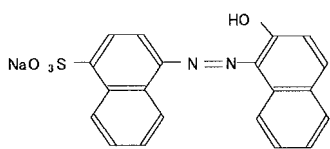


*sphaeroides* を単離培養した。この光依存性細菌は、元々、光依存性細菌共存型脱窒汚泥 (photosynthetic bacteria coexisting in denitrifying sludge: 熊本大学 古川教授より分与) に存在していた菌種である。この生物叢は下水処理場の嫌気処理槽汚泥を嫌気-可視光照射下で紅色となるまで培養することによって得られた。この生物叢より、単離培養した光依存性細菌溶液を 5800 rpm で約 4 分間遠心分離させ上澄みだけを分取し、濾過 (孔径 0.45 $\mu$ m) して細胞を除去した濾液を、細胞由来物質溶液として以下の各実験を行った。

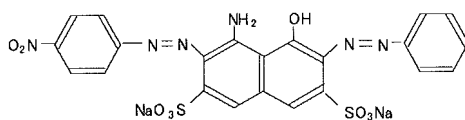
### B. 1. 染料と二次処理水の脱色処理能力

処理対象物質と細胞由来物質を混合させ、溶液中の吸光スペクトル時間変化を調べた。光源として蛍光灯 (日立製 20 W) を用い 37 $^{\circ}$ C の恒温槽内で行った。

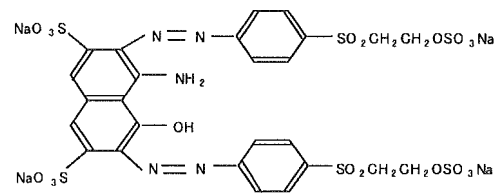
各対象物質の濃度測定は各吸光ピーク波長を用いて行った。対象物質は染料と二次処理水 (落合処理場) とした。フミン酸、タンニン酸は、二次処理水の主な着色成分と考えられているため、今回用いることとした。それぞれの物質の構造式を図 1 にまとめた。また溶解条件および吸光ピーク波長を表 1 にまとめた。



Acid Red 88 (AR88)



Acid Black 1 (AB1)



Reactive Black 5 (RB5)

図 1 使用染料の構造式

表 1. 各対象物質の実験条件

Target substance	concentration (M)	volume (ml)	Extracellular material (ml)	absorbance peak (nm)
Acid Red 88	$1 \times 10^3$	0.5	9.5	510
Acid Black 1	$1 \times 10^3$	0.5	9.5	620
Reactive Black 5	$1 \times 10^3$	0.5	9.5	600
Secondary effluent		5	5	
Humic acid	$5 \times 10^7$	1	9	
Tannic acid	$5 \times 10^6$	1	9	

### B. 2. 光触媒による細胞損傷に伴う細胞由来物質および脱色能力への影響

光依存性細菌の単離培養液を図 2 に示す円筒型の反応容器に投入し、光触媒酸化チタン・コーティングした石英板の光触媒面が光依存性細菌溶液と接触するように蓋をし、溶液を攪拌しながら反応させた。光源は紫外線 (東芝製殺菌灯, 20W) とした。

1 日間光触媒反応をさせた後、溶液中の細胞由来物質増加量を吸光度変化によって調べた。

さらに対象染料として Acid Blue 92 を用いて、脱色処理速度を調べた。ここでは分離して得た細胞由来物質溶液 5 mL に、濃度 1000 mg/L の AB92 を 0.1 mL を加えて実験を行った。

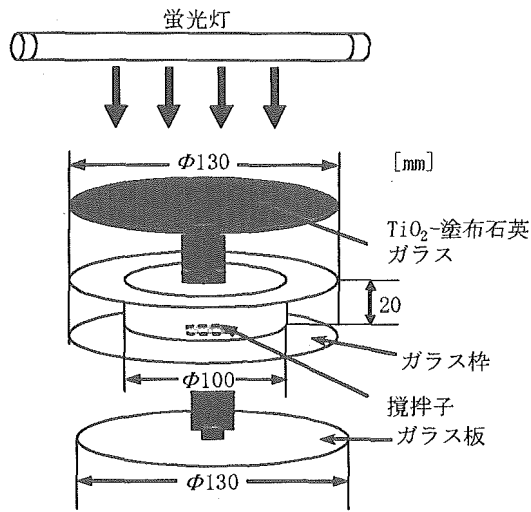


図2 光触媒反応装置

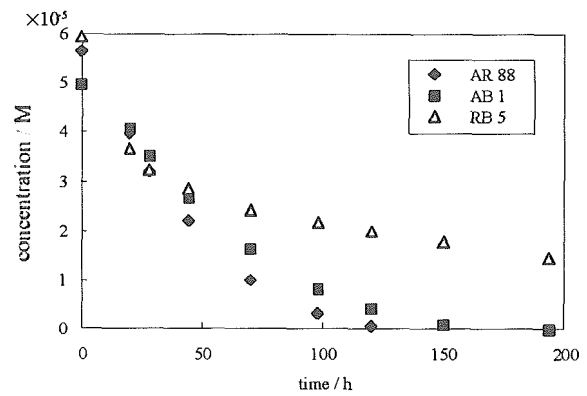


図4 AR88, AB1, RB5 の濃度変化

C. 研究結果および考察

C. 1. 染料物質の脱色分解効率

細胞由来物質に蛍光灯による可視光照射を行うことにより3種の染料は全て脱色されることがわかった。図3にAR88+細胞由来物質溶液の吸光スペクトル変化、図4に核物質のピーク波長吸光度より算定した各染料の濃度変化を示す。

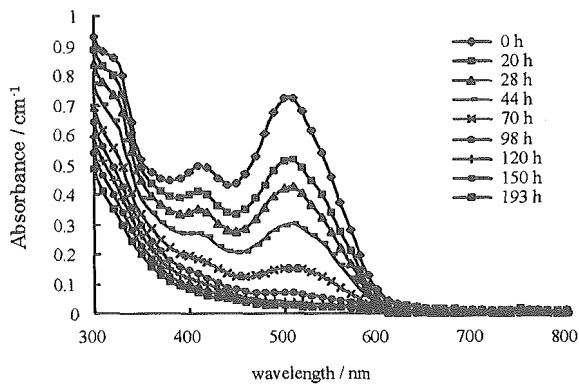


図3 Acid Red 88 溶液の吸光スペクトル変化

図4より、酸性染料 (AR88, AB1) と反応性染料 (RB5) の反応速度は大きく異なることがわかった。

C. 2. 反応機構について

上記の細胞由来物質の可視光応答反応が、酵素反応であるとして、Michaelis-Menten 式を仮定し、次式(1)に従うとして実験データをプロットした。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_s} \frac{1}{C} + \frac{1}{V_s} \quad \dots (1)$$

$v$ : 反応速度 [h/M]     $V_s$ : 最大速度 [h/M]  
 $K_m$ : ミカエリス定数 [M]     $C$ : 染料濃度 [M]

プロットした結果、酸性染料 (AR88, AB1) は、直線関係が得られ、Michaelis-Menten 式にあてはまることがわかった。しかし反応性染料 (RB5) の当てはまりは悪く、異なる機構をもつものと考えられた。

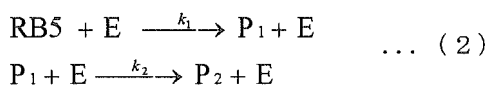
表2に各染料の脱色反応における Michaelis-Menten 式の各係数の算定結果を示した。

表.2 Michaelis-Menten 式の各係数

	$V_s \times 10^3$ [h/M]	$K_m \times 10^4$ [M]
Acid Red 88	4.87	3.62
Acid Black 1	4.8	7.57

$K_m$  は、中間生成物形成の平衡定数を指し、細胞由来物質の染料に対する親和性を表す。AR88 と AB1 を比較すると、 $K_m$  の値が AR88 の方が小さい。このことより、AR88 は AB1 より、細胞由来物質に対して親和性が大きいことがいえる。しかし、一般的な酵素反応の値と比較すると、大きい値であることがわかった。

RB5 については、別の反応機構が考えられる。既存の研究より、生物代謝による染料はアゾ結合が開裂して脱色されることがわかっている。そこで、RB5 の2つのアゾ結合が順次開裂されていく次のような2段階反応を仮定した。



P1：中間生成物（吸光は RB1 の半分）

P2：最終生成物（吸光無し）

E：細胞由来物質

ここで、P<sub>1</sub> は発色団を完全に分解していないので吸光物質であり、もとの RB5 の半分の吸光を持つと仮定した。従って吸光成分は RB5 と P<sub>1</sub> であり、全体の吸光度および吸光度より算定される濃度変化を表すのは、 $S + 1/2 P_1$  となると仮定した。また、1段階目と比べて、2段階目の反応が相対的に非常に遅い ( $k_1 \gg k_2$ ) と仮定した。以上の仮定のもとに、速度式を展開して次式 (3) を得た。

$$[\text{RB5}] = [\text{RB5}_0] e^{-k_1[E]t} \frac{1}{2} \frac{k_1 [\text{RB5}_0]}{k_2 - k_1} (e^{-k_1[E]t} - e^{-k_2[E]t}) \dots (3)$$

RB5 の実験データに合うように定数  $k_1, k_2$  を求

めたところ、それぞれ  $k_1[E] = 1, k_2[E] = 0.04$  であった。この結果を図5に示す。この反応機構モデルによって現象を表すことができたと考えられる。

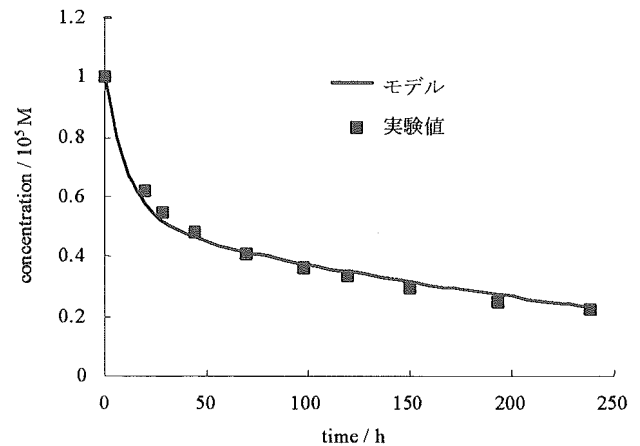


図5 RB5 の反応機構モデルと実験値

### C. 3. 二次処理水および着色物質の脱色効率

二次処理水を細胞由来物質を用いて可視光照射下で反応させたところ、可視光領域に全体的に吸光度が減少した。図6に二次処理水を細胞由来物質に混合して可視光照射を行った時の溶液の吸光スペクトル変化を示す。染料と比較して反応速度は非常に遅かった。

