

Ⅶ-165

初期生物膜形成時における流速の生物膜構造に及ぼす影響

北海道大学大学院 正○岡部 聡、佐藤 久、渡辺 義公
北海道庁 尾原 裕昌

1.はじめに

生物膜はフラットな連続体ではなく、微生物のクラスターや間隙から構成される非常にporousで複雑な構造を有している¹⁾。それ故に生物膜内で水流が存在し液本体から生物膜への物質輸送を促進していると考えられている。例えばdeBeerら²⁾によると生物膜への溶存酸素の輸送の約50%は間隙を介して移流によって輸送されたと結論づけている。このように、生物膜への物質輸送は、微生物の表面形状や間隙等に代表される内部構造に強く影響される。従って生物膜の構造はその機能と密接に関係しており、生物膜の機能を把握し強化するためには、生物膜の構造を定量化する必要がある。生物膜への物質輸送や拡散係数の解析には、生物膜はフラットな連続体と仮定した従来のモデルではなく、不均一さを考慮した新たなモデルが必要となる。しかしながら、不均一な生物膜構造の形成課程やその影響因子に関する知見は未だ皆無である。そこで本研究では、初期生物膜形成時における流速のその構造に与える影響を実験的に検討した。生物膜の構造を3次元的に観察するために、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡（CSLM）を用いた。

2.実験方法

図1に実験装置を示す。この実験装置にホモジナイズした活性汚泥を種汚泥として植種し、6時間のバッチ運転の後、人工基質の投与とともに連続運転を行った。各実験においてポンプの流量を変化させることにより流速を変化させた。cyclone air-liquid separatorでは、人工基質の投与、曝気、攪拌、排水を行う。Flow cellは生物膜を共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡下で直接観察可能な様に、上下両面がカバーガラスで覆われている。馴養期間中、光学顕微鏡により生物膜の成長過程を観察すると同時に、視野内のコロニー数を測定した。一定期間（48時間）馴養した後、生物膜を共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡により観察し、得られた画像について画像解析を行った。共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡による観察は、FITC(0.1 mM、pH<4.0)溶液で槽内を置換し、positive stainingする事によって行った。また、流速が生物膜内への物質輸送に与える影響を評価するために溶存酸素濃度を例として、生物膜中の溶存酸素濃度を、流速を変化させて微小電極を用いて測定した。

3.実験結果と考察

流入人工基質(DOC=20mg/L)を用いて流速を変えて(0.4cm/s,14.6cm/s)馴養した生物膜の構造を、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて観察した画

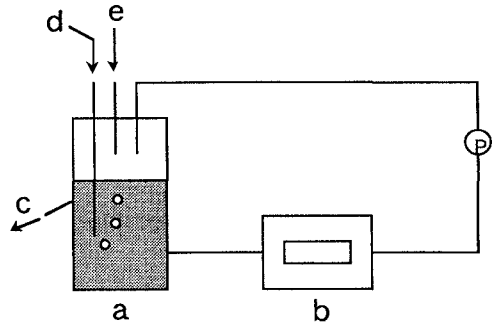


図1 実験装置。a; cyclone air-liquid separator b; flow cell c; 排水 d; エアレーション e; 人工基質 p; ポンプ

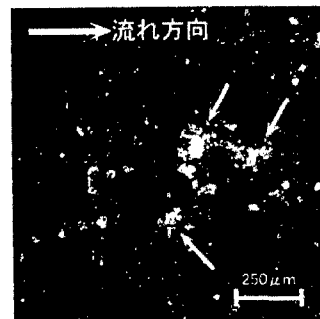


図2a 生物膜の水平断面画像。流速=0.4cm/s.

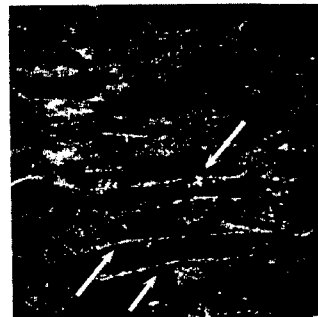


図2b 生物膜の水平断面画像。流速=14.6cm/s.

