

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18143

研究課題名(和文)クオラムセンシングに基づく生物化学的MBR膜ファウリング制御手法の検証

研究課題名(英文) Investigation on quorum sensing-based microbiological control of MBR fouling

研究代表者

飛野 智宏 (Tobino, Tomohiro)

東京大学・環境安全研究センター・助教

研究者番号：90624916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、膜分離活性汚泥法(MBR)において、細菌が有する情報伝達シグナル物質を介した菌体密度感知システム(クオラムセンシング)を対象とした革新的膜ファウリング制御技術について、そのメカニズムの解明に資する知見を得ることを目的とした。シグナル物質であるアシルホモセリンラクトン(AHL)の汚泥中濃度の分析手法を確立し、異なる条件で運転した実験室MBR中のAHL濃度と膜ファウリングの関係性を検証した。その結果、MBR汚泥中において複数のAHLを検出し、MBR汚泥中でクオラムセンシングが機能していることが示唆された一方、汚泥上澄み中で検出されたAHL濃度と膜ファウリングとの明確な関連は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at unraveling fundamental mechanisms of an innovative technology for MBR membrane fouling control that targets "quorum sensing" with which bacteria utilize signaling compounds to sense their cell density. Analytical method for quantification of signaling compounds acyl homoserine lactones (AHLs) has been developed, and AHL concentrations in MBR sludge were quantified to reveal the relationship to membrane fouling. AHLs were detected from MBR sludge samples under different conditions, indicating the involvement of quorum sensing system in the MBR sludge, whereas no clear relationship of detected AHL concentrations in the sludge supernatant to membrane fouling was found.

研究分野：環境微生物、水処理工学

キーワード：膜分離活性汚泥法 ファウリング クオラムセンシング アシルホモセリンラクトン フーリエ変換型質量分析装置

## 1. 研究開始当初の背景

膜分離活性汚泥法(Membrane Bioreactor; MBR)は、活性汚泥法における生物反応処理後の汚泥と上澄水の分離プロセスを、従来の重力沈降ではなく膜ろ過にて行う下水処理プロセスである。完全なSS成分の除去による処理水質の高度化、高濃度汚泥の保持による処理施設のコンパクト性等優れた特徴を有する。都市化の拡大や人口増加等による処理能力増強ニーズへの対応や、水資源の不足する地域での水再利用技術として、特に海外の大都市での導入が進んでいる。また運転の自動化が容易であるという特徴から、人口減少の進む国内においても技術者不足を補うことのできる技術としての可能性も秘めている。一方で、処理に伴い膜が目詰まり(ファウリング)が必ず進行し、処理水量の低下もしくはろ過に要する動力の増大へとつながる。そのため、ファウリングを制御しながらの処理が必要となる。一般には、膜面下部からの曝気を行うことで連続的に膜面を洗浄しつつろ過を行う。しかし、膜面曝気に必要な動力が大きく、エネルギー消費量および電力費が大きいことが欠点となっている。そのため、如何に効率よくファウリングを制御できるかがMBR技術普及における重要な鍵となる。

2009年にYeonら(2009, Environmental Science & Technology)により、細菌の菌体密度感知システムであるクオラムセンシングを妨害(クオラムクエンチング)することにより、膜ファウリングを効果的に抑制可能であることが報告された。クオラムセンシングとは、細菌が生産するその細菌特有のシグナル物質の濃度に基づいて菌体密度を感知し、特定の遺伝子の発現を制御するシステムである。Yeonらの報告は、クオラムセンシングという微生物学的な機構に基づいて、活性汚泥細菌の生理活性を制御し、膜ファウリングという工学的課題を解決するという画期的なアプローチである。その後もクオラムクエンチングによるファウリング抑制効果に関する論文が複数報告されている。一方で、そのメカニズムに関する報告例はほとんどない。クオラムクエンチングに基づくファウリング制御が普遍的にMBR膜ファウリング制御に有効なアプローチであるか、またその応用における効率化を図るためにも、クオラムセンシングと膜ファウリングの関連のメカニズムを明らかにすることが必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、MBRにおけるクオラムセンシングと膜ファウリングとの関係性を明らかにするための基礎的知見を得ることを目的とした。具体的には、精密質量分析を用いた活性汚泥中に存在するクオラムセンシングシグナル物質の定量手法の確立を行い、実験室リアクター中のシグナル物質の濃度を分析し、膜ファウリングとの関連性を検証し

