

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26701009

研究課題名(和文) N原子と電子フローに着目したアンモニア酸化細菌のN₂O生成機構解明と診断技術構築研究課題名(英文) Elucidating N₂O production mechanisms by ammonia-oxidizing bacteria based on nitrogen atoms and electron flows

研究代表者

寺田 昭彦 (Terada, Akihiko)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30434327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,800,000円

研究成果の概要(和文)：高い温室効果とオゾン層破壊能を有する亜酸化窒素(N₂O)の削減が強く求められている。本研究では、排水の窒素除去を省エネで行える部分硝化プロセスによって排出されるN₂Oの生成経路解明に取り組んだ。複雑な生成経路の解明に向け、¹⁵Nトレーサー法を用いて、異なる分子量を有するN₂Oの解析を行ったところ、部分硝化バイオリアクターからのN₂O生成経路は複数あり、ヒドロキシルアミンと亜硝酸が反応するハイブリッド反応が起こることを明らかにした。また、この反応が非生物学的にも起こりうることを示し、モデルを構築した。さらに、溶存酸素濃度により複数のN₂O生成経路の分配は大きく異なることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mitigation of nitrous oxide (N₂O), known as a highly-potent greenhouse gas and ozone-depleting substance, is demanded. This study elucidated production pathways of N₂O emitted during partial nitrification (PN) as a promising technology to removal nitrogen from wastewater in a cost-effective way. To unveil intricate N₂O production pathways during PN, mainly mediated by ammonia-oxidizing bacteria, a ¹⁵N tracer method was employed, capable of measuring N₂O isotopologues. The application of the method to batch tests for PN demonstrated that N-nitrosation hybrid reaction, coupling hydroxylamine with nitrite, mainly occurred in a PN bioreactor. This hybrid reaction was likely to occur also via an abiotic reaction, which has been incorporated into a new N₂O production model. Furthermore, the experiment on dissolved oxygen (DO) effect on N₂O production and pathways underpinned that proportions of N₂O production pathways vary depending on DO concentrations.

研究分野：環境バイオテクノロジー

キーワード：亜酸化窒素 アンモニア酸化細菌 部分硝化 ¹⁵Nトレーサー 省エネ型排水処理 窒素除去 ハイブリッド反応 ヒドロキシルアミン

1. 研究開始当初の背景

亜酸化窒素 (N₂O) は二酸化炭素の約 300 倍の温室効果を有する温室効果ガスである。また、オゾン層破壊物質としても知られていることから、排出量の削減が強く求められている。1990 年代では排水処理施設における生物処理からの N₂O 排出量は産業界全体の 5% 以下であり、排水処理施設からの N₂O 削減の必要性に関しては大きな注目を集めてこなかった。その一方で、近年はこのような考え方の見直しが行われている。この見直しは嫌気性アンモニア酸化細菌 (アナモックス細菌) を用いた新規窒素除去経路の発見と、それを用いたプロセス開発に代表される排水中の窒素除去の省エネ化・低コスト化の進展に大きく関与している。このアナモックス細菌を用いた窒素除去プロセスは、第一段階としてアンモニアを部分的に亜硝酸に変換する部分硝化プロセスが必要である。この部分硝化プロセスは、多量の N₂O を排出することが確認されており、健全な窒素除去と温室効果ガス排出量削減に向け、窒素除去プロセスの省エネ化と N₂O 排出量の削減を同時に達成することが求められている。

N₂O 排出量削減に向け、複雑な N₂O 生成経路を明らかにし、体系的な評価を行うことがまずは必要となる。部分硝化プロセスはアンモニアを亜硝酸に酸化可能な独立栄養性のアンモニア酸化細菌 (AOB) が N₂O 生成に大きく関わっている。しかしながら、この AOB による N₂O 生成の詳細なメカニズムについてはまだ完全に明らかにされていない。また、AOB などの微生物による生化学的な N₂O の生成に加え、金属と窒素化合物との相互作用による非生物学的な N₂O 生成も否定できない。このような複雑な生成経路を紐解くことが、N₂O 削減技術の第一歩として重要になってきている。これらの課題を解決するために自然同位体比を用いた N₂O 生成経路の解明が精力的に展開されているものの、上述した複数経路の解明には新たなアプローチが必要となっている。

