

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25701010

研究課題名(和文) 新規な嫌氣的メタン酸化脱窒微生物を用いた温室効果ガス排出抑制型脱窒プロセスの創成

研究課題名(英文) Novel denitrification process reducing the emission of green house gases using anaerobic denitrifying bacteria

研究代表者

幡本 将史 (Hatamoto, Masashi)

長岡技術科学大学・その他部局等・准教授

研究者番号：20524185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、嫌氣的メタン酸化脱窒微生物による新規窒素除去システムの開発を目標に、嫌氣的メタン酸化脱窒リアクターの構築および連続運転を行った。その結果、嫌氣的メタン酸化脱窒微生物のリアクター方式による集積培養に成功した。またそのリアクター内で培養される嫌氣性メタン酸化脱窒微生物の優占種は電子受容体の種類だけでなく、その負荷量の違いによる影響を受けることが示唆された。さらに、硝酸の嫌氣的メタン酸化脱窒反応において、硝酸から亜硝酸への脱窒反応が律速段階であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, denitrifying anaerobic methane oxidizing (DAMO) microorganisms was used for development of nitrogen removal system, which reduces the emission of green house gases. To collect the basic knowhow on the novel nitrogen removal process, continuous flow reactor system and batch experiment were conducted. Enrichment of DAMO microorganisms was achieved by using continuous flow reactor systems from paddy filed soils. Clone libraries of 16S rRNA and pmoA gene were constructed using NC10 bacterial specific primer pairs to detect DAMO microorganisms in the reactor. The enriched microorganisms might be affected not only the types of electron acceptor but also it's loading rate. In addition, cultivation method strongly affect the microbial community structures of DAMO cultures. Further, in the step of DAMO reaction using nitrate, nitrate reduction to nitrite could be the late limiting steps.

研究分野：土木環境システム

キーワード：メタン 排水処理 温室効果ガス 脱窒 細菌 古細菌

## 1. 研究開始当初の背景

近年、嫌氣的メタン酸化反応の電子受容体として、亜硝酸および硝酸を用いて脱窒を行う新規な微生物が発見された。この嫌氣的メタン酸化脱窒微生物は、NC10 門に属する細菌であり、脱窒経路において、強温室効果ガスの亜酸化窒素を放出しないことが示唆されている。したがって、本微生物を用いた窒素除去プロセスは、温室効果ガスの削減に寄与した新規脱窒処理になり得る可能性を秘めている。しかしながら、嫌氣的メタン酸化脱窒微生物は、増殖が非常に遅く、難培養微生物であるため、窒素除去プロセスへの応用は難しいのが現状である。また、嫌氣的メタン酸化脱窒システムの開発を目指した連続処理に関する知見も乏しい状況にある。

## 2. 研究の目的

本研究では、嫌氣的メタン酸化脱窒微生物による新規窒素除去システムの開発を最終目標とし、まずは、嫌氣的メタン酸化脱窒リアクターの構築および連続運転を行い、基質中の電子受容体濃度、微量元素濃度を変化させ培養への影響を評価し、最適な培養条件の検討などの、本微生物の窒素除去プロセスに関する基礎的知見を収集した。また、反応に関与する微生物群の推定を目的として、リアクター内の微生物叢解析を行った。

さらに本研究では下降流懸垂型スポンジ担体 (DHS) リアクターを用いた嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養方法に着目した。DHS リアクターは気液接触率、微生物保持性能共に高いためメタンを用いて反応を行う嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の反応に適していることが予想される。さらに、嫌氣性処理を組み合わせることで、回収されるメタンを用いて脱窒が可能となることから、外部からの有機物供給を必要としない効率的な下水処理システムとなることが期待される。実験では 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脱窒装置の開発を目的に、DHS リアクターによる嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 集積培養

嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の集積培養に用いたリアクターは容積  $255\text{ cm}^3$ 、高さ 130 mm の円筒型のガラスカラムで構成し、中には汚泥保持担体としてスポンジを配置した。リアクターにはクローン解析により NC10 の存在が確認された水田土壌を植種源として用いた。

