

## B-34 生物膜表面凹凸の定量化に関する基礎的研究

○太田 昂平・大久保 孝樹・西野 耕一

函館工業高等専門学校 専攻科環境システム工学専攻 (〒042-0953 函館市戸倉町14-1)

E-mail:05k01@kamui.hakodate-ct.ac.jp

### 1. はじめに

生物膜はさまざまな障害を引き起こすとともに、その一方で廃水処理や河川浄化などに利用されている有益な面もある。このような生物膜の挙動を解明することは、生物膜の問題解決や効率的利用するためには必要不可欠なことである。生物膜の挙動、特に基質除去は、生物膜の表面形態と表面上の流体挙動に大きな影響を受けている。そのため本研究では、生物膜の表面形態を定量化し、その定量化指標によってどのように生物膜の基質除去に影響を与えているかを調べることを目的とした。今回は、定量化指標を行い、レーザー変位系のデータのみで定量化解析を行った。なお、ここで用いた解析データは、過去のデータを再整理、再解析したものである。

### 2. 生物膜の表面形態の計測

#### 2.1 レーザー変位計による方法

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ステージに設置してから、ステッピングモーターで移動させX-Y方向のZの高さ（生物膜凹凸）を測定した。X-Yステージはコンピューターにより制御し、レーザー変位計はトリガを設定することによって、ある区域の生物膜凹凸のデータを取得する。

#### 2.2 実体顕微鏡を用いたステレオ撮影による方法

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に取り込む。

### 3. 画像解析による3D表示

#### 3.1 レーザー変位計画像

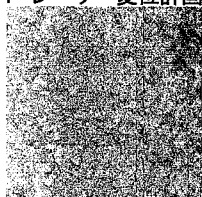


図-1 10日馴致生物膜



図-2 23日馴致生物膜

反応層上層

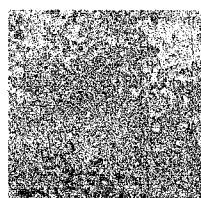


図-3 10日馴致生物膜

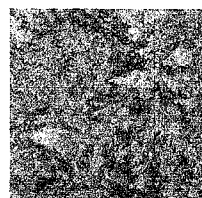


図-4 23日馴致生物膜

反応層中層

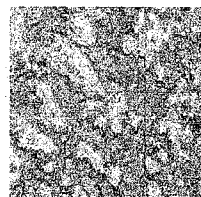


図-5 10日馴致生物膜

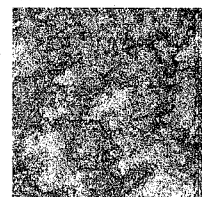


図-6 23日馴致生物膜

反応層下層

レーザー変位計の測定データを用いて、生物膜の凹凸を計測して2次元的なデータを得た。上層より下層の方が生物膜の凹凸が激しくなっている。また10日馴致生物膜より23日馴致生物膜の方が生物膜の凹凸が激しくなっている。

#### 3.2 ステレオ計測画像



図-7 10日馴致生物膜



図-8 23日馴致生物膜

反応層上層



図-9 10日馴致生物膜

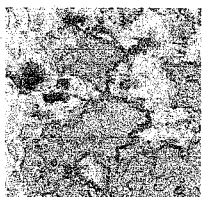


図-10 23日馴致生物膜

反応層中層

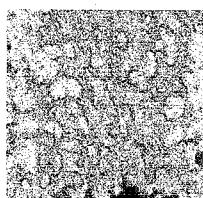


図-11 10日馴致生物膜

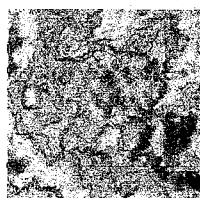


図-12 23日馴致生物膜

反応層下層

ステレオ計測は水中での計測およびゆらぎも計測可能と考えられるので、今後の測定手法として用いるステレオ計測の2次元データも得ている。なお、これらの画像はレーザ変位計の画像と同じ部位の近傍を表している。

#### 4. 定量化手法

本研究では定量化指標として表面積、RMS、パワースペクトル（一次元）を用い、生物膜の基質除去速度との関連性を調べた。

##### 4.1 表面積

不規則な凹凸を持つ微生物膜の表面積算出方法として、生物膜表面上に格子状に4点取り、格子点4点の平均を中心点として、その5点によって分割される三角形より格子状の表面積を計算する。

