

(5) 平板上に形成される脱窒処理生物膜の生長過程

DEVELOPMENT OF DENITRIFYING BIOFILM ATTACHED TO THE SURFACE OF A FLAT SUBSTRATUM

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

ABSTRACT ; For a rational design and operation of a biofilm reactor for the treatment of water and wastewater it is necessary to clarify the mechanism of biofilm formation and detachment and to estimate the biomass hold-up retained within the reactor. In this study the biofilm development was recorded on video tape and the relationships between the biofilm detachment rate, the content of extracellular biopolymer(ECP) and the area of cavity, which was formed at biofilm/substratum interface, was quantified to investigate the type of biofilm detachment and what factors govern the phenomenon. Experimental biofilm which consisted of denitrifying microorganisms was established on the surface of the polyvinyl chloride plate. Three types of large biofilm detachment were observed. The first type showed that about 30 % of the biofilm detached cleanly from the surface of the substratum after about 40 days. It was considered that this type was caused by the formation of the cavity and the decrease of the ECP content. The second type was revealed that a part of the biofilm detached from the middle of the biofilm in the course of 60-90 days. This phenomenon seemed to be attributable to the gas production within the biofilm. The third type displayed a combination of the first and second types after about 100 days.

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

1. はじめに

生物膜法に関する研究の開発動向は近年著しく、生物膜の基質除去機構の解明やそのモデル化とシミュレーション等によって、反応器の処理性能を予測・評価することは容易となり、生物膜法による下・廃水処理装置が普及しつつある。しかしながら、反応器の合理的な設計や操作方法が確立されるまでには至っていない。この原因の一つとして生物膜量の挙動に関する知見が不十分であるということが挙げられる。

生物膜は、支持体に微生物が付着・増殖して膜を形成するものと、付着担体なしに自己凝集・集塊機能によってグラニュール形成するものがあり、前者に関していえば、生物膜が生長して生長と剥離がバランスしたプラトー状態に達した後は、脱離と再生の定期的な繰り返しが起きると考えられている^{1, 2)}。しかしながら、プラトー状態は運転開始からどのくらいの期間で達し、その後に脱離と再生が繰り返されるのか、もしそうだとした場合の剥離がどのくらいの間隔で起きるのかといった不明な点が数多い。

また、どのような機構で微生物同士が付着するのかといった基礎的な情報も乏しい。活性汚泥法においても、フロック形成は固液分離工程において重要であるため、このフロック形成のメカニズムについて数多く

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

**アジア工科大学(Environmental Eng. Div., Asian Institute of Technology)

***長岡技術科学大学工学部(Dept. of Civil Eng., Technological University of Nagaoka)

研究がなされており、細胞外ポリマーが大きく関与していると考えられているが、その機構についてはほとんど未解明である³⁾。

生物膜の付着・剥離機構の解明にあたり、各種形状の複雑な支持体上での生物膜を取り扱う前段階として、平板上のような単純化した系で生物膜生長過程の基礎的な知見を得ることは重要である。また好気性生物膜の場合、酸素と有機物の2基質の生物膜内への拡散浸透および消費現象のために生物膜生長速度の扱いが複雑となるが、一方脱窒生物膜においては硝酸性窒素だけ考慮すればよいために取扱いが容易となる。そこで著者らは、チューブ内壁の支持体に付着・形成させた脱窒生物膜の生長過程を観察し、生長と共に膜密度は増加するが細胞外ポリマーの糖含有量が減少すること、生物膜量と剥離量には正の相関があることを報告した⁴⁾。また剥離は、流体せん断力のような外的な要因だけではなく、内的な要因が重要であることを指摘した。

本研究では、水路の底面に浸水設置した硬質塩化ビニール板上に付着・形成していく脱窒生物膜のビデオ観察、剥離量の測定、細胞外ポリマー成分の分析、剥離を誘因する内的因子と考えられる空洞面積の測定などを行い、生物膜の剥離形態とその周期性および細胞外ポリマー成分の影響等について検討した。

2. 実験方法

2.1 実験装置および方法

実験装置の概略図をFig. 1 に示す。生物膜は、水路（アクリル板 幅20×長さ100×高さ30cm）の底面に浸水設置してある支持体（厚さ6mmの透明の硬質塩化ビニール板）上に形成・生長させた。支持体の大きさは、10×10cmと5×10cmの2種類で、それぞれ中央1列に8枚、両側の2列に16枚配置してある。水路内には流入側に整流板2枚（5cm間隔）、流出側に整流板と堰（5cm間隔）を設けている。流量は、基質タンク（100ℓ）から $28\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ と循環タンク（90ℓ）から $2340\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ の合計 $2368\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ を定量ポンプで水路へ流入させている。生物膜形成前の水深は2cmであり、支持体表面に作用する流体せん断応力は、マンニング式を適用して算出すると $740\text{ dyne}\cdot\text{m}^{-2}$ （粗度係数を0.01と仮定）である。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の人工下水を用い、基質タンク内の濃度をそれぞれ $500\text{ mg}\cdot\text{N}\cdot\ell^{-1}$ 、 $1500\text{ mg}\cdot\ell^{-1}$ とし、若干の無機塩類が添加してある。また、りん酸緩衝液（イオン強度0.01）でpHを7にしている。循環タンク内にはヒーターおよびサーモスタットを設置して、水温を25℃に制御した。生物膜から剥離する生物を捕獲するためにフルイ（メッシュ0.25mm）を循環タンク内に浸水させてある。タンクと水路との連結にはシリコンチューブを用いてある。水路の上面に蓋はなく開放されており空気の再バッキがあるが、基質タンク内を一旦窒素バッキすることで循環水の溶存酸素濃度は $0.5\text{ mg}\cdot\ell^{-1}$ 以下であった。都市下水処理場の活性汚泥を植種して開始し、105日間の運転を行った。

