

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12225

研究課題名(和文)嫌気的メタン酸化脱窒微生物を用いた温室効果ガス大気放散ゼロ脱窒プロセスの開発

研究課題名(英文) Development of novel zero-GHG emission denitrifying process using denitrifying methane-oxidizing microorganisms.

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究課題では、嫌気性アンモニア酸化(アナモックス)反応と嫌気的メタン酸化脱窒(DAMO)反応を組み合わせた新規リアクターの開発を目的としてアナモックス細菌とDAMO微生物の共培養リアクターにおける窒素除去性能の評価を行った。実験の結果、共培養リアクターによりアンモニアと硝酸の同時除去が可能であることがわかったが、嫌気性メタン酸化脱窒微生物の亜硝酸生成反応が律速となっている可能性が示唆された。また、ガス成分の分析結果からN<sub>2</sub>Oが発生していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, anaerobic ammonium oxidation (anammox) and denitrifying anaerobic methane oxidation (DAMO) reaction were used for development of nitrogen removal process. Using the both microorganisms in continuous flow reactor or down-flow hanging sponge (DHS) reactor, both of reactor system could be removed the ammonia and nitrate simultaneously with methane as a carbon source. The consumed methane quantities were stoichiometrically close to the theoretical value in DAMO reaction suggested that DAMO reaction was occurred in our continuous culture. However, ammonia removal rate was lower than that of original anammox reactor, which is assumed that the nitrate reduction to nitrite by DAMO microorganism is rate-limiting step. In addition, nitrous oxide gas could be detected in the reactor. Thus, further research require more careful monitoring for relationship between green gas house emission and operational condition.

研究分野：環境工学

キーワード：メタン 脱窒 温室効果ガス 亜酸化窒素 水処理 微生物

### 1. 研究開始当初の背景

廃水中からの窒素除去法として嫌気性アンモニア酸化 (アナモックス) 反応と嫌気的メタン酸化脱窒 (DAMO) 反応が近年注目されている。アナモックス反応はアンモニアを電子供与体として用いて亜硝酸塩を還元する反応である。嫌気性メタン酸化微生物は、メタン酸化反応の電子受容体として硫酸や亜硝酸・硝酸を用いる微生物である。また通常の脱窒反応における中間代謝物である温室効果ガスの亜酸化窒素 ( $N_2O$ ) を経由しない新奇な脱窒代謝経路を保持していることとして、世界的に注目されている新奇な微生物である。この DAMO 反応には硝酸塩の還元で古細菌 (DAMO アーキア)、亜硝酸塩の還元で NC10 門に属する細菌 (DAMO バクテリア) の 2 種類の微生物群が関わっていると報告されている。

近年、環境に配慮した新たな窒素除去システムとしてこの 2 つの反応を組み合わせるシステムが提案された。アナモックス反応と DAMO 反応を組み合わせた脱窒システムは溶存メタン及び二酸化炭素の排出の低減や、制御の難しい部分硝化を必要としないこと等が利点として挙げられている。加えて、本システムはアンモニアと硝酸の同時除去が期待できる。

### 2. 研究の目的

上述のようにアナモックス反応と DAMO 反応を組み合わせた反応が提案されているが、メタンガスの大気放散防止などは考慮されておらず、実用化へ適したリアクターシステムは開発されていない。そこで、本研究ではアナモックス反応と DAMO 反応を組み合わせた新規リアクターの開発を目的としてアナモックス細菌と DAMO 微生物の共培養リアクターにおける窒素除去性能の評価を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 上昇流式リアクター方式による培養

アナモックス細菌と DAMO 微生物の培養は容積  $255 \text{ cm}^3$  の円筒形の上向流式リアクターによって行った。リアクターの水理的滞留時間 (HRT) は 4 時間、培養温度は  $35^\circ\text{C}$  に設定し、基質は無機培地を用いた (表-1)。アナモックス細菌の培養には窒素源として  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  と  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  を  $20 \text{ mg-N/L}$  で供給し、DAMO 微生物の培養には  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  を  $11 \text{ mg-N/L}$ 、メタンガスを基質にパージして供給した。共培養リアクターは DAMO 汚泥とアナモックス汚泥を 1:1 で混合して上記と同様のリアクターを用いて連続運転を行った。共培養リアクターに供給する  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  と  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  はそれぞれ  $20 \text{ mg-N/L}$  に設定した。基質はアルゴンでパージを行った後、メタンでパージし還元剤を投入してリアクターに供給した。脱窒活性は各リアクターの窒素除去率より算出した。 $\text{NO}_3^-\text{-N}$  と  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  濃度は高

速液体クロマトグラフィー (SPD-10A, Shimadzu) を用いて測定した。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  濃度はネスラー試薬を用いた吸光度測定 (DR2800, HACH) により測定した。また、アナモックスリアクターは還元剤を用いていなかったが、DAMO リアクターは還元剤を用いて運転していた。そこで、後に汚泥を混合することを考えて還元剤の有無によるそれぞれの反応への影響評価を行った。アナモックスリアクターは運転 30 日目から還元剤を投入し、DAMO リアクターは運転 40 日目から還元剤の投入を停止し実験を行った。

汚泥からの DNA 抽出には FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を使用し、16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR 増幅をしたのち MiSeq (イルミナ社) を用いてシーケンス解析を実施した。

#### (2) スポンジ担体リアクター方式による培養

スポンジ担体リアクターを用いた集積培養の植種源には、嫌気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。嫌気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  $8.47 \text{ L}$  投入したカラム容積  $14.1 \text{ L}$  のスポンジ担体リアクターを用いた (図-1)。基質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  $20 \text{ mg-N/L}$  の濃度で添加した後、メタンでパージを行い無酸素状態にした。DHS リアクターの運転条件は温度  $35^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH} 7.5 \sim 8.0$ 、HRT を 6~24 時間と設定した。

$\text{N}_2\text{O}$  濃度の計測には ECD 検出器を設置したガスクロマトグラフ (GC-2014, Shimadzu) を用いて測定した。その他の分析方法は上述 (1) と同様とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 上昇流式リアクター方式による培養

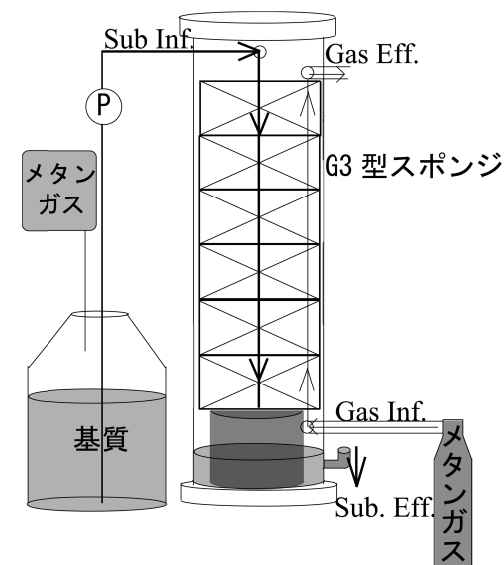


図-1 実験に用いたスポンジ担体リアクターの概略図

本研究ではまず、アナモックスリアクターと DAMO リアクターの培養を 97 日間行った。アナモックスリアクターは全運転期間を通して  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  除去率  $75\pm 14\%$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  除去率 99% 以上、DAMO リアクターにおいては全運転期間を通して  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  除去率  $41\pm 5\%$  であった。また、2 つのリアクターは後に汚泥を混合することを考えて還元剤の有無による影響を確認した。まず、アナモックスリアクターは運転 30 日目から還元剤を投入した。その結果、亜硝酸の除去率の変化はほとんど見られなかったが、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  の除去率は徐々に低下し、運転 58 日目から 97 日目で  $59\pm 8\%$  と安定した。DAMO リアクターは還元剤の停止により硝酸除去率は 10% 以下まで低下したが、還元剤の再投入により除去率は  $41\pm 6\%$  にまで回復した (図-2)。これらの結果より共培養リアクターでは還元剤を投入することとした。還元剤の影響を確認した後、それぞれの汚泥を混合し共培養リアクターの運転を開始した。共培養リアクターの  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  と  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  の除去率は運転 50 日目までにそれぞれ  $47\pm 9\%$ 、 $17\pm 4\%$  であった。また、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  は流出水において検出されなかった。運転開始 50 日間の共培養リアクターの  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  除去率はアナモックスリアクターの除去率と比較して約 60% 低かった。その原因は、共培養リアクター内では  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  に対して DAMO 微生物とアナモックス細菌による競合が起きていたことが考えられる。そこで、共培養リアクターの  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  の除去が全てアナモックス反応によるものと仮定し、除去された  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  が全て DAMO アーキアにより  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  となったと仮定した場合、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$  はアナモックス反応経路により 37%、DAMO 反応経路により 63% が消費されると計算できる。したがって、DAMO アーキアにより生成された  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  の消費に対し 2 は DAMO 反応に優位性があることが示唆された。また、アナモックス反応への  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  濃度の影響を調査するために、共培養リアクターに供給する基質を一時的に  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  から  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  に変えて実験を行った。すると、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$  の除去率は変更した 2 日後に  $47\pm 4\%$  に上昇した。したがって、アナモックス反応の低下の原因の一つとしてアナモックス細菌への  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  の供給不足が考えられた。

共培養リアクターの汚泥と植種元の汚泥

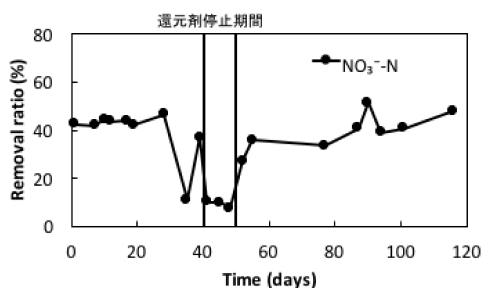


図-2 DAMO リアクターに対する還元剤の影響

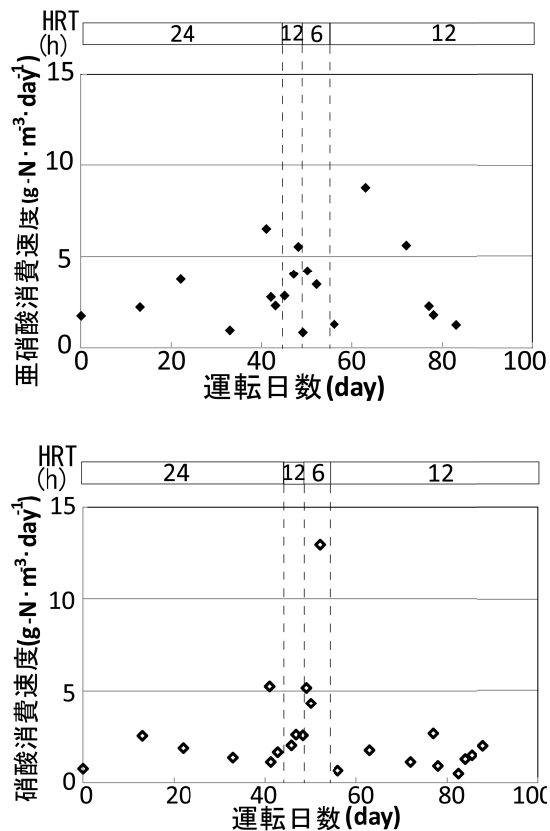


図-3 DHS リアクターにおける硝酸・亜硝酸消費速度の経日変化

表-1 各 HRT における DHS リアクターの窒素消費速度

窒素源	HRT [h]	消費速度 [g-N·m <sup>-3</sup> ·day <sup>-1</sup> ]
硝酸	6	7.5±4.8
	12	2.3±0.4
	24	2.7±2.2
亜硝酸	6	2.9±1.8
	12	4.2±1.4
	24	3.9±2.3

について微生物解析を実施した。その結果、アナモックスリアクターでは *Planctomycetes* 門の *Kuenenia* 属微生物がアナモックス微生物では主要なものであった。その一方で、共培養リアクターでは、アナモックスリアクターと異なり、*Kuenenia* だけではなく *Ca. Brocadia* や *Ca. Jettenia* も検出され培養条件の違いによって微生物群集が変化していることが確認できた。

## (2) スポンジ担体リアクター方式による培養

スポンジ担体リアクターの硝酸・亜硝酸消費速度の経日変化を図-3 に示す。培養開始直後よりスポンジ担体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、スポンジ担体リアクターでは嫌氣的メタン酸化

