

(12) 混合培養系生物膜内の懸濁微粒子の挙動に関する基礎的研究

Transport of Inert Fluorescent Microparticles in Multispecies Biofilms

岡部 聡\*、安田 岳雄\*\*、佐藤 久\*、渡辺 義公\*

Satoshi OKABE\*, Takeo YASUDA\*\*, Hisashi SATOH\*, Yoshimasa WATANABE\*

**ABSTRACT:** The dynamics of spatial distribution of particulate components in mixed population biofilms was investigated using 1  $\mu$ m fluorescent microparticles as tracer. Shifts of the tracer bead spatial distribution in the biofilm were measured by sectioning the biofilm with a microslicer and were compared with model simulations to evaluate the growth-advection concept in the existing biofilm models. The tracer beads could traverse throughout a 360  $\mu$ m thick biofilm within 23 minutes, could be attributed to advective transport via water channels and pores. The release of the entrapped beads were much slower than predicted by a one dimensional model due to spatial and temporal changes in cell density in the biofilm. This evidence implied that cell growth and advection was not balanced due to the presence of biofilm heterogeneity (e.g., pores and voids). Three dimensional observation by a confocal scanning laser microscope clearly indicated that the biofilm consisted of semicontiguous base film and relatively high thickness variation of loose surface film. The substratum was not uniformly covered by the biofilm and cell-free spaces and voids were observed near the substratum. This suggested that the pores, voids and cell-free spaces in the biofilm were firstly filled with growing biomass, thereafter displacement of the tracer beads took place once the cell density reached certain levels. Model assumptions of constant cell density and a continuum concept (flat biomass) are clearly over simplified and should be revised. It was concluded that microbial population dynamics in the biofilm can be determined by not only microbial growth kinetics and physiology, but also by the biofilm structure and growth pattern. One dimensional approach (modeling) is, therefore, adequate to predict biofilm accumulation and its performance, but inadequate to accurately describe the microbial population dynamics in the biofilm.

**KEYWORDS:** population dynamics, biofilms, fluorescent microbeads, confocal scanning laser microscope (CSLM), oxygen microelectrode.

1. はじめに

生物学的排水処理プロセスを安定的に運転し、その処理効率を向上させるためには、従来のように反応器をブラックボックスとして扱い経験的な入出力操作のみの解析では不十分であり、微生物群(生物膜または微生物フロック等)の生態学的構造とその機能の解明が必須であり、多くの研究が活発に行われている<sup>2-4, 9-13, 17, 24)</sup>。近年、生物膜の機能を解析する手法として各種微小電極が開発され、溶存基質の生物膜への輸送機構及び*In Situ*での微生物活性等の解析が可能となってきた<sup>1, 23)</sup>。しかしながら、微生物を含む懸濁性微粒子(particulate components)の生物膜表面への付着及び生物膜内での輸送機構に関してはほとんど知見が得られていない。これら懸濁微粒子の生物膜内での挙動を明らかにすることは、生物膜内のポピュレーションダイナミクスを解析するうえで非常に重要である。混合培養系生物膜内では基質や溶存酸素及び空間をめぐる微生物種間の競合が生じ、既存の生物膜モデルでは競合に不利な微生物種(一般的に増殖速度や収率係数の小さい微生物)は強者の増殖により生物膜表面方向に押し出され、最終的に生物膜表面は強者に占領され、弱者は深層部のみに存在可能であると考えられている<sup>7, 16)</sup>。しかしながら既往の研究では、活発に増殖している好気性のheterotrophic biofilmsの表面にも競合に不利と考えられる硝化細菌や絶対嫌気性細菌である硫酸塩還元細菌が堅実に

\* 北海道大学工学部衛生工学科 (Dept. of Sanitary Eng., Hokkaido Univ.)、〒060 札幌市北区北13条西8

\*\* 日本上下水道設計(株)(Nihon Jyousesuido Consultants, Co., Ltd.)、〒730広島市中区国安奉寺町2-1-23

存在する事が報告されている<sup>12, 13, 22, 24)</sup>。この事実は微生物の動力学や既存の生物膜モデルでは十分に説明できない。この理由として、生物膜内での微生物を含む懸濁物質の輸送メカニズムや生物膜構造との相互関係に関する知見が皆無であるためである。そこで本研究では、直径1 $\mu$ mのラテックスビーズをトレーサーとして用い、生物膜への付着、浸透及び生物膜内での輸送を実験的に測定した。ある特定の微生物の挙動を対象とせず、微生物に類似するラテックスビーズを用いることにより、菌体計測の手間や不確実性を排除でき、より正確に懸濁微粒子の挙動を追跡することが可能である。同様のラテックスビーズを用いた研究はDruryら<sup>5,6)</sup>やTijhuisら<sup>18)</sup>によって報告されているが、Druryら<sup>5,6)</sup>は人工基質で培養した非常にルーズで膨潤で比較的若い*Pseudomonas aeruginosa*の純粋培養系生物膜を用いており、都市下水を基質とした比較的強固な混合培養系生物膜内におけるビーズの挙動とは大きく異なると考えられる。またTijhuisら<sup>18)</sup>は、人工下水を基質としエアリフト生物膜流動床(BASR)で馴養した混合培養系生物膜内でのビーズの平均滞留時間を測定し、BIOSIM<sup>19, 20)</sup>による計算結果と比較検討したが、生物膜内の膜深さ方向のビーズ密度分布は測定しておらず、生物膜内での詳細なビーズの挙動は解明されていない。本研究では、都市下水を流入基質とし馴養した生物膜を用い、生物膜深さ方向のトレーサービーズ密度及び細菌密度分布の経時変化を測定し、ビーズの侵入及びその後の輸送機構を解析した。また、既存の一次元生物膜モデル(BIOSIM)<sup>19, 20)</sup>を用い膜深さ方向の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することにより、モデルの"growth-advective flux concept" (微生物の増殖により隣の微生物が膜表面に押し出しされるという単純化された仮定)の妥当性を検討した。

2. 実験装置と方法

トレーサービーズの生物膜への付着、浸透及び生物膜からの吐き出し現象は表－1に示すように4つの異なる実験条件で行った。生物膜内でのビーズの存在する位置がビーズのポピュレーションダイナミックスに与える影響を評価するために、ビーズを生物膜増殖の初期と後期に添加した。