培地は既報の無機合成培地を用い、一方のリアクターには亜硝酸のみ、もう一方には硝酸のみを電子受容体として添加した。それぞれの系での電子受容体の濃度は  $0.5\text{ mM}$  から  $1.0\text{ mM}$  に段階的に増加させた。基質はアルゴンでパージし嫌氣状態にしたのち、メタンを溶存させた。この基質は滞留時間 (HRT) を 4

時間として流量  $1\text{ ml/min}$  でリアクターに流入させた。

### (2) 基質条件の検討

基質組成は電子受容体濃度、銅濃度、ピロキノリンキノン (PQQ) 添加の有無を変化させ、窒素消費速度の変化を観察した。はじめに電子受容体濃度による影響を評価するため、それぞれ供給する電子受容体濃度を  $0.5\text{ mM}$  から  $1\text{ mM}$  まで段階的に上昇させた。このとき銅濃度は  $1.0\text{ }\mu\text{M}$  で固定した。次に微量元素による影響を評価するため、電子受容体濃度を  $0.8\text{ mM}$  で固定し、銅濃度を  $1.0\text{ }\mu\text{M}$ 、 $6\text{ }\mu\text{M}$ 、 $12\text{ }\mu\text{M}$  と段階的に上昇させた。次に PQQ を  $2\text{ }\mu\text{M}$  の濃度で添加し培養を行った。PQQ は酸化還元補酵素であり、嫌氣的メタン酸化脱窒反応の活性を上昇させることが報告されている。

### (3) DHS リアクターによる嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養

DHS リアクターによる嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養では、容積  $1250\text{ cm}^3$  の円筒形ガラスカラム内部に汚泥保持担体として、 $2\text{ cm}\times 2\text{ cm}\times 2\text{ cm}$  のスポンジを 15 個直列に吊した。植種源には、嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養系より採取した汚泥を使用した。基質は既報の無機合成培地を用い、窒素源として亜硝酸および硝酸をそれぞれ  $0.5\text{ mM}$  の濃度で添加した後、アルゴンでパージを行い嫌氣状態にした。メタンは運転 178 日までは基質に溶存させ、以降はガスバックにメタンガスを封入後、 $2.0\text{ ml/min}$  の速度でリアクター内に流入させた。

### (4) 分析方法

培養への影響の評価は窒素消費速度を比較することで行った。窒素除去率及び窒素消費速度は培養装置の流入水、流出水中の亜硝酸・硝酸態窒素濃度より算出した。亜硝酸・硝酸態窒素濃度の測定は高速液体クロマトグラフ (SPD-10A, Shimadzu) を用いて行った。

微生物叢解析に用いた汚泥は、リアクターより採取した。PCR-cloning は、嫌氣的メタン酸化脱窒微生物である NC10 細菌の 16S rRNA 遺伝子および *pmoA* 遺伝子を標的としたプライマーセットを用いて行った。FISH 法による解析は、NC10 細菌および全細菌、全古細菌をそれぞれ標的とした蛍光標識 DNA プロブを用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) ガラスカラムリアクターによる集積培養結果

Fig. 1 に培養 108 日までの亜硝酸及び硝酸消費速度の経日変化を示す。両リアクターにおいて亜硝酸及び硝酸が消費されていることが確認された。また、硝酸を添加したリアクターにおいて窒素負荷を増加させるほど

硝酸消費速度が増加することが確認された。一方、亜硝酸を添加したリアクターにおいては亜硝酸濃度を 0.5 mM から 1.0 mM まで増加させたが、窒素消費速度の増加はあまり見られなかった。

### (2) FISH 法による連続培養サンプルの解析

FISH 法により連続培養リアクターの NC10 門に属する細菌の検出を行った。その結果を Table. 1 に示す。両リアクターにおいて NC10 門に属する細菌が優占的に存在していた。よって、連続培養リアクターでの嫌氣的メタン酸化と脱窒反応は NC10 門に属する細菌によるものであることが示唆された。

