

令和元年6月11日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02975

研究課題名(和文)嫌気性メタン酸化脱窒アーキアを用いた新規脱窒プロセスの開発と反応メカニズムの解明

研究課題名(英文) Development of novel nitrogen removal process from wastewater using denitrifying anaerobic methane oxidation reaction and investigation of microorganism involved in the reaction

研究代表者

幡本 将史 (HATAMOTO, Masashi)

長岡技術科学大学・産学融合トップランナー養成センター・特任准教授

研究者番号：20524185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンガスを炭素源として用いて硝酸および亜硝酸を窒素ガスに還元する嫌気的メタン酸化脱窒反応に着目し、メタンガスを効率良く供給できるスポンジ担体リアクターを用いて新規プロセスの開発を行った。その結果、脱窒反応に伴い発生する温室効果ガスの亜酸化窒素の発生を従来法よりも低減させたプロセスを構築することができた。また中空糸膜リアクターを用いる事で、リアクターを迅速に立ち上げることができた。反応に関わる微生物群集の解析から、植種源により窒素除去に関わる微生物群が異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嫌気的メタン酸化脱窒反応では亜酸化窒素を経由しないため、従来の脱窒反応とは異なり、温室効果ガスである亜酸化窒素の大気放出が抑制できると考えられている。しかしながら、本研究では共存微生物からの亜酸化窒素放出が存在することを確認した。その一方で、従来法よりも亜酸化窒素放出量は少ないことも明らかにした。本成果は温室効果ガスの排出を抑制した新規な廃水からの窒素除去プロセスの開発に繋がる物である。

研究成果の概要(英文)：In this study, nitrogen removal process from wastewater using denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO) reaction was developed. The method has advantages of no organic carbon requirement, less sludge production and low-cost for construction and maintenance. However, their drawback is long time requirement for biomass growth. In order to overcome this drawback, this study used sponge carrier reactor named DHS and hollow fiber membrane reactor for its unique structure which facilitates the biofilm growth and the gas-liquid mass transfer. The results of this study showed that using DAMO combined with DHS showed lower N<sub>2</sub>O gas emission during the nitrogen removal compared to conventional nitrogen removal. Using hollow fiber membrane reactor, it showed faster reactor start up and we found different microbial groups were involved in nitrogen removal, which might be strongly influenced the inoculum source.

研究分野：環境工学

キーワード：メタン 亜酸化窒素 嫌気 脱窒反応 メタン酸化 廃水処理

### 1. 研究開始当初の背景

排水中の窒素化合物は富栄養化の原因である。そのため、下水処理場ではこの窒素化合物を除去するために生物学的窒素除去法が用いられている。この生物学的窒素除去法はアンモニアが亜硝酸・硝酸へと酸化される硝化反応と、硝酸・亜硝酸が窒素へと還元される脱窒反応に分けられる。この脱窒反応は水素供与体である有機物の投与が必要であり、有機物投与には多大なコストがかかる。また、上記の硝化・脱窒反応では二酸化炭素の約 300 倍以上の温室効果を有する亜酸化窒素 ( $N_2O$ ) が生成されることから、亜酸化窒素の削減が求められている。そこで、本研究では嫌氣的メタン酸化脱窒反応に着目した。

嫌氣的メタン酸化脱窒反応とは、硝酸および亜硝酸を電子受容体としてメタンを酸化する脱窒反応である。本反応は亜酸化窒素を経由せず窒素ガスが生成されるため、温室効果ガスである亜酸化窒素を削減できる新たな脱窒プロセスとして注目されている。現在、嫌氣的メタン酸化脱窒反応に関する研究は基礎研究から実用化を目指した研究まで幅広く行われている。しかし、嫌氣的メタン酸化脱窒微生物を集積培養したリアクターにおいて微量の亜酸化窒素の生成が報告されているにも関わらず、嫌氣的メタン酸化脱窒反応と亜酸化窒素発生量の関連性についての報告はない。

嫌氣性メタン酸化脱窒反応には様々な微生物が関与している。これまでに嫌氣性メタン酸化脱窒反応やアナモックス反応に直接関わる微生物については、研究報告がいくつかあるがそのほかの共存微生物についての報告はほとんどない。

