

研究论文

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-038

基于机器视觉的高通量微生物克隆挑选工作站研制及应用

张建康^{1,2}, 王文君^{1,2}, 郭洪菊^{1,2}, 白北辰^{1,2}, 张亚飞^{1,2}, 袁征^{1,2}, 李彦辉^{1,2}, 李航^{1,2}⁽¹⁾ 生物芯片北京国家工程研究中心, 北京 102206; ⁽²⁾ 博奥生物集团有限公司, 北京 102206)

摘要: 微生物克隆挑选是基因工程生物实验中的关键环节, 需要从生长有大量菌落的培养皿中将符合质量要求的单克隆菌落准确、快速挑取出来并接种到培养基中, 以便进一步扩大培养或检测。在高通量实验中, 克隆挑选环节任务量大、记录繁复、容易交叉污染, 依靠人工操作难以在短时间准确完成。针对这一难题, 本项目成功研制出一种自动化克隆挑选工作站, 通过菌落图像的深度学习实现克隆定位和筛选, 并利用机器人技术完成挑取-接种-清洗-高温灭菌过程。在所研制的可视化工作界面中, 工作站系统能够个性化编辑适用于多种微生物克隆的多项实验操作流程。通过样机验证实验结果, 证明了所研制系统和方法的可行性和有效性, 为高通量实验室自动化发展提供了有效工具和有益实践。

关键词: 自动化平台; 深度学习; 克隆挑选; 机器视觉; 合成生物学

中图分类号: TP273 **文献标志码:** A

Development and application of a high-throughput microbial clone picking workstation based on machine vision

ZHANG Jiankang^{1,2}, WANG Wenjun^{1,2}, GUO Hongju^{1,2}, BAI Beichen^{1,2}, ZHANG Yafei^{1,2},
YUAN Zheng^{1,2}, LI Yanhui^{1,2}, LI Hang^{1,2}

⁽¹⁾National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology, Beijing 102206, China; ⁽²⁾CapitalBio Corporation, Beijing 102206, China)

Abstract: Microbial clone picking, a crucial step in genetic engineering and biological experiments, involves the accurate and rapid isolation of single colonies with desired characteristics from petri dishes teeming with numerous clones, followed by their inoculation into culture media for further propagation or analysis. In high-throughput settings, this task becomes burdensome due to its vast volume, complex record-keeping requirements, and the risk of cross-contamination, rendering manual operations impractical for achieving timely and precise results. To address this challenge, we present the design and manufacture of an automated clone picking workstation that performs efficient clone picking using 96-channel pneumatic pick-up pins, eliminating the need for consumables. The pins can be reused after ultrasonic cleaning and sterilization at high temperature following the previous picking cycle, making it more

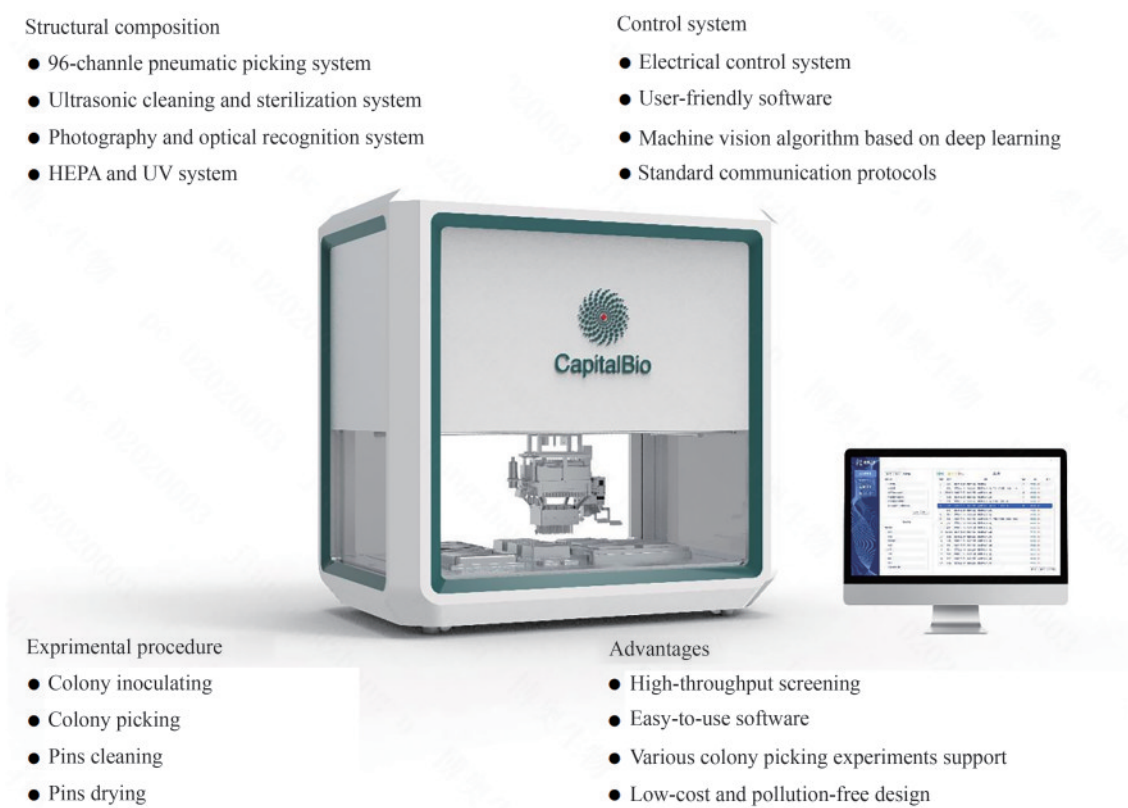
收稿日期: 2025-04-29 修回日期: 2025-06-25

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFA0902302, 2018YFA0902304)

引用本文: 张建康, 王文君, 郭洪菊, 白北辰, 张亚飞, 袁征, 李彦辉, 李航. 基于机器视觉的高通量微生物克隆挑选工作站研制及应用[J]. 合成生物学, 2025, 6(4): 956-971

Citation: ZHANG Jiankang, WANG Wenjun, GUO Hongju, BAI Beichen, ZHANG Yafei, YUAN Zheng, LI Yanhui, LI Hang. Development and application of a high-throughput microbial clone picking workstation based on machine vision[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(4): 956-971

economical and environmentally friendly, compared with other methods that use disposable pipettes or picking needles. The pins can be replaced to adapt to different types of bacterial strains to meet various experimental requirements. The grab integrated on the picking head can rotate 360° and transfer the plates to different work positions. In the aspect of colony detection, the photos are automatically taken by an optical system, and the positioning and screening of colonies are achieved through the deep learning of numerous colony images by the software, which was designed independently. The precision image recognition technology is coupled with robotic and automated control technologies to enable seamless processes for picking, inoculating, cleaning, and drying. The High-Efficiency Particulate Air Filter and ultraviolet sterilization prevent cross-contamination, ensuring the experimental environment meets the required standards. This workstation is equipped with an independent operation computer and has developed a set of user-friendly software that enables personalized editing of multiple experimental protocols tailored to diverse microbial clone types. It can also communicate with external devices *via* TCP/IP protocols, facilitating the integration for conducting experiments such as fully automated synthetic biology. The validation experiment of bacterial colony picking was conducted by a prototype machine to test the selection efficiency. The success of the experiment suggests that the proposed system and method are feasible and effective, offering a valuable tool and a practical approach for the automation development of high-throughput laboratories.



Keywords: automation platform; deep learning; clone picking; machine vision; synthetic biology

高通量筛选技术因其高效率、低人工的显著优势，在合成生物、药物研发等领域得到了快速发展^[1-3]。克隆挑选是涉及基因工程的生物实验的关键

环节之一^[4-6]。在克隆挑选过程中，需要从生长出大量菌落的培养皿中，使用尖头物体将符合质量要求的单克隆菌落挑取到培养基或培养液中进行接种，以供

进一步检测或者扩大培养。该任务属于重复性劳动，在高通量实验中占用大量人力和时间，容易产生操作失误、记录错误和交叉污染，影响实验结果^[7-9]。

随着自动化技术和人工智能技术在生物实验室中的应用，各类辅助实验操作的自动化装备已经能够帮助实验人员完成诸如移液、传递、离心振荡等重复性高精度操作^[10-11]。然而，克隆菌落生长位置不固定，不同菌种的生长特性各异，不同的生长培养环境也可能导致克隆菌落的形态特征差异巨大，为自动化目标菌落识别方法的设计带来挑战。克隆操作还面临多样化操作流程适配、严格清洁和灭菌等需求，需要装备设计中进行通用化考虑。此外，克隆挑选工作站还应该能够配合自动化工作平台中的其他设备共同运行，完成流程链条更长、更复杂的完整实验任务。

近年来，国外实验室自动化设备研发和制造单位如美国 Hudson Robotics 等公司推出部分能够开展微生物克隆挑选的自动化系统，这些系统采用不同的工作原理完成菌落的获取和释放。在菌落克隆获取方式方面，英国 KBiosystems 公司推出的自动克隆挑选系统 K6 采用 32 道独立控制气动挑针，垂直穿透培养基蘸取菌落，最大可适配 220 mm×220 mm 方形培养皿。该设备功能较为完备，但体积较大，需要手工进行物料准备和开闭柜门，仅适合作为独立设备放置于实验室内，不易与自动化平台进行集成。在功能区布局方面，典型的如美谷 (Molecular Devices) 公司，由于进入行业比较早，技术和实验数据积累雄厚，其 QPix 400 系列克隆筛选系统兼具菌液涂布与挑取功能，按照工作轨迹将工作空间规划为微孔板栈、涂布板位、挑取板位、接种板位和清洁区。该系统清洁区设置有 3 个毛刷清洗槽和 1 个卤素灯烘干槽，可为适配的 24、96 或 384 通道挑针提供统一清洁作业，而且有大量实验应用^[12]。在挑针形式方面，除个别系统采用一次性移液吸头作为挑针，无需进行挑针清洁外，大部分克隆挑选系统采用气动组件控制不锈钢挑针阵列，垂直获取和接种菌落，以此节约耗材用量、降低运行成本。Hudson Robotics 公司 RapidPick MP 系统采用独特的旋转机构，将 20 枚挑针分布在盘状结构圆周上，逐一进行克隆挑取，并实现挑取、接种、清洁的同步进行^[13-15]。

在菌落成像方式方面，SciRobotics 公司 Pickolo 克隆挑选系统可按需配备可见光成像系统或荧光成像系统。可见光光源位于培养皿底部，用于荧光团激发的外部照明位于培养皿上方。当采用荧光照明时，需在工业相机镜头前安装荧光滤光片。该系统配备灵活 8 通道挑针，每轮次可依次获取 8 个克隆菌落。系统结构较为紧凑，无固定大小和布局，一般用于集成在指定品牌的自动化综合工作站中。在菌落操作功能方面，部分系统支持通过流程设计控制定位机构运动，在基本接种外，实现双接种、复制、重排等多样操作。

国内大部分厂家的设备都采用吸头挑选的方式，北京化工大学张依朗研制了一款 32 通道带挑针的克隆挑选系统^[16]，但与 96 通道相比，挑针数量偏少，如需挑满一块 SBS 标准的整板 96 孔菌落，一个流程需要清洗灭菌 3 次，这势必影响其高通量挑选实验中的效率。

本研究设计了一款克隆挑选工作站，采用 96 通道免耗材气动挑针设计，降低了使用成本，同时开发自主知识产权的机器视觉算法，提高了菌落识别的准确度和挑取准确率。下文将介绍自动化工作站的系统整体设计、基于机器视觉的微生物克隆菌落识别方法、系统交互与自定义 workflow，并通过实验研究，验证系统的可行性和有效性。

1 工作站系统整体设计

面对自动化工作平台的克隆挑取需求，克隆挑选工作站需要在有限的仪器台面上，尽可能紧凑地实现多样克隆操作。

自动化生物实验操作的对象为符合 Standard Block Size (SBS) 标准尺寸的实验室微孔板或深孔板，常见孔数为 24~384 孔。微生物克隆的挑取数量较多，且常见挑针尖端直径在 0.2~2 mm，为最大限度保证仪器的通用性，同时降低使用中的耗材成本，工作站核心部件采用 96 根不锈钢挑针阵列设计。围绕挑针阵列，开展工作站系统整体设计。所设计克隆挑选工作站的整体形态如图 1 所示，其外部尺寸为 1230 mm (长) × 830 mm (宽) × 1240 mm (高)，结构紧凑，能够适用于常见实验室台面和自动化整合平台空间。

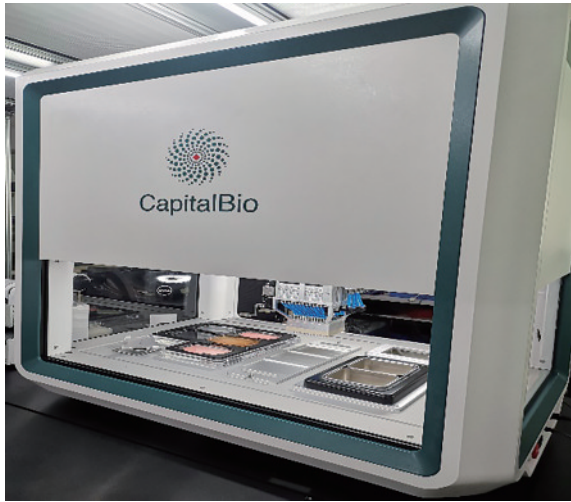


图1 克隆挑选工作站整体形态

Fig. 1 Overall form of clone selection workstation

1.1 工作站系统构成

克隆挑选工作站整体可分为成像子系统、挑取子系统、清洁子系统、物料传递子系统、环境控制子系统、系统控制软件等6个部分，如图2所示。

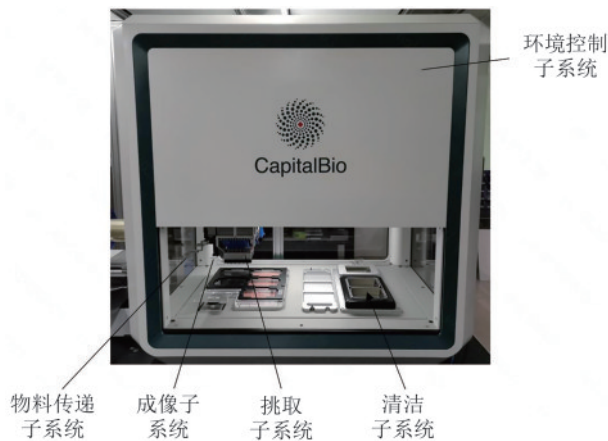


图2 克隆挑选工作站系统构成

Fig. 2 System composition of clone picking workstation

成像子系统在定制光源环境下对生长有克隆菌落的培养皿进行高清晰度光学成像，图像传输至计算机进行自动分析，定位符合条件的目标菌落位置。挑取子系统使用可独立控制的96挑针阵列，沿X-Y-Z空间导轨运动到目标菌落上方后，弹出对应挑针蘸取菌落，之后运动到接种板进行洗脱接种。清洁子系统对使用后的挑针阵列进行清洁和灭菌。先后使用2个分别盛装有1%次氯酸钠

和75%酒精的超声波清洗槽进行清洁，再使用卤素灯进行高温灭菌和挑针烘干。待挑针冷却后，即可进行下一轮工作。物料传递子系统通过电动夹爪将菌板、接种板等物料转移到预设的板位上，并支持取放板盖操作。为配合自动化工作平台的其他设备，物料过渡板位采用旋转设计，适配从孔板的宽、窄两个方向进行夹取。环境控制子系统为高效微粒空气过滤，工作区为正压环境，同时设计紫外灭菌控制，为克隆挑选工作站提供洁净的工作环境。系统控制软件对工作站各运动部件进行控制。通过预先编辑的流程文件，可实现板位配置、时间控制、克隆形态条件设置、挑取模式和接种模式设置等。系统软件既支持带有用户交互界面的单机模式，也支持通过数据接口的远程调用运行。

1.2 运动机构和电气控制设计

在克隆挑选工作站的主要工作空间内，由X-Y-Z丝杠导轨驱动挑针模组进行运动，运动模组选用精密传动模组，其中X、Y轴重复定位精度在0.005 mm，Z轴重复定位误差0.02 mm。为节约不必要的运动部件，电动夹爪、高清工业相机、超声距离传感器与挑针模组全部集成在同一基座上，同时运动。其中夹爪Z轴（垂直方向）通过独立设计的导轨实现独立的升降运动。

工作站由上位控制计算机发送指令，控制基于PLC的主控电气电子电路，完成对各个作动部件的控制。各传感器信号数据经由PLC接口，回传至上位控制计算机。另外，部分部件经由计算机串口进行连接和控制。其电气控制系统原理图如图3所示。

