

B-4

生物膜表面上の流体計測手法に関する研究

函館工業高等専門学校環境都市工学科

○大久保孝樹

横浜国立大学大学院工学研究院システムの創生部門

西野耕一

1. はじめに

水環境中に存在する微生物は、担体に付着するか浮遊した状態で存在しているが、そのほとんどは担体に付着して生物膜を形成している。生物膜は、自然環境中や廃水処理場などに存在しているが、処理場や自然の自浄作用などのように有益な面を我々に与えている一方で、いろいろな障害(Biofouling: 細菌汚染・腐食・伝熱阻害・圧力損失・剥離汚染 etc.)を与えている。このような現象を有益な方向で捉えていくためには、生物膜の基本的本質的な挙動を把握していかなければならない。現在、このような研究は国内外で行われており、ミクロ的な部分、特に実験計測的には、かなりの部分まで解析研究がなされている。しかし、これらはミクロ的な部分にとどまっており、これらの現象を総括的なものに還元していくには、まだ遠い位置にいると思われる。現在、生物膜の処理性能を解析するために、ほとんどの研究者、技術者は1次元の生物膜モデルで十分であるとしている。また、ミクロ的な解析や2次元、3次元モデルの解析では、定性的な生物膜の性状を知る上だけで十分としている。しかし、このようなミクロ的な現象や2次元、3次元現象は、1次元の生物膜モデルに簡易的に内包されるべきであって、その寄与の度合いを定量化するためには、2次元、3次元の解析が重要となってくる。

本研究では、特に凹凸を呈した生物膜表面上の2次元流体挙動を捉えるための計測手法の確立と、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指している。ここでは、生物膜表面上の流れを計測した。この流体計測によって、生物膜の基質除去の制御の確立が可能になり、シミュレートも含めた生物膜の制御という大きな問題への解明の一助となることを願っている。

2. 実験及び計測手法

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(*Thiobacillus Ferrooxidans*)によって形成された生物膜である。

(1) 実験装置

生物膜を馴養するための実験装置の概略を図-1に示す。反応槽は、透明塩ビ板製で直径18cm、高さ30cmの円筒形である。4枚羽根を取り付けた攪拌棒を用いている。攪拌装置の回転数は約124rpmで混合特性は完全混合である。攪拌装置だけでは、水表面からの酸素供給が少ないので、図-1に示すようにガラスパイプで曝気してある。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。

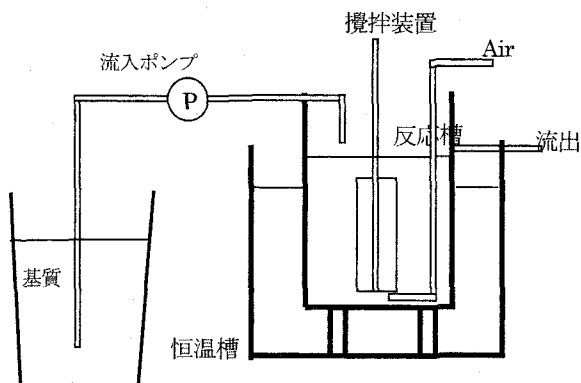


図-1 生物膜を馴養するための実験装置

(2) 連続実験

連続状態で実験を行う前に、反応槽の壁面に鉄酸化バクテリアを付着させる目的で、回分状態で約5日間反応を進ませた。回分状態の初期条件は、9K培地を2倍に希釈した基質に、100mlの種菌溶液を接種した。

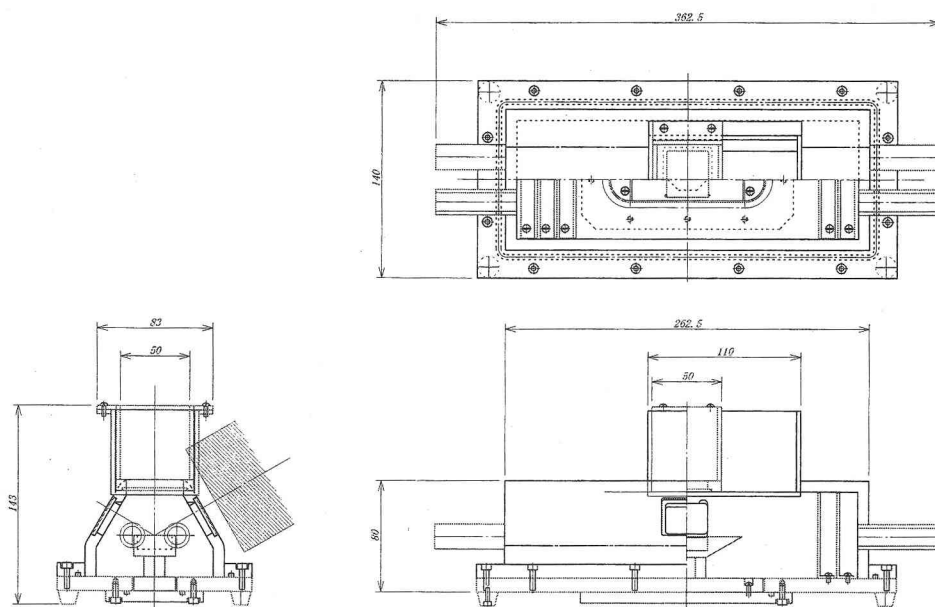


図-2 流体計測用チャンバーの設計図

反応槽内の水温は、20℃となるように恒温槽で調節した。反応槽の攪拌は、攪拌装置で回転数約124rpmで行っており、別の実験で反応槽壁面上約1cmはなれたところ(6箇所)の流速を電磁流速計で測定したところ、約8~12cm/secの範囲にあった。実験は2系列行い、同一流量(約0.96~0.10 l/hr)で、さらに同一環境条件(水温、酸素供給等)で行った。各系列は、それぞれ10日(Run. 1)、23日(Run. 2)に終了させた。生物膜の試料は、反応槽の上層、中層、下層から各5個ずつ計12個取り出し、生物膜表面上の流体計測用とした。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。連続実験の種菌として用いた鉄酸化バクテリアは、9K培地で培養は水温30℃で空気曝気の状態で行った。



図-3 紫色レーザーを用いた流体計測

2.2. 流体挙動計測装置

(1) 流体計測用チャンバー

生物膜をセットできる流体計測用チャンバーの設計図面を図-2に示す。長さ25cmの台形型チャンバーで、流入と出口に整流板が装着されている。中央の位置に生物膜の試料を脱着できる台を置き、その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がボックスとガラス窓を装備している。

(2) 計測装置

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(30 μ m: Duke Scientific Corp.)が必要となる。

(3) 実験計測装置の構成

図-3は、CCDカメラを装着した実体顕微鏡と流体計測用チャンバー、紫色レーザーを設定し、チャンバー

内の蛍光パーティクルを含んだ流体に紫色レーザーを照射しているところである。実体顕微鏡の対物レンズには蛍光波長(473nm)を通し、照射波長(412nm)の照り返しをカットするフィルターを装着している。これは、生物膜表面上の照射による反射光を取り除き、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である。本研究における実験計測装置の特徴をまとめると、紫色レーザー、蛍光パーティクル、カットオフフィルターを用い、物体表面の照り返しを除去し、斜めから撮影することによって物体表面上の流体計測を可能にしたことにある。

4. 流体計測結果

4.1. フィールド画像

図-4は、シャッター速度1/1000のフィールド画像であり、(A)が馴致期間10日、(B)が馴致期間23日の生物膜上の蛍光パーティクル画像である。

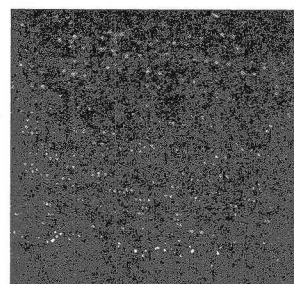
4.2. 流速ベクトル

図-5に、シャッター速度1/1000とした場合の流速ベクトル図を示す。図は馴致期間10日の生物膜上の流速ベクトルを表している。この図から生物膜近傍の流体挙動を読み取ることが可能である。図-6は、図-5の四角領域を拡大したもので、生物膜近傍の流速を示している。生物膜近傍での流速は0.2~1.0mm/secの範囲で遅い流速挙動のデータが得られている。生物膜表面上100 μ m以内で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。この実験条件では、生物膜表面から離れた上部での流速が約60mm/secであり、生物膜近傍の流速の約60~300倍以上の流速となっている。以上の流体計測計算には、2時刻追跡のPTV法を用いている。

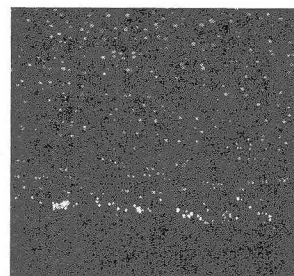
今後、詳細なマイクロ領域の流速分布を計測するために、実体顕微鏡の倍率を上げ、小さな蛍光パーティクル(5~10 μ m)を用いて計測することを考えている。また、流体挙動と生物膜の凹凸の大小を見るために、生物膜表面の3D画像を組み合わせる表示の必要性がある。今回は、生物膜表面のステレオ画像を取得しているが、3D計算と表示が上手くいかなかった。今後、この3D画像表示の手法を確立していく必要性がある。

5. まとめ

- ①生物膜表面上の流体挙動を計測するため、流体計測用チャンバー、実体顕微鏡、CCDカメラ、紫色レーザー、カットオフフィルター、蛍光パーティクルを用い流体挙動の画像を取得し、PTV法による流体計測手法を確立した。
- ②今後、生物膜の3D画像も組合せ、かつマイクロの部分も詳細に計測する手法を確立する必要性がある。



(A) 馴致期間 10 日



(B) 馴致期間 23 日
図-4 シャッター速度
1/1000のフィールド画像

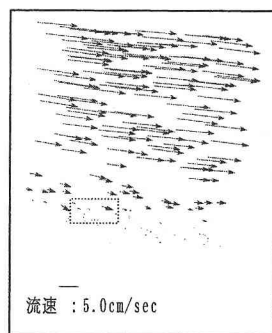


図-5 生物膜表面上の流速
ベクトル図

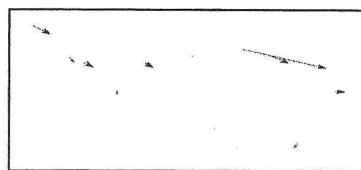


図-6 生物膜表面近傍の流速ベクトル

謝辞：本研究は平成12年度~14年度文部科学省科学研究費(基盤研究C(2)課題番号12650556 研究代表者大久保孝樹)の補助を受けた研究の一部であることを付記し、ここに謝意を表します。

参考ホームページ：PTV・PIV法の研究：西野研究室(横浜国大)

<http://www.me.ynu.ac.jp/faculty/thermo/nishino/nishino.html>