

現場培養法による MBR バイオフィーム形成細菌の分離培養の試み

長岡技大・院 学生会員 ○水田裕貴, 三輪徹 正会員 幡本将史, 渡利高大, 山口隆司
産業技術総合研究所 滝本祐也

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, 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, 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, 化学薬品による洗浄や物理洗浄を行う必要があり, 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, バイオフィーム形成細菌 (Biofilm-Forming Bacteria: BFB) が重要な役割を担うことが報告されており, BFB は未培養微生物である可能性も示唆されている¹⁾. 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分離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²⁾. そこで, 本研究では BFB の分離培養を目的に, ichip 培養法等を用いて実下水を処理する MBR で形成された膜面バイオフィームから BFB の分離培養を試みた.

2. 実験方法

2.1. 平板培養

BFB の分離サンプルとして, 実下水処理のラボスケール MBR の膜ファウリング発生時にバイオフィームを採取した. 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, 通常濃度と 1/100 の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 を使用した. これらの条件を組み合わせた 12 パターンのプレートに段階希釈後のサンプルを塗抹し 28°C で最長 2 週間培養を行った. 平板培地(12 パタ

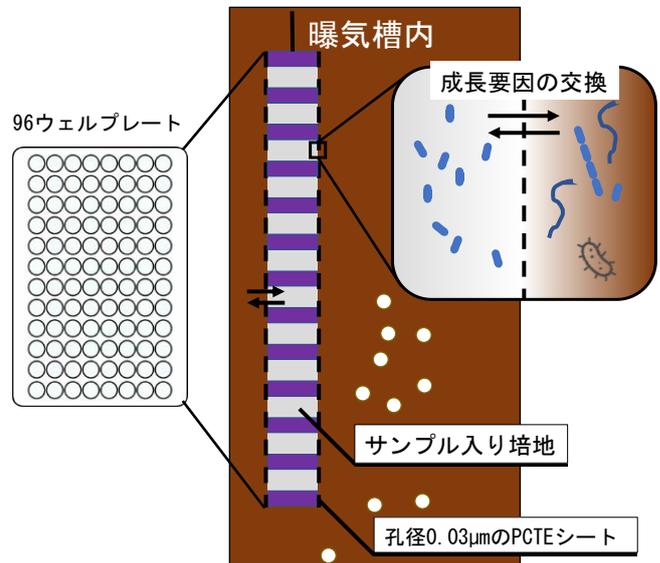


図1 ichip 培養の模式図

ーン)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液体培地に釣菌し, 30°C で最大 1 ヶ月間培養を行った.

培養菌株の解析は 16S rRNA 遺伝子を対象としたプライマー515F-806R を用いて行った. シーケンスは iSeq 100 (illumina) で実施し, 得られた遺伝子配列の解析は Qiime2 ソフトウェアを用いて行った.

2.2. ichip 培養

Berdy らの報告²⁾を参考に 96 ウェルプレートに段階希釈したバイオフィームサンプルと 1/100 濃度の MHB, R2A 培地を混合・注入し, PCTE シート (孔径 0.03 μm) を両面に貼った ichip を作成した. 作成した ichip は MBR 曝気槽に浸漬させ, 2 週間培養を行った (図 1). その後 ichip ウェル内で増殖した微生物の分離菌株を得るため, ichip ウェル内の固形培地を PBS で段階希釈し, 1/100 濃度の MHB, R2A 培地に塗抹し 28°C で培養した. 培養菌株の特定手法は平板培養サンプルと同様である.

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, 1/100 濃度の培

キーワード ichip 培養, MBR, 膜ファウリング, バイオフィーム形成細菌

長岡技術科学大学大学院 環境社会基盤工学専攻 水田裕貴

〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 Mail s205038@stn.nagaokaut.ac.jp

地には小さくて透明なコロニーが多く表れた。バイオフィル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³⁾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 株に対して行った微生物群集構造解析結果を図 2 に示す。解析結果から BFB として報告³⁾されている *Enterobacter* 属, *Pseudomonas* 属, *Thermomonas* 属の存在が明らかとなった。また、既存の分離株との 16S rRNA 遺伝子配列の相同性が低い細菌も存在しており、これらの多くは 1/100 濃度の R2A 培地から検出された。R2A 培地は他の培地に比べて固有の分離菌株割合が高い傾向にあった。また、Gellan gum 培地のみで検出された菌株が 11 種存在したことから、ゲル化剤及び培地成分の影響は大きいことが示唆された。

3. 2. ichip 培養

培養終了後の ichip ウェル内のゲルを採取し DAPI 染

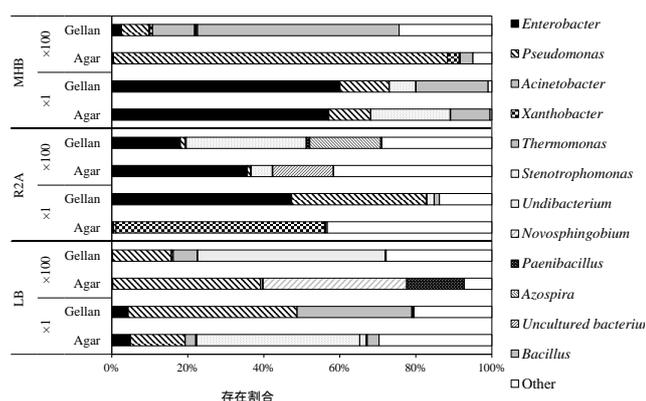


図 2 異なる平板培養条件から分離された微生物の系統分類の割合

色後、顕微鏡観察を行った。その結果ウェルによって異なる形態的特徴をもつ菌種の優占が確認できた。またマイクロコロニーのように密集した菌をスライド上で確認した。これらの結果から、注入した少量の菌が培養期間を経て増殖していることが示唆された。

1/100 濃度の MHB 及び R2A 培地での継代培養を行った結果、低濃度平板培養にも表れた小さくて透明なコロニーが発生した。これより、ichip 培養菌株に対して低濃度培地を使用した平板培養は可能なことが示唆された。

ichip 培養サンプルによって得られた菌株の解析を行った結果、平板培養では得られなかった菌株の存在を確認した。これにより、ichip 培養による既存の分離菌株以外の培養可能性が示された。また、BFB の候補となる *Xanthomonadaceae* 科の存在も明らかとなった。

4. まとめと今後の予定

平板培養後に選定した分離菌株を解析した結果、BFB とされる菌の存在が確認された。

ichip 培養の結果、本平板培養では確認されていない培養菌株を獲得した。

今後は BFB と見られる細菌や活性汚泥に比較してバイオフィルム内で優占する菌の分離培養を行い、それらのバイオフィルム形成能を評価する。

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) Takimoto, Yuya, et al., *Scientific reports*, vol.8.No. 1, pp1-9, 2018.
- 2) Berdy, Brittany, et al., *Nature protocols* vol.12. No. 10, pp2232, 2017.
- 3) Ishizaki, So, et al., *Water research*, vol. 100, pp448-457, 2016.

表 1 ichip 培養で出現した菌株

phylum	class	order	family	最大存在割合
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	<i>Pseudomonadaceae</i>	83%
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	<i>Xanthomonadaceae</i>	23%
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	<i>Aeromonadaceae</i>	22%
*Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	<i>Caulobacteraceae</i>	7%
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	<i>Yersiniaceae</i>	5%
Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	<i>Weeksellaceae</i>	5%
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	<i>Comamonadaceae</i>	3%
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	<i>Enterobacteriaceae</i>	3%
Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	<i>Flavobacteriaceae</i>	2%
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	<i>Xanthobacteraceae</i>	1%

* (赤字は平板培養で確認されず、ichip 培養でのみ検出された菌株)