

論文の内容の要旨

論文題目

Analysis of Microbial Communities and Their Interrelationship in the Membrane Separation Activated Sludge Process

(膜分離活性汚泥プロセスにおける微生物群集とその相互関係の解析)

氏名

Begum Shaila Luxmy

(ラクシミー, ベーガム シャイラ)

膜分離活性汚泥 (MSAS: Membrane Separation Activated Sludge) プロセスは、膜生物反応槽 (MBR: Membrane Bioreactor) の1種であり、膜分離により固液分離を行う活性汚泥法である。微生物群集は生物学的廃水処理プロセスにおける活性汚泥を形成し、処理の重要要素であるが、その知見は特に近年発達した MSAS プロセスについて不足している。MSAS プロセスの微生物群は従来型の活性汚泥 (CAS: Conventional Activated Sludge) プロセスとは異なり得、より明確な解析が求められる。本研究の目的は、最適処理条件に関する知見を与えるために、MSAS プロセスにおける微生物群集、即ちその構造・役割・相互関係／相互作用、更には異なる環境下での差異、を明らかにすることである。

実験は、東京都内の下水処理場にパイロットスケールの MBR を 4 槽設置して行った。メインの反応槽 (メイン MBR) は大きさが (1000mm × 1000mm × 200mm)、流速が 100l/ d、HRT が 1.5d とした。流出水は 6 分毎に 1 分間のサイクルで引き抜かれた。膜フラックスは 0.15m/ d に保った。その他の反応槽 (MBR1~3) には実下水 10l/ d を流入させ、HRT は 1d とした。膜は孔径 0.1 μ m の中空糸膜を用いた。本研

究では、2 つの分子生物学的手法、in situ 蛍光ハイブリダイゼーション法 (FISH: Fluorescent In Situ Hybridization) と PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (PCR-DGGE: Polymerase Chain Reaction- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) を適用し、MSAS プロセスの微生物多様性を解析した。

● MBR 内の微生物群集解析と CAS 等との比較

FISH 法によって、MBR における微生物群集の構造を解析した。用いたオリゴヌクレオチドプローブは、ALF1b (ターゲット: Proteobacteria α)・BET42a (Proteobacteria β)・GAM42a (Proteobacteria γ)・HGC69a (高 G+CDNA のグラム陽性菌)・CF319a (Cytophaga-Flavobacterium) の 5 種である。また、EUB338 (Eubacteria) プローブも同時に用いた。その結果、EUB プローブとの比より、Proteobacteria の α -、 β -の両サブクラスが MBR において優占している事が明らかになった。また、DGGE 法によって MSAS プロセスと CAS との微生物群集を比較した。その結果、MBR と CAS の微生物群集の差異がバンドパターンの差異として現れた。また、バンドパターンの定量的解析によって、MBR における微生物群集は CAS のものとは 0.6 以上の非類似度指標をもって異なっていた。また、微生物多様性指標 (Shannon-Weaver 指数) を求めた結果、MBR1 と CAS では似たような値を示したものの、その微生物群集は互いに異なった。さらに、様々なパイロットスケールの処理プラント (嫌気-好気、無酸素-好気、回分式) と MBR との比較も行い、MBR の多様性指標はこれらのプラントにおける値とは異なり、それぞれのプラントについてもまた、その最適運転条件 (pH など) によってもまた違うことが分かった。

● MBR 内の硝化細菌の解析

アンモニア硝化・亜硝酸硝化に特定の様々なオリゴヌクレオチドプローブを用いて、MBR 内の硝化を行う群集の解析を行った。その結果、MBR は *Nitrosomonas* や *Nitrosococcus* などのアンモニア硝化細菌の増殖に非常に適しており *Nitrobacter* も非常に多く観察された。硝化細菌は様々な形状を見せるクラスターを形成していたが、それは細菌細胞の配列や位置の差異によっていた。*Nitrobacter* もクラスターを形成した。当初の仮定では、MBR システムではウォッシュアウトが起こらないため、硝

