

## 〈論文〉

## バイオフィーム形成に対する Quorum Sensing の RO 膜抵抗への影響評価およびそのシグナル物質と細菌の同定

石塚 美和<sup>1)</sup>, 諸星 知広<sup>2)</sup>, 池田 宰<sup>2)</sup><sup>1)</sup> (株)東芝 電力・社会システム技術開発センター 環境・水システム開発部  
(〒183-8511 東京都府中市東芝町1番地 E-mail: miwa.ishiduka@toshiba.co.jp)<sup>2)</sup> 宇都宮大学大学院工学研究科 物質環境科学専攻 (〒321-8585 栃木県宇都宮市陽東7-1-2)

## 概要

膜ろ過法は処理水質が安定しており運転管理が容易なことから、上下水道施設や海水淡水化施設への導入が進んでいる。その一方、膜の性能は水温や原水水質の影響を受けやすく、特にファウリングによる透過水量低下が課題となっている。本報告では、逆浸透膜におけるバイオフィームの主な要因であるバイオフィームに対し、その形成のメカニズムから Quorum Sensing という細菌の情報伝達機構に着目し、Quorum Sensing と膜ファウリングの関係性を評価した。その結果、当社工場総合排水の生物処理水において、Quorum Sensing による膜ファウリングへの影響があることが分かった。

キーワード：逆浸透膜, バイオフィーム, Quorum Sensing, バイオフィーム

原稿受付 2014.5.22 原稿受理 2014.9.11

EICA: 19(2・3)9-14

## 1. 背景

21世紀の水需要は、人口の増加等に伴い拡大し、世界的に水不足となることが予想されている。このため水ビジネスが巨大市場となることから、すでに世界規模でのビジネス競争が始まっている<sup>1,2)</sup>。

少ない資源を有効に利用するには、水を効率的にリサイクルさせることが重要となる。水浄化技術の一つである膜ろ過技術は、処理水質が安定で、運転管理が容易なことから、近年普及してきており、なかでも逆浸透（以下、RO とする）膜は、高い除濁性能や脱塩機能を有するため、再生水への導入が進んできている。

一方で、膜処理では原水に含まれる様々な成分などが、膜に付着して透過流束を低下させる膜ファウリングが生じ、これが膜処理における動力や膜洗浄・膜交換といった運転コストを押し上げることが課題となっている<sup>3)</sup>。ファウリングの原因物質としては、炭酸カルシウムや硫酸カルシウム、シリカ等の無機物、界面活性剤やオイル、たんぱく質等の有機物の他、細菌やこれらが産生する粘着物質のバイオフィームがある<sup>4)</sup>。

本報告では、バイオフィームの主な要因の一つであるバイオフィームを対象として、その形成過程で重要となる Quorum Sensing という細菌間の情報伝達機構に着目した。バイオフィームの形成は、Quorum Sensing に関連しており、Fig. 1 に示すように細菌が膜上に付着した後、Quorum Sensing により仲間を認識することで細菌が代謝物を放出し、バイオフィーム

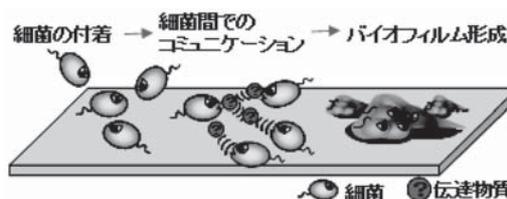


Fig. 1 Mechanism of bio-film formation

を形成すると考えられている<sup>5,6)</sup>。膜処理技術では RO 膜処理などにおいて、Quorum Sensing との関連性が研究されてきている<sup>7)</sup>。本報告では、膜ろ過技術を用いた水再生システムにおける様々な原水に対し、Quorum Sensing とバイオフィームの関係性が成り立つことを確認するため、当社工場総合排水の生物処理水中で Quorum Sensing を行っている細菌およびそのシグナル物質の同定を行い、このシグナル物質による膜抵抗への影響を評価した。Quorum Sensing とは、細胞密度依存性の遺伝子発現制御機構であり、シグナル物質として周囲の菌体密度を一定値以上感知すると、様々な遺伝子の発現を制御する<sup>8)</sup>。アシル化ホモセリンラクトン（以下：AHL とする）は、多くのグラム陰性細菌のシグナル物質として知られており、これらを用いて菌体密度を検知している。

