

生物膜表面上のマクロ的ミクロ的流体挙動計測に関する研究

Study on Measurement Analysis of Macro and Micro Scale Fluid Behavior Over Biofilm Surface

函館高専環境システム工学専攻	○学生員 浅 野 良 介 (Ryosuke Asano)
函館高専環境都市工学科	正 員 大久保 孝 樹 (Takaki Okubo)
横浜国大大学院システムの創生部門	西 野 耕 一 (Koichi Nishino)
函館高専環境都市工学科	学 生 瀧 口 朝 海 (Asami Takiguchi)

1. はじめに

水環境中に存在する微生物の大多数は担体に付着して生物集塊を形成している。一般的に担体表面に薄い膜状に形成された微生物集合体を生物膜という。生物膜は近年、廃水処理施設の処理方法(浸漬ろ床法・回転円板法・散水ろ床法)に利用されているなど、我々に有益な面を与えている反面、様々な障害・問題点も抱えている。障害や問題を起こしている例として、熱交換器中のパイプ内表面での微生物膜の増殖による熱伝導の低下、機器及び金属パイプ内での界面上での腐食問題、上水道配水管などに付着する微生物膜の増殖集積による細菌汚染などが挙げられ、人体にも悪影響を及ぼす項目も含まれている。このような微生物膜表面上の流体挙動を本質的に把握することは、廃水処理性能の効率化、自然水系の浄化機構の解明、パイプなどに生育する微生物膜の増殖の軽減等に大きく役立つものと思われる。上記のような現象を解析するためには、ある形態を持った生物膜表面上の流体挙動計測をするとともに、これらのデータを踏まえ生物膜表面をモデル化し、その表面上内外の浸透流も含めた流体挙動をシミュレートする必要性がある¹⁾。

本研究では、凹凸を呈した生物膜表面上の2次元的な流体挙動を捉えるための計測手法を確立し、PTV法を用いて流体計測を行い、ミクロ的な部分も含めた総括的流体挙動を把握する手法の確認を目的としている。

この流体計測手法を確立することにより、生物膜の基質除去に及ぼす影響や、生物膜表面上の拡散、移流などの流体挙動を解明する一助となることを願っている。

2. 実験装置および計測手法の概要

2.1 生物膜の作成

本実験で馴致した生物膜は、好酸性鉄酸化バクテリアによって形成された生物膜である。実験で用いた好酸性鉄酸化バクテリアは、北海道胆振管内に所在する伊達鉱山(廃止鉱山)から流出する鉱山廃水から分離し

たものである。

2.1.1 実験装置

生物膜を馴養するための実験装置は、流入ポンプ・攪拌装置・反応槽・恒温槽から構成されている。生物膜表面凹凸の計測のための試料は、両面テープを用い反応槽の壁面に粘着させた2.5×3.0cmのプラスチックパッチから採取した。

2.1.2 連続実験

流入基質は、 Fe^{2+} として700mg/lと栄養塩溶液を添加した。また、連続実験の種菌として用いた鉄酸化バクテリアは、9K培地で培養し、水温30℃で空気曝気の状態で行った。

2.2 流体挙動計測装置

2.2.1 流体計測用チャンパー

生物膜をセットできる流体計測用チャンパーの設計図面を図-1に示す。長さ25cmの台形型チャンパーで、斜め両側面のどちらからでも実体顕微鏡とCCDカメラで生物膜表面と表面上のミクロ的マクロ的な流体挙動の画像を取得できるように、硬質のガラス板の窓を装着している。生物膜固定台の上面は、圧力の水位を調整できるように開放し、紫色レーザーの照射を行えるよう、ボックスとガラス窓を装備している。

2.2.2 実験計測装置の構成

計測装置は、実体顕微鏡(オリンパス)、紫色レーザー(ネオアーク㈱)、CCDカメラ2台(テクノポート㈱)、カットオフフィルター(誠工特殊硝子㈱)からなっており、PTV法による流体計測を行うための蛍光パーティクル(マクロ約25μm、ミクロ約4μm: Duke Scientific Corp.)が必要となる。カットオフフィルターは、実体顕微鏡の対物レンズに装着するものであり、蛍光波長のみを通し、生物膜表面上の紫色レーザー照射による照り返しを除去し、流体挙動を示す蛍光パーティクルの光のみを画像として捉えるためのものである。また、CCDカメラの光軸は垂直方向に30°、水平方向に約10°傾いている。

