

令和元年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14747

研究課題名(和文) 汚泥フロック外微粒子に着目したMBR膜ファウリング機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of membrane fouling mechanism in MBRs focusing on fine particles outside sludge flocs

研究代表者

飛野 智宏 (Tobino, Tomohiro)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師

研究者番号：90624916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膜分離活性汚泥法(MBR)の膜目詰まりの要因物質として、活性汚泥フロックの外に存在する生物由来の微粒子成分に着目し、蛍光染色とフローサイトメーターを用いて微粒子のサイズや構成成分といった多成分座標軸上で特徴づけて定量する方法を検討した。サイズ、核酸量、細胞膜脂質量の3軸を用いて、構成成分の異なる細菌細胞由来の粒子を異なるピークとして検出できることが示された。本手法を用いてベンチトップMBRの汚泥上清試料を解析した結果、汚泥フロック外微粒子構成にダイナミックな変化が生じていること、微粒子構成が汚泥のろ過性と強い関連を有することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜分離活性汚泥法は高度な水質の処理水を得ることのできる下廃水処理技術であるが、膜目詰まりの効率的な制御が課題となっている。本研究により、汚泥フロック外の微粒子とろ過性との強い関連が明らかとなったことから、膜目詰まり機構および制御のための新規指標として活用可能と考えられる。また、これまでほとんど着目されてこなかったフロック外の微粒子および微生物群集組成に着目し、そこでダイナミックな変化が生じていること等、学術的に新規な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：As a factor affecting the membrane fouling of membrane bioreactors (MBRs), this study focused on fine particles of biological origin existing outside activated sludge flocs and developed a method to characterize and quantify the particles by size and composition. By three axes of size, nucleic acids and membrane lipids, bacterial cell particles of different compositions could be detected as different peaks. Application to the supernatant of bench-top MBRs revealed that the profile of fine particles showed dynamic change through the period and had a strong association with the change in membrane filterability of the sludge.

研究分野：環境工学、微生物工学、生物学的廃水処理

キーワード：膜分離活性汚泥法 ファウリング 微粒子 蛍光染色 フローサイトメトリー 多変量解析

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

### 1. 研究開始当初の背景

膜分離活性汚泥法 (Membrane Bioreactor, MBR) は、省スペースかつ良質な処理水が得られる廃水処理技術として、産業排水処理および下水道事業において普及が進められている。従来の活性汚泥法と異なり、沈澱池不要で、膜ろ過による完全な固液分離が可能となるため高濃度の汚泥を槽内に保持できる。結果、装置のコンパクト化、処理水質の高度化が可能となり、特に海外では、大都市における処理能力の増強や水資源の不足した地域での水再利用を背景に導入が進んでいる。一方で、余剰汚泥発生量が少なく、運転の自動化が容易である点で、維持管理を省力化しやすく、国内の少子高齢化社会における技術者不足を補うことのできる技術としても有望である。しかしながら、膜分離の性質上、処理とともに膜の目詰まり (ファウリング) が必ず進行し、処理効率が低下する。その対策として、一般的に連続曝気による膜面洗浄が行われるが、それに要する動力が大きく、MBR の消費エネルギーは従来の活性汚泥法よりも高い。これが、特に公共下水道分野における MBR 普及の妨げとなっており、如何に効率良くファウリングを制御するかが今後の MBR 技術の進展の重要な鍵となる。

ファウリングの制御に向け、ファウリング機構の解明を目指した研究が精力的に進められてきた。その中でも特にファウリングに寄与する成分については、これまで様々な報告がなされている。活性汚泥中の懸濁成分、コロイド成分、溶解性成分に分けてそれぞれの寄与を評価した事例や、溶解性成分のうち多糖類やタンパク質といった微生物由来の細胞外高分子成分とファウリングとの関連を示した報告がある。しかしながら、統一した見解はこれまでのところ得られていない。MBR における膜ファウリングが、膜の特性、汚泥性状、流入水質、運転条件が相互に作用して進行する複雑なプロセスであることが一つ理由であるが、一方でこれまで着目してきた物質群の設定方法にもその一因があると考えられる。すなわち、分画操作で定義される大まかな画分、またその平均的な成分濃度に基づく情報では、活性汚泥中で生じているダイナミックな性状の変化を捉えることが難しい。

### 2. 研究の目的

本研究では、新たな評価対象として活性汚泥中のフロック外微粒子に着目する。これまで評価に用いられてきた糖・タンパクなどの特定成分の濃度やろ過性・水質といったマクロな指標ではなく、汚泥フロック外に存在する微粒子をそのサイズや構成成分といった多成分座標軸上で特徴づけて直接定量することにより、従来の指標では見えなかった変化を捉え、膜ファウリングとの関連を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 染色剤および分析条件の検討

検討した染色剤は、SYTO9 (核酸染色剤)、SYPRO Orange (タンパク質染色剤)、Concanavalin A, Alexa Fluor 647 conjugate (多糖類染色剤)、FM4-64 (細胞膜脂質染色剤) である。これらの試薬を純水で適当な濃度に希釈した Working solution を用意し、1.5 ml チューブに採った試料 495  $\mu\text{l}$  に対して 5  $\mu\text{l}$  を添加し、37 °C で 10 min インキュベートした。バックグラウンドノイズの検討では超純水 (MilliQ 水) ポジティブコントロールを用いた検討では LB 培地で一晚培養した大腸菌細胞を懸濁させた緩衝液 (りん酸緩衝液もしくは Tris-EDTA バッファー) を試料とした。フローサイトメーターは BD Accuri C6 (BD Biosciences) を使用した。

#### (2) モデル粒子を用いた検討

活性汚泥内に存在する生物由来微粒子のモデル粒子として、大腸菌ファージ (T4) および物理破砕した大腸菌細胞を用いた。大腸菌ファージ試料には、宿主細胞培養液にファージストックを添加し、培養後、回収した上清をろ過 (0.2  $\mu\text{m}$ ) したものを使用した。大腸菌破砕細胞試料には、大腸菌懸濁液をビーズの入った 2 ml チューブに入れ、ビーズ破砕装置により激しく振とうしたものをを用いた。これらの試料を用いて、(1) の条件で染色 (ただしファージは 80 °C のインキュベートも行った) フローサイトメーターでの検出を行った。

#### (3) ベンチトップリアクターでの検討

人工基質を原水とするベンチトップ MBR を 2 基 (以後 R1、R2 と呼ぶ) 運転した。容積は 5.5 L、PVDF 製の中空糸膜 (公称孔径 0.4  $\mu\text{m}$ 、膜面積 800  $\text{cm}^2$ ) を浸漬し、0.2 m/d の平均ろ過フラックスとなるよう、間欠吸引ろ過 (8 min ON, 2 min OFF) を行った。グルコース、ペプトン、酢酸ナトリウムを主体とした濃縮人工基質を一定流量で連続添加し、水位計を用いて槽内水位が一定の範囲内となるよう水道水を断続的に添加した。水理的滞留時間は両リアクターとも 8.5 h であり、汚泥滞留時間は R1 で 60 d、R2 で 34 d となるよう数日おきに汚泥を引き抜いた。リアクターから採取した汚泥試料を 11  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し、SYTO9 および FM4-64 での二重染色によるフローサイトグラムを取得した。汚泥性状の変化の指標として粒度分布分析による平均粒径を、またろ過性指標としてろ紙ろ過量および Capillary suction time (CST) を数日おきに分析した。また汚泥試料および 11  $\mu\text{m}$  のフィルターを用いたろ過で得られた汚泥上清中微生物画分を採取し、DNA 抽出および TRFLP 法による 16S rRNA 遺伝子配列のフィンガ

ープリント解析を行い、データを取得した。また得られたフローサイトグラムを、3つの軸(FSC、FL1、FL3)の階級値で定義される多変量データに変換し、それらを独立変数とし、汚泥性状指標を従属変数としてPartial Least Square (PLS) 回帰分析を行った。

#### 4. 研究成果

異なる細胞成分を対象とする4種類の染色剤を用いて、フローサイトメーターによる微生物細胞由来微粒子の検出可能性を検討した。MilliQ水を試料として染色剤由来のバックグラウンドシグナルレベルを確認した結果、SYRPO Orangeで高いバックグラウンドシグナルが観察された。それ以外の染色剤では、適切なthreshold値を設定することで、バックグラウンドノイズを低く抑えることができた。ポジティブコントロールとして大腸菌を試料とした場合、SYTO9およびFM4-64による染色で明瞭な大腸菌由来のピークが観察された。一方、SYPRO OrangeおよびConcanavalin Aでは明瞭なピークは観察されなかった。SYPRO Orangeは先述した高いバックグラウンドノイズ、Concanavalin Aは低いシグナル強度(大腸菌細胞の多糖類含有率に依存)が要因となりシグナルノイズ比が低くなり、ピークを分離・検出できなかったと考えられた。更なる染色条件の検討による改善の余地はあるものの、複数の成分に基づく微粒子の検出という本研究の目的からは、SYTO9およびFM4-64の2種の染色剤を用いることで検証可能であることから、以後はこの2種の染色剤を用いることとした。

大腸菌細胞より小さい粒子の検出可能性を検討するために、モデル粒子として大腸菌ファージT4(大きさ約100nm)を試料として染色および検出を行った。なお、T4ファージは細胞膜脂質を持たないため、核酸染色剤SYTO9のみでの検討とした。その結果、T4ファージに由来すると考えられるピークは観察されず、検出された粒子数と試料中のファージ粒子濃度にも相関は見られなかった。既報の文献を参考に試料の希釈液の組成やインキュベーション温度を変えた検討も行ったが、いずれの条件でもファージ粒子由来のシグナルを得ることができなかった。T4ファージ粒子の核酸含有量は大腸菌の1/20程度であることから、検出に十分なシグナル強度が得られなかったことが一つの要因と考えられた。

大きさや細胞構成成分の組成が異なる生物由来微粒子の検出可能性の検討を目的として、大腸菌懸濁液を物理破碎(ビーズビート)した試料を用意した。破碎処理により、生菌数は1/10程度に減少したことから、試料中の多くの細胞が細胞膜に致命的な損傷を受けており、大きさの異なる細胞断片が生成されていることが推測された。物理破碎前後の大腸菌懸濁液をSYTO9およびFM4-64で染色し、フローサイトメーターによる検出を行った。また検証のため、同試料を0.2μmのメンブレンフィルターでろ過し、捕集された細胞を蛍光顕微鏡により観察した。その結果を図1に示す。SYTO9染色のサイトグラムでは、破碎前に1つのピークしか見られなかったが、破碎後では元のピークより蛍光強度が小さい位置にもう1つのピークが出現した。一方、FM4-64では、破碎前後でピークの位置に変化は見られなかった。これらのピークをそれぞれゲーティングし(図中P1、P2、P3)、各ピークのカウント数を表1にまとめた。SYTO9およびFM4-64で破碎前のピーク(P1およびP3)のカウント数は同程度であり、無傷の大腸菌細胞が検出されたと考えられる。破碎後は、P1とP3でカウント数が減少した。また、P1+P2の数がP3の数と概ね一致していた。これらの結果は、図2に示すような現象で説明できる。破碎処理後には無傷もしくは大きな損傷のない細胞(P1)と損傷を受け細胞内の核酸が流出等により減少した細胞(P2)が存在する。これらのシグナル強度は核酸量に応じるためSYTO9染色で蛍光強度の異なる2つのピークとして検出される。一方、それらは細胞が粉碎されるま

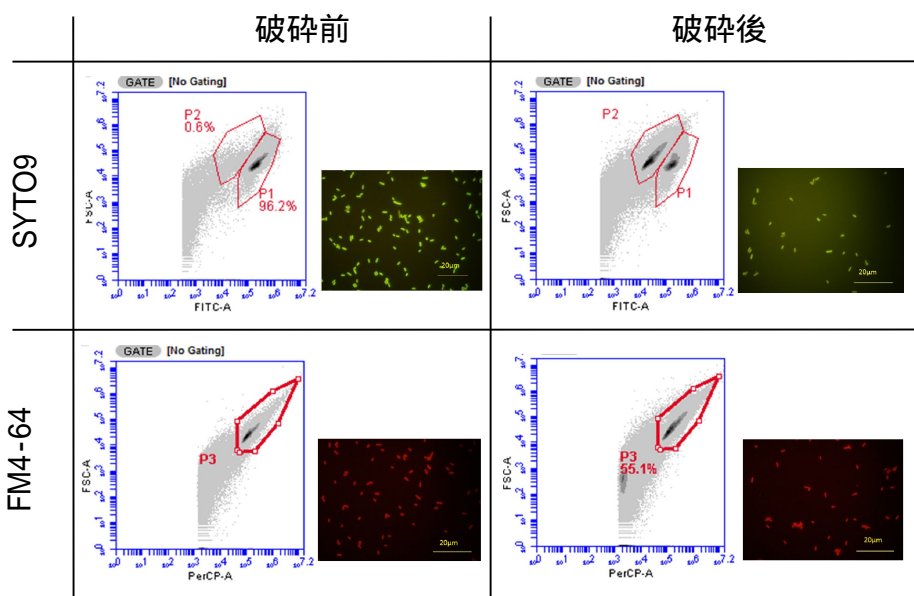


図1 破碎した大腸菌細胞の蛍光検出結果

でははいたっておらず、FM4-64 では無傷の細胞と同じ位置のピークとして検出される (P3)。粉砕された細胞断片 (破砕前の細胞の 37-38%) はいずれの蛍光染色でも検出されない。以上の議論より、細胞構成成分の組成が異なる粒子を本手法により異なるピークとして検出可能であることが示された。

表 1 破砕前後での各ピークにおけるカウント数

		破砕前 (count/ $\mu$ l)	破砕後 (count/ $\mu$ l)	% (破砕前/破砕後)
SYTO9	P1	20,814	7,119	34
	P2	-	6,138	29
FM4-64	P3	21,024	13,081	62

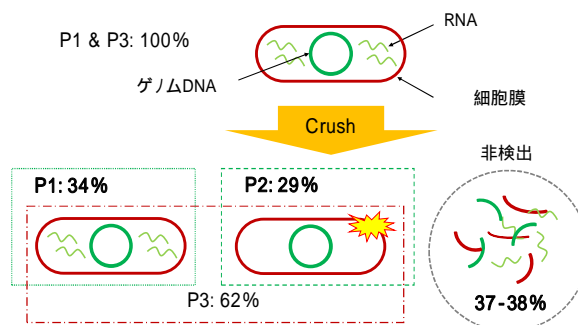


図 2 破砕前後での大腸菌粒子構造の変化と検出されるピークの対応

SRT の異なる 2 基のベンチトップ MBR を運転し、採取した汚泥上清中の粒子のフローサイトグラムを SYTO9 および FM4-64 の二重染色により取得した。検出された粒子は、これらの蛍光強度および前方散乱光強度の 3 軸上で表現される。得られたフローサイトグラムから、微粒子構成が運転期間を通じてダイナミックに変化していることが明らかとなった。同様に、ろ過性指標であるろ紙ろ過量および CST の値も大きく変動した。一方で、汚泥の平均粒径には大きな変化は見られなかった。このことから、汚泥のろ過性は、汚泥フロックの平均的な変化よりも、フロック外の微粒子の変化により強く影響を受けている可能性が示唆された。微粒子構成の多変量データからろ過性指標 (ろ紙ろ過量および CST) を予測する PLS 回帰モデルを作成した結果、予測精度の指標である  $Q^2$  は両モデルにおいて 0.5 以上となったことから、微粒子構成と汚泥のろ過性との間の関連が強く支持された。予測モデルを構築する上で重要な変数を variable importance in projection (VIP) 値に基づいて抽出した。VIP > 1 となる変数は、526 個の全変数のうち、ろ紙ろ過量と CST でそれぞれ 55 個、50 個であり、かつこれらのほとんどが共通していた。このことから、汚泥のろ過性に相対的に大きい影響を及ぼすと考えられる微粒子画分を見出すことができたといえる。

汚泥上清中の微粒子構成には、汚泥中の微生物活性の変化が大きく影響していると考えられる。16S rRNA 遺伝子配列に基づく微生物群集構成の解析結果からは、2 基のリアクターで微生物構成が似た変遷を辿ることが明らかとなった。一方で、汚泥フロック画分よりも上清画分中の微生物構成のほうが 2 基のリアクター間でより異なる傾向が見られた。運転条件の違いが上清中微生物構成でより鋭敏に反映されたと考えられる。また、このような微生物群集構成の変化が汚泥フロック外の微粒子構成に影響を与えたものと推察された。運転条件の違いがどのように微生物構成に影響を与え、どのように上清中の微粒子構成の変化に繋がったのか、そのメカニズムについては今後の検討課題として残された。

以上を総括すると、本研究を通して、汚泥フロック外の微粒子を蛍光染色およびフローサイトメーターを用いてその粒子のサイズと構成成分により特徴付けた検出が可能であり、それが汚泥のろ過性と強く関連していることが確認された。今後は、核酸および細胞膜脂質以外を対象とした蛍光染色条件の検討、より長期のデータでの検証、汚泥フロック外微粒子構成が変化する微生物学的メカニズムの解明に向けた検討が求められる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

Yamaguchi, N., T. Tobino, M. Yanagihara, F. Nakajima (2019) Relationship of fine particles characterized by flow cytometry with filterability of activated sludge in membrane bioreactors, Water and Environment Technology Conference 2019, 13-14 July 2019, Osaka, Japan

Yamaguchi, N., T. Tobino, F. Nakajima, K. Yamamoto (2018) Detection of fine particles of microbial origin in activated sludge by fluorescent staining and flow cytometry. The 5th Asian Conference on Safety and Education in Laboratory, November 21-22, 2018, Okinawa, Japan

八木大輔, 飛野智宏, 中島典之, 山本和夫 (2018) MBR 中に存在するアシルホモセリンラクトン類濃度の定量と膜間差圧変化との関係, 第 52 回日本水環境学会年会講演集 p.208, 2018 年 3 月 15-17 日, 札幌

岡本紫音, 飛野智宏, 中島典之, 山本和夫 (2018) アシルホモセリンラクトンの添加および分解操作が精密ろ過膜面上の汚泥ケーキ層形成過程に及ぼす影響, 第 52 回日本水環境学会年会講演集 p.667, 2018 年 3 月 15-17 日, 札幌

Tobino, T. (2018) Monitoring quorum sensing signaling molecules in MBRs, The 3rd International Forum on Asian Water Environment Technology, 2 March 2018, Singapore

〔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。