

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K21980

研究課題名(和文)「見える」ファウリング物質を用いた膜ファウリングメカニズムの根本的解明

研究課題名(英文)Elucidating mechanisms of membrane fouling by using "visible" foulants

研究代表者

松下 拓(Matsushita, Taku)

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：30283401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：同位体ラベリングした基質を加えた培地中で微生物(活性汚泥)を増殖させることにより、同位体ラベリングされた細胞外高分子有機物が創出されることを同位体顕微鏡を用いて確認した。このようにして作製した細胞外高分子有機物を用いて活性炭吸着実験を行い、同位体顕微鏡で観察することにより、細胞外高分子有機物は活性炭外表付近の細孔に吸着し、それより奥の細孔を閉塞することにより吸着阻害を引き起こしていることが分かった。同様の手法を膜ファウリングの分析に用いることにより、そのメカニズム解明へと繋がる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行った、同位体ラベリングした基質を加えた培地中で微生物(活性汚泥)を増殖させることにより、同位体ラベリングされた細胞外高分子有機物を創出し、それを同位体顕微鏡により観察しようとする試みは世界的にも全く前例がなく、極めて斬新かつ学術的にも意義が高いと評価できる。同位体ラベリングされた細胞外高分子有機物は、活性炭への吸着阻害メカニズムの解明のみならず、膜ファウリングメカニズムの解明にも適用が可能であると期待でき、大きな発展が望める。また、活性炭吸着阻害や膜ファウリングのメカニズム解明を通じ、これらの水処理技術の欠点の克服への道筋が開けるため、社会的にも大きな貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Observation with an isotope microscope confirmed that isotope-labeled extracellular macromolecular organics were produced by cultivating microorganisms (activated sludge) in a medium containing isotope-labeled substrates. Activated carbon adsorption experiments were carried out using the extracellular macromolecular organics, and the activated carbon particles after adsorption was observed with the isotope microscope. The observation revealed that the extracellular macromolecular organics were adsorbed in the mesopores near the outer surface of the activated carbon particles, indicating that the adsorption inhibition with the organics was caused by pore blocking. This methodology is expected to be applicable to analyzing the membrane fouling, showing that the possibility of leading to the elucidation of the mechanism.

研究分野：土木工学およびその関連分野

キーワード：土木環境システム 膜ファウリング 同位体ラベリング

## 1. 研究開始当初の背景

浄水処理と下水処理を含む水処理分野では、膜を利用した水処理技術が新しい処理法として実処理施設に導入されつつある。膜処理には、極めて高い処理水質が得られるという利点があり、例えば膜分離活性汚泥法を東京湾沿岸の全ての下水処理場に導入すると、現段階では50%にとどまる「海水中全窒素濃度の環境基準をクリア可能な水域の割合」が、全水域で達成可能であるとの試算がなされている。それと同時に運転の省スペース化・省力化が可能であるという大きな利点もあり、来るべきダウンサイジングな時代に対して柔軟に対応できるシステムとして大きな期待がかかっている。

しかしながら、膜処理を継続して行くと、膜を通過できなかった物質が膜に付着することにより、細孔が閉塞されてくる。この現象を膜ファウリングと呼び、膜ファウリングの進行に伴い、同量の水を処理するために必要な圧力が増加するため、運転コストが増大する。大きなメリットがある膜処理の実施設への導入を阻んでいる最大の障壁が膜ファウリングであり、膜ファウリングさえ解消されれば、水処理分野への膜処理の導入が大幅に加速されることは確実視されている。

膜ファウリングの原因物質として、(特に下水処理で用いられる活性汚泥中の)微生物が生体活動の一環として細胞外に放出するポリマーやフミン質などの細胞外高分子有機物や、凝集を前処理とした場合にはアルミニウム系の無機物が挙げられている。しかしながら、膜ファウリングの原因追及を行う多くの研究では、膜へ通水する水中の物質濃度が、膜ファウリングの程度と相関があることを示すことにより、その物質が膜ファウリングを引き起こしているのであろうと「間接的に」示しているに過ぎない。ファウリング物質を膜から抽出して、エネルギー分散型 X 線分析などでその元素組成を調べる研究もあるが、それが「何」であるかは推測の域を出ない。このように、「何が」膜の「どこに」詰まっているのかが明確に示されていない状況下では、どのような運転を行えば、あるいは膜をどのように改変すれば、膜ファウリングを効率よく抑制できるかなどの戦略が立てられず、結果として未だに膜ファウリングが膜処理導入の大障壁として立ちばだかっている状況にあると言わざるを得ない。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1) 微生物のエサとして与えるグルコースを同位体ラベリングすることにより ( $^{13}\text{C}$ -グルコース) それを微生物が代謝することにより生成される細胞外高分子有機物が同位体ラベリングされるようにし、(2) 得られた同位体ラベリング細胞外高分子有機物を用いてファウリングさせた膜を同位体顕微鏡で観察することにより、世界で初めて膜ファウリングを可視化し、「何が」膜の「どこに」詰まることにより膜ファウリングが生じるのかを明確にすることに挑戦した。

