OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	実規模膜分離活性汚泥法における膜面付着微生物群集の解析
Author(s)	高田, 一輝
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69589
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博士学位論文

実規模膜分離活性汚泥法における膜面付着微生物群集の解析

高田　一輝

２０１８年１月

大阪大学大学院工学研究科
環境・エネルギー工学専攻

目次

緒論.....1

第 1 章　バイオファウリング生起のメカニズムに関する既往研究.....4
1.1　はじめに.....4
1.2　細胞外高分子物質が寄与するバイオファウリング.....4
1.3　膜表面微生物群集の特徴.....5
1.4　要約.....7

第 2 章　三宝下水処理場における微生物群集構造解析.....8
2.1　はじめに.....8
2.2　調査方法.....8
2.2.1　対象とした処理場.....8
2.2.2　試料の採取.....9
2.2.3　ファウリング物質の分析.....9
2.2.4　DNA の抽出と微生物群集解析.....10
2.2.5　統計解析.....11
2.3　結果.....13
2.3.1　リアクターの運転状況.....13
2.3.2　ファウリングの状態.....13
2.3.3　微生物群集のクラスター解析.....14
2.3.4　微生物群集の主成分分析.....15
2.4　考察.....19
2.5　要約.....20

第 3 章　泉北水再生センターにおける微生物群集構造解析.....22
3.1　はじめに.....22
3.2　調査方法.....22
3.2.1　対象とした処理場.....22
3.2.2　試料の採取.....27
3.2.3　ファウリング物質の分析.....27
3.2.4　DNA の抽出と微生物群集解析.....27
3.2.5　統計解析.....30
3.3　結果.....31

3.3.1　リアクターの運転状況.....31
3.3.2　流入水質および処理成績.....33
3.3.3　ファウリング物質.....35
3.3.4　T-RFLP 解析により調査した微生物群集.....38
3.3.5　メタゲノム解析により調査した微生物群集.....40
3.4　考察.....45
3.5　要約.....48

総括ならびに結論.....49

参考文献.....52

略語一覧.....57

補遺　難分解性有機物除去を目的とした MBR へのバイオオーグメンテーションの検討
.....59
4.1　はじめに.....59
4.2　実験方法.....60
4.2.1　OMI 株の培養.....60
4.2.2　ラボスケール MBR の立ち上げ.....60
4.2.3　バイオオーグメンテーション試験.....62
4.2.4　水質項目および運転管理項目のモニタリング.....62
4.2.5　DNA 抽出、微生物群集構造解析、および統計解析.....62
4.2.5　リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法.....63
4.3　結果.....64
4.3.1　立ち上げ期間におけるリアクターの運転状況.....64
4.3.2　バイオオーグメンテーション試験期間におけるリアクターの運転状況.....64
4.3.3　4-*t*-BP の処理成績.....68
4.3.4　C23O 遺伝子の挙動.....68
4.3.5　T-RFLP 解析による微生物群集構造解析.....68
4.4　考察.....72
4.5　要約.....74
参考文献.....75
略語一覧.....78

業績一覧 80

謝辞.....82

緒論

活性汚泥法は、下排水処理において最も広く用いられている水質浄化技術の一つである。この手法では、活性汚泥と称される混合微生物群集が生物反応槽内において下排水中の栄養塩や有機物を代謝し、二酸化炭素にまで無機化する、あるいは、同化によりバイオマス成分として体内に取り込むことによって、下排水の液相から除去することが主な浄化原理である。清澄な処理水を得るために、発生したバイオマスは、後段のプロセスで液相から分離されなければならないが、典型的には最終沈殿池での重力沈降により、この固液分離が行われている。

発明から百年余りが経過した活性汚泥法においては様々な変法が開発されているが、ここ三十年では膜分離活性汚泥法（membrane bioreactor, MBR）の普及が目覚ましい。MBR は、標準活性汚泥法における最終沈殿池を膜ろ過技術によって代替し固液分離を行うプロセスである。典型的な下排水処理の MBR において採用されるろ過膜の孔径はおよそ 0.1-0.4 μm であり、これは懸濁物質や細菌細胞よりも小さい。したがって、MBR は標準活性汚泥法と比較して高度な処理水質が得られるという特長を有している。また、最終沈殿池の設置が不要になることから、省スペース性という点においても標準活性汚泥法に対して優位性がある（Water Environment Federation, 2011）。

MBR はこうした特長を有する一方で、膜のファウリングという課題を抱えている。ファウリングとは、MBR の運転に伴ってろ過膜の閉塞が生じる問題であり、活性汚泥微生物を含めた MBR 槽内の種々の物質が膜表面上や孔内部に蓄積することによって引き起こされる。この現象は、ろ過膜の浸透性を減少させて処理速度を低下させるため、運転管理においては対策を講じるべき重要な問題である。ろ過膜の表面や孔内に蓄積した物質を取り除き、ファウリングを解消するためのもっとも一般的な対策は、薬液によるろ過膜の化学洗浄であるが、頻繁な洗浄は費用の増大につながり、また、ろ過膜の寿命を縮めることにもつながる（Drews, 2010）。ゆえに、洗浄のスパンを長くすること、すなわち、ろ過膜表面への物質の蓄積を制御し、深刻なファウリングの生起を出来る限り抑制することが望まれている。

ファウリングは極めて複雑な現象であり、その発生メカニズム等を分類する視点もさまざまである（Judd, 2006; Meng *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2012; Vanysacker *et al.*, 2014）。「実践的な分類」では、膜洗浄によって回復する可逆的ファウリングと回復しない不可逆的ファウリングに分類する。また、「構造的な分類」として、物質が膜の孔内に入り込むことで生じるポアブロッキングと物質が膜表面に吸着することで生じるケーキファウリングに分類する視点もある。さらには「ファウラントによる分類」として、ファウリングを引き起こす原因物質（ファウラント）の種類によってファウリングを分類する考え方もある。この観点から見ると、ファウリングには下排水中の有機物（多糖、タンパク質、フミン質など）や無機物（$CaCO_3$, SiO_2, $Fe(OH)_3$ など）の蓄積によって引き起こされるものがあるが（Shirazi *et al.*,

2010)、加えて、MBR の活性汚泥混合液中やろ過膜の表面に存在する微生物の代謝活動によって生じるファウラントが原因となるファウリングがあり、これは特にバイオファウリングと呼ばれる。

様々に分類されるファウリングの中でも、バイオファウリングの制御はとりわけ対処が難しいと考えられている。バイオファウリングへの対処を試みたいくつかの研究事例では、MBR の活性汚泥内の微生物群集の動態をブラックボックスとしたまま、担体の投入（Jin *et al.*, 2013）や凝集剤の添加（Guo *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2010）により、これを抑制することができるとの報告もあるが、いずれも必ずしも決め手となる対策とはなっていない。一方、バイオファウリングが微生物代謝に由来する現象であることに着目し、微生物学的側面からその詳細な発生メカニズムを解明することで、より効率的な対処法を発見しようとする試みも数多く行われている（Park and Lee, 2005; Miura *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Weerasekara *et al.*, 2016; Jeong *et al.*, 2016; Jo *et al.*, 2016; Ziegler *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2017; Matar *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018)。すなわち、MBR における活性汚泥微生物群集の挙動を詳細に検討してファウラントを生成する微生物群集を特定し、その微生物群集に対して代謝抑制を行うことが、多くの研究において目的とされている。

以上のような観点から、MBR の活性汚泥微生物群集の動態に関する研究は数多くなされるようになってきたが、その大部分はラボスケールやパイロットスケールの MBR を用いて実施されたものである。しかしながら、活性汚泥法の生物反応槽内における微生物群集の多様性はその体積に依存することが知られており（Van der Gast *et al.*, 2006)、実際の下水処理場において観察される微生物群集は人工的な環境下のラボスケールリアクターに比べて複雑な微生物群集構造を形成することが報告されている（Wong *et al.*, 2005)。加えて、流入水の性状や運転条件が大きく変動しうるという点も、ラボスケールリアクターにおいては再現できない要素である。したがって、ラボスケールやパイロットスケールの研究事例のみから、実際の処理系における微生物群集の動態を把握することは不可能であり（Saikaly *et al.*, 2005; Jenkins, 2008)、実規模の処理施設における調査に基づく知見の集積が望まれている。それにもかかわらず、実規模 MBR を対象とした微生物群集に関する研究事例は数例に限られている（Wan *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Gómez-Silván *et al.*, 2014; Jo *et al.*, 2016; Matar *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2017)。ここで、MBR のバイオファウリングに寄与する微生物群集についての知見を得るためには、活性汚泥混合液のみならず、ろ過膜の表面に存在する微生物群集の動態についても解明することが必要であると考えられるが、膜表面の微生物群集についても調査を行っている事例は、このうち 3 報のみと未だに極めて限られた情報しか得られていない（Jo *et al.*, 2016; Matar *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2017)。

本研究は、とりわけ知見の不足しているろ過膜表面を中心に、実規模 MBR の微生物群集に関する調査を行い、その動態を明らかにすることでバイオファウリングのメカニズム解明に資することを目的とした一連の研究成果をとりまとめたものである。特に、バイオ

ファウリング発生に重要な役割を担う微生物種の特徴を明らかにすることに重点を置いた。この緒論においては、MBR におけるバイオファウリング制御の重要性について述べ、本研究の背景と目的を明示している。第 1 章では、本研究を遂行するための基礎となるバイオファウリングに関する知見を、ラボスケールやパイロットスケールの事例も含めた既往研究から整理した。第 2 章では、実規模 MBR を対象として、活性汚泥混合液および膜付着物の微生物群集の調査を定期的に実施し、その動態からファウリングが発生するプロセスについての考察を行った。第 3 章では、さらに別の実規模 MBR を対象として、より詳細に経時的な活性汚泥および膜付着物の微生物群集動態を調査し、バイオファウリングにおいて鍵となる微生物の特徴について考察することを目指した。総括ならびに結論では、これらの研究で得られた知見を体系的にまとめるとともに、微生物制御によるバイオファウリング制御の可能性についてその展望を述べた。

第 1 章　バイオファウリング生起のメカニズムに関する既往研究

1.1　はじめに

本章では、第 2 章および第 3 章で実施する調査研究の参考とするため、MBR におけるバイオファウリングのメカニズムについて微生物学的側面から検討した既往研究を概観、整理した。先に述べたように、実規模 MBR での微生物群集やバイオファウリングに関する研究事例は極めて限定され、体系的な知見が得られていないことから、ここでは主にラボスケールおよびパイロットスケール MBR での研究結果から得られている知見をまとめた。バイオファウリングに寄与する微生物群集としては、活性汚泥混合液中のものが第一に考えられるが、ろ過膜表面に独特の微生物群集が形成されうることが多くの研究で指摘されていることから（Miura *et al*., 2007; Huang *et al*., 2008; Gao *et al*., 2011; Lin *et al*., 2011; Wu *et al*., 2011; Gao *et al*., 2013; Jeong *et al*., 2016; Luo *et al*., 2017; Liu *et al*., 2018）、膜表面の微生物群集が独特の役割を果たしていることも考えられている。そこで本章ではまず、MBR 生物反応槽内の微生物群集が寄与するバイオファウリングのメカニズムをについて概観した。また、膜表面の微生物群集が有する特殊性について得られている知見についても整理した。

1.2　細胞外高分子物質が寄与するバイオファウリング

バイオファウリング生起のメカニズムの一つとして、微生物群集が生産する生体高分子がファウラントとして膜表面に閉塞をもたらすものが考えられている。この生体高分子は細胞外高分子物質（extracellular polymeric substance, EPS）と呼ばれるものであり、微生物がバイオフィルムやフロックの形成を目的として細胞外に分泌する物質である。EPS には微生物の細胞表面に吸着しているものと、液中に遊離しているものがあり、後者はとくに可溶性微生物生産物（soluble microbial products, SMP）と呼ばれる。

EPS は糖類、タンパク質、フミンなどから構成されているが、とくに分子量の比較的大きな SMP 多糖が主要なファウラントであると結論付ける報告例が多い（Drews, 2010; Le-Clech *et al*., 2006; Meng *et al*., 2009; Meng *et al*., 2017）。多糖類は、必ずしも分子量が大きいものでなくとも、「ゲル化」という現象を引き起こすことによってもファウリングに寄与すると考えられている。一般にろ過膜における多糖類の「ゲル化」といえば、溶質である多糖類がろ過膜に垂直な方向に濃度勾配を作る「濃度分極」という現象によって生じるとする研究が多いが、典型的な MBR では膜表面への曝気によって生じる乱流がこれを阻害することから、濃度分極によってゲル化が進行することは比較的少ないとされている（Wang and Waite, 2009）。MBR では主に、ゲル化は多糖類同士が部分的に架橋結合することによって生じる。その高い粘着性によって付着した多糖類は膜面に蓄積することでゲル層となり、ファウリングを生起させる。また、カルシウムなど二価ないし多価の陽イオンが活性汚泥中に存在することで、膜面における多糖類のゲル化が促進されるという報告がある（Xin *et al*., 2015; Xin

et al., 2016)。膜面に形成されたゲル層はファウラントとして作用するだけでなく、膜表面の特性を変えることで、活性汚泥の付着をより容易にし、その堆積によるケーキ層の成長を助長することで、別のメカニズムによるファウリングを誘発する可能性もあるとされている（Meng *et al.*, 2017)。

先述の通り、EPS のうちでバイオファウリングに大きく寄与する物質としては多糖類が挙げられるが、タンパク質やフミンもファウラントとなる。なかでもタンパク質やフミンの関与によって最も頻繁に生じていると考えられるファウラントが、生体高分子クラスター（biopolymer cluster, BPC）である（Wang *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2015)。BPC は、タンパク質や多糖類などが相互に結合することで形成される。そのなかには微生物細胞が含まれているものの、その数は少数でありフロックとは異なる特徴を有すると考えられている（Wang *et al.*, 2007)。また BPC の粒径は 10 μm より大きく、EPS や SMP とも異なる特徴を有している（Sun *et al.*, 2011)。すなわち、BPC は EPS や SMP に比べて膜表面を透過しにくく、ろ過膜の孔を閉塞させる。そのほか、フミンは極めて高い疎水性を有していることから最初に膜表面に吸着しやすく、これがろ過膜の孔を閉塞させることで多糖類などそのほかの親水性の物質が蓄積しやすくなるという考察もある（Kimura *et al.*, 2015)。

1.3　膜表面微生物群集の特徴

活性汚泥混合液中の微生物群集が代謝によりファウラントである SMP などの生産を担うと考えられる一方で（図 1-1A)、膜表面に付着した微生物群集がその場において独特の代謝を行いバイオファウリングに寄与するとも考えられる（図 1-1B)。後者のプロセスでは、まず活性汚泥混合液中の微生物が膜面に付着し、EPS を放出してバイオフィルムを形成することで、ファウリングの契機となるとされている（Vanysacker *et al.*, 2014)。膜表面への吸着性は、運動性や細胞表面の疎水性などの要因から微生物種ごとに異なっており（Gutman *et al.*, 2013)、それゆえにファウリング初期の膜表面の微生物群集は活性汚泥混合液中と異なる独特のものになっているとも考えられている。また、活性汚泥混合液中の粒径が 10 μm より小さな粒子と膜面の微生物群集が類似していたことから、微生物群集が形成する集合体の大きさによっても膜面への吸着性が異なると推測している研究もある（Lin *et al.*, 2011)。このように、ファウリングの初期段階において膜面に付着しやすい微生物種は、「先駆種（pioneer bacterial species)」と呼ばれている（Zhang *et al.*, 2006a)。この独特な微生物群集が放出する EPS によって形成されるバイオフィルムはファウラントとして作用しうるが、多くの研究成果は、時間の経過とともにさらに別のメカニズムによってもファウリングが生起することを示唆している。

ファウリングの初期段階において先駆種が形成したバイオフィルムは、活性汚泥混合液中に存在する別の微生物群集や生体高分子が付着することを容易にする。その結果として膜表面に形成される膜付着物の層は、通常のバイオフィルムにおいて大半を占める EPS だけでなく微生物細胞などからも構成されており、独特の組成を有している（Meng *et al.*, 2017)。

さらに時間が経過してこの膜付着物の層が厚くなると、そこに存在する微生物群集にとっての環境は、初期のものから変化すると考えられている。すなわち、膜面付着物の深部には酸素や基質が伝達されにくくなるため、嫌気的かつ貧栄養の環境となる。こうしたことから、初期に膜面に付着した微生物群集はその多くが死滅し、膜面付着物中には変化した環境に適用した新しい微生物群集が出現する。この現象は、「遷移（succession）」と呼ばれている（Gao *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2017）。実際に、実規模 MBR を対象とした調査においても、膜面付着物深部の微生物群集は、膜面付着物表層や活性汚泥混合液と異なっていたとする報告がある（Choi *et al.*, 2017）。嫌気的な環境に存在する微生物群集は EPS の生産能力が高いとする報告もあることから（Zhang *et al.*, 2006b）、嫌気的な環境に適応することができる微生物種が選別されて微生物群集に遷移が生じ、遷移後の微生物群集がファウラントを生産しバイオファウリングを急速に進行させるとも考えられている。逆に、膜付着物内部に存在する微生物群集はそのほとんどが不活性ないし死滅状態にあるため（Lee *et al.*, 2009）、バイオファウリングにおいて中心的な役割を果たしているのはより表層に近い微生物群集であるとの考え方もある。この考え方では、膜の深部において死滅した微生物は細胞内部にあった生体高分子を放出するなどして、表層部の膜面付着微生物に基質を提供し、このような生体高分子を資化しやすい微生物群集が膜面に集積すると解釈される。こうして集積された微生物群集は、EPS を生産してバイオフィルムを形成することや、増殖して膜付着物の層をさらに厚くすることなどを通して、さらなるファウリングを引き起こす可能性がある。膜付着物深部において死滅した微生物群集が放出した基質を代謝している微生物は、このようにファウリングを進行させると考えられるが、逆にその分解を担う可能性もあるため、むしろファウリングを抑止する効果を有することも考えられる。ただし、EPS の主成分である多糖類は比較的生分解が難しいとの報告もあり（Hocaoglu and Orhon, 2010）、その分解能力がファウリング抑制に寄与する可能性は未知数である。

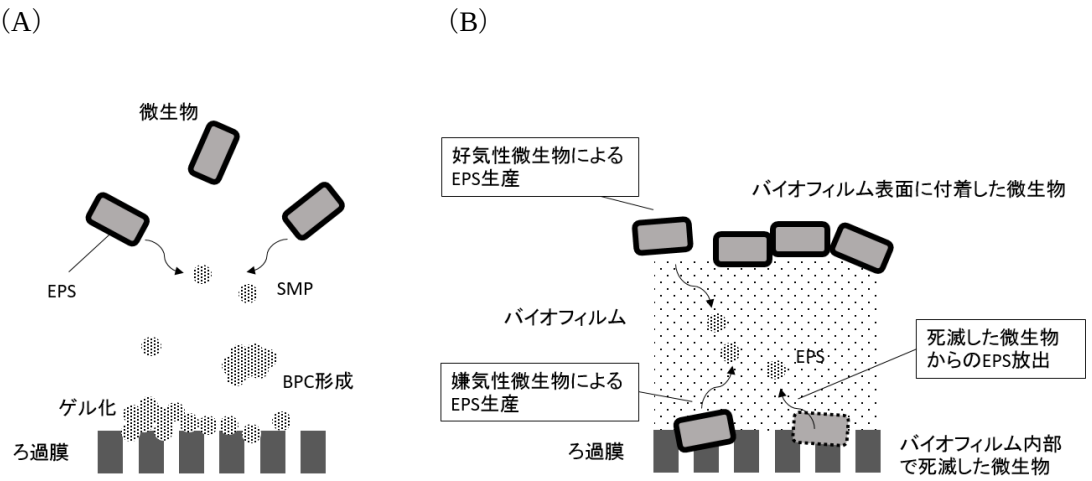


図 1-1　（A）活性汚泥混合液中および（B）膜表面の微生物によるファウリング

1.4 要約

本章では、ラボスケールおよびパイロットスケールの MBR を用いた既往研究において明らかにされているバイオファウリングのメカニズムについて概観するとともに、膜表面の微生物群集が保有する特性に関する知見を整理した。多くの研究ではバイオファウリングが生じるメカニズムとして、微生物による EPS の生産に着目していた。ファウリングに寄与する主要な EPS として SMP 多糖が挙げられているが、BPC の寄与も指摘されている。また、ファウラントの生産を担う微生物群集として、第一には、活性汚泥混合液中のものが考えられたが、ろ過膜表面に形成される独特な微生物群集に着目し、その寄与を指摘する研究も多くみられた。ろ過膜表面の独特な微生物群集は、膜面に付着しやすい先駆種によるバイオフィルムの形成、活性汚泥混合液中の物質蓄積による膜付着物層の成長、そしてその結果として生じる微生物群集の遷移によって形成されると考えられている。ただし、遷移後の微生物群集がファウリングに対してどのように寄与するかについては、様々な議論があり、未だ明らかとなっていない。

第 2 章　三宝下水処理場における微生物群集構造解析

2.1　はじめに

第 1 章では、主としてラボスケールやパイロットスケールの MBR における既往研究を概観し、現在までに提唱されているバイオファウリングのメカニズムについて整理した。しかし、緒論でも述べた通り、ラボスケールまたはパイロットスケールのリアクターで観察された微生物群集の動態のみで実規模 MBR におけるバイオファウリング現象を解釈することは不可能であり、実規模の処理施設における調査を通じた理解が不可欠である。そこで本章では、堺市三宝下水処理場で運転されている実規模 MBR を対象として、活性汚泥および膜面付着物の微生物群集構造を調査し、微生物群集の動態とファウリング発生との関係について、膜付着物試料の特徴も加味して考察を行った。

2.2　調査方法

2.2.1　対象とした処理場

三宝下水処理場では従来、標準活性汚泥法が 7 系列で運転されていたが、隣接する土地での高速道路伸長およびスーパー堤防建設工事のため、MBR を導入し省スペース化が図られた。2011 年 3 月 6 日（以下、この日を 0 日目とする）から MBR の供用が開始され、最終的には 9 系列で運転された。立ち上げ期の詳細については既往研究に述べられている（Hashimoto *et al.*, 2016）。三宝下水処理場は、主に家庭排水を受け入れているが、一部工場廃水も処理している。また、処理区域は合流式下水道によって整備されており、降雨時には雨水も流入する。

9 系列の MBR のうち、本研究では 3 系列を対象とした（Hashimoto ら（2016）の報告に記述されている No. 3、No. 5-1、および No. 5-2 に該当する MBR であり、以下では、それぞれ MBR-A、MBR-B、および MBR-C と表記する）。各系列の日平均処理水量は、MBR-A が 8,000 m^3/day であり、MBR-B および MBR-C がともに 6,500 m^3/day であった。各 MBR は、無酸素槽、間欠曝気槽、および膜分離槽から構成され、各槽の容積は、MBR-A が他の MBR のそれぞれ 1.2 倍程度であった（表 2-1）。間欠曝気槽における曝気運転は、105 分の曝気ごとに 15 分の休止期間を挟む 2 時間サイクルで行われた。

また、膜分離槽に設置されていたろ過膜の枚数を表 2-1 に示している。MBR-A の膜分離槽には 400 枚/基の膜ユニット 42 基（EK400、クボタ、以下それぞれの膜ユニットを Nos. 1-42 と呼ぶ）、MBR-B と MBR-C には 300 枚/基の膜ユニット 46 基（EK300、クボタ、同様に Nos. 1-46 と呼ぶ）が各々設置されていた。各膜ユニットには、平膜カートリッジ（0.8 m^2/膜、公称孔径 0.4 μm、塩素化ポリエチレン製、510 形、クボタ）が収納された。各系列のろ過システムは上流側と下流側に分けられており、それぞれに半数ずつの膜ユニットが割り当てられていた。すなわち、MBR-A では Nos. 1-21 と Nos. 22-42、それ以外の MBR では Nos.

1-23 と Nos. 24-46 に分けられ、ろ過流束の変更や膜の薬品による化学洗浄（薬液洗浄）を含む運転管理は上流側と下流側で個別に行われた。膜ファウリングの深刻さを把握するための指標として、圧力計（KL-3910、クボタ）を用いた遠隔モニタリングシステム（KG-200、クボタ）による膜間差圧（trans-membrane pressure, TMP）の測定も上流側と下流側に分けて行われた。薬液洗浄は、原則として TMP が 15 kPa 以上に上昇した際に、膜に 0.4%次亜塩素酸ナトリウムを 2 時間接触させることで行った。ただし、大量の雨水流入があった場合などには 10 kPa 程度の TMP であっても薬液洗浄を実施することがあった。

MBR-C では、調査期間中に MBR の改修が施された。すなわち、2013 年 12 月 11 日（1011 日目）に、上流部から Nos. 1-10 のろ過膜が除去され、ポリ塩化アルミニウム（poly aluminum chloride、PAC、Al_2O_3 濃度 10-11%）の添加が開始された。PAC の添加はリン除去を目的としたもので、日平均で 0.09-0.17 m^3/day が添加された。

2.2.2 試料の採取

膜面付着物試料および活性汚泥試料の採取は、2013 年から 2014 年の 5 回にわたって行った（表 2-2）。膜付着物試料の採取時には、膜ユニットを膜分離槽内から重機によって吊り上げ（図 2-1A）、収納されている平膜カートリッジを 1 枚引き抜いた（図 2-1B、C）。その膜カートリッジ表面を水道水で静かに洗浄して、緩やかに付着している活性汚泥を取り除いた後、中央部（約 0.5 m × 1 m）の付着物をヘラで回収して分析試料とした。701 日目、1054 日目、および 1055 日目にはそれぞれ MBR-A、MBR-B、および MBR-C の上・下流膜ユニットから 1 試料ずつ採取した。1072 日目と 1080 日目には MBR-B で試料を採取したが、下流膜ユニットでは解析に必要な量の膜付着物が得られなかったため、上流膜ユニットから採取した試料のみを解析に用いた。上流膜ユニットでは、MBR-A は上流側から 5 番目の No. 5、MBR-B は最上流の No. 1 の膜カートリッジから試料を採取し、MBR-C では Nos. 1-10 が除去されたために最上流となった No. 11 から採取した。下流膜ユニットについては、いずれも上流側から 5 番目の膜カートリッジ（MBR-A では No. 26、MBR-B と MBR-C では No. 28）から試料を採取した。活性汚泥試料は、膜付着物試料を採取すると同時に、膜分離槽の中流部（上流側と下流側の膜ユニットの中間点）から採取した。

また、処理成績を調査するため、MBR の流入水（最初沈殿池越流水）と処理水を膜付着物試料および活性汚泥試料の採取時に採水して、溶存態有機炭素（dissolved organic carbon, DOC）濃度を測定した。DOC 濃度の測定には、No. 2 定性ろ紙（ADVANTEC）により浮遊物質を除去したろ液に終濃度 5%となるように 2 M 塩酸を添加して生物反応を停止させたものを用い、全有機体炭素計（TOC-5000A、島津）により測定した。

2.2.3 ファウリング物質の分析

ファウラントの物質を特定する観点から、膜付着物に含まれる鉄（Fe）、カルシウム（Ca）、アルミニウム（Al）、EPS タンパク質、EPS フミンの量を定量した。無機物は、JIS K0102（工

場排水試験法）に準じて測定した（Japanese Standard Association, 2008）。すなわち、乾燥重量 2-5 g-dry の膜付着物試料を 10 mL の硝酸と 10 mL の塩酸に加え、電子ホットプレートで 20-30 分間加熱することで消化した後、室温まで放冷させた。消化による白煙が出なくなるまでこの操作を繰り返し、放冷後、超純水を少しずつ加えて全量を 50 mL とした。この液体は No. 5B 定量ろ紙でろ過した後、誘導結合プラズマ発光分析（ICPE-9000、島津）により Fe、Ca、および Al を定量した。有機物は、Frølund ら（1996）の手法で、EPS に含まれるタンパク質とフミンの量を測定した。この手法において EPS は、液中に遊離している SMP、微生物細胞に緩やかに吸着している loosely-bound EPS（LB-EPS）、および微生物細胞に強く吸着している tightly-bound EPS（TB-EPS）の三つに区分されるが、本章ではこれらを個別に求めた後、合計して含有量を求めた。

2.2.4 DNA の抽出と微生物群集解析

膜付着物試料および活性汚泥試料から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を対象とした末端標識制限酵素断片多型（terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP）解析に供した。膜付着物試料は DNA 抽出の前に、50 mM 滅菌リン酸カリウム緩衝液（KH_2PO_4 50 mM, K_2HPO_4 50 mM, pH 7.5）に 4 mg-wet/mL となるように調整して懸濁させた。

試料からの DNA 抽出は、ISOIL for Beads Beating（Nippon gene）を用いて、添付のプロトコルに従って行った。また、夾雑物を除去するため、MagExtractor™ –PCR&Gel Clean up–（Toyobo）を用いて精製し、これを微生物解析用の DNA テンプレートとして用いた。T-RFLP 解析に供する真正細菌の 16S rRNA 遺伝子の増幅は、フォワードプライマーの 5’末端を 6-FAM（6-Carboxyfluorescein）で蛍光標識したプライマーセット [27F-FAM, 1392R]（Amann *et al*., 1995）を用いて行った。ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction, PCR）は、反応系を 50 μL（TaKaRa ExTaq（TaKaRa）1.5 U、10×ExTaq buffer（TaKaRa）5 μL、dNTP 各 200 μM、フォワードプライマー1 μM、リバースプライマー1 μM、DNA テンプレート 5 μL）とし、サーマルサイクラーMastercycler standard（Eppendorf）を用いて行った。PCR の反応条件は、熱変性 95°C（10 min）に続けて、熱変性 95°C（1 min）、アニーリング 57°C（1 min）、伸長 72°C（3 min）を 1 サイクルとして 20-24 サイクル、最後に伸長 72°C（10 min）を行うプログラムとした。サイクル数は、各試料について 20、22、24 サイクルで検討を行い、対数増殖の初期となるものを用いた。該当するサイクルがなかった場合は、DNA テンプレートを滅菌水で希釈して、再度サイクル数を検討した。