2.2 生物膜の観察と分析

(1) ビデオ観察

実験期間中、水路の中央部に設置したホームビデオカメラ（S-VHS）で、支持体（流入から中央の4枚目の10×10cm）上に付着・形成していく生物膜の間欠撮影（5分または2分間に1秒間）による観察を行った。

(2) 生物膜厚さおよび表面の凹凸

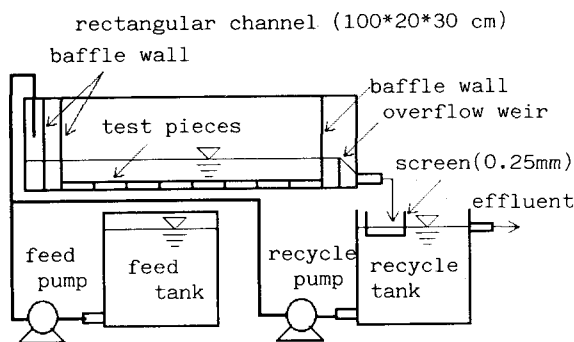


Fig.1 Schematic diagram of the rectangular channel reactor with effluent recycle.

ビデオ撮影した支持体の生物膜の厚さを約1週間ごとに求めた。測定は写真測量に準じて両眼視差の原理により行った。すなわち、35mmの1眼カメラを用いて、高さ約45cmから生物膜表面の写真2枚(60%の重なりをもつ)を撮影し、4つ切りサイズに拡大した写真で立体視をしながら、121点の視差差を測定することで各点の膜厚を算出した。

(3) 生物膜表面および支持体付着面の画像処理

画像処理装置(東芝EWS, TOSPIX-Uの粒子解析パッケージ)を用いて、ビデオ撮影している支持体の生物膜が形成されていない、あるいは剥離した部分(以後、剥離部と記す)と支持体の裏面から判断できる支持体表面と生物膜との空洞部分(以後、空洞部と記す)の抽出を行い、剥離部と空洞部の面積等を測定した。

(4) 生物膜量

約1週間の間隔で水路から支持体を1枚(ビデオ撮影板以外)ずつ(ただし105日目は4枚)ランダムに取り出し(計16枚、以下、初期設置板と呼ぶ)、生物膜の湿潤、乾燥重量を測定した。生物膜湿潤重量は、取り出した支持体を約15分間傾斜させて水を切った後に重量を測定して求めた。また、支持体から剥ぎ取った生物膜は次項の細胞外ポリマーの分析を行い、支持体は再び水路内へ設置させた。運転終了日には、その再度設置した支持体(12枚、以下、中途設置板と呼ぶ)を取り出して同じ項目の測定をした。

(5) 細胞外ポリマー

生物膜の細胞外ポリマーは、水蒸気抽出によって抽出した。まず、剥し取った生物をホモジナイズし、オートクレーブ104℃中で60分間の抽出を行い、次に遠心分離(8,000rpm, 20分間, 4℃)をして上澄み液を細胞外ポリマーとした。細胞外ポリマーの分析項目は、全糖(アンスロン法)、ウロン酸(カルバゾール法)、アミノ糖(Elson-Morgan法)とシアル酸(直接 Ehrlich法)である。

(6) 細胞外ポリマーのゲルクロマトグラフィー

バイオゲル P-200を用いたゲルクロマトグラフ(カラム: 内径2×50cm、押し出し液: 0.1M NaCl)で分画を行った。流出液は7mLずつ分取し、吸光度254nmと280nmおよび全糖(フェノール硫酸法)、ウロン酸、アミノ糖を測定した。

(7) 剥離量

生物膜から剥離する生物量は、生物膜量の測定後に循環タンクを洗浄して、約24時間後のフルイに残留する生物量から求めた。またフルイを通過した量は、循環タンク内の浮遊生物量から算出した。すなわち、フルイを通過した剥離生物が流入する循環タンク内の物質収支は、基質消費速度が0次反応とすると次のようになる。

$$V \frac{dX}{dt} = X_d + V \cdot \mu \cdot X - V \cdot k_d \cdot X - X \cdot Q$$

ここに、V: 循環タンクの容積(l)、X: 循環タンク内のSS (mg-SS・l⁻¹)、t: 時間(h)、X_d: 単位時間当りのフルイ通過剥離量 (mg-SS・h⁻¹)、μ: 比増殖速度 (h⁻¹)、k_d: 死滅速度係数 (h⁻¹)、Q: 循環タンクから流出する流量 (l・h⁻¹)。

