

深層学習による浄水場から取得可能なデータを用いた従属栄養細菌数予測技術の開発

長岡工業高等専門学校 非会員 徳嵩友志 長岡工業高等専門学校 会員 川上周司

1. はじめに

従属栄養細菌とは、菌体の生育に必要な炭素源として、有機化合物を必要とする細菌の総称である。従属栄養細菌の中には、必要なエネルギーを光合成により得る光合成従属栄養細菌と、エネルギーも炭素源も有機化合物から得る化学合成従属栄養細菌の2つのタイプが存在し、大部分は後者である。上水道において検査対象とされる従属栄養細菌は、後者の化学合成従属栄養細菌であり、上水試験法では「比較的低濃度の有機栄養培地を用いて長期間好気培養したとき、集落を形成するすべての細菌」を従属栄養細菌としている。

わが国の水道水質基準では、微生物に係る基準項目として、昭和32年の水道法制定以降一貫して一般細菌(100CFU/mL)が用いられてきた。この基準値は、19世紀末のRobert Kochが提唱した、コレラやチフスの集団感染は砂汙過により細菌集落数(現在の一般細菌に相当)が<100個/mLに制御された水道水を介しては発生しない、という観測事実に依拠する²⁾。しかしながら、今日の水道にあっては、細菌の現存量を把握するためには一般細菌に代わって従属栄養細菌を用いる方が適切であると考えられている。その理由として、従属栄養細菌は一般細菌検査の培養条件(36°Cで24時間培養)¹⁾では生育しないような菌も含めた本来的な水中細菌数を表現すること、培養方法(20°Cで7日間培養)が確立していること、配水系統での生物膜やスライムの形成など水道施設の清浄度の劣化を端的に表現する指標として優れていること、などが挙げられる²⁾。しかしながら、従属栄養細菌の測定においては7日間の培養期間を要するため、迅速性に欠けるという問題点がある。

近年、画像解析や分類の分野で成果を上げている深層学習を用いたモニタリング技術は数多く報告されているが、細菌数の計測へ適用された事例は少ない。また、培養期間を介さずに深層学習を用いて従属栄養細菌数を計測した事例は未だない。本研究は、この従来の培養法の課題を解決するために機械学習を用いることで浄水場の従属栄養細菌数を迅速に計測できる技術の開発を目的とした。

2. 研究方法

2.1 サンプルング

本研究では、長岡市水道局妙見浄水場を調査対象とした。同施設における、原水1ヶ所、濾過水2ヶ所、浄水1ヶ所の計4地点から採水を実施した。

2.2 画像の撮影方法

得られた試料は実験室に搬入後、R2A寒天培地を用いて $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ で7日間培養し、従属栄養細菌を定量した。本研究では、採水試料中の従属栄養細菌数を培養期間を介さずに評価することを目的とし、培養前の細菌を光学顕微鏡により直接観察した。観察に際しては、採取した水試料を減圧濾過により濾過し、得られたメンブレンフィルターをグラム染色して細菌を光学顕微鏡で観察できるようにした。グラム染色により、濾紙上の細菌をグラム陽性菌およびグラム陰性菌に分類した。染色には、クリスタルバイオレットとヨウ素液、95%エタノール(脱色液)およびサフラニンを使用した。濾紙上の染色濃度を調整するため、クリスタルバイオレットは蒸留水で3倍希釈して使用した。また、すべての染色試薬は使用前に孔径 $0.2\mu\text{m}$ のフィルターで滅菌した。採取試料100mLを、滅菌済み混合セルロースエステル製メンブレンフィルター(孔径: $0.2\mu\text{m}$)を装着した減圧濾過用フィルターホルダーを用いて濾過した。グラム染色はフィルターをホルダーに支持したまま行った。まず、500 μL の95%エタノールをフィルターに滴下して減圧化で微生物を固定した。続いて、200 μL の希釈クリス