増殖産物の 100 μL は、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（TaKaRa）により添付のプロトコルに従って精製し、制限酵素 *Hha*I による消化を 37°C で 5 時間以上行った。消化物の 1 μL は、12 μL の Hi-Di Formamide（Applied Biosystems）および 0.5 μL の GeneScan 2500 ROX size standard（Applied Biosystems）と混合し、92°C（3 min）の熱変性後、4°C に急冷し、Genetic Analyzer ABI Prism 310（Applied Biosystems）によるレーザー蛍光検出キャピラリ電気泳動に供し、蛍光末端断片（terminal restriction fragment, T-RF）パターンを得るとともに、付属の断

片長解析ソフトウェア GeneScan（v3.7、Applied Biosystems）により断片長解析を行った。電気泳動は、60℃ で、POP-4（Applied Biosystems）を充填した 47 cm×50 μm のキャピラリカラムを用いて行った。

2.2.5 統計解析

T-RFLP 解析では、それぞれの試料について各 T-RF 断片長ごとの優占度 P_i が求められる。P_i は、ある T-RF のピーク面積を、全 T-RF のピーク面積の総和で除した値として算出される。さらに、T-RF プロファイルに基づいて試料を分類、序列化するため、それぞれクラスター解析と主成分分析（principal component analysis, PCA）を行った。クラスター解析とは、試料間の類似度を算出し、その結果に基づいて試料を分類する手法である。ここでは指標として、下式 2-1 によって算出されるユークリッド距離 D_E を用いた。

$$D_E(\boldsymbol{x_1}, \boldsymbol{x_2}) = \sqrt{\sum_{j=1}^{N}(w_{1j} - w_{2j})^2} \quad \cdots (2\text{-}1)$$

ここで、$\boldsymbol{x_1}$ と $\boldsymbol{x_2}$ はベクトル $\boldsymbol{x_1} = (w_{11}, w_{12}, \ldots, w_{1N})$、$\boldsymbol{x_2} = (w_{21}, w_{22}, \ldots, w_{2N})$ であり、その要素は 2 つの試料において出現した N 個の T-RF それぞれの優占度 P_i である。このようにして各試料間の距離を総当たりで算出した後、非加重結合法によって系統樹を作成した。一方、PCA は膨大な要素の中から、主成分（principal components, PCs）を抽出し、より低次元で試料を序列化する方法である。ここでは、試料間のユークリッド距離を保つように序列化が行われる。これら 2 つの統計解析には、PAST ソフトウェア（v1.3.4）を用いた。

表2-1　三宝下水処理場MBRを構成する反応槽の容積、膜の枚数、およびPAC添加の有無

MBR	反応槽容積 [m^3]			ろ過膜の枚数 [a]		PAC添加
	無酸素槽	間欠曝気槽	膜分離槽	上流側	下流側	
A	380	590	980	8,400	8,400	無
B	320	470	800	6,900	6,900	無
C	320	470	800	3,900	6,900	有 [b]

[a] ろ過膜は、平膜、膜面積0.8 m^2/枚、公称孔径0.4 μm、塩素化ポリエチレン製であった

[b] PAC添加は1011日目から行われた

表2-2　膜付着物および活性汚泥試料の一覧

採取日	日数[a]	MBR	試料の略称		
			上流膜	下流膜	活性汚泥
2013年2月4日	701	MBR-A	MU-1	MD-1	AS-1
2014年1月23日	1054	MBR-B	MU-2	MD-2	AS-2
2014年1月24日	1055	MBR-C	MU-3	MD-3	AS-3
2014年2月10日	1072	MBR-B	MU-4	対象外[b]	AS-4
2014年2月18日	1080	MBR-B	MU-5	対象外[b]	AS-5

[a] 三宝下水処理場の MBR が運転を開始した 2011 年 3 月 6 日を 0 日目とした日数を表す

[b] 解析に必要な量の膜付着物が得られなかったため

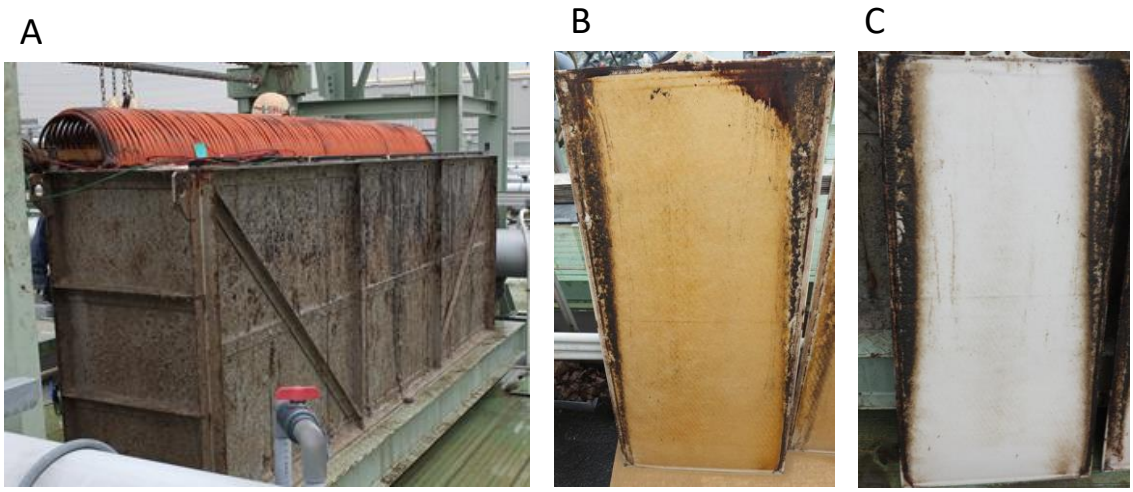


図 2-1　三宝下水処理場に設置されていた膜ユニット（2013 年 2 月 4 日の膜モジュール吊り上げの様子（A）、および同日に対象とした上流膜（B）と下流膜（C）の外見）

2.3 結果

2.3.1 リアクターの運転状況

対象とした MBR は、701 日目まで、水理学的滞留時間（hydraulic retention time, HRT）6.5-9.1 時間、汚泥滞留時間（sludge retention time, SRT）30-51 日で運転されていた（Hashimoto *et al.*, 2016）。同期間における膜分離槽の活性汚泥浮遊物質（mixed liquor suspended solids, MLSS）濃度は 8-10 g/L で維持されており、溶存酸素（dissolved oxygen, DO）濃度は 1.9-9.9 mg/L で変動していた。TMP の値は 1.3-21.4 kPa で変動した。DOC 除去率は 83%であった。

これに対して、本研究で調査対象とした期間（701 日目から 1080 日目）では、HRT は 7.1-9.9 時間、SRT は 25-85 日、MLSS 濃度は 9-11 g/L、DO 濃度は 5.5-7.5 mg/L で、ほぼ同様の運転が行われていた。DOC 除去率は 83%以上が常に維持されていた。TMP の上昇は上流側の膜ユニットにおいて下流側に比べて早く生じ、上流側の膜ユニットでファウリングが生じやすいことが確認された。その結果、上流側では約 30 日に一回のペースで薬液洗浄が行われたのに対して、下流側では約 40 日に一回のペースで薬液洗浄が行われた。また、改修を施した MBR-C ではファウリングの進行が比較的遅く、53 日間（1020 日目から 1073 日目）は薬液洗浄が不要であった。凝集剤の添加によるバイオファウリングの抑制効果が報告されていることから（Guo *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2010）、PAC の添加が影響した可能性が高い。

2.3.2 ファウリングの状態

本研究では、薬液洗浄からの経過日数、TMP（日最大値、日平均）およびろ過流速から判断して、さまざまな状態の膜付着物試料を採取することができた（表 2-3）。701 日目には大量の雨水を処理していたため、同日の MBR-A のろ過流束（0.57 m/day）は、他の日の値（0.46-0.50 m/day）に比べて高く設定されていた。結果として、MU-1 と MD-1 ではそれぞれ日最大 TMP が 15.4 kPa、9.9 kPa となり、重度のファウリングが発生している状況であった。MBR-B では、1054 日目と 1072 日目にそれぞれ膜付着物試料 MU-2 および MU-4 を採取したが、その間には薬液洗浄は行われなかったため、MU-2 と MU-4 の膜付着物試料の相違は、18 日間におけるファウリングの進行を反映していると考えられる。また、1073 日目に薬液洗浄が行われた後、1080 日目に MBR-B から再び膜付着物試料（MU-5）を採取した。すなわち、MU-5 は、薬液洗浄から 7 日間で再形成した膜付着物となっている。MBR-B と MBR-C における日最大 TMP は、MU-4 の採取時に 6.0 kPa であったことを除き、いずれの試料採取時にも 3.4-4.4 kPa であり類似の値を示したが、日平均 TMP は、MD-1、MD-3 の採取時の下流側ではそれぞれ 1.6 kPa、1.5 kPa と比較的低い値を示したのに対して、MU-2、MU-3、MU-4、および MU-5 の採取時の上流側では 2.6-3.9 kPa といずれも高い値を示した。これらのことから、MD-1 および MD-3 の採取時の MBR-B および MBR-C の下流側ではファウリングが軽度であったのに対して、MU-2～5 採取時の上流側の膜では付着物試料はが中度のファウリングが生じていたものと示唆された。

また、表 2-3 には膜付着物の化学組成も示している。上流の膜付着物試料には、MU-3 を

除き、Fe をはじめとする無機元素が比較的多く含まれた。また、EPS タンパク質や EPS フミンの付着量も、上流の膜に多く含まれる傾向であった。MD-1 には、本研究で分析した無機元素はわずかしか含まれなかったが、EPS が多く含まれた。膜の外見を比較すると、上流の膜表面は赤褐色であったのに対し、下流では薄い茶色あるいは黄褐色となっていた（図 2-1）。確証は得られていないものの、表 2-3 に示す分析結果から、上流の膜における赤褐色は大量の Fe が酸化鉄などの形態で蓄積したことによるものであると推測された。

表 2-3　採取した膜付着物試料の諸特性

試料	直近の薬液洗浄 [日前]	TMP 日最大 [kPa]	TMP 日平均 [kPa]	ろ過流束 [m/d]	膜面あたりの物質付着量 Fe [mg/m^2-membrane]	Ca	Al	ﾀﾝﾊﾟｸ質	フミン
MU-1	28	15.4	7.7	0.57	62	23	13	9	13
MD-1	28	9.9	6.1	0.57	2	2	2	10	5
MU-2	13	4.4	3.2	0.50	20	10	9	19	6
MD-2	13	4.1	1.6	0.50	2	3	3	2	1
MU-3	35	4.1	2.9	0.50	< 1	< 1	< 1	3	1
MD-3	10	3.4	1.5	0.50	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
MU-4	31	6.0	3.9	0.46	33	14	12	9	14
MU-5	7	3.7	2.6	0.48	14	5	5	5	2

2.3.3　微生物群集のクラスター解析

図 2-2 に、膜付着物試料および活性汚泥試料を T-RFLP 解析に供することで得られた微生物群集の T-RF プロファイルを示す。また、図 2-3 には、その T-RF プロファイルに基づいて行ったクラスター解析によって作成した樹形図を主要な T-RF（優占度 $P_i > 0.05$ となったもの）の優占度とともに示している。

406-409 bp の T-RF は、192-701 日目にかけても三宝下水処理場 MBR 活性汚泥で検出されていたが（Hashimoto *et al.*, 2016）、本研究で調査した 701-1080 日目においてもすべての活性汚泥試料において優占した。軽度のファウリングが確認された膜付着物試料 MD-2 と MD-3 における T-RF プロファイルは、活性汚泥試料のうち、同日に採取したものを含む、AS-2、AS-3、および AS-4 と類似した T-RF プロファイルを有しており、クラスター解析において一つのクラスターを形成した（Group I）。これらの試料は共通して、406-409 bp と 1085-1087 bp の T-RF が高い優占度で存在した。また、AS-2 を除き、560-565 bp の T-RF も高い優占度で存在した。

中度のファウリングが確認された MU-2、MU-3、MU-4、および MU-5 は、Group I とは別

のクラスターを形成した（Group II）。このクラスターでは、Group I において大きな優占度を占めた 406-409 bp の T-RF は優占度が低く、201 bp の T-RF が大きく優占した。他方、1085-1087 bp の T-RF の優占は Group I と Group II の両クラスターに共通していた。また、Group I で AS-2 以外に共通して大きく優占した 560-565 bp の T-RF は、Group II に属するすべての試料においても大きな優占度で検出された。

その他の試料である AS-1、AS-5、MU-1、および MD-1 ではそれぞれ独特の T-RF（AS-1 における 61 bp と 925 bp、AS-5 における 1033 bp と 1045 bp、MU-1 における 370 bp、MD-1 における 370 bp、375 bp、および 675 bp など）が優占しており、Group I と Group II で優占した 560-565 bp と 1085-1087 bp の T-RF はほとんど優占していなかった。ただし、膜付着物試料 MU-1 では、他の上流膜試料においても優占が確認された 201 bp の T-RF が非常に大きく優占し、Group II に属する MU-3 や MU-4 で優占した 58-59 bp の T-RF が含まれた。また、活性汚泥試料である AS-1 と AS-5 では、Group I に属する活性汚泥試料でも優占した 406-409 bp の T-RF の優占が確認された。

また、主要な T-RF の中には、活性汚泥試料のみで優占し、膜付着物試料では優占しないものも含まれた。特徴的なものとして、AS-1 と AS-2 で優占した 98 bp や、AS-3 や AS-4 で優占した 1038-1039 bp の T-RF は、いずれの膜付着物試料でも優占していなかった。

2.3.4 微生物群集の主成分分析

T-RF プロファイルを基にした PCA で得られた第一主成分（the first principal component, PC1（寄与率：34.2%））および第二主成分（the second principal component, PC2（寄与率：18.2%））を用いて作成した散布図を図 2-4 に示す。図中には、各 PC の得点と表 2-3 に示した物理化学的指標との相関係数を併せて示している。また、主要な T-RF の主成分負荷量を表 2-4 に整理している。散布図では、クラスター解析の結果から定義されたクラスター（Group I および Group II）に属する試料がそれぞれ近い位置にプロットされ、AS-1、AS-5、MU-1、および MD-1 はそれらの試料から離れた位置にプロットされた。

PC1 に対して顕著な正あるいは負の主成分負荷量を示した T-RF は、201 bp（+0.42）、1085-1087 bp（-0.77）、および 406-409 bp（-0.23）であった。このため、406-409 bp と 1085-1087 bp の T-RF の優占によって特徴づけられた Group I に属する膜付着物試料および活性汚泥試料は、負の PC1 得点を示した。他方、201 bp の T-RF の優占度が大きい Group II に属する膜付着物試料および MU-1 は、Group I より大きな PC1 得点を示した。また、1085-1087 bp の T-RF が優占しなかった AS-1、AS-5、および MD-1 は正の PC1 得点を示した。

一方、PC2 に対して顕著な正あるいは負の主成分負荷量を示し、大きな影響を与えた T-RF は、1045 bp（+0.40）、406-409 bp（+0.33）、560-565（-0.50）、201 bp（-0.44）、および 1085-1087（-0.26）であった。Group I に属する試料は、406-409 bp、560-565 bp、および 1085-1087 bp と、正負の主成分負荷量の大きな T-RF が共存したため、PC2 得点はゼロ付近となった。これに対して、Group II は負の主成分負荷量の大きい 201 bp および 560-565 bp の T-RF が大

きく優占したため、負の PC2 得点を示した。また、活性汚泥試料は、いずれも 406-409 bp の T-RF が優占したため、正の PC2 得点を示し、1045 bp の優占度が高かった AS-5 が最も大きな PC2 得点を示した。

物理化学的指標との相関を見ると、日平均 TMP 値、EPS フミンおよび Fe の膜面付着量が PC1 得点と正の相関を示したが、特に日平均 TMP 値の相関が強かった（$r = 0.9, p < 0.05$）。これは、膜付着物試料において、日平均 TMP の増加に伴って 201 bp の T-RF の優占度が増加し、1085-1087 bp の T-RF の優占度が減少する傾向を反映したものであると考えられた。一方、本研究で調査した物理化学的指標の中では、PC2 得点と強い相関を示すものはなかった。

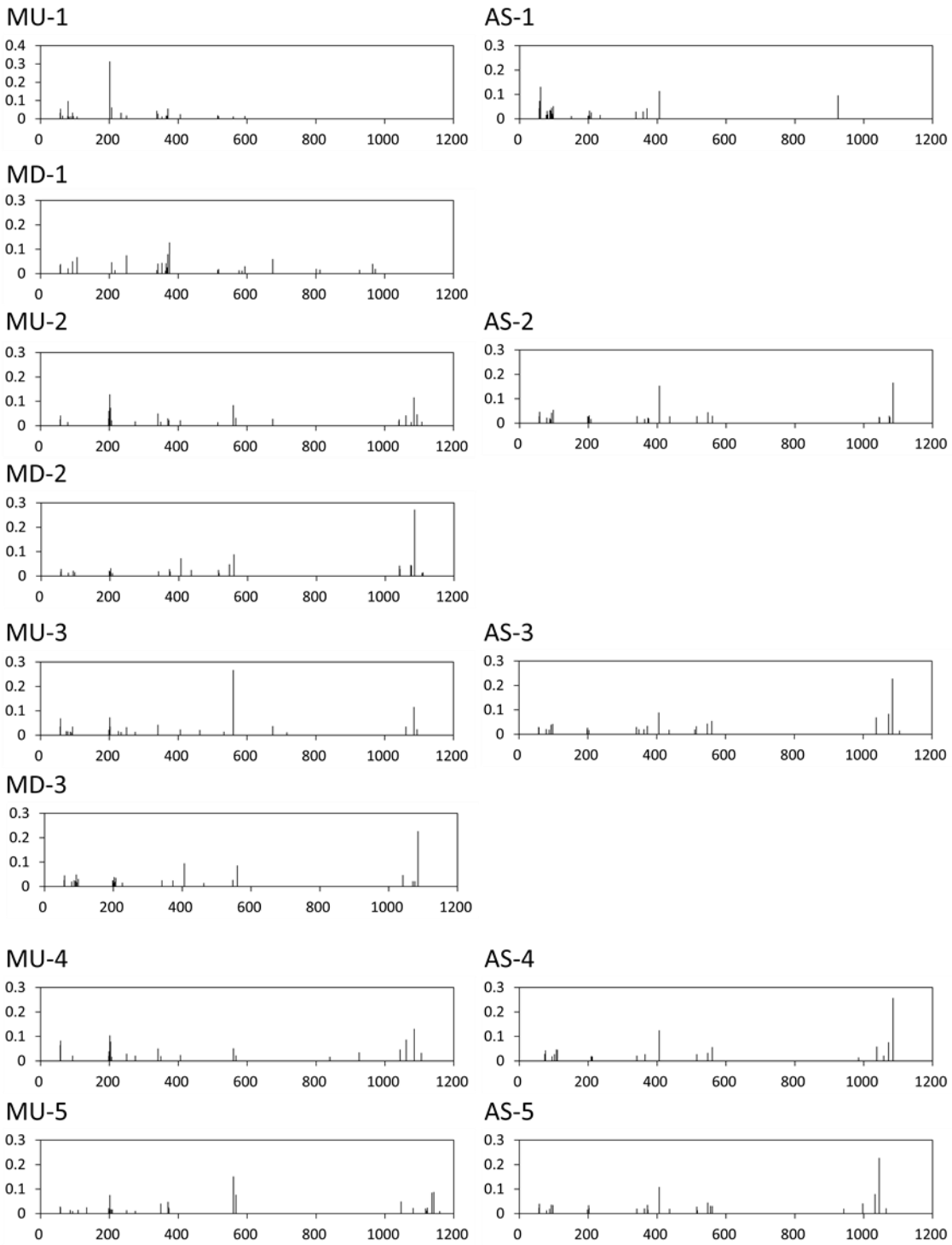


図 2-2　三宝下水処理場 MBR から採取した膜付着物試料および活性汚泥試料を制限酵素 *Hha*I により消化して得られた T-RF プロファイル（各グラフの横軸および縦軸はそれぞれ、T-RF [bp]とその優占度 P_i を示し、傍記した英数字は試料の略号を意味する）

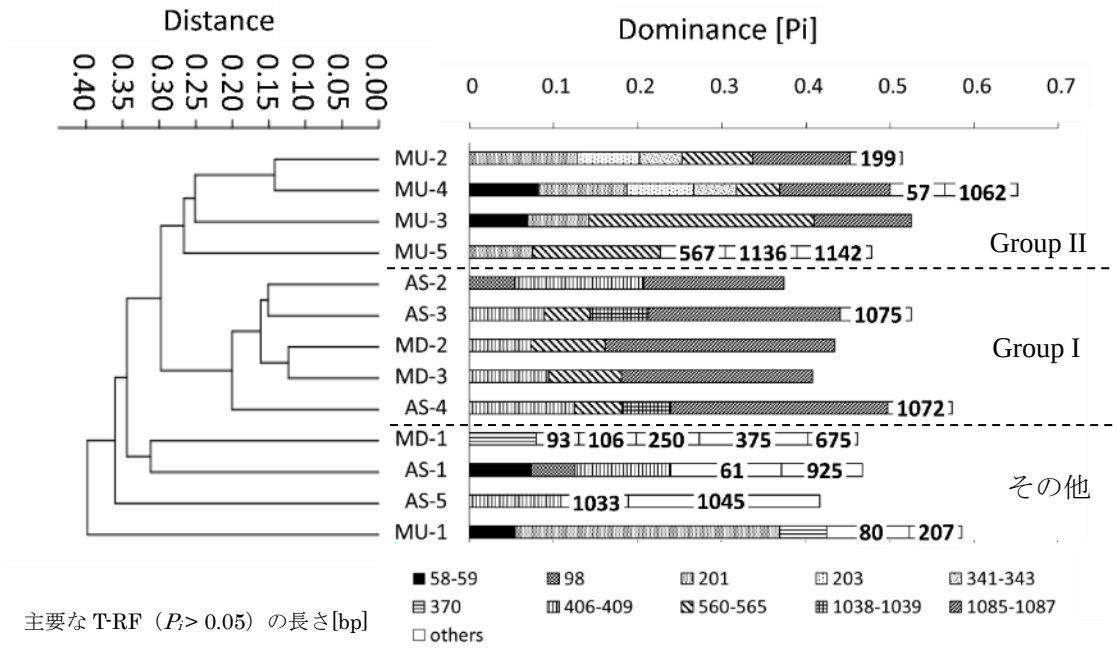


図 2-3　膜付着物試料および活性汚泥試料の T-RF プロファイルを基にクラスター解析を行い作成した樹形図と、主要な T-RF の優占度（2 つ以上の試料で共通して優占していたものについては、棒グラフにパターンと凡例を付した）

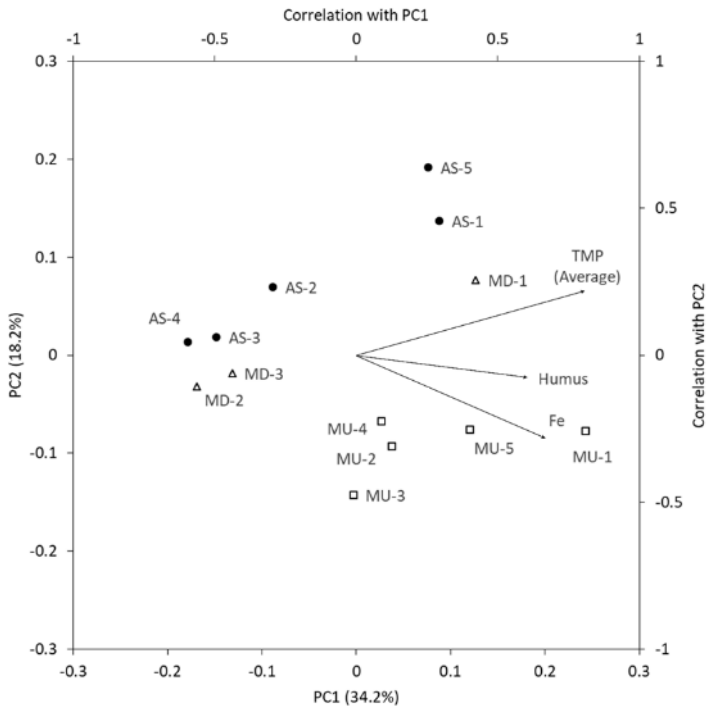


図 2-4　膜付着物試料および活性汚泥試料の T-RF プロファイルを基に PCA を行い作成した散布図（ベクトルは PC1 得点と PC2 得点と各物理化学的指標の相関係数を示す）

表 2-4　膜付着物試料および活性汚泥試料の主要な T-RF の主成分負荷量（太字体の数字は特に絶対値の大きな主成分負荷量を意味する）

T-RF			T-RF			T-RF		
[bp]	PC 1	PC 2	[bp]	PC1	PC2	[bp]	PC1	PC2
58-59	0.07	-0.02	207	0.08	-0.05	1033	0.03	0.14
57	0.05	-0.02	250	0.08	-0.03	1038-1039	-0.10	0.02
61	0.05	0.16	341-343	0.00	-0.07	1045	0.07	**0.40**
80	0.14	-0.01	370	0.16	0.01	1062	0.02	-0.13
93	0.05	0.09	375	0.05	0.09	1072	-0.06	0.01
98	-0.05	0.15	406-409	**-0.23**	**0.33**	1085-1087	**-0.77**	**-0.26**
106	0.05	0.04	560-565	-0.09	**-0.50**	1136	0.05	-0.06
199	-0.03	-0.08	567	0.05	-0.09	1142	0.05	-0.06
201	**0.42**	**-0.44**	675	0.04	-0.03			
203	0.04	-0.08	925	0.04	0.10			

2.4　考察

T-RF プロファイルに基づくクラスター解析の結果、膜付着物試料の微生物群集は 2 つのクラスター（Group I および Group II）とその他に分類された（図 2-3）。Group I に分類された試料（MD-2 および MD-3）は軽度のファウリング、Group II に分類された試料（MU-2、MU-3、MU-4、および MU-5）は中度のファウリングが発生していた膜から採取したものであり、これらに含まれなかった試料は雨水の急激な流入により重度のファウリングが発生していたもの（MU-1 および MD-1）であった。これらの結果から、膜表面付着微生物群集がファウリングの深刻さに関連していることが示唆された。

軽度のファウリングが生じていた膜付着物試料（Group I）では、406-409 bp、560-565 bp、および 1085-1087 bp の T-RF が優占しており、活性汚泥試料（AS-2、AS-3、AS-4）と類似の微生物群集構造を示した（図 2-3）。一方、中度のファウリングが生じていた膜付着物試料（Group II）の微生物群集は Group I とは明らかに異なる構造を有し、特に 201 bp の T-RF の優占度の高さが特徴的であった。MBR-B から採取した MU-2 と MU-4 では、膜の薬液洗浄からの経過日数が異なっていたにもかかわらず、類似の T-RF プロファイルが確認された。このことは、膜付着微生物群集の構造が安定であったことを示唆している。また、これらの試料を採取した後に薬液洗浄を経て採取された MU-5 や、異なる MBR である MBR-C から採取された MU-3 が同一のクラスターに分類されたことは、中度にファウリングした膜付着物の微生物群集がある種の「同一性」を有することを示唆するものといえる。

本章で述べた結果は、第 1 章で述べたラボスケールやパイロットスケールのリアクター

において得られた知見に当てはめて解釈することができる。すなわち、軽度にファウリングし、ファウリング進行の初期段階であると考えられた Group I に属する膜付着物試料で優占した 406-409 bp、560-565 bp、および 1085-1087 bp の T-RF は初期に膜表面に付着してバイオフィルムを形成する先駆種を表している可能性がある。逆に、活性汚泥試料においてのみ優占していた 98 bp や 1038-1039 bp の T-RF は、三宝下水処理場で使われているろ過膜との親和性が低く、付着しにくかった微生物種を表していると考えられる。また、中度のファウリングが発生し、ファウリングが比較的進行した時期の膜付着物試料が含まれる Group II では、406-409 bp の T-RF の優占度が小さくなっていることから、前述の先駆種のうち、406-409 bp の T-RF を示す微生物種は遷移により層が厚くなった膜付着物においては優占しない種と推測される。中度のファウリング膜では、406-409 bp の T-RF に代わって、201 bp、58-59 bp、203 bp、および 341-343 bp の T-RF が優占したことから、これらの T-RF は遷移の過程で優占しやすい微生物種を表していると考えることができる。特に、201 bp の T-RF は、その優占度が日平均 TMP の値と有意な相関を有することから（表 2-4）、ファウリングの状態を反映する T-RF であると考えられた。

一方、重度にファウリングが生じていた膜付着物試料（MU-1 および MD-1）は、Group I、Group II のいずれとも異なる微生物群集構造を示した（図 2-3）。いずれの試料も急激に雨水が流入した時点で形成された膜付着物であることから、第 1 章で述べた通常のバイオファウリングだけでなく、微生物細胞や流入水中の様々な成分による急激な閉塞など、別のメカニズムも働いていたと推測される。また、Huang ら（2008）は、ろ過流束の変化が膜表面付着微生物群集に大きな影響を与えると指摘している。両試料の採取時のろ過流速は他の試料の採取時に比べて明らかに高かったことから（表 2-3）、これらの試料でのみ優占した 370 bp の T-RF は、高いろ過流束で運転されている MBR においてバイオファウリングに関与する微生物であると解釈することもできる。本研究では、合流式で都市下水を処理する MBR を対象としたことから、ラボスケールやパイロットスケールの MBR を用いて行われた既往研究に比べて複雑な微生物群集動態を観察したものと考えられる。

2.5 要約

本章では、三宝下水処理場の MBR を対象として、実規模 MBR における膜付着物試料および活性汚泥試料の微生物群集を T-RFLP 解析によって調査し、ファウリングの深刻さを膜付着物中の微生物群集の動態と関連付けることを試みた。TMP の値やろ過流速に基づいてファウリングの深刻度を軽度、中度、重度の 3 パターンに分類し、微生物群集との関連性をみたところ、軽度のファウリングが発生した膜面の微生物群集は活性汚泥の微生物群集に類似しているが、中度のファウリング発生時の膜面には活性汚泥とは異なる独特な微生物群集が形成されることが明らかとなった。また、この膜付着微生物群集の相違は、ラボスケールやパイロットスケールの MBR を用いた既往研究においても観察されている遷移によって生じたものと考えられた。他方、重度のファウリングが発生している膜の付着

