

中華民國第 59 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 農業與食品學科

第三名

052207

製作簡便抗生素檢測系統-以生物檢測法結合機器學習辨識抗生素的種類

學校名稱：臺北市立建國高級中學

作者： 高二 魏欽典 高二 黃惟喆	指導老師： 黃慧茹
---------------------------------	------------------

關鍵詞：抗生素、生物檢測、機器學習

摘要

食品安全是現今台灣所面臨的一大問題,其中抗生素是殘留於食品中一大危害物質。本研究欲製作一套使用生物檢測方法的可攜式抗生素辨識系統,以簡易快速地初步辨識食品樣本中抗生素種類。本研究使用一間以色列實驗室提供的 14 株不同基改大腸桿菌,每株細菌受到不同壓力因子時會產生不同亮度的生物冷光。透過拍攝細菌在不同抗生素中冷光亮度,建立各株細菌在 11 種抗生素中亮度變化的數據資料庫,並利用機器學習訓練抗生素預測模型。測試結果顯示,此模型確實能快速簡易地依照作用機制檢測並分類樣本中未知的抗生素,且能在三小時內達到高達 90%的準確率。未來將持續為此系統建立更大規模的資料庫,以辨識食品樣本中更多種類、濃度及多重組合的抗生素。

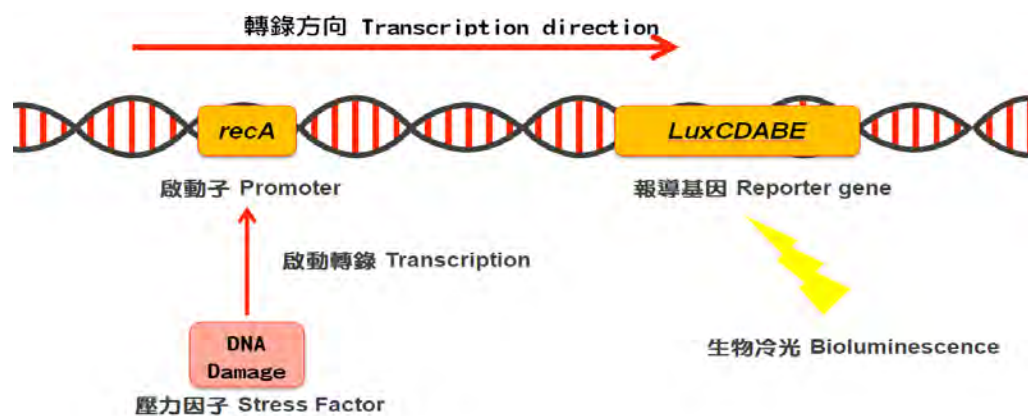
壹、研究動機

食品安全是現在台灣所面臨的一大問題,而其中抗生素又是殘留於食品中一大危害物質。現今檢驗食品中抗生素的化學或物理性檢測方式,不但耗時又需要昂貴的高級設備,或只能針對已知的抗生素進行一對一檢測。因此本研究嘗試利用以色列實驗室提供的特殊基改細菌,製作出能簡易、快速的抗生素辨識系統,以「生物檢測」法依照作用機制初步檢測並辨識食品中未知抗生素。

貳、研究目的

一、 研究背景

以色列實驗室(Department of Plant and Environmental Sciences , The Alexander Silberman Institute of Life Sciences ,the Hebrew University of Jerusalem , Jerusalem 91904 , Israel.)提供 14 株基因轉殖大腸桿菌(*Escherichia coli*)，每株細菌質體上含有不同特定啟動子基因，在受到特定損傷刺激（如受抗生素作用）時會啟動質體上基因之轉錄。於轉錄方向之下游存在一組特殊之報導基因 (reporter gene) *luxCDABE*，經轉錄、轉譯可合成螢光素酶 (LuxA 和 LuxB 之二聚體)以及可由細胞環境中之物質合成螢光素之酵素(LuxC、LuxD 和 LuxE)，使大腸桿菌發出生物性冷光(bioluminescence) (圖一)。



圖一：基改細菌發光機制
(圖一資料來源:研究者繪製)

在 14 株細菌中，每株細菌在受到特定損傷刺激時會啟動質體轉錄而發光。將細菌置於不同抗生素中時，因每種抗生素都有特定損傷細菌的途徑，能刺激特定細菌發光。同時因每一種細菌在基因轉殖後特性不同，受到抗生素抑制生長的情形也會不同。因此細菌亮度會受到質體的啟動與生存的細菌總數影響，而抗生素正是影響上述兩個條件的重要變因。因此，每種不同抗生素應該要能使 14 株基改細菌產生不同的亮度變化。

本研究嘗試利用這十四株檢測細菌，製作一套可攜式抗生素辨識系統。只需利用可攜式的恆溫攝影裝置，拍攝一張照片紀錄樣本中 14 株細菌亮度變化情形，與抗生素資料庫的個種抗生素的資料比對，辨識樣本未知抗生素的種類。

二、 研究目的

為完成可攜式抗生素辨識系統，須完成下列部分：

- (一) 收集 14 株細菌在不同抗生素中亮度變化大量對照組數據，製作抗生素資料庫。
- (二) 利用機器學習將資料庫訓練成模型，以辨識不同種類的未知抗生素。
- (三) 製作可攜式、恆溫之攝影裝置。

參、研究設備及器材

一、實驗儀器

細菌培養箱兩個(Dengyng)、分光光度計(Metertech)、離心機(Eppendorf)、加熱攪拌器(SunTex)、振盪器(SCIENTIFIC INDUSTRIES)、EOS 800D 數位單眼相機(Canon)、STF-8300 相機(Diffraction Limited)、滅菌釜、鑽床(CHIN)、玻璃切割器、微波爐、電子秤(AND)、電動轉盤控制器(ThorLabs)、PID 溫度控制器(TGHG)、CO₂雷射雕刻機 V2000、紅外線熱像儀(Fluke)、移液器(Eppendorf)、電動式吸管輔助器(Eppendorf)

二、實驗藥品

(一) LB 粉末(Bacto™ Agar)

(二) Agar(Difco™ LB Broth)

(三) M9 salt

Na₂HPO₄*7H₂O、KH₂PO₄、NaCl、NH₄Cl、MgSO₄、glucose、CaCl₂、

Casamino acid、Thiamine

(四) 溶劑

ddH₂O、99%甲醇

(五) 抗生素：皆於 Sigma Aldrich 購買

抗生素	作用途徑類別	Catalogue Number	抗生素	作用途徑類別	Catalogue Number
Amoxicillin	Penicillins	10039	Doxycycline	Tetracyclines	D3447
Ampicillin	Penicillins	A9393	Nalidixic acid	Naphthyridone	N8878
Ceftiofur	Cephalosporin	34001	Rifampicin	Rifampicin	R3501
Cefapirin	Cephalosporin	SMB00605	Thiamphenicol	Phenicol	T0261
Chloramphenicol	Phenicol	C0378	Tetracycline	Tetracyclines	31741
Ciprofloxacin	Quinolone	17850			

表一：研究所需抗生素及其 Catalogue Number
(表一資料來源:研究者繪製)

三、實驗用品

各式離心管、養菌管、玻璃管(含蓋)、6 well 養菌盤、tip、酒精燈、洗碗精、漂白水、酒精、PCR film、燒杯、parafilm、紙、筆

四、自製裝置材料

架設相機各式零件、PMMA 板、感溫線、多段式變壓器、ITO 玻璃、金屬電極片、保麗龍、膠帶

五、細菌

1. 14 株基因改造大腸桿菌(以色列實驗室提供)(表二)
2. 1 株含抗 ampicillin 與 *recA* 質體的基改大腸桿菌，因其生長力較強，我們稱作 super *recA*。

Strain	Plasmid	Sensing element information
SM332	pBRlux- trp: <i>emrA</i> :: <i>luxCDABE</i>	Cytoplasmatic membrane fusion protein
SM333 ^a	pBRlux- trp: <i>acrA</i> :: <i>luxCDABE</i>	Periplasmic lipoprotein component of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump
SM334	pBRlux- trp: <i>zwf</i> :: <i>luxCDABE</i>	G6PDH,regulated by SoxS and MarA
SM335 ^a	pBRlux- trp: <i>soxS</i> :: <i>luxCDABE</i>	Dual transcriptional activator ,participates in the removal of antibiotics
SM337 ^a	pBRlux- trp: <i>tolC</i> :: <i>luxCDABE</i>	Outer membrane porin involved in the efflux transport system
SM338 ^a	pBRlux- trp: <i>inaA</i> :: <i>luxCDABE</i>	pH-inducible protein involved in stress response
SM340 ^a	pBRlux- trp: <i>zntA</i> :: <i>luxCDABE</i>	Lead ,cadmium ,zinc and mercury transporting ATPase
SM341 ^a	pBRlux- trp: <i>marR</i> :: <i>luxCDABE</i>	Multiple antibiotic resistance protein
SM342 ^a	pBRlux- trp: <i>recA</i> :: <i>luxCDABE</i>	DNA recombination protein , induce the SOS response to DNA damage
SM343 ^a	pBRlux- trp: <i>micF</i> :: <i>luxCDABE</i>	Antisense regulator of the translation of the OmpF porin ,under SoxS regulation
SM344 ^a	pBRlux- trp: <i>katG</i> :: <i>luxCDABE</i>	Bifunctional hydroperoxidase I ,having both catalase and peroxidase activity
SM345 ^a	pBRlux- trp: <i>sodA</i> :: <i>luxCDABE</i>	Superoxide dismutase protein
SM346 ^a	pBRlux- trp: <i>rpoB</i> :: <i>luxCDABE</i>	RNA polymerase ,beta subunit
SM347 ^a	pBRlux- trp: <i>ompF</i> :: <i>luxCDABE</i>	Outer membrane porin

表二：14 株基因改造大腸桿菌

(表二資料來源: Melamed, S., Lalush, C., Elad, T., Yagur-Kroll, S., Belkin, S., & Pedahzur, R. (2012). A bacterial reporter panel for the detection and classification of antibiotic substances. *Microbial biotechnology*, 5(4), 536-48.)

六、軟體

Excel、Spyder、MatLab、APT Software、PhotoShop、Autocad、Canon EOS Utility

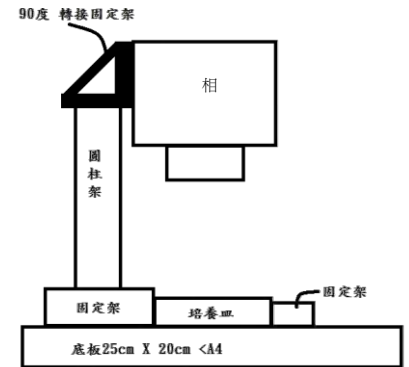
肆、研究過程及方法

一、細菌製備測試與初步實驗：

(一) 架設便宜、可攜式攝影器材：

為了完成可攜式的攝影裝置，架設符合需求的攝影器材

1. 利用圓柱架、固定架、90 度轉接固定架等零件使用螺絲將相機鎖在小於 A4 的底板上，使整個器材可以攜帶。(如圖二)
2. 將紙箱外部包密鋁箔紙，內部貼上光學黑布，照在整個攝影器材上方，使其能阻隔光線。
3. 將拍攝目標放於鏡頭下方的底板上，進行拍攝。



圖二：攝影器材示意圖
(圖二資料來源: 研究者繪製)

(二) 製備 LB 培養基與 Agar 培養基：

為提供細菌生長所需養分，配置培養細菌用的 LB 培養基與 Agar 培養基

1. 取含 10g tryptone、5g yeast extract、5g NaCl 的混和 LB 粉末加入 1 升的 ddH₂O。
2. 使用加熱攪拌器攪拌 10 分鐘至均勻。
3. 攪勻後即為 LB 培養基，裝瓶。
4. 在裝瓶後 LB 培養基中額外加入 1.5% 的 Agar 粉末，即為 Agar 培養基。
5. 將瓶蓋蓋上旋緊後鬆開一點，以防滅菌時水蒸氣散出。
6. 放入滅菌釜自動滅菌。
7. 滅菌後取出，蓋子旋緊，室溫保存。

(三) M9 salt medium 配製：

為提供細菌生長所需養分，配置培養細菌用的 M9 salt medium 培養基

1. 5 倍 M9 salts 配製

(1) 混和以下藥品：

材料	量
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	64g
KH_2PO_4	15g
NaCl	2.5g
NH_4Cl	5g

表三：5 倍 M9 salts 配方
(表三資料來源: 研究者繪製)

(2) 將混和後的 5 倍 M9 salts 放入滅菌釜滅菌。

2. M9 salt medium 配製:

(1) 5 倍 M9 salts 滅完菌後，待其冷卻，加入以下無菌藥品(經過滅菌或過濾)。

材料	量
5X M9 Salts	80 ml
1M MgSO_4	800 μl
20% glucose	8 ml
CaCl_2	40 μl
20% Casamino acid	4 ml
0.5% thiamine	0.08 ml

表四：M9 salt medium
(表四資料來源: 研究者繪製)

(2) 每加入一項，需搖晃至沉澱消失，可加入下一項。

(3) 完成後，冷藏保存。

(四) 細菌培養製備

為得到條件一致且具有活性的菌液，透過一下流程培養細菌，製備菌液

1. 將 M9 salt medium 放入養菌管。(若要養 *super recA*，則使用 LB，並加入 0.5% Ampicillin)
2. 將細菌株以 1000 倍稀釋滴入養菌管。
3. 放入培養箱培養約 10 小時。
4. 以 LB 稀釋 25 倍於玻璃管中。
5. 放回培養箱 regrowth 約 2 小時。
6. 使用分光光度計測量其菌液濃度。
7. 取出 1ml 至離心管，離心 4 分鐘。
8. 將上清液吸出。
9. 將分光光度計測出的濃度計算，加入適量 LB，將濃度稀釋為目標濃度。
10. 得到目標濃度之菌液，放入冷藏庫，備用。



圖三：分光光度計
(圖三資料來源: 研究者拍攝)

(五) 含抗生素之固體培養基 Agar 養菌盤製備:

為使抗生素能與細菌接觸，製備含有特定濃度抗生素的固態 agar 培養基

1. 將瓶裝 Agar 瓶蓋稍微旋開，放入微波爐內加熱，直至完全融化
2. 將液態 Agar 倒入離心管中，放入裝滿熱水的大燒杯中保溫，並用加熱攪拌器持續加熱，維持水溫。
3. 將抗生素高濃度溶解於小離心管內，此管封膜後可儲存。(依照抗生素的性質，選擇甲醇或水作為溶劑)
4. 將高濃度抗生素溶液加入含 Agar 的離心管中稀釋，以達到目標濃度。
5. 將加入抗生素後的離心管使用震盪器充分搖晃混和。
6. 將上步的 Agar 以 pipet 吸到目標養菌盤上(6 well 養菌盤或貼好 PCR 膜的自製養菌盤)。
7. 將上步的養菌盤放到燃燒的酒精燈旁 10 分鐘，時間到後轉向再燒 10 分鐘，去除多餘水分。
8. 得到成品。

