

Ⅶ-79

共焦点レーザー顕微鏡を用いた生物膜の構造解析と膜内流速分布の測定

北海道大学大学院 正 岡部 聡、渡辺 義公
北海道庁 川村 美穂

1. はじめに

共焦点レーザー顕微鏡を用いた生物膜の三次元構造解析の結果、生物膜は微生物集塊と間隙（水路）等から構成される複雑な不均一構造を有することが明らかとなった。このような生物膜の構造は、生物膜への物質輸送及び基質消費特性に大きく影響を及ぼすと考えられる。従って、生物膜の機能を正確に把握し強化するためには、生物膜を微生物が均一に分布するフラットな連続体の膜と仮定した従来の生物膜モデルではなく、生物膜の構造を考慮した新たなモデルが必要となる。そこで本研究では、生物膜内部及び表層近傍の流体運動と生物膜構造の関係を明らかにすることを目的とし、共焦点レーザー走査型顕微鏡(CSLM)を用いたパーティクル・トラッキング法により、膜深さ方向の流速分布と生物膜構造の同時測定を行った。

2. 実験方法

実験はCSLMのステージに載せ直接観察が可能なように、上下両面をカバーガラスで貼ったフローセル(30×40×5、流路:3×30×5[mm])を用いた(Fig. 1を参照)。生物膜は、ホモジナイズした活性汚泥を接種源とし3-6時間の回分運転の後、人工基質による連続運転を行い馴養した。馴養期間中のフローセル内の平均流速は5 cm/sとした。一定期間（約48時間）馴養した後、フローセル内に粒径1.0 μm の蛍光ラテックスマイクロビーズ(FITCを含む)を注入し、生物膜内におけるビーズの動きを倒立型CSLM(Carl Zeiss 510、アルゴンレーザー 488nm、対物レンズ×10)を用いて追跡した。フローセルの流入、流出口付近にはデッドスペースや乱れが生じるため、観察は流れが均一となるカバーガラス中央部に付着した生物膜を対象とした。フローセル下面のカバーガラスに付着した生物膜の任意深さにおける水平断面を一定のスキャンスピード(0.26-1.5s)で連続してスキャンし、得られた5-10枚の画像を重ね合わせ、ビーズの軌跡より移動距離を測定しスキャンスピードで除して流速を求めた。同様の操作を膜深さ方向に20 μm 間隔で行い流速分布を求めた。また、フローセル内の平均流速はフローセルの流出部からの流量を実測し、フローセルの断面積で除することにより求めた。生物膜の間隙率はCSLMで得られた画像より、バイオマス以外の面積を画像解析ソフトにより検出し、全画像面積に占める割合を間隙率と定義した。

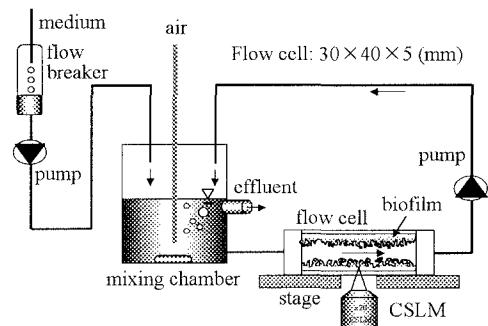


Figure 1. The schematic diagram of experimental setup.

3. 実験結果と考察

最初に生物膜の付着していないフローセル内の上下スライドガラス間の流速分布を測定した。フローセル内の平均流速が今回設定した範囲内(860-1400 $\mu\text{m/s}$)では、フローセル内のビーズは流れ方向に一樣に直線的に移動しており、流れは層流であることが確認された。Fig. 2に示すように、上下スライドガラス間の流速分布は放物線を示した。CSLMを用いたパーティクルトラッキング法による流速測定の限界は、対物レンズ(×10)を用いた場合スキャン範囲(xy断面)が510×510 μm であり、最速のスキャンスピードが0.26sであることより、限界流速は1960 $\mu\text{m/s}$ である。次に生物膜が付着したフローセルを用いて生物膜内部及び表面近傍の流体の動きを観察した。Fig. 3(A)にはフローセル内平均流速 $v=1400 \mu\text{m/s}$ 、カバーガラス表面から160 μm 地点の水路側面に付

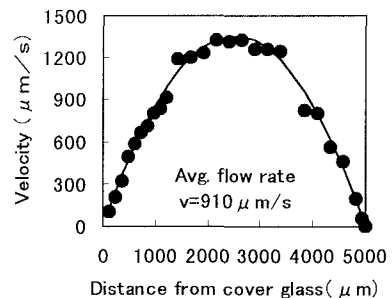


Figure 2. A velocity profile at an average flow rate of 910 $\mu\text{m/s}$ without biofilm.