### 2. 研究の目的

本研究では、下降流懸垂型スポンジ担体 (DHS) リアクターを用いて嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の集積培養を行い、嫌氣的メタン酸化脱窒反応による窒素除去性能と亜酸化窒素発生量を評価することを目的とした。また、嫌氣的メタン酸化脱窒反応に関わる微生物群の共生関係の解明のために、より集積度の高い培養系を得る目的で中空糸膜を用いた膜分離リアクターを用い、環境条件 (基質濃度、pH、補助栄養素など) と微生物挙動の関係を調査しメタン酸化、アンモニア酸化と亜硝酸の利用に関する微生物の共生・競合関係の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養には G3 型スポンジ担体を容積 8.47 L 投入したカラム容積 14.1 L の DHS リアクターを用いた (図-1)。植種源には嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の集積培養をしている回分式リアクターの汚泥を用いた。

DHS リアクターの基質には無機合成培地を用い、窒素源として硝酸及び亜硝酸を約 20 mg-N/L の濃度で添加した後、アルゴンでパージを行い無酸素状態にした。DHS リアクターにはメタンを 10 mL/min で流入させた。運転 41 日目から 52 日目に水理的滞留時間 (HRT) を 24 時間から 12、6 時間に短縮を試みた。運転 112 日目以降から窒素消費速度を増大させるために基質に還元剤を投与した。硝酸・亜硝酸個々における亜酸化窒素発生量を計測するために、運転 52 日目から 183 日目にかけて硝酸と亜硝酸を個別に添加した。DHS リアクターの運転条件は温度 35 °C、pH7.0 から 8.0、HRT は 6、12、24 時間と設定した。

嫌氣的メタン酸化脱窒反応に関わる微生物群の共生関係の解明の実験では中空糸膜リアクター (HfMBR) を用いた。2 台 HfMBR を用いて HRT は 9.5 時間で 30 °C の条件で運転した。

リアクターの流入水と流出水の硝酸及び亜硝酸の濃度は UV-VIS 検出器を備えた高速液体クロマトグラフ (SPD-20AV, Shimadzu) を用いて測定した。DHS リアクター内のガスのメタン濃度の計測には TCD 検出器を備えたガスクロマトグラフ (GC-8A, Shimadzu) を、 $N_2O$  濃度の計測には ECD 検出器を備えたガスクロマトグラフ (GC-2014, Shimadzu) を用いて測定した。

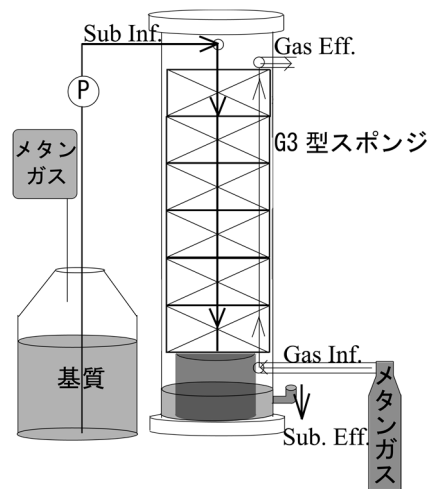


図-1 DHS リアクター概略図

### 4. 研究成果

DHS リアクターの硝酸・亜硝酸消費速度経日変化を図-2 に示す。培養開始直後より DHS リアクターでは硝酸及び亜硝酸の消費が確認されたことから嫌氣的メタン酸化脱窒反応が起きていることが示唆された。運転 41 日目から 52 日目に HRT を 24、12、6 時間と短縮した。結果、DHS リアクターの亜硝酸消費速度は HRT12 時間で最大亜硝酸消費速度 (平均  $4.2 \pm 1.4 \text{ g-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ ) を示し、硝酸消費速度は HRT6 時間で最大硝酸消費速度 (平均  $7.5 \pm 4.8 \text{ g-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ ) を示した。運転 183 日目から硝酸・亜硝酸の両方を基質に添加した。その結果、亜硝酸消費速度は減少せず

に  $4.9 \pm 2.1 \text{ g-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$  を示したが、硝酸消費速度は  $1.5 \pm 1.5 \text{ g-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$  と減少する傾向を示した。既報では嫌氣的メタン酸化脱窒微生物は硝酸よりも亜硝酸を電子受容体として優先的に用いることが報告されており、本結果も同様に亜硝酸を電子受容体として優先的に使用されたことが考えられた。

