

VII-216

生物膜内への懸濁微粒子の輸送に与える生物膜構造の影響

北海道大学大学院 正〇岡部 聡、フェロー 渡辺 義公
(株)日水コン 前嶋 恵、川崎重工(株) 黒田 浩史

1. はじめに 生物膜内で生じる生物学的反応は、微生物固有の動力学的特性と生物膜内への物質輸送により決定される。既往の一次元生物膜モデルでは、拡散層内及び生物膜内での物質輸送は、分子拡散のみに依存すると仮定されているため、生物膜は均一でフラットな連続体として取り扱われてきた。しかしながら、近年、生物膜は個別のマイクロコロニーから成る非常に多孔質な構造を有しており、コロニー間に存在する水路が物質輸送に大きく関与していることが明らかにされつつある。生物膜への、又は生物膜内での物質輸送は、表面形状や水路に代表される生物膜構造に大きく左右される。生物膜内での溶存基質の挙動に関しては、各種微小電極を駆使して検討されてきたが、これらの研究には生物膜の構造は考慮されていない。更に、懸濁性有機物の付着・分解プロセス、及び生物膜内のポピュレーションダイナミクスを解析する上で重要となる、懸濁性微粒子の生物膜内での挙動(付着・剥離・輸送)に関する研究は皆無である。そこで本研究では都市下水生物膜を対象とし、膜深さ方向の空隙率(固相:液相比)分布の経日変化を測定した。同時に蛍光ラテックスビーズをトレーサーとして用い、膜内への侵入及びその後の挙動を追跡した。更に、膜内の空隙率分布を考慮した一次元生物膜モデル(AQUASIM 1.0)³⁾を用いて、膜深さ方向のビーズ密度分布の変化をシミュレーションし、実験結果と比較することにより懸濁微粒子の挙動に与える生物膜内部構造の影響を検討した。

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殿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。実験は生物膜厚が定常に達した時点で、流入及び流出水を止め、2%蛍光ビーズ溶液を反応槽内に直接添加し、5~6時間生物膜内にビーズを取り込ませた。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、生物膜深さ方向のビーズ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、蛍光ビーズを直接蛍光顕微鏡で計数した。本研究でトレーサーとして用いた蛍光マイクロビーズ(Polysciences)は、直径0.5,1.0,4.5,10μm、比重は1.05、表面は負の電荷を帯びている。空隙率分布は、付着生物膜を支持体ごと OCT-compoundで包埋し凍結後、cryostat (Reichert-Jung, Lica)を用いて支持体に対し水平方向に、30~40μmに切片化しスライドガラスに貼り付けた。風乾後、各深さごとに10枚の切片を任意に選択し、CCDカメラ(対物レンズ5倍)を用い画像を取り込み、画像解析ソフト(Quantimet 500+, Leica)を用いて、一定視野内のバイオマス表面積を検出し、全視野面積に対するバイオマス表面積の比を空隙率として求めた。顕微鏡観察時の照度および画像解析時の検出色相値等、条件を全て統一した。

モデルシミュレーション:一次元生物膜モデル(AQUASIM ver 1.0)³⁾を用い、空隙率の膜深さ方向分布を考慮した場合について、膜内のビーズ密度分布の変化をシミュレーションした。生物膜の剥離速度に関する定量的な実験データが存在しないので、実測の生物膜厚の増殖カーブにフィットするように剥離速度をキャリブレーションした。

3. 実験結果と考察 空隙率の膜深さ方向分布の経日変化を Fig.1 に示す。生物膜厚は約400μmであり、膜底部部と表層部の空隙率が約0.7であり、中層部において空隙率が最小となる結果であった。この結果は、一般的に観察される表層部から底部部へ徐々に密になる安定した生物膜構造とは異なっていた。この空隙率の測定から約一週間後に殆どの生物膜が剥離したことから、本構造は水理学的に安定でなく未期的な生物膜であったと推察される。このデータにカーブフィットさせ、空隙率分布を支持体からの距離の関数 $\varepsilon_z = 0.7 - 1.1863(z/L_f)^3 + 2.915(z/L_f)^2 - 1.629(z/L_f)$ として表現した。ここで、 ε_z =空隙率、 z =支持体からの距離(m)、 L_f =生物膜厚(m)である。Fig.2 には、膜厚約640μmの定常期に達した回転している生物膜と静止状態の生物膜に、直径1.0μmのビーズを取り込ませた時の膜深さ方向のビーズ密度分布の経時変化を示す。各系におけるビーズの侵入の違いを明確にするために、生物膜中のビーズ密度は液本体中のビーズ濃度に対する比で示した。Fig.2 から明らかのように、回転している生物膜では、ビーズ添加5分後には既に、液本体ビーズ濃度の約20倍のビーズが膜底部にまで侵入した(Fig.2A)。約4.5時間後には、膜表層の密度は液本体濃度の約800倍となり、膜底部から表面に増加するビーズ

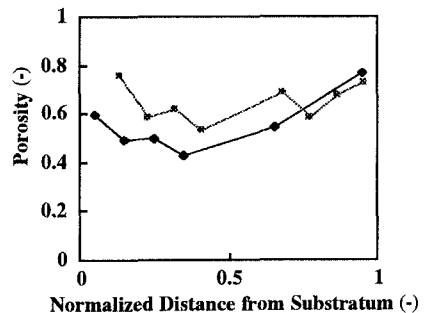


Figure 1. Spatial distribution of porosity in biofilms

キーワード: 生物膜構造、懸濁微粒子の輸送、蛍光ビーズ、一次元生物膜モデル

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都市環境工学専攻 Tel&Fax: 011-706-6267