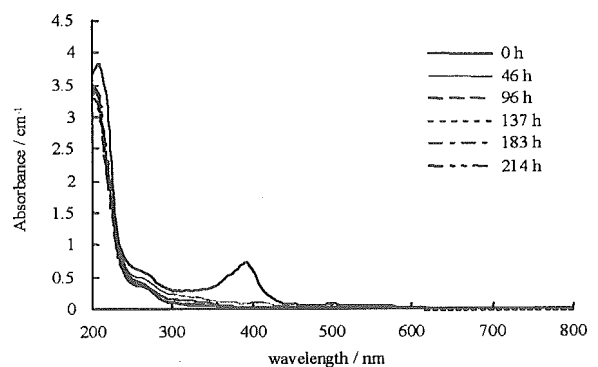


図6 二次処理水の吸光スペクトル変化

二次処理水中の主な着色物質と考えられてい

るフミン酸について脱色効果を調べてみた。図7は、フミン酸を細胞由来物質に混合して可視光照射を行った時の溶液の吸光スペクトル変化を示す。図より、二次処理水と同様に吸光度は減少しているが、その速度は非常に遅かった。

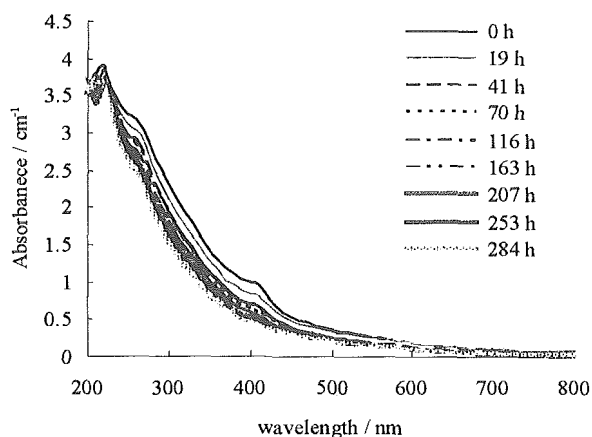


図7 フミン酸溶液の吸光スペクトル変化

タンニン酸は、中間生成物ができ、色が濃くなったが、その後時間経過ごとに、吸光度は減少した。二次処理水そのものでは、色は少し黄色がかっているが、時間経過ごとに吸光度も少しではあるが減少し、色もなくなっていった。時間はかかるが、二次処理水に対しても処理能力があると考えられる。

#### C. 4. 光触媒反応による細胞由来物質量の増加と脱色能力への影響

光触媒反応を光依存性細菌 *Rhodobacter sphaeroides* に行うことで細菌細胞を損傷し、細胞内由来物質と考えられるものを放出させ、脱色能力をもつ細胞由来物質を増加させる方法を試みた。

細胞由来物質量は、この物質を分離した溶液の吸光ピーク波長である 390 nm の吸光度で比較

した。測定結果を表3に示す。

表3 各反応後溶液の吸光度比較

	absorbance:390 nm [cm <sup>-1</sup> ]	rate of increase [%]
0 h	0.1671	100
24 h with photocatalysis	0.202	121
24 h without photocatalysis	0.1764	106

一日間、光触媒反応を行った場合の溶液中の弓道は、反応を行わずに一日間おいたものに比べて、14%程値が増加しており、細胞由来物質を増加させることができた。

次に、これらの細胞由来物質溶液に対象染料として AB92 を加えて脱色実験を行った結果を図8に示す。

図に示されるように、細胞由来物質が増加しているにも関わらず、その他の場合と脱色反応速度は変わらないことがわかった。

以上のことから光触媒反応によって、細胞由来物質を増加させることは出来たが、それによって増加させた物質には顕著な脱色能力が認められないことがわかった。

また光触媒反応によって、脱色反応をもつ細胞由来物質が分解された可能性も考えられる。

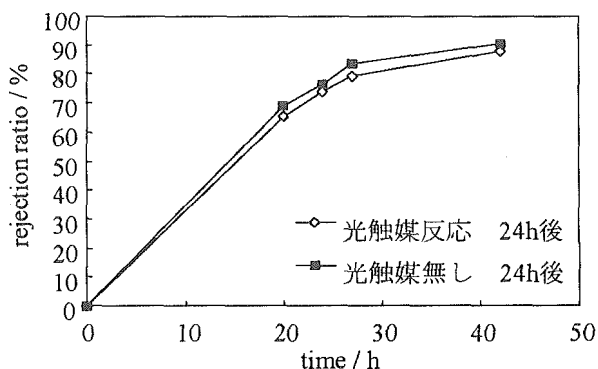


図8 光触媒反応の有無における脱色率変化

## D. 結論

細胞由来物質は蛍光灯照射下において、酸性染料の分解能力を持つこと、二次処理水に対しては分解能力はあるが時間かかることがわかった。効率を高める方法の一つとして、細胞由来物質を増やすことが考えられる。光触媒反応による細胞からの溶出増加を狙ったが、細胞由来物質は増えたものの、分解能力の増加には至らなかった。従って、現時点では、依存性細菌数を増加させることが、細胞由来物質の増加方法として有効な手段と考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hong J., Emori H. and Otaki M., Photodecolorization of Azo dyes by extracellular metabolites under fluorescent light and influence of operational parameters, *J. of Bioscience and Bioengineering*,

(査読済み, 掲載予定)

### 2. 学会発表

洪静蘭, 江守寛子, 大瀧雅寛「光合成細菌の細胞外物質による染料の光分解」第41回環境工学フォーラム講演集, pp.74-76, 2004

厚生科学労働研究費補助金(がん予防等健康科学総合研究事業)  
分担研究報告書

都市下水処理を目的とした MBR 内の微生物群集構造と運転性に関する研究  
分担研究者 岡部 聡 (北海道大学大学院工学研究科助教授)

## 研究概要

近年、従来の排水処理法に膜分離技術を導入した生物学的排水処理法である、MBR 法が注目されている。MBR 法は多くの利点を有する一方で膜ファウリングの発生に伴う運転性の低下が生じるという欠点を有する。この膜ファウリングにおいて、特に MBR 槽内の微生物群集に関連して生じるバイオフィウリングの影響は大きい。

本研究では、パイロットスケールの凝集沈澱を前処理として設けた MBR (HMBR)、および直接排水を処理する MBR (CMBR) における微生物群集構造の解析を、FISH 法を用いて行った。その結果、CMBR の MBR 槽内には *Chloroflexi* に属する糸状性細菌が優占的に存在することが確認された。*Chloroflexi* は主にフロック内に存在し、フロックの形成を助長することにより、混合液粘度の上昇等、混合液の物理特性に影響をおよぼすことが示唆された。また、MAR-FISH 法を用いた解析により、嫌気・好気条件に関わらず、微生物細胞壁の主要構成物質である NAG を利用することが確認され、MBR 槽内で最終有機物分解者として機能することにより、MBR の処理・運転性に大きく寄与している可能性が示唆された。更に、CMBR の膜モジュール面において、運転の継続に伴い、微生物が付着・増殖することによりバイオフィームを形成し、膜ファウリング発生の要因の一つとなっていることが示唆された。このバイオフィームを形成する主要な微生物は  $\beta$ -*Proteobacteria* に属する細菌であることが明らかとなった。これらの、混合液中の *Chloroflexi* および膜面上に主に付着・増殖する  $\beta$ -*Proteobacteria* に属する細菌の単離、およびその生理生態学的特徴の把握を行うことは、MBR の処理・運転性に関する機能の改善を行う上で非常に有用な結果を得ることができると考えられた。

## A. 研究目的

### 研究背景

現在、都市下水・産業廃水処理は標準活性汚泥法 (Activated Sludge, AS) が最も多く採用されている。活性汚泥には多種多様な微生物が存在し、排水中の有機物の分解に寄与している。このような生物学的処理を用いた排水処理法の一つに、膜分離活性汚泥 (Membrane Bioreactor, MBR) 法がある。MBR 法は、①膜孔径に応じた完全な固液分離が可能、②処理過程における余剰汚泥の生成を抑制することが可能、そして③増殖速度の遅い微生物の保持も可能等の利点を有する。このような利点のために MBR 法はより良好な処理水を得ることが可能であることから、都市下水処理への適用が検討されている。一方、MBR 法には膜ファウリングの発生による膜透過水フラックスの低下等が生じることから、安定した運転を長期間連続して行うことが困難という欠点をもつ。現在、この膜ファウリング発生機構の解明、および抑制方法について様々な研究が行われているが、未だ不明な点が多い<sup>1),2),3)</sup>。

膜ファウリングは膜の素材と活性汚泥中の物質との相互作用により生じると考えられている<sup>1)</sup>。活性汚泥中の物質とは溶解性物質、微生物、微生物残屑、および細胞外ポリマー (EPS) に代表される微生物代謝産物のことである。活性汚泥、および排水中に含まれる溶解性有機物は微生物により分解処理される。また溶解性有機物の分解処理過程において EPS 等の代謝産物が生じ、

様々な微生物の代謝を経て最終的に難分解性の最終代謝産物となる。EPS の様な生物代謝産物は活性汚泥中でのフロック形成の機能を担う他、膜ファウリングの直接の原因物質となると考えられている<sup>4),5),6),7)</sup>。このため、MBR を用いた排水処理系では、いかに溶解性有機物を最終代謝産物まで分解するかが重要となる。このことから溶解性有機物の処理性、膜ファウリングに関連する MBR の運転性、および微生物群集は密接に関連しているといえる。

微生物群集には多種多様な微生物が存在しているが、その中で培養可能な微生物は僅か数%程度である。そこで環境浄化の鍵を握る、培養困難な微生物を特異的に検出する方法が必要となる。近年の進展の著しい分子生物学的手法を利用した解析の進展は、これまで生態学的なアプローチだけでは解析不可能であった部分を次々と明らかにしてきた。中でも Polymerase Chain Reaction (PCR) 法、および Fluorescence in situ Hybridization (FISH) 法の貢献は大きく、微生物群集に関する理解を深めた。その結果、遺伝子レベルでの群集構造解析が可能となってきたことから、MBR 法等の様々な排水処理系における微生物群集とその処理機能の関連性に関しての知見が少しずつ得られてきている。

以上の背景から、MBR において安定した運転性および処理性を維持するためには、従来の経験に基づく入出力操作だけでは不十分である。生物学的排水処理に

おける運転条件や処理性能は、有機物処理を担う微生物群集の構造、機能、および活性は密接に関連している。そこで MBR におけるこれらの微生物群集の生態学的構造および微生物の生理生態を考慮した解析を行い、得られた知見を総合的に判断し、リアクターに適用することは、プロセスの性能向上につながると考えられる。また、複合微生物系として in situ における各細菌間の相互作用や生態学的役割を把握することにより、効率的な微生物群集の構築・制御が可能となると考えられる。

