

平成23年3月4日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20760357

研究課題名（和文） 脱窒を伴う嫌気メタン酸化反応利用技術の創出基盤

研究課題名（英文） Fundamental study for the cultural development of anaerobic oxidation of methane with denitrification.

研究代表者

伊藤 司（ITO TSUKASA）

群馬大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：80431708

研究成果の概要（和文）：

本研究では、淡水環境におけるメタン脱窒の重要性を明らかにすることを最終目的とし、第一段階として、河川底泥と嫌気性グラニュールをそれぞれ嫌気的条件下で硝酸とメタンを基質として与えて培養することでメタン脱窒反応に関与する微生物群集の集積培養を試みた。集積培養を試みながらメタン脱窒反応の活性化因子や脱窒メカニズムについても検討してきた。その結果、現在では、グラニュール系では比較的安定した硝酸塩減少速度が得られるようになった。しかしながら、メタン脱窒機構を解析し、活性化因子を評価するためには、十分な速度がなかなか得られなかった。本培養方法では、これ以上の速度は得られないと判断し、培養方法から再検討することにした。また、ガスクロマトグラフィによる測定結果からは酸素の排除が完全でない可能性が考えられたため、気密性を高めて、メタン分圧を高く制御できるリアクターを設計、製作した。通常のエアレーションに比べて、ガスを効率よくリアクター内に分散させ溶解させられること、さらには長時間残存させられることを実験的に明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

The significance of anaerobic oxidation of methane with denitrification in fresh water habitats is largely unknown. First, we tried to enrich the microbial community that denitrify with methane and nitrate under anaerobic condition. A portion of a river sediment and anaerobic methanogenic granular sludge were inoculated for the culture. High denitrifying activity was observed in the anaerobic granular sludge. However, the denitrification rate was still too low to investigate what parameters influence the methane denitrifying activity. Therefore, we developed the bioreactor which increased gas concentration such as methane in the liquid culture medium. The developed bioreactor was able to distribute microbubbles in the water phase and to keep high concentration of gas such as oxygen and methane.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：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：メタン酸化、メタン脱窒、環境技術、地球温暖化ガス排出削減、  
水質汚濁・土壌汚染防止・浄化

### 1. 研究開始当初の背景

温室効果ガスの一つであるメタンは単位量あたりの温室効果は二酸化炭素の約 20 倍大きく、また人為的に排出される温室効果ガスの約 2 割を占めることが報告されている。一方、近年脱窒を伴い嫌気メタン酸化を行う微生物が報告されたことで、地球上の炭素循環や窒素循環におけるメタン脱窒の重要性を、温室効果ガスの挙動の観点からも検討することが必要であると考えられる。しかしながら自然環境中でのメタン脱窒反応を好気性メタン酸化や有機性脱窒と区別して解析することは難しい。そこで、メタン脱窒反応を担う微生物に特徴的な遺伝子配列を特定し、この遺伝子配列を遺伝子マーカーとして、このマーカーを環境中から検出することが有用であると考えた。本研究では、淡水環境におけるメタン脱窒の重要性を明らかにすることを最終目的とし、第一段階として、河川底泥と嫌気性グラニュールをそれぞれ嫌気的条件下で硝酸とメタンを基質として与えて培養することでメタン脱窒反応に関与する微生物群集の集積培養を試みた。

また、メタン脱窒菌培養の効率向上のため、液体中に比較的長時間滞在する特性を持った非常に小さい気泡（マイクロバブル）を発生させる振動多孔版を用いたメタン脱窒菌用のリアクターを製作し、リアクターの性能評価の実験を行った。

### 2. 研究の目的

河川底泥と嫌気性グラニュールをそれぞれ嫌気的条件下で硝酸とメタンを基質として与えて培養することでメタン脱窒反応に関与する微生物群集の集積培養を試みた。集積培養を試みながらメタン脱窒反応の活性化因子や脱窒メカニズムについても検討してきた。

また、メタン脱窒菌培養の効率向上のため、液体中に比較的長時間滞在する特性を持った非常に小さい気泡（マイクロバブル）を発生させる振動多孔版を用いたメタン脱窒菌用のリアクターを製作し、リアクターの性能評価の実験を行った。

### 3. 研究の方法

#### 3. 1 メタン脱窒菌の集積培養と培養条件

#### の検討

メタン脱窒菌の培養の種汚泥には、硝酸性窒素により汚染された河川底泥（サンプル名：池、公、リアクター）とメタン生成と脱窒を同時に行う嫌気性グラニュール（メタン生成脱窒グラニュール）を用いてメタン脱窒菌の培養を行った（サンプル名：A、B、C）。メタン生成脱窒グラニュールは、元々はグルコースと硝酸塩を基質として培養され、グラニュールの外側に脱窒菌、その内側にメタン生成古細菌が存在する微生物群集構造を形成していた。全てのサンプルで培養はメタンガスと硝酸塩を主要基質とした人工培地を用い、定期的に培地交換する半回分培養により行った。集積状況の調査はイオンクロマトグラフィーによる硝酸塩濃度の測定、ガスクロマトグラフィーによるガス組成の測定により行った。また、グラニュールを用いた培養系は培養 83 日目にガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) によりガス成分、特に亜酸化窒素ガス ( $N_2O$ ) について調査した。

集積培養を試みる中で、亜硝酸塩を用いた脱窒の状況と脱窒菌における古細菌の活性を調べるために 84 日目以降、B には亜硝酸塩を C には硝酸塩と 10 mM BES (2-Bromoethanesulfonic acid sodium salt) を添加した。

メタン脱窒活性に影響を及ぼすと思われる因子としては、硝酸塩濃度、培地交換、pH の検討をした。

#### 3. 2 メタン脱窒反応用リアクターの開発

リアクターは、リアクター本体、エアポンプ、発振機、アンプ、振動多孔板で構成される (図 1A)。振動多孔板は、噴孔径 4~8  $\mu\text{m}$ 、噴孔のピッチ間隔は 100~150  $\mu\text{m}$  の千鳥配置である (図 1B)。エアポンプから送った気体は振動多孔板を通り微細気泡化される。振動は発振機の信号をアンプで増幅して圧電素子に供給することで得られる。約 20 種類の構造の異なる振動多孔板に対して発信機の周波数を 80~170 kHz の間で変化させ、最も微細な気泡が発生するように周波数および通気流量を変化させ、微細気泡化の最適条件を選定した。リアクターの微細気泡化の性能は、総括酸素移動容量係数  $KLa$  および酸素移動効率 EA により評価した。

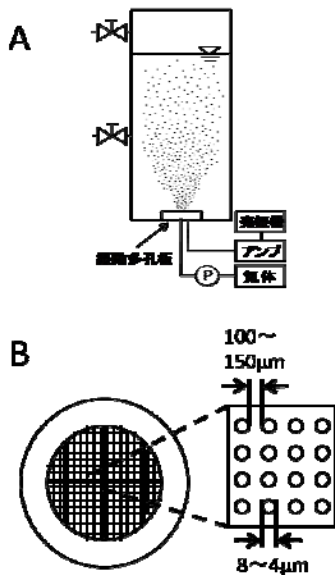


図1. 振動多孔板リアクターの装置図(A)と多孔板概略図(B)

#### 4. 研究成果

##### 4. 1 メタン脱窒菌の集積

集積状況はメタン脱窒反応式 ( $5\text{CH}_4 + 8\text{NO}_3^- + 8\text{H}^+ \rightarrow 5\text{CO}_2 + 4\text{N}_2 + 14\text{H}_2\text{O}$ ) における硝酸塩を基準としたメタン減少量の理論値より推定した (図2)。培養当初は約3割であったが現在ではA, B, C, 全てが7割ほどになりメタン脱窒菌の集積が進行した。最も集積が進んでいる71日~84日間の平均硝酸塩減少速度はAが15 mg-N/L/day Bが14 mg-N/L/day Cが11 mg-N/L/dayであり、経過時間860日目の河川底泥系3サンプルの平均減少速度が2.7 mg-N/L/dayであるのに対して4~6倍大きい。このことからメタン脱窒反応の種汚泥には嫌気性グラニュールが適していると考えられる。