## 3. 研究の方法

### (1) 同位体ラベリングした細胞外高分子物質 (バイオポリマー画分とフミン画分) の創出

下水処理場(札幌市創成川水再生プラザ)にて実際の処理に用いられている活性汚泥 100 mL と M9 培地 900 mL を混合した。この際、M9 培地中の窒素源である塩化アンモニウムの 50% を同位体塩化アンモニウム ( $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ) とした。これを曝気しつつ、炭素源としてグルコースを毎日添加して培養することにより、グルコースの代謝産物である細胞外高分子物質を培地内に蓄積させた。この際、グルコースの 20% を同位体グルコース ( $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4^{13}\text{CHO}$ ) とした。培養後、混合セルロース膜 (孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ) でろ過することにより活性汚泥を取り除いた。このろ液を、再生セルロース UF 膜 (分画分子量 10 kDa) を用いて、バイオポリマー画分 (ろ過されなかった側) と、ろ液に分画した。さらに、NaOH にてこれらの画分の pH を 12 に調整した後、マグネティックスターラーで攪拌しつつ窒素曝気することにより、培地中に高濃度で含まれる未利用の  $\text{NH}_4^+$  を取り除いた (アンモニアストリッピング)。ろ液側は、再生セルロース UF 膜 (分画分子量 1 kDa) を用いてさらに分画し、フミン画分 (ろ過されなかった側) と、低分子画分 (ろ液側) を得た。バイオポリマー画分とフミン画分は、それぞれ分画分子量 10 kDa と 1 kDa の膜を用い、「Milli-Q 水添加 ろ過」を繰り返すことにより、無機イオン濃度をその後の実験に支障のない程度まで低減した。

### (2) 同位体ラベリングされたフミン画分を用いた活性炭競合吸着実験

環境水と同程度となるように無機イオン濃度と pH (7.0) を調整したイオン調整水にてフミン画分を希釈し、DOC が 1.6 mg/L となるように調整した。フミンとカビ臭物質 MIB の競合吸着を調べるため、以下の 3 通りの吸着実験を行い結果を比較した。(a) フミンなし：イオン調整水に MIB を 1,000 ng/L になるように添加した後、活性炭を 1 mg/L になるように加えて振盪しつつ吸着させた。1 週間の振盪後、液相中の MIB を GC/MS により定量した。(b) 後フミン：イオン調整水に MIB を 2,000 ng/L になるように添加した後、活性炭を 2 mg/L になるように加えて振盪しつつ吸着させた。1 週間の振盪後、イオン調整水と同量のフミン画分を加え、さらに 2 週間振盪しつつ吸着させた。振盪後の液相中の MIB を定量した。(c) 前フミン：フミン画分に活性炭を 1 mg/L になるように加えて 1 週間振盪した後、MIB を 1,000 ng/L になるように添加したてさらに 2 週間振盪しつつ吸着させた。振盪後の液相中の MIB を定量した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 同位体ラベリングした細胞外高分子物質（バイオポリマー画分とフミン画分）の確認

図1に、培養後に孔径0.45 μmの混合セルロース膜でろ過した活性汚泥の液体クロマトグラフ-有機炭素検出器（LC-OCD）クロマトグラムを示す。クロマトグラムには2つの大きなピークが確認された。保持時間20~30分頃がバイオポリマーであり、30~50分頃がフミンのピークである。

まず、バイオポリマーが同位体標識されているか否かを調べるため、フラクションコレクタを用い、保持時間20~30分の試料を採取した。このうち1 mLをアルミナ製の円盤に滴下し、デシケター中で乾燥させた。この試料を金蒸着した後、同位体顕微鏡を用いて点分析し、炭素同位体比を求めた。その結果、同位体グルコースを用いずに作製したバイオポリマーでは炭素同位体比が  $108 \pm 1\%$ （天然同位体比は  $107\%$ ）であったのに対し、同位体グルコースを用いた場合は  $123 \pm 8\%$ と有意（ $p < 0.05$ ）に大きかった。すなわち、同位体グルコースを用いて活性汚泥を培養することにより、同位体ラベリングしたバイオポリマーを作製できることが確認された。