密度分布を形成した。直径 $10\mu\text{m}$ のビーズを用いた場合も、同様に迅速なビーズの輸送が確認されたことより、ビーズは生物膜内の間隙を水流によって輸送されたものと推察される。一方、静止状態の生物膜では、最も付着した膜表面でさえ液体本体濃度の数倍程度であり、膜深部には殆ど侵入していなかった (Fig.2B)。以上のことより、生物膜の回転によって膜内部の間隙(液相部)に水流が発生しており、膜内への物質輸送を支配していると考えられる。

ビーズ添加後、5~6 時間バッチ運転でビーズを生物膜に取り込ませた後、再び連続運転を開始し生物膜内に取り込まれたビーズの膜内での挙動を追跡した (Fig.3)。生物膜構造が不均一であるためデータに多少のばらつきがあるものの、時間の経過と共に膜表層部のビーズ密度が徐々に減少し、12 日後には密度勾配がフラットとなった。底層部のビーズ密度分布にはあまり変化が見られなかった。同様の傾向は、異なる粒径のビーズ、生物膜を用いた場合でも観察され、本実験の再現性は高いと思われる。

次に、一次元生物膜モデル(AQUASIM ver 1.0)を用いて生物膜内ビーズ密度分布の経時変化をシミュレーションし、実験結果と比較検討した (Figs.4A and 4B)。Fig.4A には空隙率を膜深さ方向に一定 ($\varepsilon = 0.58$) とした場合(従来のモデル)、Fig.4B には実測した膜内の空隙率分布を用いた場合のシミュレーション結果を示す。空隙率を一定にした場合は、特に、膜表層における固相比を過大評価しているため、ビーズの押し出し速度、すなわち剥離速度を過小評価する結果となり、実験結果に比べ膜表層におけるビーズの減少速度が遅く(言換えれば滞留時間が長く)なっている。これに対し、実測の空隙率分布を用いた場合では、一定とした場合に比べ、表層におけるビーズの減少が早くなったうえ、表層のみでなく膜中層におけるビーズの減少が再現され、より実験結果に近い結果となった。しかしながら、Fig.2 から明らかなように、実際の生物膜内では水流が存在し、ビーズの剥離や剥離したビーズの移動・再付着が生じているものと推察される。また、生物膜へのビーズの侵入現象については、現在のところシミュレーションで再現することが困難であり、生物膜内に生じる水流のビーズの挙動に与える影響をいかにモデルに反映させるか現在検討中である。

4. まとめ 本研究に用いた都市下水生物膜は、微生物が集塊した固相部とそれを取り囲む間隙部(液相部)から成り、非常に多孔質な構造を有していた。そのため、生物膜内への懸濁微粒子の輸送は、間隙部の水流に支配されていることが明らかとなった。従って、生物膜内の空隙率分布を考慮した生物膜モデルによって、膜内に抑留されたビーズの挙動をより上手く再現できた。

【参考文献】1) Reichert, P. (1994) AQUASIM—A tool for simulation and data analysis of aquatic systems, *Water Sci. Tech.*, **30**(2), 21-30.

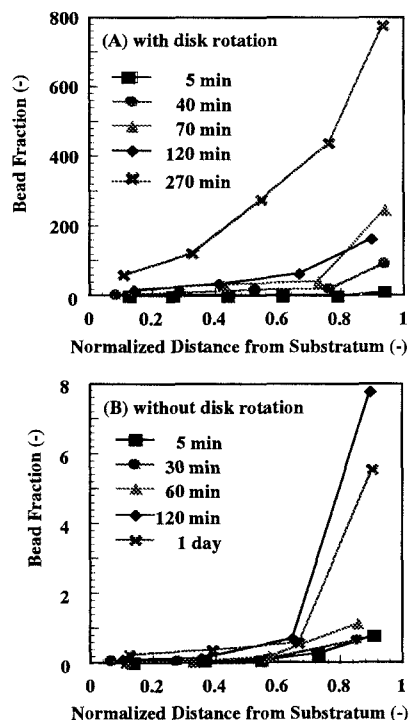


Figure 2. $1.0\mu\text{m}$ bead penetration into the biofilm

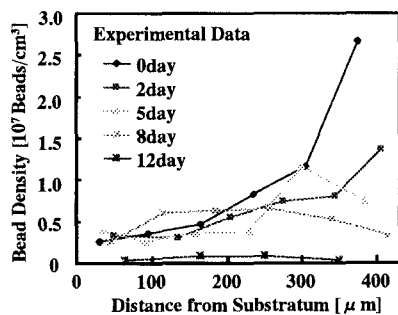


Figure 3. Bead detachment from the biofilm

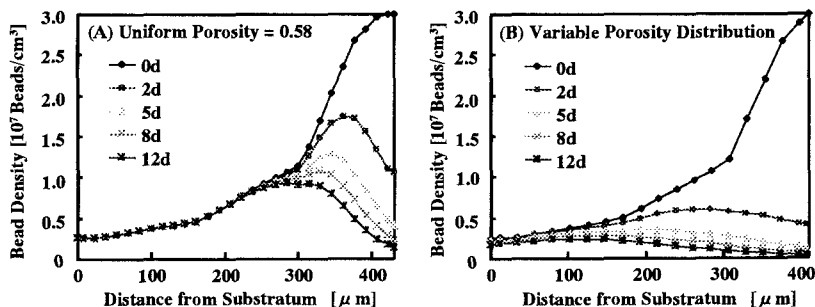


Figure 4. Model simulations of the spatial distribution of tracer beads within the biofilm