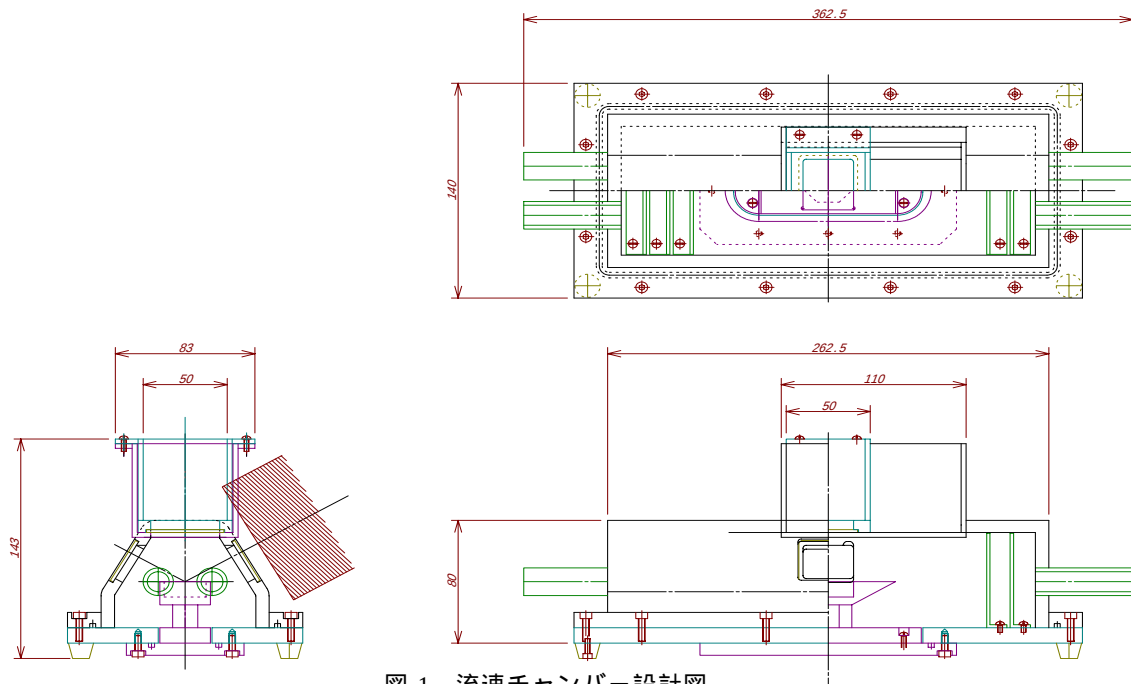


図-1 流速チャンバー設計図

2.3 流体計測手順の概要

実験で用いた生物膜は、33 日馴致したものを使用した。

2.3.1 流体計測用チャンバーの溶液循環

基質として調整した溶液は、最初に貯留槽から水流ポンプによってチャンバーへ送られる(途中で貯留槽とポンプに接続している軟質塩化ビニール管にコックピンを付け流量調節できるようにしてある)。

チャンバー流出口からも軟質塩化ビニール管を接続し、コック調節のついた硬質塩化ビニール管を通し貯留槽へと開放している。また、溶液を流す前に、前もってチャンバーの中に、生物膜を設置し、紫色レーザーを照射しておいた。(図 - 2)

2.3.2 生物膜表面上の流体計測画像

(蛍光パーティクル画像)の取り込み

流体計測チャンバーに、基質として調整した溶液(栄養塩を希釈したもの)を流す。流体の循環が一定になったところであらかじめ水溶液に分散させた蛍光パーティクルを貯留槽に投入する。

暗室状態にして、CCD カメラでレーザー照射された生物膜表面凹凸付近を流れている蛍光パーティクルの画像を取り込んだ。本研究では、マクロ領域とミクロ領域の 2 種類の流体挙動画像を取り込み、各挙動の把握を目指している。また、シャッター速度はマクロ・ミクロ領域共に 1/500 を 1 回、1/1000 を 2 回それぞれ行い、フィールド画像を取り込んだ。フィールド画像とは、1/60sec 間隔に 2 画像を垂直方向に交互に取り込んだ 1 枚の画像で、1/60sec 前後の情報が入っている。

