

令和 2 年 9 月 10 日現在

機関番号：32641

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18889

研究課題名（和文）膜ファウリング物質を資化する好低温グラム陽性菌の単離と応用技術の開発

研究課題名（英文）Isolation and application of bacillus sp. for reduction of membrane foulants

研究代表者

山村 寛（YAMAMURA, HIROSHI）

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：40515334

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：膜分離活性汚泥法は、既存の標準活性汚泥法と比較して極めて高度な処理水を得られる一方で、膜の目詰まりが課題となっている。本研究では、低温で膜ファウリング物質を分解しうる菌を探索することを目的として研究を実施した。低温で馴致した汚泥から、バイオポリマーを基質として利用する細菌を単離することに成功し、中温時とは全くことなる細菌が低温時に活動することが明らかとなった。また、低温時にこれらの細菌が活動することで、膜ファウリングが抑制できることも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低温で活性化する細菌を発見し、その細菌がバイオポリマーを分解する酵素を生成することが明らかとなった。この酵素は、膜を洗浄する際に有効となることから、従来の次亜塩素酸や硫酸のように膜を薬品により傷つける心配なく、洗浄が可能となる。膜交換の頻度を伸ばせる可能性があることから、膜分離活性汚泥法の維持管理費用を大幅に低減できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Membrane bioreactor can obtain extremely advanced treated water compared with conventional activated sludge process, while fouling of membranes pores has become a serious problem. In this study, the study was carried out with the aim of searching for bacteria capable of decomposing the membrane fouling substance at low temperature. From the sludge acclimated at low temperature, the bacteria using the biopolymer as a substrate was successfully isolated, and it was clarified that the bacteria which became completely at the mesophilic time was active in the low temperature. It was also confirmed that the membrane fouling can be suppressed by the activity of these bacteria at low temperature.

研究分野：用排水処理

キーワード：膜分離活性汚泥法 酵素処理 膜ファウリング 細菌の単離 活性剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的な都市人口の増加に伴い、水資源の乏しい地域では都市下水の再利用を前提とした新しい都市水循環の構築が始まっている。膜分離活性汚泥法(以後 MBR と表記する)は活性汚泥を多孔質膜で固液分離する手法であり、従来の活性汚泥法よりも遙かに高い処理水質を達成できるため、排水再利用を前提とした新しい水循環を構築する上での要素技術として注目されている。一方で、ろ過に伴って細孔が閉塞(以後、膜ファウリングと表記する)するため、実際には膜が持つ透水性能の 30%程度しか利用出来ていない。現状、膜ファウリング発生に伴う運転効率の著しい低下が、新しい都市水循環構築にとって、最大の妨げとなっているのである。

膜ファウリングの抑制には、膜ファウリング物質の素性を明らかにした上で、ファウリング物質を分解・除去しうる技術が必要となる。これまでの研究により、膜孔径に近いサイズの細胞外代謝産物(EPS)や溶解性代謝物(SMP)が、ファウリングの主要因であることを明らかにしている。また、水温が 15 以上の場合、定期的実施する膜洗浄や細かな運転条件などを最適化することで、ある程度、膜ファウリングの進行を緩和出来ることを明らかにしている。一方で、水温が 15 を下回った場合には、ファウリングの原因物質である EPS や SMP 濃度が急激に上昇し、洗浄・運転条件にかかわらず、急激に膜ファウリングが進行する様子を多々経験してきた。我々の経験と同様に、多くの実規模 MBR 施設においても、低水温時において閉塞が進行し、運転が不安定になることが報告されている。低水温でも MBR を安定的に運転できるようになれば、これまで導入が困難であった欧米北部や中国北部の大都市群においても MBR を導入できるようになり、再利用を前提とした都市水循環が世界的に急進するものと考えられる。以上の背景から、我々は、低水温条件で EPS/SMP を分解・除去しうる技術開発に取り組む。

