

DOI:10.19431/j.cnki.1673-0062.2018.06.011

基于颜色特征的酶标板孔菌液浑浊度与菌体生长情况研究

邹 盛,赵立宏*

(南华大学 机械工程学院,湖南 衡阳 421001)

摘要:为了快速检测酶标板培养孔菌体不同时期的生长情况,代替传统的微生物生长中人工对菌体数量的测得从而对其生长情况判断的方法;通过对 JM09 菌株在加有 LB 液体培养基的酶标板中连续 24 h 的培养,采用机器视觉的图像采集和图像处理算法对酶标板孔培养孔的菌体颜色特征的每隔一个小时进行颜色特征值计算方法;得到了菌体不同生长时期菌液浑浊度和颜色特征值的曲线变化关系;提出一种根据菌体培养时菌液浑浊度变化和颜色特征值的关系对菌体数量及生长情况判断的方法。

关键词:机器视觉;图像检测;颜色特征;浑浊度;菌群生长情况

中图分类号:TH79;TP391 **文献标志码:**B **文章编号:**1673-0062(2018)06-0070-04

Image Detection Method for Growth Status of Microbiota in ELISA Plate Hole

ZOU Sheng, ZHAO Lihong*

(School of Mechanical Engineering, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract:In order to quickly detect the growth of the cells in different time periods, the method of judging the growth of the number of cells in the traditional microbial growth was used to judge the growth of the cells. The JM09 strain was added with LB liquid. The culture medium was cultured for 24 hours in a continuous manner, and the color eigenvalues were calculated every hour of the bacterial color characteristics of the wells of the microplates by machine vision image acquisition and image processing algorithms; The relationship between the turbidity and color characteristic values of bacterial liquid in different growth stages was proposed. A method for judging the number and growth of bacterial cells based on the relationship between the turbidity change and the color characteristic value of the

收稿日期:2018-07-27

基金项目:南华大学研究生科学基金项目(2018KYY069)

作者简介:邹 盛(1993-),男,硕士研究生,主要从事机械电子方面的研究.E-mail:695449327@qq.com. *通信作者:
赵立宏(1967-),男,教授,主要从事机械电子、测控技术及应用等方面的研究.E-mail:430003414713@usc.edu.cn

bacterial culture was proposed.

key words: machine vision; image detection; color characteristics; turbidity; growth of flora

0 引言

微生物培养过程中,对微生物的生长情况及数量变化进行检测是完成后续菌体的筛选和转移的重要步骤.微生物生长中细胞数量的测定主要有直接计数法(测定时需用细菌计数器或血球计数板,本法仅适于单细胞的微生物类群)、比浊法、稀释平板、计数法、液体稀释培养计数法、浓缩法^[1-2].传统的比较常见的比浊法是根据菌悬液的透光量间接地测定细菌的数量.细菌悬浮液的浓度在一定范围内与透光度成反比,与光密度成正比,所以,可用利用分光光度计^[3]测定菌液,用光密度(OD 值)^[4]表示样品菌液浓度,但这种传统方法需要外加分光光度计设备且不方便对酶标板孔这种多孔板菌群浑浊度^[5]的自动检测进行生长情况的判断,也无法满足微生物自动化批量生产的需求.

基于上述情况,本研究提出一种新的对菌液浓度的表示方法,利用图像检测方法^[6]提取到的颜色特征值通过实验得到菌体生长期间数量变化时菌液浑浊度的改变与颜色特征值的关系,为以后对符合要求的菌体设定合适的阈值自动检测筛选提供基础.

1 酶标板培养孔菌液浑浊度的表示

由于菌体在生长周期里的繁殖和代谢,随着菌体培养时间的增加,菌体数量也将不断增加,培养基菌液出现不同程度的浑浊,这时菌液的颜色值也将出现明显差异.利用采集到的酶标板图像所记录的每个培养孔区域像素点颜色值,计算每一时刻各个培养孔区域的颜色平均值,不同时期这些培养孔区域颜色特征值将发生变化改变.将不同时期菌液的浑浊度转化为颜色特征值表示,通过颜色特征值的变化对培养孔菌群生长情况进行判断.

故对培养孔菌液浑浊度检测的关键就是培养孔区域颜色特征值的计算,通过图像处理算法定位到每个培养孔的实际圆心位置以及选取每一个圆孔区域.提取的每个孔位区域保留了原有孔位区域的 H、S、V 三通道颜色值,每个像素点都对应一个 H 值、S 值、V 值,不同浑浊度液体的 HSV 颜

色值都不同,本次研究采用提取每个截取培养孔圆形区域的 HSV 三通道^[7-8]平均值作为浑浊度表示.

2 酶标板培养孔颜色特征提取

考虑到环境中光线条件的影响,物体本身的颜色会发生变化,具体到本研究的具体做法是在普通摄像头采集酶标板区域图像时,将酶标板放在一块均匀的 Led 灯板上,使酶标板孔受到均匀的光照这样可以减少光线等环境因素带来颜色特征值计算的误差.

2.1 酶标板孔位区域选取

由于不同时期菌液的浑浊度由颜色特征值^[9]表示,培养孔的颜色特征值计算的准确度关系到浑浊度表示的准确性,因此为保证计算的精确程度对于培养孔区域的选取设计了两种方案.方案一:直接采用像素和实际尺寸的比例关系,计算培养孔的内径及圆心位置,以此来获取最大内接圆形区域,计算每一个孔位区域的 H、V、S 颜色平均值,如图 1 的(a)图所示.根据实际实验情况结合摄像头的成像原理,采集到的图像会发生一定程度畸变,会使酶标板的孔位发生轻微变形,且酶标板孔外侧孔壁具有边缘效应,即靠近外侧孔壁的部分会发生颜色偏差,如采用方案一会造成实际圆心位置与图像上的孔位不一致,因此这样选取的培养孔颜色判定区域会包含非培养孔区域和培养孔孔壁区域,对颜色计算结果造成比较大的误差,所以本实验在之前方案的基础上提出基于实际尺寸计算的圆心坐标,给每一个圆心坐标设置一定的偏差,由于酶标板和摄像头相对位置固定,孔位偏差是固定,偏差值 Δx 和 Δy 通过多次实验合理给出,得到调整后的培养孔圆形选取区域圆心坐标

$$\begin{cases} x_{\text{center,调整后}} = x_{\text{center,实际值}} + \Delta x \\ y_{\text{center,调整后}} = y_{\text{center,实际值}} + \Delta y \end{cases}, \text{酶标板}$$

孔位区域选取的方案二采用上述圆心纠偏和半径调整的方法,如图 1(b)所示.

2.2 培养孔颜色值计算实验结果分析

采用这两种方案分别在酶标板培养孔中滴入等量同种颜色进行实验,并进行多组不同颜色的实验对照,分别计算代表酶标板 96 个孔位区域的

H、V、S 颜色分量平均值.选取其中三组不同颜色分别采用两种方案的的 96 孔位的三个颜色分量平均值标准差得到的实验误差如表 1 所示.

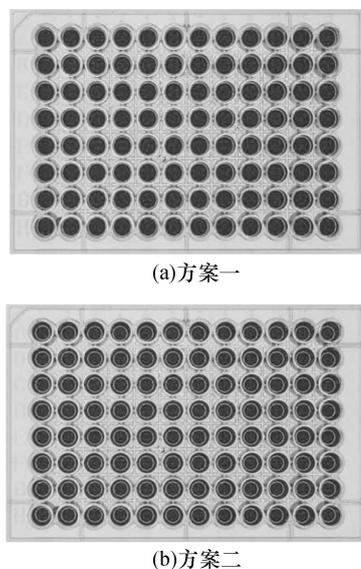


图 1 酶标板培养孔颜色特征提取实验方案
Fig.1 Experimental scheme for color feature extraction of culture plate

表 1 酶标板培养孔 HSV 颜色特征提取误差分析
Table 1 Error analysis of color feature extraction of HSV in culture plate

	H 颜色分量	S 颜色分量	V 颜色分量
方案一	1.94	1.52	0.98
方案二	0.56	1.04	0.90
方案一	2.24	2.44	1.38
方案二	1.52	1.83	1.30
方案一	2.57	4.72	1.70
方案二	0.87	3.02	1.59

对比上述实验结果,对酶标板培养孔孔位为同一颜色采用方案一和方案二进行不同组的实验结果来看,方案二计算酶标板培养孔的颜色的 HSV 平均值标准误差较方案一出现明显降低,平均值波动更小,有效降低颜色特征提取的误差.