キーワード：生物膜、共焦点レーザー顕微鏡、生物膜内の流速分布

連絡先：〒060-0813 札幌市北区北13条西8丁目 北海道大学大学院工学研究科、Tel&Fax:011-706-6267

着した生物膜の垂直断面像である。図中の白い部分はバイオマス部、黒い部分は間隙部である。連続して5回スキャン（0.82s）を行い、重ね合わせた像であり、点線のように見えるのはビーズの動きを示している。この図から明らかなように、生物膜表面近傍の流速は液本体より遅く、膜の表面形状に沿ってビーズが動いている様子が解る。Fig. 3(B)は同条件（但しスキャン:10回）で、カバーガラスから100 μm 地点の水平断面におけるビーズの動きを示している。Fig. 3(B)に示すように、生物膜はバイオマスと間隙から構成される不均一な構造体であり、ビーズはバイオマス集塊を縫うように間隙部をバイオマスに沿って流れていた。間隙を縫って流れるため、液本体の流れに対し垂直方向の流れや渦流も局所で観察された。バイオマス近傍の流速は間隙中央部に比べ一段と遅かった。また、スキャン中にビーズが焦点面から上下いずれかの方向に逸脱するため、連続したビーズの軌跡が得られない箇所が存在した。これは、鉛直方向の流れや乱れ等が存在すること示している。同一条件、同一平面上で数回測定を行い、ビーズの挙動に顕著な違いは見られなかったことから、生物膜内の水流は再現性の高いある一定のパターンを持つことが示唆された。

生物膜底部（ガラス表面から20 μm ）では、流動するビーズはごく僅かでありその流速も小さかった。しかし底層から表層に向かうにつれて、液本体の流向と一致する流れが卓越するようになり、その流速も徐々に増加した。生物膜表層に近づくに従って、連続して観察できるビーズが減少し、生物膜表面近傍ではビーズをトラッキングすることが非常に困難な領域が存在した。これは、この領域で流れが存在しないということではなく、液本体は層流である場合でも膜表面の凹凸等による乱れが生じ、3次元的な複雑な流れが存在していると考えられる。この現象は生物膜への物質輸送に大きく影響を及ぼしているものと推察される。

Fig. 4には生物膜内の流速分布と間隙率の関係を示す。間隙率はガラス表面から約50 μm 付近で最小値0.1となり、この地点を境に膜表層に向かって急激に増加した。底層では流速はほとんど存在しないが、ガラス表面から約100 μm 付近から表層に向かって徐々に増加しはじめ、膜外で急激に増加した。また、底層から表層へいくに従い測定値のばらつきが大きくなる傾向が認められた。異なる液本体平均流速において測定した生物膜内の間隙率と流速分布の関係をFig. 5に示す。液本体流速を890 $\mu\text{m/s}$ から2230 $\mu\text{m/s}$ まで変化させても、生物膜内の流速分布にはさほど大きな変化は見られず、間隙率とより密接な関係があることが明らかとなった。このことは、間隙部の断面積が大きいほど液本体からの水流が生物膜内に侵入し易くなる、つまり、液本体の流速以上に生物膜の内部構造が物質輸送に大きく影響を与えることを示唆している。

4. 結論

本研究で得られた結果をまとめると、(1)生物膜内にはバイオマス（微生物の集塊）の形状に沿う水流が存在する、(2)生物膜内の流速分布は生物膜の間隙率に依存すると考えられる。以上の結果より、生物膜への物質輸送は分子拡散のみではなく移流によって促進されるものと推察される。

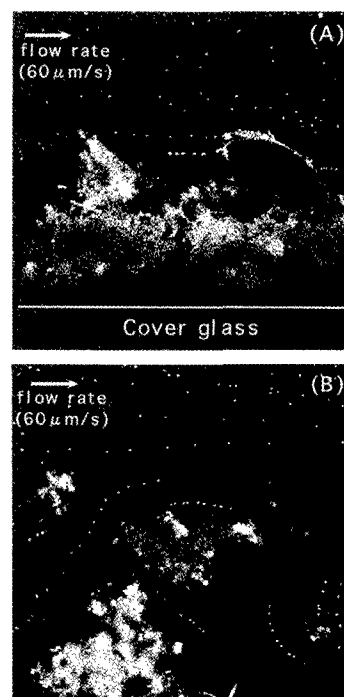


Figure 3. Time sequence images showing bead movement in vertical section (A) and in a horizontal section (B).

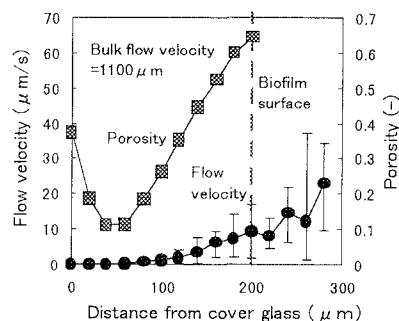


Figure 4. Velocity and porosity profiles within the biofilm

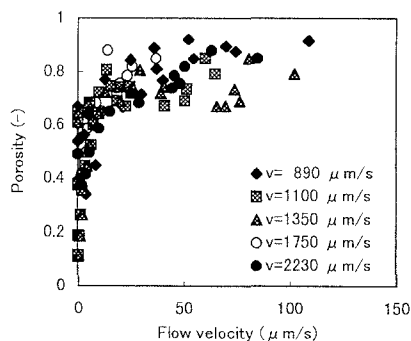


Figure 5. Relationship between velocity and porosity within the biofilm at various bulk flow rates.