

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25281039

研究課題名(和文) 膜分離活性汚泥法へのバイオオーグメンテーションによる高機能排水処理システムの構築

研究課題名(英文) Development of an advanced wastewater treatment system by bioaugmentation to membrane bioreactors

研究代表者

惣田 訓 (Soda, Satoshi)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30322176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：廃水処理に有用な細菌を膜分離活性汚泥(MBR)に導入すれば、その細菌の沈降性や凝集性に左右されず、処理に適した活性汚泥細菌群集をデザインできることを提案した。難分解性化学物質として4-tert-ブチルフェノール(4-t-BP)を選び、分解菌 *Sphingobium fuliginis* OMI を実験用 MBR にバイオオーグメンテーションした。流入濃度 20 mg/L の 4-t-BP に対し、対照系の MBR は処理水の濃度が 8～14 mg/L で変動し、十分な処理ができなかった。オーグメンテーションをした MBR は、7～21 日後は処理水から 4-t-BP が検出 (<0.1 mg/L) されず、目的が達成された。

研究成果の概要(英文)：This study proposed the design of the bacterial community in activated sludge for advanced wastewater treatment by bioaugmentation to membrane bioreactors (MBRs). For demonstrating this proposal, 4-tert-butylphenol (4-t-BP) was selected as a recalcitrant chemical. *Sphingobium fuliginis* OMI as a 4-t-BP-degrading bacterium was augmented to a lab-scale MBR. Against the influent concentration at 20 mg/L, the effluent 4-t-BP concentration in the control MBR was 8-14 mg/L, indicating insufficient treatment. On the other hand, 4-t-BP was not detected from effluent (<0.1 mg/L) in the bioaugmented MBR after 7-21 days of inoculation of the bacterium, indicating successful advanced treatment.

研究分野：環境工学

キーワード：膜分離活性汚泥法 微生物解析 バイオオーグメンテーション

## 1. 研究開始当初の背景

活性汚泥法には、約 100 年の歴史があり、BOD だけでなく、栄養塩類の除去を目的とした様々な変法も開発されてきた一方、近年は大きな変化がなかった。しかし最近、難分解性化学物質やレアメタルを含む重金属が下水に流入し、その処理機能の強化が必要とされている。活性汚泥法の大きな進歩がなかった原因の一つは、処理機構を担う細菌群集の挙動の解明や制御が困難であったことが挙げられる。本研究では、活性汚泥細菌群集をデザイン化し、その機能を向上させることを目的とし、膜分離活性汚泥法 (MBR: membrane bioreactor) にバイオオーグメンテーションを組み合わせたことを提案する。最終沈殿池の代わりに膜ろ過により固液分離を行う MBR は、省スペースであり、処理水が清澄であることから、主に産業廃水の処理へ適用されつつある。重力沈降によって固液分離をする標準活性汚泥法と比較して、沈降性の低い細菌や増殖速度の遅い細菌も槽内に留まることができ、汚泥濃度が数倍以上に高まることで、BOD-SS 負荷が低くなる。このため、MBR は特有の細菌群集を形成するものと考えられる。一方、処理に有用な細菌を導入することで活性汚泥の機能増強を狙った手法がバイオオーグメンテーションである。本研究組織は、2,4-ジクロロ酢酸の分解細菌<sup>1)</sup>や、金属セレンの還元細菌<sup>2)</sup>のバイオオーグメンテーションの効果を実証してきた。しかし、導入細菌の沈降性や凝集性が低いと、リアクターから流出しやすく、土着細菌との競合によっても、機能を持続的に発揮できなかった。そこで、処理に有用な細菌を MBR に導入すれば、その細菌の沈降性や凝集性に左右されず、処理に適した活性汚泥細菌群集をデザインでき、難分解性化学物質や有害金属を含む廃水を処理できる高機能プロセスを構築できるものと発想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、MBR にバイオオーグメンテーションを施し、細菌群集をデザインすることで、活性汚泥を高機能化させるため、サブテーマで研究を実施した。

### (1) 実規模 MBR における細菌群集の解析

全国約 10 カ所の下水処理場の MBR と関西圏を中心とする標準活性汚泥法の細菌群集の解析を 16S rRNA 遺伝子を指標として実施する。季節変化を踏まえて、試料を増やし、標準活性汚泥法と MBR の細菌群集が異なる傾向を確認する。また、試料中の多糖類等の分析を行い、MBR の膜の閉塞に関する細菌群の挙動との関連を解析する。

