

蛍光画像処理によるメタン菌計測技術と これを用いた動力学モデルの開発

廣辻 淳二、 四元 初男、 吉村由美子、
中津川直樹、 小沢 建樹

三菱電機株式会社 中央研究所
〒661 兵庫県尼崎市塚口本町8-1-1

概要

メタン菌固有の補酵素F420に着目し、画像処理技術と組合わせて、新方式のメタン菌計測装置を開発するとともに、F420をメタン菌濃度の指標として用いる動力学モデルについて検討した。この計測装置は、試料をプレパラート状に自動固定し、励起光照射によって得られる蛍光画像を画像処理してメタン菌を識別、計数するものである。実廃水リアクタで基本性能を評価した結果、計測値はF420濃度の手分析値と良好な相関を示し、プロセス計測装置として十分な精度であった。一方、F420濃度をメタン菌濃度として用い、酸醗酵過程とメタン醗酵過程の反応を別個に記述するモデルを考案し、浮遊式リアクタのデータを用いて、その妥当性を図解法により検討した。データのバラツキは小さく、得られた動力学定数値も文献値、理論値と比較的一致したので、考案したモデルは妥当で、F420をメタン菌濃度の指標として使用できることが分った。

キーワード

メタン醗酵、メタン菌、補酵素、F420濃度、画像処理、動力学モデル

1. はじめに

近年、省エネルギー、新エネルギー資源開発が重要課題となるなかで、メタン醗酵が再認識され、兼型リアクタから新規メタン菌まで幅広く研究開発が行われている^{1,2,3)}。メタン醗酵には酸生成菌とメタン菌が関与しているが、後者は増殖速度が小さく環境変化に鋭敏で、しばしば酸敗等のプロセス破綻を引起こす。従って、メタン醗酵プロセスの適正管理にはメタン菌の濃度、活性の計測監視が極めて重要である。

微生物センサーとしては光学式や超音波式の濃度計が既に実用化されているが、メタン醗酵の場合、これらの方式ではメタン菌だけでなく酸生成菌も計測される。特に、下水汚泥処理の場合には処理対象の汚泥までを計測してしまい、メタン菌のみの計測は困難である。

筆者らは、メタン菌固有の蛍光性補酵素に着目し、画像処理技術と組合わせてメタン菌のみの計

測する装置を開発するとともに、これを活用する制御技術の開発を目指して、F 420 を組込んだ重力学モデルについて検討した。

2. 画像処理によるメタン菌計測

計測装置 F 420 は、420 nm に吸収極大を示すジアザフラビン誘導体であり、その酸化型は472 nm の蛍光を発する⁴⁾。図1に示すように、本装置はこの性質を利用してメタン菌の濃度、活性を計測するものである。即ち、励起光をフィルタで420 nm 付近を限定し、プレパラート状に固定した試料に照射する。試料の蛍光はフィルタで処理した後、カメラで画像として取得する。この蛍光画像にはメタン菌以外の蛍光も含まれるので、画像処理では高感度カメラのS/N対策、照明むら・シェーディング影響の補正、きょう雑物排除のための粒子選択ならびに特徴抽出を行い、メタン菌を識別し計数する。

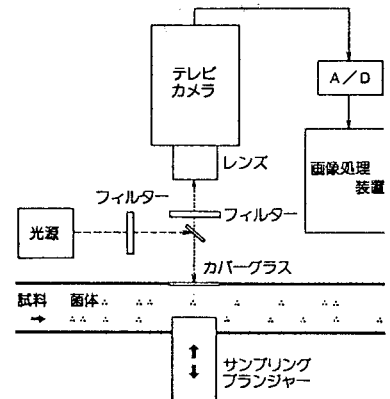


図1 メタン菌計測装置の構成

光学系仕様は、蛍光顕微鏡とモノクロメータを用いて、純粋菌、混合菌の励起光ならびに蛍光ベクトルについて検討し、励起光、蛍光フィルタの波長 (λ_{max}) をそれぞれ408.5 nm、481.5 nm に設定した。また、カメラは 480 nm 付近に最大感度を有するSITカメラを選定し、レンズ倍率に捕捉時の試料厚みと菌形状の識別限界から設定した

