

海水脱塩処理における膜透過水への微生物漏洩を リアルタイムで監視する技術の開発

藤岡 貴浩

長崎大学大学院工学研究科

概要

逆浸透膜を用いた海水淡水化中における微生物の挙動をオンラインで計測することは、膜透過水の安全性を担保するための重要な役割を果たす。リアルタイム微生物数計測技術はオンラインで細菌(バクテリア)数を計測する能力を持つが、水中有機物の自家蛍光がその分析を妨害してしまうことが分かっている。そこで、本研究では、これら分析妨害物質を連続で除去するための前処理技術(透析膜前処理)の有効性を評価すると共に、海水中のバクテリア数のオンライン計測の定量性を検証することを目的とした。さらに、海水淡水化処理における逆浸透膜の供給水及び膜透過水中で検出されるバクテリア数の検証も行った。結果、透析膜前処理は海水中に存在する分析妨害物質を効果的に取り除き、バクテリアのオンライン計測を可能にした。リアルタイム微生物数計測器の計測値は、蛍光顕微鏡と染色剤を使った蛍光染色法による値よりも、フローサイトメーターによる分析値がより近い値を示した。フローサイトメーターとリアルタイム微生物数計測器は染色剤の使用有無の違いはあるが、原理的に同じ(水中粒子それぞれに対し、散乱光強度と蛍光強度により微生物粒子数を決定)である。よって、フローサイトメーターによって決定されるバクテリア濃度は、リアルタイム微生物数計測器により計測されるバクテリア濃度を推定する指標となり得ることが分かった。最後に、膜供給水と膜透過水中に存在するバクテリア数をリアルタイム微生物数計測器により計測することで、逆浸透膜を用いた海水淡水化装置のバクテリア阻止性能を評価した。結果、リアルタイム微生物数計測器で計測された膜供給水と膜透過水のバクテリア濃度はそれぞれ約 1.1×10^4 counts/mL、約 2.0×10^2 counts/mL であった。本結果を基に、常に膜透過水に検出されるバクテリア数をベースラインとしてオンライン計測し、それを大幅に超えるような場合には膜劣化・膜破断が起きているとアラームを出すシステムの構築が推奨された。本研究結果より、リアルタイム微生物数計測技術は海水淡水化処理において、膜のバクテリア阻止性能を担保するための監視計測技術として有効であることが明らかになった。

1. 研究目的

海水を処理して淡水を作り出す海水淡水化設備は、脱塩のための逆浸透膜及びその前処理である砂ろ過処理(又は精密膜ろ過処理)で構成されている。海水中に存在する病原性微生物はこれら膜処理で除去されるが、膜処理による完全な病原性微生物の除去を常時担保する技術が未だ存在しないため、膜処理は水の安全性を保証する技術と成りえていない。また、前処理より逆浸透膜面へ漏れてくる微生物は、逆浸透膜の膜面で増殖して「バイオ

ファウリング」を起こすことで造水コストを高める原因となっている。このような現状の中、微生物汚染の常時監視が唯一可能な技術であるリアルタイム微生物数計測器を、膜の完全性担保技術として確立するための研究開発を世界に先駆けて実施してきた^[1, 2]。本技術(リアルタイム微生物数計測器)は、水中の細菌(バクテリア)数を染色剤添加なしでリアルタイム計測できる。本技術は、製薬用水や透析水等の清澄な水の汚染検知のために開発された経緯を持ち、不純物を多く含む水の計測には適していない。海水

淡水化においては、膜透過水には不純物がほとんど含まれていないことから十分計測が可能であるが、膜供給水には多くの不従物が含まれており、本技術が海水中のバクテリア数計測に対応可能であるかは分かっていない。さらに、この新手法による海水中の微生物の定量性は未だ検証されておらず、分析値の信頼性が不明である。そこで本研究では、海水処理水中の微生物数のリアルタイム計測の定量性を検証し、さらに実証試験を通して膜の完全性を担保するための技術として確立することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 透析膜前処理

