

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 1 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13869

研究課題名(和文) バイオフィルムの流体力学的評価と流動抵抗低減

研究課題名(英文) Hydrodynamic evaluation of biofilm and flow drag reduction

研究代表者

玉野 真司 (Tamano, Shinji)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40345947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、バイオフィルムの形成促進のための生物学的手法に加えて、バイオフィルムの表面粗さと粘弾性の流体力学的評価を行うことで、抵抗低減壁面としてのバイオフィルムの可能性を吟味する。まず、バイオフィルムの流体力学的アプローチとして、バイオフィルム形成のノウハウを構築した。次に、光学電子顕微鏡を用いて、クリスタルバイオレット染色によるバイオフィルムの観察のためのノウハウを構築した。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、透明な薄膜であるバイオフィルムの凹凸形状を観察した。バイオフィルムの効率的かつ大量生成手法については、今後の研究課題とする。

研究成果の概要(英文)：In the present study, how to promote the development of the biofilm was investigated with respect to the biological and hydrodynamic techniques, and then the roughness and viscoelastic properties of the biofilm were evaluated by the hydrodynamic method. The biofilm on the test piece was color-treated due to the crystal violet and the image was captured by the optical electron microscope. We could confirm the existence of the biofilm. Next, the roughness of the biofilm was measured by the confocal laser microscope. For further discussion, the investigation of the massive production method would be needed, which is the future work.

研究分野：流体工学

キーワード：バイオ流体力学

1. 研究開始当初の背景

バイオフィーム（生物膜）は、細菌をはじめ、藻類、原生動物など多種多様な微生物から構成される粘液状物質であり、水中にある固体（壁面）上に形成される。バイオフィームは湿度が高い浴槽や台所でもしばしば見られ、一般には「ヌメリ」と言われる。バイオフィームはパイプの腐食や飲料水の汚染など工業上・衛生上の問題を引き起こすことから抑制・除去に関する研究が多いが、排水処理や環境浄化においては微生物の付着しやすい材料の研究なども進められている。しかしながら、いずれの場合も、生物学、細菌学、衛生学の立場からの研究がほとんどであり、流体力学の立場からの研究は見当たらない。

研究代表者はこれまでに、壁面性状の高機能化による流動抵抗低減効果（以降「DR効果」と呼ぶ）に関する研究を進めてきた。特に、アザラシ毛皮面によるDR効果の解明、リブレット（微細な縦溝構造）と毛皮面の知見を融合した静電植毛リブレットの提案などを行っている。しかし、微細加工面と毛皮面のいずれの場合においても、高コストや製作の困難さの問題があった。また、研究代表者は、粘弾性流体である界面活性剤水溶液の壁面注入によるDR効果に関する研究にも取り組んでいる。DR効果を有する粘弾性流体は、一般的に曳糸性や粘着性を示す。以上の学術的背景から、バイオフィームは壁面粗さと粘弾性の両方の性質を有していることに着目し、それらを流体力学的見地から評価し、バイオフィーム壁面を高機能化することでDR効果が得られるのではないかと考え、「バイオフィームの流体力学的評価と流動抵抗低減」という本研究課題を着想するに至った。よって、本研究課題は、研究代表者が長年にわたり取り組んできた壁面性状の高機能化と流体物性の制御による流動抵抗低減に関する両方の知見を融合・発展させたものである。

2. 研究の目的

上記研究目的を達成するため、1) バイオフィームの生物学的アプローチの実施、2) バイオフィームの流体力学的アプローチの実施、3) 流動中におけるバイオフィーム壁面の流動抵抗の測定を推進することで、バイオフィームの流動抵抗低減壁面としての可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細菌培養装置

クリーンベンチ (TY-33AD, AS ONE 製) およびインキュベータ (EI-300B, AS ONE 製) を用いて細菌を培養・繁殖させる。図1に示すクリーンベンチは上部ファンと殺菌灯により細菌の繁殖を防ぎ内部をクリーンな状態に保つ装置である。インキュベータは細菌を培養中の温度管理のための装置である。



図1 細菌培養装置. 左図: クリーンベンチ, 右図: インキュベータ

なお、細菌の培養時に用いるシャーレや復水液等の滅菌には、オートクレーブ (NCC-1701, AS ONE 製) を使用した。設定温度は 121 °C または 132 °C に、滅菌時間は 5 ~ 99 分に設定可能である。