## 2. 方法

### 2.1 シグナル物質の同定

当社工場総合排水の生物処理水を RO 膜で連続処理を行ったところ、バイオフィウリングが生じたことから、Quorum Sensing によるバイオフィーム形成が起こっていると考え<sup>8)</sup>、Quorum Sensing のシグナル物質である AHL を合成する細菌の検出と、その AHL 構造の同定を試みた。AHL 合成細菌の検出には、2 種類のレポーター株 (*Chromobacterium violaceum* CV026, VIR07) を用いて評価を行った。レポーター株は、AHL 合成遺伝子が破壊されていることにより、自ら AHL を合成することはできないが、外部から AHL を受け取ると紫色の色素を生成するため、目的の細菌が AHL を合成しているか確認することが可能である。CV026 は炭素数 4~10, VIR07 は炭素数 10~18 のアシル鎖を持つ AHL に応答するレポーター株である。

手順の概要を Fig. 2 に示す。まず、生物処理水から採取し単離した細菌 (Fig. 2 の工程 1) を 96 穴型マイクロプレートに作成した寒天培地上 (LB) のブロックの上方に植菌し、さらに同ブロックの下方に CV026 と VIR07 を植菌して一晩培養した (30°C) (Fig. 2 の工程 2)。培養後、生物処理水中の細菌が AHL を合成していれば、生成された AHL をレポーター株が受け取り紫色の色素を生成するため、紫色に呈色する。したがって、視覚的に AHL 合成細菌を検出することが可能となる。

次に、検出した AHL 合成細菌が使用する AHL の構造を同定した。AHL 合成細菌を LB 培地で一晩培養し (30°C)、遠心分離した培養液の上澄み液を取り出し、エバポレータを用いて水分を蒸発させた。これに酢酸エチルを加え、分液漏斗を用いて有機層を分離した。乾燥後、残渣をジメチルスルホキシドに溶解して AHL 濃縮液を作成し (Fig. 2 の工程 3)、薄層クロマトグラフィー (Thin-Layer Chromatography: 以下、TLC とする) を用いて展開した。展開には、メルク社製の TLC プレート、展開液にメタノール溶液を用いた。また、展開した結果を視覚化するため、培養したレポーター株を TLC に吹きかけてから一晩培養し、紫色に呈色させて評価を行った (Fig. 2 の工程 4)<sup>9)</sup>。

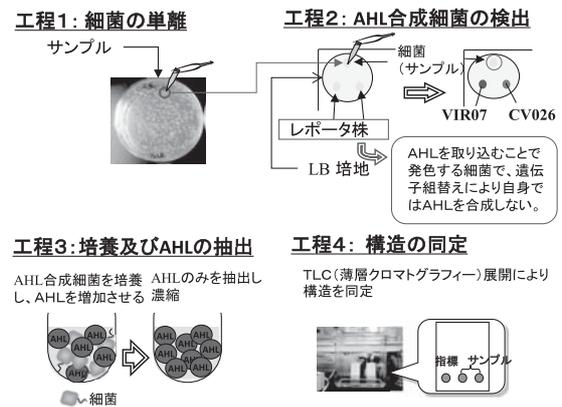


Fig. 2 Method of the AHL identification

### 2.2 連続膜ろ過処理試験

Quorum Sensing とバイオフィウリングとの関係性を評価するため、Fig. 3 に示す小型 RO 膜装置を 2 系列使用し、当社工場総合排水の生物処理水を対象として、連続膜ろ過処理を行った。RO 膜は日東電工製のメンブレンマスター C70-F, 前処理膜はキュノ製の糸巻きフィルタ、真空計は長野計器製の BE10-133 を使用した。2 系列の一方に AHL (N-Butyryl-L-Homoserine Lactone, フナコシ製) を 1 μmol/L 添加し Quorum Sensing を促進させ、両者の RO 膜抵抗の変化を比較評価した。