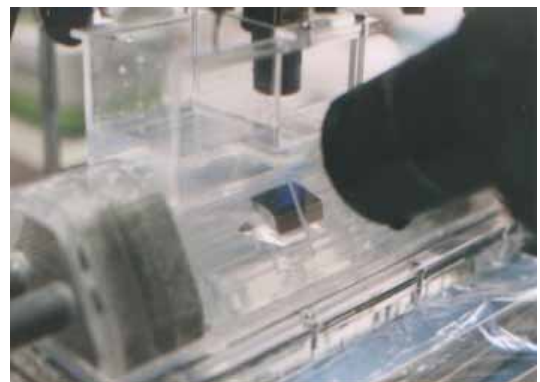
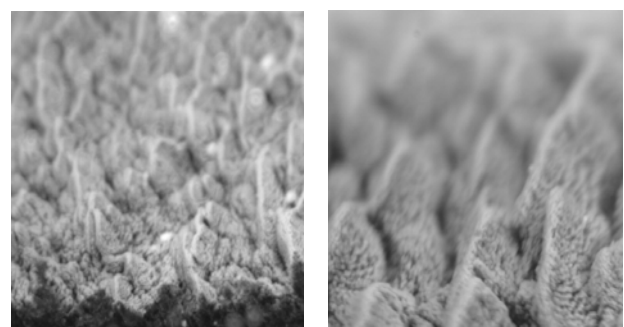


図-2 流速チャンバー内への紫色レーザーの照射

2.3.3 生物膜表面画像の取り込み

2.3.2 の流体計測のみでは、まだ生物膜表面の凹凸を取り込んでいない。したがって、流体の循環と紫色レーザーを止め、実験室内の照明に切り替えた。そして、実体顕微鏡の 2 つの CCD カメラで、生物膜表面凹凸のマクロ領域・ミクロ領域の画像(図-3: それぞれ異なる生物膜の試料)をステレオで各 5 枚取り込んだ。



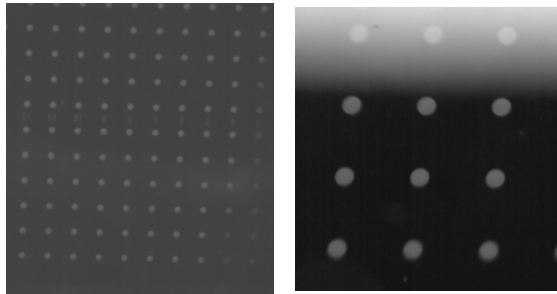
(マクロ領域)

(ミクロ領域)

図-3 生物膜表面上の凹凸形態

2.3.4 標定板画像取り込み

カメラパラメータのための標定板画像の取り込みは、流体ベクトルの表示計算と生物膜表面の3次元計算のために必要である。既知座標点が1mm間隔に表示してある標定板を室温25℃の水が満たされているチャンバー内に入れ、Z軸方向の高さを、マクロ領域画像では0.5mm間隔、ミクロ領域画像では0.2mm間隔でそれぞれ5段階移動させステレオ画像(1段階に1枚)を取り込む。照明は、一般の電気スタンドを用いて明るさを保った。



(マクロ領域) (ミクロ領域)

図-4 標定板画像

2.4 2次元の流体挙動の計算

2.4.1 カメラパラメータの計算

2.3.4の標定板画像を2値化(黒白化)し、点の重心計算を行い、単写真標定の計算をすることによって、カメラパラメータ(写真の座標位置・カメラの傾き・レンズの歪みなど)を求める。このカメラパラメータを用いることによって、仮定した座標上のパーティクル位置を計算し、2次元表示することができる。

2.4.2 PTV法(2時刻パターンマッチング法)²⁾

PTV法とは、流体力学の可視化手法の1つでありパーティクルの流れの同一認識をすることにより、流速ベクトルを測定する手法である。その手法の1つが、2時刻パターンマッチング法である。フィールド画像を分離した2つのフレーム画像をそれぞれ第1時刻、第2時刻とする。第1時刻の画像の着目粒子と第2時刻の候補粒の近傍粒子との配列パターンを画像解析と数学的手法を用いて導き出し、各配列パターンを重ね合わせた時のマッチング度が高い時、同一粒子とみなすことができるという方法である。

