

論文の内容の要旨

論文題目 Functional characterization of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in granular activated carbon filter for advanced drinking water purification
(高度浄水処理粒状活性炭ろ過におけるアンモニア酸化古細菌及びアンモニア酸化細菌の機能特性評価)

氏名 牛 佳

原水中のアンモニア態窒素は、塩素と反応することでカルキ臭の原因物質の一つであるトリクロラミンを生成する。水道水におけるトリクロラミン生成を抑制するためには、アンモニア態窒素の除去が必要である。近年、高度浄水処理としてオゾン処理と粒状活性炭 (GAC) ろ過を組み合わせた方法が広く導入されてきている。物理吸着は GAC の主要な除去機構であるが、GAC 表面に定着した微生物も浄水処理に貢献していることが知られている。特に、アンモニア酸化古細菌 (AOA) とアンモニア酸化細菌 (AOB) は硝化に寄与している。しかし、AOA については、近年発見されたということもあり、AOB との関係やアンモニア酸化への寄与など情報が不足している。従って、GAC ろ過は、アンモニア酸化微生物に関する理解が進まないまま、経験的に運用されているのが現状である。そこで、本研究では、GAC に付着する AOA 及び AOB の特性解析を通して、GAC ろ過の硝化機構を解明することを目的とした。具体的な課題としては、(1) 異なる浄水場における GAC のアンモニア態窒素除去能の評価、(2) GAC に付着する AOA 及び AOB の存在量と多様性の評価、(3) 浄水工程及び逆洗時における AOA 及び AOB の動態評価、(4) 異なる培養条件下 (アンモニア態窒素濃度、有機物の影響) における AOA 及び AOB の増殖活性の DNA-安定同位体プロービングを用いた評価、を掲げた。

異なる浄水場の GAC のアンモニア態窒素除去能を評価するために、2011 年 8 月～11 月に、国内 12 か所の浄水場 (Plant A～L) から 13 種類の GAC を採取した (使用期間 4～46 ヶ月)。アンモニア態窒素除去能は、異なる試料において大きな差異はなかった (0.006～0.047 mg N/L/h/g-dry)。AOA *amoA* 遺伝子と AOB *amoA* 遺伝子の量は試料間で大きく異なったが (AOA *amoA* 遺伝子: $9.3 \times 10^3 \sim 3.9 \times 10^8$ gene copies/g-dry、AOB *amoA* 遺伝子: $5.5 \times 10^4 \sim 4.2 \times 10^8$ gene copies/g-dry)、ほとんどの試料で AOA の方が優占していた。アンモニア態窒素除去能は、AOA あるいは AOB、両者の合計量、どちらか多い方のいずれにも有意な相関を示さなかった。制限末端断片長多型と塩基配列解析により、AOA と AOB の群集構造を解析したところ、検出されたすべての AOA は水圏の Group 1.1A の AOA に近縁であった。また、AOA については、ある特定の操作的分類単位 (OTU) がすべての試料から共通して検出された。一方、AOB については、GAC 間での差異が大きく、すべてに共

通した OTU は検出されなかった。季節による影響を評価するために、東京都の 6 種類の GAC を夏と冬に採炭した。AOB が優占している GAC については、AOB の存在量の減少と共に、冬季にアンモニア態窒素除去能が大きく減少していた。一方、AOA については、冬季でも存在量の減少は観察されなかった。群集構造は AOA も AOB も、季節による変化は見られず安定していた。

浄水工程における AOA 及び AOB の動態を評価するために、原水及び各処理工程水を国内 12 か所の浄水場から採水した。また、東京都の 5 か所の浄水場については、夏と冬の 2 回、採水を行った。原水中では、AOA の存在量の方が AOB よりも 1~2 桁ほど多かった。AOA の存在量はオゾン処理で減少する場合と変化しない場合が見られたが、GAC 処理水では増加していた。一方、AOB の存在量は浄水工程を通して減少傾向であった。原水中の AOA の多様性は高かったが、浄水工程を経るに従って検出される OTU は減少し、オゾン処理後には限られた OTU しか残存しないことが明らかになった。この残存した OTU は、GAC から検出される OTU と一致していた。従って、オゾン処理は GAC に定着する AOA の多様性を決定する重要な要因の一つであることが示唆された。GAC 流入水、流出水の AOA、AOB の濃度から正味の増殖速度を推算したところ、AOA の方が AOB よりも正味の増殖速度は速いことが示された。夏と冬の工程水を比較したところ、AOA 及び AOB ともに、冬季には凝集沈殿処理水中の濃度が顕著に減少することが観察され、前塩素処理の影響が考えられた。しかし、AOA の多様性については、夏季と冬季とで大きな差異は見られなかった。また、Plant C において、AOA 及び AOB に与える逆洗の影響を評価したところ、GAC における AOA 及び AOB の付着量は逆洗前後でほとんど変化していなかった。逆洗水中の AOA 濃度は逆洗工程を通してほぼ一定であったのに対して、AOB 濃度は逆洗工程後半では低下していた。逆洗全体を通して系外に排出される AOA 及び AOB の量は、GAC ろ過池における現存量と比較すると微々たるものであることが判明し、逆洗が AOA や AOB に与える影響は顕著ではないことが推察された。

