

B-24 メタンを炭素源とした亜酸化窒素の脱窒

○山本 崇寛^{1*}・松浦 哲久¹・阿部憲一¹・幡本 将史²・金田一 智規¹・尾崎 則篤¹・大橋 晶良¹

¹広島大学大学院工学研究院社会基盤環境工学専攻 (〒739-8527広島県東広島市鏡山1-4-1)

²長岡技術科学大学 建設・環境系 環境システム工学専攻 (〒940-2188新潟県長岡市上富岡1603-1)

* E-mail: m090399@hiroshima-u.ac.jp

1. はじめに

人間活動に起因する温室効果ガスを原因とした地球温暖化は、我々の直面する最も重要な環境問題の一つとして認識されている。そのため地球温暖化の原因物質である温室効果ガスは、様々な分野において排出防止の取り組みがなされている。排水処理分野においても 1999 年に「下水道における地球温暖化防止実行計画策定の手引き」が発行され、2009 年には同手引きの改訂が行われた¹⁾。手引きには処理方式の改善や省エネルギー化などの対策が盛り込まれており、排水処理分野における温室効果ガス削減の流れは、今後加速すると考えられる。

排水処理分野で排出される温室効果ガスは、二酸化炭素(CO₂)の他に、CO₂の 21 倍の温室効果能を有するメタン(CH₄)や、310 倍の温室効果能を有する亜酸化窒素(N₂O)が排水処理工程や污泥焼却によって排出されている。この両温室効果ガスの排出量は、CO₂換算で排水処理分野全体の温室効果ガス排出量の 4 割以上を占めている¹⁾。そのため、排水処理施設において発生する N₂O と CH₄ を処理することにより、環境への負荷を大いに低減できると考えられる。現在、N₂O や CH₄ は、污泥の高温焼却や大量のエアレーションを行うことで発生抑制が行われている。しかしこのようなエネルギーをかけた抑制法では実質的な環境負荷低減はあまり期待できない。

そこで CH₄ を炭素源として利用した N₂O の生物学的脱窒反応に着目した。この反応では、電子供与体である CH₄ は酸化され CO₂ となり、一方 N₂O は還元され窒素(N₂)となる。その結果、発生ガスの温室効果能を反応前後で大幅に低減することができる。CH₄ は硫酸還元²⁾や硝酸還元³⁾における電子供与体として機能することが知られており、N₂O の脱窒においても同様に機能する可能性が考えられる。この反応は熱力学的には十分に起こりうる。しかし、現在このような反応は確認されておらず、どのような微生物群が関与するのかまったくの未知であ

る。本研究では CH₄ を用いた N₂O の脱窒プロセスを担う微生物の特定及び集積を目的とし、ラボスケールリアクターを用いた培養・処理実験を行った。またリアクターより得られたバイオマスについての分子生物学的解析を行った。

2. 実験方法

(1) DHSリアクターを用いた培養及び処理実験

本実験では円柱状プラスチック製カラムのDHSリアクターを用いた(図-1)。スポンジ担体は東広島市で採取した水田土壌の希釈液を染み込ませることで植種を行った。N₂OとCH₄は嫌気性無機排水を模した人工基質にそれぞれ溶存させたものを、基質流量比1:9(N₂O溶存基質:CH₄溶存基質)となるように流入させた。またN₂O以外の窒素源としてアンモニアと硝酸の添加を行った。溶存N₂Oと溶存CH₄濃度の測定はヘッドスペースガスクロマトグラフ法を利用して行った。またHPLCによる各態窒素濃度の測定を行い、処理性能のモニタリングを行った。

