

平成 22 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20760358
 研究課題名 (和文) 硝化微生物群集の解析による生物活性炭の硝化機構の解明と運用方法の最適化
 研究課題名 (英文) Investigation of nitrification mechanism of biological activated carbon through analysis of nitrifying microorganisms and optimization of operational conditions
 研究代表者
 春日 郁朗 (KASUGA IKURO)
 東京大学・大学院工学系研究科・助教
 研究者番号：20431794

研究成果の概要 (和文)：高度浄水処理として、オゾン-生物活性炭処理が各地の浄水場に導入されているが、生物活性炭における硝化をはじめとした生物学的浄化機構には不明な点が多い。そこで本研究では、アンモニア酸化を担うアンモニア酸化細菌とアンモニア酸化古細菌の存在量や多様性を調査することで、生物活性炭の硝化機構の解明を目指した。その結果、生物活性炭で優占しているのはアンモニア酸化古細菌であること、また、前塩素処理を行うと、アンモニア酸化古細菌の定着が著しく阻害を受けることなどが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：Ozonation-biological activated carbon (BAC) has been widely used as an advanced drinking water treatment. However, mechanism of biological treatment such as nitrification in biological activated carbon remains unknown. In this study, we investigated abundance and diversity of ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and archaea (AOA) associated with BAC. The results indicated that dominant ammonia-oxidizers are AOA, not AOB. In addition, pre-chlorination severely inhibit the settlement of AOA on BAC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：環境微生物工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：アンモニア酸化古細菌、アンモニア酸化細菌、アンモニア性窒素、高度浄水処理、硝化、生物活性炭

1. 研究開始当初の背景

現在、各地の浄水場において、オゾン酸化と生物活性炭 (Biological Activated Carbon) とを組み合わせた高度浄水処理プ

ロセスの導入が進められている。生物活性炭では、活性炭が有機物を物理的に吸着すると共に、活性炭に定着した微生物により、生物学的な浄水処理が行われている。生物

活性炭の生物学的作用として、特に注目されているのがアンモニア性窒素の酸化（硝化）である。アンモニア性窒素は、塩素注入量の増加、クロラミン生成によるカルキ臭の発生などにつながるため、適切に処理することが求められている。しかし、生物活性炭の運用は経験的に確立されてきた経緯があり、どのような微生物が硝化を担っているのかという微生物学的な知見がないままに運転されているのが現状である。

従来、アンモニア性窒素の酸化を行う微生物としては、真正細菌に属する「アンモニア酸化細菌（Ammonia-Oxidizing Bacteria：AOB）」と称される微生物群のみが知られてきた。しかし、近年、環境メタゲノム解析の結果から、真正細菌とは系統的に全く異なる古細菌の中に、アンモニウム性窒素の酸化能を有する微生物「アンモニア酸化古細菌（Ammonia-Oxidizing Archaea：AOA）」が存在することが明らかになり、従来の硝化微生物の知見を大きく修正することが求められている。AOAは土壌、海洋、活性汚泥など様々な場所から検出されており、土壌中のAOAのアンモニア酸化酵素（*amoA*）遺伝子の存在量は、AOBの*amoA*遺伝子量の3000倍にも上るという報告もある。しかし、AOAの単離株は現在1株しか得られておらず、その生理特性、AOBとの競合等については不明な点が多い。

以上のような背景を踏まえ、本研究では、AOBだけではなく、AOAも加味した最新の微生物学的知見に基づき、生物活性炭の硝化機構の全容を解明するという着想を得るに至った。

2. 研究の目的

生物活性炭の導入を進める浄水場では、確実な硝化を期待しているものの、硝化機構の詳細が不明であるために、経験的な運用に頼らざるを得ない状況にある。そこで、本研究では、次のような観点から、生物活性炭の硝化機構を明らかにすることを目的とした。

1) 生物活性炭に定着する硝化微生物群集の特性評価

現状では、生物活性炭において硝化を担っている微生物の情報が欠如していることから、国内の複数の浄水場に設置された生物活性炭を対象として、生物活性炭に定着しているAOA/AOBの群集構造・存在量を分子生物学的手法によって明らかにする。

2) 生物活性炭の硝化微生物の単離

これまで、生物活性炭に定着する硝化微生物を単離して、個々の生理特性を評価した研究はない。本研究では、アンモニウア

性窒素濃度を段階的に変えた無機培地を用いて、生物活性炭に定着した硝化微生物の単離を試みる。

3) 生物活性炭への硝化微生物の定着過程の評価

生物活性炭が硝化機能を示すまでには、経験的に数週間から数ヶ月要するとされてきたが、この間の定着過程に関する知見は皆無である。生物活性炭に定着する硝化微生物の起源、その定着過程を解明することは重要である。

4) 生物活性炭の硝化活性に与える影響因子の特定と運転条件の最適化

1)から3)の結果を踏まえ、生物活性炭の硝化活性を迅速に立ち上げ、維持するための運転条件の最適化を検討する。

3. 研究の方法

生物活性炭を導入している国内の複数の浄水場を選定し、生物活性炭試料の硝化能を評価すると共に、生物活性炭に定着するAOB、AOAの*amoA*遺伝子の定量・多様性評価を分子生物学的手法によって行った。特に2008年度には、新規に生物活性炭を導入した生物活性炭施設を対象におよそ一ヶ月間隔で、原水および逆洗直後の生物活性炭を採取し、生物活性炭への硝化微生物の定着と硝化能との関係について評価した。

室内実験としては、生物活性炭試料を異なるアンモニア性窒素濃度（0.01, 0.1, 1, 10mM）で連続培養し、アンモニア酸化古細菌の集積を試みた。

4. 研究成果

1) 生物活性炭に定着する硝化微生物群集の特性評価

生物活性炭処理に関するパイロットプラントを運転している浄水場対象として、AOB、AOAの存在状況を調査した。本プラントでは、砂ろ過処理をオゾン-生物活性炭の前段あるいは後段においた2系列で運転を行っている。2つの系の生物活性炭のアンモニア酸化能を評価したところ、系列ごとの明確な違いは見られなかった。リアルタイムPCRによって、AOB-*amoA*遺伝子、AOA-*amoA*遺伝子のコピー数を定量した。その結果、AOB-*amoA*遺伝子は 10^4 (gene copies/g-dry)程度であったのに対して、AOA-*amoA*遺伝子は 10^6 (gene copies/g-dry)程度と、AOBよりもAOAの方が優占していることが推測された。T-RFLPによるAOA-*amoA*遺伝子の多様性の評価を行ったところ、全ての試料において170 bpと223 bpにピークが検出され、系列ごとのプロファイルに差異は見られなかった。また、生物活性炭の深さ方向におけるAOB、AOAの分布状

況を調査したところ、深さ方向に特徴的な分布は見られず、一様に分布していることが示唆された。更に、逆洗前後の生物活性炭試料について、アンモニア酸化能と AOB、AOA の付着量を比較した。その結果、逆洗前後におけるアンモニア酸化能、AOB-*amoA* 遺伝子及び AOA-*amoA* 遺伝子のコピー数に変化は見られなかった、これらの結果から、通常の逆洗条件では、硝化微生物の顕著な剥離やそれに伴う硝化能の低下は起こりにくいことが示された。

2) 生物活性炭の硝化微生物の単離

硝化能を発現している生物活性炭を採取し、室内で異なるアンモニア性窒素濃度 (0.01, 0.1, 1, 10 mM) を含む無機培地を連続的に供給し、AOA, AOB の馴致を試みた。培養を 2 ヶ月ほど続けた。それぞれの系において、硝化活性は認められたが、AOA あるいは AOB の存在量が有意に増加する傾向は認められなかった。

3) 生物活性炭への硝化微生物の定着過程の評価

2007 年 10 月より新規に生物活性炭の運転を開始した浄水場を対象として、定期的なモニタリングを 1 年間にわたって行った。

図 1 に、2007 年 10 月から 2008 年 11 月にかけてのアンモニア性窒素濃度 (原水、凝集沈澱処理水、生物活性炭処理水) と着水井における前塩素注入率の推移を示す。原水中のアンモニア性窒素は、0.10mgN/L 以下であることが多かったが、特に 2008 年 1 月から 2 月にかけて 0.10mgN/L を超え、最大で約 0.30mgN/L にまで達した。前塩素処理を行っている間は、凝集沈澱処理水の段階でアンモニア性窒素が除去されていることが確認された。しかし、生物活性炭処理水については、原因は明らかではないが、定量下限付近の低濃度のアンモニア性窒素が検出されるという現象が 2008 年 6 月あたりまで見られた。2008 年 7 月 23 日より前塩素処理を停止したところ、凝集沈澱処理水からアンモニア性窒素が検出されるようになったが、生物活性炭処理水からはアンモニア性窒素は検出されず、硝化反応が十分に進行していることが明らかにされた。

図 2 に、原水及び生物活性炭を対象とした 16S rDNA (全細菌、全古細菌)、*amoA* 遺伝子 (AOA, AOB) の定量結果を示す。原水における 16S rDNA のコピー数は、全細菌で約 10^9 gene copies/100mL、全古細菌で約 10^8 gene copies/100mL のオーダーで推移し、季節的な変動は見られなかった。AOA-、AOB-*amoA* 遺伝子のコピー数については、通年で AOA-*amoA* 遺伝子の方が AOB-*amoA* 遺伝子よりも多く存在していた。

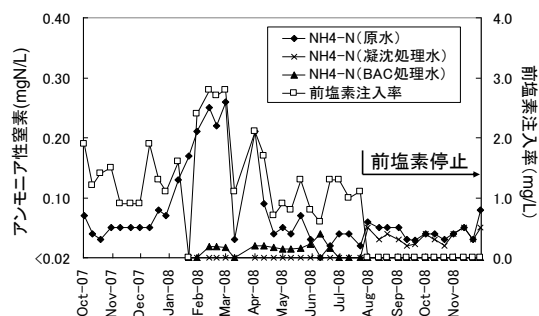
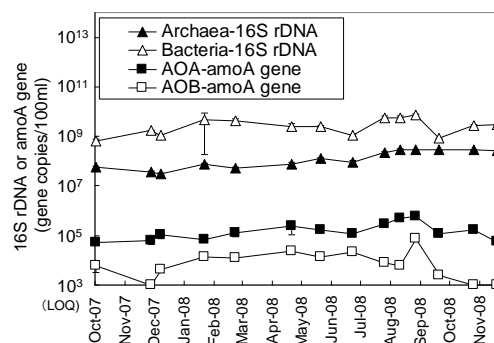
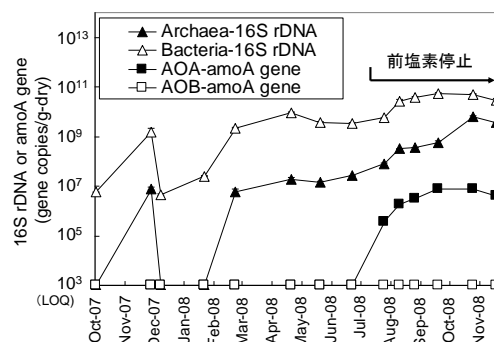


図 1 アンモニア性窒素濃度と前塩素注入率の推移



a) 原水



b) 生物活性炭

図 2 原水(a)、生物活性炭(b)における 16S rDNA (全細菌、全古細菌)、*amoA* 遺伝子 (AOB、AOA) コピー数の変化

一方、生物活性炭については、全細菌の 16S rDNA が、運転開始直後から 10^6 gene copies/g-dry オーダーで検出された後、2008 年 11 月には 10^{10} gene copies/g-dry オーダーまで増加した。全古細菌の 16S rDNA については、2008 年 2 月までは定量下限以下になることがあるなど不安定であったが、それ以降は漸増し、2008 年 11 月には 10^9 gene copies/g-dry オーダーに達した。全細菌、全古細菌ともに前塩素処理の停止の前後でコピー数が大きく変動するという事とはなく、前塩素処理による定着阻害は見られなかった。ただし、今回の検出対象は DNA であり、微生物の活性の議論とは直接関連しないことにも注意する必要がある。一方、硝化微生物

物については、従来、生物活性炭における硝化を担っていると考えられてきたAOBの *amoA* 遺伝子は通年で検出されなかった。AOA の *amoA* 遺伝子についても、前塩素処理を行っている期間は検出されなかったが、前塩素処理を停止するとその直後から 10^5 gene copies/g-dry オーダーで検出され、2008年9月以降は 10^6 gene copies/g-dry オーダーにまで達して安定した。前塩素処理を停止しても生物活性炭でアンモニア性窒素が除去されていたことから、生物活性炭における硝化能の発現とAOAの動態は関連していることが推察される。また、硝化活性のある生物活性炭において、AOBよりもAOAが優占するという結果は、他の生物活性炭試料の結果とも一致した。今回の結果より、前塩素処理によって、生物活性炭で優占する硝化微生物であるAOAの定着は阻害されていたが、前塩素処理を停止すると速やかにその定着が促進されたことが明らかになった。

4) 生物活性炭の硝化活性に与える影響因子の特定と運転条件の最適化

本研究の成果として、処理プロセスにおける砂ろ過処理の位置は、オゾン-生物活性炭処理の前段であろうと後段であろうと、硝化微生物の存在量や多様性には大きな影響を与えないことが示されたが、前塩素処理を行うと特に生物活性炭の立ち上げ時にはAOAの定着に悪影響を及ぼすことが明らかになった。

生物活性炭は各地で導入が積極的に進められているにもかかわらず、実際には硝化をはじめとする機能がブラックボックスとして扱われているプロセスである。本研究の成果は、硝化機能の発現を迅速に達成するための要件を微生物学的視点から明示したものであり、生物活性炭を経験的に運用してきた現場に対し、有用なフィードバックとなることが期待される。

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1件)

- ① Ikuro Kasuga, Hiroataka Nakagaki, Futoshi Kurisu, Hiroaki Furumai (2010) Abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria on biological activated carbon in a pilot-scale drinking water treatment plant with different treatment processes, *Water Science and Technology*, in press、査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 中垣宏隆、春日郁朗、栗栖太、古米弘明：高度浄水処理用生物活性炭へのアンモニア酸化細菌及び古細菌の定着過程、第43回日本水環境学会年会講演要旨集、p. 289、2009年3月17日、山口大学(山口県)、査読無
- ② 春日郁朗、中垣宏隆、栗栖太、古米弘明、関哲雄：生物活性炭立ち上げ時の微生物定着に及ぼす前塩素処理の影響、第60回全国水道研究発表会講演集、pp. 164-165、2009年5月21日、大宮ソニックシティ(埼玉県)、査読無
- ③ 春日郁朗、中垣宏隆、栗栖太、古米弘明：生物活性炭における硝化微生物の付着過程と硝化能との関係、第9回日中水道技術交流会論文集(第8回水道技術国際シンポジウム 特別セッション)、pp. 15-18、2009年6月11日、神戸国際会議場(兵庫県)、査読無
- ④ Ikuro Kasuga, Hiroataka Nakagaki, Futoshi Kurisu, and Hiroaki Furumai : Abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria on biological activated carbon in a pilot-scale drinking water treatment plant with different placements of sand filtration, *The 3rd IWA-ASPIRE conference Abstracts*, p. 6. 2009年10月19日、台北国際コンベンションセンター(台北、台湾)、査読無
- ⑤ Ikuro Kasuga : Characterization of ammonia-oxidizing archaea associated with biological activated carbon used for advanced drinking water treatment, *International Workshop on water and Wastewater Treatment*, 2009年10月24日、国立成功大学(台南、台湾)、査読無

[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://www.recwet.t.u-tokyo.ac.jp/kasuga/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春日 郁朗 (KASUGA IKURO)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：20431794

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :