量化を満たす機器の設計開発」, 日本大学理工学部 学術講演会予稿集, 2022.