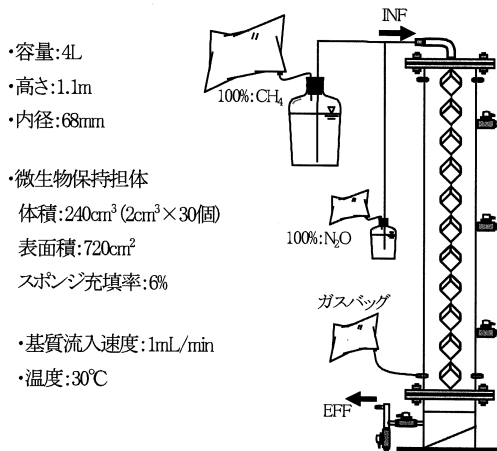


図-1 DHSリアクター概要

(2) 16S rRNA遺伝子に基づく系統解析

培養された微生物種の同定を行うために、運転277日目にスポンジ担体表面に付着したバイオマスサンプルを採取した。そのバイオマスサンプルについてDNA抽出、PCRを行い、アガロースゲル電気泳動によって増幅の確認を行った。PCR増幅は、細菌にはEUB338F/UNIV1492Rのプライマーセット⁹⁾を、古細菌にはARC109F/ARC912Rのプライマーセット⁹⁾を用いて行った。得られたクローンの塩基配列を元にARBプログラムを用いて系統樹を作成した。

3. 結果と考察

(1) 集積培養結果と処理性能

DHSリアクターは、HRT(水理学的滞留時間)を4時間、 CH_4 負荷約 $0.45 \text{ kg-COD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ 、 N_2O 負荷約 $0.25 \text{ kg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ となるように設定を行い運転を開始した。運転40日目には N_2O 、 CH_4 の除去が確認された(図-2,3)。しかし、 CH_4 を電子供与体とした N_2O の還元反応では、化学量論的に $\text{N}_2\text{O} : \text{CH}_4 = 4 : 1$ で反応が進行すると考えられるが($\text{CH}_4 + 4\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{N}_2$)、実際にはその量論的關係に比べ CH_4 が多く減少していることが確認された($\text{mol-N}_2\text{O} / \text{mol-CH}_4 : 0.8-1.3$)。また除去量も不安定であった。運転98日目以降に N_2O の供給を停止することで原因の解明を行ったところ、リアクター立ち上げの際に窒素パージを行ったカラム気相部への溶存ガスの放散が非常に大きく影響していることが考えられた。そこで運転147日目からカラム気相部を N_2O 、 CH_4 混合ガス($\text{N}_2\text{O} : \text{CH}_4 = 9 : 1$)でパージを行い、亜酸化窒素の流入を再開させ運転を行った。パージ後の運転では CH_4 除去速度が約 $0.35 \text{ kg-COD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ で安定したため、運転250日目にHRTを2時間に変更した。このとき N_2O 除去速度は $0.12-0.20 \text{ kg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ であった。HRTを短縮し負荷を上昇させた後は、 CH_4 除去速度は約 $0.8 \text{ kg-COD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ であり、 N_2O 除去速度は $0.2-0.5 \text{ kg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ であった。しかし、処理が行われている一方で予測した量論比での反応の確認は出来なかった。反応が予測と異なる可能性も考えられるが、本実験では N_2O と CH_4 を溶存態として供給していたため流入濃度が安定せず、それに伴って除去速度が安定しなかったことが物質収支や反応比が変動する事の一つの原因であると考えられた。従って今後は量論的な確認を取るためにリアクター運転条件やリアクターのモニタリング方法の再検討が必要である。

N_2O 、 CH_4 の除去量と比較し、硝酸イオン濃度の除去量は流入量の10%程度と非常に小さく、またアンモニウムイオン濃度の流入出での変化も大きくは見られなかった(図-4)。そこで、流入窒素源を N_2O に単一化し、窒素収支の確認を容易にすることを目的とし硝酸ナトリウム、塩化アンモニウムの添加を運転444日目に停止した。この操作前後で、 N_2O 、 CH_4 の除去性能に大きな変化は見られず、これらの無機態窒素の反応への関与は非常に小さいものと考えられた。また運転450日目頃から徐々に CH_4 処理速度の向上し、その一方で N_2O 処理速度の減少が見られた。当初は基質への各態窒素の添加停止の影響

である可能性が考えられたが、実際にはカラムの破損による空気の混入であることが判明し、カラム内部からも酸素が検出された。そのため、運転577日目にカラム本体を交換し、再度DHSリアクターの立ち上げを行った。