硝酸・亜硝酸消費あたりの平均亜酸化窒素発生量を図-3 に示す。運転 83 日目から 200 日目までの硝酸・亜硝酸消費あたりの平均亜酸化窒素発生量は各々  $0.0020 \pm 0.0020$ ,  $0.0014 \pm 0.0013\%$  を示した。下水処理プラントにおける亜酸化窒素の排出量は流入窒素の 0.5 から 2.5% と報告されており、本結果から嫌氣的メタン酸化脱窒反応を用いることにより亜酸化窒素の発生を抑制できることが示唆された。運転約 110 日目から 180 日目にかけて、硝酸・亜硝酸消費あたりの亜酸化窒素発生量は減少する傾向が示唆された。これは該期間において硝酸・亜硝酸消費速度が増大したが、亜酸化窒素発生量はほぼ一定の値を示したためであると考えられた(図-4)。

本研究では、DHS リアクターを用いて嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の集積培養を行い、窒素除去性の評価と亜酸化窒素発生量を評価した。その結果、HRT6 時間で平均最大硝酸消費速度  $7.5 \pm 4.8 \text{ g-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$  を、HRT12 時間で平均最大亜硝酸消費速度  $4.2 \pm 1.4 \text{ g-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$  を達成した。また、基質に硝酸・亜硝酸を同時に添加した結果、硝酸消費速度は減少する傾向を示唆した。嫌氣的メタン酸化脱窒反応を用いた DHS リアクターの硝酸・亜硝酸消費あたりの亜酸化窒素排出量は各々  $0.0020 \pm 0.0020$ ,  $0.0014 \pm 0.0013\%$  を示した。本結果から嫌氣的メタン酸化脱窒反応を用いることにより亜酸化窒素の発生を抑制できることが示唆された。また、嫌氣的メタン酸化脱窒反応培養系からの亜酸化窒素発生量は窒素消費に関係なく一定の値を示すことが考えられた。

HfMBR を用いた実験では、2 つの異なる植種源を用いた 2 台のリアクターで微生物群集構造とメタン酸化、アンモニア酸化と亜硝酸の利用に関する微生物の共生・競合関係の解明を目指した。実験ではアンモニアと硝酸および亜硝酸による窒素源の供給とメタンガスの供給有無により、phase1 から phase5 までの条件で実験を行った(表-1)。

活性汚泥を植種源としたリアクター no.1 は土壌を植種源としたリアクター no.2 よりも高いアナムモックス活性を有していた。その一方で土壌を植種源とした no.2 リアクターはメタン供給の有無にかかわらず高い硝酸消費速度を示した。また両リアクターから異化型亜硝酸還元と考えられる反応が確認された。HfMBR は効率よくメタンを供給することで迅速なリアクターの立ち上がりを達成できた。したがって、気体のメタンを炭素源として供給するリアクターとしては非常に有望なシステムであることも確認できた。

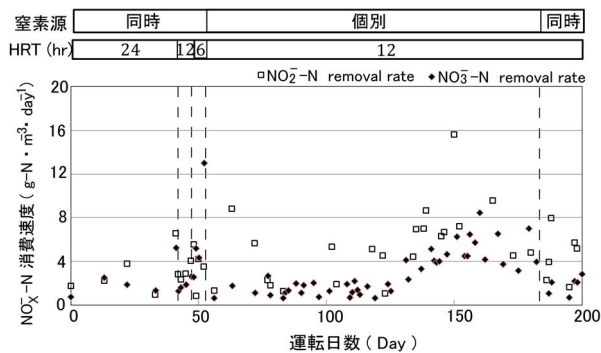


図-2 硝酸・亜硝酸消費速度の経日変化

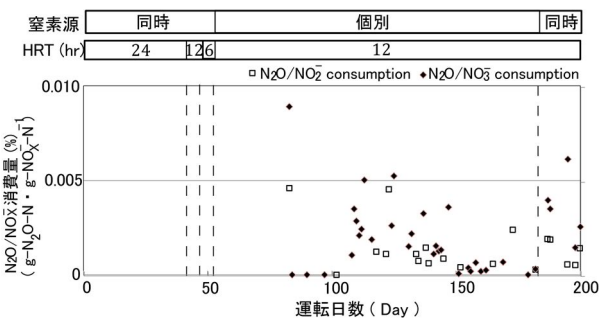


図-3 硝酸・亜硝酸消費あたりの亜酸化窒素発生量の経日変化

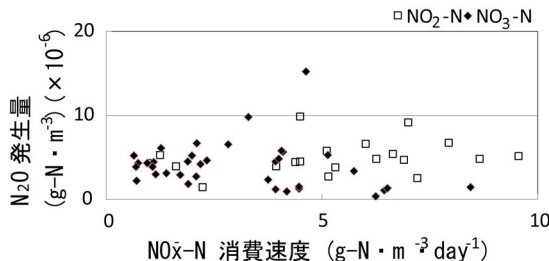


図-4 硝酸・亜硝酸消費速度と亜酸化窒素生成

表-1 HfMBR の運転条件と窒素除去率

Phase (day period)	N sources(mgN/L)	Gas supply	Total nitrogen removal (% ± %)	
			HfMBR1	HfMBR2
1(0 ~ 52)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (28), NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (13)	5% CO <sub>2</sub> , 95% CH <sub>4</sub>	16.1 ± 13.3	17.0 ± 7.8
2(53 ~ 61)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (10), NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (14)	99.999%Ar	33.3 ± 14.8	31.3 ± 8.5
3(62 ~ 72)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (10)	5% CO <sub>2</sub> , 95% CH <sub>4</sub>	63.2 ± 20.6	41.0 ± 14.7
4(73 ~ 78)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (10)	99.999%Ar	47.7 ± 19.9	60.1 ± 5.8
5(79 ~ 86)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (13)	99.999%Ar	16.1 ± 6.8	26.4 ± 9.2

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計2件)

Hatamoto Masashi, Nemoto Sho, Yamaguchi Takashi. Effects of Copper and PQQ on the Denitrification Activities of Microorganisms Facilitating Nitrite- and Nitrate-Dependent DAMO Reaction. International Journal of Environmental Research. Vol.12, No.5, pp.749-753, 2018

DOI: <https://doi.org/10.1007/s41742-018-0118-7>

Masashi Hatamoto, Takafumi Sato, Sho Nemoto, Takashi Yamaguchi. Cultivation of denitrifying anaerobic methane-oxidizing microorganisms in a continuous-flow sponge bioreactor. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol.101, Issue 14, pp.5881-5888. 2017

DOI: 10.1007/s00253-017-8315-4

### 〔学会発表〕(計5件)

Tran Phuong Thao, Hatamoto Masashi, Takahiro Watari, Takashi Yamaguchi. Application of Hollow Fiber Membrane Reactor in Autotrophic Removal of Nitrogen. 第53回日本水環境学会年会. 2019.

津場大輔、吉田悠亮、根本笙、牧慎也、幡本将史、山口隆司. DHSリアクターにおける嫌氣的メタン酸化脱窒反応による亜酸化窒素発生量の評価. 平成29年度土木学会全国大会. 2017.

津場大輔、吉田悠亮、根本笙、牧慎也、幡本将史、山口隆司. 嫌氣的メタン酸化脱窒反応による窒素除去と亜酸化窒素発生量の評価. 第51回日本水環境学会年会. 2017.

Masashi Hatamoto, Takafumi Sato, Shou Nemoto, Yusuke Yoshida, Takashi Yamaguchi. Application of denitrifying methane-oxidizing microorganisms for wastewater treatment using sponge bioreactor. 16th International Symposium on Microbial Ecology (ISME16). 2016.

津場大輔、根本笙、牧慎也、幡本将史、山口隆司. DHSリアクターを用いた嫌氣的メタン酸化脱窒反応による硝酸・亜硝酸の窒素除去. 第34回土木学会関東支部新潟会研究調査発表会. 長岡. 2016.

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://ecolab.nagaokaut.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：山口 隆司

ローマ字氏名：YAMAGUCHI Takashi

所属研究機関名：長岡技術科学大学

部局名：工学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 10280447

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。