

# 膜ファウリング原因細菌の分離・培養の試み

長岡技術科学大学・院工 (非)○工藤千紘 (正) 幡本将史 (正) 渡利高大 (正) 山口隆司

## 1. はじめに

膜分離活性汚泥法 (MBR) とは生物学的排水処理と膜ろ過による固液分離を組み合わせた水処理方法である。MBR は従来の活性汚泥法と比較して、高度な処理水質が得られること、占有スペースを削減できることなどの優れた特徴を有している。しかし、MBR の継続運転に伴う膜の目詰まり (膜ファウリング) が問題視されており、膜透過流量および運転性能の著しい低下を引き起こしている。膜ファウリング要因の中でも、細菌が膜表面に付着してバイオフィームを形成することに起因する「バイオフィウリング」は膜ファウリングの 45%以上を占め、主なファウリングの中で除去が最も困難とされている<sup>1)</sup>。

本研究では膜ファウリング原因細菌を特定することを目的として、MBR 中に存在する細菌の分離・培養および、細菌培養液の膜透過特性評価を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1. 培養と分離株の同定

ファウリング原因細菌の培養に用いた活性汚泥、流入下水、バイオフィームは都市下水処理を行うラボスケール MBR から採取した。活性汚泥および流入下水は室温で 3000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、その上澄みを微生物の分離に用いた。活性汚泥は遠心分離を行わないサンプルも用意した。培地は、“KBM”チョコレート HB 寒天培地、TRYPTO-CASEIN SOY BROTH (TSB) および Lysogeny Broth (LB) を使用し、TSB と LB の固化剤は Agar および Gellan Gum とした。サンプルは 3 段階希釈を行ったものを培地に塗布し、37°C で培養した。無作為に釣菌したコロニーを画線培養して純菌を得た。分離した細菌はサンガーシーケンスにより 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、BLAST によって細菌種を同定した。

### 2.2. クロスフローろ過試験

分離した細菌の膜透過特性評価のためにクロスフローろ過試験を行った (Fig. 1)。試験にはコロニーが粘性性状であった細菌を選択した。試験菌株は液体 LB 培地で振とう培養し、OD<sub>600</sub>=0.5 程度になるように調製した。試験系では孔径 0.45 μm のナイロン製膜を使用し、試験ごとに新しい膜に交換した。測定項目は膜透過量および膜間差圧力 (TMP : Trans-Membrane Pressure) とし、30 秒間隔で記録した。

## 3. 結果および考察

### 3.1. 培養結果

本研究では、遠心分離後も上清に浮遊する活性汚泥内の細菌が、直接膜に付着することにより発生する膜ファウリングの可能性について調査を行うため、活性汚泥及び流入下水の遠心分離後の上清を用いて分離培養を行った。

活性汚泥から分離した 84 株の細菌の 16S rRNA 遺伝子を解析した結果、35 種の細菌を同定した。培地の違いによる分離菌種の違いは見られなかった。一方、前処理として遠心分離を用いた培養系と、用いなかった培養系では、分離される細菌に違いが見られた。遠心分離を用いたサンプルからは、*Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* などの細菌が分離され、遠心分離を行わないサンプルからは *Aeroms*, *Bacillus*, *Methylobacterium* が分離された。

バイオフィームからは 67 株の分離に成功し、23 種の細菌を同定したが、活性汚泥と同様に培地の違いによる分離菌種の違いは見られなかった。また、流入下水からは 14 種の細菌を同定した。

活性汚泥、流入下水、バイオフィームの異なるサンプルにおいて、分離した同じ細菌をまとめた (Fig. 2)。3 つのサンプル全てで共通して分離した細菌は 3 種 (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Klebsiella*) であった。バイオフィームと流入下水では 2 種 (*Aeromonas*, *Klebsiella*)、流入下水と活性汚泥では 3 種 (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Brucella*) が共通して分離された。バイオフィームと活性汚泥では 7 種 (*Aeromonas*, *Aquamicrobium*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*) の細菌を共通して分離した。バイオフィームと活性汚泥から共通して分離した細菌が比較的多く、これは活性汚泥中の細菌がバイオフィーム形成に影響するという既往の研究と同様の傾向が示された<sup>2)</sup>。

### 3.2. クロスフローろ過試験

膜透過特性評価は *Kluyvera cryocrescens* (No.46), *Deinococcus misasensis* (No.100), *Rhodococcus ruber* (No.102) の 3 種の細菌を用いた。*R. ruber* にはバイオフィームを形成する株が存在し、特にムコイド状 (光沢のある粘性性状) のコロニー形態を示す菌株は EPS を多量に生産することが報告されている<sup>3)</sup>。今回分離した No.102 もムコイド状のコロニーを形成す

る株であったため、バイオフィーム形成に関与している可能性が高い。また、他の細菌においても同様にムコイド状のコロニーを形成するものはバイオフィーム形成に関与する可能性があると考えた。そこで、コロニーがムコイド状とみられた No.46 および No.100 を選択した。

クロスフローろ過試験の結果、培養液 250 g を全量ろ過するのにかかった時間は、blank (LB 培地のみ) で 810 秒、No.46 で 7350 秒、No.100 で 3810 秒、No.102 で 4440 秒であり、時間経過によってろ過速度が緩やかになる傾向が確認された (Fig. 3)。TMP の低下量は、blank で 2 kPa、No.46 で 11~12 kPa、No.100 で 10~11 kPa、No.102 で 11~12 kPa であった (Fig. 4)。ろ過に時間がかかる菌株の TMP が 1~2 kPa 低下する傾向が確認できたが、いずれも 2 時間程度までの短時間の評価であり、その TMP の差は 1.2 倍以内と小さかった。

以上の結果より、短時間の評価では TMP の低下よりもろ過時間の方が微生物自体のろ過性をより正確に評価できる可能性が考えられた。今後はより長時間のクロスフローろ過試験において TMP の変化をモニタリングし、細菌の膜透過特性を評価する必要があると考えられた。

#### 4. おわりに

本研究では膜ファウリングに関与する可能性がある細菌の分離・培養および膜透過特性評価を行った。今後、膜透過特性の評価方法を再検討したうえで、新たに分離した細菌の膜ファウリング特性およびバイオフィーム形成能について調査していく予定である。

#### 謝辞

本実験では長岡中央浄化センターに実験場所を提供していただきました。ここに感謝の意を表します。

#### 参考文献

- 1) Aslam, M. et al., (2018). Recent developments in biofouling control in membrane bioreactors for domestic wastewater treatment. *Separation and Purification Technology*, 206, 297-315.
- 2) Du, X. et al., (2020). A review on the mechanism, impacts and control methods of membrane fouling in MBR system. *Membranes*, 10(2), 24.
- 3) 浦井誠. (2007). *Rhodococcus* 属細菌の菌体外多糖のバイオロジー. 環境バイオテクノロジー学会誌, 7(1), 11-17.

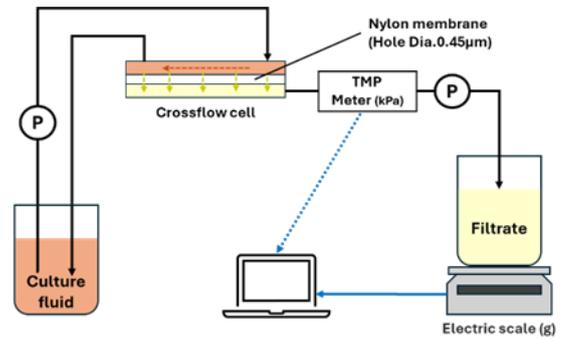


Fig. 1 クロスフローろ過試験概略図

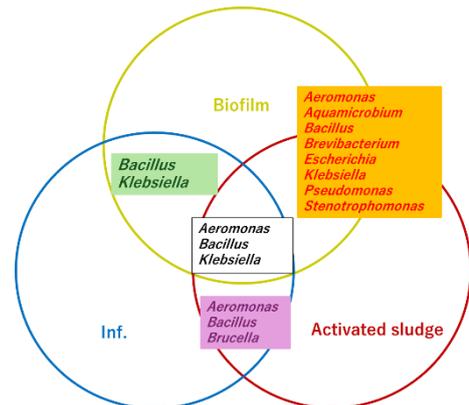


Fig. 2 異なるサンプル間において共通して分離された細菌

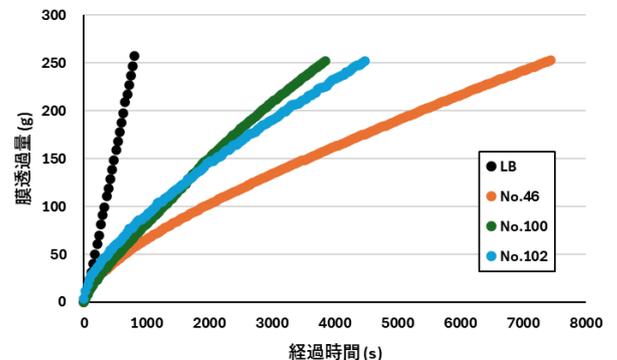


Fig. 3 膜透過量の経時変化

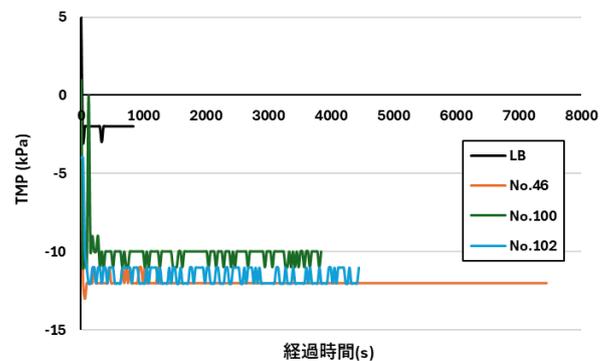


Fig. 4 TMP の経時変化