

一 般 論 文

近赤外分光分析法を用いた生物代謝物の測定法

Evaluation of bacterial metabolite products by near infrared spectroscopic analysis

本 多 典 広*	長 塩 尚 之**
N. Honda	N. Nagashio
吉 岡 雅 也*	粟 津 邦 男*
M. Yoshioka	K. Awazu

概 要

廃水処理プロセスの実時間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分光法（1000～2000nmの波長範囲）の適用可能性を、検討した。廃水処理モデルとしては、既知基質に対し、微生物が資化・代謝する系を用い、反応水中の動的変化の把握を近赤外分光計測および独自に開発した散乱計測法にて行った。その結果、波長1200nmの換算散乱係数を用いて濁度を計測する事ができ、培養時間の増加に伴う波長約2260nmの吸収の増加を観測した。本法により、近赤外分光分析を用いた廃水処理過程のモニタリングの可能性が見出された。

Synopsis

The monitoring technology of wastewater treatment process is important as one of the operation management technologies. The objective of this study is to investigate the potential of near-infrared (NIR) spectroscopy for wastewater treatment monitoring in the wavelength range between 1000 nm and 2500 nm. *Escherichia coli* (*E. coli*), the glucose and glutamine mixed (GG) and skim milk solutions are used as a wastewater model. For quantitative analysis, the optical properties of the *E. coli* solution were evaluated with the optical properties measurement system developed by us. The NIR absorption spectra of the *E. coli* cultured with GG or skim milk solutions were measured. The linear fitting of the calibration curves obtained a correlation coefficient above 0.9. The absorption peaks relating to acetate increased with the culture time increment around the wavelength of 2260 nm. These results show the potential of the NIR spectroscopy for the wastewater treatment process monitoring.

1. はじめに

廃水処理の最適化は、最小限の運転コストで、安定した処理水質を得る事にある。廃水処理を最適化するために、処理がどの時点でどの程度進んでいるのかを把握する事は、非常に重要である。

すなわち、処理すべき汚濁負荷を的確に把握し、処理水質を監視することが重要であり、これまでに多くの監視装置が開発・実用化されている。

現在、多くの場合、有機廃水は活性汚泥法に代表される方法で、生物学的に処理されている。活性汚泥法による好氣的な生物処理は、有機性の汚水中で微生物を連続的に培養・増殖させて、汚水中の浮遊物や溶解性物質を吸着・酸化・同化するものである¹⁾。

廃水処理では、これまで、主に「最終処理性能」に着目し、活性汚泥法等の生物学的処理に於ける、有機物・窒素・リン等の挙動把握・解析が行われてきた。一方、廃水処理を行っている資化微生物の代謝過程に於いて生じた物質の挙動については、あまり注目されてこなかった。

資化による中間代謝物質の挙動を知る事は、処理状況を把握する事に繋がり、ひいては「省エネ運転」の足掛かりとなる可能性も秘めている。特に、多段反応槽方式の場合、重要であると考えられる。

また、汚泥濃度を正確かつ連続的に測定し、その値を指標として、薬品注入や脱水、焼却など汚泥処理プロセスの効率を高めることも重要である。現在、透過光や散乱光を利用した濁度計が用いられているが、試料の着色等によ

*大阪大学大学院 工学研究科
**日新電機(株) 研究開発本部

本稿は、「近赤外分光分析法を用いた生物代謝物の測定法」、環境システム計測制御学会誌, Vol.16, No.2,3, pp38-43, に掲載の論文の一部加筆したものである。

て、正確に計測できない場合がある。試料の着色や濁度などの光学的特徴は、それぞれ、光の吸収のしやすさを表す吸収係数 μ_a [mm^{-1}]、散乱のしやすさを表す換算散乱係数 μ_s' [mm^{-1}]等の光学特性値で記述する事ができる。だが、これまで、これら光学特性値に着目して、汚泥の μ_a 、 μ_s' を計測・算出し、濁度を計測した例はない。

本研究では、活性汚泥中の微生物や微生物の資化・代謝により生じる物質の動的把握を簡便に行うことができる分析手法の確立を目的として、近赤外波長において独自に開発した光学特性算出装置を用いて、光学特性値の計測、および、近赤外吸収分光分析の適用を検討した。本稿では、大腸菌と模擬廃水から成る生物処理系を用いて、光学特性値算出法を活用した大腸菌液中の菌濃度の定量的評価および、近赤外吸収分光分析法を活用した反応水中の動的变化の把握を試みた結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