微生物群集は、さらに特殊な構造を有しており、本研究で対象とした MBR が合流式下水道から流入する雨水の処理も行っていたことに起因するものと考えられた。

第 3 章　泉北水再生センターにおける微生物群集構造解析

3.1　はじめに

第 2 章では、実規模 MBR から採取した膜付着物の微生物群集構造を T-RFLP 法によって解析し、活性汚泥懸濁液と大きく異なる場合があることを明らかにした。しかし、T-RFLP 法では、手法上の制約から、ファウリングに関与する微生物の具体的な系統学的分類までを明らかにすることはできなかった。そこで本章では、ハイスループットシーケンシングを用いた微生物群集の網羅的解析を実施することにより、ファウリング発生のメカニズムについて微生物群集の視点から理解を深めることを目的とした。

3.2　調査方法

3.2.1　対象とした処理場

本章では、堺市泉北水再生センターに新設された 2 系列の MBR（以下、MBR-A および MBR-B と表記する）を対象とした。各 MBR は、無酸素槽（1,295 m^3）、好気槽（261 m^3）、および膜分離槽（1,295 m^3）で構成され（図 3-1）、計画処理水量および実際の平均処理水量はいずれもそれぞれ 10,000 m^3/day、8,000 m^3/day であった。両 MBR は同一の流入水を処理するために並列運転されたが、立ち上げの時期が異なっており、MBR-A は 2016 年 3 月 22 日（以下、この日を 0 日目とする）、MBR-B は同年 7 月 25 日（125 日目）に運転が開始された。立ち上げに当たっては、第 2 章で調査対象とした三宝下水処理場で用いられていたろ過膜が各 MBR 槽内に移設された。また、両 MBR の種汚泥には、泉北水再生センターで運転されていた標準活性汚泥法の余剰汚泥を用いた。

対象とする MBR では、分流式下水道からの都市下水を受け入れ、調査期間中（0 日目から 477 日目まで）は、無酸素槽 3.9 時間、好気槽 0.8 時間、膜分離槽 3.9 時間の HRT で運転された。ただし、MBR-B では、調査期間のうち 224 日目から 363 日目と 443 日目以降には、し尿汚泥（平均投入量 70 m^3/day）が追加で投入された（図 3-2）。汚泥引き抜きは、MBR-A では、21 日目までは行わず、その後 168 日目まで 0-116 m^3/day の範囲で量を変更しながら引き抜きを行い、169 日目以降は基本的に MLSS 濃度を 8 g/L 付近に維持できるよう、安定した量（70-85 m^3/day）が引き抜かれた（図 3-3）。MBR-B では、125 日目の立ち上げから 132 日目までは汚泥を引き抜かず、その後は 143 日目にかけて徐々に引き抜き量を増加させ、171 日目以降は MBR-A と同様の汚泥引き抜きを実施した。ただし、一時的なし尿汚泥の投入に伴い、256 日目から 363 日目には MBR-A よりも多くの汚泥（100-106 m^3/day）が引き抜かれた。汚泥引き抜き量が概ね安定した 171 日目以降には、汚泥引き抜き量は、MBR-A では 71±13 m^3/day、MBR-B では 82±19 m^3/day となり、SRT は、それぞれ 40 日と 35 日であった。

また、リン除去のため、好気槽末端から凝集剤として PAC（Al_2O_3 濃度 10-11%）が投入さ

れた。PAC の添加量は 0.25 m^3/day 程度を基本とし、MBR-A では 157 日目から 272 日目、276 日目から 383 日目にそれぞれ 0.53 m^3/day、0.40 m^3/day、MBR-B では 125 日目から 203 日目に 0.40-0.66 m^3/day と通常よりも多量の PAC が投入された（図 3-4）。

膜分離槽には、72 基（以下、Nos. 1-72 と呼ぶ）の膜ユニットが設置された（300 枚/基、EK300、クボタ）。一つの膜ユニットは、上段膜ケース、下段膜ケース、および散気ケースからなり、上下段膜ケースにはそれぞれ 150 枚の平膜カートリッジ（0.8 m^2/膜、公称孔径 0.4 μm、塩素化ポリエチレン製、510 形、クボタ）が収納された。ろ過システムは Nos. 1-36（上流側）と Nos. 37-72（下流側）に分けられ、TMP は半導体歪ゲージ式圧力計（PTG60G-G4B1C4-MC-1、アズビル）を用いて個別に測定された。また、日平均 TMP の経時変化を把握するため、下式 3-1 に従い、運転日数 t [日目] に対する日平均 TMP [kPa] の離散関数 $f_1(t)$から TMP の変化量を表す関数 $f_2(t)$を求めた。

$$f_2(t) = \frac{f_1(t+1) - f_1(t-1)}{(t+1) - (t-1)} \qquad \cdots (3\text{-}1)$$

曝気による膜洗浄は、ブロワー（PTG60G-G4B1C4-MC-1、クボタ）を用いて常時約 12.5 m^3/m^2/day の風量で行った。また、TMP が上昇した際には、0.4%次亜塩素酸ナトリウムまたは 0.5%クエン酸を 4-4.5 時間膜に接触させ、薬品洗浄を行った。TMP の上昇に伴う薬品洗浄の詳細な日程は、図 3-5 および表 3-1 に示した。

MBR 運転管理状況や、MBR 流入水（最初沈殿池の後に設置された流量調整槽からの流入水）および処理水の各種水質指標（生物学的酸素要求量（biochemical oxygen demand, BOD）、化学的酸素要求量（chemical oxygen demand, COD）、全窒素（total nitrogen, T-N）濃度、全リン（total phosphorus, T-P）濃度）は、処理場の月報から情報を得た。水質指標の測定はそれぞれ、工場排水試験法（JIS K 0102: 2016）の項目 21、17、45.2、46.3.1 が定める手法に基づいて行われた（Japanese Standard Association, 2016）。すなわち、BOD は、試料を pH 7.2 に調製し、20°C で 5 日間放置したときに消費された溶存酸素の量から求め、COD は、100°C における過マンガン酸カリウムによる酸素消費量から求めた。T-N 濃度は、試料に水酸化ナトリウム-ペルオキソ二硫酸カリウム混合溶液を加え約 120°C に加熱することで有機物を分解するとともに全窒素化合物を硝酸態窒素に変えた後、pH を 2-3 として硝酸イオンを 220 nm の吸光度から求める紫外線吸光光度法を用いて測定した。T-P 濃度は、試料にペルオキソ二硫酸カリウムを加えて 120°C に加熱することで有機物を分解するとともに全リン化合物をリン酸態リンに変えた後、モリブデン酸アンモニウム-アスコルビン酸混合溶液と反応させ 880 nm の吸光度を測定することによって求めた。

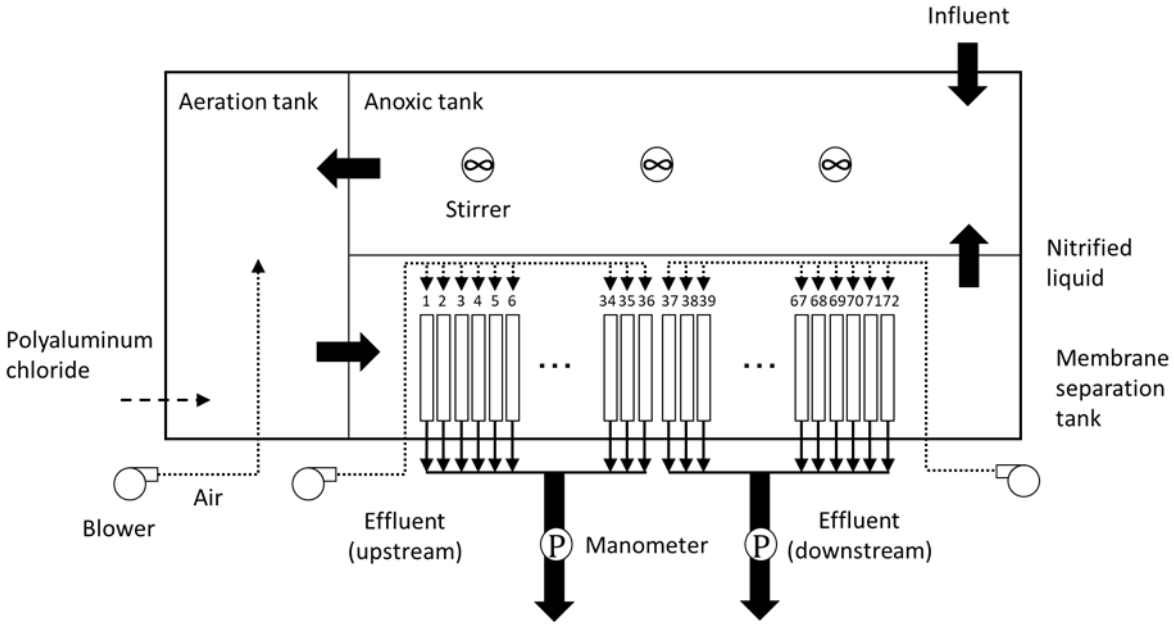


図 3-1　堺市泉北水再生センターMBR の概略図（実線の矢印は水の流れ、数字が傍記された長方形は、膜ユニットとその番号を表す）

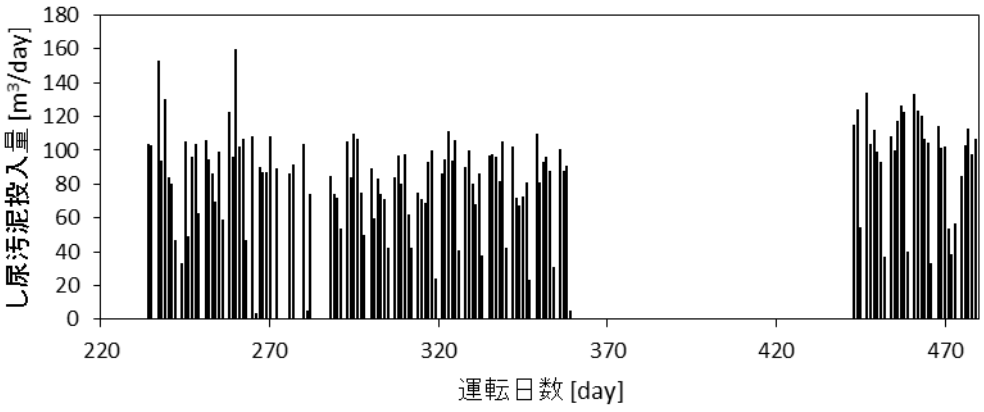
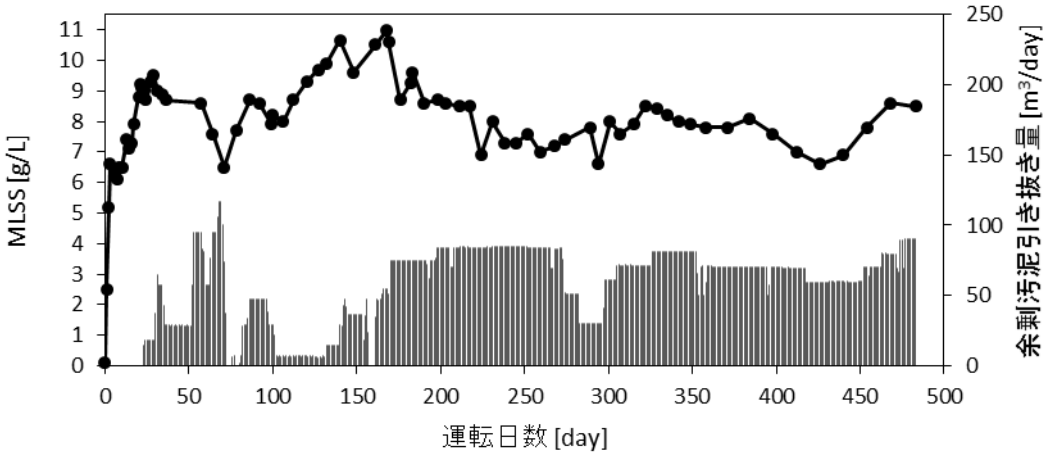


図 3-2　　MBR-B へのし尿汚泥投入量（224 日目から 233 日目にかけてはデータ測定なし）

（A）MBR-A



（B）MBR-B

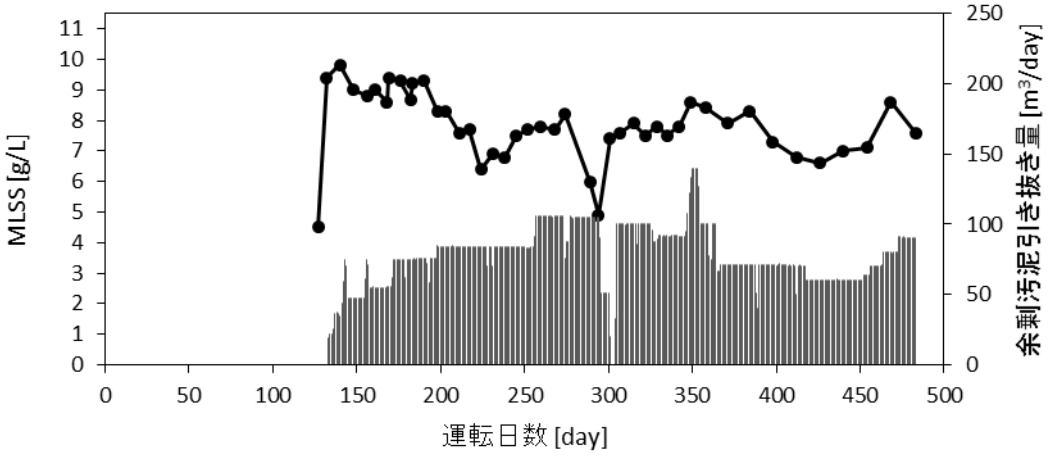


図 3-3　両 MBR の MLSS 濃度（折れ線グラフ）と汚泥引き抜き量（棒グラフ）の挙動

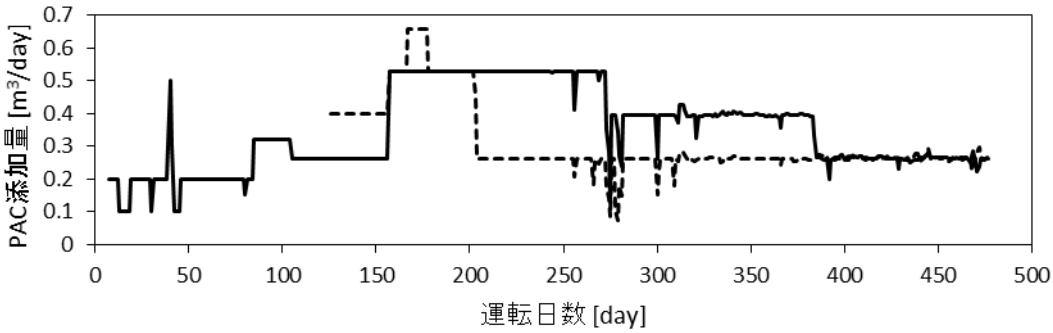


図 3-4　MBR-A（実線）および MBR-B（破線）への PAC 添加量（192 日目までのデータは計画量、193 日目以降のデータは流量計に基づく実測値である）

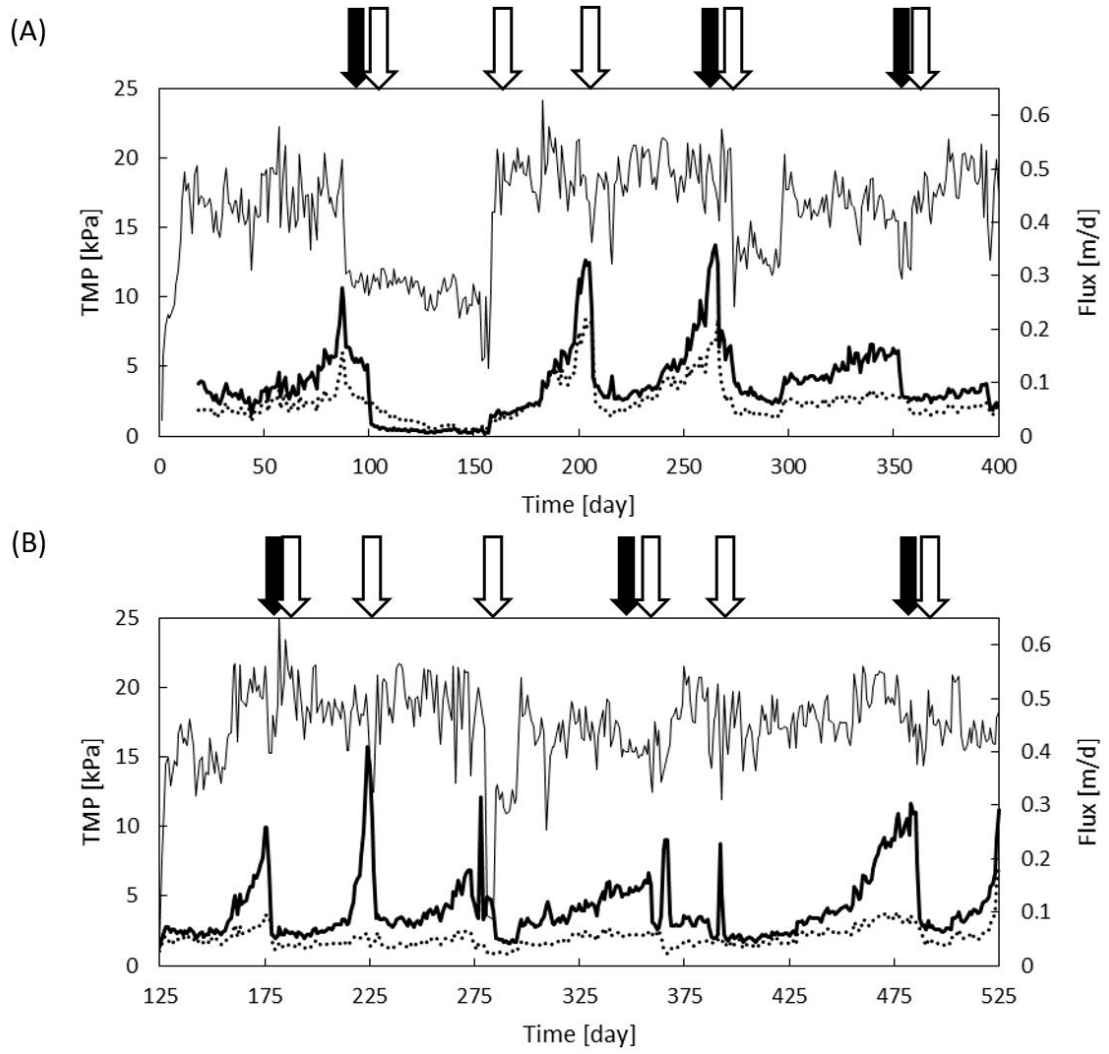


図 3-5　MBR-A（A）および MBR-B（B）におけるろ過流束と日平均 TMP の挙動（ろ過流束は細い実線、膜ユニット Nos. 1-36 の TMP を実線、Nos. 37-72 の TMP を点線で示した。黒矢印および白矢印はそれぞれ、サンプリング日および膜洗浄日を示す）

表 3-1　膜の薬品洗浄の詳細な日程

対象 MBR	対象膜ユニット	膜洗浄実施日[日目]
MBR-A	Nos. 1-36	99、153、205、265、352
	Nos. 37-72	156、206、266、356
MBR-B	Nos. 1-36	177、227、274、359-360[a]、387-388[a]、486
	Nos. 37-72	178、230、275、364-365[a]、489

[a] 初日に次亜塩素酸を用いた洗浄を行い、翌日にクエン酸を用いた洗浄を行った。この符号がついていない日は、次亜塩素酸のみで洗浄を行った

3.2.2 試料の採取

本研究で解析に使用した膜付着物試料および活性汚泥試料の採取日と各試料の略号を表 3-2 に示す。いずれの採取日も、膜の薬品洗浄の計画日の直前にあたり、付着からある程度時間が経過した膜付着物になっていることが期待された。膜付着物試料は、No. 2（上流）、No. 32（中流）、No. 72（下流）の三つの膜ユニットの上段膜ケースに収納されていた膜カートリッジから、第 2 章と同様の方法で採取した。また、活性汚泥試料は、膜分離槽中流部（No. 36 と No. 37 の中間）から採取した。

表 3-2　膜付着物試料および活性汚泥試料の一覧

			試料略号			
			膜付着物			活性汚泥
MBR	採取日	日数 [a]	(No.2)	(No.32)	(No.72)	
MBR-A	2016 年 6 月 27 日	97	A-MU-1	A-MM-1		A-AS-11
MBR-A	2016 年 6 月 28 日	98			A-MD-1	A-AS-12
MBR-A	2016 年 12 月 6 日	259	A-MU-2	A-MM-2	A-MD-2	A-AS-2
MBR-A	2017 年 3 月 8 日	351	A-MU-3	A-MM-3	A-MD-3	A-AS-3
MBR-B	2016 年 9 月 13 日	175	B-MU-1	B-MM-1	B-MD-1	B-AS-1
MBR-B	2017 年 3 月 8 日	351	B-MU-2	B-MM-2	B-MD-2	B-AS-2
MBR-B	2017 年 7 月 12 日	477	B-MU-3	B-MM-3	B-MD-3	B-AS-3

[a] MBR-A が運転を開始した 2016 年 3 月 22 日を 0 日目とした日数を表す

3.2.3 ファウリング物質の分析

採取した膜付着物試料は、乾燥重量および強熱減量を測定した。乾燥重量は、試料を白磁皿にとってウォーターバス上で蒸発乾固させ、ほぼ乾燥してから 105-110°C の乾燥機に入れて約 2 時間加熱したものを、デシケーターで放冷し、秤量して求めた。強熱減量は、この残留物を電気炉に入れて 600±25°C で 30-40 分間強熱し、デシケーターで放冷してから秤量して求めた。

また、膜付着物試料および活性汚泥試料の化学組成分析も実施した。無機元素では、第 2 章と同様に、Ca、Fe、Al、Mn、および Si の含有量を、JIS K0102 に基づき、誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICPE-9000、島津）を用いて測定した。有機成分については、第 2 章と同じく Frølund ら（1996）の手法を用いて EPS 糖類を測定した。

3.2.4 DNA の抽出と微生物群集解析

第 2 章の手法に準拠して、膜付着物試料および活性汚泥試料から DNA を抽出した。抽出した DNA 試料は、16S rRNA 遺伝子を標的とした T-RFLP 法およびメタゲノム解析に供した。T-RFLP 法は、第 2 章に述べた方法で実施した。

メタゲノム解析は株式会社生物技研に委託し、以下のプロトコルに従い、16S rRNA 遺伝子の V1-V2 領域を標的とした Illumina MiSeq シーケンシングを実施した。まず、抽出した DNA を two-step tailed PCR に供して、ライブラリーを作成した。PCR に用いた混合液およびプライマーの配列をそれぞれ表 3-3 および表 3-4 に示す。1 回目の PCR に用いたプライマーは、16S rRNA 遺伝子の可変領域である V1-V2 領域を標的としたもの（Kim *et al*., 2013）、2 回目の PCR のためのオーバーハング配列を付与したものであった。2 回目の PCR に用いたプライマーには、試料を識別するための配列（Index 1 および Index 2）をそれぞれ付与した（表 3-5）。1 回目の PCR の反応条件は、熱変性 94°C（2 min）に続けて、熱変性 94°C（30 sec）、アニーリング 55°C（30 sec）、伸長 72°C（30 sec）を 1 サイクルとして 25 サイクル、最後に伸長 72°C（5 min）を行うプログラムとした。また、2 回目の PCR の反応条件は、熱変性 94°C（2 min）に続けて、熱変性 94°C（30 sec）、アニーリング 60°C（30 sec）、伸長 72°C（30 sec）を 1 サイクルとして 10 サイクル、最後に伸長 72°C（5 min）を行うプログラムとした。PCR に供する DNA 濃度の定量は Synergy H1（Bio Tek）および QuantiFluor dsDNA System（Promega）を用いて行った。

得られたライブラリーは、Illumina MiSeq を用いた 2×300 bp のシーケンシングに供した。シーケンシングデータは、ソフトウェア QIIME（v1.9.1）（Caporaso *et al*., 2010）を用いて以下の処理を実施した。シーケンシングで得られた生データ（Fastq ファイル）から、配列の読み始めが使用プライマーと完全に一致する配列のみを抽出し、プライマー配列の削除、100 塩基以下の長さとなった配列の削除、ペアエンド配列のマージ、キメラチェックを実施し、以降の解析に使用する配列を抽出した。有効な配列のうち、97%の相同性を有するものを同一の OTU（operational taxonomic unit）として分類し、各 OTU の代表配列を基に Greengenes データベース（http://greeengenes.secondgenome.com）を照合し、生物分類を推定した。さらに主要な OTU については、BLAST 検索（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）を実施して 16S rRNA データベースと照合し、推定された生物分類の確認を行った。

表 3-3　PCR に供した混合液の組成（反応系 10 μL）

	初期濃度	液量 [μL]	終濃度
TaKaRa ExTaq（TaKaRa）	5 U/μL	0.1	0.05 U/μL
10×ExTaq Buffer（TaKaRa）		1.0	
dNTP Mixture	各 2.5 mM	0.8	各 0.2 mM
フォワードプライマー	10 μM	0.5	0.5 μM
リバースプライマー	10 μM	0.5	0.5 μM
DNA テンプレート	1 回目: 0.5 ng/μL	2.0	1 回目: 0.1 ng/μL
	2 回目: 5 ng/μL		2 回目: 1 ng/μL
滅菌水		5.1	

表 3-4　メタゲノム解析の two-step tailed PCR に用いたプライマーの配列

回数	プライマー	配列（5'→3'）[a]
1 回目	フォワード[b]	**ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG C**TC TTC CGA TCT- AGR GTT TGA TYM TGG CTC AG
1 回目	リバース	**GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT G**CT CTT CCG ATC T- TGC TGC CTC CCG TAG GAG T
2 回目	フォワード[c]	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC AC- Index 2- **ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG C**
2 回目	リバース[c]	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT- Index 1- **GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT G**

[a] オーバーハング配列は太字体で示した

[b] 4 種類の塩基を表すアルファベット以外は縮重塩基を示す。ここで、R は「A か G」、Y は「T か C」、M は「A か C」を意味する

[c] Index 1 および Index 2 は、DNA テンプレートを識別するために付与された配列を意味する

表 3-5　試料を識別するために用いた配列

試料名	Index 1	Index 2	試料名	Index 1	Index 2
A-MU-1	AGG AGT CC	AAG GCT AT	B-MU-1	GCT CAG GA	TTC TAG CT
A-MM-1	AGG AGT CC	GAG CCT TA	B-MM-1	GCT CAG GA	CCT AGA GT
A-MD-1	AGG AGT CC	TTA TGC GA	B-MD-1	GCT CAG GA	GCG TAA GA
A-AS-11	AGG AGT CC	CTA TTA AG	B-AS-1	GCT CAG GA	TCG ACT AG
A-MU-2	CAT GCC TA	TTC TAG CT	B-MU-2	GCT CAG GA	AAG GCT AT
A-MM-2	CAT GCC TA	CCT AGA GT	B-MM-2	TCC TCT AC	CTA TTA AG
A-MD-2	CAT GCC TA	GCG TAA GA	B-MD-2	GCT CAG GA	TTA TGC GA
A-AS-2	CAT GCC TA	TCG ACT AG	B-AS-2	GCT CAG GA	CTA TTA AG
A-MU-3	CAT GCC TA	AAG GCT AT	B-MU-3	TCC TCT AC	AAG GCT AT
A-MM-3	CAT GCC TA	GAG CCT TA	B-MM-3	AGG AGT CC	CCT AGA GT
A-MD-3	CAT GCC TA	TTA TGC GA	B-MD-3	AGG AGT CC	GCG TAA GA
A-AS-3	CAT GCC TA	CTA TTA AG	B-AS-3	AGG AGT CC	TCG ACT AG

3.2.5 統計解析

メタゲノム解析により得られた微生物群集に対しては、試料のα多様性およびβ多様性を調べるための統計解析を行った。このうちα多様性については、Shannon 多様性指数（*H'*）および Chao 指数（*Chao* 1）をそれぞれ下式 3-2 および 3-3 から算出した。

$$H' = -\sum_{i=1}^{S_{obs}} P_i \times \ln P_i \quad \cdots (3\text{-}2)$$

$$Chao\,1 = S_{obs} + \frac{{F_1}^2}{2F_2} \quad \cdots (3\text{-}3)$$

ここで、S_{obs} はある試料において観測された OTU の数であり、P_i（i =1, 2, …, S_{obs}）は各 OTU の優占度である。優占度とは、ある試料に出現した各 OTU の出現回数（リード数）をその試料における全リード数総計で除した値である。また F_i（i =1, 2, …）は、ある試料においてリード数が i 回であった OTU の数をいい、F_1 や F_2 は希少な OTU の数を表す指標となる。

また、β多様性を調べるためには、第 2 章でも用いた PAST ソフトウェア（v. 1.3.4）を使い、クラスター解析および主座標分析（principal coordinate analysis, PCoA）を行った。クラスター解析には、類似度の指標として下式 3-4 によって算出される Bray-Curtis 指数 D_{BC} を用いた。

$$D_{BC}(\boldsymbol{x_1}, \boldsymbol{x_2}) = \frac{\sum_{j=1}^{N} |w_{1j} - w_{2j}|}{\sum_{j=1}^{N} (w_{1j} + w_{2j})} \quad \cdots (3\text{-}4)$$

ここで、$\boldsymbol{x_1}$ と $\boldsymbol{x_2}$ はベクトル $\boldsymbol{x_1}$ = (w_{11}, w_{12}, …, w_{1N})、$\boldsymbol{x_2}$ = (w_{21}, w_{22}, …, w_{2N}) であり、その要素は 2 つの試料において出現した N 個の各 OTU の優占度 P_i である。第 2 章における T-RFLP 解析によって得られた結果の統計解析では、別の類似度の指標であるユークリッド距離 D_E に基づいたクラスター解析を行っていたが、この算出方法は変数の数が少ない場合に簡易的に採用されるものである。これに対して、本章で実施したメタゲノム解析の結果には多くの OTU が出現していたため、Bray-Curtis 指数を類似度とした非加重結合法によって系統樹の作成を行った（Legendre and Legendre, 2012）。またこれに伴って、Bray-Curtis 指数を用いた低次元化のために、PCA に代えて PCoA を行った。PCA では常にユークリッド距離に基づく低次元化を行うが、PCoA ではこれ以外の指標を用いた低次元化が可能である。PAST による PCoA では分析の前に類似度を累乗するが（この時の指数 c は transformation exponent と呼ばれる）、本研究ではデフォルト値の c = 2 に設定した。