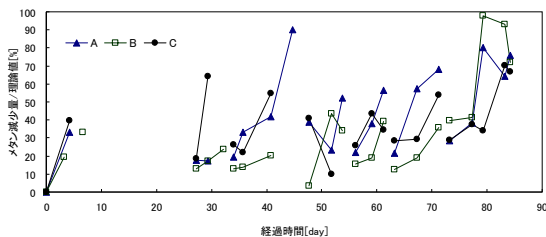


図2 メタン脱窒反応を仮定した場合に硝酸塩減少量を基準として求めた理論的メタン減少量に対する実際のメタン減少量の割合

メタン脱窒反応における脱窒メカニズムを図3より硝酸塩減少速度にメタン減少量の変移を照らし合わせて考察すると、硝酸塩減少がみられてからメタンが消費されるま

でタイムラグが約1日あり(図3の中の○印)、硝酸塩減少とメタン消費が交互に繰り返される現象が現在まで継続して観察された。またGC-MSを用いたガス分析の結果、A, B, C 全てにおいて亜酸化窒素ガス ( $\text{N}_2\text{O}$ ) が検出された。以上のことからメタン脱窒反応では脱窒からメタン酸化までに約1日間を要し、 $\text{N}_2$ と $\text{N}_2\text{O}$ が脱窒過程で放出されることがわかった。

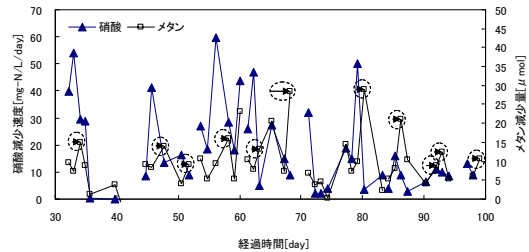


図3 減少速度とメタン減少量の変移 (グラニュール A)

##### 4. 2 メタン脱窒反応機構について

メタン脱窒反応への古細菌の関与を調査するため、古細菌のメタン酸化活性を阻害するBES(10mM)を培地中に添加したところ(図4)、添加後2日間硝酸塩の減少が認められなかった。3日目以降から硝酸塩が減少し始めたことの原因は明らかでないが、BES添加による影響が現れたことで、メタン脱窒反応に古細菌が関与している可能性は否定できないと思われる。2008年10月の報告では、嫌気性メタン脱窒反応には古細菌が関与しないという報告がされているためFISH法などの微生物群集解析による確認が必要であると思われた。

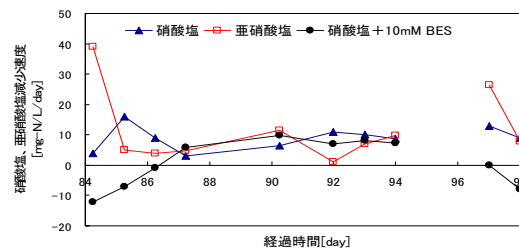


図4 亜硝酸塩添加後およびBES添加後の窒素減少速度

##### 4. 3 メタン脱窒反応の活性化因子

亜硝酸塩を84日目に添加した培養系は、硝酸塩添加系に比べて、添加直後の硝酸塩減少速度が10倍速くなった。97日目にも亜硝酸塩添加系の硝酸塩減少速度が硝酸塩添加系に比べて2倍速いという結果が得られ、亜硝酸塩添加の添加を継続的に行うことにより、メタン脱窒反応を活性化させられる可能

性があると考えられた。

硝酸塩濃度範囲ごとの硝酸塩減少速度を比較した(図5)。硝酸塩減少速度が不規則ではばらつきが大きい、硝酸塩濃度 100~200 mg-N/L で硝酸塩濃度が高くなる傾向が見られ、硝酸塩濃度と硝酸塩減少速度は比例関係にあるわけではなかった。