Table 1. Experimental Protocols

| Experiment | Medium     | Dilution rate<br>(h <sup>-1</sup> ) | Time at bead<br>addition<br>(day) | Length of bead<br>addition<br>(hour) | Average L <sub>r</sub> at the<br>end of bead addition<br>( $\mu$ m) |
|------------|------------|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Run-1      | Synthetic  | 0.26                                | 0                                 | 24                                   | 25                                                                  |
| Run-2      | Synthetic  | 0.26                                | 14                                | 24                                   | 170                                                                 |
| Run-3      | Wastewater | 0.35                                | 6                                 | 24                                   | 40                                                                  |
| Run-4      | Wastewater | 0.14                                | 49                                | 24                                   | 360                                                                 |

2-1.            マイクロビーズの特徴            本研究で用いた蛍光ラテックスマイクロビーズ(No.15702, Polysciences)は平均直径1 $\mu$ m、比重は1.05、表面は負の電荷を帯びている。蛍光色素(FITC)はビーズ内部に取り込まれているため衰退することなく、微生物に対して毒性を持たない。また通常の蛍光顕微鏡を用いることにより微生物や他の物質と容易に識別が可能である。

2-2. 生物膜リアクターと生物膜の馴養    本研究では、札幌市創成川下水処理場に設置したベンチスケールの半水没型回転円板装置(反応槽体積1.4L、生物膜表面積2830cm<sup>2</sup>)を用いた。円板の一部は生物膜のサンプリングのために抜き取れるように加工してある。生物膜は、同下水処理場の活性汚泥を種汚泥として用い約一週間バッチで運転し、その後、人工下水(runs-1&2)と最初沈澱池流出水(runs-3&4)を流入基質として連続運転を行ない培養した(円板回転速度14rpm)。人工基質の組成はNH<sub>4</sub>Cl, 73.4; NaHCO<sub>3</sub>, 600; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 70; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 100; NaCl, 71; sodium acetate, 17.1(mg/L)である。実験装置及び運転方法の詳細は参考文献(13)と同様である。

2-3. ビーズの添加 流入及び流出水を停止し、2%のビーズ溶液(2mL)を直接反応槽に添加し、24時間バッチで馴養した。ビーズの添加時期は表-1に示すとおりである。液本体ビーズ濃度はバッチ期間中約 $5 \times 10^{10}$ から $2 \times 10^{11}$  beads/mLであった。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及び全細菌密度分布の経時変化を以下に示す様に測定した。

2-4. 測定方法 採取した生物膜をマイクロスライサー™(DSK Model DTK-1000)により膜深さ方向にスライスし<sup>12,13)</sup>、スライスした生物膜断片をホモジナイズした後、全細菌数及びビーズの測定に供した。全細菌数はアクリジンオレンジ(0.02% in 2%ホルマリン溶液)で約2-4時間染色し、ビーズは無染色で直接蛍光顕微鏡(NIKON, X2F-EFD2, B-2A filter(BP450-490), 対物レンズCF Fluor 100X)でHobbieら<sup>8)</sup>の方法に従って計数した。計測されたビーズ密度は、シミュレーションとの比較のため(ビーズ)/(ビーズ+全細菌数)の比で表わした。生物膜厚はマイクロスライサーでスライスした全層厚を合計することにより算出した。生物膜の構造は共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡(Carl Zeiss LSM-310、アルゴンレーザ 488nm & 514nm, BP515-540, 対物レンズ10X)(CSLM)を用いて3次的に観察した。生物膜試料は0.02%のアクリジンオレンジ溶液で染色、 $\text{ddH}_2\text{O}$ で洗浄後、0.1%のアーガロース(Agarose 1600, 和光純薬(株))で固定した<sup>10)</sup>。生物膜の機能を把握するために流出水水質(TOC, DOC,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ , DO)を定期的に測定した。

2-5. 微小酸素電極 生物膜内の溶存酸素濃度分布を測定するために、カソードタイプの(微小電極先端の直径は約20 $\mu\text{m}$ )をRevesbech and Jorgensen<sup>15)</sup>の手法に従って作成した。予め採取した生物膜をフローセルリアクター内に固定し、酸素飽和した人工基質を連続流入(流速=0.04m/s)し約12時間馴養した後、生物膜内DO濃度分布を水平方向に100 $\mu\text{m}$ 間隔で1000 $\mu\text{m}$ にわたって測定した。参照電極にはAg/AgClタイプ(HORIBA, 2010A-06T)を用いた。

2-6. モデルシミュレーション Wanner & Gujer<sup>19,20)</sup>が提案した一次元生物膜モデル(BIOSIM)を用いて生物膜内の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た。このモデルは生物膜を均一でフラットな連続体として取り扱い、溶存基質及び各種微生物密度(ビーズも含む)は膜深さ方向(z軸方向)のみに変化すると仮定してある。しかしながら固相比(solid volume fraction)は時間的、空間的に一定と仮定されており(固相比+液相比=1.0)、微生物の増殖に伴う生物膜体積の膨張は支持体から生物膜表面方向へのみ生じ、懸濁微粒子の支持体方向への移動は考慮されていない。本シミュレーションでは5つの溶解性基質( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , DO, 酢酸)と4つの懸濁成分(他栄養性細菌、アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌、トレーサービーズ)を対象とした。シミュレーションに用いた代表的なパラメーターや初期値を表-2に示す。各種微生物の動力学係数は文献(12)を参考にした。生物膜の剥離速度(erosion, sloughing等)に関する定量的な実験のデータが存在しないので、剥離速度を変化させて生物膜の増殖カーブにフィットするようモデルをキャリブレーションした。

### 3. 実験結果と考察

#### 3-1. 生物膜の特徴

運転開始初期には、他栄養性細菌が優占種と思われる透明もしくは白色のマイクロコロニーが円板表面に不均一に付着した。初期の生物膜は凹凸が顕著であったが、増殖と共にスムーズで強固なこげ茶色の生物膜となった。図-1には各runにおける生物膜厚の増加を示す。各runにおいて基質除去(有機物除去及びアンモニア性窒素の硝化)は連続運転開始後約10日間で安定したにもかかわらず、生物膜厚は30日以降も増加し続け、その後定常に達した。run-4を除くすべてのrunで30日前後で生物膜の剥離が著しくなり実験を強制的に終了しなければならなかった。

