

DHS リアクターによる嫌氣的メタン酸化脱窒細菌の培養と窒素除去プロセス

長岡技術科学大学 学生会員 ○佐藤 崇文
正会員 幡本 将史, 中村 明靖, 山口 隆司

1. はじめに

嫌氣的メタン酸化脱窒反応とは、嫌氣的メタン酸化の電子受容体として亜硝酸及び硝酸を用いて、脱窒を行う反応である。本反応を担う主要な微生物は NC10 という門レベルで未培養な系統分類群に属する細菌であり¹⁾、農業用水路の堆積物から初めて集積された。それ以降、様々な自然環境中に存在することが報告されている^{2,3)}。そのため、嫌氣的メタン酸化脱窒細菌は、地球規模での炭素・窒素循環に寄与している可能性が示唆されており、注目を浴びている微生物の一種である。また、近年、嫌氣的メタン酸化脱窒細菌の反応経路が推定され、この微生物による脱窒プロセスでは、温室効果ポテンシャルが高い N_2O を発生させないことが示唆されている²⁾。そのため、嫌氣的メタン酸化脱窒反応を脱窒処理に適用することができれば、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ことが考えられる。しかしながら、嫌氣的メタン酸化脱窒細菌の培養成功例は少なく、また、既報の培養例では回分式培養が主流であり、窒素除去プロセスへの応用を目指した連続処理プロセスの報告もほとんど無い。そこで、嫌氣的メタン酸化脱窒細菌を用いた窒素除去プロセスに用いるリアクターとして、我々は下降流懸垂型スポンジ担体 (DHS) リアクターに着目した。DHS リアクターは、スポンジ担体に微生物を高濃度で保持することが可能であり、気液接触効率が高いため、水に溶けにくいメタンガスをスポンジ内部にまで効率的に供給することができる。そのため、嫌氣的メタン酸化脱窒細菌の培養を効率的に行う事ができると考えた。

本研究では、DHS リアクターを用いて嫌氣的メタン酸化脱窒細菌の連続培養を試み、培養リアクター内における嫌氣的メタン酸化脱窒反応の調査を行った。

2. 実験方法

2.1 培養に用いる植種汚泥の採取および FISH 法による解析

DHS リアクターを用いた連続培養の植種源には、以前から培養を行っている、嫌氣的メタン酸化脱窒細菌の集積培養系より採取した汚泥を使用した。採取した汚泥の菌叢解析は FISH 法を用いて行った。解析には、嫌氣的メタン酸化脱窒反応を担う微生物と考えられている NC10 門に属する細菌の 16S rRNA を標的として行った。解析に用いた DNA プローブは、DBACT-0193, DBACT-0447, NC10-1162 を使用した。また、DNA プローブには Alexa555 を蛍光標識として付加した。

2.2 培養装置

嫌氣的メタン酸化脱窒細菌の培養には、容積 1250 cm^3 の円筒形ガラスカラム内部に汚泥保持単体として、 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ のスポンジを 15 個直列に吊した DHS リアクターを用いた (図 1)。植種源は、FISH 法により嫌氣的メタン酸化脱窒細菌を確認した汚泥を使用した。基質は無機合成培地¹⁾を用い、窒素源として亜硝酸及び硝酸をそれぞれ 0.5 mM の濃度で添加した後、アルゴンでパージを行い嫌気状態にした。メタンは培養 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 ml/min の速度でリアクター内に流入させた。運転温度は 30°C 、水理学的滞留時間 (HRT) は培養 63 日までは 4 時間とし、以降は 3 時間および 2 時間に短縮した。

2.3 分析方法

培養リアクター内の亜硝酸及び硝酸濃度の測定には高速液体クロマトグラフ (SPD-10A, Shimadzu) を使用し、メタン濃度は TCD 検出器を備えたガスクロマトグラフ (GC-8A, Shimadzu) を用いて測定した。