上式の微分方程式を解くことで、通過剥離量X_dは次式で求めることができる。

$$X_d = \frac{X(Q + k_d \cdot V - \mu \cdot V)}{1 - \exp(\mu - k_d - Q/V)t}$$

計算に当たっては、k_d=0.021(day⁻¹)、μ=0.0477(hr⁻¹)を用いた⁵⁾。

3. 実験結果および考察

3.1 生物膜の生長過程

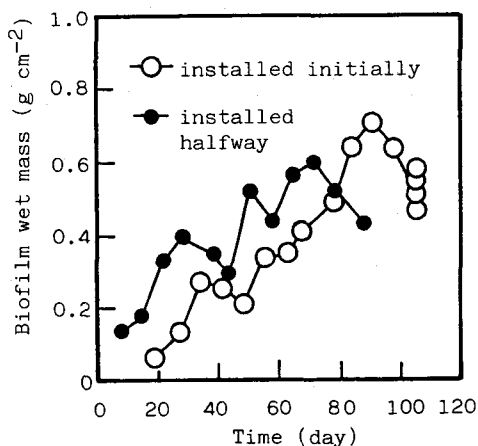


Fig. 2 Temporal change of biofilm wet mass per unit area on the test pieces installed initially and halfway.

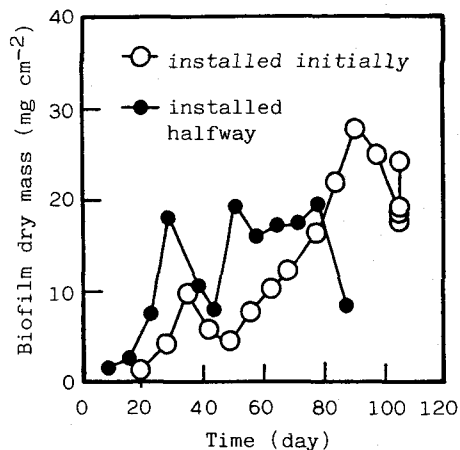


Fig. 3 Temporal change of biofilm dry mass per unit area on the test pieces installed initially and halfway.

付着生物膜の発達は、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プラトー状態を経由して、⑤脱離と再生の定期的な繰り返し、が起こると考えられている^{1, 2)}。Fig. 2 に初期設置板および中途設置板の水路に浸水してからの経過日数における付着単位面積当りの生物膜湿潤重量を示す。湿潤重量の挙動は、単調増加でもなく、またプラトー状態も見られず、剥離と再生は起こっているが定期的な繰り返しでもない。実験期間が100 日程度のために定期的な剥離・再生の繰り返し現象が起こらなく、さらに長期間の観察をすれば起きるかもしれないが、図が示すように生物膜の生長過程はかなり複雑な挙動をすると考えられる。

初期設置板と中途設置板の生物膜湿潤重量の経日変化を比較すると、初期設置板の方が図中の右側に位置している。これは、中途設置板の方が数日ほど速く生長していることを意味している。初期設置板を水路に設置した時には、水路の流水の生物濃度は植種量だけの薄い状態である。一方、中途設置板を水路に設置した時には、すでに周りの支持体には生物膜が形成されており、それから剥離した生物が浸水させたばかりの中途設置板に沈殿・付着する。このために生長速度に違いがでたと考えることができる。

Fig. 3 に初期設置板および中途設置板の単位付着面積当りの生物膜乾燥重量の経日変化を示す。湿潤重量の挙動とよく似ているが、僅かな違いがみられる。このことは生物膜の密度が生長によって異なることを示唆している。生物膜の乾燥密度は、膜厚の増加に伴って増加する⁴⁾ことや、膜内での密度に分布がある⁵⁾ことが報告されており、生物膜の厚さだけで生物膜重量を把握することは容易でないと考えられる。

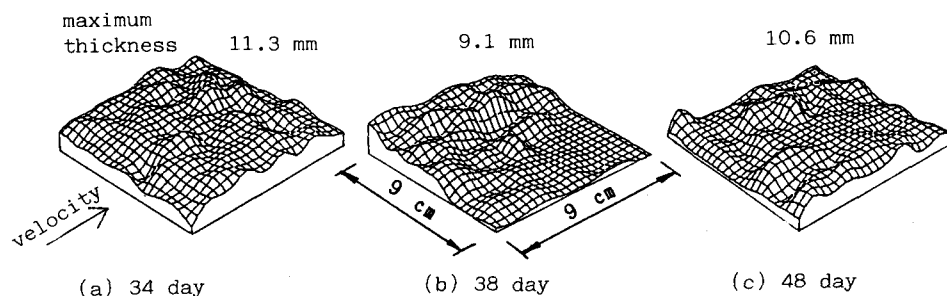


Fig. 4 Shape of biofilm surface.

生物膜厚さの測定をもとにB-スプライン曲面で表した生物膜表面の形状⁷⁾ (34, 38, 48日目)をFig. 4に示す。経過34日目では1 cm以上の膜厚に達する部位もあり、想像以上に肥大した生物膜が形成された。これは、線流速が速いと強固な生物膜が形成されやすいという報告^{8, 9)}があるように、本実験の流体せん断応力がかかり小さかったことに起因していると考えられる。図より81cm²の正方形内でもかなりの凹凸がみられ、場所によって生長速度が違うことが分かる。34日目までは大きな剥離はなかったが、38日目には1/4程度の大規模な剥離をしており、一部では生物膜が再生されている。48日目では大部分の生物膜が支持体の表面から剥離をしてしまったが、依然として剥離をせずに増大している部分も残されている。生物膜厚の増加に伴って水路の水深は2 cmから約3 cmまで増加した。また、生物膜表面の凹凸が顕著になる40日目頃からランダムな流速分布が生じた。

循環水は、NO₃-N が経過40日以降に300mg・ℓ⁻¹程度となり、pHはりん酸緩衝液が添加してあるが、7から8.5程度まで増加した。基質タンク内と流出水の硝酸態窒素の割合である実験装置における基質除去率をFig. 5に示す。支持体上の生物膜を定期的に取り出していることや循環タンク内で剥離生物が増殖するために、水路底面の生物膜だけによる除去率は正確に求められないが、大まかな傾向は図からよみとることができる。すなわち、40日目頃までは除去率が着実に上がっており、生物膜の生長に対応したものと思われる。しかしそれ以降、生物膜量が増加しているにも拘らず、除去率は多少の変動をしながら限界に達したようである。このことは、40日目頃から生物膜内に基質が浸透していない部位ができたと推測される。また、Christopher¹⁰⁾が流体せん断応力などによって膜厚が制限されない場合に、膜厚が増加しても活性の生物膜量は一定値になることをシミュレーションによって示しており、生物膜が生長して基質浸透していない下部に不活性の生物膜ができ、その上部に生物膜が生長していったと推察される。

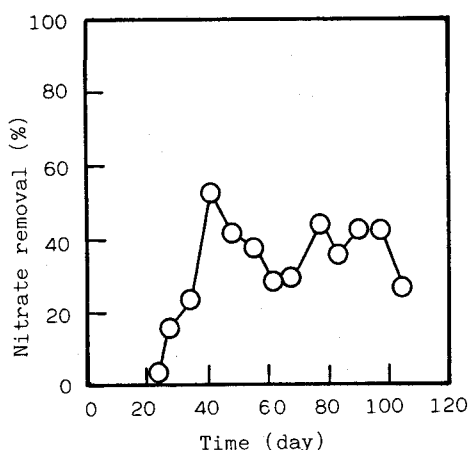


Fig.5 Temporal change of nitrate removal.

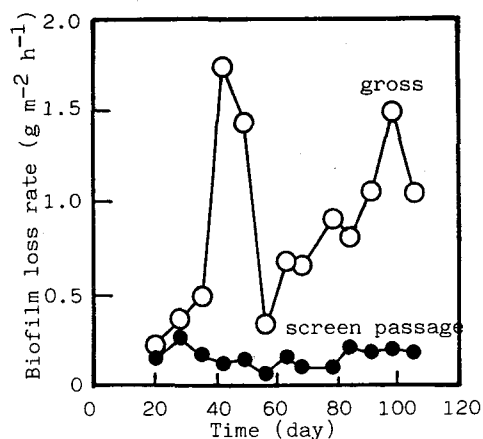


Fig.6 Temporal change of biofilm loss rate.

3.2 生物膜の剥離

単位付着面積、単位時間当りの生物膜から剥離する生物量の経日変化をFig. 6に示す。フルイ (0.25mm) を通過する粒径の小さい剥離生物は、全体の剥離量に比較するとその変動幅は極端に小さい。また30日目頃までは、総剥離量に対するフルイ通過量の占める割合は大きい、その後は小さく、生長に伴って大きな塊の剥離生物が多くなっていることが分かる。

総剥離量は38日目頃まで増加をしているが、その間でも生物膜量はFig. 2, 3に示したように増加している。その直後、剥離量は増大したために、それに伴って生物膜量が減少している。そして、生物膜量が減少した

ためか剥離量もすぐに少なくなっている。しかし、その後の剥離量は90日目頃まで再び増加をしている。この期間は剥離量がかなり多いにもかかわらず、生物膜量は増加をしており、剥離速度よりも増殖速度の方が勝っていることが分かる。ただし、100日目頃には剥離量の方が多くなり、生物膜量が減少している。

ビデオ観察から、剥離には三つの特徴的に形態があることが分かった。第Ⅰは40日目頃の大規模な剥離、第Ⅱは60～90日目頃の剥離量が増加しながらも生物膜が増加するときの剥離、第Ⅲは100日目頃の大きな剥離

で、これらの剥離形態を模式的に示すとFig. 7 のようであった。すなわち、第Ⅰの剥離は生物膜と支持体との間に空洞が形成され、これが次第に大きくなり、ついには生物膜が支持体からきれいに、しかも大きく剥離したものである。第Ⅱの剥離は脱窒による窒素ガスと思われる小さな空隙が生物膜内に多量にできて、ガスの浮力によって生物膜の途中から一部分が剥離したものである。第Ⅲの剥離は空洞部は小さいものの再び形成され、この部分から周りに少しの生物膜が支持体に付着した状態で剥離したものであった。これらの剥離形態は、ビデオ撮影板だけでなく全ての場所において同じように生じていた。ただし、剥離の時期は場所によって1週間程度の差があった。