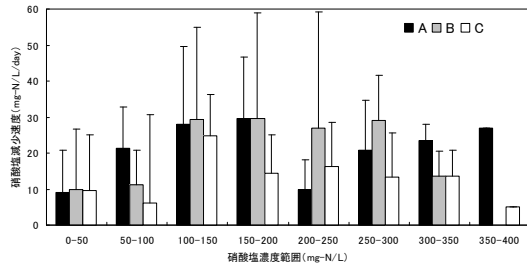


図5 硝酸塩濃度範囲ごとの硝酸塩減少速度の分布

培地交換後の硝酸塩減少速度の変移を図6に示した。ばらつきはあるが交換1日後の平均が 20 mg-N/L/day であり通常の1.5倍の活性が見られた。また、交換1日後よりも2日後の方が硝酸塩減少速度は速い傾向にあり、2日目の平均は 40 mg-N/L/day であった。このことから培地交換における活性化には交換後1日以上が必要であると言え、連続培養を行う際の水理学的滞留時間の設定において重要になると思われる。

pHによる影響は、グラニュールを用いた培養系では活性化に結びつく関連性を明らかにする段階まで至らなかった。また、河川底泥の培養系のサンプルでは pH は脱窒が進む中でほぼ一定の値 (pH 8 前後) になり比較することができなかった。

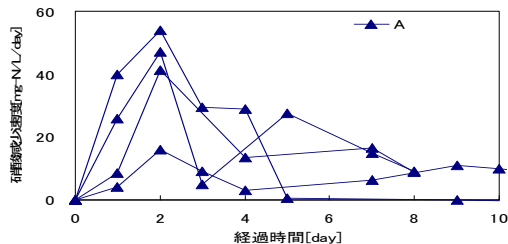


図6 培地交換後の減少速度の変移 (グラニュール A)

#### 4. 4 振動多孔板を用いたリアクター

振動多孔板による流量 9 ml/min でのエアレーションで得られた  $KLa$  の値は 1.9 1/hr で、散気球による流量 9 ml/min でのエアレーションで得られた  $KLa$  の値は 1.3 1/hr であった。散気球による流量 900 ml/min での

エアレーションで得られた  $KLa$  の値は 3.9 1/hr であった。流量 900 ml/min の散気球でのエアレーションにより得た  $KLa$  は、流量 9 ml/min の振動多孔板によるエアレーションで得たそれより大きかった。この  $KLa$  の差は流量の違いが大きく影響していると考えられたため、単純に比較することはできない。また、振動多孔板による流量 9 ml/min でのエアレーションを溶存酸素濃度 4.9 mg/L で止め、60 分後に溶存酸素濃度を測定した結果、溶存酸素濃度は 6.6 mg/L に増加していた。一方、散気球による流量 9 ml/min でのエアレーションを溶存酸素濃度 8.13 mg/L で止め、60 分後に溶存酸素濃度を測定した結果、溶存酸素濃度は 8.01 mg/L になった。これらの結果から、散気球のエアレーションにより生じる一般的な気泡は径が大きいため上昇速度は速くすぐに大気中に放出されるが、振動多孔板のエアレーションにより生じる気泡は微細 (約 50  $\mu$ m) であるため水溶液中に留まり溶存酸素濃度の持続あるいは持続的な上昇を助けると考えられた。

#### 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)

[学会発表] (計 2 件)

① 田代直也、志賀正規、渡邊智秀、伊藤司。脱窒を伴う嫌気性メタン酸化微生物群の集積培養の検討。第 17 回衛生工学シンポジウム、2009. 6. 30、北海道大学 (北海道)

② 志賀正規、高井俊博、渡邊智秀、伊藤司。脱窒を伴う淡水性メタン酸化系とメタン生成系の古細菌群集と脱窒活性の検討。第 43 回 日本水環境学会年会、2009. 3. 16、山口大学 (山口県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ce.gunma-u.ac.jp/bio/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 司 (ITO TSUKASA)

群馬大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：80431708

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし