

B-31 生物膜表面凹凸のステレオ計測の 評価に関する基礎的研究

○伊早坂 理沙¹・大久保 孝樹^{2*}・西野 耕一³

¹函館工業高等専門学校 環境システム工学専攻

²函館工業高等専門学校 環境都市工学科

³横浜国大大学院 システムの創生部門

*E-mail: ohkubo@hakodate-ct.ac.jp

1. はじめに

生物膜は、微生物が担体に膜状に付着した微生物集合体である。生物膜は処理場や自然河川において浄化作用などの有益な面がある一方で、様々な障害 (Biofouling: 細菌汚染、腐食、伝熱障害、圧力損失、生物膜剥離汚染) を与えており、これらの現象を有益に捉えていくためには、基本的な生物膜の挙動を解明する必要がある。

本研究では、生物膜の挙動を解明する方法の1つとして、生物膜表面形態が生物膜表面上の流体挙動と基質除去に影響していることに着目し、ステレオ計測を用いて生物膜の表面形態を計測し定量化するための基礎研究を行った。さらに、これら結果をレーザー変位計による直接的な計測方法と比較することによって、ステレオ計測の適否を評価した。

2. 表面形態の計測方法

(1) ステレオ計測

ステレオ計測機器の構成は実体顕微鏡 (オリンパス) と2台の CCD カメラ (ソニー)、同期信号発生器、画像処理装置 (Nexus)、ステッピングモーター付 X-Y ステージ (中央精機) である。実体顕微鏡に2本の鏡筒をつけ、その上部に CCD カメラを取り付ける。実体顕微鏡対物レンズの下方に、Z 軸ステージを付けたステッピング付 X-Y ステージ上に生物膜試料を設置し、その表面画像をコンピューターに取り込む。

(1) レーザー変位計

機器は、拡散型レーザーヘッド、データ信号変換機、データ取り込み装置、パソコンで構成されている。レーザー変位計のレーザーヘッドを固定台に装着し、生物膜試料を X-Y ステージに設置しステッピングモーターで移動させ X-Y 方向の Z (生物膜の凹凸) の高さをコンピューターに取り込む。

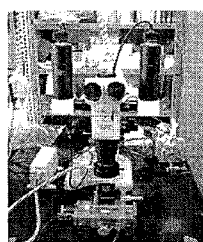


図1 ステレオ計測機器

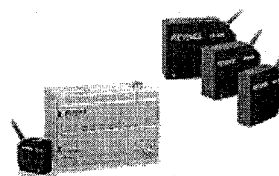


図2 レーザー変位計機器

3. ステレオ画像の評価方法

ステレオ画像の評価は、レーザー変位計画像と比較して、その適否を判断した。比較手法は、ステレオ計測画像内でレーザー変位計画像と同一の画像を探索し、その両画像の相対的高さの相関係数により判断した。すなわち、ステレオ画像のデータの高さ Z_s とレーザー変位計画像のデータの高さ Z_L により相関係数を算出することにより評価した。また、もう一つの評価方法として各画像の RMS (root mean square) を算出した。同一の RMS であれば同一の凹凸の大きさであることが判断できるので、この RMS によっても評価できる。

相関係数

$$X_{sm} = \sum_{i=1}^N X_{si} / N, \quad X_{Lm} = \sum_{i=1}^N X_{Li} / N$$

$$\sigma_s = \sqrt{\sum_{i=1}^N (X_{si} - X_{sm})^2 / N}, \quad \sigma_L = \sqrt{\sum_{i=1}^N (X_{Li} - X_{Lm})^2 / N}$$

$$S_{SL} = \sum_{i=1}^N (X_{si} - X_{sm})(X_{Li} - X_{Lm}) / N$$

$$r = \frac{S_{SL}}{\sigma_s \sigma_L} : \text{相関係数}$$

X_{sm} : ステレオ計測の平均高さ

X_s : ステレオ計測の高さデータ

X_{Lm} : レーザー変位計の平均高さ

X_L : レーザー変位計の高さデータ

RMS: RMSは σ_s と σ_L (標準偏差のこと)

図4は、ステレオ計測画像とレーザー変位計画像の余分な画像箇所をカットする VBasic のプログラムである。ステレオ計測画像内でレーザー変位計画像の同一箇所を相関係数によって探索し画像を切り出して、相関係数と RMS を算出した。

4. 同一箇所画像の切り出し

図3は、ステレオ計測の連結画像 ($6 \times 6 = 36$) とレーザー変位計による画像を示したものである。ステレオ計測は生物膜表面を実体顕微鏡で拡大し、 $6 \times 6 = 36$ 枚の画像を連結したものであるが、レーザー変位計の測定データ ($20 \mu\text{m}$ 間隔、 501×501 の高さデータ) より、やや粗い測定データを用いて3D画像 (3次元画像) を表示しており、図3に示されるような画質となっている。

図4は、探索するにあたり余分な箇所をカットするプログラムである。カットされた画像は画面の左下に表示される。

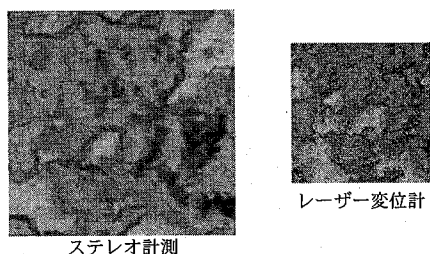


図3 探索前のステレオ計測とレーザー変位計の画像例

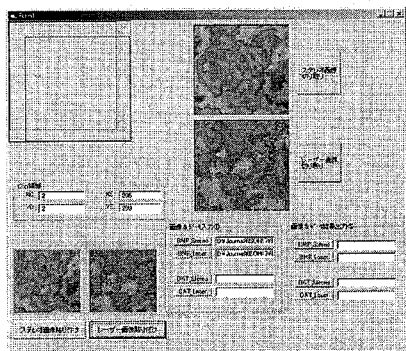


図4 探索をするにあたり余分な箇所をカットするプログラム

5. 結果と考察

図7は、10日間馴致した生物膜の3D画像である。また図8は、23日間馴致した生物膜の3D画像である。これらの図は、ステレオ計測画像とレーザー変位計画像の同一箇所画像を高さデータの相関係数により判断し切り出した図である。生物膜の3D画像は、反応槽上層、反応槽中層、反応

槽下層、それぞれ2個ずつあり、ここでは相関係数の高い方の画像を載せた。

(1) 相関係数

表1 10日間馴致した生物膜の3D画像の相関係数

反応槽上層	反応槽中層	反応槽下層
0.944	0.892	0.776
0.682	0.431	0.533

表2 23日間馴致した生物膜の3D画像の相関係数

反応槽上層	反応槽中層	反応槽下層
0.833	0.923	0.978
0.961	0.861	0.958

10日間馴致した生物膜の3D画像の相関係数は表1のようになった。0.8以上の画像もあるが、0.431と低いものもある。原因として、図5に示すように、高さデータが同じ箇所に集中していると、相関係数が小さくなってしまいうためである。よって、相関係数によりステレオ計測値分布とレーザー測定値分布の同一箇所を認識し得ないので、凹凸の小さい生物膜表面では相関係数による評価は難しいと考えられる。

23日間馴致した生物膜の3D画像の相関係数は表2のようになった。0.83~0.98の範囲で高い一致が確認された。図6のように凹凸が激しいとデータが直線上に散らばるので、相関係数が高くなる。よって、ステレオ計測の評価は適と考える事ができる。

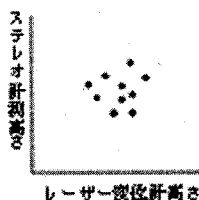


図5 10日間馴致の高さデータをグラフ化した例

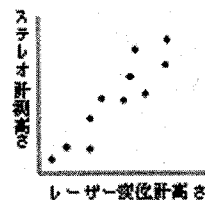


図6 23日間馴致の高さデータをグラフ化した例

(2) RMS

表3 10日間馴致した生物膜の3D画像のRMS

	ステレオ計測	レーザー変位計
反応槽上層	0.138	0.139
	0.107	0.114
反応槽中層	0.139	0.112
	0.112	0.119
反応槽下層	0.138	0.148
	0.138	0.132

表4 23日間馴致した生物膜の3D画像のRMS

	ステレオ計測	レーザー変位計
反応槽上層	0.185	0.191
	0.324	0.337
反応槽中層	0.365	0.371
	0.337	0.339
反応槽下層	0.347	0.363
	0.438	0.458

