

(22) 生物膜の生長過程と剥離に関する実験的研究

EVALUATION OF BIOFILM DEVELOPMENT AND DETACHMENT IN WATER AND WASTEWATER TREATMENT REACTOR

大橋 晶良*, 原田 秀樹**, 桃井 清至**
Akiyoshi OHASHI*, Hideki HARADA**, Kiyoshi MOMONOI**

ABSTRACT ; For rational design and operation of biofilm reactor for treatment of water and wastewater it is necessary to clarify the mechanism of biofilm formation and detachment and to estimate biomass hold-up retained within the reactor. In this study a relationship between the adhesive strength of cells, the biofilm detachment rate and the content of extracellular biopolymer was quantified to investigate what factors govern the phenomenon of biofilm detachment. Experimental biofilm which consisted of denitrifying microorganisms were established on inner surface of tubes. The critical value as Bingham fluid for biofilm which corresponds to adhesive strength between cells was much higher than fluid shear stress acting on biofilm surface. Therefore not only extrinsic factors like fluid shear stress but also intrinsic factors of biofilm physiological conditions may take a important role in biofilm mechanical structure and detachment. The high correlation between biofilm loss rate and biofilm mass per unit area was observed. With an increase in biofilm mass per unit area, the content of extracellular biopolymer decreased, whereas gas content within biofilm increased. The magnitude of biofilm detachment seemed to be attributable to the content of extracellular biopolymer and gas production.

KEYWORDS ; biofilm reactor, water and wastewater treatment, extracellular biopolymer, biofilm development and detachment, adhesive strength

1. はじめに

支持体に付着・増殖した微生物スライムや付着担体なしに凝集・集塊機能によって形成される粒状汚泥と云った、いわゆる生物膜を利用した生物学的下水処理装置は、反応器内に高濃度の微生物を保持できる等、浮遊型の処理装置に比較して際立った特長を有している。このため、生物膜法に関する研究の開発動向は近年著しく、好気性、嫌気性、硝化・脱窒処理など、その応用範囲は拡大されている。

生物膜下水処理装置の処理性能を評価するための基質除去機構のモデル化に関する研究は古く、そのモデルの大半は基質の生物膜内への分子拡散と細菌による生化学反応とを基本にしている¹⁾。モデル中の重要なパラメーターである生物膜量(生物膜厚さ、膜乾燥密度)は変化せず一定とした、定常状態を仮定してモデルの解析が行われているのが大部分である。しかしながら、生物膜の自己増殖と死滅に加え剥離現象によって、生物膜厚さ・膜乾燥密度は複雑な挙動をする。従って、処理性能を予測・評価し合理的な設計・操作方法を確立するためには、長期的な生物膜量の挙動を把握する必要がある。特に生物膜の形成機構および剥離・脱落現象の解明が必要であるが、これらの基礎的な知見は十分とは言えない^{2,3)}。

付着用支持体に形成される生物膜において、生物膜量評価に関する問題点は、1)生物膜初期形成過程、2)非定常状態での生物膜構造と剥離量および3)基質が支持体表面上まで拡散浸透しない場合の支持体から生物

* 呉工業高等専門学校土木工学科 (Dept. of Civil Eng., Kure National College of Technology)

** 長岡技術科学大学建設系 (Dept. of Civil Eng., Technological University of Nagaoka)

膜が剥がれ落ちる脱離現象、の把握が主なものとして挙げられる。生物膜初期形成速度は、支持体の表面特性、すなわち、表面の粗さ^{3,4)}・表面張力^{3,5-7)}と細菌の表面張力^{6,7)}・細胞外粘質物⁷⁻⁹⁾などの相互作用として検討されているが、解明されるまでに至っていない。剥離に関しては、生物膜表面に作用するせん断応力と剥離量の関係について若干研究されているものの、せん断応力が弱くても剥離現象が見られるような場合については、ほとんど言及されていない¹⁰⁻¹⁴⁾。

本研究では、支持体表面と細菌との付着および脱離現象については言及せず、生物膜内細胞間の付着と剥離について検討する。まず、生物膜生長に伴う膜構造（生物膜厚さ、膜乾燥密度、ガス含有量、膜表面の粗さ）の変化、細胞外ポリマー含有量および生物膜内の付着力の推移を把握し、剥離生物量との関連性を考察する。さらに、剥離に及ぼす因子を抽出し、生物膜の生長と剥離現象の解明を試みる。なお、実験は脱窒菌の生物膜について、基質濃度を高くし、基質が支持体表面上にも十分あるような完全浸透状態で行った。

2. 実験

2.1 実験装置および方法

実験装置の概略を Fig.1 に示す。支持体として長さ 1 m のチューブを用い、これを連続に 10~12 本連結してある。各チューブは曲がらないように、チューブの外径と同じ内径のアクリル管で覆ってある。チューブ内の液流量は、基質タンクと循環タンクからポンプによって連続的に流下している。実験は、Table 1 に示してある 4 系列の条件で行った。RUN 1 は、生物膜表面の粗さを測定する系で、RUN 2, 3, 4 は流速と付着面積の違いによる生物膜の構造変化を調べる系として行った。各 RUN とも、基質は水素受容体として硝酸ナトリウム、水素供与体としてメタノールと無機塩類から構成

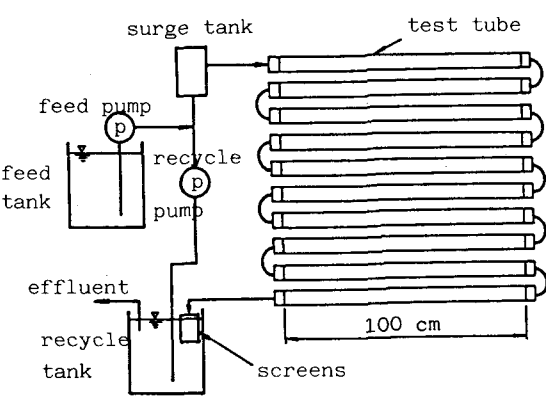


Fig.1 Schematic diagram of the tubular reactor with effluent recycle.