2.4.3 2次元流体挙動のベクトル化

2.3.2の流体パーティクルが写ったフィールド画像を画像処理することによって、2値化された2枚の粒子画像となり、PTV法による同一点認識の計算に用いられる。これらの一連の処理は以下に示す手順によってバッチ処理(複数のプログラムファイルを実行させる処理)されている。

フィールド画像を2つのフレーム画像に分離する。
パーティクル画像の輝度を調べ、正しい形状の輝度の良いパーティクルを2値化(黒白化)する。

2つの2値化したフレーム画像のパーティクルにラベリング(番号付け)する。

PTV法によって同一点の認識をする。

(数値データ(同一点の情報)の完成)

カメラの位置情報が入ったカメラパラメータを用いて、

データを実際の位置に変換し、流速ベクトルを計算する。

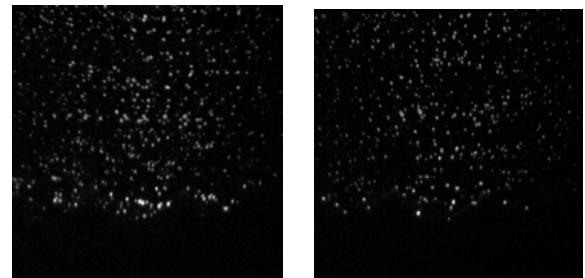
以上により、求めた流速ベクトルデータをソフトを使用して表示することができる。

3. 流体計測結果と考察

3.1 フィールド画像

マクロ領域

図-5左に、シャッター速度1/500のフィールド画像を示す。シャッター速度1/500では、粒子の点が若干伸びて写っている。図-5右は、シャッター速度1/1000のフィールド画像である。1/500に比べ粒子の点の伸びがなくなっており、しかも、十分な数の点が撮影されている。したがって、シャッター速度1/1000の方が、この流速における最適な条件であると考えられる。



(1/500)

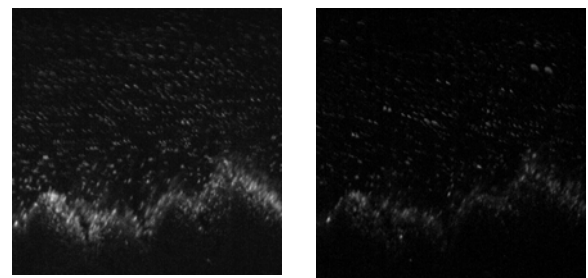
(1/1000)

図-5 マクロ領域における

各シャッター速度のフィールド画像

ミクロ領域

図-6左に、シャッター速度1/500のフィールド画像を示す。シャッター速度1/500では、粒子の点が全体的に写っており、全体の流体挙動を捉えていた。一方のシャッター速度1/1000のフィールド画像では、1/500に比べ粒子の点が多かった。これは、パーティクルが4μmと小さくまた倍率が高いため、視野の蛍光が弱まったためと考えられる。よって、ミクロ領域ではシャッター速度1/500を用いた。



(1/500)

(1/1000)

図-6 ミクロ領域における

各シャッター速度のフィールド画像

3.2 流速ベクトル

3.1 より, 2 次元流体挙動の流速ベクトルを表示した。以下に各領域の結果を示す。

マクロ領域

図-7, 8 は, シャッター速度 1/1000 で撮影した生物膜表面上の流速ベクトル図の中で特徴的な 2 枚の画像である。図-7 は画像下の生物膜表面から離れた上層部流れが直線的な状態であり, 図-8 は, 上層部の流れが生物膜の固定部分や凹凸によって, 右上がりに緩やかなゆらぎを生じていることが観察された。流速は約 50mm/sec であった。両画像の生物膜表面上ではあらゆる箇所でゆらぎが生じ, 流速は約 0.2 ~ 2.0mm/sec の範囲で遅い流速形態となった。