##### 4.2 RMS (Root Mean Square)

RMSは高さの標準偏差と考えてよく、平均値からの高さの縦距を2乗して、その和の平均の平方根をとったものである。

$$rms = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - Y_m)^2}{N}}$$

##### 4.3 パワースペクトル

パワースペクトルはMEM（最大エントロピー法）で計算した。

#### 5. 表面形態の定量化結果

本研究では10日馴致した生物膜と、23日馴致した生物膜の二つの生物膜のデータにより定量化を行った。なお、ステレオ計測によるデータは定量化していない、レーザ変位計のデータのみで定量化を行っている。

##### 5.1 生物膜の凹凸

生物膜凹凸の測定結果の一部を示す。

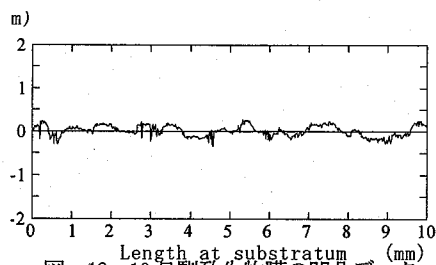


図-13 10日馴致生物膜の凹凸データ

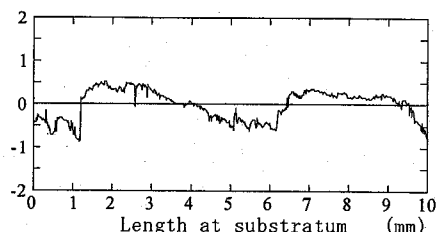


図-14 23日馴致生物膜のx方向凹凸データ

図-13、図-14はそれぞれの生物膜の凹凸計測データを表したものの一部で、10日馴致生物膜より23日馴致生物膜のほうが凹凸が激しくなっている。

#### 5.2 表面積とRMS

生物膜表面の表面積・RMSの計算結果を表にまとめたものを以下に示す。

| 10日馴致 | 表面積 (mm <sup>2</sup> ) | RMS   |
|-------|------------------------|-------|
| 反応槽上層 | 177.6                  | 0.171 |
|       | 178.9                  | 0.120 |
| 上層平均  | 178.2                  | 0.146 |
| 反応槽中層 | 192.6                  | 0.125 |
|       | 204.7                  | 0.132 |
| 中層平均  | 198.6                  | 0.129 |
| 反応槽下層 | 212.3                  | 0.155 |
|       | 183.1                  | 0.141 |
| 下層平均  | 197.7                  | 0.148 |
| 平均    | 191.5                  | 0.141 |

表-1 10日馴致生物膜の表面積・RMS

| 23日馴致 | 表面積 (mm <sup>2</sup> ) | RMS   |
|-------|------------------------|-------|
| 反応槽上層 | 243.0                  | 0.187 |
|       | 298.0                  | 0.335 |
| 上層平均  | 270.5                  | 0.261 |
| 反応槽中層 | 312.5                  | 0.388 |
|       | 336.5                  | 0.340 |
| 中層平均  | 324.5                  | 0.364 |
| 反応槽下層 | 315.7                  | 0.387 |
|       | 341.7                  | 0.463 |
| 下層平均  | 328.7                  | 0.425 |
| 平均    | 307.9                  | 0.350 |

表-2 23日馴致生物膜の表面積・RMS

| 生物膜   | 表面積                   | RMS   | 基質除去速度                       |
|-------|-----------------------|-------|------------------------------|
| 10日馴致 | 191.5 mm <sup>2</sup> | 0.141 | 0.309 mg/cm <sup>2</sup> ・hr |
| 23日馴致 | 307.9 mm <sup>2</sup> | 0.350 | 0.508 mg/cm <sup>2</sup> ・hr |