(六) 將菌液滴於養菌盤

為使抗生素能在實驗進行中與細菌接觸，將菌液滴於上步製備的含抗生素的養菌盤上，滴完後需立即開始拍攝觀察，並保持恆溫

1. 使用 10 μ l 的 pipet 與 tip 將步驟四製備好的細菌吸起。
2. 打出細菌，使細菌在 tip 頂端成圓珠狀。
3. 將成圓珠狀的細菌接觸養菌盤上的 Agar，注意 tip 不要破壞 Agar 表面。
4. 吸取不同細菌需要更換 tip，以免汙染。

(七) 使用攝影裝置拍攝以培養箱養殖之細菌

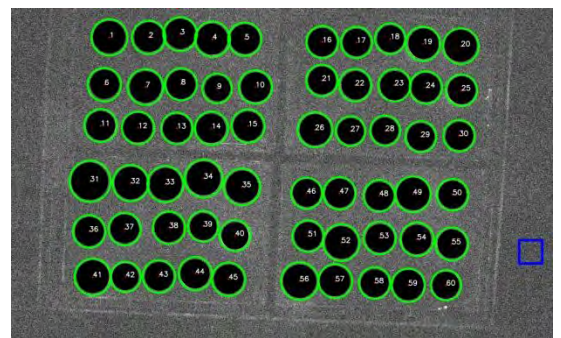
最初的實驗使用培養箱保持恆溫

1. 將滴好細菌的 6 well 養菌盤放入培養箱生長。
2. 每固定時間取出，使用攝影裝置拍攝。
3. 拍攝完迅速放回培養箱，等待下次拍攝。

(八) 利用自製程式計算照片中細菌亮度

為計算照片中細菌亮度，使用自製程式(程式雛形由中研院分生所提供)協助計算

1. 將實驗照片用 PhotoShop 手動圈出細菌所在的位置與範圍。
2. 將一次實驗同一養菌盤的所有照片依時間排序放入程式，並將上步圈出細菌的照片放在最後一張。
3. 程式會以 OpenCV 的 HoughCircle 函式，尋找最後一張照片內所出來的圓，判斷細菌的位置範圍(如圖四)。
4. 程式會將找到細菌的範圍內所有 pixel 亮度(0~255)的加總。
5. 程式將所加總的值依序輸出並放入 Excel 分析。。



圖四： OpenCV 圈圓

(圖四資料來源: 研究者繪製)

二、使用轉盤與培養箱收集大量數據，以建立資料庫：

為了提供未知抗生素比對的資料，我們需要收集多種抗生素的對照數據，並找到細菌受到各種抗生素刺激後發光的結果。我們選擇架設轉盤與培養箱來收集大量數據，以建立 14 株細菌在不同抗生素中亮度變化資料庫。

(一) 轉盤架設:

1. 將電動轉盤置於培養箱內，設計自製盤面，一次能讓 4 個自製養菌盤於盤上旋轉。
2. 架設 STF-8300 天文相機於培養箱內，鏡頭對準其中一片養菌盤位置。
3. 使用 MatLab 寫程式控制轉盤自動旋轉與相機拍照。

(二) 自製養菌盤製作

為使養菌盤能置於轉盤上，自製養菌盤

1. 使用 Autocad 繪製草圖。
2. 將 PMMA 板使用 CO₂ 雷射雕刻機根據草圖，刻出自製養菌盤。
3. 將市售塑膠培養盤(聚苯乙烯)用 CO₂ 雷射雕刻機刻成蓋子。
4. 用鑽床在蓋子上鑽出 16 個小洞，以利氧氣進出
5. 在自製養菌盤下方貼上 PCR 膜，即可在內填充 Agar。
6. 將 PCR 膜與 Agar 去除，清洗後即可重複使用

(三) 抗生素資料庫蒐集:

1. 將滴完細菌的養菌盤放在轉盤上，蓋上自製蓋子，並用膠帶固定。
2. 關上培養箱，使用黑布罩住培養箱，隔絕光線。
3. 啟動程式，等待拍攝完成。

(四) 抗生素資料庫資料處理方法

1. 方法一：將數據點的亮度數值除以對應的空白組(未添加抗生素)發出的亮度

舉例：若是要取得 SM332 於 Amoxicillin 中，180 分鐘時的比值資料，計算方法：

$$\frac{\text{SM332 於 Amoxicillin 中，180 分鐘時的亮度數值}}{\text{SM332 於空白組中，180 分鐘時的亮度數值}}$$

2. 方法二：將單株細菌所有時間點之亮度數值標準化

舉例：若是要取得 SM332 於 Amoxicillin 中 180 分鐘時的比值資料，計算方法：

$$\frac{(\text{SM332 於 Amoxicillin 中，180 分鐘時的亮度數值}) - (\text{SM332 於 Amoxicillin 中，180 分鐘內的所有亮度數值之平均})}{\text{SM332 於 Amoxicillin 中，180 分鐘內的所有亮度數值之標準差}}$$

3. 方法三：將單一時間點中 14 株細菌之原始亮度數值標準化

舉例：若是要取得 SM332 於 Amoxicillin 中，180 分鐘時的比值資料，計算方法：

$$\frac{(\text{SM332 於 Amoxicillin 中，180 分鐘時的亮度數值}) - (\text{180 分鐘時於 Amoxicillin 中，14 株細菌的所有亮度數值之平均})}{\text{180 分鐘時於 Amoxicillin 中，14 株細菌的所有亮度數值之標準差}}$$

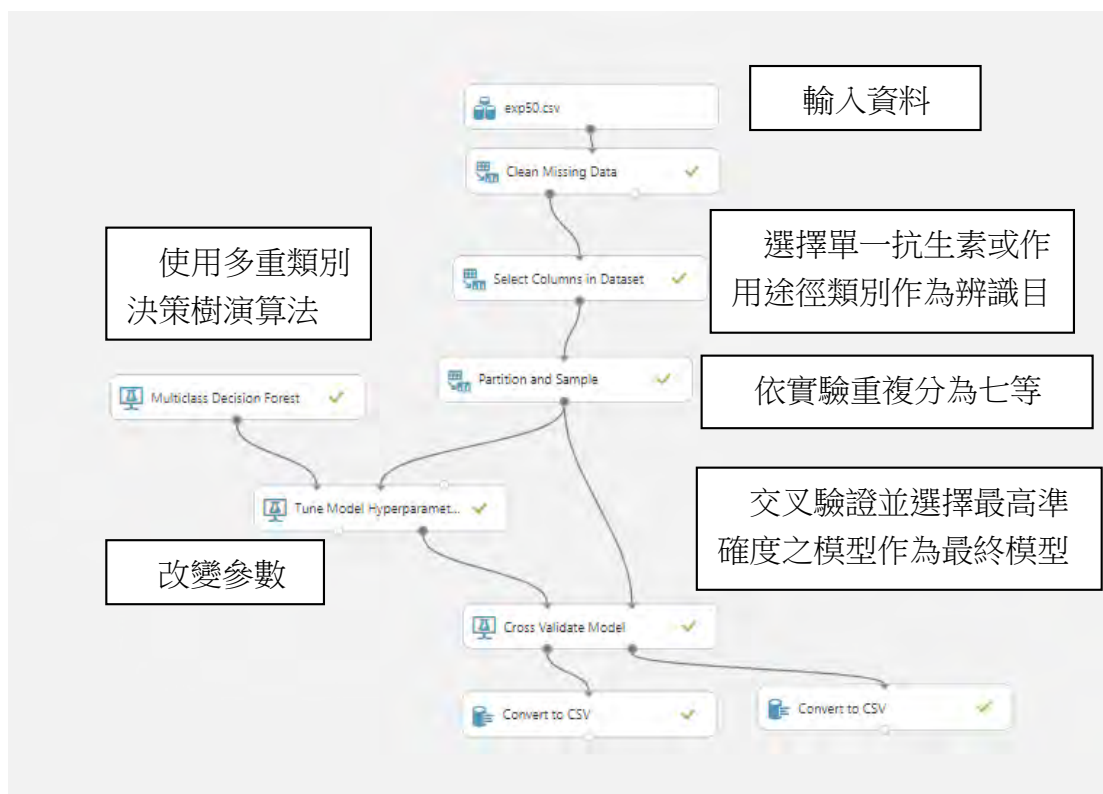
三、利用機器學習將資料庫訓練成模型，以辨識不同種類的未知抗生素：

(一) 資料處理：

分別將經由三種資料前處理方法處理後的抗生素資料庫數據做為參數對應至該抗生素名稱或是作用途徑類別。

(二) 訓練模型及測試模型：

以多重類別決策樹系(Multiclass DecisionForest)演算法對抗生素的名稱或是類別訓練分類模型，調整決策樹的數量、分岔情形、高度及隨機度等參數並使用交叉驗證(cross-validation)方式測試模型準確度，選擇準確度最佳者作為最終模型。



圖五：機器學習訓練過程說明
(圖五資料來源:研究者利用 Azure 平台繪製)

四、製作恆溫系統

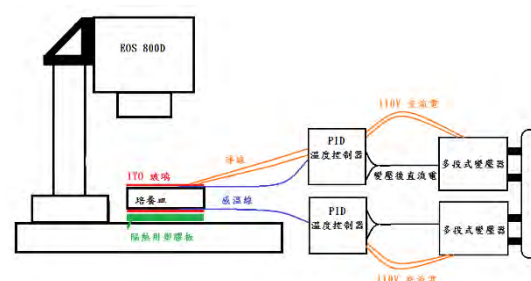
(一) 恆溫系統製作

為使拍攝過程中保持恆溫，於攝影裝置上架設恆溫系統

1. 切割兩片適合大小的 ITO 導電玻璃。
2. 將電極金屬片以銀膠貼於 ITO 玻璃兩側
3. 將已剝去頭尾的導線，焊於電極金屬片
4. 改造多段式變壓器使其多拉出一條 110V 電源，供應 PID 溫度控制器。
5. 將感溫線與各導線連接於 PID 溫度控制器。
6. 使用溫水校正感溫線測量的溫度，調整溫度控制器的溫度設定。
7. 將 ITO 玻璃四周用保麗龍包住，並使兩片玻璃間有能放養菌盤的空間。



圖六：PID 溫度控制器
(圖六資料來源: 研究者拍攝)



圖七：恆溫系統導線連接示意圖
(圖七資料來源: 研究者繪製)

(二) 使用恆溫裝置拍攝養菌盤

詳細說明使用恆溫裝置拍攝養菌盤的步驟

1. 將滴完細菌的自製養菌盤放入恆溫裝置的保麗龍中。
2. 將下玻璃的感溫線插入 Agar 中感溫。
3. 上蓋蓋上，注意不要使上玻璃的感溫線接觸上玻璃，只能使其接觸空氣。
4. 將相機 wifi 連接電腦，使用 Canon EOS Utility 3 設定自動延時攝影。
5. ISO 值設定為 25600。
6. 將隔光紙箱蓋上，等待拍攝完成。

伍、研究結果

一、測試攝影裝置，並找出在日後實驗中，控制變因的最佳條件。

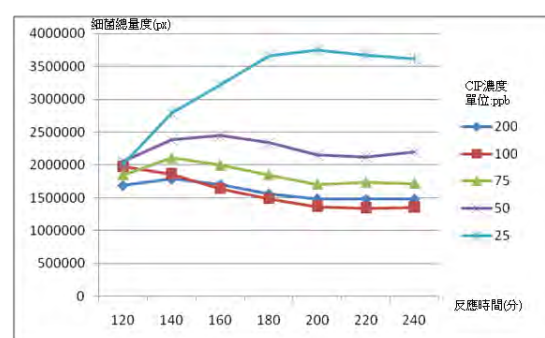
完成攝影裝置後，為實際測試其功能，熟悉操作步驟，進行不同變因:抗生素濃度、細菌濃度、曝光時間等實驗，並以實驗結果選擇控制變因的最佳條件。

(一) 【抗生素濃度及細菌量對細菌亮度的影響】

細菌使用 *super recA*，每一滴細菌 5 μ l，細菌濃度 2.0OD，滴於含 CIP 濃度 0、25、50、75、100、200 ppb 的 Agar 中，每個濃度重複三次(如圖八)，以 EOS 800D 曝光 30 秒，養於培養箱，自點下細菌起 120 分鐘開始拍攝至 240 分鐘，每 20 分鐘拍攝一次，實驗結果如(圖九)。



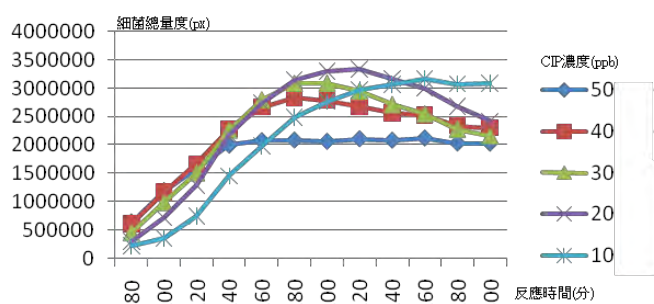
圖八：反應 240 分鐘時拍攝之細菌
(圖八資料來源:研究者拍攝)



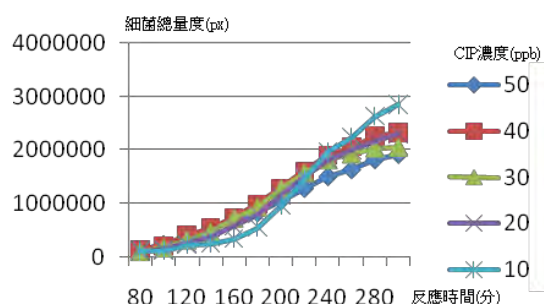
圖九：細菌亮度隨時間的變化
(圖九資料來源:研究者繪製)

(二) 【細菌濃度對細菌亮度的影響】

細菌使用 *super recA*，每一滴細菌 5 μ l，細菌濃度 2.0OD 與 0.4OD，滴於含 CIP 濃度 0、25、50、75、100、200 ppb 的 Agar 中，每個濃度重複三次，以 EOS 800D 曝光 30 秒，養於培養箱，自點下細菌起 80 分鐘開始拍攝至 300 分鐘，每 20 分鐘拍攝一次，實驗結果如(圖十)、(圖十一)。



圖十：濃度 2.0OD 細菌亮度隨時間的變化
(圖十資料來源:研究者繪製)



圖十一：濃度 0.4OD 細菌亮度隨時間的變化
(圖十一資料來源:研究者繪製)

(三) 【曝光時間對細菌亮度的影響】

細菌使用 *super recA*，每一滴細菌 5 μ l，細菌濃度 2.0OD，滴於含 CIP 濃度 0、25、50、75、100、200 ppb 的 Agar 中，每個濃度重複三次(如圖十二)，以 EOS 800D 曝光 10 秒、20 秒、30 秒，養於培養箱，自點下細菌起 120 分鐘開始拍攝至 240 分鐘，每 20 分鐘拍攝一次。



圖十二：反應 240 分鐘時不同曝光時間拍攝之細菌(左至右:10s、20s、30s)
(圖十二資料來源:研究者繪製)

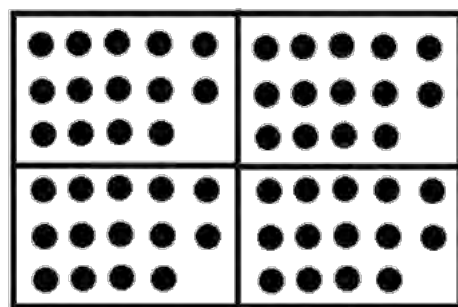
三種不同曝光時間之圖，經分析後，透過伸縮平移後幾乎完全相同，然而亮度並不與曝光時間成正比。

二、收集 14 株細菌在不同抗生素中亮度變化資料庫，供未知抗生素比對分類。

【14 種細菌在不同抗生素內發光情形】

為了提供未知抗生素比對的資料，我們需要收集多種抗生素的對照數據，並找到細菌受到各種抗生素刺激後發光的結果。我們使用轉盤與培養箱來收集大量數據，以建立 14 株細菌在不同抗生素中亮度變化資料庫。

每一次實驗使用 11 種抗生素，濃度為 1500 ppb，每種抗生素與 Agar 混和於不同的 well 裡。每個 well 滴上 14 株細菌(見表二)，每一滴細菌 3 μ l，細菌濃度 2.0OD。再另外做不含抗生素的對照組 4 組，以作為當次實驗的基準，並控制誤差。將 plate 置於轉盤上拍攝，以 STF-8300 曝光 30 秒，每三分鐘拍一張，共拍攝 10 小時。一共進行了 7 次實驗。



圖十三：自製養菌盤內細菌位置示意圖
(圖十三資料來源:研究者繪製)

【細菌亮度資料前處理】

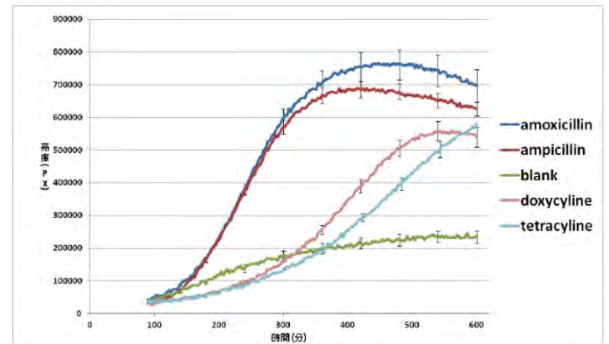
將細菌亮度變化資料利用三種不同方法進行前處理後可以有效強化並顯露出資料的不同特徵。

(一) 方法一：將資料點的亮度數值除以對應的空白組(未添加抗生素)發出的亮度

為了得到細菌暴露在抗生素內所造成的影響，與不含抗生素的空白組比較是其中一種方式，因此我們將要處理的資料點除以同一時間同一株細菌在空白組中的亮度數值，會得到以比值方式呈現的數據。

(二) 方法二：將單株細菌所有時間點之亮度數值標準化

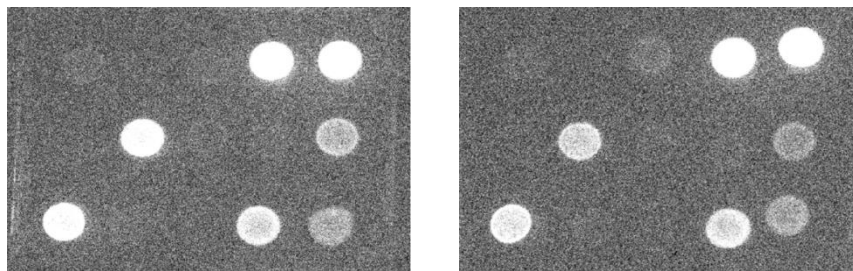
觀察 SM334 於四種抗生素中，600 分鐘內的亮度變化曲線(圖十四)，發現同種作用途徑抗生素中，細菌亮度對時間變化具相似性，因此嘗試將單株細菌所有時間點之亮度數值標準化來強化此特徵。



圖十四：SM334 於四種抗生素中亮度變化曲線
(圖十四資料來源:研究者繪製)

(三) 方法三：將單一時間點中 14 株細菌之原始亮度數值標準化

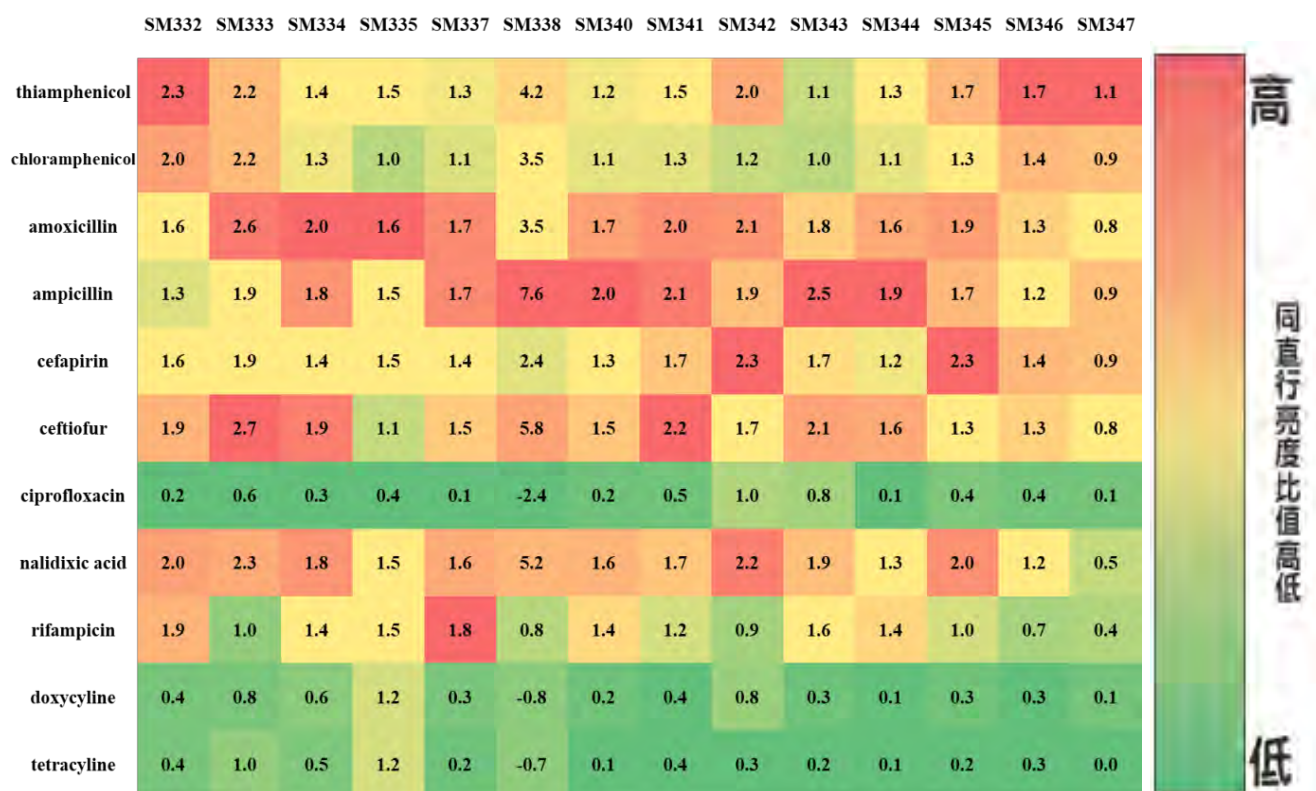
下圖為 14 株細菌(加 *super recA*)於 ampicillin 中，180 分鐘時，兩次重複之照片(圖十五)，發現在相同抗生素環境中 14 株細菌亮度在不同次實驗重複結果皆有類似的亮度大小關係，因此嘗試將單一時間點中 14 株細菌之原始亮度數據標準化來強化此特徵。



圖十五：180 分鐘時，SM334 於 ampicillin 中兩次重複之照片
(圖十五資料來源:研究者拍攝)

【細菌亮度資料與抗生素作用途徑的關係】

因本實驗的數據量極為龐大，僅將 300 分鐘時，各株細菌於各抗生素中，以方法一(將數據點的亮度數值除以對應的空白組發出的亮度)處理的比值資料呈現(表五)。



表五：300 分鐘時，各株細菌於各抗生素中，以方法一處理的比值資料
(表五資料來源:研究者繪製)

由(表五)我們可以很清楚的觀察到，每種抗生素都有其特殊的顏色分布，稱為圖型 (Pattern)。本實驗所選用之抗生素可根據其抑制細菌生長的途徑分為不同作用途徑類別 (如表一)，而舉差異十分明顯的 SM347 細菌作為分析舉例可見相同作用途徑類別的亮度也相似，如 Penicillines 類其比值皆為 1.7，Cephalosporin 類為 1.4、1.5，Phenicols 類為 1.1、1.3，Tetracyclines 類為 0.3、0.2。符合先前提到，同類別有相同亮度變化之預測。

三、 利用機器學習分類抗生素資料庫數據

本研究以機器學習中，多重類別決策樹系(Multiclass Decision Forest)演算法訓練抗生素辨識模型，並使用交叉驗證(cross-validation)對模型進行準確度測試。

【利用抗生素資料庫和機器學習訓練與測試分類模型】

(一) 選定機器學習的辨識目標

本實驗所選用之抗生素可根據其抑制細菌生長的途徑分為不同作用途徑類別(如表一)，因此訓練模型時可選擇未分類的單一抗生素種類(如 Amoxicillin, Ampicillin)作為辨識目標，或以分類後的抗生素作用途徑類別(如 Penicillins)作為辨識目標。

若選擇單一抗生素種類為辨識目標，並以單株細菌所有時間點之亮度數值標準化的數據(420 分鐘時)作為參數訓練抗生素辨識模型。訓練結果之混淆矩陣如(圖十六)，其整體準確度為 50%。

若選擇抗生素的作用途徑類別為辨識目標，並以單株細菌所有時間點之亮度數值標準化的數據(420 分鐘時)作為參數訓練抗生素辨識模型。訓練結果之混淆矩陣如(圖十七)，其整體準確度為 71%。

	amx	amp	blank	cep	cef	chl	cip	dcy	na	rim	tcy	thl
amoxicillin	0.3	0.1			0.1					0.4		
ampicillin		0.3	0.1	0.1	0.1				0.1			0.1
blank	0.3		0.3	0.1		0.3						
cefapirin			0.1	0.7	0.1							
ceftiofur			0.1		0.7	0.1						
chloramphenicol	0.1	0.1	0.1		0.1	0.3						0.1
ciprofloxacin							1.0					
doxycycline							0.6				0.4	
nalidixic acid		0.3						0.4			0.1	0.1
rimfampicin									1.0			
tetracycline						0.3				0.7		
thiamphenicol		0.3							0.1		0.1	0.4

圖十六：以抗生素種類為辨識目標之混淆矩陣
(圖十六資料來源:研究者繪製)

	penicillins	blank	cephalosporin	phenicols	ciprofloxacin	nucleic acid	tetracyclines
amoxicillin	0.3		0.1	0.1		0.4	
ampicillin	0.9		0.1				
blank	0.3	0.3	0.1	0.3			
cefapirin			1.0				
ceftiofur			0.9		0.1		
chloramphenicol	0.3		0.4	0.3			
thiamphenicol	0.4	0.1		0.4			
ciprofloxacin				0.1	0.7	0.1	
nalidixic acid	0.3					0.7	
rimfampicin						1.0	
doxycycline							1.0
tetracycline							1.0

圖十七：以抗生素類別為辨識目標之混淆矩陣
(圖十七資料來源:研究者繪製)

比較(圖十六)、(圖十七)，可知以抗生素作用途徑類別為辨識目標時，其整體準確度顯著較高。原因為本實驗使用之檢測細菌發光原理是對壓力刺激產生反應，而相同作用類別抗生素對細菌造成之壓力類別也會相似，其亮度變化資料亦會相似，符合【細菌亮度資料與抗生素作用途徑的關係】觀察之結果。因此若對單一抗生素進

行辨識容易對模型造成混淆，因此本系統選擇較適合此組檢測細菌之抗生素作用類別為檢測、模型辨識目標。

(二) 三種資料處理方法，對訓練辨識模型的影響

分別以三種資料處理方法(將資料點的亮度數值除以對應的空白組發出的亮度、將單株細菌所有時間點之亮度數值標準化、將單一時間點中 14 株細菌之原始亮度數值標準化)之數據(420 分鐘)作為參數，以預測抗生素的類別為辨識目標，訓練抗生素辨識模型。三者訓練結果之混淆矩陣分別如(圖十八)、(圖十九)、(圖二十)，其整體準確度分別為 68%、71%、71%。

	penicillines	blank	cephalosporin	phenicols	ciprofloxacin	nucleic acid	tetracyclines
amoxicillin	0.7			0.3			
ampicillin	0.9		0.1				
blank		0.3	0.3	0.1		0.1	
cefapirin		0.1	0.4	0.1			0.1
ceftiofur			0.9			0.1	
chloramphenicol		0.1		0.7		0.1	
thiamphenicol	0.1			0.7		0.1	
ciprofloxacin					1.0		
nalidixic acid	0.3			0.3		0.6	
rimfampicin	0.4	0.1	0.1	0.1		0.1	
doxycycline							0.9
tetracycline			0.1				0.9

	penicillines	blank	cephalosporin	phenicols	ciprofloxacin	nucleic acid	tetracyclines
amoxicillin	0.3		0.1	0.1		0.4	
ampicillin	0.9		0.1				
blank	0.3	0.3	0.1	0.3			
cefapirin			1.0				
ceftiofur			0.9		0.1		
chloramphenicol	0.3		0.4	0.3			
thiamphenicol	0.4	0.1		0.4			
ciprofloxacin				0.1	0.7	0.1	
nalidixic acid	0.3					0.7	
rimfampicin						1.0	
doxycycline							1.0
tetracycline							1.0

	penicillines	blank	cephalosporin	phenicols	ciprofloxacin	nucleic acid	tetracyclines
amoxicillin	0.4		0.3	0.1		0.1	0.1
ampicillin	0.9					0.1	
blank		0.6	0.3	0.1			
cefapirin		0.3	0.4	0.1	0.1		
ceftiofur			0.7				
chloramphenicol		0.3	0.1	0.6			
thiamphenicol	0.1			0.9			
ciprofloxacin					1.0		
nalidixic acid						1.0	
rimfampicin				0.6	0.1	0.1	0.1
doxycycline				0.1			0.9
tetracycline							1.0

圖十八：以方法一處理之混淆矩陣
(圖十八資料來源:研究者繪製)

圖十九：以方法二處理之混淆矩陣
(圖十九資料來源:研究者繪製)