されている人工下水で、リン酸緩衝液(イオン濃度0.01)でpH=7.0 にしてある。循環タンク内にヒーターおよびサーモスタットを設置し、水温を25℃に制御した。RUN 1 は、支持体チューブの材質はシリコンで、各チューブの両端にマンノメータが取り付けられてあり、摩擦損失水頭を測定することができる。RUN 2~4 では、チューブの材質は硬質塩化ビニールで、生物膜から剥離する生物を粒径別に捕獲するために、循環タンク内に

Table 1 Experimental conditions

RUN	Tube		Flow rate (ml·min ⁻¹)		Substrate concentration in feed tank			
	Material	Inner diameter(mm)	Segment	Feed tank	Recycle tank	NO ₃ -N (mg·l ⁻¹)	Methanol (mg·l ⁻¹)	
1	Silicone rubber	6.8,10,12,15	2(each diameter) 10 (total)	60	190	100	300	
2	Polyvinyl chloride		8	10	28	170	300	900
3	Polyvinyl chloride		10	12	28	166	400	1200
4	Polyvinyl chloride		8	10	28	120	400	1200

6種類フルイ(5, 2.0, 0.84, 0.42, 0.25, 0.105mm)を設置している。運転は都市下水処理場の活性汚泥を植種して開始した。

2.2 測定および分析方法

(A) 生物膜厚および密度

チューブに付着・増殖した生物膜の厚さ δ (cm), 生物膜湿潤密度 ρ_{bw} ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) は, 生物膜が形成される前と後のチューブの質量およびチューブ内を水で満たしたときの全質量を測定し, 付着前後の質量の差から体積を算出し次式により求めた。

$$\begin{aligned}\delta &= (d_0 - d_1) / 2 \\ &= \{ (4V_0 / \pi L)^{1/2} - (4V_1 / \pi L)^{1/2} \} / 2 \\ &= \{ (m_0^* - m_0)^{1/2} - (m_1^* - m_1)^{1/2} \} / (\rho_w \pi L)^{1/2}\end{aligned}\quad (1)$$

$$\begin{aligned}\rho_{bw} &= m_{\text{wet}} / V \\ &= m_{\text{wet}} / (V_0 - V_1) \\ &= (m_1 - m_0) / \{ (m_0^* - m_0 - m_1^* + m_1) / \rho_w \}\end{aligned}\quad (2)$$

ここに, d_0, d_1 : 生物膜付着前と後のチューブの内径 (cm)

L : チューブの長さ (cm)

m_0, m_1 : 生物膜付着前と後のチューブの質量 (g)

m_0^*, m_1^* : 生物膜付着前と後のチューブ内を水で満たしたときの全質量 (g)

V_0, V_1 : 生物膜付着前と後のチューブ内の体積 (cm^3)

V, m_{wet} : チューブ1本に付着した生物膜の湿潤の体積 (cm^3) および質量 (g)

ρ_w : 水の密度 ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

生物膜表面は平ではなく凹凸が観察され, 均一な膜厚さではないが, 式(1)で算出される膜厚さは平均値として表される。また, 生物膜乾燥密度 ρ_{bd} ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) はチューブ付着生物の乾燥質量 m_{dry} (g) を測定することにより, m_{dry} / V として求められる。本測定法は, 重量を測定するだけで求められる簡単な方法であるが, 生物膜付着後のチューブの質量 m_1 の測定 (チューブを5分間傾斜させて水を切った後に測定) は生物膜表面に付着している液膜が多少残るため誤差を生じる。生物膜表面の液膜を除くために長時間放置すると後の細胞外ポリマー等の分析に影響を及ぼす可能性があること, また傾斜直後にチューブ内の水はほとんど排除され, 生物膜厚が厚いと残留液膜量の生物膜量に対する割合が小さいことより, 傾斜時間を便宜的に同一条件の5分間とした。

RUN 1 においては, 各チューブにおける生物膜厚さを測定した後, チューブを再び実験装置に設置し, 運転を再開した。これを7回繰り返して実験を行った。RUN 2~4 では, チューブを1本ずつ定期的に取り出し (RUN 2, 3, 4 をそれぞれ7, 11, 5回), 生物膜厚, 膜湿潤密度を測定した後, チューブから生物膜をはぎ取り, これを次項の分析に供した。

(B) 細胞外ポリマー

生物膜および剥離生物の細胞外ポリマーの抽出を水蒸気抽出法によって行った。まず, 採取した生物をホモジナイズし, オートクレープ104℃中で60分間の抽出を行う。次に遠心分離 (8,000rpm, 20分間, 4℃) をして, 上澄液を細胞外ポリマーとし, アンスロン法によって還元糖として定量した。

(C) 生物膜の塑性粘性係数および降伏値

生物膜は高粘度の非ニュートン流体に属すると考えられ, RUN 4 で形成された生物膜 (乱された状態) について, 塑性粘性係数および降伏値を求めた。測定はウペローデ粘度計を多少改良 (ウペローデ粘度計にガ

ラスシリンジを接続し、シリンジ内に圧力を加えると細管内の生物膜試料に伝達されるようになっている) した加圧形毛細管粘度計を用いて行った。方法はチューブからはぎ取られた生物膜を粘度計に挿入し、ある圧力を載下した時の見かけ粘性係数を測定する。これを数段階の圧力下で試験を繰り返し、次章の3.3節で記述する計算式を用いて塑性粘性係数と降伏値を算出した。また、採取された同一の生物膜に水を加えて乾燥密度を小さくした生物膜(乱された状態)についても同様の方法で数回粘度測定を行った。

3. 結果および考察

3.1 生物膜の生長

付着生物膜の発達には、典型的には1)細菌の支持体表面への吸着、2)細菌の増殖による生物膜の形成および対数増殖、3)転移期、4)静止状態を経由して、5)脱離と再生の定期的な繰り返し、が起こると考えられる^{13, 14)}。生物膜の生長は、単に膜厚が増加するだけではなく膜乾燥密度も共に変化し、膜構造は複雑な挙動を示す。Benefield and Molz¹⁵⁾は、細菌の死滅によって膜乾燥密度が小さくなると仮定したモデルを提示している。一方、膜厚の増加と共に膜乾燥密度も増加したという報告もある¹⁸⁾。