前処理には中空糸透析膜モジュール (PES-Dα 25 eco, ニプロ社製) を用いた。本モジュールは有効膜面積 3.0 m^2 、中空糸内径 $200 \mu\text{m}$ 、中空糸外 $280 \mu\text{m}$ で構成されている。サンプルは中空糸内側、透析液は外側を通る。前処理装置は、膜モジュール、スムーズフローポンプ (Q100, タクミナ社製)、透析液循環用のダイアフラムポンプ (DCP 8800, Aquatec International 社製)、10 L の透析液容器であった (図 1a)。

2.2 分析方法

リアルタイム微生物数計測器 (IMD-WTM, アズビル社製) を使用した。本分析器は、 405 nm の励起光 (Excitation light, EX) に対し、分散光 (Scattered light, SL) の強度を基に粒子がバクテリアの大きさに相当するかを決定し (図 2a)、さらに、バクテリアのリボフラビンから発せられる自家蛍光 (Fluorescent light, FL) の強度を基に粒子が微生物かを決定する。

微生物由来の自家蛍光強度は低く、分析妨害物質であるフミン酸又はフミン酸様物質等の自家蛍光強度は高いことから、分析妨害物質はバクテリアの自家蛍光をマスクする役割を果たしてしまう。よって、前処理はこの分析妨害物質の自家蛍光強度を下げる役割が期待された (図 2b)。これら分析妨害物質は、透析膜の孔径よりも十分小さいため、膜中を拡散によって透過してサンプルから分離されると想定された。さらに、またサンプル中のバクテリアは透析膜の孔径よりも大きいいため、膜を透過せず濃度をほとんど変えないままリアルタイム微生物数計測器まで到達することが想定された。

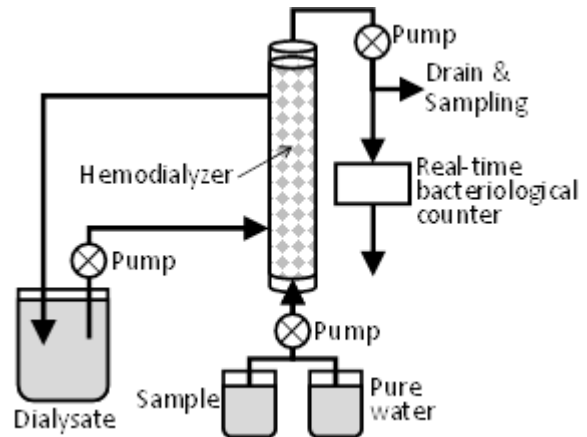


図 1 透析膜前処理とリアルタイム微生物数計測器の概要図

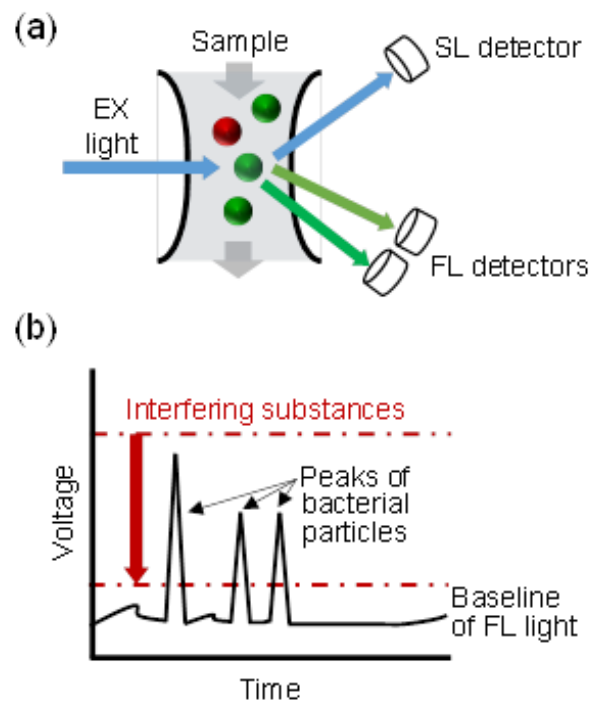


図 2 (a)微生物数計測器の原理図と(b)分析妨害物質の低減効果

バクテリア濃度は、フローサイトメーターと蛍光染色法により細胞膜が正常な生細胞 (Intact bacteria) と細胞膜が傷ついた死細胞 (damaged bacteria) それぞれの濃度を測定した。フローサイトメーター (BD Accuri® C6, BD Biosciences 社製) では、まず染色剤 SYBR Green I nucleic acid gel stain (Takara Bio 社製) により全菌数を求

め、死細胞のみを染色する propidium iodide (Thermo Fisher Scientific 社製) を使って計数した死細胞数を全菌数から引くことで生細胞数を算出した。蛍光顕微鏡 (BZ-X800, キーエンス社製) を使った蛍光染色法では、染色剤として LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific 社製) を使用した。この染色剤には全ての菌を染色する SYTO®9 と死細胞のみを染色する propidium iodide が含まれている。15 分間の染色時間後、200 μL のサンプルを孔径 0.2 μm のポリカーボネート製のトラックエッチド膜 (メルク社製) でろ過し、これを蛍光顕微鏡で測定した。3 次元蛍光測定には、RF-6000 spectrophotometer (島津製作所社製) を用いた。全有機炭素濃度の分析は、TOC-L CSN (島津製作所社製) を使用した。

2. 3 前処理評価方法

前処理では、まずサンプル側の純水を透析膜モジュールに 10.5 mL/min で送水した。透析側は、透析液である純水を 0.5 L/min で循環した。透析膜モジュールを出た処理水は、リアルタイム微生物数計測器に 10.0 mL/min の流量で送水された。この純水を用いたバクテリア計測値が安定した後、純水を海水 (砂ろ過による前処理水を行った海水) に切り替えた。切替を行って 20 分経過した後に、透析膜モジュール前後の水を採水し、手分析によるバクテリア濃度計測と溶存有機物の解析を行った。

2. 4 膜ろ過装置と分析

運転中の海水淡水化パイロット試験設備から逆浸透膜の膜供給水と膜透過水 (ろ過水) を採水し、それぞれに対してオンライン分析を行った。試験装置には、4 インチの SWC5 海水淡水化用逆浸透膜 (Hydranautics 社製) が一本重点されており、海水を砂ろ過で前処理した供給水が使用された (図 3)。サンプル後、膜透過水はリアルタイム微生物数計測器で直接計測し、膜供給水は透析膜前処理を行った上で連続計測を行った。

3. 結果と考察

3. 1 透析膜前処理とオンライン分析

全体として、透析膜モジュールによる前処理は安定的に砂ろ過処理後の海水中的微生物数を計測することを可能にした。海水サンプル中では、バクテリア濃度として約 4.2×10^3 counts/mL が計測された (図 4)。なお、純水から

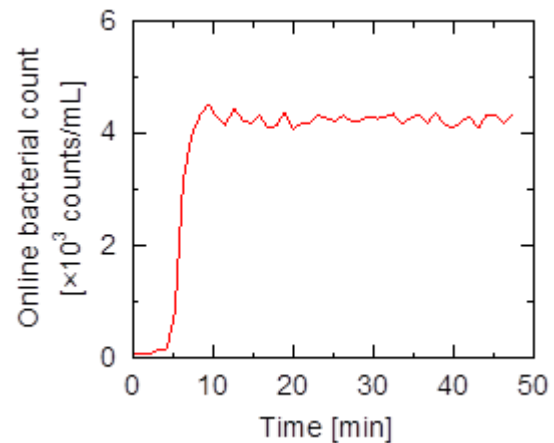
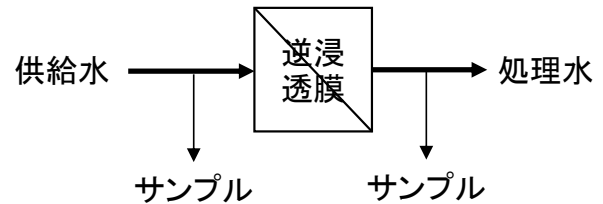