1.3 工作区设计

克隆挑选工作站工作区采用板位阵列设计，按照工作流程顺序依次分为挑取区、接种区和清洁区，可同时满足3块培养皿的克隆挑取任务。如超过板位数量的挑取任务，可由外部机械臂与工作站夹爪配合，进行物料的转移调度，实现连续挑取。

挑取板位的照明采用电激荧光发光片实现，

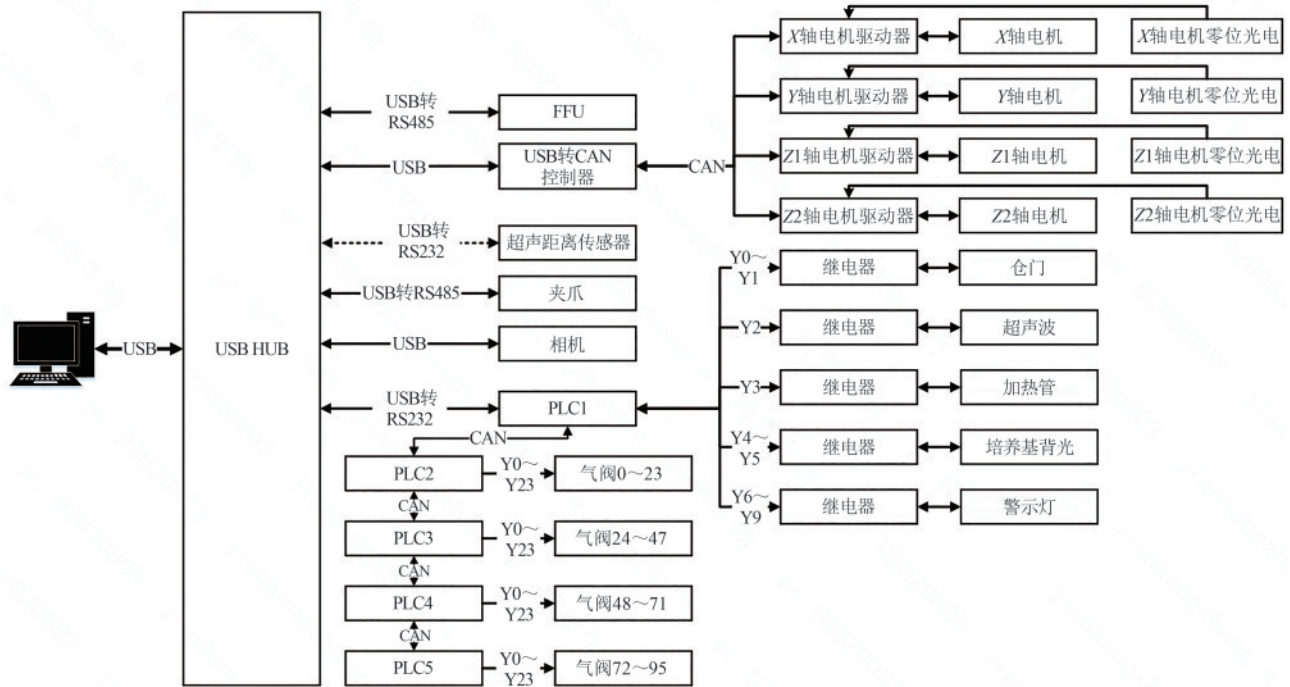


图3 电气控制系统原理图

Fig. 3 Electrical schematic diagram

位于板位底部。相比传统LED光源，具有光线均匀、尺寸灵活、厚度极小、不产生热量的优势，非常适合提供观察克隆菌落需要的稳定光线条件。清洗区采用40 kHz超声振荡方式完成挑针清洁，相较毛刷清洁具有速度快、清洁彻底、不产生残留、无需更换配件、易于维护的优点。经实验测试，挑针在超声清洗其中，仅需5 s即可实现全部可见污染物的有效剥离。此外，烘干板位的卤素灯可产生300 °C以上的高温，实现对挑针的有效灭菌与干燥。工作区的平面图如图4所示。



图4 工作站工作区平面图

Fig. 4 Arrangement of the work area for the clone picking workstation

2 基于机器视觉的微生物克隆菌落识别

在培养皿中生长的微生物克隆菌落具有形态多样、颜色不一的特点，传统图像处理方法识别菌落^[17-21]主要通过对图片进行阈值分割、Canny算子边缘检测等计算，二值化后计算形态学参数^[22]计算得到每个菌落的形态参数和位置。判别菌落是否合格主要依据形态学参数：菌落直径、圆形度、轴比、邻近度等限制条件，最终辨别获得符合挑取要求的菌落信息。然而，菌落经常出现连体生长、连片生长等情况，培养皿底面可能存在文字标记、水汽液滴，菌液涂布过程中的操作不当还可能使图像中出现成片痕迹，同一菌种在不同生长条件下产生的菌落也存在较大差异，如图5所示。传统图像处理方法即便采用自适应阈值计算也很难适应这些复杂现象，导致有效菌落的识别准确率降低，需要对每张图片参数进行人工调节。

为解决上述问题，软件设计过程中通过大量文献调研^[23-27]及测试实验，最终使用一种基于深度学习与传统图像算法相结合的微生物克隆菌落识别方法。数据主要来自多种培养条件和不同照明条件下的真实菌落图片，进行菌落的标注，通

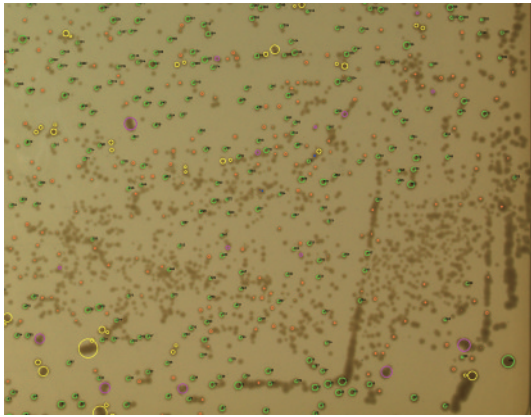


图5 菌落图像存在的各类影响识别的问题
Fig. 5 Problems existing in colony images that affect recognition

过分割网络对训练集进行学习，建立二分类分割模型，实现自适应的克隆菌落识别模型。该方法具有准确率高、图像质量容忍度宽的优势，无需人工确认结果，自动完成克隆菌落识别和分类。同时为保证整个系统识别的全自动化，系统实现了培养皿内边框的自动识别模型，通过对圆形、方形培养皿的边缘自动计算，保证系统中挑针运行的安全性。

2.1 微生物克隆菌落图像识别参数

微生物克隆菌落图像识别过程包括两个步骤：第一步图像中每个菌落区域分割；第二步菌落形态参数计算及辨识合格菌落。菌落定位识别流程如图6所示。

菌落区域分割在系统中是最关键的步骤，本系统主要针对真实培养出的克隆菌落进行识别挑选，真实样本中菌落直径从0.2 mm至30 mm都需准确地识别出菌落区域，通过文献调研得知在医学或生物图像分割网络中^[28-30]表现能力突出的包括UNet和ResUNet及其变种，根据文献^[31]提到ResUNet++在肠镜检查图像的语义分割结果上表现突出，ResUNet++从网络结构上通过使用条件随机场（conditional random field, CRF）和测试时间增强（test-time augmentation, TTA）提升了整体的预测能力，并且使用了Attention注意力模块。本系统通过使用ResUNet++网络学习识别菌落图像。

