

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16233

研究課題名(和文) 水処理膜の完全性を脅かすバイオフィルムのリアルタイムイメージング

研究課題名(英文) Real-time imaging of fouling-related biofilm in wastewater treatment

研究代表者

稲葉 知大 (Inaba, Tomohiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・環境管理研究部門・研究員

研究者番号：90760439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：限られた水資源を持続的に利用していく上で廃水処理は非常に重要である。水処理再生技術として膜分離活性汚泥法(Membrane Bioreactor 法:MBR 法)処理後に逆浸透膜(RO 膜)を用いた処理を行う MBR-RO システムが注目されている。MBR-ROシステムでは膜閉塞(膜ファウリング)は避けることのできない問題であり、膜ファウリングの抑制・制御は当該技術による水処理再生における最も重要な課題である。今回我々は共焦点反射顕微鏡法を用いたバイオフィルムの非破壊観察と、次世代シーケンシングによる微生物の大規模同定技術とを組み合わせ、新たな膜ファウリング機構を発見した。

研究成果の概要(英文)：In recent years, global water shortages have become more serious and the need for reclaimed water is rapidly rising. By the membrane bioreactor (MBR)-reverse osmosis (RO) membrane method, high-quality reclaimed water can be obtained, but the clogging of water treatment membrane, called membrane fouling, is the most serious problem in MBR-RO system. Although the details of the mechanism of the membrane fouling are still unknown, microbial aggregates, i.e. biofilms, are considered to be one major cause of membrane fouling. In this study, the structure of fouling related biofilm was investigated using non-destructive confocal reflection microscopy and high-throughput sequencing of 16S rRNA genes. The results of combined analysis demonstrated that the architectures, chemical components and microbiomes of the biofilms on fouled membranes were tightly associated with one another and differed considerably depending on the organic loading conditions.

研究分野：微生物学

キーワード：バイオフィルム バイオフィアウリング 水処理再生

1. 研究開始当初の背景

限られた水資源を持続的に利用していく上で廃水処理は非常に重要である。近年はより直接的な廃水の再利用のため、活性汚泥法に膜処理過程を組み合わせた膜分離活性汚泥法(Membrane Bioreactor 法:MBR 法)処理後に逆浸透膜(RO 膜)を用いた処理を行う MBR-RO システムが注目されている。

本システムでは水処理膜が処理の中核を担っており、その閉塞(ファウリング)が喫緊に解決すべき最も深刻な課題である。ファウリングの発生原因は膜表面での微生物の増殖(バイオフィーム形成)であるとされるが、その原因微生物が何であるのか、また何に由来するのかなどファウリング発生機構には不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では申請者独自のリアルタイム観察技術「連続最適化共焦点反射顕微鏡法(COCRM 法)」と最先端の大規模微生物解析技術を融合した解析により技術的困難を打破し、これまでに不明であった水処理膜上の微生物の振る舞いと処理膜の完全性、ファウリングへの影響を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

水処理膜上でのバイオフィーム形成の過程を、その原因微生物のリアルタイム観察と高感度同定から解明し、それらが膜に与える影響を評価する。水処理膜上のバイオフィーム観察に共焦点反射顕微鏡法を適用し最適化することで、水処理膜へのバイオフィーム形成過程の全貌を可視化し、さらに膜表面への影響を評価する。加えてバイオフィーム形成の“主犯”微生物を特定するため、バイオフィームおよび処理水(MBR 処理後の水)において、次世代シーケンサーを用いた大規模遺伝子解析を COCRM 法の相補技術として行っていく。最終的にバイオフィーム形成を主導する微生物を特定し、膜閉塞の発生これらの解析を通して、膜の完全性を維持し、閉塞を抑制・制御するための基礎的な知見を蓄積する。

4. 研究成果

まずはじめに、MBR-RO システムにおいて前段処理となる MBR について、ファウリング発生機構の解析を行った。有機物濃度の異なる、2 種類の人工的に廃水を模擬したモデル廃水を用いて MBR システムを連続運転し、ファウリングを発生させた。これらのモデル廃水によるファウリングの過程を調べるため、共焦点反射顕微鏡法によって水処理膜上のバイオフィームを非破壊で可視化したところ、高負荷時にはファウリングの進行度とバイオフィームの厚みに正の相関が観察された。一方、低負荷時には明らかな相関が見られず、ファウリングの機構が一様でな