実験結果と考察 写真1は、本計測装置を用いて撮影した下水処理リアクタ試料の蛍光画像であり、画像処理のために積分処理を行ったものである。写真に示すように、F 420 に基づく蛍光のコントラストは良好であり、画像もほぼ静止している。写真2は写真1を画像処理したものである。写真1と比較すると、メタン菌の蛍光が精度よく切出されていることが分る。

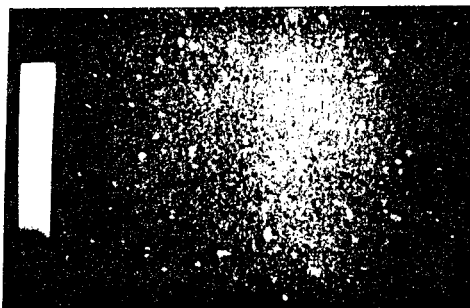


写真1 計測装置による蛍光画像

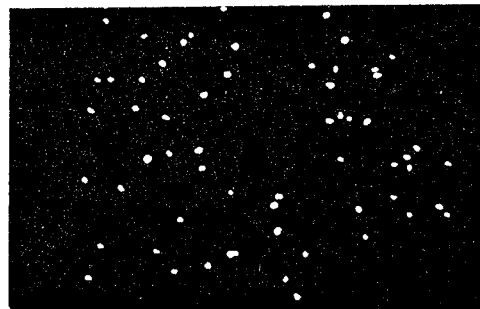


写真2 蛍光画像の画像処理結果

図2は、リアクタ試料を段階的に希釈し、手分析によるF 420 濃度と本装置の計測値の相関性について検討した結果である。直線性は非常に良好で、回帰直線もほぼ原点を通っていることから、本装置はメタン菌計測装置として十分な精度を有していることが分る。図3は約2ヶ月間に亘って図2と同様に検討した結果である。プロットは図2よりも若干ばらついているが、両者の相関性は良好である。また、この期間、計測装置として安定に動作することを確認した。