### 本研究の目的

本研究では、パイロットスケールの MBR を用いて実都市下水処理を行った。この処理において、MBR 槽内の微生物群集に関連して以下に示す2通りの作用により膜ファウリングが進行すると仮定した。①微生物群集による良好な有機物分解・除去が行われない場合、MBR 槽内に溶解性有機物が蓄積し、膜ファウリングが進行する、②膜面における微生物の付着・増殖により膜ファウリングが進行する。以上の仮定を検討するため、MBR 槽内の混合液中の微生物群集構造を解析した。特に特異的かつ優占的に存在する微生物群に着目し、これらの溶解性有機物分解・除去と膜ファウリングの進行との関連性を検討した。また、膜面における、加圧水程度の物理洗浄では容易に剥離しない付着汚泥を解析した。特にバイオフィームとしての存在の有無、またバイオフィームである場合、その形成過程および構造の検討を行うことを目的とした。

### B. 実験概要

#### MBR

Fig.1 に札幌市の都市下水処理場(合流式下水道)内に設置した、パイロットプラントの MBR の概略図を示す。前処理としての凝集沈殿処理は、傾斜管付きの噴流攪拌固液分離装置(JMS:W1240mm×L3400 mm×H2350 mm)を採用した。JMS は多孔板において凝集と沈殿が同時に発生し、残余のフロックは傾斜管により除去可能な固液分離装置である。運転は凝集剤として PSI を

10mg-Fe/L 添加し、1.5 時間の水理的滞留時間(HRT)で行った。MBR (W350mm×L520 mm×H1200 mm)に使用した膜モジュールは膜面積 3 m<sup>2</sup>, ポリエチレン製の浸漬型MF 中空糸膜(三菱レイオン製)である。運転は間欠曝気式、定流量吸引過方式を採用した。また膜間差圧(Trans-membrane Pressure, TMP)が 30 kPa となった場合を運転継続困難な状況と判断し、加圧水による物理洗浄を行った。更に、物理洗浄で回復困難な状態と判断した場合、塩酸を用いた酸洗浄、および次亜塩素酸を用いたアルカリ洗浄による薬液洗浄を行った。同処理場の最初沈殿池流出水を JMS で凝集沈殿処理を行い、その流出水を MBR で処理した系を Hybrid MBR (HMBR)とした。この対照系として最初沈殿池流出水を直接 MBR で処理した系も平衡して設け、これを Conventional MBR (CMBR)とした。実験条件を Table. 1 に示す。

MBR は水温、混合液粘度、DO、および TMP 等を測定し運転状況の把握を行った。また、MBR 槽内の混合液を 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過した液の全糖濃度を測定し、これを MBR 槽内の溶解性糖濃度とした。更に、混合液汚泥、および加圧水の吹き付けによる物理洗浄を行った後の膜モジュールを採取し、FISH 法、クローン解析、MAR-FISH 法、および SEM 等の実験に供した。

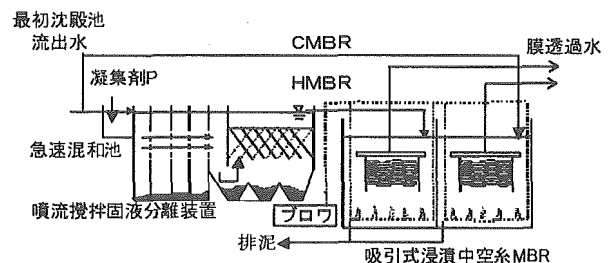


Fig.1 本実験に用いたパイロットスケール MBR 装置の概略図

Table. 1 CMBR の運転条件

	RUN 1	RUN 2		RUN 3		RUN 4
		RUN 2-1	RUN 2-2	RUN 3-1	RUN 3-2	
Operation time (day)	230	40	90	95	95	135
Pore size (μm)	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.4
HRT (hr)	3.6-6.0	3.6	4.5	5.5	9.0	7.0
MLSS (g/L)	3-24	5-10	10	10	10	20
SRT (day)	90	40	45	50	95	75
Flux (m/day)	0.3-0.5	0.5	0.4	0.3	0.2	0.3
Membrane filtration cycle	suction for 12 minutes, and stop for 3 minutes					

## FISH 法による定量

サンプリングした汚泥は 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定(4°C、12-24 時間)した後、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄(5 分間×2 回)し、1:1 の PBS・エタノール混合溶液で希釈、-20 度で冷凍保存した。FISH に用いた蛍光オリゴヌクレオチドプローブを Table. 2 に示す。プローブは fluorescein isothiocyanate (FITC) または tetramethylrhodamine 5-isothiocyanate (TRITC) で標識されたものを用いた。ハイブリダイゼーションは 46°C で 3 時間行い、その後 48°C で 20 分間洗浄を行った。ハイブリダイゼーションしたサンプルは共焦点レーザー蛍光顕微鏡(LSM510,Zeiss)を用いて、波長 488nm(Ar レーザー)と 543nm(HeNe レーザー)のレーザーでスキャンを行い観察した。スキャン時の条件を統一した各サンプルの FISH 画像から 20 視野を任意に選び、内臓の画像解析ソフトを用いて 1 視野あたりのプローブにより染色された細菌の蛍光面積を測定し、各細菌の定量を行った。

## 16S rRNA 遺伝子クローン解析

各サンプルは DNA 抽出を行った後、全細菌に特異的な Bac11F、Uni1492R、および *Chloroflexi* に特異的な 941R 等のプライマーを用いて PCR 増幅を行った。PCR 産物は精製後クローン解析を行い、得られたクローンから系統樹を作成した。

## MAR-FISH 法

マイクロオートラジオグラフィ(MAR)と FISH を組み合わせた MAR-FISH 法は、放射性同位体(RI)を含む基質を用いて微生物集団を培養した後、FISH 法で特定の基質を資化した細菌を解析する手法である。MAR-FISH により用いた放射性同位元素で標識された基質は、[14C]glucose、[14C]N-acetyl glucosamin の 2 つとした。培養条件を Table. 3 に示す。マイクロオートラ

ジオグラフィは Lee の方法に準拠した<sup>9)</sup>。MAR-FISH を行ったサンプルは共焦点レーザー顕微鏡の透過光により銀粒子を観察した。

Table. 3 MAR-FISH の培養条件

サンプル No.	MAR-FISH 下の設定環境	pH	供与基質
No.1	oxic	4	Glucose
No.2	oxic	4	N-acetyl glucosamin
No.3	anoxic	4	Glucose
No.4	anoxic	4	N-acetyl glucosamin
No.5	oxic	7	Glucose
No.6	oxic	7	N-acetyl glucosamin
No.7	anoxic	7	Glucose
No.8	anoxic	7	N-acetyl glucosamin
No.9	oxic	10	Glucose
No.10	oxic	10	N-acetyl glucosamin
No.11	anoxic	10	Glucose
No.12	anoxic	10	N-acetyl glucosamin

## C. 結果と考察

### MBR 槽内における微生物群集構造の解析 混合液中の細菌群集

Table. 4 に FISH 法を用いて行った、2 系列の MBR 槽

Table. 2 FISH 法で用いた蛍光オリゴヌクレオチドプローブ

Probe	Target organisms	FA (%)	Reference
EUB338	Domain bacteria	35	Amann <i>et al.</i> , 1990
EUB338 II	Fungi	35	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338 III	Members of the phylum Verrucomicrobia	35	Daims <i>et al.</i> , 1999
ALF1b	$\alpha$ -subclass of Proteobacteria	20	Manz <i>et al.</i> , 1992
Ntspa 026	Nitrospira moscovensis activated sludge clones A4 and A11	20	Juretschko <i>et al.</i> , 1998
BET42a	$\beta$ -subclass of Proteobacteria	35	Manz <i>et al.</i> , 1992
GAM42a	$\gamma$ -subclass of Proteobacteria	35	Manz <i>et al.</i> , 1992
CF319a/b	Cytophage Flavobacterium cluster	25	Manz <i>et al.</i> , 1996
HGC69a	Actinobacteria (Gram-positive bacteria with high G+C content of DNA)		Roller <i>et al.</i> , 1994
BAC303	Bacteroidales group of the Bacteroidetes	0	Manz <i>et al.</i> , 1996
SRB385	Some sulfate-reducing bacteria of the Deltaproteobacteria and other Deltaproteobacteria and Gram-positive bacteria	35	Amann <i>et al.</i> , 1990
SRB385Db	Some sulfate-reducing bacteria of the Deltaproteobacteria and many nonsulfate-reducing bacteria	35	Widdel <i>et al.</i> , 1996
LGC354a	Firmicutes (gram-positive bacteria with low G+C content)	35	Meier <i>et al.</i> , 1999
LGC354b			
LGC354c			
GNSB-941	Phylum Chloroflexi (green nonsulfur bacteria)	35	Gichet <i>et al.</i> , 2001
CFX1223	Phylum Chloroflexi (green nonsulfur bacteria)	35	Bjornsson <i>et al.</i> , 2002



内およびAS曝気槽内の各活性汚泥における細菌群集の定量解析結果を示す。全反応槽で共通して *Proteobacteria* に属する細菌が最も高い割合で存在し、特に  $\alpha$ -*Proteobacteria*、および  $\beta$ -*Proteobacteria* の割合が顕著であった。この活性汚泥中の細菌群集における *Proteobacteria* の優占性は、本実験と同様に FISH 法を用いて活性汚泥中の細菌群集の定量解析を行った、既存の研究の結果と一致している<sup>10)</sup>。また、AS における *Proteobacteria* の研究例は比較的多く、特に排水中の有機物分解に果たす役割が大きいことが示唆されている<sup>11)</sup>。そのため、MBR 槽内の細菌群集において優占的に存在する *Proteobacteria* が排水中の有機物処理に果たす役割が大きいことが示唆された。一方、糸状性細菌に関して各反応槽の細菌群集を比較すると、HMBR は AS や CMBR と比較して、糸状性細菌 (*Actinobacteria*・*Firmicutes*・*Chloroflexi*) が存在する割合が低かった。このことから凝集沈澱を前処理として導入することには、後段の反応槽中の活性汚泥において糸状性細菌発生の抑制効果をもたらすことが示唆され、これは既往の報告とも一致する。また、AS と CMBR を比較すると、AS では *Actinobacteria* が最も高い割合で存在したのに対し、CMBR では *Chloroflexi* が最も高い割合で存在した。また、データは示していないが、CMBR であるにも関わらず MLSS を 2-3 g/L と設定した運転系列では *Chloroflexi* 等の糸状性細菌はほとんど観察されなかった。このことは MBR 槽内においては MLSS を低濃度に維持することにより、糸状性細菌の発生を抑制する効果がある可能性が示唆された。しかし、MBR 槽内の MLSS を低濃度に維持することは MBR の利点を損なうことに加え、糸永の研究より処理性も著しく損なうことが明らかとなっている。このように多くの場合、糸状性細菌は AS や MBR など各排水処理法において普遍的且つ顕著に観察される。しかし汚泥中における糸状性細菌は、これまで形態学的に単純な分類が行われているのみで、多くの細菌が未同定であった。しかし、高度処理を目的とした AS の他、MBR においても糸状性細菌は他の従属栄養細菌と競合し、バルキングや発泡を生じさせるなど、運転性を悪化させるという問題がある。一方、糸状性細菌のその他の機能として、フロック生成との関連性が示唆されている。しかし糸状性細菌が他の従属栄養細菌との競合に打ち勝ち増殖する理由についての知見は得られていない。更に *Chloroflexi* は *Proteobacteria* や *Actinobacteria* と比較して既存の菌が未だほとんど存在しないことに加え、研究例が少なく、その機能に関しては不明な点が多い。しかし、CMBR において MLSS を最適処理濃度 (10-12 g/L) に保持した場合、*Chloroflexi* が高い割合で存在することから、*Chloroflexi* が CMBR の処理・運転性に影響を及ぼしている可能性が高いことが示唆された。そのため、CMBR における *Chloroflexi* の MBR に及ぼす影響の解明を行う

