

増殖モニターの開発（第1報）レーザー光を用いた菌体密度測定法についての基礎的実験

許 正憲^{*1} 手塚 久男^{*2} 伊藤 富男^{*1}
辻 義人^{*1}

深海微生物実験システムにおいて、高圧、高温下で培養されている微生物の増殖状況を、その環境条件を変えずに観察する増殖モニターの開発を行う必要がある。

従来、微生物の密度を計測する方法としては、落射型蛍光顕微鏡を用いた計数法等が挙げられるが、本システムは構造が複雑で制約があるため、直接使用することは困難である。

そこで、本システムではレーザー光を微生物に照射し、その散乱光の強度を検出することにより、微生物の増殖状況を観察する手法を検討することにした。このような手法は気中における粉塵量の計測等に利用されているが、水中に応用された例はなく、ましてや、高温、高圧下で使用するにはさらに多くの開発要素が残されている。

本報告では、実際の微生物を使い、基本的な光学的実験を行うことにより、本手法の実用への可能性を確認することが出来た。

キーワード：増殖モニター、微生物密度、レーザー、散乱光、透過光

Development of Growth Monitor I Fundamental Experiment for Microbes Density Measurement Method by using a Laser

Masanori KYO^{*3} Hisao TEZUKA^{*4}
Tomio ITO^{*3} Yoshito TSUJI^{*3}

In the deepsea microbes experiment system, there is a need to develop a microbes density measurement device to observe the growth condition while retaining the ambient high pressure and high temperature .

*1 深海環境プログラム推進室

*2 三菱重工(株) (元深海環境研究推進準備室)

*3 Office for Deepsea Environment Exploration Program Promotion

*4 Mitsubishi Heavy Industries

Conventional methods for measuring the microbes density, for example direct count method by using a reflect type fluorescence microscope, cannot be directly adopted to this system due to the complexed structure and limited space of this system.

Therefore, we have developed a growth monitor by measuring the intensity of scattered light from microbes, using laser irradiation. This method has been used as a counter for airborne dust, but has never been developed for high pressure and temperature use.

In this paper, we verified the possibility of using this method by fundamental optical experiments of microbes.

Key word : Growth monitor, Microbes density, Laser, Scattered light, Transmitted light

1 はじめに

センターは深海微生物の研究を実施するため、微生物の生息する現場環境条件を維持した状態で試料を採取し、陸上の実験施設にて深海環境を再現して培養実験等を行う「深海微生物実験システム」の開発、建造に着手した。

一般に微生物の培養実験では、様々な培養条件に対する微生物の増殖状況を観察し、最適な培養法の決定を行う。従来より微生物の増殖量を計測する方法としては、試料の一部を抽出し、落射型蛍光顕微鏡で微生物数を直接計数する検鏡法¹⁾及び試料に光を直接照射し、その濁度による散乱光または透過光の光量を測定する光量測定法^{2), 3)}等が用いられてきた。

本実験システムでは試料が微量であり、抽出が不可能なので、後者の光量測定法が望ましいが、一貫して深海の特殊環境を維持した状態で、一連の実験を行うために、各装置の構造は極めて複雑で制約があり、従来の光量測定法を直接応用することはできない。そこで、本実験システムの使用目的に適応した、培養液中の微生物密度を測定するための光量測定法である増殖モニターの開発を行うにあたり、諸々の留意事項を検討する必要がある。

まず、基礎的実験として、常圧、常温下で微生物の入った試料にレーザー光を照射し、試料を透過した光、または試料から散乱した光を捉え、それらの光量を計測することにより、微生物の密度と光量の相関を求めた。そして、これらの結果よ

り、光学的に微生物密度を算定する方法の妥当性について検討を行った。本手法の類似例としては、大気中における粉塵量を測定するためのダストカウンター等があるが、高圧・高温下で使用された例はこれまでにない。

本報告では、これらの実験方法、結果及び本実験システムへの適応性等について述べる。

2 増殖モニターの開発における検討項目

深海微生物実験システムは、採泥器、希釈装置、分離装置及び培養槽の4つのサブシステムから構成されているが、この中で増殖モニターは分離装置と培養槽に装備される。分離装置及び培養槽の圧力及び温度条件を表1に、本手法による増殖モニターを装備した状態での分離装置及び培養槽の概念図を図1にそれぞれ示す。以下、分離装置及び培養槽における増殖モニターの使用目的、また、増殖モニターを設計する上で必要となる分離装置及び培養槽の構成、さらに増殖モニターを本実験システムに適応する上での検討項目について述べる。

(1) 分離装置

分離装置の前段階として、深海から持ち帰った泥試料は希釈装置にて希釈されるが、ここではこの希釈試料中に微生物が含まれているかを、培地と混合し、それらの増殖状況から判断するものであり、このために増殖モニターが必要となる。

分離装置は主として耐圧容器、耐圧容器を覆う加熱冷却器及び耐圧容器内に装備された36個の

ガラス製均圧型セル（各容量約 20 ml）から構成されている。希釈された泥試料はこのガラス製セル内へ移送され、微生物の栄養源となる培地と混合される。セルの周囲は加圧媒体である純水で満たされており、内部に気相は存在しない。

各セルは耐圧容器の底蓋上に円周状に配列されており、これらを光学的に観察するためには、耐圧容器の胴体部に 36 個の耐圧覗き窓を設ける方式、または 1 個の覗き窓のみ設け、36 個のセルをターンテーブル上に配列し、ターンテーブルを

表 1 圧力・温度条件
Table 1 Pressure・Temperature condition

サブシステム	圧力		温度	
	範囲	精度	範囲	精度
分離装置	0～680kgf/cm ²	± 1 % FS	0～300℃	± 1 % FS
培養槽	0～680kgf/cm ²	± 1 % FS	0～300℃	± 1 % FS

回転させることにより各セルを覗き窓の位置に停止させる方式等検討したが、何れも大型化、複雑化となるため、光源部及び受光部を光ファイバーを用いて、耐圧容器内のセル近傍まで延長し、光ファイバーを回転させ、各セルの位置で停止させる方式を検討中である。光ファイバーは耐圧容器の底部を貫通して容器内に延長されるが、貫通部におけるシール性能を確保するために、別途、耐圧チューブを設け、光ファイバーはこのチューブ内に収められている。また、光源部から導き出されたレーザー光をセルに焦点を合わせるために、レンズ系で構成された光プローブ部を光ファイバー先端に設け、これもまた耐圧チューブ内に収められる。耐圧チューブ先端部にはサファイア製耐圧覗き窓が取り付けられる。