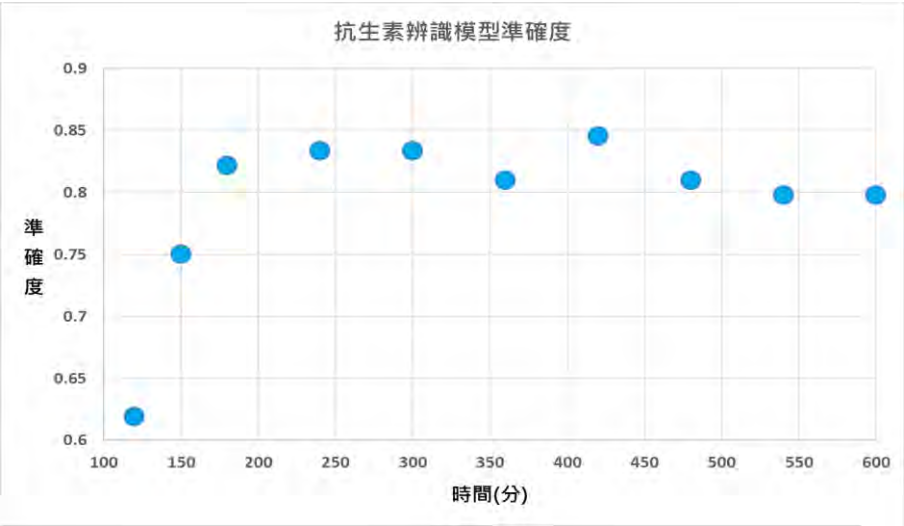
圖二十：以方法三處理之混淆矩陣
(圖二十資料來源:研究者繪製)

分別以三種資料處理方法訓練的模型對不同種類的抗生素辨識上各有優缺。方法一能對 Penicillines 類別有較高準確度，而方法二則對 Cephalosporins 與 Nucleic Acid 類有較高準確度，方法三對 Phenicols 與 Nalidixic Acid 準確度較高。若同時以三種資料處理方法一起訓練模型(共 $14 \times 3 = 42$ 個參數)，結果顯示機器學習能夠自動綜合各自優點，提升整體準確度至 85%(圖二十一)。

(三) 不同反應時間與準確度的關係

使用不同反應時間點的細菌亮度資料訓練抗生素辨識模型。其準確度對使用之資料時間點關係圖如(圖二十一)。結果顯示，以三小時至八小時的資料點，以三種

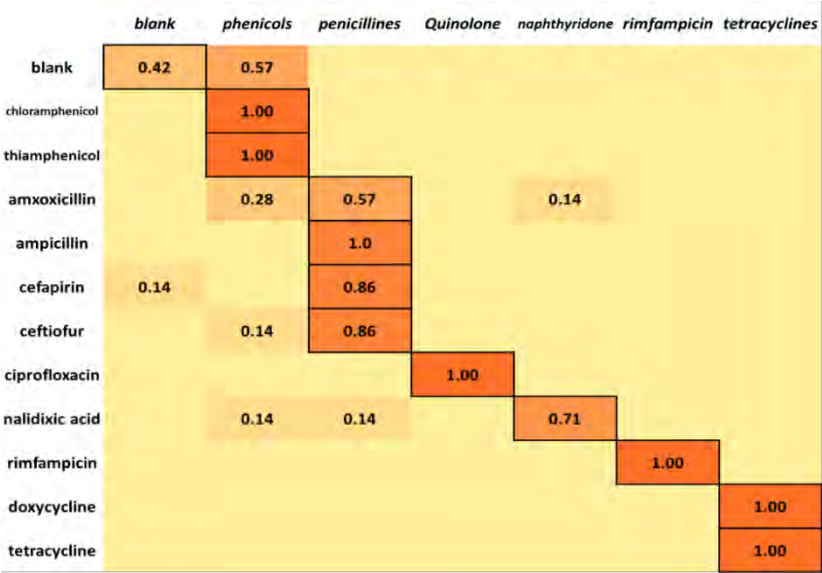
資料處理方法一起訓練模型，結果顯示檢測準確度皆維持在 80%~85%之間。為了符合快速篩檢的目的，本研究選用反應時間三小時之資料點做為目標檢測時間。



圖二十一：準確度與資料時間點關係圖
(圖二十一資料來源:研究者繪製)

(四) 分類類別調整

進一步探討發現 Cephalosporins(包含 Cefapirin/Ceftiofur)和 Penecillins(包含 Ampicillin/Amoxicillin)作用途徑皆為藉由抑制 DD-transpeptidase 來阻礙細菌細胞壁合成，可統一歸類 β -lactams 抗生素。兩者之差異只在於 Cephalosporins 較不易被細菌之抗藥性蛋白 β -lactamase 降解，但因選擇之反應時間只有三小時，此現象較不明顯。因此調整分類類別使兩者皆歸類為 β -lactams 作用途徑類別抗生素。反應時間三小時訓練結果之混淆矩陣如(圖二十二)，整體準確度提升至 86.8%。



圖二十二
分類類別調整後之混淆矩陣
(圖二十二資料來源:研究者繪製)

(五) 以二分法模行進行優化

三小時反應時間訓練混淆矩陣(圖二十二)顯示，未添加抗生素(blank)的空白組易呈現偽陽性，被模型誤判為含有 phenicols 類抗生素，因此使用二分法模型進一步單獨對 blank 和 phenicols 進行第二次模型訓練和辨識來提升整體辨識準確率。訓練結果之混淆矩陣(圖二十三)，整體準確度提升至 90.4%，並大幅降低對 Phenicols 類別之偽陽性。此模型極為本研究選用之最終抗生素類別辨認模型。

	<i>blank</i>	<i>phenicols</i>	<i>penicillines</i>	<i>Quinolone</i>	<i>naphthyridone</i>	<i>rimfampicin</i>	<i>tetracyclines</i>
blank	0.86	0.14					
chloramphenicol		1.00					
thiamphenicol		1.00					
amxoxicillin		0.28	0.57		0.14		
ampicillin			1.0				
cefapirin	0.14		0.86				
ceftiofur		0.14	0.86				
ciprofloxacin				1.00			
nalidixic acid		0.14	0.14		0.71		
rimfampicin						1.00	
doxycycline							1.00
tetracycline							1.00

圖二十三：二分法模行優化後之混淆矩陣

(圖二十三資料來源:研究者繪製)

四、 架設恆溫系統

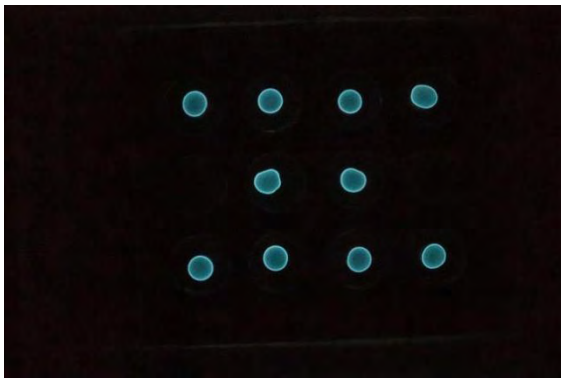
【測試恆溫系統】

恆溫系統架設完成後，為確保其溫度均勻，我們使用紅外線熱像儀拍攝玻璃的溫度，於周圍外加保麗龍後，發現玻璃中間放置培養皿之處，溫度十分均勻，皆在 36.5 度至 37.5 度之間。但為確保恆溫系統內所有環境條件皆一致，設計以下實驗。

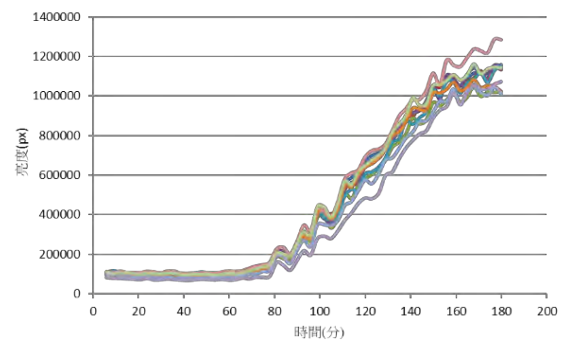


圖二十四：玻璃在紅外線攝像儀下溫度十分均勻
(圖二十一資料來源:研究者拍攝)

細菌使用 *super recA*，每一滴細菌 5 μ l，細菌濃度 2.0OD，曝光時間 10 秒，養於恆溫裝置，自點下細菌起開始拍攝至 180 分鐘，使用 Ciprofloxacin 濃度 25ppb，於養菌盤內各個位置滴菌(如圖二十五)。實驗結果如(圖二十六)，每一條線皆代表一個細菌點。



圖二十五：細菌位置分布情形
(圖二十五資料來源:研究者拍攝)



圖二十六：細菌於相同濃度 CIP
在恆溫裝置中亮度變化
(圖二十六資料來源:研究者繪製)

五、 【利用恆溫系統與資料庫分類抗生素】

將 14 株細菌，每一滴細菌 5 μ l，細菌濃度 2.0OD，分別滴於三大類抗生素的代表，Ampicillin、Ciprofloxacin 與 Tetracycline 中，另外再做不含抗生素的對照組 4 組，以作為當次實驗的基準。以 STF-8300 曝光 30 秒，養於恆溫裝置，拍攝自點下細菌起 180 分鐘之相片。將實驗所得數據以三種方法處理，放入最終模型內，分別辨識出三種代表性抗生素類別為 Penicillines、Quinolones 與 Tetracyclines，皆為正確之分類。

陸、討論

一、 在【抗生素濃度對細菌亮度的影響】中，細菌亮度對時間圖(圖九)代表的意義。

根據結果，在 120 到 240 分鐘內，五種 CIP 濃度中細菌在 25ppb 時亮度最高，而 75ppb-25ppb 中濃度越低亮度越暗，然而 140 分鐘後 100ppb 之亮度始低於 200ppb。我們推測過高的濃度會提高細菌偵測效率或抑制細菌活性，在兩者交互影響之下，100ppb 濃度不但抑制了細菌的活性，同時無法有效提升偵測效率，故亮度在 140 分鐘後始低於 200ppb。所有資料線皆有明顯之轉折下降點(峰值)，其中 25/50/75ppb 隨濃度降低，峰值出現時間越晚，且峰值越高。因此我們得知，抗生素濃度會影響細菌發光情形，而峰值則是一個重要指標。

二、 在【細菌量對細菌亮度的影響】中，細菌密度造成亮度趨勢差異(圖十、十一)所代表的意義。

細菌密度 2.0OD 時，五個濃度皆可見到明顯之峰值，且濃度越低峰值出現之時間越晚。峰值之亮度中最大值為 20ppb，其餘依序為 10ppb、30ppb、40ppb、50ppb。在抗生素濃度 20~50ppb 中細菌亮度差距十分明顯，可為檢測之目標濃度範圍，其中最明顯的指標可為峰值及其出現之時間。

細菌密度 0.4OD 時，細菌亮度皆十分接近。2.0OD 細菌在 300 分鐘內皆已表現出所有峰值，但 0.4OD 者卻皆無達到峰值，代表細菌與抗生素交互作用較慢，因此日後實驗皆選擇較濃 2.0OD 的細菌濃度。

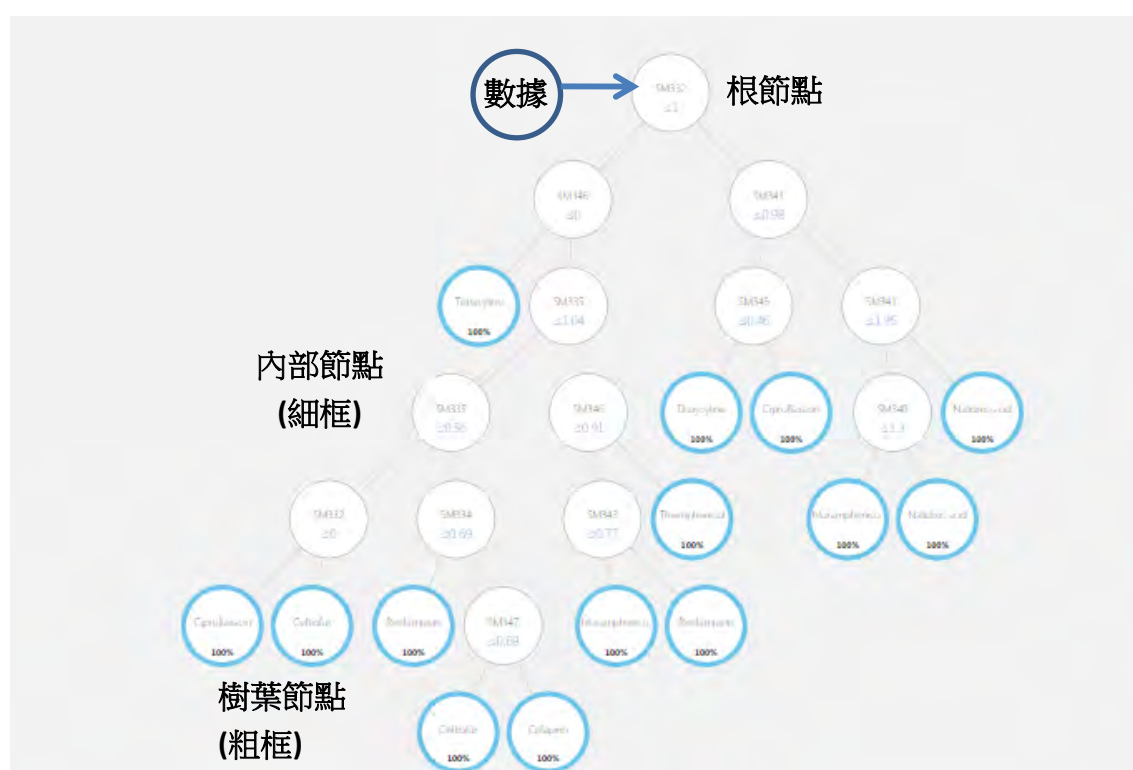
三、【利用抗生素資料庫和機器學習訓練與測試分類模型】中多重決策樹系演算法的意義和合理性。

(一) 決策樹系簡介:

決策樹系演算法藉由大量的已知數據訓練建構出多棵決策樹，類似樹狀圖，從中歸納出自變數與應變數之間人眼無法輕鬆分辨的隱藏規則，對未知的數據進行預測。

(二) 決策樹系原理:

每一顆決策樹由根節點開始分枝出大量的內部節點，每遇到一個內部節點對自變數中其中一個參數進行一次二分法分類，經過大量的節點各個參數進行數次分類後，最終於決策樹系頂端的樹葉節點得到該筆數據各種可能的對應分類機率（如圖二十七）。綜合每一顆決策樹分類結果得到最終的決策樹系模型進行測試和改進。



圖二十七:決策樹系原理
(圖二十七資料來源:研究者繪製)

(三) 決策樹系合理性:

