

平成 31 年 4 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05535

研究課題名(和文)クオラムセンシングに着目したMBR法におけるバイオフィウリング形成機構の解明

研究課題名(英文)Understanding of biofouling formation focusing on quorum sensing in a MBR process

研究代表者

本多 了(Honda, Ryo)

金沢大学・地球社会基盤学系・准教授

研究者番号：40422456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、極性 分子量2次元マトリクスによるバイオポリマー分析により、MF膜では70-200kDaのバイオポリマーが膜内部でのファウリングを引き起こしていることを明らかにし、クオラムセンシング阻害剤であるバニリンを添加することで、これらの比較的低分子のバイオポリマーが減少し、膜ファウリングの進行を顕著に抑制できることが明らかになった。また、FTMSを用いたAHL分析により、活性汚泥中には複数種のオートインデューサー(AHL)が存在し、嫌気条件の存在がAHL濃度の上昇に影響していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜ろ過を用いた下水処理プロセスは、水資源保全のための水再利用や、河川上下流での間接飲用再利用における再生水の品質向上に重要であるが、膜ファウリング(いわゆる目詰まり)の洗浄に伴うエネルギー消費と運転コストの削減が国内での普及促進の課題の一つである。本研究では、膜ファウリングの原因となるバイオポリマーの特徴を明らかにするとともに、微生物阻害剤であるバニリンを添加することで、膜ファウリングの進行を顕著に抑制できること、そのメカニズムを明らかにした。このメカニズムを応用することで、膜ろ過を用いた下水処理プロセスにおけるエネルギー消費と運転コストの大幅な削減が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Size-polarity matrix analysis of biopolymer revealed that EPS of 70-200kDa size caused irreversible fouling in the interior of MF membrane. Vanillin, a quorum sensing inhibitor, could mitigate membrane fouling in MBR remarkably by reducing this size of EPS. Autoinducer analysis by FTMS revealed that activated sludge had diverse AHL species.

研究分野：環境工学

キーワード：膜ろ過 バイオポリマー 廃水処理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一部の細菌は、自身が産生する情報伝達物質の濃度によって同種の細菌の生息密度を感知 (=クオラムセンシング) し、ある一定の生息密度になると菌体外バイオポリマーを生成し始めバイオフィルムを形成することが知られている。膜分離活性汚泥法 (MBR) における膜ファウリングにおいても、活性汚泥微生物によるクオラムセンシングが膜ファウリングの進行に一定の影響を与えているという報告がされはじめた。しかし、その具体的なメカニズムはまだ分かっていない。具体的には、膜ファウリングの原因とされているバイオポリマーのどの成分がクオラムセンシングの制御によって影響を受けているのか、また、多種の情報伝達物質のうち、活性汚泥にはどのようなものが存在しているのか、を知ることが、MBR 法においてクオラムセンシングが膜ファウリングの原因に与える影響とそのメカニズムを理解するために必要である。

2. 研究の目的

MBR 法においてクオラムセンシングが膜ファウリングの原因に与える影響とそのメカニズムを理解するために、次のことを明らかにすることを目的とした。

- (1) 膜ファウリングの主要な原因となるバイオポリマー成分
- (2) クオラムセンシングと(1)で特定したバイオポリマー成分の挙動との関係
- (3) 活性汚泥微生物が産生する情報伝達物質
- (4) 情報伝達物質に応答してバイオフィルムを引き起こす微生物群の特定

3. 研究の方法

- (1) 膜ファウリングの原因となるバイオポリマー成分の特定

MBR リアクターの運転

実験室規模の浸漬型 MBR リアクターを用いて模擬下水の連続処理実験を行った。ろ過膜には、塩素化 PE 製 MF 平膜 (クボタ製) と PVDF 製 MF 中空糸膜 (三菱ケミカル社製) をそれぞれ用いた。模擬下水の TOC 濃度は 350 mg/L、HRT は 6 時間、SRT は MLSS 5000 mg/L を目標としておよそ 15 日で運転した。膜ファウリングの進行は膜間差圧と透過流束より透水性能の低下を評価した。