大きさ10×10cmの支持体上でも場所によって生長速度が異なることを上述したが、支持体上に生物膜が形成されていない、あるいは支持体表面から剥離をした部位（剥離部）および支持体と生物膜との間の空洞部の大きさと数は刻々と変化する。これら剥離部と空洞部の支持体に対する面積の割合を画像処理により求め、その経日変化をFig. 8 に示した。経過10日目頃は生物膜の形成が少ないために剥離部の値が高くなっているが、30日目頃には剥離部がなくなり、生物膜が支持体の一面に形成されたことを示している。そして、40日目頃の第Ⅰの剥離が起こり剥離部の値が高くなっている。第Ⅱの剥離では剥離部の割合が少しずつ増加し、第Ⅲの剥離で多少は高くなっているが、第Ⅰの剥離と比較すると1/5 程度である。空洞部の割合は、第Ⅰの剥離の前に5 %程度と大きくなっている。第Ⅱの剥離時には空洞部はあまり形成されていないが、第Ⅲの剥離の前から徐々に増加している。

生物膜の剥離は、流体せん断力などの外的因子と内的因子の二つによって生じると考えられる。生物膜の細胞間の付着力は100 dyne・cm⁻² 以上の強度^{5, 11)} があり、この付着力よりもかなり小さい流体せん断応力でも剥離が起こることが観察されており、内的因子の重要性が指摘されている⁹⁾。海野ら⁹⁾は、好気性の生物膜内に空洞部分が生じ、これが剥離につながると報告している。本実験での流体せん断応力は740 dyne・m⁻²

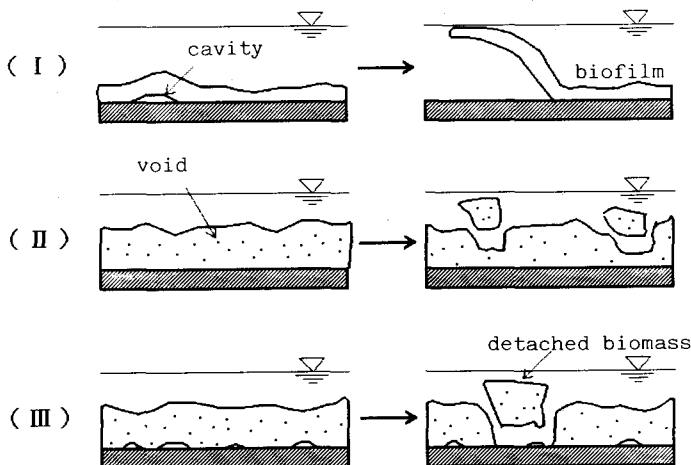


Fig.7 Three types of biofilm detachment.

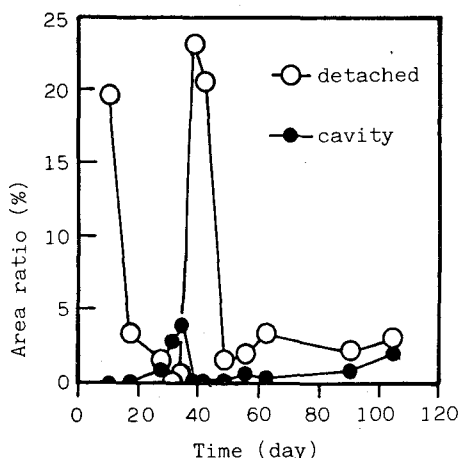


Fig.8 Temporal change of detached and cavity area of biofilm.

と非常に小さい条件下であり、第Ⅰ～Ⅲの剥離形態は、空洞や気泡の生成による内的な因子に強く依存していると言える。

第Ⅰの剥離の前に大きな空洞が形成されたが、この原因を究明することは重要である。脱室生物膜のために窒素ガスが発生し、これが生物膜と支持体との間に留まり、増大することで生物膜を剥しながら空洞が形成されるとも考えられる。しかし支持体の裏面からの観察では、空洞部内はガスよりも水で満たされており、また生物膜の内部には空隙が見られなかったことから、他の機構によって形成されたと思われる。生物膜の生長と共に支持体表面付近の生物膜密度は高くなると考えられ、仮に膜密度がある限界値（菌体が球としたときの不規則充填時での空間率は $0.38^{12)}$ ）に達すると生物膜は周囲に広がろうとする。ところが支持体と横方向の生物膜に拘束されているために拘束力の最も小さい膜厚方向に広がろうとし、このために、支持体と生物膜の間に空洞が形成されるのではないかと推測される。この場合、菌体の増殖が生物膜の重量を持ち上げる力があるかという疑問も生じるが、生物膜の湿潤密度は $1\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 程度⁴⁾であるため、生物膜を持ち上げる力はほとんどなくても起こると思われる。そして支持体表面付近の膜密度が、30～40日程度で限界に達すると予測される。なお、空洞部がある部位は膜厚が大きくなっていた。

第Ⅱの剥離時には空洞があまり形成されなかったが、これは上述したように基質が支持体表面まで到達しない不完全浸透のために細菌の活性が小さく、膜密度の増加速度が鈍るためと推察される。このとき基質がない支持体表面から剥離をしないのは興味深い。生物膜の内部では空隙が形成され、膜内の付着面の低下と湿潤密度の低下（ $1\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 以下）に伴う生物膜の浮力により、生物膜の途中から容易に剥離すると考えられる。