實際上決策樹系的原理可視為進行極大量次類似【細菌亮度資料與抗生素作用途徑的關係】中 SM347 為例的分類。討論四中針對一株細菌已可初步分類抗生素，若進行更多次的分類應能增強分類的精細度和準確度，因此使用機器學習來完成人工無法輕易多次分類行為應為合理的資料處理方法。

(四) 決策樹系模型測試與選擇:

訓練模型時採用準確度(accuracy)作為訓練模型的評價依據，從中選出準確度最佳的模型作為最終訓練結果，並以測試集測試分析訓練出的最終模型。

四、 【利用抗生素資料庫和機器學習訓練與測試分類模型】中使用交叉驗證測試模型的原理與意義

將資料依實驗重複分為七筆，一次將六筆資料作為訓練集訓練模型，剩餘一筆資料作為測試集評估模型準確度，共重複七次使每一筆資料皆曾作為測試集，將七次訓練的測試結果綜合後作為整體模型準確度。若不將資料分為訓練集和測試集，易發生過適現象，雖然訓練結果對於本身訓練集可得到更高的準確度，但實際上是因為模型記下了資料的數值而非找出資料的相似性，對於未知資料將不具預測性，稱為過適(overfitting)。因此使用交叉驗證將互相獨立的實驗資料分為訓練集和測試集可有效避免過適現象，同時重複可使每一筆資料皆曾作為測試集可最大化分析每一次實驗的數據。

五、 【利用抗生素資料庫和機器學習訓練與測試分類模型】辨識模型對七次實驗外數據辨識的可行性:

討論四提到辨識模型可能具有過適現象，意即模型可能只是記下七筆資料而非真正尋找出資料中的特徵，因此無法對七筆實驗資料外的數據進行辨識。本實驗計算出每一種抗生素每一株細菌的平均值和標準差，利用標準常態分布的機率隨機產

生每種抗生素 1000 筆模擬資料測試模型，其測試結果的混淆矩陣如圖，整體準確率達 87.8%，接近【利用抗生素資料庫和機器學習訓練與測試分類模型】中利用七筆實驗數據測試得之 90.4%(圖二十八)，可見本模型不具過適現象，可正確地針對七筆實驗數據外之數據進行辨識檢測。

	<i>blank</i>	<i>phenicols</i>	<i>beta lactam</i>	<i>Quinolone</i>	<i>naphthyridone</i>	<i>rimfampicin</i>	<i>tetracyclines</i>
blank	0.74	0.24	0.01				
chloramphenicol		0.63	0.37		0.01		
thiamphenicol	0.01	0.94	0.06				
amxoxicillin		0.02	0.52	0.01	0.24	0.19	
ampicillin			1.00				
cefapirin	0.01	0.24	0.74				
ceftiofur			1.00				
ciprofloxacin				1.00			
nalidixic acid					0.98	0.02	
rimfampicin				0.01		0.99	
doxycycline							1.00
tetracycline							1.00

圖二十八: 常態分布模擬數據測試混淆矩陣
(圖二十八資料來源:研究者繪製)

六、【利用恆溫系統與資料庫分類抗生素】中可攜式抗生素辨識系統的可用性

結果顯示，10 株細菌當中，發光的情形幾乎一樣，這表示其生長環境也都一樣，因此此恆溫系統內的環境一致。使用養於恆溫裝置內之細菌所得到之資料，放入最終模型進行辨識，能得到正確之結果。代表此可攜式抗生素辨識系統已能成功使用。

七、 本系統相對目前使用中的其他抗生素檢驗方式之優勢

(一) 質譜儀

使用質譜儀檢測抗生素為現今政府機關檢測用藥並開罰的法規標準，但是其儀器貴重，成本非常的高，且其不具備可攜式的特性。本研究旨非取代質譜儀，而是提出一種快速簡便且準確地初步篩檢抗生素的方法，篩檢出可能具有抗生素的樣本及其抗生素種類，再送至質譜儀進行法規上的判定。

(二) 酵素抗體免疫篩檢法(ELISA)

市面上常用的抗生素初步篩檢方法為酵素抗體免疫篩檢法(ELISA)，其最大缺點在於只能針對樣本中的抗生素進行一對一辨識。若我們知道樣本中有抗生素 A，只要使用與其相對應的抗體 A 便可快速使用 ELISA 進行篩檢。但在一般情況下我們並不會知道樣本中有的的是哪一種抗生素，便需要使用各種抗體一一進行檢測，如此變得十分昂貴又耗時。然而本研究的生物檢測方法只需要一次檢測，一張照片便能藉由比較資料庫知道樣本中擁有的抗生素是哪一類別，明顯較具方便性。同時每種抗生素需相對應的抗體來檢測，對於一些尚未製造出抗體的新抗生素便無法使用。而本研究之系統具備簡易擴充性，若需要收集新型抗生素之資料並納入資料庫，只需要七次實驗便能建立資料庫，顯然較方便。而對於本研究之裝置其辨識原理是針對抗生素的作用途徑進行辨識。因此我們不需對所有抗生素進行資料庫建立，只需建立同一類別中的代表性抗生素，對於其他抗生素，系統能利用與資料庫中同途徑之的抗生素資料來進行辨識。本研究確實也在 Tetracyclines 和 Penicillins 作用類別抗生素中觀察到此現象。

八、 未來展望

本研究旨在推廣恆溫攝影裝置和抗生素資料庫方法的使用，且此方法的優勢之一在於資料庫的擴充性十分自由，因此期望更多的研究人員能使用此方法持續擴增檢驗更多種類、濃度與多重組合的抗生素，使系統能檢測的樣本目標範圍更大完善，並達成共享抗生素資料庫之願景。

柒、結論

一、 14 株細菌在 11 種抗生素中皆產生不同的亮度變化圖型,且相同作用機制抗生素亮度變化圖型也會相似。

二、 利用機器學習中決策樹系演算法以資料庫訓練抗生素預測模型,測試結果能快速簡易地依照作用機制辨識並分類樣本中未知的抗生素,並在三小時內達到高達 90%的準確率。

三、 利用 ITO 導電玻璃維持溫度,製作出可攜式拍攝裝置。

捌、參考資料及其他

- 一. Melamed,S ,Lalush,C , Elad,T Yagur-Kroll,S , Belkin,S , & Pedahzur,R (2012).A bacterial reporter panel for the detection and classification of antibiotic substances. Microbial biotechnology , 5(4) , 536-48. Doi: [10.1111/j.1751-7915.2012.00333.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00333.x)
- 二. Singh, Bhoj. (2015). Antibiotics: Introduction to Classification.
- 三. Machine Learning - Initialize Model – Classification
(<https://docs.microsoft.com/en-us/azure/machine-learning/studio-module-reference/machine-learning-initialize-model-classification>)
- 四. Ericicoding. (2018, January 24). Multiclass Decision Forest - Azure Machine Learning Studio. Retrieved March 12, 2019, from <https://docs.microsoft.com/en-us/azure/machine-learning/studio-module-reference/multiclass-decision-forest>
- 五. Sauvage E1, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis.FEMS Microbiol Rev. 2008 May;32(3):556. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x

【評語】 052207

1. 以不同大腸桿菌螢光反應偵測不同抗生素之探討。
2. 實驗內容充實，並能具體完成。
3. 建議進一步討論準確率是否符合國家標準之規定，則成果更有應用價值。

摘要

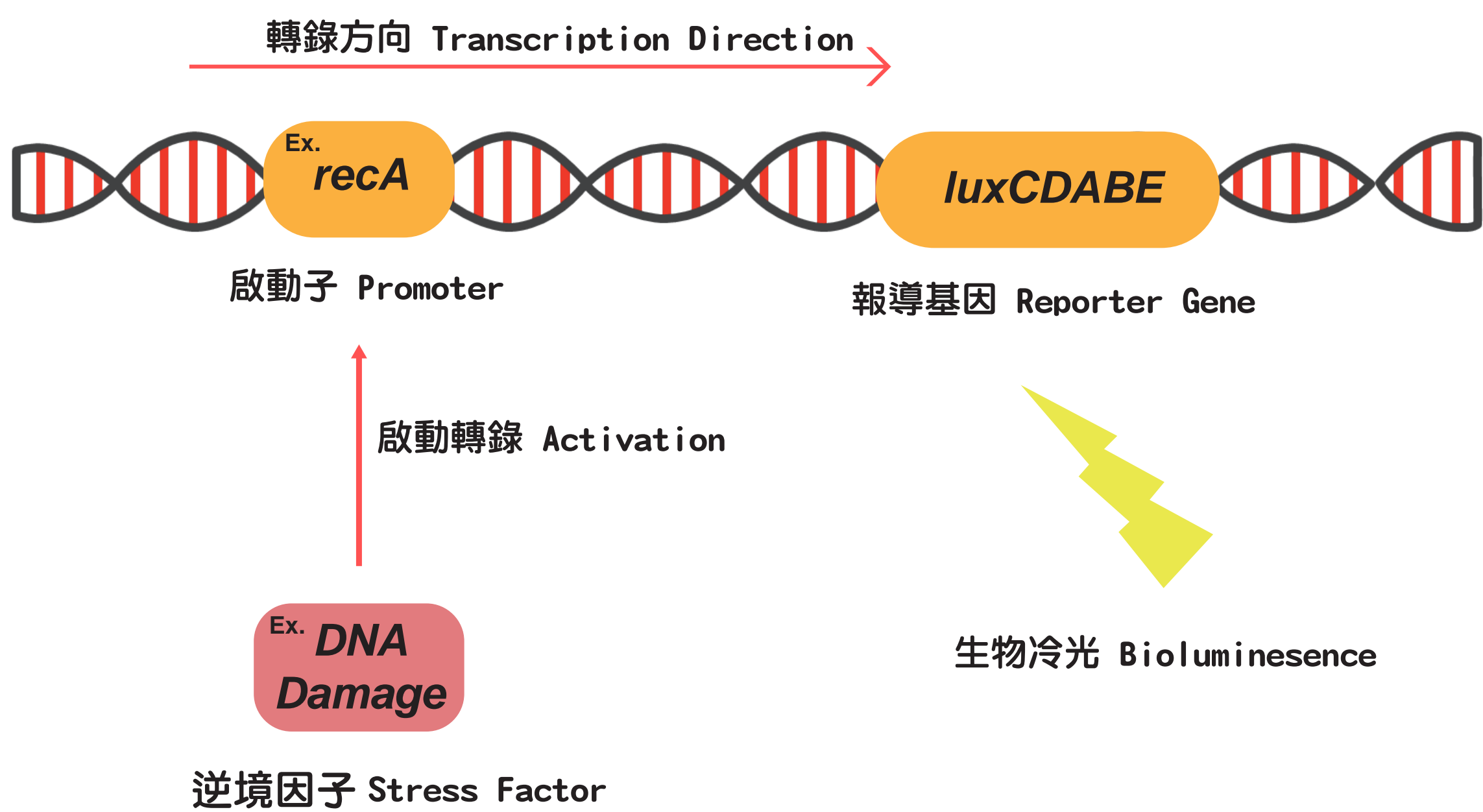
食品安全是現今台灣所面臨的一大問題, 其中抗生素是殘留於食品中一大危害物質。本研究欲製作一套使用生物檢測方法的可攜式抗生素辨識系統, 以簡易快速地初步辨識食品樣本中抗生素種類。本研究使用一間以色列實驗室提供的14株不同基改大腸桿菌，每株細菌受到不同壓力因子時會產生不同亮度的生物冷光。透過拍攝細菌在不同抗生素中冷光亮度，建立各株細菌在11種固定濃度1.5ppm的抗生素中亮度變化的數據資料庫，並利用機器學習訓練抗生素預測模型。測試結果顯示，此模型確實能快速簡易地依照作用機制檢測並分類樣本中未知的抗生素，且能在三小時內達到高達90%的準確率。對於較低且未知濃度的八種抗生素，利用機器學習以資料庫訓練抗生素預測模型，測試結果能在三小時內對七種抗生素達到500ppb的偵測下限，並進一步在十小時內達到125ppb，整體辨識準確率83%的偵測下限。未來將持續為此系統建立更大規模的資料庫，以辨識食品樣本中更多種類及濃度的抗生素。

壹、研究動機

食品安全是現在台灣所面臨的一大問題，而其中抗生素又是殘留於食品中一大危害物質。現今檢驗食品中抗生素的化學或物理性檢測方式，不但耗時又需要昂貴的高級設備，或只能針對已知的抗生素進行一對一檢測，因此本研究嘗試利用以色列實驗室提供的特殊基改細菌，製作出能簡易、快速的抗生素辨識系統，以「生物性方法」依照作用機制初步檢測並辨識食品中未知抗生素。

貳、研究背景

以14株特殊基改細菌進行生物檢測：



參、研究目的

利用14株特殊細菌在不同抗生素中亮度的變化，設計一套可攜式抗生素辨識系統，簡易、快速地初步檢測分析手上未知抗生素樣本。

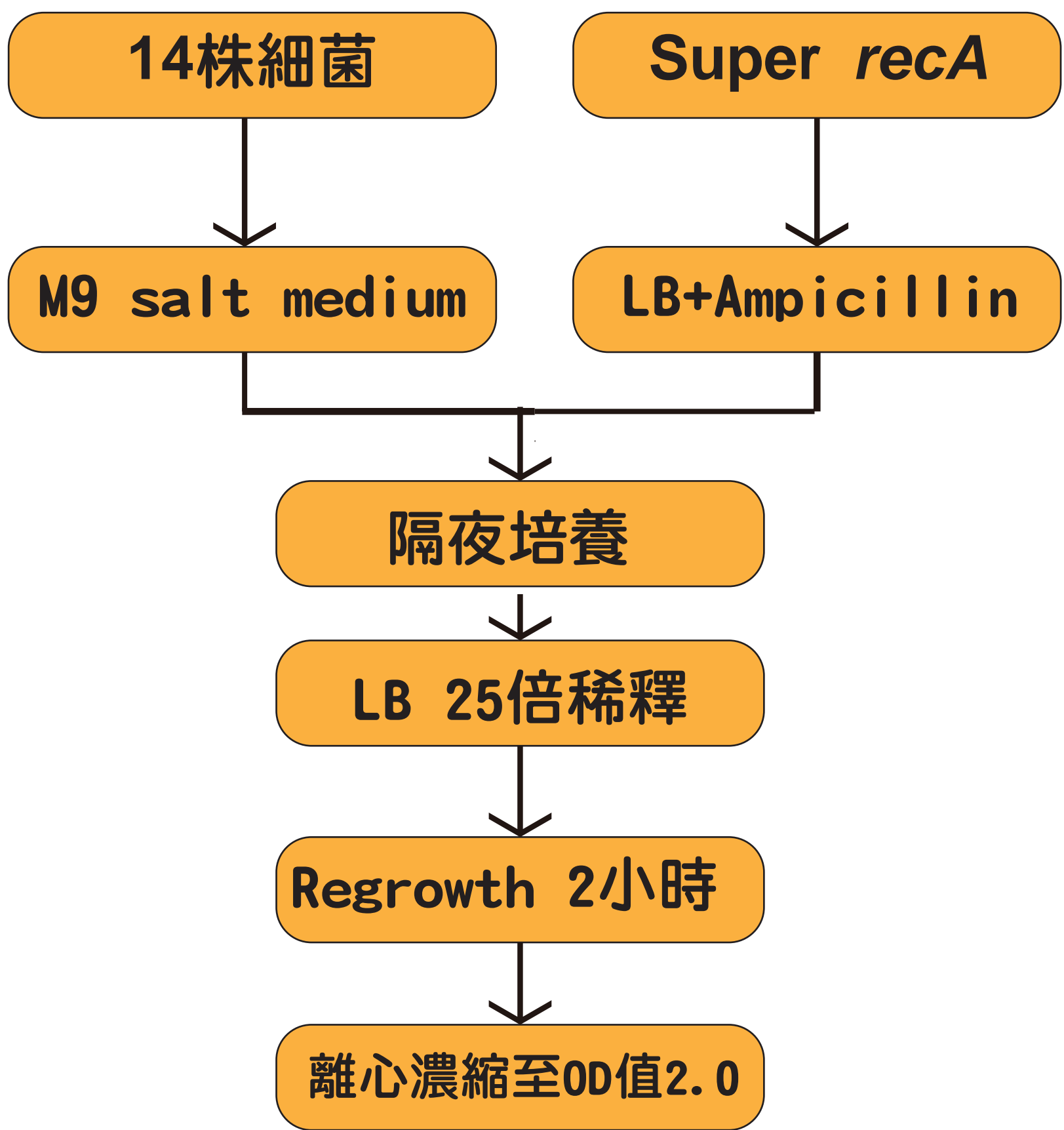
製作抗生素辨識系統分為下列三部分：

- (一) 收集不同抗生素對照組的大量資料庫
- (二) 利用機器學習訓練模型辨識分類樣本中抗生素種類
- (三) 製作可攜式、恆溫攝影裝置

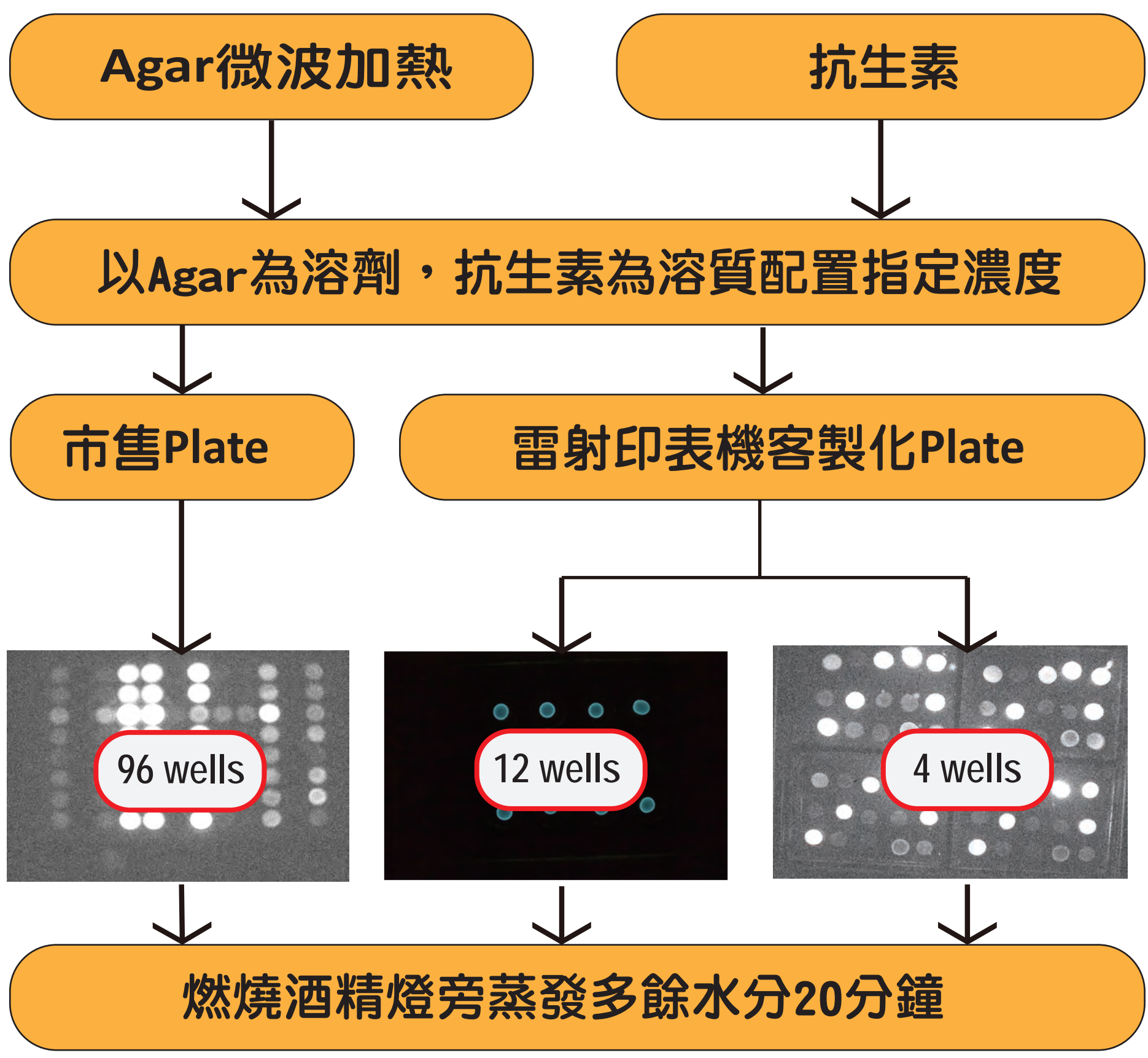
肆、研究過程及方法

(一) 製備細菌盤與培養基：

培養細菌：



製作培養基：

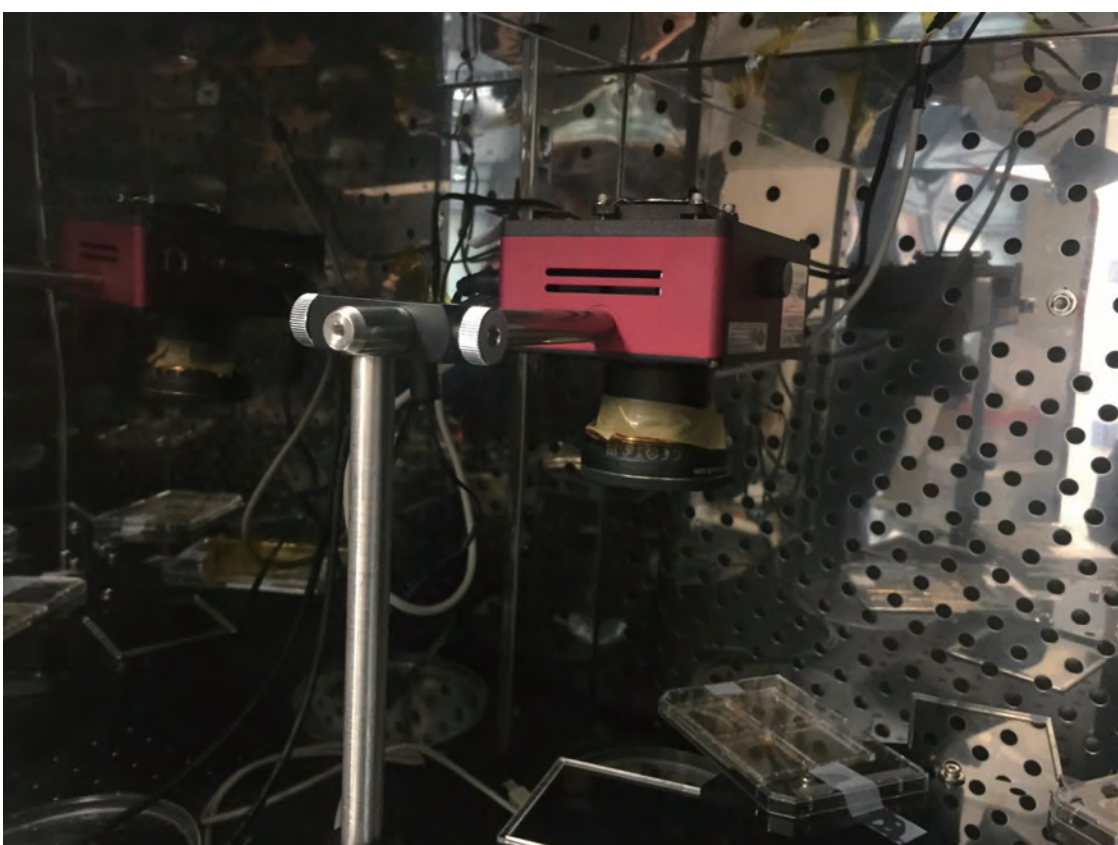


(二) 使用轉盤與培養箱收集大量數據：

為了提供未知抗生素比對的資料，因此本研究使用轉盤與培養箱收集大量數據來建立抗生素資料庫，記錄分析細菌受到各種抗生素刺激後發光的結果。



轉盤輪流拍攝四盤細菌盤
上蓋密封防風乾打洞透氣



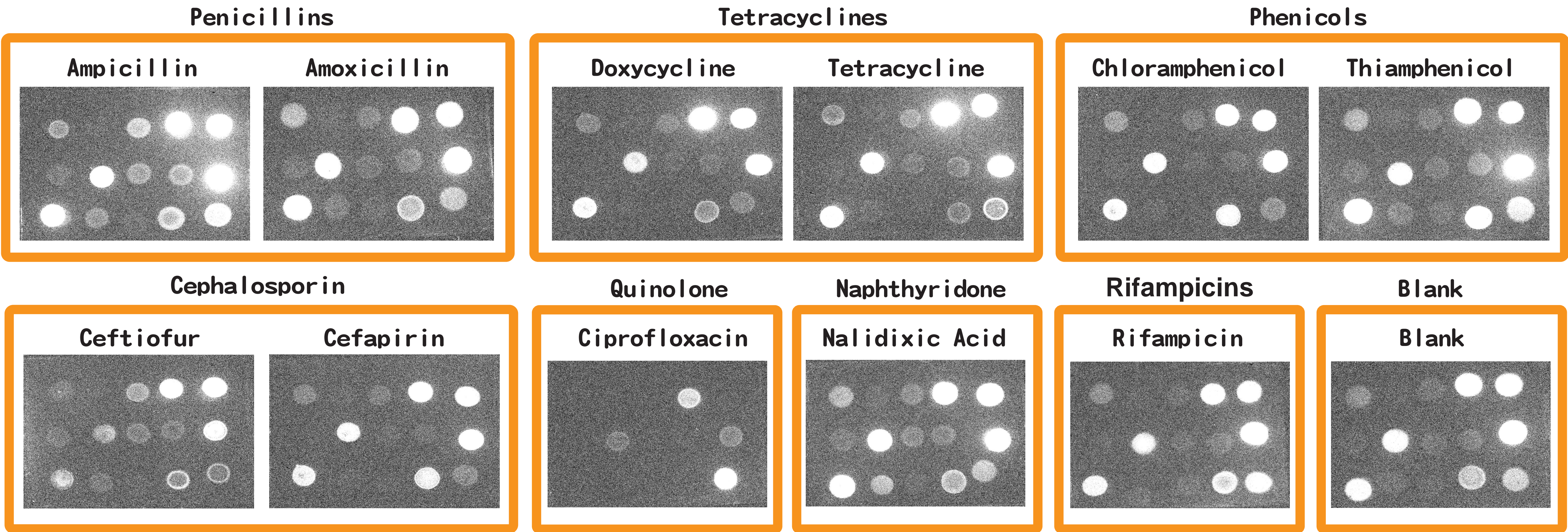
自動冷卻型相機 (STF-8300)
在37度培養箱中維持解析度



MatLab整合控制轉盤與相機
以OpenCV分析細菌亮度變化

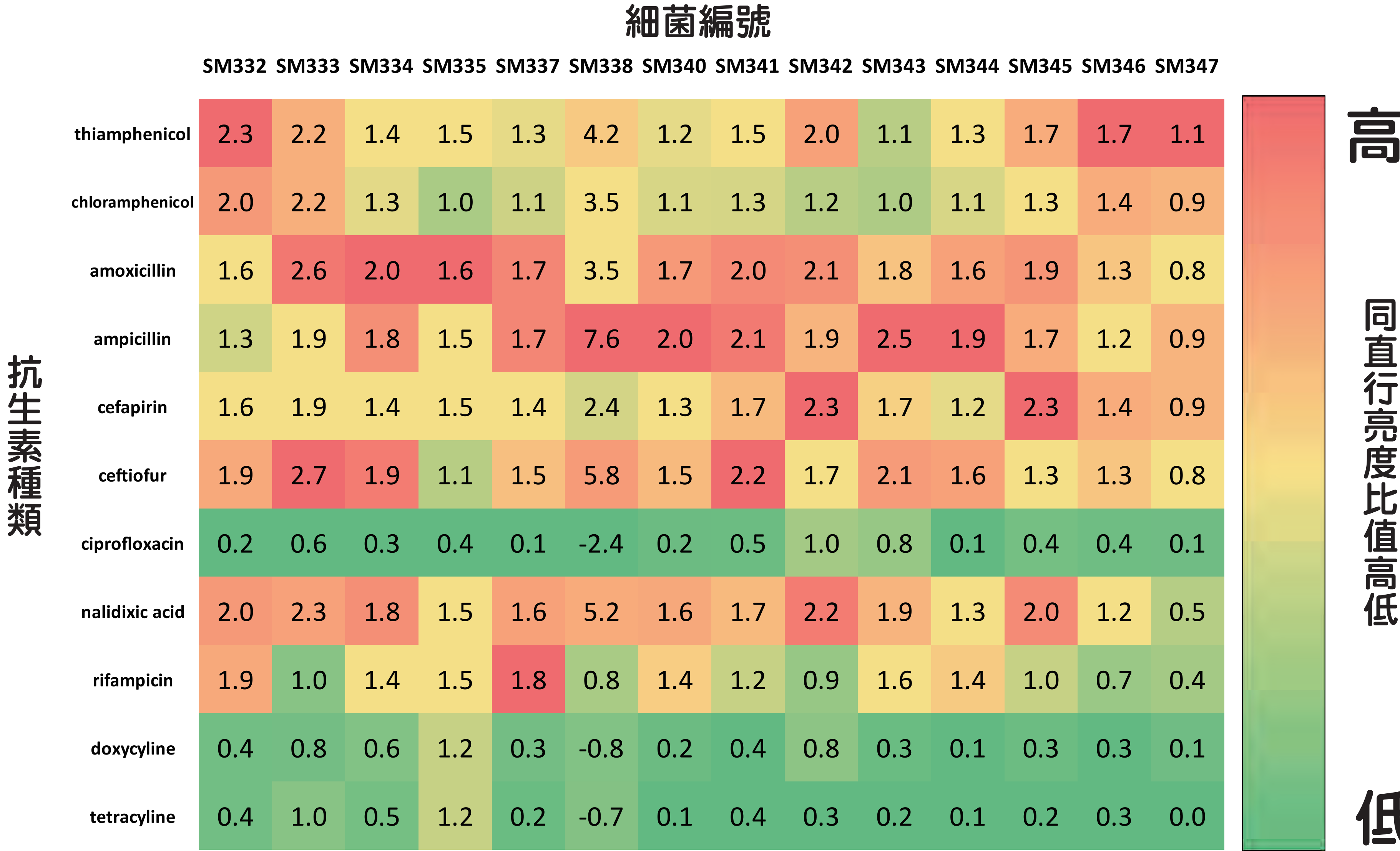
伍、研究結果

一、使用轉盤與培養箱收集的大量數據建立抗生素資料庫，每三分鐘拍攝一張共拍攝十小時。進行七次獨立實驗：



二、抗生素資料庫資料處理：(抗生素濃度1.5ppm 反應時間5小時)

