

下水処理 MBR から分離培養したゲル状バイオフィルム形成細菌の解析

長岡技術科学大学・院工 (学) ○五十嵐智哉 (学) 永井孔明

(正) 渡利高大 (正) 山口隆司 (非) 牧慎也 (正) 幡本将史

1. はじめに

膜分離活性汚泥法 (MBR 法) は活性汚泥と処理水の固液分離に膜ろ過を用いた生物学的排水処理技術である。本技術は処理施設のコンパクト化や余剰汚泥の排出量削減が可能となるほか、良好な処理水質が得られるため世界中で導入が進められている。その一方で、長期運転に伴う分離膜の閉塞 (膜ファウリング) の発生が問題となっている。膜ファウリングは細菌が分泌する細胞外高分子物質 (EPS) 等で構成されたバイオフィルム (BF) が膜面に形成されることが原因の 1 つである。BF は膜透過性能を低下させ、MBR の運用コストを増加させる要因となっている。また、可溶性微生物産物やバイオポリマーのゲル化によって生じるゲル状 BF は高いろ過抵抗を有し、深刻な膜ファウリングを引き起こすとされている。これらのことから、膜ファウリングの発生を防ぐためにはゲル状 BF を形成する細菌を特定し、その活性を制御することが有効であると考えられる。そこで我々は、膜ファウリングが生じた下水処理 MBR からゲル状 BF 形成細菌の分離培養に挑戦し 1%濃度の R2A 平板培地上でゲル状のコロニーを形成する IK01 株の取得に成功した (図-1)。そこで本研究では、IK01 株が MBR 膜面でのゲル状 BF 形成に関与しているかどうかを明らかにするために、IK01 株の種の同定、生産するゲルの定性分析および BF 形成能評価を行った。

2. 実験方法

2.1 IK01 株の同定

IK01 株の同定は 16S rRNA 遺伝子解析により行った。抽出した DNA を鋳型に、Bac8F-Univ.1492rm のプライマーペアを用いて PCR 増幅を行い、精製した PCR 増幅産物をサンガーシーケンスに供した。得られたシーケンスデータに対し、低クオリティ領域のトリミングと配列アライメントを実施し、IK01 株の 16S rRNA 遺伝子配列を決定した。これを NCBI のデータベースと照合することで同定結果を得た。また、近隣結合法 (NJ 法) により分

子系統樹を作成した。

2.2 IK01 株のゲルの定性分析

ゲルの定性分析は GC-TOF/MS を用いた組成推定により行った。分析試料は平板培地上に形成された IK01 株のゲル状コロニーとした。試料は Milli-Q 水と混合し、0.20 μm のフィルターろ過により菌体を除去してから分析に供した。分析はガスクロマトグラフ (8890 GC System, Agilent Technologies) およびマルチショット・パイロライザー (PY-3030D, Frontier Lab) に TOF/MS を組み合わせた GC-TOF/MS (JMS-T200GCx-plus, JEOL) により行った。試料のイオン化は電子イオン化法で行った。また、下水処理 MBR の膜面 BF についても同様に分析を行った。

2.3 IK01 株の BF 形成能評価

IK01 株の BF 形成能評価はクリスタルバイオレット (CV) 染色法により行った。96 ウェルプレートに 0.22 μm フィルターでろ過した活性汚泥の上清および $\text{OD}_{660}=0.15$ 程度に調整した菌懸濁液を分注し、96 ピンプレート被せ 28℃ でインキュベートした。各ピンに形成された BF を CV 溶液で染色し、その量を OD_{590} で測定した。また、インキュベートした各ウェルの OD_{660} を測定し菌体量とした。実験には IK01 株のほか、比較対象株として近縁種である *Novosphingobium capsulatum* および既報で高い BF 形成量を示した *Stenotrophomonas maltophilia* を用いた。BF 形成量の経時変化を調査するために、インキュベート時間を 6, 12, 24, 48, 72 時間とした実験系を用意した。

3. 実験結果および考察

3.1 IK01 株の同定結果

16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析の結果、IK01 株は *Novosphingobium* 属細菌であり、*N. capsulatum* と最も近縁であることがわかった (図-2)。*Novosphingobium* 属細菌は自然界に広く分布し、その一部は芳香族化合物の分解や植物への塩分ストレス軽減、EPS 生産を行うことが報告されている²⁾。また、*N. capsulatum* は硝酸塩還元能を有し、寒天培地上で粘性のある巨大な

キーワード：膜ファウリング、膜分離活性汚泥法 (MBR)、バイオフィルム、細胞外高分子物質 (EPS)

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 hatamoto@vos.nagaokaut.ac.jp

コロニーを形成することが報告されている³⁾。しかしながら、*N. capsulatum* (NBRC12533) を IK01 株と同様に 1% 濃度の R2A 平板培地でインキュベートしたが、粘性のある巨大なコロニーの形成は認められなかった。これらのことから、IK01 株は硝酸塩呼吸および EPS 生産が可能な通性嫌気性細菌であり、活性汚泥などの環境条件下に適応した株である可能性が考えられた。

3.2 IK01 株のゲルの定性分析結果

GC-TOF/MS 分析の結果、IK01 株のゲルからは飽和脂肪酸や炭化水素、下水処理 MBR の膜面 BF からはニトリル化合物や飽和脂肪酸が検出された (表-1) 。ヘキサデカン酸などの脂肪酸が共通して検出されたことに加え、MBR の BF は約 70%を脂質が占めるとする報告もあることから、IK01 株のゲルが下水処理 MBR 膜面におけるゲル状 BF 形成に関与している可能性が考えられた⁴⁾。