ファウリング物質の分析

バルク汚泥およびケーキ汚泥から分画・抽出した EPS を試料として、EPS 量 (VS)、多糖類 (フェノール硫酸法)、タンパク (ローリー法)、3 次元励起蛍光マトリクスによる分析を行った。また、逆相 LC による EPS のピークを分取し、ピークごとの分子量分布をサイズ排除 (SEC) LC にて得た。逆相と SEC のそれぞれの保持時間を x、y 軸にとって、EPS の極性-分子量分布を 2 次元マトリクス上にプロットした。

また、ファウリングしたろ過膜を樹脂包埋して薄片を作成して、透過型電子顕微鏡 (TEM-EDX) によって膜表面と内部におけるファウリング物質の分布を観察した。

- (2) クオラムセンシング阻害剤添加によるバイオポリマー成分と微生物群集構造の変化

バニリンを添加した MBR リアクターの運転とバイオポリマー分析

(1) の模擬下水処理水に、クオラムセンシング阻害剤としてバニリン 250mg/L を添加して、同様の運転条件で MBR リアクターを運転し、バイオポリマーの組成分析を行った。(1) を対照系 (2) をバニリン添加系として、バニリン添加によるバイオポリマーの組成変化を比較した。

微生物群集構造解析

バルク汚泥とケーキ汚泥から DNA を抽出し、16SrRNA V3-V4 領域を対象とした次世代シーケンス解析を行い、(1) の対照系、(2) のバニリン添加系による微生物群集構造の変化を比較した。

- (3) 活性汚泥微生物が産生する情報伝達物質の分析

実下水処理場から採取した活性汚泥 900mL を等量の酢酸エチルを用いて溶媒抽出をおこなった。蒸発濃縮した抽出液をアセトニトリルに溶解し、フーリエ変換型質量分析計を用いて、実際の下水汚泥が産生する N-アシルホモセリンラクトン (AHL) の種類と濃度を測定した。また、同時に(2)と同様の方法で微生物群集構造解析を行い、AHL 組成との関係を比較した。

4. 研究成果

- (1) 膜ファウリングの主要な原因となるバイオポリマー成分

汚泥から抽出した EPS の極性-分子量マトリクス分析より、70-200 kDa の親水性 LB-EPS がバルク汚泥に存在するが、ケーキ汚泥と透過水には存在していないことが分かった (図 1)。このことから、この LB-EPS は、ろ過膜内部に不可逆ファウリングを引き起こしている可能性が示唆された。また、TEM-EDX によるファウリング物質の可視化を試行した結果、ファウリング膜では Ca が不規則に観察され (図 2)、二価イオンによる膜と EPS の架橋が起こっていることが示唆された。しかし、EPS の校正元素には C、H、O、N など軽い元素が多く、TEM 観察及び EDX 分析においてその分布を明白に可視化することはできなかった。

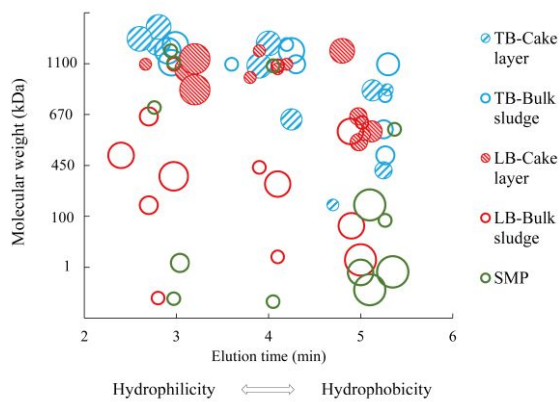


図1 バルク汚泥とケーキ汚泥から分画抽出したEPSの極性分子量マトリクス (J. Water. Environ. Technol. 16(1): 40-53)