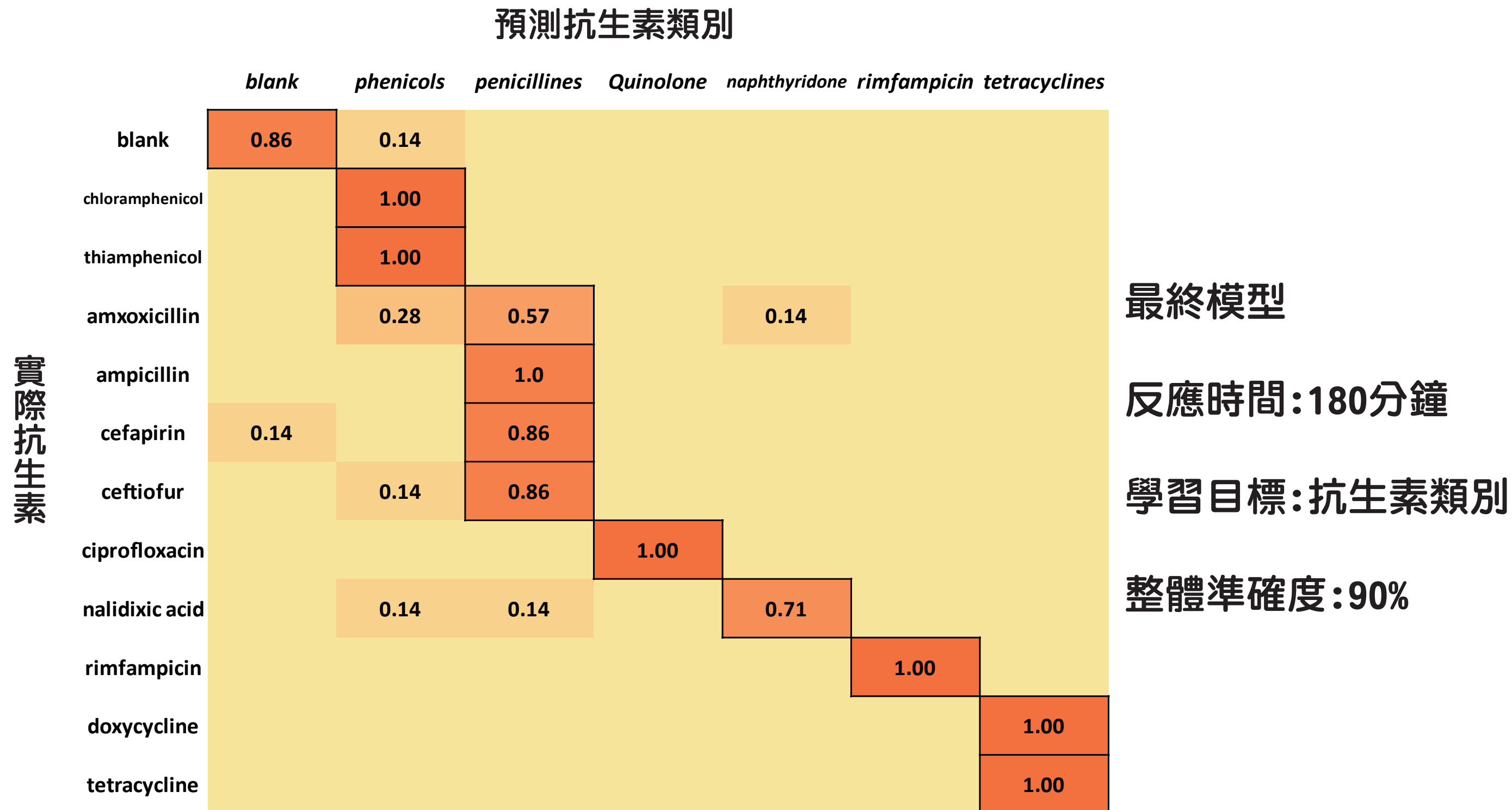
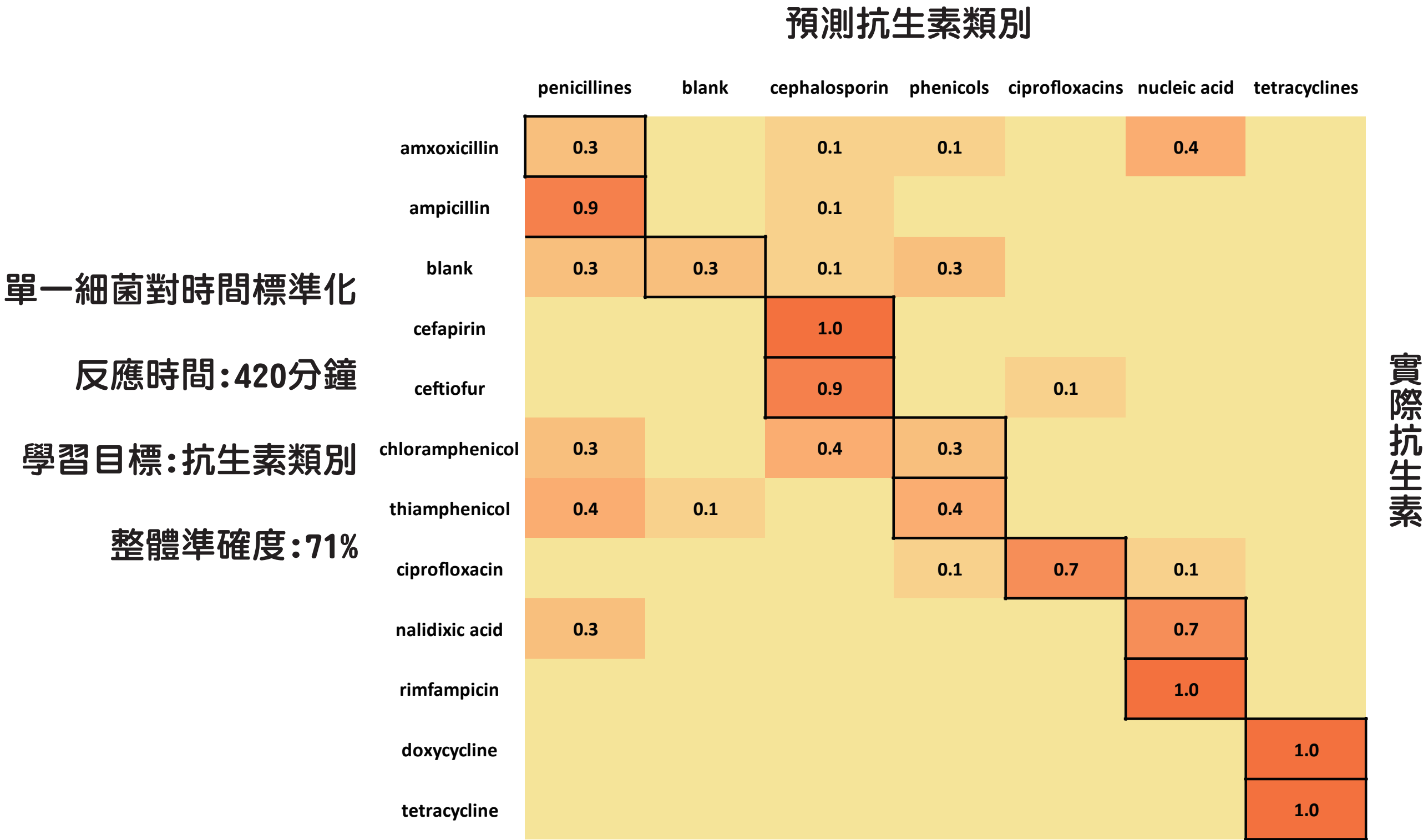
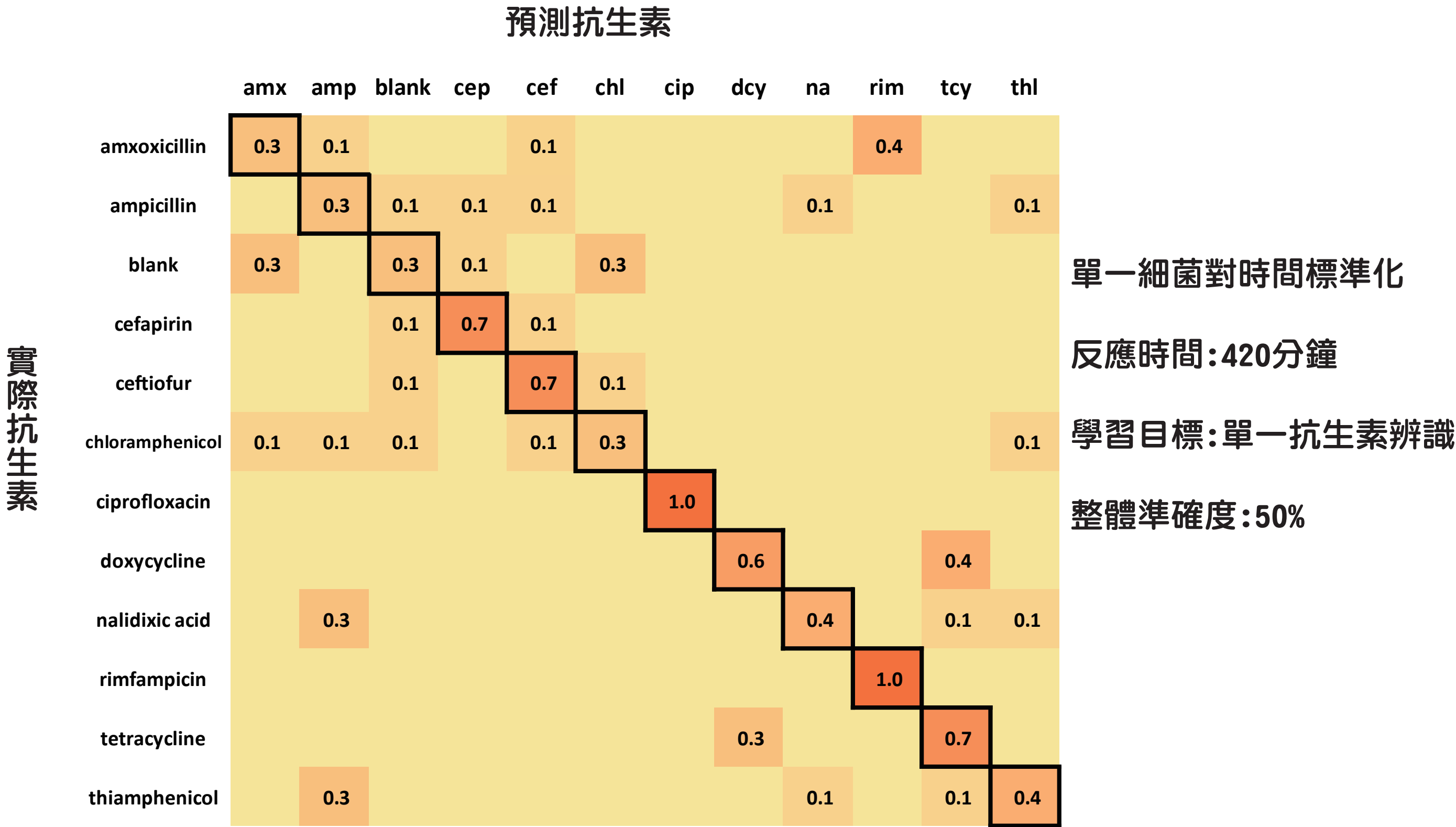
將14株細菌於不同抗生素中發出亮度原始數據除以同一時間點同一株細菌於空白組 (未添加抗生素) 中發出亮度得到比值，並對數據進行兩種標準化處理，分別強化細菌亮度對時間變化以及細菌間亮度大小關係兩特徵。



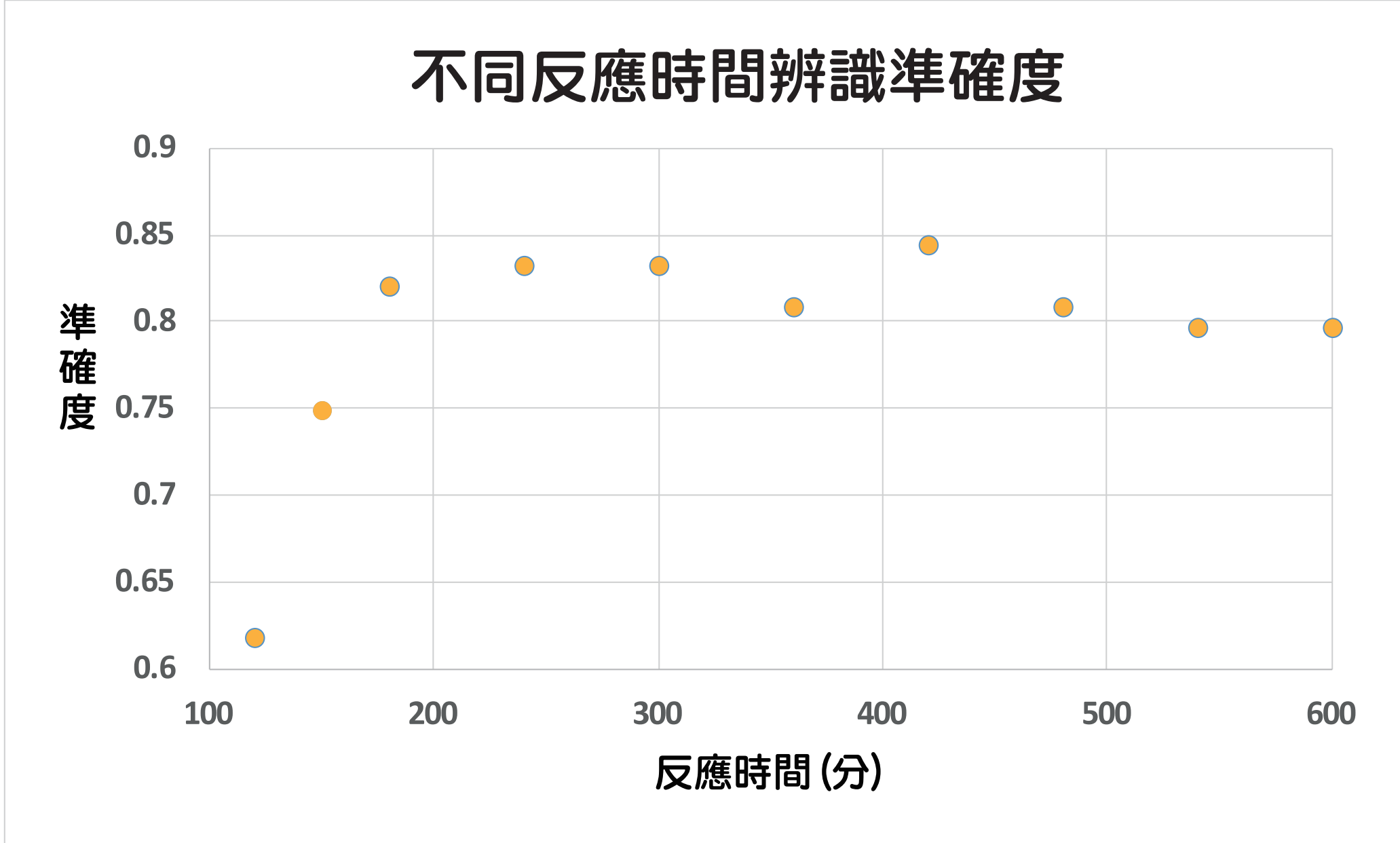
(抗生素濃度1.5ppm 反應時間3小時)