EPS/SMP の分解を目的として、2000 年に Pei らはタンパク質分解酵素であるプロテアーゼを汚泥に添加し、EPS/SMP 低減効果と膜ファウリング低減効果を確認している。一方で、市販の酵素試薬が非常に高価であり、保管状態によって活性が大きく変動するため、プロテアーゼ投入法の実用化は困難とされる。そこで現在、グラム陽性桿菌である枯草菌(*Bacillus sp.*)のプロテアーゼ酵素生成機能に着目して研究を進めている。枯草菌は活性汚泥中に元から存在するものの、ほとんどの場合において増殖に必要な基質が不足するため、EPS/SMP を十分低減しうる量の酵素生成には至っていない。これまでに活性汚泥から 80 種類以上のバチルス菌を単離し、その中から特に EPS/SMP 分解酵素生産に優れた枯草菌 A 株の選抜に成功している。さらに、A 株の基質利用特性を調べることで、流入下水中に含まれる成分のうち、シリカや鉄などの無機成分が不足していることを明らかにしている。そこで、不足する無機成分(無機活性剤と表記する)を調合し、MBR 槽内中に定期的に投入したところ、A 株を 10^8 /mL まで増殖することに成功し、汚泥中でのプロテアーゼ酵素の生成および EPS/SMP の低減が確認できた。さらに、A 株の活性化により、MBR の膜ファウリングを 1/10 に低減できることも確認した。我々がこれまでに構築した技術と発想を以て、低温で増殖・酵素生産に優れた好低温菌株の単離および前記バチルス株を活性化しうる技術が開発できれば、低水温時に増加する EPS/SMP を効率的に低減でき、MBR の安定運転につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、低温条件下における無機活性剤添加による MBR の膜ファウリング抑制効果を検証すると共に、低温時にバイオポリマー分解に寄与する細菌の単離および単離菌の生理活性評価を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) MBR の運転条件

ジャケットを装着した有効容積 10L の水槽に、公称孔径 $0.1 \mu\text{m}$ の PVDF 製の平膜(東レ製)を 3 枚(有効膜面積: 0.06 m^2)浸漬し、吸引ろ過運転を行った。原水には標準下水(ISO 11733、2004)に、有機物負荷調整を目的としたペプトンと pH 調整を目的とした NaHCO_3 をそれぞれ添加した基質を用いた。ジャケットの温度を 10°C に保つことで、低水温期の運転を再現した。表 1 に示すように、Run1 にのみ 10 mL の無機活性剤(表 2)を毎日 1 回投入した。

表 1 MBR 運転条件

	Run 1	Run 2
活性剤投入量	10 mL/d	なし
温度	10.2 ± 0.5	
Flux	0.5 m/d	
曝気量	12.5 L/min	
HRT	9 h	
SRT	40 d	

表-2 無機活性剤の成分 [mg/L]

Si	Fe	Al	Ca	Mg	Mn
2.13	0.046	1.13	4.09	0.409	0.0195

(2) 評価項目

水質評価

運転期間中、活性汚泥浮遊物質 (MLSS) および MLSS の強熱減量 (VSS) を測定した。槽内中のバイオポリマー濃度は HPLC に online TOC 計を接続した LC-OCD を用いて測定した。得られたクロマトグラムの 11 ~ 17 分のピークを積分することで、有機物濃度を算出した。

ろ過性の評価

ろ過抵抗 R [m^{-1}] は、以下のダルシーの式より算出した。

$$R = \Delta P / (\mu \cdot N)$$

なお、 ΔP : 膜間差圧 [Pa]、 μ : 曝気槽内混合液の粘度 [$\text{Pa} \cdot \text{s}$]、 N : MBR のろ過 Flux [$\text{m}^3/\text{m}^2/\text{s}$] を示す。膜間差圧 ΔP は、データロガーを用いて 1 s ごとに記録した値の日平均を算出した。また、曝気槽内混合液の粘度は、粘度計 (DV-II + Pro) により計測した。

パチルス A 株活性化

採取した活性汚泥から NucleoSpin® Soil (タカラバイオ) を用いて DNA を抽出し、パチルス A 株のプライマーを用いて、表 1-3 に示す PCR 条件で RT-PCR (Applied Biosystems) 測定を行った。

(3) バイオポリマー低減メカニズムの解明

バイオポリマーの回収

バイオポリマーは下水処理場の最終沈殿池の上澄を採取し、前処理を行った後、分画分子量 50 kDa の UF 膜を用いて精製・濃縮を行い、凍結乾燥して得た試料を使用した。

バイオポリマー分解に優れた細菌の単離

炭素源として前述したバイオポリマーと無機成分を添加した寒天培地を用い、運転条件の異なる 4 種類の汚泥から細菌を単離した。単離は画線培養を 10°C と 30°C の条件で行った。コロニーの生成を目安に、10°C では 1 ~ 2 日間、30°C では 6 時間インキュベータ内で培養した。コロニーを色や形で見分け、それぞれ新しい寒天培地に塗抹し、培養を繰り返すことで単一の細菌に分離した。

細菌の同定

単離した細菌について 1400 以上の配列データ 16S rRNA シーケンス解析した後に、BLAST 検索することで、株を同定した。

酵素活性の測定

人工下水 (ISO 11733: 2004) を 20 倍の濃度に調整した液体培地を用い、単離後の細菌を前培養、本培養を行った。本培養の混濁液を遠心分離し、上澄液中に含まれる酵素に対して、バイオポリマーの主成分が多糖および、タンパク質であることから多糖の一種であるデンプン分解酵素活性と、タンパク質の一種であるカゼイン分解酵素活性を測定した。デンプン分解酵素活性はヨウ素デンプン反応を用い 520 nm の吸光度を測定した。カゼイン分解酵素活性は Pierce Fluorescent Protease Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、トリプシン相当量で算出した。

4. 研究成果

(1) 汚泥の性状

92 日間の馴致期間を経て、SRT20 日で汚泥の引き抜きを開始した。MLSS を図 1 に示す。汚泥の引き抜きを開始してから、MLSS の低下が見られたが、徐々に安定した。また、MLSS 中の VSS の割合を図 2 に示す。浮遊物質中の有機物の割合は活性剤添加の有無に関わらず、88~92%