いことを可視化により示した。さらに、膜閉塞の原因物質を特定するため、蛍光プローブを使用して細胞に由来する高分子ごとに可視化したところ、低負荷時には多糖類が、高負荷時には脂質が主要な構成成分として検出された(図1)。

黄色:多糖 / 青色:脂質 / ↓

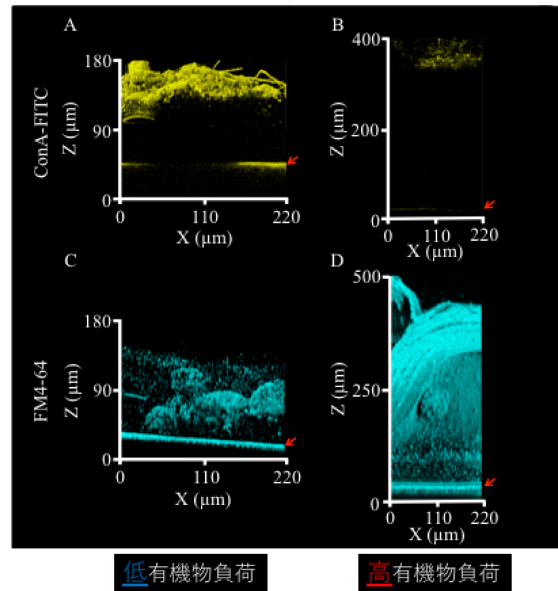


図1 バイオフィーム中の細胞由来高分子

さらに次世代シーケンサーによりバイオフィーム中の微生物を大規模に同定した結果、人工下水中の有機物濃度の違いにより、バイオフィームを構成する主要な微生物種が異なることが分かった。低有機物負荷時には高有機物負荷時には、*-Proteobacteria* 網に属するバイオフィーム菌類として知られる *Pseudomonas* 属細菌などが主要な微生物種であることが明らかになった。高有機物負荷時においても同様に、*-Proteobacteria* 網の *Pseudomonas* 属細菌が主要な微生物種であった(図2)。

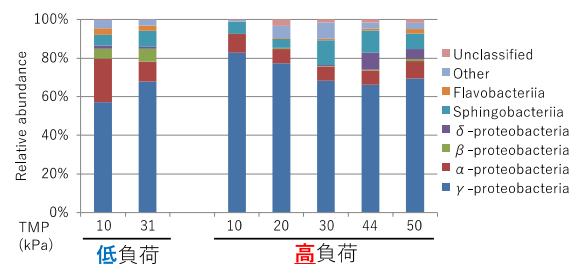


図2. バイオフィームを構成する微生物の存在割合

しかし高有機物負荷時にファウリングが過度に上昇すると、*Pseudomonas* 属細菌の細胞質を摂取し、細胞膜脂質を食べ残す性質を持った *-Proteobacteria* 網に属する細菌食性の *Bdellovibrio* 属細菌が増加していることが明らかとなった。これらの結果から、共焦点顕微鏡で観察されたように高負荷時の

バイオフィームに蓄積された脂質は、菌食性細菌に捕食された微生物の死細胞膜脂質に由来することが強く示唆された。このような水処理膜上での微生物の振る舞いは、本研究により世界で初めて報告されたもので、バイオフィーム中の異種細菌間の捕食被食関係が膜閉塞を直接的に引き起こすという新たなモデルを提唱するに至った(図3)。

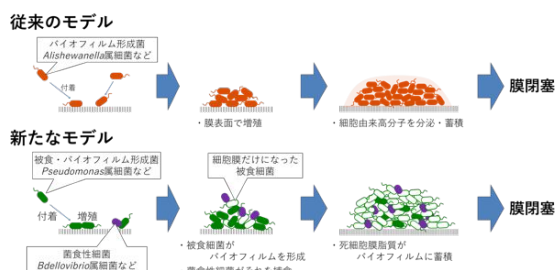


図3. ファウリング発生機構の概略図

この成果は、旧来より支持されてきた、微生物の単純な増殖によるファウリング発生モデルのみではなく、水処理膜上に存在する微生物の生理や生態がファウリングに重要であることを明らかにした。

実際の排水を使用した実験においても同様の結果を得ることに成功した。多量の窒素を含む高濃度有機性廃水である畜産廃水を用いた MBR 処理においては、モデル廃水を凌ぐ高有機物負荷での運転となった。この運転時に 16S rRNA 遺伝子解析を行うと、ファウリングの発生した状態では *Pseudomonas* 属や *Clostridium* 属に属する細菌などがリアクター内で優占した。さらに、ファウリングが急速に進行する状態では *-Proteobacteria* 綱に属する菌食性の *Enhygromyxa* 属や *Nannocystis* 属細菌が優占し、上記の新ファウリングモデルが実際の廃水処理においても起こる可能性があることを示唆した。さらに広範な微生物を対象にファウリングの発生機構をを調査するため、真核生物を対象とした 18S rRNA 遺伝子解析を行った。その結果、真核微生物叢も同様にファウリングの状態と関連して、捕食対象の異なる原生・後生動物の優占度に差異が見られた。一例を挙げると、ファウリングが抑制されているような状況下では、バイオフィーム形成細菌を捕食する原生動物が増加した。一方でその後ファウリングを誘導する条件へと誘導を行うと、上記の原生動物を捕食する、別の原生動物が増加し細菌食性の原生動物の減少が見られた。これらの結果は実際の処理現場における微生物間相互作用がファウリングの発生に関与している可能性を示唆するものである。

上述の成果は、水処理膜のファウリング発生機構が一樣ではなく、多種多様な微生物が関係する複雑な相互作用(捕食-被捕食など)の結果生じる現象であることを強く示唆した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

稲葉 知大、堀 知行、佐藤 由也、青柳 智、花島 大、尾形 敦、羽部 浩、Eukaryotic Microbiomes of Membrane-Attached Biofilms in Membrane Bioreactors Analyzed by High-Throughput Sequencing and Microscopic Observations, *Microbes and Environments*、査読有、33(1)、2018、98-101

DOI: 10.1264/j sme2.ME17112

稲葉 知大、堀 知行、Ronald R. Navarro、尾形 敦、花島 大、羽部 浩、Revealing sludge and biofilm microbiomes in membrane bioreactor treating piggery wastewater by non-destructive microscopy and 16S rRNA gene sequencing、*Chemical Engineering Journal*、査読有、331、2017、75-83

DOI: 10.1016/j.cej.2017.08.095

稲葉 知大、堀 知行、愛澤 秀信、尾形 敦、羽部 浩、Architecture, component, and microbiome of biofilm involved in the fouling of membrane bioreactors、*npj Biofilms and Microbiomes*、査読有、3(5)、2017、1-8

DOI: 10.1038/s41522-016-0010-1

稲葉 知大、生体・環境におけるバイオフィームの意義 水処理プロセスにおけるバイオフィーム、臨床と微生物、査読無、45(1)、2018、39-43

ISBN978-4-87402-240-5

稲葉 知大、誰が膜を詰まらせるのか?、*生物工学会誌*、査読無、95 (4)、2017、204

https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9504/9504_biomedica_2.pdf

〔学会発表〕(計 6 件)

稲葉 知大、堀 知行、Navarro R Ronald、尾形 敦、花島大、羽部 浩、畜産廃水処理 MBR の安定化に関する汚泥中および分離膜上の微生物群集、第 51 回日本水環境学会年会、熊本県、2017

稲葉 知大、水処理再生と微生物の凝集、稲葉 知大、筆頭・登壇、界面動電現象研究会 2016 年サマースクール、招待講演、茨城県、2016

稲葉 知大、水処理再生技術とバイオフィルム, 稲葉 知大, 筆頭・登壇, 「産業化に向けたバイオフィルム研究とクオラムクエンチング酵素工学」セミナー, 招待講演、東京都、2016

稲葉 知大、堀 知行、Navarro R Ronald、愛澤 秀信、尾形 敦、羽部 浩, The Membrane Fouling Biofilm: An Extreme Environment in Wastewater Treatment and Reclamation, 11th International Congress on Extremophiles, 京都、2016

稲葉 知大、堀 知行、高橋秀彰、Navarro R. Ronald、松尾和幸、羽部 浩、花島大、尾形 敦, MBR による畜産廃水処理の安定化に關与する微生物群集の解析, 第 50 回日本水環境学会年会, 徳島、2016

稲葉 知大、堀 知行、愛澤 秀信、Navarro R Ronald、尾形 敦、羽部 浩, Divergence of the biofilm architecture, component and microbiome involved in the fouling of membrane bioreactors, 日本微生物生態学会第 31 回大会, 神奈川県、2016

〔その他〕

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/emri/114envmicrob/index.html>

プレス発表

「活性汚泥による水処理膜の閉塞を新たな手法で解析」

http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2017/pr20170223/pr20170223.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 知大 (INABA, Tomohiro)
産業技術総合研究所・環境管理研究部門・
研究員
研究者番号: 90760439