

## 低有機物負荷 A/O-MBR のバイオフィーム形成過程と原生動物の役割

長岡技術科学大学 学生会員 ○滝本祐也, 曾我徹, 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, 高い排水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<sup>1)</sup>. しかし, 継続運転に伴う膜孔の閉塞 (膜ファウリング) 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バイオフィーム形成を能動的に誘発することを見出した<sup>2)</sup>.

バイオフィーム形成過程は一般的に三段階に分けられることが知られており, 膜ファウリングを抑制するためには, バイオフィーム発生初期から中期の段階を制御することが重要であると考えられる. これまでに, バイオフィーム発生初期から中期において形成されるマイクロコロニーが, バイオフィームを成熟化させ, 深刻な膜ファウリングを誘発することがわかってきた. 一方で, 膜ファウリング発生過程において, バイオフィーム中の細菌と原生動物の関係は報告されておらず, 原生動物のバイオフィーム中での役割は明らかになっていない. 本研究では, 共焦点レーザー顕微鏡 (confocal laser scanning microscopy: CLSM) を用いて低有機物負荷 A/O-MBR で発生するバイオフィームの形成過程を観察し, バイオフィーム形成における細菌と原生動物の挙動および膜ファウリング原因物質を追跡することで, バイオフィーム中での原生動物の役割を明らかにする.

## 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. 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, 水理的滞留時間 (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 38 日後, 膜透過水を無酸素槽に循環供給し, 低負荷条件 (OLR:  $0.002 \text{ kg-COD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ ) として運転を行った. 運転期間中の好気槽の水温は  $11.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  であった. 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, 好気槽汚泥上清の全有機炭素 (TOC), タンパク質・糖, および好気槽内汚泥 (AS) の MLSS および生細胞の割合を測定した. 生細胞の割合は, AS の MLSS を約  $400 \text{ mg/L}$  に希釈し, Live/dead 試薬で処理した後に蛍光強度比の検量線から算出した. 蛍光強度比の検量線は増殖定常期に達した大腸菌を用いて生・死細胞を任意の割合で混合し Live/dead 試薬で染色することで作成した. 観察用の膜サンプルは, 膜ファウリング進行中に好気槽から膜モジュールを取り出し, 膜面の 3 か所から約  $200 \text{ mm}^2$  の膜断片を切り出し, PBS に浸漬させ保存した. 膜面堆積物中の生細胞, 死細胞, 多糖およびタンパク質は, SYTO9, propidium iodide, calcofluor white および Film Tracer SYPRO ruby biofilm matrix strain をそれぞれ用いて蛍光標識した. 蛍光標識した膜断片を PBS に 24 時間以上浸漬させた後, CLSM (A1, Nikon) にて 2 つ以上の膜断片から, それぞれ 3 枚ずつの画像を取得した.

キーワード: 膜ファウリング, バイオフィーム, 共焦点レーザー顕微鏡, 有殻アメーバ

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

### 3. 実験結果および考察

A/O-MBR の低有機物負荷運転開始 11 日目において TMP の上昇と Flux の低下により膜透過性能が急激に低下した (図 1). 11 日目から 18 日目にかけて膜透過性能が 0.92 から 0.38 LMH/kPa に大きく低下し, その後徐々に 0.18 LMH/kPa (29 日目)まで低下した. したがって, 11 日目を初期, 13 日目を中期および 18 日目を後期ファウリングと定義し, 各段階における膜断片の CLSM による解析を行った. 図 2 に AS の生細胞の割合の推移を示す. 低有機物負荷運転開始 7 日目において生細胞の割合が 84% (1 日目) から 65%に低下し, 溶菌の発生が確認された. その後 22 日目の 84%まで徐々に増加し, 29 日目には 71%に低下した. 4, 5 日目では生細胞の割合が 100%を超えていたが, これは死細胞の多くが溶解し細胞形態を保てなくなり蛍光標識されなかったことが原因であると考えられた.