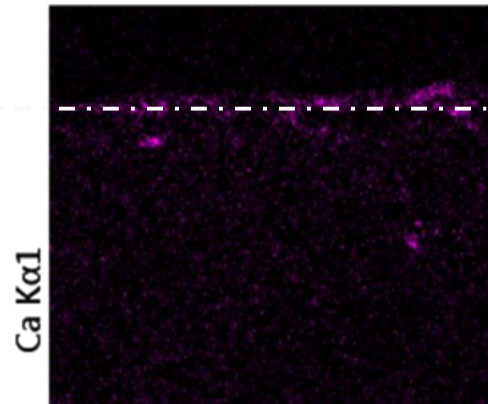


図2 ファウリング膜の TEM-EDX による Ca の分布. 点線は おおよその膜面の位置。

(2) バニリン添加による膜ファウリングの抑制とそのメカニズム

クオラムセンシング阻害剤であるバニリン添加により、膜ファウリングの進行が顕著に抑制された(図3)。また、バニリン添加による膜ファウリングの進行抑制効果は、塩素化 PE 製 MF 平膜と PVDF 製 MF 中空糸膜のいずれの場合も顕著であり、膜素材に依存しなかった。

バルク汚泥の MLSS とバイオポリマー (EPS) 量はバニリン添加による有機物負荷の上昇により増加したが、汚泥 MLSS あたりの EPS 生産量は変化がなかった。極性-分子量 2 次元マトリクスによる EPS 組成分析を行ったところ、バニリン添加系では 250kDa 以下の EPS が抑制されており(図4)、分子量が大きい EPS が卓越することによってファウリング層のろ過抵抗が小さくなったことが考えられた。

バルク・ケーキ汚泥の微生物群集構造解析をおこなったところ、クオラムセンシング関連微生物については、その割合は増加・減少の一定した傾向が見られなかった。原因としては、クオラムセンシング関連微生物の存在割合が小さいこと、存在割合よりも代謝の大小の影響が大きいこと、バニリンの阻害はクオラムセンシングよりはバイオポリマー自体の代謝への影響が尾大きい、などの原因が考えられた。また、PE 製平膜を用いた実験では EPS 分解細菌の減少が見られたが、PVDF 膜での実験においては、顕著なちがいは見られなかった。

以上のことから、バニリン添加による膜ファウリングの抑制の直接的な原因は、低分子バイオポリマーの抑制によってファウリング層のろ過抵抗が減少したためと考えられた(図5)。低分子バイオポリマーの抑制は、EPS 分解細菌の阻害が一因となっている可能性が示唆されたが、それ以外の可能性も排除できなかった。

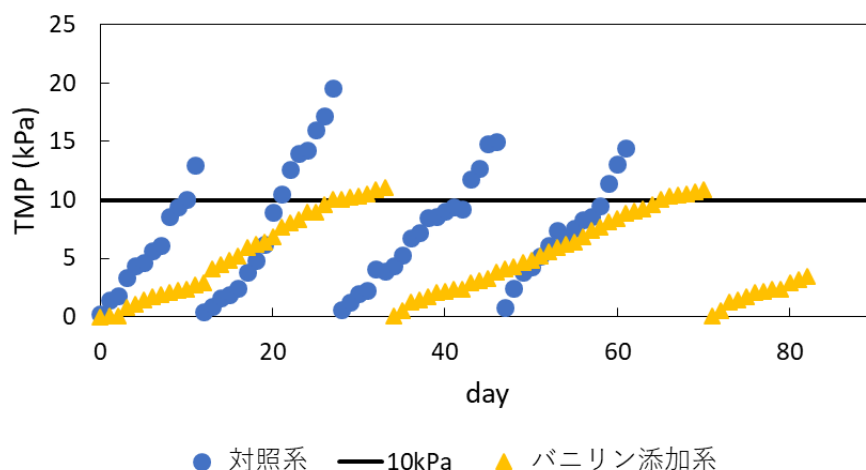


図3 バニリン添加系と対照系における膜間差圧の継時変化 (PVDF 膜の場合)

