

## 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

長岡技科大院・工 学生会員 ○根本笙,  
非会員 佐藤崇文, 正会員 幡本将史, 山口隆司

### 1. はじめに

廃水中の窒素化合物は富栄養化の原因となる。そこで、下水処理場では窒素化合物を廃水中から除去する技術として生物学的窒素除去法が利用されている。この処理法では、廃水中の主な窒素化合物であるアンモニアは微生物により亜硝酸、硝酸へ酸化されたのち、脱窒反応により窒素ガスとなり大気中に放出される。このとき、アンモニアから硝酸への硝化には電子受容体として酸素などが、硝酸から窒素への脱窒には電子供与体として有機物などが必要となる。

近年、電子供与体としてメタンを用いて亜硝酸態窒素および硝酸態窒素を嫌氣的に脱窒する微生物が発見された<sup>1)</sup>。この微生物による反応は酸素を使わずに亜硝酸態窒素を直接脱窒し、また有機物を用いることなく硝酸態窒素を還元する。よって、今までにない新たな窒素除去プロセスとして注目されている<sup>2)</sup>。しかし、この嫌氣的メタン酸化脱窒微生物は難培養性であり、培養に関する知見も十分ではない。そのため嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の知見は乏しく、下水処理の窒素除去プロセスへの応用はいまだされていないのが現状である。

本研究では嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養を行い、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を行った。

### 2. 実験方法

#### 2.1. 嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養装置

嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養には、容積 255 cm<sup>3</sup>、高さ 130 mm の円筒型ガラスカラムを用いた。同様のカラムを 2 つ用意し、一方には電子受容体として亜硝酸態窒素を、もう一方には硝酸態窒素を供給した。カラム内には植種汚泥保持担体としてスポンジを封入した。基質は無機合成培地<sup>1)</sup>を用いた。基質はアルゴンでパージを行い嫌氣状態にしたのち、メタンガス (99.5%メタン) でパージしメタンを溶存させた。この基質は HRT4.2 h で連続的に供給した。

#### 2.2. 培養に用いた植種汚泥

嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の植種源には、以前

の研究で運転した集積培養装置の汚泥を用いた。この培養装置は水田の汚泥を植種源とし、本実験と同条件で約 2 年間運転を行い、その後約 6 か月常温で保存したのち、本実験の植種源として用いた。

#### 2.3. 基質組成の変化

基質組成は電子受容体濃度、銅濃度、ピロロキノリンキノン (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 mM から 1 mM まで段階的に上昇させた。このとき銅濃度は 1.0 μM 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 mM で固定し、銅濃度を 1.0 μM, 6 μM, 12 μM と段階的に上昇させた。次に PQQ を 2 μM 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<sup>3)</sup>。

#### 2.4. 分析方法とサンプルの採取

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。サンプルは週 1~3 回、培養装置の流入水・流出水を採取し測定した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1. 電子受容体濃度の影響

本実験結果より得られた基質中の電子受容体濃度と窒素消費速度の関係を図 1 に示す。まず、電子受容体濃度を 0.6 mM から 0.8 mM に上昇させたとき、電子受容体濃度の上昇とともに窒素消費速度の上昇が確認された。また、電子受容体濃度が 0.8 mM のとき、亜硝酸態窒素消費速度は  $2.3 \pm 0.32 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$ 、硝酸態窒素消費速度は  $2.4 \pm 0.20 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$  となりそれぞれ最大値を示した。このとき、窒素除去率はそれぞれ  $56 \pm 3.2\%$ 、 $50 \pm 3.2\%$  であった。さらに電子受容体濃度を 0.8 mM から 1.0 mM に上昇させたが、窒素消費速度は上昇しなかった。このとき、反応に用いられる電子受容体と溶存メタンはともに十分量存在している状態であった。

キーワード 嫌氣的メタン酸化脱窒, 窒素除去, 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 0258-47-1611-6646

### 3.2. 銅濃度の影響

本実験結果より得られた基質中の銅濃度と窒素消費速度の関係を図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<sup>4)</sup>。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。

### 3.3. PQQ による影響

本実験により得られた基質中の PQQ 濃度と窒素消費速度の関係を図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. 結論

本研究では電子受容体濃度、銅濃度そして PQQ が嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養に与える影響について評価を行った。その結果、電子受容体濃度の上昇は嫌氣的メタン酸化脱窒反応を促進させるこ

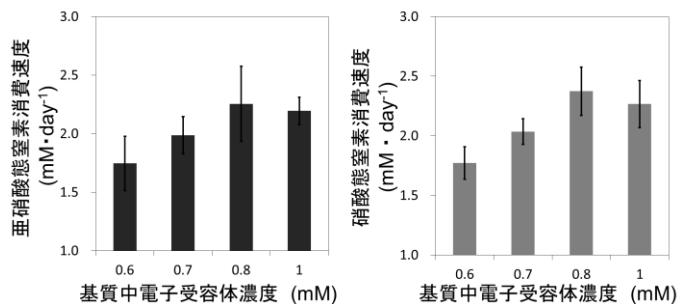


図1 基質中電子受容体濃度と窒素消費速度の関係

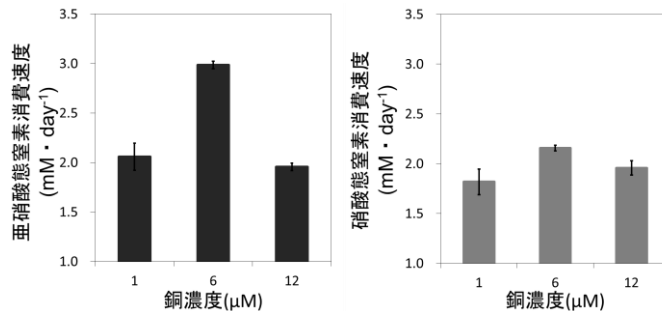


図2 基質中銅濃度と窒素消費速度の関係

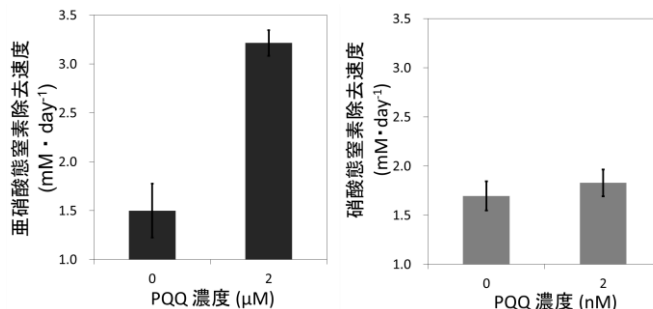


図3 PQQ 濃度と窒素消費速度の関係

とが判明した。また、基質中銅濃度は  $6 \mu\text{M}$  まで上昇させると亜硝酸の嫌氣的メタン酸化脱窒反応を促進することが判明した。また、PQQ は亜硝酸の嫌氣的メタン酸化脱窒反応を促進することが判明した。それらに対して、硝酸の嫌氣的メタン酸化脱窒反応は銅と PQQ による促進を受けないことが判明した。このことより、硝酸の嫌氣的メタン酸化脱窒反応は硝酸から亜硝酸への反応において律速となっていることが示唆された。今後は、硝酸の嫌氣的メタン酸化脱窒反応を促進する方法を検討していく。

## 参考文献

- 1) Ettwig, et al, (2008) Environmental Microbiol, 75, 3164-3173.
- 2) Etteig, et al., (2010) Nature, 464, 543-548.
- 3) Wu, et al. (2011) Biochemical society, 39, 243-248.
- 4) Haroon, et al, (2013) Nature, 500, 567-570.