

B-60 多孔体中における二重間隙微生物輸送モデルのパラメータ推定

○下條 佑樹^{1*}・井上 康^{2*}・山川 哲¹・片山 新太²

¹名古屋大学大学院工学研究科社会基盤工学専攻 (〒464-8603 愛知県名古屋市中千種区不老町)

²名古屋大学エコトピア科学研究所 (〒464-8603 愛知県名古屋市中千種区不老町)

¹* E-mail: h065116m@mbox.nagoya-u.ac.jp, ²* inoue@esi.nagoya-u.ac.jp

1. 背景と目的

地下水汚染浄化手法の一つであるバイオレメディエーションでは、その効率性と安全性を評価するために、微生物の拡がりを予測する手法の確立が必要不可欠である。地下水中における微生物輸送のプロセスは非常に複雑であるため、理想条件下での微生物移動に影響する要素を組み込んだ論理的モデルの構築が重要となる。我々はこれまでに、二重間隙微生物輸送モデルを構築し、微生物輸送現象に対する適用性の検討を行った。しかしながら、未知パラメータをどのように推定するかという点が課題として残された。そこで本研究では、微生物輸送解析に必要なパラメータの初期推定を簡便に行う手法を確立することを目的として、二種類の微生物 (*Sphingomonas paucimobilis* EPA 505株, *Escherichia coli* K12) を用いたカラム実験を行い、本来溶存態が対象であるCXTFIT2 (U.S. Salinity Laboratory) のTwo-regionモデルを援用したパラメータフィッティング方法の検討を行った。

2. 理論的考察

飽和多孔体内における微生物輸送シミュレーションを行うために、我々は式(1), (2)に示すような優先流れを考慮した二重間隙微生物輸送モデルを構築した (山川, 2005)。

$$\frac{\partial(\theta_m c_m)}{\partial t} = \theta_m D_m \frac{\partial^2 c_m}{\partial x^2} - v_m \theta_m \frac{\partial c_m}{\partial x} - \alpha(c_m - c_{im}) - (k_c \theta_m c_m - f k_y \rho_b \theta_{b,m}) \quad (1)$$

$$\frac{\partial(\theta_{im} c_{im})}{\partial t} = \alpha(c_m - c_{im}) - [k_c \theta_{im} c_{im} - (1-f) k_y \rho_b \theta_{b,im}] \quad (2)$$

ここで、 α : 物質移動係数[L³ L³ T⁻¹], c_m : 流動域液相における濃度[ML⁻³], c_{im} : 滞留域液相における濃度[ML⁻³], θ_m : 流動域液相の間隙率[L³ L³ or L⁰], θ_{im} : 滞留域液相の間隙率[L³ L³ or L⁰], k_c : 微生物の吸着速度定数[T⁻¹], k_y : 微生物の脱着速度定数[T⁻¹], f : 固相への吸着サイトの比率, ρ_b : 微生物の密度[ML⁻³], $\theta_{b,m}$: 流動域吸着相微生物の比体積[L³ L³ or L⁰], $\theta_{b,im}$: 滞留域吸着相微生物の比体積[L³ L³ or L⁰], D_m : 分散係数[L² T⁻¹], v_m : 間隙流速[LT⁻¹]である。添字 m は流動域, 添字 im は滞留域を表す。

このモデルの特徴は、媒体領域を移流や水理学的分散が生じる流動域 (mobile region) と、地下水流動がなく拡散のみによる物質移動が生じる滞留域 (immobile region) の2種類に分割していることである。また、微生物の固相への吸着プロセスは、吸着だけでなく脱着も考慮されており、一次速度式で表現されている。

CXTFIT2では、地下水帯の一次元定常流れにおける溶質の輸送をモデル化している (Toride ら, 1995)。CXTFIT2を用いることにより、時間と物質濃度の実測データに対して、一次元移流分散や式(3), (4)のような一次元 Two-region 移流分散をモデルとしたパラメータフィッティングを行うことができる。

$$(\theta_m + f \rho_b k_d) \frac{\partial c_m}{\partial t} = \theta_m D_m \frac{\partial^2 c_m}{\partial x^2} - v_m \theta_m \frac{\partial c_m}{\partial x} - \alpha(c_m - c_{im}) - \theta_m \mu_{i,m} c_m \quad (3)$$

$$[\theta_{im} + (1-f) \rho_b k_d] \frac{\partial c_{im}}{\partial t} = \alpha(c_m - c_{im}) - \theta_{im} \mu_{i,im} c_{im} \quad (4)$$

ここで、 $\mu_{i,m}$: 流動域の液相から固相への微生物の一次堆積速度定数[T⁻¹], $\mu_{i,im}$: 滞留域の液相から固相への微生物の一次堆積速度定数[T⁻¹], k_d : 固相への吸着係数 [L³ M⁻¹], ρ_b : かさ密度[ML⁻³]である。

本研究では、二重間隙微生物輸送モデルの一部のパラ

メータを初期推定するために、Two-region モデルを用いた。このモデルでは、多孔体内における溶質の移流、分散、吸着、分解、生成、領域間移動が考慮されているが、ここでは微生物輸送を対象としているため、微生物の堆積を考慮する必要がある。そのため、CXTFIT2 の Two-region モデルの分解項は一次反応速度で表現されているため、便宜的に微生物の堆積項として置き換えた。

3. 実験方法

Spingomonas paucimobilis EPA 505株および*Escherichia coli* K12株を用い、微生物の移動特性を調べた。

(1) *S. paucimobilis* EPA 505 株

この微生物は好気性のグラム陰性菌であり、長さ約 1.5 μm 、幅約 0.5 μm の桿菌である。20%グリセロール培地中に -84°C で保存しておいた菌株を M220 寒天培地上に植菌し、 22°C 、4 日間培養してシングルコロニーを得た。これを 4.0 g/l グルコース-M457 培地 5 ml に植え継ぎ、 22°C で試験管培養した。吸光度 ($\lambda=600\text{nm}$) が 1.0 となったことを確認後、菌液 2 ml を 4.0 g/l グルコース-M457 培地 1000 ml に移した。吸光度が 1.0 となるまで増殖させた後、M457 培地で 3 度洗浄した。さらに、M457 培地 1000 ml で 72 時間培養したものを実験に用いた。

(2) *Escherichia coli* K12 株

液体培地で振とう培養 (30°C 、125rpm) し、開始約 8 時間後の初期定常期の菌を液体培地に懸濁させ、遠心分離 ($8,000\times g$ 、10min) して菌体を得た後、滅菌済みの 9%生理食塩水で 2 回洗浄して培地成分を取り除いた。滅菌済みの 0.9%食塩水に懸濁させて流入液とした。

(3) 実験装置と方法

Fig.1 に示す装置を用いた。内径 2.6cm、長さ 12cm のガラスカラムにガラスビーズ (GB) を飽和充填した。空気の流入を防ぐため、カラム上下端は O リングを用いて密閉し、また GB の流出を防ぐため、カラム下端に口径 0.15mm のステンレスメッシュスクリーンを挿入した。3000ml 三角フラスコに 1000ml の微生物懸濁液を用意し、その供給にはペリスタリックポンプを用い、カラム上端に接続した内径 1mm $\times$ 3mm のフロンチューブから行った。カラム下部からの流出水をサンプル瓶で回収した。カラム、GB、サンプル瓶は 121°C 、20 分間オートクレーブ滅菌し、フロンチューブ、ステンレスメッシュスクリーン、O リングは 70%エタノールに浸して滅菌した。滅菌水で飽和させた後、カラム上端から微生物懸濁液を供給して輸送試験を行った。流出水を GB 充填カラ

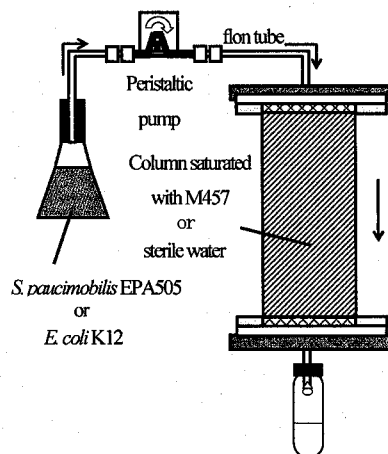


Fig. 1 Schematic diagram of bacterial transport experiment

ムの間隙体積換算で 0.2PV 毎にサンプリングし、吸光度を測定して、微生物濃度を求めた。なお、実験は 22°C の恒温室内で行った。

4. 結果と考察

Fig.2は、*S. paucimobilis* を用いたカラム実験の結果と、NaClトレーサー試験結果から求めた初期推定パラメータを用いた二重間隙微生物輸送モデルの結果を比較したものである。実験値と計算値はあまり適合していないと言える。特に、計算値は実験値の微生物流出初期段階での遅れを再現できていない。この原因として、モデルの初期パラメータとして微生物自体の輸送に対する速度や分散係数、物質移動係数を与えていなかったことや、微生物流出の遅れを考慮しなかったことから、微生物輸送の再現に影響を与えたものと考えられた。

Fig.3に*S. paucimobilis* の破過曲線に対して、CXTFIT2のTwo-regionモデルによってフィッティングを行った結果を示す。また、実験値と最も適合したときのパラメータをTable 1に示す。実験値と計算値は良く適合しているが、実際の流速に対して推定流速が小さな値を示す結果となった。微生物はサイズ排斥などの効果により多孔体内を選択的に移動すると考えられているため、推定流速が小さくなる方向にはないと推測される。そこで、微生物の流出の遅れ ($R=1+(\rho_m k_d)/\theta$) を考慮したパラメータフィッティングを行った。その結果、実験流速と推定流速はほぼ同じ値を示し、実験値と計算値の破過曲線もよく適合した (Fig.4, Table2)。

E. coli K12の結果を用いて、微生物の違いによる推定パラメータの影響を調べた。Table 2より、*E. coli* K12は、多孔体粒径によってRの値が変化するのに対して、*S. paucimobilis*は、多孔体粒径1.0cmで高流速の条件以外は全

Table1 Experiment conditions and CXTFIT parameters determined from the best fittings (*S. paucimobilis*)

Run	Experiment Condition		fitted parameter			
	Mean diameter of Pore velocity GB d_{50} (cm)	v_m (cm/sec)	v_m (cm/sec)	D (cm ² /sec)	θ_m	θ_{im}
1	0.5	1.7×10^{-2}	6.2×10^{-3}	3.7×10^{-5}	0.13	0.31
2	0.5	1.7×10^{-2}	6.2×10^{-3}	5.3×10^{-5}	0.19	0.25
3	1.0	1.7×10^{-2}	3.3×10^{-3}	9.8×10^{-5}	0.35	0.10
4	1.0	1.7×10^{-2}	2.8×10^{-3}	9.4×10^{-5}	0.34	0.12
5	0.5	1.7×10^{-3}	1.0×10^{-4}	4.7×10^{-5}	0.17	0.27
6	0.5	1.7×10^{-3}	1.7×10^{-4}	7.1×10^{-5}	0.25	0.19
7	1.0	1.7×10^{-3}	-	-	-	-
8	1.0	1.7×10^{-3}	5.9×10^{-4}	6.2×10^{-5}	0.22	0.23

Table2 Experiment conditions and CXTFIT parameters determined from the best fittings (considered *R*)

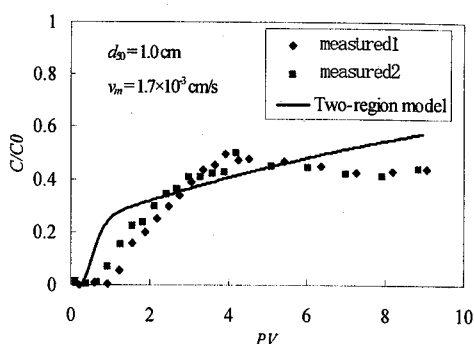
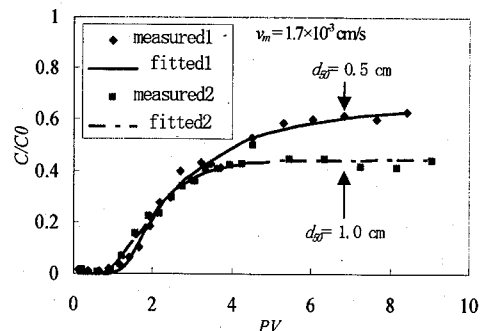
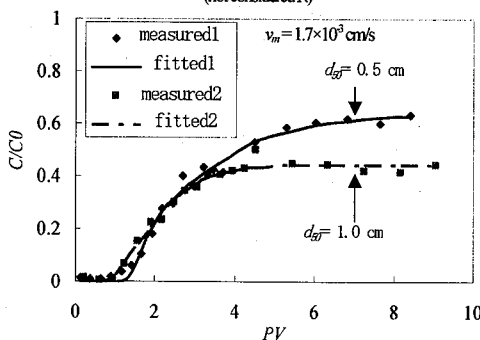
Run	Experiment Condition		fitted parameter					
	Mean diameter of Pore velocity GB d_{50} (cm)	v_m (cm/sec)	v_m (cm/sec)	D (cm ² /sec)	θ_m	θ_{im}	R	
1	0.5	1.7×10^{-2}	1.5×10^{-2}	1.1×10^{-3}	0.13	0.31	3.0	
2	0.5	1.7×10^{-2}	1.6×10^{-2}	6.2×10^{-3}	0.14	0.30	3.3	
3	1.0	1.7×10^{-2}	1.3×10^{-2}	4.0×10^{-3}	0.34	0.12	1.2	
4	1.0	1.7×10^{-2}	1.0×10^{-2}	2.8×10^{-3}	0.27	0.19	1.3	
5	0.5	1.7×10^{-3}	1.0×10^{-3}	1.0×10^{-4}	0.17	0.27	2.8	
6	0.5	1.7×10^{-3}	1.1×10^{-3}	2.0×10^{-4}	0.26	0.19	2.8	
7	1.0	1.7×10^{-3}	1.8×10^{-3}	4.0×10^{-4}	0.19	0.25	3.0	
8	1.0	1.7×10^{-3}	1.7×10^{-3}	5.9×10^{-4}	0.17	0.29	3.2	
9	0.5	1.5×10^{-2}	7.0×10^{-3}	4.0×10^{-4}	0.13	0.31	1.2	
10	0.5	1.5×10^{-2}	7.9×10^{-3}	5.0×10^{-4}	0.12	0.32	1.3	
11	1.0	1.5×10^{-2}	1.6×10^{-2}	2.5×10^{-4}	0.16	0.30	2.4	
12	1.0	1.5×10^{-2}	1.4×10^{-2}	1.7×10^{-3}	0.18	0.28	1.9	
13	0.5	5.5×10^{-3}	5.4×10^{-3}	5.5×10^{-3}	0.20	0.24	2.0	
14	0.5	5.5×10^{-3}	5.3×10^{-3}	6.2×10^{-3}	0.21	0.23	2.2	
15	1.0	5.5×10^{-3}	5.2×10^{-3}	6.3×10^{-3}	0.16	0.29	2.6	
16	1.0	5.5×10^{-3}	5.7×10^{-3}	5.4×10^{-3}	0.18	0.28	3.0	

Run1-8 : *S. paucimobilis* EPA505, Run9-16 : *E. coli* K12

て $R=3.0$ 前後である。*E. coli* K12は親水性微生物であるのに対して、*S. paucimobilis*は疎水性微生物であるため、異なる吸着特性を持つと考えられる。この結果より、疎水性微生物の方がより微生物の遅れの影響が大きいと言える。したがって、疎水性微生物の輸送を再現する際には、微生物の遅れを考慮する必要性が高いと考えられる。

5. 結論

本研究では、微生物輸送解析に必要なパラメータの簡便な初期推定手法の確立を目的として、CXTFIT2を用いたパラメータフィッティングを行い、パラメータを推定した。再現性は良好であったが、流速推定値が現実を表していないことが分かったため、瞬間平衡吸着を考慮することにより、実験値と計算値との適合、流速の推定値と実測値の一致の両者を満たすことが可能となった。CXTFIT2では固相表面への微生物の吸着量を評価できないなどの問題点があり、予測モデルとしては利用出来ないが、微生物輸送モデルのパラメータを初期推定するためには、非常に簡便かつ有効な手法であるといえる。二重間隙微生物輸送モデルでは、瞬間平衡吸着を考慮して

Fig2 *S. paucimobilis* transport and fitted curve by Two-region modelFig3 *S. paucimobilis* transport and fitted curve by CXTFIT2 (not considered *R*)Fig4 *S. paucimobilis* transport and fitted curve by CXTFIT2 (considered *R*)

いないが、微生物流出の遅れを考慮する必要があるものと考えられた。

謝辞

本研究の一部は平成19年度科学研究費補助金若手研究(B) 1971066の援助を受けた。ここに感謝の意を表する。

参考文献

- Toride, N.ら (1995) : The CXTFIT code for estimating transport parameters from laboratory or field tracer experiments, version 2.0. *Research Report No. 137, U.S. Salinity Laboratory, USDA, ARS, Riverside, California.*
- 山川哲 (2006) : 界面活性剤を用いた多環芳香族化合物バイオレメディエーションのモデルに関する実験的検証, 平成17年度名古屋大学工学研究科社会基盤工学専攻修士論文