いずれのリアクターにおいても培養前と培養後 108 日後のサンプルで、検出される NC10 門の微生物の種類が異なった。亜硝酸を添加したリアクターの培養前のサンプルにおいては、DBACT-0447 及び NC10-1162 プロブで約 1  $\mu\text{m}$  の桿菌が検出された。それに対して亜硝酸態窒素濃度が 1.0 mM のときは DBACT-0193 でのみ標的微生物が観察された。一方、硝酸を添加したリアクターの培養前のサンプルにおいては、DBACT-0193 プロブでのみ標的微生物が検出された。それに対して、硝酸態窒素濃度が 1.0 mM のときは DBACT-0193, DBACT-0447, NC10-1162 すべてのプロブにおいて標的微生物が検出された。

以上の結果から、培養される嫌氣性メタン酸化脱窒微生物の優占種は添加される電子受容体の種類だけではなく、その負荷量の違いによる影響を受けることが示唆された。

### (3) 基質条件の検討結果

基質中の銅濃度と窒素消費速度の関係を Fig. 2 に示す。まず、電子受容体として亜硝酸を供給した培養系において、基質中銅濃度を 1.0  $\mu\text{M}$  から 6.0  $\mu\text{M}$  に上昇させたとき、窒素消費速度は  $2.1 \pm 0.13 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$  から  $3.0 \pm 0.038 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$  に上昇した。また、銅濃度を 6.0  $\mu\text{M}$  から 12  $\mu\text{M}$  まで上昇させたとき、窒素消費速度は  $3.0 \pm 0.038 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$  から  $2.0 \pm 0.038 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$  に減少した。このことより、銅の添加は亜硝酸の嫌氣的メタン酸化脱窒反応を促進するが、12  $\mu\text{M}$  の銅の添加は反応を阻害することが示唆された。

次に、電子受容体として硝酸を供給した培養系において、基質中銅濃度を 1.0  $\mu\text{M}$  から 6.0  $\mu\text{M}$  に上昇させたとき、窒素消費速度は  $1.8 \pm 0.13 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$  から  $2.2 \pm 0.071 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$  に上昇した。この硝酸の窒素除去速度の上昇量は亜硝酸の窒素除去速度の上昇量の半分以下であった。これは硝酸から亜硝酸への脱窒反応が律速段階となっているためだと考えられる。Haroon らによると、硝酸の嫌氣的メタン酸化脱窒反応経路は脱窒反応から始まり、*M. nitroreducens* という古細菌により硝酸は亜硝酸へ脱窒される。その後の嫌氣的

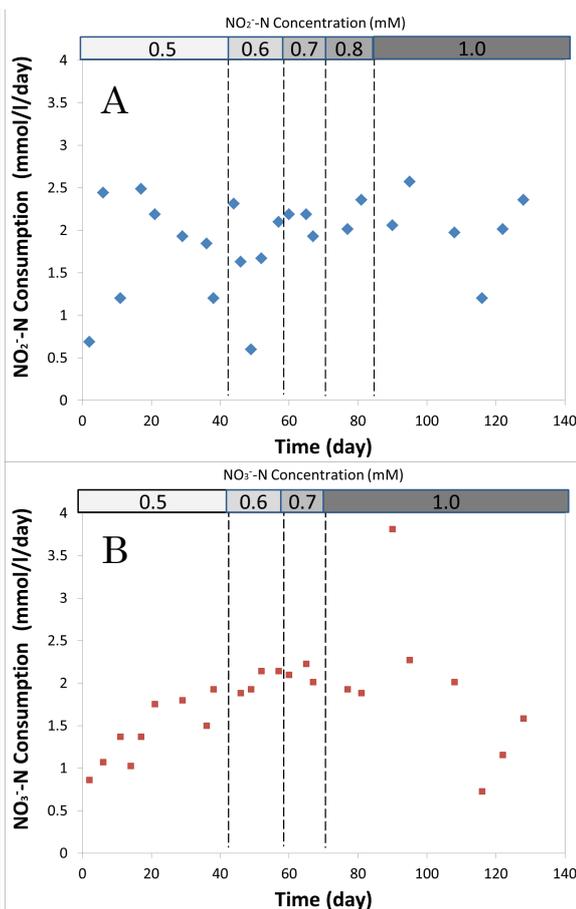


Fig.1 Time course of nitrite (A) and nitrate (B) consumption rate.