ことは、MBR の処理性・運転性に寄与できる、と考えられた。

Table. 4 FISH 法による各系列の細菌群集解析結果

Probes	AS	HMBR	CMBR	
<i>Proteobacteria</i>	<i>alpha</i>	17.1	17.4	19.1
	<i>beta</i>	26.2	16.0	21.9
	<i>gamma</i>	10.5	9.2	8.6
	<i>delta</i>	8.6	5.2	10.5
<i>Chloroflexi</i>	11.0	5.1	24.8	
<i>Actinobacteria</i>	20.0	7.8	6.7	
<i>Fimicutes</i>	2.9	6.0	6.7	
<i>Bactroidales</i>	1.6	4.6	1.0	
<i>Nitrospira</i>	2.2	1.5	1.0	
Other bacteria	0.0	27.3	0.0	

T target organisms / EUB (%)

#### CMBR 槽内に存在する *Chloroflexi* のクローン解析

CMBR 槽内に存在する *Chloroflexi* を詳細に同定するため、プライマー Bac11F と GNSB941R を用いてクローン解析を行った。検出されたクローンは 5 つの Operational taxonomic unit (OTU) に分類することができた。各 OTUs は *Chloroflexi* subdivision 1、または *Chloroflexi* subdivision 3 に分類され、特に subdivision 1 に属するクローンが多かった (検出率 19/29)。一方、subdivision 3 に属する *Chloroflexi* の検出率は低く (4/29)、FISH 法を用いた定量でもほとんど観察されなかった (全細菌に対する存在率 2%)。そのため本研究の MBR 槽内において、subdivision 3 に属する細菌が MBR の有機物の処理性等に及ぼす影響は subdivision 1 に属する細菌と比較して小さいと考えられた。*Chloroflexi* subdivision 1 は、各サブディビジョンレベルで比較すると最も多くのクローンが、温泉水、地下水、好気・嫌気排水処理汚泥、および汚染帯水層等の様々な環境から検出されている。しかしその培養例はわずかに数例のみと非常に少ない。加えて、現在までに培養されている細菌は全て好熱性細菌であり<sup>12),13)</sup>、比較的低水温下 (5-25°C) で検出された本研究のクローンは、これらの既存種と異なる特徴を有する可能性がある。また、検出した全クローンは既存の分離菌株との相同性が 81-94% 程度と属レベルで新規の細菌である可能性があることから、これらの細菌に関して生理生態学的な機能の調査を行う必要がある。

#### *Chloroflexi*、水温、および溶解性多糖類の関連性に関する検討

Fig. 2 に RUN 1、RUN 2 における全細菌に占める *Chloroflexi* の存在する割合の経日変化、MBR 槽内の水温、および溶解性多糖類濃度の経日変化を示す。RUN 1 において運転開始から 50 日目まで *Chloroflexi*

の存在する割合は 5%前後と低かった。これは、RUN 1 では運転を開始する直前に、MLSS 濃度が 3000 mg/L 前後の AS 曝気槽内の活性汚泥を種汚泥として投入した。そのため、RUN 1 運転開始当初の MLSS は、MBR として運転に用いるには比較的低濃度であった。更に、MBR の運転に適した汚泥性状に変化させるための汚泥養生期間を全く設けていなかったため、運転開始当初の *Chloroflexi* の存在する割合が比較的低く、更に既存の *Chloroflexi* の倍加時間 (48hr 以上) より、本 MBR 槽内に存在する *Chloroflexi* の増殖速度が比較的遅いと推測されること、およびこの期間が MLSS の増加を目的とした汚泥の養生期間であったため、*Chloroflexi* と比較して増殖速度が早いと考えられる他の従属栄養細菌の存在する割合が高くなったことが理由として考えられた。しかしその後、MBR の運転に適した汚泥 (細菌群集) にシフトした結果、*Chloroflexi* の存在する割合は増加傾向を示した。150 日目には全細菌の約 18% を *Chloroflexi* が占め、優占的となった。しかし 150 日目以降、わずかに存在比が低下し始め、200 日目における *Chloroflexi* の割合は約 15% 程度となった。更に、この存在比の低下に伴い、MBR 槽内に存在する *Chloroflexi* の全長が短くなるという傾向も同時に観察された。一方、MBR 槽内の水温は、運転開始から 75 日目まで平均水温が約 12°C と低めであったが、75 日目以降、次第に水温が上昇し始め、200 日目までには 23°C まで達した。150 日目以降の *Chloroflexi* の割合低下の原因として、この水温の上昇が考えられた。低水温下では活性が低下していた他の従属栄養細菌活性が、水温の上昇により高くなり増殖した結果、*Chloroflexi* が淘汰されたと推測された。次に RUN 1 における MBR 槽内の有機物の処理性に関して、運転開始から約 50 日間は MBR 槽内の溶解性多糖類濃度が 20 mg/L を超える日が多く、MBR 槽内の有機物処理が円滑に行われていなかった。しかし、その後 MBR 槽内の溶解性多糖類濃度は、50 日目以降に観察された *Chloroflexi* の存在割合の増加とほぼ同時期に低下し始め、100 日目以降は 5 mg/L 以下となる日が多くなった。以上の結果より、MBR 槽内における有機物、特に溶解性多糖類の処理に *Chloroflexi* が関与している可能性が高いことが示唆された。次に、RUN 2 においては RUN 1 と異なり、ある程度汚泥を濃縮した状態で運転を開始したことから、運転開始当初より *Chloroflexi* の存在割合が高く、全運転期間を通して存在割合に大きな変化は見られなかった。また、全細菌に対して常に 20-30% を占める程、高い割合で存在していたことから、RUN 2 においては常に優占的であったと言える。RUN 2 における水温は運転開始当初から 15°C 程度と RUN 1 の後期と比較して比較的低温で、またその後徐々に低下し 10°C 付近で一定となった。この結果より、*Chloroflexi* は他の従属栄養細菌の活性が低い低水温下で増殖する可能性が高いことに加え、更にそ

の温度は 15°C 以下の水温である可能性が示唆された。また、MBR 槽内の溶解性多糖類の処理性も良好で、運転期間を通して 5 mg/L 程度であった。

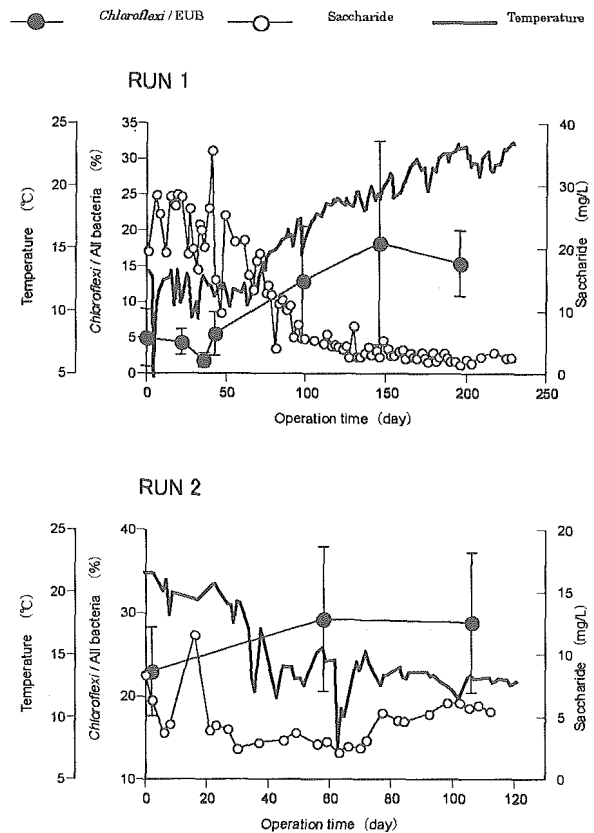


Fig. 2 RUN 1, RUN 2 における *Chloroflexi* / 全細菌、溶解性多糖類濃度、および水温の経日変化

#### MAR-FISH 法を用いた *Chloroflexi* の機能解析

MBR の継続的な運転において、*Chloroflexi* の存在率が高くなると共に槽内の溶解性多糖類濃度が低下するなど、*Chloroflexi* が溶解性多糖成分を利用する可能性があることが推測された。そこで、MAR-FISH 法を用いて *Chloroflexi* の糖代謝機能を解析した (Table. 5)。その結果、*Chloroflexi* がグルコースおよび N-アセチルグルコサミン (NAG) を基質として利用することが判明した。この結果は既存の報告とも一致した<sup>16)</sup>。特に *Chloroflexi* が優先的に基質を利用する条件は、pH 7 で NAG を基質として供与した場合と pH 10 でグルコースを供与した場合であった。また、アセチルグルコサミンはグラム陰性・陽性を問わず、細胞壁のペプチドグリカンやリポ多糖類を構成している物質であることから、ペプチドグリカンの解重合は外界へのアセチルグルコサミンの放出を促す。以上の結果より、*Chloroflexi* はグルコース様の比較的利用しやすい有機物を利用する他、アセチルグルコサミンの様な生体高分子の分解生成有機物を利用することが示唆された。MBR 法は高濃度の菌体を保

持することから、単位重量当たりの菌体に対する有機物負荷(F/M比)が小さくなり、余剰汚泥の生成率がASと比較して低いという特徴を有する。そのため MBR 槽内における死滅菌体およびその分解割合が高いことが推測される。その結果、NAG 様の生体由来の多糖類が比較的高濃度に発生し、これらの有機物の利用・分解を行う微生物が必須となる。本 MBR においては NAG の分解能力を有する *Chloroflexi* が優占的となる一因と考えられた。