アンモニア態窒素除去能と AOA 及び AOB の存在量との間には有意な相関が見られなかったことから、GAC-C, D, E を対象として、異なるアンモニア態窒素濃度条件下における AOA 及び AOB の増殖活性を、 ^{13}C -標識重炭酸を用いた DNA-SIP によって直接的に評価した。低濃度条件下 (0.14 mg N/L) では、培養 7 日後、14 日後、28 日後の試料において、AOA の増殖が観察された。一方、AOB は最初の 14 日間は増殖せず、28 日後に初めて増殖が観察された。高濃度条件下 (1.4 mg N/L) では、AOA と AOB の双方が 14 日後までに増殖活性を示した。これらの傾向は、AOA の方が AOB よりも多い GAC-C、両者がほぼ等しい GAC-D の双方において共通していた。一方、AOB の方が AOA よりも多い GAC-E については、低濃度条件下において、培養 28 日後にも AOB の増殖が観察されないという差異があった。実際の浄水場において、処理対象のアンモニア態窒素濃度はおおむね $<0.02 \sim 0.1$ mg N/L であることから、本研究の成果は、実際の浄水処理において AOA の方が AOB

よりも硝化に貢献していることを示唆している。更に、AOA 及び AOB の増殖において、アンモニア態窒素が唯一の電子供与体になっていることも、アンモニア態窒素のみを培地から抜いた実験により確認した。

最後に、AOA 及び AOB の混合栄養増殖活性とオゾン処理水中での増殖活性について DNA-SIP による評価を行った。 ^{13}C -ピルビン酸を投与したところ、14 日間の培養において、AOA も AOB もピルビン酸を同化することは観察されなかった。しかし、全細菌の SIP プロファイルの結果から、従属栄養性の細菌群が ^{13}C -ピルビン酸を同化したこと、その結果としてアンモニア態窒素も同化経由で除去されたことが確認された。一方、尿素の利用性を評価したところ、 ^{13}C -尿素を AOB は直接炭素源・エネルギー源として増殖することができたが、AOA は同化することができなかった。一方、 ^{12}C -尿素と ^{13}C -重炭酸を同時に投与すると、AOA が尿素由来のアンモニア態窒素を酸化すると共に、重炭酸を同化することが観察された。オゾン処理水に低濃度のアンモニア態窒素 (0.14 mg N/L) と $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -重炭酸を投与した系において、14 日間の培養では AOA も AOB も増殖しなかったが、28 日後には AOA が増殖することが観察された。オゾン処理水中において、AOA の増殖が遅延した理由としては、何かしらの増殖律速因子が不足していたことが推察された。以上の結果から、AOA は低濃度のアンモニア態窒素に親和性が高く、独立栄養増殖するのに対して、AOB は尿素などの有機窒素を直接利用できる利点を持ち合わせていることが明らかになった。

本研究は、高度浄水処理で用いられている GAC ろ過の硝化機構の解明に資する成果を示している。多くの GAC 試料において、優占しているアンモニア酸化微生物は AOA であり、低濃度のアンモニア態窒素条件下では、AOA の独立栄養増殖活性が AOB よりも高いことが明らかになった。一方、AOB は有機窒素を直接利用できるという利点があることも確認された。これらのことから、GAC ろ過のアンモニア酸化については、AOB よりも AOA が重要な役割を担っていると考えられる。本研究の成果を踏まえ、実際の環境条件下での AOA の生理や活性を更に研究することは、GAC ろ過の硝化性能を最適化する上で有用である。