

嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養条件の検討と散水ろ床型リアクターへの適用

長岡技科大院 工学研究科 環境システム工学専攻
水圏土壌環境研究室 学籍番号 12329981
根本笙

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、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。また、従来の生物学的プロセスを用いた下水処理方法では温室効果ガスである二酸化炭素、メタン、一酸化二窒素が排出される。このうち、一酸化二窒素は二酸化炭素の約 300 倍の温室効果を持つためその排出が問題となっている¹⁾。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。嫌氣的メタン酸化脱窒反応による脱窒は一酸化二窒素を排出せずメタンを消費するため、温室効果ガス排出量を削減可能な新たな窒素除去プロセスとして注目されている²⁾³⁾。しかし、この嫌氣的メタン酸化脱窒反応を担う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成されていないのが現状である。

本研究では基質組成が与える嫌氣的メタン酸化脱窒反応への影響の調査を行った。さらに、嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養に適することが期待される下降流懸垂型スポンジ担体 (DHS) リアクターでの培養を試みた。

2. 実験方法

2.1. 嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の適切な培養条件の検討

本実験では無機合成培地中の組成物のうち電子受容体と微量元素、メタノールの酸化還元に関わる補酵素であるピロロキノリンキノン (PQQ) が与える脱窒速度への影響の調査を行った。脱窒活性への影響の調査は上向流型の連続培養装置を用いて行った。連続培養装置には容積 255 cm³、高さ 130 mm の円筒型ガラスカラムを用いた (図 1A)。カラム内には植種汚泥保持担体としてスポンジを導入した。基質は無機合成培地²⁾をアルゴンでパージして嫌気状態にしたのち、メタンガスでパージしメタンを溶

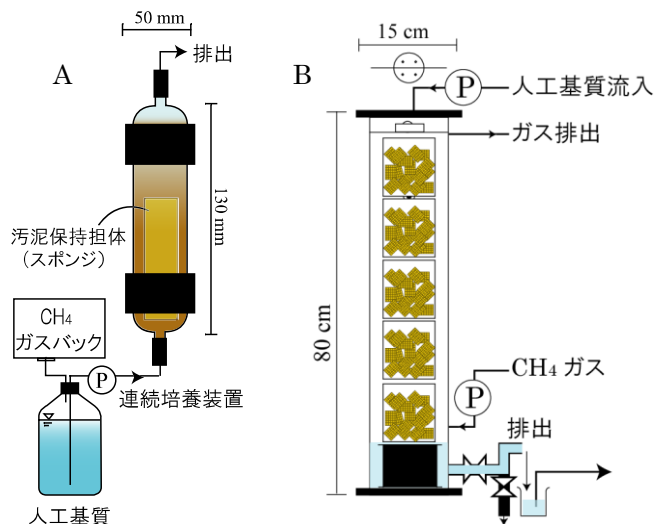


図 1 実験に用いた培養装置の概略図 (A: 上向流型リアクター、B: DHS リアクター)

存させて用いた。この基質は HRT4.2 h で連続的に供給した。条件の適切さは基質中亜硝酸、硝酸態窒素濃度を測定し、窒素消費速度を算出することで評価した。硝酸、亜硝酸態窒素濃度の測定は高速液体クロマトグラフ (HPLC, SPD-10A, Shimadzu) を用いて行った。

2.2. 嫌氣的メタン酸化脱窒微生物培養 DHS リアクターの運転条件

本実験では、嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の新たな培養方法として散水ろ床リアクターである DHS リアクターに着目した。DHS リアクターは気液接触率・微生物保持性能ともに優れているという利点を持つ。そのため、DHS リアクターはメタンを用いて反応を行う嫌氣的メタン酸化脱窒微生物の培養に適することが予想される。また、DHS リアクターと嫌気性処理の組み合わせは回収されるメタンを用いた脱窒を行うことで外部からの有機物供給を必要としない効率的な下水処理システムとなりうることが期待される。

DHS リアクターは内径 15 cm、高さ 80 cm の円筒型で、内部には G3 型のスポンジ担体 60 個を充填したカゴを縦に 5 つ導入した (図 1B)。植種汚泥は容積 5 L のシーケンスバッチリアクターにて 200 日間 DAMO 微生物を培養して得られた汚泥を用いた。培養は電子受容体として亜硝酸、硝酸を含む無機合成培地