Table. 5 MAR-FISH の解析結果

No.	( pH )	Substrate	<i>Chloroflexi</i>	Other bacteria
No.1	( pH4 )	Glucose	++	++
No.2	( pH4 )	N-acetyl glucosamin	+	+
No.3	( pH4 )	Glucose	+	+++
No.4	( pH4 )	N-acetyl glucosamin	+	+
No.5	( pH7 )	Glucose	+++	+++
No.6	( pH7 )	N-acetyl glucosamin	++	+
No.7	( pH7 )	Glucose	++	++
No.8	( pH7 )	N-acetyl glucosamin	++	+
No.9	( pH10 )	Glucose	+++	+
No.10	( pH10 )	N-acetyl glucosamin	+	+
No.11	( pH10 )	Glucose	+	+
No.12	( pH10 )	N-acetyl glucosamin	+	+

— : 基質利用無  
+ : 基質利用率低  
++ : 基質利用率中  
+++ : 基質利用率高

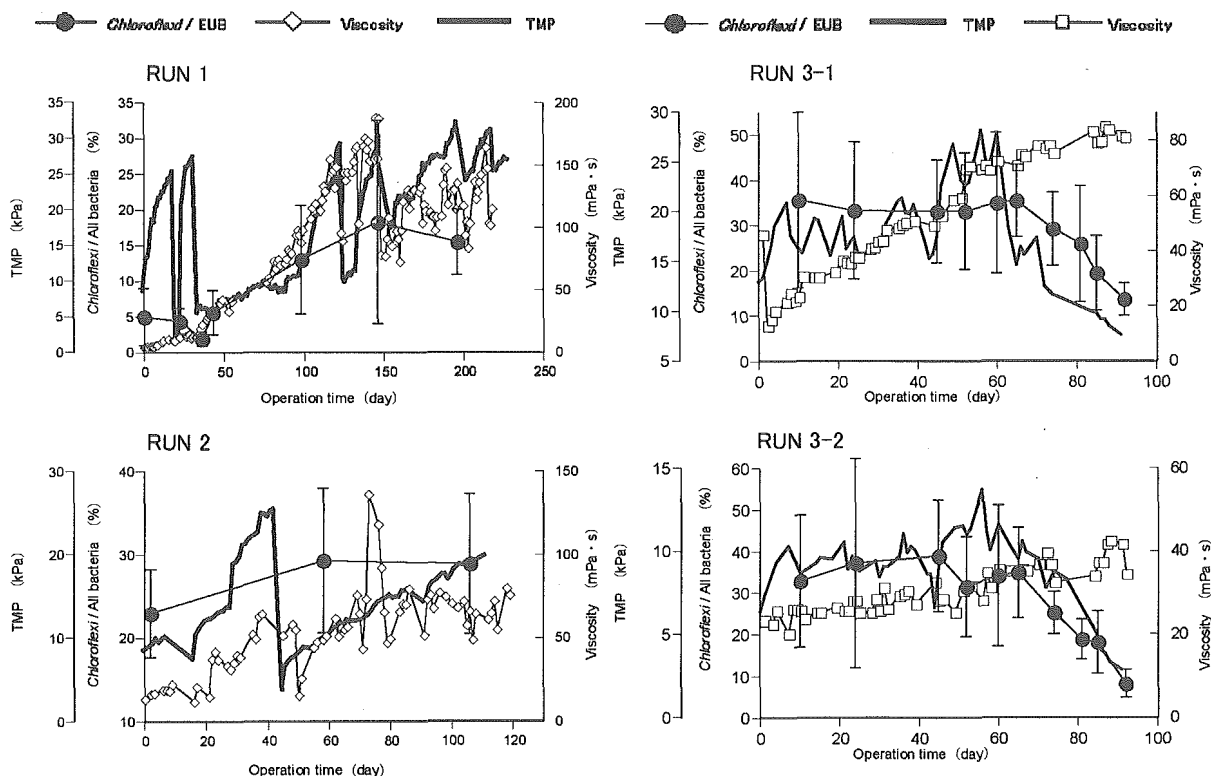


Fig. 3 RUN 1、RUN 2、および RUN 3における、全細菌に占める *Chloroflexi* の存在割合、TMP、および混合液粘度の経日変化

### *Chloroflexi*、混合液粘性、およびフロック粒径の関連性に関する検討

糸状性細菌はフロックの形成を助長する可能性が高いと考えられている。加えて糸永の研究により MBR 槽内の混合液粘度は MLSS 濃度とフロックの粒径によって支配することが分かっている。このことから、MBR 槽内において *Chloroflexi* がフロックの形成に関与することにより、MBR 槽内の混合液粘度上昇に影響をおよぼす可能性があることが考えられた。そこで Fig. 3 に RUN 1、RUN 2、RUN 3 における全細菌に占める *Chloroflexi* の割合、混合液粘度、および TMP の経日変化を示した。RUN 1 において、50 日目以降から MBR 槽内の混合液粘度が過度に上昇し始めた。50 日以降の混合液粘度の経日変化は TMP、および *Chloroflexi* の存在割合の経日と同様の傾向を示していることから、これらの間には高い正の相関があるといえる。Fig. 2 より、RUN 1 の 100 日目以降の MBR 槽内における溶解性多糖類濃度は比較的低い状態が維持されている。そのため、この時期の TMP 上昇に関しては MBR 槽内混合液の溶解性有機物による影響よりも混合液粘度の影響力が大きかった可能性が高いと考えられた。RUN 2 では、*Chloroflexi* の存在する割合と混合液粘性、および TMP の間に高い関連性は見られなかったが、RUN 3 においては、RUN 3-1、RUN 3-2 の両実験系列において、60 日目以降の *Chloroflexi* の存在する割合の急激な低下と同時に混合液粘性の低下が観察された。そのため、この混合液粘性の低下は *Chloroflexi* の存在割合の低下

に起因するフロックの粒径縮小化が原因と考えられた。そこで、*Chloroflexi* がフロックの粒径におよぼす影響を検討するために、RUN 3 における MBR 槽内の汚泥の粒径分布に関して検討した (Fig. 4)。RUN 3 においては、すでに MBR 槽内の混合液を MBR の運転開始に合わせて養生していたため、運転開始初期から MBR 槽内の細菌群集において *Chloroflexi* が 25-35% 程度と、比較的高い存在割合を保っていた。この期間のフロックは常に、最も存在する割合の高い粒径が 56  $\mu\text{m}$  で一定であった。しかし 60 日以降、*Chloroflexi* の存在割合の急激な低下と同時に、粒径も徐々に小さくなる方向にシフトし、両運転系列において、最も存在する割合の高い粒径は 38  $\mu\text{m}$  まで低下した。この時期は、水温が上昇し始めていた時期であり、この水温上昇が混合液粘度低下の一因になったと考えられた。しかし一方で、フロック中において格子として機能していたと考えられる *Chloroflexi* の存在割合が、この水温の上昇に起因して低下したことにより、フロックの安定性が低下に起因する、フロックの分散、および縮小化が生じ、その結果、混合液粘度低下の一因につながったと考えられた。以上の結果から得られた仮定の現実性を更に補完するために、混合液中における *Chloroflexi* の存在割合とフロック粒径との相関関係の検討を行った (Fig. 5)。両者の間には高い相関関係が得られた。一方、*Chloroflexi* の存在割合と混合液粘度に関しては、高い相関が得られる場合と、あまり相関が見られない場合があったが、これは前述のように、混合液粘度はフロック粒子の大きさのみならず、MLSS によっても大きく支配されるため、一概に *Chloroflexi* の存在割合によるのみではその変化を予測できないためであると考えられた。

一方、RUN 3 における 60 日目以降の *Chloroflexi* の減少、および混合液粘性の低下に伴って、激しい発泡現象が観察されるようになった。この発泡現象は、水位センサーに機械的な誤差を生じさせるなど、運転性に支障をもたらした。この発泡現象は *Chloroflexi* の存在割合の低下が観察され始めるようになってから顕著となったため、*Chloroflexi* は糸状性細菌ではあるが、発泡現象とは関連性が小さい細菌であると考えられた。更に RUN 4 において、*Chloroflexi* の存在する割合はほぼ、20% 程度で安定していた。しかし、他の糸状性細菌の存在が顕著であり、加えてこれらの糸状性細菌がフロック外に存在する、もしくは *Chloroflexi* の周辺に密集し、*Chloroflexi* がフロックの内部に存在できないように作用している様子が観察された時期、軽度の発泡現象と顕著なバルキング作用が観察された。この RUN 4 におけるバルキングは、*Chloroflexi* との関連性に関しては、検討を行うことが困難であったが、*Chloroflexi* ではない、他の糸状性細菌が特に顕著に観察された時期に目立って観察されるようになったことから、発泡現象と共に、バルキング作用に関しても本 MBR 槽内において観察さ

れた *Chloroflexi* の影響により発生した可能性は極めて低いと考えられた。

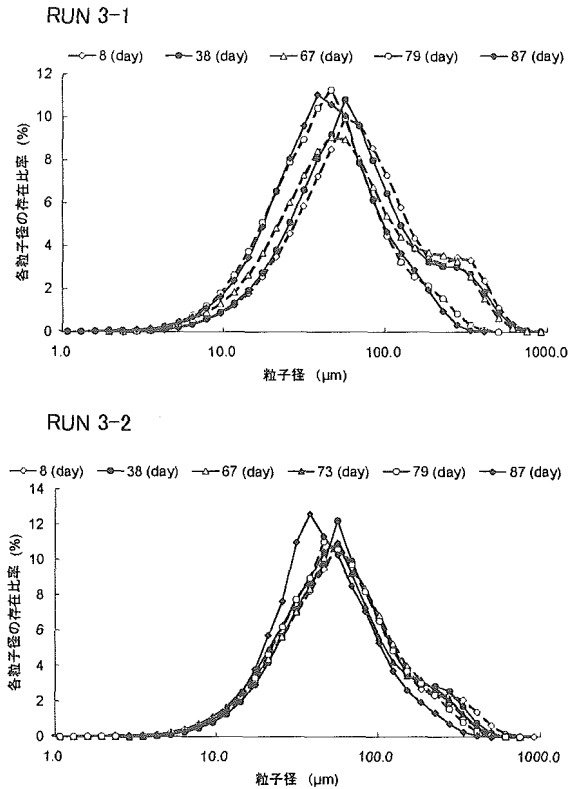


Fig. 4 RUN 3-1、RUN 3-2 における MBR 槽内汚泥の粒度分布の経日変化

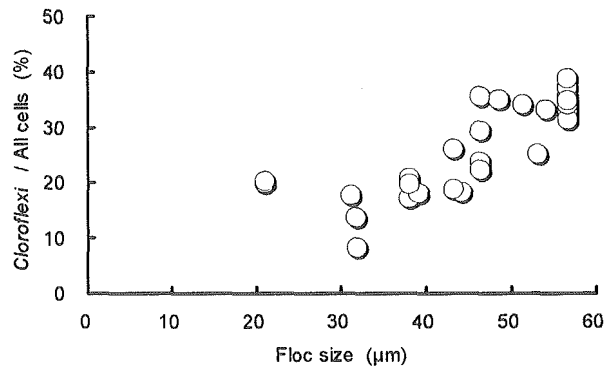


Fig. 5 MBR 槽内における *Chloroflexi* とフロック径の関係

### 膜面上に形成する細菌群集構造の解析 運転期間中における MBR の運転性評価

CMBR の RUN 4 における TMP の経日変化を Fig. 6 に示す。本実験では約 130 日間継続して運転を行った。運転開始直後から急速に TMP の上昇による膜透過性能の低下がみられた。これは MLSS を高濃度 (20  $\text{g/L}$ ) に維持しているにもかかわらず、エアレーションが不十分であったため、膜面に作用するせん断力が不足してい