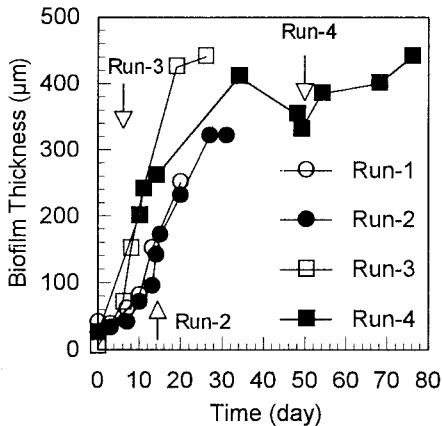
**Table 2.** Initial conditions and parameters used in the model simulations.

| Parameters                                              | Values                | Reference |
|---------------------------------------------------------|-----------------------|-----------|
| Liquid boundary layer thickness ( $\mu\text{m}$ )       | 70                    | (12)      |
| Fraction of liquid phase in the biofilm (-)             | 0.8                   | (20)      |
| Fraction of solid phase in the biofilm (-)              | 0.2 <sup>a</sup>      | (20)      |
| Intrinsic density of cell mass ( $\text{g m}^{-3}$ )    |                       |           |
| heterotrophs                                            | $5.0 \times 10^4$     | -         |
| nitrifiers                                              | $1.07 \times 10^5$    | -         |
| Ratio of diffusivity in biofilm to water (-)            | 0.8                   | (20)      |
| Diffusion coefficient ( $\text{m}^2 \text{day}^{-1}$ )  |                       |           |
| acetate                                                 | $1.04 \times 10^{-4}$ | (14)      |
| $\text{NH}_4^+$                                         | $1.86 \times 10^{-4}$ | (14)      |
| $\text{NO}_2^-$                                         | $1.86 \times 10^{-4}$ | (14)      |
| $\text{NO}_3^-$                                         | $1.86 \times 10^{-4}$ | (14)      |
| $\text{O}_2$                                            | $2.19 \times 10^{-4}$ | (14)      |
| Reactor Volume ( $\text{m}^3$ )                         | $1.37 \times 10^{-3}$ | -         |
| Biofilm area ( $\text{m}^2$ )                           | 0.283                 | -         |
| Initial $\text{NH}_4^+$ -N conc. ( $\text{mg L}^{-1}$ ) | 20                    | -         |
| Initial acetate conc. ( $\text{mg L}^{-1}$ )            | 5                     | -         |
| Initial DO conc. ( $\text{mg L}^{-1}$ )                 | 3.5                   | -         |

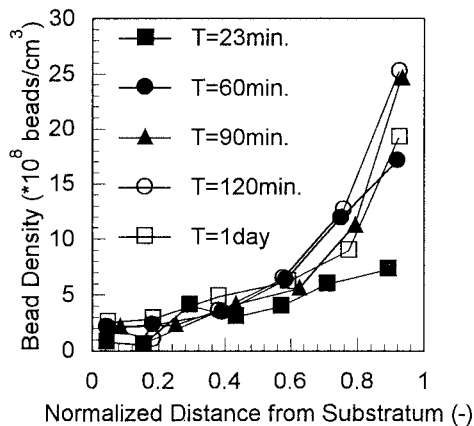
<sup>a</sup> Fraction of solid phase ( $f=0.2$ )=fraction of microbial species+fraction of tracer beads.  
The initial fraction of heterotrophs,  $\text{NH}_4$ -oxidizers and  $\text{NO}_2$ -oxidizers was 98:1:1.<sup>12,13</sup>

3-2. トレーサービーズの生物膜への侵入

図-2にはrun-4において生物膜が360 $\mu\text{m}$ の時点で、トレーサービーズを添加した場合のビーズの侵入の様子を示した。ビーズ添加23分後には既にビーズは膜の最深部まで到達し、時間の経過とともに徐々に膜表面のビーズ密度が増加し、90分後にはほぼ平衡密度分布に達した。この非常に素早いビーズの侵入を、もしビーズが生物膜内を分子拡散のみで侵入したと仮定すると、360 $\mu\text{m}$ の生物膜を移動する時間スケール( $L_t^2/D$ , ここで直径1 $\mu\text{m}$ のビーズの拡散係数をStokes-Einsteinの式より $D=1.53 \times 10^{-9} \text{m}^2 \text{h}^{-1}$  at 20°Cと仮定する)は約85時間となる。つまりビーズの素早い侵入はビーズの分子拡散のみでは説明できず、その他の要因を考えなければならない。本研究で用いた生物膜は下水を基質とする混合系生物膜であり、DeBeerら<sup>2-4)</sup>、Druryら<sup>5-6)</sup>、Stoodleyら<sup>17)</sup>が用いたpure cultureもしくはdefined mixed



**Figure 1.** Progressions of biofilm thickness. Arrows indicate the tracer bead addition. The tracer beads were added at T=0 for run-1.



**Figure 2.** Penetration of the tracer beads into the biofilm (run-4). The tracer beads were added at T=49days.

cultureの生物膜と比較すると、より強固で厚く密度も高いが、生物膜内には局所的な生物群集(microcolony)が存在し、その周囲を取り巻く水流がしばしば観察された。また後述するように、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡による観察の結果、生物膜内には水路や間隙が存在しビーズは移流によって膜深部まで侵入し付着したと考えられる。

### 3-4. トレーサービーズの生物膜からの吐き出し

ビーズを添加し24時間バッチ運転の後、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挙動を追跡した。連続運転再開後、液本体のビーズ濃度は常に検出限界以下であった。取り込まれたビーズは非常にゆっくりと液本体に吐き出され、連続運転再開後20日までにrun-4を除き全ビーズの約20%が液本体に移行した(図-3)。run-4では64%のビーズが液本体に移行した。この理由としてrun-4の生物膜はほぼ定常に達しており、(増殖+付着)速度が剥離速度と平衡状態であるのに対し、他の生物膜は増殖期であるため、(増殖+付着)速度が卓越し比較的剥離速度が小さかったためである。またrun-4では、生物膜内のビーズの存在位置が主に増殖の活発な表層部であるのに対して、その他のrunでは膜深部であり、表層部ではビーズの押し出し速度が速くより多くのビーズが押し出されたためである。この事実は生物膜深層部は微生物の抑留時間(Solid retention time)が表層部に比べて長く、ポピュレーションダイナミクスに及ぼす影響が大きいことを示唆している。