3 酶标板孔菌体培养实验

本次菌体培养实验采用了 JM09 菌株和 LB 液体培养基,实验开始在无酶标板的 1~6 列加入 196 μL 培养基和 4 μL 菌体,7~12 列只加入 200 μL LB 液体培养作为对照观察,将酶标板放在设定温度为 36.7 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中进行培养

观察.使用摄像头进行进行每间隔 1 h 在 Led 灯板上采集一次酶标板板孔菌体的图像信息.由于采集的图片均在光照比较强的白光上采集,对于人眼观察和图像显示容易观察到细微的浑浊度变化带来的颜色改变,故对所采集的图片进行了伽玛校正(Gamma correction),所谓 Gamma 校正就是对输入图像灰度值进行的非线性操作,使输出图像灰度值与输入图像灰度值呈指数关系,将灰度过高或者灰度过低的图片进行修正,增强对比度,这样有助于观察.图 2 为展示了 0、3、12 和 24 h 采集到的酶标板菌体生长过程图,所示图片为经过了 Gamma 校正后的图像.通过观察菌体生长不同时期培养孔菌液浑浊度的变化带来了较明显的颜色差异,也给利用颜色特征值进行菌体生长情况的判断提供了依据.

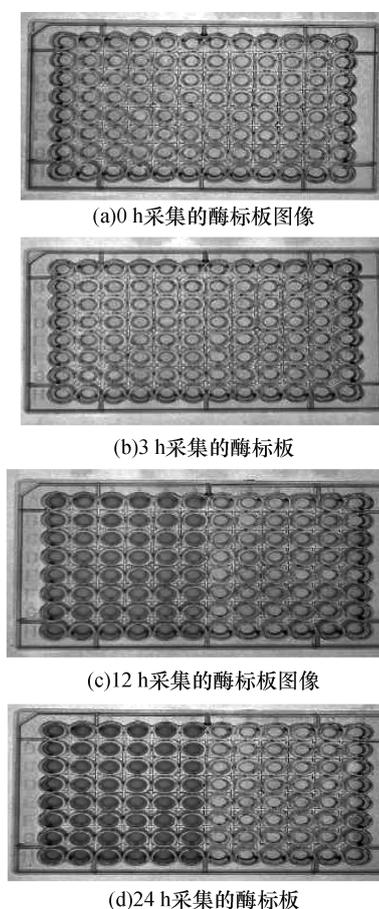


图 2 菌体生长不同时间采集的酶标板图像
Fig.2 Image of the ELISA plate collected at different times of cell growth

通过对摄像头采集的 24 h 的酶标板图像利用上述酶标板培养孔颜色特征提取的方案二计算酶标板 1~6 列菌体培养孔培养菌液每个时期的三

通道颜色平均值,在 MATLAB 中对得到的不同时期的 HSV 三通道颜色平均值进行正弦类函数的曲线拟合,得到不同生长时期颜色变化的曲线.图 3 分别为不同时期酶标板酶标板培养孔菌体的 H、S、V 颜色通道平均值曲线分布图.

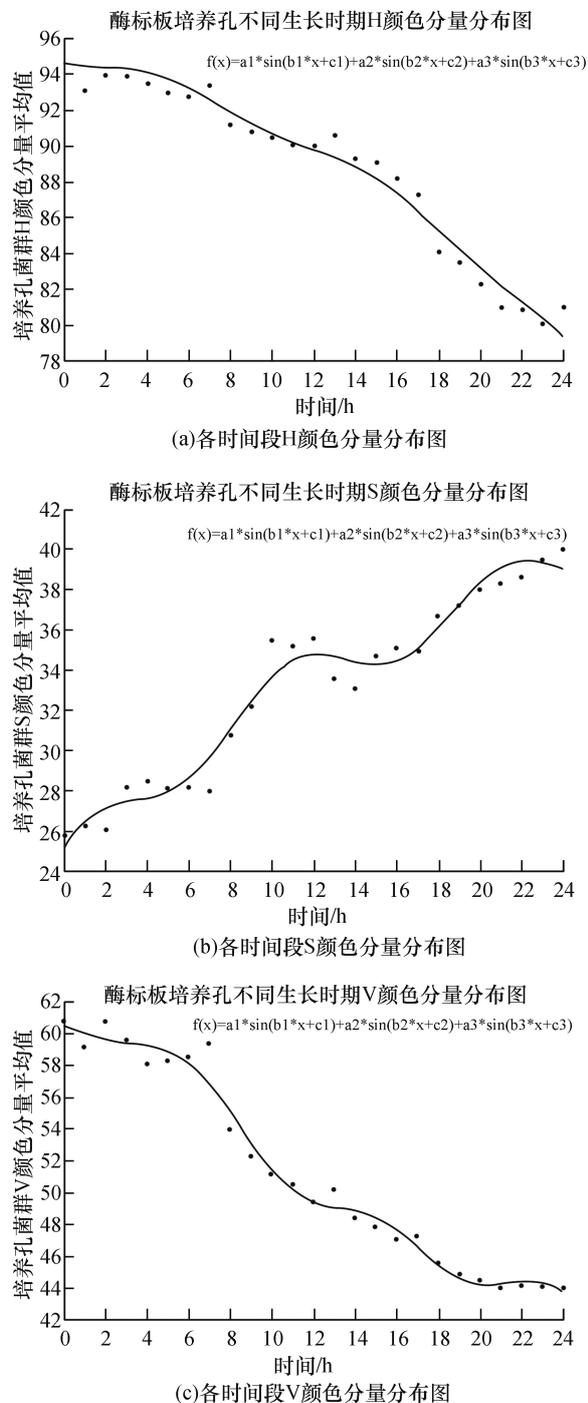


图 3 不同时间段酶标板培养孔菌体三通道颜色平均值分布图

Fig.3 Distribution of three-channel color average values of microbial cells in different time zones

通过不同时期的三颜色通道分布图可以看出该菌体不同生长时期浑浊度的不同带来的 HSV 颜色平均值的变化满足一定的曲线变化规律,也符合菌体繁殖生长所经历的迟缓期,对数期,稳定期三个时期的变化.能给客观的通过颜色特征值的改变的反应培养孔菌体不同生长时期菌体数量的变化,能为菌体生长情况的筛选提供依据.

4 结 论

本方法利用摄像头输入的酶标板目标图像的图像处理方法,通过实验菌体的培养,根据菌体生长时菌液的浑浊度变化计算了不同时期每个培养孔区域的 HSV 颜色平均值,为酶标板孔菌群浑浊度的检测提供了一种新的方法,为后续通过机器视觉对酶标板孔培养孔生长状况符合要求的细菌的筛选提供了一种依据.此外,如果要更好的将此识别系统应用于微生物自动化生产实践中,还需要更多更精确的菌体培养实验得到不同菌体不同生长时期菌液与颜色特征值的关系曲线,获得线性关系,为菌体筛选提供更为准确的数据.

参考文献:

- [1] 马秀玲,陈蕊君,王飞,等.吸光度法快速确定菌悬液浓度及其适用范围[J].微生物学杂志,2014,34(4):90-92.
- [2] 应朝福.基于光谱技术的微生物生长检测研究[D].杭州:浙江师范大学,2016.
- [3] 曹国珍,缪建顺,张苗苗,等.分光光度法测定酿酒酵母细胞悬液浓度研究[J].中国酿造,2014,33(4):129-131.
- [4] 秦云贺,王艺红,郭庆龙,等.结核分枝杆菌菌悬液光密度值与菌落计数的关联性[J].中国感染控制杂志,2016,15(3):150-155.
- [5] 刘建华,李平,张成成,等.浊度计法测定工业废水中的悬浮物[J].绿色科技,2015,15(11):181-182.
- [6] 李寒,张漫,高宇,等.温室绿熟番茄机器视觉检测方法[J].农业工程学报,2017,33(1):328-333.
- [7] 彭明阳,王建华.结合 HSV 空间的水面图像特征水岸线检测[J].中国图象图形学报,2018,23(4):526-533.
- [8] 谭晓波,殷袭茗,周书仁,等.融合 HSV 空间与形态学的救生衣图像分割[J].计算机应用与软件,2016,33(1):198-202.
- [9] 张丽.基于颜色和纹理特征的图像检索技术研究[D].南京:南京邮电大学,2017.

(责任编辑:扶文静)