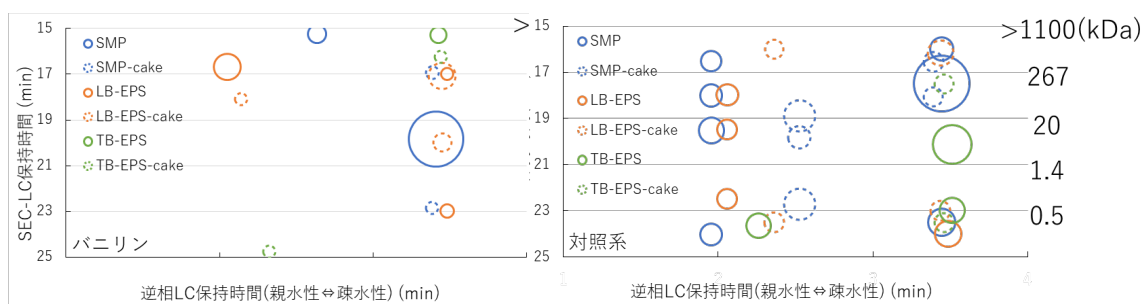


図4 バニリン添加系(左)と対照系()における汚泥EPSの極性分子量マトリクス

(3) 活性汚泥微生物が産生する情報伝達物質と微生物群集との関係

計3か所の実下水処理場から採取した15の活性汚泥試料のうち,11試料から3OH-C8-HSLと3OH-C10-HSLが検出された。また,濃度範囲は0.1~1.6 ng/Lであり,これに汚泥に試料によって大きく幅があった。16S rRNAに基づく微生物群集構造と検出されたAHL種・濃度間に有意な相関は見られなかった。

表1 LC-FTMSで検出された活性汚泥のAHL

WWTP	C4-HSL	C6-HSL	C7-HSL	C8-HSL	C10-HSL	C12-HSL	3OH-C8-HSL	3OH-C10-HSL
A (July)	<10.3	<1.3	<1.4	<1.9	<1.3	<2.3	<0.88	<0.25
A (Oct)	<29.3	<3.7	<3.9	<5.3	<3.6	<6.4	<2.5	<0.70
A (Jan)	<15.0	<1.9	<2.0	<2.7	<1.8	<3.3	1.58	<0.36
A (May)	<4.5	<1.7	<1.8	<2.4	<0.54	<1.0	1.62	0.19
B (July)	<8.5	<1.1	<1.1	<1.5	<1.03	<1.9	0.74	<0.20
B (Jan1)	<4.5	<1.7	<1.8	<2.4	<0.54	<1.0	0.26	0.05
B (Jan2)	<4.5	<1.7	<1.8	<2.4	<0.54	<1.0	0.24	0.08
B (Jan3)	<4.5	<1.7	<1.8	<2.4	<0.54	<1.0	0.20	0.08
B (May)	<4.5	<1.7	<1.8	<2.4	<0.54	<1.0	0.79	<0.11
C (July)	<5.5	<0.69	<0.74	<1.0	<0.67	<1.2	0.23	<0.13
C (Dec)	<4.5	<1.7	<1.8	<2.4	<0.54	<1.0	0.11	<0.11
C (Jan)	<4.5	<1.7	<1.8	<2.4	<0.54	<1.0	0.09	<0.11
C (Apr1)	<5.5	<2.1	<2.2	<3.0	<0.67	<1.2	<0.47	<0.13
C (Apr2)	<4.5	<1.7	<1.8	<2.4	<0.54	<1.0	<0.38	<0.11
C (Apr3)	<4.5	<1.7	<1.8	<2.4	<0.54	<1.0	0.18	<0.11

Note: The values in italic indicates that the concentration was under detection limit

