

低有機物負荷 A/O-MBR で発生するバイオフィームにおける未培養門細菌の役割

長岡技術科学大学 学生会員 ○滝本祐也、鞍立大喜、正会員 渡利高大、幡本将史、山口隆司

1. はじめに

膜分離活性汚泥法 (Membrane bioreactor: MBR) は従来の活性汚泥法と膜分離を組み合わせた排水処理方法の一つであり、高濃度の汚泥をリアクター内に保持できることから、高い処理性能を有していることが特徴である。単一槽で生物学的処理と完全な固液分離が可能のため、活性汚泥法の代替排水処理プロセスとして適用が進められている¹⁾。しかし、継続運転に伴う膜孔の詰まり (膜ファウリング) の発生が未だに主要な問題として残っている。膜ファウリングは MBR 膜面に発生する細菌性バイオフィームの形成が原因と考えられており、MBR の長期の安定的な運転にはバイオフィーム形成機構の解明が急務の課題である。我々は、無酸素/好気 (anoxic/oxic: A/O) -MBR を極めて低有機物負荷 (OLR: $0.002 \text{ kg-COD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$) で運転することで膜ファウリングの発生とともに膜面堆積物を確認し、低負荷運転および通常運転のバイオフィームの菌叢中に未培養門細菌が優占することを見出した²⁾。したがって、未培養門細菌は膜面堆積物中でバイオフィームを形成する上で重要な役割を担っていることが示唆された。

共焦点レーザー顕微鏡 (confocal laser scanning microscopy: CLSM) は、バイオフィームを解析する上で非常に有用な情報を提供してくれる。CLSM を用いることでバイオフィームの形状を保持した状態で直接観察することができるため、バイオフィームの構造を解析することが可能となり、MBR で発生するバイオフィームにおいても CLSM が適応されてきた^{3,4)}。本研究では、CLSM を用いた解析と微生物解析を併用して低有機物負荷運転で発生した A/O-MBR の膜面堆積物に存在する未培養門細菌の役割を解明することを目的とする。

2. 実験方法

本研究では、有効容積 6 L の無酸素槽と 6 L の好気槽から構成された A/O-MBR を用い、好気槽中に平均孔径 $0.2 \mu\text{m}$ の塩素化ポリエチレン製平膜を浸漬させた (図 1)。流入水には都市下水の最初沈殿池越流水を用いた。A/O-MBR の汚泥滞留時間 (solid retention time: SRT) を 60 日および水理学的滞留時間 (hydraulic retention time: HRT) を 8 時間とし、有機物負荷 (organic loading rate: OLR) は $0.42 \text{ kg-COD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ として運転を開始した。MBR の運転が安定した後、膜透過水を無酸素槽に再供給し、低負荷条件 (OLR: $0.002 \text{ kg-COD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$) として運転を開始した。処理性能の評価として、膜間差圧 (trans-membrane pressure: TMP)、30 分膜透過流量の測定、好気槽汚泥上清サンプルの化学的酸素要求量 (COD)、全有機炭素 (TOC)、タンパク質・糖、全窒素 (TN)、全リン (TP)、硝酸性窒素 ($\text{NO}_3^- \text{-N}$)、アンモニア性窒素 ($\text{NH}_4^+ \text{-N}$) および好気槽内汚泥 (AS) の MLSS を測定した。微生物群集構造解析には、AS および膜面堆積物を用いて 16S rRNA 遺伝子を対象に V4 領域を含む 515F および 806R のユニバーサルプライマーを用いて PCR を行い、MiSeq にて解析を行った。膜ファウリング進行中に各 MBR から膜モジュールを取り出した後、約 0.25 cm^2 の断片を切り出し、2% パラホルムアルデヒドに浸漬した。PBS で洗浄した後、膜面堆積物中の生細胞・死細胞・多糖およびタ

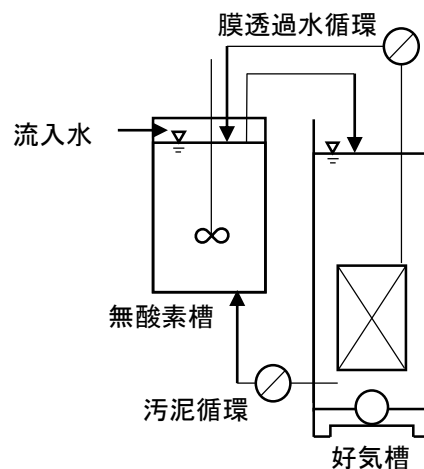


図1 装置概要図

キーワード：低有機物負荷運転、バイオフィーム、共焦点レーザー顕微鏡、16S rRNA 遺伝子解析

連絡先：〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 水圏土壌環境研究室 TEL: 0258-47-9612

ンパク質を蛍光標識するために、SYTO9・propidium iodide (PI)・calcofluor white および Film Tracer SYPRO ruby biofilm matrix strain をそれぞれ用いた。染色されたそれぞれの膜断片は CLSM を用いて観察した。

3. 実験結果および考察

A/O-MBR の低負荷運転開始後、1～2 週間で TMP の上昇が確認され、膜透過流量も低下し始めた。最終的には、低負荷運転開始から約 3 週間で各 MBR の TMP は約 90 kPa に到達し、

深刻な膜ファウリングが発生した。図 2 に膜ファウリング発生初期および中期に発生したバイオフィルムの CLSM 観察画像を示す。赤色は死菌を示し、緑色は生菌を示しており、膜ファウリング初期の膜面には生菌及び死菌が膜全体に点在している様子が観察された。膜ファウリング中期の膜面においては、死菌は膜全体に沈着している様子が見られた一方で、生菌は集塊を形成し偏在している様子が観察された。さらに、膜ファウリング後期のバイオフィルムでは、膜面全体に生菌の増殖が確認され、成熟したバイオフィルムが形成されたことが示唆された。これらのことは、膜ファウリング発生初期 (TMP の緩やかな上昇) において膜面に生菌が付着し、膜ファウリング中期 (TMP の急上昇) において膜面に付着した生菌のうち、バイオフィルム形成が早い細菌が増殖し集塊を形成することによって TMP の上昇を促していることを示唆している。

膜面に発生したバイオフィルムの 16S rRNA 遺伝子に基づく解析によって、純粋なバイオフィルム (中期バイオフィルム) においては、成熟したバイオフィルム (汚泥を含むバイオフィルム) 中よりも未培養門細菌の存在割合が高いことが明らかとなった。したがって、低有機物負荷運転 A/O-MBR の膜ファウリング発生中期に増殖した細菌は未培養門細菌であるという可能性が示唆された。

4. まとめ

本研究では、低有機物負荷で A/O-MBR を運転しバイオフィルム形成に伴う膜ファウリングを発生させ、膜ファウリング発生初期、中期および後期のバイオフィルムを採取し CLSM 解析を行った。バイオフィルム生成初期においては生菌と死菌が膜面に付着し、バイオフィルム生成中期に膜面に付着した生菌の一部が増殖し集塊を作ることによってバイオフィルムの成熟化を促していることが示唆された。

参考文献

- 1) Meng F., Zhang S., Oh Y., Zhou Z., Shin H. S., & Chae S. R. (2017). Fouling in membrane bioreactors: an updated review. *Water Research*, 114, 151-180.
- 2) Takimoto Y., Hatamoto M., Ishida T., Watari T., & Yamaguchi T. (2018). Fouling Development in A/O-MBR under Low Organic Loading Condition and Identification of Key Bacteria for Biofilm Formations. *Scientific reports*, 8, 11427.
- 3) Hwang, B. K., Lee, C. H., Chang, I. S., Drews, A., & Field, R. (2012). Membrane bioreactor: TMP rise and characterization of bio-cake structure using CLSM-image analysis. *Journal of membrane science*, 419, 33-41.
- 4) Inaba, T., Hori, T., Aizawa, H., Ogata, A., & Habe, H. (2017). Architecture, component, and microbiome of biofilm involved in the fouling of membrane bioreactors. *npj Biofilms and Microbiomes*, 3, 5.

謝辞 本研究の実施にあたって、長岡中央浄化センターには研究実施場所を提供頂いた。ここに感謝の意を記す。

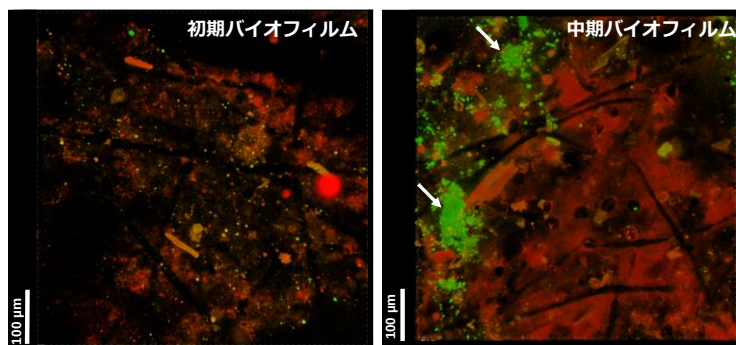


図 2 膜ファウリング発生初期および中期のバイオフィルムにおける CLSM 観察画像 (赤は死菌、緑は生菌を示す。矢印は生菌の集塊を示す。)