図 4 透析膜前処理を行った海水のオンラインバクテリア計測濃度

海水へサンプルを切り替えた ($t = 0$ min) 後、計測が安定するまでに約 10 分程度要した。サンプル容器から透析膜モジュールを配管を通して経路してリアルタイム微生物数計測器に至るまでの空間容積は比較的大きく (> 50 mL), 前処理を行う際には 10 分程度のタイムラグが出てしまうことが分かった。この時間は透析膜前処理に送る水量を 10.5 mL/min から大幅に増やすことで達成可能であるが、透析膜の処理水量と分析妨害物質の除去性能を確認する必要がある。

透析膜モジュールによる前処理によってサンプル中のバクテリア濃度に大幅な変化が起こらないことを確認するため、前処理前後のバクテリア濃度をフローサイトメーターと蛍光染色法により手分析にて比較評価した。結果、いずれの分析法を用いた評価においても、透析膜前処理後のバクテリア濃度は、前処理前のバクテリア濃度よりわずかに低下した (図 5)。低下した理由としては、バクテリアの中空糸透析膜内への吸着や、前処理システム内の配管への吸着が考えられた。しかし、オンライン分析結果 (図 4) は非常に安定していたことから、この透析膜前処理中のバクテリアの減少は安定したものであると考えられる。よっ

図 3 逆浸透膜装置とサンプリング場所の概略図

て、透析膜モジュールによる海水の前処理は、バクテリア濃度を大幅に変えることなくバクテリア濃度を計測することを可能にする技術である。

次に、リアルタイム微生物数計測器による計測値の定量性を、手分析の結果と比較することで検討した。透析膜処理後の海水サンプルは、フローサイトメーターによる全菌数と生菌数がそれぞれ 2.9×10^3 and 2.8×10^3 counts/mL、蛍光染色法による全菌数と生菌数がそれぞれ 2.4×10^5 and 3.2×10^4 counts/mL であった(図 5)。オンライン分析による菌数が 4.2×10^3 counts/mL であることから、蛍光染色法に比べ、フローサイトメーター分析による数がよりオンライン分析の数値に近い結果となった。フローサイトメーターとリアルタイム微生物数計測器は染色剤の使用有無の違いはあるが、原理的に同じ(水中のそれぞれの粒子に対し、散乱光と蛍光の強度により微生物粒子数を計測)である。一方、蛍光顕微鏡を使った蛍光染色法はサイズの識別が正確にされていないため、フローサイトメーターとリアルタイム微生物数計測器で微生物粒子としてカウントされていない小さなバクテリアも計測している可能性がある。このような計測原理の違いが実際に計測しているバクテリアの種類・サイズ・活動レベルにどの程度影響を及ぼしているかは不明であるが、本研究結果より、フローサイトメーターによって計測するバクテリア濃度は、リアルタイム微生物数計測器により計測するバクテリア濃度を推定する指標となり得ることが分かった。

3. 2 分析妨害物質除去

次に、透析膜前処理による海水中の分析妨害物質の除去効果を、リアルタイム微生物数計測器が計測している蛍光波長領域内の強度変化を調べることで評価した。励起波長 405 nm に対し、バクテリア中に存在するリボフラビンの蛍光はおよそ 475 - 575 nm で計測される^[3]。よって、リアルタイム微生物数計測器は、それぞれの粒子の蛍光波長 490 - 530 nm (Band B) を計測している。これに加え、PTFE やシリコン粒子などの疑似自家蛍光物質^[4]を識別するため、もう一つの蛍光波長 415 - 450 nm (Band A) も計測している。つまり、Band A で蛍光波長がピークを示す粒子は疑似自家蛍光物質として判別されてバクテリアとしてカウントされず、Band B で蛍光波長がピークを示す粒子はバクテリアとしてカウントされる。

3次元蛍光装置を用いてこれら Band A と B 領域内の蛍光強度の変化を調べた結果、透析膜前処理により海水サンプル中の蛍光強度が低下することが分かった(図 6)。特に Band B 領域の蛍光強度は、透析膜前処理により大幅に低下しており、ほとんどの分析妨害物質が海水サンプル中から除去されたことを示している。この除去は、微生物から発せられる自家蛍光が溶存有機物によって妨害されにくくなったことを示している。

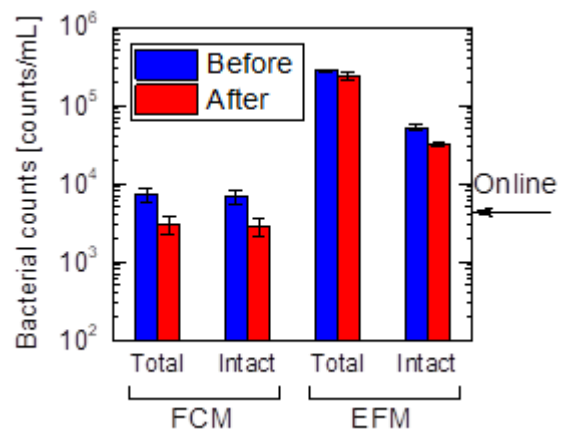


図 5 透析膜前処理前後のフローサイトメーター (FCM)、蛍光顕微鏡 (EFM) 計測によるバクテリア数とオンライン分析によるバクテリア数

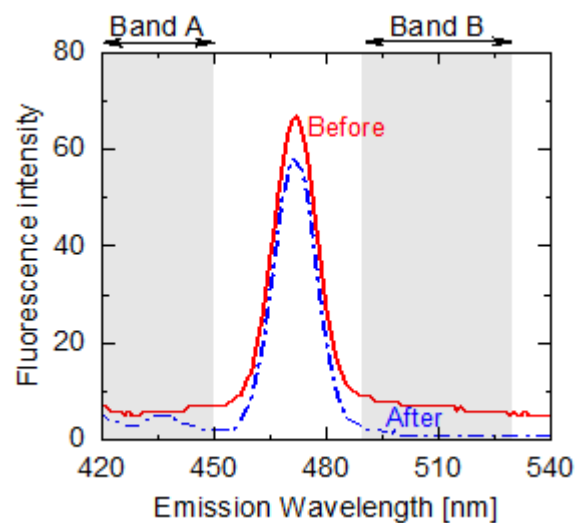


図 6 海水の透析膜前処理前後の蛍光スペクトラム(励起光の波長 = 405 nm)

蛍光波長領域 Band A と B に影響を及ぼしている分析妨害物質の種類について、3次元蛍光分析により調査を行った。結果、透析膜前処理前の海水は励起/蛍光波長 320/400 nm(記号A)の地点でピークを示していた(図 7a)。これらはフミン酸又はフミン酸様物質であると想定される¹⁵⁻¹⁷⁾。これら物質は Band A と B にまたがっており、リアルタイム微生物数計測器の分析に影響を及ぼしていると考えられた。一方、透析膜前処理を行うことで、これらフミン酸又はフミン酸様物質のピークは確認されず、これらの物質を除去できたことが分かった(図 7b)。実際、全有機炭素濃度も 0.5 mg/L(透析膜前処理前)から < 0.05 mg/L(透析膜前処理後)まで低下しており、透析膜前処理は海水中のほとんどの有機物を除去していることが分かった。

なお、フミン酸又はフミン酸様物質の他に、海水中にタンパク質系物質のピークが励起/蛍光波長 270/300 nm(トリプトファン等、記号 B)、220/300 nm(チロシン等、記号 C)で確認された(図 7a)。これらは、低分子量有機物であるにも関わらず、透析膜前処理ではほとんど除去されていなかった(図 7b)。しかし、これら励起/蛍光波長の範囲の物質は分析妨害を起す物質ではないことから、透析膜前処理の有効性を低下させる要因にはならない。

これら透析膜を通して海水サンプル側から透析液側へ拡散・除去された分析妨害物質は、循環している透析液内(本研究では 10 L)において濃度が高くなっていく。膜分離において拡散による輸送は濃度差が駆動力になることから、透析液側濃度の上昇はサンプル側と透析液側の溶質濃度差を低下させ、結果として分析妨害物質の拡散(除去)量を徐々に低下させていくことになる。そこで、サンプル側の分析妨害物質の濃度の経時変化をリアルタイム微生物数計測器の蛍光強度データに基づいて調べた。結果、Band A・B の蛍光強度は共に徐々に上昇することが分かった(図 8)。これは、透析液内の分析妨害物質濃度が徐々に上がっていることを意味した。長期連続計測を行う場合には、この透析液内の分析妨害物質濃度を低く維持する必要がある。その方法として、透析液の容量を多くすること、透析液を全量交換すること、透析液回路内に透析液の再生処理を追加することなどが考えられた。

3.3 逆浸透膜前後のバクテリアカウント

これまでの成果により、逆浸透膜前後のバクテリア数をリアルタイム微生物計測器によって計測することが可能に

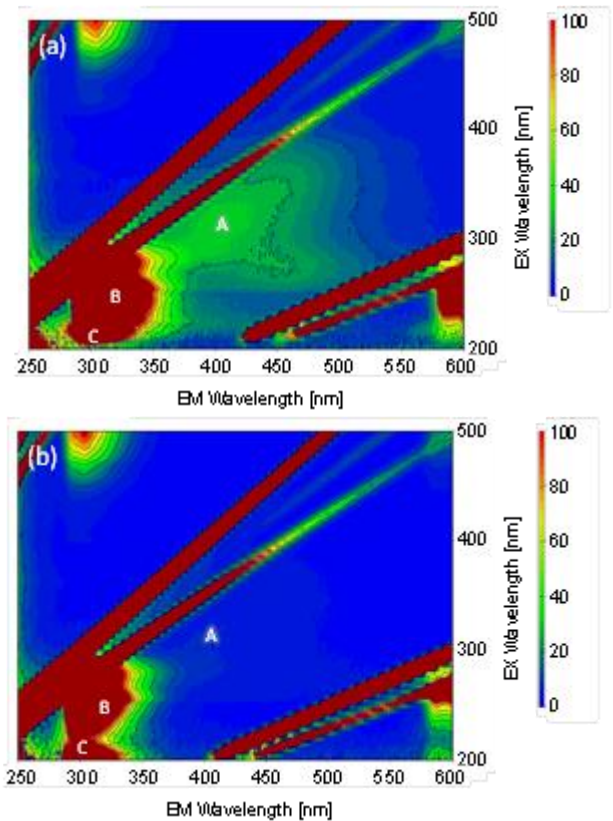


図 7 海水の 3 次元蛍光測定結果:(a)透析膜前処理前、(b)透析膜前処理後

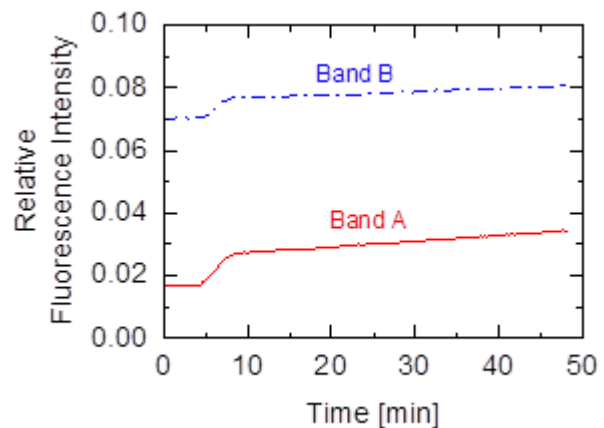


図 8 リアルタイム微生物数計測器で測定されたサンプルの蛍光強度の推移

なったことから、海水淡水化パイロット試験設備から採水した膜供給水(砂ろ過処理後の海水)と膜透過水のバクテリア数の計測を行った。結果、膜供給水と膜透過水のバクテリア濃度はそれぞれ約 1.1×10^4 counts/mL、約 2.0×10^2 counts/mL であった(図 9)。この濃度を基に計算されたバ

クテリア阻止率は 98%であった。この逆浸透膜による低いバクテリア阻止率は他の実規模/パイロット設備でも報告されている^{18, 9)}。培養法でカウントされる細菌は培地でコロニーを形成する生菌である(全菌数の数%程度)のに対し、リアルタイム微生物計測器は水中の生菌ほぼすべてを計測していると考えられ、このように多量の生菌数が膜透過水で検出された可能性がある。ただし、今回は現場での連続計測ができなかったため、採水時のコンタミや、測定までの2日間で細菌数が増加した可能性は否定できない。今後、海水淡水化パイロット試験設備の逆浸透膜ベッセル前後にサンプリング配管を直接接続し、膜供給水と膜透過水のバクテリア濃度を数週間連続して計測する予定である。

逆浸透膜処理に対するリアルタイム微生物計測器の使い方として、オンライン計測中に膜透過水中に常に検出されるバクテリア数をベースラインとし、そのラインを大幅に超えるようなバクテリア数が検出された場合には膜劣化・膜破断が起きていると判断することが可能である。また、膜供給水及び膜透過水両方の阻止率データを随時モニタリングすることにより、その阻止率が大幅に低下した場合には、同様に膜の異常が起こっていると判断できる。これに加え、膜供給水側で大幅なバクテリア数の増加が起こった際は、その前処理又は取水海水の方で異常が起こったことをアラームで知らせることも可能になる。さらに、膜供給水中のバクテリア濃度をオンラインで測定する本前処理技術は、膜ファウリングの進行と供給水中の細菌数の相関を調べるためのツールとして適用が考えられる。以上のことから、リアルタイム微生物数計測技術は、海水淡水化処理において、逆浸透膜前後のバクテリアの挙動をオンラインで監視するために役立ち、膜のバクテリア阻止性能を担保するための監視計測技術として特に有効であることが分かった。

4. まとめ

本研究では、まずリアルタイム微生物計測器の分析妨害物質を連続で除去するための透析膜前処理技術の有効性を評価した。結果、砂ろ過処理後の海水中の分析妨害物質は透析膜前処理によって十分量除去され、不純物を含む海水中のバクテリアのオンライン計測を可能にした。

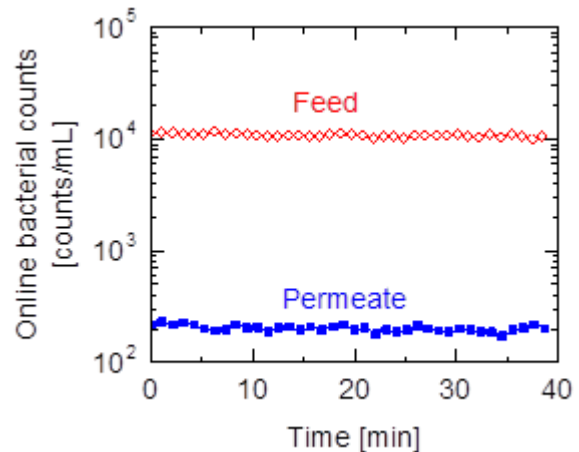


図 9 リアルタイム微生物計測器による逆浸透膜供給水(砂ろ過処理後の海水)と逆浸透膜透過水のバクテリア数計測結果。

次に、海水中のバクテリア数のオンライン計測の定量性を評価した。結果、リアルタイム微生物数計測器に原理が似たフローサイトメーターによって決定されるバクテリア濃度は、リアルタイム微生物数計測器により計測されるバクテリア濃度を推定する指標となり得ることが分かった。さらに、この分析技術の逆浸透膜処理の阻止性能担保技術としての可能性の調査を行った。結果、バクテリア除去率をオンラインで計測できることが分かった。以上の本研究結果から、リアルタイム微生物数計測技術は、逆浸透膜をベースとした海水淡水化処理において、膜透過水の安全性を担保するための監視計測技術、また膜のバクテリア阻止性能を担保するための監視計測技術として有効であることが明らかになった。

5. 文献

- [1] T. Fujioka, A.T. Hoang, H. Aizawa, H. Ashiba, M. Fujimaki, M. Leddy, Real-Time Online Monitoring for Assessing Removal of Bacteria by Reverse Osmosis, *Environ. Sci. Technol. Letters*, 5 (2018) 389-393.
- [2] T. Fujioka, T. Ueyama, F. Mingliang, M. Leddy, Online assessment of sand filter performance for bacterial removal in a full-scale drinking water treatment plant, *Chemosphere*, 229 (2019) 509-514.