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

1. Ryo Honda*, Phun-Thanh Phan, Tomohiro Tobino, Sirilak Prasertkulsak, Smarch Panchavinin, Phuc-Nguon Hong, Chanreaksmey Taing, Mana Noguchi, Wilai Chiemchaisri, Chart Chiemchaisri (2019) Diversity of N-acyl homoserine lactones in activated sludge detected by Fourier transform mass spectrometry. npj Clean Water (accepted) DOI: 10.1038/s41545-019-0035-0
2. Phuc-Nguon Hong, Chanreaksmey Taing, Phuong-Thanh Phan, Ryo Honda* (2018) Polarity-Molecular Weight Profile of Extracellular Polymeric Substances in a Membrane Bioreactor: Comparison between Bulk Sludge and Cake Layers. J. Water Environ. Technol. 16(1), 40-53. DOI: 10.2965/jwet.17-020 【WET Excellent Paper Award 受賞】
3. Phuc-Nguon Hong, Ryo Honda*, Mana Noguchi, Tomohiro Ito (2017) Optimum selection of extraction methods of extracellular polymeric substances in activated sludge for effective extraction of the target components. Biochem. Eng. J. 127, 136-146. DOI: 10.1016/j.bej.2017.08.002

[学会発表](計 7件)

1. Smarch Panchavinin, Ryo Honda*, Tomohiro Tobino, Sirilak Prasertkulsak, Hiroe Hara-Yamamura, Wilai Chiemchaisri, Chart Chiemchaisri (2018) Relation of quorum sensing signal molecules with microbial community in activated sludge. Proceedings of the International Conference on Challenges in Environmental Science & Engineering, Bangkok, November 4-8, 2018.

2. Phuc-Nguon Hong, Chanreaksmey Taing, Phuong-Thanh Phan, Ryo Honda (2017) Comparison of extracellular polymeric substances between bulk sludge and cake layers in a membrane bioreactor by polarity-molecular weight profiling. Proceedings of Water and Environment Technology Conference 2017, Sapporo, July 22-23, 2017.
3. Chanreaksmey Taing, Hong Nguon Phuoc, Mana Noguchi, Ryo Honda (2017) Effects of vanillin on characteristics of extracellular polymeric substances and treatment performance in a conventional activated sludge process. Proceedings of Water and Environment Technology Conference 2017, Sapporo, July 22-23, 2017.
4. Phuc Nguon Hong, Tomohiro Ito, Mana Noguchi, Ryo Honda (2016) Effects of acyl homoserine lactone on extracellular polymeric substances and microbial community in activated sludge under different aeration condition. Proceedings of IWA Microbial Ecology in Water Engineering and Biofilm Joint Specialist Conference 2016, Copenhagen, September 4-7, 2016.
5. 相澤 涼, Hong Phuc Nguon, 高橋 秀栄, 原(山村) 宏江, 本多 了 (2019) PVDF 膜を用いた膜分離活性汚泥法におけるバニリン添加による膜ファウリング抑制メカニズム. 第 53 回日本水環境学会年会講演集, 甲府, 2019 年 3 月 7-9 日.
6. 吉田 光輝, Phuc-Nguon Hong, Smarch Panchavinin, 飛野 智宏, 松浦 哲久, 本多 了 (2018) 膜分離活性汚泥法におけるバニリンによるクオラムセンシング阻害の処理性能への影響と膜ファウリング抑制効果. 第 52 回日本水環境学会年会講演集, 札幌, 2018 年 3 月 15-17 日. 【学生ポスター発表賞 受賞】
7. 本多 了, Thanh Phan Phuong, 飛野 智宏, Hong Nguon Phuc, 野口 愛 (2016) フーリエ変換型質量分析装置 (FT-MS) を用いた活性汚泥中の N-アシルホモセリンラク톤の検出. 第 53 回環境工学研究フォーラム講演集, 北九州, 2016 年 12 月 6-8 日, p.24.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。