生物膜全体としてビーズの減少量は約20%であったが、生物膜内の膜深さ方向の密度分布には顕著な変化が見られた(図-4)。ビーズを生物膜の増殖初期に添加した系(run-1とrun-3)では、7日までは生物膜が薄くスライスできなかったために密度分布は測定出来なかったものの、膜深部のビーズ密度は時間の経過と共に膜表面方向に移行し密度勾配は徐々にフラットとなり、その一部は液本体へ吐き出された(図-4a、4b)。これに対しビーズを生物膜の増殖中期(run-2)及びほぼ定常に達した時に添

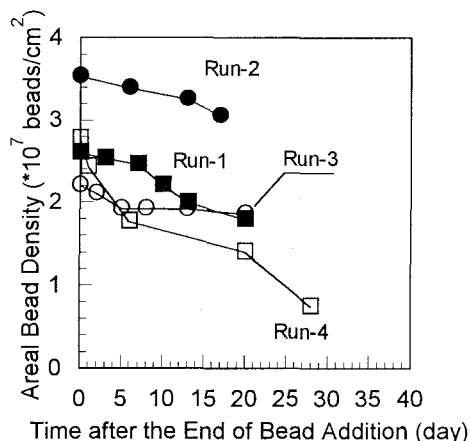


Figure 3. Decreases in total entrapped beads in the biofilms.

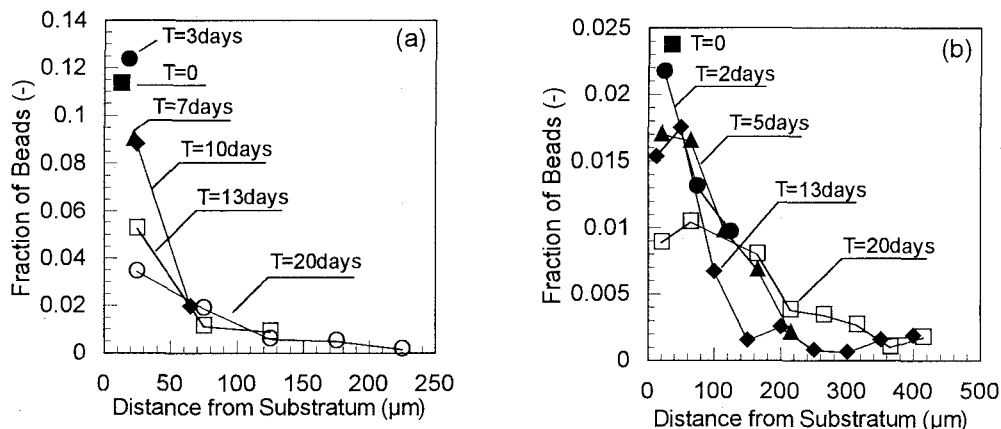
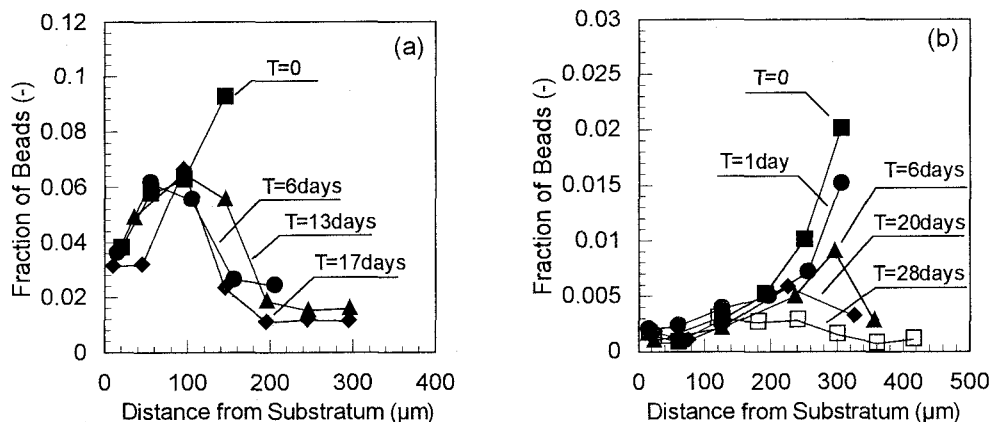


Figure 4. Changes in the tracer bead spatial distribution in actively growing biofilms for (a) run-1 and (b) run-3 during the bead release period. The beads were added at the early accumulation stage.



**Figure 5.** Changes in the tracer bead spatial distribution in the mature biofilms for (a) run-2 and (b) run-4 during the bead release period. The beads were added at the later accumulation stage.

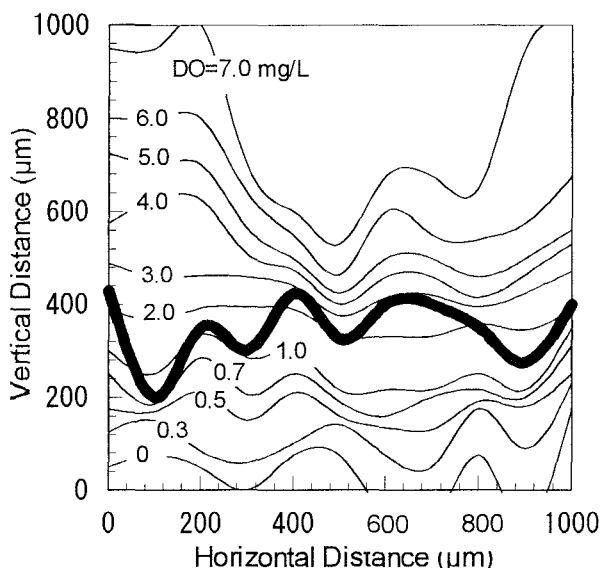
加した系(run-4)では、膜深部でのビーズ密度には顕著な変化は見られないが、表層約100 $\mu\text{m}$ でビーズ密度は徐々に減少した(図-5a, 5b)。図-5aに示すようにrun-2では17日後には支持体から約100 $\mu\text{m}$ 付近にピークを持つ凸型の密度分布となった。同様の現象がrun-4においても観察された(図-5b)。

DO微小電極による生物膜内DO濃度分布の測定では、最大でもDOは膜表面から約150-200 $\mu\text{m}$ 程度しか浸入できず(図-6)(液本体DO濃度=7.3mg/Lの場合)、またモデルシミュレーションから酢酸及び $\text{NH}_4^+$ の侵入深さは100 $\mu\text{m}$ 未満であり、100 $\mu\text{m}$ 以深は基質の拡散律速であると考えられる。つまり表層約100 $\mu\text{m}$ のみが実際に活発に増殖しており、その結果ビーズの密度もこの表層で著しく減少した。生物膜が比較的薄い場合(例えばrun-1やrun-3)は、生物膜の構造がより不均一でroughであることに加えて、基質がほぼ完全に浸透すると考えられるため膜深部でも微生物は増殖しビーズを押し出すドライビングホースとなりうる。図-6で示すように、等DO濃度線は支持体に対して平行ではなく、生物膜表面に沿った形となり、等DO濃度線間隔から推定される酸素フラックスは液本体から生物膜表面にほぼ直角に方向づけられる。生物膜内に微生物活性が局在すること及び生物膜表面の凹凸により乱流が生じること等により、等DO濃度線の間隔は一定でない。すなわち生物膜表面は水平方向に一樣に増殖するのではなく、局所的に増殖し表面に付着したビーズ等を覆い隠すと考えられる。

式(1)で表現されるような簡単な吸着-脱着モデル<sup>5, 6, 18)</sup>を用いてビーズの一次脱離速度係

$$X_b = X_b^0 \cdot e^{-\alpha t} \quad (1)$$

数( $\alpha$ )を求めた(表-3)。ここで、 $X_b$ =単位面積あたりのビーズ密度(ビーズ/ $\text{cm}^2$ )、 $X_b^0$ =初期単



**Figure 6.** A oxygen contour plot, measured at flow velocity of 0.04 m/s and DO concentration in the bulk liquid of 7.3 mg/L. The water flows perpendicular to the x-axis. The thick line represents the surface of biofilm.

位面積あたりのビーズ密度(ビーズ/cm<sup>2</sup>)、 $\alpha$ =一次脱離速度係数(1/h)、 $t$ =経過時間(h)。溶解性基質の拡散律速のため生物膜の深層部は活発に増殖していないことを考慮に入れるため、一次脱離速度係数を生物膜全体及び表層部(表層約50 $\mu$ m)においてそれぞれ算出した。生物膜内の微生物の平均比増殖速度( $\mu$ )をモデルシミュレーションにより求めた生物膜内の基質濃度分布(DO, 酢酸, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)から Monod式を用いて算出した(表-3)。ビーズの脱離(吐き出し)速度係数は全ての実験において、生物膜全体で見ると0.0016h<sup>-1</sup>以下、表層部のみでも0.01h<sup>-1</sup>以下であるのに対し、微生物の比増殖速度( $\mu$ )は平均で0.025h<sup>-1</sup>であり2倍以上も大きい。生物膜の培養条件(リアクターの種類、微生物の種類、せん断力、基質の負荷等)が異なれば、形成される生物膜の構造や強度が異なるために、ビーズの脱離(吐き出し)速度に大きな影響を与えると考えられる。表-3に示すようにTijhuisら<sup>18)</sup>の報告では、人工下水を基質としエアリフト生物膜流動床反応槽(BASR)で馴養した混合培養系生物膜は強固で比較的スムーズであり、ビーズの吐き出し速度は0.0021-0.0024h<sup>-1</sup>(生物膜全体)であった。一方、Druryら<sup>5,6)</sup>の生物膜は人工基質で培養した*P.aeruginosa*の純粋培養系生物膜であるため、非常にルーズで膨潤な比較的若い生物膜であり、ビーズの吐き出し速度は0.021-0.03h<sup>-1</sup>と本研究で得られた値より10-100倍程度大きな値を示した。このように一般的にルーズな生物膜ほどビーズの脱離速度は高くなる傾向にあった。

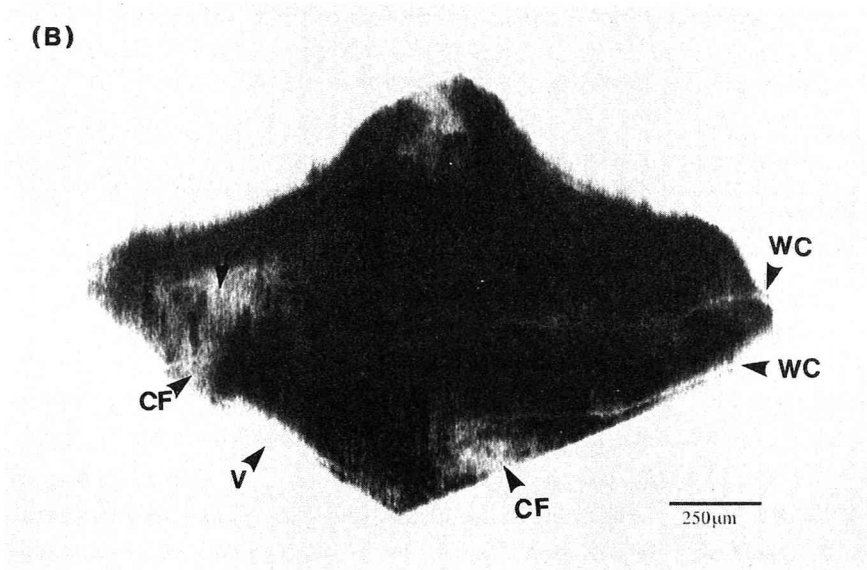
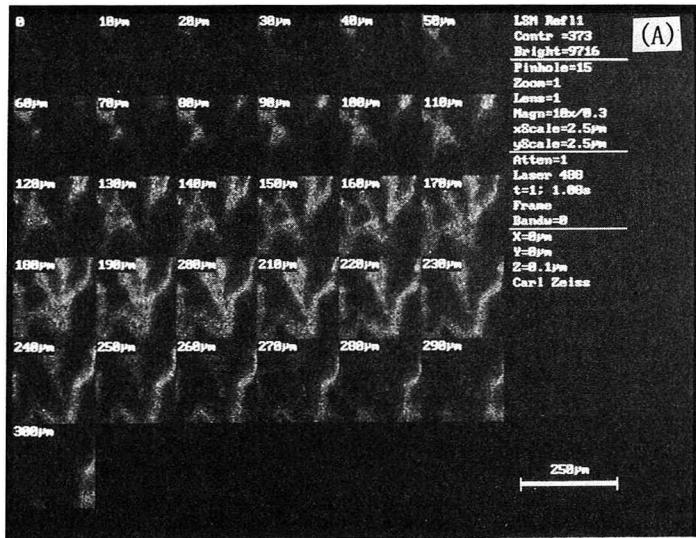
**Table 3.** Measurements of the release rates of tracer beads from biofilms in various reactors.