Table.1 Detection result of NC10 from the continuous culture reactor by FISH (○: detected, -: not detected)

Probe	Electron acceptor			
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	
	Day 0	Day 105	Day 0	Day 105
DBACT-0193	-	○	○	○
DBACT-0447	○	-	-	○
NC10-1162	○	-	-	○

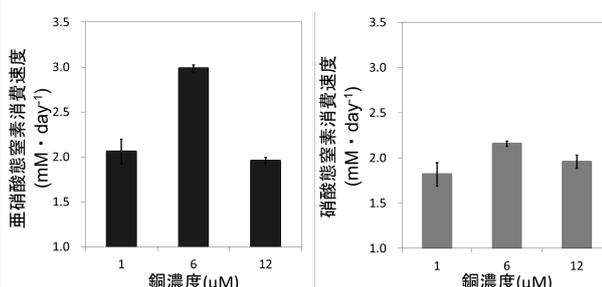


Fig.2 基質中銅濃度と窒素消費速度の関係

メタン酸化脱窒反応は、亜硝酸の嫌氣的メタン酸化脱窒経路と同様の経路をたどる。本実験より亜硝酸からの嫌氣的メタン酸化脱窒反応は銅の添加により促進されることが確認された。したがって、硝酸の嫌氣的メタン酸化反応は *M. nitroreducens* による硝酸から亜硝酸への脱窒反応が律速段階であるこ

とが示唆された。

基質中の PQQ 濃度と窒素消費速度の関係を Fig. 3 に示す。PQQ を添加したとき、電子受容体として亜硝酸を供給した培養系において、窒素消費速度は  $1.5 \pm 0.28 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$  から  $3.2 \pm 0.13 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$  に上昇した。次に、電子受容体として硝酸を供給した培養系においては、窒素消費速度が  $1.7 \pm 0.15 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$  から  $1.8 \pm 0.14 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$  となり、窒素消費速度の上昇はほとんど見られなかった。このことより、PQQ は銅と同様に亜硝酸の嫌氣的メタン酸化脱窒反応を促進することと、硝酸の嫌氣的メタン酸化脱窒反応において、硝酸から亜硝酸への脱窒反応が律速段階であることが示唆された。

#### (4) DHS リアクターによる嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養

リアクター流入出の亜硝酸及び硝酸態窒素濃度、双方の除去率の経日変化を Fig. 4 に示す。本実験では、亜硝酸および硝酸を添加した期間を Phase1、硝酸のみを添加した期間を Phase2 とした。