た。また、シグナル物質を添加もしくはシグナル物質分解酵素を添加した系で同様に膜ファウリングとシグナル物質濃度の関係を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) リアクターの運転

検討に用いるための実験室リアクターを設置・運転した。検討の目的および時期に応じて3つのリアクターを運転した。

#### (a) 人工基質を原水とする実験室MBR

検討した時期により、水槽の形状や容積(7.5~17.5 L)および流入基質組成の異なるリアクターの運転を行った。都市下水処理場より譲渡を受けた汚泥を種汚泥とした。流入原水には、炭素源としてグルコース、ペプトン、酵母抽出物、酢酸ナトリウムを主体とする基質を使用した。ろ過膜はPVDF製の中空糸膜(公称孔径0.4 μm)もしくはC-PVC製の平膜(公称孔径0.4 μm)を使用した。ろ過フラックスは概ね0.5 m/d程度に設定し、吸引・停止のサイクルろ過を行った。HRTおよびSRTも時期により多少異なるが、概ねHRTは8時間、SRTは20-30日に設定した。膜面下部から散気管を用いて連続曝気を行った。レベルセンサーを用いて原水ポンプのON/OFFを制御し、水位を一定の範囲内に維持した。膜間差圧が30 kPaを超えた場合は膜を取り出し、次亜塩素酸による浸漬洗浄を行った。

#### (b) バッチMBR

複数の異なる条件での比較を行うため、卓上のバッチリアクターを運転した。メスシリンダーを用いて容積0.5 Lの水槽を6基製作した。中空糸膜1本からなるろ過膜を挿入し、下部から連続曝気を行いながら、吸引・停止のサイクルろ過を行った。上記(a)の汚泥を投入して運転を開始した。ろ過水をリアクターへと返送する循環運転とし、基質(上記(a)と同じ人工基質)も一定間隔で間欠投与した。分析のためのサンプリングを除いて、汚泥の引き抜きは行わなかった。

#### (c) 実下水を原水とする実験室MBR

容積8.5 L、C-PVC製の平膜(公称孔径0.4 μm)を浸漬した実験室リアクターを下水処理場内の実験施設に設置し、実下水を原水とする連続運転を行った。同下水処理場から採取した汚泥を種汚泥とした。HRTは4.5時間程度とし、MLSS濃度を10 g/L程度に維持するよう間欠的に汚泥を引き抜いた。その他の運転条件は概ね上記(a)と同様である。

### (2) シグナル物質濃度の分析

本研究を通して、クオラムセンシングシグナル物質としてアシルホモセリンラクトン(以後AHL)を対象とした。汚泥中AHL濃度の定量には固相抽出による回収、高速液体クロマトグラフィー(以後LC)による分離、高分解能フーリエ変換型質量分析装置(以後FTMS; Exactive, Thermo

Fisher Scientific) による検出を用いた。固相抽出は、Bond Elut C18 (500 mg, Agilent Technologies) を使用し、メタノールおよび MilliQ 水によりコンディショニング 試料通液 MilliQ 水による洗浄 アセトニトリルによる溶出 窒素ガス吹き付けによる濃縮のステップにて AHL を回収した。内標準として C7-AHL を抽出操作前に試料に添加した。ただし、回収率の検討を行う場合には、試料に 11 種類の AHL 混合標準液を添加した後、固相抽出を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 汚泥中 AHL 濃度の分析方法の確立

汚泥中の AHL 濃度の定量に関する報告がほとんどないため、まず定量分析方法の検討を行った。

標準物質を用いて LC 条件および MS 分析条件を最適化した後、LC/FTMS による定量性を確認した。使用した 11 種類の標準物質の定量下限は 0.5 ~ 4 µg/L であり、エリア値と濃度は良好な直線性を示した。

続いて固相抽出による回収率を検討した (図 1)。MilliQ 水および汚泥上澄み液 (人工下水を基質とするリアクターより採取) に AHL 標準物質を添加し、通液量を変えて固相抽出を行い、回収率を比較した。親水性の高い AHL は概して回収率が低く、通液量の増加に伴い顕著に回収率が低下した。100 ml 以上の通液では C4-HSL、3O-C6-HSL および C6-HSL はほとんど回収することができなかった。一方で、疎水性の高い AHL の回収率は 50% 以上であり、通液量による影響も限定的であった。一方で、MilliQ 水と比べて汚泥上澄み中からの回収率は低下する傾向にあった。固相抽出プロセス中の汚泥上澄み中溶存成分 (マトリクス) との相互作用による回収率低下もしくは FTMS 分析でのマトリクスによるイオン化抑制作用の影響が考えられた。別途行った検証では、マトリクスによるイオン化抑制の影響はあるものの、回収率の低下を全て説明できない結果であった。そのため、固相抽出中でのマトリクスとの相互作用による回収率低下も生じていることが示唆された。回収率向上のためのより適した固相抽出法の検討の余地はあるものの、汚泥上澄み液からの回収率は 500 ml まで通液で 40% 以上であり、本研究の検討に用いる上では十分であると判断した。

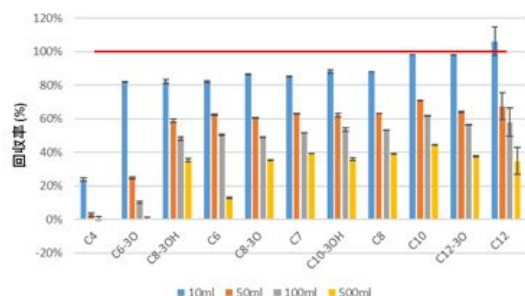


図 1 汚泥上澄みからの AHL 回収率

AHL は特にアルカリ条件下で加水分解を受けやすく、また汚泥上澄み中には AHL 分解酵素が存在していることが知られている。そのため、試料採取後速やかに分析しなければ、保管中に AHL が分解され、濃度の定量が困難となる。そこで、AHL 分析を前提とした汚泥試料の保管方法を検討した。汚泥上澄みに AHL 標準物質を添加し、pH と温度を変えて AHL 濃度の経時変化を追った。20、pH 7 で保存した場合は 7 日後に AHL がほぼ全て分解されていたのに対し、4 保存もしくは pH 3 で保存した場合はほぼ初期濃度そのまま保たれていた。この結果から、pH 3 程度に調整し冷蔵保存することで AHL が分解されることなく最低 1 週間は保管可能であることが確認された。

##### (2) 実験室 MBR 汚泥からの AHL 検出

連続運転中の実験室 MBR から汚泥試料を採取し、上澄み中の AHL 濃度を固相抽出および LC/FTMS により分析した。その結果、人工下水を基質とする実験室 MBR から複数種の AHL が 0.01 ~ 1 µg/L の濃度で検出された。また、同一条件で運転中の 2 基の実験室 MBR において同種の AHL が概ね同程度の濃度で検出されたことから、MBR 汚泥中で AHL がある程度再現性をもって存在していることが示唆された。同様に、実下水を原水とする実験室 MBR からも AHL を検出することに成功した。MBR 中の AHL 濃度に関する報告は他に無く、本研究において貴重なデータを取得できたといえる。またこれらの結果から、クオラムセンシングが MBR 汚泥中においても機能していることが示唆された。

##### (3) AHL 濃度と膜ファウリングの関係

実験室 MBR 汚泥中の AHL 濃度を定量し、膜間差圧との関連を調査した (図 2)。しかし、人工基質および実下水いずれの原水を用いた MBR においても、検出された上澄み中 AHL の濃度と膜間差圧の間に明確な相関は観察されなかった。また、人工基質を原水とする MBR では汚泥固相中の AHL の定量も試みたが、回収率が低く (20% 以下) 再現性

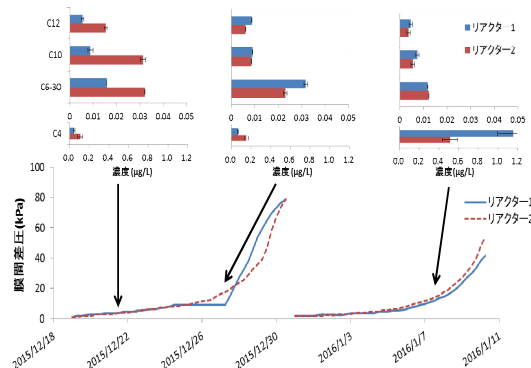


図 2 実験室 MBR (人工基質) の AHL 濃度と膜間差圧の変化

も十分でなかったことから、汚泥固相中の AHL 濃度と膜ファウリングとの関連性を議論することは困難であった。

#### (4) AHL 分解・添加操作による膜ファウリングへの影響

外部的に MBR 汚泥中の AHL 濃度を操作することで、AHL 濃度と膜ファウリングの関連についての検討を進めた。

AHL を分解する酵素である Acylase を MBR に連続添加し、膜間差圧の変化を調べた。Acylase は、同条件にて並列で運転している 2 基の MBR の片方に 1 mg/L もしくは 10 mg/L の濃度で連続添加した。また、リアクターの違いによる影響を見るために、Acylase を添加するリアクターを入れ替えた検討も行った。

人工基質を原水とするリアクターでは、1 mg/L の Acylase の添加の有無に関わらず、一方のリアクターでの膜間差圧上昇速度が他方よりも高く、Acylase 添加による影響は見られなかった。また、上澄み中のたんぱく質および多糖類濃度を分析した結果、Acylase 添加による影響は観察されず、汚泥性状への明確な影響も見られない結果となった。上澄み中 AHL 濃度を分析した結果、2 基のリアクターで AHL 濃度の明確な違いは見られず、Acylase 添加による AHL 分解効果は確認できなかった。

実下水を原水とする MBR においても、10 mg/L の Acylase の添加による膜間差圧変化への影響は観察されなかった(図 3)。微生物叢への影響を見るために、汚泥固相および上清画分から抽出した DNA をテンプレートとして Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism 法により、微生物叢のフィンガープリントを取得し、その経時変化を調べた。その結果、Acylase 添加の影響は見られず、Acylase の添加が微生物組成に影響を与えないことが確認された。また、2 基のリアクター中の微生物組成は非常に再現性よく変化している一方、汚泥固相中と上清中の微生物構成は明確に異なっていることが確認された。

別途運転したバッチ MBR では、AHL を外部的に添加し、膜差圧の変化への影響を検討したが、明確な違いは観察されなかった。ただし、AHL の添加は間欠的に行っており、AHL 濃度分析の結果、添加した AHL が比較的速やかに分解を受けていることが示唆された。そのため、今回の検討では AHL 添加が不十分であった可能性も否定できない。

以上の検討の結果から、今回設定した条件の範囲では、検出された AHL 濃度と膜ファウリングおよび汚泥性状との関連は観察されなかった。既報と異なり、AHL 分解酵素の添加による膜ファウリングへの影響が見られなかった要因としては、使用している汚泥やリアクター(膜含む)が異なることが挙げられる。そのことはすなわち、クオラムセ

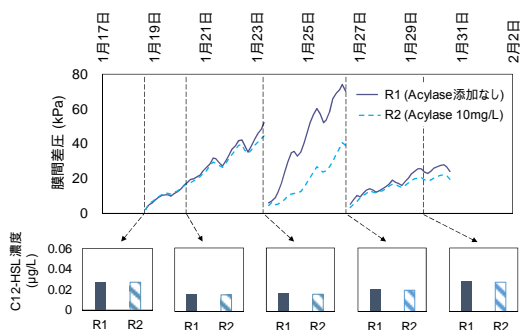


図 3 実験室 MBR (実下水) における Acylase 添加による膜間差圧および AHL 濃度 (C12-HSL) への影響

ンシングが膜ファウリングの主要因でない場合には、クオラムクエンチングによるファウリング抑制効果が必ずしも大きくないことを示唆している。一方で、MBR 汚泥中から AHL が検出されたことから、クオラムセンシングが MBR 汚泥中で機能していることも示唆された。また、今回、主として分析対象とした汚泥上清画分中の AHL 濃度は、汚泥中に存在する AHL 分解酵素等の働きにより速やかに分解され、その変化が捉えにくかったことも考えられる。今後は、クオラムセンシングが主因となって膜ファウリングが引き起こされる条件の検討を進めるとともに、汚泥フロック中や膜表面上に形成されるバイオフィーム中の AHL 濃度を中心とした分析手法の確立と評価を進め、膜ファウリングとの関連について検討を進めたい。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Daisuke Yagi, Tomohiro Tobino, Fumiyuki Nakajima, Kazuo Yamamoto (2016) Quantification of acyl homoserine lactones in MBR sludge using solid phase extraction and mass spectrometry. Water and Environment Technology Conference 2016. 2016 年 8 月 27~28 日, 中央大学(東京都・文京区)
2. Shu Hirano, Tomohiro Tobino, Fumiyuki Nakajima, Kazuo Yamamoto (2015) Effect of acyl-homoserine lactone concentrations in activated sludge on membrane fouling in membrane bioreactors. Water and Environment Technology Conference 2015. 2015 年 8 月 5~6 日, 日本大学(東京都・千代田区)

〔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

<http://envrisk.t.u-tokyo.ac.jp/hp/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

飛野 智宏 (TOBINO, Tomohiro)

東京大学・環境安全研究センター・助教

研究者番号：90624916

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )