

現場培養法による膜ファウリング原因微生物の分離培養の試み

長岡技術科学大学大学院 ○(学) 水田裕貴, (学) 滝本祐也, (学) 曾我 徹
(正) 渡利高大, (正) 幡本将史, (正) 山口隆司

1. はじめに

膜分離活性汚泥法 (Membrane Bio Reactor : MBR) は、従来の標準活性汚泥法等と比較して、設備の小型化や、高負荷処理が可能で、処理水質が良好などの理由から排水処理の分野において適用が進んでいる。一方で、MBR には膜ファウリングと呼ばれる膜閉塞に伴う膜透過流量の低下現象が発生し、これが普及を妨げる原因となっている。膜ファウリングの原因の一つは MBR 内の微生物群が膜面にバイオフィームを形成することで発生する。これを解消するために、化学薬品や物理洗浄を行うことで、膜の消耗や交換費用など、様々な問題が起こる。このため膜面のバイオフィーム形成を抑制することが重要である。

MBR 膜面のバイオフィームはその形成過程において、ファウリング原因菌 (Fouling-Causing Bacteria : FCB) が重要な役割を担うことが報告されており¹⁾、FCB は未培養微生物である可能性も示唆されている²⁾。未培養微生物は一般的な平板培養などの方法で分離することは難しい。そこで未培養微生物の新規培養方法として報告された ichip 培養法に着目した。ichip 培養は平板培養と比較して、原位置での培養が可能、新規微生物の検出割合が高いなどのメリットが挙げられる³⁾。そこで、本研究では FCB の単離を目的に、実下水を処理する MBR で形成された膜面バイオフィームから FCB の培養を試みた。

2. 実験方法

2.1. 平板培養

長岡中央浄化センターで実下水処理のラボスケール MBR を継続運転し、膜ファウリング発生時 (TMP:33.6kPa) にバイオフィームを採取した。平板培養における培養条件を表 1 に示す。本研究で使用した培地は LB (Difco), R2A (和光純薬), MHB (Difco) である。環境中の有機物濃度に近づけるため、低濃度に調整した培地を用意した。また使用するゲル化剤は寒天と Gellan gum (和光純薬) を使用した⁴⁾。準備したプレ

表 1 平板培養の培地条件

種類	希釈倍率	ゲル化剤
LB	1	Agar
		Gellan gum
	100	Agar
		Gellan gum
R2A	1	Agar
		Gellan gum
	100	Agar
		Gellan gum
MHB	1	Agar
		Gellan gum
	100	Agar
		Gellan gum

ートに段階希釈後のサンプルを塗抹し 28°C で最長 2 週間ほど培養を行った。

2.2. ichip 培養

ichip プレート (以下, ichip) を作成するため、96 ウェルプレートに 0.03 μm ポアサイズのシートを両面に貼り、各ウェルに PBS で段階希釈したバイオフィームを固形培地と混合し注入した。

作成した ichip は流入下水と MBR 活性汚泥の混合液に浸漬させ、2 週間培養を行った。培養後、ichip 培養による微生物の増殖を確認するため DAPI 染色を行い、顕微鏡観察を行った。また、分離菌株を得るため継代培養として ichip ウェル内の固形培地を 1×PBS で 10^5 倍希釈を行い、100 倍希釈した R2A 培地に塗抹し 28°C で培養した。

2.3. 微生物群集構造解析

平板培養の 12 パターンの培地からコロニー形状や生育速度によってそれぞれ 16 菌株、計 192 菌株を選定した。選定した代表菌株を生育に使用した培地からゲル化剤なしの液体培地に釣菌し、30°C で 2 週間培養を行った。分離菌株は 8 菌株を 1 サンプルとして NucleoSpin Tissue XS (タカラバイオ) を用いて DNA 抽出を行った。PCR は 16S rRNA 遺伝子を対象としたユニバーサルプ

ライマーセット 515F-806R を用いた。得られた増幅産物を MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、iSeq 100 (illumina) を用いて遺伝子配列の解析を行った。16S rRNA 遺伝子配列は Qiime2 ソフトウェアを用いて解析を行った。

3. 実験結果

3.1. 平板培養

通常濃度の培地からはコロニー形状や生育速度など多種多様なコロニーを確認した。一方、100 倍希釈培地には小さくて透明なコロニーが多く表れた。バイオフィーム形成能が高い菌のコロニー特徴として、透明でつやのある凸型コロニーを形成するという報告⁴⁾がある。この報告や生育速度などを基準にコロニーの選定を行った。

分離菌 192 株に対して微生物群集構造解析結果を図 1 に示す。解析結果から FCB として報告⁵⁾されている *Enterobacter* 属, *Pseudomonas* 属, *Thermomonas* 属の存在が明らかとなった。また、未培養細菌も存在していた。未培養細菌の多くは 100 倍希釈 R2A 培地から検出された。また、R2A 培地は他の培地に比べて固有の分離菌株割合が 2 倍程度であることが明らかとなった。

3.2. ichip 培養

顕微鏡観察および 100 倍希釈 R2A 培地での継代培養を行った。DAPI 染色を行い顕微鏡観察した結果、細菌

様の蛍光が検出された。このことから ichip によって原位置での培養を行えることが示唆された。また、継代培養プレートからも小さくて透明なコロニーが発生したことから、ichip 培養菌株でも平板培養が可能なが示唆された。

4. まとめと今後の予定

平板培養後に選定した分離菌株の解析を行った結果、FCB とされる細菌の存在が確認された。今後は FCB と見られる菌の純培養を行い、全量ろ過試験や OD600 による各菌体の増殖速度の測定し、バイオフィーム形成能を評価する。ichip 培養サンプルによって得られた菌株は今後解析を行い平板培養との結果を比較する。

謝辞

長岡中央浄化センターから研究場所を提供して頂きました。記して謝意を表します。

参考文献

- 1) Vanysacker, Louise, et al., *Applied microbiology and biotechnology*, vol.98.No.19, pp8047-8072, 2014.
- 2) Takimoto, Yuya, et al., *Scientific reports*, vol.8.No. 1, pp1-9, 2018.
- 3) Berdy, Brittany, et al., *Nature protocols* vol.12. No. 10, pp2232, 2017.
- 4) 玉木秀行ら, 応用および環境微生物学 vol. 71.No. 4, pp2162-2169, 2005.
- 5) Ishizaki, So, et al., *Water research*, vol. 100, pp448-457, 2016.

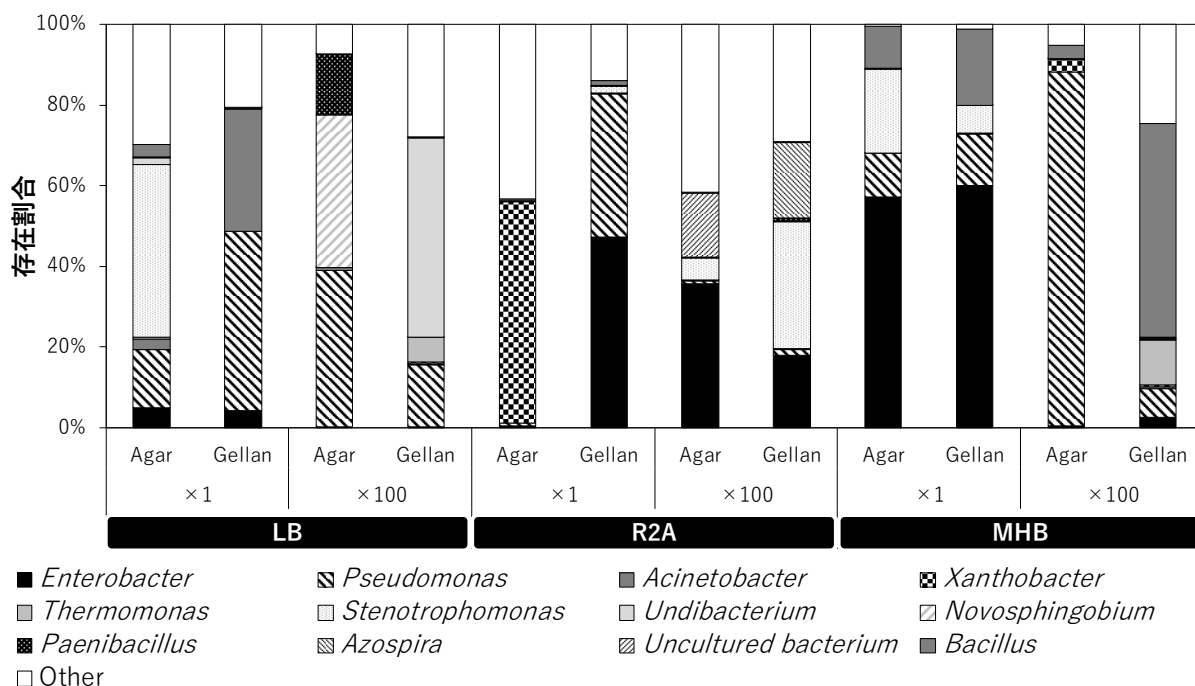


図 1 異なる平板培養条件から分離された微生物の系統分類の割合