化細菌は、基質・酸素の運搬に好ましい分散形態をとるものと考えられた。ところが、アンモニア硝化細菌は、殆ど凝集体・クラスターを形成していた。さらに、そのクラスターの詳細な観察により、基質・酸素の供給に優れた空隙構造が明らかになった。さらにクラスター内には、同様の機能を果たすと考えられる経路の存在が示唆された。3次元配置と断面解析によると、あるフロックは球形であったが、不定形フロックでは特に細胞は表面に位置するだけのものもあった。硝化細菌の比率は、小フロックの方が大フロックよりも高かった。

平均運転条件を仮定し、フロック内の基質・酸素の輸送を記述した数学的シミュレーションを行った。その結果、小さいフロック(40~50 μm 以下)において、独立栄養細菌の効率が高いことが分かった。さらにこのシミュレーションにより、MBR内のフロックは通常小さいため、効率的な独立栄養細菌の汚泥を得ることがMBRでは比較的容易であることが、重要な知見として明らかになった。このシミュレーションの結果と自動粒径測定器によって得たフロック径データをもとに、MBR内の基質利用における独立栄養細菌の寄与率を計算したところ、全体の72%がプロセス中の独立栄養細菌によるものであると算出された。また、pH=5~7の範囲内でMBRを運転したところ、pHが硝化細菌に及ぼす影響は硝化作用・細胞配置共に見られなかった。

● MBR内のフォーミング微生物の解析とCASとの比較

活性汚泥法において最も困難で頻発する、操作運転上の障害の1つは、曝気槽内での粘性のある泡の発生(フォーミング)である。本研究でもメインMBRにて厚い茶色の泡が発生したので、泡とフォーミングMLSSを採取した。また、CASで生じたフォーミングとの比較も行った。フォーミング微生物フロックは、グラム染色によれば比較的小さかった。グラム陽性に属する枝状*Nocardia*がフロック内部に見られ、外側にも分散して観察された。その他のグラム陽性桿菌・球菌は分散形態として数多く観察されたが、その菌種は顕微鏡観察では判定できなかった。一方、CASのフォーミングではフロックが概して大きく、互いに*Nocardia*の枝状糸状菌(MBRよりも極めて長い)によって連なっていた。オリゴヌクレオチドプローブを用いた二重染色をMBRおよびCASの泡に適用した。用いたプローブは、*Mycobacterium*プローブ(S*-Myb-0736-a-A-22)と*Gordona (Nocardia) amarae*プローブ(S-S-G.am-0192-a-

A-18)である。FISH イメージより、CAS のフォーミング微生物 (Myb より同定) の 90% 以上が *Gordona amarae* に属している一方、MBR ではその他の分散したフォーミング微生物が観察された。さらに、Eubacteria に対する *Gordona amarae* の比も 3 ヶ月間で 35% から 20% に減少した。また DGGE によってフォーミング微生物の群集構造変化がバンドパターンの変化として観察できた。MBR と CAS のフォーミング MLSS の Shannon-Weaver 指数はそれぞれ 1.54、1.58 と差がみられなかった。さらに、DGGE バンドを切り出して V3 と V9 部位のシーケンシングを行った。得られたシーケンスは、フォーミング原因微生物として知られる *Mycobacterim*、*Actinomycetes*、*Acinetobacter*、*Planctomyces* と高い相同性を得た。特に、優占的な V9 バンドは *Mycobacterim nonchromogenicum* との 100% 類似を得た。また pH がフォーミングに与える影響を調べるために、pH を 5 から 7 まで変化させた MBR で泡の高さを測定し、放線菌を観察した。その結果、pH=7 付近で泡が最も低かった。また、放線菌の Eubacteria に対する割合を FISH によって算出した結果、pH の上昇によって減少した。しかし目視による変化は認められなかった。