菌落形态参数在不同克隆挑选工作站系统中筛选标准不尽相同，主要参数包括：菌落大小、

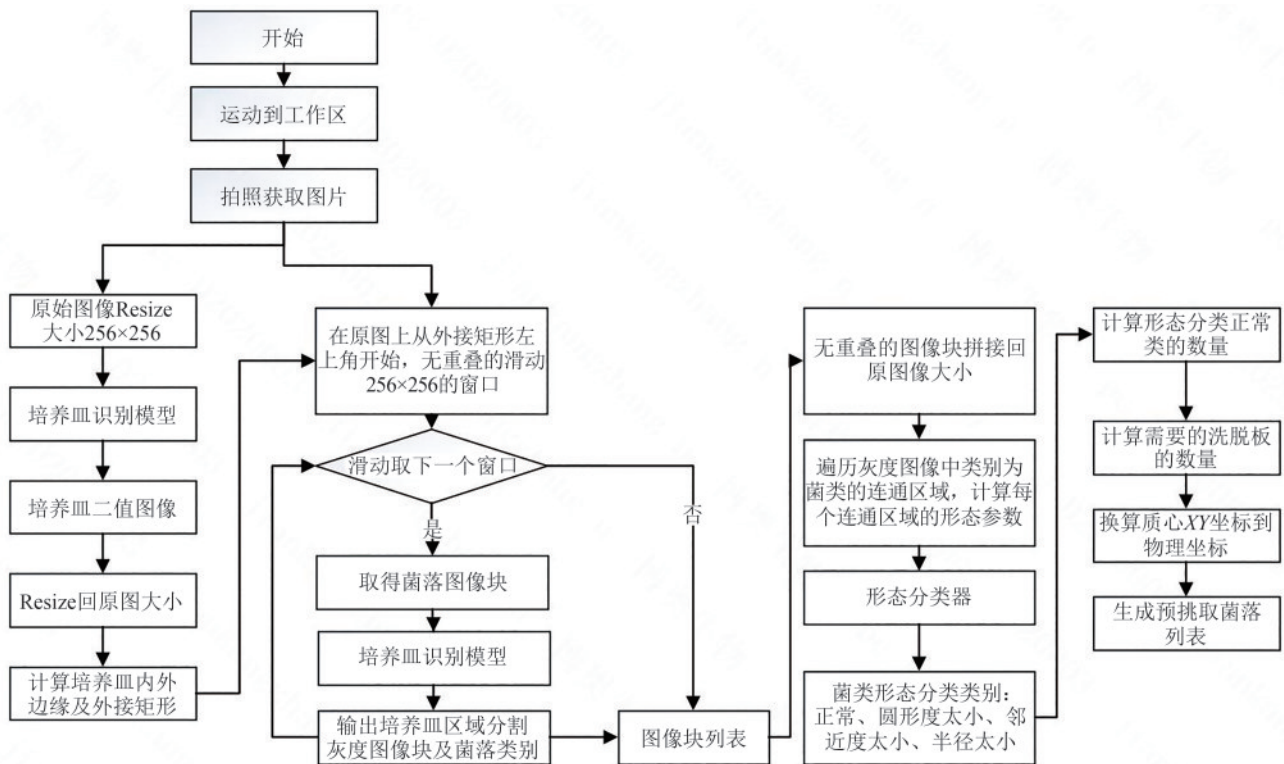


图6 菌落识别定位流程图

Fig. 6 Flowchart of colony identification and location

圆形度、邻近度、轴比、分离度或者紧致度、颜色等参数。圆形度主要判别菌落形态是否是圆形，正常情况菌落是圆形，非正常情况菌落边缘不光滑，圆形度越接近1质量越好；轴比也判别菌落形态的参数，主要计算菌落区域长轴与短轴的比，轴比的值越大越好；邻近度的值是判别菌落之间的邻近程度，也就是克隆挑取时是否能保证不接触到其他菌落，不同系统根据运动精度、挑针大小及不同菌株而筛选邻近度的值。紧致度主要辨识每个菌落表面分布是否均匀，合格的菌落每个菌落表面分布均匀；颜色只要辨识菌落颜色深浅及是否带“光晕圈”，主要是针对带荧光菌落的颜色辨识；本系统主要针对大肠杆菌、酵母菌株依据数据筛选出合适的菌落形态参数。

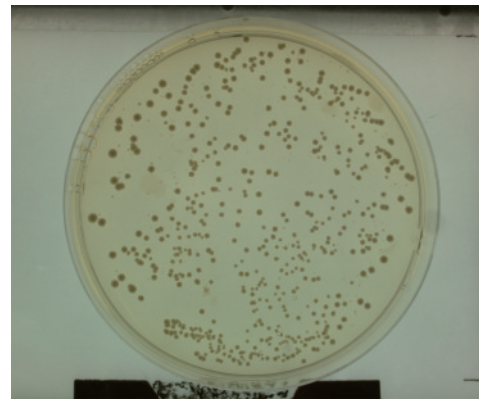
2.2 基于深度学习的克隆菌落识别和定位

2.2.1 培养皿识别模型

为了保证机械运行系统在挑取菌落时处于安全状态，避免与培养皿边缘碰撞，软件系统首先对培养皿的内外边缘进行识别（图7），确保挑针在培养皿边缘内运行，同时只识别培养皿内的菌落提升工作效率。培养皿的识别与菌落识别采用相同的 ResUNet++ 语义分割网络模型，挑选圆形和方形培养皿训练样本量 132 张，图像 Resize 为 256×256 大小，直接输入到模型中，对训练过程调整了训练参数，准确率和 Loss 曲线如图 8 所示。测试培养皿 52 张，计算测试集语义分割的 IOU，取大于 0.70 的阈值计算准确率达到 100%。培养皿分割模型针对真实图像分割的效果图如图 9 所示。

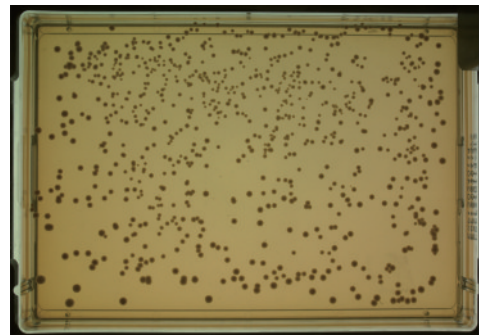
2.2.2 克隆菌落识别

菌落在培养过程中的不同阶段呈现出不同的形态，而且实验员会在培养皿上标注字迹，实验过程中有时也会出现污染印记，或者有杂质点，为了保证真实实验过程中，系统能准确识别出质量优的菌落，采用了语义分割网络对菌落区域进行像素级别的分割，主要判别菌落是否合格和计算形态学参数使用。系统兼容 3664×2748 和 4000×3000 两种像素尺寸的图像，系统根据自制定标图例计算图像分辨率为 0.033 mm，准确计算图像分



(a) 圆形

(a) circular



(b) 长方形

(b) rectangle

图7 培养皿

Fig. 7 Petri dish

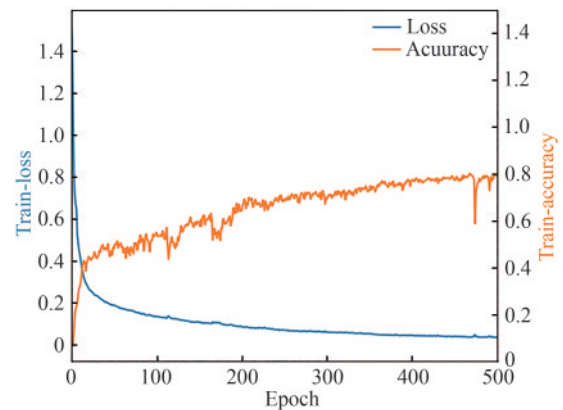


图8 Dish-训练曲线

Fig. 8 Dish training curve

辨率对于保证图像识别后控制运动机构到目标位置挑取合格菌落至关重要。

2.2.3 建立训练集

由于真实实验数据拍摄的是一张大图。标签制作是标记的大图，共标记样本量大图 38 张，网

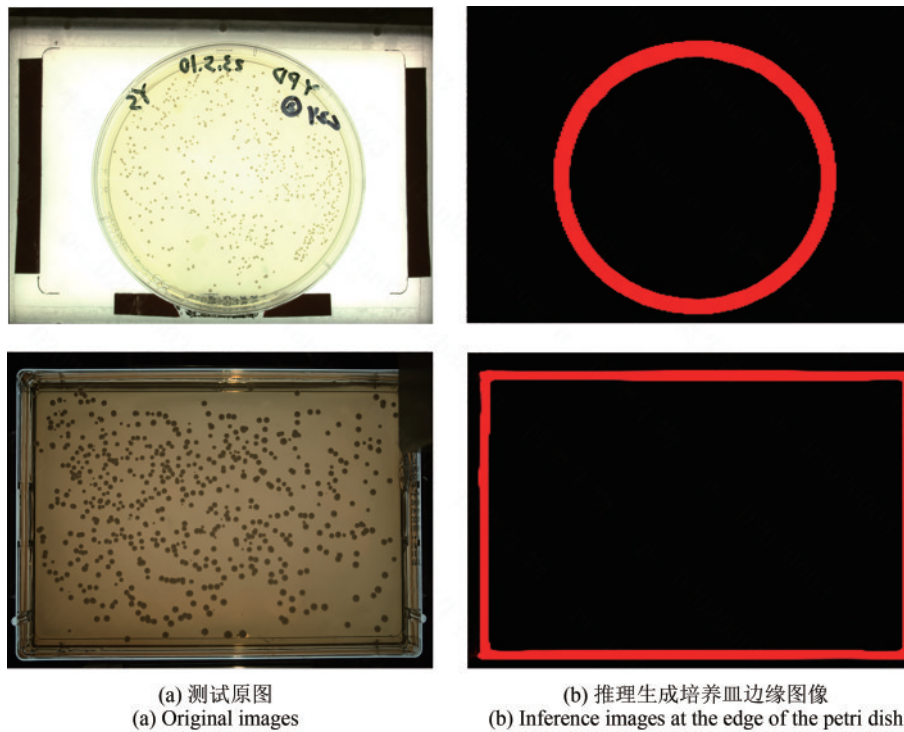


图9 培养皿识别标注

Fig. 9 Identification and labeling of petri dishes

络模型要求图像输入尺寸是256×256像素，采用有重叠的滑动窗口方式将完整菌落图片及其掩码图裁剪成图像块，在大图像块及其掩码图像块上有覆盖的滑动窗口裁剪小图像块和小图像块掩码，滑动窗口步长为100，小图像块尺寸为256×256像素。从裁剪的小图像块中挑选模型的训练集和验证集，将挑出的训练集小图像块生成训练数据集，将小图像块对应的掩码图像块生成训练标签集。数据集的分布情况见表1，表中第二列为训练集样本量：大图34张，挑256×256图像块5160张；第三列为测试集样本量：大图4张，256×256图像块1466张。训练集按照训练数据：验证数据4：1的比例划分，训练得到菌落训练曲线如图10所示，epoch=500，图中Loss从1.6降到0.8左右，准确率最终达到0.92。菌落语义分割模型推理生成灰度图像如图11所示，利用图像分割模型测试测试集，IOU为0.75，由于测试样本里只标注了菌落，没有标注灰尘等其他，基本不存在假阳性，模型的假阴性率是0.16。

根据菌落语义分割模型生成的灰度图像，计算图像中每个菌落的形态参数，主要参数包括：

表1 数据集分布情况

Table 1 Distribution of the dataset

数据集 Data set	训练集 Training set	测试集 Test set
完整菌落图像 Complete colony images	34	4
挑选出小图像块 Small image blocks selected	5160	1466

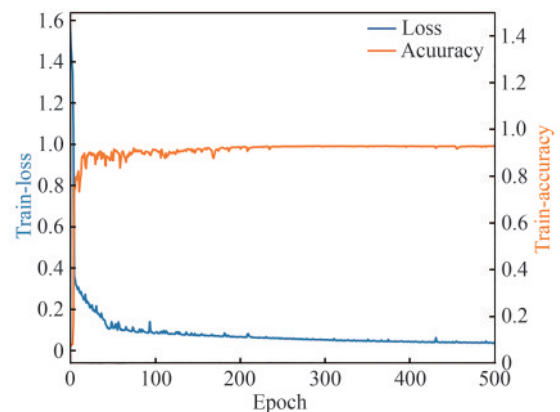


图10 菌落-训练曲线

Fig. 10 Colony-training curve

菌落大小、圆形成、邻近度、轴比等。依据系统的需求建立菌落辨识参数阈值。根据形态参数阈

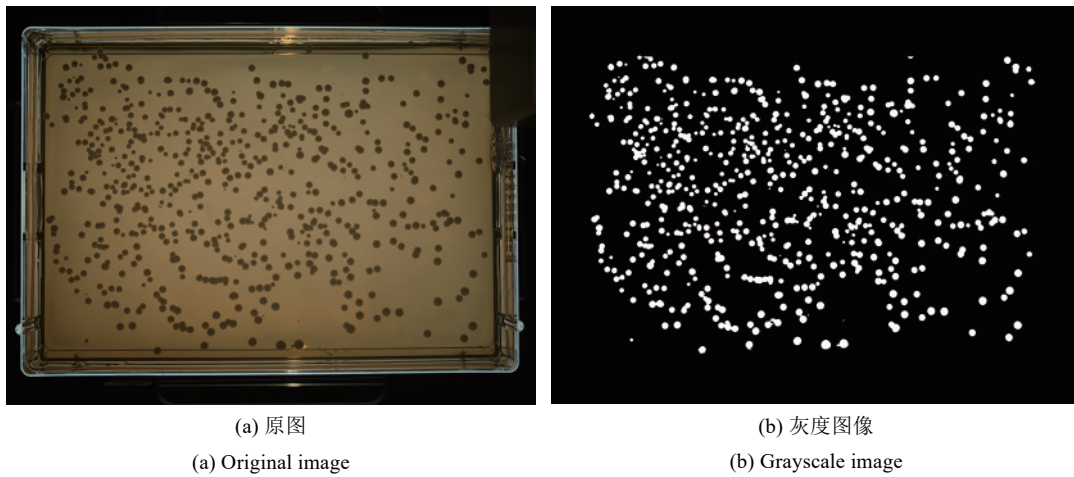


图11 推理生成灰度图像

Fig. 11 Grayscale image generated by reasoning

值辨识出合格菌落、不合格菌落（半径不合格、圆形度不合格、邻近度不合格等）用不同颜色标示，图12中绿色小圈表示合格菌落。此外，挑针对不同大小菌落的克隆挑取精度和准确度与挑针模组 X 、 Y 、 Z 的运动精度有关，关于精度已在文中运动机构部分给出数值，可满足挑针在邻近度参数阈值内精确挑取。

3 系统交互与自定义 workflow

为便于用户操作，克隆挑选工作站采用带有交互界面的上位控制计算机软件进行控制。同时，软件系统设计了控制接口，克隆挑选工作站整体

可以作为一部设备集成在自动化工作平台中，接受平台主控计算机的调用，并反馈设备运行状态。

3.1 用户交互界面和自定义 workflow

用户交互界面为操作者提供可视化的设备控制和状态监测功能，分为流程管理、位置标定、用户管理、系统设置四个分界面，如图13所示。

流程管理界面提供设备单次运行的流程编辑功能。用户可以根据实验需求，自行配置实验物料的板位位置，按照作业顺序搭建任务序列，如挑取、接种（洗脱）、清洁、烘干等，并对每个任务进行个性化配置，如挑取数量、接种循环数、运行速度、清洁时间、高温灭菌时间等。设计完

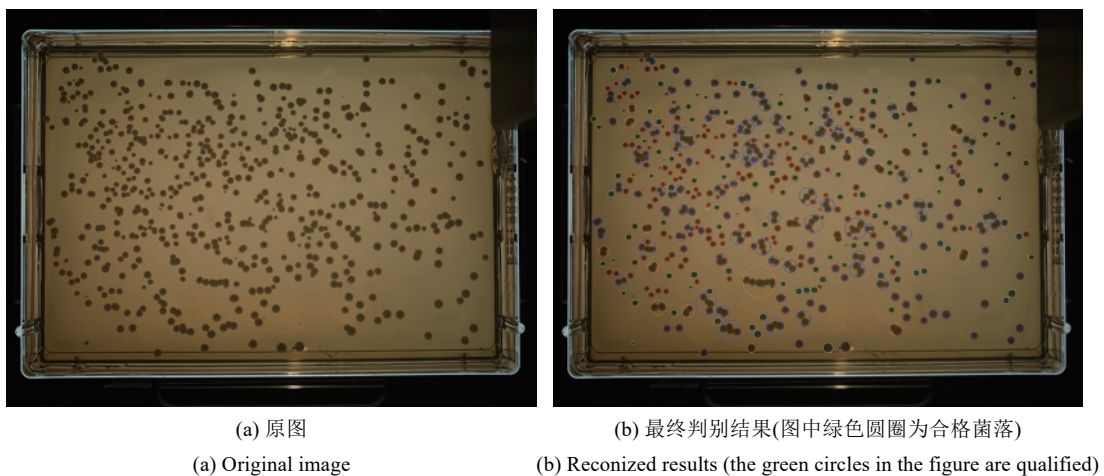


图12 合格菌落识别

Fig. 12 Identification of qualified colonies



图13 用户交互界面设计

Fig. 13 UI design

成的流程可以进行保存，便于相同实验再次运行时载入运行，同时提供实验运行过程控制功能，如开始、暂停、停止。位置标定界面为新机调试提供全面详细的参数设置功能，一般仅面向工程师开放设置权限。设备的作动部件数量较多，各自由度电机、夹爪、旋转板位、挑针等均需要进行精确的位置标定，以达到与各个板位位置的良好配合。 X - Y - Z 空间位置支持标定精度为 0.1 mm ，旋转自由度标定精度为 0.1° 。用户管理界面一般面向管理员开放设置权限，可在此界面为实验人员创建新账户，设置登录密码、修改密码。系统设置界面为用户提供克隆挑选工作站系统内独立模块的单独控制，如转台控制、仓门控制、过滤风机控制、图像采集控制、板位背光控制、高温灭菌控制、超声波清洗控制、紫外灭菌、挑针控制，以及挑选参数和洗脱参数设置。