(2) 培養槽

培養槽では、前段階の分離装置で増殖が確認された培養液を移送し、大量の培地を用いて、大量の培養が行われる。また与えられたある量の培地に対して、微生物の増殖が定常状態に近づく増殖が鈍化した場合はこの培養液の一部を取り出し、

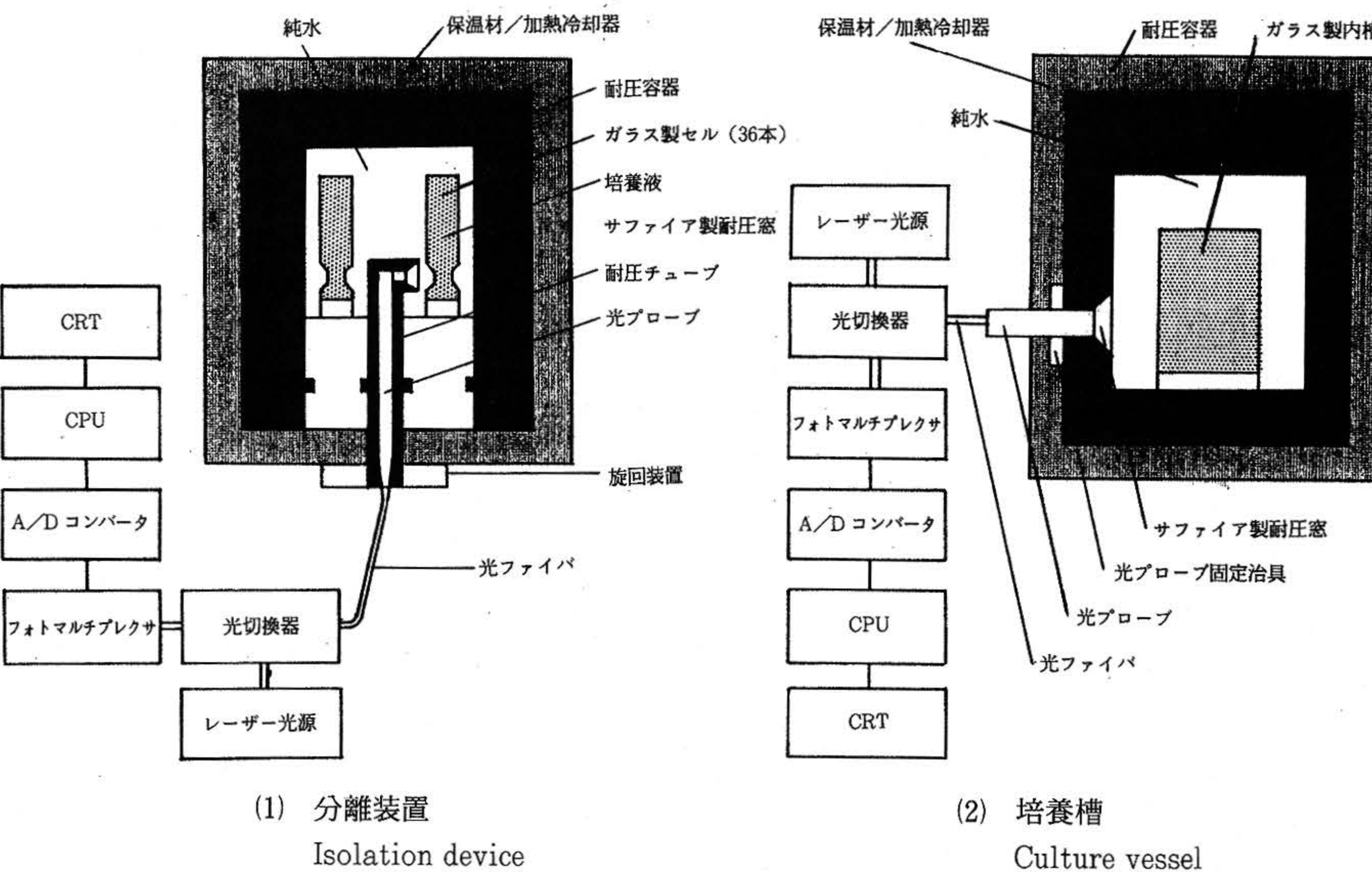


図 1 増殖モニターの概念図
Fig.1 Schematic diagram of growth monitor

新たな培地を供給することにより再び増殖を開始させることができる。

このように大量培養を行う上で増殖状況を確認するため、また、ここでは、圧力、温度、培地等様々な培養条件を変え、このときの微生物の増殖状況を観察することにより、深海の特殊微生物の培養法を確立すること等が行われるが、これらのために増殖モニターが必要になる。

培養槽は、分離装置と類似して、耐圧容器、加熱冷却器等から構成されているが、大量培養を行うために容器内には容量約 1000 ml の内槽を 1 個のみ設けている。内槽は分離装置と同じくガラス製均圧型である。培養槽は全体として、2 式揃えられている。

内槽が 1 個であるため、分離装置のように光ファイバーを容器内部に貫通させる必要はなく、耐圧容器の胴体部に耐圧覗き窓を設けて、容器外から観察を行う。光ファイバー、光プローブの構成は、分離装置とほぼ同じである。

(3) 検討項目

- ① 微生物のような微小粒子を含む液体中にレーザー光を照射し、透過光または散乱光の強度を計測した場合、微小粒子密度と透過光または散乱光強度に十分な相関がみられなければならない。
- ② セル及び内槽の形状が曲面と平面の場合で、表面における光の屈折、反射特性を把握し、効率よく照射、受光するために必要なセル及び内槽の形状選定を行わなければならない。
- ③ 高温下で良好に作動しなければならない。特に光ファイバー、光プローブは直接、高温下に装備されるため、これらの高温下での特性を良く把握しなければならない。また、これらを固定する治具も熱により変形するので、これによる光学系の歪に対する影響も考慮しなければならない。
- ④ 高圧下で良好に作動しなければならない。ただし、光ファイバー、光プローブ自体が高圧下に暴路されることはないが、分離装置の場合、これらを収納する耐圧チューブが圧力を受けるため、固定する治具も変形するので、これによる光学系の歪に対する影響も考慮しなければならない。また、耐圧覗き窓につい

