

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K19988

研究課題名（和文）水素資化性N₂O還元細菌のガス透過膜による戦略的集積培養・獲得と利用に向けた検討研究課題名（英文）Exploring and enrichment of hydrogen utilized N₂O reducing bacteria using a gas-permeable membrane biofilm reactor

研究代表者

末永 俊和 (Suenaga, Toshikazu)

広島大学・先進理工系科学研究科(工)・助教

研究者番号：80828377

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：亜酸化窒素（N₂O）はオゾン層破壊物質、強力な温室効果ガスとして知られている。そのN₂Oを窒素に無害化する微生物群として脱窒細菌の一部であるN₂O還元細菌がある。これらの細菌群は一般的に有機物を電子供与体として利用するが水素も利用可能か検討した。嫌気性アンモニア酸化（アナモックス）プロセスから放出されるN₂Oの存在量を把握し、アナモックスバイオマスに水素を電子供与体として添加することでN₂O還元活性が上昇することを見出した。また、ガス透過膜を用いて水素とN₂Oを供給しアナモックスバイオマスからの集積培養を試みたが、目的細菌の遅い増殖速度の故か獲得には至らず、引き続き培養を継続することとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで脱窒反応の電子供与体は原則として有機物の添加が必要であった。一方で、独立栄養的な環境に有機物を添加すると、従属栄養的な細菌群が増殖し、目的外の微生物群が優占化する危険性がある。今回、水素が独立栄養的環境下でN₂O還元の電子供与体として利用可能であることが示唆されたことで、アナモックスプロセス等からのN₂O抑制技術の開発への糸口になる可能性がある。本研究では結果的に水素資化性N₂O還元細菌の獲得には至らなかったが、活性を見出す事はできたので、引き続き検討を勧めることで、有用微生物群の獲得とN₂O放出抑制技術の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：Nitrous oxide (N₂O) is known as an ozone-depleting substance and a potent greenhouse gas. N₂O-reducing bacteria, which are part of denitrifying bacteria, are a group of microorganisms that detoxify N₂O into nitrogen. These bacteria generally use organic compounds as an electron donor, but we investigated whether they can also use hydrogen. We determined the amount of N₂O released from the anaerobic ammonia oxidation (anammox) process, which is an autotrophic environment, and found that the addition of hydrogen as an electron donor to the anammox biomass increased N₂O reduction activity. In parallel, we carried out the enrichment of the bacteria by supplying hydrogen and N₂O through a gas permeable membrane, but were unable to obtain the target bacteria, and we decided to continue the culture.

研究分野：化学工学、環境微生物学

キーワード：亜酸化窒素 水素 集積培養 アナモックス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

省エネルギー・低コスト型の排水処理システムとして、独立栄養的微生物反応が着目され、特に嫌気性アンモニア酸化 (Anammox) プロセスの実用化と普及が期待されている (Kartal *et al.*, 2010)。Anammox 細菌は亜酸化窒素 (N_2O) を反応中間体として生成しないが、共生している硝化細菌や脱窒細菌が副生成物として N_2O を生成し、それが処理水中に残留することが分かってきた (Okabe *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2016)。これは二酸化炭素の 265 倍の強力な温室効果能を持ち、21 世紀最大のオゾン層破壊物質である N_2O が、通常の排水処理システムの 10-1000 倍高濃度な状態で処理水と共に放出されるリスクを意味している。Anammox プロセスがもたらす省エネルギー化は温室効果ガス放出という短所とトレードオフの関係にあり、これを解決する新たな N_2O 除去戦略が必要である。

近年世界的に注目されているのが、 N_2O を窒素に還元する生物的 N_2O 還元経路の活用である。この反応を媒介する細菌 (N_2O 還元細菌) の利用により、常温・常圧環境、低コストで大規模スケールな N_2O 無害化技術が提案可能である。ただ、Anammox プロセスへのこの技術の適用は以下の 2 つの制限がある。① 生成 N_2O の大半が大気中に拡散せず溶存態として存在するため、排気ガスのバイオフィルター処理 (Yoon *et al.*, 2017) は適用が難しい。② 電子供与体となる有機物の供給が無い場合、一般的な従属栄養細菌による還元 (Suenaga *et al.*, 2018) は適用困難である。また、有機物添加には、目的外の細菌増殖による Anammox プロセスの破綻、余剰汚泥の過剰生成やコスト高などのリスクも伴う。

近年のメタゲノム解析により、Anammox との共生細菌に N_2O 還元酵素を有する種が存在し、さらに硝酸または亜硝酸還元能力を欠損し、 N_2O 還元能に特化した非脱窒性 N_2O 還元細菌の可能性が示唆されている (Speth *et al.*, 2016)。一方で、利用可能な電子供与体をはじめ、その生理活性の殆どが不明である。近年、硫酸塩を利用できる、独立栄養 N_2O 還元細菌も発見されていることから (Mino *et al.*, 2018)、貧栄養や独立栄養的な環境中でも、 N_2O 還元活性を発現できるのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、独立栄養的環境下に残存する N_2O の新規除去プロセスを志向した、水素酸化性 N_2O 還元細菌の探索・評価、ならびに実現可能性の検討である。まず、対象とする独立栄養的環境下において、 N_2O がどれ程存在しているのか把握する為、代表的な独立栄養的環境として Anammox リアクター内の N_2O の生成・蓄積状況をモニタリングした。また、Anammox バイオマスを用いた回分試験では、 N_2O と水素を添加することで N_2O の消費速度が向上するか明らかにした。さらに水素酸化性 N_2O 還元細菌の集積培養に向けて連続培養実験を開始した。

3. 研究の方法

(1) Anammox リアクターの N_2O の生成・蓄積状況の把握

Anammox リアクターからの N_2O の発生挙動を把握する為、本研究において新たに 1 L の容積の上向流型 Anammox リアクターの運転を開始した。本リアクターは流出水として系外に放出される溶存態 N_2O と、ガスパックでガスを捕集することで脱窒のガスと共に系外に排出されるガス態 N_2O を分けてモニタリングした。 N_2O と水素の分析には GC-ECD と GC-TCD (Shimadzu, Kyoto) をそれぞれ用いた。アンモニウムと亜硝酸を含有した無機態人工排水を供給し Anammox 脱窒活性と共に供給された窒素がどれ程 N_2O として排出されたかを示す N_2O 転換率を算出した。水質分析にはイオンクロマトグラフィ (Shimadzu) を利用した。

(2) Anammox バイオマスに水素を添加した際の N_2O 還元活性

Anammox バイオマスにおいて水素が N_2O 還元反応の電子供与体として利用できるか確かめるために回分試験を行った。ブチルゴム栓付き 30 mL ガスバイアルに、(1) の Anammox リアクターからバイオマスを採取し窒素環境下で封入した。実験系として、4% 水素-窒素ガスでヘッドスペースを置換した系、有機物 (イーストエクストラクト、ペプトン) を 100 mg/vial となるように添加した系、電子供与体を添加しない系をそれぞれ 3 連で用意した。全ての系に 0.5% N_2O となるように添加、32 °C の恒温槽内に静置し、バイアル内の N_2O 濃度の時間変化を GC-ECD にて測定した。測定終了後、バイアル内のバイオマス量を秤量することで、バイオマス重量あたりの N_2O 還元速度を算出した。また、同様の実験を一般下水を処理している排水処理施設の活性汚泥でも実施した。

(3) N_2O と水素を供給する連続培養装置の運転

水素を電子供与体として N_2O を還元する細菌群の集積培養に向けて、連続培養装置の運転を行った。アンモニウムを含む無機培地を供給し、中空糸ガス透過膜に N_2O と水素を供給することでバブルレスで供給することとした。接種汚泥は Anammox バイオマスを用いた。

4. 研究成果

(1) Anammox リアクターの N_2O の生成・蓄積状況の把握

スタートアップ期間を経て 200 日超の連続運転を行った。120 日目までは流入水に酸素が混入していた影響で、リアクター内が微好気条件となっていたとみられ、Anammox 活性よりも亜硝酸酸化活性が優勢となっていた。この時の N_2O はほぼ溶存態として検出されており、更に亜硝

酸酸化活性が高くなった 116 日目付近では N_2O の生成が観測されなくなった(図 1)。

流入水中の溶存酸素を排除した運転条件に変更後、Anammox 活性が優勢となった(120 日目以降)。 N_2O は溶存態とガス態両方で同程度の量が放出されていることが明らかとなった。これは、殆どガス態 N_2O として放出される一般排水処理システムとは異なる特徴である。更に、 N_2O 転換率最大 2%程度を記録した。これは一般排水処理システムで報告されている値よりも 10-100 倍程度高い割合である。

また、幾つかの地点で排気ガス中の水素濃度を測定したが、装置の検出下限値以下(<10 ppm)でありリアクターからの水素の放出は確認されなかった。

(2) Anammox バイオマスに水素を添加した際の N_2O 還元活性

水素添加系、有機物(イーストエクストラクト、ペプトン)添加系、電子供与体無添加系にて経時的に N_2O の消費活性を測定した結果を図 2 に示した。有機物添加系が最初の 6 時間目までは最も早く消費するように見えたが、最終的には水素添加系で N_2O が最も早く枯渇した。また、これらのバイアル内に含まれるバイオマス量を考慮した N_2O 消費速度を算出した結果、

水素添加系 : 0.0442 mgN/mg-d.w./day

有機物添加系 : 0.0165 mgN/mg-d.w./day

無添加(対照)系 : 0.00587 mgN/mg-d.w./day

となり、水素添加系が有機物添加系の 2.5 倍、

無添加系の 7.5 倍高い活性を示した。さらに同様の実験を一般下水を処理している活性汚泥を用いて行ったが、水素の添加による N_2O 消費活性の有意な上昇は確認されなかった。つまり、

Anammox バイオマスにおいて N_2O 還元活性の活性化に水素添加が有効である可能性が示唆され、その特定は通常の活性汚泥と比較してユニークであることが示された。

(3) N_2O と水素を供給する連続培養装置の運転

N_2O と水素を供給した連続培養運転により、中空糸ガス透過膜表面上にバイオフィームとして微生物群が集積されると想定されたが、実験期間中では有意にバイオフィームの形成を確認できなかった。その原因として、対象としている細菌群の増殖速度が非常に遅く、バイオフィームとして観察されるまでには更に長い培養期間が必要であることが示唆される。本培養装置は本課題終了後も培養を継続し、引き続き水素資化性 N_2O 還元細菌の獲得を目指すこととした。

まとめと今後の展望

本研究において、Anammox リアクターからの N_2O 発生挙動を観測した結果、通常の活性汚泥と比較して高い転換率で N_2O が放出されていることが明らかとなった。またガス態と溶存態、両形態で N_2O が同程度放出される事が明らかとなり、ガス態のみを対象としているこれまでの対策技術ではカバーできない可能性が示唆された。水素の添加によって Anammox 汚泥中の N_2O 消費活性の向上が確認された。これにより、電子供与体として有機物に代わる新たな選択肢として検討する目処が立った。一方で、水素資化性 N_2O 還元細菌の集積培養を目的とした連続培養装置の運転では、有意なバイオフィーム形成が確認できなかった。ターゲットとしている細菌種の増殖速度が一般的な従属栄養細菌よりも遅い可能性が考えられるため、本課題終了後も引き続き運転を継続することとした。

<参考文献>

- Ali, M.; Rathnayake, R. M. L. D.; Zhang, L.; Ishii, S.; Kindaichi, T.; Satoh, H.; Toyoda, S.; Yoshida, N.; Okabe, S. Source Identification of Nitrous Oxide Emission Pathways from a Single-Stage Nitritation-Anammox Granular Reactor. *Water Res.* 2016, 102, 147–157.
- Kartal, B.; Tan, N. C. G.; Van Biezen, E. De; Kampschreur, M. J.; Van Loosdrecht, M. C. M.; Jetten, M. S. M. Effect of Nitric Oxide on Anammox Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, 76 (18), 6304–6306.
- Okabe, S.; Oshiki, M.; Takahashi, Y.; Satoh, H. N_2O Emission from a Partial Nitrification-Anammox Process and Identification of a Key Biological Process of N_2O Emission from Anammox Granules. *Water Res.* 2011, 45 (19)
- Speth, D. R.; In't Zandt, M. H.; Guerrero-Cruz, S.; Dutilh, B. E.; Jetten, M. S. M. Genome-Based Microbial Ecology of Anammox Granules in a Full-Scale Wastewater Treatment System. *Nat. Commun.* 2016, 7.
- Suenaga, T.; Riya, S.; Hosomi, M.; Terada, A. Biokinetic Characterization and Activities of N_2O -Reducing Bacteria in Response to Various Oxygen Levels. *Front. Microbiol.* 2018, 9 (April), 1–10.

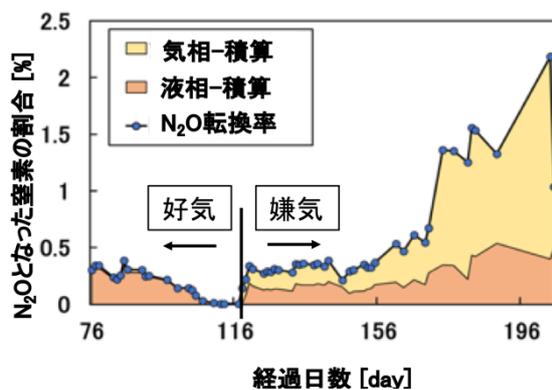


図 1. 独立栄養的環境の Anammox リアクターにおける N_2O の放出挙動

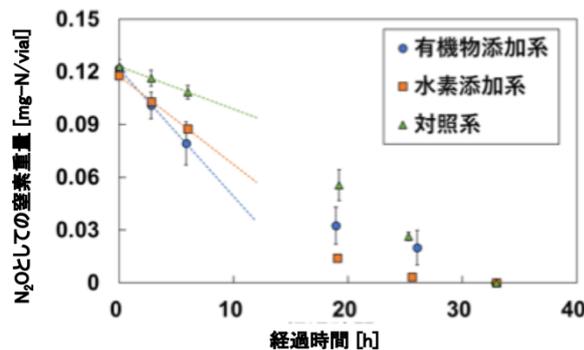


図 2. Anammox バイオマスに各種電子供与体を添加した際の N_2O 還元反応

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 赤穂圭亮, 末永俊和, 中井智司, 後藤健彦
2. 発表標題 アナモックス汚泥からの亜酸化窒素放出挙動の解明と削減の試み
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keisuke AKOH, Toshikazu SUENAGA, Satoshi NAKAI, Wataru NISHIJIMA, Takehiko GOTOH
2. 発表標題 N2O emission behavior of anammox sludge and its mitigation strategies
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference Online2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------