- [3] T. Naramura, T. Ide, K. Sekimoto, S. Takesawa, Novel System to Detect Bacteria in Real Time in Aquatic Environments, *Biocontrol Sci.*, 18 (2013) 75-82.
- [4] A. Scott, Selecting Microspheres to Calibrate and Assess Online Water Bioburden Analyzer System Performance, *American Pharmaceutical Review*, September/October (2017) 1-4.
- [5] T. Liu, Z.-l. Chen, W.-z. Yu, S.-j. You, Characterization of organic membrane foulants in a submerged membrane bioreactor with pre-ozonation using three-dimensional excitation–emission matrix fluorescence spectroscopy, *Water Res.*, 45 (2011) 2111-2121.
- [6] S.-N. Nam, G. Amy, Differentiation of wastewater effluent organic matter (EfOM) from natural organic matter (NOM) using multiple analytical techniques, *Water Sci. Technol.*, 57 (2008) 1009-1015.
- [7] W. Chen, P. Westerhoff, J.A. Leenheer, K. Booksh, Fluorescence excitation–emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter, *Environ. Sci. Technol.*, 37 (2003) 5701-5710.
- [8] K.P. Ishida, W.J. Cooper, Analysis of parameters affecting process efficiency, energy consumption, and carbon footprint in water reuse, *WaterReuse Research Foundation*, Alexandria, VA, 2015.
- [9] T. Fujioka, R. Makabe, N. Mori, S.A. Snyder, M. Leddy, Assessment of online bacterial particle counts for monitoring the performance of reverse osmosis membrane process in potable reuse, *Sci. Total Environ.*, 667 (2019) 540-544.

Development of the Real-Time Counting Technology for Bacteria in the Reverse Osmosis Permeate during Seawater Desalination

Takahiro Fujioka

Graduate school of Engineering, Nagasaki University

Summary

The online monitoring of bacterial content during seawater desalination by reverse osmosis membrane is an important strategy for enhancing safety of treated waters. Although real-time bacteriological counting techniques enable online bacterial counts monitoring, the auto-fluorescence of background organic constituents in the waters (e.g., humic acids) interferes with such analysis. In this study, the efficacy of a new pre-treatment technique involving a dialysis membrane for continuously removing interfering substances is evaluated. In addition, the reliability of bacterial counting by real-time bacteriological counting technique is assessed. Further, bacterial counts in the feed and permeate of reverse osmosis process during seawater desalination were evaluated. Pre-treatment of pre-sand filtered seawater using the dialysis membrane demonstrates the effective removal of background interfering substances, thereby improving online bacterial analysis. The bacterial counts by the real-time bacteriological counter were closer to those by flow cytometry than those by epifluorescence microscopy. These two techniques are fundamentally different; the flow cytometry technique counts bacteria through nucleic acid staining, whereas the real-time bacteriological counter considers only bacteria-sized particles with high auto-fluorescence intensity. However, both analytical techniques measure bacterial cell counts based on (a) real-time particle counts and (b) biological activities determination from the fluorescence intensity of the particles. Thus, the intact bacterial cell counts by flow cytometry highlight the potential for predicting changes in bacteria counts by the real-time bacteriological counter. Lastly, the separation performance of reverse osmosis for bacterial removal was assessed by counting bacteria in the feed and permeate of reverse osmosis treatment during seawater desalination. The results showed that bacterial counts in the feed and permeate were approximately 1.1×10^4 and 2.0×10^2 counts/mL, respectively. It was suggested that the online-monitored bacterial counts in permeate can be the baseline for generating an alarm of abnormal number of bacteria in permeate, so that the deterioration of reverse osmosis separation performance can be detected. Overall, this study indicates that the real-time bacterial counting technique is an effective approach for monitoring the separation of bacteria by reverse osmosis treatment during seawater desalination.