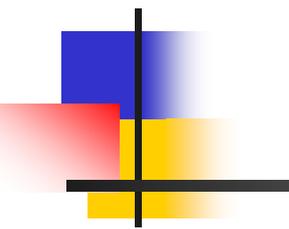


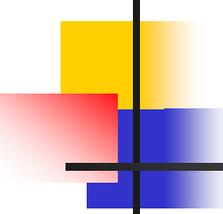
第10回水環境制御研究センターシンポジウム
－水道システムにおける微生物指標の活用と課題－



生物活性炭処理における 微生物群集の構造と機能

2007年12月7日

東京大学大学院工学系研究科
都市工学専攻 春日郁朗

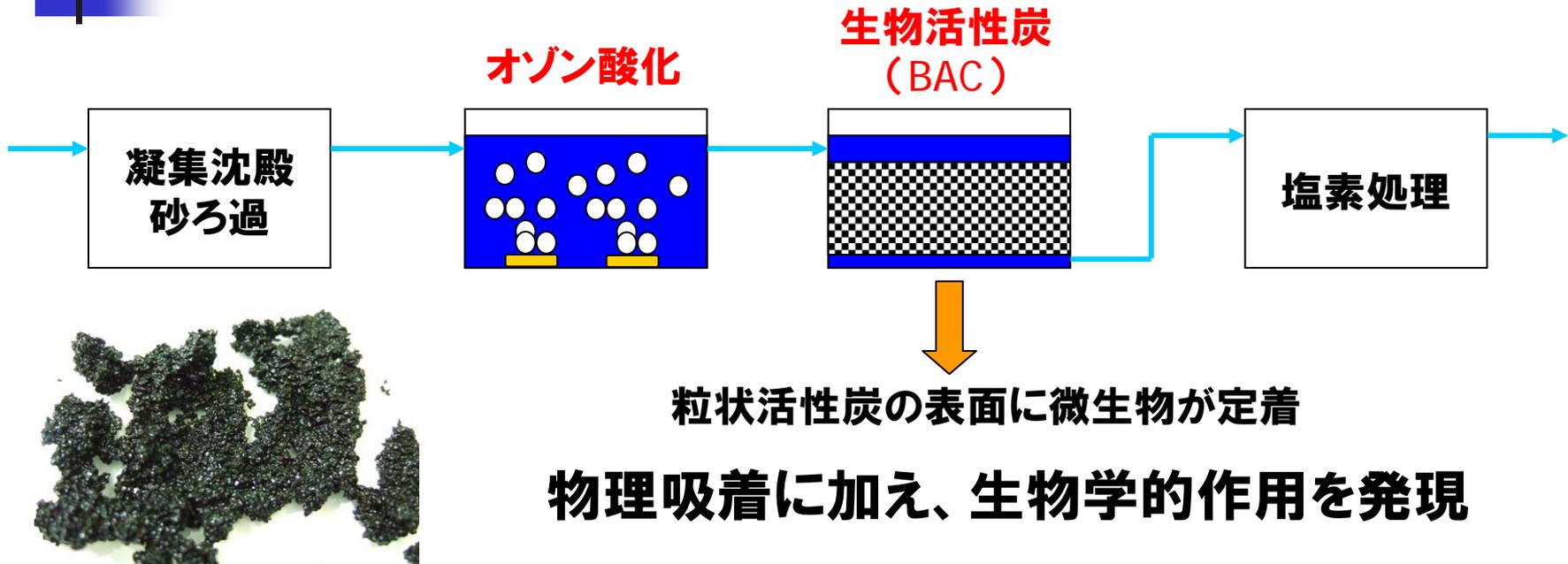


本日の話題

1. 生物活性炭の概要と課題
2. 生物活性炭の微生物群集構造の評価
3. 生物活性炭における硝化機構
4. 生物活性炭におけるAOC除去機構
5. 今後の展開

1. 生物活性炭の概要と課題

高度浄水処理としての生物活性炭



高度浄水処理の中核技術として、“安全でおいしい水”を供給

例



「安全でおいしい水プロジェクト」(東京都)



「おいしい水計画」(大阪市)



「おいしい水づくり計画」(千葉県)

生物活性炭で期待される効果

■ 有機物の生分解

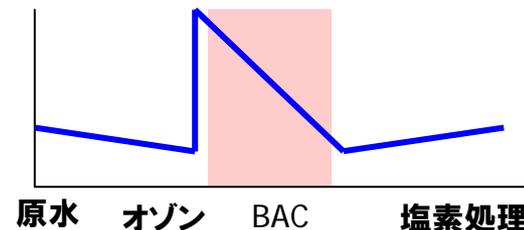
トリハロメタン前駆物質

カビ臭物質

陰イオン界面活性剤

・・・生物再生(Bioregeneration) ⇒ 吸着作用が長期間持続

生物同化性炭素
(Assimilable Organic Carbon)



・・・親水性低分子有機物(オゾン副生成物) ⇒ 吸着されにくい

■ 硝化

アンモニア性窒素

・・・水温低下時に除去率が低下

生物活性炭の導入の歴史と現状

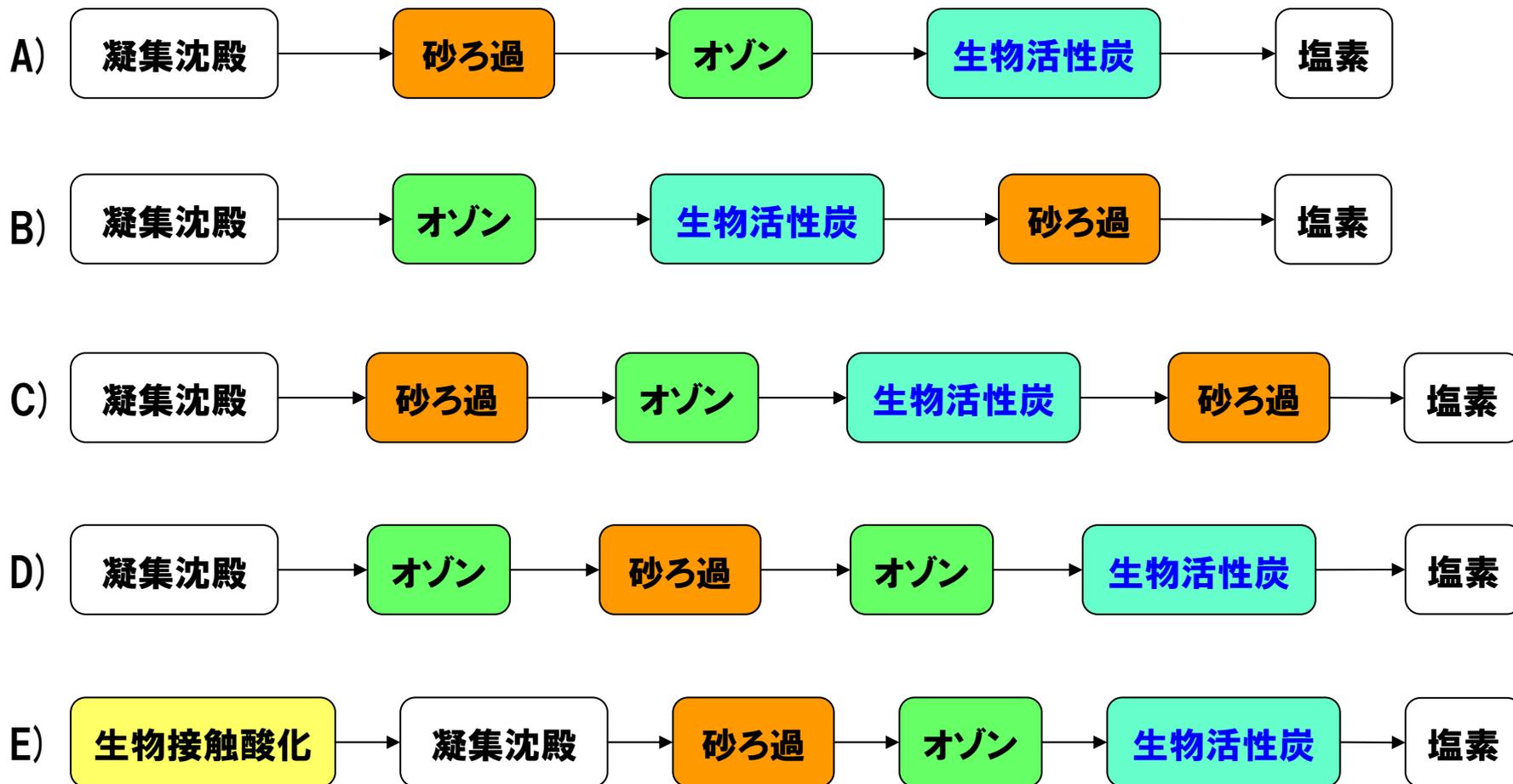
- オゾン-GAC(Granular Activated Carbon)・・・塩素処理の後段に活性炭処理
- オゾン-BAC(Biological Activated Carbon)・・・塩素処理の前段に活性炭処理

⇒ 概念的に定義されている部分もあり、検討の余地あり

Cf. 年譜	(S.55	柏井浄水場(千葉県)	オゾン-GAC)
	H.3	楠見池浄水場(現丸亀市)	オゾン-BAC
	H.4	北谷浄水場(沖縄県)	+生物接触酸化
		金町浄水場(東京都)	オゾン-BACの後段に砂ろ過
	H.10	大阪府営水道	オゾン-GAC 全量供給
	H.12	大阪市水道局	オゾン-BAC 全量供給
	H.13	阪神水道企業団	オゾン-BAC 全量供給
	H.19	ちば野菊の里浄水場(千葉県)	オゾン-BAC
	H.25	東京都水道局	利根川水系全浄水場 オゾン-BAC導入

生物活性炭の処理方式

わが国で実用化されている生物活性炭処理のバリエーション



生物活性炭を巡る課題

生物活性炭の“生物”に関する知見が不足

■ 生物学的作用はブラックボックス(概念的・教科書的な理解)

- 何が何をしているのか(生物の実体・生態が不明)?
- 経験的な運用(水質条件、運転条件)
- 生物学的作用の評価方法(アンモニア性窒素濃度のみが手かかり)
- 活性炭交換時期の評価(生物再生の効果?)

GACとBACの差異－現場報告例－

	カビ臭物質	溶存有機炭素
GAC(+塩素)	2年:除去率40-60%	300日:除去効果消失
BAC(-塩素)	3年:除去率90-100%	3年:除去効果持続

水道施設設計指針2000

生物活性炭の生物学的処理の機構解明

本研究の目的

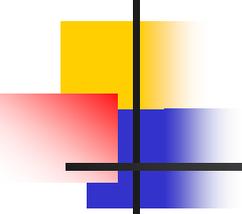
微生物学的視点から生物学的処理の機構を解明する

- 生物活性炭にはどの程度の微生物が付着しているのか？
- 微生物の多様性と生理・生態
- 地域・運転方式による微生物群集構造の差異
- 微生物の付着過程
- ...

現場への工学的フィードバック



- 水質・運転因子が生物活性にどのように影響するのか？
- どのように生物学的作用を評価すればよいか？



2. 生物活性炭付着微生物 の群集構造

生物活性炭の「生物」の評価

- 環境中の細菌の中でコロニーを形成するのは わずかに数%
→ 多くの見過ごし
- 分子生物学的手法により、培養可能性に左右されずに直接遺伝子レベルで把握。



○ どの程度の菌が付着しているのか？

⇒ DAPI染色による生物活性炭付着菌数(全菌数)の計数

○ 付着微生物の群集構造、多様性は？

⇒ クローニング、T-RFLP(末端制限酵素断片長多型)法

- 真正細菌 (16S rDNA)
- 真核生物 (18S rDNA)・・・原生動物, 後生動物

調査対象の浄水場

生物活性炭を導入している全国7箇所の浄水場を対象として、
原水・活性炭に付着する微生物群集構造を評価

浄水場	原水	処理工程
Plant A	河川水	凝沈→オゾン→活性炭→塩素→ろ過→塩素
Plant E	河川水	
Plant F	河川水	
Plant B	河川水	凝沈→前ろ過→オゾン→活性炭→塩素→ろ過→塩素
Plant C	湖水	凝沈→ろ過→オゾン→塩素→活性炭→塩素
Plant D	ダム湖水	凝沈→中間オゾン→ろ過→後オゾン→活性炭→塩素
Plant G	ダム湖水 地下水等	生物接触酸化→凝沈→ろ過→オゾン→活性炭→塩素

2005年8月～9月に採取(活性炭は、逆洗工程の直前に表層部から採取)