一方、第Ⅲの剥離で空洞部が形成されている。これは基質が不完全浸透と言っても、基質消費速度が0次反応でなければある膜厚から基質が零になることはなく、支持体付近の基質濃度がかなり小さいだけで、支持体表面付近の細菌でも多少は活性できるために徐々に空洞が形成されたと考えられる。すなわち、第Ⅱ～Ⅲの剥離が起きる期間には支持体表面付近の生物膜の増殖が著しく低下し、高密度の膜が形成されるのに時間を要するものと推察される。そして第Ⅲの剥離形態は、支持体表面付近の空洞形成による支持体付着面積の低下と生物膜の浮力との総合作用によって起きたと考えられる。

上記の知見をもとに経過 105日以降の生物膜の挙動を予測すると、第Ⅰの剥離が起きることはなく、第ⅡとⅢの剥離によって生物膜量の変移するであろう。ただし、定期的に第ⅡとⅢの剥離を繰り返すかどうかは不明である。また、観察された剥離現象が好気性や嫌気性の生物膜にも一般的に起きるかどうかは分からないが、かなり共通性があると推察される。

3.3 細胞外ポリマー

生物膜の付着現象や活性汚泥のフロック形成には、微生物が生産する細胞外ポリマーが大きく関与していると考えられている³⁾。細胞外ポリマーの含有量、成分等は活性汚泥と生物膜では異なるであろうし、生物膜の生長に伴っても変化し、細胞外ポリマー含有量の減少やある成分の減少が細胞間の付着力を低下させ剥離を助長させることが予想される。このため細胞外ポリマーと生物膜の生長と剥離との関連について検討した。細胞外ポリマーを抽出する方法には、水蒸気、遠心分離、アルカリ、エタノール、EDTA抽出など種々の方法がある¹³⁾が、細胞外ポリマーだけを正確に抽出する方法は現在のところなく、各方法にはそれぞれ長短あると思われる。一方、Figueroa and Silverstein¹⁴⁾は細胞外ポリマーを抽出せずに、その多糖類を測定するルテニウムレッド吸着方法を提示している。本研究は、水蒸気抽出された細胞外ポリマーから考察したものである。

生物膜重量に対する細胞外ポリマーの重量、アンスロン糖、ウロン酸、アミノ糖、シアル酸含有量の各割合の経日変化をFig. 9 に示す。細胞外ポリマー重量は、経過20日目頃には約50%あったものが、生長に伴って減少し、60日目以降の値は30%付近で推移している。アンスロン糖は38日目頃までは減少して、その後一

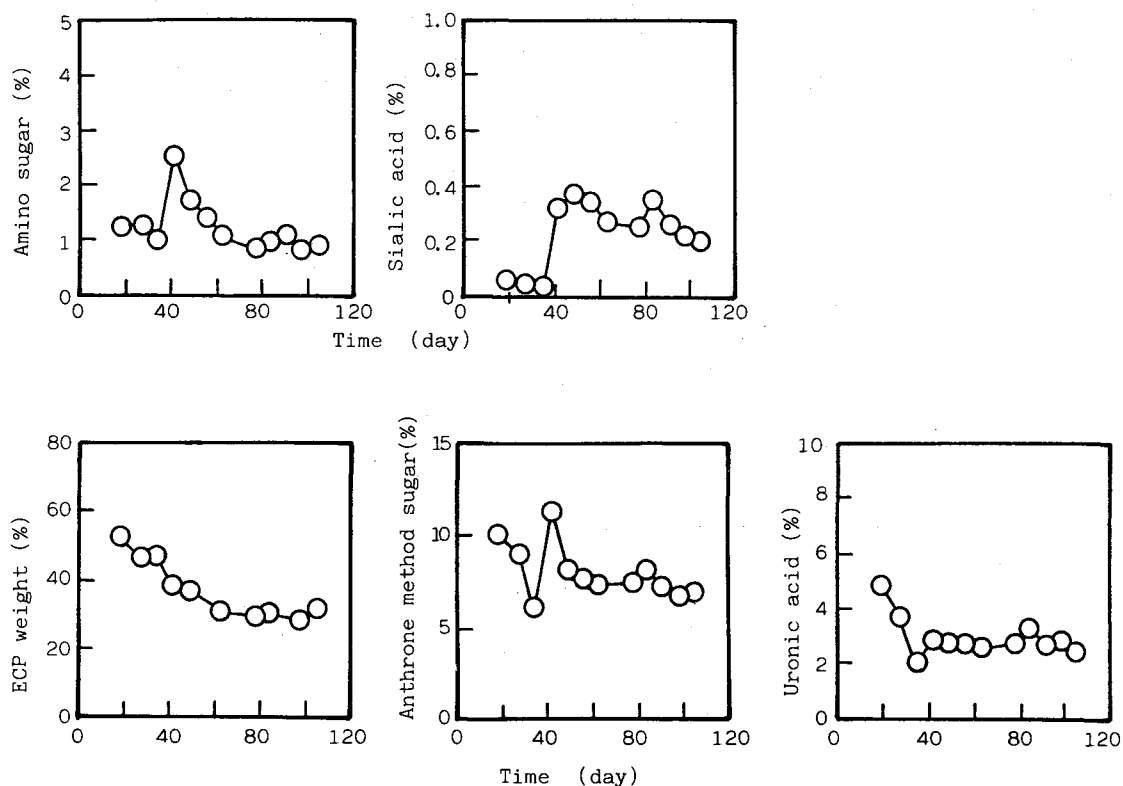


Fig.9 Temporal change of extracellular polymers(ECP) per volatile biofilm weight.

旦は増加するが再び減少しはじめ、60日目以降は変化が少ない。ウロン酸については、38日目頃までは減少しているが、その後の変化は少ないようである。シアル酸は前項目の2成分とは異なり、40日目頃に一旦増加をして、その後の変化は少ないようである。一方アミノ糖も40日目頃に増加をするが、その後60日目頃まで減少している。

これらの成分と生物膜の生長と剥離との関連についてみると、経過60日目以降の基質が不完全浸透で第ⅡとⅢの剥離形態のときには、各成分とも変化がないようである。第Ⅰの剥離現象とよく一致しているのがアンスロン糖で、剥離をする前にアンスロン糖が減少して、剥離した後は生物膜形成初期と同じような状態になるためかアンスロン糖が増加している。ただし、細胞外ポリマー重量の割合は第Ⅰの剥離後には増加がみられなく、剥離との直接的な関係は弱いかもしれない。また、細胞外ポリマー重量が初期には減少していくのに対して、シアル酸とアミノ糖が経過40日目頃に増加をしており、この2種の糖質と生物膜の生長との関係は不明である。これらのことから、アンスロン糖が生物膜の挙動に強く関係していると考えられる。

Fig. 10は細胞外ポリマーのゲルクロマトグラム（吸光度 254nm(E254)、フェノール硫酸糖、ウロン酸、アミノ糖）を示す。縦軸は、経日変化の影響をみるために生物膜重量当りの分画濃度で表している。経日変化は、生物膜形成初期でアンスロン糖含有量が高かった18日目と第Ⅰの剥離を起こす前後の34日目と41日目およびアンスロン糖が減少した62日目を図示している。細胞外ポリマーはバイオゲルP-200 によって3つの成分に分画されるようで、第1はフラクションNo. 7付近、第2はNo. 14 付近、第3はNo. 23 付近である。有機成分の指標であるE254では、経過18日目に第2分画成分がかなりあるが、31日目以降では減少している。第Ⅰの剥離をする前の34日目のE254の全体量は少なく、41と62日目の第3分画のE254は高くなっている。フェ

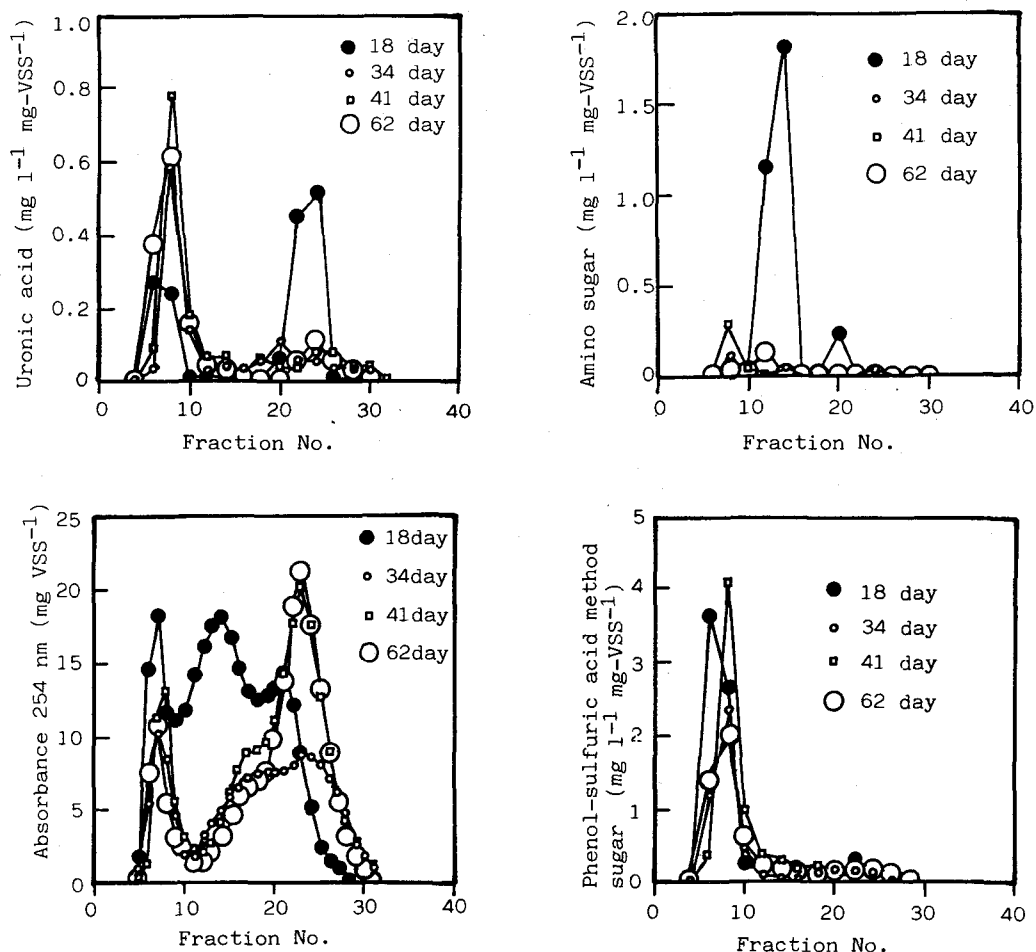


Fig.10 Gel chromatogram of extracellular polymers in biofilm.