3. 実験結果及び考察

3.1 FISH 法による植種汚泥の解析結果

FISH 法による植種汚泥の解析結果を図 2 に示す。亜硝酸及び硝酸をそれぞれ分けて添加している双方の集積培養系より採取した汚泥において、NC10 門に属する細菌が DAPI に対して約 20% 存在することが確認された。検出された嫌氣的メタン酸化脱窒細菌の特徴は、形状が縦 $1\sim 2\mu\text{m}$ 、横 $0.5\sim 1\mu\text{m}$ 程度の桿菌であり、本研究と同じ DNA プローブを使用した既報においても、嫌氣的メタン酸化脱窒細菌の形状が似ていることが確認されている²⁾。そのため、植種源として使用した汚泥内では、嫌氣的メタン酸化脱窒細菌が優占的に存在することが示唆された。

3.2 培養リアクター内における嫌氣的メタン酸化脱窒反応

培養リアクター内における流入亜硝酸・硝酸負荷及び除去速度の経日変化を図 3

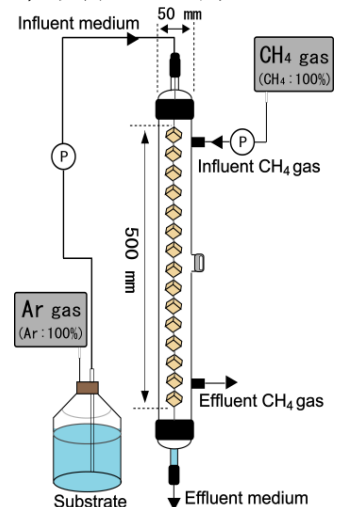


図 1 培養リアクターの概要図

キーワード 嫌氣的メタン酸化脱窒、窒素除去、DHS リアクター、連続培養

連絡先 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学大学院 環境システム工学専攻 TEL 47-1611-6646

表 1 培養リアクター内における窒素源除去速度及びメタン酸化速度 (培養 264 日から 298 日までの平均)

窒素源	窒素源 除去速度 (mmol / L · day)	メタン 酸化速度 (mmol / L · day)	メタン 酸化速度理論値 (mmol / L · day)	メタン 酸化速度理論値 合計(亜硝酸+硝酸)
亜硝酸	4.30 ± 0.30	2.12 ± 0.34	1.60	2.58
硝酸	1.56 ± 0.16		0.98	

に示す. 培養開始直後より亜硝酸および硝酸の除去を確認することができた. そのため, 培養リアクター内では, 早期に脱窒反応が進行していることが示唆された. その後, 培養 40 日以降より, 亜硝酸除去速度が増加し, 安定的な除去を確認した. そのため, HRT を短縮させ, 基質の流入負荷を上昇させることで亜硝酸除去速度の向上を試みた. その結果, 培養 70 日目に HRT を 4 時間から 3 時間に短縮したところ, 亜硝酸除去速度は最大 $47.3 \text{ g-N/m}^3 \cdot \text{day}$ まで上昇した. 培養 110 日目ではさらに HRT を 2 時間に短縮したところ, 亜硝酸除去速度は最大 $70.8 \text{ g-N/m}^3 \cdot \text{day}$ (除去率 91%) に達した. そこで, 培養 251 日目より, 添加する亜硝酸濃度を 0.5 mM から 0.7 mM に上昇させることでさらなる除去速度の向上を試みたが, 亜硝酸除去速度は著しく低下し, 反応への阻害が確認された. 一方, 硝酸除去速度は亜硝酸除去速度ほどの経時的な増加は見られず, 最大で $33.5 \text{ g-N/m}^3 \cdot \text{day}$ (除去率 33%) と亜硝酸除去速度の約 4 割程度であった. また, 培養リアクター内における流入・流出メタンガス濃度を測定したところ, 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気的メタン酸化反応は, 亜硝酸を用いた場合, $3\text{CH}_4 + 8\text{NO}_2^- + 8\text{H}^+ \rightarrow 3\text{CO}_2 + 4\text{N}_2 + 10\text{H}_2\text{O}$, 硝酸を用いた場合, $5\text{CH}_4 + 8\text{NO}_3^- + 8\text{H}^+ \rightarrow 5\text{CO}_2 + 4\text{N}_2 + 14\text{H}_2\text{O}$ で進行する. したがって, メタン酸化と亜硝酸および硝酸除去は化学量論的に, $\text{NO}_2^- : \text{CH}_4 = 2.7 : 1$, $\text{NO}_3^- : \text{CH}_4 = 1.6 : 1$ で反応が進行すると考えられる. 本培養リアクターにおいて, メタン酸化が安定的に行われた培養 264 日から 298 日までの亜硝酸・硝酸除去速度及びメタン酸化速度の平均を表 1 に示す. メタン酸化速度は, 双方の窒素源除去速度及び化学量論比より算出した理論値と比較的近い値を示した. そのため, 培養リアクター内では嫌気的メタン酸化脱窒反応の進行が推測された. 既報では, 嫌気的メタン酸化脱窒細菌は, メタン酸化の電子受容体として亜硝酸を優先的に用いることが報告されている¹⁾. 我々の培養リアクター内においても, 亜硝酸を優先的に除去してメタン酸化が起きており, また, メタン酸化速度の実測値が理論値と比較的近い値を示したことより, 既報にあるような NC10 門に属する嫌気的メタン酸化脱窒細菌が培養されている可能性が考えられた.