→オゾン-GAC処理

活性炭試料の特徴

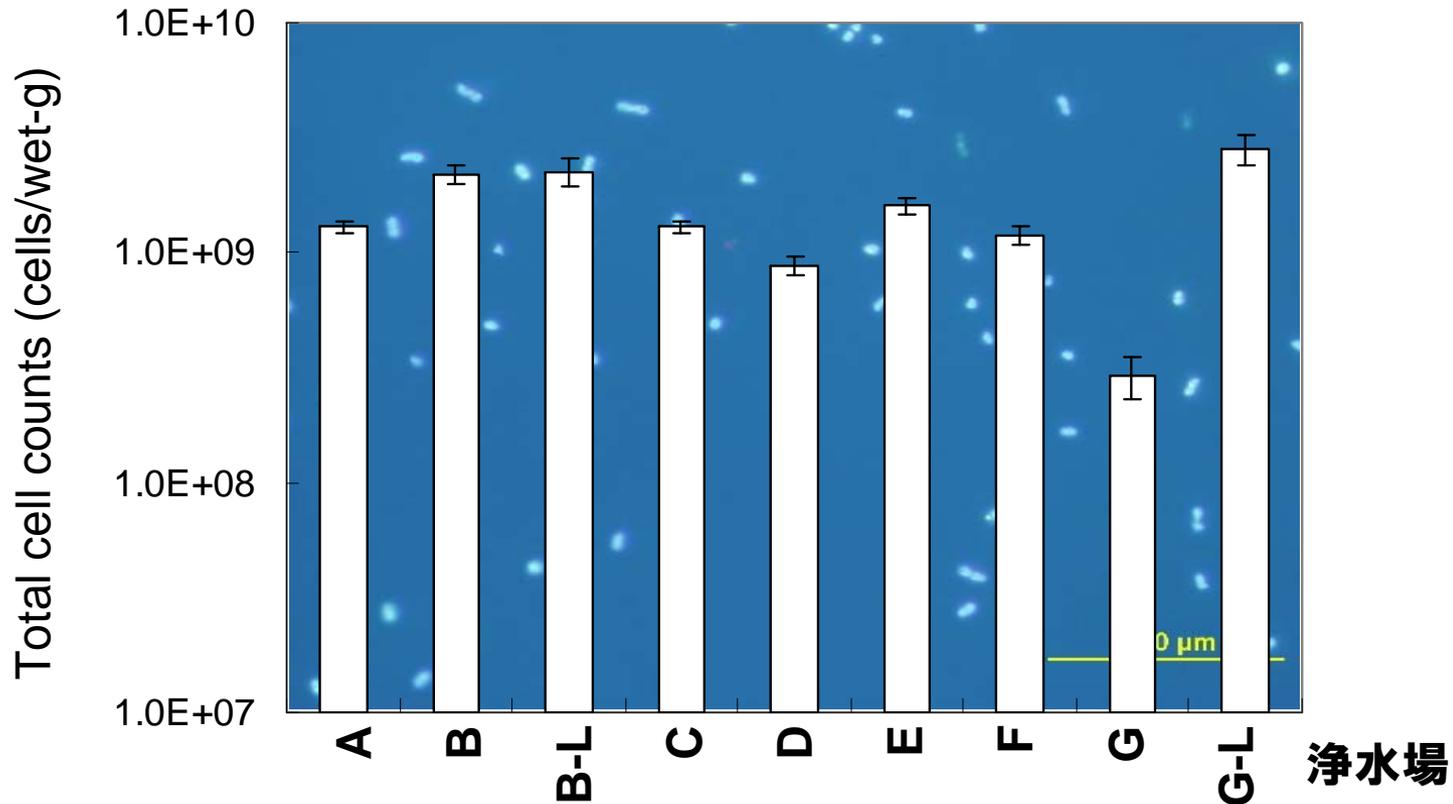
各活性炭の処理条件

浄水場	処理方法	活性炭 使用期間	接触時間 (分)	逆洗頻度 (日)
Plant A	固定床下向流	2年	14	4
Plant B	固定床下向流	9ヶ月	15	4
Plant C	流動床上向流	1ヶ月	12	-
Plant D	固定床下向流	3年	10	3
Plant E	流動床上向流	12年*	8.5	-
Plant F	流動床上向流	12年*	8.5	-
Plant G	固定床下向流	5ヶ月	12	3

*年20%ずつ新炭補充

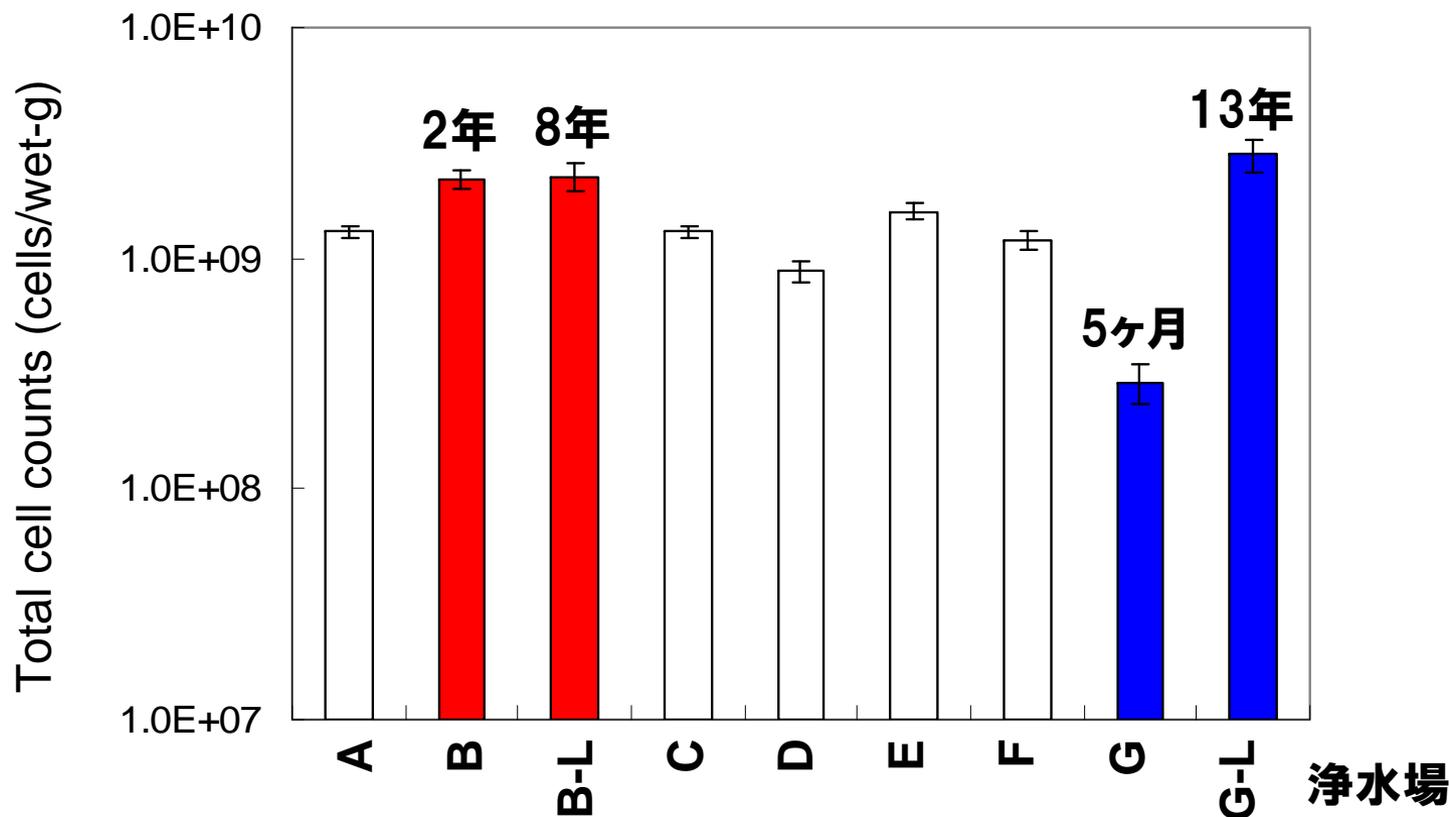
生物活性炭の付着菌数

超音波で剥離後、DAPI染色



- 処理方式、使用期間にかかわらず、どの浄水場の活性炭にも $10^8 \sim 10^9$ cells/wet-g の細菌が付着
- 生菌と死菌の合計値であることに注意

使用期間による付着菌数の差異



同一浄水場内で使用期間の異なる活性炭を比較

Plant B: 2年 ≒ 8年

Plant G: 5ヶ月 < 13年 (約10倍)

微生物群集構造の比較

原水

活性炭

全菌数はどの活性炭も
同程度だったが...

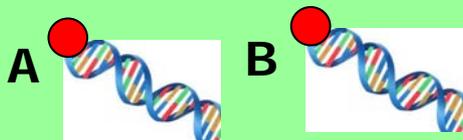
核酸抽出

PCR (16S/18S rDNA)

T-RFLP法

クローニング法

● Forward primer (蛍光標識)
— Reverse primer



制限酵素による切断パターン

電気泳動によってパターン評価

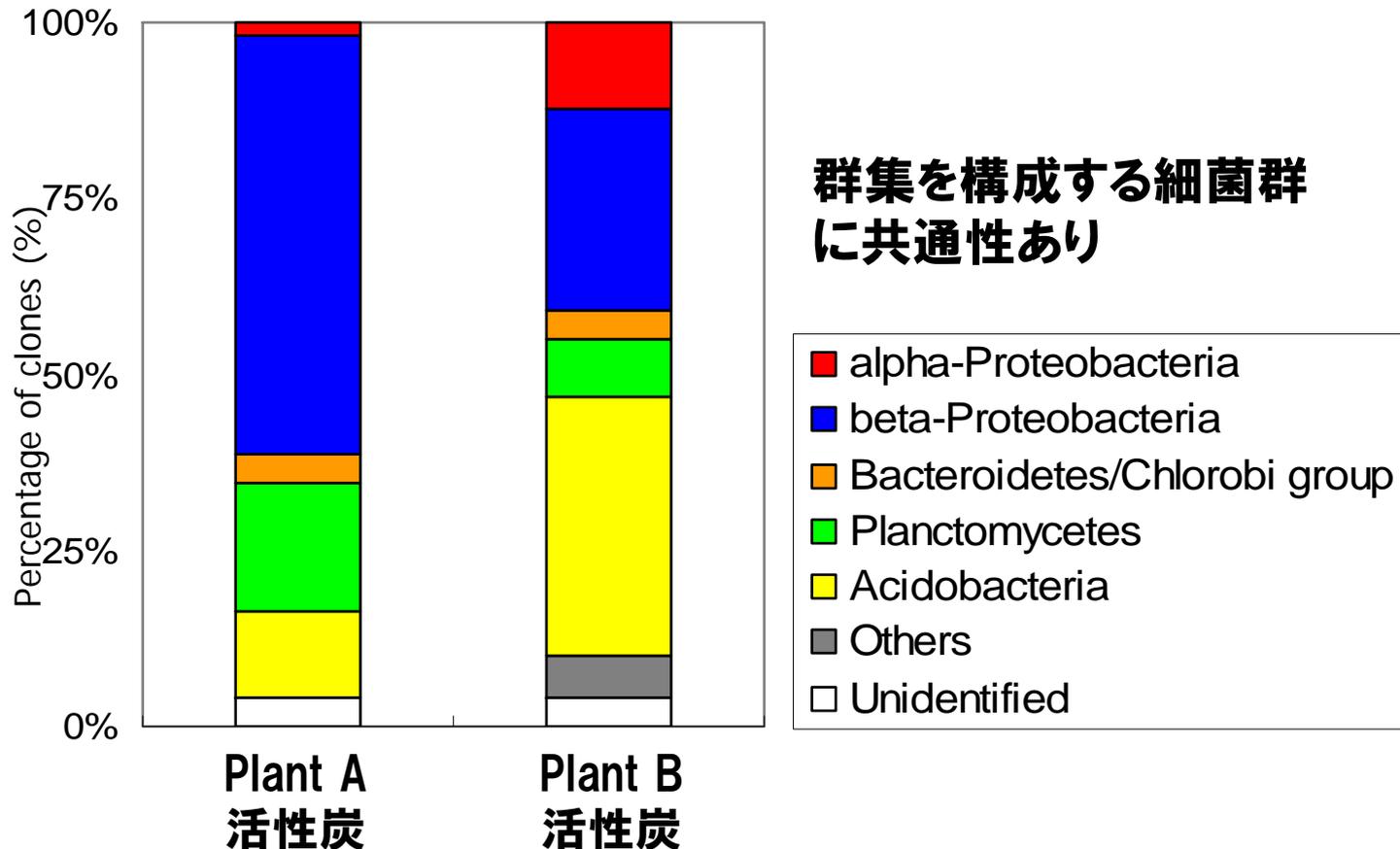
— Forward primer
— Reverse primer



個々のPCR産物を分離

遺伝子配列の決定・既知配列との比較

真正細菌群集構造(クローニング)



活性炭試料から検出された *Planctomycetes* 門、*Acidobacteria* 門に近縁なクローンは原水からは検出されず。

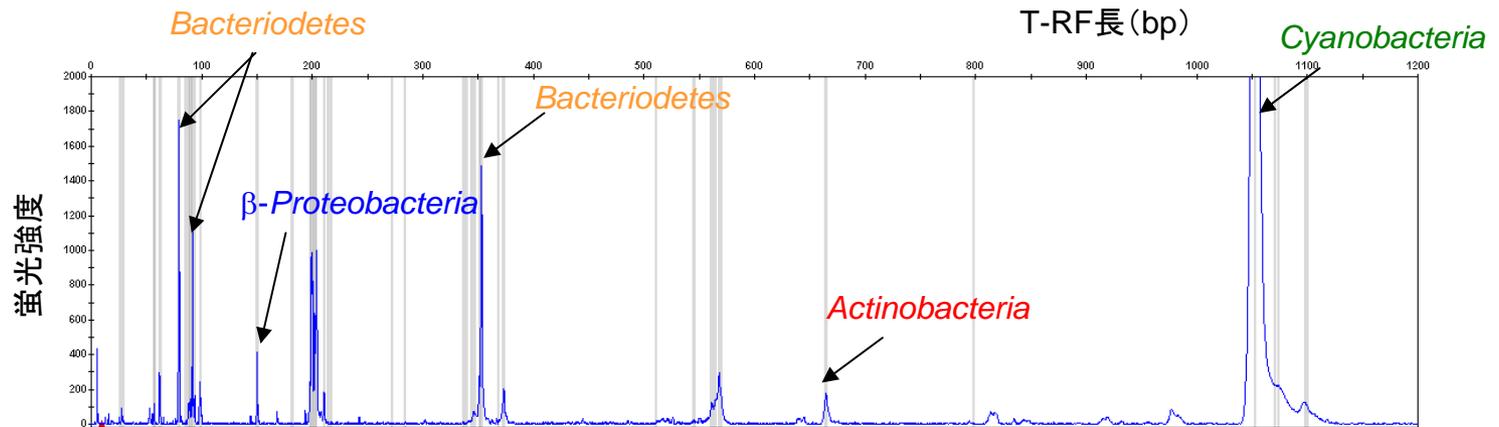
真正細菌群集構造(T-RFLP法)

制限酵素で切断した末端断片の電気泳動

⇒ 群集構造を反映するプロファイル

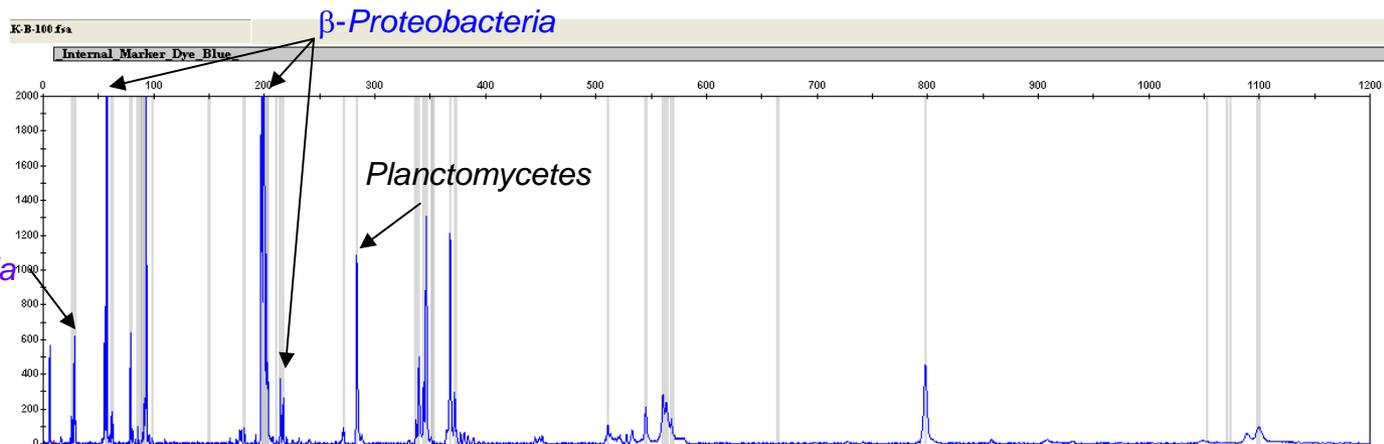
Plant A

原水



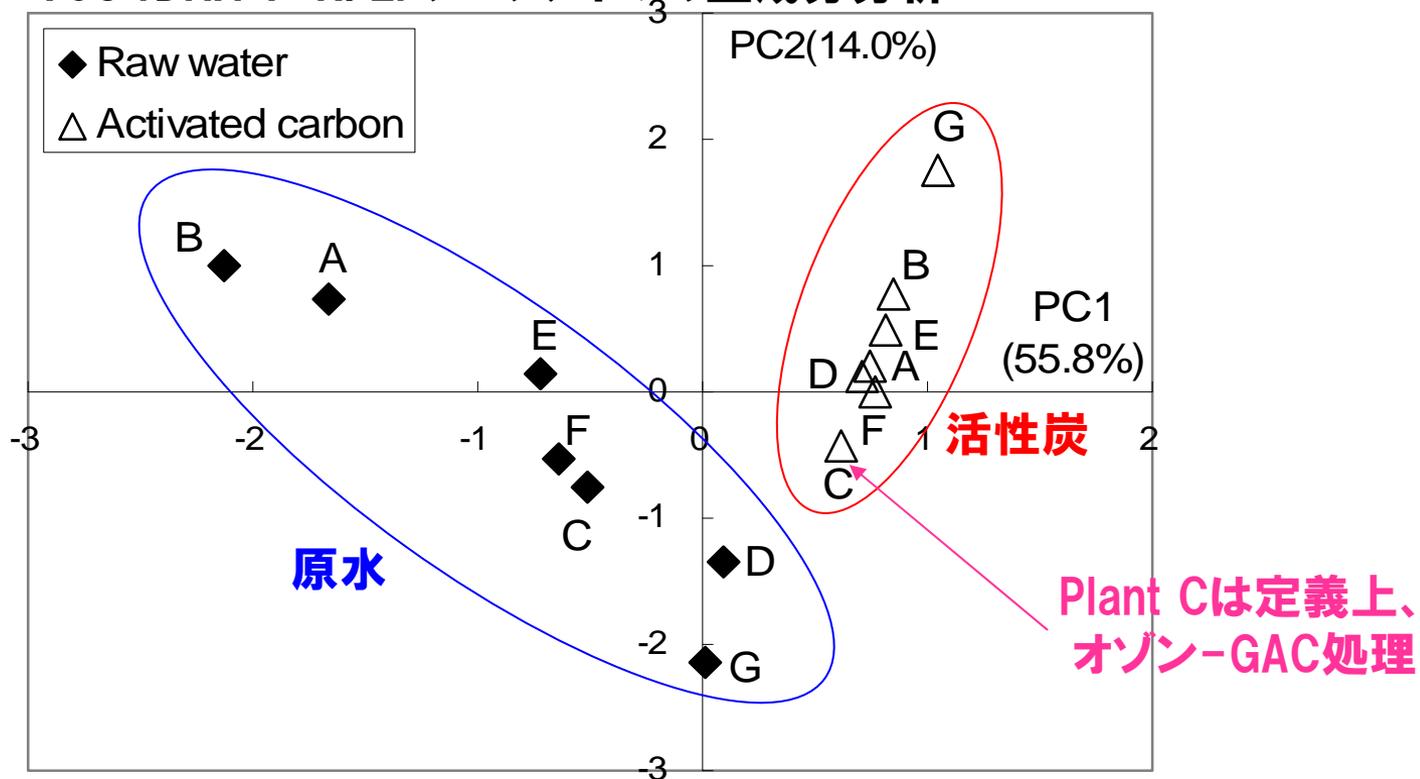
BAC

Acidobacteria



真正細菌群集構造(T-RFLP法)

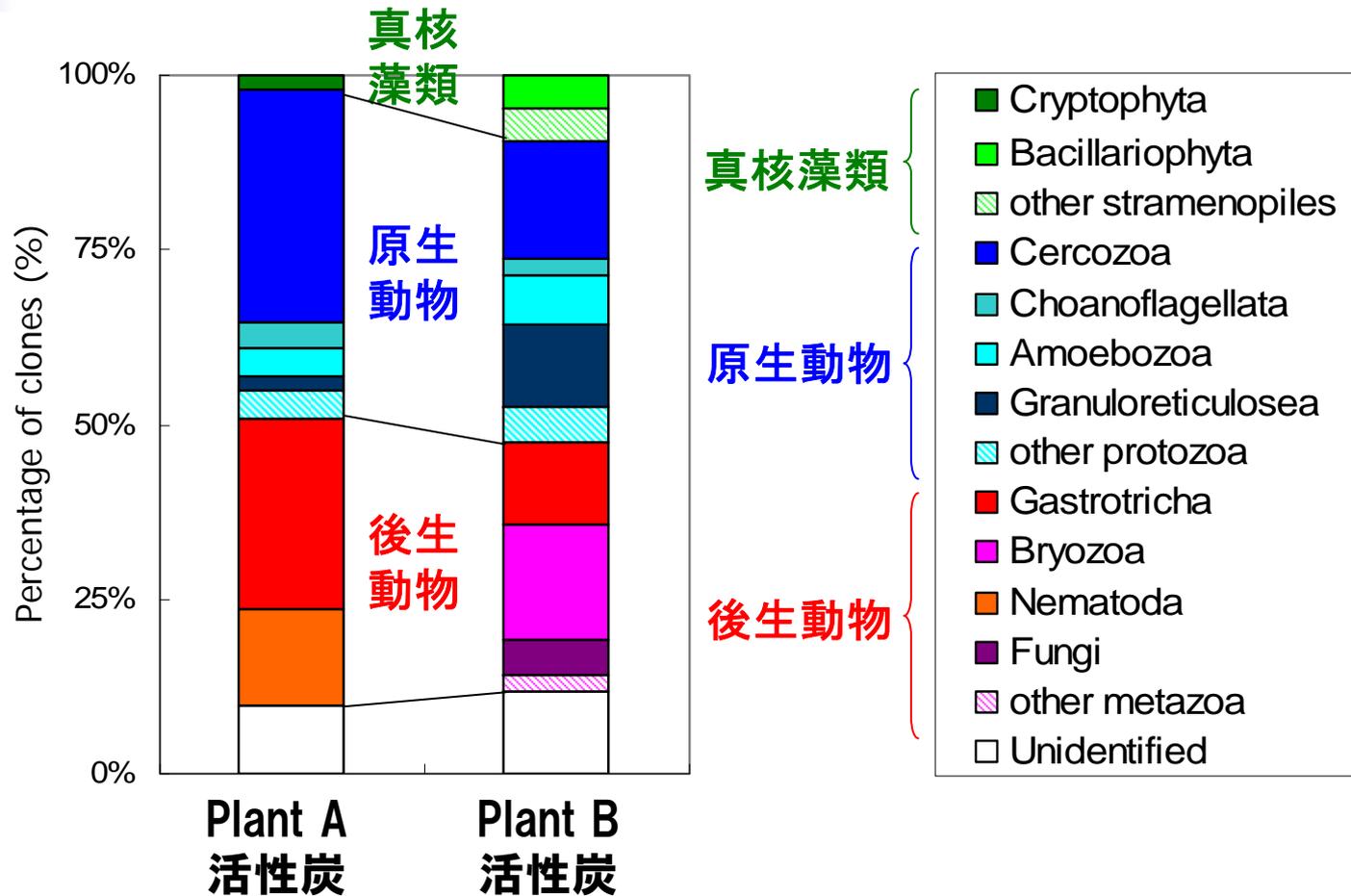
16S rDNA T-RFLPプロファイルの主成分分析



原水のT-RFLPプロファイルは浄水場間の差異が大きいが、
活性炭試料のT-RFLPプロファイルは浄水場間で類似！

→処理工程における生残性の差異、付着特性などに起因？

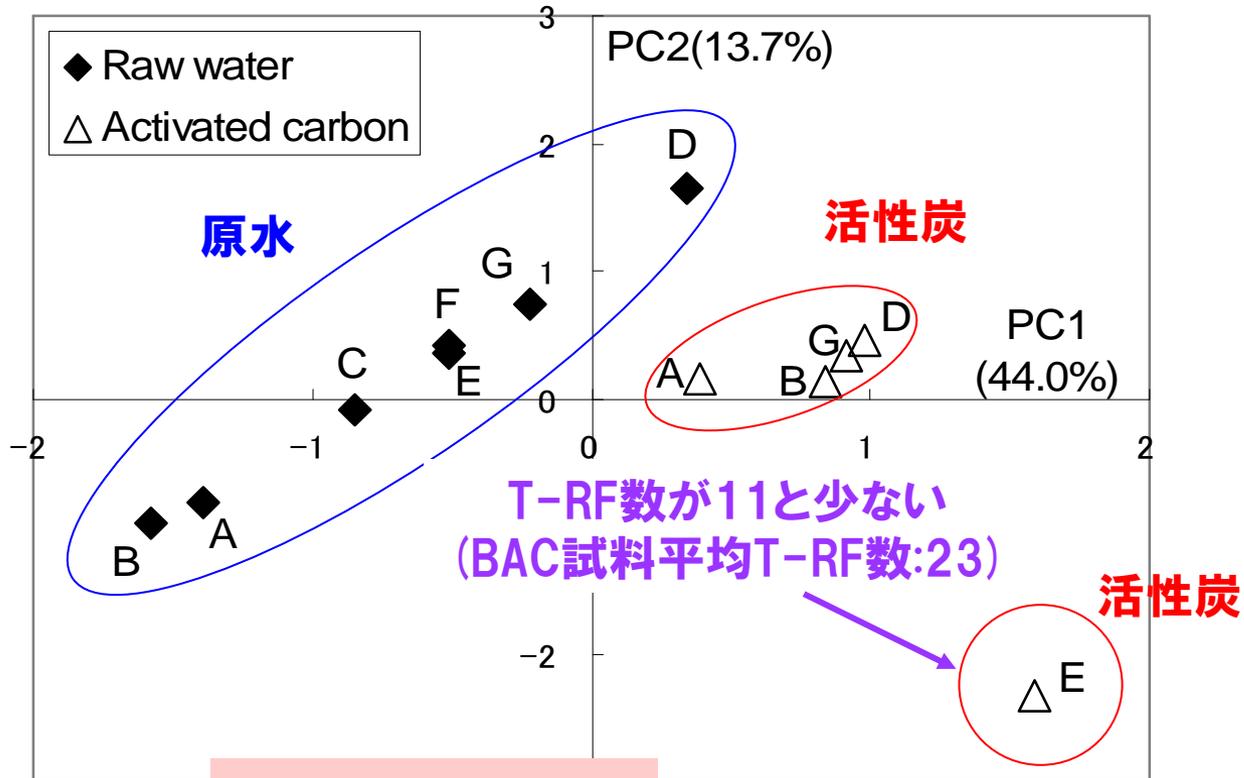
真核生物群集構造(クローニング)



*Cercozoa*門 *Cercomonas* (原生動物)、*Gastrotricha*門 *Chaetonotus* (後生動物) など共通した微生物が活性炭に付着⇒ 原水からは検出されず。

真核生物群集構造(T-RFLP法)

18S rDNA T-RFLPプロファイルの主成分分析



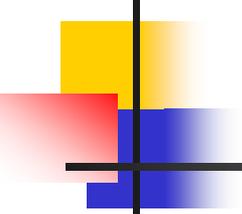
Plant C, Fの活性炭
→PCR産物得られず

Plant C, E, Fは流動床上向流
(Plant Cでは活性炭槽に塩素注入)

16S rDNA同様、原水のT-RFLPプロファイルの差異は大きいですが、
固定床下降流の浄水場における活性炭のT-RFLPプロファイルは類似！

微生物群集構造解析のまとめ

- **活性炭にする付着する細菌数**
 - 活性炭表面の全菌数は $10^8 \sim 10^9$ cells/wet-gであった。
- **活性炭に付着する微生物群集の特徴**
 - 原水, 処理工程, 活性炭の使用期間によらず, 活性炭に付着する真正細菌群集, 真核生物群集の構造は比較的類似していた。
- **原水中の微生物群集との比較**
 - 原水中の微生物群集は地点間での差異が大きく, 活性炭表面の微生物群集とは異なった。
- **運転方法の影響**
 - 流動床上向流・塩素処理は, 真核生物の定着に影響を与える可能性が示唆された。



3. 生物活性炭における 硝化機構

アンモニア性窒素の制御



硝化→BACの主要な生物学的作用

- 塩素との関係→カルキ臭対策(トリクロラミン)
- 配水管路における硝化細菌の制御(クロラミン消毒)

■ 硝化微生物の多様性・存在量

- BACの生物活性を示す現象として研究報告例も多いが、微生物学的な知見は少ない。
- 従来は真正細菌に属するアンモニア酸化細菌が取り上げられてきたが・・・
- アンモニア酸化古細菌という新しい微生物群が発見された (Treusch *et al.*, 2005, Könneke *et al.*, 2005)。
→これまでの硝化機構の理解は正しかったのか？

(参考) AOAについて

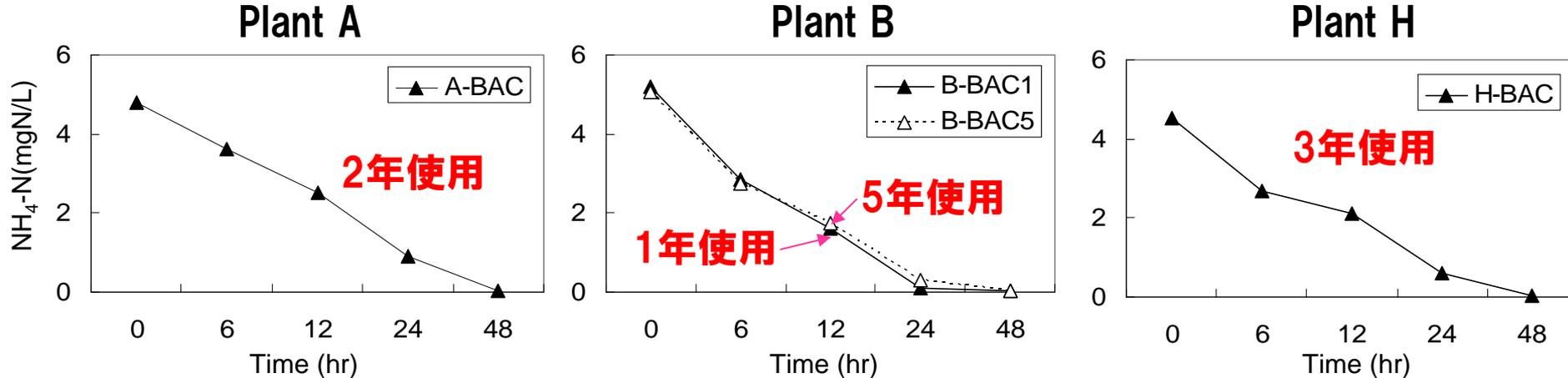
■ メタゲノム解析から発見されたAOA

- 1.1b *Crenarchaeota*由来のフラグメントに *amoA*, *amoB* 遺伝子が土壌メタゲノムから発見された。
- AOBと比較して、アンモニアモノオキシゲナーゼの遺伝子構成・順序に差異がある。
 - *Proteobacterial* AOB: *amoCAB*
 - **AOA**: *amoBCA*, *amoBC*(unknown) *A*, *amoB* (unknown) *A*
- Hydroxylamine oxidoreductaseはまだ見つかっていない。
- 炭酸固定回路(還元的TCA回路、3-hydroxypropionate回路)と同時に、酸化的TCA回路も見つかっている→autotroph or mixotroph?
- 土壌、底泥、海洋、活性汚泥等に幅広く分布
- 単離された株はこれまでのところ *Nitrosopumilus maritimus*のみ(1.1a lineage)
 - 硝化速度等はAOBに類似
- 土壌の場合、 β -*Proteobacteria*の存在量は 10^4 - 10^6 cells/gであるのに対して、AOAの存在量は 10^7 cells/g以上

実際の硝化をどの程度担っているのか？

生物活性炭の硝化活性

無機培地におけるBAC(100ml)の硝化活性 (5mg NH₄-N/L)

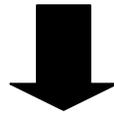


浄水場、使用期間によらず、24～48時間で約5mgN/Lのアンモニア性窒素を完全に酸化

硝化微生物(AOB/AOA)の解析

アンモニア酸化細菌(AOB: Ammonia-Oxidizing Bacteria)

アンモニア酸化古細菌(AOA: Ammonia-Oxidizing Archaea)



アンモニア酸化酵素AmoA subunit Aをコードする*amoA*遺伝子の検出

・・・原水・生物活性炭試料(Plant A、B、D~I)

- β -*Proteobacteria*に属するAOB-*amoA*遺伝子
- メタゲノム解析等から推定されたAOA-*amoA*遺伝子



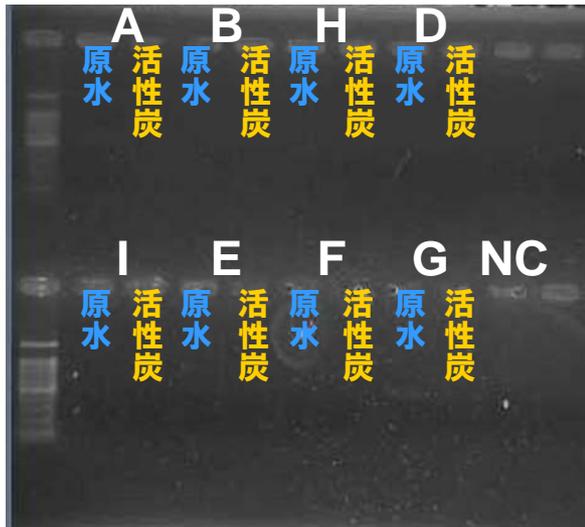
多様性・・・T-RFLP法、クローニング&配列解析

存在量・・・定量PCR

生物活性炭におけるAOB/AOAの検出

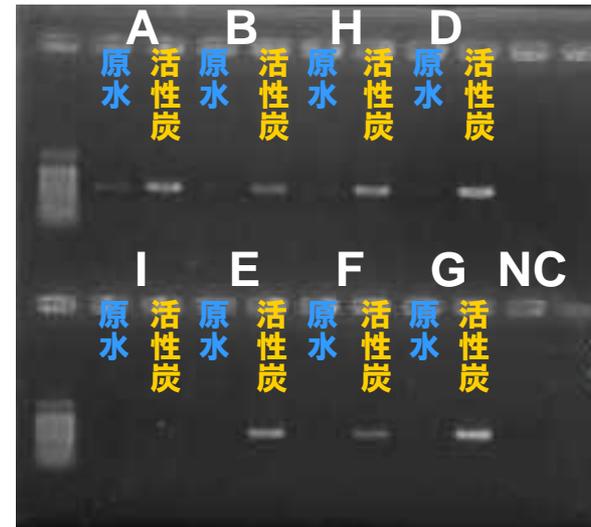
PCR(30サイクル)の結果

原水・活性炭から検出されず



AOB-amoA

一部の原水・活性炭試料から検出



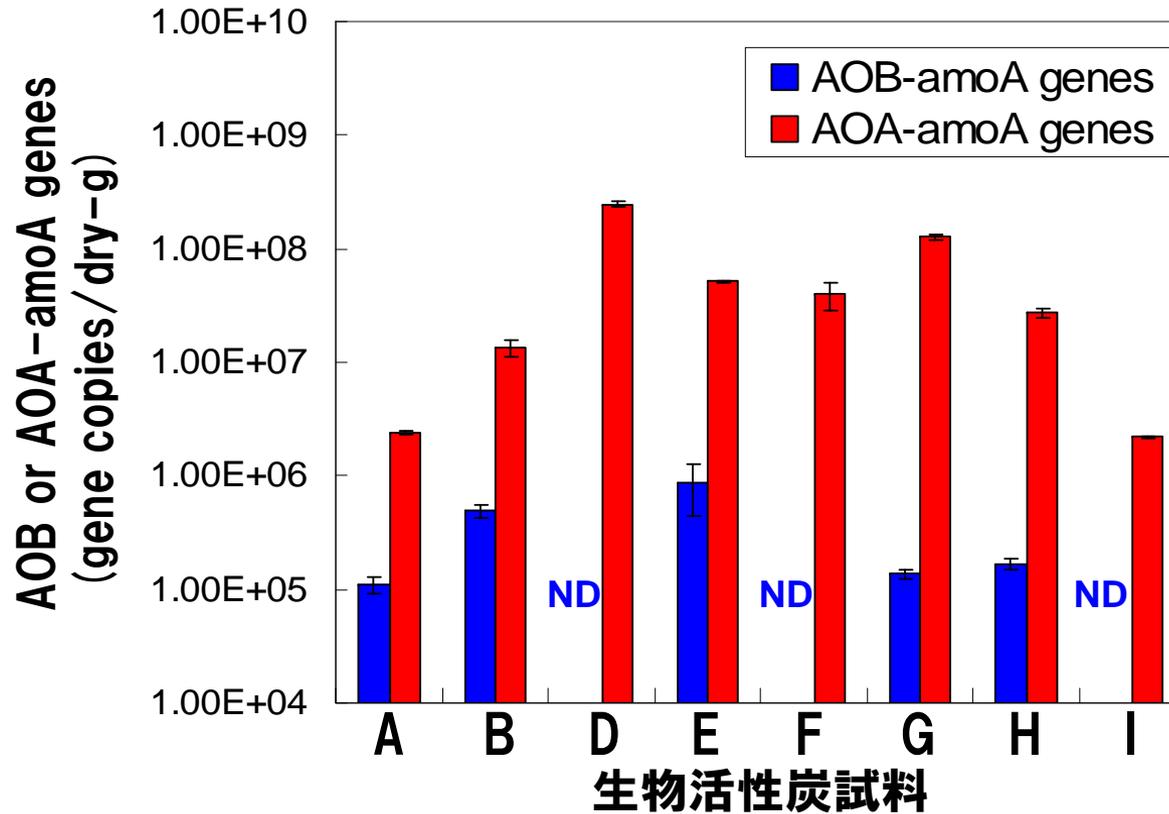
AOA-amoA

生物活性炭では、**AOB**よりも**AOA**の方が優占？

* γ -Proteobacteriaに属するAOBも検出されなかった。 28

AOA-*amoA*遺伝子の定量

Real-Time PCRによるAOA-*amoA*遺伝子の定量



AOA-*amoA*遺伝子のコピー数は、
AOB-*amoA*遺伝子のコピー数の10~1000倍以上



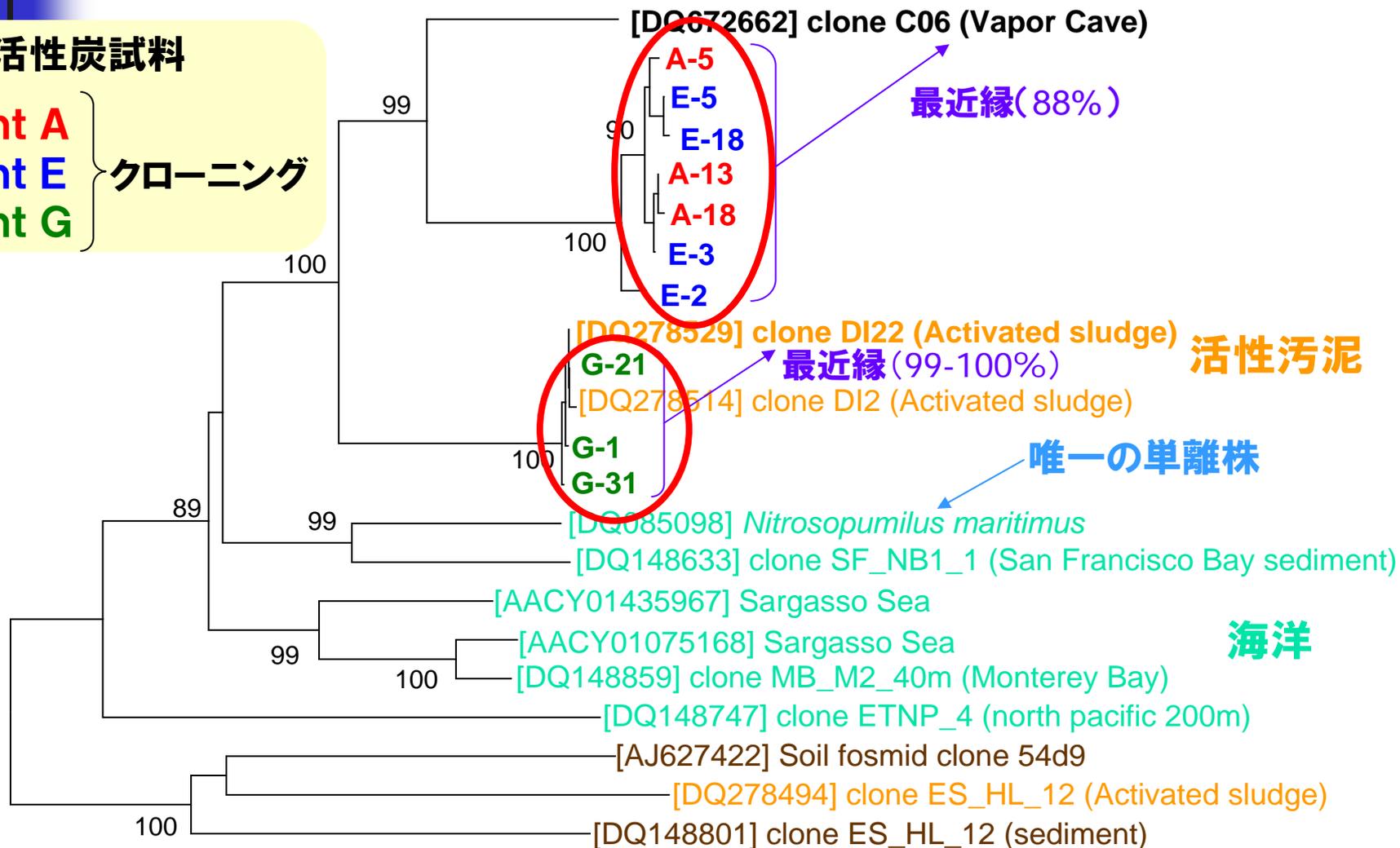
実際、硝化にどの程度
寄与しているのか？

AOA-*amoA*遺伝子の系統解析 (DNA)

生物活性炭試料

Plant A
Plant E
Plant G

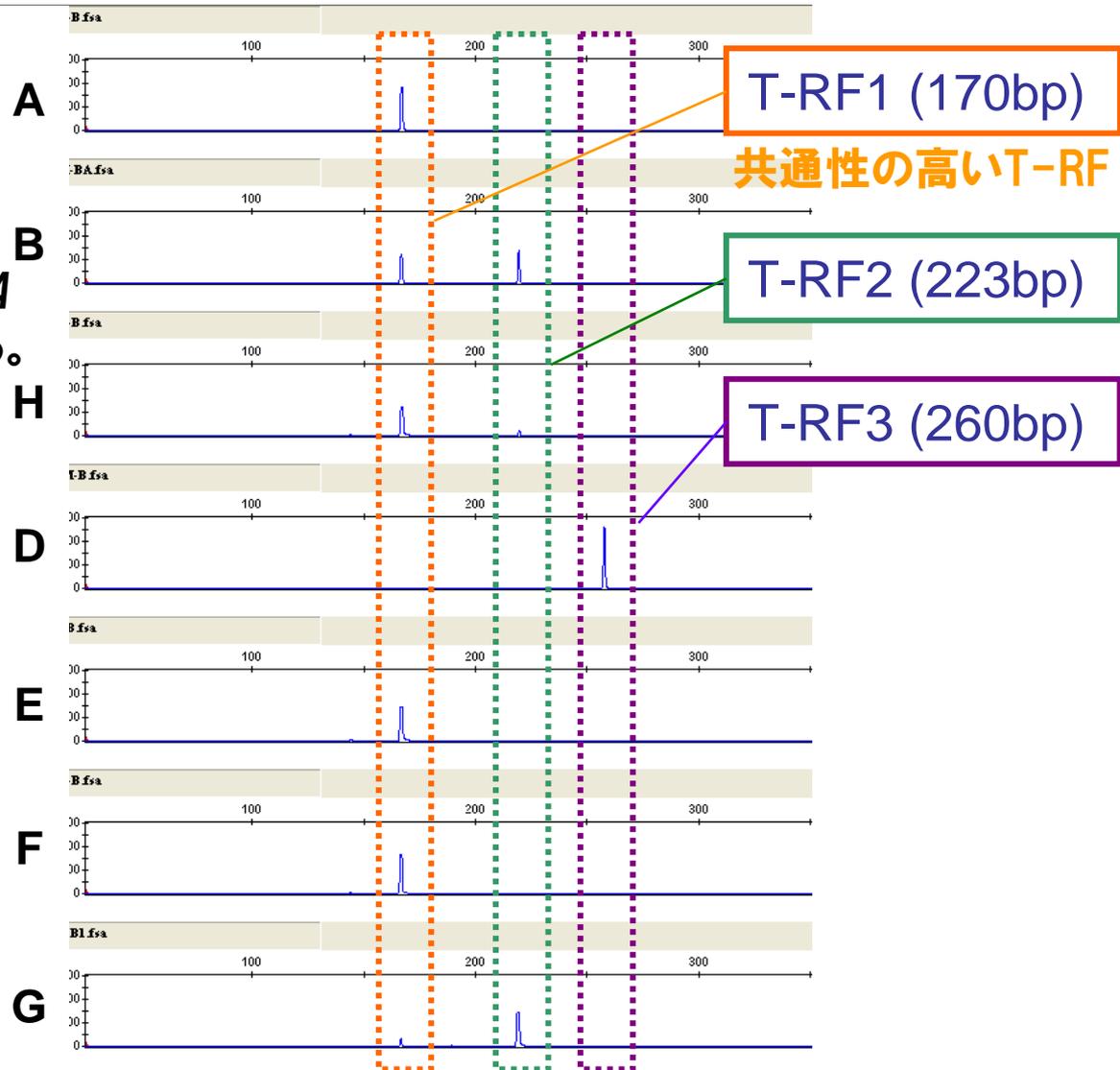
クローニング



AOA-*amoA*遺伝子の無根系統樹

土壌・底泥

AOA-*amoA*遺伝子のT-RFLP法による解析



浄水場によって、AOA-*amoA* 遺伝子の多様性に差異がある。



それぞれの*amoA*遺伝子を有するAOAを単離



AOAの生理・生態と硝化活性との関係

生物活性炭の硝化機構のまとめ

■ 生物活性炭に付着する硝化微生物

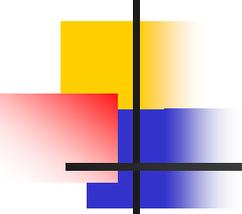
- AOBの*amoA*遺伝子は検出されなかったのに対し、AOAの*amoA*遺伝子が検出された。

■ AOA-*amoA*遺伝子 & AOB-*amoA*遺伝子の定量

- 生物活性炭のAOA-*amoA*遺伝子のコピー数は、AOB-*amoA*遺伝子の約10-1000倍以上であった。

■ AOA-*amoA*遺伝子の系統解析・多様性

- Plant A, E, Gの生物活性炭から検出されたAOA-*amoA*遺伝子は、活性汚泥やVapor Caveから検出されたクローン配列に近縁であった。
- 生物活性炭から検出されたクローンは、唯一単離されたAOAである*Nitrosopumilus maritimus*の*amoA*遺伝子とは、系統的に異なっていた。
- T-RFLP法による解析の結果、浄水場によって、AOA-*amoA*遺伝子の構成は異なることが示された。



4. 生物活性炭における AOC除去機構

給配水系統における微生物再増殖

給配水系統における水質劣化への懸念

- 水質管理目標設定項目に「従属栄養細菌」(2000cfu/ml: R2A培地、20±1℃、7日間)を追加する動き
- 簡易専用水道(全国21万箇所)に加え、小規模貯水槽水道(全国89万箇所)の責任の所在が明確化



給配水系統における微生物再増殖問題
(健康リスク・清潔さ etc.)

AOC除去による再増殖制御

オゾン処理による生物同化性有機炭素
(AOC: Assimilable Organic Carbon)の生成

(例: 酢酸、シュウ酸、ギ酸などの低級脂肪酸)

微生物再増殖の懸念

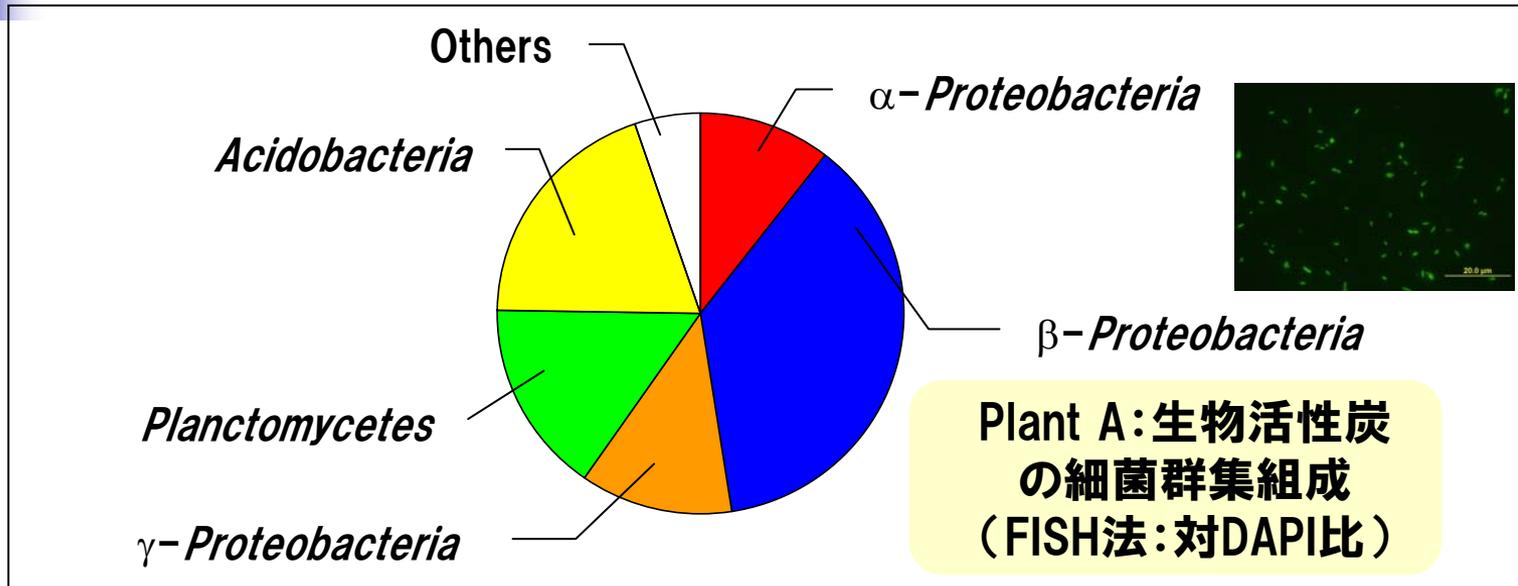
生物活性炭による生物学的除去

AOC・・・生物処理 > 吸着処理

配水する前に生物処理 vs 生物漏洩

- 給配水系統の水質管理の必要性
- 塩素低減化の流れ
- AOC濃度の管理(10~50 μ g/L)