2)を HRT 5 h で連続的に供給することで行った。このとき同時にメタンガスを連続的に供給することでリアクター内は嫌気的条件下を保った。亜硝酸、硝酸消費速度は高速液体クロマトグラフ (HPLC, SPD-10A, Shimadzu) を用いて測定した。

本実験では蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法 (Fluorescence in situ hybridization method: FISH 法) により嫌気的メタン酸化脱窒微生物の検出を行った。本実験は嫌気的メタン酸化脱窒細菌である NC10 門微生物と嫌気性メタン酸化古細菌 (ANME-2d) を標的として微生物観察を行った。NC10 門微生物嫌気的メタン酸化脱窒反応において亜硝酸の還元を担い、ANME-2d は硝酸の還元を担うことが報告されている²⁾⁴⁾。サンプルは培養開始後 95 日目の DHS リアクターの汚泥をパラホルムアルデヒドで固定して用いた。

3. 結果と考察

3.1. 嫌気的メタン酸化脱窒微生物の適切な培養条件の検討結果

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。

銅濃度を増加させたとき、亜硝酸消費速度は $2.1 \pm 0.13 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$ から $3.0 \pm 0.038 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$ に上昇し、硝酸消費速度は $1.8 \pm 0.13 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$ から $2.2 \pm 0.071 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$ に上昇した。このことより、硝酸脱窒活性は銅濃度増加の影響を受け辛く、亜硝酸脱窒活性は銅濃度増加の影響を受けやすいことが判明した。

次に PQQ 濃度を増加させたとき、亜硝酸消費速度は $1.5 \pm 0.28 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$ から $3.2 \pm 0.13 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$ に上昇し、硝酸消費速度は $1.7 \pm 0.15 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$ から $1.8 \pm 0.14 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$ に上昇した。このことより、硝酸脱窒活性は PQQ 濃度増加の影響を受け辛く、亜硝酸脱窒活性は PQQ 濃度増加の影響を受けやすいことが判明した。

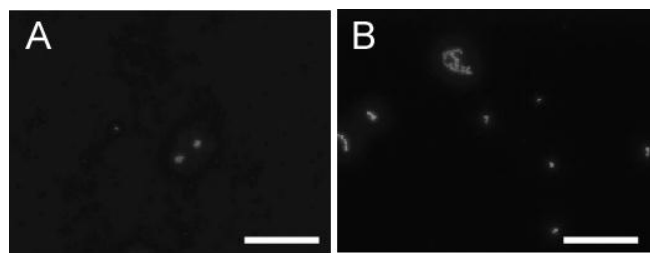


図 2 FISH 法による DHS リアクター中嫌気的メタン酸化脱窒微生物の観察結果。A が ANME-2d, B が NC10 門微生物, スケールバーは 10 μm

3.2. DHS リアクターによる嫌気的メタン酸化脱窒微生物培養結果

運転開始から 4 日後に亜硝酸と硝酸の消費が始まり、運転開始後 60 日目に亜硝酸消費速度は $0.34 \pm 0.13 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$ 、硝酸消費速度は $0.13 \pm 0.093 \text{ mM} \cdot \text{day}^{-1}$ となった。FISH 法により培養 95 日目の汚泥の観察を行った結果を図 2 に示す。本実験は嫌気的メタン酸化脱窒微生物である NC10 門微生物と嫌気的メタン酸化細菌 (ANME-2d) を標的として微生物観察を行った。結果、リアクター内には嫌気的メタン酸化脱窒微生物である NC10 門微生物と ANME-2d の両者が存在していることがわかった。

4. 結論

本実験において、培地中に含まれる微量元素のひとつである銅濃度と PQQ 濃度の変化は亜硝酸の嫌気的メタン酸化脱窒反応に特異的に影響を及ぼし、硝酸の脱窒には影響を及ぼしにくいことが判明した。また DHS リアクター内にて嫌気的メタン酸化脱窒反応による脱窒が確認されたことから、DHS リアクターによる嫌気的メタン酸化脱窒微生物の培養は可能であることが示唆された。

参考文献

- 1) Kampschren et al. (2009) Water research, 43, 4093-4103.
- 2) Ettwig, et al, (2008) Environmental Microbiol, 75, 3164-3173.
- 3) Ettewig, et al., (2010) Nature, 464, 543-548.
- 4) Haroon, et al. (2013) Nature 501:1-7.