3. メタン酸酵動力学モデル

動力学モデル 図4に本研究で開発した動力学モデルを示す。このモデルは、廣辻等が下水汚泥

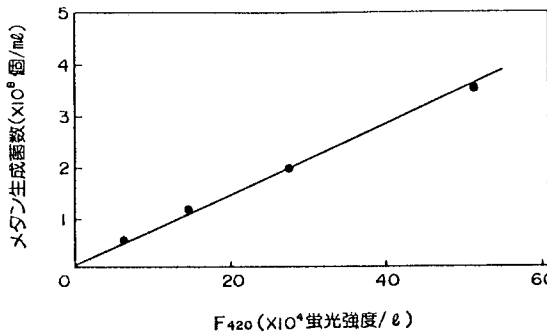


図2 装置計測値と手分析値の相関

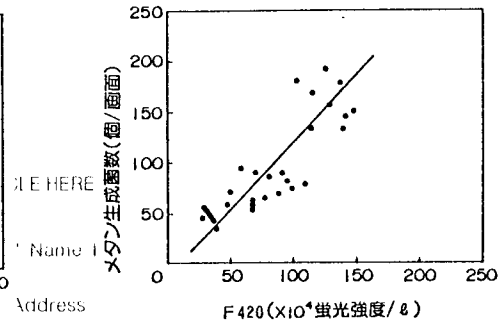


図3 約2ヶ月間の計測値と手分析値の相関

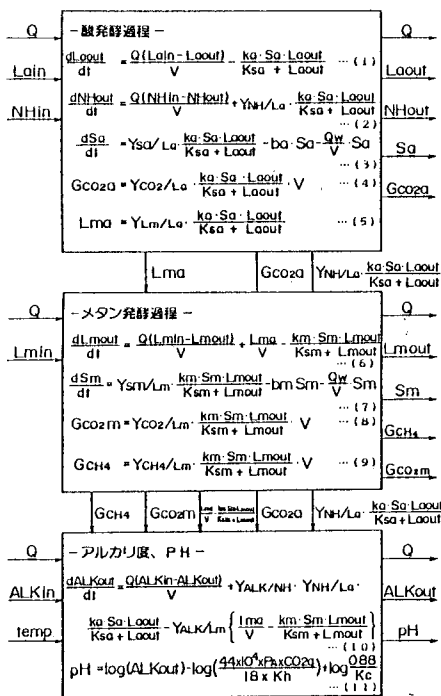


図4 F420濃度を用いたメタン醱酵の動力学モデル

消化槽において開発したモデル⁵⁾を基本とし、酸醱酵過程とメタン醱酵過程の反応を別個に示すモデルである。F420濃度をメタン菌濃度としているが、F420はメタン生成反応に直接関与することから、Monod式の微生物濃度として使用できると考えた。また、メタン菌のF420含有量は菌種、増殖フェイズによって異なるが、連続培養系では主に対数増殖期にあると考えられるし、菌相と廃水組成がおおよそ決まると考えられるので、F420含有量は安定していると考えた。

実験装置および方法 合成下水基質の浮遊式膜分離型リアクタ(実容積75ℓ)において流入流量を急増させ、F420濃度、処理水質、ガス発生量等の応答を追跡した。モデル式は傾きあるい切片から動力学定数値が得られるような直線に変形し、この座標上に実験データをプロットしてそのバラツキ具合から妥当性を検討した。

記号 La: 酸醱酵過程基質濃度(mg/L), Lm: 有機酸濃度(mg/L), Sa: 酸生成菌濃度(umol-NAD/L), Sm: メタン生成菌濃度(蛍光強度-F420/L), NH: アンモニア濃度(mg/L), Alk: アルカリ度(mg/L), GCo2: 炭酸ガス発生量(L/d), GCH4: メタンガス発生量(L/d), Q: 流入水量(L/d), V: リアクタ容積(L), Qw: 引抜き流量(L/d), ka: 酸醱酵過程基質の最大比除去速度定数(1/d), km: 最大比有機酸除去速度定数(1/d), Ksa, Ksm: 飽和定数(mg/L), Y(NH/La): 酸醱酵過程基質に対するアンモニア収率(-), Y(Sa/La): 酸醱酵過程基質に対する酸生成菌収率(umol/mg), ba, bm: 酸生成菌、メタン菌の自己分解係数(1/d), Y(Co2/La): 酸醱酵過程基質に対する炭酸ガス収率(L/mg), Y(Lm/La): 酸醱酵過程基質に対する有機酸収率(-), Lma: 酸醱酵過程基質からの有機酸生成量(mg), Y(Sm/Lm): 有機酸に対するメタン菌収率(F420-蛍光強度/mg), Y(COm/Lm): 有機酸に対する炭酸ガス収率(L/mg), Y(CH4/Lm): 有機酸に対するメタンガス収率(L/mg), Y(Alk/La): 酸醱酵過程基質に対するアルカリ度収率(-), Pa: リアクタ内全圧(mmHg), Kh: ヘンリ定数, CO2g: 炭酸ガス濃度(%), Kc: 炭酸の平衡定数, 添字a, m: それぞれ、酸醱酵過程、メタン醱酵過程を示す, 添字in, out: それぞれ、流入水、リアクタ流出水を示す

解析結果と考察 図5にメタン菌増殖モデルの解析結果を示す。同図では(7)式、(9)式から、(12)式のように変形してプロットしており、傾きから $Y(\text{Sm}/\text{Lm}) / Y(\text{CH}_4/\text{Lm})$ が、切片から $bm+Qw/V$ が得られる。なお、(12)式の $k-1, k, k+1$ は時刻を示す。グラフの直線性は比較的良好で、 $Y(\text{Sm}/\text{Lm}) = 56.8$ (F420-蛍光強度/HAc-mg)、 $bm=0.020$ (1/日) が得られた。 $Y(\text{Sm}/\text{Lm})$ は同一単位系での文献値がないが、 bm は文献値 $0.01 \sim 0.04$ (1/日)⁶⁾とよく一致している。

$$\frac{\{Sm(k+1) - Sm(k-1)\}}{\{2 \cdot Sm(k)\}} = \frac{Y(\text{Sm}/\text{Lm})}{Y(\text{CH}_4/\text{Lm})} \cdot \frac{GCH_4(k)/Sm(k)/V}{-bm + Qw(k)/V} \quad \dots (12)$$