AOC除去機構に関する細菌群の特定



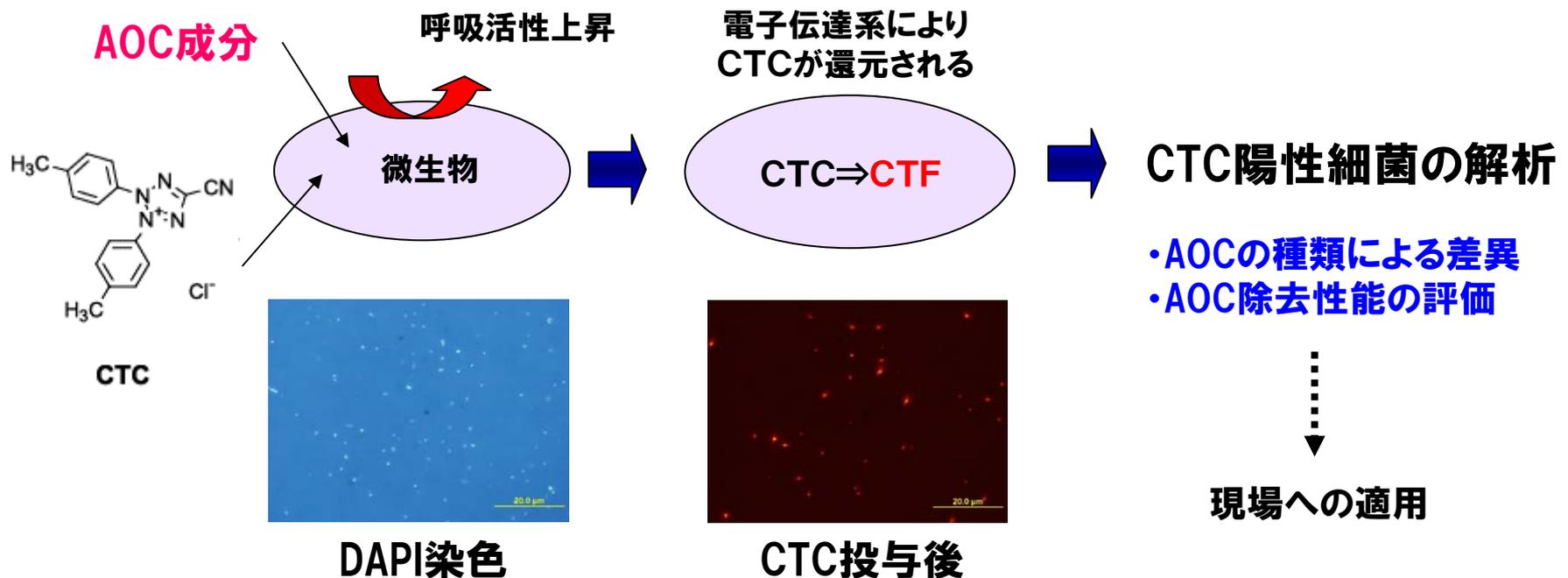
有機物の生分解の役割分担？

- AOC除去に関する微生物群の特定
* 生物再生に関する微生物群との差異
- AOC除去機構に影響する環境因子の評価(cf.リン)

AOC除去機構に関する細菌群の特定

■ CTCを用いたAOC利用細菌の検出

「AOC利用に伴う呼吸活性の上昇」をとらえる。



AOC除去機構のまとめ

■ 生物活性炭のAOC除去機能

- 給配水系統の水質管理が求められる中、AOC除去機能を有する生物活性炭は有効な処理方法と考えられる。

■ 生物活性炭におけるAOC利用細菌の特定

- AOCの利用に伴う呼吸活性の上昇をCTCによって検出することを検討している。
- 生物再生に関与する細菌群とAOCを除去する細菌群に差異はあるのか(有機物生分解の役割分担)?
- AOCの種類による差異、オゾン処理条件による差異、実際の浄水場におけるAOC除去特性などの観点から解析を行う。

5. 今後の展開

今後の展開



~~ブラックボックスとしての~~ 生物活性炭の生物学的処理機構の解明

微生物群集構造と機能とのリンク

→生物学的作用の状態と群集構造との関係、指標微生物？

生物活性炭の機能の明示と定量化(可能性・限界)

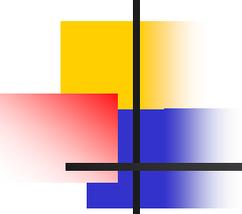
→生物学的作用の評価方法の提示(硝化、AOC、生物再生)

給配水システムも考慮した水道システムにおける役割

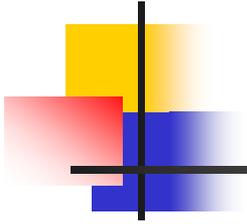
→微生物学的に安定な水道水の供給

経験的な運用の再評価

→水質因子・運転因子が生物活性に与える影響



ご清聴ありがとうございました。

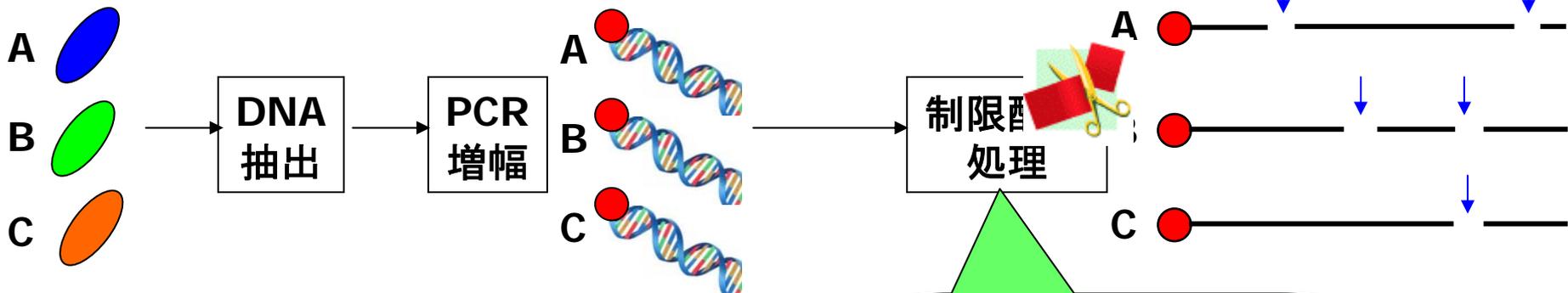


補足

T-RFLPについて

Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphisms (末端制限酵素断片長多型)

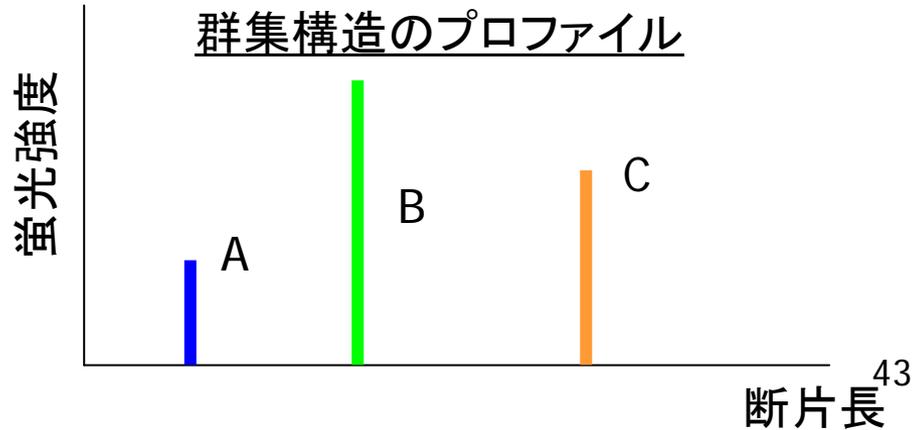
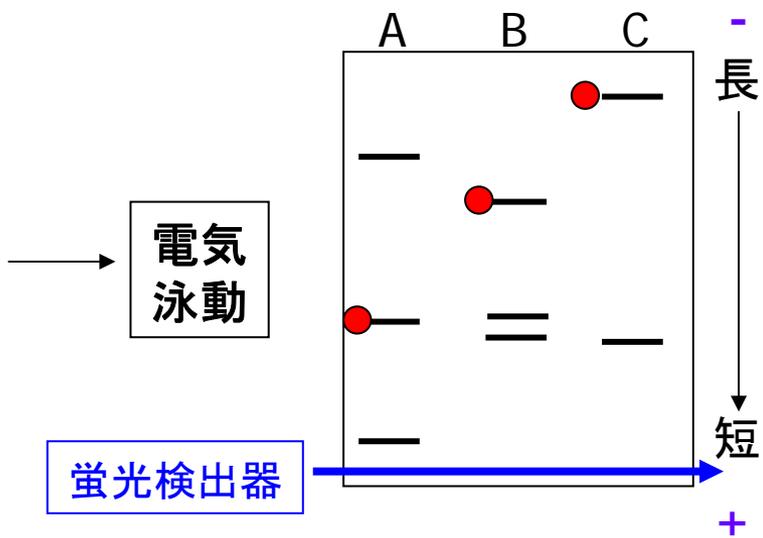
● Forward primer (蛍光標識)
 — Reverse primer



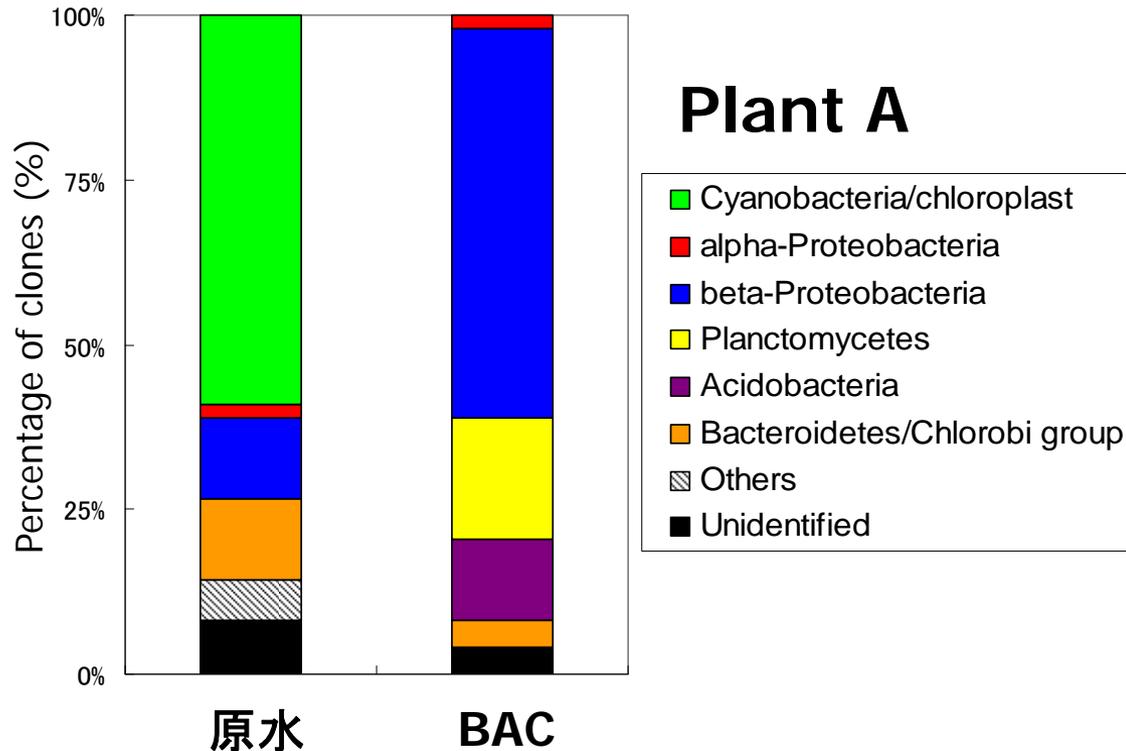
16S/18S rDNA増幅産物

特定の塩基配列を認識して切断する酵素

例 *HhaI*



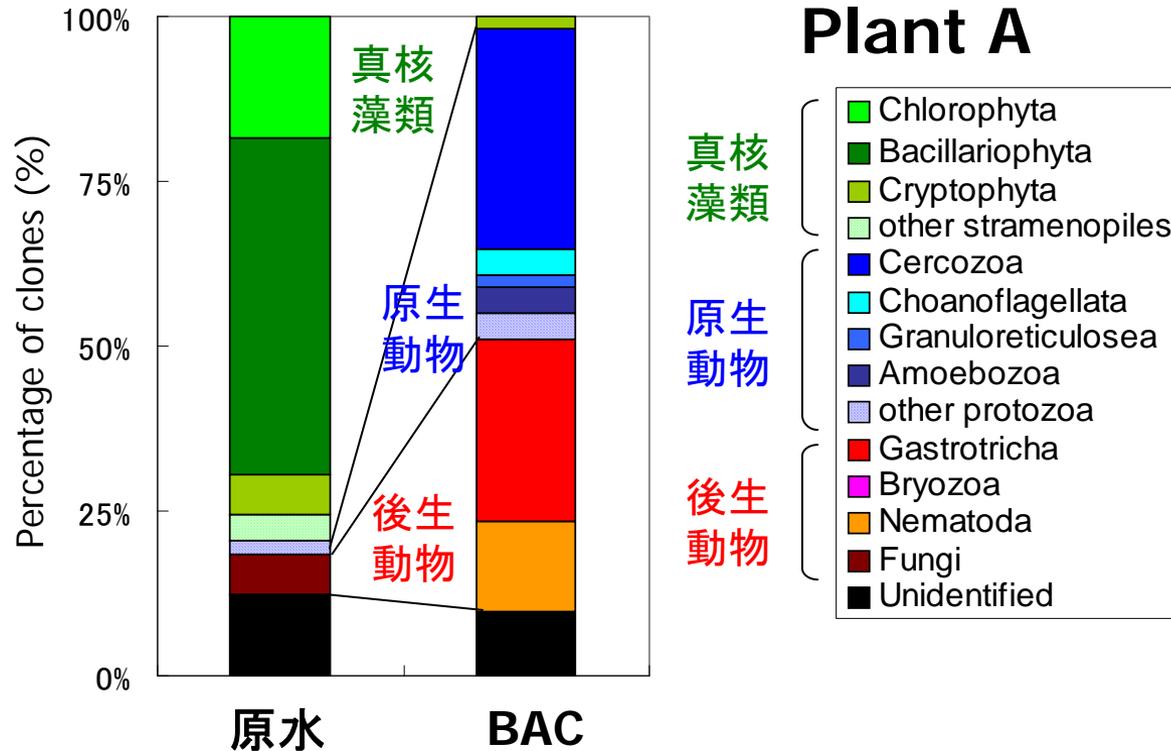
16S rDNA (真正細菌)



