

## 〈特集〉

## 都市下水を処理する膜分離活性汚泥法の細菌叢構造

物田 訓<sup>1,2)</sup>, 高田 一輝<sup>1)</sup>, 橋本 くるみ<sup>1,3)</sup>, 池 道彦<sup>1)</sup><sup>1)</sup>大阪大学大学院工学研究科 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)<sup>2)</sup>(現所属)立命館大学理工学部  
(〒525-8577 滋賀県草津市野路東1-1-1 E-mail: soda@fc.ritsumei.ac.jp)<sup>3)</sup>(現所属)広島大学環境安全センター  
(〒739-8513 広島県東広島市鏡山1-5-3)

## 概要

三宝下水処理場に導入された膜分離活性汚泥法 (MBR) の細菌叢を Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism 解析によって調査した。MBR の活性汚泥には、標準活性汚泥法とは異なる優占種が出現し、細菌叢は大きく変化し続けた。ファウリングが進行した分離膜上の生物膜には、活性汚泥とはさらに異なる細菌叢が形成され、膜間差圧や生物膜中の鉄や腐植の含有量と相関を示す細菌の存在が示唆された。

キーワード: 膜分離活性汚泥法, ファウリング, T-RFLP

原稿受付 2017.12.14

EICA: 22(4) 41-45

## 1. はじめに

膜分離活性汚泥法 (Membrane Bio-Reactor: MBR) は、最終沈殿池の代わりに膜分離を用いるため、固液分離障害がなく、省スペースで清澄な処理水を得ることができる利点を有しており、都市下水処理への適用例が増加している<sup>1,2)</sup>。一方、ファウリング (膜閉塞) が生じてしまった場合、薬液を用いた逆洗浄が必要であり、その防止策として膜表面の剪断力を高めるために大量曝気をしなくてはならない課題も抱えている。

活性汚泥法の污水処理能力は、微生物の中でも細菌の特性に大きく依存している。最終沈殿池を有する標準活性汚泥法とその変法 (従来法) では、沈降性が高い微生物を反応槽に選択的に返送している。MBR では、すべての微生物が沈降性とは関わりなく膜分離されるため、固液分離による選択圧がない。従来法に比べて汚泥滞留時間 (sludge retention time, SRT) が長くなり、増殖速度の遅い微生物も生残できるようになる。微生物濃度が高く維持され、溶存酸素濃度も高く、低BOD-SS負荷となることから、汚泥の自己分解も進み、貧栄養条件に適応できる微生物に有利な環境となる。そのため、MBRには従来法とは異なる微生物叢が形成されることが考えられる。

一方、MBRのファウリングの原因物質は、流入水中の有機物 (多糖類, タンパク質, 腐植物質) や無機物 (CaCO<sub>3</sub>, SiO<sub>2</sub>, Fe(OH)<sub>3</sub>) であり、細胞外高分子物質 (extracellular polymeric substances, EPS) や溶存態代謝産物 (soluble microbial products, SPM) を生産する細菌に

由来する場合もある。分離膜上に生物膜が形成されると膜間差圧が急上昇するため、その対策には、バイオフィウリングに参与する微生物に関する知見が必要である。

しかし、実規模のMBRの微生物学的な研究例は少ない<sup>1,2)</sup>。我々の研究チームでは、真正細菌の16S rRNA遺伝子のT-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)<sup>3)</sup>によって、MBRを用いている国内12ヶ所の下水処理場の活性汚泥の細菌叢が、従来法のものとは大きく異なることを明らかにしてきた<sup>2)</sup>。ここでは、大阪府堺市の三宝下水処理場 (現在は三宝水再生センター) に導入されたMBRの細菌叢の調査結果<sup>4,5)</sup>を紹介する。

なお、T-RFLPは末端蛍光標識したプライマーセットで鋳型DNAをPCR増幅し、制限酵素による消化後、その断片を解析する方法である<sup>3)</sup>。適切な制限酵素を選択すれば、細菌の種類によって異なる長さの断片 (T-RF) がエレクトロフェログラムに現われる。細菌の属種までは正確にはわからないが、そのプロファイル (T-RFの長さや数、蛍光強度) によって、細菌叢構造を大まかに把握できるフィンガープリンティング解析の一つである。T-RFプロファイルから、その類似度に基づいて試料を分類するクラスター解析や、主成分を抽出し、より低次元にて試料を序列化する主成分分析が行われることも多い。