図6に有機酸除去モデルの解析結果を示す。同図では(9)式を(13)式のように変形してプロットしており、傾きから $Ksm / Y(\text{CH}_4/\text{Lm}) / km$ が、切片から $1/Y(\text{CH}_4/\text{Lm}) / km$ が得られる。図に示すように、グラフの直線性は良好で、 $km=0.00138$ (HAc-mg/F420-蛍光強度・日)、 $Ksm=144$ (mg-HAc/L)が得られた。 km も同一単位系の文献値がなく比較できないが、 Ksm は文献値 $2 \sim 1000$ (mg-HAc/L)⁶⁾の範囲内にある。

$$\frac{Sm(k) \cdot V / GCH_4(k)}{1/Y(\text{CH}_4/\text{Lm}) / km} = \frac{Ksm / Y(\text{CH}_4/\text{Lm}) / km / Lmout(k)}{+1/Y(\text{CH}_4/\text{Lm}) / km} \quad \dots (13)$$

以上から、F420はMonod式においてメタン菌濃度の指標と成り得ることが分かった。なお、その他のモデル式の場合も同様の結果が得られ、考案したモデルは妥当であることが分かった。

4. おわりに

本稿では、蛍光画像処理による新方式のメタン菌計測装置、ならびにF420を組込んだ動力学モデルについて報告した。以上のように、メタン菌計測装置によれば、共生系においてもメタン菌のみを分離して、その濃度、活性をオンライン計測できる。メタンガス発生量、有機酸濃度、pH等はメタン菌活性変化の間接的な計測手段であり、本計測値の方がより直接的に、また早期に活性変化を知ることができると考えられる。また、計測値をメタン菌濃度として動力学モデルを構築できるので、運転支援やプロセス制御への展開も可能で、安定かつ高効率のメタン醗酵が可能となろう。なお、本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構からアクアルネサンス技術研究組合への委託業務『高性能分離膜複合メタンガス製造装置開発』の一環として実施したものである。

参考文献

- 1) 吉村等、日本農芸化学会1989年度大会、新潟、1989/4。
- 2) 中津川等、日本農芸化学会1989年度大会、新潟、1989/4。
- 3) 富士原、月刊下水道、Vol. 8、No. 8、16(1985)。
- 4) 遠藤、荏原インフィルコ時報、No. 92、54(1985)。
- 5) 廣辻、第2回水システム自動計測制御国内ワークショップ論文集、201(1984)。
- 6) M. Henze, Wat. Sci. Tech., Vol. 15, No. 8/9 1(1983)

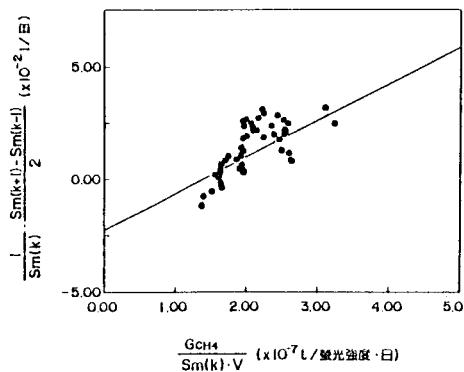


図5 メタン菌増殖モデルの解析結果

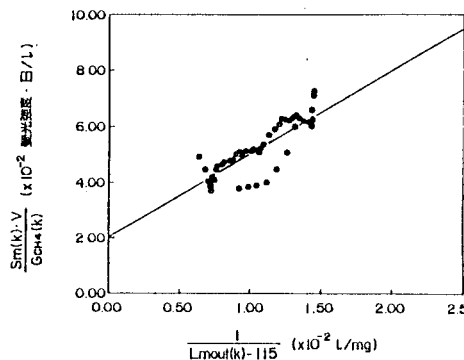


図6 有機酸除去モデルの解析結果