ては直接、圧力を受けるので、窓が歪んだ際の光学系への影響も考慮しなければならない。

- ⑤ 耐圧容器の構造上、耐圧覗き窓の径が小さくなり、十分な光量が通過できないので、これを考慮にいった光学系の設計をしなければならない。
- ⑥ 対象となる試料の容量が少く、十分な散乱効果が得られないので、これを考慮にいった光学系の設計をしなければならない。
- ⑦ 構造上、光プローブをセルまたは内槽から離れた位置に装備しなければならないので、途中に介在する純水による光の拡散、減衰の影響を考慮しなければならない。
- ⑧ 分離装置では巡回装置により光プローブを円周配列された各セルに向けるため、光ファイバーはねじれる恐れがあり、このねじれに対する光の減衰を考慮しなければならない。
- ⑨ 光ファイバー、光プローブ等、光が通過する部分は効率よい計測を行うために、光の減衰が最も小さくなる材料、形状を選定しなければならない。
- ⑩ 加熱、冷却により耐圧容器内の純水に対流が起こり、密度が不均一となるため、これによる光の屈折を考慮しなければならない。

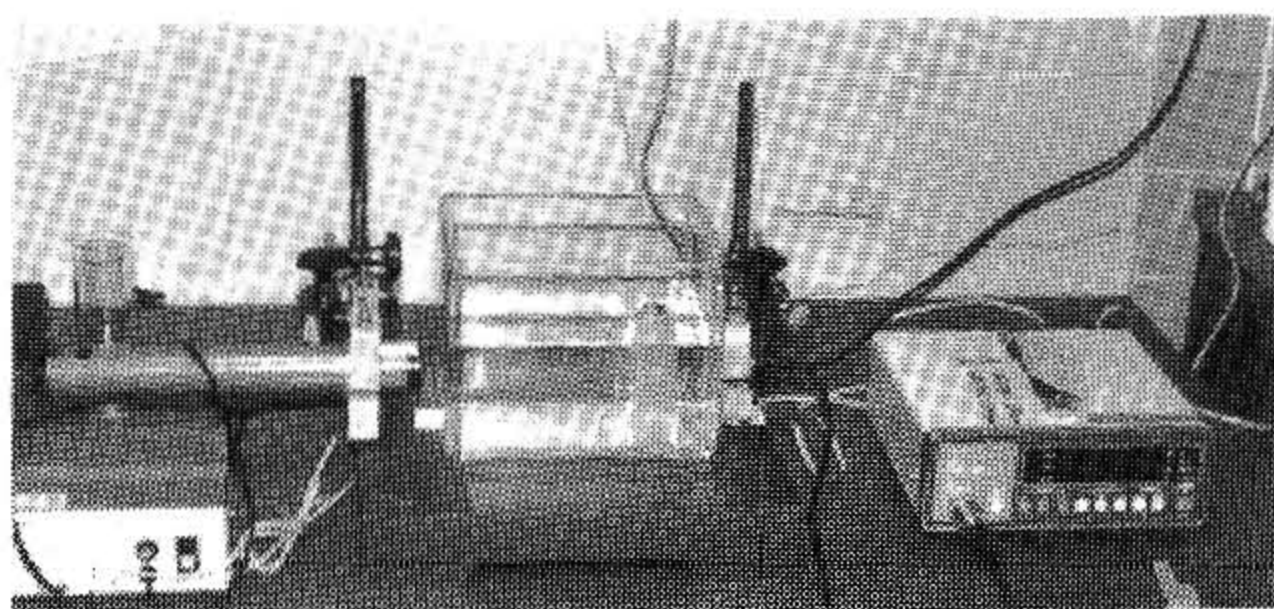
3 実験

3.1 散乱光または透過光の距離減衰 についての実験

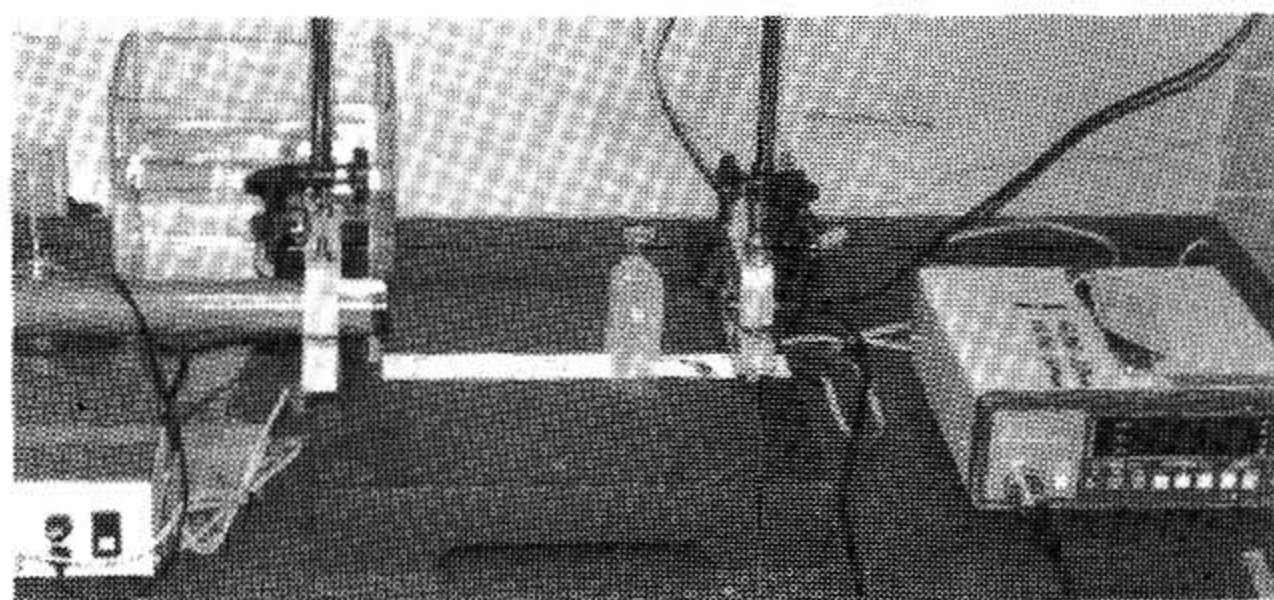
「2. 増殖モニターの開発における検討項目 (3) 検討項目 ⑦」で述べたように、セル及び内槽は耐圧容器内に設置され、また、受光部をセル及び内槽表面に接して装備することができないため、試料からの散乱光または透過光は途中で介在する純水により減衰してしまう。ここでは、増殖モニターの光学系設計に必要となるデータとして、散乱光または透過光の純水による距離減衰量を常圧、常温下で計測した。

距離減衰量計測のための装置を写真 1 (1) に示す。

光源部は He-Ne レーザーのヘッダーとレーザーパワーアンプ (写真左側, (株) 日本レーザー製, JSH-IPS) から構成され、受光部には光ファイバーの減衰量測定用のオプティカルパワーメータ (写



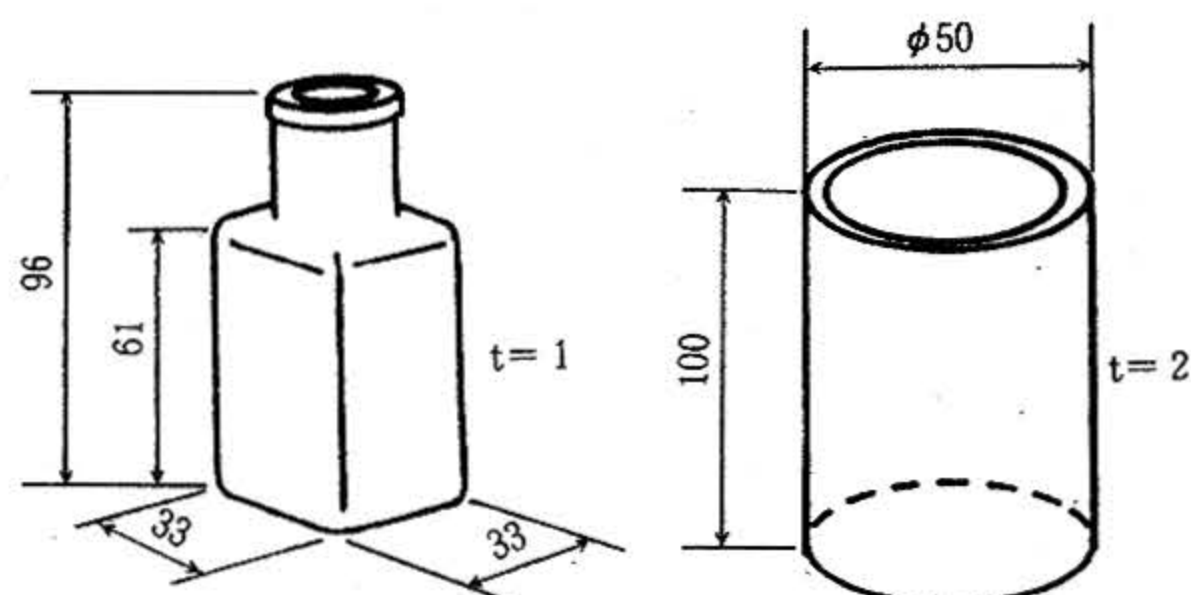
(1) 水中の測定



(2) 空気中の測定

写真1 光の強さ測定装置

Photo 1 Optical power measurement device



(1) 角柱セル (2) 円柱セル

図2 セルの外観

Fig.2 Appearance of cell

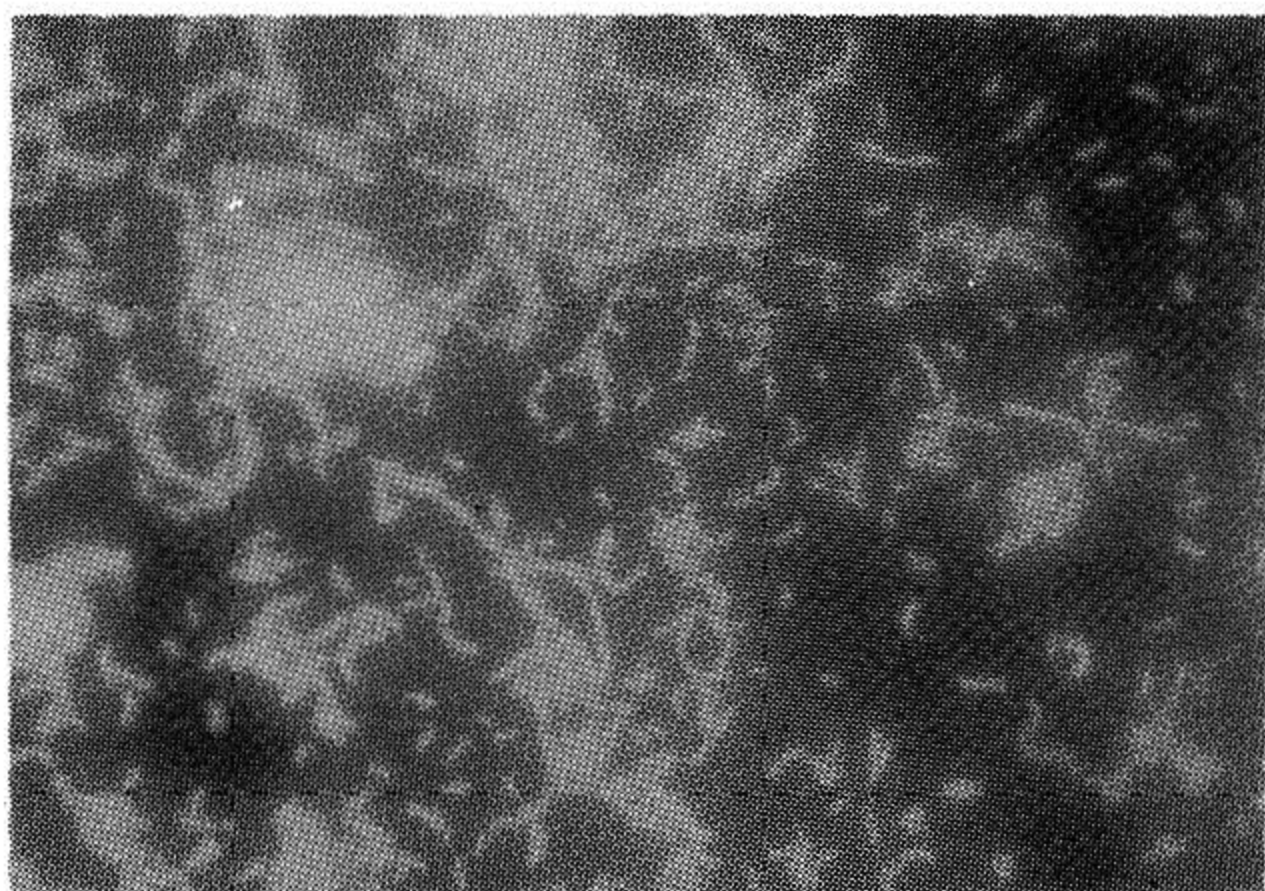


写真2 *Vibrio* (菌株 No. 0001)

Photo 2 *Vibrio* (Strain No. 0001)

真右側、安藤電気(株)製、AQ-1111)を用いた。受光センサーには約5mm×5mmのフォトダイオードを用いている。これらの光源部及び受光部は3自由度のマグネット付きホルダーに固定された状態で、定盤上に設置される。

光源部と受光部の間には蒸留水を満たした水槽を置き、レーザーヘッダと受光センサーはこの水槽のそれぞれの端面に接した位置で、それぞれの光軸が一致するように高さ、方向が調整されている。

水槽内には角柱セルを置き、セル内には微生物の入った試料を満たす。角柱セルの外観を図2(1)に示す。

微生物には、海洋微生物として代表的な *Vibrio* (菌株 No.0001, 写真2) を使用し、これを表2に示す組成の培地により 10^8 個/ml オーダまで増殖させ、その後固定液により増殖を停止させたものを試料として使用した。微生物の計数にあたっては、アクリジンオレンジ(AO)染色による直接計数法を用いた。

試料の入った角柱セルを水槽内の光源部側から受光部側へ光軸上で移動させ、それぞれの位置において、レーザー光をセルに照射し、試料からの散乱光(一部透過光を含む)の光量を計測した。

また、同等の試験を空気中でも行った(写真1(2))。なお、これらの実験は周囲の光によるノイズを減らすために暗室の中で行った。

3.2 微生物の密度と散乱光及び透過光強度の相関についての実験

「2. 増殖モニターの開発における検討項目(3) 検討項目①」で述べたように、微生物の密度と散乱光または透過光の強度に十分な相関があるかどうか、本手法の増殖モニターへの実用性を決定する。ここでは、この相関を調べるために種々の微生物密度の試料にレーザー光を照射し、試料から散乱する光または試料を透過する光の光量を計測した。

光量計測装置の構成は上述の距離減衰の計測で空気中で行ったもの(写真1(2))と同等である。

ただし、空気中での光の減衰を極力減らすためにレーザーヘッダー及び受光センサーはセル端面に接触するように配置した。また、透過光計測の場合、受光センサーはレーザーヘッダーと同じ光

軸上に置き、散乱光計測の場合、受光センサーはレーザーヘッダーの光軸とは 90° の位置 (90° 側方散乱光) に置いた。

さらに「2. 増殖モニターの開発における検討項目 (3) 検討項目 ②」で述べたように、セルの形状が曲面と平面で、表面における光の屈折、反射特性が異なり、散乱強度と密度の相関に影響すると考えられる。ここではこれも合わせて確認するために、上述の角柱セルの他に円柱セルについても同等の計測を行い、それぞれの比較を行った。円柱セルの外観を図 2 (2) に示す。

微生物の密度については上述と同じ方法で調整した 10^8 個/ml オーダの試料を同じ培地により順次希釈し、微生物数が $10^8 \sim 10^4$ 個/ml まで 10 培ステップで異なる 5 種類の試料を準備した。

3.3 光のスペクトル分析による菌種判別法についての検討

上述までの実験ではコヒーレント光源である He-Ne レーザーを用いたが、ここでは帯域幅が広い白色光源であるハロゲンランプを用いて 3.2 と同じ実験を行った。

計測装置の構成を図 3 に示す。光源部 (TQ 8111 (株) アドバンテスト製) の白色光を試料の入ったセルに照射し、光源部の光軸と同軸上に受光部を設置することにより、試料からの透過光 (一部散乱光が含まれている) をとらえ、これを光スペクトルアナライザ (TQ 8345 (株) アドバンテスト製) で分析し、微生物の形状と吸収される波長に相関があるかを調べた。

ハロゲンランプと受光素子はそれぞれセルに接

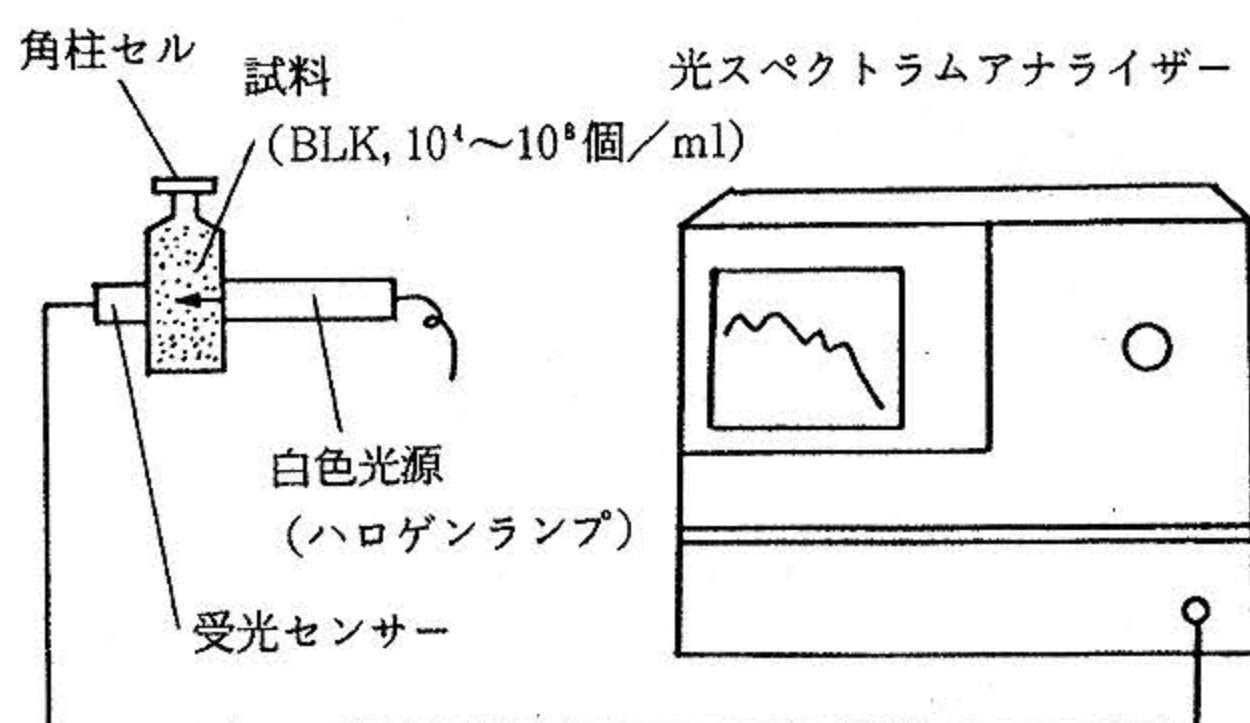


図 3 光のスペクトル分析の概念図

Fig.3 Schematic diagram of optical spectrum analysis

するように設置されている。

また、光源部と受光部はレイアウト上、お互いの光軸が直交する位置に配置することができなかったため、 90° 側方散乱光について同様の実験を行うことができなかった。

4 結果

4.1 散乱光または透過光の距離減衰についての実験

レーザー光を試料の入ったセルに照射し、試料からの散乱光または透過光の水中及び空気中での減衰について計測した結果を図 4 に示す。

実験は空気中での計測結果、点線は水中での計測結果をそれぞれ表わす。また、距離 X (mm) とはセル端面と受光センサーの距離である。

距離減衰の実験では受光センサーはレーザー光の光軸上に設置されているので、ここで捉えられる光は試料を透過してきた光と試料から前方に散乱される光の両方を含んでいるが、これらを分離して計測することはできなかった。しかし、ここでは試料として微生物密度が 10^8 個/ml のものを使用しており、この場合、散乱光の強度が透過光の強度よりも数段強く、受光センサーで捉えられた光はほとんど散乱光に支配されているといえる。

図 4 より、セルの試料から散乱した光の強さは距離により指数関数的に減衰しており、この関係は、光が吸収媒質中を通過する時、その強度は伝搬距離とともに指数関数的に減衰するというベアー則 (Beer's Law)⁴⁾ が適用できることが確認できた。

セル表面 (X = 0 mm, 途中に蒸留水及び空気が介在しない状態) での光の強さを実験データから外挿すると、空気中では約 $36 \mu W$, 水中では

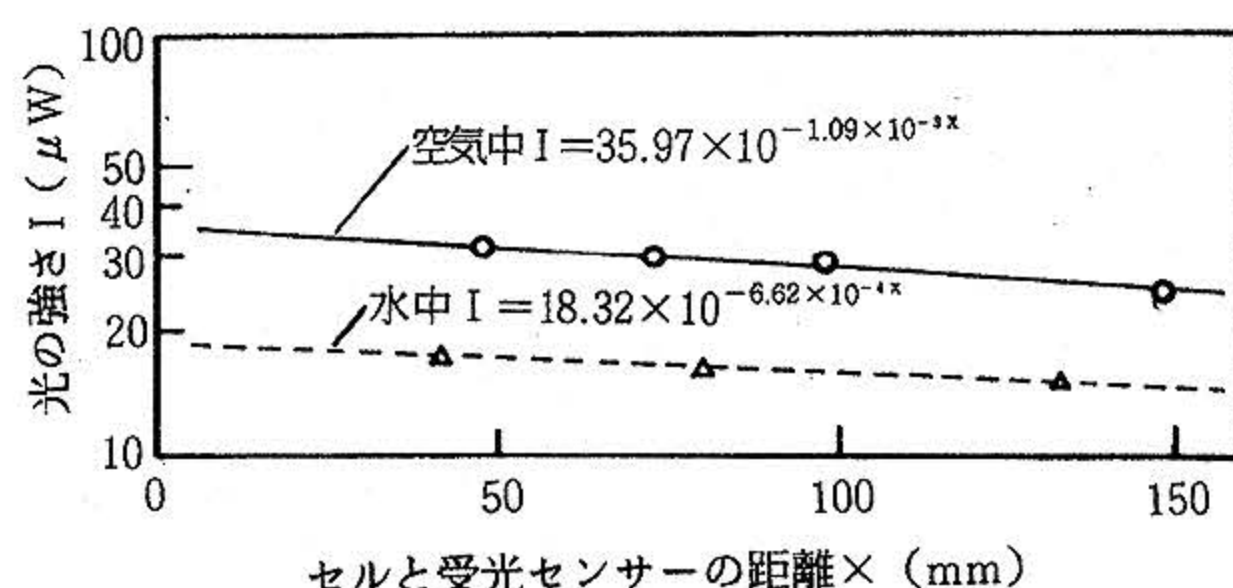


図 4 セルを透過した光の距離減衰

Fig.4 Attention of transmitted light

約 $18\mu\text{W}$ となる。このように空気中に比較して水中での値が低くなるが、これは水中での計測において受光部を水中に入れることができず、受光センサーを水槽のガラス外壁面に接触するように配置したため、空気中に比べ水槽のガラス1枚分だけ多くガラス壁が介在することになり、これによる光の反射、屈折、吸収等が影響していると考えられる。

そこで、空気中にて試料の入っていないガラス製セルを透過する光量と、途中に何も介在せず直接入射する光量をそれぞれ測定し、その差分からガラスのみの減衰量を求めた。この結果、ガラス2枚分を透過することにより、入射光に対し光量が約8%までに減衰することがわかった。よって、ガラス1枚では約46%減衰することになり、ほぼ6dBの減衰量となる。水槽とセルのガラス厚さは異なるが、上述のセル表面での空気中及び水中の値を比較した結果からもガラス1枚の光減衰量は約6dBとなる。

4.2 微生物の密度と散乱光、透過光強度の相関についての実験

微生物の密度が異なる種々の試料にレーザー光を当てた場合の、セルからの透過光及び側方散乱光の強さを測定した結果を図5及び図6に示す。

図5は円柱セルを用いた場合であり、図6は角柱セルを用いた場合である。実線は受光センサーをレーザーヘッダーの光軸に配置した場合、つまりセルからの透過光（ただし、4.1で述べたように実際には透過光と前方散乱光の両方を含んでいる）を、点線は受光センサーをレーザーヘッダーの光軸に対して 90° の位置に配置した場合、つまりセルからの側方散乱光の結果をそれぞれ表わす。また、BLK（ブランク）とは、微生物を含まず、表2に示す組成のみからなる培地である。

図5、6の結果より、透過光（実線）、散乱光（点線）ともBLKさら 10^6 個/mlまでは光の強さはほぼ同じであり、区別がつかない。しかし、微生物の密度が 10^6 個/mlを越えると側方散乱光の強さは急激に増大し、透過光の強さは急激に減少する傾向にあり、この範囲で十分、散乱光及び透過光の強さから微生物の密度を推定することができる。

また、円柱セルと角柱セルの比較については、

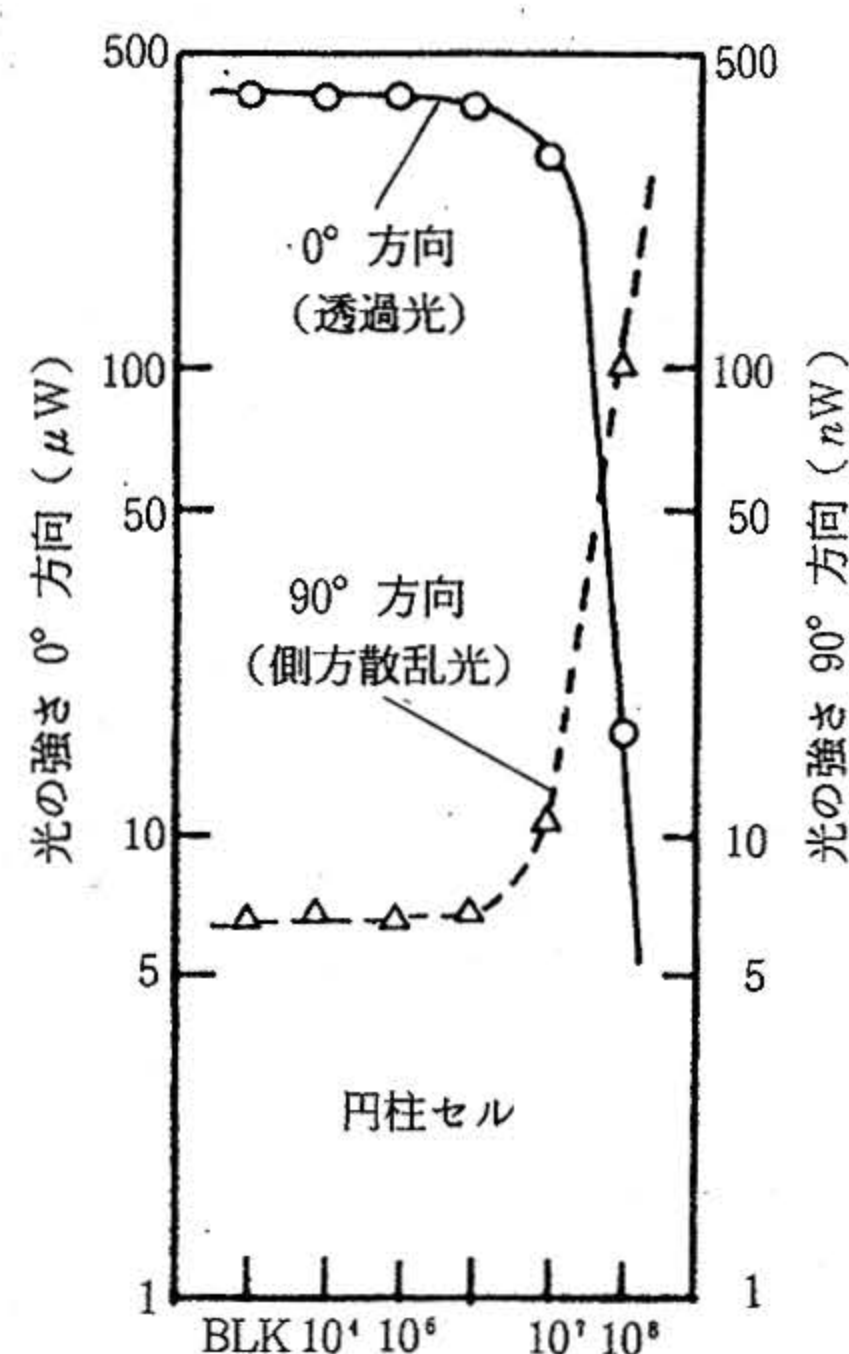


図5 微生物密度と光の強さの関係（円柱セル）
Fig.5 Correlation between microbes density and light intensity
(Circular cylinder cell)

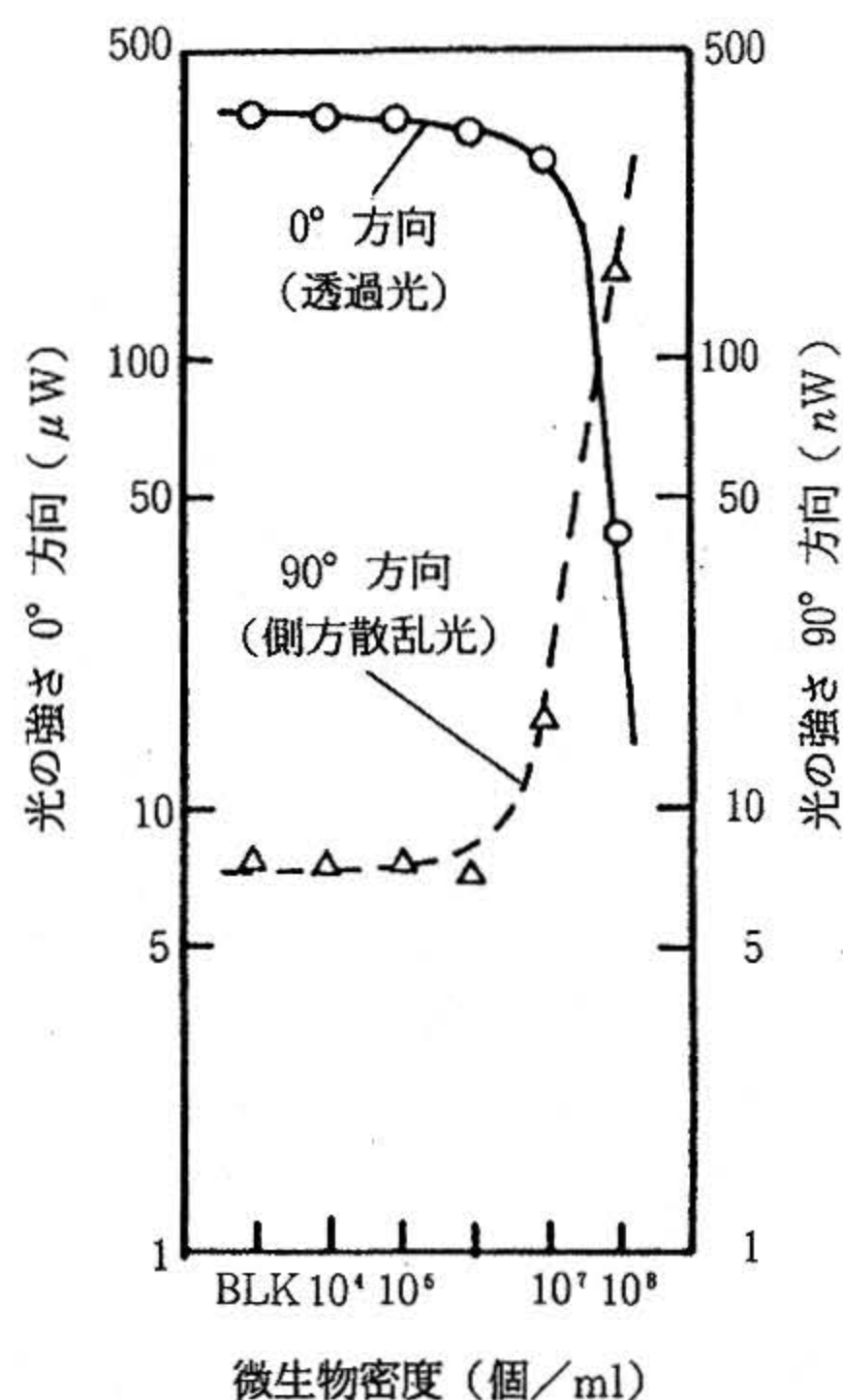


図6 微生物密度と光の強さの関係（角柱セル）
Fig.6 Correlation between microbes density and light intensity
(Square cylinder cell)

曲面の方が平面に比べ、ガラス面での反射、屈折の影響が顕著であると考えられたが、今回の結果では両者にはそれほど違いはみられなかった。ただし、今回の実験ではセルに対するレーザーヘッダーと受光センサーの位置を精密に調整して設置することができたが、実際の深海微生物実験システム・分離装置では36本のセルを観察するために、光プローブを高圧、高温下で巡回させなければならず、このような機構でセルと光プローブの位置関係を精密に調整することは困難である。今後、実機製作に必要となるデータを得るために、人為的にセルとレーザーヘッダー、受光センサーの位置関係をずらした状態での実験をする必要がある。

4.3 光のスペクトル分析による菌種判別法
についての検討

白色光源であるハロゲンランプを試料の入った

表2 培地の組成
Table 2 Media component

組成	含有量(g)
ペプトン	0.5
イーストエキストラクト	0.5
濾過海水	900
蒸留水	100

セルに照射し、その透過光をスペクトル分析した結果を写真3に示す。

写真3 (1)～(3)の何れも低波長側及び高波長側にノイズがみられる。これは低波長側では光源の特性による光量低下が、高波長側では水や容器等の吸収による光量低下があり、内部回路や迷光等に起因するランダムノイズが演算の結果増幅されスペクトルに表われたものと考えられる。

これらのノイズの部分を除いた波長範囲で比較してみると、微生物の密度が 10^8 個/mlの試料は明らかに他とは異なるスペクトルパターンを示しているが、 10^6 個/ml以下の試料については差異は認められない。これは4.2で試料からの散乱または透過した光の強さを計測した結果と同じである。

光のスペクトル分析から菌種を判別する方法については、 10^8 個/mlの結果をみると波長600 nmあたりは急激な落込みがみられ、これがこの菌種(*Vibrio*)による特性ともみられる。ただし、今回の実験では、他の形状の微生物を準備できなかったため、形状とスペクトルパターンの相関についてはわからなかった。今後、他の形状の微生物についても同様の実験を行う必要がある。

5 おわりに

深海微生物実験システムの目的にあった増殖モニターとして、レーザー光を試料に照射し、その散乱光または透過光を計測することにより微生物密度の算定を行う手法を検討し、これについて基礎的な実験を行い、以下の結果を得た。

- ① レーザー光は他の光源に比較して、光源を微小に絞ることができ、またエネルギー密度を

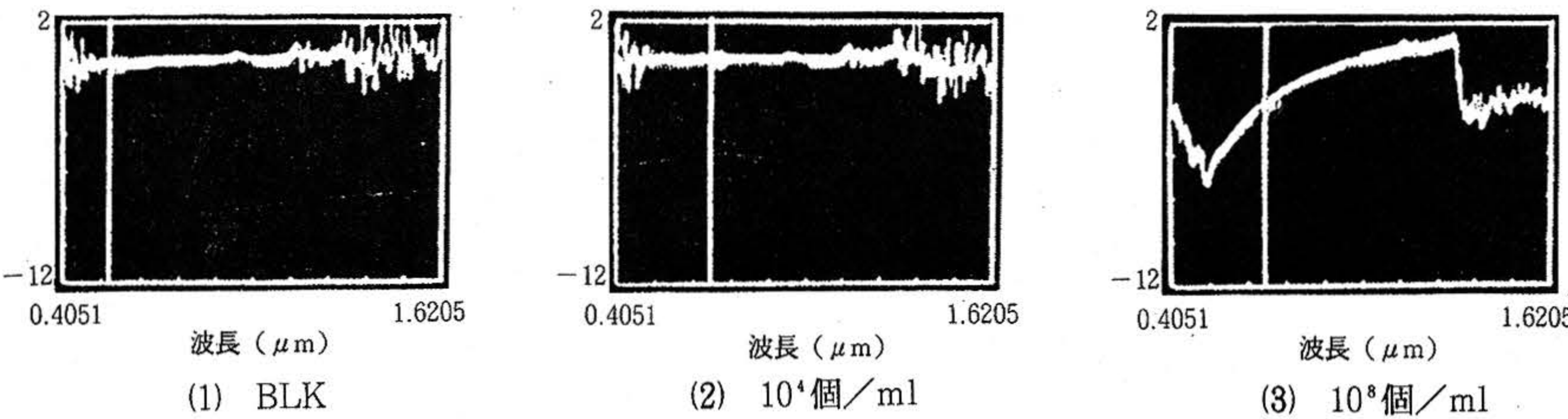


写真3 光スペクトルによる分析結果
Photo 3 Results of optical spectrum analysis

高くできるといった利点があり，本実験システムにとっては適当と言える。

- ② 散乱光または透過光の強度から，微生物の密度を算定する方法は本実験システムに取って有効である。しかし，今回の実験では 10^6 個/ml 以下を区別することは困難であり，実機ではこれ以下の密度での計測が要求されるため，レンズで効率よく集光するなど工夫が必要である。
- ③ 散乱光または透過光の水中での距離減衰についてはベアー則が成立ち，光は距離に対して指数関数的に減衰する。よって，実機の実機ではこれを考慮に入れるとともに，光量が足りない場合は，レンズ等で集光する必要がある。
- ④ 円柱セルと角柱セルの相違点についてははっきりした結果は得られなかった。今後，ガラス面に対するレーザー光の入射角を変え，両セルの比較を行ってみる必要がある。
- ⑤ 光のスペクトル分析により菌種を判別する方法について，今回は十分な実験が行えなかったため，今後，引続き検討を行う。

今後，これらの結果，課題を考慮にいれ，また「2. 増殖モニターの開発における検討項目(3) 検討項目」で未検討の検討項目を実験等で確認し，増殖モニターの開発をすすめていく。

参考文献

- 1) 門田 元，多賀信夫編；海洋微生物研究法，学会出版センター（1985）
- 2) N. G. JERLOV；MARINE OPTICS, CHAPTER 15 APPLICATIONS TO MARINE BIOLOGY, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHING COMPANY（1976）
- 3) J. R. NORRIS, D. W. RIBBONS；Methods in Microbiology, Vol.8, ACADEMIC PRESS（1973）
- 4) 霜田光一，岩澤宏，神谷武志共訳；レーザー物理，丸善株式会社（1978）

（原稿受理：1990年11月21日）