

# 水処理生物膜の解析技術

🔗 生物膜解析, グラニューール, 嫌気性アンモニア酸化細菌

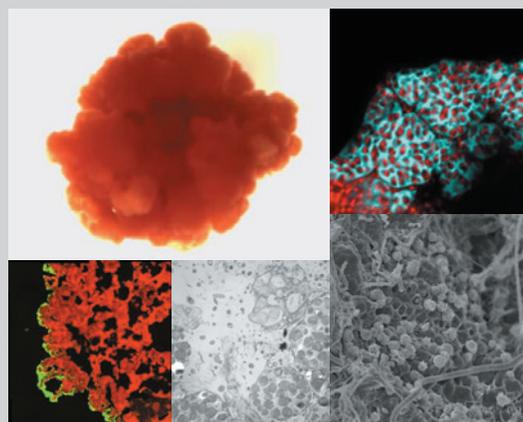
\* 黒住明大 Akihiro Kurosumi

\*\* 福崎康博 Yasuhiro Fukuzaki

## 概要

廃水を微生物の浄化能力を利用して処理する場合、微生物の機能を有効に活用することが重要になる。近年、廃水の高度処理を目指し、廃水処理の主たる浄化機能を担う細菌が形成する生物膜を人工的に制御する試みが注目されており、遺伝子工学や生物化学工学などの異分野と融合した新しい廃水処理技術の研究が進められている。

当社は、廃水処理システムの長期間安定性と処理効率の更なる向上を実現するため、水処理生物膜に関する解析基礎技術の開発と廃水処理システムへの応用研究を行っている。成果の一つとして、嫌気性アンモニア酸化細菌グラニューールの生態学的構造と形成メカニズムに関する情報を得ることができた。



生物膜解析の一例

## 1. ま え が き

生物学的廃水処理システムを長期間安定的に運転し、その処理効率を向上させるためには、廃水処理槽を制御する環境因子パラメータの制御に加え、生物膜の生態学的構造とその機能の解明が必要になる<sup>(1)</sup>。当社は、名古屋大学との共同研究を通じて、生物学的廃水処理の基礎技術として生物膜解析技術を構築し、当社の廃水処理システムへの応用を進めている。

本稿では、生物膜解析技術の応用事例として、当社廃水処理システムで馴養した嫌気性アンモニア酸化細菌生物膜の解析結果を紹介する。

## 2. 生物学的廃水処理

### 2.1 微生物による浄化

廃水処理には、自然の水浄化機能の一部を人工

的に効率よく進行させる生物処理法が広く普及している。生物処理法では、細菌・菌類・原生動物・微小後生動物などの多種多様な微生物が複雑な複合培養系を形成し、有機物などを除去している。

以下に廃水中の有機物摂取メカニズムと微生物同士の関わり合いについて説明する。細菌や菌類は廃水中の有機物を除去し、原生動物は有機物の摂取を行わないが、浮遊している細菌や菌類を摂取する。微小後生動物も原生動物と同様に有機物除去を行わないが、原生動物の死骸や細菌類を摂取する<sup>(2)</sup>。廃水中の有機物除去の主たる役割を担う細菌は、自然環境中では種々の細菌が共生するための生物膜を形成している。この生物膜に菌類・原生動物・微小後生動物が付着・増殖して複合生態系生物膜が構築され、高度な水浄化機能が発揮されている<sup>(3)</sup>。

\*材料技術研究所 \*\*膜・水処理プラント部

## 2.2 生物膜の構造

一般的に生物膜は微生物構造体を指し、微生物及びその間隙や表層を覆う菌体外分泌物から構成される三次元構造を有する。菌体外分泌物には、様々な生体由来分子が含まれており、主要なものとして多糖類やポリペプチド・細胞外核酸などがある<sup>4)</sup>。活性汚泥システムで形成される微生物凝集体（フロック）や嫌気性アンモニア酸化細菌などが形成する自己造粒物（グラニュール）も生物膜の一形態で<sup>6)</sup>、同じ生物膜内でも空間的な場所の違いや時間の経過・環境因子に応じて、生息する微生物種の組み合わせや機能が異なる。生物膜は柔軟性に富んだ多細胞生物体とみなせる<sup>6)</sup>。