キーワード：生物膜の構造、bulk流速、微小電極、2-DDO濃度分布

連絡先：060 札幌市北区北13条西8、北海道大学大学院工学研究科都市環境工学専攻、tel&fax：011-706-6267

像を図2a、図2bに示す。図2aでは柱状及び球状のコロニー（矢印部）が様に点在していたのに対し、図2bでは微生物がガラス表面に密に付着し、それを基盤に流速が速い場合、流れ方向に細長い流線型のコロニー（矢印部）がある間隔で形成した。図3にコロニー数の経時変化を示す。人工基質投与開始までの6時間、コロニー数は時間の経過とともに増加した。この期間は、活性汚泥によるバッチ運転のためコロニー数の増加は活性汚泥の付着に由来し、コロニーは茶褐色を呈しており、水の流れに伴う乱流によって振動していた。しかし、人工基質投与開始後コロニー数は減少した。これは人工基質投与によって循環水中の活性汚泥（微生物）濃度が減少し、生物膜の脱離速度が、付着速度を上回ったためと思われる。循環水中の微生物濃度の上昇とともにコロニー数も増加し始め、コロニーの大型化も促進された。この時期に形成されるコロニーは茶褐色ではなく微生物の増殖に由来する白色のコロニーであった。馴養開始から約24時間後のコロニー数の減少は、生物膜の剥離によるものではなく、大型化したコロニーが隣り合うコロニーと結合したためである。次に、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡で観察した画像中にしめる微生物（コロニー）の面積割合を、画像解析により求めた結果を図4に示す。この図から明らかなように、流速の増加とともに、付着する微生物量が増加する事が確認できた。流速が生物膜内への溶存基質のフラックスに与える影響を明らかにするために、二次元の溶存酸素濃度分布を異なるbulk流速で測定した（図5a、5b）。流速が0.5cm/sでは、膜表面から2000 μ m程度から徐々にDO濃度が減少し始め、生物膜表面では1 $\sim$ 2mg/Lであった。等DO線の間隔は広く、支持対に対して平行となるようになった。流速が5cm/sでは、等DO線は間隔（拡散層厚）が狭く、生物膜の表面形状に沿うようになり、生物膜へのフラックスは支持対に垂直ではなく、生物膜表面に対して垂直となる。生物膜表面のDO濃度は5 $\sim$ 6mg/L程度であり、流速の増加により、生物膜内へのDOフラックスが促進されたことが示唆された。

4. 結論

以上の結果から、生物膜の構造は基質獲得及び代謝物排除が最も効率よく行えるように、適当な大きさの微生物クラスターの周りを水路や間隔ははりめぐり、液本体と生物膜を連結している。また、液本体流速の増加に対応しクラスターの形状は流線形となり、構造的に最も安定した構造を形成する。これらの構造が普遍的に見られるのか、また構造を決定する環境因子を特定することは、生物膜を制御する上で非常に重要である。

5. 参考文献

- 1) 黒田他、生物膜の物理的構造と懸濁微粒子の輸送に関する研究、第31回日本水環境学会年會講演集Pp.134.
- 2) deBeer et al., Liquid flow in heterogeneous biofilms, *Biotechnol. Bioeng.* 44 (5), 636-641.

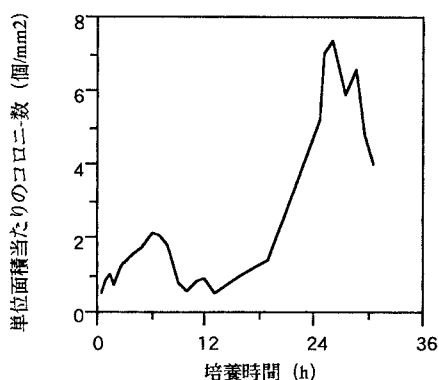


図3 コロニー数の経時変化。流速=4.4cm/s.

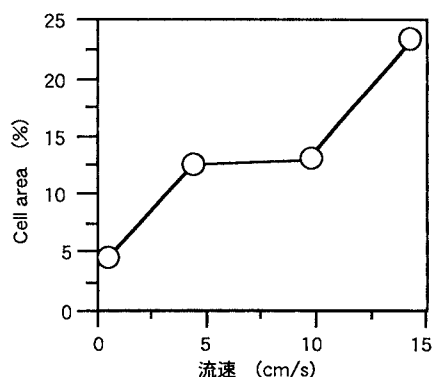


図4 流速とcell areaの関係.

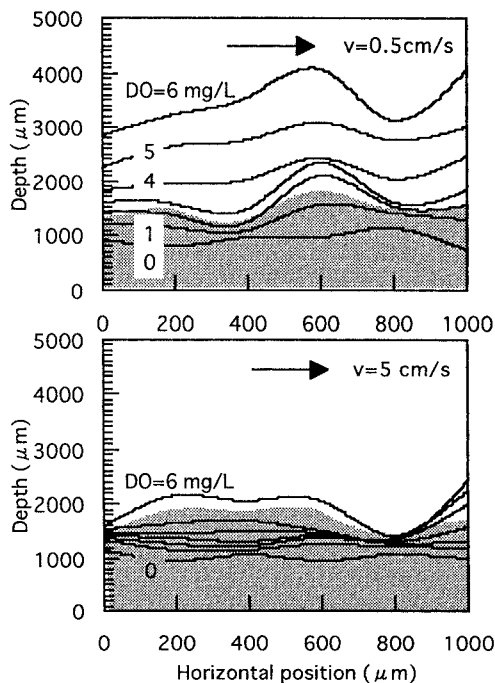


図5 2-DDO濃度分布流速 (a); 0.5 (b); 5.0 cm/s.