脱窒反応が起きていることが示唆された。培養約 40～60 日目にかけてスポンジ担体リアクターの HRT を短縮することによる窒素消費速度の増加を試みた。培養 40～60 日目までのスポンジ担体リアクターの各 HRT における平均窒素消費速度を表-1 に示す。その結果、スポンジ担体リアクターの亜硝酸消費速度は HRT12 時間まで短縮すると増加する(平均  $4.2 \pm 1.4 \text{ g-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ ) 傾向を示し、HRT を 6 時間まで短縮すると減少する(平均  $3.9 \pm 2.3 \text{ g-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ ) 傾向が示唆された。また、スポンジ担体リアクターの硝酸消費速度は HRT6 時間で増加する(平均  $7.5 \pm 4.8 \text{ g-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ ) 結果を示した。スポンジ担体リアクターの最大硝酸消費速度は  $13 \text{ g-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ 、最大亜硝酸消費速度は  $8.8 \text{ g-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$  を示した。Juan ら<sup>1)</sup>は本研究と類似した Biotrickling Filter (BTF)リアクターを用いて硝酸のみを添加して嫌氣的メタン酸化脱窒微生物を集積培養した結果、培養 3.8 ヶ月目で最大硝酸消費速度は  $16.3 \text{ g-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$  を示したと報告している。本研究でも、培養 3 ヶ月で硝酸、亜硝酸を同時に添加した条件でほぼ同様の硝酸除去速度を達成できており、スポンジ担体リアクターを用いたリアクターの処理効率の高さが確認できた。

培養 83 日目のスポンジ担体リアクターのガス組成を分析した。その結果、 $\text{N}_2\text{O}$  は検出され、その濃度は  $54.3 \pm 3.84 \text{ ppmv}$  であった。Zhu ら<sup>2)</sup>も嫌氣的メタン酸化脱窒反応を用いたリアクターにおいても少量の  $\text{N}_2\text{O}$  の発生を確認している。しかし、嫌氣的メタン酸化脱窒反応を用いたリアクターでの  $\text{N}_2\text{O}$  発生に関する知見が不足しており、今後はスポンジ担体リアクターの窒素負荷当たりの  $\text{N}_2\text{O}$  発生量を検討する予定である。また、スポンジ担体リアクター内のメタンガス濃度は  $93.8 \pm 0.1\%$  であり、スポンジ担体リアクターはメタンで気密されていることが確認された。

#### <引用文献>

- 1 ) López, J. C. et al., (2017) *Biotechnol. Bioeng.*, 114: 665–673.
- 2 ) Zhu *et al.*, *Water Research* (2016) 90, 203-215

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

M.Hatamoto, T.Sato, S.Nemoto, T.Yamaguchi. Cultivation of denitrifying anaerobic methane-oxidizing microorganisms in a continuous-flow sponge bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 査読有, 印刷中 doi: 10.1007/s00253 -017-8315-4.

〔学会発表〕(計 6 件)

吉田悠亮、根本笙、幡本将史、山口隆司 . ア

ナモックス反応と嫌氣的メタン酸化脱窒反応を組み合わせた窒素除去システムの性能評価 . 平成 28 年度土木学会全国大会 . 2016 年 9 月 9 日 . 仙台

M.Hatamoto, T.Sato, S.Nemoto, Y.Yoshida, T.Yamaguchi. Application of denitrifying methane-oxidizing microorganism for wastewater treatment using sponge bioreactor. 16<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology. 2016 年 8 月 25 日 . Montreal.

吉田悠亮、根本笙、幡本将史、山口隆司 . 嫌氣的メタン酸化脱窒反応とアナモックス反応を組み合わせた窒素除去システムの検討と保持汚泥の微生物解析 . 第 50 回 日本水環境学会年会 . 2016 年 3 月 18 日 . 徳島

〔その他〕

ホームページ等

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

#### 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・産学融合特任准教授

研究者番号 : 20524185

##### ( 2 ) 研究分担者

山口 隆司 (YAMAGUCHI Takashi)

長岡技術科学大学・工学研究科・教授

研究者番号 : 10280447