ノール硫酸糖では、第1分画成分だけで第2、3分画は出現せず、また、細胞外ポリマーのアンスロン糖の含有量が多かった日(18, 41日目)に第1分画成分が高い値となっている。ウロン酸では、18日目だけに第3成分がみられる。一方アミノ糖では、分画された濃度が低く、定量限界に近いために精度よくは測定できていないが、18日目だけに第2の分画成分がみられる。

上述の関係を整理すると、生物膜が生長すると細胞外ポリマー含有量は減少していき、E254で示される有機成分においては第3分画の低分子量成分の割合が増していくが、これらと剥離現象とに関連性はみられない。剥離現象と関連性がみられるのは、全糖の含有量で、しかも第1分画成分の分子量の高い糖であり、その含有量が低くなると大きな剥離に至るようである。

4. 結 論

平板上に付着・形成していく脱窒生物膜の生長を長期間の観察をすることで、生物膜の形成・剥離機構について検討を行い、次のような知見が得られた。

- 1) 生物膜は基質が不完全浸透となった後にも直ちに支持体表面から剥離をすることはなく生長を続け、厚

い膜を形成する。

- 2) 小さな剥離は常時起こっているが、大きな剥離には3つの形態があった。第Ⅰは、支持体の表面からきれいに、しかも大きく剥離をする。第Ⅱは、生物膜の途中から一部分が剥離をする。第Ⅲは、第ⅠとⅡの複合型として剥離をする。
- 3) 第Ⅰの剥離は、生物膜と支持体との間に空洞が形成され、これが次第に大きくなり剥離に及んだものである。この空洞形成の原因として生物膜の高密度化によるものという仮説を提言した。第Ⅱの剥離は、膜内に窒素ガスの小さな空隙が多量にできて、ガスの浮力によって剥離をする。
- 4) 細胞外ポリマーの全糖含有量は、第Ⅰの剥離と関係していると考えられるが、第Ⅱの剥離以降においては、細胞外ポリマー含有重量やゲルクロマトグラフ分画成分などに特別な変化はみられなかった。

上記の知見は、流速が小さくて流体せん断応力が小さい場合であって、これが大きい場合には違った生物膜の生長・剥離を起こすかもしれない。この流体せん断応力の影響については今後の課題として残されている。また、他の好気性や嫌気性の生物膜に対して適用できるかは不明であるが、かなりの共通性があると推測される。今後、得られた知見を基に生物膜の生長モデルの構築、シミュレーションを行っていく予定である。

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) Bryers J.D. and Characklis W.G. : Processes governing primary biofilm formation, *Biotechnol. and Bioeng.* Vol. 24, pp. 2451-2476, 1982
- 2) 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
- 3) 佐藤孝彦ほか：好気性微生物の自己凝集メカニズム，水質汚濁研究，第13巻，第5号，pp. 268-292, 1990
- 4) 大橋晶良・原田秀樹・桃井清至：生物膜の生長過程と剥離に関する実験的研究，衛生工学研究論文集，第25巻，p. 209-220, 1989
- 5) Harada H. et al. : Process analysis of fluidized bed biofilm reactor for denitrification, *Water Sci. and Technol.*, Vol. 19, p. 151-162, 1987
- 6) 増田純雄・渡辺義公・石黒政義：回転円板付着生物膜内の細菌に関する研究，下水道協会誌，Vol. 24, No. 278, p. 19-31, 1987
- 7) 岡中正三・大橋晶良：B-スプライン曲線・曲面による点列および格子点列の補間，呉高専研究報告，第26巻，第1号，p. 11-21, 1990
- 8) Characklis W.G. : Fouling biofilm development: a process analysis, *Biotechnol. and Bioeng.*, Vol. 23, pp. 1923-1960, 1981
- 9) 海野 肇・橋本直樹・明島高司：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
- 10) Christopher T.S. : Effect of biofilm growth on steady-state biofilm models, *Biotechnol. and Bioeng.*, Vol. 35, pp. 502-510, 1990
- 11) 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
- 12) 白井隆：流動層，科学技術社，丸善，p. 39, 1977
- 13) Morgan J.M., Forster C.F. and Evison L. : A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges, *Water Res.*, Vol. 24, No. 6, pp. 743-750, 1990
- 14) Figueroa L.A. and Silverstein J.A. : Ruthenium red adsorption method for measurement of extracellular polysaccharides in sludge flocs, *Biotechnol. and Bioeng.*, Vol. 33, pp. 941-947, 1989