高圧ポンプを用いて原水槽から原水を 1 MPa (一定) で RO 膜へ通水し、濃縮水は原水槽に戻して循環運転を行った。透過水は容器に受けて 10 分ごとの重量を電子天秤で記録した。排出された透過水量分だけ原水の塩分濃度が上昇するため、純水注入装置にて純水を原水に注入することで原水中の塩分濃度を一定に保った。以上の操作を連続的に実施し、RO 膜の抵抗変化を評価した。RO 膜抵抗は、実測した透過流速を膜ろ過の流束と圧力差の関係を表す基礎式である式 (1) に当てはめて算出した<sup>10)</sup>。

$$J = \frac{\Delta P}{\mu R} \quad (1)$$

J : Flux (流束のことで、透過流速/膜面積から算出)

$\Delta P$  : 膜差圧

$\mu$  : 粘度

R : 膜抵抗

Table 1 Quality of raw water

有機物 (mg/L)		無機物 (mg/L)	
TOC	13.9	Al	0.145
TN	38.8	Ca	104.5
SS	8	Si	21.6
		Fe	0.1
		Mn	0.025
		Mg	14.3
		Na	152

また、RO 膜面上に付着したバイオフィーム量を酸性多糖の一種である Transparent Exopolymer Particles (以下、TEP とする) を代替指標として測定した<sup>11)</sup>。

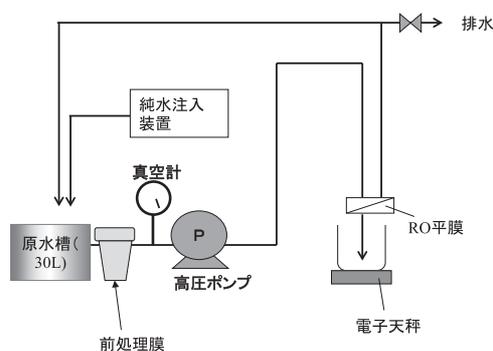


Fig. 3 Schematic flow of the bench-scale RO unit

### 2.3 バイオフィーム形成試験

バイオフィーム形成と Quorum Sensing の関係性を確認するため、さらにラボ試験を実施し、AHL によりバイオフィーム形成の促進有無を評価した。生物処理水中でバイオフィームを形成する細菌 (2.1 で同定した AHL 合成細菌) を用いてマイクロプレートにバイオフィームを形成させ、その付着量をクリスタルバイオレット法により測定した。バイオフィーム形成細菌に対して、AHL 合成遺伝子を破壊した遺伝子組換え菌株 ( $\Delta I$ ) と AHL レセプター遺伝子を破壊した遺伝子組換え菌株 ( $\Delta R$ ) を作成し、これらの菌株におけるバイオフィーム形成を評価した。バイオフィームの形成が、AHL により制御されていると仮定した場合、 $\Delta I$  に AHL を添加するとバイオフィーム形成量が増加するが、 $\Delta R$  に AHL を添加しても感知することができないため、バイオフィーム形成量は変化しないと考えられる。測定手順を以下に示す (Fig. 4 参照)。

- ① 4 mL の LB 液体培地にバイオフィーム形成細菌を培養
- ② ①を 1% となるように R2A 液体培地と混合 (AHL なし)
- ③ ①を 1% となるように 10  $\mu$ M の AHL を添加した R2A 液体培地と混合 (AHL あり)
- ④ ②および③をそれぞれ 100  $\mu$ L ずつ 96 穴プレートに注入し、6 時間培養
- ⑤ 6 時間後の④に 0.1% クリスタルバイオレット溶液を 10  $\mu$ L ずつ 96 穴プレートの各穴に注入後、15 分間放置
- ⑥ 各穴の液体 (バイオフィーム以外) を吸引機で吸引除去する
- ⑦ 300  $\mu$ L の蒸留水を注入して、数分放置した後⑥のように吸引器で吸引除去する
- ⑧ 100  $\mu$ L エタノールを各穴に注入
- ⑨ 595 nm で吸光度を測定する。ブランクとしてエタノールのみを測定し、各値から差し引く

なお、生物処理水で Quorum Sensing を行う細菌を

同定の結果、LB 培地の方が増殖しやすい細菌であったため、①のプロセスでは培養に LB 培地を用い、②以降のプロセスでは、AHL での評価がしやすいこと、後で評価する阻害剤を用いる際に R2A の方がよいため、合わせて R2A 培地を使用する。

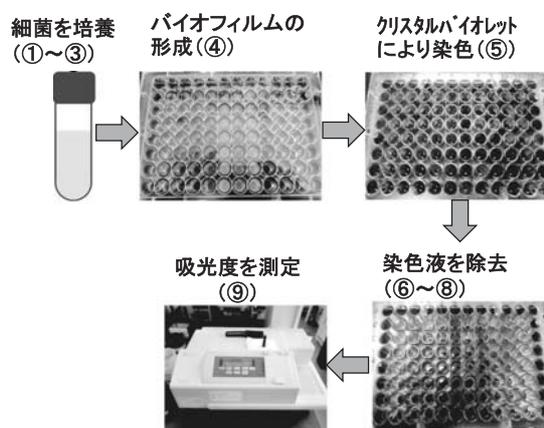


Fig. 4 Procedure for measuring the amount of biofilm formation

## 3. 結果

### 3.1 シグナル物質の同定

生物処理水中で Quorum Sensing を行う細菌とそれらがシグナル物質として使用する AHL を同定した。生物処理水中から単離した細菌が、AHL 合成細菌であるか否かを確認した結果を Fig. 5 に示す。CV026 の AHL 検出細菌がより濃く発色したものが多かったため、主に炭素数 4~10 のアシル鎖を持つ AHL をシグナル物質として使用していると考えられる。また、生物処理水で検出された AHL 合成細菌の 16S rRNA 塩基配列を基にした系統解析により菌種を同定した結果、主に *Aeromonas* 属細菌が生物処理水中に存在していることが分かった。

Fig. 6 に TLC の展開結果を示す。その結果、アシル鎖の炭素数が 4 と 6 (3-oxo-を含む) である AHL (C4-AHL, C6-AHL) を *Aeromonas* 属細菌が用いて Quorum Sensing を行っていることが分かった。

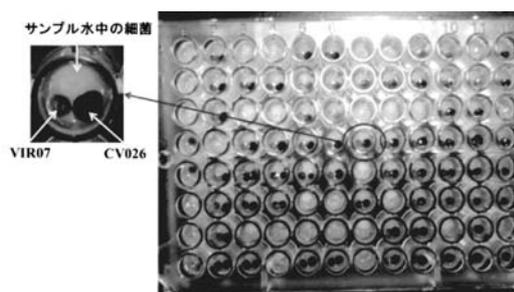


Fig. 5 Result of the bacteria detection

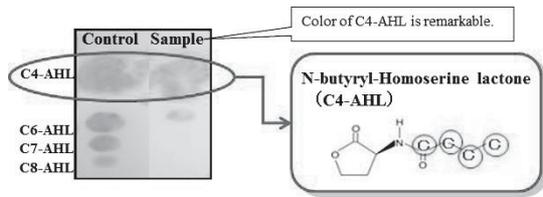


Fig. 6 Detection of AHL molecules by TLC

### 3.2 AHL と RO 膜抵抗の関係性評価

RO 膜におけるファウリングについて、AHL との関係性を確認するため、生物処理水を原水として、3.1 で同定した AHL による膜抵抗上昇への影響を検証した。

Fig. 7 は経過時間に対して RO 膜抵抗の変動を示したものである。膜ろ過処理は、膜が閉塞した時点で停止し、膜の付着物分析を実施した。膜閉塞の判断基準は、膜メーカーが推奨する薬品洗浄の判断基準を参考とし、逆浸透膜の抵抗上昇により透過水量が初期値の 20% 低下とした<sup>12)</sup>。

Fig. 7 より、AHL を添加した系の膜抵抗が、添加なしのものと比較すると、抵抗増加の時間変化が 4 倍大きいことが分かった。これは、AHL が多く存在する状況下でファウリングが促進されたと考えられる。

次に、AHL による TEP 生成への影響を評価するため、膜処理後に膜面上の付着物を除去し、その TEP 量を測定した。この分析結果を Fig. 8 に示す。その結果、AHL を添加することで、TEP 量が多少の増加を示すことを確認した。

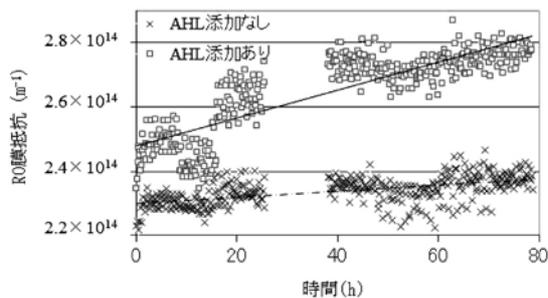


Fig. 7 Influence on resistance by AHL

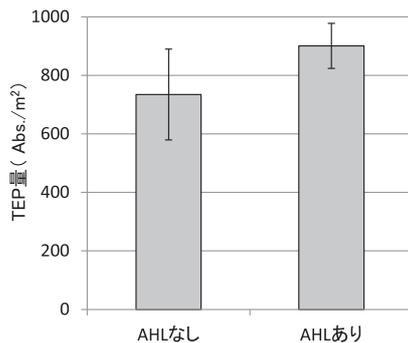


Fig. 8 Amount of TEP in the sample

### 3.3 バイオフィーム形成試験

バイオフィーム形成量の測定結果を Fig. 9 に示した。ΔI は AHL 合成遺伝子を破壊した遺伝子組換え菌株、ΔR は AHL レセプター遺伝子を破壊した遺伝子組換え菌株である。親株及び ΔI では、AHL を添加することでバイオフィーム形成量が増加しているのに対し、ΔR は AHL レセプターが機能せず AHL を認識することができないため、バイオフィーム形成量は AHL の添加、非添加に関わらず変化は見られなかった。このことから、本菌株ではバイオフィーム形成に AHL を介した Quorum Sensing が関与している可能性が示唆された。

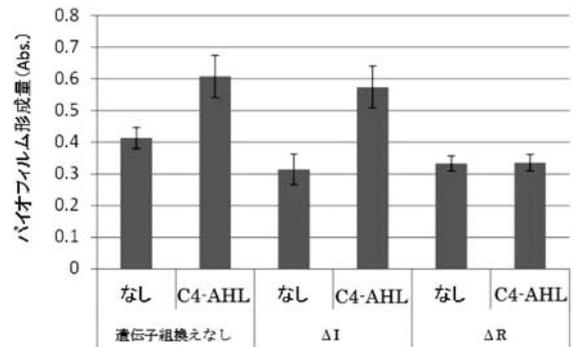


Fig. 9 Amount of biofilm formation

### 3.4 前処理におけるファウリング

RO 膜ろ過処理を実施中、AHL を添加した系において、RO 膜がファウリングを起こす前に、前処理膜 (孔径: 25 μm) のファウリングが発生した。AHL 添加なしの系では、前処理膜の後に設置した真空計の値が -0.005 MPa に対し、添加ありの系では -0.05 MPa とポンプの吸引圧が高く、前処理膜がファウリングを発生していることが分かった (原水槽の水位は同程度であり、原水層の水圧変動の影響は受けていない)。このため、前処理膜を取り出し、その付着物の分析を行った。取り出した前処理膜は、pH=11 の水酸化ナトリウム溶液に 24 時間浸し、付着物を膜表面から取り除いたのち中和を行い、TEP を測定した。その結果を Fig. 10 に示す。AHL を 1 μmol/L 添加した系の前処理膜では、無添加の系に比べて TEP 量が 2.5 倍多く付着していた。これより、RO 膜だけでなく、前処理膜においても、Quorum Sensing が膜抵抗上昇に影響を及ぼしている可能性が確認された。

## 4. ま と め

本報告では、バイオフィームの形成過程で重要となる Quorum Sensing に着目し、その情報伝達ツールである AHL の同定を行い、この AHL による膜抵抗上

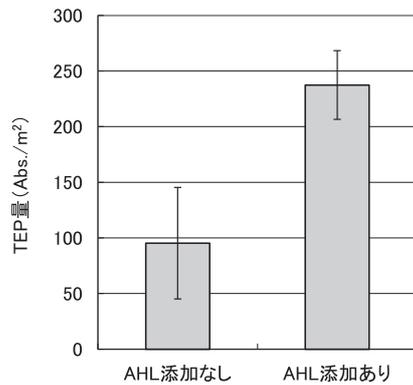


Fig. 10 Amount of TEP on the pretreatment membrane

昇への影響を検証した。その結果、当社工場総合排水の生物処理水中で Quorum Sensing を行い、バイオフィルムを形成する細菌が、主に *Aeromonas* 属細菌であり、これらのシグナル物質が主に N-Butyryl-Homoserine Lactone であることが分かった。また、このシグナル物質の添加により、主なファウリング要因物質の一つであるバイオフィルムが増加し、膜抵抗上昇が顕著となることが分かった。これにより、Quorum Sensing が膜抵抗上昇に寄与している可能性が示唆された。