(2) 細菌培養方法

上記(1)の培養装置を用いて細菌を培養する。本研究では、先行研究^[1]が最も多く、バイオフィームが形成しやすいとされている緑膿菌 (Pseudomonas) を液体培養した。緑膿菌は独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) から購入した。液体培養は培養に必要な栄養分を含んだ液体を用いて細菌を培養する方法である。本研究では、L-乾燥標品アンプルに入った緑膿菌を試験細菌とするため、培養液として復水液 702 ダイゴを用いた。アンプル内に 10 mL ほどの 702 ダイゴを注入し、懸濁したところで 702 ダイゴが 100 mL ほど入った三角フラスコに移し、インキュベータにより温度 35 °C で 4 日間培養した。

(3) フローセルシステム

図2に本研究で構築したフローセルシステムの概略図を示す。脈動の発生がほとんどないスムーズフローポンプ (Q-100-VE-P-S, タクミナ製) により培養液を流し、Bubble trap で空気抜きし、テストセクション内の試験片にバイオフィームを形成する。

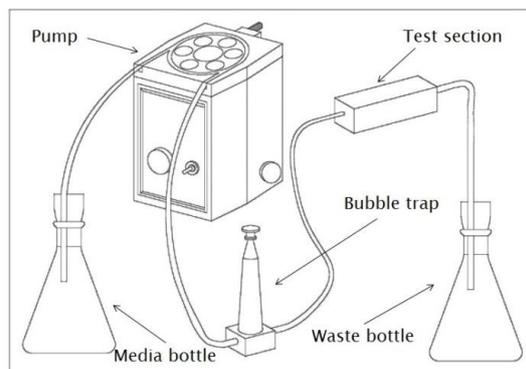


図2 実験装置の概略図

(4) スクリーニング流路

図2のテストセクションに様々な試験片(本研究では、フィルターゲージ、SS430、SPCCについて調べた)を置き、バイオフィーム形成の違いを調査した。制作したスクリーニング流路の写真を図3示す。



図3 製作したスクリーニング流路(テストセクション)

(5) バイオフィームの形成方法

(2)で作製した懸濁液を図2に示したフローセルシステムに流し、図3のテストセクション内に置かれた試験片にバイオフィームを形成する。バイオフィーム形成条件は、溶液温度を30℃、試験片をSUS430、流量を100 mL/min、形成期間を2週間とした。

(6) バイオフィームプレート作成流路

本研究では、バイオフィーム壁面による流動抵抗技術の開発を最終目的としている。そのためにバイオフィームが一様に形成されたプレートの製作が必要となる。そこで、バイオフィームプレートを作成するために使用した流路を図4に示す。テストセクション内にプレートを挿入しバイオフィームを形成させる構造となっている。



図4 バイオフィームプレート(テストプレート)形成用の流路

4. 研究成果

(1) 培養前後の溶液

図5に緑膿菌添加前の復水液を図6に緑膿菌を添加96時間経過後の培養液の写真を示す。両図の比較より、緑膿菌添加により復水液の色が懸濁したことが確認される。これは細菌が繁殖し、復水液内の細菌数が増えたためと考えられる。



図5 緑膿菌添加前の復水液



図6 緑膿菌添加96時間後の溶媒液

(2) 培養液の粘度計測

培養した溶液のせん断粘度を明らかにするため、E型粘度計(TPE-100, 東機産業製)による粘度計測を実施した。設定温度は10, 20, 30, 40℃とした。図7にせん断粘度 η_e [mPa s]とせん断速度 $\dot{\gamma}$ [s⁻¹]の関係を示す。せん断粘度はせん断速度が200 1/sより大きい領域ではほぼ一定であり、溶液温度が高くなるにつれて小さくなる。また、同じ温度の水の粘度の1.2~1.3倍大きいことが明らかになった。