Phase1 では、運転 30 日頃から、リアクター流出水の亜硝酸態窒素濃度の減少が大きくなり、運転 40~300 日までの亜硝酸除去率の平均は  $73.9 \pm 15.6\%$  と長期間にわたり高い除去率を示した。一方、流出水の硝酸態窒素濃度は、運転 200 日以降から徐々に減少する傾向が見られたものの、硝酸除去率が最も高かった運転 206 日から 300 日までの平均値は  $30.4 \pm 8.3\%$  と亜硝酸除去率の 4 割程度であった。そのため、リアクター内では、既報の嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養系と同様に亜硝酸を優先的に除去することが示唆された。続いて、リアクターの流入出メタンガス濃度を測定した結果、投入した窒素源の減少に伴うメタンガス濃度の減少を確認した。亜硝酸および硝酸を電子受容体として利用する嫌氣的メタン酸化反応は、亜硝酸を用いた場合、 $\text{NO}_2^- : \text{CH}_4 = 2.7 : 1$ 、硝酸を用いた場合、 $\text{NO}_3^- : \text{CH}_4 = 1.6 : 1$  で反応が進行すると考えられている。本リアクターにおいて、メタン酸化および窒素除去が安定的に行われた運転 264 日から 298 日までのメタン酸化速度および亜硝酸・硝酸除去速度の平均を算出した結果、それぞれの平均値は、 $\text{CH}_4 = 2.74 \pm 0.82$ 、 $\text{NO}_2^- = 4.30 \pm 0.30$ 、 $\text{NO}_3^- = 1.56 \pm 0.16 \text{ (mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1})$  となり、メタン酸化速度は、双方の窒素除去速度および化学量論比から算出した理論値  $2.58 \text{ (mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1})$  と近い値を示した。そのため、リアクター内では、嫌氣的メタン酸化脱窒反応の進行が推測され、同時に、嫌氣的メタン酸化脱窒リアクターの構築は可能であることが示唆された。一方、メタン酸化速度の実測値は理論値よりもやや高い傾向が見られた。したがって、リアクター内では、本反応以外にメタンが消費されている可能性も考えられた。

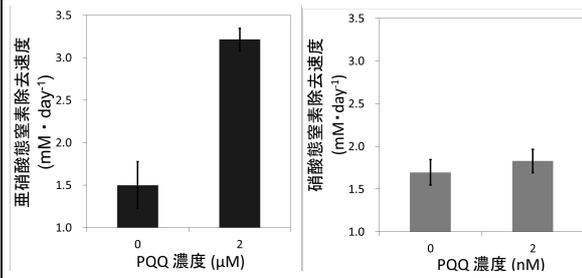


Fig.3 PQQ 濃度と窒素消費速度の関係

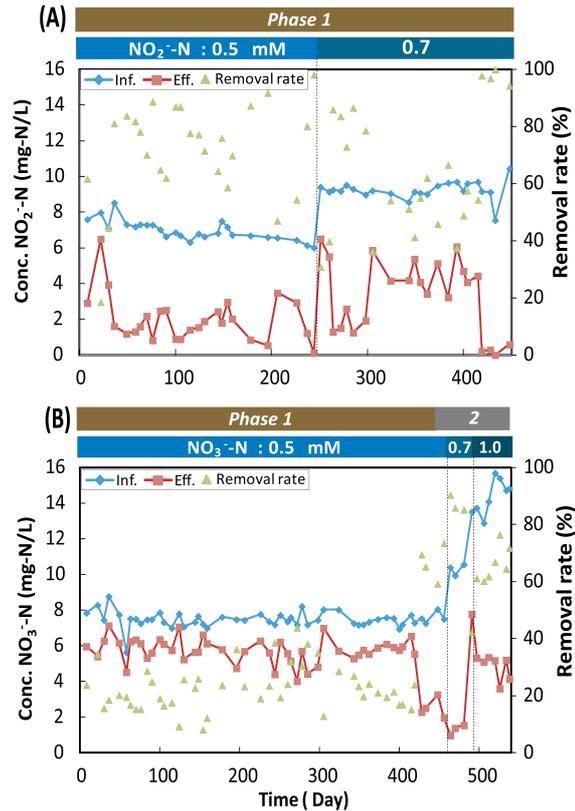


Fig.4 リアクター流入出の亜硝酸・硝酸態窒素濃度および除去率の経日変化。(A)は亜硝酸、(B)は硝酸を示す。

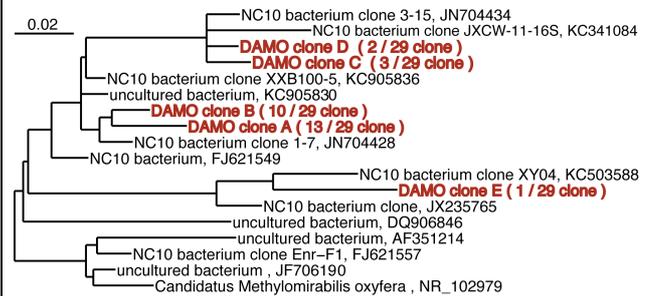


Fig.4 16S rRNA 遺伝子に基づいた NC10 門に属する細菌の系統樹

亜硝酸除去率がおおよそ 97% と非常に高かった運転 420~450 日 (Phase1) において、硝酸除去率が徐々に上昇する傾向が見られた。そこで、Phase2 よりリアクターに硝酸のみを添加して運転を行ったところ、流出水の