三、以機器學習訓練測試抗生素辨識系統：

將抗生素資料庫數據經過前處理後做為參數，以多重類別決策樹系 (Multiclass Decision Forest) 演算法訓練抗生素辨識模型，並使用交叉驗證 (cross-validation) 對模型進行準確度測試。

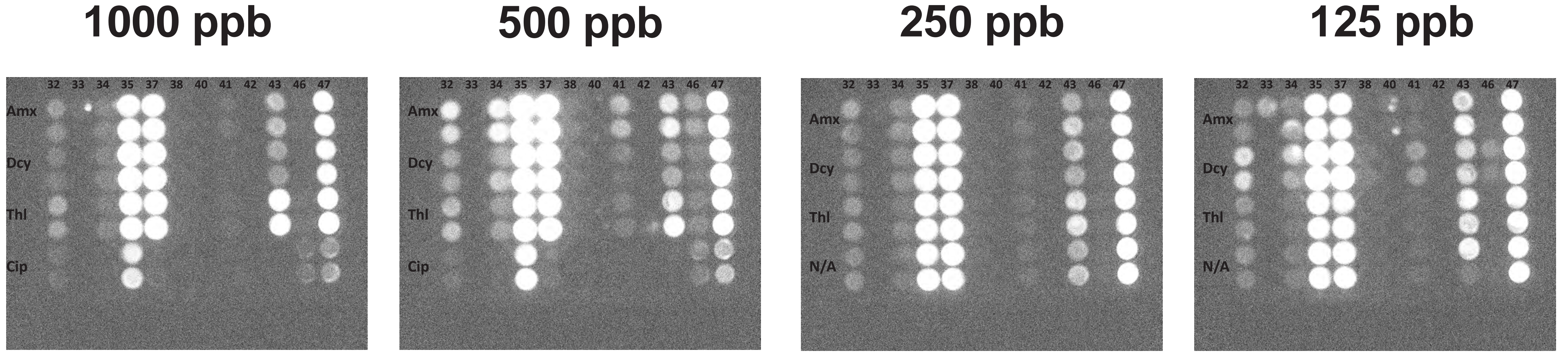


藉由改進資料前處理方法，同時針對不同的時間點進行模型健康度的測試和分類類別的調整，最終模型可在三小時以高達90%的整體準確度辨識濃度1. 5ppm的11種抗生素。



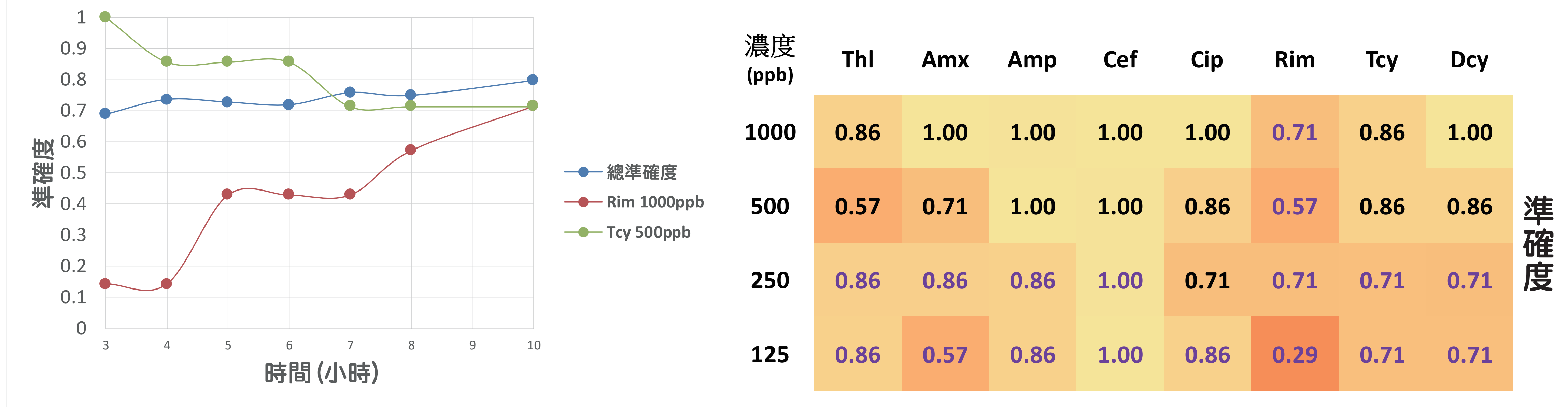
四、低濃度抗生素檢測與辨識

為確保抗生素檢測系統能正確辨識樣本中較低濃度的抗生素，因此本研究進一步選擇八種代表性抗生素建立四種較低濃度 (1000/500/250/125 ppb) 之抗生素資料庫，並以相同機器學習方式進行模型訓練與測試。

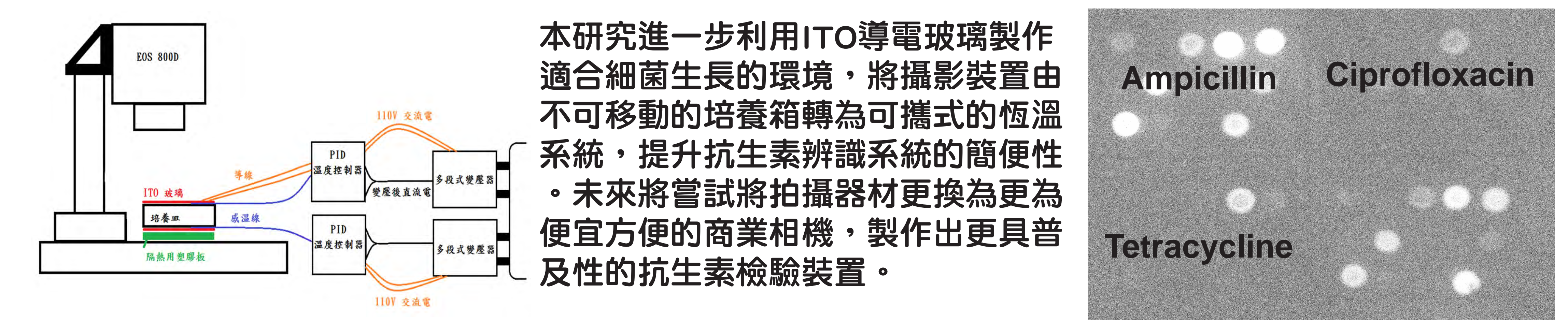


(四種抗生素 反應時間10小時)

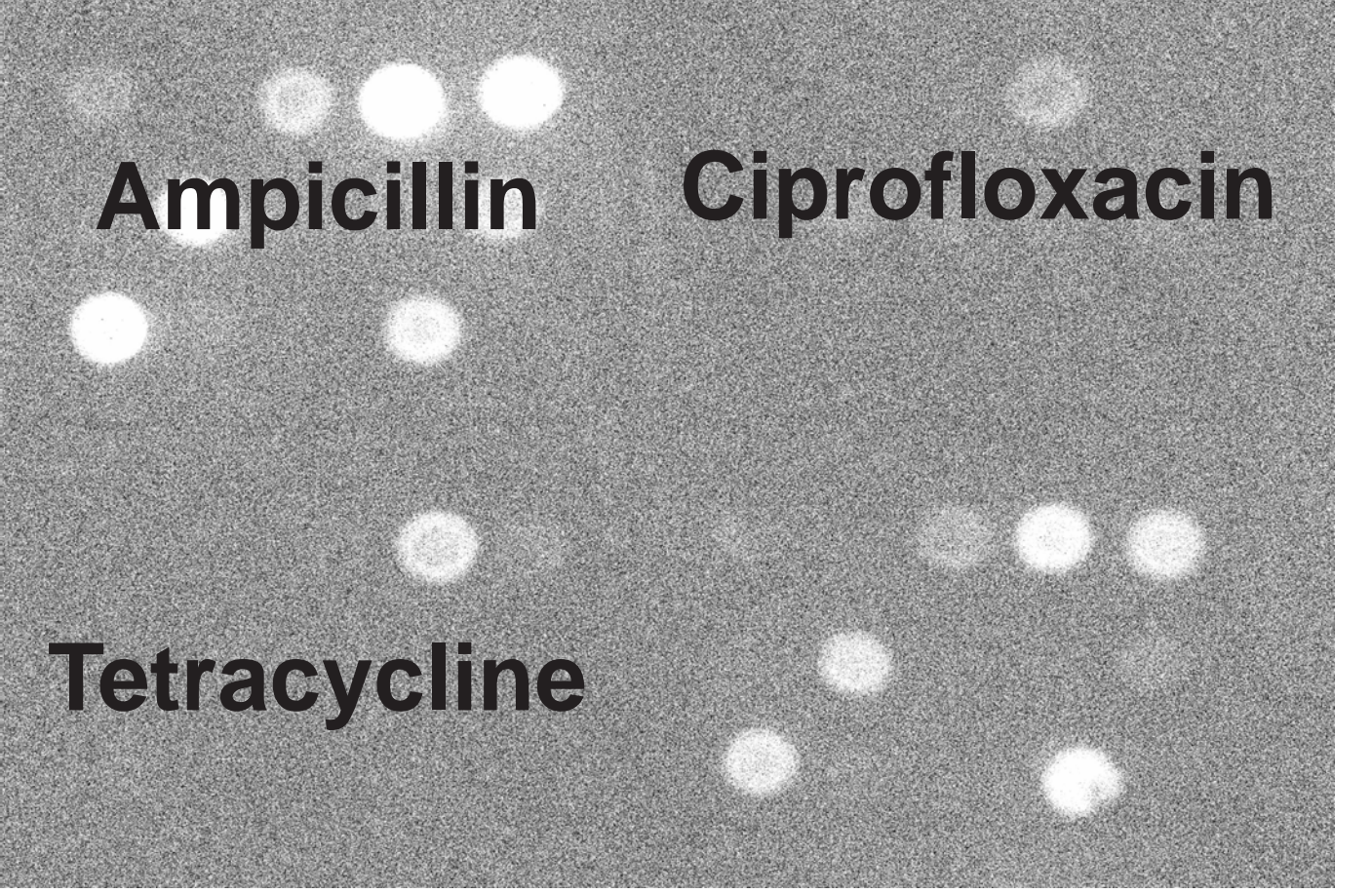
在反應時間四小時時，系統整體辨識準確度已達70%，但對於低濃度 (250ppb以下) 或反應較弱之抗生素 (Rifampicin) 抗生素辨識準確率極低，十小時時此現象已明顯改善，但對於較高濃度 (500ppb以上) 抗生素辨識準確率卻降低。因此本系統選擇了反應時間四小時作為目標檢測時間，並以反應時間十小時的檢測辨識結果對低濃度及低反應抗生素進行修正，達到整體辨識準確率83%，125ppb偵測下限。



(五) 製作可攜式、恆溫攝影裝置



(反應時間4小時/10小時)



可攜式恆溫攝影裝置實際測試

陸、討論

- 一、使用多重決策樹系演算法的意義和合理性：
觀察肆之二之表格可藉由人工方式以二分法稍微對抗生素進行分類，而決策樹系可視為以電腦計算代替人腦進行極大量次數的二分法，因此具備能成功分類抗生素的合理性。同時用於計算準確度的交叉驗證法分別利用不同筆獨立的實驗數據作為訓練集和測試集，是機器學習上常用且具備合理性的檢驗方法。
- 二、系統辨識未知抗生素能力探討：
由細菌的發光原理可推測類似作用途徑的抗生素應有類似亮度圖型，使用作用途徑訓練模型也確實得到比單一抗生素訓練模型較高的準確率。本研究更進一步分別將Doxycycline和 Thiamphenicol由抗生素資料庫去除後訓練模型，再對這兩種抗生素的亮度資料進行預測，結果確實顯示本系統可藉由抗生素資料庫內相同途徑(Tetracycline/Chloramphenicol)的抗生素來辨識樣本中未在資料庫內的同種類未知抗生素。

三、此系統和目前使用中的其他抗生素檢驗方式比較：

	生物檢測	質譜儀	ELISA
用途	初步篩選	法規基準 (\$5000)	市面初步篩選
檢測對應性	一對多	一對一	一對一
準確率	83%~90%	接近100%	偽陽性高
反應時間	3~10小時	3個工作天	6~12小時
優缺點	完全擴增性	須經HPLC	研發試紙耗時

柒、結論

- 一、14株細菌在11種抗生素中皆產生不同的亮度變化圖型，且相同作用機制抗生素亮度變化圖型也會相似。
- 二、對於已知濃度1.5ppm的十一種抗生素，利用機器學習中決策樹系演算法以資料庫訓練抗生素預測模型，測試結果能快速簡易地依照作用機制辨識並分類樣本中未知的抗生素，並在三小時內達到高達90%的準確率。
- 三、對於較低且未知濃度的八種抗生素，利用機器學習以資料庫訓練抗生素預測模型，測試結果能在四小時內對七種抗生素達到500ppb的偵測下限，並進一步在十小時內達到125ppb，整體辨識準確率83%的偵測下限。
- 四、利用ITO導電玻璃維持溫度，製作出可攜式拍攝裝置，達到簡便檢測食品中抗生素的目的。
- 五、未來將持續為此系統建立更大規模的資料庫，以辨識更多種類及濃度的抗生素。