Fig. 2, 3 に単位表面積当りの生物膜量 X_A および膜厚 δ の経時変化をそれぞれ示す。生物膜量と膜厚は、経過と共に増大しているが、単調な増加ではなく、大きな剝離を経験しながら生長している。特にRUN 3 のチューブ内径が10mmの場合にはその傾向が顕著である。一方、Fig. 4 に示している膜乾燥密度 ρ_{bd} は、膜厚に比較して剝離による変動は殆どみられず、経過と共に高密度化されている。仮に、生物膜の生長において、膜厚は一定で不変であるとし、膜乾燥密度 ρ_{bd} のみが増加すると仮定すると、剝離のない場合は ρ_{bd} の時間変化は Fig. 4 の片対数紙上で線形となる。しかし実験においては線形とはならず、傾きも各 RUN で異なっている。実際の生物膜の生長は、乾燥密度だけが大きくなるのではなく、膜厚も増加することから、上記の仮定から算出される傾きよりも実験値の方が小さくなると予想される。Fig. 2~4 において、RUN 2 と RUN 4 は似た値を示しているが、RUN 3 とはかなりの違いがみられる。RUN 2, 4 と RUN 3 の実験条件の違いはチューブ内径であり、チューブ内径の大きい、すなわち支持体表面積の大きな RUN 3 の方が生長速度は遅くなっている。この原因は3.3節で論ずるが、支持体表面積が大きいと生物膜の拘束度が小さく、このために剝離し易くなり、このような結果になったと考えられる。

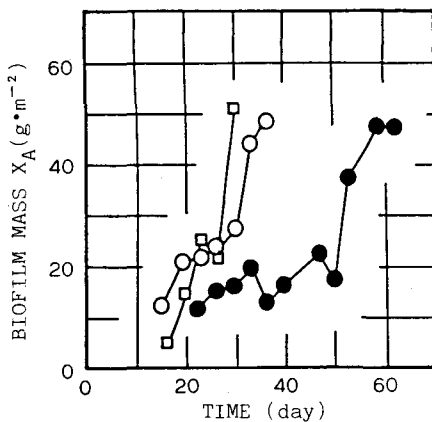


Fig.2 Temporal change of biofilm mass per unit area X_A . Symbols : (○)RUN2, (●)RUN3, (□)RUN4.

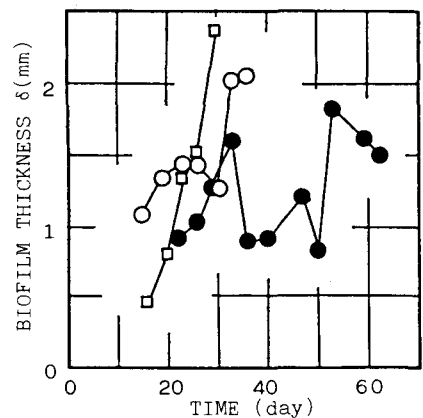


Fig.3 Temporal change of biofilm thickness δ . Symbols : (○)RUN2, (●)RUN3, (□)RUN4.

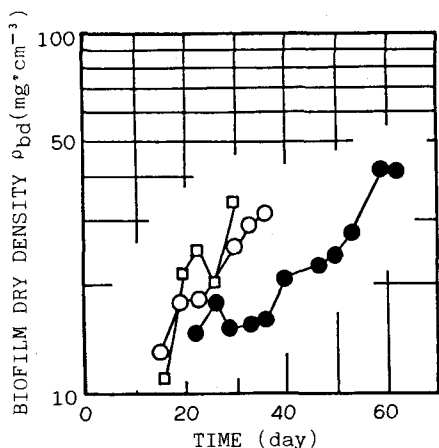


Fig.4 Temporal change of biofilm dry density ρ_{bd} . Symbols : (○)RUN2, (●)RUN3, (□)RUN4.

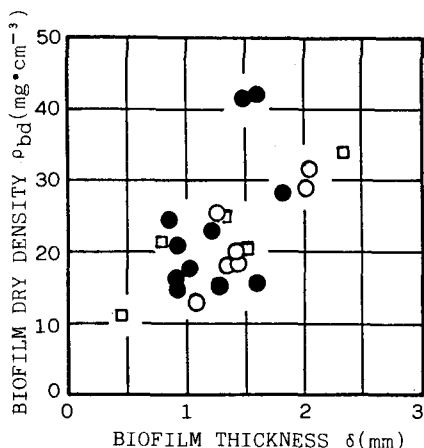


Fig.5 Relation between biofilm dry density ρ_{bd} and biofilm thickness δ . Symbols : (○)RUN2, (●)RUN3, (□)RUN4.

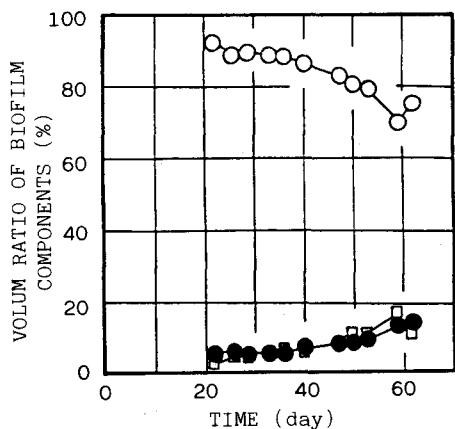


Fig.6 Temporal change of volume ratio of biofilm components for RUN3. Symbols : (○)water, (●)cells, (□)gas.

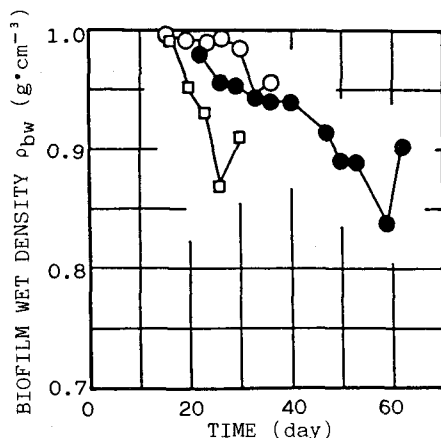


Fig.7 Temporal change of biofilm wet density ρ_{bw} . Symbols : (○)RUN2, (●)RUN3, (□)RUN4.