(1) 前培養

普通ブイヨン(ダイゴ製)培地100mLを50mLずつ、2つの坂口フラスコに入れ、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)を、1白金耳植菌し、30°Cで30時間振盪培養を行った。

(2) 集菌・種菌液

遠心分離(10000r.p.m. 15分)を2回繰り返して、集菌した。菌ペレットを滅菌したリン酸緩衝液(0.01M, pH7.0)中に懸濁し、全体で約50mLに調製した液を大腸菌液とした。大腸菌液の光学特性値を算出する為、遠心分離(4000 r.p.m. 15分)を行い、上記濃度より12倍に濃縮し、その後、段階希釈により6.3倍の濃度に調整し種菌液とした。

(3) 植菌

予め、蒸気滅菌(121°C,15分)を行ったBOD標準液(グルコース3410 mgとグルタミン酸3410mgを1Lの純水に溶解させたものをBOD5000mg/Lの標準液とした、以下GGと略記)3mLと14100mg/Lのスキムミルク溶液3 mLに種菌液を1mLずつ添加した混合液を、22°Cで振盪培養を行った。

(4) 培養

植菌した培養大腸菌液を24時間後までサンプリングし吸光度計測用の試料とした。

2.2 分析方法

(1) 光学特性値の算出

スライドガラス(S1112,松浪硝子工業株式会社)間に厚み0.2mmのスペーサーを挟んで、作成したサンプルホルダーに、培養液をいれたものを測定試料とした。大腸菌

液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算出装置²⁾を用いて求めた。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, Labsphere)の間に設置した試料に照射し、拡散反射率 R_d と透過率 T_t を計測した。 R_d および T_t の計測には、コア直径1000 μm のマルチモードファイバー(CUSTOM-PATCH-2243142, Ocean Optics)を用いて導光し、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200回にて行った。測定した R_d および T_t から、Wangら³⁾により作成されたMonte Carloシミュレーションを用いて独自に開発した逆モンテカルロ法により、光学特性値 μ_a および μ_s' を算出した。

(2) 近赤外吸光度計測

スライドガラス間に厚さ1 mmのスペーサーを挟んで作製したサンプルホルダーに培養液をいれたものを測定試料とした。近赤外波長1000~2500nmにおいて試料の吸光度を計測する為に、光源としてハロゲンランプ(HL-200-HP, Ocean Optics)を使用した。光源の光は、コア直径1000 μm のマルチモードファイバー(CUSTOM-PATCH-2243142, Ocean Optics)を用いて導光し、ファイバーを通過後、コリメータレンズで擬似平行化した後、試料に照射した。試料を透過した光はレンズで集光され、マルチモードファイバーを用いて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、透過法、測定面積4.4 mm ϕ 、波長分解能約7.5~25.0 nm、積算回数100回とした。

3. 課題

3.1 光学特性値算出結果

Fig. 1に大腸菌濃度毎の μ_a スペクトルを示す。波長1000~1300nmにおいて μ_a は、大腸菌濃度の増加とともに増加した。

Fig. 2に大腸菌濃度毎の μ_s' スペクトルを示す。波長1000~1400nmにおいて、 μ_s' は大腸菌の濃度の増加とともに増加した。そこで、波長1200nmにおける大腸菌液の μ_s' と大腸菌液の濃度の相関を検討した。

Fig. 3は、横軸に大腸菌濃度、縦軸に波長1200nmにおける大腸菌液の μ_s' をとって作成した図を示しており、大腸菌液の μ_s' と濃度との間には線形近似で良い相関が得られている(相関係数 $R=0.9$ 以上)。