表-3 生物膜の表面積・RMS・基質除去速度

表-3から凹凸の大きさの指標であるRMSが10日馴致生物膜と23日馴致生物膜を比べると2.5倍程大きく、また表面積も1.6倍以上大きくなっており、これに伴い基質

除去速度が1.6倍程度大きくなっていることが示されている。基質除去速度は生物膜の連続実験データより求められたものである。

### 5.3 パワースペクトル

パワースペクトルの計算結果の一部を示す。

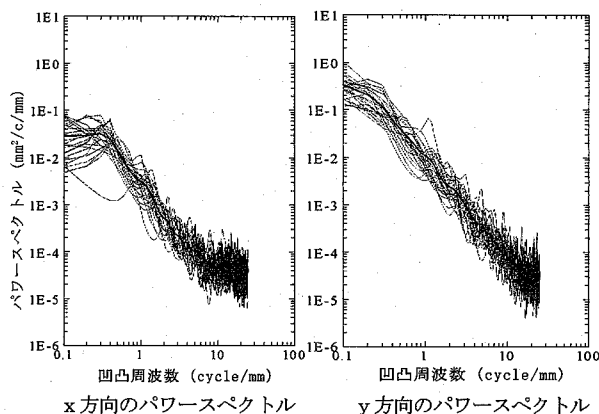


図-15 10日馴致生物膜表面凹凸のパワースペクトル

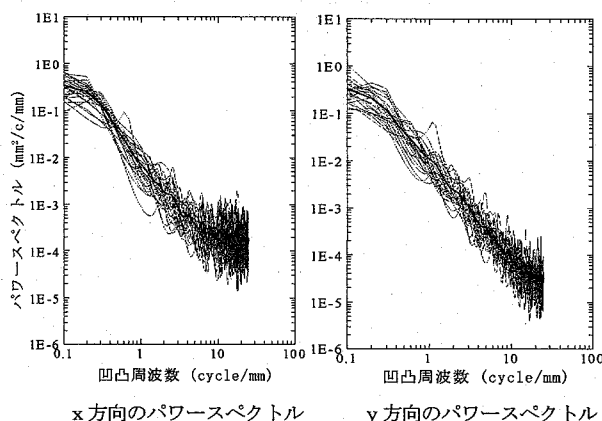


図-16 23日馴致生物膜表面凹凸のパワースペクトル

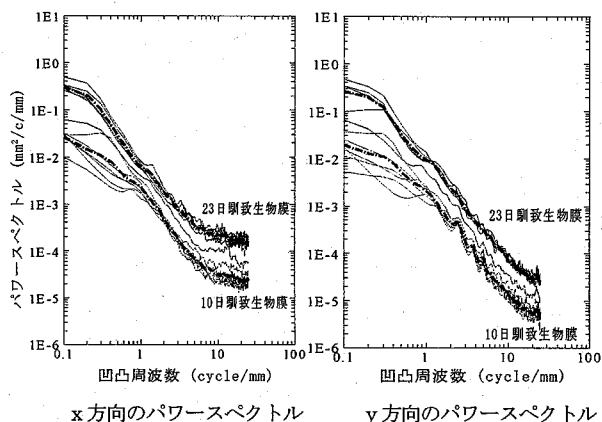


図-17 生物膜表面凹凸の平均パワースペクトル

図-15は10日馴致生物膜、図-16は23日馴致微生物膜の凹凸のx方向とy方向のパワースペクトルを表してお

り、反応槽下層から採取した生物膜凹凸データから計算したものである。細線は計算によって出された反応槽下層生物膜の各部位のパワースペクトルで、太線はそれらのパワースペクトルを平均化してまとめたものである。図-17はさらに反応槽上層、中層、下層の生物膜の平均化したパワースペクトルをまとめて平均化したもので、それぞれ10日馴致生物膜、23日馴致生物膜のx方向、y方向の総合的な平均パワースペクトルを表している。

これらの図より、パワースペクトルにおいても10日馴致生物膜より、23日馴致生物膜の凹凸のパワースペクトル値が大きくなっていることから、低周波数における凹凸の振幅（凹凸の高低差）が大きいことが示されている。

生物膜が成長して10日から23日馴致の生物膜になると各周波数において振幅が大きく成長している様子が示されている。また、x方向とy方向のパワースペクトルの分布が多少異なるのは、生物膜を流れる流体の影響を受け異方性の形態を持った生物膜が形成された可能性が高い。

## 6. 結果

- ① 生物膜の凹凸データは10日馴致生物膜より23日馴致生物膜のほうが激しくなっている。
- ② 経過日数とRMS、表面積の間には、経過日数の増加にともない、RMS、表面積が増加している関係が見られた。またRMS、表面積増加に伴い基質除去速度も増加していることがわかった。
- ③ パワースペクトルにおいても経過日数が増加するとともに、凹凸の振幅（凹凸の高低差）が大きくなっていることがわかった。またx方向とy方向のパワースペクトルの分布が、流体の影響により異方性をもっている可能性が高い。

これら定量化結果より表面積・RMS・パワースペクトルの定量化指標の妥当性を確認した。

## 7. 今後の展望

- ① ステレオ計測によって得られている計測データを用いて、レーザ変位計のデータで行った表面積・RMS・パワースペクトルの定量化解析を行う。
- ② 解析した定量化指標を用いて、定量化指標によって生物膜凹凸を自由に作成できる生物膜凹凸シミュレーションの作成。

## 8. 参考文献

- 1) 大久保孝樹、西野耕一：生物膜の基質除去に及ぼす膜表面形態および流体力学的挙動の影響、平成12年度～平成14年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））研究成果報告書、課題番号 12650556