### (2) ラボスケール MBR による難分解性化学物質除去のためのバイオオーグメンテーション

難分解性化学物質のモデルとして 4-tert-ブ

チルフェノール (4-*t*-BP) を選び、分解菌 *Sphingobium fuliginis* OMI<sup>3)</sup> を実験用 MBR にバイオオーグメンテーションする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実規模 MBR における細菌群集の解析

MBR を採用している全国 12 カ所の下水処理場 (A~L) より、曝気槽内の活性汚泥試料を採取し、16S rRNA 遺伝子をターゲットとした T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析により細菌群集構造を明らかにするとともに、汚泥試料の各種炭素源の資化性のプロファイルを Biolog GN2 マイクロプレートを用いた Biolog 法で評価した。T-RFLP 解析は fingerprint 解析の一つであり、試料中にどのような属種の細菌が含まれているかまでは分からないが、解析結果であるエレクトロフェログラム上に現れるフラグメント・ピークのパターンにより、細菌群集の姿を大まかに把握することができる。Biolog GN2 マイクロプレートを用いた Biolog 法は、汚泥試料による 95 種の異なる炭素源の分解能を調べるものであり、各炭素源の分解の有無と程度によって、汚泥の有機物代謝ポテンシャルを部分的に特徴付けるものである。

### (2) ラボスケール MBR による難分解性化学物質除去のためのバイオオーグメンテーション

合成下水と 4-*t*-BP 混合系における OMI 株の基質分解試験

易分解性の有機物と難分解性有機物である 4-*t*-BP の混合系における OMI 株の 4-*t*-BP 分解能力を評価した。合成下水に 4-*t*-BP を終濃度 25 mg/L となるように添加した液体培地 190 mL を、500 mL 容三角フラスコに分注し、洗浄した OMI 株懸濁液 10 mL を添加した。比較のため、4-*t*-BP を加えない合成下水のみを炭素源とする対照系を用意した。各系は好氣的に 27 時間培養し (28 °C, 120 rpm) 経時的に 2 mL の試料を採取した。回収した試料の溶存態有機炭素 (DOC) および 4-*t*-BP の濃度を測定した。

ラボスケール MBR によるバイオオーグメンテーション

下水処理場より採取した余剰汚泥を二台の MBR に分注して運転を開始した。図 1 に示すように MBR は、底面 150 mm × 230 mm、高さ 900 mm、容積約 31 L であり、塩化ポリエチレン製の浸漬型平膜 (孔径 0.4 μm, 有効膜面積 0.11 m<sup>2</sup>/枚) が二枚設置されていた。合成下水の流入と排出は、それぞれ独立したポンプを用いて行った。排出用のポンプは流速を 30 mL/min に設定し、9 分間の運転につき 1 分間休止するサイクルを繰り返した。合成下水の流入速度は、排水用ポンプによる排水速度を上回るように設定してあり、水位が一定以上となった場合に流入水用ポンプが停止し、一定以下となった場合に流入水用ポ

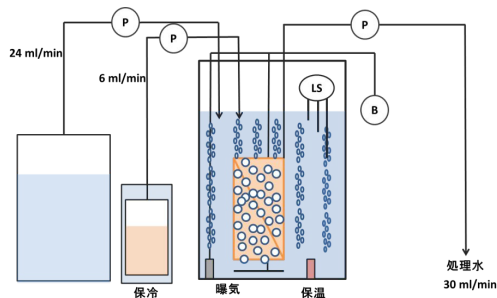


図1 ラボスケール MBR の概形

反応槽の大きさ：底面 150 mm×230 mm、高さ 900 mm (有効容積 24 L)。浸漬型平膜：塩化ポリエチレン製、面積 210 mm×297 mm×2枚、公称孔径 0.4 μm。

ンプが再び作動するように制御した。すなわち槽内水位は 700 mm 前後に保たれ、有効容積はおよそ 24 L となる。曝気は、膜面を洗浄するため膜面下部に設置した穴から行うもの (8 L/min) と、酸素を供給する目的でエアストーンを用いて行うもの (4 L/min) の二つに分けて行った。水理学的滞留時間を 24 時間、槽内の温度は常に 29-31°C の範囲に保った。

運転 76 日目に *Sphingobium fuliginis* OMI を一方の MBR にオーグメンテーションし、同時に両 MBR の流入水中の 4-t-BP 濃度を 20mg/L に設定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実規模 MBR における細菌群集の解析 細菌群集構造の特徴

図2に標準活性汚泥法 (CAS) 由来の試料と MBR 由来の試料の T-RFLP 解析の典型的なエレクトロフェログラムを示す (各5試料の比較)。CAS では全体的に類似したピークパターンが示されているのに対して、MBR では処理場によって異なるパターンが得られた。CAS では大きなピークとして示される優占菌が概ね共通しているのに対し (例えば 202bp)、MBR では処理場ごとに主要ピークが異なっており、優占菌がそれぞれ異なっていた。この結果は、CAS と MBR の細菌群集構造が異なる特徴を有し、MBR においては CAS に比べて、より多様な優占菌が選択され得ることを示唆している。

CAS と MBR の細菌群集構造が異なることは、T-RFLP の結果を PCA (主成分分析: Principal Component Analysis) に供し、散布図として図3に示した。PCA 散布図上では、類似した特性を有する試料が近い位置にプロットされるが、CAS と MBR は異なるグループを形成した。CAS は全試料が一つのグループにまとまっているのに対し、MBR のうち I 処理場は、MBR 9 処理場の形成する典型的なグループからはやや離れた位置に、また B 処

理場はかなり離れた位置にプロットされており、MBR の中でも独特な細菌群集を有していた。ここで、試料採取時のスポット的なデータではあるが、I 処理場は他の MBR と比べて T-N 除去率が低いという処理性能上の特徴があった。また、B 処理場では間欠的に膜ろ過装置と曝気装置を稼働させており、他の MBR とはかなり異なる運転操作を行っていた。これらの操作や処理性能の特徴が細菌群集構造に反映されているとすれば、T-RFLP のような簡易な手法によって MBR の運転状況を把握できることを示唆するものといえ、この知見を今後の技術開発や運転管理に利用できる可能性もある。

##### 炭素源資化性の特徴

Biolog 法で評価した CAS および MBR 汚泥試料の炭素源資化性プロファイルに PCA に供し、散布図を図4に示した。A、F、H、I の4処理場の MBR は CAS と離れた位置にプ

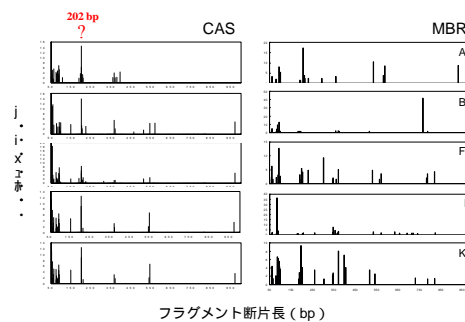


図2 CAS および MBR 由来の活性汚泥試料の T-RFLP 解析。CAS (左) MBR (右)

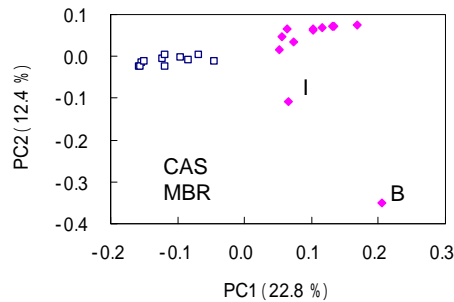


図3 T-RFLP 解析によって評価された細菌群集構造の PCA 散布図

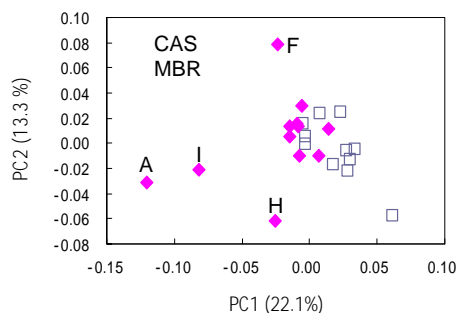


図4 Biolog 法によって評価された炭素源資化性の PCA 散布図

ロットされたが、残りの8つのMBRはCASと概ねオーバーラップするグループとしてプロットされた。これは、細菌群集構造とは異なり、炭素源資化特性に関してはMBR汚泥の多くはCASと類似していることを示している。また、CAS由来の汚泥は殆どが1つのグループを形成し、かなり類似した炭素原資化特性を示したのに対し、MBRの4処理場(A、F、H、I)ではそれぞれ大きく異なっていたことは、MBRにおいてCASとは異なる独特の有機物分解ポテンシャルを有する汚泥が形成され得ることを示唆するものである。

## (2) ラボスケール MBR による難分解性化学物質除去のためのバイオオーグメンテーション

合成下水と4-*t*-BP混合系におけるOMI株の基質分解試験

分解試験におけるDOCおよび4-*t*-BP濃度の経時変化を図5に示す。対照系の初期DOC濃度は168 mg/Lであり、8時間程度のラグ期を経て分解され、27時間後には分解速度が鈍化した。一方、合成下水と4-*t*-BP混合系では、初期のDOC濃度は189 mg/Lであり、4~8時間後にかけて顕著に減少した。4-*t*-BP濃度は、4~12時間後にかけてほぼ一定の速度で減少し、27時間後には検出下限以下となった。以上の結果から、OMI株は易分解性の基質と難分解性有機物である4-*t*-BPを混合した系においても、その分解能力を発現することが明らかとなった。

ラボスケール MBR によるバイオオーグメンテーション

MBRの処理中の4-*t*-BP濃度の変化を図6に示す。汚泥への吸着によるものか、処理開始直後の両MBRの処理水中の4-*t*-BPの濃度は5 mg/L以下であった。オーグメンテーションをしなかった対照系のMBRは、処理水の4-*t*-BP濃度が8~14 mg/Lで変動しており、十分な処理がされていない状態が続いた。オーグメンテーションをしたMBRは、4日経過までは4-*t*-BP濃度が12 mg/Lまで増加したが、7~21日の経過後は処理水から検出(0.1 mg/L)されなくなり、目的の効果が維持された。

### <引用文献>

- 1) Tsutsui, H., Anami, Y., Matsuda, M., Hashimoto, K., Inoue, D., Sei, K., Soda, S., and Ike, M. (2013) Plasmid-mediated bioaugmentation of sequencing batch reactors for enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid removal in wastewater using plasmid pJP4. *Biodegradation*, 24(3), 343-352.
- 2) Soda, S., Takahashi, H., Kagami, T., Miyake, M., Notaguchi, E., Sei, K., Iwasaki, N., and Ike, M. (2012) Biotreatment of selenium refinery wastewater using pilot-scale

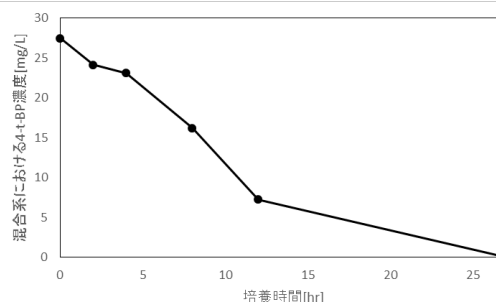
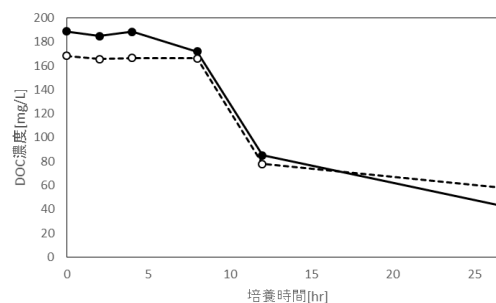


図5 OMI株を培養した混合系(●)および合成下水系(○)におけるDOCおよび4-*t*-BP濃度の経時変化

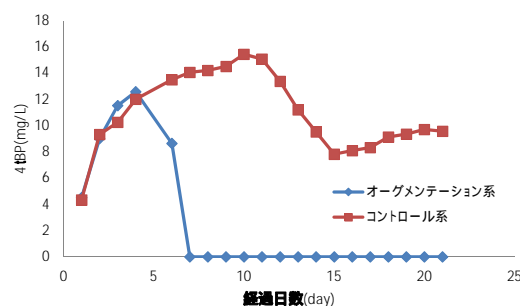


図6 MBRの処理中の4-*t*-BP濃度の挙動(流入水4-*t*-BP濃度20 mg/L, オーグメンテーションした日を0日目に再設定した)

granular sludge and swim-bed bioreactors augmented with a selenium-reducing bacterium *Pseudomonas stutzeri* NT-I. *Japanese J. Wat. Treat. Biol.*, 48(2), 63-71.

- 3) Ogata Y., Goda S., Toyama T., Sei K. and Ike M. (2013) The 4-tert-butylphenol-utilizing bacterium *Sphingomonas fuliginis* OMI can degrade bisphenols via phenolic ring hydroxylation and meta-cleavage pathway, *Environ. Sci. Technol.*, 47, 1017-1023.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Takada, K., Hashimoto, K., Soda, S., Ike, M., Yamahita, K., and Hashimoto, T. Characterization of microbial community in membrane bioreactors treating domestic

wastewater. J. Water Environ. Technol., 12(2), 99-107. 査読有  
doi.org/10.2965/jwet.2014.99

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, 138-144. 査読有.

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(1), 97-104. 査読有  
doi:10.1016/j.jbiosc.2015.12.016

〔学会発表〕(計 10 件)

高田一輝, 橋本くるみ, 惣田訓, 池道彦, 山下喬子, 橋本敏一 (2013) 都市下水を処理する膜分離活性汚泥法の微生物群集構造の解析. 第 50 回下水道研究発表会講演集, pp.322-324. 2013 年 7 月 31 日, 東京ビッグサイト (東京都江東区)

Hashimoto, K., Tsutsui, H., Hamada, H., Sakai, K., Inoue, D., Sei, K., Soda, S., Yamashita, K., Tsuji, K., Hashimoto, T., and Ike, M. (2013) Changes of bacterial community structure in a full-scale membrane bioreactor in Sambo wastewater treatment plant. Proc. of the 5th IWA-ASPIRE Conference, 10F3-3.pdf.2013 年 9 月 9 日 Daejeon Convention Center (Daejeon 韓国)

橋本くるみ, 筒井裕文, 井上大介, 惣田訓, 山下喬子, 辻幸志, 橋本敏一, 池道彦 (2014) 膜分離活性汚泥法を導入した実規模下水処理場における微生物群集の変遷. 第 48 回日本水環境学会年会講演集, p.490. 2014 年 3 月 19 日, 東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市)

高田一輝, 韓成孩, 橋本くるみ, 惣田訓, 池道彦, 槇尾隆志, 中山能成, 宮本博一, 山下喬子, 橋本敏一 (2014) 三宝下水処理場の膜分離活性汚泥法におけるファウリング物質と微生物群集の解析. 第 51 回下水道研究発表会講演集, pp.259-261. 2014 年 7 月 24 日, 大阪アカデミア (大阪府大阪市)

惣田訓, 橋本くるみ, 池道彦, 野引政芳, 笹野浩 (2014) 純酸素曝気法を用いている活性汚泥プロセスの微生物群集構造の解析. 第 51 回下水道研究発表会講演集, pp.1072-1074.258. 2014 年 7 月 24 日, 東京ビッグサイト (東京都江東区)

惣田訓, 中山能成, 槇尾隆志, 宮本博一, 高田一輝, 韓成孩, 橋本くるみ, 池道彦, 山下喬子, 橋本敏一 (2014) 堺市三宝下水処理場の膜分離活性汚泥プロセスにお

けるファウリング物質と微生物群集の解析. 第 51 回環境工学研究フォーラム講演集, 12-14.269. 2014 年 12 月 21 日, 山梨大学 (山梨県甲府市)

高田一輝, 志波俊彦, 韓成孩, 橋本くるみ, 惣田訓, 池道彦, 槇尾隆志, 中山能成, 宮本博一, 山下喬子, 橋本敏一 (2015) 実規模膜分離活性汚泥法における膜表面微生物の解析. 日本水処理生物学会誌別巻, 33, p. 7.273. 2015 年 11 月 12 日, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市)

志波俊彦, 高田一輝, 惣田訓, 池道彦, 三宅将貴, 江口正浩 (2015) ラボスケール膜分離活性汚泥法プロセスのスタートアップにおける微生物群集の解析. 日本水処理生物学会誌別巻, 33, p.28. 2015 年 11 月 12 日, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市)

Soda, S., Takada, K., Ike, M. (2016) Characterization of bacterial community structure related with fouling in membrane bioreactors treating domestic wastewater. The 2nd Workshop on Environment and Energy between Indian Institute of Technology, Hyderabad and Japanese Universities. 2016 年 3 月 10 日大阪大学银杏会館 (吹田市 日本)

惣田訓, 土倉嵩一郎, 黒田真史, 池道彦 (2016) *Sphingobium fuliginis* OMI によるビスフェノール類の分解動力学, 第 50 回日本水環境学会年会講演集, p. 374. 2016 年 3 月 18 日アスティとくしま (徳島県徳島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

惣田 訓 (SODA Satoshi)  
大阪大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号: 30322176

(2) 研究分担者

池 道彦 (IKE Michihiko)  
大阪大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 40222856

黒田 真史 (KURODA Masashi)  
大阪大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号: 20511786