|                                                                                       | Run-1                 | Run-2  | Run-3      | Run-4  | Tijhuis <i>et al.</i> <sup>18)</sup> |                | Drury <i>et al.</i> <sup>5)</sup> |                |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------|------------|--------|--------------------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|
| Type of reactor                                                                       | Rotating disk reactor |        |            |        | BASR                                 |                | Rotatorque <sup>TM</sup>          |                |
| Type of microorganisms                                                                | Mixed population      |        |            |        | Mix. pop.                            |                | <i>P. aeruginosa</i>              |                |
| Type of substrate                                                                     | Synthetic             |        | Wastewater |        | Synthetic                            |                | Synthetic                         |                |
| Biofilm surface specific substrate load rate (g-TOC m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> ) | 0.15                  | 0.15   | 0.21       | 0.08   | 25 <sup>a</sup>                      | 5 <sup>a</sup> | 1.7                               | 1.7            |
| (g-N m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )                                                | 0.62                  | 0.62   | 0.83       | 0.33   | 7.2                                  | 20             | 0.55                              | 0.55           |
| 1st order release rate coeff. in the outermost layer (h <sup>-1</sup> )               | 0.0098                | 0.0061 | 0.0041     | 0.0031 | - <sup>b</sup>                       | - <sup>b</sup> | - <sup>b</sup>                    | - <sup>b</sup> |
| in the entire biofilm (h <sup>-1</sup> )                                              | 0.0009                | 0.0004 | 0.0002     | 0.0016 | 0.0021                               | 0.0024         | 0.021                             | 0.030          |
| Average cell growth rate in the active layer (h <sup>-1</sup> )                       | 0.015                 | 0.017  | 0.043      | 0.023  | 0.037                                | 0.056          | 0.077                             | 0.110          |

<sup>a</sup> (g-COD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>). <sup>b</sup> Not available.

### 3-5. CSLMによる生物膜の観察

生物膜の構造を把握するために、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡(CSLM)を用いて観察した。図-7a-dにはrun-4においてビーズ添加約1週間後(培養55日目)の生物膜を示す。図-7aはCSLMによりz軸方向(膜深さ方向)に10 $\mu$ m間隔でoptical sectioningした画像のシリーズを示す。各層において切断面が不均一であることが伺える。この30枚におよぶoptical sectioningの画像を3次元的に再構築したものが図-7bである。生物膜表面は凹凸に富み、支持体表面は一樣に生物膜で覆われておらず空隙(V)、微生物の密度が粗の領域(CF)、水路(WC)等が存在することが観察できる。増殖初期の生物膜はpatchyでdiscreteなマイクロコロニーでありこれらが支持体全体に増殖した結果、このような不連続なbase filmの上にルーズで凹凸に富む表層が形成されたと考えられる。図-7cは異なる視野において支持体から140 $\mu$ mにおけるx-y断面の画像であり、空隙(V)や細孔が観察される。A-A, B-Bの位置における切断面が図-7d, 7eである。鉛直方向の蛍光部(白色部)と無蛍光部の縞模様は鉛直方向に伸びる生物膜と空隙または水路の配列を示している。これら水路は生物膜の深層部と液本体を連結し溶解性基質やビーズの輸送に貢献しているものと思われる。



**Figure 7.** Confocal micrographs of a 55-day-old biofilm, showing a representative biofilm heterogeneous structure. (a) series of optical sectioning images (10  $\mu\text{m}$  interval) of a vertical scan, (b) three-dimensional reconstruction of the optical sectioning images (CF: cell-free space, V: void or pore, WC: water channel), (c) horizontal (x-y) image, 140  $\mu\text{m}$  from the substratum, (d) sagittal (x-z) view at A-A optical cutting position, (e) (y-z) view at B-B optical cutting position.