● パイロットスケール MBR 内のフォーミングとその原因微生物

様々な処理場にあるパイロットスケールの MBR で発生するフォーミングの形成前後の解析を行った。当初、汚泥の上澄み及び沈降汚泥の両方から、高 G+C 含有細菌 (actinomycetes) とフォーミングの原因となる mycolic acid 含有細菌群が非常に多く存在していた。また DGGE 解析では、上澄み・沈降汚泥中の分散した細菌は同じバンドパターンを示すことが明らかになった。さらに、フォーミング形成前にも *Nocardia* 様の枝状糸状細菌が多く存在し、フォーミングの形成を示唆していた。また、最も障害を引き起こす糸状菌の 1 つである *Microthrix parvicella* 様の枝状糸状菌も観察されたが同定は出来なかった。形成後の試料からは、*Nocardia* spp.、*Microthrix parvicella*、*Nostocoida limicola*、type1851、type0041、type1701、type0675、type021N、type0914 等の形態の様々な糸状菌が観察された。さらに、種特異オリゴヌクレオチドプローブを用いたところ、*Gordona amarae*、type021N、*Sphaerotilus*、*Thiothrix nivea* の存在が確認できた。また、*Microthrix parvicella* が同定できたので、MPA プローブ (*Microthrix parvicella* 特異) と Eub プローブにより、

Microthrix parvicella 群集の定量を行った。その結果、*Microthrix parvicella* は泡の中で最も優占的である事が分かった。

● MBR 内の捕食生物が細菌やフロックに及ぼす影響

MSAS プロセスではその長い SRT のために、捕食者(原生動物や後生動物の様な高等な生物)と被食者(主に細菌)の関係が非常に重要な役割を果たす。本研究の MBR でも捕食微生物が数多く観察され、とりわけ繊毛類が多かった。MBR フロックは 200 μm 以下と小さいが、中でも 10 μm 以下の極めて小さいフロック群が非常に高い割合を占めていた。これは、引き抜き以外の流出がないために細かい粒子の継続的な蓄積が起こるためである。同様に、分散した細菌のサイズに関する分布においても、長さ 1 μm 以下の極めて小さい細菌群が優占していた。捕食者のポピュレーションは安定せずその数も変動した。捕食者、特に固着性繊毛類・遊泳性繊毛類の増加に伴い、10 μm 以下の繊毛類の捕食に適したサイズのフロックならびに 1 μm 以下の細菌群は大幅に減少した。この変動パターンより、10 μm 以下のフロックは 1 μm 以下の微生物によって構成されていると示唆された。さらに、1 μm 以下の細菌群は捕食者数との強い負の相関が見られた。即ち、MSAS プロセスではこれらの小さな細菌による小さなフロックが極めて良く捕食される状態にある、と結論付けられた。

● MBR の環境変化と微生物群集と処理成績の変動

MBR システムの内部に担体となる物質を導入することは高等捕食生物の増殖条件を改善し、高密度の後生動物群集は汚泥の無機化につながる、と考えられる。本研究では、上記の考えから MBR3 種類の比較によって担体導入の効果を測定した。即ち、1 つは担体のみを導入し、もう 1 つは担体と環形動物(ミミズ)を導入し、もう 1 つは対照として何も導入しなかった。これらの処理システム内の変更は生態系全体に影響を与えると考えられ、処理水質と共に群集解析も行った。その結果、処理水質・微生物群集の両方の面で差異が見られた。担体のみを導入したリアクターで最も良い炭素・窒素の除去成績を得た。即ち、処理水中の DOC 濃度は最も少なく、NO₃-N 濃度は最も多かった。一方、ミミズを加えたリアクターでは、処理水中の DOC・NH₄-N 共に最も高く(徐々に改善した)、NO₃-N は最も低かった。また、平均フ

ロック径はミミズを投入したリアクターが最も小さかった。さらに DGGE によって、ミミズを投入したリアクターではある種の細菌が時間と共に消滅することが示された。その他の高等微生物群集は、リアクターごとに大きく違っていた。即ち、担体のみを導入したリアクターでは固着性繊維毛類のみが優占する一方、ミミズを投入したリアクターでは遊泳性繊維毛類・ほふく性繊維毛類が優占した。なお、対照リアクターではいずれも多く存在していた。

MBR における微生物多様性と処理効率に与える pH の影響を調べるために、pH=5・6・7 の 3 条件で運転した。DGGE バンドパターン解析から求めた Shannon-Weaver 指数より、高 pH ほど微生物多様性が観察された。MBR1 では pH が 7、MBR2 では pH=6 と通常範囲内となった。その結果、高 pH の方が良い処理効率を達成し、より高い生物多様性を示す、という関係を得た。