膜厚 ρ と膜乾燥密度 ρ_{bd} の関係を Fig. 5 に示す。生物膜は剝離を起こすため、膜乾燥密度と膜厚とに強い相関があるとは考えられない。しかし、図が示しているように膜厚が増えれば膜乾燥密度も増加する傾向が見られる。生物膜の生長過程において、この関係を正確に定量化することは困難と思われるが、ある程度の傾向と関係式を見いだすことは可能であると推測される。

生物膜を細胞・水・気体の 3 成分に大別し、細胞内の水分含有量が 75%¹⁷⁾、細胞の乾燥密度が $1.3\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ¹⁶⁾ と仮定すると、生物膜の体積に対する 3 成分の体積の割合 (体積率) を土の 3 相の算出と同様な方法で求めることができる。Fig. 6 に RUN 3 における 3 成分の体積率の経時変化を示した。細胞の体積率は徐々にではあるが増加していき、前述したように膜乾燥密度が高くなっていくのが分かる。脱窒生物膜のために、気体すなわち気泡の成分は窒素ガスがほとんどであると思われる。21 日目为数%であった気泡の体積率は、約

60日目には20%近くまで増加しており、かなり大きな気泡が生物膜内に生成されていくようである。一方、水の体積率は60日目には約70%までに減少している。

Fig. 7 に生物膜の湿潤密度 ρ_{bw} の経時変化を示す。図示されているように生物膜の湿潤密度は水の密度よりも小さく、膜乾燥密度とは逆の減少傾向にあることが分かる。これは、前述したように生物膜内での気泡の生成に起因するものと考えられる。また、RUN 2, 3, 4 の減少の速さに違いがみられ、RUN 4 の場合が最も早く減少している。RUN 4 は、RUN 2 によりも液流速が遅い条件で、RUN 3 とは液流速はほぼ同じであるが、チューブ内径が小さい条件下で行われている。これは、液流速が早い方が強固な生物膜が形成されやすいという報告^{2,4)}があるように、液流速が小さい（流体せん断応力が小さい）と気泡を生物膜内にとどめやすい状態となること、また支持体表面積が大きいと剝離しやすいと述べたように、剝離しにくいと気泡をとどめたまま膜厚が生長すること等の原因によって起こったと推測される。

3.2 生物膜の粗度

生物膜の表面は平ではなく、凹凸が観察される。この表面の粗さの度合を相互に比較検討するために式が簡単なマンニング式の粗度係数を用いた。マンニング式は次式で表され、本実験がチューブを用いているため容易に適用することができる。

$$u = \frac{1}{n} R^{2/3} I^{1/2} \quad (3)$$

ここに、 u ：流速 ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)、 n ：粗度係数 ($\text{m}^{-1/3} \cdot \text{s}$)、 R ：径深 (m)、 I ：動水勾配 (—) である。式(3)に実験値の損失水頭 h_f を代入し変形すると、粗度係数 n は次式で求められる。

$$n = (d_i/4)^{2/3} \cdot (h_f/L)^{1/2} / u \quad (4)$$

Fig. 8 は、上式を用いて計算した RUN 1 の粗度係数の経時変化を示している。内径の異なる5種類のチューブいずれの場合にも、経過と共に粗度係数が高くなっている。また、チューブの内径が大きいくほど粗度係数は高くなっている。このことは、流速が遅い（せん断応力が小さい）あるいは支持体の表面積が大きいチューブは生物膜表面の凹凸が大きく、生物膜表面の形態はせん断応力・支持体面積の影響を受けるかも知れない可能性を示唆している。

3.3 生物膜の粘度と細胞外ポリマー

細胞同志が何らかによって相互に付着しなければ生物膜は形成されない。この相互の付着に細胞が分泌する細胞外ポリマーが重要な橋渡しをすると考えられている。この細胞外ポリマーの成分の主要成分は多糖類¹⁸⁾であり、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} のカチオンがクロスリンケージとして作用し、膜構造を維持しているという指摘がある^{19,20)}。Fig. 9 は細胞外炭水化物含有量 ECP/VBW

(mg-extracellular carbohydrate / mg-volatile biofilm weight) と生物膜内の細胞の体積率 V_c/V との関係を示している。細胞の体積率が増加すると細胞外炭水化物含有量は減少している。しかも各 RUN の違いは殆ど

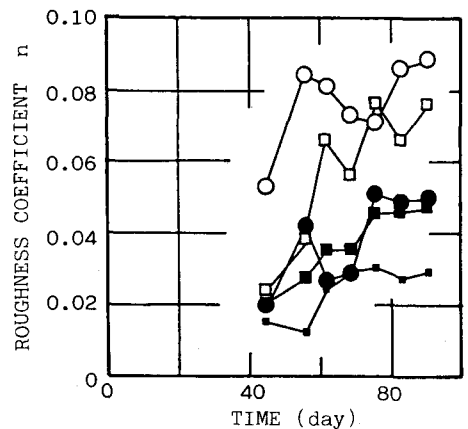


Fig.8 Temporal change of roughness coefficient of biofilm surfaces n for RUN1. Symbols : tube inner diameter (○) 15mm, (□) 12mm, (●) 10mm, (■) 8mm, (■) 6mm.

なく、指数的に減少しているように見える。細胞の体積率が高くなれば平均的な細胞間の距離は短くなり、細胞外ポリマー量が少なくても生物膜を構成できると推察されるが、なぜ細胞外ポリマー含有量が少なくなるのか、原因は明らかでない。

生物膜は、大きなせん断応力 τ を与えると変形流動して流体としての性質を示す非ニュートン流体と考えられる。非ニュートン流体の中で、せん断応力がある値(降伏値 f_y) よりも大きくならなければ流動せず、一旦流動すれば必ず速度 D_s (単位距離あたりの流速の変化量) とせん断応力 τ との関係が直線的である流体をビンガム流体とよばれ、流動曲線は次式で表される。

$$\eta_B = (\tau - f_y) / D_s \quad (5)$$

ここに、 η_B : 塑性粘性係数である。細管内のビンガム流体は、Fig. 10で示されるような流速分布とせん断応力分布を有する流れとなり、管壁におけるせん断応力 τ_a (dyn・cm⁻²)、塑性粘性係数 η_B (dyn・cm⁻²・s)、降伏値 f_y (dyn・cm⁻²) の関係は次式で表される²¹⁾。

$$\eta_p = \frac{\eta_B}{1 - \frac{4}{3} \frac{f_y}{\tau_a} + \frac{1}{3} (f_y / \tau_a)^4} \quad (6)$$

ここに、 η_p : 見かけ粘性係数 (dyn・cm⁻²・s) である。見かけ粘性係数は、非ニュートン流体をニュートン流体と見なし、細管方式の粘度計を用いてハーゲン・ポワジューユの式より求めた粘性係数をいう。流体がきまれば見かけ粘性係数 η_p は τ_a のみの関数となる。式(6)において、 $f_y / \tau_a < 0.4$ ぐらいであれば $1/3 (f_y / \tau_a)^4$ 項が無視でき、また式を変形すると次式の近似式が得られる。

$$\frac{\tau_a}{\eta_p} = \frac{1}{\eta_B} \left(\tau_a - \frac{4}{3} f_y \right) \quad (7)$$

上式の中の見かけ粘性係数 η_p と壁面せん断応力 τ_a は粘度測定から求められる。粘度測定の一例 (RUN 4, 経過日数26日目, $\rho_{bd} = 13.4 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$) として、 τ_a を6回変えてそれぞれについて測定し求めた τ_a / η_p と τ_a の関係を Fig. 11 に示した。図が示すように強い線形関係が見られ、式(7)が適用できることを示し、生物膜がビンガム流体に属するものと考えられる。図中の直線の傾きは $1/\eta_B$ 、横軸の τ_a との切片は $4/3 f_y$ となり、 η_p と f_y を求めることができる。

RUN 4 の試験チューブから採取した生物膜およびこれに水を加え乱されている状態の乾燥密度のみを数段階下げた同一の生物膜について

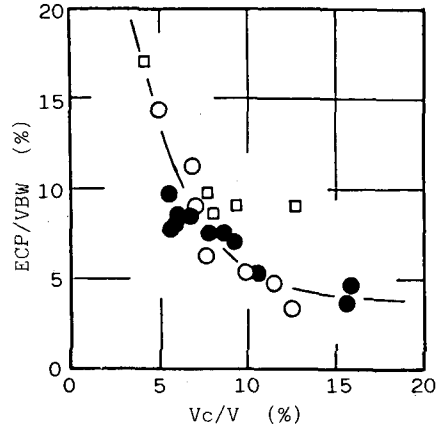


Fig.9 Relation between extracellular carbohydrate per volatile biofilm weight (ECP/VBW) and volume ratio of cells in biofilm (Vc/V). Symbols : (○) RUN2, (●) RUN3, (□) RUN4.

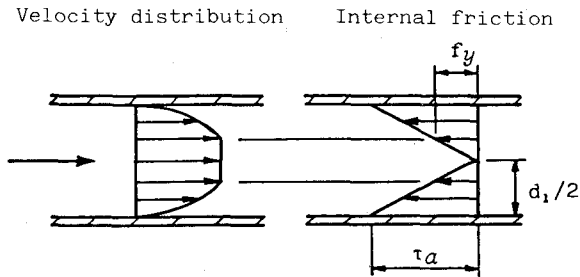


Fig.10 Flow of Bingham fluid in narrow pipe.

の塑性粘性係数と乾燥密度 ρ_{bd} の関係を Fig. 12 に示す。ただし生物膜内の水の粘性 η_w の影響を除くため、 $\eta_B - \eta_w$ (生物濃度がゼロ、すなわち水になると $\eta_B - \eta_w = 0$) で図示した。生物膜乾燥密度 ρ_{bd} を減少させると $\eta_B - \eta_w$ は小さくなっている。しかも経過日数が違ってもその傾きはほぼ同じようである。しかし、生物膜が生長(日数が経過)すると、図中の右に移行しているようである。塑性粘性係数は膜乾燥密度と関係していると思われるが、膜乾燥密度だけでは説明できない要因があると考えられる。そこで、Fig. 13 に膜乾燥密度の代わりに生物膜内の細胞外炭水化物濃度 ECP/V ($\text{mg-carbohydrate} \cdot \text{cm}^{-3}$) を横軸にとり、塑性粘性係数との関係を図示した。図中より強い線形関係がみられ、生物膜の生長による影響をも考慮した相関となっている。すなわち、生物膜の細胞外炭水化物濃度 ECP/V ($\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$) が高くなると塑性粘性係数 η_B ($\text{dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$)。

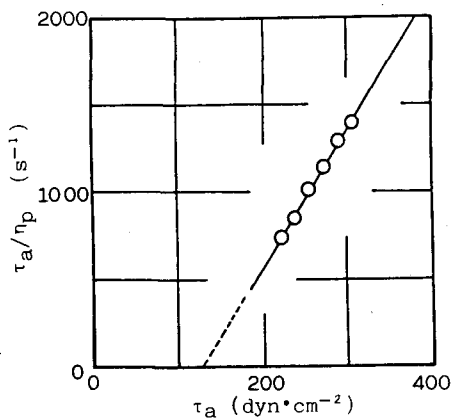


Fig.11 Result of viscosity test for RUN4 (26 day, $\rho_{bd}=13.4 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$).

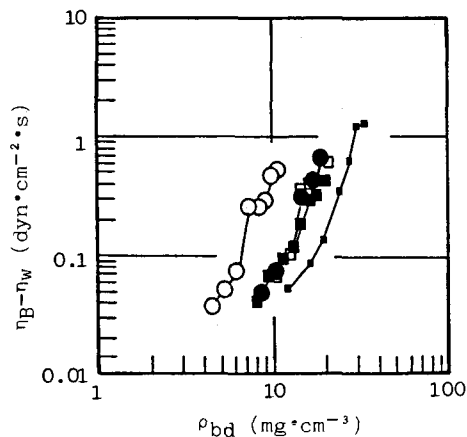


Fig.12 Influence of biofilm dry density ρ_{bd} on plastic viscosity. Symbols : (○)16, (●)20, (□)23, (■)26, (▪)30 day for RUN4.

