

# 都市下水処理 MBR から分離培養した特徴的なゲル状コロニー形成細菌の解析

長岡技術科学大学・院工 (非) ○五十嵐智哉 (学) 永井孔明  
(正) 幡本将史 (正) 渡利高大 (非) 牧慎也 (正) 山口隆司

## 1. はじめに

膜分離活性汚泥法 (MBR) は生物学的排水処理法のひとつであり、活性汚泥と処理水の固液分離に膜ろ過を用いることが特徴である。本技術は処理施設のコンパクト化が可能であり、それに加え、良好な処理水質を得られるため世界中で導入が進められている。その一方、MBR は長期運転に伴い膜透過性能の著しい低下をもたらす分離膜の閉塞 (膜ファウリング) が発生する。膜ファウリングの発生要因は未だ明確でなく MBR の適用範囲拡大の制限因子となっている。膜ファウリングは膜面に付着した微生物が生成する細胞外高分子物質 (EPS) などから構成されるバイオフィームが膜面に形成されることが原因の1つである。そのため膜ファウリングを抑制するためには、膜面に付着してバイオフィーム形成を担う細菌 (Biofilm-Forming Bacteria: BFB) を特定し、活性制御を行うことが必要である。そこで本研究では、平板培養法により BFB の分離培養を行い、得られたゲル状のコロニーを形成する分離株について、種の同定とそのゲル状分泌物の組成分析を行った。

## 2. 方法

### 2.1 平板培養

培養試料は、長岡中央浄化センターに設置した A/O-MBR の膜面から採取したバイオフィームを用いた。試料の前処理として、バイオフィームを Milli-Q 水に懸濁し適宜希釈した。調製した平板培地に、前処理を施した試料を塗抹し、28°C でインキュベートした。培養終了後、形成されたコロニーから釣菌し、新たな平板に画線培養することで分離株を得た。

### 2.2 分離株の同定

分離株の同定は 16S rRNA 遺伝子解析により行った。分離株から抽出した DNA を鋳型に、Bac 8F-Uni v. 1492 nm のプライマーペアを用いて PCR 増幅 (94 °C: 5 min, [94 °C: 30 sec, 55 °C: 30 sec, 72 °C: 1 min]×33 サイクル, 72 °C: 10 min) を行い、増幅産

物を精製後、DNA シーケンスに供した。得られたシーケンスデータに対し、Chromas 2.6.6 で低クオリティ領域のトリミングおよび BioEdit 7.2.5 で配列アライメントを行い、分離株の 16S rRNA 遺伝子配列を決定した。これを BLAST 検索により NCBI のデータベースと照合し同定結果を得た。また、MEGA 11 を用いて分子系統解析を行った。系統樹は NJ 法を用いて作成した。

### 2.3 ゲル状分泌物の組成分析

ゲル状分泌物の組成分析は、GC-TOF/MS を用いて行った。試料は、平板培地上に形成されたゲル状コロニーから採取した。採取したゲルを Milli-Q 水に溶かし、菌体の除去のため孔径 0.20 μm のメンブレンフィルターでろ過した試料を GC-TOF/MS 分析に供した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 分離株の同定

MBR 膜面のバイオフィームを培養試料に用いて様々な条件で平板培養を行った結果、ゲル状の特徴的なコロニー (図-1) を形成する細菌 (IK01 株) の分離に成功した。分離した IK01 株は、長さ 1-2 μm、太さ 0.5 μm 程度の桿菌であった。コロニー内における菌体の分布は特徴的であり、互いに距離を保っているような様子であった (図-2)。16S rRNA 遺伝子解析の結果、この IK01 株について 1,355 bp の遺伝子配列を決定した。これを BLAST 検索により NCBI のデータベースと照合した結果、この IK01 株は *Novosphingobium* sp. であることが判明した。*Novosphingobium* 属細菌は自然界に広く分布しており、活性汚泥のほか、有害な化学物質に汚染された土壌、植物の根圏、淡水、海水、温泉などからも分離されている<sup>1)</sup>。また、分子系統解析の結果 (図-3)、この IK01 株が *Novosphingobium capsulatum* と最も近縁であることを明らかにした。*N. capsulatum* は硝酸塩還元能を有し、寒天培地上で粘性のある巨大なコロニーを形

成する<sup>2)</sup>. 従って、この IK01 株は *N. capsulatum* と同様に硝酸塩還元能を有し、MBR 内の硝化反応によって生成された硝酸塩を還元して脱窒プロセスに寄与していることが考えられた。

### 3.2 ゲル状分泌物の組成分析

IK01 株が形成する特徴的なゲル状のコロニーの成分を GC-TOF/MS により分析した結果、このコロニーのゲル状分泌物の主成分は炭素数 9-17 の炭化水素とパルミチン酸やステアリン酸などの飽和長鎖脂肪酸であることがわかった。一般的には、バイオフィーム形成に関与する EPS の成分は多糖類やタンパク質、細胞外 DNA などとされており、この分離株のゲル状分泌物が一般的な EPS ではないことが示唆された。一方で、MBR で発生するバイオフィームの組成は約 70 %を脂質が占めるとする報告もある<sup>3)</sup>. 従って、本研究で MBR 膜面のバイオフィームから分離培養されたこの分離株は、膜面でのゲル状バイオフィーム形成に関与している可能性が考えられた。

### 4. おわりに

本研究では、平板培養法により BFB の分離培養を行い *Novosphingobium* sp. IK01 株の分離に成功した。IK01 株は平板培養上でゲル状のコロニーを形成する特徴を有しており、ゲル状分泌物の主成分が炭化水素および飽和長鎖脂肪酸であることを明らかにした。今後はバイオフィーム形成試験を実施し、IK01 株のバイオフィーム形成能を調査する。

### 謝辞

ラボスケールリアクター設置のための実験場所を長岡中央浄化センターに提供いただきました。

### 文献

- 1) Liu et al.(2021). Systematic and Applied Microbiology, 44(3), 126202.
- 2) LEIFSON, E.(1962). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 12(4), 161-170.
- 3) Inaba et al.(2017). npj Biofilms and Microbiomes, 3(1), 1-8.

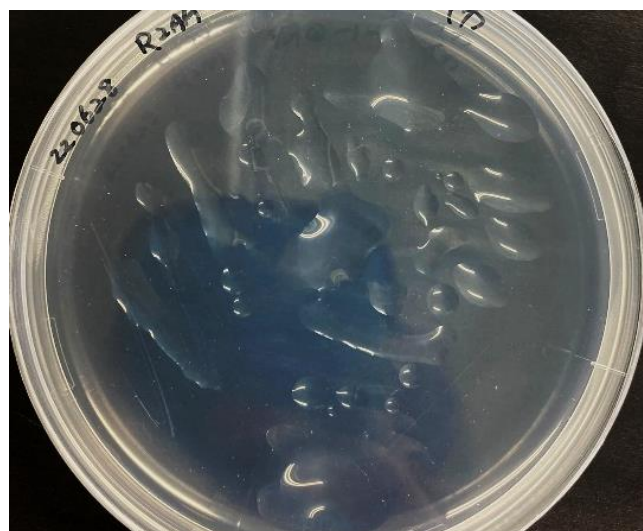


図-1 IK01 株のゲル状コロニー

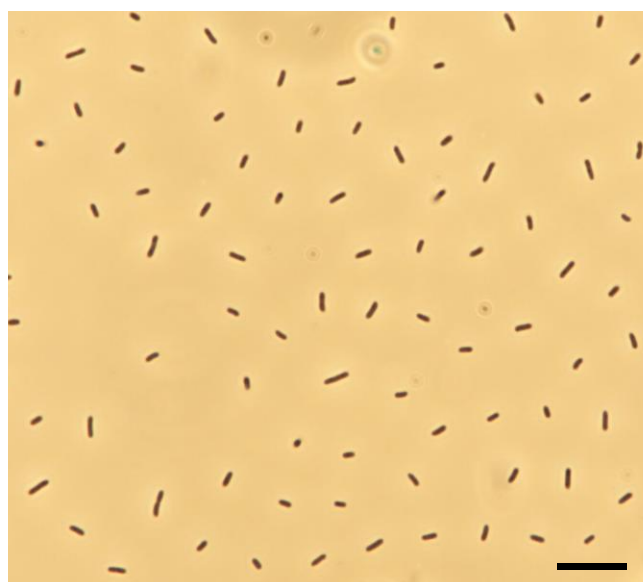


図-2 IK01 株の顕微鏡観察結果 (スケールバーは 10 μm)

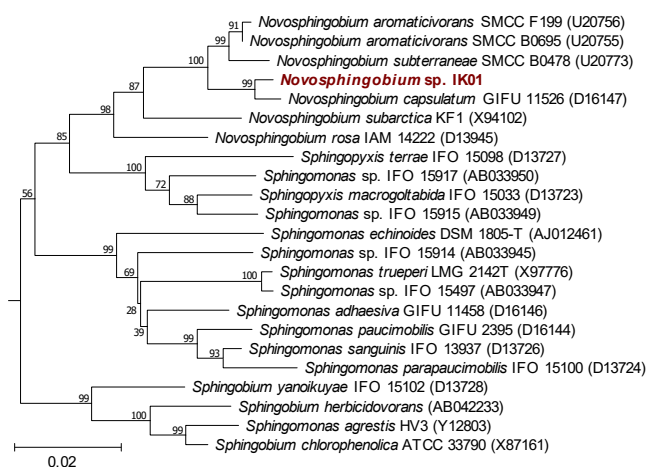


図-3 16S rDNA 遺伝子配列に基づく系統樹 (節点の数値は 1,000 回の複製に基づくブートストラップ値を示す。)