3.2 外部接口设计

克隆挑选工作站支持通过TCP/IP协议网络进

行远程控制。在外部控制模式下，系统无需启动交互界面，仅通过控制指令实现操作。工作站的外部接口支持是本系统与市面上其他设备的重要不同之一，也是自研自动化系统的独特优势所在。

大部分实验室自动化设备，如离心机、封膜机、振荡模块、PCR仪等，能够支持以命令行形式发送的指令代码，但该控制方式仅适用于简单操作命令，类似于“面向过程”的控制方式。工作站既能够支持单独作动部件的运动功能，也能够如3.1节所述，支持任务序列的连续执行。考虑到实验人员的理解习惯，系统外部接口设计采用类似于“面向对象”的控制方式，通过方法文件的传递（.med文件），向工作站一次性发送包含内在逻辑的任务序列，由工作站进行解码并完整执行，无需对每个参数变量进行单独设置。该方式更加符合真实实验中对克隆挑选环节的功能预期，最大程度降低了实验人员的编程难度，同时保持了使用交互界面操作和使用接口操作的一致性。当仅需要工作站完成简单动作时，方法文件

中的任务序列仅包含一条命令即可。同样地，设备运行状态也无需通过反复查询的方式获取。软件系统将设备运行状态自动存放在数据管理库中，上位系统软件可根据需要随时进行提取。控制接口设计框架如图14所示。

本设计研究的克隆挑选工作站还可实现模块化扩展，连接转板机械臂、移液工作站、核酸提取等设备，实现克隆挑选与液体分装、DNA提取协同，自动化完成DNA组装与克隆挑选。

4 克隆挑选实验验证

为验证所研制系统和方法的有效性，在搭建

的原型样机上初步开展酵母菌落的克隆挑取实验，并从挑取准确率、灭菌效果等方面对系统性能进行评估。

实验以完成对生长有酵母菌落的培养皿进行96个克隆挑取为任务目标，在系统软件中建立典型菌落图像识别-挑取-接种-清洁高温灭菌实验流程任务序列。系统初始化完成后，首先将培养皿放置在挑取板位上，对培养皿进行图像采集和图像分析，然后使用挑针阵列完成96个克隆挑取，接种至预加注1000 μL培养液（常规YPD培养基）的深孔板中，最后挑针阵列先后进行2次超声清洁和高温灭菌，流程结束。其中，单次超声清洁时间为5 s，高温灭菌烘干时间为80 s。完整克隆挑选流程如图15所示。

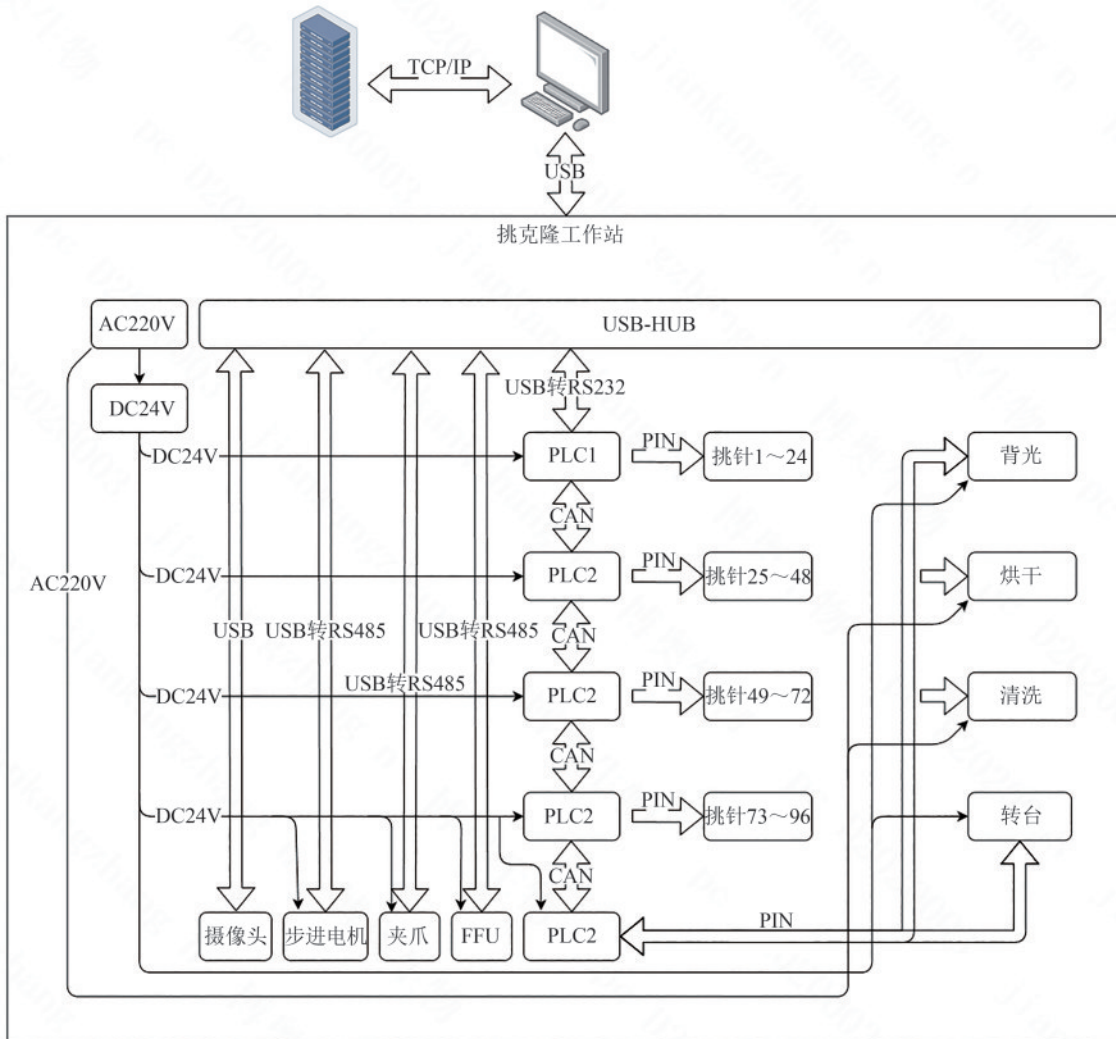
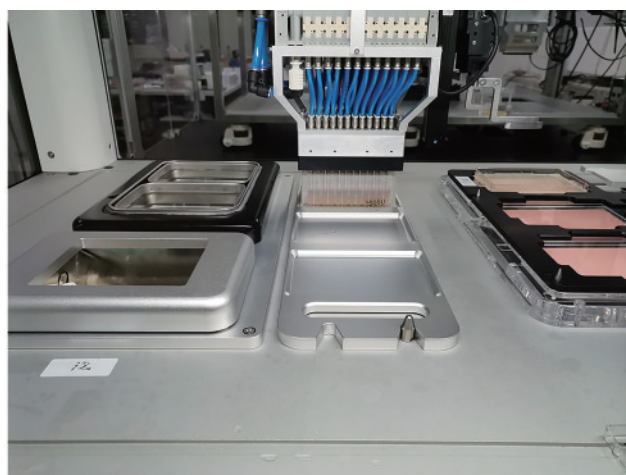


图14 工作站控制接口框架

Fig. 14 Control interface framework of the workstation



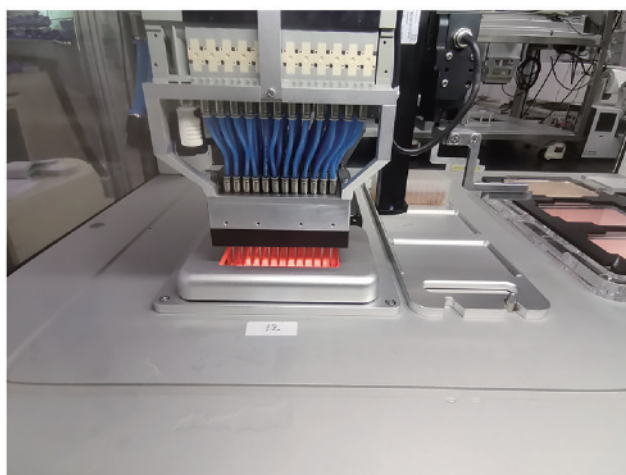
(a) 菌落图像识别挑取
(a) Colony image recognition and picking