たことが原因と考えられた。そこで、エアレーション流量を 3500 L/hr から 5000 L/hr に変更して運転を継続した。その結果、TMP の上昇速度が低下する等の運転性に改善が見られた。また、変更前の MBR 槽内の DO は平均 0.2 mg/L と非常に無酸素に近い状態であったのに対し、変更後は平均 2.7 mg/L と好氣的な状態にシフトした。しかし、エアレーション流量変更時に行った、物理洗浄直後の TMP が 23 kPa と高く既に運転を継続することが比較的困難な状態であった。このため 55 日目に薬液洗浄を行い、膜透過性能の回復を図った。その後運転を再開したが、約 40 日間で運転の継続が困難となったため、再度薬液洗浄を行った。しかし、1 回目の薬液洗浄直後 (TMP: 5 kPa) 程、顕著な回復は見られなかった (TMP: 14 kPa)。薬液洗浄後、運転を再開したが運転が困難な状況が続き、133 日目に実験を終了した。

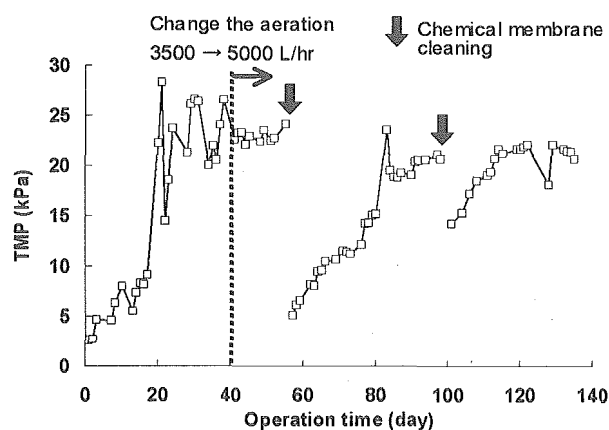


Fig. 6 RUN 4 の CMBR における TMP の経日変化

### 膜面におけるバイオフィーム形成過程

FISH 法を用いた膜サンプル観察の結果、運転開始、または再開直後に採取した膜サンプルにはほとんど微生物が観察されなかった。その後運転の継続に伴い、膜面上に付着した微生物の存在割合が高くなった。また初期に観察された微生物のほとんどは単一細胞、または比較的小さなコロニーを形成している状態であり、その菌体の多くは死滅菌体として観察された。しかし運転を継続するに従い単一細胞で存在する微生物、または微小コロニーの数が増加し、更に比較的大きなコロニーも観察されるようになった。また、菌体の増加に伴い生菌数の存在率も増加した (Fig. 7)。約 40 日目のエアレーション流量変更後は、一時的に膜面上に存在する菌体量の低下が見られたが、次第に菌体量の増加、および生菌数の存在率の増加が観察された。以上より、膜面上に存在する細菌は膜ろ過によって形成したケーキ層 (堆積したバイオマス) ではなく、付着増殖するバイオフィームを形成しており、膜透過性能低下の一因となっていることが示唆された。

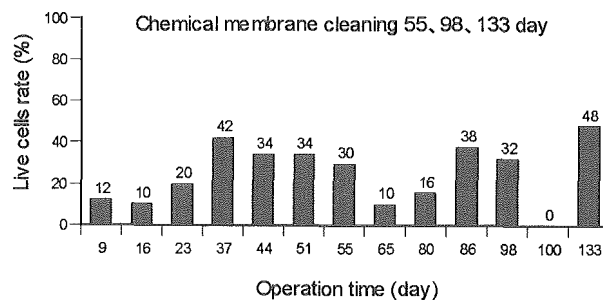


Fig. 7 膜面上に付着する微生物群集の生菌数の割合の経日変化

### 走査型電子顕微鏡 (SEM) によるバイオフィームの観察

SEM による膜面上のバイオフィームの観察結果より、細菌群集は以下の複数の方法により、膜面に対して強固に付着している様子が観察された。①死滅菌体由来の溶菌物質、または生菌体由来の代謝産物等のペースト状物質を膜面に貼り付ける。②膜面の細孔に菌体の一部を差し込む。③菌体表面から無数の糸状の有機体 (アンカー) を伸ばし、それらを膜面上に強固に付着させる。また、①のペースト状物質が膜面に付着し、膜細孔が完全に閉塞しているのが観察された。更に、③の糸状の有機体は多数の菌体から排出されることにより、集積・凝縮し、単一の大きな物質を構成しているのが観察された。これらが膜ファウリングの一因となっていると考えられた。

### 膜面上のバイオフィームの細菌群集構造解析

膜面上に存在する微生物は、MBR 槽内混合液と異なる細菌群集を形成していた。膜面上の細菌群集において、*Chloroflexi* 等の糸状性細菌が存在する割合は低く、桿状、または球状の形態をした *Proteobacteria* に属する細菌の存在割合が高かった。FISH 法を用いた膜面上の細菌群集解析の結果、エアレーション流量の設定を 3500 L/hr としていた運転初期は *Proteobacteria* に属する細菌が優占的となっており、特に  $\alpha$ -*Proteobacteria* (30%) と  $\beta$ -*Proteobacteria* (30%) に属する細菌が存在する割合が大きかった。また、膜面上の細菌群集の存在比は、混合液中の細菌群集の糸状性細菌を除いた存在比とおおよそ一致していた。しかし、40 日目にエアレーション流量を増加して以降の膜面上の微生物群集において、 $\beta$ -*Proteobacteria* に属する細菌の割合が特に大きくなり、薬液洗浄直前における存在率は 75% 程度であった。薬液洗浄後、運転を再開し、細菌群集の変遷を観察した。その結果、膜透過性能の低下とともに、 $\beta$ -*Proteobacteria* に属する細菌の割合が再び大きくなり、最終的に薬液洗浄直前までに約 70% 程度まで増加した。エアレーション流量の変更前後における細菌群集に対して、最も影響を及ぼした要因は MBR 槽内の DO 濃度の変化であると考えられた。エアレーション流量の変更を行うまでは、MBR 槽内の DO は非常に低かった。

そのため、膜面上の微生物群集において、嫌気性細菌が多く属する  $\delta$ -*Proteobacteria* が高い割合で存在した (15%)。しかし、エアレーション流量の変更以降、MBR 槽内の DO が増加し、これらの  $\delta$ -*Proteobacteria* に属する細菌の存在率が低下 (5%) した結果、好気性細菌、または通性嫌気性細菌が多く属する  $\beta$ -*Proteobacteria* の存在率が大きくなったと考えられる。これらの細菌群集に関する更なる詳細な情報を得るために、1 回目の薬液洗浄直前における膜面上のバイオフィルムのクローン解析を行った。クローン解析は全細菌を検出するプライマー Bac11F および Uni1492R を用いて行った。主に検出されたクローンは  $\beta$ -*Proteobacteria* に属する細菌であった (検出率 32/47)。検出された  $\beta$ -*Proteobacteria* に属する細菌は 22 の OTU に分類することができた。最も検出率が高い OTU (7/47) は *Dechloromonas* sp. に近縁なクローンであった。*Dechloromonas* sp. は一般的に電子供与体として有機酸を、電子受容体として酸素や塩素酸塩、または硝酸塩を利用する通性嫌気性の従属栄養細菌であることが知られている。また、硝酸塩を窒素ガスに還元するなどの作用があることも知られている。しかし、今回検出された細菌の膜面での生理生態学的機能に関しては今後の検討課題である。

#### D. 結論

本研究では以下のことが明らかになった。

- MBR 槽内の混合液中において糸状性細菌である *Chloroflexi* は高い存在割合を占めていた。*Chloroflexi* はブロック形成に関与し、混合液粘度の上昇に影響を及ぼすなど MBR 槽内混合液の物理的な特性の指標となることが示唆された。更に、死滅菌体由来の有機物などを利用することから、MBR 槽内の有機物分解に非常に重要な役割を果たし、溶解性有機物の蓄積による膜ファウリング進行の抑制に寄与することが示唆された。
- 膜面上にバイオフィルムが付着・増殖することによるバイオフィルムが膜ファウリング進行の重要な要目の一つであることが示唆された。このバイオフィルム形成は  $\beta$ -*Proteobacteria* に属する細菌が主要な役割を果たしていることが示唆された。

#### E. 参考文献

1. Chang, I.-S., P. L. Clech, B. Jefferson, and S. Judd. 2002. Membrane fouling in membrane bioreactors for wastewater treatment. *J. Environ. Eng.* **128** (11): 1018-1029.
2. Meier-Haack, J., N. A. Booker, and T. Carroll. 2003. A permeability-controlled microfiltration membrane for reduced fouling in drinking water treatment. *Water Res.* **37** (3): 585-588.

3. Schäfer, A. I., U. Schwicker, M. M. Fischer, A. G. Fane, and T. D. Waite. 2000. Microfiltration of colloids and natural organic matter. *J. Membr. Sci.* **171** (2): 151-172.
4. Wilén, B. M., B. Jin, and P. Lant. 2003. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Res.* **37** (9): 2127-2139.
5. Laspidou, C. S. and B. E. Rittmann. 2002. Non-steady state modeling of extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Res.* **36** (8): 1983-1992.
6. D. T. Sponza. 2003. Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme and Microbial Technol.* **32**: 375-385.
7. Baker, J. S. and L. Y. Dudley. 1998. Biofouling in membrane systems — A review. *Desalination.* **118**: 81-89.
8. Ammann, R. I. 1995. *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes, pp.1-15. In A. D. L. Akkerman, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
9. Lee, N., P. H. Nielsen, K. H. Andreasen, S. Juretschko, J. L. Nielsen, K.-H. Schleifer, and M. Wagner. 1999. Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1289-1297.
10. Juretschko, S., A. Loy, A. Lehner, and M. Wagner. 2002. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *System. Appl. Microbiol.* **25**: 84-99.
11. Kämpfer, P., R. Schulze, U. Jäckel, K. A. Malik, R. Amann, and S. Spring. 2005. *Hydrogenophaga defluvii* sp. nov. and *Hydrogenophaga atypica* sp. nov., isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 341-344.
12. Sekiguchi, Y. Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, and H. Harada. 2000. *Syntrophothermus lipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 771-779.
13. Sekiguchi, Y. H. Takahashi, Y. Kamagata, A. Ohashi, and H. Harada. 2001. *In situ* detection,

isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green non-sulfur bacteria, subdivision I. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5740-5749.

