

VII-56

生物膜内の微粒子の挙動に関する基礎的研究

北海道大学工学部 正○岡部 聡、正 渡辺 義公
日本上下水道設計（株）正 安田 岳雄

1. はじめに

溶存基質の生物膜への輸送機構については、各種微小電極等を用いて多くの研究成果が報告されている。しかしながら、微粒子の生物膜表面への吸着、取り込み（浸透）、及びその後の吐き出しのメカニズムに関してはほとんど知見が得られていない。これら微粒子の生物膜との関係を明らかにすることは、生物膜内のポピュレーションダイナミクスを解析するうえで重要な要因となる。例えば、新たに付着した細菌（侵入菌）によって既存の優占種が置換されるという現象も考えられる。そこで本研究では、菌体計測の手間や不確実性を考慮に入れるため、ある特定の微生物の挙動を対象とせず、 $1\mu\text{m}$ のラテックスビーズをトレーサーとして用い、生物膜内の挙動を追跡した。また既存の生物膜モデル(BIOSIM)¹⁾を用いたシミュレーション結果と比較検討した。

2. 実験装置と方法

生物膜は、札幌市創成川下水処理場最初沈澱池流出水を用いて半水没型回転円板装置で馴養した。円板回転速度=14rpm、反応槽体積=1.4L、生物膜表面積=2830cm²である。実験は生物膜が $40\mu\text{m}$ 及び $360\mu\text{m}$ に達した時点で、流入及び流出水を止めトレーサービーズを反応槽内に添加し、24時間馴養した。その後生物膜内に取り込まれなかったビーズを排除し再び連続運転を開始した。生物膜深さ方向のビーズ及び全細菌密度分布の経時変化を測定した。測定は採取した生物膜をマイクロスライサーにより膜深さ方向にスライスし、スライスした生物膜断片をホモジナイズし全細菌数及びビーズの測定に供した。全細菌数はアクリジンオレンジで染色し、ビーズは無染色で直接蛍光顕微鏡で計数した。本研究で用いた蛍光マイクロビーズ(No. 15702, Polysciences)は平均直径 $1\mu\text{m}$ 、比重は1.05、表面は負の電荷を帯びている。マイクロビーズはその蛍光色が衰退することなく、微生物に対して毒性を持たない。また蛍光顕微鏡を用いることにより微生物や他の物質と容易に区別が可能である。生物膜の構造は共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡(Carl Zeiss LSM-310、アルゴンレーザ 488nm & 514nm) (CSLM)を用いて3次元的に観察した。生物膜試料は0.02%のアクリジンオレンジ溶液で染色後、0.1%のアーガロース(Agarose 1600, 和光純薬(株))で固定した。

3. 実験結果と考察

図1には生物膜が $360\mu\text{m}$ の時点でトレーサービーズを添加した場合のビーズの侵入の様子を示した。ビーズ添加23分後には既にビーズは膜の最深部まで到達していた。時間の経過とともに徐々に膜表面のビーズ密度が増加し、90分後にはほぼ平衡密度に達した。この非常に素早いビーズの侵入はビーズの分子拡散のみでは説明がつかず、生物膜内に水路や間隙が存在し移流によって輸送されたと考えられる。図2に示すようにCSLMによる観察でも膜深さ方向に直径 $100\mu\text{m}$ 以上の水路（または空隙）が見られ、生物膜は均一な連続体ではないことが示唆された。生物膜は支持体に様に付着しておらず、底層部でも水路や空隙が存在していた。また生物膜表面は凹凸が顕著であった。24時間後、再び流入を開始し微生物の増殖に起因する取り込んだビーズの膜表面への押し出しの様子を図3に示した。膜表面から約 $100\mu\text{m}$ でビーズ密度は徐々に減少し、30日後には密度勾配がゼロとなった。図4は生物膜厚が $40\mu\text{m}$ の時点でビーズを添加した場合の生物膜内のビーズの挙動である。支持体近傍のビーズ密度は時間と共に減少し、密度勾配は徐々に緩やかになった。生物膜によるビーズの取り込はうまくシミュレーションでは表現できなかったが、吐き出し現象のシミュレーション結果を図5に示す。このシミュレーションでは図3における24時間後のビーズ分布を初期分布として用いた。生物膜内の細菌密度が時

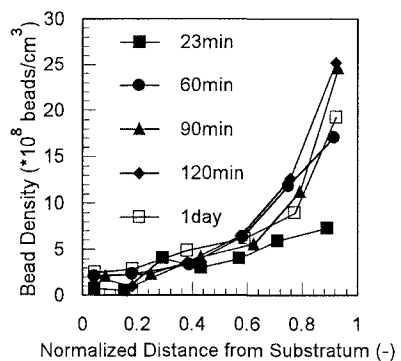


図1 生物膜へのビーズの侵入
($360\mu\text{m}$ 時点でビーズ添加)