図 3 に各ファウリング段階の生・死菌, タンパク質・多糖の CLSM 観察像を示す. 11 日目では, 死菌とタンパク質由来の蛍光が優占しており, 形態的特徴から糸状性細菌の死細胞が確認された. 溶菌によって細胞から放出されたタンパク質が膜面でコンディショニングフィルムの役割を果たし, 膜透過性能の低下に影響を与えたことが示唆された. 13 日目では, 死菌由来の蛍光が減少した一方で, 生菌由来の蛍光の増加とともに多糖由来の蛍光が優占していた. このことは, コンディショニングフィルム上への細菌の付着と増殖に伴う多糖の生産を示唆している. 18 日目では, 多糖の蛍光が顕著に増加した. 生細胞と死細胞は膜面を覆うようにして広がり, 多数の有殻アメーバの存在が確認された. 有殻アメーバは細菌や線虫の捕食者として報告されており<sup>3,4)</sup>, その細胞内に死菌由来の蛍光が検出された. したがって, 有殻アメーバはバイオフィルム中で細菌の捕食を担っていることが示唆された.

### 4. まとめ

本研究では, 低有機物負荷 A/O-MBR で発生したバイオフィルムを経時的に CLSM にて観察した. 膜上では, 溶菌由来物質によるコンディショニングフィルムの形成 (膜ファウリング初期), 生細菌の付着・増殖 (中期), 原生動物による細菌の捕食と増殖 (後期) が進行していることが明らかになった.

#### 参考文献

- 1) Meng et al. *Water Res.* (2017)., 2) Takimoto et al. *Sci. Rep.* (2018)., 3) 李ら, *水環境学会誌* (1999). 4) Yeates et al., *Biol. Fert. Soils.* (1995).

謝辞 本研究の実施にあたり, 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.

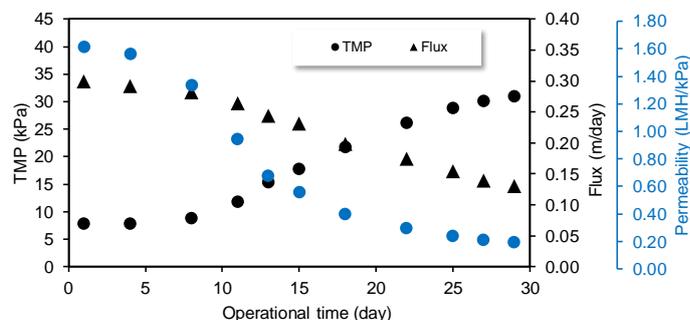


図 1 低有機物負荷運転期間における TMP, Flux および Permeability (膜透過性能) の推移

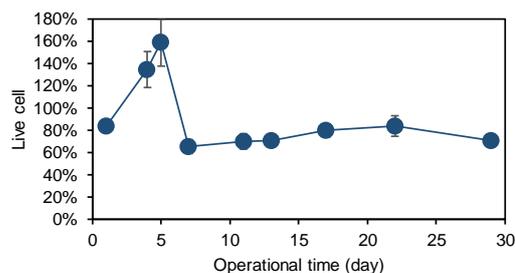


図 2 低有機物負荷運転期間における好気槽汚泥中 (AS) の生細胞の割合

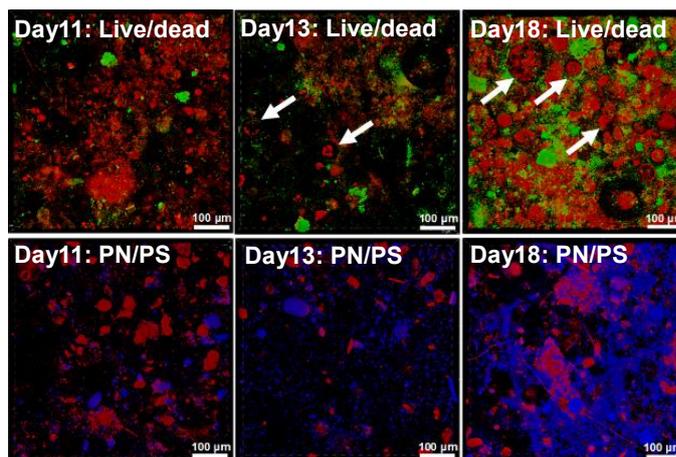


図 3 膜ファウリング発生過程のバイオフィルムの二次元 CLSM 観察像 (Live/dead は生菌 (緑), 死菌 (赤) を示す. PN/PS はタンパク質 (赤), 多糖 (青) を示す. 矢印は細胞内に死細胞の蛍光を持つ有殻アメーバを示す.)

その細胞内に死菌由来の蛍光が検出された. したがって, 有殻アメーバはバイオフィルム中で細菌の捕食を担っていることが示唆された.