## 2. MBR の活性汚泥細菌叢<sup>4)</sup>

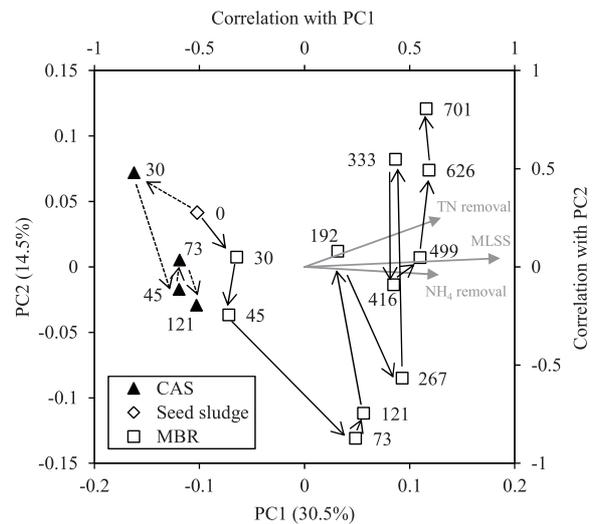
高速道路の建設に伴う水処理施設の移転に伴い、三宝下水処理場では、旧1系の標準活性汚泥法を改造し、2011~2014年までMBRを仮設備として導入した。そのため、国内の他のMBRは処理量が数千 $\text{m}^3/\text{日}$ までであるのに対し<sup>1)</sup>、三宝下水処理場のMBRは、日最大60,000 $\text{m}^3/\text{日}$ （計画日最大フラックス0.58 $\text{m}^3/\text{日}$ ）もの下水を合流式で処理する特殊事例となった。

2011年3月6日（運転0日目）からMBRは運転された。標準法7系のうち、5系（No.1~5）がMBR9系（No.1-1, No.1-2, No.2-1, No.2-2, No.3, No.4-1, No.4-2, No.5-1, No.5-2）に改修された。標準法の残りの2系（No.6, No.7, 各曝気槽3,200 $\text{m}^3$ , 最終沈殿池1719 $\text{m}^3$ ）では、改修事業が終了する7月まで（121日目）、MBRと並行して同じ下水を処理する運転がなされた。

No.3系以外のMBR反応槽は、幅4.0 $\text{m}$ ×長さ99.7 $\text{m}$ ×有効水深4.0 $\text{m}$ であり、窒素除去を目的として、無酸素槽（323 $\text{m}^3$ ）、好気槽（472 $\text{m}^3$ ）、膜分離槽（800 $\text{m}^3$ ）で構成されていた。No.3系は他よりも幅が約1.2倍大きかった。塩素化ポリエチレン製の浸漬型平膜カートリッジ（0.8 $\text{m}^2/\text{枚}$ , 公称孔径0.4 $\mu\text{m}$ , 楕円形）が膜分離槽に設置され、膜分離槽から無酸素槽へ硝化液が循環された。従来法の余剰汚泥が種汚泥としてMBRに導入され、汚泥（MLSS）濃度の調整のために4月に生汚泥も導入されたが、3月21日からは通常の処理運転がなされた。

分離膜が300枚/膜ユニット×46基が設置されていたNo.2-1系MBRおよびNo.6系標準法の活性汚泥試料を解析対象とした。汚泥（mixed liquor suspended solids, MLSS）濃度は、標準法が0.7~1.5 $\text{g/L}$ 程度であったのに対し、MBRは8~10 $\text{g/L}$ に維持された。SRTは、標準法が約20日、MBRは約250日であった。溶存酸素濃度は、標準法が1.5~3.0 $\text{mg/L}$ であり、MBRは大量曝気によって1.9~9.9 $\text{mg/L}$ と高かった。また、日平均膜間差圧は1.3~21.4 $\text{kPa}$ を示し、次亜塩素酸ナトリウム溶液によるインライン洗浄が約1か月に1回実施された。標準法の溶存態有機炭素、全窒素、ケルダール窒素の除去率は、それぞれ68~82%, 48~69%, 53~84%であった。一方、MBRの溶存態有機炭素、全窒素、ケルダール窒素の除去率は、それぞれ83%以上、65%以上、90%以上と良好であった。なお、全リンの除去率は、MBR（30~80%）よりも標準法（50~85%）のほうが良好であった。