硝酸態窒素濃度は Phase1 と比較して顕著に減少する傾向が見られた。さらに、この期間(運転 460~530 日)の硝酸除去率の平均値は、72.6 ± 10.8 % まで上昇し、Phase1 における硝酸除去率の平均値の約 2 倍高い値を示した。したがって、硝酸のみを添加した Phase2 では、嫌氣的メタン酸化脱窒微生物が亜硝酸の枯渇に伴い硝酸を利用する可能性が考えられた

リアクターの上部と下部の 2 カ所のスポンジ担体よりそれぞれ汚泥を採取し、その汚泥内の微生物叢解析を行った。NC10 細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-cloning では、リアクター上部のみで PCR 増幅が成功し、下部の汚泥から増幅産物が得られなかった。リアクター上部の汚泥から得られたクローン配列は、5 つの OTU に分類され、それらの OTU 全てが NC10 門に属することが確認された (Fig. 5)。また、それらのクローン配列は、水田土壌から得られた NC10 細菌の配列 (JN704440) や河川の堆積物から得られた配列 (KC50358) と近縁であった。一方、NC10 細菌の *pmoA* 遺伝子を標的とした PCR-cloning でも、16S rRNA 遺伝子と同様にリアクター上部のみで DNA 増幅が確認された。リアクター上部からは、4 種類の *pmoA* 遺伝子が検出され、それらのクローン配列は、既知の NC10 細菌の *pmoA* 遺伝子配列と高い相同性を示した。さらに、本実験で得られ 16S rRNA 遺伝子および *pmoA* 遺伝子のクローン配列は、嫌氣的メタン酸化脱窒反応を担うことが明らかになっている *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* の双方の遺伝子配列ともそれぞれ 90~93% の相同性であった。したがって、リアクター内では NC10 門に属する嫌氣的メタン酸化脱窒微生物が反応に関与している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ①□ Hatamoto M., M. Kimura, T. Sato, M. Takahashi, S. Kawakami, N. Araki, and T. Yamaguchi. Enrichment of denitrifying methane-oxidizing microorganisms using up-flow continuous reactors and batch cultures. PLOS ONE. 9 (12), e115823. doi:10.1371/journal.pone.0115823, 2014

[学会発表] (計 11 件)

- ①□ 根本 笙, 幡本将史, 山口隆司, 嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の最適な培養条件の検討と DHS リアクターへの適用, 第 50 回日本水環境学会年会, 徳島, 2016 年 3 月 16 日
- ②□ 根本 笙, 佐藤 崇文, 幡本将史, 山口隆司, 嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の集積培養と脱窒活性に与える基質

組成の影響, 平成 27 年度土木学会全国大会 第 70 回年次学術講演会, 岡山, 2015 年 9 月 16 日

- ③□ T. Sato, M. Hatamoto, A. Nakamura and T. Yamaguchi. Cultivation of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms using continuous sponge bioreactor. The 5th Taiwan-korea-Japan International Symposium on Microbial Ecology, Jhongle, Taiwan, Oct. 31-Nov. 2, 2013
- ④□ M. Hatamoto, M. Koizumi, T. Sato, M. Kimura, M. Takahashi, S. Kawakami, T. Yamaguchi. Enrichment and molecular analysis of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms using continuous and batch cultures. 13th World Congress on anaerobic Digestion, Santiago de Compostela, Spain, June 25-28, 2013

[その他]

ホームページ等

<http://www.nagaokaut.ac.jp/j/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 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