10日間馴致した生物膜の3D画像のRMSは表3のようになった。ステレオ計測とレーザー変位計のRMSの差が0.001~0.027の範囲であり、同一画像ではほぼ同程度の値となっているので表面形態が同一の凹凸の大きさであることが判断できるので、ステレオ計測の評価は適と判断することができる。

23日間馴致した生物膜の3D画像のRMSは表4のようになった。ステレオ計測とレーザー変位計のRMSの差が0.002~0.020の範囲であり、同一画像ではほぼ同程度の値となっているので表面形態が同一の凹凸の大きさであることが判断できるので、ステレオ計測の評価は適と判断することができる。

5. まとめ

23日間馴致した生物膜の3D画像は0.8以上の高い相関係数が得られた。しかし、相関係数を算出するときのデータ分布により、10日間馴致した生物膜の3D画像の相関係数は0.8以上の物もあるが、0.431と非常に低い物もある。原因として、前述のとおり凹凸が小さいことによる相関係数低下のためであると考えられる。よって、23日間馴致した生物膜の3D画像のように凹凸の激しい生物膜表面では、ステレオ計測の評価は適と考える事ができるが、10日間馴致した生物膜の3D画像のように凹凸の小さい生物膜表面では、ステレオ計測の評価は難しいと考えられる。また、RMSは同一画像で同程度の値が得られたので、ステレオ計測の評価は適と考えられる。

水環境中でレーザー変位計での計測は光の反射や試料のゆらぎのために試料の計測が不可能であると考えられる。よって、生物膜のステレオ計測の可能性が認識され、水中における計測手法への応用の可能性が確立された。さらに、ゆらぎのある生物膜も時系列的に計測可能と考えられる。

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

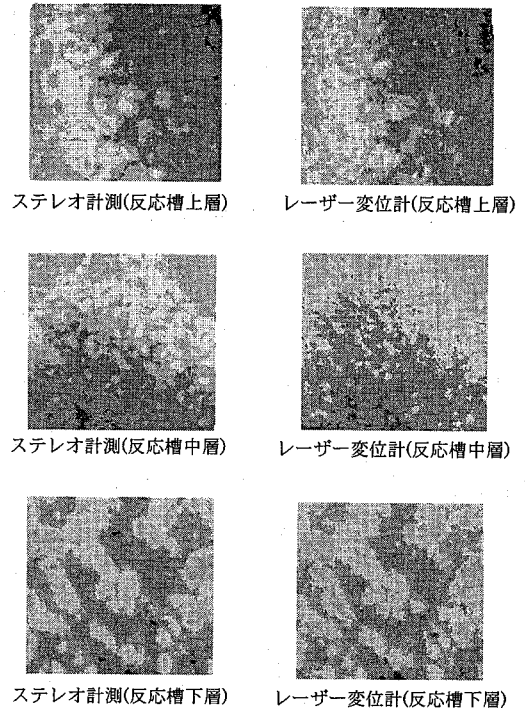


図7 ステレオ計測の連結画像とレーザー変位計による画像との比較（10日間馴致生物膜の表面形態）

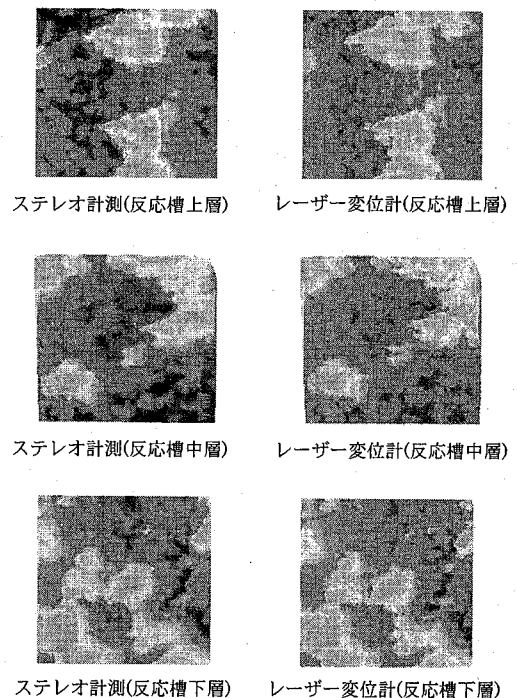


図8 ステレオ計測の連結画像とレーザー変位計による画像との比較（23日間馴致生物膜の表面形態）