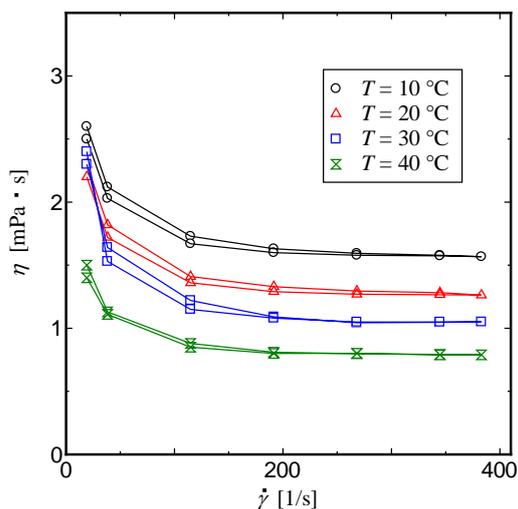


図7 培養液のせん断粘度とせん断速度の関係

(3) 光学電子顕微鏡によるバイオフィームの観察

試験片上へのバイオフィームの形成を確認するために、図8にバイオフィームの表面画像を、図9にバイオフィームにクリスタルバイオレットを10分間添加した場合の画像

を示す。撮影にはワイドレンジズームレンズ（VH-Z100R、KEYENCE 製）を用いた。図 8 の写真ではバイオフィルムの形成が分かりにくい、図 9 の写真ではクリスタルバイオレットにより細菌が染色されており、試験片上の細菌の存在を確認できる。なお、クリスタルバイオレットによる染色時間については、10、20、30 分間で調べた結果、10 分間が最適であることが確認された。

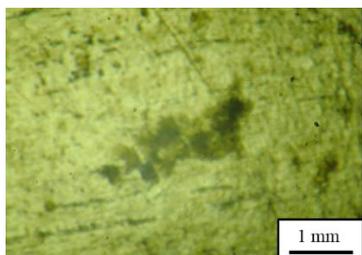


図 8 二週間後の試験片上のバイオフィルムの観察結果（倍率 300 倍）

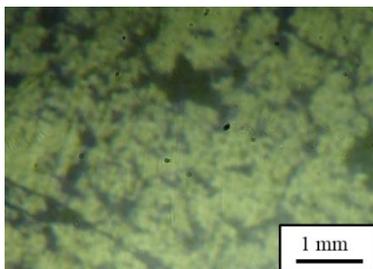


図 9 二週間後の試験片上のバイオフィルムをクリスタルバイオレットで染色した場合の観察結果（倍率 300 倍）

(2) 共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィルムの観察

図 10 に共焦点レーザー顕微鏡（OPTELCIS HYBRID C3、レーザーテック製）を用いて撮影したバイオフィルム撮影画像を示す。バイオフィルムの厚さは最大 200 μm になるとの報告例^[2]もあるが、本研究で観察されたものは最大で約 2 μm でありとても薄かった。しかし、バイオフィルムの特徴である表面の凹凸形状は観察された。

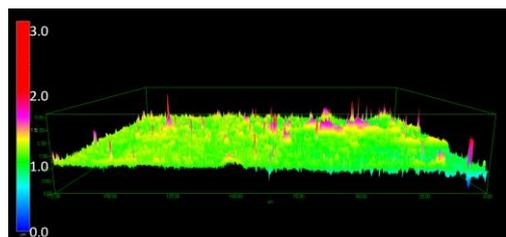


図 10 共焦点レーザー顕微鏡により撮影されたバイオフィルム

研究スタート当初は円管内部にバイオフィルムを生成することを予定していたが、バイオフィルムの生成は予想以上に時間を要し、円管内の広範囲かつ一様にバイオフィルムを生成させることが極めて困難であることが判明した。そこで、試験片を用いた計測を実施するためのスクリーニング流路を製作し、その後、矩形流路にテストプレート挿入する方法へと変更した。

なお、バイオフィルムリブレットについては本研究期間内には実施できなかった。バイオフィルムの効率的かつ大量生成手法を確立した後に実施する必要があることから、今後の研究課題とする。

<引用文献>

[1] 兼松秀行, 生貝初, 黒田大介, 平井伸充, バイオフィルムとその工業利用, 米田出版。

[2] Costerton, J. W., 他 4 名, Microbial biofilms, Annu. Rev. Microbiol., Vol. 49, 1995, pp. 711-774.

5. 主な発表論文等

〔その他〕

ホームページ等

<http://tamano.web.nitech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉野 真司 (TAMANO, Shinji)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：40345947