タルバイオレットで5秒間染色し、10 mLの蒸留水で洗浄した。次に、200 μ Lのヨウ素液を10秒間反応させた後、同様に蒸留水で染色した。その後、500 μ Lの95%エタノールで10秒間脱色し、200 μ Lのサフラニンで5秒間対比染色を行い、最終的に蒸留水で洗浄した。染色後、フィルターを乾燥させたのちにスライドガラスに貼付し、屈折率1.518の浸漬油を1滴滴下して清澄化した。22 $\times$ 22 mmのカバースリップを気泡が入らないように注意しながら載せ、油浸レンズ（総倍率1000倍）を用いて光学顕微鏡観察を行った。各サンプルについて、観察視野から100枚の顕微鏡画像を取得した。

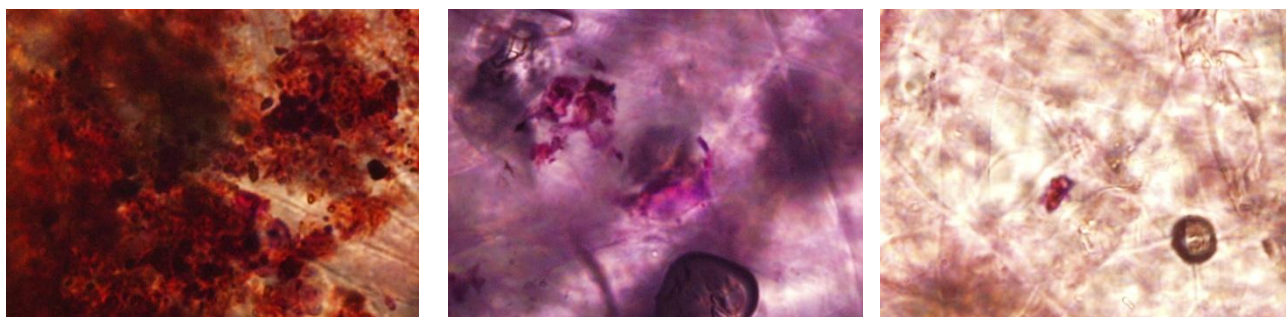


図1 各サンプルをメンブレンフィルターに集菌し、顕微鏡で観察した様子。左から原水(培養法での菌数計測結果: 3840CFU/mL)、中が濾過水 (1350CFU/mL)、右が浄水(20CFU/mL)を示す。

3. 結果及び考察

本研究の手法によって取得した原水、濾過水、浄水をメンブレンフィルターに集菌し顕微鏡で観察した写真と培養を用いたそれらの従属栄養細菌数を図1に示す。図1より本研究の手法によって浄水場で採取したサンプルを濾過したフィルターをグラム染色することにより、光学顕微鏡を用いて細菌を培養期間を介さず直接観察することが可能だとわかった。また、その際に写真で確認できる細菌の染色具合と実際の従属栄養細菌数とで相関があることがわかった。そのため、実際に深層学習を用いて従属栄養細菌数を予測することは可能であると考えられる。

4. まとめ

本研究の最終的な目標は従属栄養細菌数が未知である任意のデータから従属栄養細菌数を予測することである。図1より現状では写真に写る水中の夾雑物が細菌数の予測の際に大きなノイズになることが考えられる。これは、水中にいる細菌の多くが夾雑物に付着しているためである。今後、細菌と夾雑物を分離させ、ポアサイズが比較的大きな濾紙を使って夾雑物のみを除去する仕組みを作成する必要がある。

謝辞

本研究のデータは、長岡市水道局妙見浄水場のご協力により取得したものです。この場を借りて深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 日本水道協会, 上水試験方法 2020 版, IV. 微生物編, 2021; p47-53
- 2) 厚生労働省, 平成 15 年 4 月 28 日付け厚生労働省科学審議会「水質基準の見直し等について(答申)」. 2023
<https://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/04/s0428-4b.html>