

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：16KK0146

研究課題名（和文）微生物間情報伝達に起因するバイオポリマー付着を引き起こす濾過膜表面ケミストリー（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Understanding of membrane surface chemistry on adhesion of biopolymers produced by microbial quorum sensing(Fostering Joint International Research)

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） 10,800,000円

渡航期間： 7ヶ月

研究成果の概要（和文）：汚泥のバイオポリマー付着により濾過膜表面の物理化学特性が膜目詰まりに与える影響を明らかにした。バイオポリマーによる膜面汚染により、精密濾過(MF)膜では電子受容性が増加し、バイオポリマーなどの有機物との親和性が高くなっていることが示唆された。また、定圧濾過によって微生物の膜面付着と多糖類の産生が促進されるメカニズムを明らかにした。また、バニリン添加による分子量分布の変化が膜目詰まりを抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、MBR法における膜目詰まりの進行に与えるバイオポリマーの影響について、実際の汚泥バイオポリマーにおいて、膜面とバイオポリマーに働く拡張DLVO力と透過水流の関係から説明することができた。また、膜面へのバイオポリマーや微生物付着が膜ファウリングに正のフィードバックを持つ可能性を明らかにした。これらの成果により、効率的な処理プロセスの運転の実現に向けたMBR法における膜ファウリングの進行を緩和する対策や濾過膜の開発につなげることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study investigated effect of membrane contamination with biopolymers on surface tension parameters of the membrane surface. Contamination of membrane surface with biopolymer possibly make MF more adhesive to biopolymers by increase of electron receptivity. Constant TMP operation enhances biofouling by stimulating initial adhesion of microbial cells and production of polysaccharides. Dose of vanillin mitigates biofouling by changing molecular size distribution of biopolymers.

研究分野：環境工学

キーワード：膜ろ過 バイオポリマー 拡張DLVO理論

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜分離活性汚泥法(MBR)では活性汚泥中の微生物が生成する高分子物質(=バイオポリマー)によって引き起こされる膜ファウリングによる透水性能低下の制御が重要となる。基課題において、極性分子量マトリクスによるバイオポリマー組成分析により、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可能性を明らかにした。また、クオラムセンシング阻害剤として報告があるバニリンを添加することで、膜ファウリング抑制が顕著に抑制されることが確認された。濾過膜の目詰まりの抑制には、原因となるバイオポリマー成分が付着しにくい濾過膜素材の選択が重要となる。

カリフォルニア大学ロサンゼルス校の Eric Hoek らの研究グループは、ウシ血清アルブミンやアルギニン酸をモデル物質として用いた実験で、濾過膜にバイオポリマーが付着することで膜表面特性が変化し、バイオポリマーの種類によっては、膜バイオポリマー間の吸着、膜表面に付着したバイオポリマーとバルク内のバイオポリマー間の相互吸着が促進されることを拡張 DLVO 理論による表面自由エネルギーの変化を用いて理論的に説明した。

しかし、基課題で明らかになったように、実際の MBR で生成されるバイオポリマーは、多くの高分子物質の複合体であり、その組成は微生物の種構成や生育条件、クオラムセンシングによる微生物情報伝達の阻害などによって変化しうる。しかし、実際の汚泥に含まれるバイオポリマーによる膜面汚染によって膜表面の物理化学特性がどのように変化するかについての知見は限られている。また、その膜表面特性の変化によって膜面付着微生物群集が変化しうるかについてもいまだ未知である。

2. 研究の目的

本研究では、汚泥のバイオポリマー付着により濾過膜表面の物理化学特性が膜目詰まりに与える影響を理解するため、次のことを明らかにすることを目的とした。

- (1) 汚泥バイオポリマーの付着による濾過膜の表面の物理化学特性の変化
- (2) 濾過条件の変化による汚泥バイオポリマーの組成と付着微生物群集の変化
- (3) バニリン添加による汚泥バイオポリマーの改変が膜目詰まり進行に与える影響