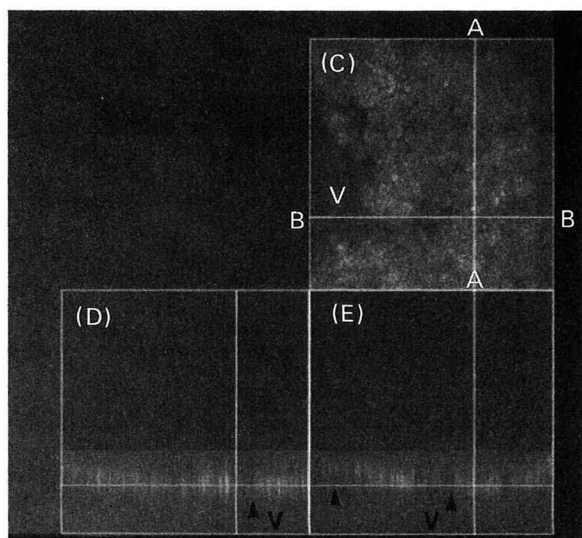
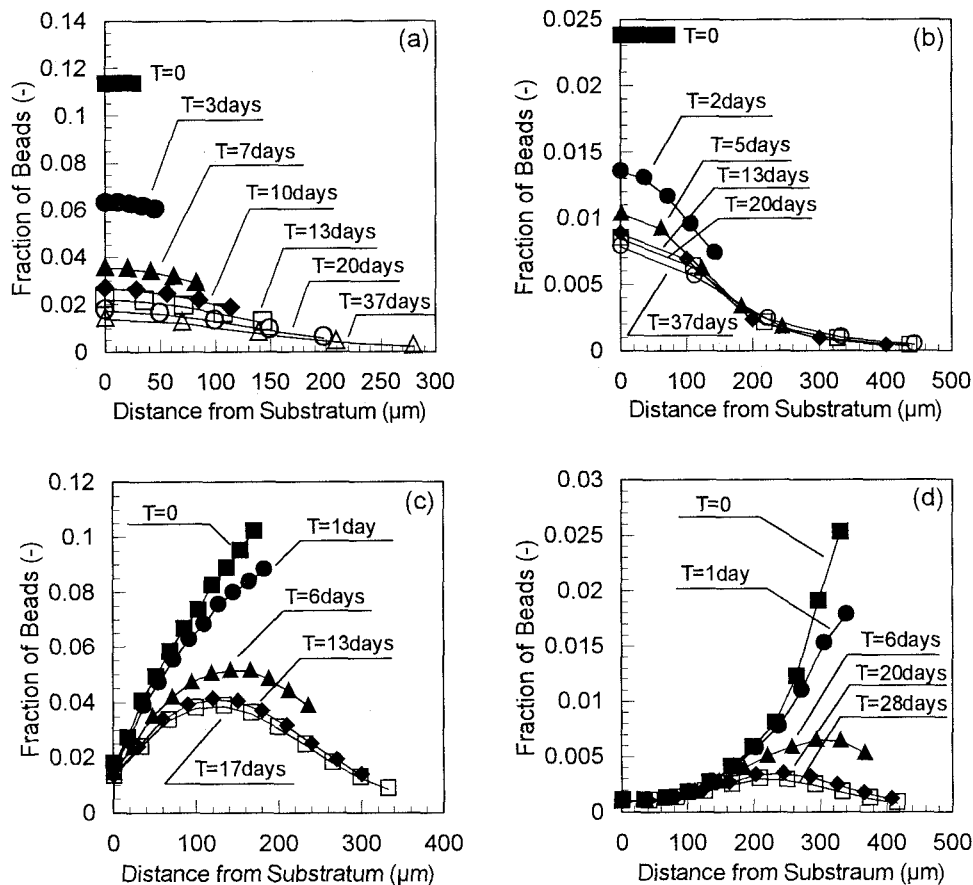


Figure 7. (continued)

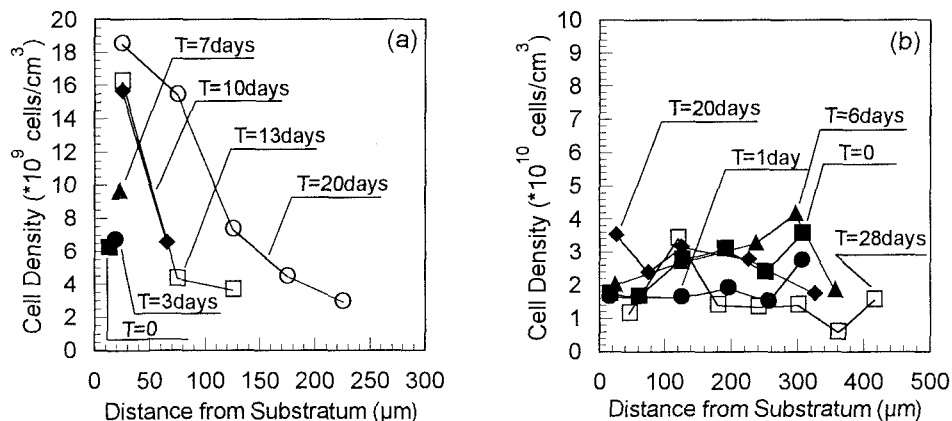
### 3-6. モデルシミュレーションとの比較

生物膜モデル(BIOSIM)を用いて生物膜内の膜深さ方向のビーズ密度分布をシミュレーションし、実験結果と比較検討した。生物膜へのビーズの侵入現象はうまくシミュレーションできなかったため、吐き出し現象のシミュレーション結果のみを図-8に示す。このシミュレーションでは図-2でビーズ添加24時間後のビーズ密度分布を初期分布として用いた。ビーズを生物膜の増殖初期に添加した系(runs-1&3)では、初期のビーズ密度分布は膜深さ方向に均一であると仮定した。成長期にある生物膜の場合(例えばruns-1&3)(図-8a, 8b)、実験結果と比較するとビーズが表面方向に移動し密度勾配が徐々にフラットになるという一般的現象はある程度表現できたが、モデルシミュレーションの方が初期のビーズ密度の減少が非常に速い結果となった。一方、ほぼ定常に達した生物膜の場合(run-4, 図-8d)、両者に多少のずれは見られるもののビーズの挙動をある程度表現できたと思われる。図-8a, 8bでモデルシミュレーションと実験結果の間に大きな食い違いが生じた理由として、生物膜内の微生物密度分布の影響が考えられる。モデルでは生物膜内の微生物密度は時間的、空間的に一定と仮定されており、微生物の増殖と生物膜体積の膨張のバランスが取れていて、微生物の増殖が直接ビーズの押し出し速度に比例する。しかし現実には図-9aに示すように、特に成長期にある生物膜の場合(run-1)、微生物密度が時間の経過と共に、特に支持体近傍で増加する傾向にあった。ゆえに微生物の増殖がビーズの押し出し速度に直接反映されなかったため、シミュレーションでは実験結果よりも著しく速く支持体近傍のビーズ密度が減少する結果となった。定常にほぼ達した生物膜(run-4)は微生物密度が時間的にも空間的にも比較的一定であったため(図-9b)、比較的良好なシミュレーション結果が得られたと考える。またモデルでは、微生物の増殖により生物膜の体積が膜表面方向にのみに膨張すると仮定されているが、実際には微生物密度は3次元的に増加するため膜表面方向にビーズを押し出す速度は遅くなる。以上のことより、生物膜内の微生物密度勾配の変化を考慮に入れると更に正確にビーズの挙動を表現できるとと思われる<sup>21)</sup>。

マイクロビーズは自己増殖できないにもかかわらず、生物膜の不均一構造(空隙や水路の存在)により、活発に増殖する生物膜内に長期間存在することが可能であった。この事実は既往の研究で示唆されたように、活発に増殖する生物膜表面に硝化細菌や硫酸塩還元細菌が比較的高密度で存在できるこ



**Figure 8.** Model simulations on changes in the tracer bead spatial distribution in the biofilms for (a) run-1, (b) run-3, (c) run-2 and (d) run-4.