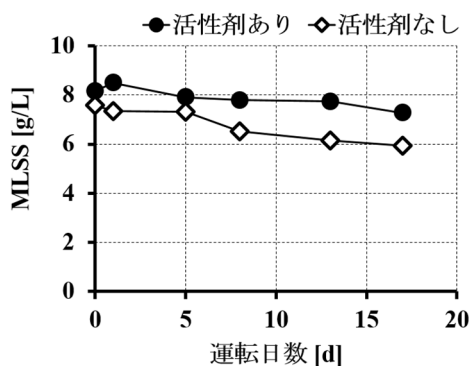


図 1 MLSS の経日変化

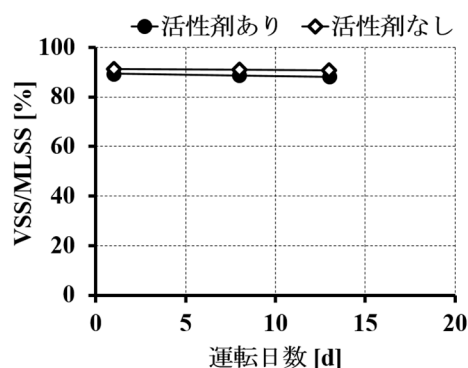


図 2 VSS/MLSS の経日変化

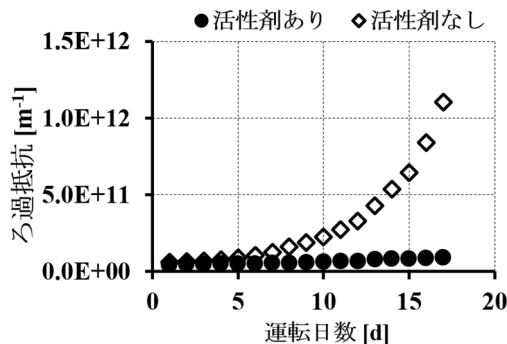


図3 ろ過抵抗の経日変化

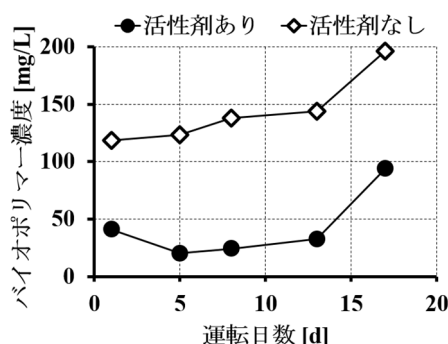


図4 バイオポリマー濃度の経日変化

を示した。割合も同等であることから、添加した無機活性剤が曝気槽内に蓄積しておらず、消費されていることが明らかとなった。

(2) 膜ファウリング抑制効果

ろ過抵抗値の算出結果を図-3に示す。無機活性剤を添加した MBR ではろ過抵抗の上昇が抑制され、膜ファウリングが抑制されていることが明らかとなった。この結果は、25°Cで行った MBR 実験と同様の結果が得られ、10°Cの低温運転においても無機活性剤の添加が膜ファウリング抑制に有効であることが示された。

(3) バイオポリマー低減効果

バイオポリマー濃度の測定結果を図4に示す。無機活性剤を添加した MBR では、添加していない MBR と比較し、バイオポリマー濃度が低い値を示した。この結果から、膜ファウリングの原因物質であるバイオポリマーを低減することで、膜ファウリングが抑制されたことが明らかとなった。よって、10°Cの低温運転においても無機活性剤の添加がバイオポリマー低減に有効であることが示された。

(4) バチルス A 株活性化効果

25°Cの MBR 同様、バチルス A 株の分泌する酵素により、バイオポリマーが分解されたか考察するため、バチルス A 株の菌数を測定した(図5)。結果より、無機活性剤添加によるバチルス A 株の菌数への影響はみられなかった。しかし、10°Cの MBR 運転において、無機活性剤添加による膜ファウリング抑制効果、バイオポリマー低減効果が得られていることから、運転温度 25°Cの MBR とは異なる細菌がバイオポリマー分解に寄与していることが示唆された。

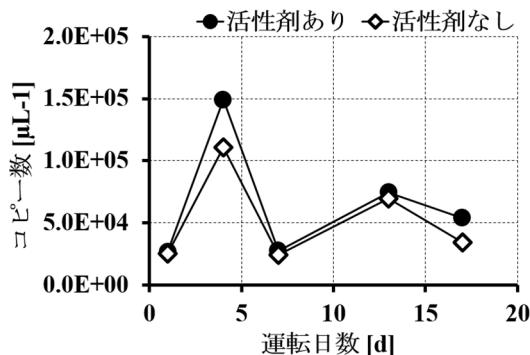


図5 バチルス A 株数の経日変化

(5) バイオポリマー低減効果メカニズムの解明

30°Cで単離した細菌

30°Cで単離した結果、8種の細菌を得られた。単離した細菌のデンプン分解酵素活性を図-6に示す。主にバチルス属細菌がデンプン分解に寄与していることが明らかとなった。

次に、カゼイン分解酵素活性を図-7に示す。デンプン分解酵素活性と同様に、バチルス属細菌がカゼイン分解に寄与していることが明らかとなった。また、バチルス属細菌の中でもデンプン分解のみ活性を示す細菌やデンプンおよび、カゼイン分解どちらも活性を示す細菌が存在することから、細菌によって分泌する酵素が異なる可能性が示唆された。また、デンプン分解を示す種がカゼイン分解を示す種より多いことから、バイオポリマー中の含まれる成分はタンパク質より多糖が多く、多糖の分解能力が高い細菌が単離できたと考えられる。

これらの結果は、25°Cの MBR においてバチルス属細菌がバイオポリマー分解に寄与し、膜ファウリングを抑制するメカニズムを裏付けた。

10°Cで単離した細菌

10°Cで単離した結果、4種の細菌を得られた。単離した細菌のデンプン分解酵素活性を図-8に示す。10°Cではバチルス属細菌は単離されず、Pseudomonas 属細菌、Exiguobacterium sibiricum がデンプン分解に寄与していることが明らかとなった。この結果から、10°Cの MBR では Pseudomonas 属細菌、Exiguobacterium sibiricum がバイオポリマー分解に寄与している可能性が示唆された。特に Pseudomonas 属細菌は低温で増殖する種が多く、デンプンやタンパク質分解酵素を分泌する種も存在することが知られている2)。

次に、カゼイン分解酵素活性を図-9に示す。10°Cにおいてカゼイン分解酵素活性を示す種は単

離できなかった。これらの結果から、10°Cの MBR では多糖の一種であるデンプン分解酵素を分泌する細菌がバイオポリマー分解に寄与していることが示唆された。

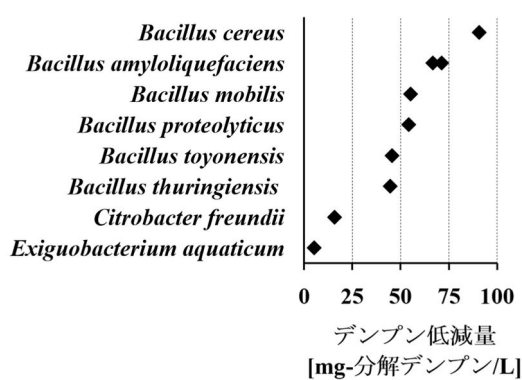


図 6 30 で単離した細菌のデンプン分解酵素活性

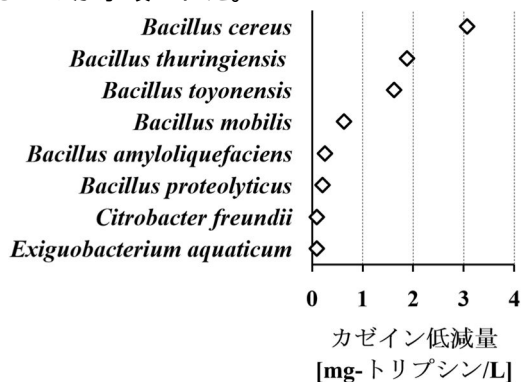


図 7 30 で単離した細菌のカゼイン分解酵素活性

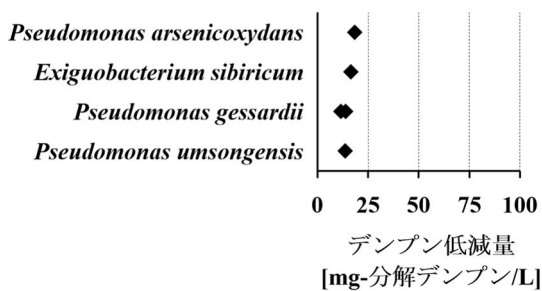


図 8 10 で単離した細菌のカゼイン分解酵素活性

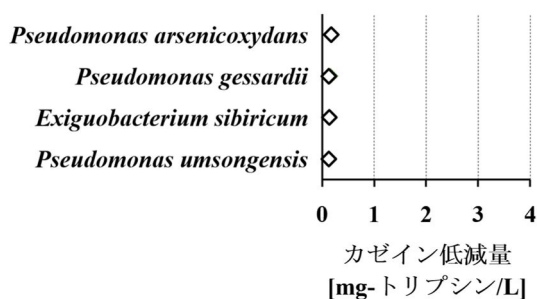


図9 10 で単離した細菌のカゼイン分解酵素活性

参考文献

- 1) Hai-yan, P. et al. : Effect of protease and cellulase on the characteristic of activated sludge, *Hazardous Materials.*, 178 (2010) 397–403.
- 2) Cadera, L., et al. : Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods, *Food Microbiology.*, 54 (2016) 142-153.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 押 かすみ、山村 寛
2. 発表標題 活性汚泥単離細菌の多糖およびタンパク質分解酵素活性
3. 学会等名 第53回日本水環境学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 押かすみ, 山村寛, 渡辺義公, 田口和之, 平岡睦久
2. 発表標題 バイオポリマー分解Bacillus sp.の生理特性
3. 学会等名 下水道研究発表会講演集 55th
4. 発表年 2018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