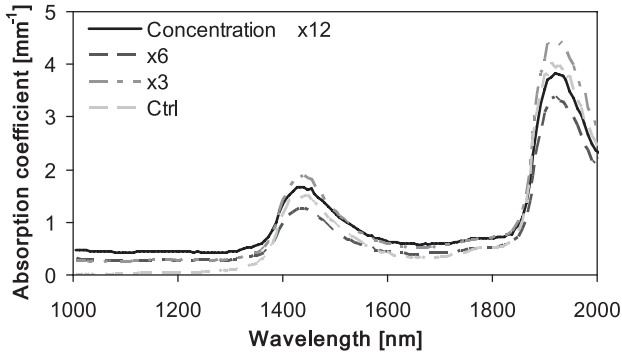


Fig. 1 The absorption coefficient μ_a spectra of the *E. coli* solution

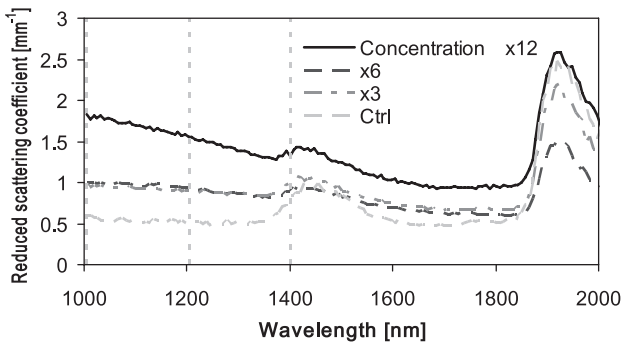


Fig. 2 The reduced scattering coefficient μ_s' spectra of the *E. coli* solution

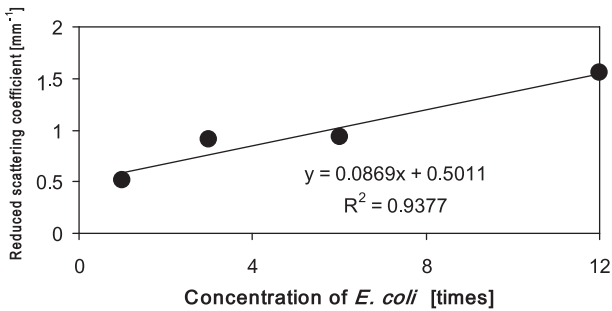


Fig. 3 The calibration curve of the reduced scattering coefficient μ_s' of the *E. coli* solution versus *E. coli* concentration

3. 2 近赤外分光分析結果

Fig. 4にGGを添加培養した培養液、Fig. 5にスキムミルクを添加培養した培養液の近赤外吸収スペクトルを示す。

近赤外分光法では、吸光度のピーク位置を検出するための手法として二次微分を取ることが一般的である。二次微分を取る事により急峻なピークとして現れ、尚且つ重なりあったピークの位置検出も容易になる。そこで、各培養液を測定して得られたスペクトルを二次微分した結果をFig. 6、Fig. 7に示す。Fig. 6およびFig. 7に示すように、波長約2250nm付近において二次微分吸光度は大きく変化する。

GGを添加した試料の二次微分吸光度は添加0.5時間

後以降、経過時間とともに増加した。また、スキムミルクを添加した試料の二次微分吸光度は、添加4時間後以降から12時間後まで、経過時間とともに増加した。波長2250nm付近のGGおよびスキムミルク添加後の吸光度の増加分を計算する為に、波長2218~2321nmにて、GGおよびスキムミルク添加後0.5時間から24時間の培養液の各吸光度値から、添加0時間後の吸光度値を差し引いた。得られたGGおよびスキムミルク添加後の培養液の吸収スペクトルをそれぞれFig. 8およびFig. 9に示す。Fig. 8およびFig. 9に示すように、GGおよびスキムミルクを添加した場合のいずれにおいても、経過時間とともに波長2255 nmを中心とする吸収帯の値が増加した。

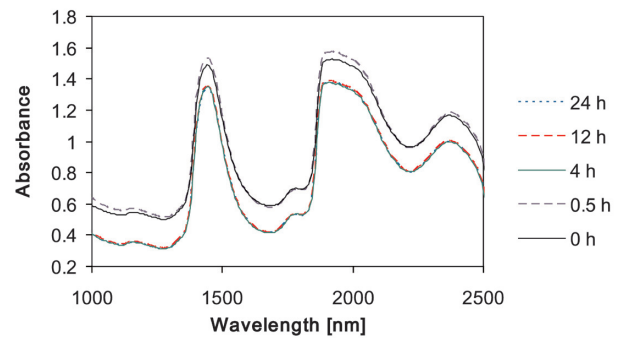


Fig. 4 The near infrared absorption spectra of bacterial culture medium with GG for up to 24 hours