次に、フミンが同位体標識されているか否かを調べる。まず、上記の分画操作により獲得されたフミン画分（図2）24 mLを振盪瓶に入れ、そこに粉末活性炭を1 mg/Lになるように添加して1週間振盪することにより、フミンを活性炭に吸着させた。吸着後、孔径0.2 μmのアルミナ製膜を用いてろ過することにより、膜上に活性炭を捕捉した。この活性炭粒子を金蒸着し、同位体顕微鏡にて観察した。その結果、同位体塩化アンモニウムを用いずに作製したフミン画分では窒素同位体比が  $3.0 \pm 0.3\%$ （天然同位体比は  $3.7\%$ ）であったのに対し、同位体塩化アンモニウムを用いた場合は  $103 \pm 79\%$ と有意（ $p < 0.05$ ）に大きかった。すなわち、同位体塩化アンモニウムを用いて活性汚泥を培養することにより、同位体ラベリングしたフミン画分を作製できることが確認された。

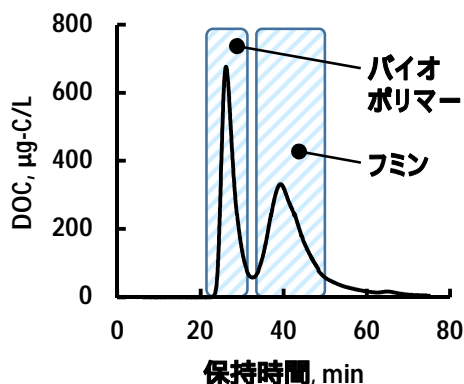


図1. 培養した活性汚泥(5倍希釈)のLC-OCDクロマトグラム

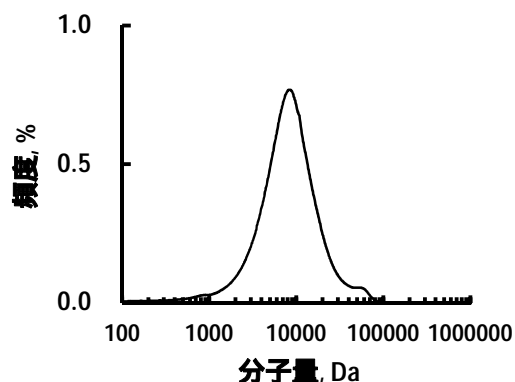


図2. 分画後のフミン画分の分子量分布

##### (2) 同位体ラベリングされたフミン画分を用いた競合吸着実験

フミン画分を加えない場合のMIB残存率(フミンなし)に比べ、フミン共存下でのMIB残存率(後フミン, 前フミン)は大きかった(図3)。すなわち、水中の共存フミンは、活性炭によるMIBの吸着を阻害することが示された。さらに、フミンを吸着させた活性炭にMIBを吸着させた方が(前フミン)MIBを吸着させた活性炭にフミンを吸着させた場合より阻害が大きかった。フミンによるMIBの吸着阻害には、(1)MIBとフミンが活性炭細孔表面の吸着座を奪い合う「競合吸着」と、(2)フミンが活性炭表面近くの細孔に吸着することにより、MIBがその奥に存在する細孔へ到達できなくなる「細孔閉塞」の2つのメカニズムが提唱されている。「競合吸着」が支配的であれば、フミン添加の順序に関わらず同程度の吸着阻害(すなわち、同程度のMIB残存率)が期待されるが、実験結果はそのようにはならなかった。よって、「細孔閉塞」が支配的であろうと推察された。

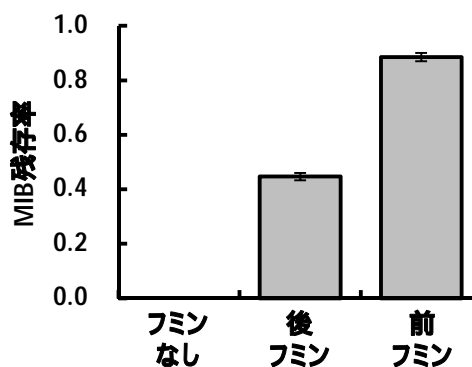


図3. MIBとフミン画分を添加する順番が活性炭吸着によるMIB残存率に与える影響

##### (3) 同位体顕微鏡による細孔閉塞の直接観察

前節で推察された「細孔閉塞」が生じているか否かを、フミン画分を吸着させた活性炭を同位体顕微鏡で観察することにより調べた。活性炭10粒子を分析したところ、9粒子にて、活性

炭内部に比べ、活性炭外表面付近にて高い同位体比が観察された(図4に一例を示す)。すなわち、フミンは、活性炭内部ではなく、外表付近の細孔に吸着されていると判断された。このように、外表付近のメソ孔に分子サイズの大きいフミンが吸着することにより、それより奥に存在する細孔表面(ミクロ孔)にある吸着座へのMIBの到達が物理的に閉ざされるため、MIBの吸着阻害が起こっていると考えられた。同位体ラベリングされていない天然のフミンでは、活性炭が含有するCやNとの分別観察ができないため、「どこ」に吸着されているのかが判断できなかったが、同位体ラベリングされたフミンを創造し同位体顕微鏡で観察することにより、「どこ」に吸着されているのかを明らかにすることができた。

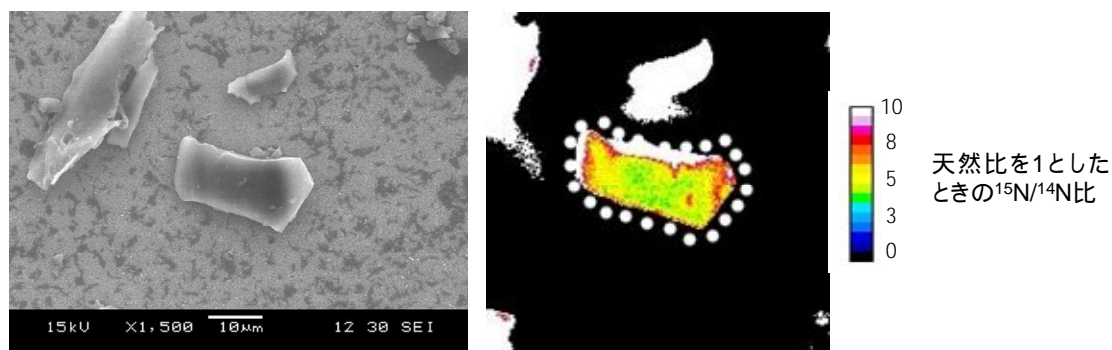


図4. 低真空走査型電子顕微鏡(左)と同位体顕微鏡(右)による同位体ラベリングしたフミン画分を吸着させた活性炭の観察

本研究では、 $^{13}\text{C}$ -グルコースと $^{15}\text{N}$ -塩化アンモニウムを用いて活性汚泥を培養することにより、 $^{13}\text{C}$ と $^{15}\text{N}$ でラベリングされた細胞外高分子物質(バイオポリマーとフミン)を創造する手法を確立した。また、同位体ラベリングされた細胞外高分子物質を用いた活性炭吸着実験を行い、得られた活性炭を同位体顕微鏡で観察することにより、活性炭の「どこ」に細胞外高分子物質が吸着しているのかを直接示すことに成功した。同様の手法を、膜ファウリングの解析に用いることで、膜の「どこ」に「何」が詰まることによりファウリングが生じているのかを調べることが可能となり、ファウリング研究に新しい方向性を示すことができたと判断された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nakayama Akiko, Sakamoto Asuka, Matsushita Taku, Matsui Yoshihiko, Shirasaki Nobutaka	4. 巻 182
2. 論文標題 Effects of pre, post, and simultaneous loading of natural organic matter on 2-methylisoborneol adsorption on superfine powdered activated carbon: Reversibility and external pore-blocking	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Water Research	6. 最初と最後の頁 115992 ~ 115992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.watres.2020.115992	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakayama, A., Matsui, Y., Sakamoto, A., Matsushita, T. and Shirasaki, N.
2. 発表標題 Effect of sequential 2-methylisoborneol/NOM loading on adsorptive removal by activated carbon: directly observation of intraparticle MIB distribution.
3. 学会等名 NOM7: IWA Specialist Conference on Natural Organic Matter in Water 2019（国際学会）
4. 発表年 2019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
研究協力者	桂 美月  (Katsura Mizuki)		
研究協力者	中山 明子  (Nakayama Akiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------