## 2.3 分子生物学的手法を用いた生物膜解析

生物膜は分離培養が困難な微生物群で構成される場合が多く、このような複合系微生物の群集解析には、微生物の遺伝子の塩基配列に基づく系統分類解析（菌叢解析）が広く用いられている。この解析結果から、生物膜に存在する微生物の系統的同定と多様性評価を行う。

また、標的とする微生物に共通な遺伝子配列を特定し、色素で標識した遺伝子プローブを作製してin situハイブリダイゼーション（Fluorescence in situ hybridization；FISH解析）を行うことで、標的とする微生物の検出及び空間分布を解析することができる。

生物膜の構成要素である菌体外分泌物については、糖鎖結合蛋白質の結合特異性を用いて多糖成分を解析することができる。

当社は、第1表に示す生物膜解析技術を用いて廃水処理を担う生物膜の解析・評価を行い、生物膜が廃水処理に適した状態を維持できるように、生物膜を取り巻く環境を制御することで、廃水処

第1表 生物膜解析技術一覧

代表的な生物膜解析技術を示しており、解析対象とする生物膜の性状や構成する細菌の種類に合わせて前処理や解析手法を変更する必要がある。

生物膜解析項目	技術詳細
菌叢解析	生物膜を構成する細菌種を遺伝子解析より把握
定量PCR	生物膜に存在する目的の微生物量を定量
FISH解析	生物膜に存在する目的微生物の空間分布状況を把握
菌体外分泌物解析	細菌が分泌した多糖類の種類と生物膜中の分布状態を把握

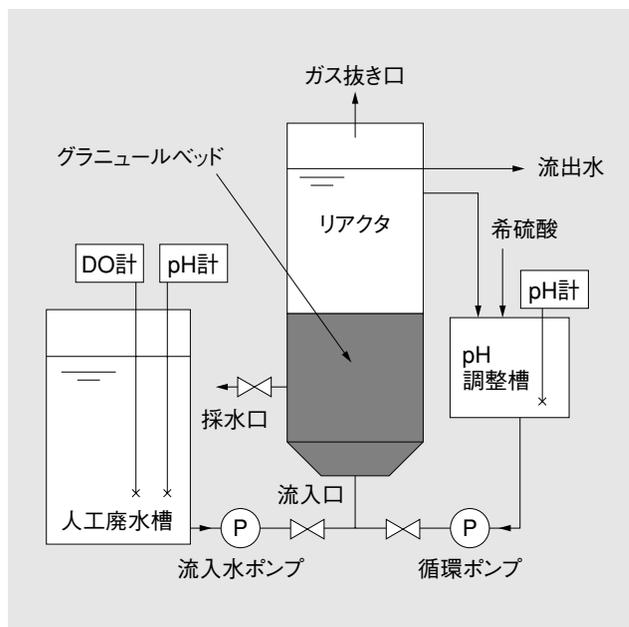
理システムの高度処理化と長期安定運転の実現を目指している。

## 3. 生物膜の解析結果の一例

### 3.1 嫌気性アンモニア酸化細菌グラニュール

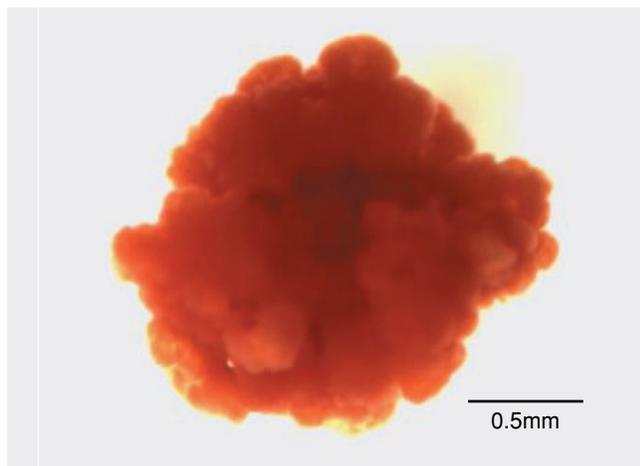
生物膜解析の一例として、嫌気性アンモニア酸化細菌が形成する生物膜（グラニュール）の解析結果を紹介する。独立栄養細菌である嫌気性アンモニア酸化細菌を利用した窒素廃水処理技術は、従来の従属栄養細菌を利用した脱窒素処理に替わる優れた窒素廃水技術として注目されている。嫌気性アンモニア酸化細菌を用いた窒素処理プロセスのメリットとして、従属栄養細菌を利用したプロセスよりもランニングコストを低く抑えられる点と、プラントを小形化できる点などが挙げられる。

