

# 膜ファウリング原因となる微小細菌の分離・培養の試み

長岡技術科学大学 学生会員 ○ 長谷川貴哉 正会員 幡本将史  
正会員 山口隆司 正会員 渡利高大

## 1. はじめに

膜分離活性汚泥法 (MBR : Membrane Bioreactor) は、活性汚泥法に比べて設置面積が少なく、処理水質が比較的良好であることから、排水処理分野において適用が進んでいる。しかし、MBR は継続運転に伴いバイオフィームが膜面に形成され、目詰まりを起す現象 (膜ファウリング) が発生する。膜ファウリングの発生は膜洗浄のためのコストや膜の交換頻度の増加、更には処理水質の悪化につながることから、MBR 普及における最大の課題となっている。

バイオフィーム形成の要因は、膜面に付着した微生物が代謝産物を生成することが要因であると言われている。そのためバイオフィーム形成の原因となる微生物を特定し、単離・培養によりその生態学的特徴を明らかにすることは、新たな膜ファウリング制御方法の開発につながると考えられる。

これまでの研究により、膜ファウリングの主要因であるバイオフィームを形成する細菌は、未培養門細菌である可能性が報告されている<sup>2)</sup>。特に OD1 (*Parcbacteria*) は、これまでの膜ファウリングに関する研究でも多数報告されているものの<sup>3)</sup>、これまでに培養された例がなく、培養手法はいまだ確立されていない。OD1 は 0.2  $\mu\text{m}$  以下の超微小細菌 (UMB : Ultra Micro Bacteria) の一種と考えられており、孔径 0.1 $\mu\text{m}$  以下のフィルターで鉱山地下水をろ過したそのろ液には OD1 が優占して検出されたことが報告されている<sup>4)</sup>。そこで本研究では、UMB の培養手法の確立を目的に、まずサンプルを 0.1  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$  膜で分離し、その後平板培養することで活性汚泥中およびバイオフィーム中に存在する UMB の培養を試みた。

## 2. 実験方法

### 2. 1 培養に使用した試料

UMB の培養に用いたサンプルは、都市下水処理を行うラボスケール MBR から採取した。それぞれ、膜ファウリング発生時の活性汚泥、膜面に付着したバイオフィーム、処理水を採取した。サンプルの前処理と

して、活性汚泥は 10000 rpm $\times$ 10 分で遠心分離を行い、その上澄みを培養に使用した。バイオフィームは 1 g (w/w) を 50 mL の MQ に溶解させた後に 10000 倍希釈し培養に用いた。処理水は MQ で 10000 倍希釈を行い培養に用いた。

上述の前処理済みサンプルは 0.1  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターを用いて、1 回または複数回の連続ろ過を行いそのろ液を採取した<sup>5)</sup>。また、ろ過後の膜は 5 mL の MQ によって洗浄し、これを膜洗浄液として採取しそれぞれを培養に用いた。

### 2. 2 培養方法

微生物の培養は Agar および Gellan gum を固化剤として使用した低濃度 R2A 平板培地を用いた。平板培地に各サンプルを 50  $\mu\text{L}$  塗布し、28 $^{\circ}\text{C}$  で好氣的に培養を行った。

### 2. 3 16S rRNA 遺伝子配列の解析

ろ液と洗浄液及び平板培養後に採取したコロニーは、Kaneka Easy DNA Extraction Kit を用いて DNA 抽出を行った。得られた DNA に対して 16S rRNA 遺伝子を対象とした 515F-806R プライマーペアを用いて PCR 増幅を行った。PCR 条件は 94 $^{\circ}\text{C}$  : 3 分, [94 $^{\circ}\text{C}$  : 45 秒, 50 $^{\circ}\text{C}$  : 1 分, 72 $^{\circ}\text{C}$  : 1 分 30 秒] $\times$ 30 サイクル, 72 $^{\circ}\text{C}$  : 10 分とした。精製した PCR 産物を、次世代シーケンサー (iSeq 100) を用いて解析し、得られた遺伝子配列の解析には QIIME2 ソフトウェアを使用した。検出率が 5% 以下のものは Other として表記した。

## 3. 結果と考察

図 1 に活性汚泥上澄みをそれぞれ 0.45  $\mu\text{m}$ 、0.22  $\mu\text{m}$ 、0.1  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過し、そのろ液と洗浄液の菌叢解析結果を示す。

図 1 より膜の孔径の違いにより菌叢が変化することが確認された。0.45  $\mu\text{m}$  膜では 60%以上が Other であり、多様な菌が検出されているのに対し、フィルターの孔径が小さくなるにしたがって Other の割合は減少した。以上のことから、多くの微生物種はフィルターを通過せず微生物のサイズによって選択的に微生物を

濃縮できる可能性が示唆された。

図2に処理水を0.45 μm, 0.22 μm, 0.1 μm フィルターのろ液と洗浄液の菌叢解析結果を示す。図2と同様に、膜の孔径の違いにより菌叢が変化することが確認された。しかし、Otherの割合は活性汚泥上澄みと比較して変化していないことから処理水中の菌叢は平膜を通過可能な細菌のみであるためフィルターろ過の効果が高いことが示唆された。処理水及び活性汚泥上澄みの試料からOD1は今回検出されなかった。

図3に0.1 μmでろ過した活性汚泥上澄みのろ液と洗浄液の継代培養後の菌叢解析結果、図4に0.22 μmでろ過した処理水のろ液と洗浄液を継代培養したコロニーの菌叢解析結果を示す。

*Paraburkholderia*は活性汚泥上澄みの0.10 μm膜の濾液と洗浄液と処理水の0.45 μm膜以降で優占していた。*Paraburkholderia*が活性汚泥上澄み内で占めている割合は、0.45 μm膜から0.22 μm膜まで5%以下であったのに対して、0.1 μm膜で24%、0.1 μm膜ろ液で90%となった。そのため、活性汚泥中の*Paraburkholderia*は0.22 μmより小さいと考えられる。しかし、既報では*Paraburkholderia*の細胞サイズは0.4 μmから1.2 μmである<sup>6)</sup>。そのため、活性汚泥中の*Paraburkholderia*が飢餓状態や環境ストレスによって細胞が矮小化したため<sup>7)</sup>、0.22 μm膜を通過したと考えられる。

また、多くのサンプルで検出された*Yersinia*は、細胞サイズが幅0.5 μmから0.8 μm、長さ1 μmから3 μmであるが、ストレスなどで小さくなることが示唆された<sup>8)</sup>。

#### 4. まとめ

サンプルをフィルターでろ過することによって細胞サイズの大きい菌の除去に成功した。これにより、活性汚泥やバイオフィームから、細胞サイズの小さな細菌を分画できることが明らかとなった。

#### 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。

#### 参考文献

- 1) Katsuki Kimura *et al.*, *Water Research*, **42**(3), 2008, 625–632.
- 2) Ryan De Sotto *et al.*, *J. Environ. Manage.*, **217**, 2018, 268–277.

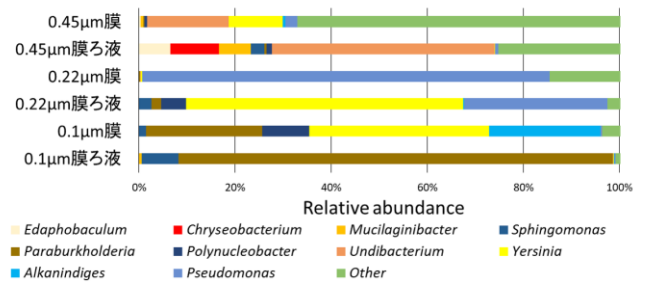


図1 ろ過した活性汚泥上澄みの菌叢解析結果

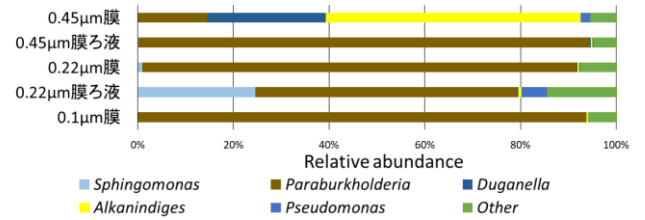


図2 ろ過した処理水の菌叢解析結果

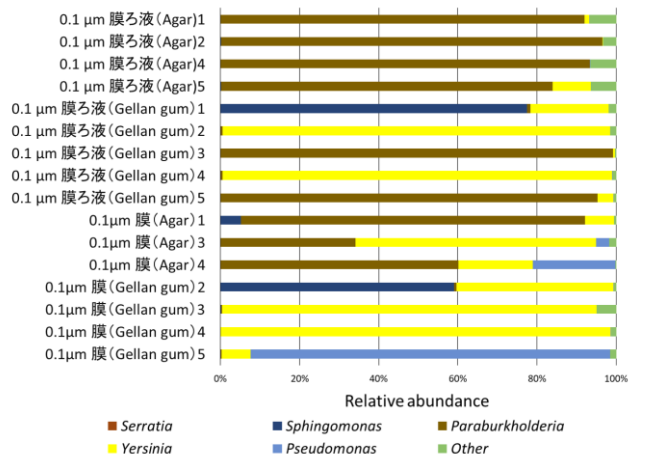


図3 ろ過した活性汚泥上澄みを培養したコロニーの菌叢解析結果

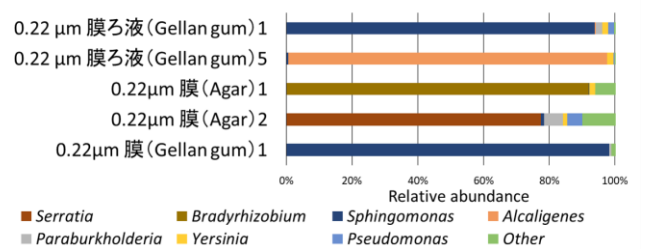


図4 ろ過した処理水を培養したコロニーの菌叢解析結果

- 3) Takimoto Yuya *et al.*, *Scientific Reports*, **8**, 2018, 11427.
- 4) Tatsuo Miyoshi *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(2), 2005, 1084–1088.
- 5) Martin W Hahn *et al.*, *J. Microbiol. Methods*, **57**(3) 2004, 379–390.
- 6) Santiago Adolfo Vio *et al.*, *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 2020, 271–311.
- 7) Mary A. Hood *et al.*, *Microbiol. Ecol.* **14**, 1987, 113–127.
- 8) MD Furones *et al.*, *Annu. Rev. of Fish Dis.*, **3**, 1993, 105-125.