2. 研究の目的

以上の観点を鑑み、本研究では安定同位体である ¹⁵N トレーサーを用いることにより、N₂O の生成経路解明に取り組んだ。特に、AOB による N₂O 排出量が非常に大きな寄与

を占める部分硝化リアクターからの N₂O 生成経路の解明を目指した。具体的には、以下の 5 つの項目に取り組んだ。

- (1) N₂O 生成経路解明のためのシステムティックス構築
- (2) 部分硝化リアクターからの N₂O 生成機構の解明
- (3) 非生物学的な N₂O 生成の関与の検討
- (4) N₂O 生成機構のモデル構築とシミュレーション
- (5) 部分硝化リアクターの溶存酸素 (DO) 濃度が N₂O 生成経路に及ぼす影響評価

3. 研究の方法

(1) N₂O 生成経路解明のシステムティックスの解明

¹⁵N トレーサー法を用いた N₂O 生成経路解明に向け、測定系の確立を行った。部分硝化リアクターで生成する N₂O の同位体比をオンラインで測定可能な連続観測システムを構築した。溶存態 N₂O と一酸化窒素 (NO) のマイクロセンサー、pH、DO、温度センサーを投入した。さらに、分子量 44、45 の N₂O や同位体比情報を追跡可能な N₂O 同位体比アナライザーを接続して、排気ガスの N₂O の起源に関する情報を追跡可能なシステムを新たに構築した。

(2) 部分硝化リアクターからの N₂O 生成機構の解明

8.4 L の回分式部分硝化リアクターで集積したバイオマスを用いて N₂O 生成機構の解明を行った。このバイオマス中には常に約 8 割の AOB が集積されている。これまでの知見から、部分硝化法において生成する N₂O は 3 つの経路に集約することができる (図 1)。

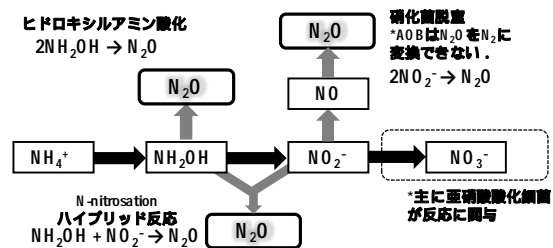


図 1 AOB が関与する 3 つの N₂O 生成経路

これらの経路は、アンモニア酸化の反応中間体であるヒドロキシルアミン (NH₂OH) の化学反応も

しくは生化学的反応によって N_2O が生成するヒドロキシルアミン酸化, 部分硝化の生成物である NO_2^- 2 分子が AOB により N_2O に変換される脱窒経路(硝化菌脱窒), および NO_2^- と NH_2OH の反応によって N_2O が生成する経路(N-nitrosation ハイブリッド反応), の3つである.

N_2O 生成経路同定に向けた検討は, リアクターの回分操作により行った. 半回分式部分硝化リアクターを想定し NO_2^- および $^{15}NH_4^+$ の初濃度がそれぞれ 400 mg-N/L, 200 mg-N/L になるように調整し, 15 分間攪拌を行った. その後, 空気量一定で曝気を開始した. アンモニア酸化反応により pH が 7.5 より低くなった際は炭酸水素ナトリウムを添加することにより pH を調整し, pH が 7.5 付近になるように制御した. 得られた水質 (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) に関してはイオンクロマトグラフィーを用いた. また, 溶存態 N_2O , NO 濃度に関しては, マイクロセンサーを, ガス態 N_2O に関しては分子量 44, 45, 46 ($^{44}N_2O$, $^{45}N_2O$, $^{46}N_2O$) を四重極型 GC-MS を用いて評価を行った.

(3) 非生物学的な N_2O 生成の関与の検討

(2) の検討により N-nitrosation ハイブリッド反応の重要性が確認されたため, この反応が生物反応によるものかの検討を行った. まず, NO_2^- 400 mg-N/L を含む三角フラスコに AOB で集積されたバイオマスを投入する系と投入しない系を準備した. 次に, $^{15}NH_2OH$ を初濃度 10 mg-N/L になるように添加し, バイオマスの有無により N_2O の生成量がどのように異なるかを四重極型 GC-MS および N_2O 同位体比アナライザーにより測定した.

次に, 非生物学的な N-nitrosation ハイブリッド反応について評価した. 各三角フラスコに NO_2^- が 400 mg-N/L になるように溶液を調整した. さらに, 鉄, マグネシウム, 銅, 亜鉛などを含んだ微量元素を加えた. そこに $^{15}NH_2OH$ が初濃度で 10 mg-N/L になるように添加し, 溶存態およびガス態 N_2O 濃度のダイナミクスを四重極型 GC-MS および N_2O 同位体比アナライザーにて追跡した. また, 用意した金属イオンやミネラルを1つずつ除いて同様に試験を行い, N-nitrosation ハイブリッド反応を含めた複数の生成経路による N_2O 生成反応を促進・抑制させる金属やミネラルの同定を行った.

(4) N_2O 生成機構のモデル構築とシミュレーション

活性汚泥モデルをベースとした既往の N_2O モデルにおける課題を抽出するため, パラメータの不確実性が N_2O 生成予測にどのような影響を及ぼすか評価した. モンテカルロシミュレーションを行い, 特に N_2O 生成予測に影響を及ぼすパラメータを抽出した.

非生物学的な N-nitrosation ハイブリッド反応を組み込んだ新しい N_2O 生成モデルの構築を行った. N-nitrosation ハイブリッド反応および生物反応を考慮した N_2O 生成速度を表す式を以下に示す.

$$\frac{\delta C_{n2o}}{\delta t} = k_1 C_{nh2oh} C_{no2} - k_L a C_{n2o} + k_2 X \frac{C_{no}}{C_{no} + K_{no}} \frac{C_{nh2oh}}{C_{nh2oh} + K_{nh2oh}} \quad (式1)$$

C_{n2o} は溶存態の N_2O 濃度 [mg-N/L], C_{nh2oh} は NH_2OH 濃度 [mg-N/L], C_{no2} は NO_2^- 濃度 [mg-N/L], C_{no} は一酸化窒素 (NO) 濃度 [mg-N/L], C_{n2o} は N_2O 濃度 [mg-N/L] である. また, k_1 は二次反応速度定数 [L/mg-N/day], $k_L a$ は N_2O の総括移動容量係数 [1/day], k_2 は AOB による最大 N_2O 生成速度 [mg-N/mg-biomass/day], X は AOB 濃度 [mg-biomass/L], K_{no} は NO の半飽和定数 [mg-N/L], K_{nh2oh} は NH_2OH の半飽和定数 [mg-N/L] をそれぞれ示す. (3) で得る N_2O プロファイルより k_1 を算出し式1に適用した. また, (2) で得る回分試験における溶存態・ガス態 N_2O 濃度とシミュレーション結果を比較することにより, 提案するモデルの妥当性を評価した.

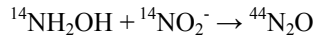
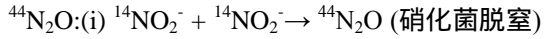
(5) 部分硝化リアクターの溶存酸素 (DO) 濃度が N_2O 生成経路に及ぼす影響評価

(1) および (2) で構築した N_2O 生成経路解明のシステムティクスを用い, 部分硝化リアクター内の DO 濃度の違いが N_2O 生成量および生成経路に及ぼす影響の評価を行った. 測定項目は, (2) で示した項目に加え, 比色法による NH_2OH 濃度を, 同位体比アナライザーを用いてガス態 N_2O 濃度および N の同位体比の評価を行った.

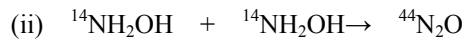
4. 研究成果

(1) N_2O 生成経路解明のシステムティクスの解明

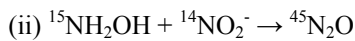
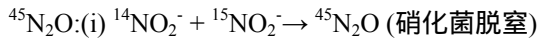
部分硝化リアクターおよびオンラインセンサーの設置により、 N_2O 濃度の追跡が可能になった。また、分子量 44,45,46 の N_2O が生成される際の N_2O 生成パターンを以下に示す化学式でまとめ、各生成経路からの N_2O 生成経路の割合を算出するための式を提案した。



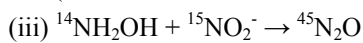
(N-nitrosation ハイブリッド反応)



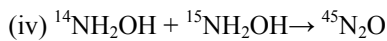
(ヒドロキシルアミン酸化)



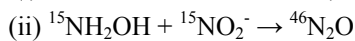
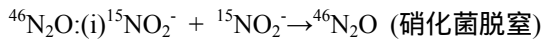
(N-nitrosation ハイブリッド反応)



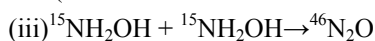
(N-nitrosation ハイブリッド反応)



(ヒドロキシルアミン酸化)



(N-nitrosation ハイブリッド反応)



(ヒドロキシルアミン酸化)

また、同位体アナライザーで測定できない $^{46}N_2O$ を溶存態 N_2O 濃度から予測するモデルを開発し、適用可能な条件の範囲を明らかにした。

(2) 部分硝化リアクターからの N_2O 生成機構の解明

回分試験において N_2O の各分子量 (44,45,46) の積算の生成量を解析したところ、 $^{45}N_2O$ の生成量が最も高くなった。(1) で構築した N_2O 生成経路の解明手法を用いて評価を行った結果、生成した N_2O の約 5 割が NH_2OH と NO_2^- の反応により N_2O が生成する N-nitrosation ハイブリッド反応によるものであることを示した。部分硝化リアクターからの N_2O 生成は、AOB による硝化菌脱窒およびヒドロキシルアミン酸化が主要な N_2O 生成経路であることが従来の知見であった。今回の成果により、N-nitrosation ハイブリッド反応が、条件によっては部分硝化リアクターにおける N_2O の主要な経路になることを示した。

(3) 非生物学的な N_2O 生成の関与の検討

N-nitrosation ハイブリッド反応が生物学的

もしくは非生物学的に生成するかを確認した結果、この反応は非生物学的に起こりうることを示した。バイオマスが存在している場合は、N-nitrosation ハイブリッド反応はより迅速に起こり、生化学的な反応の N_2O 生成への関与も示唆された。

実験で用いた培養液から金属イオンおよびミネラルを全て除いた場合、N-nitrosation ハイブリッド反応による非生物学的な N_2O 生成は見られなかった。したがってこの反応は、培養液に含まれる金属やミネラルを触媒として作用することで化学的に起こりうることを示唆された。N-nitrosation ハイブリッド反応を化学的に引き起こす金属イオンの同定を行った結果、 Cu^{2+} を除いた場合 N_2O の生成が抑制されたため、 Cu^{2+} が非生物学的な N-nitrosation ハイブリッド反応の引き金になることを明らかにした。さらに PO_4^{2-} を除いた培養液で、 N_2O 生成量が大幅に増大する現象も観察され、 PO_4^{2-} が N_2O 生成の抑制因子になっている可能性も示唆された。

(4) N_2O 生成機構のモデル構築とシミュレーション

モンテカルロシミュレーションを行った結果、総括酸素移動容量係数のパラメータ値の不確実性が N_2O 排出量予測に多大な影響を及ぼすことを明らかにした。さらに、従来の N_2O 生成モデルに非生物学的な N_2O 生成機構を組み込むなどの改訂が必要であることを示した。

(3) で観察された非生物学的な N-nitrosation ハイブリッド反応を組み込んだモデルを用い、シミュレーションを行った結果、この反応を組み込んでいない従来のモデルの場合、アンモニア酸化に伴う亜硝酸イオンの生成および N_2O 排出を忠実に再現できないことが示された。一方で、N-nitrosation ハイブリッド反応を組み込んだ新規モデルの場合、 N_2O 排出のダイナミクスを追跡可能であることが示され、モデルの妥当性が示唆された。

