

〈研究発表〉

光散乱を用いた微生物群の構成比のモニタリング

吉岡 雅也¹⁾, 本多 典広¹⁾, 長塩 尚之²⁾, 栗津 邦男¹⁾

¹⁾ 大阪大学大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1-A14, E-mail: awazu@see.eng.osaka-u.ac.jp)

²⁾ 日新電機株式会社 材料研究所 (〒615-8686 京都府京都市右京区梅津高畝町 47, E-mail: Nagashio_Naoyuki@nissin.co.jp)

概要

活性汚泥中の微生物群の構成比のモニタリングを目的として、非接触・連続計測法として近年注目されている近赤外光 (1~2 μm の波長範囲) を用いた光散乱計測手法の適応可能性につき検討した。活性汚泥の簡易モデルとして大腸菌, および酵母の混合液を用い, 独自に開発した光学特性算出システム, および多変量解析を用いて各菌濃度の検量線を作成した。結果, 大腸菌, および酵母濃度を体積分率 1%まで定量できた。本法により近赤外光の光散乱を用いた, 活性汚泥中の微生物群の構成比のモニタリングの可能性が見出された。

キーワード: 廃水処理, 微生物群構成比, 近赤外光, 光学特性値, 部分的最小 2 乗回帰分析

1. はじめに

近年, 地球温暖化防止の観点から, 活性汚泥法の運転に伴うエネルギー消費の低減, および活性汚泥の処理性能の把握が求められている。活性汚泥の処理性能を把握する上で, フロックサイズ, 圧密性, および形状等のフロックの状態は, 固液分離性を左右するため, 重要な指標といえる¹⁾。さらに, フロックサイズと活性汚泥の沈降特性 (固液分離性の 1 つ) は, 糸状性細菌の増加等の微生物群の構成比の変化と関連しており, 処理プロセスを把握する指標となる可能性が示されている²⁾。よって, フロックの状態を把握するために, 微生物群の構成比をモニタリングすることは, 活性汚泥による良好な廃水処理性能の維持に向けて重要といえる。

フロックの状態を把握する手法としては, 現在, 顕微鏡観察が広く用いられている³⁾。さらに, 浸漬型のモニタ等を用いた *in situ* 測定に向けた研究も報告されている³⁾。また, 活性汚泥の一般的な *in situ* 測定手法として, 可視光を用いた濁度計による濁度測定が挙げられるが, 実時間で汚泥中の微生物群の構成比の把握は出来ていないのが現状である。

一方, 本研究では微生物の構成比の把握のために近赤外光に着目した。近赤外光は, 可視光と比較して, 光が数 mm オーダーまで侵達することが特徴である。これは活性汚泥の *in situ* モニタリングに向けては大きなメリットと考えられる。先行研究では, 大腸菌液中の大腸菌濃度の把握に向けた検討として, 大腸菌液の光学的特徴を表す吸収係数 μ_a [mm^{-1}] (光の吸収のしやすさを表す指標), および換算散乱係数 μ_s' [mm^{-1}]

(散乱のしやすさを表す指標) を算出し, μ_s' を用いた大腸菌濃度の定量の可能性を示した⁴⁾。

本研究では, 簡便に活性汚泥中の微生物群の構成比を把握可能な分析手法の確立を目的とし, 近赤外波長において独自に開発した手法を用いて, 活性汚泥の簡易モデルとして, 大腸菌, および酵母を含む懸濁液の μ_s' を算出し, μ_s' , および多変量解析を用いて, 各菌濃度の定量的評価を検討した。

2. 実験方法

2.1 試料

(1) 前培養・種菌

普通ブイヨン (ダイゴ製) 培地, およびポテト培地 (Difco 製) 各 100 mL を三角フラスコに入れ, 蒸気滅菌 (121°C, 15 分) し, 冷却後, 事前に培養しておいた, 大腸菌 (*Escherichia coli*, NBRC3301), およびパン酵母をそれぞれ 1 白金耳植菌し, 37°C でそれぞれ 24, および 48 時間振盪培養を行った。

(2) 集菌・調整

各培養液を遠心分離 (4000 r.p.m. 10 分) を 2 回繰り返し集菌した。集菌後, 菌ペレットを滅菌した 0.01 M リン酸緩衝液 (37242-55, ナカライテスク) で懸濁し, 各溶液中の大腸菌, および酵母の体積分率が, 25% となるように調整した。その後, 段階希釈を行い, 12.5, 6.3, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1% の濃度に調整した。大腸菌, および酵母の混合液は, 上記と同様の手順で溶液中の体積分率 10% の大腸菌液, および酵母液を作成後, 大腸菌と酵母の体積比が 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10 となるように混合した。

2.2 分析方法

スライドガラス (S1112, 松浪硝子工業株式会社) 間に厚み 0.5 mm のスペーサーを挟み, 作成したサンプルホルダーに菌液をいれたものをサンプルとした. 各実験におけるサンプル数は 2 とした. サンプルの光学特性値は双積分球光学系と逆モンテカルロ法を組み合わせた光学特性算出システム⁵⁾を用いて算出した. Fig. 1 に双積分球光学系の模式図を示す. 光源にはハロゲンランプ (LS-H150IR-FBC, 株式会社住田光学ガラス) を用いた. 光源からの光を, レンズを用いて集光し, 二つの積分球 (CSTM-3P-GPS-033-SL, Lab-sphere) の間に設置したサンプルに照射し, 拡散反射率 R_a と透過率 T_t を計測した. R_a および T_t は, コア直径 1000 μm のマルチモードファイバー (CUSTOM-PATCH-2243142, Ocean Optics) を用いて導光され, ファイバーを通過後, 受光器まで導光した. 受光器には近赤外分光器 (NIR256-2.5, Ocean Optics) を用いた. 測定条件は, 波長 840~2632 nm, 波長分解能約 7.5~25.0 nm, 積算回数 10 回にて 3 回測定を行った.

測定した R_a および T_t から, Wang ら⁶⁾により作成されたモンテカルロシミュレーションコードを用いて独自に開発した逆モンテカルロ法により, 波長 1000~1300 nm における光学特性値 μ_a , および μ_s' を算出した. 波長 1100~1300 nm における μ_s' スペクトルに, 前処理として直交化信号補正を行った後, 部分的最小 2 乗 (partial least squares: PLS) 回帰分析を行った. PLS 回帰分析は The Unscrambler X (v10.2) (Camo) を用いて, Random cross validation 法により行った.

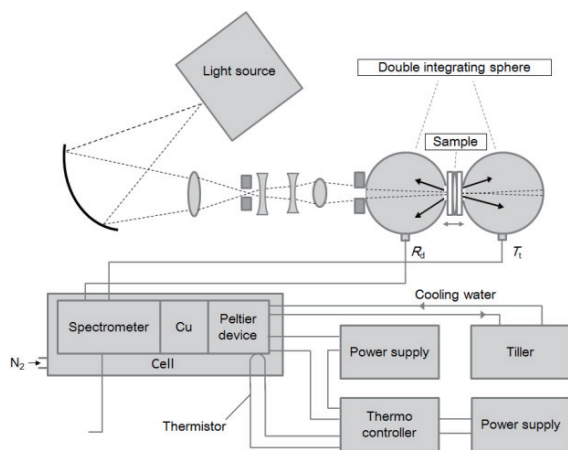


Fig. 1: Schematic diagram of the double integrating sphere optical setup⁵⁾.

3. 実験結果

Fig. 2 に大腸菌液中の大腸菌濃度毎の μ_s' スペクトルを示す. 波長 1100~1300 nm でのスペクトルは, 大腸菌の体積分率 3.2~25% の範囲で, 大腸菌の体積分率の増加とともに増加した. 波長 1100~1300 nm において, μ_s' の標準偏差は 0.019 程度であった. Fig. 3 に, 横軸に大腸菌の濃度を, 縦軸に波長 1203 nm における大腸菌の μ_s' をとり作成した図を示す. Fig. 4 は, Fig. 3 の大腸菌濃度 0.1~3.2 v/v% までの範囲を示す. 大腸菌濃度 0.1~25 v/v% の範囲において, 大腸菌液の μ_s' と大腸菌の濃度には線形近似で良い相関が得られた ($R \geq 0.98$).

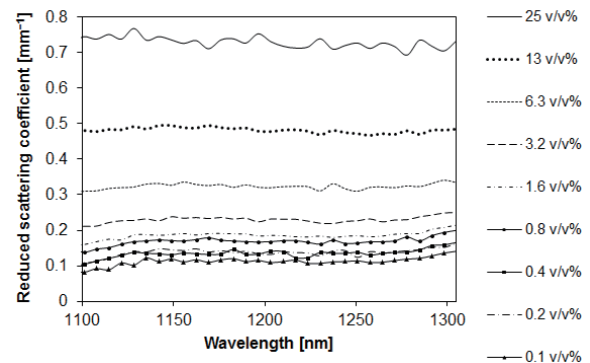


Fig. 2: The reduced scattering coefficient μ_s' spectra of the *E. coli* solutions in the wavelength range from 1100 to 1300 nm. Each line represents a different *E. coli* concentration ($n=2$).

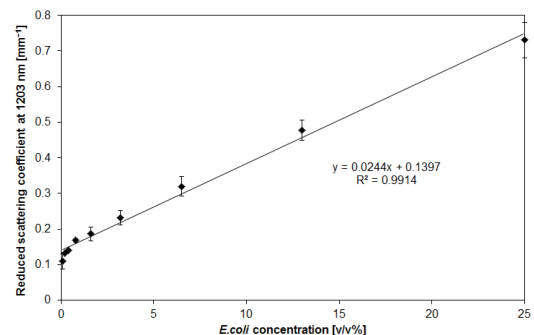


Fig. 3: The calibration curve of the reduced scattering coefficient μ_s' at 1203 nm of the *E. coli* solutions versus *E. coli* concentration. *E. coli* concentration was varied from 0.1 to 25 v/v%.

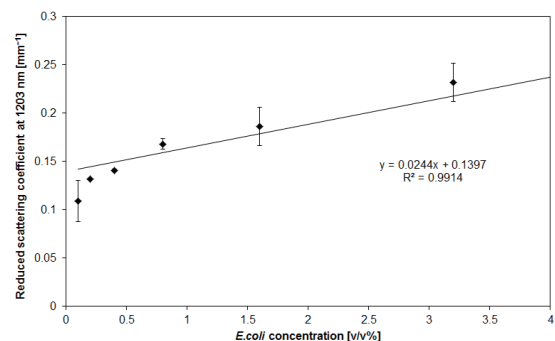


Fig. 4: The calibration curve of the reduced scattering coefficient μ_s' at 1203 nm of the *E. coli* solutions versus *E. coli* concentration in the range of 0.1 to 3.2 v/v%.

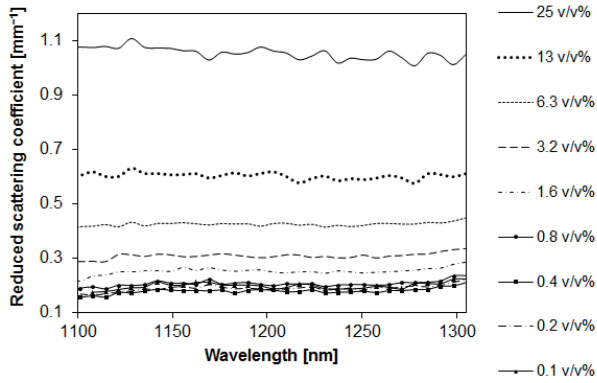


Fig. 5: The reduced scattering coefficient μ_s' spectra of the yeast solutions in the wavelength range from 1100 to 1300 nm. Each line represents a different yeast concentration ($n=2$).

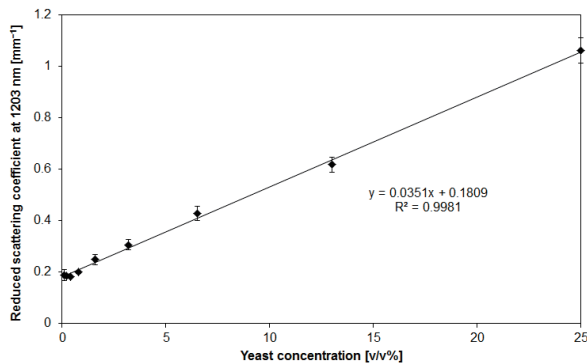


Fig. 6: The calibration curve of the reduced scattering coefficient μ_s' at 1203 nm of the yeast solutions versus yeast concentration. Yeast concentration was varied from 0.1 to 25 v/v%.

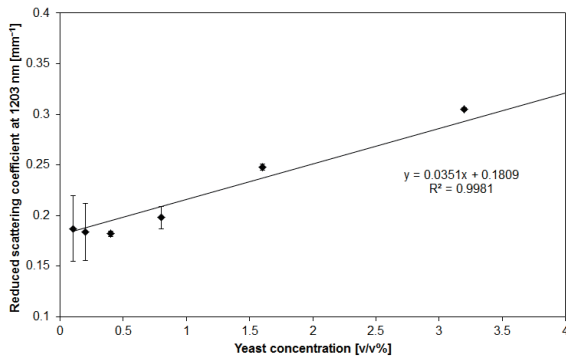


Fig. 7: The calibration curve of the reduced scattering coefficient μ_s' at 1203 nm of the yeast solutions versus yeast concentration in the range of 0.1 to 3.2 v/v%.

Fig. 5 に酵母液中の酵母濃度毎の μ_s' スペクトルを示す。波長 1100~1300 nm でのスペクトルは、酵母の体積分率 1.6~25% の範囲で、酵母の体積分率の増加とともに増加した。波長 1100~1300 nm において、 μ_s' の標準偏差は 0.028 程度であった。Fig. 6 に、横軸に

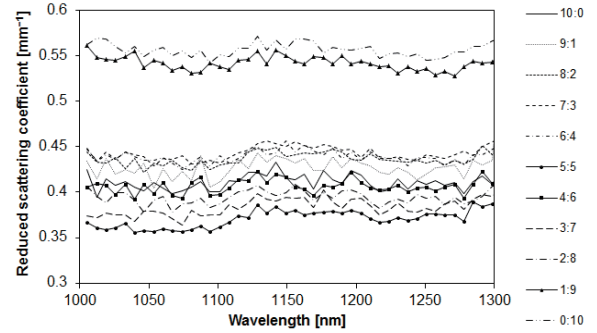


Fig. 8: The reduced scattering coefficient μ_s' spectra of the *E. coli* and yeast mixed solutions in the wavelength range from 1000 to 1300 nm. The concentration of *E. coli* and yeast was varied from 10:0 to 0:10 v/v% ($n=2$).

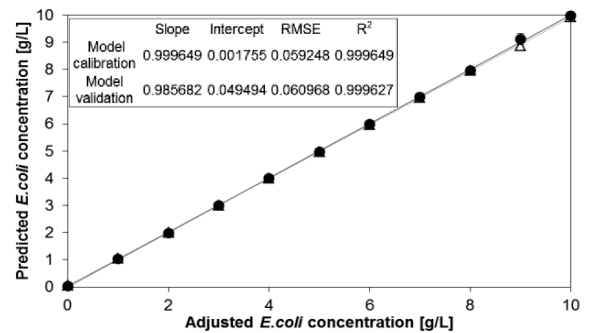


Fig. 9: The adjusted values of *E. coli* concentration are plotted against PLS model predicted *E. coli* values. Closed circle and open triangle correspond to calibration and validation points, respectively.

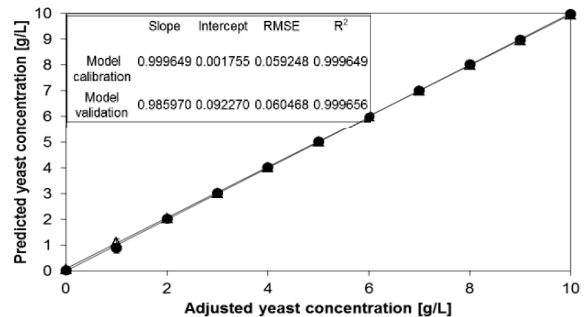


Fig. 10: The adjusted values of yeast concentration are plotted against PLS model predicted yeast values. Closed circle and open triangle correspond to calibration and validation points, respectively.

酵母の濃度を、縦軸に波長 1203 nm における酵母の μ_s' をとり作成した図を示す。Fig. 7 は、Fig. 6 の酵母濃度 0.1~3.2 v/v% までの範囲を示す。酵母濃度 0.1~25 v/v% の範囲において、酵母液の μ_s' と酵母の濃度には線形近似で良い相関が得られた ($R \geq 0.98$)。Fig. 8 に大腸菌、および酵母の混合液の μ_s' スペクトルを示す。

波長 1000~1300 nm において、 μ_s' の標準偏差は 0.05 程度であった。Fig. 9 に波長 1100~1300 nm における混合液の μ_s' と、PLS 回帰分析を用いて得られた混合液中の大腸菌濃度の検量線を示す。Fig. 10 に、Fig. 9 と同様の手法で得られた混合液中の酵母濃度の検量線を示す。図中の凡例上段は、検量線の検量モデルの値を、下段は検量線の評価モデルの値をそれぞれ示している。各検量線を用いて、混合液中の大腸菌、および酵母濃度をそれぞれ体積分率 1% まで定量可能であった。検量線の精度を示す指標である平均最小二乗誤差 (Root mean squared error : RMSE) 値はそれぞれ 0.061, 0.06 であった。

4. 考察

波長 1100~1300 nm にて、大腸菌液内の菌濃度と大腸菌液の換算散乱係数 μ_s' には高い相関 ($R \geq 0.98$) が得られた。これは、先行研究の結果⁴⁾と一致している。さらに、酵母についても同様の結果が得られた。また、多変量解析の 1 つである PLS 回帰分析を用いて、大腸菌、および酵母の混合液中での、各菌濃度の良い検量線が得られ、結果体積分率 1~25% まで定量可能であった。

光は光の波長と散乱体の大きさが一致する際、 μ_s' は高くなる⁷⁾。今回の結果は、計測対象とする物質の粒子径が測定波長と近い場合だけでなく、測定波長より大きい場合でも、近赤外光を用いることで、物質の濃度を定量的に計測できる可能性を示唆している。

実際の活性汚泥中には、大腸菌等の浮遊細菌、酵母等の浮遊真菌の他に、微生物群の集合体であるフロックなどが存在する。フロックは、大腸菌や酵母よりもさらに大きな粒子径の散乱体となる。今後、活性汚泥の μ_s' を算出し、実際に活性汚泥中の微生物群の構成比を概算できるかどうか検討する必要がある。

5. まとめと今後の展望

本研究では、近赤外光を用いて簡便に活性汚泥中の微生物群の構成比を把握可能な分析手法の確立を目的とし、光学特性値算出システムを用いて、菌液中の菌濃度の定量を検討した。波長 1100~1300 nm 付近における μ_s' を用いることにより、大腸菌液内の大腸菌濃度、酵母液内の酵母濃度、および大腸菌、および酵母の混合液内の各菌濃度を定量評価可能であった。

以上より、本概念は、活性汚泥の μ_s' を算出することで、廃水処理過程における微生物群の構成比の変化をモニタリングするための技術となることが期待できる。

今後、実廃水を用いた系で、実廃水中の大腸菌、および酵母濃度の概算を行った後、活性汚泥を用いた系で活性汚泥中の微生物群の構成比の概算が可能かどうか検討を行う。

参考文献

- 1) 千種薫: 図説 微生物による水質管理, 産業用水調査会, pp. 8-54, 71-74 (1996)
- 2) R. Govoreanu, D. Seghers, I. Nopens, B. De Clercq, H. Saveyn, C. Capalozza, P. Van der Meeren, W. Verstraete, E. Top and P.A. Vanrolleghem: Linking floc structure and settling properties to activated sludge population dynamics in an SBR, *Water Science and Technology*, Vol. 47, No. 12, pp. 9-18 (2003)
- 3) 鈴木一如: 活性汚泥微生物の画像認識による下水処理の制御, *環境システム計測制御学会誌*, Vol. 4, No.2, pp. 27-40 (1999)
- 4) 本多典広, 長塩尚之, 吉岡雅也, 栗津邦男: 近赤外分光分析による微生物生成代謝物の推定に関する基礎的検討, *環境システム計測制御学会誌*, Vol. 16, No.2, 3, pp. 38-44 (2011)
- 5) 本多典広, 石井克典, 南條卓也, 栗津邦男: 双積分球光学系と逆モンテカルロ法を用いた組織の可視・近赤外域光学特性値算出システムの開発とその評価, *日本レーザー医学会誌*, Vol. 32, No. 4, pp. 421-428 (2012)
- 6) L.-H. Wang, S.L. Jacques and L.-Q. Zheng: MCML-Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues, *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, Vol. 47, pp. 131-146 (1995)
- 7) V. V. Tuchin: *Tissue Optics*, SPIE Press, pp. 132-142 (2007)