14. **Björnsson, L., P. Hugenholtz, G. W. Tyson, and L. L. Blackall.** 2002. Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology.* **148**: 2309-2318.

15. **Itonaga, T., K. Kimura, and Y. Watanabe.** 2004. Influence of suspension viscosity and colloidal particles on permeability of membrane used in membrane bioreactor (MBR). *Wat. Sci. Technol.* **50**(12): 301-309.

16. **Kindaichi, T., T. Ito, and S. Okabe.** 2004. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1641-1670.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 三浦佑己、伊藤 司、岡部 聡、渡辺義公、Membrane bioreactor の運転性に伴う微生物群集構造の解析、第 39 回日本水環境学会年会講演集、千葉、(2005 年 3 月)
- 2) 平岩ミリアンのり子、伊藤 司、岡部 聡、渡辺義公、Microbial community structure and membrane bioreactor performance、第 38 回日本水環境学会年会講演集、札幌、p546、(2004 年 3 月)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得 (なし)

##### 2. 実用新案登録 (なし)

##### 3. その他 (特になし)

健康で豊かな水環境を創造するための新しい水管理システムの可能性

—その戦略的構築と支援技術開発

分担課題：メンブレン関連技術

分担研究者：浦瀬太郎 東京工業大学大学院理工学研究科助教授

研究要旨

地下水を介した水の開放循環系を膜分離技術を用いた水処理技術を用いて実現することを想定し、比較的親水性を持つ有機化合物である医薬品およびエストラジオール類に着目して、活性汚泥による分解除去実験を行い、除去に影響を与える因子を探索した。物質ごとの除去率では、 $17\beta$ エストラジオール(E2)は比較的除去率が高かった。一方、医薬品では、エストロゲン類の中では難分解性であるとされる $17\alpha$ エチニルエストラジオール(EE2)よりも除去率がさらに低いものが多かった。医薬品の低い除去率を向上させる方法として、高脂血症治療薬、消炎鎮痛剤などの酸性医薬品に対しては、pHを酸性側で活性汚泥を運転する方法が有効であることを見出した。これらの物質は、pHが中性域では親水性が強く、水相から汚泥相への移行が進まず、汚泥自体には分解能力があるにもかかわらず、水相から除去されないが、pHを酸性にすることにより、医薬品のイオン解離を抑制し、水相から汚泥相へこれらの物質を移行させることができた。また、低pH時の反応槽内にこれらの物質が蓄積していないことから、汚泥へ吸着した医薬品は、分解反応を受けたと考えられる。

A. 研究目的

水システムを自律分散型にするための一つの要素技術として、地下水を介した開放循環系と膜分離技術を組み合わせた水システムがある。こうした地下水を介した開放循環系と膜分離技術を組み合わせた水システムでは、微量の人への影響が懸念される物質をどのように取り除くかは重要である。

下水処理水を地下水涵養に用い、一方で、地下水資源を有効に利用するシステムを考えると、硝酸性窒素のように、地下水中で移動しやすい物質が問題となる。これまで微量化学物質対策では、ダイオキシン類のように疎水性で難分解性の化合物が主として注目を集めてきたが、地下水利用などを考えた場合には、水溶性を持つが難分解性の物質、すなわち、医薬品やエストロゲン類、消毒副生成物ではハロ酢酸などが重要となる。

下水処理水の持つ内分泌攪乱作用については、ヒトの排泄する尿に含まれる $17\beta$ エストラジオール(E

2)が主因であろうと考えられている。さらに1990年代から、欧米を中心に水環境中で医薬品の検出に関する研究発表がなされるようになり、医薬品が新たな環境汚染物質として注目されるようになった。医薬品は生体に取り込み易くするために親水性のあるものが多く、生体内での効果が持続するように難分解性であり、生物に対して何らかの活性を持っている<sup>4)</sup>。 $17\alpha$ エチニルエストラジオール(EE2)の分解に硝化運転が有効であるなどの知見が断片的に報告されているが、活性汚泥法における医薬品やエストロゲン類の除去率に影響する因子を明らかにすることはきわめて重要である。

本研究では、活性汚泥によるエストラジオール類や医薬品を含む人工下水の連続処理実験を行い、活性汚泥の運転条件が医薬品の除去性能にどのような影響を与えるかについて、実験した。その結果、エストラジオール類に比較してほとんどの医薬品は難分解性であり、さらに、酸性医薬品に対しては、pH



が除去を決定する重要な因子となることを見出した。また、医薬品の物理化学的性状と除去率の関係について、有効な知見を得たので報告する。

## B. 研究方法

### 実験対象物質

図1に実験対象物質を示した。この実験での対象物質は、女性ホルモンの一種である17 $\beta$ -estradiol (E2)、E2の分解反応生成物であるestrone (E1)、合成エストロゲンで経口避妊薬の成分である17 $\alpha$ -ethynilestradiol (EE2)、代表的環境ホルモンとしてbisphenol A (BPA)、benzophenone (BZP)、医薬品については解熱鎮痛剤や高脂血症治療薬など、日本での使用量<sup>1)</sup>を参考にclofibrilic acid (CA)、gemfibrozil (GFZ)、ibuprofen (IBP)、fenoprofen (FEP)、ketoprofen (KEP)、naproxen (NPX)、diclofenac (DCF)、indomethacin (IDM)、propyphenazone (PPZ)、carbamazepine (CBZ)を選んだ。なお、医薬品、エストロジェンの各種抱合体については検討していない。また、本研究では、E1以外の代謝生成物を測定していないことから、以下で「分解」とは、その初期の化合物ではなくなった状態のことをいい、必ずしも、二酸化炭素まで分解されたことを意味しない。

### 実験方法

図2に実験装置を示す。15L活性汚泥リアクターに流入と流出の流量が等しくなるようにポンプを取り付け、エアレーションをしながら約30日間連続運転を行った。水温は、20℃に設定した。流入水は、グルコース・ペプトンを主成分とする人工下水(TOC=60~100mg/L)に中間生成物であるE1を除く対象物質がそれぞれ100 $\mu$ g/Lになるように添加したものをいい、水理滞留時間は24時間とした。リアクター内には中空糸精密ろ過膜(孔径0.4 $\mu$ m、膜面積0.2m<sup>2</sup>)を設置し流出水を引き抜いた。汚泥の引き抜きはサンプリングの際に微量取り除かれるだけで、今回の連続実験では一度も引き抜かなかった。

流入水と流出水、また反応槽内の水相と汚泥相に含まれる対象物質の濃度を測定した。水相中の微量物質の分析方法についてまず述べる。E2、E1、EE2、BPA、BZPは、C18ディスク型固相抽出、ジメチル誘導体化のあと、E2-d4をサロゲート、chrysene-d12を内標準として、GC/MS法で分析した。CA、GFZ、IBP、FEP、KEP、NPX、DCF、IDMは、pH=2の酸性条件でC18ディスク型固相抽出、PFBBR誘導体化の後、2,3-dichlorophenoxyacetate、chrysene-d12をサンプルスパイクとして、2,4-dichlorobenzoic acidを誘導体化率を確認するために添加し、GC/MS法で分析した。なお、PPZ、CBZについては、誘導体化は必要がないが、PFBBR誘導体化の操作を経ても、同じクロマトグラムに残るため、CAなどと同時定量した。活

性汚泥懸濁液については、3000rpm、10分の遠心分離の後、上澄みを保持径1 $\mu$ mのガラス繊維ろ紙でろ過した試料を溶解性とし、以下、膜透過水と同一の操作により測定した。一方、沈殿した汚泥に対しては、E2、E1、EE2、BPA、BZPについては、メタノール30mLを加え、超音波溶出を行い、また、CA、GFZ、IBP、FEP、KEP、NPX、DCF、IDM、PPZ、CBZの医薬品については塩酸2mLとメタノール30mLを加え、超音波溶出を行い、再度水希釈の後、膜透過水と同一の操作により測定した。

### リアクターの運転条件

図3に連続運転開始から30日までのリアクター内のpHの変化を示した。開始当初、リアクター内は中性であったが、徐々に酸性側に移行させた。特に21日目以降は人工下水の栄養塩組成のうち(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を増加させたことにより、さらに酸性側でのリアクター運転状態となった。リアクター内の酸性化は25日目にはpH=4.3まで進んだ。その後29日目以降は、原水タンクにNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を混入させることによってpHをアルカリ性側に移行させ、リアクター内のpHを初期値付近まで強制的にもどした。流出水中の全無機態窒素に占める硝酸・亜硝酸の割合を硝化率と定義すると、0~20日目の硝化率は90%、21日~25日は47%、27日~32日では85%であった。アンモニア流入負荷が大きく、かつ、低pH運転であった21日~25日の期間の硝化率が低かった。流出TOC濃度は、すべての期間でおおよそ5mg/Lで、有機物の除去は順調かつpHの変動の影響を受けなかった。この期間のMLSS濃度は、2,700mg/L~3,500mg/Lであった。

## C. 研究結果

図4に医薬品であるPropyphenazone (PPZ) とエストロジェンのEstradiol (E2)、図5に医薬品のIbuprofen (IBP)、Ketoprofen (KEP)の除去結果を示す。図の縦軸は、流出濃度を流入濃度(約100 $\mu$ g/L)で割った値(%)を示しているの、値が小さいほどよく除去されることを意味している。E2はほとんどの期間を通して90%以上除去されており、比較的易分解性の物質と考えられる。なお、流出水中に20~40 $\mu$ g/LのE1を検出していることから、流入したE2のうちかなりの部分はE1に転換し、さらにその一部は流出水中に残存したと考えられる。

一方、医薬品について見てみると、図-4のPPZは実験全期間を通して全く除去されなかったが、図-5のIBPとKEPはpHが下がると除去率が上昇した。IBPの除去率は、pHが6以下では90%以上、また、KEPは、pHが6以下になると除去率が向上し、pHが5以下になると、70%程度除去された。さらに、実験開始後、28日目にpHの値をもとに戻したところ、IBPとKEPの除去率はもとの低い値にもどった。このことから、こうしたIBPとKEPの除去率の変化は、汚泥の馴致に

よるものではなく、pHの変化によるものであると考えられる。

表1に30日までの実験期間を大きく三つにわけて、今回の測定対象の物質の平均除去率を示した。期間5～10日目は、運転開始して状態が安定した時期でpHは、6.8～7.6であった。期間20～25日目は、pHの値が最も酸性側に保たれていた時期で4.3～5.0であった。期間28～30日目は、pHの値を開始時付近にまで戻した時期でpH=7.5～8.0であった。

この表に示すように、医薬品10種のうちPPZとCBZを除く8種は、pHが下がると除去率が向上し、28日目以降にpHの値をもとに戻すと実験開始時の低い状態に戻った。したがって、低pH期間における除去率の向上は、汚泥の馴致によるものではなく、pHの影響であると考えられる。

表1には同期間におけるTOCの除去率も併記したが、TOCは常に90%以上除去されていた。TOCの除去率よりも高い除去率となった化合物は、E2の全期間とBP Aの一部の期間だけで、他の化合物はTOCの除去率と比較すると、除去率が低かった。EE2は、分解が遅いことで知られるが、中性のpH領域での医薬品の分解速度はEE2の分解速度よりも遅いものがほとんどであった。

また、本実験では、反応槽内水相濃度と膜透過液を比較した場合では、膜透過液中濃度の方が、最大30%程度低い濃度を示した。これは、沈殿分離ではなく、膜分離によって処理水を得ているため、膜自体には微量物質の阻止性能はないものの、膜面堆積物質などにより当該物質の吸着・除去が行われたためと考えられる。

#### D. 考察

##### Log Kowと除去率のpH依存性の間の関係

リアクター内pHが低下するとともに、医薬品の除去率は上昇するものが多かったが、除去されはじめるpHの値は物質ごとに異なった。図6は物質ごとの除去され始めるpHとLog Kowの相関を表したものである。除去され始めるpHとは、連続運転開始時における除去率と比較して20%以上除去率が向上した時点でのpHと定義した。なお、CAZとPPZは、pHを4.3まで下げても除去されなかったため、図の下部に表記した。

図6に示すように、COOH基を持つ物質については、Log Kowの大きいものほど高いpHで除去され始める傾向があった。また、COOH基もOH基も持たず、Log Kowが小さいPPZとCBZは、pHが低い条件でも除去されにくいということが示された。

対象とした医薬品のうちCOOH基をもつ物質は中性付近ではほとんど除去されなかったにもかかわらず、pHが下がると除去率が向上した理由については、これらの物質の電離状態から考えることができる。CO

OH基を持つ物質は、中性付近ではマイナスイオンであるが、酸性条件ではイオン解離が抑制され電荷のない溶質になる。電荷のない状態では、疎水性が強くなり汚泥に吸着し、医薬品がいったん汚泥の表面に吸着されると、比較的速やかに分解が進むと考えられる。これに比べて、PPZ等の酸性官能基を持たない物質やエストロジェンでは、pHが除去率に及ぼす影響は小さく、その物質自身のもつ分解性に依りて、分解されるかどうかが決まると考えられる。

##### 低pH運転時におけるリアクター内マスバランス

表2は17日目～24日目におけるマスバランスを求めたもので、この期間における各物質の総流入量、総流出量、17日目のリアクター内存在量(水相および汚泥相の総和を15リットルのリアクター容積に換算して計算)、24日目のリアクター内存在量を示したものである。マスバランスの取れない部分が、リアクター内での分解と考えた。ただし、分離膜表面での捕捉、分解分は、無視されている。

この表でC、Dの値を比較すると、ほとんどの物質に対して、24日目のときのリアクター内濃度の方が17日目より少なくなっている。よってこの期間では医薬品はリアクター内に蓄積せず、流入と流出の差分は単に汚泥に吸着されただけではなく、少なくとも初発化合物以外の物質に分解されたと考えられる。

##### 本実験で得られた除去率とこれまで報告のある実処理場での測定値

本実験で得られた除去率と実処理場での除去率の報告例とを図7に比較した。本実験で得られた除去率として、それぞれの物質のpH=7付近の除去率とpH=4.5付近の除去率の両方を示した。本実験における5～10日目のpHが中性付近における除去率と実処理場での文献報告値を比較すると、本実験での除去率が高い化合物は実処理場でも除去率が高く、本研究が実処理場の現象を模擬し得ていることがわかるが、全般に実処理場での除去率の方が高かった。これは、本実験が実処理場の約100～10,000倍の濃度で分解実験を行っていること、および、実下水を処理している汚泥の方が実験室で長期間馴致した汚泥に比較して、微量物質の分解能力が高いためであると考えられる。また、実際の処理場において、流入下水とともに流入してくるSS成分が化合物の吸着に関して大きな役割を果たしている可能性も指摘できる。

一方、pHを4.5付近まで酸性にした場合の本実験での除去率を実処理場での除去率と比較すると、ほとんどの物質で、本実験での除去率が実処理場よりも優れた除去率を示した。pHを酸性側に移行させることの有効性が十分に示唆されていると考えられる。

## E. 結論

実験室内にて活性汚泥に対して、エストロゲン、合成化学物質、医薬品の全15種類の化学物質を連続投与し、分解除去実験を行った。得られた知見は以下の通りである。

- 1) pH中性域での運転では、 $17\beta$ -estradiol (E2) を90%以上除去することができた。一方、医薬品では、エストロゲン類の中では難分解性であるとされる $17\alpha$ -ethynilestradiol (EE2) よりも除去率がさらに低いものが多かった。実験期間中に汚泥が微量物質に対して馴致し除去率が向上することはなかった。
- 2) Propyphenazone (PPZ) と Carbamazepine (CBZ) を除く今回対象としたカルボキシル基を含む鎮痛剤などの酸性医薬品は、pHを低くするほど高い除去率が得られた。PPZとCAZはpHを下げてほとんど除去されなかった。酸性医薬品について、対象物質が除去されるpHとLog Kowとの関係を求めたところ、Log Kowの小さい物質ほどpHを酸性側へ大きく動かすことが除去のために必要であることがわかった。
- 3) pHを低くすることによって、除去が促進される理由は、pHが低くなると、当該物質がイオン性を失い、汚泥に吸着しやすくなり、水相から汚泥相に当該物質が輸送されるからであると考えられる。汚泥相に一旦輸送された医薬品等は、比較的速やかに活性汚泥によって少なくとも初発化合物からは分解され、汚泥に蓄積することはなかった。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 浦瀬太郎, 香川千絵 (2004): 活性汚泥中での医薬品・女性ホルモン様物質の除去に影響を及ぼす因子, 用水と廃水, 46, 11, 955-961.
- 2) 香川千絵, 菊田友弥, 浦瀬太郎 (2005): 医薬品の除去に対する膜分離活性汚泥法分離膜の付加効果, 水環境学会誌, 28, 3, 207-210.

### 2. 学会発表

- 1) 香川千絵, 浦瀬太郎, 菊田友弥 (2004): 固液間の化学物質の分配に着目した医薬品の活性汚泥での吸着分解挙動, 土木学会年次学術講演会, 59, VII-020.
- 2) T. Urase, C. Kagawa, T. Kikuta (2004): Factors affecting removal of pharmaceutical substances and estrogens in membrane separation bioreactor, Proc. of International conference on Membranes in drinking and industrial water production, L'Aquila, Italy.
- 3) 佐藤孝太, 浦瀬太郎 (2004): ナノろ過膜による医薬品の阻止性能のpH依存性, 土木学会環境工学研

究フォーラム講演集, 41, 110-112. (優秀ポスター賞受賞)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

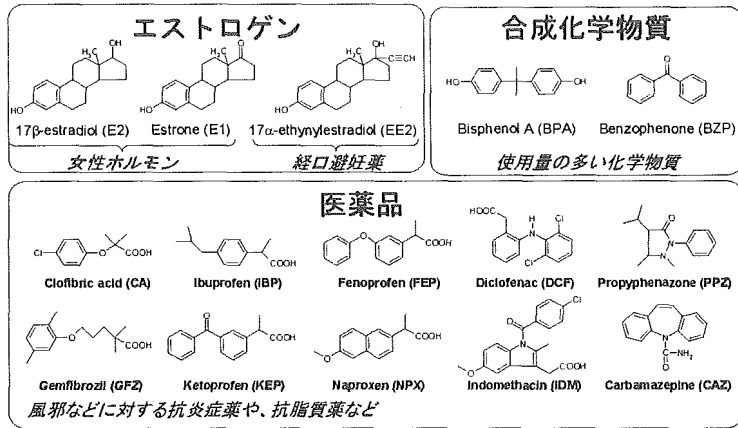


図1 実験対象物質とその構造式

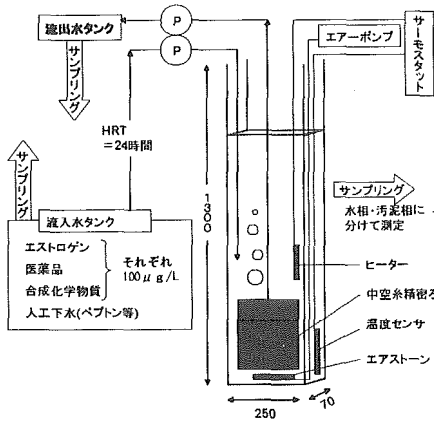


図2 活性汚泥リアクター実験装置図 (mm)

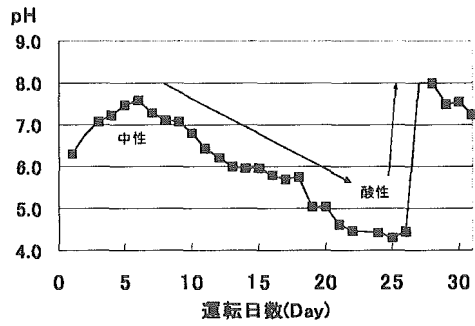


図3 連続運転時の反応槽内のpH変化

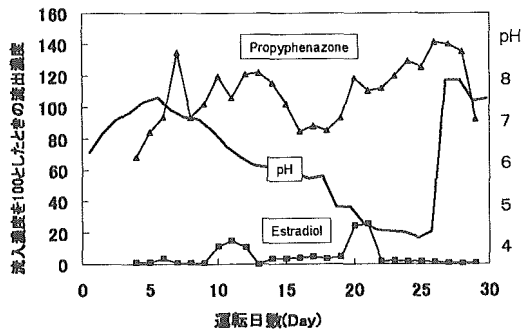


図4 PPZとE2の流出濃度の変化

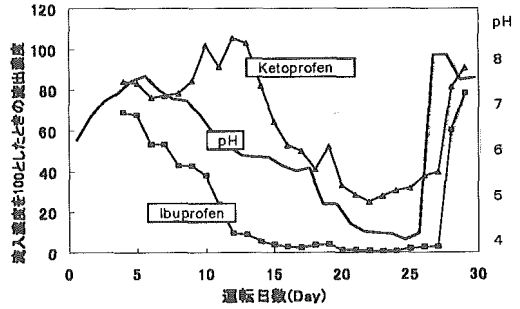


図5 IBPとKEPの流出濃度の変化