汚泥の蓄積は運転200日目ごろから顕著になり、スポンジ担体表面に赤褐色の汚泥付着が見られるようになった。クローン解析用のバイオマスサンプルを採取した運転277日目には、上部から中程までのスポンジ担体に汚泥付着が見られるようになった。

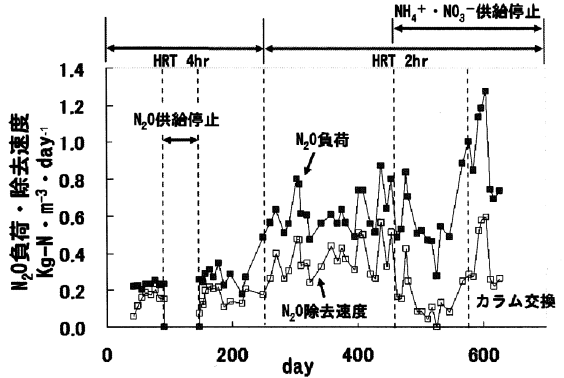


図-2 亜酸化窒素除去速度

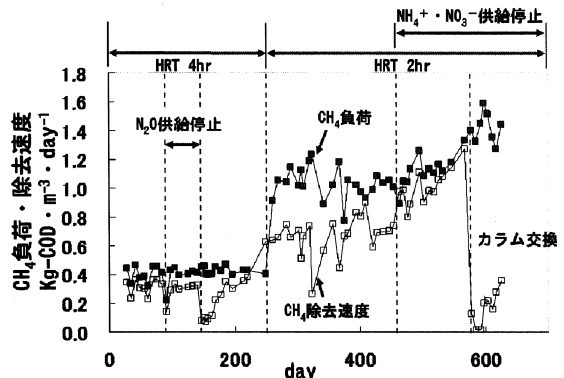


図-3 メタン除去速度

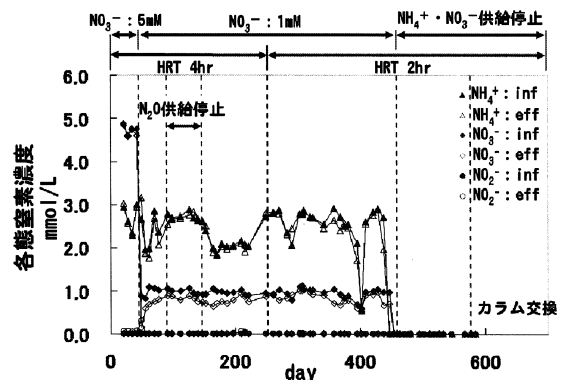


図-4 流入出気質における各態窒素濃度

(2) 16S rRNA遺伝子に基づく系統解析

細菌及び古細菌の16S rRNA遺伝子を標的としたPCRの結果より、古細菌については増幅が確認されなかったため、その存在数は細菌の存在数に比べ非常に少ないと考えられた。そのためDHSリアクター内で行われている CH_4 酸化と N_2O の脱窒反応に対する古細菌の関与は非常に小さいものと推定し、細菌を標的として16S rRNA遺伝子に基づく系統解析を行った。

解析された95クローンのうち、クローン同士の相同性が97%以上のものを、同一のphylotypeにまとめた結果、6つのphylotype (全95クローン中32クローン)が*Comamonadaceae*科に属しており、特に優占なクローングループとして検出された。

図-5に細菌の16S rRNA遺伝子に基づく系統解析結果のうち特に優占的であった*Comamonadaceae*科に近縁なクローンの系統樹を示す。DHSリアクター内から検出されたクローングループは[Clone amod-]として示す。*Comamonadaceae*科には、脱窒能を有するとされる*Brachymonas denitrificans*⁶⁾や*Comamonas testosteroni*⁷⁾のような細菌種が存在していることから、検出された*Comamonadaceae*科に近縁な細菌種が、リアクター内における N_2O の還元に関与している可能性が十分に考えられる。このことからDHSリアクター内の CH_4 酸化と N_2O の脱窒は*Comamonadaceae*科に近縁なクローングループによって進行しているものと考えられた。

しかし、これらの得られたクローングループの近縁種が、 CH_4 を脱窒の電子供与体として使用出来るという研究報告はなされていない。また N_2O の脱窒に焦点を当てた研究事例は、硝酸・亜硝酸の脱窒に関する研究と比べ非常に少ないのが現状である。そのため、今後は得られたクローングループの近縁種の純菌株を利用したバッチ処理試験を行い、DHSリアクター内でどのような機能を担っているのかを調査を行う予定である。

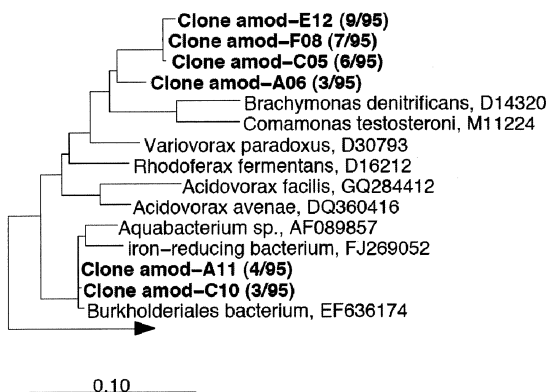


図-5 細菌の16S rRNA遺伝子に基づく
*Comamonadaceae*に近縁なクローンの系統樹

4. まとめ及び今後の予定

本研究では、水田土壌を植種材料として用いたDHSリアクターを構築し、溶存 N_2O 、溶存 CH_4 の同時除去を行うことができた。達成されたDHSリアクターの除去能力は、 CH_4 除去速度が約 $0.8 \text{ kg-COD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ 、 N_2O 除去速度が $0.2-0.5 \text{ kg-N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$ であった。しかし、溶存 N_2O 、溶存 CH_4 の除去が行われている一方で、化学量論的に予測された $\text{N}_2\text{O}:\text{CH}_4=4:1$ の反応を確認することはできず、論理的な反応の裏づけを取る段階までは至れなかった。また除去速度も安定せず、課題の多く残る結果となった。

本DHSリアクターのスポンジ担体表面部には*Comamonadaceae*科に属する細菌群が特に優占化していることが16S rRNA遺伝子に基づく系統解析によって確認された。これらの優占的な細菌種には脱窒能を有する近縁種が存在していることから、リアクター内での N_2O 除去に大いに関連していると考えられた。その一方で古細菌の存在数は細菌と比較し非常に少なく反応への関与は小さいものと考えられた。

今後はDHSリアクターの運転条件の見直しや、本DHSリアクターから得られたバイオマスをを用いて実験系を構築し、反応の化学量論的な確認を取るとともに、安定した N_2O 、 CH_4 除去を目指す。また細菌の16S rRNA遺伝子に基づく系統解析結果をもとに、反応への関与微生物の特定を行い、知見の蓄積を行っていく予定である。

5. 参考文献

- 1) 国土交通省下水道部 下水道における地球温暖化防止対策検討委員会(2009): 下水道における地球温暖化防止推進計画策定の手引き。
- 2) Valentine et al., 2000, New perspectives on anaerobic methane oxidation, *Environmental Microbiology* 2 (5), 477-484.
- 3) Modin et al., 2007, Denitrification with methane as external carbon source, *Water Research*, 41 (12), 2726-2738
- 4) Hatamoto et al., 2007, Identification and cultivation of anaerobic, syntrophic long-chain fatty acid-degrading microbes from mesophilic and thermophilic methanogenic sludges, *Applied and Environmental Microbiology* 73 (4), 1332-1340.
- 5) Lueders et al., 2000, Archaeal Population Dynamics during Sequential Reduction Processes in Rice Field Soil, *Applied and Environmental Microbiology* 66 (7), 2732-2742.
- 6) Hiraishi et al., 1995, *Brachymonas denitrificans* gen. nov., sp. nov., an aerobic chemoorganotrophic bacterium which contains rhodoquinones, and evolutionary relationships of rhodoquinone producers to bacterial species with various quinone classes, *The Journal of General and Applied Microbiology* 41 (2), 99-117.
- 7) Zala et al., 2004, Nitrate removal from the effluent of a fertilizer industry using a bioreactor packed with immobilized cells of *Pseudomonas stutzeri* and *Comamonas testosteroni*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(7), 661-665.