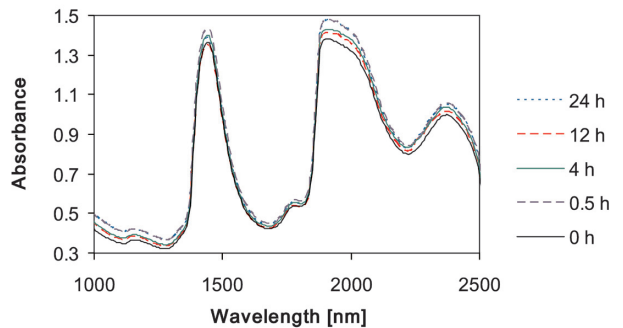


Fig. 5 The near infrared absorption spectra of bacterial culture medium with skimmilk for up to 24 hours

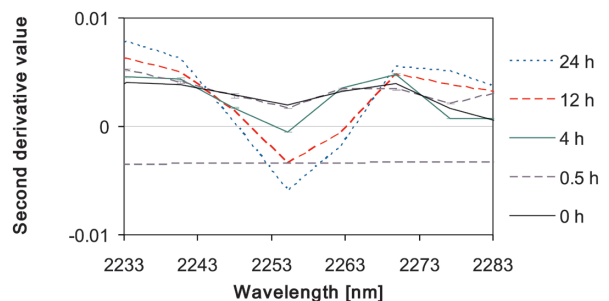


Fig. 6 The second derivative spectra of absorption spectra of bacterial culture medium with GG

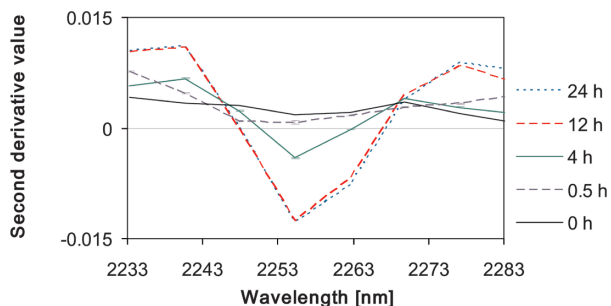


Fig. 7 The second derivative spectra of absorption spectra of bacterial culture medium with skim milk

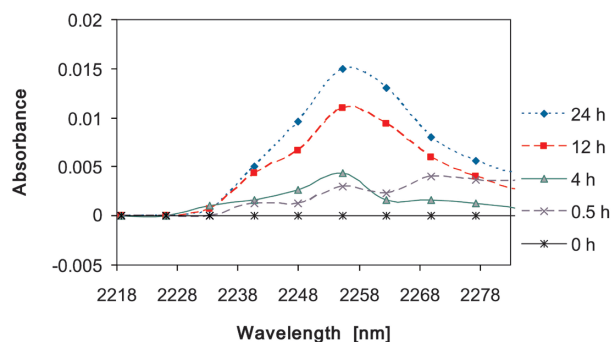


Fig. 8 The revised absorption spectra of the bacterial culture medium with GG

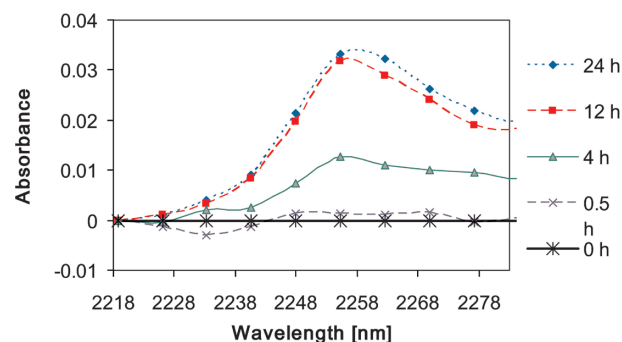


Fig. 9 The revised absorption spectra of the bacterial culture medium with skim milk

4. 考察

4. 1 大腸菌液の換算散乱係数 μ_s'

波長1200nm付近において、大腸菌液の菌濃度と換算散乱係数 μ_s' には高い相関 ($R \geq 0.9$) が得られた。一般的に、その波長と散乱体の大きさとが一致する際、光は、よく散乱される⁴⁾。

一方、大腸菌の大きさは、およそ1000nm程度である⁵⁾。即ち、大腸菌液の μ_s' が大腸菌液の濃度と、良い相関が得られた理由として、測定に用いた波長1200nmが大腸菌の大きさとほぼ等しかったためと考えられる。この結果は、計測対象とする物質の粒子径と近い波長を用いることで、物質の濁度を定量的に計測できる可能性を示唆し

ている。一方、散乱体を含む測定対象の μ_s' の大きさは散乱体の大きさやその濃度に依存することが知られている⁴⁾。Alinceら⁶⁾やBurgerら⁷⁾は、粒子径の異なる散乱媒体の μ_s' を算出した結果、 μ_s' スペクトルの値やパターンは粒子径によって異なることを報告している。活性汚泥中には、大腸菌等の浮遊細菌、酵母菌等の浮遊真菌や、菌類の集合体であるフロックなどが存在する。酵母等の大きさはおよそ5000~10000 nmである⁸⁾。また、フロックは、菌類の集合体であることから酵母等の真菌よりもさらに大きな粒子径の散乱体となる。その為、活性汚泥の μ_s' スペクトルを算出することにより、活性汚泥中の菌の構成比などを概算できる可能性がある。今後は、活性汚泥等の μ_s' を算出し、実際に活性汚泥の菌群の分布や濁度を定量できるかどうかについて検討する予定である。

4. 2 波長2255 nm付近における近赤外吸収分光分析

今回、波長2255 nm付近にて、GGおよびスキムミルクを混合後、時間経過に伴う吸収帯の増加が認められたが、嫌気状態において、大腸菌がグルコースを資化する際に、酢酸塩が生じることが報告されており⁹⁾、Hallら¹⁰⁾は、大腸菌を用いた実験にて、波長2260 nmの吸収帯が酢酸塩由来であると述べている。今回の実験では、植菌後、振盪培養を行っていた際、遠沈管の蓋を閉めていたので、遠沈管内が嫌気状態になった可能性がある。これらの事より、本研究で観測された波長2255 nm付近の吸収帯の増加は、大腸菌がグルコース等を資化することで生じた酢酸塩由来である可能性が高いと考えた。

一方、栗津らは、全有機炭素 (TOC) の経時的減少に伴って、糖類等の赤外吸収が消長することを報告している¹¹⁾。そこで、本研究で得られた波長2255 nmの吸光度と、過去にTOC濃度と相関が得られた赤外波長9.7 μ mの吸光度の関連性を検討した。(赤外波長9.7 μ mのデータは過去に報告した値¹¹⁾を参考にした。ただし、参考にした実験データは本実験と試料濃度の条件が異なること特記する。試料濃度は本実験と異なるものの、大腸菌が資化・代謝することによるTOC濃度の変化は同様の傾向があるため、実験データを参考資料として用いた。)

Fig. 10およびFig. 11に、GGおよびスキムミルクを添加した後の波長2260nmと波長9.7 μ mにおける吸光度の経時変化を示す。Fig. 10に示すように、GGを添加後、時間経過とともにTOCと相関のある波長9.7 μ mの吸収は指数関数的に減少し¹¹⁾、一方、酢酸塩由来と考えられる波長2260nmの吸収は増加する傾向が得られた。また、Fig. 11に示すようにスキムミルクを添加後、時間経過とともに、波長9.7 μ mの吸収は指数関数的に減少し、波長2260nmの吸収は増加する傾向が得られ、この変化はGGを添加した際と同様の傾向であった。そこで、波長9.7

μmの吸光度の変化と波長2260nmの変化に相関があるかどうか検討した。

Fig. 12に、波長9.7μmの吸光度の逆数を縦軸、波長2260nmの吸光度を横軸にとって、作成した図を示す。

Fig. 12に示すように、TOC濃度の減少に相関のある吸光度と、微生物が資化し生じた酢酸塩由来と考えられる吸光度の増加には相関が得られた。

高橋ら¹²⁾は、活性汚泥のバルキングが酢酸塩などの有機塩の存在と関係していると報告しており、本手法で計測可能であった酢酸塩由来の吸収をモニタリングすることが、活性汚泥のバルキングを防ぐためのツールになる可能性が得られた。今後は、好気状態の場合に、活性汚泥より資化・代謝されて生じる物質が近赤外波長域で検出可能かどうかを検討する必要がある。

廃水中の浮遊性固形汚濁物質を、レイリー散乱光を測定することによりモニタリングすることができることは、宗宮ら¹³⁾により報告されている。また、宮田ら¹⁴⁾は蛍光分析法が廃水処理プラント運用のためのモニタリングとして活用できることを報告している。栗津ら¹¹⁾は、赤外分光分析が生物処理過程のモニタリング方法として有効であると報告した。赤外分光分析法を用いる場合、測定前に前処理として、試料を乾燥させる必要がある。今回用いた近赤外光は、赤外光に比して、水による吸収が小さいので、試料への光の侵達度が数mmオーダーに達する。そのため、近赤外分光分析法は、前処理を必要とせずに測定対象のスペクトルを迅速に計測できる簡便な方法である。また、本実験結果より、近赤外分光分析法を用いることで、資化・代謝された物質の同定が可能であることが示唆された。

今後、活性汚泥などから廃水処理過程で生じた物質を、近赤外光を用いてモニタリングする事が可能か否かを検討する。本手法で用いられている近赤外光は、紫外・可視光よりも散乱によるノイズの影響が小さく、シグナルの検出が妨害されにくいと考えられる。活性汚泥を測定する際に、濁度の増加に伴うシグナルの鈍化がどの程度計測結果に影響するかを検討する必要があると考えている。

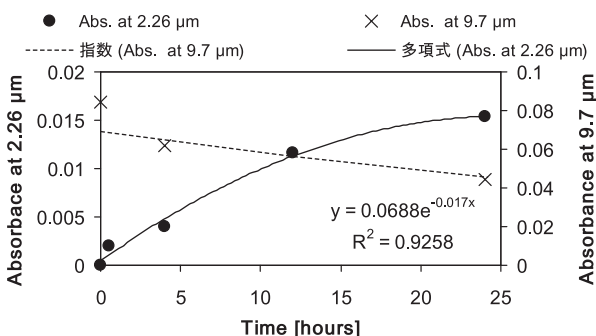


Fig.10 The relationship between absorbance (Abs.) of the bacterial culture medium with GG and culture time at wavelengths of 2.26 and 9.7 μm

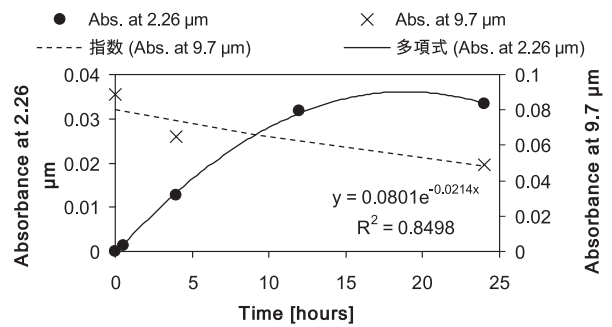


Fig.11 The relationship between absorbance (Abs.) of the bacterial culture medium with skimmilk and culture time at wavelengths of 2.26 and 9.7 μm

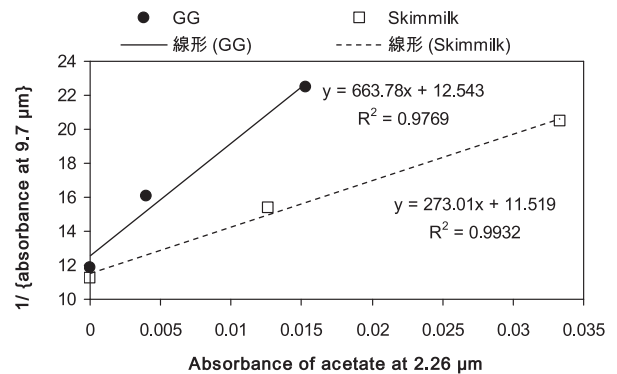


Fig.12 The calibration curve of absorbance at the wavelength of 2.26 μm versus reference values at the wavelength of 9.7 μm

5. まとめと今後の展望

本研究では、廃水処理に於いて処理がどの時点でどの程度進んでいるかを知るために、大腸菌モデル系を用いて、光学特性値算出装置や近赤外分光分析法を活用する事が可能か否かを、検証した。

その結果、波長1200nmの短波長側の分光分析を行って、換算散乱係数を求める事によって、大腸菌液の濃度を測定可能であることがわかった。また、波長2260nm付近の長波長側の分光分析を行うことにより、GGおよびスキムミルク添加後の、資化・代謝された酢酸塩の増加を観測することができた。以上より、近赤外分光法は、廃水処理中の資化・代謝により生じた物質を観測し、廃水処理の過程をモニタリングするための技術となることが分かった。

今後、実際の活性汚泥等を用いて廃水処理場に近い条件で資化・代謝される物質の詳細な経時変化を追跡し、近赤外分光分析法によって廃水処理の過程のモニタリングが可能か否かの検討を行う。

また、今回用いた、独自に開発した逆モンテカルロ法による光学特性値の算出法は、廃水と非接触で測定できる事が特徴であり、廃水処理計測に於ける、最大の問題点の一つである「センサ汚れ」を回避できる可能性を秘めている。

今回は、モデル実験として大腸菌を用いた系で検証を行ったが、今後は、実廃水・実現場での検証を行っていく所存である。

参考文献

- (1) 社団法人日本下水道協会, エアレーションタンクの微生物—検鏡と培養の手引き—, pp. 1-21
- (2) 本多典広, 寺田隆哉, 南條卓也, 石井克典, 粟津邦男: Inverse Monte Carlo法による光線力学療法前後の腫瘍組織の光学特性の算出, 日本レーザー医学会誌, Vol. 31, No.2, pp. 115-121 (2010)
- (3) L.-H. Wang, S.L. Jacques and L.-Q. Zheng: Monte Carlo modeling of photon transport in multi-layered tissues. Computer Methods and Programs in Biomedicine, Vol. 47, pp.131-146 (1995)
- (4) V. V. Tuchin: Tissue Optics, SPIE Press, pp. 132-142, (2007)
- (5) F. J. Trueba and C. L. Woldringh: Changes in cell diameter during the division cycle of Escherichia coli, Journal of Bacteriology, Vol. 142, No. 3, pp. 869-878 (1980)
- (6) B. Alinec and P. Lepoutre: Light-scattering of coatings formed from polystyrene pigment particles, Journal of Colloid and Interface Science, Vol. 76, No. 1, pp. 182-187 (1980)
- (7) T. Burger, J. Kuhn, R. Caps and J. Fricke: Quantitative determination of the scattering and absorption coefficients from diffuse reflectance and transmittance measurements: Application to Pharmaceutical Powders, Applied Spectroscopy, Vol. 51, No. 3, pp. 309-317 (1997)
- (8) T. Srinorakutara: Determination of yeast cell wall thickness and cell diameter using new methods, Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 86, No. 3, 253-260 (1998)
- (9) J.-N. Phue, S. B. Noronha, R. Hattacharyya, A. J. Wolfe and J. Shiloach: Glucose metabolism at high density growth of E. coli B and E. coli K: differences in metabolic pathways are responsible for efficient glucose utilization in E. coli B as determined by microarrays and Northern blot analysis” Biotechnology and Bioengineering, Vol. 90, pp. 805-820 (2005)
- (10) J. W. Hall, B. McNeil, M. J. Rollins, I. Draper, B. G. Thompson and G. Macaloney: Near-Infrared spectroscopic determination of acetate, ammonium, biomass, and glycerol in an industrial Escherichia coli fermentation, Applied Spectroscopy, Vol. 50, No. 1, pp. 102-108 (1996)
- (11) 粟津邦男, 長塩尚之, 石井克典: 赤外分光分析による微生物中間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. 15, No.2, 3, pp. 5-7 (2010)
- (12) 高橋力也, 小山幸治, 安村和晃, 川北省一, 鈴木昌治, 米山平: バルキング活性汚泥による乳酸, 酢酸, プロピオン酸および酪酸の生成, 醗酵工学会誌, Vol. 68, No. 1, pp. 17-23 (1990)
- (13) 宗宮功, 岸本直之, 小野芳郎, 西本聡: 散乱スペクトル分析による水質の連続分析, 水環境学会誌, Vol. 19, No. 1, pp.47-55 (1996)
- (14) 宮田純, 中原啓介: 廃水処理プラントにおけるオンサイト水質モニタリング技術, JFE技報, No. 13, pp. 59-64 (2006)

執筆紹介



本多典広 Norihiro Honda
大阪大学大学院工学研究科
環境・エネルギー工学専攻



長塩尚之 Naoyuki Nagashio
研究開発本部
材料技術開発研究所 グループ長



吉岡雅也 Masaya Yoshioka
大阪大学大学院工学研究科
環境・エネルギー工学専攻



粟津邦男 Kunio Awazu
大阪大学大学院工学研究科
環境・エネルギー工学専攻