4. まとめ

本研究では, DHS リアクターを用いて嫌気的メタン酸化脱窒細菌の連続培養を行った. その結果, 培養リアクター内では, メタン酸化の電子受容体として亜硝酸を優先して除去し, また, メタン酸化速度の実測値が理論値と比較的近い値を示した. そのため, 我々の培養リアクター内においても, 既報にあるような嫌気的メタン酸化脱窒細菌が培養されている可能性が考えられた. 今後は, 培養リアクター内の汚泥の菌叢解析を行い, 嫌気的メタン酸化脱窒細菌についてより詳細な情報の収集を行う予定である.

参考文献

- 1) Ettwig, K. F. et al., (2008) *Environmental Microbiology*, 75, 3656-3662,
- 2) Ettwig, K. F. et al., (2010) *Nature*, 64, 543-550.
- 3) Deutzmann, J.S et al., (2011) *Environmental Microbiology*, 77, 4429-4436,

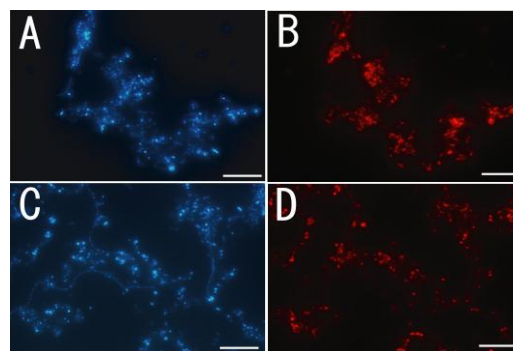


図 2 FISH 法による植種汚泥の解析結果. A, B は亜硝酸添加リアクター, C, D は硝酸添加リアクターを示す. 左図 A, C は UV 励起による DAPI 視野, 右図 B, D NC10 門に属する細菌に特異的なプローブを用いた G 励起による蛍光視野である. スケールバーは $10 \mu\text{m}$ を示す.

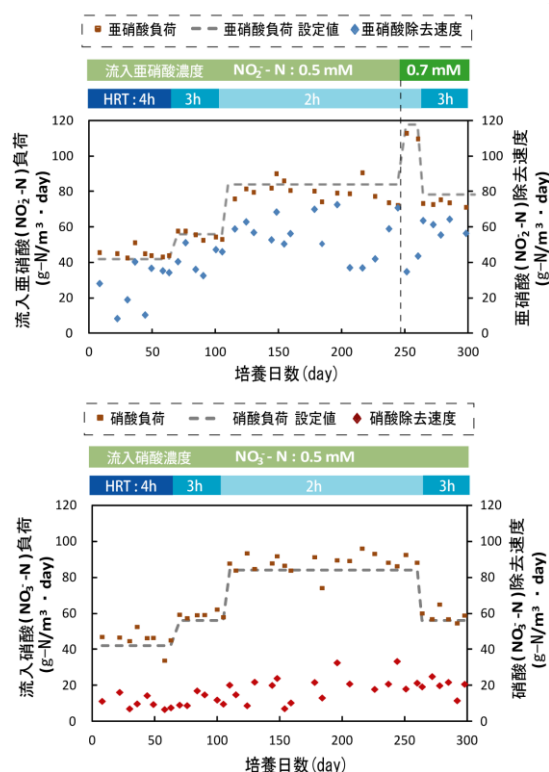


図 3 培養リアクターにおける流入亜硝酸・硝酸負荷及び除去速度の経日変化