(5) 部分硝化リアクターの DO 濃度が N_2O 生成経路に及ぼす影響評価

DO 濃度 0.5 mg/L に制御して (2) と同様の回分試験を行った結果、 N_2O 転換率が最も高くなり、10% を超えた。一方で、設定した

最も高い DO 濃度 2.0 mg/L で制御した場合、転換率は 2%であった。⁴⁴N₂O は DO 濃度が低い系ほど生成しており、DO 濃度が 0.5 mg/L では全体の 6 割近くを占めた。一方、DO 濃度を 1.0, 1.5, 2.0 mg/L に制御した際の ⁴⁵N₂O は、どの濃度でも主要な N₂O であった。(1) で記載した N₂O 生成機構の解析を用いて N₂O 生成経路の評価を行ったところ、0.5-2.0 mg/L の DO 濃度範囲において、N-nitrosation ハイブリッド反応による N₂O 生成が起こることを確認した。また、DO 濃度が高くなると、N₂O 転換率は低下する一方、これまで部分硝化リアクターではほとんど注目されていなかった N-nitrosation ハイブリッド反応による N₂O 生成の割合が高くなった。DO 濃度 0.5 mg/L に制御した系では、硝化菌脱窒による N₂O 生成経路が主要なものであったものの、N-nitrosation ハイブリッド反応による N₂O 生成は無視できない経路であることが示された。

次に、同位体比アナライザーによる ⁴⁵N₂O 濃度の時系列的な評価を行ったところ、回分試験開始後 5 分間で急激な ⁴⁵N₂O 生成が起こった。本実験の開始においては NO₂⁻ の存在下において ¹⁵NH₄⁺ の添加が行われているため、実験開始直後の ⁴⁵N₂O 生成は N-nitrosation ハイブリッド反応による N₂O 生成と同義と考えることができる。よって、N-nitrosation ハイブリッド反応はアンモニア酸化が起こる初期の段階の主要な N₂O 生成経路であることが示唆された。この急激な N₂O 生成が窒素除去バイオリアクターの処理性能の変調を示唆するかどうか、診断技術として用いられるかを今後検討していく必要がある。

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 6 件)

Terada A, Sugawara S, Hojo K, Takeuchi Y, Riya S, Harper WF, Yamamoto T, Kuroiwa M, Isobe K, Katsuyama C, Suwa Y, Koba K, Hosomi M. 2017. Hybrid nitrous oxide production from a partial nitrifying bioreactor: Hydroxylamine interactions with nitrite. *Environ Sci Technol* 51:2748-2756.

DOI: 10.1021/acs.est.6b05521 (査読あり)

Kinh CT, Ahn J, Suenaga T, Sittivorakulpong N, Noophan P, Hori T, Riya S, Hosomi M, Terada A. 2017. Free nitrous acid and pH determine the predominant ammonia-oxidizing bacteria and amount of N₂O in a partial nitrifying reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:1673-1683.

DOI: 10.1007/s00253-016-7961-2 (査読あり)

Song K, Harper Jr WF, Takeuchi Y, Hosomi M, Terada A. 2017. Effect of biological and mass transfer parameter uncertainty on N₂O emission estimates from WWTPs. *Water Environ Res.* (印刷中)

DOI: 10.2175/106143015X14338845155066

(査読あり)

Song K, Riya S, Hosomi M, Terada A. 2015. Effect of carbon sources on nitrous oxide emission in a modified Ludzak Ettinger process. *Water Sci Technol* 72:572-578.

DOI: 10.2166/wst.2015.250 (査読あり)

Harper WF, Takeuchi Y, Riya S, Hosomi M, Terada A. 2015. Novel abiotic reactions increase nitrous oxide production during partial nitrification: Modeling and experiments. *Chem Eng J* 281:1017-1023.

DOI: 10.1016/j.cej.2015.06.109 (査読あり)

寺田昭彦 (2015) 硝化プロセスにおける亜酸化窒素の放出特性と生成機構 (特集 下水処理場における N₂O 排出抑制に関する研究). *水環境学会誌* 38(9), 334-339. (査読なし)

[学会発表](計 11 件)

Kinh CT, Suenaga T, Hori T, Riya S., Hosomi M, Terada A. 2017. Identification hotspots for production and consumption of NO and N₂O in a membrane aerated biofilm for nitrogen removal, 10th International Conference on Biofilm Reactors (Dublin, Ireland) 2017.5.9-5.12

中村洋貴, 丸尾光希, 細見正明, 寺田昭彦 2017. 15N トレーサー法と同位体比アナライザーの併用による部分硝化リアクターの亜酸化窒素生成機構解明, 第 51 回日本水環境学会年会 (熊本大学, 熊本) 2017.3.15-3.17

Kinh CT, Suenaga T, Hori T, Riya S, Smets BF, Hosomi M, Terada A. 2016. Spatial distribution of microbial community and N₂O depth profiles in counter- and co- diffusion

biofilms functioning simultaneous nitrification and denitrification. MEWE-Biofilm (Copenhagen, Denmark) 2016.9.4-9.8

Kinh CT, Suenaga T, Hori T, Riya S, Hosomi M, Terada A. 2016. A biofilm employing counter-current substrate diffusion geometry facilitates N₂O mitigation: Proof of concept. Water Environment Technology Conference 2016. (中央大学, 東京) 2016.8.27-8.28.

Kinh CT, Suenaga T, Hori T, Riya S, Smets BF, Hosomi M, Terada A. 2016. Depth profiles of nitrous oxide and functional genes in counter- and co- diffusion biofilm performing nitrification and denitrification. WEF/IWA Nutrient Removal and Recovery 2016. (Denver, Colorado) 2016.6.10-6.13.

Terada A, Takeuchi Y, Hojo K, Riya S, Koba K, Hosomi M. 2015. Identification of a predominant nitrous oxide production pathway from a partial nitrifying bioreactor: A 15N tracer study. International Conference on Nitrification 4 (Edmonton, Canada) 2015.6.28-7.1

Terada A, Kinh CT, Yamamoto T, Hojo K, Riya S, Hosomi M. 2015. Nitrous oxide production potential of ammonia-oxidizing bacteria enriched in a bioreactor towards partial nitrification. PRES'15 (Kuching, Malaysia) 2015.8.23-8.27.

Terada A, Harper Jr. WF, Takeuchi Y, Riya S, Hosomi M. 2015. Nitrous oxide production by multiple pathways in a partial nitrifying bioreactor: Significance of abiotic reaction. The 6th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition (Beijing, China) 2015.9.20-9.24

竹内裕貴, 丸尾光希, 利谷翔平, 細見正明, 寺田昭彦. 2016. 部分硝化リアクターから放出される亜酸化窒素の生成メカニズム: 非生物学的反応経路の関与, 第 50 回日本水環境学会年会(アステイ徳島, 徳島) 2016.3.16-3.18.

Terada A, Hojo K, Yamamoto T, Riya S, Koba K, Hosomi M. 2014. Nitrous oxide production pathways of nitrifying activated sludge in a sequencing batch reactor. IWA World Water Congress (Lisbon, Portugal) 2014.9.21-9.25.

竹内裕貴, 北條圭祐, 利谷翔平, Harper Jr. WF, 細見正明, 寺田昭彦. 2014. 15N トレーサー法による回分式・連続式部分硝化リア

クターからの亜酸化窒素生成機構の解明(アクトシティ浜松, 静岡) 2014.10.22-10.24.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 昭彦 (TERADA, Akihiko)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 30434327

(2) 研究協力者

木庭 啓介 (Koba, Keisuke)

京都大学・生態学研究センター・教授
研究者番号: 90311745

諏訪 裕一 (SUWA, Yuichi)

中央大学・理工学部・教授
研究者番号: 90154632

堀 知行 (HORI, Tomoyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・環境管理研究部門・主任研究員
研究者番号: 20509533