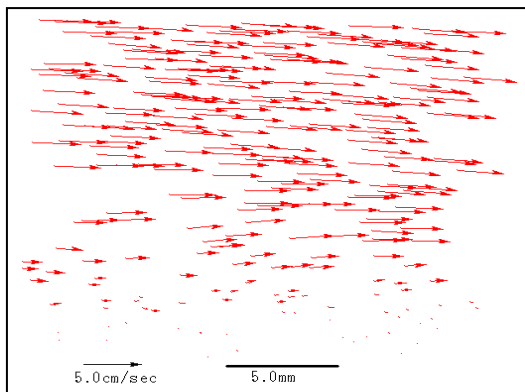


図-7 シャッター速度 1/1000 の
生物膜表面上の流速ベクトル図

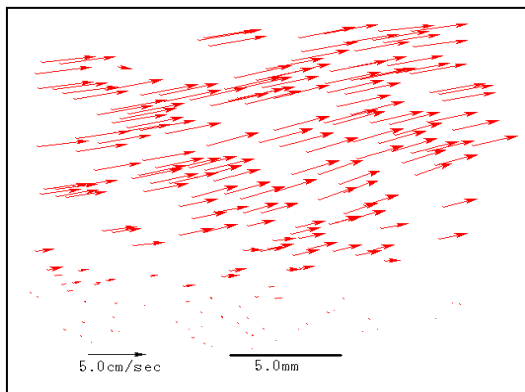


図-8 シャッター速度 1/1000 の
生物膜表面上の流速ベクトル図

ミクロ領域

図-9, 10 は, シャッター速度 1/500 で撮影した生物膜表面上の流速ベクトル図の中で特徴的な 2 枚の画像である。図-9 は画像下の生物膜近傍から離れた上層部流れが直線的な状態であり, 図-10 は, 上層部や中層部, 生物膜表面部分と全体的に連動した半円状のゆらぎを起こしていることが観察された。上層部の流速は共に約 10mm/sec であった。両画像の生物膜表面上ではあらゆる箇所でゆらぎが生じ, 流速は約 0.1 ~ 1.0mm/sec の範囲で遅い流速形態となっていた。これは, 生物膜表面上約 500 μ m 以内は生物膜表面凹凸の影響による生物

膜垂直方向の移流と拡散の影響が混在した領域と考えられる。

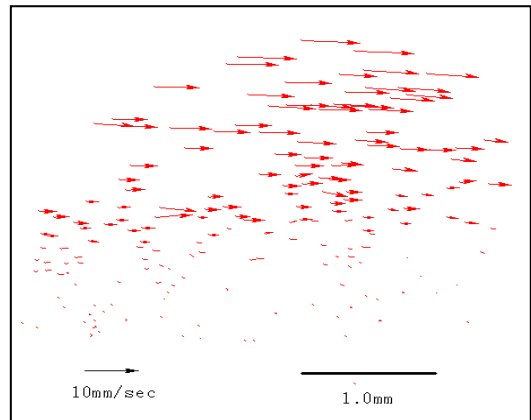


図-9 シャッター速度 1/500 の
生物膜表面上の流速ベクトル図

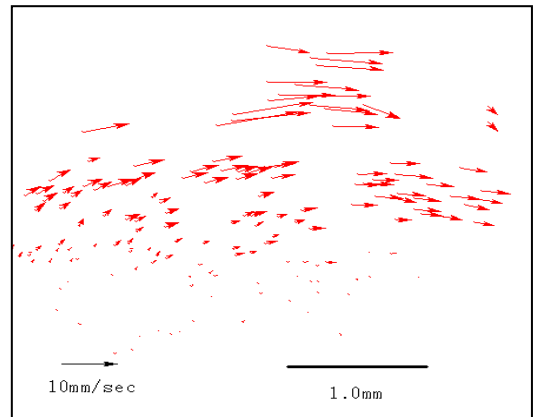


図-10 シャッター速度 1/500 の
生物膜表面上の流速ベクトル図

4. まとめ

今回行った流体挙動計測によってマクロ的にもミクロ的にもある程度計測が可能であった。

5. 今後の課題

今後は, 流体挙動と生物膜の凹凸の大小を見るために, 生物膜表面の 3D 画像を組み合わせる表示の必要性がある。今回は, 生物膜表面のステレオ画像を取得しているが, 3D 計算と表示法を研究中である。

また, PTV 法の画像の取り込みは, ステレオ PTV 法の開発のために左右の CCD カメラでステレオ画像を取り込んでいる。蛍光粒子の位置を PTV 法の同一点認識手法を用い, 3D 的に流速ベクトルを表示していくことを行っている。

参考文献

- 1) 大久保孝樹, 微生物膜の基質除去に及ぼす膜表面形態の影響に関する研究, 1999, 東北大学学位論文
- 2) 西野耕一, 2 次元 PTV における粒子追跡方法 - 3 時刻パターンマッチング法, 1992, 第 10 回流体計測シンポジウム講演