MBRと標準法の活性汚泥の制限酵素*HhaI*で消化したT-RFプロファイルは、流入水のものとは大きく異なり、下水中の細菌群は、生物処理槽で生存しにくいことが示唆された。標準法からは18~31個、MBR



**Fig. 1** Principal component scatter diagram based on the *HhaI*-digested T-RF profiles of the MBR and the conventional activated sludge (CAS) process. The number near the plot is the sampling date. Vectors of the correlation coefficients between the operational indicators and principal component scores are also shown.

からは17~49個のT-RFが検出され、そのプロファイルの主成分分析の結果をFig. 1に示す。主成分1と主成分2の二次元空間において、プロファイルの類似しているものは、近くにプロットされる。標準法の活性汚泥では、202~203 bpのT-RFが0~121日目まで優占し、類似したプロファイルが得られた。*β-Proteobacteria*と推定されるこのT-RFは、従来法を採用している大阪府内の他の処理場でも優占することが報告されており<sup>2)</sup>、やはり最終沈殿池によって沈降性が高い細菌が選択されることが、細菌叢の安定性の理由と思われる。MBRの活性汚泥の細菌叢は、運転45日目までは標準法のものと同様であった。しかし、73日目から大きく変化し、202~203 bpのT-RFは相対量が10%以下となり、499日目以降にはFirmicutesと推定される406~409 bpのT-RFが優占し、700日が経過しても細菌叢は変化し続けた。処理場の運転管理指標と第2主成分には強い相関が見いだせなかったが、第1主成分は、MLSS濃度やアンモニア態窒素・全窒素の除去率と相関があった。標準法に適応していた細菌叢に沈降性による選択圧がなくなり、長いSRTや硝化・脱窒の促進など、MBRの環境条件が細菌叢を遷移させたと考えられる。

## 3. MBR のファウリングに関する細菌叢<sup>5)</sup>

続いてNo.3系、No.5-1系、No.5-2系を対象にファウリングに関する細菌叢を調査した。No.3系には400枚/膜ユニット×42基、No.5-1系は300枚/膜ユニット×46基、No.5-2系は300枚/膜ユニット×36基が設置されていた。なお、2014年12月からリ

ン除去のために No.5-2 系は上流の膜ユニット 10 基を除去し、凝集剤が添加された。Table 1 に示すように各調査において、膜分離槽から活性汚泥（試料 AS）を採取し、上流（試料 MU）および下流（試料 MD）の分離膜上の生物膜を採取した。

膜間差圧、フラックス、生物膜中の化学物質の含有量を Table 2 に示す。流入水には、溶存態鉄が 0.25~0.50 mg/L 含まれており、分離膜表面には酸化鉄を含むと思われる赤茶色の生物膜が形成された。生物膜試料は、鉄やカルシウムなどの無機物質を多く含んでおり、SMP も多かった。運転 701 日目の MU-1 と MD-1 は、雨水の流入によって高フラックス運転となったことでファウリングが顕著に進行した状態の生物膜試料である。MU-2, MU-3, MU-4, MU-5 は中度のファウリング状態のものであり、MD-2 と MD-3 は軽度のファウリング状態の生物膜試料である。No.5-1 系 MBR の試料である MU-2 と MU-4 の物理化学指標の差は、18 日間のファウリングの進行を、MU-5 の指標は、逆洗浄から 7 日後のファウリングの再進行を反映している。

T-RF の相対量と、そのプロファイルをクラスター解析した結果を Fig. 2 に示す。運転 192~701 日目に高頻度で検出された 406~409 bp の T-RF は、701~1080 日目にも活性汚泥中で優占していた。軽度なファウリング時の生物膜の細菌叢は、活性汚泥のものと同様であり、クラスター解析によってグループ I を形成した。これらの試料は 406~409 bp に加え、1085~1087 bp の T-RF を共通して含み、AS-2 を除いて 560~565 bp の T-RF も多かった。また、201 bp の T-RF は少なかった。