(b) 菌落接种
(b) Colony inoculation



(c) 挑针清洁
(c) Needles cleaning



(d) 挑针高温灭菌、烘干
(d) The needles are sterilized at high temperature and dried

图15 克隆挑选过程

Fig. 15 Clone picking process

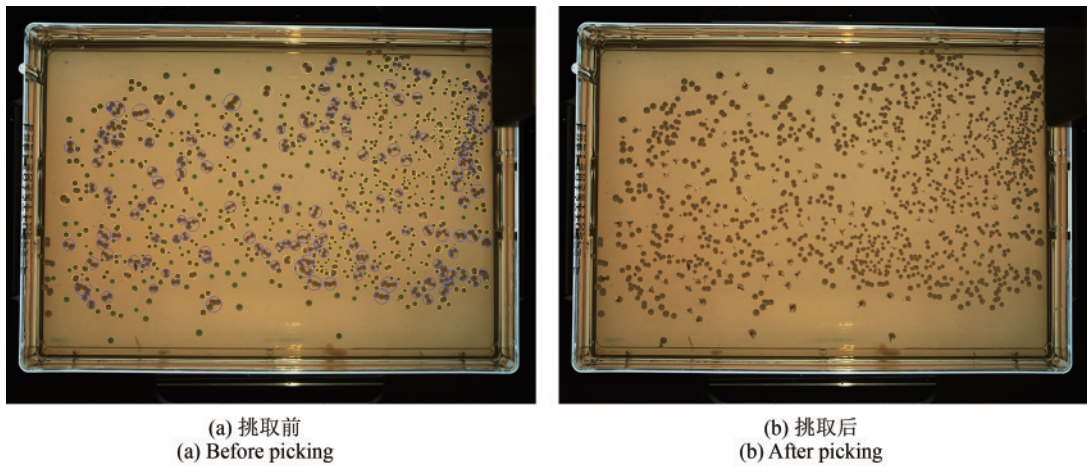
4.1 克隆挑取准确性

准确的克隆挑取受到图像识别精度、坐标转换精度、硬件装配精度、摄像头的视场偏差等综合影响，各个影响因素产生的误差会产生累加。通过对系统进行精确标定，能够消除系统误差。为检测实际挑取过程中目标克隆是否被挑针有效挑取，对挑取前、后均拍摄一帧高清图像，对目标克隆菌落位置进行放大比对，原菌落位置在挑取后出现培养基破损导致的放射状挑针孔，且菌落形状不再完整的，可记为有效挑取，如图16所示。实验中，挑取前培养皿图像共识别到各类克隆菌落8053个，其中符合挑取条件的克隆菌落有

101个，选择其中的96个菌落作为目标菌落，挑取后，全部96个目标菌落均被有效挑取，挑取准确率达到100%。

4.2 培养和灭菌效果

挑取作业后，挑针阵列在接种板内上下洗脱5次。使用硅胶密封盖对接种板进行封口，并转移至振荡培养箱中（型号：THZ-C恒温振荡器，苏州培英实验设备有限公司），在30℃，220 r/min转速下培养48小时。根据培养后深孔板各孔内培养液浑浊情况，判断接种是否有效。实验中，96个孔内培养液全部变浑浊，如图17所示。



(a) 挑取前
(a) Before picking

(b) 挑取后
(b) After picking

图16 挑取前、挑取后的图像对比

Fig. 16 Image comparison before and after picking

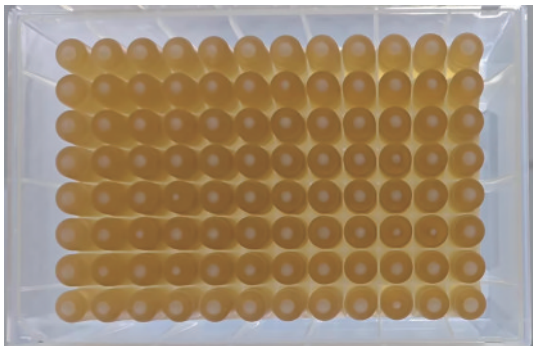


图17 深孔板孔内含菌落培养液

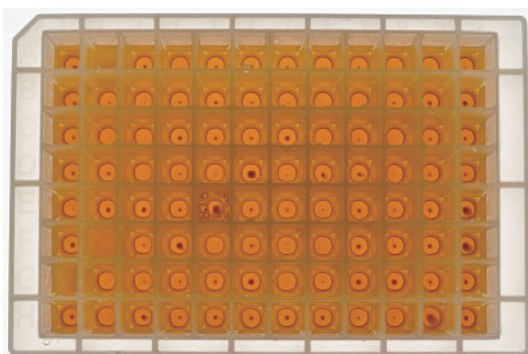
Fig. 17 Deep well plate containing colony culture medium

此外，还开展了灭菌效果验证实验，分为实验组和对照组，实验组挑针未做清洗灭菌，直接接种至加有培养基的深孔板中。作为对照组，先后使用2个分别盛装有1%次氯酸钠和75%酒精的

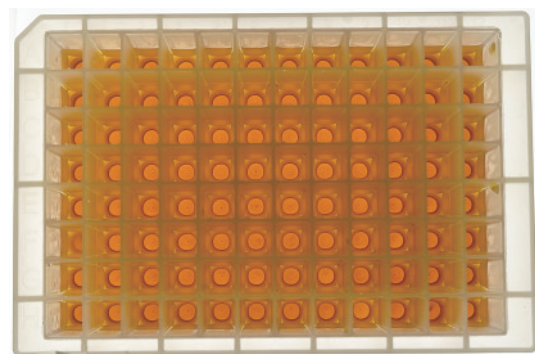
超声波清洗槽进行预清洁，再使用卤素灯进行高温灭菌和挑针烘干。待挑针冷却后，再次接种至加注有培养基的深孔板中，密封后与实验组同步进行培养。实验中，实验组检出浑浊物，对照组未检出浑浊，证明了所采用的清洁方式和灭菌时长的有效性。实验结果如图18所示。

5 结论

本研究成功实现了基于机器视觉的高通量微生物克隆挑选工作站，通过融合自动化控制、高精度视觉定位与智能算法，显著提升了微生物克隆筛选的效率和准确性，实验结果表明，该工作站具备以下核心优势：



(a) 实验组
(a) Experimental group



(b) 对照组
(b) Control group

图18 灭菌效果验证

Fig. 18 Verification of sterilization effect

①高效性与稳定性：通过采用深度学习与图像算法相结合的微生物克隆菌落识别方法实现了菌落的快速识别与定位，识别准确率最高可达100%，挑取准确率不低于98%，最高可达100%，同时高精度96气动免耗材挑针模块确保了挑选动作的精度、操作稳定性。

②设备兼具环保性与经济性：与使用一次性吸头相比，按照年工作260天，日挑选1万个菌落计算，年节省吸头（260万个）的CO₂排放当量可达12吨^[32]（文献分析每吨塑料全生命周期碳排放可达2.3吨CO₂），年节省成本不低于26万（按单个吸头0.1元计算）。

③应用价值：本工作站在合成生物学、药物开发及微生物筛选领域具有重要应用潜力，通过减少人工干预，降低了样本污染风险，还为大规模克隆库构建提供了解决方案。

④通过数据对比表明本研究设计的挑克隆工作站，在图像分辨率、菌落识别准确度、克隆挑取准确率各方面已经达到国外产品QPix的相近水平（表2是市面上可见的几款挑克隆工作站的对比）。

针对以上研究结果，未来在深度学习与图像算法方面将继续优化，增加多样性样本的训练，特别是高密度、模糊和粘连的菌落，可以在分割网络前端加入轻量级超分辨率子网络，提升输入图像质量再进行分割，提高复杂菌落识别的准确率。

最后，本研究通过跨学科技术整合开发，验证了基于深度学习的机器视觉技术在微生物高通量筛选中的重要价值，为生命科学研究的自动化与智能化转型提供了可复用的技术基础，具有显著的科学与产业推广价值。

表2 本设备与其他3款克隆挑选工作站的技术参数对比

Table 2 A comparison of technical parameters of this device with other three clone picking workstations

设备型号	通道数量	挑取方式	CCD分辨率/(Pixel/mm)	菌落识别尺寸/mm	菌落识别准确度/%	挑取准确率/%	有效像素/万
QPix 420	96	挑针	22	≥0.1	0.5~0.7mm 菌落,>97%	>98%	500
Hedylax T200 智能微生物菌落挑选工作站	单通道或8通道	吸头	—	—	—	≥98%	2500
全自动菌落挑选工作站 G3000	2或4	挑针	—	≥0.5	—	1 mm 以上 98%	600~ 2000
本设备	96	挑针	30	≥0.2	≥98%	≥98%	1000

参 考 文 献

- MACARRÓN R, HERTZBERG R P. Design and implementation of high throughput screening assays[J]. *Molecular Biotechnology*, 2011, 47(3): 270-285.
- HUGHES S R, BUTT T R, BARTOLETT S, et al. Design and construction of a first-generation high-throughput integrated robotic molecular biology platform for bioenergy applications [J]. *SLAS Technology*, 2011, 16(4): 292-307.
- 孙梦楚, 陆亮宇, 申晓林, 等. 基于荧光检测的高通量筛选技术和装备助力细胞工厂构建[J]. *合成生物学*, 2023, 4(5): 947-965.
SUN M C, LU L Y, SHEN X L, et al. Fluorescence detection-based high-throughput screening systems and devices facilitate cell factories construction[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(5): 947-965.
- 卢挥, 张芳丽, 黄磊. 合成生物学自动化装置 iBioFoundry 的构建与应用[J]. *合成生物学*, 2023, 4(5): 877-891.
LU H, ZHANG F L, HUANG L. Establishment of iBioFoundry for synthetic biology applications[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(5): 877-891.
- STEPHENSON A, LASTRA L, NGUYEN B, et al. Physical laboratory automation in synthetic biology[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(11): 3156-3169.
- PAVAN M. Setting up an automated biomanufacturing laboratory[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2229: 137-155.
- MARTIN V J J, PITERA D J, WITHERS S T, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21

- (7): 796-802.
- [8] WIN M N, SMOLKE C D. Higher-order cellular information processing with synthetic RNA devices[J]. *Science*, 2008, 322 (5900): 456-460.
- [9] PADDON C J, WESTFALL P J, PITERA D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 528-532.
- [10] CHAO R, MISHRA S, SI T, et al. Engineering biological systems using automated biofoundries[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 42: 98-108.
- [11] 唐婷, 付立豪, 郭二鹏, 等. 自动化合成生物技术与工程化设施平台[J]. *科学通报*, 2021, 66(3): 300-309.
TANG T, FU L H, GUO E P, et al. Automation in synthetic biology using biological foundries[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2021, 66(3): 300-309.
- [12] ZIMMERMANN M, ZIMMERMANN-KOGADEEVA M, WEGMANN R, et al. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes[J]. *Nature*, 2019, 570(7762): 462-467.
- [13] CERBINI T, LUO Y Q, RAO M S, et al. Transfection, selection, and colony-picking of human induced pluripotent stem cells TALEN-targeted with a GFP gene into the AAVS1 safe harbor[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2015(96): 52504.
- [14] DJATNA T, HADI M Z. Implementation of an ant colony approach to solve multi-objective order picking problem in beverage warehousing with drive-in rack system[C]//2017 International Conference on Advanced Computer Science and Information Systems (ICACSIS), 28-29 October 2017, Bali, Indonesia, 2017: 137-142.
- [15] HUANG C, HE K, LIU C L, et al. A colony picking robot with multi-pin synchronous manipulator[C]//2018 IEEE International Conference on Information and Automation (ICIA), 11-13 August 2018, Wuyi Mountain, Fujian, China, 2018: 7-12.
- [16] 张依朗. 基于机器视觉的高通量自动菌落挑取系统研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2021.
ZHANG Y L. Research on high throughput automatic colony picking sysetem based on machine vision[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2021.
- [17] CHEN W B, ZHANG C C. Automated bacterial colony counting for clonogenic assay[M]//*Dental Computing and Applications*. New York: IGI Global, 2009: 134-145.
- [18] GOROKHOV O, FAZYLOV R, KAZACHUK M, et al. Bacterial colony detection method for microbiological photographic images[C]//2022 International Joint Conference on Neural Networks (IJCNN). July 18-23, 2022, Padua, Italy. IEEE, 2022: 1-8.
- [19] ZHANG L. Phase contrast microscopy cell population segmentation: a survey[EB/OL]. arXiv, 2019: 1911.11111. (2019-11-29)[2025-03-01]. <https://arxiv.org/pdf/1911.11111>.
- [20] LAWLESS C, WILKINSON D J, YOUNG A, et al. Colonyzer: automated quantification of micro-organism growth characteristics on solid agar[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 287.
- [21] REHMAN A, SALEEM Z, AMJAD J, et al. A comparison of bacterial colonies count from petri dishes utilizing hough transform and traditional manual counting[EB/OL]. arXiv, 2025: 2505.20365. (2025-05-26)[2025-06-01]. <https://arxiv.org/abs/2505.20365>.
- [22] RUSS J C, NEAL F B. The image processing handbook [M/OL]. 7th ed. Boca Raton: CRC Press, 2016. (2018-09-03) [2025-06-25]. <https://doi.org/10.1201/b18983>.
- [23] MOEN E, BANNON D, KUDO T, et al. Deep learning for cellular image analysis[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(12): 1233-1246.
- [24] WAKABAYASHI R, AOYANAGI A, TOMINAGA T. Rapid counting of coliforms and *Escherichia coli* by deep learning-based classifier[J]. *Journal of Food Safety*, 2024, 44(4): e13158.
- [25] SHEN B Y, CHEN X, CAI D L, et al. Real-Space Imaging of the Ordered Small Molecule Orientations in Porous Frameworks by Electron Microscopy[EB/OL]. arXiv, 2020: 2001.09588. (2020-01-27) [2025-06-01]. <https://arxiv.org/abs/2001.09588>.
- [26] ALI AKBAR S, GHAZALI K H, HASAN H, et al. Rapid bacterial colony classification using deep learning[J]. *Indonesian Journal of Electrical Engineering and Computer Science*, 2022, 26(1): 352.
- [27] ANDREINI P, BONECHI S, BIANCHINI M, et al. a deep learning approach to bacterial colony segmentation[C/OL]// KŮRKOVÁ V, MANOLOPOULOS Y, HAMMER B, et al. Artificial neural networks and machine learning-ICANN 2018. 27th International Conference on Artificial Neural Networks, Rhodes, Greece, October 4-7, 2018, Proceedings, Part III. Cham: Springer, 2018. (2018-09-18) [2025-06-01]. https://doi.org/10.1007/978-3-030-01424-7_51.
- [28] RONNEBERGER O, FISCHER P, BROXET T, et al. U-Net: convolutional networks for biomedical image segmentation [EB/OL]. arXiv, 2015: 1505.04597. (2015-05-18) [2025-06-

- 01]. <https://arxiv.org/pdf/1505.04597.pdf>.
- [29] OKTAY O, SCHLEMPER J, LE FOLGOC L, et al. Attention U-Net: learning where to look for the pancreas[EB/OL]. arXiv, 2018: 1804.03999. (2018-05-20)[2025-06-01]. <https://arxiv.org/abs/1804.03999>.
- [30] HE K M, GKIOXARI G, DOLLÁRET P, et al. Mask R-CNN for object detection and instance segmentation[EB/OL]. arXiv, 2017: 1703.06870. (2018-01-24)[2025-06-01]. <https://arxiv.org/abs/1703.06870>.
- [31] JHA D, SMEDSRUD P H, JOHANSEN D, et al. A comprehensive study on colorectal polyp segmentation with ResUNet++, conditional random field and test-time augmentation[J]. IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics, 2021, 25(6): 2029-2040.
- [32] 曹淑艳, 陈雪景, 张洵洋. 中国塑料行业绿色低碳发展研究报告 [R/OL]. [2025-06-01]. <https://www.ccetp.cn/newsinfo/4697881.html>.
- CAO S Y, CHEN X J, ZHANG X Y. Green and low carbon

development of the plastics industry in China[R/OL]. [2025-06-01]. <https://www.ccetp.cn/newsinfo/4697881.html>.



通讯作者: 李航(1971—),男,技术负责人,工程师。研究方向为工业自动化系统集成、精密机电设备研发、智能检测技术工程化应用。

E-mail: hli@capitalbio.com



第一作者: 张建康(1986—),男,高级工程师。研究方向为实验室自动化系统开发、机器人技术应用、智能装备研发。

E-mail: jiankangzhang@capitalbio.com