**Figure 9.** Changes in spatial distributions of total cell density in the biofilms for (a) run-1 and (b) run-4.

とを裏付けている。硝化細菌や硫酸塩還元細菌は、増殖速度が遅く収率係数が低いとはいえ増殖可能であり、剥離や押し出しによる損失をカバーすることができ、生物膜内における微生物間の競合に関してはビーズよりも有利である。ゆえに生物膜内のポピュレーションダイナミックスを解析するためには、微生物の動力学や生理学に加えて、生物膜の構造解析も重要な要因となる。

#### 4. 結論

蛍光ラテックス(直径 $1\mu\text{m}$ )をトレーサーとして用い、混合培養系生物膜内のポピュレーションダイナミックスを解析する基礎的実験として、マイクロビーズの挙動を実験により測定し、既存のモデルによるシミュレーション解析と比較検討した。その結果、添加されたビーズは $360\mu\text{m}$ の生物膜深部まで素早く浸透し、取り込まれたビーズはシミュレーションよりも長く生物膜内に保持された。共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡による生物膜の三次元構造解析の結果、生物膜の表面は凹凸に富み、空隙や水路が存在する不均一な構造を持つことが明らかとなった。以上のことより、ビーズは水路や空隙内を移流によって生物膜内に侵入し、付着する。生物膜は主に膜表面及び液本体に接する水路の周囲などから成長するため、水路や空隙を塞ぎ付着したビーズを捕獲すると考えられる。生物膜内のポピュレーションダイナミックスは、微生物の動力学のみでなく、生物膜の構造及び成長過程に大きく影響されることが明らかとなった。故に、一次元的な分析手法及び既存の一次元生物膜モデルのみでは、生物膜内のポピュレーションダイナミックスを表現するには不十分である。生物膜の不均一構造を考慮に入れた新しい生物膜モデル(三次元モデル?)及び生態学的構造の *In Situ* での三次元的解析技術の開発が今後の研究課題である。

#### 5. 謝辞

共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡の観察において、北海道大学農学部森林科学科の船田 良助教授、大学院修士過程の古澤 治君、及び工学部衛生工学科大学院修士過程の黒田 浩史君の多大なご協力を頂いたことをここに付記し、深く感謝致します。

#### 【参考文献】

- 1) deBeer D., van den Heuvel J. C., and Ottengraf S. P. P. (1993) Microelectrode measurements of activity distribution in nitrifying bacterial aggregates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 573-579.
- 2) deBeer D. and Stoodley P. (1995) Relation between the structure of an aerobic biofilm and transport phenomena. *Wat. Sci. Tech.*, **32**, 11-18.
- 3) deBeer D., Stoodley P. and Lewandowski Z. (1994a) Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 636-641.
- 4) deBeer D., Stoodley P., Roe F. and Lewandowski Z. (1994b) Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 1131-1138.
- 5) Drury W. J., Characklis W. G. and Stewart P. S. (1993) Interactions of  $1\mu\text{m}$  latex particles with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Wat. Res.*, **27**, 1119-1126.
- 6) Drury W. J., Stewart P. S. and Characklis W. G. (1993) Transport of  $1\mu\text{m}$  latex particles in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 111-117.
- 7) Fruhen M., Christan C., Gujer W. and Wanner O. (1991) Significance of spatial distribution of microbial species in mixed culture biofilms. *Wat. Sci. Technol.*, **23**, 1365-1374.
- 8) Hobbie J. E., Daley R. J. and Jasper S. (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence

microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1225-1228.

- 9) Lawrence J. R., Korber D. R., Hoyle B. D., Costerton J. W. and Caldwell D. E. (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.*, **173**, 6558-6567.
- 10) Massol-Deya A. A., Whallon J., Hickey R. F. and Tiedje J. M. (1995) Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 769-777.
- 11) Ohashi A., de Silva D. G., Mobarry B., Manem J. A., Stahl D. A. and Rittmann B. E. (1995) Influence of substrate C/N ratio on the structure of multi-species biofilms consisting of nitrifiers and heterotrophs, *Wat. Sci. Tech.*, **32**, (8), 75-84.
- 12) Okabe S., Hirata K. and Watanabe Y. (1996) Dynamic changes in spatial microbial distribution in mixed-population biofilms: Experimental results and model simulation. *Wat. Sci. Technol.* **32**, (8), 67-74.
- 13) Okabe S., Hirata K. and Watanabe Y. (1996) Microbial spatial distribution of nitrifying bacteria in mixed-population biofilms, *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 24-35.
- 14) Perry R. H. and Chilton, C. H. (1973) Chemical engineer's handbook, 5th ed. McGraw-Hill, New York.
- 15) Revsbech N. P. and Jorgensen B. B. (1986) Microelectrodes: Their use in microbial ecology. *Adv. Microb. Ecol.*, **9**, 293-352.
- 16) Rittmann B. E. and Manem J. A. (1992) Development and experimental evaluation of a steady-state, multispecies biofilm model. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 914-922.
- 17) Stoodley P., de Beer D. and Lewandowski Z. 1994. Liquid flow in biofilm systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2711-2716.
- 18) Tijhuis L., van Benthum W. A. J., van Loosdrecht M. C. M. and Heijnen J. J. (1994) Solid retention time in spherical biofilms in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 867-879.
- 19) Wanner O. and Gujer W. (1984) Competition in biofilms. *Water Sci. Technol.*, **17**, 27-44.
- 20) Wanner O. and Gujer W. (1986) A multispecies biofilm model. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 314-328.
- 21) Wanner O. and Reichert P. (1996) Mathematical modeling of mixed-population biofilms. *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 172-184.
- 22) Watanabe Y., Okabe S., Hirata K. and Masuda S. (1995) Simultaneous removal of organic materials and nitrogen by micro-aerobic biofilms. *Wat. Sci. Technol.*, **31**, (1), 193-203.
- 23) Wijffels R. H., Eekhof M. R., deBeer D., van den Heuvel, J. C. and Tramper J. (1995) Pseudo-steady state oxygen concentration profiles in an agar slab containing growing *Nitrobacter agilis*. *J. Ferment. Bioeng.*, **79** (2), 167- 170.
- 24) Zhang T. C., Fu Y. C. and Bishop P. L. (1994) Competition in biofilms. *Wat. Sci. Technol.*, **29**, (10/11), 263-270.