第1図に実験に使用した装置の概略図を示す。基質とした合成無機廃水にNH<sub>4</sub><sup>+</sup>とNO<sub>2</sub><sup>-</sup>をリアクタ下部から連続通水した。リアクタは内温度が35℃の条件下で、窒素容積負荷を4.0-6.0kg-N/m<sup>3</sup>/日の範囲に制御した。第2図に本リアクタによって馴養した嫌気性アンモニア酸化細菌グラニュールを示す。嫌気性アンモニア酸化細菌は自ら生成する脱窒ガスにより流動しながら自己造粒し、直径0.2~5mm程度のグラニュールを形成した。画像解



第1図 嫌気性アンモニア酸化細菌グラニュールを用いた廃水処理装置の概略図

人工廃水がリアクタ底部から供給され、嫌気性アンモニア酸化細菌グラニュールが充填したグラニュールベッド内で窒素処理が行われる。人工廃水の流入に伴う上昇流によってグラニュールは常に流動している。



**第2図 嫌気性アンモニア酸化細菌グラニューール**  
 嫌気性アンモニア酸化細菌は赤色の球状のグラニューールを形成する性質を持っている。グラニューールは固液分離性が非常に高く、微生物が高密度で固定化されていることから、廃水処理速度が速いなどの利点を有している。

析ソフトを用いて500個のグラニューールの粒子径を測定し、0.5mmごとの階級に分けて粒度分布を測定した結果、階級が直径1.5-2.0mmが最頻階級であったため、この階級のグラニューールを解析に供した。

**3.2 グラニューールを構成する細菌**

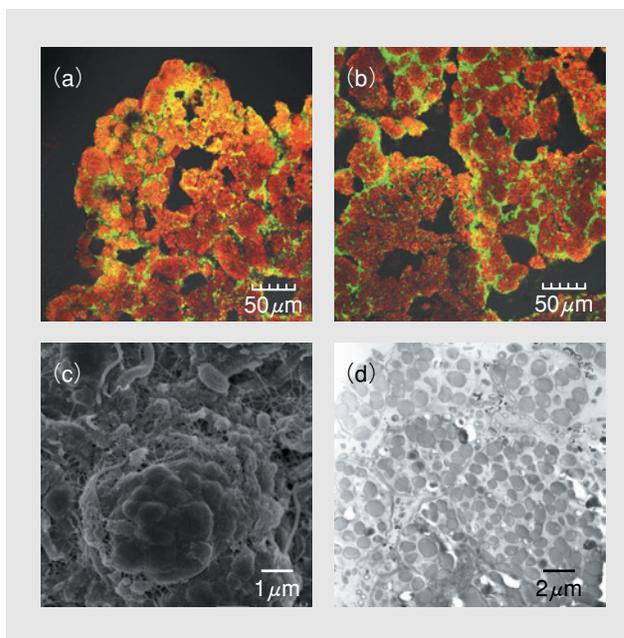
グラニューールを構成する細菌種を把握するため、グラニューールから細菌の遺伝子を抽出し、各細菌の固有遺伝子配列が保存されている領域を解読した。第2表に細菌の遺伝子情報に基づく菌叢解析結果を示す。グラニューールは嫌気性アンモニア酸化細菌であるCandidatus Kuenenia stuttgartiensisのほかに少なくとも9種の細菌から構成されていた。また、定量PCR法によってグラニューールを構成する全細菌の遺伝子量と嫌気性アンモニア酸化細菌の遺伝子量から嫌気性アンモニア酸化細菌の存在割合を算出したところ、約60%が嫌気性アンモニア酸化細菌であった。第1図に示す当社リアクタで馴養したグラニューールでは、嫌気性アンモニア酸化細菌が優先種となっていることから、当社リアクタは嫌気性アンモニア酸化細菌の集積培養に適しており、高速窒素処理が可能なリアクタであることが示唆された。

菌叢解析と定量PCR法は、生物膜からの遺伝子抽出収率が解析結果に大きな影響を与えるため、当社は超音波ホモジナイザ処理と凍結粉碎処理を併用したグラニューールからの遺伝子抽出手法を採用した。超音波ホモジナイザ処理によって生物膜

**第2表 嫌気性アンモニア酸化細菌グラニューールの菌叢解析結果**

相同性が高い細菌をまとめた結果、グラニューールを構成する6つの門にまたがる10種の細菌が検出された。

門	種	相同性(%)
Planctomycetes	Candidatus Kuenenia stuttgartiensis	99~100
	Plancomyces brasiliensis	99~100
	Phycisphaera mikurensis	99~100
Proteobacteria	Zoogloea sp. UNPF89	99~100
	Zoogloea sp. UNPF36	99~100
Chloroflexi	Thermanaerotherix daxensis	93~99
	Belliinea caldifistulae	95~99
Ignavibacteria	Ignavibacterium album	88~95
Bacteroidetes	Rhodothermus marinus	94~99
Armatimonadetes	Fimbriimonas ginsengisoli	95~99



**第3図 嫌気性アンモニア酸化細菌グラニューールの観察・解析画像**

(a)はグラニューールの周辺部、(b)は内部のFISH解析画像であり、両者に顕著な差はなかった。黄色-赤色は嫌気性アンモニア酸化細菌を示し、緑は共生細菌を示す。(c)はグラニューールのSEM(走査型電子顕微鏡)画像であり、中央の球状細菌の凝集体は嫌気性アンモニア酸化細菌凝集体と推察する。(d)はグラニューールのTEM(透過型電子顕微鏡)画像であり、嫌気性アンモニア酸化細菌と推察される球状細菌の凝集体の周囲に共生細菌が存在していた。

中に微生物を分散させ、凍結粉碎処理によって微生物と微生物を覆う菌体外分泌物を分離させることで、遺伝子抽出収率が約15%向上し、さらに解析の阻害物質を含んでいる菌体外分泌物の影響を受けにくくなり、解析制度が向上した。

**3.3 嫌気性アンモニア酸化細菌の分布**

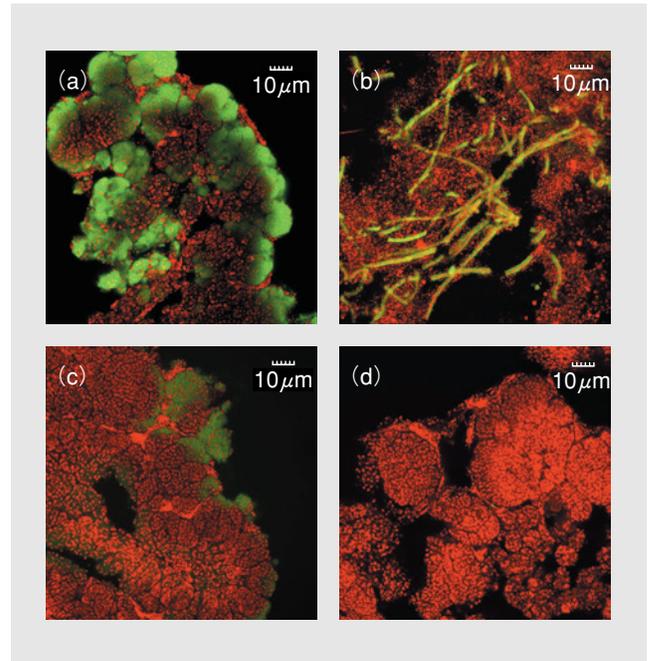
第3図に顕微鏡を用いたグラニューールの観察・解析画像を示す。グラニューールに存在する嫌気性

アンモニア酸化細菌の分布状況を把握するため、凍結切片作製機を用いて厚さ約 $20\mu\text{m}$ のグラニューール切片を切り出し、嫌気性アンモニア酸化細菌検出用遺伝子プローブと細菌検出用遺伝子染色液を用いてFISH解析を行った。(a)及び(b)にFISH解析結果を示す。嫌気性アンモニア酸化細菌はグラニューール内部で数 $\mu\text{m}$ ～数十 $\mu\text{m}$ の凝集体を多数形成しており、さらに凝集体周辺には嫌気性アンモニア酸化細菌と共生する細菌が存在していることが分かった。グラニューールの周辺部と内部でも同様の分布状態であった。(c)に走査型電子顕微鏡によるグラニューール表面観察結果を示す。嫌気性アンモニア酸化細菌と推測する球状細菌が直径 $10\mu\text{m}$ の凝集体を形成しており、その周辺に糸状性菌・球菌・かん菌などの共生細菌が付着していた。(d)に透過型電子顕微鏡を用いたグラニューール内部の観察結果を示す。嫌気性アンモニア酸化細菌が形成したと推察する凝集体の周囲に共生細菌が存在していることを確認した。電子顕微鏡を用いた観察・解析結果から、嫌気性アンモニア酸化細菌は凝集体を形成し、凝集体同士を一部の共生細菌がつなぎ合わせる役割を担っている可能性があり、グラニューール形成の鍵となる共生細菌の存在を確認した。

グラニューール中の嫌気性アンモニア酸化細菌や共生細菌の分布状態を継続的に把握することで、廃水処理システムの処理性能が悪化したときの前駆現象発見や回復運転手法などの運転管理技術の構築につなげる。

### 3.4 糖鎖結合蛋白質を用いた菌体外分泌物解析

糖鎖結合蛋白質は主に植物から抽出され、特定の糖鎖とのみ結合する性質を持っていることから、糖鎖構造解析に利用されている。当社は菌体外分泌物の主成分である多糖類の解析に糖鎖結合蛋白質を利用した。第4図に糖鎖結合蛋白質の結合特異性を用いた菌体外分泌物の解析結果を示す。第3図に示したFISH解析手法と同様にグラニューールから薄切片を切り出し、糖鎖結合蛋白質で菌体外分泌物を染色し、遺伝子結合試薬で細菌を染色した。糖鎖結合蛋白質の種類によって、菌体外分泌物の染色される部分が異なり、グラニューールを構成する菌体外分泌物の主成分はある種の酸性アミノ糖含有物質であることが分かった。この物質



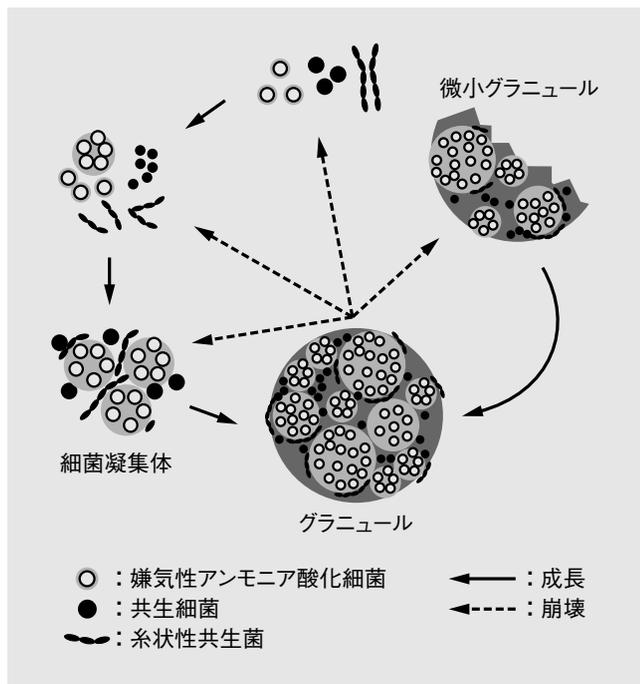
第4図 糖鎖結合蛋白質の結合特異性を用いた菌体外分泌物の解析結果

緑色は糖鎖で赤色は細菌を示し、(a)～(d)はそれぞれ異なる糖鎖結合蛋白質で糖鎖を検出した。

は、嫌気性アンモニア酸化細菌が凝集体を形成するために不可欠な物質である可能性が非常に高く、嫌気性アンモニア酸化細菌の酸性アミノ糖含有物質を合成する代謝経路を活性化させて、嫌気性アンモニア酸化細菌の細胞分裂が活発化し、廃水処理の高速化を目指す。

### 3.5 グラニューール形成メカニズム

生物膜解析や顕微鏡観察解析を応用し、嫌気性アンモニア酸化細菌グラニューールの形成メカニズムの解明に取り組んだ。第5図に種々解析結果から導き出したグラニューールがリアクタ内で形成されるメカニズムを示す。グラニューールは成長と崩壊を繰り返しており、グラニューールが崩壊すると、嫌気性アンモニア酸化細菌・共生細菌・糸状性の共生細菌が放出され、これらが凝集・成長することで再びグラニューールになる。グラニューールは、成長して肥大化すると内部に基質が行き届かず、内部に存在する菌の活性が低下し、生物膜を維持するためのタンパク質や多糖類を分泌できなくなり、崩壊に至ると推測される。また、リアクタ内にはグラニューールの崩壊によって発生した微小グラニューールや細菌凝集体が大量に存在していることが分かり、これらも成長してグラニューールになると推察する。微小グラニューールは全体が菌体外



第5図 嫌気性アンモニア酸化細菌グラニュール形成メカニズム

グラニュールは、嫌気性アンモニア酸化細菌・共生細菌・糸状性共生細菌などから構成されており、これらが凝集して三次元的に成長することでグラニュール化すると考えられる。

分泌物に覆われている状態を示し、細菌凝集体は細菌同士が付着している状態を示す。嫌気性アンモニア酸化細菌を用いた廃水処理設備の立ち上げ段階では、槽内にグラニュールをいち早く高密度化させることが重要になる。このような細菌凝集体や微小グラニュールを槽内に留める措置を施すことで、従来よりも立ち上げに要する期間を短縮できる可能性が示唆された。

#### 4. む す び

当社が開発に取り組んでいる生物膜解析技術を用いた解析事例を紹介した。生物膜解析結果から嫌気性アンモニア酸化細菌が形成する生物膜の生態学的構造と形成メカニズムに関する情報が得られた。

今後は実廃水を用いたパイロットプラントで馴養された水処理生物膜に開発技術を適用し、生物

膜制御・管理手法の構築を通じて、当社廃水処理システムの長期安定運転と処理効率の向上を目指す所存である。

本生物膜解析技術の開発にあたり、ご指導ご助言をいただいた名古屋大学 堀克敏教授に深く感謝する次第である。

・本論文に記載されている会社名・製品名などは、それぞれの会社の商標又は登録商標である。

#### 《参考文献》

- (1) Okabe S., et al. : Proc. Of Environmental Engineering Research, Vol.33, 1996, pp.103-114.
- (2) 橋本奨ほか：新しい活性汚泥法，産業用水調査会，1986，pp1-40.
- (3) Sudou. R., et al. : 農芸化学会誌，Vo.52, No.2, 1978, pp.9-20.
- (4) 森川正章：生物工学会誌，Vol.90, No.5, 2012, pp.246-250.
- (5) Harada. H., et al. : Journal of Environmental Biotechnology Vol.4, No.1, 2004, pp.19-27.
- (6) McDougald. D. et al. : Nat. Rev. Microbiol., Vol.10, No.1, 2011, pp.39-50.

#### 《執筆者紹介》



黒住明大 Akihiro Kurosumi  
水処理生物膜解析の研究・開発に従事



福崎康博 Yasuhiro Fukuzaki  
水処理システムの研究・開発に従事