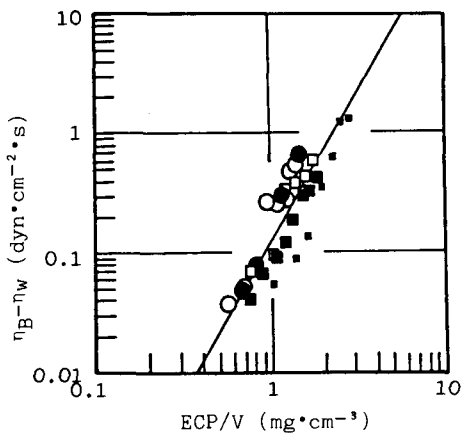


Fig.13 Influence of extracellular carbohydrate concentration ECP/V on plastic viscosity. Symbols are same as indicated in Fig.12.

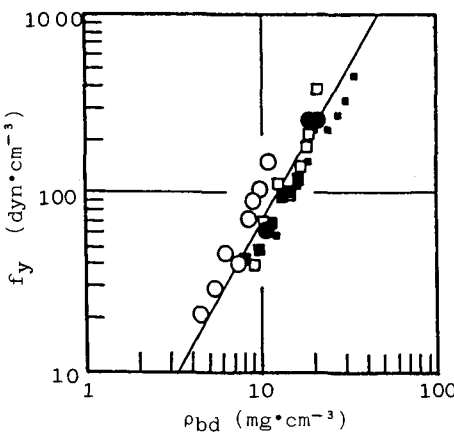


Fig.14 Influence of biofilm dry density ρ_{bd} on critical strength of biofilm adhesion f_y . Symbols are the same as indicated in Fig.12.

s) も大きくなり、この関係は次式で表される。

$$\eta_B - \eta_w = 0.125 (\text{ECP} / V)^{2.50} \quad (8)$$

生物膜に降伏値以上のせん断応力が作用すれば、生物膜内にずれが生じ、もはや膜構造を維持することはできず流動が始まる。すなわち、生物膜に剝離が生じると考えられる。このため、降伏値は生物膜内の付着力に匹敵するものと考えられる。Fig. 14 は降伏値 f_y と膜乾燥密度 ρ_{bd} との関係を示したものである。 f_y と ρ_{bd} の関係は経過日数によって多少のずれは見られるが、ほぼ直線で近似できるようなのである。このことは、降伏値 f_y は膜乾燥密度 ρ_{bd} に強く依存しており、生物膜が生長し $\rho_{bd}(\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3})$ が増加すれば $f_y(\text{dyn} \cdot \text{cm}^{-2})$ も大きくなり、生物膜内の付着力は強くなることを示唆している。次式にこの関係の近似式を示す。

$$f_y = 1.30 \rho_{bd}^{1.75} \quad (9)$$

降伏値 f_y は塑性粘性係数とは異なり、細胞外炭水化物濃度の影響よりも膜乾燥密度によって変化し、膜乾燥密度が約 $13 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ 以上になると降伏値は $100 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$ 以上になる。ただし、式(9)は乱された状態の生物膜について求められたもので、支持体に付着している生物膜ではこれより大きな降伏値を有すると考えられる。

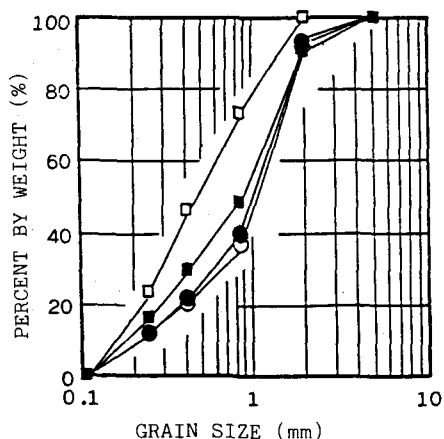
3.4 生物膜の剝離

支持体表面上にまで基質が浸透しなく、このために生物膜が剝がれ落ちるような場合以外に、生物膜の生長過程においても生物膜の一部分が剝離している^{4,13)}。この剝離に及ぼすものとして外的と内的因子の二つが考えられる。外的因子の主なものとして液流速によるせん断応力が挙げられる。Duddridge et al.¹⁰⁾ は、ステンレス鋼に形成された生物膜について、流体せん断応力が $100 \sim 120 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$ 以上で急激な剝離が起こることを観察している。観察された剝離は、支持体と細胞あるいは細胞間のどちらが引き離されたものかは明確でないが、生物膜の細胞間の付着力は、 $100 \sim 120 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$ 以上ということになる。前節で求めた降伏値は乾燥密度が $13 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ 以上で $100 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$ 以上であったように、Duddridge et al. の実験結果とはほぼ符合している。一方、本実験内で作用している流体せん断応力は約 $0.5 \sim 5 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$ で、最大値でも降伏値とは2オーダーも低い値であるにもかかわらず生物膜の剝離が観察されている。また、流動床のバイオパーティクル(砂+生物膜)表面に作用するせん断応力 $\tau_0(\text{dyn} \cdot \text{cm}^{-2})$ は次式で表される。

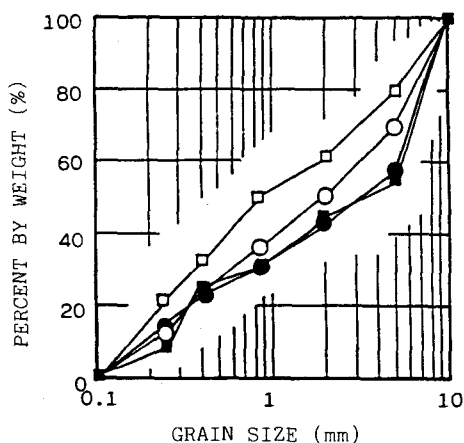
$$\tau_0 = d_p (\rho_{pw} - \rho_w) g / 6 \quad (10)$$

ここに、 d_p , ρ_{pw} : バイオパーティクルの粒径(cm)および密度($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)、 g : 重力加速度($\text{cm} \cdot \text{sec}^{-2}$)である。仮に $\rho_{pw} = 2.5 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, $d_p = 0.2 \text{ cm}$ と仮定しても、せん断応力 $\tau_0 = 50 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$ となり、まだ降伏値までには達していない。ただし、生物膜の凹凸により局所的な部位に大きなせん断応力が作用し、その突き出た部分が剝離するとも考えられ、Fig. 8 に示されるように生物膜の粗度は一定値を示すようになる。その他に、内的因子の重要性が考えられる。内的因子として、明確ではないが細菌の死滅、気泡の生成による生物膜内の亀裂、細胞外ポリマー量の変化等が考えられる。海野ら⁴⁾ は、膜内に空洞部分が生じこれが剝離につながると報告している。ただし、これらの内的因子は誘引的な要因であって、これによって剝離をさせるというものではなく、外部からの作用がなければ剝離は発生しないと考えられる。

Fig. 15 に RUN 2, 3 の剝離生物の粒度分布を示す。図中の粒径は、剝離生物の不均一な直径を測定したのではなく、水中で留まるフルイの径を表している。また、フルイ(0.105 mm)を通過した剝離生物量はかなりあると思われるが、測定してなく、0.105 mm のフルイに残留する生物が多ければ通過する生物も多くなると思われるため、残留する生物量を剝離生物量として以下検討する。図に示されるように RUN 2, 3 ともに経過日数につれて粒径加積曲線は図の右に移動している。このことは、生物膜が生長すると粒径の大きな生物膜が多く剝離することを意味している。RUN 2 と 3 を比較するとチューブ内径の大きな場合の RUN 3



(a) RUN2, Symbols : (□)15, (○)23, (●)26, (■)33day.



(b) RUN3, Symbols : (□)22, (○)29, (●)47, (■)62day.

Fig.15 Grain-size-distribution curves of detached biomass fragments.

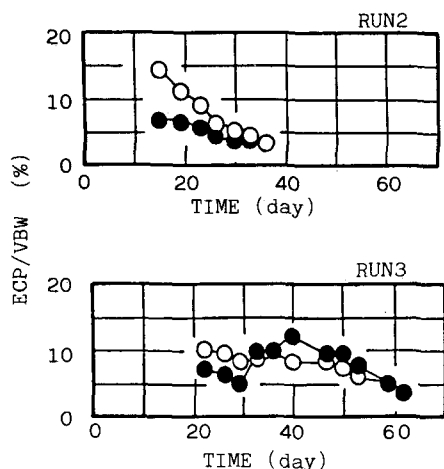


Fig.16 Temporal change of extracellular carbohydrate per attached(○) and detached(●) volatile biofilm weight (ECP/VBW).

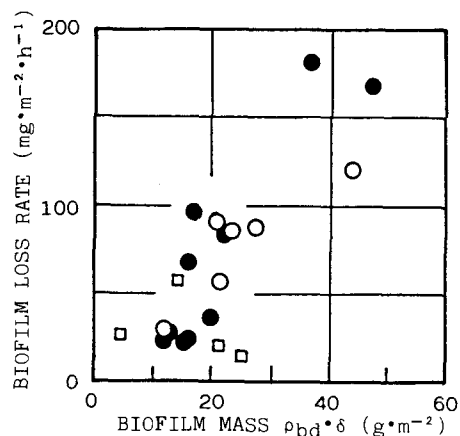


Fig.17 Biofilm loss rate as a function of biofilm mass per unit area. Symbols : (○)RUN2, (●)RUN3, (□)RUN4.

の方が剥離生物の粒径は大きくなっている。支持体の表面積が大きいと生物膜の拘束が少ないために大きな生物膜の塊が剥離し易くなると推測されるが、RUN 2 ではチューブ内径が小さいために、剥離生物が流下する間に砕かれて小さくなる可能性も考えられる。しかしながら、このことは剥離生物の粒径が生物膜量（特に膜厚）と支持体の表面積によって影響されることを示唆している。

生物膜および剥離生物の細胞外炭水化物含有量 ECP/VBW(mg-carbohydrate/mg-volatile biofilm weight) の経時変化を Fig. 16 に示す。RUN 2, 3 とともに経過約30日までは、細胞外炭水化物含有量は生物膜も剥離生物も減少しているが、生物膜の方が値は高いようである。しかし RUN 3 では30日目以降、生物膜についてはその後も減少しているが、剥離生物ではいったん増加し生物膜とほぼ同じあるいは少し高い値で推移して

Table 2 Result of multiple regression analysis

	Partial regression coefficient	Partial correlation coefficient	t-value
Coefficient ($\text{mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	15.7		
$\rho_{bd} \cdot \delta$ ($\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$)	45.6	0.536	2.641*
τ_0 ($\text{dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$)	-16.5	-0.301	1.224
Va/V (%)	-1.93	-0.186	0.734
ECP/VBW (%)	-1.81	-0.098	0.379
Multiple correlation coefficient		0.813	
Ratio of variance		7.45**	

* : Significant at 0.05, ** : Significant at 0.01

いる。生物膜内に細胞外炭水化物含有量の少ない部位が存在し、その一部が剝離し易くなると推察されるが、RUN 3 の挙動の原因については明らかでない。

単位支持体面積当りの剝離生物量は、剝離生物の体積あるいは膜厚に対する剝離の割合が同一であっても付着生物膜量

Table 3 Correlation coefficient

(膜乾燥密度、膜厚)が多ければ増加す

るため、剝離生物量と付着生物膜量は密接な関係にあると考えられる。Fig. 17 はこの関係を図示したもので、Rittmann が報告¹²⁾しているように正の相関がみられ

	$\rho_{bd} \cdot \delta$	τ_0	Va/V	ECP/VBW	Rd
$\rho_{bd} \cdot \delta$	1.000				
τ_0	0.569	1.000			
Va/V	0.534	-0.182	1.000		
ECP/VBW	-0.774	-0.348	-0.437	1.000	
Rd	0.788	0.314	0.448	0.672	1.000

る。しかし剝離現象は、生物膜量にのみ

依存するという単純なものではなく、内的および外的な因子が複雑に作用していると考えられる。そこで、流体せん断応力 τ_0 ($\text{dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$) (本実験の範囲内では層流であるため摩擦係数 $f = 64/\text{Re}$ として算出)、気泡体積率 V_a/V (%), 細胞外炭水化物含有量 ECP/VBW (%) および単位面積生物膜量 $\rho_{bd} \cdot \delta$ ($\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$) の4項目を説明変量とし、生物膜剝離速度 Rd ($\text{mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) との間に線形関係が成り立つと仮定して重回帰分析を試みた。Table 2 に分析結果を示す。表より危険率5%で有意性を示したのは単位面積生物膜量だけであって、他の説明変量は生物膜剝離速度にはほとんど影響を与えない結果となっている。しかし流体せん断応力については、本実験範囲が狭かったためで、せん断応力と剝離速度は両対数紙上で線形であると報告¹²⁾があるように、広い範囲で行えば剝離速度に影響すると考えられる。また、気泡体積率、細胞外炭水化物含有量は剝離に影響しないのではなく、Table 3 に示されるように生物膜量と相関が高いために、生物膜量だけで剝離速度を十分に説明することができたと考えられる。

4. 結論

付着生物膜の生長とそれに伴う剝離現象の解明を目的として、チューブ内壁に付着増殖させた脱窒生物膜の膜構造、細胞外ポリマー含有量、粘性、剝離生物量の経時変化の推移を調べ、これらの関連性を検討した結果、次のような知見が得られた。

- 1) 生物膜の生長に伴って生物膜乾燥密度 ρ_{bd} は増大するが、一方、膜厚は生物膜の剝離と再生が繰り返されるため、膜乾燥密度と膜厚との関係は単純ではないがほぼ正の相関が認められた。
- 2) 生物膜内の細胞間の付着力に匹敵すると考えられる生物膜の降伏値は、剝離が観察されときの流体せ

ん断応力の値に比較してかなり高い。このため剝離に及ぼす因子は、流体せん断応力のような外的要因だけでなく、内的要因が重要であると推察される。

3) 生物膜乾燥密度が増加すると生物膜の降伏値が高くなり細胞間の付着力は強くなる一方、生物膜が生長していくと気泡が増大し、付着力のない空洞部分が形成される。

4) 生物膜剝離速度は、単位面積生物膜量と高い正の相関がみられた。また単位面積生物膜量は細胞外ポリマー含有量と負の、気泡体積率とは正の相関がみられ、これらは剝離速度に誘引的に影響していると考えられる。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費（奨励研究A）の補助を受けて行ったものである。

<参考文献>

- 1) Atkinson B. et al.: Kinetics, mass transfer, and organism growth in a biological film reactor, Trans. Instn Chem. Engrs, Vol. 45, pp. 257-264, 1967
- 2) Characklis W. G.: Fouling biofilm development: a process analysis, Biotechnol. and Bioeng., Vol. 23, pp. 1923-1960, 1981
- 3) 岩井重久ほか: 生物膜法, 産業用水調査会, p. 237-242, 1980
- 4) 海野 肇・橋本直樹・明昌高司: 好気性付着生物膜の形成過程—酸素消費速度と膜構造による解析—, 水質汚濁研究, 第9巻, 第10号, pp. 643-651, 1986
- 5) Pringle J. H. and Fletcher M.: Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces, Appl. and Environ. Microbiol., Vol. 45, No. 3, p. 811-817, 1983
- 6) Absolom D. R. et al.: Surface thermodynamics of bacterial adhesion, Appl. and Environ. Microbiol., Vol. 46, No. 1, p. 90-97, 1983
- 7) 森崎久雄・服部黎子: 界面と微生物, 学会出版センター, p. 13-61, 1986
- 8) La Motta E. J. and Buydos J. F.: Effect of polyelectrolytes on biofilm growth, J. Environ. Eng. Div., Proc. ASCE, Vol. 108, No. EE6, 1982
- 9) Eiahy T. T. et al.: Electron microscopic examination of wastewater biofilm formation and structural components, Appl. and Environ. Microbiol., Vol. 45, No. 6, p. 1921-1931, 1983
- 10) Duddridge J. E. et al.: Effect of surface of shear stress on the attachment of *Pseudomonas fluorescens* to stainless steel under defined flow conditions, Biotechnol. and Bioeng., Vol. 24, pp. 153-164, 1982
- 11) Powell M. S. and Slater N. K. H.: Removal rates of biological cells from glass surfaces by fluid shear, Biotechnol. and Bioeng., Vol. 24, pp. 2527-2537, 1982
- 12) Rittmann B. E.: The effect of shear stress on biofilm loss rate, Biotechnol. and Bioeng., Vol. 24, pp. 501-506, 1982
- 13) Bryers J. D. and Characklis W. G.: Processes governing primary biofilm formation, Biotechnol. and Bioeng. Vol. 24, pp. 2451-2476, 1982
- 14) Chang H. T. and Rittmann B. E.: Comparative study of biofilm shear loss on different adsorptive media, J. Water Pollut. Control Fed., Vol. 60, No. 3, p. 362-368, 1988
- 15) Benefield L. and Molz F.: Mathematical simulation of a biofilm process, Biotechnol. and Bioeng., Vol. 27, p. 921-931, 1985
- 16) Harada H. et al.: process analysis of fluidized bed biofilm reactor for denitrification, Water Sci. and Technol., Vol. 19, p. 151-162, 1987
- 17) 合葉修一・永井史郎: 生物化学工学 反応速度論, 科学技術社, p. 17, 1983
- 18) Horan N. J. and Eccles C. R.: Prification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges, Water Res., Vol. 20, No. 11, pp. 1427-1432, 1986
- 19) 打川清孝ほか: 水処理装置における生物膜の形成と崩壊機構に関する一考察, 土木学会第41回年次学術講演会講演概要集第2部, p. 831-832, 1986
- 20) Turakhia M. H. et al.: Influence of a calcium-specific chelant on biofilm removal, Appl. and Environ. Microbiol., Vol. 46, No. 5, p. 1236-1238, 1983
- 21) 川田裕郎: 計量管理技術双書(1)粘度, コロナ社, p. 1-69, 1976