T-RFLP 解析の結果を基にした統計解析は、第 2 章に述べた手法と同様に行った。

3.3 結果

3.3.1 リアクターの運転状況

調査期間中の膜分離槽中流部における MLSS 濃度の変動を図 3-3 に示す。各 MBR における MLSS 濃度は、汚泥引き抜き状況に依存して変動したが、処理場における運転条件の検討が終了し安定した引き抜き量が維持されるようになった約 200 日目頃以降には、両 MBR とも 6-8 g/L で比較的安定した。ただし、システムのトラブルにより流入水の供給が停止していた 294 日目の MBR-B では、一時的な MLSS 濃度の低下が確認された。ろ過流束は、いずれの MBR でもおおむね 0.5 m/day で維持されたが、下流部の洗浄ライン用のポンプが故障し膜の薬品洗浄が実施できなかった 87 日目から 156 日目、および年末年始をまたいだ 273-296 日目には、TMP の上昇を抑えるために低ろ過流速で運転された（図 3-5）。調査期間中における MBR 槽内の水温は、15-30°C の範囲で変動した。

また、薬液洗浄実施日（表 3-1）とろ過流束に変化があった日（87 日目および 273 日目）の前後 1 日を除いた日平均 TMP 変化量の変動を図 3-6 に示す。TMP の増加は単調ではなくノイズを含む傾向にあったため、変化量は負の値を示すこともあった。薬液膜洗浄により TMP が減少した直後の変化量を見ると、MBR-A では上・下流の両膜ユニットそれぞれで±0.4 kPa/day、±0.1 kPa/day、MBR-B では上・下流ともに±0.3 kPa/day 程度の範囲で変動していた。MBR-A においては基本的に上・下流の両膜ユニットとも、薬液洗浄からの時間経過に伴い変化量が大きな正の値を示すようになる傾向にあった。膜付着物試料の採取を行った 97-98 日目の時点ではろ過流束が低下していたため変化量は負の値をとっていたが、ろ過流速が変更される直前の 84 日目には、上流・下流それぞれで+1.3 kPa/day、+0.7 kPa/day と顕著に大きな変化量となっていた。259 日目も、上流・下流それぞれで+1.0 kPa/day、+0.5 kPa となっており、変化量が大きな正の値を示すようになりつつあった。351 日目は、直近の膜洗浄から 3 カ月程度が経過していたが、変化量の変動範囲は洗浄直後と大きくは変わらなかった。一方、MBR-B においては、上流側では時間の経過に伴う TMP 変化量の急激な増加が観察されたが、下流側では全調査期間を通して顕著な増加が認められなかった。膜付着物を採取した 175 日目、477 日目の時点で、上流膜ユニットではそれぞれ+0.8 kPa/day、+0.5 kPa/day の変化量を記録していた。ただし、上流側においても 359-360 日目および 387-388 日目の薬液洗浄時は明確な変化は認められなかった。

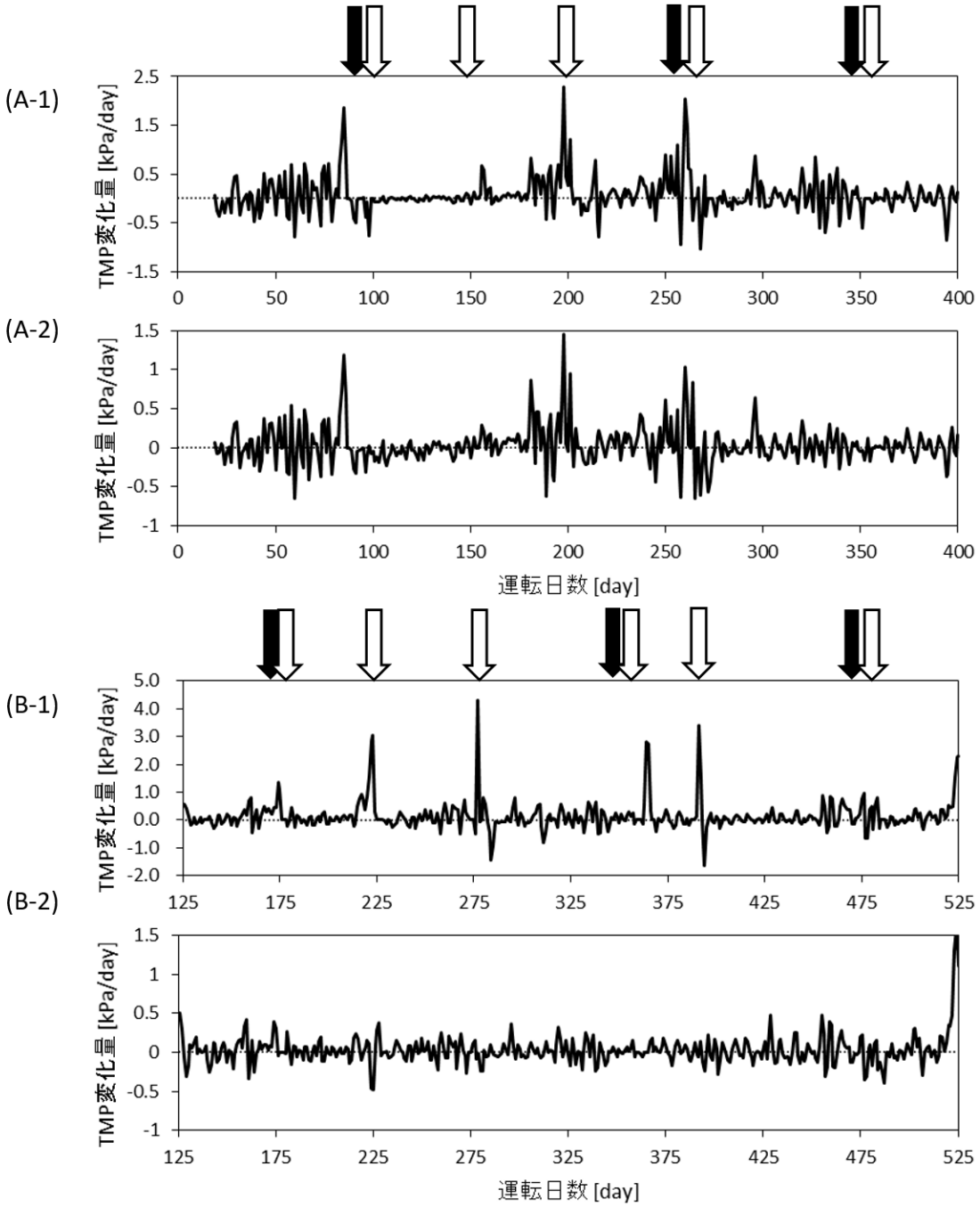


図 3-6　MBR-A の上流側・下流側膜ユニット（A-1、A-2）および MBR-B の上流側・下流側膜ユニット（B-1、B-2）における日平均 TMP の変化量（黒矢印および白矢印はそれぞれ、サンプリング日および膜洗浄日を示す）

3.3.2 流入水質および処理成績

最初沈殿池越流水の水質を図 3-7 に示す。BOD、COD、T-N、および T-P の濃度はそれぞれ 74±15 mg/L、54±6 mg/L、27±5 mg/L、2.7±0.4 mg/L で変動していた。また、MBR-B に投入されたし尿汚泥の BOD および COD 濃度は、それぞれ 3.0±0.2 g/L、2.2±0.4 g/L であった。MBR の処理水量（約 8,000 m^3/day）とし尿汚泥の投入量（約 70 m^3/日）から、し尿投入期間における MBR-B の BOD-SS 負荷は他の時期より 1.4 倍程度高くなっていたと推測された。

各 MBR における処理水の水質を図 3-8～3-10 に示す。BOD 濃度は、MBR-A、MBR-B において、それぞれ 0-3.2 mg/L、0-3.5 mg/L の範囲で変動し、2 つの MBR で顕著な差は見られなかった（図 3-8）。除去率換算では、MBR-A、MBR-B それぞれ 96-100%、97-100%で変動しており、きわめて良好な処理成績を示した。COD および T-N の濃度は、MBR-B の立ち上げ日である 125 日目と 224 日目から 238 日目までを除くと、両 MBR で類似した挙動を示した（COD 濃度 4.1-7.5 mg/L、T-N 濃度 3.0-11 mg/L）（図 3-8、3-9）。BOD と同様にして算出した除去率換算では MBR-A で 85-92%、MBR-B で 82-91%となっており、COD 除去の観点からも良好な処理成績が確認できた。224 日目は MBR-B へのし尿汚泥投入が開始された日であることから（図 3-2）、224 日目以降の一時的な COD、T-N 濃度の上昇は、その負荷上昇を反映した結果であると考えられた。また、T-P 濃度は、立ち上げ 1 週間後に MBR-A、MBR-B でそれぞれ 4.6 mg/L、2.0 mg/L まで上昇したが、その後はいずれの MBR でも次第に低下し、1 mg/L 付近で安定した。

また、表 3-6 に示しているように、分析した無機元素の中では、Ca、Si、Fe、Al、Mn の順で流入水中に多く含まれていた。97 日目の MBR-A 処理水の調査から、MBR では Ca と Si は除去されなかったが、Fe、Al、Mn は顕著に除去されることが明らかになった。

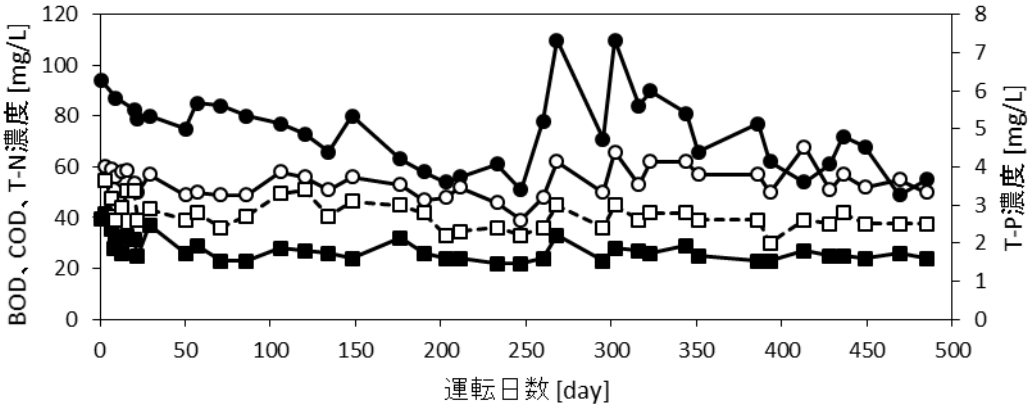


図 3-7 調査対象とした MBR 流入水の各種水質項目変動（黒丸は BOD、白丸は COD、黒四角は T-N、白四角は T-P 濃度をそれぞれ示す）

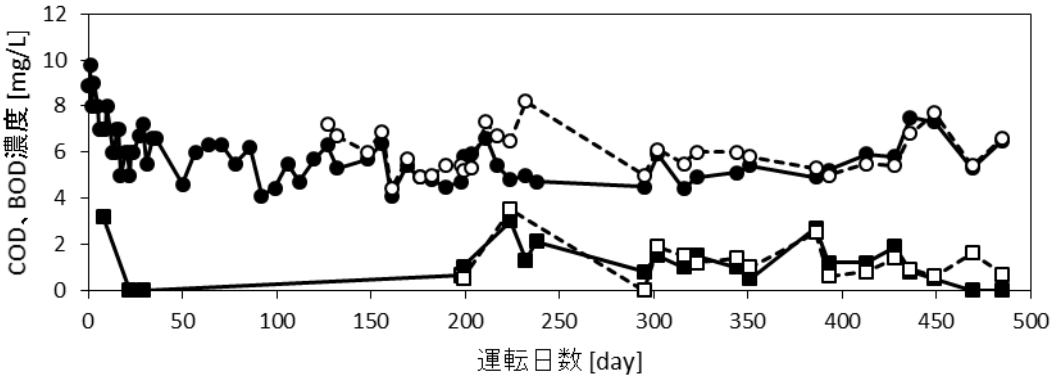


図 3-8　MBR-A（実線）および MBR-B（破線）の処理水中に含まれる COD（丸印）および BOD 濃度（四角印）の変化

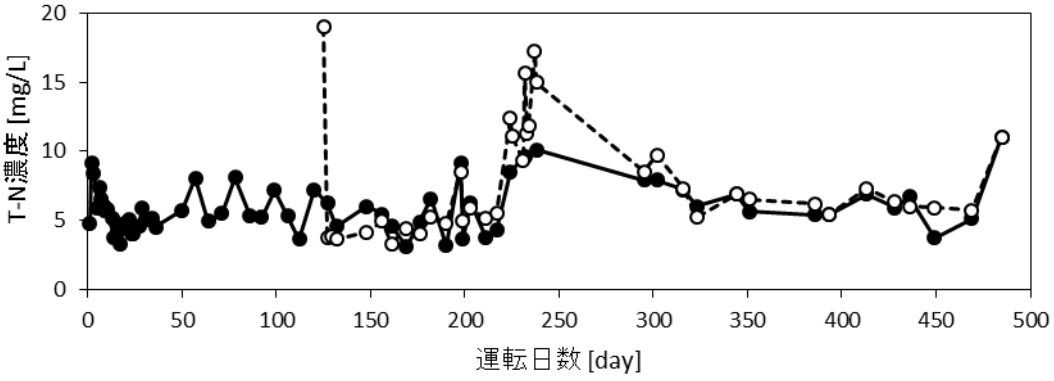


図 3-9　MBR-A（実線）および MBR-B（破線）の処理水中に含まれる T-N 濃度の変化

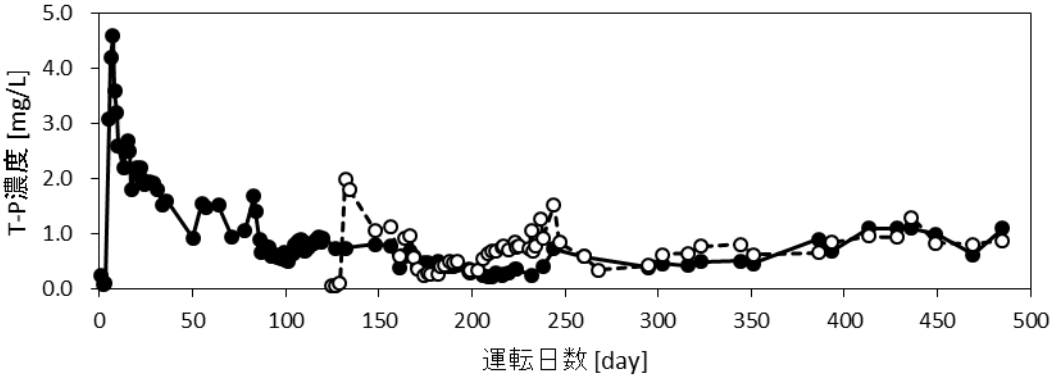


図 3-10　MBR-A（実線）および MBR-B（破線）の処理水中に含まれる T-P 濃度の変化

表 3-6　流入水および処理水に含まれていた金属元素濃度 [mg/L]

	Ca	Si	Fe	Al	Mn
流入水					
97 日目	20.5	4.39	0.35	0.24	0.093
259 日目	25.0	5.20	0.28	0.19	0.090
351 日目	22.9	5.71	0.29	0.28	0.084
処理水					
97 日目	22.9	4.64	0.02	0.01	0.011

3.3.3　ファウリング物質

膜付着物試料の乾燥重量を図 3-11 に示す。同日の膜付着物試料を比較すると、MBR-B では、一貫して上流から下流にかけて膜付着物の重量が減少する傾向が見られた。一方、MBR-A では、MBR-B と同様の傾向は見られず、上流から下流にかけて増加する（2 回目の調査）あるいは中流で最大となった（1、3 回目の調査）。また、膜付着物の絶対量は、MBR-A の 2 回目の調査において、全ての試料で 10 g-dry/m^2 を超え、他の試料に比べて顕著に膜付着物量が多かった。一方、MBR-B の 2 回目の調査時の中・下流の膜付着物量は 1 g-dry/m^2 を下回っており、これらの膜で生じていたファウリングは、比較的軽微であったと考えられた。また、膜付着物の乾燥重量に対する可燃成分の割合は、全膜付着物試料で 70.5-83.4%であり、同じ調査日の活性汚泥試料（70.9-79.9%）とおおむね同程度であった。

また、無機元素について調査した結果、活性汚泥試料には Al が最も多く含まれ（15-58 mg/g-dry）、Si はほとんど検出されなかった（0-1.2 mg/g-dry）（図 3-12）。流入水で Ca よりも濃度が低かった Al（表 3-6）の含有量が高かったのは、PAC の添加（図 3-3）によるものと考えられた。膜付着物試料におけるこれら無機元素の組成は、多くの調査時の採取試料では同日の活性汚泥試料と類似の傾向を示したが、351 日目の調査（MBR-A の 3 回目、MBR-B の 2 回目の調査）には、活性汚泥試料に比べて Al や Fe が少なく、Mn が多くなっていた。

EPS 糖類の含有量を図 3-13 に示す。膜付着物試料に含まれる乾燥重量あたりの EPS 糖類の総量は、8 mg/g-dry を下回った B-MU-3 および B-MM-3 を除き、活性汚泥試料（2.6-7.5 mg/g-dry）よりも顕著に多く（21-56 mg/g-dry）、特に LB-EPS 糖類が多く含まれた。また、活性汚泥中の SMP 糖類は、MBR-A の立ち上げ期の試料（A-AS-11 および A-AS-12）では検出下限値未満（<2.5 mg/L）であったが、他の試料では 3.3-12.6 mg/L（SS あたりに換算して 0.4-1.6 mg/g-dry）で検出された。これらの結果から、SMP は MBR の運転が安定した後に処理槽内に蓄積するようになっていたものと考えられた。

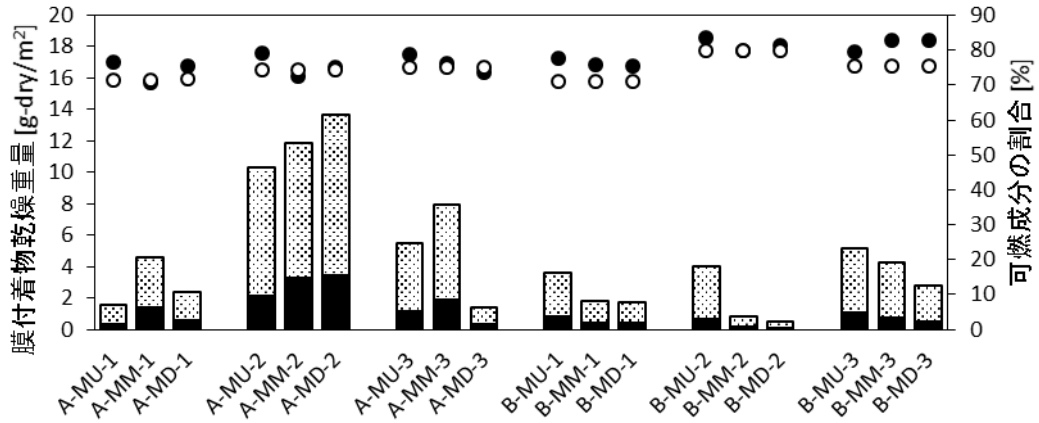


図 3-11　膜付着物試料の乾燥重量全体（棒グラフ）における可燃成分（網掛け）と不燃成分（黒塗り）の内訳（黒点および白点はそれぞれ、膜付着物試料の乾燥重量に対する可燃成分の割合と、同日に採取した活性汚泥試料の可燃成分割合を示す）

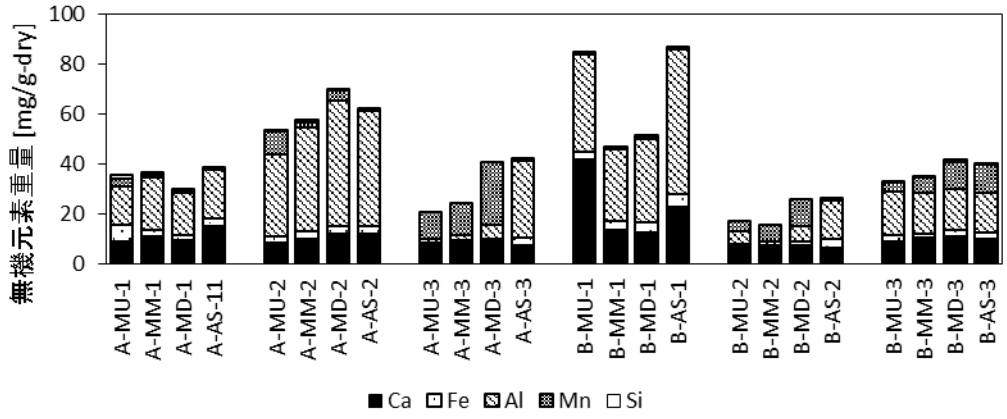
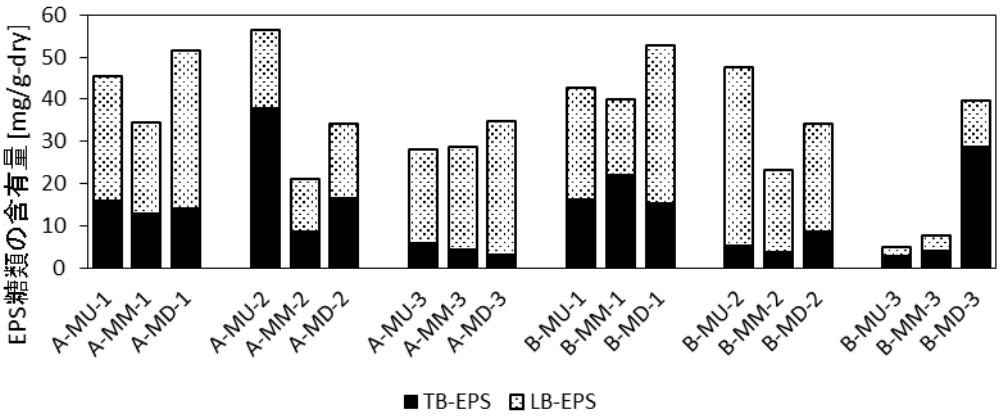


図 3-12　膜付着物試料および活性汚泥試料の単位乾燥重量あたりに含まれる無機元素重量

(A)



(B)

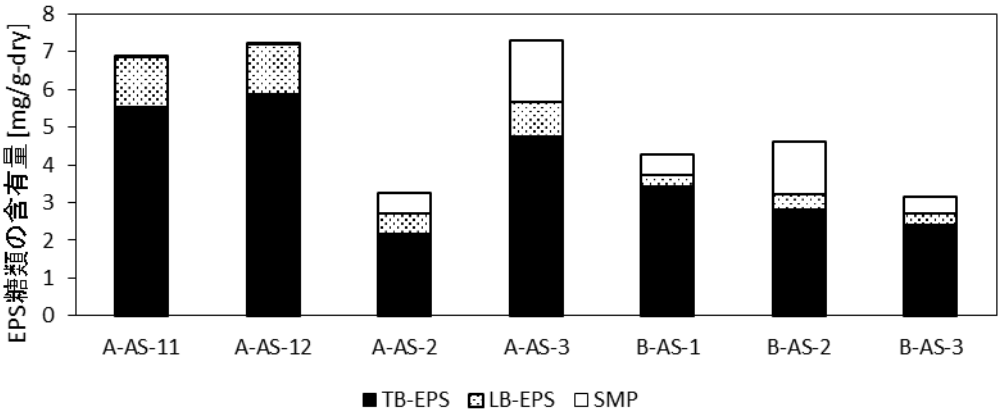


図 3-13　膜付着物試料 (A) および活性汚泥試料 (B) の単位乾燥重量あたりに含まれる EPS 糖類重量

3.3.4 T-RFLP 解析により調査した微生物群集

T-RFLP 解析で得られた T-RF プロファイルを図 3-14 に示す。優占した T-RF（優占度 $P_i \geq 0.01$）の数は、膜付着物試料よりも活性汚泥試料において多い傾向であった。最も普遍的に優占していた T-RF は 663-664 bp であり、A-MM-1 と B-AS-3 を除く全試料において非常に大きく優占（$P_i > 0.1$）し、特に MBR の立ち上げから時間が経過した調査日の膜付着物試料（A-MM-2、A-MD-2、A-MD-3、B-MM-2、B-MD-2、B-MU-3、B-MM-3、および B-MD-3）で極めて大きく優占（$P_i > 0.2$）する傾向を示した。また、370 bp の T-RF も活性汚泥試料と膜付着物試料に共通して優占したが、立ち上げ期に MBR-A から採取した試料（A-MU-1、A-MM-1、A-MD-1、および A-AS-1）では優占度が低くなった（$P_i < 0.05$）。一方で、174 bp の T-RF は、B-AS-2（$P_i = 0.03$）の例外を除き、膜付着物試料において特異的に優占（$P_i > 0.01$）した。

T-RF プロファイルを基にしたクラスター解析および主成分分析の結果を図 3-15 に示す。クラスター解析の結果では、立ち上げ初期の試料（A-AU-1、A-MM-1、A-MD-1、A-AS-11、A-AS-12、B-MU-1、B-MM-1、および B-MD-1）が同じクラスターに分類される一方で、両 MBR の 3 回目の調査時の膜付着物試料が近い距離で全て同じクラスターに含まれていた。これらのことから、MBR の運転に伴って微生物群集構造が変遷していたことが示唆された。また、主成分分析で得られた PC1（寄与率：32.2%）および PC2（寄与率：18.9%）を基に散布図を作成したところ、クラスター解析と同様に、両 MBR の 3 回目の調査時の膜付着物試料が近い位置にプロットされた。また、これらの軸に対する各 T-RF の主成分負荷量を調べた結果、174 bp（PC2 に対して-0.37）、370 bp（PC1 に対して 0.59、PC2 に対して 0.59）、および 663-664 bp（PC1 に対して 0.66、PC2 に対して-0.43）の T-RFs が大きい主成分負荷量を示し、3 回目の調査時の膜付着物試料における微生物群集構造の類似が 370 bp と 663-664 bp の T-RF の優占度に依存することが示唆された。

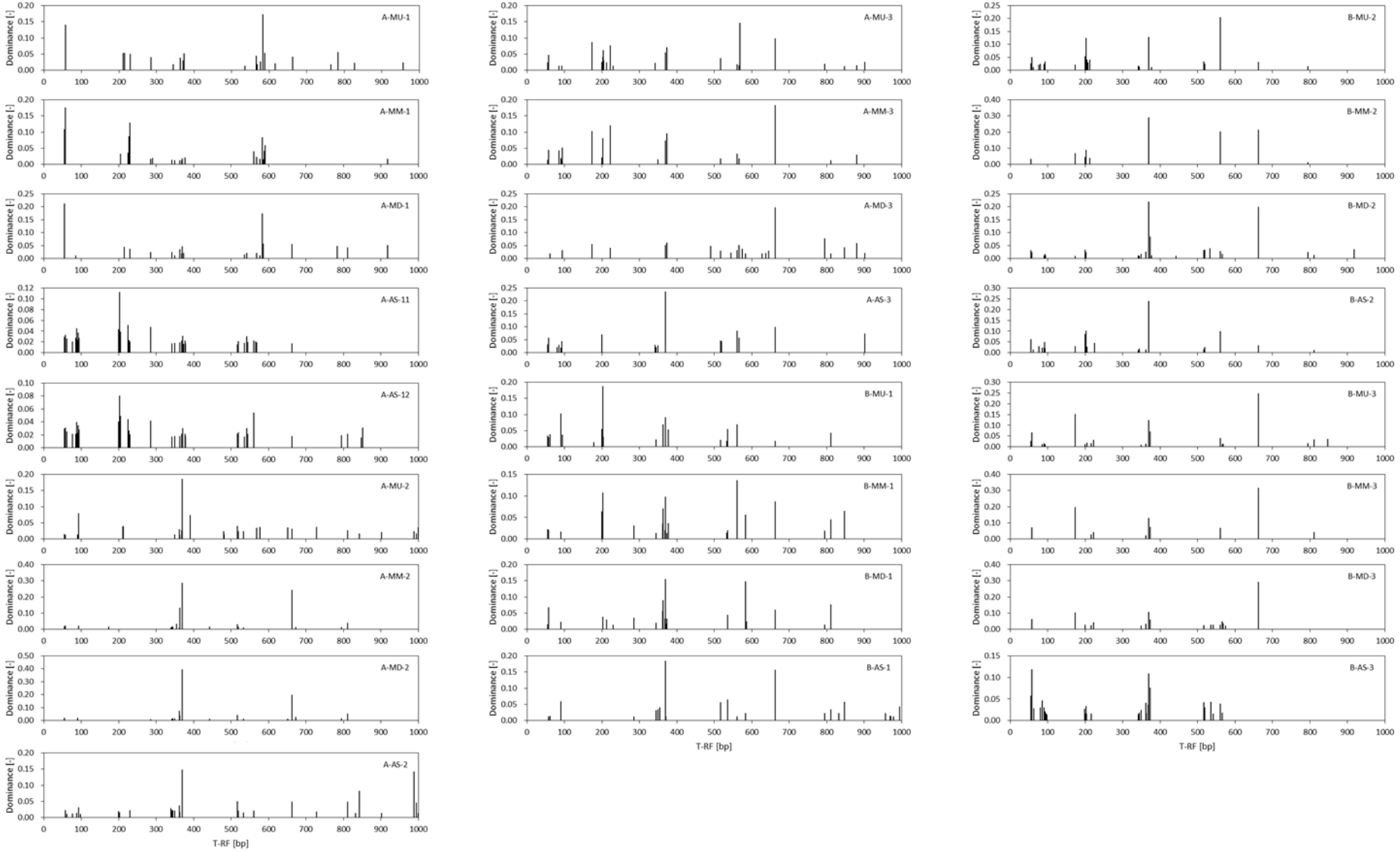


図 3-14　膜付着物および活性汚泥試料の T-RF プロファイル（横軸は T-RF 断片長[bp]、縦軸は優占割合[-]、右上の英数字は試料の種類を表す）

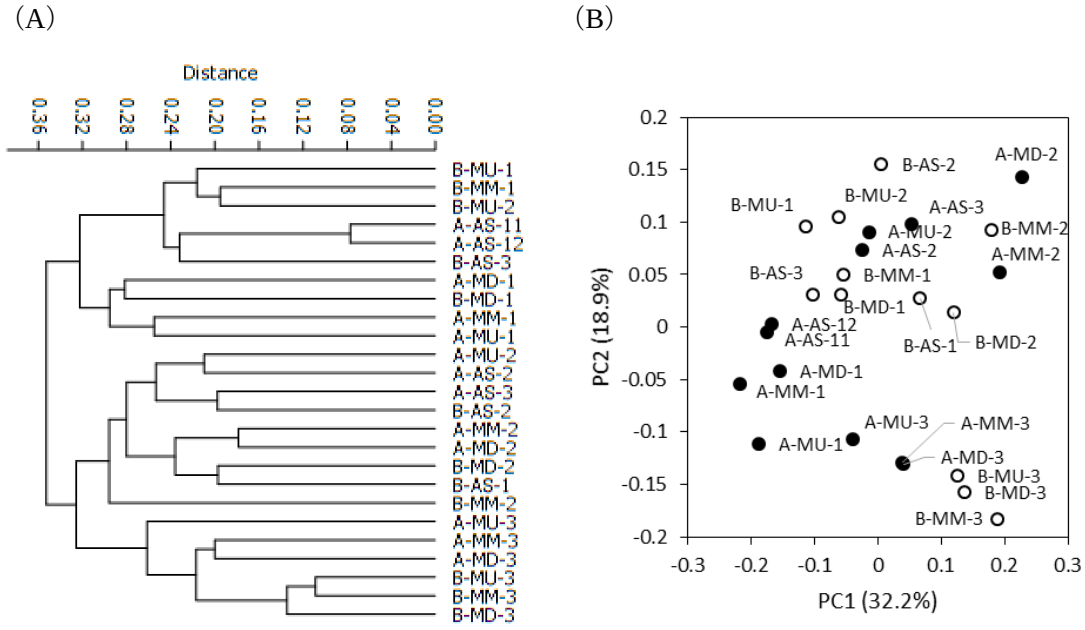


図 3-15　T-RF プロファイルを基に作成した（A）ユークリッド距離を用いたクラスター解析に基づく樹形図、および（B）PCA に基づく散布図

3.3.5　メタゲノム解析により調査した微生物群集

活性汚泥・膜付着物 24 試料のメタゲノム解析の結果、958,422 reads（1 試料あたり平均 39,934 reads）から 16,360 OTUs が得られた。各試料におけるα多様性指数を図 3-16 に示す。Shannon 多様性指数、Chao 指数ともに、膜付着物試料では同日の活性汚泥試料より小さい値を示し、膜付着物中の微生物群集の多様性が活性汚泥微生物群集に比べて小さいことが示唆された。

得られた OTU の中身を門レベルで分類すると、*Proteobacteria*（3,983 OTUs）、*Firmicutes*（2,035 OTUs）、*Bacteroidetes*（1,582 OTUs）、*Actinobacteria*（1,521 OTUs）、*Chloroflexi*（697 OTUs）、*Acidobacteria*（508 OTUs）、*Nitrospirae*（178 OTUs）、*Chlorobi*（86 OTUs）などの門や、TM7（400 OTUs）、TM6（219 OTUs）などの門候補、およびその他の門や門候補（1,168 OTUs）に分けられた（図 3-17）。また、残りの 3,983 OTUs は、いずれの門あるいは門候補にも割り当てられなかった。活性汚泥試料における主要な門は、いずれも *Proteobacteria*、*Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Actinobacteria* であったが、B-AS-1 では *Firmicutes* の優占度（0.23）が他（0.08±0.01）に比べて高く、他の 5 つの活性汚泥試料では *Bacteroidetes* の優占度（0.26±0.06）が B-AS-1（0.06）に比べて高い点が異なった。膜付着物試料では、MBR-A の 3 回目および MBR-B の 2、3 回目の調査時の試料における主要な門の優占度が *Proteobacteria* 0.22±0.07、*Firmicutes* 0.08±0.04、*Bacteroidetes* 0.25±0.09、*Actinobacteria* 0.10±0.03 となっており、B-AS-1 以外の活性汚泥試料の群集とも類似した門構成であった。一方、MBR-A の 1、2 回目および MBR-B の 1 回目の調査時の試料のうち、B-MU-1 は、同日の活性汚泥試料（B-

AS-1）と類似した構成を示したが、残りの試料では、*Firmicutes* が顕著に優占し（$P_i > 0.4$）、対応する調査日の活性汚泥試料とは大きく異なる門構成を示した。

多くの試料において優占度の高かった *Proteobacteria*、*Firmicutes*、および *Bacteroidetes* について、綱レベルの構成を図 3-18 に示す。*Proteobacteria* は、主に *Alphaproteobacteria*（1,097 OTUs）、*Betaproteobacteria*（914 OTUs）、*Gammaproteobacteria*（1,124 OTUs）で構成された。MBR-A の 2 回目の調査の上流膜、3 回目の調査の上・中流膜、および MBR-B の 1 回目の調査の中・下流膜では、膜付着物における綱構成が活性汚泥とは若干異なったが、それ以外では膜付着物と活性汚泥において類似の綱構成を示した。また、*Firmicutes* では *Clostridia*（1,437 OTUs）および *Bacilli*（549 OTUs）がほぼ全てを占めており、多くの試料では *Clostridia* が特に優占したが、MBR-A の 1 回目の調査時の膜付着物試料、および MBR-B の 1 回目の調査時の中・下流の膜付着物試料と活性汚泥試料では *Bacilli* の優占が顕著であった。*Bacteroidetes* は、*Saprospirae*（819 OTUs）、*Flavobacteriia*（297 OTUs）、*Cytophagia*（163 OTUs）、*Sphingobacteriia*（120 OTUs）が主な綱であった。活性汚泥試料では、それぞれの MBR において *Saprospirae* が時間の経過とともに優占度を増す傾向が確認された。また、A-AS-3 では *Sphingobacteriia* の優占度が特に高く（$P_i = 0.10$）、両 MBR の 3 回目の調査時の膜付着物試料では *Flavobacteriia* が顕著に高い優占度を示した（$P_i = 0.08$-0.18）。

さらに、OTU レベルで見たところ、いずれかの試料において優占度 P_i が 0.1 を超える OTU が 9 つ存在した。これらの OTUs と、それぞれのゲノム配列から推定される系統学的分類を表 3-7 に整理した。これらの中で、denovo6066 は MBR-A の 1 回目の調査における全ての膜付着物試料において特に顕著な優占度を示した。また、denovo7912 は、MBR-B の 1 回目の調査における中・下流の膜付着物試料において大きな優占度を示した。これらの OTUs はいずれも *Bacilli* に属し、属レベルでは、前者が *Exiguobacterium* 属、後者が *Carnobacterium* 属に分類されると推定された。また、MBR-A の上流の膜付着物試料（A-MU-1、A-MU-2、および A-MU-3）では、それぞれ denovo5360、denovo5876、denovo12823 が大きく優占した。これらのうち、denovo5360 および denovo5876 は *Nitrospira*、denovo12823 は *Nitrosomonas* と推定され、いずれも硝化に関わる微生物であった。

いずれの試料においても優占度が $P_i < 0.001$ しかなかったマイナーな OTU を除く 734 OTUs の優占度プロファイル（0.1%カットオフ・プロファイル）を基にしたクラスター解析および PCoA の結果を図 3-19 に示す。クラスター解析の結果、A-AS-11 における例外を除く全ての試料が、調査した MBR および調査日ごとに、それぞれ異なるクラスターに分けられた。また、PCoA で得られた PC1（寄与率：25.9%）、PC2（寄与率：14.4%）を基に作成した散布図においても、膜付着試料か活性汚泥試料かによらず、MBR および調査日ごとにプロットが近接する傾向が見られた。クラスター解析と PCoA の結果はともに、MBR-A から 1 回目に採取した膜付着物試料がそのほかの試料とは異なる独特の微生物群集を有していたことを示していた。また、MBR-B から 1 回目に採取した試料は、活性汚泥試料を含め他の試料とは異なっていた。

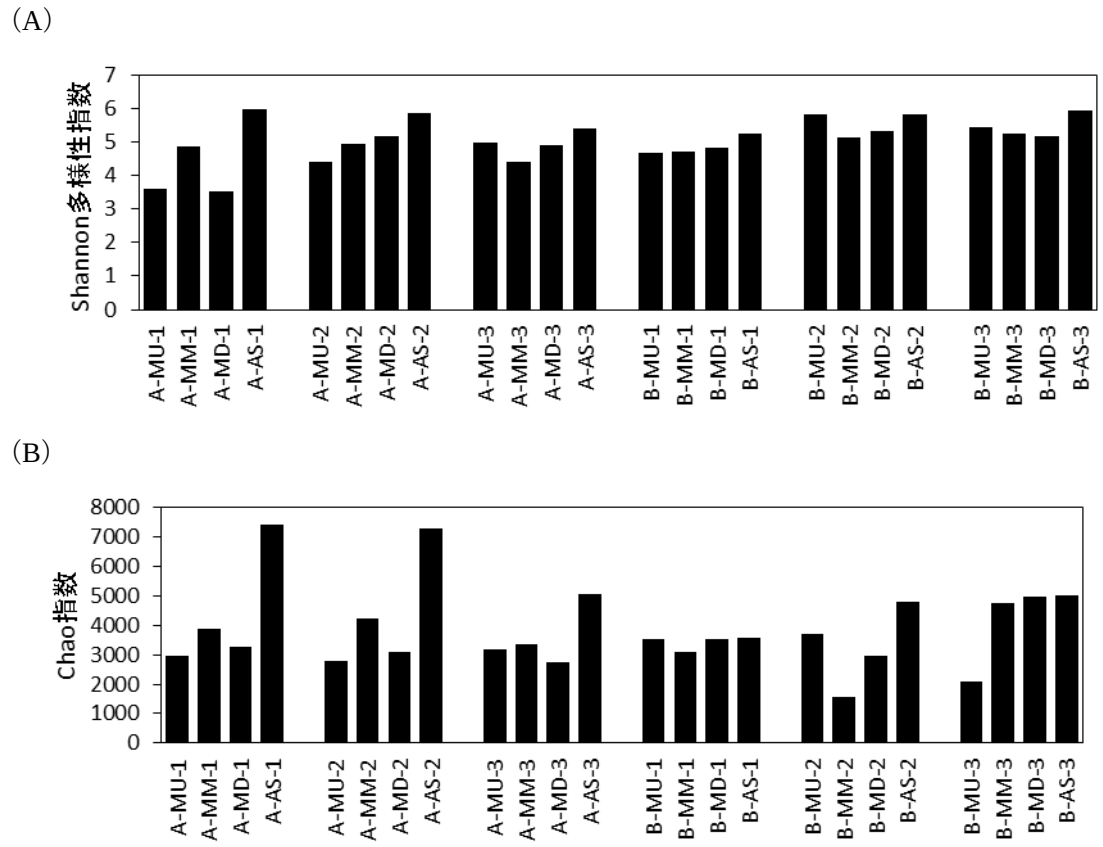


図 3-16　膜付着物試料および活性汚泥試料それぞれに対して計算した（A）Shannon 多様性指数および（B）Chao 指数

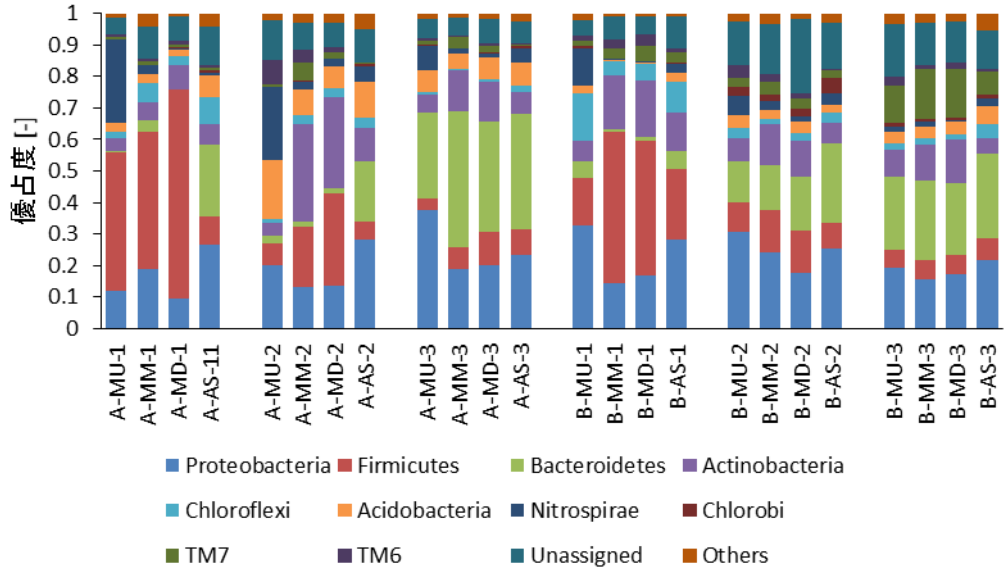


図 3-17　膜付着物試料および活性汚泥試料の門レベルでの微生物群集構造

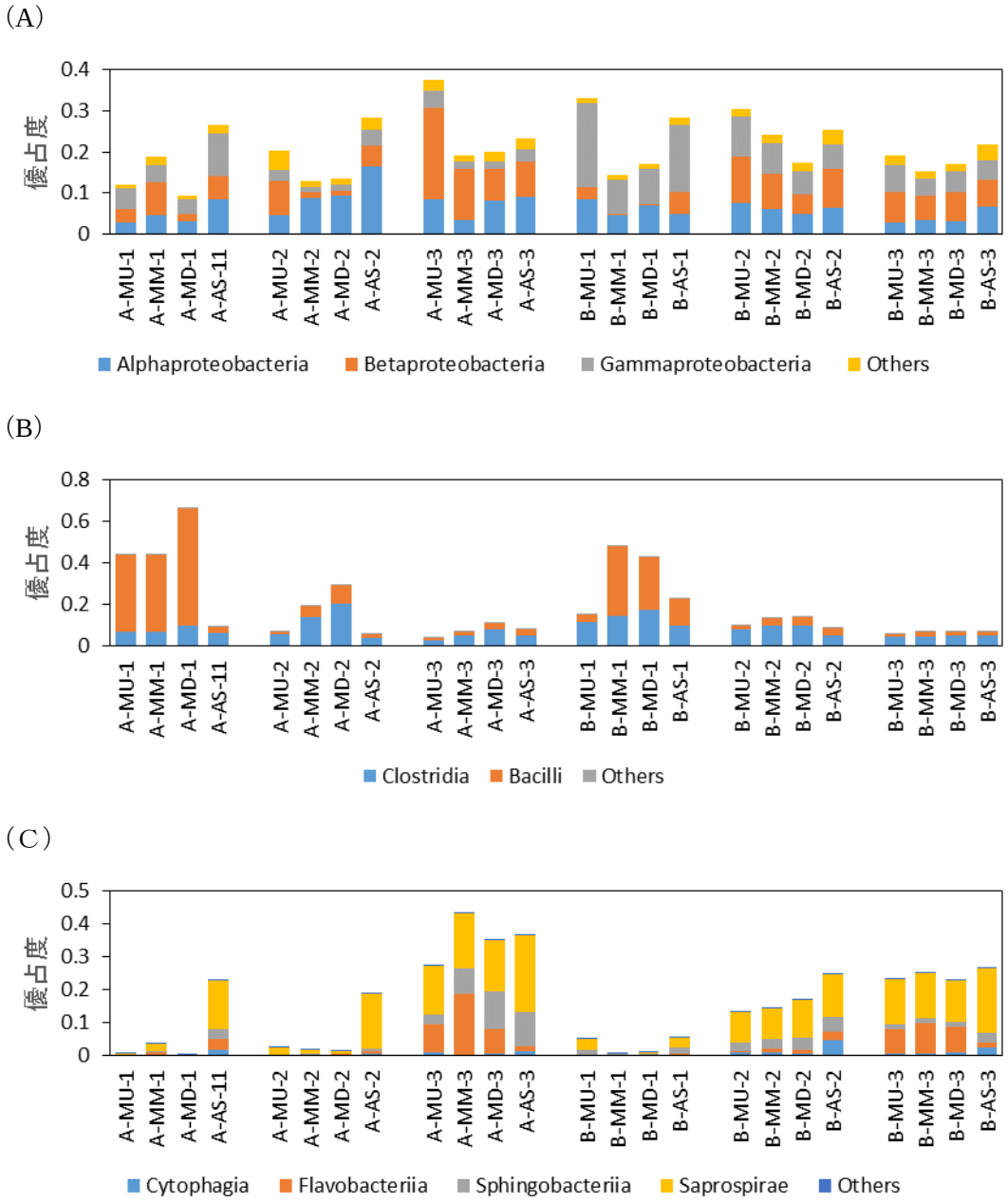


図 3-18　膜付着物試料および活性汚泥試料に含まれていた（A）*Proteobacteria*、（B）*Frimicutes*、および（C）*Bacteroidetes* の綱レベルでの構成

表 3-7　高い優占度で検出された OTU とゲノム配列から推定される系統学的分類

OTU ID	優占した試料 [a]	推定される門	推定される綱	推定される目
denovo383	A-MM-2 (0.12)	*Actinobacteria*	*Actinobacteria*	*Actinomycetales*
denovo1641	B-AS-1 (0.11)	*Proteobacteria*	*Gammaproteobacteria*	*Pseudomonadales*
	B-MU-1 (0.13)			
denovo5360	A-MU-1 (0.24)	*Nitrospirae*	*Nitrospira*	*Nitrospirales*
	B-MU-1 (0.11)			
denovo5876	A-MU-2 (0.13)	*Nitrospirae*	*Nitrospira*	*Nitrospirales*
denovo6066	A-MU-1 (0.23)	*Firmicutes*	*Bacilli*	*Bacillales*
	A-MM-1 (0.25)			
	A-MD-1 (0.40)			
denovo7912	B-MM-1 (0.17)	*Firmicutes*	*Bacilli*	*Lactobacillales*
	B-MD-1 (0.13)			
denovo12823	A-MU-3 (0.12)	*Proteobacteria*	*Betaproteobacteria*	*Nitrosomonadales*
denovo15668	A-MD-3 (0.11)	*Bacteroidetes*	*Sphingobacteriia*	*Sphingobacteriales*
denovo16318	A-MM-3 (0.15)	*Bacteroidetes*	*Flavobacteriia*	*Flavobacteriales*

[a] 括弧内の数字は当該試料における優占度 P_i を示す

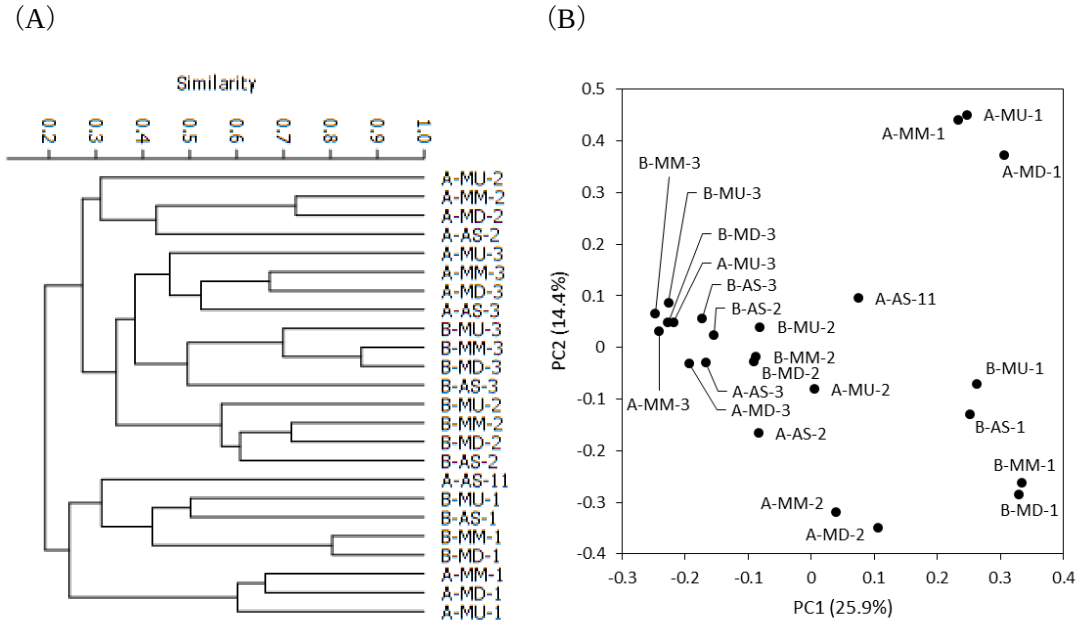


図 3-19　メタゲノム解析で得た OTU の 0.1%カットオフ･プロファイルを基に作成した（A）Bray-Curtis 指数を用いたクラスター解析に基づく樹形図、および（B）Bray-Curtis 指数の 2 乗値を用いた PCoA に基づく散布図

3.4 考察

対象とした処理場では、MLSS 濃度（図 3-3）及び流入水の組成（図 3-7）が変動しており、その結果として BOD-SS 負荷が 0.01-0.05 kg-BOD/kg-MLSS の範囲で変動した。また、MBR-B におけるし尿汚泥の一時的な投入（図 3-2）による BOD-SS 負荷の増大、MBR-A における PAC 投入量の変動（図 3-4）、季節的な水温の変動等により、処理条件は時期によって大きく異なった。しかし、BOD と COD の除去率は立ち上げ段階からそれぞれ 96%以上、82%以上で維持され、調査期間を通して非常に安定した処理成績を示した（図 3-8）。すなわち、MBR では様々な条件下において安定して高い処理成績を発揮することができることが改めて確認された。

また、メタゲノム解析の結果から、活性汚泥の微生物群集も MBR の立ち上げ段階から速やかに環境へ適応し、安定した群集構造を維持するようになることが確認された。特に、門レベルでは、MBR-A においては常に *Proteobacteria* と *Bacteroidetes* が最も優占しており、MBR-B でも 2 回目の調査以降には *Proteobacteria* と *Bacteroidetes* が最も優占した（図 3-17）。他の実規模 MBR の活性汚泥の調査事例においても、*Proteobacteria* と *Bacteroidetes* が代表的な優占種であると報告されている（Jo *et al*., 2016; Matar *et al*., 2017; Choi *et al*., 2017）。すなわち、より細かい分類では優占する分類群の変動はある程度見られるものの、MBR 活性汚泥の微生物群集の門レベルでの構成は、立ち上げ後速やかに安定するものと考えられ、これが安定して高い処理性能につながったものと示唆された。

他方、膜表面に付着する微生物群集の状況は運転の段階によって異なった。外部からの人為的な植種がない限り、膜表面の微生物群集は活性汚泥を唯一の起源とするため、基本的には膜表面の微生物群集は活性汚泥の微生物群集と類似するはずである。実際、本研究において採取した膜表面付着物で検出された微生物群のうち平均 93±3%は同日の活性汚泥で検出された OTU と一致した。本研究の調査期間の後期（MBR-A の 3 回目、MBR-B の 2、3 回目の調査時）には、膜表面付着物の微生物群集と活性汚泥の微生物群集は門レベルの構成が類似しており、これらの調査時に生じたファウリングでは活性汚泥中の微生物群集が膜表面に付着しただけの状態であったものと推察される。一方、調査期間の早期（MBR-A の 1、2 回目と MBR-B の 1 回目（B-MU-1 を除く）の調査）では、膜表面付着の微生物群集の門構成は活性汚泥とは顕著に異なった（図 3-17）。既往研究においても、高い TMP 値を示した MBR の膜付着物の微生物群集の構成は活性汚泥と異なる場合（Miura *et al*., 2007; Huang *et al*., 2008; Lin *et al*., 2011; Gao *et al*. 2011; Gao *et al*., 2013; Ma *et al*., 2013; Luo *et al*., 2017; Choi *et al*., 2017; Liu *et al*., 2018）と、類似の場合（Park *et al*., 2005; Wu *et al*., 2011; Ziegler *et al*., 2016; Jo *et al*., 2016; Matar *et al*., 2017）の双方が報告されている。しかし、本研究の結果から、運転の段階によって、膜付着物の微生物群集が活性汚泥の微生物群集と異なる場合と類似する場合のあることがあることが初めて明らかとなった。

膜付着物の微生物群集構造が活性汚泥とは顕著に異なった調査期間の早期には、膜表面付着物の形成段階において、なんらかの選択圧が強く働いたものと考えられた。第一の選択

圧として、微生物種ごとに異なる膜面付着特性が挙げられ（Zhang *et al*., 2006a; Lim *et al*., 2012）、実規模 MBR を調査した既往研究においても膜面に付着しやすい微生物種には偏りがあることが指摘されている（Matar *et al*., 2017）。もう一つの可能性として、特に TMP の高い膜での微生物群集の「遷移」が関わっている可能性がある。膜付着物の厚みが増すことによって膜表面の溶存酸素濃度が低下すると、初期に付着した微生物が死滅して膜表面の微生物群集は独特のものになるといわれており（Gao *et al*., 2011）、実規模 MBR の調査においてもこれによるバイオファウリングの発生が確認されている（Choi *et al*., 2017; 本論文第 2 章）。バイオファウリングの対策に関連する既往研究では、ファウリング初期に膜表面に付着する微生物群集を重視するものと（Zhang *et al*., 2006a; Lim *et al*., 2012; Matar *et al*., 2017）、「遷移」後の微生物群集がファウラント生産に主に寄与していると指摘しているもの（Miura *et al*., 2007; Huang *et al*., 2008; Jo *et al*., 2016; Choi *et al*., 2017）の両者がある。

本研究で調査した処理場のバイオファウリング形成に対する上記 2 種類の選択圧の寄与を明確にするため、活性汚泥試料とは異なる門構成の微生物群集が確認された 8 つの膜付着物試料（MBR-A の 1、2 回目と MBR-B の 1 回目の試料（B-MU-1 を除く））に対して、ファウリングの進行度を調べた。ファウリングの進行は TMP の上昇パターンによって以下の 3 つに分けられる。すなわち、ごく初期の数時間における急激な TMP 上昇、長期にわたる線形の TMP 上昇、および「TMP ジャンプ」として知られる急激な dTMP/dt（TMP 変化量）の上昇を経た指数関数的な TMP 上昇である（Cho and Fane, 2002; Zhang *et al*., 2006b; Meng *et al*., 2009）。本研究では日単位での TMP 変化を観察したため、TMP ジャンプの前後という大きく 2 つの段階が観察されると予想された。MBR-A では、1 回目（97-98 日目）、2 回目（259 日目）の調査の直前には上下流の両膜ユニットにおいて TMP 変化量が急激に上昇した（図 3-6）。このことから、これら 2 回の調査時には、上流から下流のすべての膜が TMP ジャンプを経ていたと推測される。したがって、MBR-A の 1、2 回目の調査時の膜試料はファウリングが進行した時点のものであり、その微生物群集は「遷移」による選択圧が生じて形成したものと考えられた。一方、MBR-B では、下流膜ユニットの TMP 変化量が常にほぼゼロであり、TMP 値が大きく上昇することはなかった（図 3-5、図 3-6）。このため、MBR-B の 1 回目の調査で下流膜ユニットから採取した B-MD-1 は、TMP ジャンプを経験する前の試料と考えられた。また、B-MM-1、TMP 値を B-MU-1 と併せてモニタリングしていたため確実な判断はできないが、膜付着物乾燥重量の状況から B-MD-1 に近いファウリングの進行度であったと推測された（図 3-11）。すなわち、MBR-B の 1 回目の調査時の中下流の試料はファウリングの進行度が軽微な試料であり、活性汚泥と異なる微生物群集構造を示した原因として、主に微生物種の膜面付着特性が関与したしたものと考えられた。

微生物種に特有の膜面付着特性が選択圧として推測された MBR-B の 1 回目の調査時の中下流の試料では、*Carnobacterium* 属と推定される denovo7912 の OTU の優占が特徴的であった（表 3-7）。既往研究では、膜と微生物細胞の物理的な親和性の高さなどが初期に付着する微生物の特徴として指摘されており（Zhang *et al*., 2006a; Gutman *et al*., 2013）、確証を得るに

は純菌を用いた検討が必要であるものの、*Carnobacterium* 属は本研究で対象とした処理場で採用されている膜との物理的な親和性に優れた微生物と考えられた。さらに、*Carnobacterium* 属はバクテリオシンを生産することがよく知られていることから（Meltivier *et al*., 1998; Hammi *et al*., 2016）、*Carnobacterium* 属は膜に速やかに付着した後、抗菌活性物質の生産によって他の微生物を膜表面から排除し、優占化した可能性が考えられた。他方、「遷移」が選択圧であると推測された MBR-A の 1 回目の調査時には、すべての膜付着物試料において、*Exiguobacterium* 属と推定される denovo6066 が大きく優占した（表 3-7）。*Exiguobacterium* 属にはタンパク質分解酵素であるプロテアーゼ（Rajesh-Banu *et al*., 2017）や高分子多糖を分解するキサンチンオキシダーゼ（Nagaraj *et al*., 2017）を分泌するものが含まれている。すなわち、膜表面付着物の微生物群集が遷移した後には、*Exiguobacterium* 属のように、蓄積した膜付着物を分解し増殖することができる微生物が優占化する可能性がある。また、MBR-A の 2 回目の調査時の試料のうち、A-MM-2 と A-MD-2 では、特定の OTU の顕著な優占は見られなかったが、*Firmicutes*（とりわけ *Clostridia*）が顕著に優占した（図 3-17、図 3-18）。A-MU-2 を除けば、活性汚泥とは異なる微生物群集構造を示す膜付着物試料では、門レベルでの活性汚泥と膜付着物の相違点として *Firmicutes* の優占が共通している。すなわち、膜表面に活性汚泥とは異なる構成の微生物群集が形成する場合、*Firmicutes* が初期付着段階から遷移後に至るまで一貫して重要な役割を担っていたものと理解できる。本研究で優占が確認された *Carnobacterium* 属と *Exiguobacterium* 属はいずれも通性嫌気性の微生物であることが知られており（Collins *et al*., 1983; Meisel *et al*., 1994）、膜面付着物に優占していた *Firmicutes* はバイオファウリング初期の好気的な環境にも膜付着物の厚みが増した嫌気的な環境にも適応することがでる微生物であった可能性がある。これまでの実規模 MBR の研究では、膜表面付着物の優占門は *Proteobacteria* あるいは *Bacteroidetes* であることが報告されており（Jo *et al*., 2016; Matar *et al*., 2017; Choi *et al*., 2017）、*Firmicutes* がファウリングに関与する可能性を示したのは本研究が初めてである。

なお、ここで例外として挙げた A-MU-2 は、A-MU-1 とともに *Nitrospirae* に属する OTU が顕著に優占（P_i >0.1）した（表 3-7）。いずれも MBR の上流部から採取した試料であることから、上流部ではさらに別の選択圧が働いていた可能性もあり得る。本研究では詳細を明らかにすることはできなかったが、*Nitrospirae* は亜硝酸酸化に関わる微生物群であることから、膜分離槽の直前に設置されていた好気槽における硝化の状況と関係している可能性がある。Lu ら（2016）の報告によれば、アンモニア酸化菌や亜硝酸酸化菌は高濃度のアンモニア存在下で小さなフロックを形成するために MBR のろ過膜表面に吸着しやすく、初期付着から遷移後に至るまで安定して膜表面付着物微生物群集として存在していた。本研究で対象とした MBR では、膜分離槽上流部のアンモニア態窒素濃度が下流部に比べて高くなっていた可能性があり、このことが上流における *Nitrospirae* の優占に影響したとも考えられる。

3.5 要約

本章では、泉北下水処理場の MBR を対象として、実規模 MBR における膜付着物試料および活性汚泥試料の微生物群集を T-RFLP 解析およびメタゲノム解析によって調査し、特にバイオファウリングに関与する微生物種の推定を試みた。立ち上げから 470 日余にわたる調査の結果、対象とした MBR では、流入負荷や運転条件の変動によらず、安定した処理成績を維持しており、活性汚泥試料中の微生物群集も門レベルでの構成はおおむね安定していることが確認された。一方、膜付着物試料の微生物群集は、MBR の立ち上げ早期には活性汚泥試料の微生物群集と明らかに異なっていたが、時間経過とともに類似したものになっていく傾向が確認された。TMP の挙動に基づいてファウリングの進行度を分類し、膜付着微生物群集の変遷状況の解釈を試みた結果、立ち上げ早期の MBR においては、微生物種に特有の膜面付着特性および遷移が膜表面の微生物群集の形成に対する選択圧として働いたものと推察され、それらの選択圧によって形成された初期付着微生物群集および遷移後微生物群集の双方が観察されたものと考えられた。いずれの状況下においても *Firmicutes* が優占したことから、*Firmicutes* がバイオファウリングの全体を通して重要な役割を担っていることが示唆された。また、上流の膜付着物では *Nitrospirae* が優占しやすい傾向も確認されたことから、膜分離槽前段における硝化の状況がファウリングと何らかの関連性を有する可能性が見出された。

総括ならびに結論

固液分離を重力沈降によらず膜分離にて行う MBR は、高度な処理水質が得られることや省スペースなシステムであることなど、標準活性汚泥法に比べて優位な特徴を有しているが、ろ過膜の閉塞、すなわちファウリングが生じるという運転管理上の重要な課題を抱えている。ファウリングは極めて複合的な要因により発生する現象であるが、特に MBR 中の微生物が原因となるバイオファウリングは、その発生メカニズムが解明されておらず、極めて対処が難しいものとされている。バイオファウリングのメカニズムを解明し、有効な対策技術を確立するためには、MBR 生物反応槽内の活性汚泥混合液や膜表面付着物の微生物群集の挙動や特性について十分理解することが重要である。これまでに MBR のバイオファウリングに関わる微生物学的側面からの検討は、ラボスケールあるいはパイロットスケールの小規模な実験装置を用いて行われてきたが、そのような小規模装置とは活性汚泥中の微生物組成やその動態が大きく異なることが明らかとなっている実規模の MBR を対象とした研究はほとんど行われてこなかった。そのため、既往の研究成果は、必ずしも実際に MBR のバイオファウリングの問題解決に資するものとはいえず、今後は実規模 MBR における微生物動態についての知見を蓄積していくことが望まれている。

本研究では、実規模 MBR 内での微生物群集の挙動、特にバイオファウリングに大きな影響を及ぼしているものと推測される膜表面付着微生物群集の挙動を解明することを目的とした一連の研究を行った。すなわち、MBR 内での微生物群集の動態を膜のファウリングの状態と関連付けることで、バイオファウリング生起のメカニズムを推定することを目指した。

第 1 章では、ラボスケールおよびパイロットスケールの MBR を用いた既往研究において明らかにされているバイオファウリングのメカニズムについて概観するとともに、膜表面の微生物群集が保有する特性に関する知見を整理した。多くの研究ではバイオファウリングが生じるメカニズムとして、微生物による EPS の生産に着目していた。ファウリングに寄与する主要な EPS として SMP 多糖が挙げられているが、BPC の寄与も指摘されている。また、ファウラントの生産を担う微生物群集として、第一には、活性汚泥混合液中のものが考えられたが、ろ過膜表面に形成される独特な微生物群集に着目し、その寄与を指摘する研究も多くみられた。ろ過膜表面の独特な微生物群集は、膜面に付着しやすい先駆種によるバイオフィルムの形成、活性汚泥混合液中の物質蓄積による膜付着物層の成長、そしてその結果として生じる微生物群集の遷移によって形成されると考えられている。ただし、遷移後の微生物群集がファウリングに対してどのように寄与するかについては、様々な議論があり、未だ明らかとなっていない。

第 2 章では、三宝下水処理場の MBR を対象として、実規模 MBR における膜付着物試料および活性汚泥試料の微生物群集を T-RFLP 解析によって調査し、ファウリングの深刻さを膜付着物中の微生物群集の動態と関連付けることを試みた。TMP の値やろ過流速に基づいてファウリングの深刻度を軽度、中度、重度の 3 パターンに分類し、微生物群集との関連性をみたところ、軽度のファウリングが発生した膜面の微生物群集は活性汚泥の微生物群集に類似しているが、中度のファウリング発生時の膜面には活性汚泥とは異なる独特な微生物群集が形成されることが明らかとなった。また、この膜付着微生物群集の相違は、ラボスケールやパイロットスケールの MBR を用いた既往研究においても観察されている遷移によって生じたものと考えられた。他方、重度のファウリングが発生している膜の付着微生物群集は、さらに特殊な構造を有しており、本研究で対象とした MBR が合流式下水道から流入する雨水の処理も行っていたことに起因するものと考えられた。

第 3 章では、泉北下水処理場の MBR を対象として、実規模 MBR における膜付着物試料および活性汚泥試料の微生物群集を T-RFLP 解析およびメタゲノム解析によって調査し、特にバイオファウリングに関与する微生物種の推定を試みた。立ち上げから 470 日余にわたる調査の結果、対象とした MBR では、流入負荷や運転条件の変動によらず、安定した処理成績を維持しており、活性汚泥試料中の微生物群集も門レベルでの構成はおおむね安定していることが確認された。一方、膜付着物試料の微生物群集は、MBR の立ち上げ早期には活性汚泥試料の微生物群集と明らかに異なっていたが、時間経過とともに類似したものになっていく傾向が確認された。TMP の挙動に基づいてファウリングの進行度を分類し、膜付着微生物群集の変遷状況の解釈を試みた結果、立ち上げ早期の MBR においては、微生物種に特有の膜面付着特性および遷移が膜表面の微生物群集の形成に対する選択圧として働いたものと推察され、それらの選択圧によって形成された初期付着微生物群集および遷移後微生物群集の双方が観察されたものと考えられた。いずれの状況下においても *Firmicutes* が優占したことから、*Firmicutes* がバイオファウリングの全体を通して重要な役割を担っていることが示唆された。また、上流の膜付着物では *Nitrospirae* が優占しやすい傾向も確認されたことから、膜分離槽前段における硝化の状況がファウリングと何らかの関連性を有する可能性が見出された。

以上のように、本研究では、実規模 MBR における膜表面付着微生物群集の動態を、主に活性汚泥混合液内のものと対比しながら調査した結果から、バイオファウリングが発生するメカニズムや、その中で重要な役割を果たしていると考えられる微生物種について考察し、興味深い知見を得ることができた。ラボスケールやパイロットスケール MBR を用いた既往研究からは、ろ過膜面に特定の微生物が付着することを契機にしてバイオフィルムを形成し、その中で生じる多様な環境変化によって微生物群集の遷移が生じることでバイオファウリングを発生させるメカニズムが提示されていたが、本研究ではこのようなプロセ

スが実規模 MBR においても認められ、バイオファウリングの生起に寄与している可能性を示すことができた。加えて、ラボ、パイロットスケールの実験では再現できない雨天時の処理において、膜面付着微生物が独特なものとなることなども観察することができ、実規模 MBR ではラボスケールやパイロットスケールの MBR に比べて複雑なメカニズムでバイオファウリングが発生していることを明らかにすることができた。一例に過ぎないが、膜面の微生物群集において、バイオファウリングの生起や進行に重要な役割を果たしている微生物群の候補として、*Firmicutes* を見出した。ここで、膜表面の微生物群集から検出された *Firmicutes* の細菌種を特定し、その特性や機能を明らかにすることができれば、バイオファウリングの防止対策技術の開発につながる可能性もある。また、*Nitrospirae* など硝化に関与する微生物の膜面での優占がバイオファウリングになんらかの影響を与えている可能性を指摘することができたことも、将来の対策技術開発への糸口を与えるものであると考えている。さらに、これらの知見を引き継ぎつつ、EPS 生産に関与する機能遺伝子や膜表面における微生物群集の消長に着目するなど、さまざまな視点からの研究がなされることで、バイオファウリングへの対策技術はより一層進展するものと考えられる。

参考文献

Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells with-out cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N.,Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., and Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.*, 7, 335-336.

Cho, B.D., and Fane, A.G. (2002). Fouling transients in nominally sub-critical flux operation of a membrane bioreactor. *J. Membr. Sci.*, 209, 391-403.

Choi, J., Kim, E., and Ahn, Y. (2017). Microbial community analysis of bulk sludge/cake layers and biofouling-causing microbial consortia in a full-scale aerobic membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* 227, 133-141.

Collins, M.D., Lund, B.M., Farrow, J.A.E., and Schleifer, K.H. (1983). Chemotaxonomic study of an alkalophilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 2037-2042.

Drews, A. (2010). Membrane fouling in membrane bioreactors –characterisation, contradictions, cause and cures. *J. Membr. Sci.*, 363, 1-28.

Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., and Nielsen, P.H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.*, 30, 1749-1758.

Gao D., Fu, Y., Tao, Y., Li, X., Xing, M., Gao, X., and Ren, N. (2011). Linking microbial community structure to membrane biofouling associated with varying dissolved oxygen concentrations. *Bioresour. Technol.*, 102, 5626-5633.

Gao, D., Fu, Y., and Ren, N. (2013). Tracing biofouling to the structure of the microbial community and its metabolic products: A study of the three-stage MBR process. *Water Res.*, 47, 6680-6690.

Gómez-Silván, C., Arévalo, J., Gonzáles-López, J., and Rodelas, B. (2014). Exploring the links between population dynamics of total and active bacteria and the variables influencing a full-scale membrane bioreactor (MBR). *Bioresour. Technol.*, 162, 103-114.

Guo, W., Ngo, H., Vigneswaran, S., Dharmawam, F., Nguyen, T., and Aryal, R. (2010). Effect of different flocculants on short-term performance of submerged membrane bioreactor. *Sep. Purif. Technol.*, 70, 274-279.

Guo, W., Ngo, H., and Li, J. (2012). A mini-review on membrane fouling. *Bioresour. Technol.*, 122, 27-34.

Gutman, J., Walker, S.L., Freger, V., and Herzberg, M. (2013). Bacterial attachment and viscoelasticity: physicochemical and motility effects analyzed using quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D). *Environ. Sci. Technol*., 47, 398-404.

Hammi, I., Delalande, F., Belkhou, R., Marchioni, E., Cianferani, S., and Ennahar, S. (2016). Maltaricin CPN, a new class IIa bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* CPN isolated from mould-ripened cheese. *J. Appl. Microbiol.*, 121, 1268-1274.

Hashimoto, K., Tsutsui, H., Takada, K., Hamada, H., Sakai, K., Inoue, D., Sei, K., Soda, S., Yamashita, K., Tsuji, K., Hashimoto, T., and Ike, M. (2016). Changes in bacterial community structure in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *J. Biosci. Bioeng.*, 122, 97-104,

Hocaoglu, S.M., and Orhon, D. (2010). Fate of protein and carbohydrates in membrane bioreactor operated at high sludge age. *J. Environ. Sci. Health Part A Toxic Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 45, 1101-1108.

Huang, L., De Wever, H., and Diels, L. (2008). Diverse and distinct bacterial communities induced biofilm fouling in membrane bioreactors operated under different conditions. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 8360-8366.

Japanese Standard Association (2008). *Testing methods for industrial wastewater JIS K0102: 2008*.

Japanese Standard Association (2016). *Testing methods for industrial wastewater JIS K0102: 2016*.

Jenkins, D. (2008). From total suspended solids to molecular biology tools –a personal view of biological wastewater treatment process population dynamics. *Water Environ. Res.*, 80, 677-687.

Jeong, S.Y., Yi, T., Lee, C.H., and Kim, T.G. (2016). Spatiotemporal dynamics and correlation network of bacterial and fungal communities in a membrane bioreactor. *Water Res*., 105, 218-230.

Ji, J., Qiu, J., Wai, N., Wong, F., and Li, Y. (2010). Influence of organic and inorganic flocculants on physical-chemical properties of biomass and membrane-fouling rate. *Water Res.*, 44, 1627-1635.

Jin, L., Ong, S.L., and Ng, H.Y. (2013). Fouling control mechanism by suspended biofilm carriers addition in submerged ceramic membrane bioreactors. *J. Membr. Sci.*, 427, 250-258.

Jo, S., Kwon, H., Jeong, S., Lee, C., and Kim, T. (2016). Comparison of microbial communities of activated sludge and membrane biofilm in 10 full-scale membrane bioreactors. *Water Res.*, 101, 214-225.

Judd, S. (2006). *Fundamentals. In the MBR book: Principles and Applications of Membrane Bioreactors for Water and Wastewater Treatment*. Elsevier Science, Oxford, U.K., 55-207.

Kim, S., Oh, H., Jo, S., Yeon, K., Lee, C., Lim, D., Lee, C., and Lee, J. (2013). Biofouling control with bead-entrapped quorum quenching bacteria in membrane bioreactors: physical and biological effects. *Environ. Sci. Technol.*, 47, 836-842.

Kim, S.W., Suda, W., Kim, S., Oshima, K., Fukuda, S., Ohono, H., Morita, H., and Hattori, M. (2013). Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed

by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res.*, 20, 241-253.

Kimura, K., Ogyu, R., Miyoshi, T., and Watanabe, Y. (2015). Transition of major components in irreversible fouling of MBRs treating municipal wastewater. *Sep. Purif. Technol.*, 142, 326-331.

Le-Clech, P., Chen, V., and Fane T.A.G. (2006). Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *J. Membr. Sci.*, 284, 17-53.

Lee, W.N., Cheong, W.S., Yeon, K.M., Hwang, B.K., and Lee, C.H. (2009). Correlation between local TMP distribution and bio-cake porosity on the membrane in a submerged MBR. *J. Membr. Sci.*, 332, 50-55.

Legendre, P., and Legendre, L. (2012). *Q mode: distance coefficients. In Numerical ecology. (Third edition)*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 295-312.

Lim, S., Kim, S., Yeon, K., Sang, B., Chun, J., and Lee, C. (2012). Correlation between microbial community structure and biofouling in a laboratory scale membrane bioreactor with synthetic wastewater. *Desalination*, 287, 209-215.

Lin, H., Liao, B., Chen, J., Gao, W., Wang, L., Wang, F., and Lu, X. (2011). New insights into membrane fouling in submerged anaerobic membrane bioreactor based on characterization of cake sludge and bulk sludge. *Bioresour. Technol.*, 102, 2373-2379.

Liu, Y., Liu, Q., Li, J., Ngo, H.H., Guo, W., Hu, J., Gao, M., Wang, Q., and Hou, Y. (2018). Effect of magnetic powder on membrane fouling mitigation and microbial community/composition in membrane bioreactors (MBRs) for municipal wastewater treatment. *Bioresour. Technol.*, DOI: 10.1016/j.biortech.2017.10.027.

Lu, H., Xue, Z., Saikaly, P., Nunes, S.P., Bluver, T.R., and Liu, W.T. (2016). Membrane biofouling in a wastewater nitrification reactor: microbial succession from autotrophic colonization to heterotrophic domination. *Water Res.*, 88, 337-345.

Luo, J., Lv, P., Zhang, J., Fane, A.G., McDougald, D., and Rice, S.A. (2017). Succession of biofilm communities responsible for biofouling of membrane bioreactors (MBRs). *PLoS ONE*, 12, e0179855.

Ma, J., Wang, Z., Zou, X., Feng, J., and Wu, Z. (2013). Microbial communities in an anaerobic dynamic membrane bioreactor (AnDMBR) for municipal wastewater treatment: Comparison of bulk sludge and cake layer. Process Biochem., 48, 510-516.

Matar, G.K., Bagchi, S., Zhang, K., Oerther, D.B., and Saikaly, P.E. (2017). Membrane biofilm communities in full-scale membrane bioreactors are not randomly assembled and consist of a core microbiome. *Water Res.*, 123, 124-133.

Meltivier, A., Pilet, M.F., Dousset, X., Sorokine, O., Anglade, P., Zagorec, M., Piard, J.C., Marion, D., Cenatiempo, Y., and Fremaux, C. (1998). Divercin V41, a new bacteriocin with two disulphide bonds produced by *Carnobacterium divergens* V41: primary structure and genomic organization. *Microbiology*, 144, 2837–2844.

Meng, F., Chae, S.R., Drews, A. Kraume, M., Shin, H.S., and Yang, F. (2009). Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): membrane fouling and membrane material. *Water Res*., 43, 1489-1512.

Meng, F., Zhang, S., Oh, Y., Zhou, Z., Shin, H., and Chae, S. (2017). Fouling in membrane bioreactors: An updated review. *Water Res.*, 114, 151-180.

Miesel, J., Wolf, G., and Hammes, W.P. (1994). Heme-dependent cytochrome formation in *Lactobacillus maltaromicus*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 17, 20-23.

Miura, Y., Watanabe, Y., and Okabe, S. (2007). Membrane biofouling in pilot-scale membrane bioreactors (MBRs) treating municipal wastewater: Impact of biofilm formation. *Environ. Sci. Technol.*, 41, 632-638.

Nagaraj, V., Skillman, L., Li, D., Xie, Z., and Ho, G. (2017). Control of biofouling by xanthine oxidase on seawater reverse osmosis membranes from a desalination plant: enzyme production and screening of bacterial isolations from the full-scale plant. *J. Appl. Microbiol*., 65, 73-81.

Oh, H., Yeon, K., Yang, C., Kim, S., Lee, C., Park, S., Han, J., and Lee, J. (2012). Control of membrane biofouling in MBR for wastewater treatment by quorum quenching bacteria encapsulated in microporous membrane. *Environ. Sci. Technol*., 46, 4877-4884.

Park, J. and Lee, C. (2005). Removal of soluble COD by a biofilm formed on a membrane in a jet loop type membrane bioreactor. *Water Res.*, 39, 4609-4622.

Rajesh-Banu, J., Ushani, U., Rajkumar, M., Naresh-Kumar, R., and Parthiba-Karthikeyan, O. (2017). Impact of mild alkali dosage on immobilized *Exiguobacterium* spp. Mediated cost and energy efficient sludge disintegration. *Bioresour. Technol.*, 245, 434-441.

Saiklaly, P.E., Stroot, P.G., and Oerther, D.B. (2005). Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 5814-5822.

Shirazi, S., Lin, C.J., and Chen, D. (2010). Inorganic fouling of pressure-driven membrane processes – a critical review. *Desalination*, 250, 236-248.

Silva, A.F., Carvalho, G., Oehmen, A., Lousada-Ferreira, M., Van Nieuwenhuijzen, A., Reis, M.A., and Crespo, M.T. (2012). Microbial population analysis of nutrient removal-related organisms in membrane bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93, 2171-2180.

Sun, F., Wang, X., and Li, X. (2011). Effect of biopolymer clusters on the fouling property of sludge from a membrane bioreactor (MBR) and its control by ozonation. *Process Biochem*. 46, 162-167.

Sun, F., Li, P., Li, J., Li, H., Ou, Q., Sun, T., and Dong, Z. (2015). Hybrid biofilm-membrane bioreactor (Bf-MBR) for minimization of bulk liquid-phase organic substances and its positive effect on membrane permeability. *Bioresour. Techno*l., 198, 772-780.

Van der Gast, C.J., Jefferson, B., Reid, E., Robinson, T., Bailey, M.J., Judd, S.J., and Thompson, I.P. (2006). Bacterial diversity is determined by volume in membrane bioreactors. *Environ.*

Microbiol., 8, 1048-1055.

Vanysacker, L., Boerjan, B., Declerck, P., and Vankelecom, I.F.J. (2014). Biofouling ecology as a means to better understand membrane fouling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 8047-8072.

Wan, C., De Wever, H., Diels, L., Theoeye, C., Liang, J., and Huang. L. (2011). Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Res.*, 45, 1129-1138.

Wang, X., Li, X., and Huang, X. (2007). Membrane fouling in a submerged membrane bioreactor (SMBR): Characterisation of the sludge cake and its high filtration resistance. *Sep. Purif. Technol.*, 52, 439-445.

Wang, X., and Waite, T.D. (2009). Role of gelling soluble and colloidal microbial products in membrane fouling. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 9341-9347.

Water Environment Federation (2011). *Overview of membrane bioreactor capability. In Membrane Bioreactors: WEF Manual of Practice No. 36*. WEF Press, Alexandria, NY, 12-15.

Weerasekara, N.A., Choo, K., and Lee, C. (2016). Biofouling control: bacterial quorum quenching versus chlorination in membrane bioreactors. *Water Res.*, 103, 293-301.

Wong, M., Mino, T., Seviour, R.J., Onuki, M., and Liu, W. (2005). In situ identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorous removal plants in Japan. *Water Res.*, 39, 2901-2914.

Wu, B., Yi, S., and Fane, A.G. (2011). Microbial behaviors involved in cake fouling in membrane bioreactors under different solids retention times. *Bioresour. Technol.*, 102, 2511-2516.

Xin, Y.J., Bligh, M.W., Kinsela, A.S., Wang, Y., and Waite, T.D. (2015). Calcium-mediated polysaccharide gel formation and breakage: Impact on membrane foulant hydraulic properties. *J. Membr. Sci.*, 475, 395-405.

Xin, Y.J., Bligh, M.W., Kinsela, A.S., and Waite, T.D. (2016). Effect of iron on membrane fouling by alginate in the absence and presence of calcium. *J. Membr. Sci.*, 497, 289-299.

Yu, T., Li, D., Qi, R., Li, S., Xu, S.W., and Yang, M. (2011). Structure and dynamics of nitrifier populations in full-scale submerged membrane bioreactor during start-up. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90, 369-376.

Zhang, K., Choi, H., Dionysiou, D.D., Sorial, G.A., and Oerther, D.B. (2006a). Identifying pioneer bacterial species responsible for biofouling membrane bioreactors. *Environ. Microbiol.*, 8, 433-440.

Zhang, J., Chua, H.C., Zhou, J., and Fane, A.G. (2006b). Factors affecting the membrane performance in submerged membrane bioreactor. *J. Membr. Sci.* 284, 54-66.

Ziegler, A.S., Mcllroy, S.J., Larsen, P., Albertsen, M., Hansen, A.A., Heinen, N., and Nielsen, P.H. (2016). Dynamics of the fouling layer microbial community in a membrane bioreactor. *PLoS ONE*, 11, e0158811.

略語一覧

【B】	
BOD	生物学的酸素要求量（biochemical oxygen demand）
BPC	生体高分子クラスター（biopolymer cluster）
【C】	
COD	化学的酸素要求量（chemical oxygen demand）
【D】	
DO	溶存酸素（dissolved oxygen）
DOC	溶存態有機炭素（dissolved organic carbon）
【E】	
EPS	細胞外高分子物質（extracellular polymeric substance）
【F】	
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
【H】	
HRT	水理学的滞留時間（hydraulic retention time）
【L】	
LB-EPS	Loosely-bound extracellular polymeric substance
【M】	
MBR	膜分離活性汚泥法（membrane bioreactor）
MLSS	活性汚泥浮遊物質（mixed liquor suspended solids）
【O】	
OTU	Operational taxonomic unit
【P】	
PAC	ポリ塩化アルミニウム（poly aluminum chloride）
PC	主成分（principal component）

PC1	第一主成分（the first principal component）
PC2	第二主成分（the second principal component）
PCA	主成分分析（principal component analysis）
PCoA	主座標分析（principal coordinate analysis）
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction）

【S】

SMP	可溶性微生物生産物（soluble microbial products）
SRT	汚泥滞留時間（sludge retention time）

【T】

TB-EPS	Tightly-bound extracellular polymeric substance
TMP	膜間差圧（trans-membrane pressure）
T-N	全窒素（total nitrogen）
T-P	全リン（total phosphorus）
T-RF	蛍光末端断片（terminal restriction fragment）
T-RFLP 解析	末端標識制限酵素断片多型（terminal restriction fragment length polymorphism）解析

補遺

難分解性有機物除去を目的とした MBR へのバイオオーグメンテーションの検討

4.1 はじめに

バイオオーグメンテーションは、難分解性化学物質に汚染された環境に対して、有用な生分解能力を持つ微生物を外部から導入しその浄化を図る技術である（El Fantroussi *et al.*, 2005）。下排水処理を行う活性汚泥プロセスは、バイオオーグメンテーションの主要な適用先の一つであり、Horsfall（1979）がフロリダ州にある実規模下水処理場を対象としてバイオオーグメンテーションの適用可能性を示して以来、多くの研究が進められてきた。しかしながら、単菌を活性汚泥プロセスの生物処理槽に導入する典型的な試みにおいては、導入菌が短時間で減少しバイオオーグメンテーションの効果が持続しないといった問題がいくつかの事例で報告されている（Boon *et al.*, 2000; Patureau *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2010; Dueholm *et al.*, 2015）。この原因として Patureau ら（2001）は、導入菌の原生生物による捕食、土着微生物との栄養塩競合、生物処理槽からの流亡を挙げている。

これらの原因のうち、導入菌の生物処理槽からの流亡を阻止するための手法として、膜分離活性汚泥法（membrane bioreactor, MBR）へのバイオオーグメンテーション適用が有望であると考えられる。MBR では膜モジュールにより完全な固液分離が達成され、余剰汚泥の引き抜き以外には微生物が生物処理槽外に流出することはないためである。実際にこれまで、活性汚泥による難分解性化学物質分解の向上を目的として、ラボスケール MBR に対するバイオオーグメンテーションを適用した研究事例はいくつかあり、そのほとんどにおいて、長期間の処理成績向上が見られたという報告がなされている（Cirja *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015; Hou *et al.*, 2017）。ただし、これらの研究において導入菌の生存に関する調査はほとんど行われておらず、こうした持続的なリアクター性能の向上が導入菌の寄与によるものであるという明確な裏付けはなされていない（Wen *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015; Hou *et al.*, 2017）。すなわち、唯一、Cirja ら（2009）の事例において、導入菌がバイオオーグメンテーション試験開始から 2 週間後にも残存していたことが示されているが、他の研究では導入菌の動態がモニタリングされておらず、処理成績向上との関連は明らかにされていない。今後、MBR の利点を活かした合理的なバイオオーグメンテーションの戦略を確立していくためには、導入菌の挙動を処理プロセスの運転条件や処理性能と関連付けて詳細に解明し、知見を集積していくことが望まれる。

そこで、本研究では、MBR へのバイオオーグメンテーションにおける導入菌の挙動を解明するモデル実験として、4-*tert*-ブチルフェノール（4-*t*-BP）分解菌 *Sphingobium fuliginis* OMI（以下 OMI 株、Ogata *et al.*, 2013）を 4-*t*-BP 含有排水を処理するラボスケール MBR に導入し、その挙動をモニタリングした。バイオオーグメンテーションを行わない MBR を対照系とし、処理性能やバックグランドとなる活性汚泥の細菌群集構造の変化等をバイオオーグ

メンテーション系と比較することにより、OMI 導入の効果を多元的に評価した。なおここで、4-*t*-BP は水環境において頻繁に検出され（Ying *et al.*, 2002）、生態系への悪影響が懸念されていることから（Hasselberg *et al.*, 2004）、難分解性有機物のモデル物質として用いた。

4.2 実験方法

4.2.1 OMI 株の培養

OMI 株は、4-*t*-BP を 4-*tert*-ブチルフェノールカテコールに変換したのち、そのメタ開裂経路により代謝する微生物であり、これを単一炭素源として資化し増殖することができる（Ogata *et al.*, 2013）。本研究における OMI 株の培養には、無機塩培地（mineral salt medium, MSM：$(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g/L、K_2HPO_4 1.0 g/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L、NaCl 0.05 g/L、$CaCl_2$ 0.05 g/L、$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 8.3 mg/L、$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1.4 mg/L、$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 1.17 mg/L、$ZnCl_2$ 1 mg/L）に 0.5 mM 4-*t*-BP を単一炭素源として添加したもの（MSM+4-*t*-BP、Ogata *et al.*, 2013）、および Luria-Bertani 培地（LB：トリプトン 10g/L、酵母エキス 5 g/L、NaCl 5 g/L）を用いた。

バイオオーグメンテーション試験に供する OMI 株の菌体培養は、以下の通り行った。まず、500 mL 容三角フラスコに分注した 200 mL の MSM+4-*t*-BP 培地に 1 白金耳を植菌し、通気性のあるシリコ栓で蓋をして対数増殖期まで回転振盪培養（28°C、120 r/min）した。増殖した菌体は遠心分離（15,000 ×*g*、10 min、4°C）によって回収し、50 mM 滅菌リン酸カリウム緩衝液（KH_2PO_4 50 mM, K_2HPO_4 50 mM, pH 7.5）を用いて洗浄・再懸濁した。次に、5 L 容のねじ口ガラス瓶（017200-500A、DURAN）に分注した 5 L の MSM+4-*t*-BP 培地ないし LB 培地に対して、600 nm における光学濃度（optical density, OD_{600}）が 0.02 となるように懸濁液を添加し、一定温度条件下（28°C）においてブロワーで通気（流速 2 L/min）することで対数増殖期まで培養を行った。増殖した菌体は、上述の方法で再度、回収・洗浄・再懸濁し、この菌懸濁液を直ちにバイオオーグメンテーション試験に供した。

4.2.2 ラボスケール MBR の立ち上げ

本研究では、2 台の連続式ラボスケール MBR（長さ 150 mm、幅 230 mm、高さ 900 mm、有効容積 24 L）を用いた（図 4-1）。ろ過膜には、塩素化ポリエチレン製の浸漬平膜モジュール（公称孔径 0.4 μm、総膜表面積 0.25 m^2：クボタ液中膜カートリッジ 203 形、クボタ）を用いた。

リアクターの立ち上げに際して、種汚泥には標準活性汚泥法を採用する下水処理場（大阪府）の余剰汚泥を用い、流入水には合成下水を用いた。合成下水は、腐敗防止のため水道水タンクと濃縮液タンクから分けて供するものとし、濃縮液タンクからは合成下水濃縮液（ペプトン 120 g/L、カツオエキス 80 g/L、尿素 20 g/L：溶存態有機炭素（dissolved organic carbon, DOC）濃度 78.3 g/L）を流速 0.17 mL/min で、水道水タンクからは水道水を流速 30 mL/min 流入させた。ただし、流入水を供給するポンプは、MBR の水位が 720 mm を超えると停止し、680 mm 以下になるまでは再起動しないように設定し、運転した。結果として、水道水

の流入量は 48 L/day（水理学的滞留時間（hydraulic retention time, HRT）約 12 時間）、濃縮液の流入量は 0.24 L/day となった。ここから濃縮液の DOC 濃度を参照して有機物負荷に換算すると 19 g-DOC/day となり、流入水の平均的な DOC 濃度はおよそ 400 mg-DOC/L と推定できた。

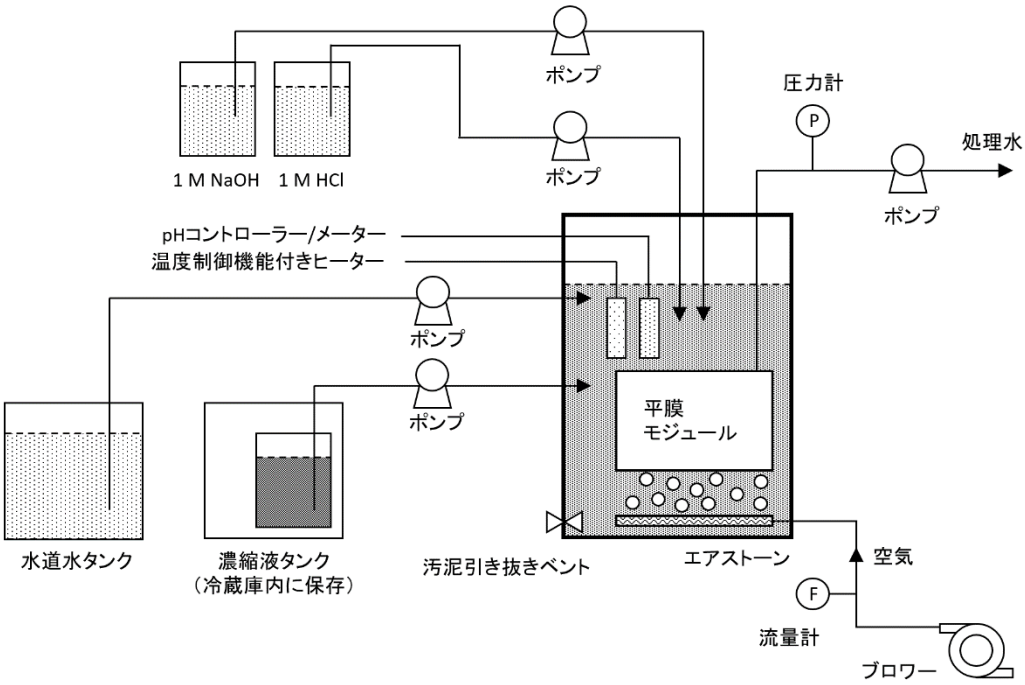


図 4-1　本研究で用いたラボスケール MBR の概略図

曝気は、ブロワー（XP-40、テクノ高槻）を用いて流速 5 L/min で行った。膜間差圧（trans-membrane pressure, TMP）の値は圧力計（GC31、長野計器）を用いてモニタリングし、値が 30 kPa を超えた際には予備の膜への交換とファウリングした膜の洗浄を行った。膜の洗浄においては、膜面付着物をゴムヘラで掻き取ってから、0.3%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 2 時間浸漬させた。この際に採取した膜面付着物は、サンプルとして-20°C で保存した。洗浄した膜は予備として保持し、使用時には 50%エタノールに 2 時間浸漬させて親水化処理を行った後、水道水を用いて洗浄した。汚泥の引き抜きは、リアクター下部のベントから毎日 500 mL ずつ行うことで、リアクターの汚泥滞留時間（sludge retention time, SRT）を 48 日と設定したが、膜ファウリングに伴う生物膜の除去を考慮していないため、実際にはそれよりも短い SRT で運転されていたものといえる。余剰汚泥として引き抜いた活性汚泥は、一部をサンプルとして-20°C で保存した。水温はヒーター（SH220、GEX）を用いて 30.2-30.6°C の範囲に制御し、pH は pH コントローラー（TDP-51、東興化学）、1 M NaOH、および 1 M HCl を用いて 6.0-7.0 に保った。

立ち上げ期間として 2 台の MBR を 75 日運転した後に、両 MBR の活性汚泥を混合し、それぞれの MBR に再度分配した。その際、それぞれの活性汚泥浮遊物質（mixed liquor suspended solids, MLSS）濃度が 8,000 mg/L となるように、水道水を用いて希釈した。

4.2.3 バイオオーグメンテーション試験

立ち上げ期間の後、MBR による 4-*t*-BP 含有排水の処理を開始した（0 日目）。ここでは、立ち上げ期間に処理していた濃縮液タンクの合成下水濃縮液に加えて、水道水タンクの 200 L 水道水に対して 4.0 g の 4-*t*-BP を溶解させた溶液を MBR に流入させ、処理させた。流入水の 4-*t*-BP 濃度は 20 mg/L となるよう溶液を調製したが、4-*t*-BP の溶解が不完全となる場合もあったため、水道水タンクの溶液を定期的に分取して、その 4-*t*-BP 濃度を確認した。なお、バイオオーグメンテーション試験では 4-*t*-BP の添加を開始したため、立ち上げ期に比べて流入水の設定上 DOC 濃度は約 16 mg/L 増加することになる。その他の運転条件は、立ち上げ期と同様とした。

試験 0 日目に、約 0.1 g-dry/L の OMI 株を一方の MBR に植菌してバイオオーグメンテーション系とし、他方は植菌せず対照系とした。さらに 8 日目に、0.01 g-dry/L の OMI 株をバイオオーグメンテーション系に再度植菌し、その後 74 日目まで MBR の運転を続けた。0 日目と 8 日目に植菌した OMI は、LB 培地および MSM+4-*t*-BP 培地でそれぞれ培養したものを用いた。植菌量の違いは、用いた培地の差異によるものである。

4.2.4 水質項目および運転管理項目のモニタリング

MLSS および溶存酸素（dissolved oxygen, DO）濃度は MLSS/DO メーター（MLDO-30N、笠原理化工業）を用いて定期的に測定した。流入水・処理水の 4-*t*-BP および DOC 濃度は、試料を 0.45 μm フィルターにてろ過した後、2M HCl を終濃度 5%となるように添加して生物反応を停止させ、高速液体クロマトグラフィー（high-performance liquid chromatography, HPLC：Shimadzu HPLC system、島津）および全有機体炭素計（TOC-5000A、島津）を用いてそれぞれ測定した。HPLC の詳細な分析条件は、表 4-1 に示した。

4.2.5 DNA 抽出、微生物群集構造解析、および統計解析

活性汚泥試料および膜面付着物試料からの DNA 抽出、ならびに活性汚泥試料の末端標識制限酵素断片多型（terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP）解析は、本論文第 2 章 2.2.4 に述べた手法で行った。すなわち、対象とする試料の 16S rRNA 遺伝子を傾向標識したプライマーセット [27F-FAM, 1392R] によって増幅した後、制限酵素で消化してその蛍光末端断片（terminal restriction fragment, T-RF）パターンを読み取った。本研究では、制限酵素に *Hae*III を用いた。また、得られたプロファイルを基にして、本論文第 2 章 2.2.5 に述べた手法で、ユークリッド距離に基づくクラスター解析および主成分分析（principal component analysis, PCA）を行った。

表 4-1　HPLC 分析条件

ポンプ	LC-10ADvp
コントローラー	SCL-10Avp
オートインジェクター	SIL-10AF
検出器	SPD-10Avp
検出波長	277 nm
カラム	Shim-pack VP-ODS 250 L ×4.6 nm
ガードカラム	Shim-pack GVD-ODS 10 L ×4.6 nm
カラム恒温槽	CTO-10Avp
溶離液	アセトニトリル/超純水 =8/2
流量	1.0 mL/min
カラム温度	40°C
サンプル注入量	1 μL
分析時間	6 min

4.2.6　リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法

SYBR Green I を用いたリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction, PCR）法によるカテコール 2,3-ジオキシゲナーゼ（C23O）遺伝子の定量により、OMI 株のモニタリングを試みた。本手法に用いたプライマーセット 31F-OMI（5'- GAA GTG TGC GTC AGG GTG TT -3'）および 222R-OMI（5'- ATA GGT GCG GAA GGC GAA ATA -3'）は、OMI 株の C23O 遺伝子配列に基づき、ソフトウェア Primer 3（Rozen and Skaletsky, 2000）を用いて設計した。ここで用いた OMI 株の塩基配列は、accession numbers BEWI01000001 から BEWI01000034 として DDBJ/EMBL/NCBI に登録されている（Kuroda *et al.*, 2017）。プライマーの特異性は、ヌクレオチドデータベースの BLAST 検索（2017 年 7 月）によって確認し、OMI 株以外では、*Sphingobium* sp. YBL2（Sun *et al.*, 2009）、*Sphingobium japonicum* UT26S（Nagata *et al.*, 2010）、および *Sphingobium indicum* B90A（Anand *et al.*, 2012）の C23O 遺伝子を増幅しうることが分かった。このことは、本研究に用いたプライマーセットが芳香族化合物を分解する *Sphingobium* spp.の C23O 遺伝子を検出することを示している。

PCR には、Power SYBR Green PCR Master Mix 10 μL（Applied Biosystems）、DNA テンプレート 2 μL、および終濃度 300 nM のプライマーセット [31F-OMI, 222R-OMI] を含む 20 μL 反応液を用いた。PCR 反応および蛍光検出は、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System（Applied Biosystems）を用いて行った。PCR 反応は、イニシャルアクティベーションとして熱変性 95°C（10 min）を実行した後、熱変性 95°C（15 sec）とアニーリング 60°C（1 min）を 1 サイクルとして 40 サイクルのシャトル PCR で実行した。

補遺

C23O 遺伝子定量のための標準試料は、OMI 株の C23O 遺伝子をプライマーセット 6F-OMI（5'- GAT TCG TGG ATT GCT CCG GGT C -3'）および 256R-OMI（5'- GAA ATG GTC GAT CTC CGC ATC CTC -3'）によって増幅し、作成した。ここで得られる 251 bp の PCR 産物は、プライマーセット [31F-OMI, 222R-OMI] によって増幅される領域を内包している。標準試料用 PCR 産物は、CicaGeneus PCR & Gel Prep Kit（関東化学）を用いて精製し、Qubit dsDNA HS Assay Kit（Invitrogen）と Qubit 3.0 Fluorometer（Invitrogen）を用いて濃度を測定した。標準曲線作成のため、標準試料は 10 倍ずつ 100,000 倍まで段階希釈し、それぞれをリアルタイム PCR に供した。ここで作成された標準曲線から、リアルタイム PCR における増幅効率は 100%であり、相関係数（r^2）は 0.99 であることが明らかとなった。

4.3 結果

4.3.1 立ち上げ期間におけるリアクターの運転状況

立ち上げ期間中、2 台の MBR の DO 濃度は 0.4-6.8 mg/L の間で変動したが、概ね好気的に維持されていた。また、両 MBR で類似の挙動が示された（図 4-2A）。MLSS 濃度の挙動も両 MBR で類似していた（図 4-2B）。MLSS 濃度は、最初の 20 日間は 6,500 mg/L から 5,000 mg/L へ減少したが、その後 8,000 mg/L にまで増加した。また、初期に MLSS 濃度が減少したのと同時期には、DOC 除去率の低下も見られた（図 4-2C）。最も処理成績が悪化した運転 11 日目には、処理水中の DOC 濃度が 154 mg/L に上昇し、DOC 除去率は 63%であった。その後、21 日目には、DOC 除去率が回復し、処理水中の DOC 濃度は 64 日目を除いて 24 mg/L 以下（除去率 ≥94%）に保たれた。MBR の立ち上げ運転においては、膜ファウリングの観点からも初期に悪化が見られた（図 4-2D）。運転 11 日目から 31 日目の期間においては、いずれの MBR においても膜洗浄後 1 日以内に TMP の値が 20 kPa を超える値まで増加するという深刻な膜ファウリングが頻発し、日単位での膜洗浄が必要となった。膜ファウリングの頻度は、32 日目から 48 日目にかけては減少したものの、51 日目から 61 日目にかけて再び増加し、その後は間欠的に膜ファウリングが発生する状態となった。

4.3.2 バイオオーグメンテーション試験期間におけるリアクターの運転状況

全バイオオーグメンテーション試験期間を通したオーグメンテーション系の DO 濃度は 0.2-6.3 mg/L で変動し、全体的には立ち上げ期間との間に顕著な差は見られなかった（図 4-3A）。ただし、6 日目から 33 日目にかけては、オーグメンテーション系の DO 濃度が 0.3-3.8 mg/L であったのに対し、対照系の DO 濃度は 3.3-7.3 mg/L となり、オーグメンテーション系でやや低い値が示された。

MLSS 濃度は、40 日目まではオーグメンテーション系（8.4 ± 0.6 g/L）と対照系（8.3 ± 0.7 g/L）でほぼ同様のレベルに保たれていたが（図 4-3B）、その後、オーグメンテーション系の MLSS 濃度は 55 日目にかけて 11,000 mg/L まで増加したのに対し、対照系はそれまでの水準を維持した。

処理水中の DOC 濃度は、両 MBR において 30 mg/L 以下であり、ともに高い処理成績（除去率 ≥93%）を示していた（図 4-3C）。オーグメンテーション系では、処理水中の DOC 濃度は 1 日目から 3 日目にかけて増加した後、6 日目に大きく減少した。その後、6 日目から 37 日目までの間、21 日目を除いて対照系よりも低い DOC 濃度を維持していたが、38 日目以降は、両 MBR において類似の DOC 除去率が示された。50 日目以降の DOC 濃度は、分析機器が故障したために取得できなかった。

対照系における TMP の値は、バイオオーグメンテーション試験開始から 8 日目までは毎日 30 kPa を超え続けたため、毎日膜洗浄を行った（図 4-3D）。また、9 日目には TMP の値が 15 kPa まで低下していたが、10 日目までは各日の膜洗浄を継続して行った。その後、TMP は次第に上昇したが、69 日目まで 30 kPa を超えることはなかった。70 日目以降は、TMP が再び 30 kPa を超えるようになったため、膜洗浄を再開した。一方、オーグメンテーション系における TMP の値は、試験開始から 18 日目まで毎日 30 kPa を超え続けたため、膜洗浄を 19 日目まで毎日行い、さらに 33 日目を除いた 26 日目から 37 日目、42 日目、および 69 日目から 73 日目にも洗浄を行った。このように、オーグメンテーション系では対照系に比べてより頻繁なファウリングが発生していた。

補遺

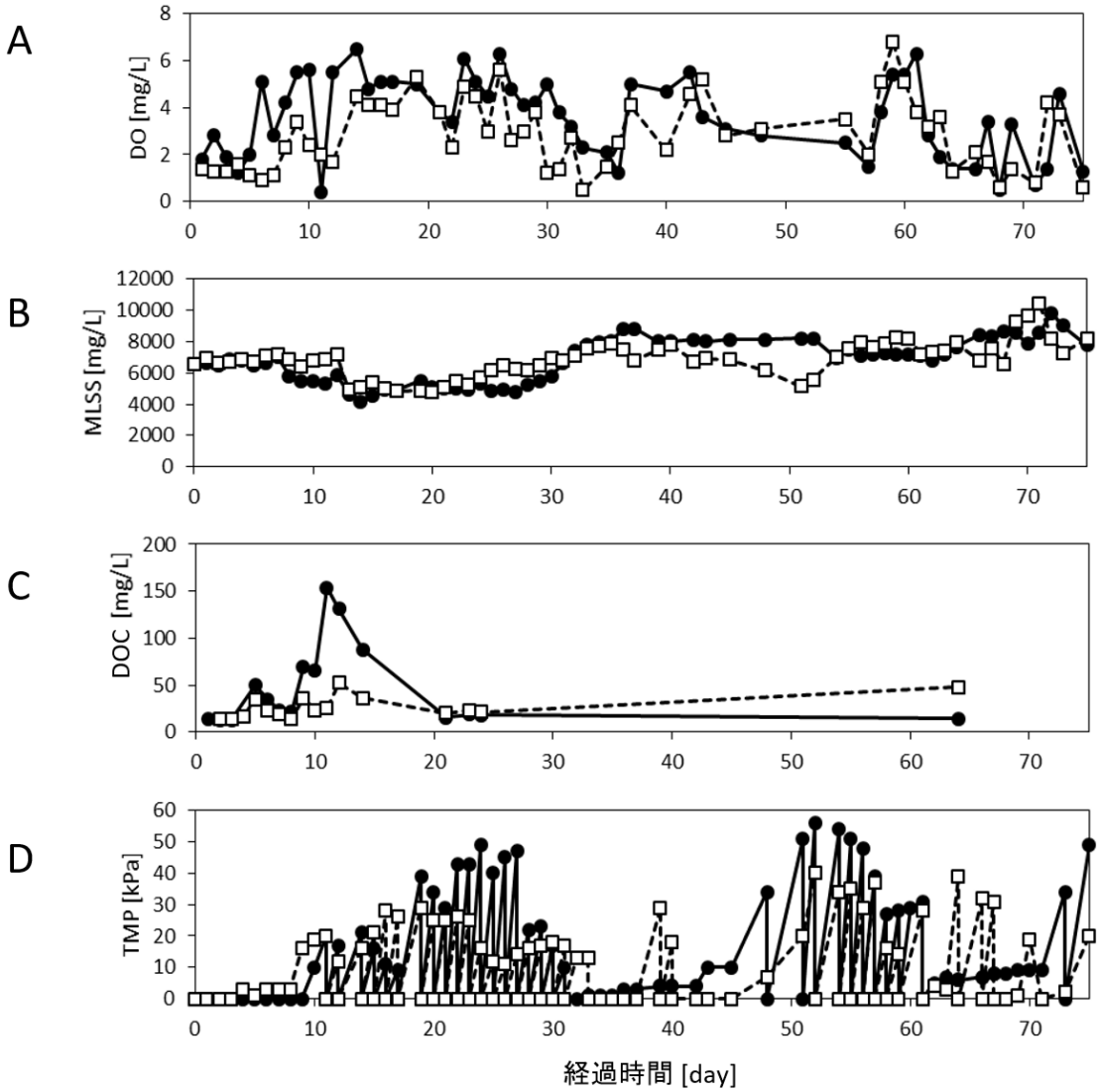


図 4-2　立ち上げ期間における MBR の（A）DO 濃度、（B）MLSS 濃度、（C）処理水中 DOC 濃度、および（D）TMP 値の挙動

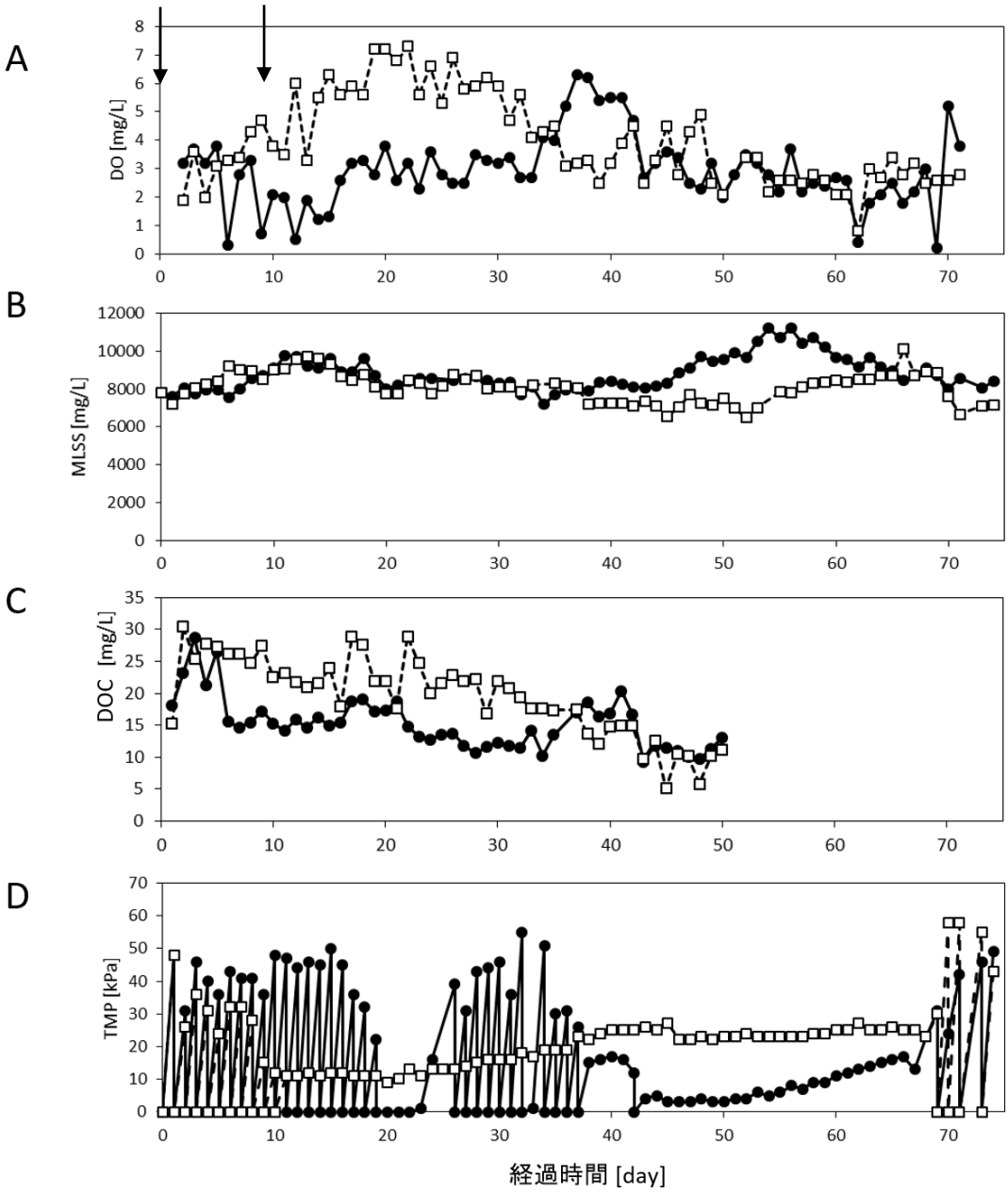


図 4-3　バイオオーグメンテーション試験期間における MBR の（A）DO 濃度、（B）MLSS 濃度、（C）処理水中 DOC 濃度、および（D）TMP 値の挙動（黒丸はオーグメンテーション系、白四角は対照系、矢印はバイオオーグメンテーションの実施時期をそれぞれ示す）

4.3.3 4-*t*-BP の処理成績

バイオオーグメンテーション試験の期間中、両 MBR からの処理水および流入水中に含まれていた 4-*t*-BP 濃度の経時変化を図 4-4 に示す。1 日目から 4 日目にかけてはいずれの MBR においても、処理水中の 4-*t*-BP 濃度が次第に増加し、流入水と同等の水準にまで達していたため、有意な分解が生じていなかったものと考えられた。また、対照系ではその後も、39 日目に検出下限値未満（<1 mg/L）となるまで処理水中から 4-*t*-BP が検出され続けたが、その濃度は徐々に低下し、40 日目以降は、処理水中から 4-*t*-BP が検出されることはほとんどなく、56 日目および 70-71 日目においてわずかに検出されたのみの良好な処理が行われるようになった。これとは対照的に、オーグメンテーション系では 6 日目には処理水中の 4-*t*-BP 濃度が低下し始め、7 日目から 35 日目にかけては 4-*t*-BP 濃度が検出下限値未満となり、安定した処理成績が示された。しかし、36 日目以降には、4-*t*-BP 除去は不安定になる期間があり、処理水が 5 mg/L 以上の 4-*t*-BP を含有していることもあった。

4.3.4 C23O 遺伝子の挙動

バイオオーグメンテーション試験期間中の MBR における C23O 遺伝子数の挙動を図 4-5 に示す。0 日目における対照系の C23O 遺伝子数は 6.1×10^{12} copies/L であったが、徐々に増加して 52 日目には 9.8×10^{14} copies/L となった。一方、0 日目におけるオーグメンテーション系の C23O 遺伝子数は 3.5×10^{13} copies/L であり、OMI 株の導入を反映して、同日の対照系よりも顕著に高い値となっていた。その後、オーグメンテーション系では、C23O 遺伝子数はさらに増加して 17 日目には 2.9×10^{15} copies/L となった。2 回目の植菌が実施される直前に調べられた 8 日目の C23O 遺伝子数が 7.1×10^{14} copies/L となっていたことから、この段階で 0 日目から顕著に増加していることが分かった。しかし、オーグメンテーション系の C23O 遺伝子数は、24 日目には 7.1×10^{13} copies/L にまで急激に減少し、その後増加することはなかった。

オーグメンテーション系では、膜付着物試料の C23O 遺伝子数についても定量を行った（図 4-6）。膜付着物の C23O 遺伝子数は、10 日目（5.5×10^{16} copies/g-dry）および 16 日目（1.7×10^{13} copies/g-dry）において、他の時期（8.4×10^{11} copies/g-dry 以下）よりも高い値を示していた。より多くの C23O 遺伝子が膜付着物に含まれていた時期は、活性汚泥中において C23O 遺伝子が増加しつつあった時期と一致していた（図 4-5 および 4-6）。

4.3.5 T-RFLP 解析による微生物群集構造解析

バイオオーグメンテーション試験期間中における活性汚泥の T-RF プロファイルでは、189 bp と 255 bp の T-RFs がすべての試料において高い優占度（P_i >0.05）を示していた（図 4-7）。加えて、195-197 bp と 327 bp の T-RF は、対照系においてのみ高い優占度（P_i >0.05）を示した。195-197 bp の T-RF は 30 日目の対照系において初めて優占し（P_i =0.04）、36 日目にかけて増加して以降（P_i =0.09）、高い優占度（P_i >0.05）を維持し続けた。327 bp の T-RF は

30 日目に大きく優占したが（P_i =0.09）、その後次第に減少し 54 日目には P_i =0.04 となった。一方、169 bp の T-RF はオーグメンテーション系においてのみ優占（P_i >0.01）し、59 日目には P_i =0.11 と高い優占度を示した。

得られた T-RF プロファイルに基づく統計学的解析の結果を図 4-8 に示す。クラスター解析によると、解析に供した活性汚泥試料が 3 つのクラスターに大別された（図 4-8A）。すなわち、10 日目以前のオーグメンテーション系と対照系の活性汚泥が属する Group I、30 日目以降の対照系の活性汚泥が属する Group II、そして 30 日目以降のオーグメンテーション系の活性汚泥が属する Group III の 3 つである。Group I と II の距離が Group I と III の距離よりも離れていることから、対照系の活性汚泥微生物群集構造がオーグメンテーション系のものに比べて大きく変化したことが示唆された。また、2 台の MBR における活性汚泥微生物群集構造の差異は、PCA 解析の結果においても確認できた（図 4-8B）。第一主成分（the first principal component, PC1）および第二主成分（the second principal component, PC2）の寄与率はそれぞれ 33.1%、16.1%であった。各主成分に対する負荷量の絶対値が最も大きかった T-RF を挙げると、PC1 に対しては 195-197 bp および 327 bp（それぞれ-0.33）、PC2 に対しては 169 bp（+0.39）であった。このことから、全体の微生物群集構造における変化は、30 日目以降のオーグメンテーション系における 169 bp の T-RF の増加、および同期間の対照系における 195-197 bp と 327 bp の T-RF の増加によって特徴づけられるものといえる

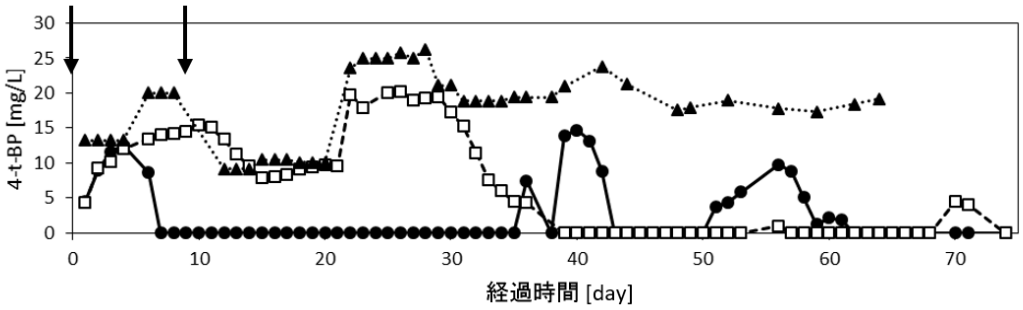


図 4-4　バイオオーグメンテーション試験期間における流入水および MBR 処理水中の 4-*t*-BP 濃度の経時変化（黒三角は流入水、黒丸はオーグメンテーション系、白四角は対照系、矢印はバイオオーグメンテーションの実施時期をそれぞれ示す）

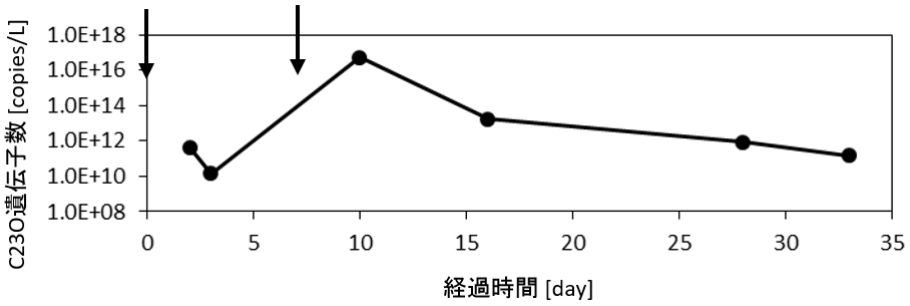


図 4-5 バイオオーグメンテーション試験期間における活性汚泥中の C23O 遺伝子数の経時変化（黒丸はオーグメンテーション系、白四角は対照系、矢印はバイオオーグメンテーションの実施時期をそれぞれ示す）

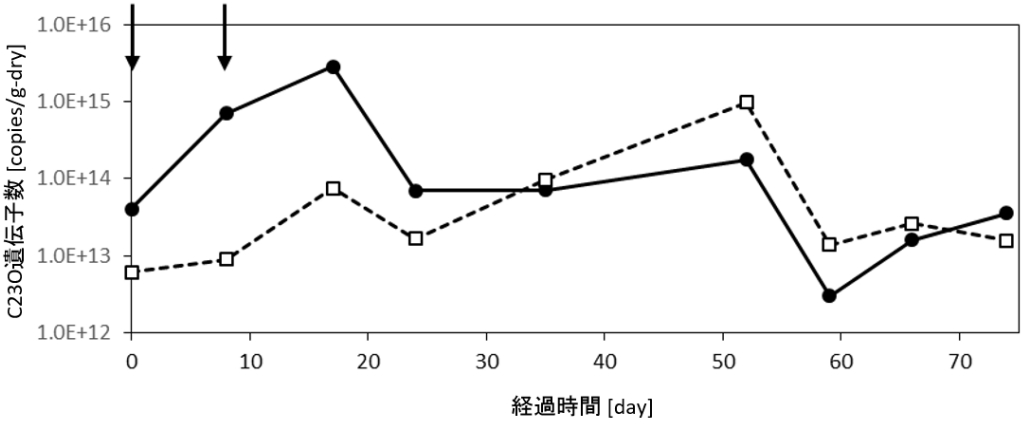


図 4-6 バイオオーグメンテーション試験期間におけるオーグメンテーション系の膜付着物中の C23O 遺伝子数の経時変化（矢印はバイオオーグメンテーションの実施時期をそれぞれ示す）

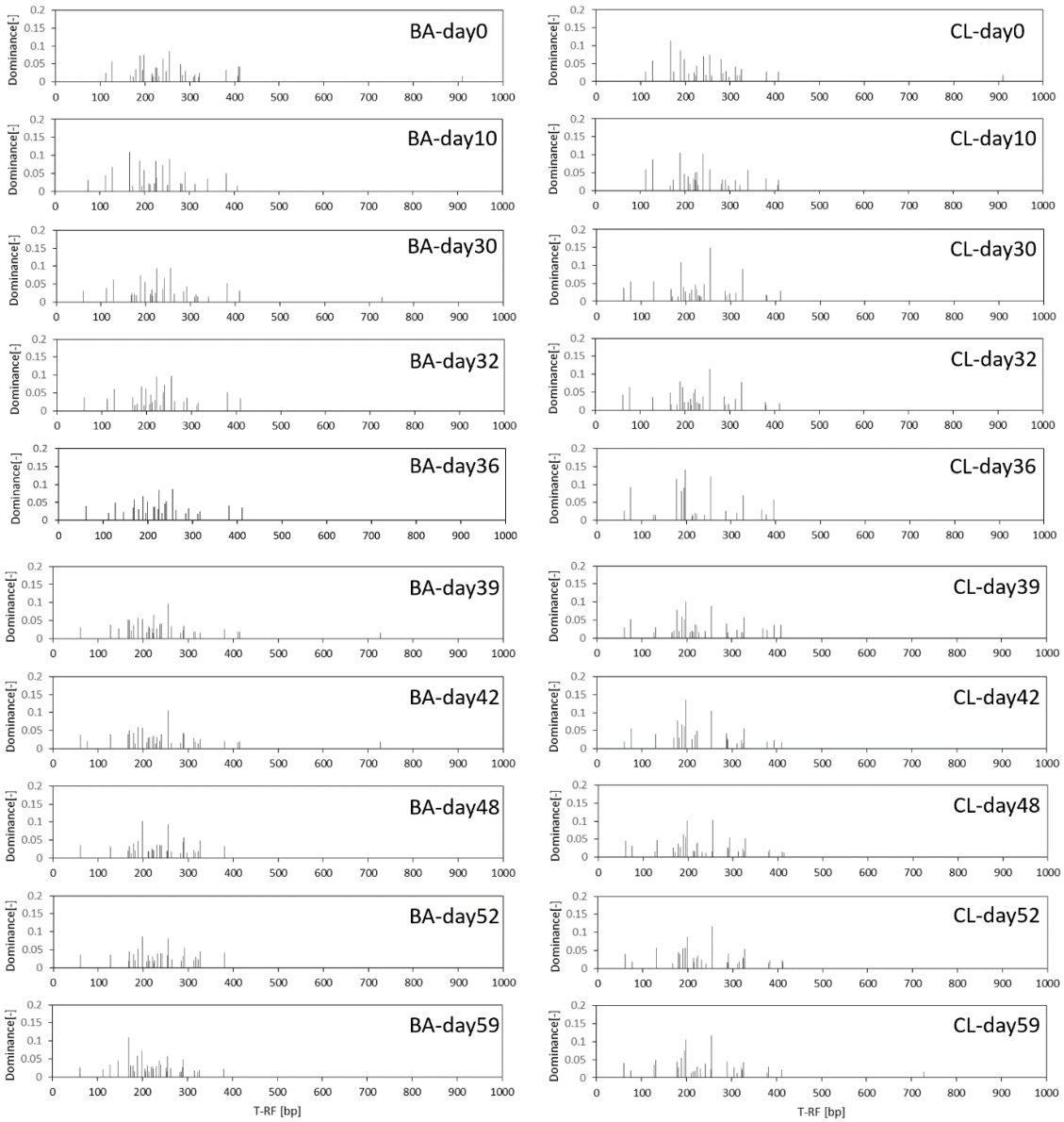


図 4-7　バイオオーグメンテーション試験期間におけるオーグメンテーション系（BA）および対照系（CL）の T-RF プロファイル（各プロファイル右肩に記載されている数字は、バイオオーグメンテーション実験の開始日からの経過日数を示す）

（A）　　（B）

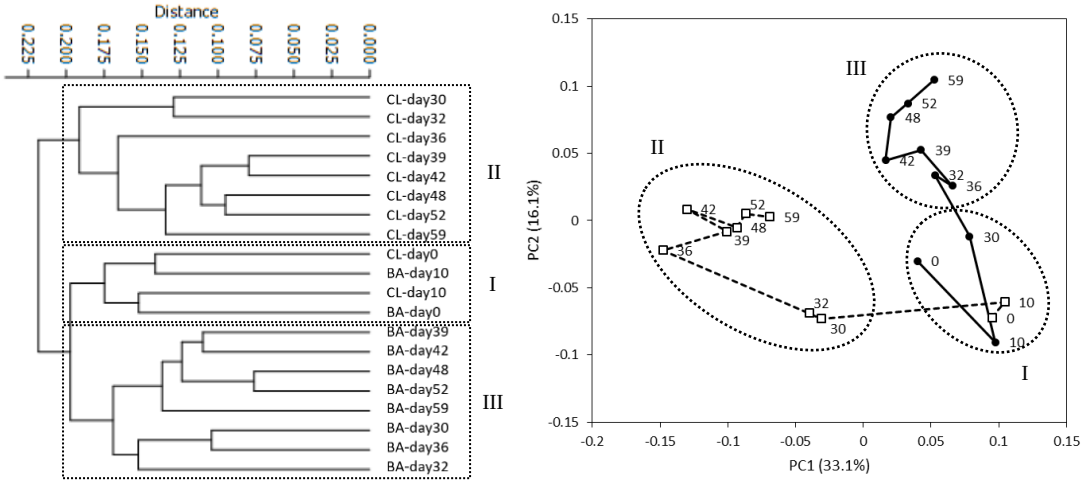


図 4-8　T-RF プロファイルに基づく（A）クラスター解析および（B）PCA の結果（樹形図の BA、CL はそれぞれオーグメンテーション系および対照系を表し、散布図の黒丸、白四角、傍記された数字はそれぞれオーグメンテーション系、対照系、およびバイオオーグメンテーション実験の開始日からの経過日数を表す。各図のギリシャ数字はグループ名である）

4.4　考察

沈殿池によって固液分離を行う従来の活性汚泥法へのバイオオーグメンテーションでは、導入菌が処理水へと流出することによるリアクター処理成績の悪化が課題であった。たとえば Dueholm ら（2015）は、HRT を 24 時間に設定した回分式活性汚泥法の処理プロセスにおいて、導入菌の 90%が 12 時間以内に処理系内から失われることを確認している。導入菌を長時間処理槽内に保持するための一つの方法は、HRT を長く設定することであり、たとえば HRT を 33.6 時間から 4 日に設定したラボスケールの実験では、バイオオーグメンテーションによる生分解能力を 2 週間から 52 日間にわたり保持できたと報告されている（Boon *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2010; Bai *et al.*, 2010）。しかしながら、HRT を長くすることは、生物処理槽の容積を大きくすること、あるいは、処理水量を制限することを意味するため、実際の下排水処理系において必ずしも実行可能な選択肢であるとはいえない。ゆえに、バイオオーグメンテーション技術の適用範囲を広げるためには、これ以外の方法によって生物処理槽内に導入菌を保持するアプローチが求められている。

『4.1 はじめに』でも述べたように、MBR へのバイオオーグメンテーションは、導入菌の流出を阻止するための有望な選択肢であると考えられている。Cirja ら（2009）はノニルフェノール分解菌である *Sphingomonas* sp. TTNP3 を用いたバイオオーグメンテーションを MBR に対して行い、15 時間という短い HRT 条件下において導入菌を処理槽内に 2 週間以上保持することに成功している。また、Hou ら（2017）は、ピリジン分解菌である *Rhizobium*

sp. NJUST18 を MBR に導入し、HRT が 12 時間の条件下で、97.6%の高いピリジン除去率を 60 日以上にわたり継続させている。

本研究では、12 時間という短い HRT の条件下で運転されたにもかかわらず、オーグメンテーション系で 4-*t*-BP の完全除去を試験開始 7 日目から 34 日目まで安定して継続させることができた（図 4-4）。すなわち、MBR へのバイオオーグメンテーションにより、およそ 1 か月にわたる 4-*t*-BP 除去が達成された。ここで、オーグメンテーション系における C23O 遺伝子数が 17 日目まで増加していることは、OMI 株の残存と増殖を示している（図 4-5）。これらの結果は、MBR における OMI 株の残存と増殖により、4-*t*-BP 除去性能が比較的長期間にわたって維持されたことを強く示唆するものである。これは、バイオオーグメンテーション開始時の活性汚泥中には 4-*t*-BP をエネルギー源として利用できる微生物が少なく、相対的に OMI 株にとって有利な環境であったことなどが理由として考えられる。

一方、OMI 株のモニタリング指標とした C23O 遺伝子数は 24 日目に大きく減少し（図 4-5）、これに続いて 36 日目以降には 4-*t*-BP 除去率も不安定になった（図 4-4）。MBR では処理水を通した導入菌の流亡は阻止されるはずであることから、観察された OMI 株の減少は、それ以外の要因によって引き起こされたものといえる。ここで、オーグメンテーション系では、膜ファウリングの発生とそれに伴う膜付着物の除去が頻発していた（図 4-3D）。加えて、オーグメンテーション系の膜付着物には、10 日目と 16 日目において他の期間より多くの OMI 株が含まれていたことが示されている（図 4-6）。これらのことから、膜ファウリングとこれに伴う膜付着物の除去が、MBR 活性汚泥中における OMI 株減少の一つの原因であったと考えられる。すなわち、オーグメンテーション系では活性汚泥中に存在していた OMI 株の多くが膜表面に形成された膜付着物の層に含まれ、その除去により系外に排出されたことで、その存在量を減少させたものと考えられる。OMI 株が膜付着物に多く含まれていた理由としては、OMI 株が *Spirodela polyrhiza* の根圏から単離された微生物であり、固体表面に付着しやすい性質を持っていたことが考えられる（Ogata *et al.*, 2013）。膜ファウリングは MBR の運転管理において重要な課題であり、MBR へのバイオオーグメンテーションにおいて導入菌が膜面に付着物を形成する引き金となることは、膜面付着物除去による導入菌の系外への排出という視点からのみならず、処理システム全体にとって大きな障害となり得ることには最大限の注意を払う必要がある。MBR に対してバイオオーグメンテーションを適用する際には、導入菌の選択段階で、その物質分解能力が高いのみでなく、膜表面に付着しにくく付着物の形成に関与することのない微生物を選択する必要があるだろう。この観点からは、親水性や表面電荷といった細胞表面の物理化学的性質が導入微生物選択のための重要な基準項目になりうるものと考えられる。

対照系においては、バイオオーグメンテーション試験初期において 4-*t*-BP はほとんど除去されなかったが、30 日目以降に処理成績が改善され、39 日目以降には完全な除去が達成されるようになった（図 4-4）。このような 4-*t*-BP 処理成績の改善は、C23O 遺伝子数の増加から、馴養によって土着の 4-*t*-BP 分解微生物が増加したことによるものと推定される。難

分解性有機物に馴養された活性汚泥中において土着の分解菌が出現・増加し、分解能力が高まることは、過去にも報告事例がある（Di Bella *et al.*, 2015; Zangi-Kotler *et al.*, 2015）。本研究において対照系の 4-*t*-BP 馴養におよそ 1 か月を要したことは、馴養に依存しない難分解性有機物除去機能の早期の付与のために、バイオオーグメンテーションが有望であることを示したものともいえる。

T-RF プロファイルに基づく統計学的解析からは、オーグメンテーション系と対照系の活性汚泥微生物群集構造が試験 30 日目以降それぞれ異なるものに変化したことが明らかになり（図 4-8）、4-*t*-BP と OMI 株の添加が MBR 活性汚泥微生物群集構造に影響したことが示された。対照系における微生物群集の変化がオーグメンテーション系におけるそれよりも顕著であったことから、OMI 株による 4-*t*-BP 除去がその毒性を弱め、元の微生物群集構造を維持するというバイオプロテクション効果（Erb *et al.*, 1997）が発揮されたことが推測される。バイオオーグメンテーションによるバイオプロテクション効果は、既往研究においても報告されている（Erb *et al.*, 1997; Eichner *et al.*, 1999）。本研究では、OMI 株の導入が土着の微生物に対する 4-*t*-BP の毒性を減少させ、結果としてバイオオーグメンテーション系での微生物群集構造を対照系と比較して保存された状態にしたものと考えられる。

4.5 要約

本研究では、OMI 株を用いた 4-*t*-BP 除去のためのバイオオーグメンテーションをラボスケール MBR に対して適用し、その処理成績とともに OMI 株のモニタリング指標として C23O 遺伝子数の挙動を調査した。その結果、OMI 株の導入により、およそ 1 か月にわたって 4-*t*-BP が安定的に除去され、オーグメンテーション試験期間初期には C23O 遺伝子数の増加も観察された。このことから、MBR は導入菌を維持することができ、バイオオーグメンテーションに適したシステムであることが確認された。一方で、膜ファウリングに伴う導入菌の損失による機能の低下も示されたことから、MBR へのバイオオーグメンテーションにおいては、バイオファウリングを引き起こしにくい導入菌を選定することが重要であることが明らかになった。

参考文献

Anand, S., Sangwan, N., Lata, P., Kaur, J., Dua, A., Singh, A.K., Verma, M., Kaur, J., Khurana, J.P., Khurana, P., Mathur, S., and Lal, R. (2012). Genome sequence of *Sphingobium indicum* B90A, a hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. *J. Bacteriol.*, 194, 4471–4472.

Bai, Y., Sun, Q., Zhao, C., Wen, D., and Tang, X. (2010). Bioaugmentation treatment for coking wastewater containing pyridine and quinoline in a sequencing batch reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 1943–1951.

Boon, N., Goris, J., De Vos, P., Verstraete W., and Top, E.M. (2000). Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2906–2913.

Eichner, C.A., Erb, R.W., Timmis, K.N., and Wagner-Döbler, I. (1999). Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol*., 65, 102-109.

Erb, R.W., Eichner, C.A., Wagner-Döbler, I., and Timmis, K.N. (1997). Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed pseudomonad. *Nat. Biotechnol*., 15, 378–382.

Cirja, M., Hommes, G., Ivashechkin, P., Prell, J., Schäffer, A., Corvini P.F., and Lenz, M. (2009). Impact of bio-augmentation with *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 in membrane bioreactors degrading nonylphenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 183–189.

Di Bella, G., Di Prima, N., Di Trapani, D., Freni, G., Giustra, M.G., Torregrossa, M., and Viviani, G. (2015). Performance of membrane bioreactor (MBR) systems for the treatment of shipboard slops: Assessment of hydrocarbon biodegradation and biomass activity under salinity variation. *J. Hazard Mater.*, 30, 765–768.

Dueholm, M.S., Marques, I.G., Karst, S.M., D'Imperio, S., Tale, V.P., Lewis, D., Nielsen, P.H., and Nielsen, J.L. (2015). Survival and activity of individual bioaugmentation strains. *Bioresour. Technol*., 186, 192–199.

El Fantroussi, S. and Agathos, S.N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.*, 8, 268–275.

Hasselberg, L., Meier, S., Svardal, A., Hegelund, T., and Celander. M.C. (2004). Effects of alkylphenols on CYP1A and CYP3A expression in first spawning Atlantic cod (Gadus morhua). *Aquat. Toxicol.*, 67, 303–313.

Horsfall, F.L. (1979). Bacterial augmentation of wastewater treatment. *J. New England WPCA.*, 13, 158–163.

Hou, C., Shen, J., Zhang, D., Han, Y., Ma, D., Sun, X., Li, J., Han, W., Wang, L., and Liu, X.

(2017). Bioaugmentation of a continuous-flow self-forming dynamic membrane bioreactor for the treatment of wastewater containing high-strength pyridine. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 24, 3437–3447.

Kuroda, M., Ogata, Y., Yahara, T., Yokoyama, T., Ishizawa, H., Takada, K., Inoue, D., Sei, K., Ike, M. (2017). Draft genome sequence of Sphingobium fuliginis OMI, a bacterium degrading alkylphenols and bisphenols. *Genome Announc.*, 5, e01323-17.

Ogata, Y., Toyama, T., Yu, N., Wang, X., Sei, K., and Ike, M. (2013). Occurrence of 4-*tert*-butylphenol (4-*t*-BP) biodegradation in an aquatic sample caused by the presence of *Spirodela polyrrhiza* and isolation of a 4-*t*-BP-utilizing bacterium. *Biodegradation*, 24, 191–202.

Nagata, Y., Ohtsubo, Y., Endo, R., Ichikawa, N., Ankai, A., Oguchi, A., Fukui, S., Fujita, N., and Tsuda, M. (2010). Complete genome sequence of the representative γ-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium *Sphingobium japonicum* UT26. *J. Bacteriol.*, 192, 5852–5853.

Patureau, D., Helloin, E., Rustrian, E., Bouchez, T., Delgenes, J.P., and Moletta, R. (2001). Combined phosphate and nitrogen removal in a sequencing batch reactor using the aerobic denitrifier, *Microvirgula aerodenitrificans*. *Water Res.*, 35, 189–197.

Rozen, S. and Skaletsky, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. pp. 365–386, in: Misener, S. and Krawetz, S. eds., Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology, Humana Press, *Totowa*, NJ.

Sun, J.Q., Huang, X., Chen, Q.L., Liang, B., Qiu, J.G., Ali, S.W., and Li, S.P. (2009). Isolation and characterization of three *Sphingobium* sp. strains capable of degrading isoproturon and cloning of the catechol 1,2-dioxygenase gene from these strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 259–268.

Wen, D., Zhang, J., Xiong, R., Liu, R., and Chen, L. (2013). Bioaugmentation with a pyridine-degrading bacterium in a membrane bioreactor treating pharmaceutical wastewater. *J. Environ. Sci. (China)*, 25, 2265–2271.

Xu, P., Ma, W., Han, H., Jia, S., and Hou, B. (2015). Isolation of a naphthalene-degrading strain from activated sludge and bioaugmentation with it in a MBR treating coal gasification wastewater. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 94, 358–364.

Ying, G.G., Williams, B., and Kookana, R. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environ. Int.*, 28, 215–226.

Yu, F.B., Ali, S.W., Guan, L.B., Li, S.P., and Zhou, S. (2010). Bioaugmentation of a sequencing batch reactor with *Pseudomonas putida* ONBA-17, and its impact on reactor bacterial communities. *J. Hazard Mater.*, 176, 20–26.

Zangi-Kotler, M., Ben-Dov, E., Tiehm, A., and Kushmaro, A. (2015). Microbial community structure and dynamics in a membrane bioreactor supplemented with the flame retardant dibromoneopentyl glycol. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 22, 17615–17624.

Zhu, X., Liu, R., Liu, C., and Chen, L. (2015). Bioaugmentation with isolated strains for the removal

of toxic and refractory organics from coking wastewater in a membrane bioreactor. *Biodegradation*, 26, 465–474.

略語一覧

【C】

C23O	カテコール 2,3-ジオキシゲナーゼ（Catechol 2,3-dioxygenase）

【D】

DO	溶存酸素（dissolved oxygen）
DOC	溶存態有機炭素（dissolved organic carbon）

【H】

HPLC	高速液体クロマトグラフィー（high-performance liquid chromatography）
HRT	水理学的滞留時間（hydraulic retention time）

【L】

LB	Luria-Bertani 培地

【M】

MBR	膜分離活性汚泥法（membrane bioreactor）
MLSS	活性汚泥浮遊物質（mixed liquor suspended solids）
MSM	無機塩培地（mineral salt medium）

【O】

OD_{600}	波長 600 nm の光学濃度（Optical density at a wavelength of 600 nm）
OMI 株	*Sphingobium fuliginis* OMI

【P】

PC1	第一主成分（the first principal component）
PC2	第二主成分（the second principal component）
PCA	主成分分析（principal component analysis）
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction）

【S】

SRT	汚泥滞留時間（sludge retention time）

【T】

補遺

4-*t*-BP	4-*tert*-ブチルフェノール（4-*tert*-butylphenol）
TMP	膜間差圧（trans-membrane pressure）
T-RF	蛍光末端断片（terminal restriction fragment）
T-RFLP 解析	末端標識制限酵素断片多型（terminal restriction fragment length polymorphism）解析

業績一覧

(1) 学術論文（○：博士論文を構成する論文）

1. **Takada, K., Hashimoto, K., Soda, S., Ike, M., Yamashita, K., and Hashimoto, T.** (2014). Characterization of microbial community in membrane bioreactors treating domestic wastewater. *Journal of Water and Environment Technology*, 12 (2), 99-107, DOI: 10.2965/jwet.2014.99.
2. **惣田訓，橋本くるみ，高田一輝，池道彦，野引政芳，笹野浩** (2016). 酸素活性汚泥法の微生物群集構造の解析-標準活性汚泥法と膜分離活性汚泥法との比較-. *下水道協会誌*, 53 (2), 138-144.
3. **Hashimoto, K., Tsutsui, H., Takada, K., Hamada, H., Sakai, K., Inoue, D., Sei, K., Soda, S., Yamashita, K., Tsuji, K., Hashimoto, T., and Ike, M.** (2016). Changes in bacterial community structure in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122 (1), 97-104, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.12.016
4. ○**Kuroda, M., Ogata, Y., Yahara, T., Yokoyama, T., Ishizawa, H., Takada, K., Inoue, D., Sei, K., and Ike, M.** (2017). Draft genome sequence of *Sphingobium fuliginis* OMI, a bacterium that degrades alkylphenols and bisphenols. *Genome Announcements*, 5, e01323-17, DOI: 10.1128/genomeA.01323-17.
5. ○**Takada, K., Hashimoto, K., Soda, S., Ike, M., Makio, T., Nakayama, Y., Miyamoto, H., Yamashita, K., and Hashimoto, T.** (2018). Microbial communities on the submerged membranes in full-scale membrane bioreactors treating municipal wastewater. *Journal of Environmental Engineering*, 144 (1), in press, DOI: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001294.
6. ○**Takada, K., Shiba, T., Soda, S., Inoue, D., Miyake, M., Eguchi, M., and Ike, M.** (2018). Bioaugmenting a lab-scale membrane bioreactor with 4-*tret*-butylphenol-degrading bacterium, *Sphingobium fuliginis* OMI. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*. 54 (1), in press.
7. ○**Takada, K., Shiba, T., Yamaguchi, T., Akane, Y., Nakayama, Y., Soda, S., Inoue, D., and Ike, M.** (Submitted) Cake layer bacterial communities during different biofouling stages in full-scale membrane bioreactors. *Bioresource Technology.*

(2) 総説

1. **池道彦，橋本くるみ，高田一輝** (2013). 膜分離活性汚泥法の微生物学的特徴. *環境技術*, 42 (8), 459-464.
2. **惣田訓，高田一輝，橋本くるみ，池道彦** (2018). 都市下水を処理する膜分離活性汚泥法の細菌叢構造. *環境システム計測制御学会誌 EICA*, 22 (4), 印刷中.

(3) 国際会議・フォーラムにおける発表

1. **Takada, K., Hashimoto, K., Soda, S., Ike, M., Yamashita, K., and Hashimoto, T.** (2013). Characterization of microbial community in membrane bioreactors treating domestic wastewater. Water and Environment Technology Conference (WET2013), 15-1-A-10, Tokyo, Japan, Jun. 15-16.
2. **Takada, K., Hashimoto, K., Soda, S., Ike, M., Yamashita, K., and Hashimoto, T.** (2013). Characterization of microbial communities of activated sludge collected from membrane bioreactors in Japan. The 6th Advanced Engineering Technology for Environment and Energy, S1-2, Osaka, Japan, Aug. 4-6.
3. **Takada, K., Han, S.H., Hashimoto, K., Soda, S., Ike, M., Makio, T., Nakayama, Y., Miyamoto, H., Yamashita, K. and Hashimoto, T.** (2014). Microbial communities and chemical substances on fouled membranes in a full-scale membrane bioreactor for domestic wastewater treatment. The 7th Advanced Engineering Technology for Environment and Energy, S4-5, Busan, Korea, Jul. 27-29.
4. **Takada, K., Hashimoto, K., Soda, S., Ike, M., Makio, T., Nakayama, Y., Miyamoto, H., Yamashita, K., and Hashimoto, T.** (2016). Microbial communities on the submerged membranes in full-scale membrane bioreactors treating municipal wastewater. World Water Congress & Exhibition 2016, paper ID 3270062, Brisbane, Australia, Oct. 9-14.
5. **Takada, K., Shiba, T., Inoue, D., Soda, S., Ike, M., Yamaguchi, T., Akane, Y., and Nakayama, Y.** (2017). Microbial community on submerged membranes in a full-scale membrane bioreactor treating municipal wastewater. The 10th Advanced Engineering Technology for Environment and Energy, S4-2, Busan, Korea, Jul. 26-28.
6. **Takada, K., Shiba, T., Soda, S., Ike, M., Miyake, M., and Eguchi, M.** (2017). Bioaugmentation with *Sphingobium fuliginis* OMI in a lab-scale membrane bioreactor for 4-*tert*-butylphenol degradation. 7th IWA-ASPIRE Conference 2017 & Water Malaysia Exhibition 2017, ID 101, Kuala Lumpur, Malaysia, Sept. 11-14.

(4) 受賞

1. **Takada, K.**, Best Presentation Award, The 7th Advanced Engineering Technology for Environment and Energy, Jul. 28, 2014.
2. **高田一輝,** ベストプレゼンテーション賞, 日本水処理生物学会第 52 回大会, 11 月 13 日, 2015 年.
3. **Takada, K.**, Best Presentation Award, The 10th Advanced Engineering Technology for Environment and Energy, Jul. 27, 2017.

謝辞

本研究の遂行および本論文作成にあたり、終始懇切丁寧かつ適切なご指導を賜りました大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻教授池道彦博士に心から感謝の意を表します。

また、本論文の査読にあたり、多くの貴重なご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻教授近藤明博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行、本論文の査読にあたり、絶えず有益なご指導、ご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻准教授井上大介博士に心から感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、貴重なご助言、ご協力を賜りました立命館大学理工学部環境システム工学科教授惣田訓博士（旧所属：大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻准教授）に深く感謝の意を表します。

本論文の遂行および発表にあたり、多数のご支援を賜りました大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻助教黒田真史博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたって、数々のご支援を頂きました大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻山岡ゆり子技官に、心より感謝いたします。

共同研究者として数々のご助言や多大なるご協力を頂きました、日本下水道事業団橋本敏一博士、山下喬子博士に心より御礼申し上げます。

共同研究者として数々のご支援、ご協力をいただきました広島大学環境安全センター橋本くるみ博士（旧所属：大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻）に深く感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、試料の採取や情報提供にご協力くださいました堺市上下水道局中山能成氏、村上卓也氏、山口多嘉子氏、赤根由依氏ほか下水処理場の皆さま、ならびに、株式会社クボタ、株式会社カンキョウの皆さまに深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多くのご協力、ご助言を頂きましたオルガノ株式会社開発センター江口正浩博士、三宅將貴氏に心より感謝の意を表します。

研究の遂行にあたり、数々のご助言、ご支援を頂きました横山高史氏、酒井孝輔氏、濱田浩志氏、岩間航一氏、土倉嵩一郎氏、矢原達也氏、石澤秀紘氏、志波俊彦氏に深く感謝の意を表します。

また、研究生活を支え、常に暖かい激励を下さいました池研究室の諸兄・諸姉に深く感謝いたします。

最後に、研究生活に理解を示し、終始多大なるご支援を賜りました家族に心から感謝いたします。