3. 研究の方法

(1) 汚泥バイオポリマーの付着による濾過膜の表面の物理化学特性の変化

処理方式の異なる4種類の汚泥から遠心分離により分画した溶存バイオポリマー(SMP)にPVDF製MF膜(孔径0.2 μ m)とUF膜(分画分子量100kDa)(Synder社製)をそれぞれ一晩浸漬し、常温乾燥させたものを試料として、純水(DI)、エチレングリコール(EG)、ジヨードメタン(DM)の3種類の溶媒を滴下して接触角を得た。得られた各溶媒に対する接触角より、Youngの式から得られた次の連立方程式を解くことで、膜表面の張力パラメータ $\gamma_m^{LW}, \gamma_m^+, \gamma_m^-, \gamma_m^{AB}, \gamma_m^{TOT}$ をそれぞれ得た。

Youngの式より、各溶媒 l と膜面 m の接触角と表面張力パラメータには次の関係が成り立つ。

$$\frac{1}{2} \left(1 + \frac{\cos\theta}{r} \right) \gamma_l^{TOT} = \sqrt{\gamma_m^{LW} \gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_m^+ \gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_m^- \gamma_l^+}$$

純水(DI)、エチレングリコール(EG)、ジヨードメタン(DM)の3種類の溶媒について3つの連立方程式が成立する。各溶媒の表面張力パラメータにはVan Oss(2006)による値を代入し、膜の表面張力パラメータ $\gamma_m^{LW}, \gamma_m^+, \gamma_m^-, \gamma_m^{AB}, \gamma_m^{TOT}$ をそれぞれ得た。なお、ここでは表面粗度 $r=1$ と仮定した。

$$\begin{cases} \frac{1}{2} \left(1 + \frac{\cos\theta}{r} \right) \gamma_{DI}^{TOT} = \sqrt{\gamma_m^{LW} \gamma_{DI}^{LW}} + \sqrt{\gamma_m^+ \gamma_{DI}^-} + \sqrt{\gamma_m^- \gamma_{DI}^+} \\ \frac{1}{2} \left(1 + \frac{\cos\theta}{r} \right) \gamma_{EG}^{TOT} = \sqrt{\gamma_m^{LW} \gamma_{EG}^{LW}} + \sqrt{\gamma_m^+ \gamma_{EG}^-} + \sqrt{\gamma_m^- \gamma_{EG}^+} \\ \frac{1}{2} \left(1 + \frac{\cos\theta}{r} \right) \gamma_{DM}^{TOT} = \sqrt{\gamma_m^{LW} \gamma_{DM}^{LW}} + \sqrt{\gamma_m^+ \gamma_{DM}^-} + \sqrt{\gamma_m^- \gamma_{DM}^+} \end{cases} \quad (1)$$

$$\gamma_m^{AB} = 2\sqrt{\gamma_m^+ \gamma_m^-} \quad (2)$$

$$\gamma_m^{TOT} = \gamma_m^{LW} + \gamma_m^{AB} \quad (3)$$

未使用膜でも同様に接触角を測定して膜表面の張力パラメータを算出し、バイオポリマー浸漬膜と比較した。また、バイオポリマーの平均粒径とゼータ電位もそれぞれ測定した。

(2) 濾過条件の変化による汚泥バイオポリマーの組成と付着微生物群集の変化

実験室規模の浸漬型MBRを用いて人工下水の連続処理実験を行った。浸漬膜は塩素化PE製平膜(クボタ社製)を浸漬しHRT6時間、SRT15日間で運転を行った。バルク汚泥及び膜間差圧(TMP)が50kPaを超えた際のケーキ汚泥を試料としてEPS抽出を行い、溶存物質(SMP)、緩結合EPS(LB-EPS)、強結合EPS(TB-EPS)に分画しSS、VS、TOC、TN、糖、タンパク濃度を

分析した。また、バルク汚泥とケーキ汚泥の微生物群集を 16SrRNA 遺伝子 V3-V4 領域を対象として次世代シーケンサーにより解析した

(3) バニリン添加による汚泥バイオポリマーの改変が膜目詰まり進行に与える影響

実験室規模の浸漬型 MBR を用いて人工下水の連続処理実験を行った。定流束濾過と定圧濾過でそれぞれ運転を行い、膜ファウリングの進行、バイオポリマー組成、微生物群集構造のちがいを比較した。浸漬膜は PVDF 製平膜(東レ社製)の未使用膜と、MBR 立ち上げに使用した後に化学洗浄を行った使用済膜の 2 つの膜モジュールを浸漬し HRT 6 時間、SRT 15 日間で運転を行った。バルク汚泥及び膜間差圧(TMP)が 50kPa を超えた際のケーキ汚泥を試料として EPS 抽出を行い、溶存物質(SMP)、緩結合 EPS(LB-EPS)、強結合 EPS(TB-EPS)に分画し SS, VS, TOC, TN, 糖, タンパク濃度を分析した。また、分取 HPLC-ELSD を用いて逆相カラム(C18M 4D, Shodex)によって極性毎に分取した画分をサイズ排除カラム(Ohpak SB-806M HQ, Shodex)を用いて分子量分析に供した。各クロマトの保持時間を 2 次元座標上にプロットすることによって極性-分子量マトリクスを作成した。

4. 研究成果

(1) 汚泥バイオポリマーの付着による濾過膜の表面の物理化学特性の変化

米国ハイペリオン下水処理場の異なる処理方式のプロセスから採取した汚泥中の溶存バイオポリマー(SMP)に MF と UF を浸漬した。汚泥は純酸素曝気方式(HPO)と無酸素酸素方式(ANO)の曝気槽 2 箇所よりそれぞれ採取した。また、250 mg/L バニリン溶液にも同様に浸漬し、接触角を測定した(図 1-1)。その結果、バイオポリマーによる膜面汚染により、MF 膜では γ^+ が大きく増加し電子受容性が増加した。一般に、有機物の多くは γ が大きく電子供与性を持つ。したがって、SMP により汚染された MF 膜はバイオポリマーなどの有機物との親和性が高くなっていることが示唆された(図 1-2)。一方、UF 膜では逆に γ が大きくなり電子供与性が大きく増加した。これは、SMP による表面汚染により、それ以上の有機物吸着が起こりにくいことが示唆された。しかし、本研究では表面粗度を考慮に入れていないため、より精密な評価のためには表面粗度の変化についても分析が必要であることが示唆された。また、処理方式のちがいによる SMP 特性のちがいは小さく、処理系列による違いの方が大きかった。