間的にも空間的にも比較的一定であったため、多少のずれは見られるもののビーズの挙動をある程度表現できたと思われる。一方、成長期にある生物膜の場合は細菌密度が時間の経過と共に、特に支持体近傍で増加するため、シュミレーションでは実験結果よりも著しく早く支持体近傍のビーズ密度が減少する結果となった(図6)。すなわちモデルでは細菌密度は一定とし、微生物の増殖により生物膜の体積が膜表面方向にのみに膨張すると仮定されているが、実際には細菌密度は3次的に増加するため膜表面方向にビーズを押し出す速度は遅くなる。また生物膜は主に膜表面及び液本体に接する水路の外周などから成長していくと考えられる。

4. まとめ

- (1) 生物膜内のポピュレーションダイナミクスは、生物膜の構造及び成長過程に大きく影響される。
- (2) 既存の一次元生物膜Modelは、生物膜リアクターの処理特性を十分に表現することはできるが、ポピュレーションダイナミクスを表現するには不十分である。【参考文献】

¹⁾ Wanner, O., and Gujer, W. 1986 A multispecies biofilm model. *Biotechnol. Bioeng.*, 28:314-328.

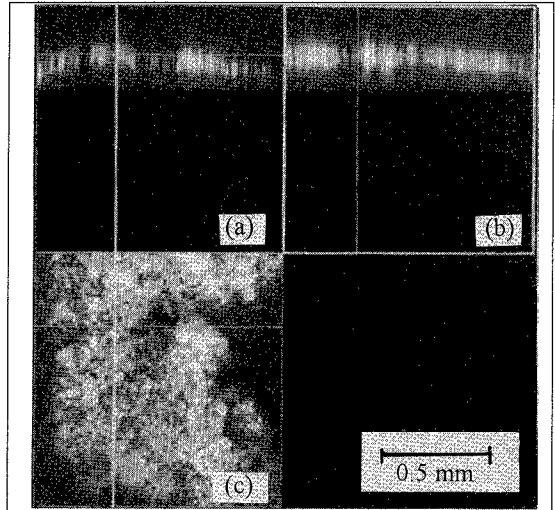


図2 CSLMによる生物膜の構造、(a) x-z断面、(b) y-z断面、(c) x-y断面(z=80μm)。白色の部分が生物膜を示す。x-z、y-z断面からz軸方向の生物膜及び水路の配列が見られる。

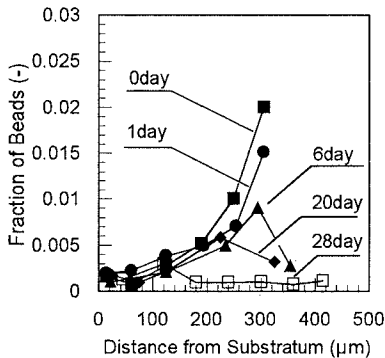


図3 生物膜からビーズの吐き出し (360μm時点でビーズ添加)

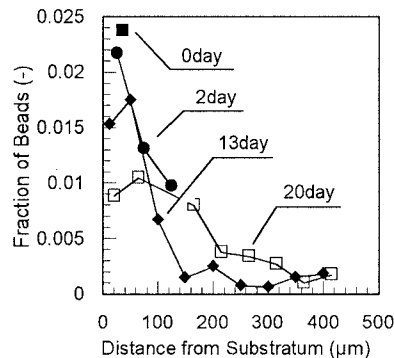


図4 生物膜からビーズの吐き出し (40μm時点でビーズ添加)

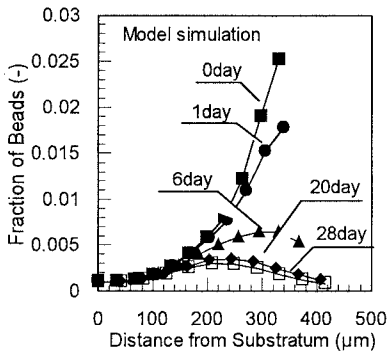


図5 Modelによるビーズの吐き出しシュミレーション (360μm時点でビーズ添加)

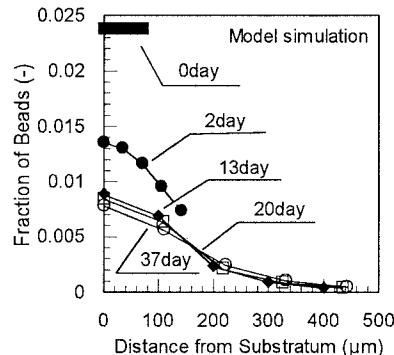


図6 Modelによるビーズの吐き出しシュミレーション (40μm時点でビーズ添加)