原水: *Cyanobacteria* (藍藻類) が優占

BAC: β -*Proteobacteria*が優占, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*に近縁なクローンも特徴的

18S rDNA (真核生物)



原水： 緑藻類, 珪藻類, クリプト藻類などの真核藻類が優占

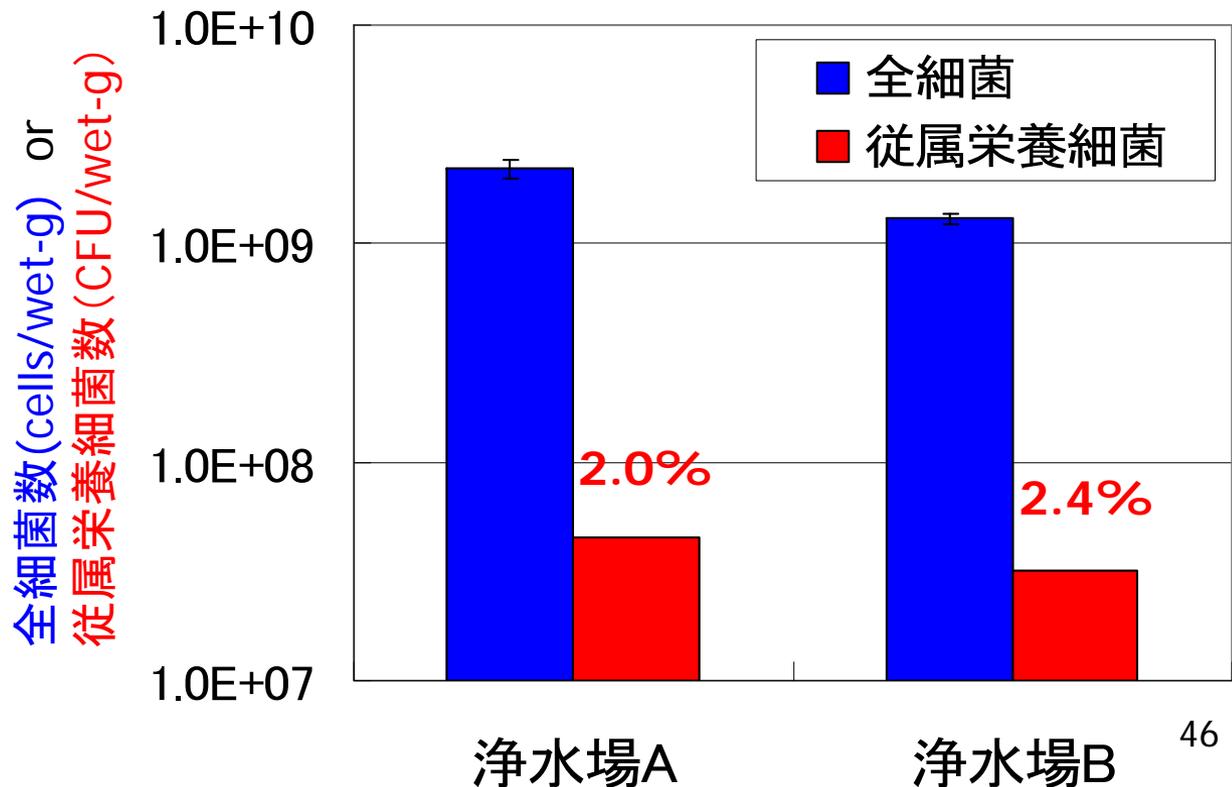
BAC： 原生動物 *Cercozoa*, 後生動物 *Gastrotricha* (イタチムシなど), *Nematoda* (線形動物) に近縁なクローンが優占

結果：従属栄養細菌数 vs. 全細菌数

浄水場A、Bともに...

- 従属栄養細菌数、全細菌数は同程度。
- 全細菌数に対する従属栄養細菌数の割合は、**2%程度**。
→ **生菌と死菌、培養可能性**

多くの細菌を見過ごしている可能性



結果：従属栄養細菌の種類

コロニーの形状・色に基づいて、従属栄養細菌を単離。

浄水場A・・・A1-A5の5株
 浄水場B・・・B1-B6の6株

遺伝子配列に基づく系統解析

単離株	コロニーの色	[Accession No.] 最近縁配列 (既知種)	分類	最近縁配列との相同性 (%)
A1	橙	[AY559429] <i>Porphyrobacter donghaensis</i> strain SW-158	α - <i>Proteobacteria</i>	100
A2	黄	[AJ556799] <i>Comamonadaceae</i> bacterium MWH55	β - <i>Proteobacteria</i>	98
A3	透明	[DQ241397] <i>Leptothrix</i> sp. S1.1	β - <i>Proteobacteria</i>	96
A4	白	[AJ007857] <i>Mesorhizobium</i> sp. HB5A4	α - <i>Proteobacteria</i>	100
A5	桃	[AJ007857] <i>Bosea thiooxidans</i> strain DSM9653	α - <i>Proteobacteria</i>	94
B1	白	[AB162081] Denitrifying bacterium W49b	α - <i>Proteobacteria</i>	99
B2	黄	[AJ556799] <i>Comamonadaceae</i> bacterium MWH55	β - <i>Proteobacteria</i>	97
B3	黄	[AF235997] <i>Alpha proteobacterium</i> F0813	α - <i>Proteobacteria</i>	100
B4	透明	[AY826639] <i>Acidovorax</i> sp. '6.5 MW-10'	β - <i>Proteobacteria</i>	100
B5	白	[AJ864853] <i>Afipia</i> sp. J44 isolate J44	α - <i>Proteobacteria</i>	99
B6	白	[AY568510] <i>Afipia massiliensis</i> strain NW-12	α - <i>Proteobacteria</i>	100

単離株は、すべて α -*Proteobacteria*、 β -*Proteobacteria*に近縁

結果：単離株の系統解析

γ-Proteobacteria

*Sphingomonas*目

α-Proteobacteria

*Rhizobiales*目

β-Proteobacteria

*Burkholderiales*目

変異の割合 10%

[AB101444] *Acinetobacter junii* S33

[AY328799] Drinking water bacterium OR2

A1
[AY559429] *Porphyrobacter donghaensis* SW-158

[AY584571] *Sphingomonas* sp. HTCC500

[AY328850] Drinking water bacterium MB28

B3
[AF235997] *Alpha proteobacterium* F0813

B1

[AJ007857] *Mesorhizobium* sp. HB5A4

[AB162081] Denitrifying bacterium W49b

A4

A5

[AJ250796] *Bosea thiooxidans* DSM9653

B6

[AY568510] *Afipia massiliensis* NW-12

B5

[AJ864853] *Afipia* sp. J44

B4

[AY826639] *Acidovorax* sp. 6.5 MW-10

[DQ128119] Uncultured *Schlegelella* sp. clone DR546AS15-3

A3

[AY662010] Uncultured bacterium clone 300A-D08

[DQ241397] *Leptothrix* sp. S1.1

[AJ556799] *Comamonadaceae* bacterium MWH55

[AB237999] Uncultured bacterium clone 16S-AK-B-42

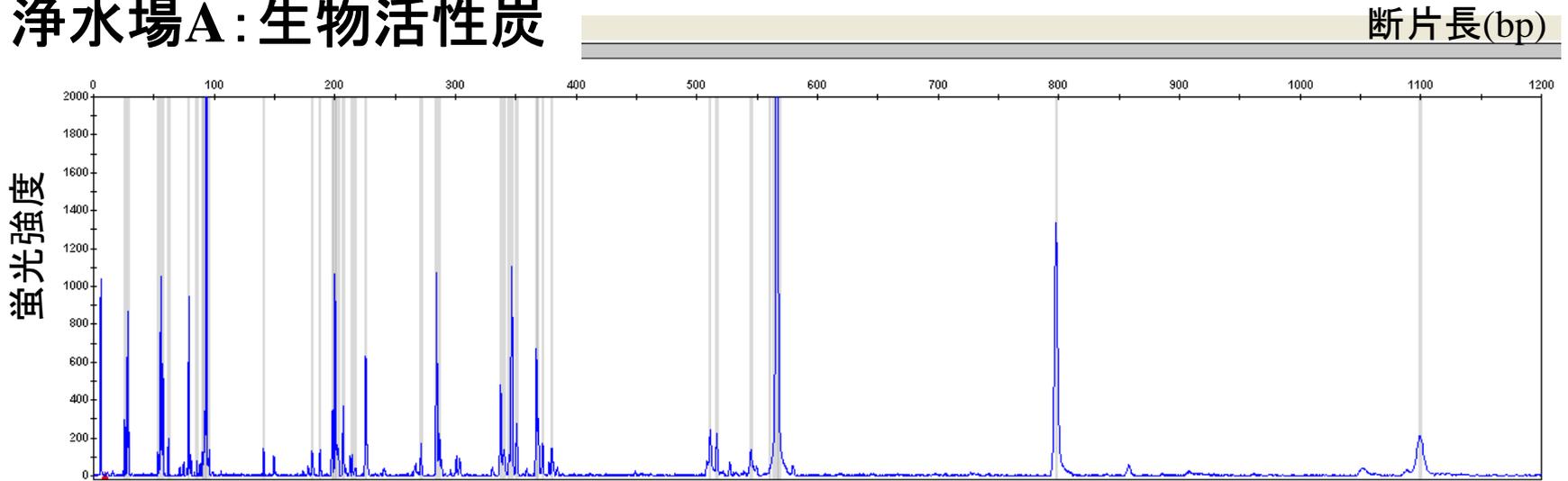
B2

[AB237993] Uncultured bacterium clone 16S-AK-B-36

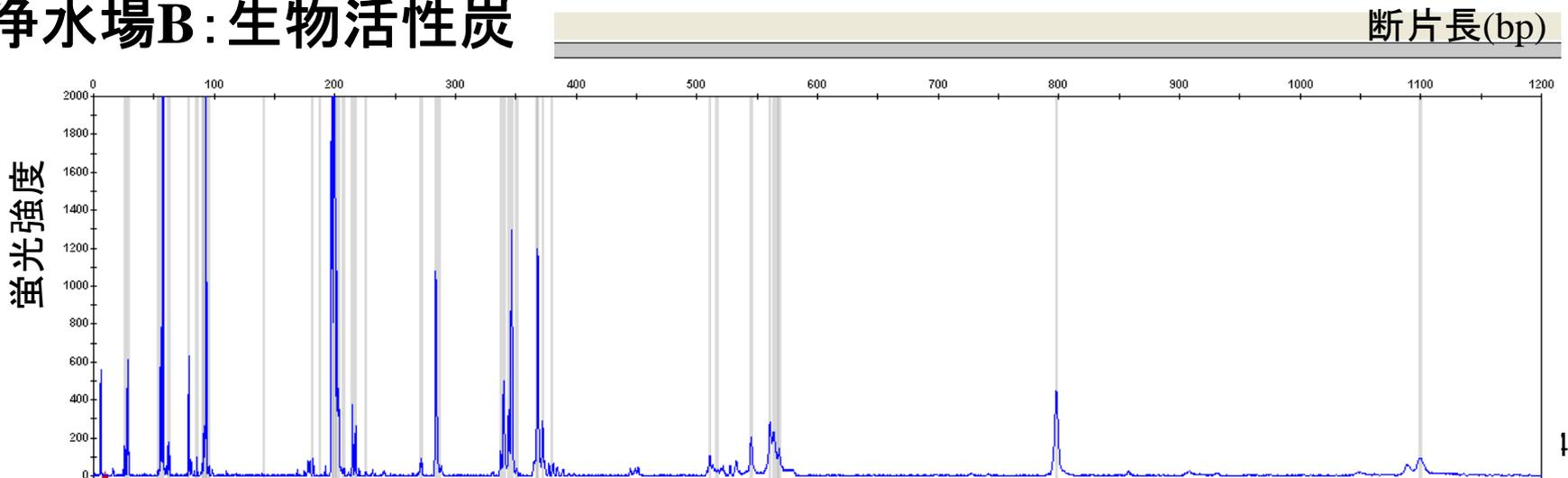
A2

結果：T-RFLPによる細菌群集解析

浄水場A：生物活性炭

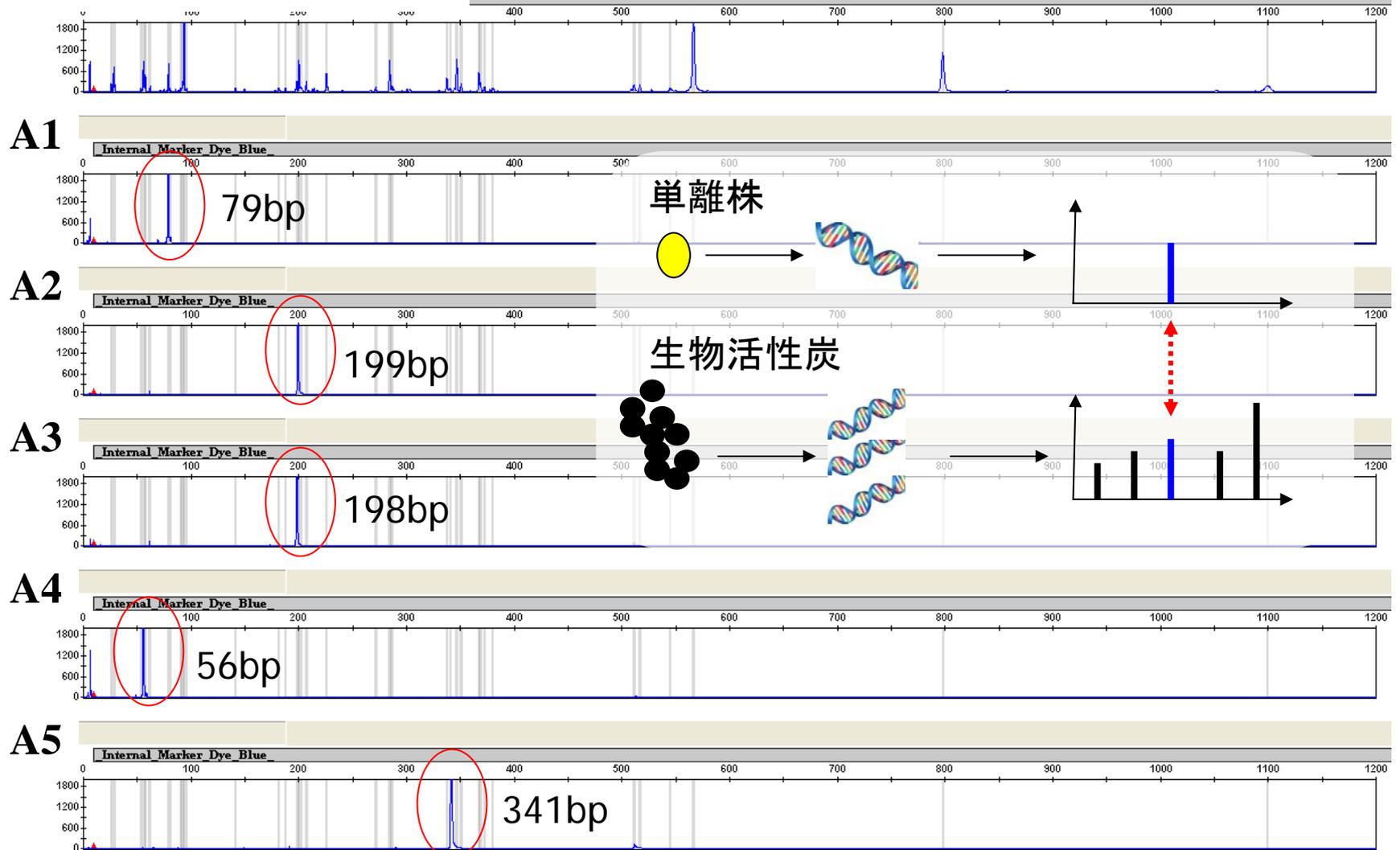


浄水場B：生物活性炭



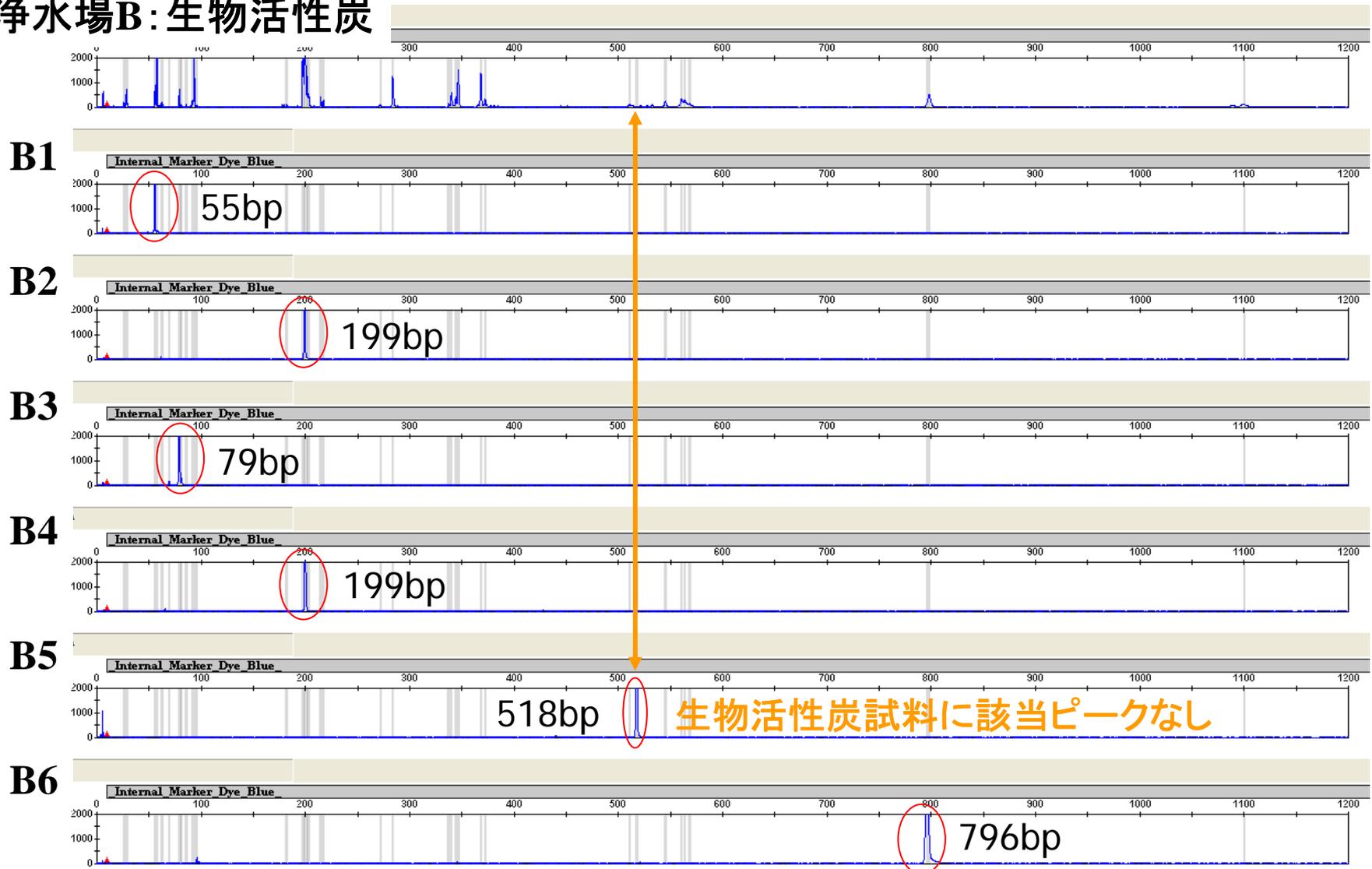
結果：T-RFLPによる単離株の照合（浄水場A）

浄水場A：生物活性炭



結果：T-RFLPによる単離株の照合（浄水場B）

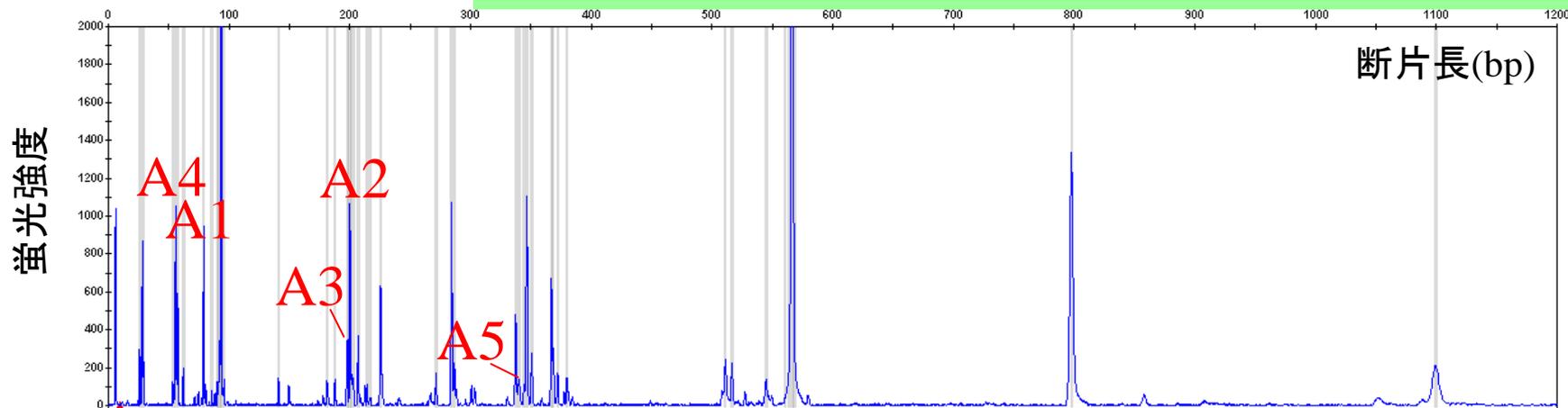
浄水場B：生物活性炭



結果:T-RFLPによる単離株の照合

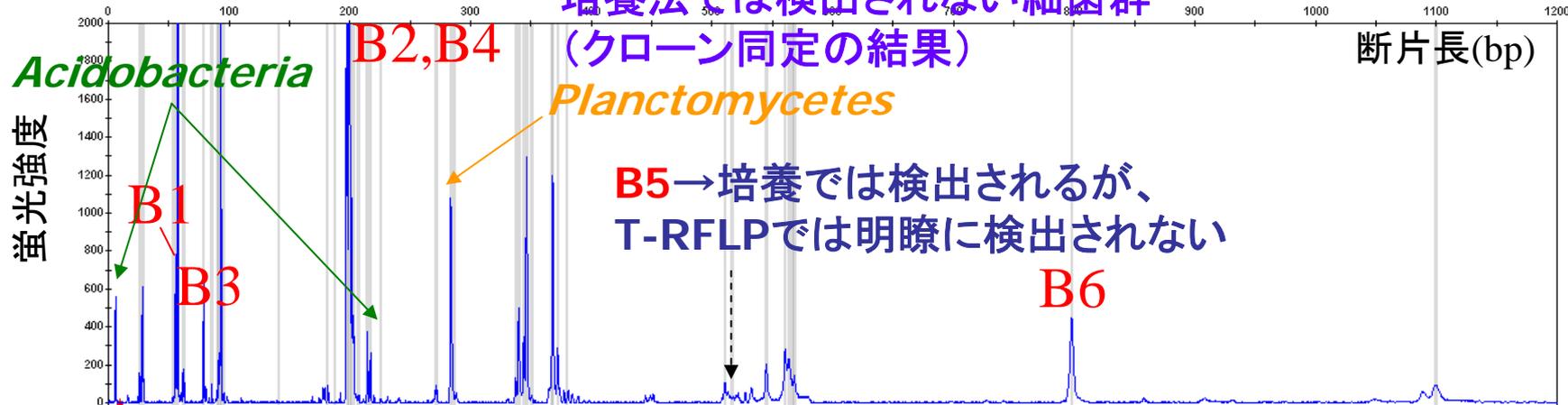
浄水場A:BAC

- ・培養法では検出されない細菌群の存在を示唆
- ・ピーク強度との関連性



浄水場B:BAC

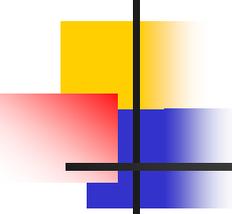
培養法では検出されない細菌群
(クローン同定の結果)



結論

生物活性炭試料を対象として……

- 細菌現存量を評価したところ、従属栄養細菌数は全細菌数の約2%に相当した。
- 従属栄養細菌として単離された株は、すべて α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria*に近縁であった。
- 細菌群集と単離株をT-RFLP法・クローニング法によって解析したところ,
 - 従属栄養細菌としては検出されないが、分子生物学的手法では検出される細菌群 (*Acidobacteria*属、*Planctomycetes*属など)が存在した。
 - 分子生物学的手法では検出されないが、従属栄養細菌としては検出される細菌群 (*Azifapia*属)が存在した。



今後の展開

- 従属栄養細菌（一般細菌）の多様性
 - 全国で同じ細菌群を評価しているのか？ 比較可能？
- 水質管理における運用
 - 平成15年の水質基準の見直しにおいて、「一般細菌」は据え置きされたが、「従属栄養細菌」への転換の可能性が議論された。
 - 結局、7日間かかって判明する結果をどうフィードバックするのか？
 - 従属栄養細菌試験からのみ得られる情報は何か？
 - 培養法・分子生物学的手法それぞれのバイアスの理解が必要。
- 従属栄養細菌（一般細菌）の指標性の考察
 - 単離された株の生理特性から、水道水質管理に有用な指標性は見出せないか？