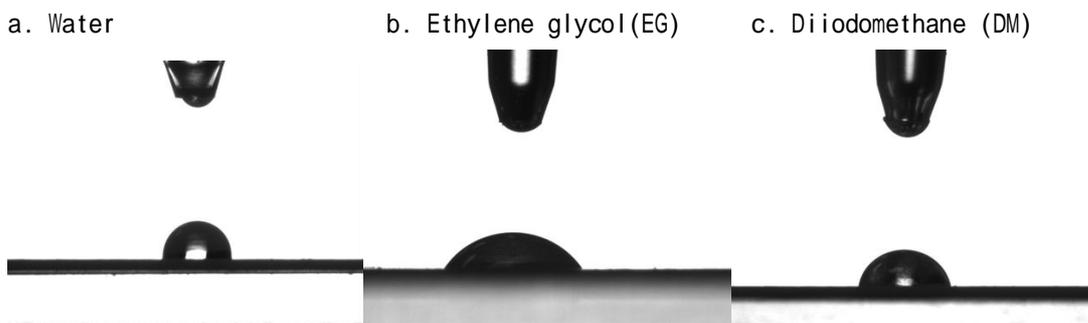


図 1-1 MF 膜における各溶媒の接触角

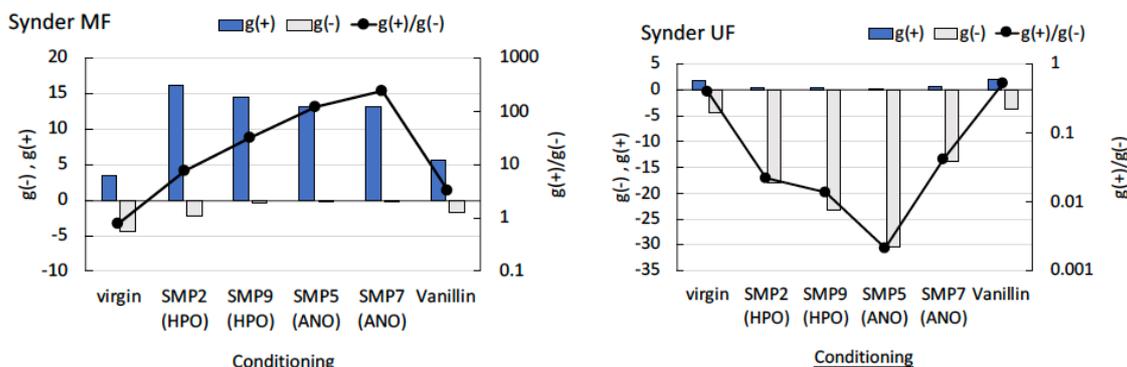


図 1-2 バイオポリマー(SMP)とバニリンへの浸漬による膜表面張力パラメータ γ^+ , γ^- の変化

(2) 濾過条件の変化による汚泥バイオポリマーの組成と付着微生物群集の変化

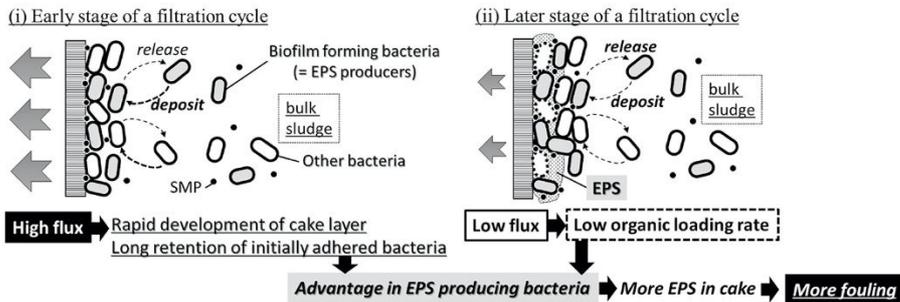
膜ファウリングの進行は、定圧濾過運転の方が低流量濾過運転よりも早かった。定圧濾過運転の方が初期流束は大きかったが、濾過サイクル開始後 2~3 日で急速に低下した。拡張 DLVO 理論によると、濾過による透過流束がなければ、微生物細胞と膜表面の間に働く力は膜面から 3-7nm 付近で反発的となる境界が存在する。しかし、透過水流による力が大きくなるとその反発境界を超えて微生物細胞が膜面に付着しやすくなる。したがって、初期流束が大きい定圧濾過運転では、濾過サイクルの初期から膜面への微生物の付着が起こりやすく、膜ファウリングが進行

が早いと考えられた。実際、7日後のケーキ層は、低流速濾過運転では 0.56 mgVS/cm^2 であったのに対して定圧濾過運転で 0.98 mgVS/cm^2 と、ケーキ層の成長が75%も早くなっていたことが観察された。

定圧濾過運転のケーキ層は、低流速運転と比べてバイオポリマー量と糖含量が有意に大きかった。定圧濾過運転の場合、流速が濾過サイクル初期と洗浄直前の末期ではHRTが大きく異なる。HRTの変動が大きいことは、有機物負荷の変動が大きいことを意味する。すなわち、濾過サイクル初期には有機物が比較的豊富なのに対して、末期には有機物供給が小さくなる。このような負荷変動の大きい条件では、有機物が豊富なときに多糖類として基質を蓄えることができる微生物のほうが生存に有利になると考えられる。定圧濾過運転のケーキ層では、低流量濾過運転のケーキ層と比べて、*Commamonadaceae* 科 *Roseatles* や *Xanthomonadaceae* 科の割合が大きかった。

以上のことから、定圧濾過運転下では次のメカニズムにより膜ファウリングが進行することが明らかになった。(1) 濾過初期の高流速によりバイオポリマーと微生物の付着が促進される、(2) 有機物負荷の変動により汚泥微生物が多糖類を多く産生する(3) 多糖類は相互吸着しやすいためケーキ層とバルク汚泥が多糖類を多く含むことでケーキ層の成長が促進される(4) 濾過圧力が高くなるため多糖類を多く含むケーキ層は圧縮されて比濾過抵抗が大きくなる。

(a) constant TMP mode



(b) constant flux mode

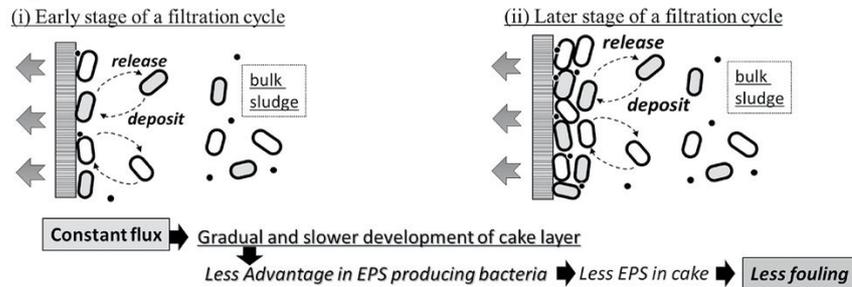


図 2-1 定圧濾過と低流速濾過運転による膜ファウリングの進行メカニズムのちがい

(3) バニリン添加による汚泥バイオポリマーの改変が膜目詰まり進行に与える影響

バニリン添加による膜ファウリングへの影響

未使用膜において対照系では膜の物理洗浄までの日数が約3日であったのに対し、バニリン添加系では約7日であり、膜ファウリング抑制が確認された。運転開始時点と比較した比ろ過抵抗の平均値は、未使用膜ではバニリン添加系が対照系の約0.84倍になっていた(図4-1(a))。一方、使用済膜においてはバニリン添加系が対照系の約2.04倍となり顕著な膜ファウリング抑制は見られなかった(図4-1(b))。未使用膜の方が物理洗浄における透過性回復率が高いことから、バニリンによる膜ファウリング抑制効果は不可逆ファウリングの抑制によるものと考察した。

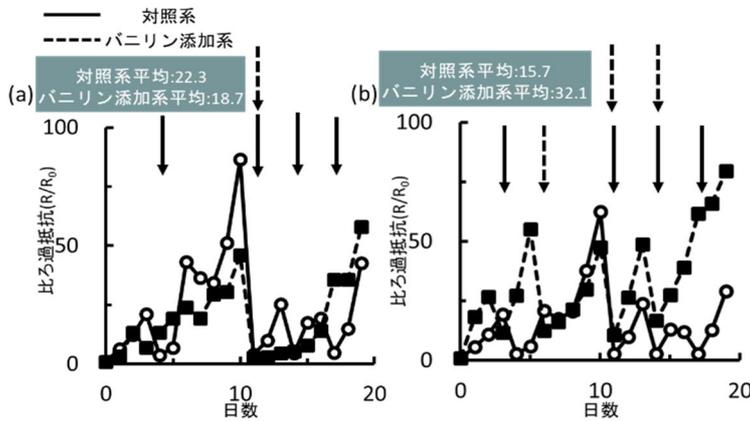


図 3-1 比る過抵抗の変化 (a)未使用膜 (b)使用済膜. 矢印は物理洗浄実施を表す

バニリン添加によるバイオポリマーの変化

バルク汚泥, ケーキ層の糖含有量の各条件における平均値は, 対照系に比べバニリン添加系での糖含有量が, 全 EPS において減少していた. この結果からバニリン添加による不可逆ファウリング抑制の要因として, EPS の糖含有量が減少したことが挙げられる. 膜ファウリングの原因とされている EPS の糖含有量減少により膜の孔内に EPS が付着しにくくなったことで物理洗浄時に膜から分離しやすくなり, 不可逆ファウリング抑制につながったと考えられた. また, バルク汚泥の極性-分子量マトリクスから, バニリン添加により SMP が低分子化, LB-EPS が高分子化, TB-EPS が親水化した.(図 4-2). バニリン添加による不可逆ファウリング抑制の要因として, バルク汚泥の中で最も生産量が大きかった LB-EPS の高分子化が挙げられる. EPS の高分子化により膜の孔内に EPS が入らず, 透水性が維持され不可逆ファウリング抑制につながったことが示唆された.

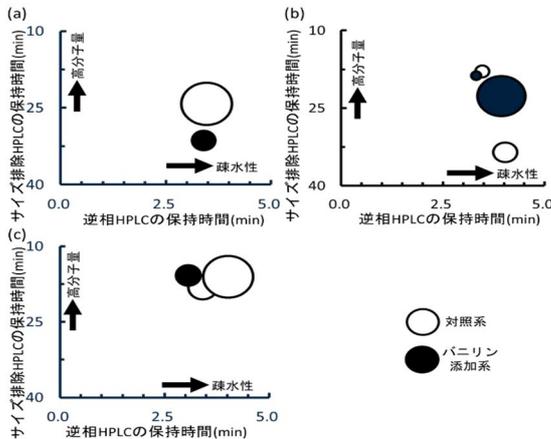


図 3-2 バルク汚泥 極性-分子量マトリクス (a)SMP (b)LB-EPS (c) TB-EPS

バイオポリマーの組成変化が膜目詰まりに与えた影響

バニリンによる膜ファウリング抑制効果は, 不可逆ファウリングの抑制によって, 洗浄後の透水性能の回復率が改善されたことに起因した. バニリン添加により EPS の糖含有量が減少したこと, EPS 加水分解菌の減少により LB-EPS が高分子量にシフトしたことが不可逆ファウリングを抑制した原因であると示唆された. バニリン添加により未使用膜では不可逆ファウリングが少なく, 物質が孔を通り抜けることでファウリングが抑制されているが, 使用済膜では孔内に存在している不可逆ファウリングに物質が詰まり, ファウリング抑制が見られなかったと考えられた

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hong Phuc-Nguon, Noguchi Mana, Matsuura Norihisa, Honda Ryo	4. 巻 592
2. 論文標題 Mechanism of biofouling enhancement in a membrane bioreactor under constant trans-membrane pressure operation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Membrane Science	6. 最初と最後の頁 117391 ~ 117391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.memsci.2019.117391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Panchavinin Smarch, Tobino Tomohiro, Hara-Yamamura Hiroe, Matsuura Norihisa, Honda Ryo	4. 巻 236
2. 論文標題 Candidates of quorum sensing bacteria in activated sludge associated with N-acyl homoserine lactones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 124292 ~ 124292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemosphere.2019.07.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honda Ryo, Phan Phuong-Thanh, Tobino Tomohiro, Prasertkulsak Sirilak, Panchavinin Smarch, Hong Phuc-Nguon, Taing Chanreaksmey, Noguchi Mana, Chiemchaisri Wilai, Chiemchaisri Chart	4. 巻 2
2. 論文標題 Diversity of N-acyl homoserine lactones in activated sludge detected by Fourier transform mass spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 npj Clean Water	6. 最初と最後の頁 11-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41545-019-0035-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 neyuki Namba, Ryo Aizawa, Hiroe Hara-Yamamura, Norihisa Matsuura, Ryo Honda
2. 発表標題 Effect of vanillin on membrane fouling in a membrane bioreactor with PVDF flat-sheet membrane
3. 学会等名 International Conference on Challenges in Environmental Science & Engineering（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 P.N. Hong, R. Honda, T. Tobino, N. Matsuura, Ryoko Yamamoto-Ikemoto
2. 発表標題 Mechanism of fouling mitigation by vanillin in MBR revealed by size vs. polarity profiling of EPS
3. 学会等名 IWA Membrane Technology Conference & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南波 恒行, 相澤 涼, 原 宏江, 松浦 哲久, 本多 了
2. 発表標題 PVDF 平膜を用いたMBR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
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryo Honda
2. 発表標題 Mechanism of fouling mitigation by vanillin in MBR revealed by size-polarity profiling of EPS
3. 学会等名 Symposium on Regional Environment Sustainable Development: Water Environment, (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryo Honda
2. 発表標題 Control of biopolymers for effective mitigation of fouling in a membrane bioreactor process
3. 学会等名 International Workshop on Environmental Management (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryo Honda
2. 発表標題 Mechanism of fouling mitigation by vanillin in MBR revealed by size-polarity profiling of EPS
3. 学会等名 Symposium on Regional Environment Sustainable Development: Water Environment (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ホーク エリック (Hoek Eric M.V.)	米国カリフォルニア大学ロサンゼルス校・土木環境工学科・教授	
その他の研究協力者	マヘンドラ シェーリー (Mahendra Shaily)	米国カリフォルニア大学ロサンゼルス校・土木環境工学科・准教授	