3.3 IK01 株の BF 形成能評価結果

図-3 に CV 染色による BF 形成試験の結果を示した。IK01 株の BF 形成量はインキュベート時間が 48 時間の実験系において最大であり、OD₅₉₀=0.528 であった。 *S. maltophilia* の BF 形成量はインキュベート時間が 24 時間の実験系において最大であり、OD₅₉₀=0.447 であった。この結果から、IK01 株は *S. maltophilia* と同様に高い BF 形成能を有することが示唆された。また、IK01 株は他の 2 つの菌株に比べ菌体量が大きく増加したことから、活性汚泥上清中の栄養条件が IK01 株の生育に適していることが示唆された。

4. おわりに

本研究では、1%濃度の R2A 平板培地上でゲル状のコロニーを形成する IK01 株について、種の同定、ゲルの定性分析および BF 形成能評価を行った。以下は本研究で得られた知見である。IK01 株は *Novosphingobium* 属細菌であり、*N. capsulatum* と最も近縁であった。そのゲルには飽和長鎖脂肪酸や炭化水素が含まれており、同様の成分が下水処理 MBR の膜面 BF からも検出された。IK01 株は BF 形成能を有しており、48 および 72 時間のインキュベートでは *S. maltophilia* を上回る量の BF を形成することが判明した。今後はクロスフロー過試験を実施し、IK01 株の膜ファウリング特性をより詳しく調査する予定である。

参考文献

1) Hong et al. (2014). Bioresource technology, 166, 295-302.
2) Liu et al. (2021). Systematic and Applied Microbiology,

44(3), 126202.

3) LEIFSON, E. (1962). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 12(4), 161-170.
4) Inaba et al. (2017). npj Biofilms and Microbiomes,3(1), 1-8.

表-1 GC-TOF/MS による組成推定結果 (上位 5 成分)

IK01 株のゲル状分泌物	現場から採取した BF
<i>n</i> -Hexadecanoic acid	Heptadecanenitrile
Octadecanoic acid	Hexadecanenitrile
Heptadecane	<i>n</i> -Hexadecanoic acid
Pentadecane	Tetradecanoic acid
1-Pentadecene	9-Octadecenitrile, (Z)-

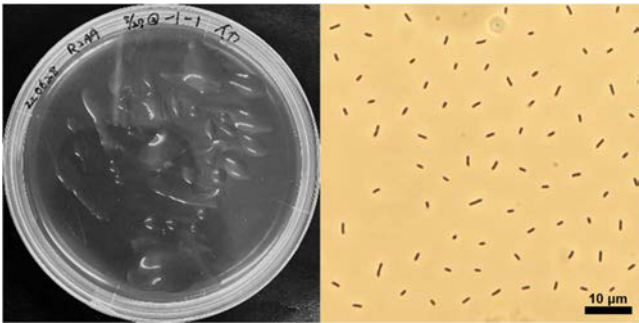


図-1 IK01 株のゲル状コロニーと顕微鏡写真

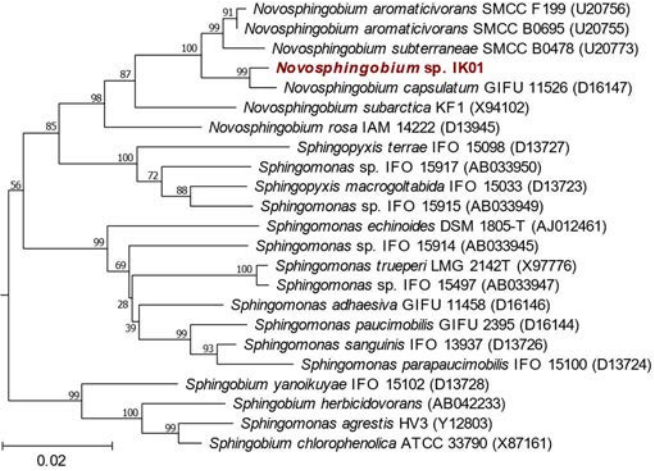


図-2 16S rDNA 遺伝子配列に基づく分子系統樹

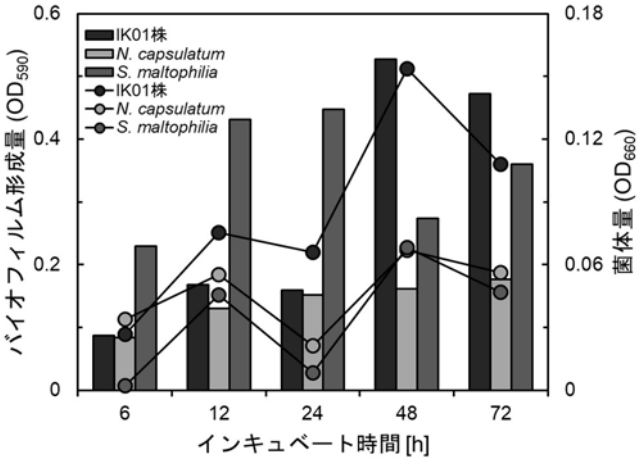


図-3 各菌株の BF 形成量 (棒) と菌体量 (折れ線)