本報告で対象とした *Aeromonas* 属細菌は、一般的な活性汚泥中にも存在する細菌であるため、下水再生水として膜処理するケースには広く当てはまると考えられるが、これらを実証するためにも、様々な排水の生物処理水に対し、同様な現象が確認できるかを評価する必要があると考える。今後は、AHL を阻害し、膜抵抗上昇を抑制可能な方法の立案も進めていく。

## 参考文献

- 1) 国土交通省水資源部：日本の水資源，pp 51-75(2009)
- 2) 沖 大幹：世界の水危機，日本の水問題，東京大学生産技術研究所(2002)
- 3) 木村克輝：膜の劣化とファウリング対策，株式会社エヌ・ティー・エス，pp 93-107(2008)
- 4) 川崎睦男：膜の劣化とファウリング対策，株式会社エヌ・ティー・エス，pp 88-92(2008)
- 5) 池田 宰：細菌のクオラム・センシングを標的とした病原性抑制技術開発，バイオサイエンスとインダストリー Vol. 69 No. 5, pp 358-364(2011)
- 6) D. An, T. Danhorn, C. Fuqua, M. R. Parsek: Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 103, pp. 3828-3833 (2006)
- 7) M. Kim, S. Lee, H-D. Park, S-I. Choi and S. Hong: Biofouling control by quorum sensing inhibition and its dependence on membrane surface, Water Science & Technology, Vol. 66, No. 7, pp. 1424-1430 (2012)
- 8) 諸星知広，加藤紀弘，池田 宰：バイオフィルムの基礎と制御，株式会社エヌ・ティー・エス，pp 38-45 (2008)
- 9) Ochiai S, Morohoshi T, Kurabeishi A, Shinozaki M, Fujita H, Sawada I, Ikeda T. Production and degradation of N-acylhomoserine lactone quorum sensing signal molecules in bacteria isolated from activated sludge, Biosci. Biotechnol. Biochem. 77(12), pp 2436-2440 (2013)
- 10) 澤田繁樹，膜の劣化とファウリング対策，株式会社エヌ・ティー・エス，pp 12-27 (2008)
- 11) U. Passow and A. L. Alldredge, A dye-binding assay for the spectrophotometric measurement of transparent exopolymer particles (TEP), Limnol. Oceanogr., 40 (7), pp 1326-1335 (1995)
- 12) 日東電工株式会社，スパイラル型エレメント NTR-759HR-S4, NTR-759HR-S8 取扱説明書，pp 28

# Evaluation of Effect of Quorum Sensing Affecting the RO Membrane Resistance through Biofilm Formation, and Identification of Responsible Bacteria and Signal Molecules

Miwa Ishizuka<sup>1)</sup>, Tomohiro Morohoshi<sup>2)</sup> and Tsukasa Ikeda<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> TOSHIBA Corporation Power and Industrial Systems R&D Center

<sup>2)</sup> Utsunomiya University Department of Material and Environmental Chemistry

† Correspondence should be addressed to Miwa Ishizuka :

(TOSHIBA Corporation Power and Industrial Systems R&D Center

E-mail : miwa.ishiduka@toshiba.co.jp)

## Abstract

Reverse osmosis (RO) membrane filtration has features of easy operation management and stable quality of treated water though, it has problems with membrane foulants. The RO membrane fouling is due to various components and contaminants, and is the main cause for increase of the electricity cost and membrane replacement cost in RO plants.

In this study, we focused on the quorum sensing from the viewpoint of the mechanism of biofilm formation, and tried to identify bacteria performing quorum sensing in the sample. As a result, we confirmed *Aeromonas* is one of the responsible bacteria, and additional AHL caused the increase of RO membrane resistance.

**Key words :** reverse osmosis membrane, bio-fouling, quorum sensing, bio-film