**Table 1** Abbreviations of samples of biofilm on the membranes and activated sludge

| Days from the start-up | MBR     | Abbreviations of the samples from |                     |                  |
|------------------------|---------|-----------------------------------|---------------------|------------------|
|                        |         | upstream membrane                 | downstream membrane | activated sludge |
| 701                    | No. 3   | MU-1                              | MD-1                | AS-1             |
| 1054                   | No. 5-1 | MU-2                              | MD-2                | AS-2             |
| 1055                   | No. 5-2 | MU-3                              | MD-3                | AS-3             |
| 1072                   | No. 5-1 | MU-4                              | Not collected       | AS-4             |
| 1080                   | No. 5-1 | MU-5                              | Not collected       | AS-5             |

中度のファウリング時の生物膜試料は、グループ II を形成した。これらの細菌叢には、201 bp の T-RF が多く、グループ I に優占していた 406~409 bp の T-RF が少なかった。また、MU-2 と MU-3 には 203 bp と 341~343 bp が、MU-3 と MU-4 には 58~59 bp の T-RF が多いことが特徴的であった。

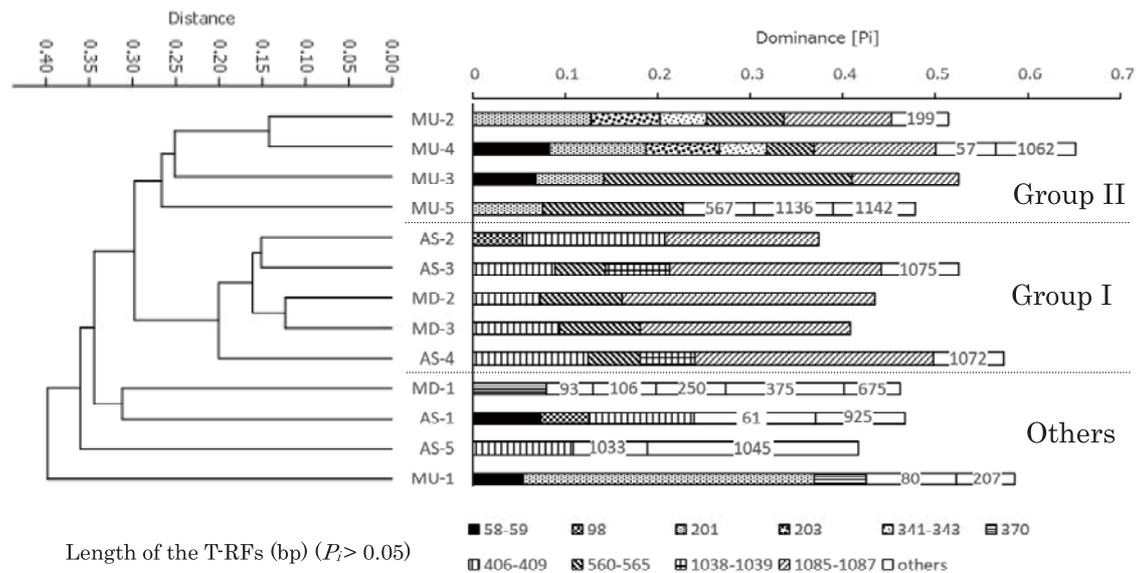
グループ I とグループ II の試料の多くは、560~565 bp と 1085~1087 bp の T-RF を含んでいたが、それらを含まない試料は、どちらのグループにも属さなかった。顕著なファウリング時の生物膜試料 MU-1 には 370 bp, さらに MD-1 には 375 bp と 675 bp の T-RF が特徴的に含まれていた。MU-1 はグループ II に共通して検出された 201 bp の T-RF や、MU-2 と MU-3 に検出された 58~59 bp の T-RF も含んでいた。活性汚泥 AS-1 と AS-5 には、グループ I に特徴的な 406~409 bp の T-RF も含んでいた。

T-RF プロファイルの主成分分析の結果を Fig. 3 に示す。第 1 主成分の負荷量の絶対値が大きい T-RF は、201 bp (+0.42), 1085~1087 bp (-0.77), 406~409 bp (-0.23) であった。そのため、グループ I の第 1 主成分得点は負値となり、グループ II に属する中度のファウリング時の生物膜と MU-1, どちらのグループにも属さない試料は第 1 主成分得点が正值となった。第 2 主成分の負荷量の絶対値が大きい T-RF は、1045 bp (+0.40), 406~409 bp (+0.33), 560~565 bp (-0.50), 201 bp (-0.40), 1085~1087 bp (-0.26) であった。そのため、グループ II の試料は第 2 主成分得点が負値となった。物理化学指標との相関解析の結果、膜間差圧と試料中の腐植と鉄の含有量は、第 1 主成分と正の相関を示した。すなわち、生物膜中において 201 bp の T-RF を持つ細菌が優占化し、1085~1087 bp と 406~409 bp の T-RF を持つ細菌が非優占化すると、ファウリングが進行していることを示している。

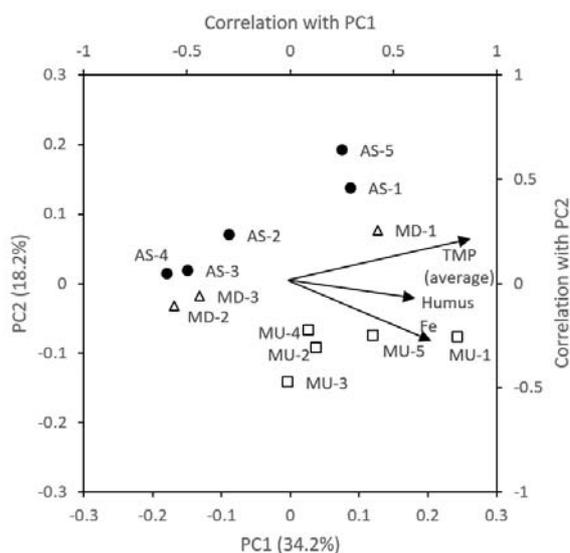
バイオフィウリングの進行モデル<sup>6)</sup>では、まず分離膜に付着しやすい先駆種が生物膜の形成のきっかけとなるとされている。先駆種は EPS や SMP を生産し、分離膜への付着性は、細胞の表面構造や疎水性、電荷などが関与している。さらに他の細菌種を巻き込んで

**Table 2** Characteristics of the membranes and the biofilm samples in the MBRs

| Sample | Days after backwashing [days] | Average TMP [kPa] | Flux [m/d] | Fe | Ca | Al [mg/m <sup>2</sup> -membrane] | Protein | Humus |
|--------|-------------------------------|-------------------|------------|----|----|----------------------------------|---------|-------|
| MU-1   | 28                            | 15.4              | 0.57       | 62 | 23 | 13                               | 9       | 13    |
| MD-1   | 28                            | 9.9               | 0.57       | 2  | 2  | 2                                | 10      | 5     |
| MU-2   | 13                            | 2.3               | 0.36       | 20 | 10 | 9                                | 19      | 6     |
| MD-2   | 13                            | 1.2               | 0.36       | 2  | 3  | 3                                | 2       | 1     |
| MU-3   | 35                            | 2.2               | 0.37       | <1 | <1 | <1                               | 3       | 1     |
| MD-3   | 10                            | 1.1               | 0.37       | <1 | <1 | <1                               | <1      | <1    |
| MU-4   | 31                            | 3.9               | 0.47       | 33 | 14 | 12                               | 9       | 14    |
| MU-5   | 7                             | 2.5               | 0.46       | 14 | 5  | 5                                | 5       | 2     |



**Fig. 2** Dendrogram showing clustering of the *HhaI*-digested T-RF profiles of biofilm on the membranes and activated sludge in the MBRs. The ratio of the major T-RFs with dominance  $> 0.05$  in each T-RF profile are also shown. The figures in the bar graphs mean length of the T-RFs, whereas commonly dominant T-RFs are shown as the patterns of the bars.



**Fig. 3** Principal component scatter diagram based on the *HhaI*-digested T-RF profiles of biofilm on the membranes and activated sludge in the MBRs. Vectors of the correlation coefficients between the fouling indicators and principal component scores are also shown.

生物膜は成長し、ある程度肥大化すると、内部に酸素や基質が届きにくくなり、先駆種の何種類は生存しにくくなる一方、遷移種や極相種である細菌種が優占化する。分離膜上の生物膜が、大量曝気による剪断力でも剥離できないほどの極相に達すると、膜間差圧が上昇し、薬液洗浄が必要となる。

このモデルに基づいて考えると、406~409 bp, 560~565 bp, 1085~1087 bp の T-RF を持つ細菌は、洗浄後の分離膜の表面に付着する先駆種である可能性がある。一方、生物膜には少なく、活性汚泥のみから検出された 1038~1039 bp の T-RF を持つ細菌は、分

離膜に付着しにくい種類かもしれない。406~409 bp の T-RF を持つ細菌は、生物膜が成長すると優占化しにくいものの、201 bp, 58~89 bp, 203 bp, 341~343 bp の T-RF を持つ細菌は、生物膜形成の遷移種または極相種である可能性がある。なお、雨水の流入後にファウリングが顕著に進行した状態の生物膜は、高フラックス運転によって有機物、無機物とともに、微生物が分離膜上に付着・濃縮され、307 bp の T-RF を持つ細菌のような特殊な細菌叢を形成したと考えられる。

#### 4. おわりに

T-RFLP 解析により、沈殿池を有する従来法とは異なる活性汚泥細菌叢が MBR には形成され、分離膜上の生物膜には、バイオフィリングに関与する細菌叢が形成される知見が得られた。最近では、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子解析が可能になり、MBR に特徴的な細菌の特性を把握することができれば、運転操作や処理性能と関連付けることによって、新たなリアクターデザインや論理的な運転指針の構築につながるものと考えられる。

#### 謝辞

本原稿は、堺市、日本下水道事業団、大阪大学の共同研究成果<sup>4,5)</sup>をもとに再構成したものである。堺市ならびに日本下水道事業団、クボタ環境サービス株式会社の関係各位に謝意を表す。

## 参考文献

- 1) C.-Y. Wan, H. De Wever, L. Diels, C. Thoeye, J.-B. Liang and L.-N. Huang: Biodiversity and Population Dynamics of Microorganisms in a Full-scale Membrane Bioreactor for Municipal Wastewater Treatment. *Water Res.*, Vol. 45, No. 3, pp. 1129-1138 (2011)
- 2) K. Takada, K. Hashimoto, S. Soda, S. M. Ike, K. Yamashita and T. Hashimoto: Characterization of Microbial Community in Membrane Bioreactors Treating Domestic Wastewater. *J. Water Environ. Technol.*, Vol. 12, No. 2, pp. 99-107 (2014)
- 3) C. L. Kitts: Terminal Restriction Fragment Patterns: A Tool for Comparing Microbial Communities and Assessing Community Dynamics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, Vol. 2, No. 1, pp. 17-25 (2001)
- 4) K. Hashimoto, H. Tsutsui, K. Takada, H. Hamada, K. Sakai, D. Inoue, K. Sei, S. Soda, K. Yamashita, K., Tsuji, K., T. Hashimoto and M. Ike: Changes in Bacterial Community Structure in a Full-scale Membrane Bioreactor for Municipal Wastewater Treatment. *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 122, No. 1, pp. 97-104 (2016)
- 5) K. Takada, K. Hashimoto, S. Soda, S. M. Ike, M., T. Makio, Y. Nakayama, H. Miyamoto, K. Yamashita and T. Hashimoto: Microbial Communities on the Submerged Membranes in Full-scale Membrane Bioreactors Treating Municipal Wastewater. *J. Environ. Eng.*, Vol. 144, No. 1, 04017084 (2017)
- 6) K. Zhang, H. Choi, D. D. Dionysiou, G. A. Sorial and D. B. Oerther: Identifying Pioneer Bacterial Species Responsible for Biofouling Membrane Bioreactors. *Environ. Microbiol.*, Vol. 8, No. 3, pp. 433-440 (2006)