

# 水素を電子供与体とし窒素酸化物を除去可能な微生物群の探索と応用に向けた検討

末 永 俊 和\*

## Exploring for Denitrifying Bacteria Using Hydrogen as an Electron Donor and Investigation of Their Application

Toshikazu SUENAGA\*

Nitrogen pollution of the water environment is a global issue and can be a health risk to humans and livestock animals. This study focused on an autotrophic denitrification that uses hydrogen as an electron donor. We attempted to detect the activity of the reaction, and to enrich a microbial community, responsible for the reactions. The activity detection using a usual activated sludge indicated that nitrate was denitrified using hydrogen, but the activity was low. In the enrichment reactors, supplying nitrate, nitrite, and nitrous oxide as electron acceptors with hydrogen, the unique microbial communities were observed. This suggests that the microorganisms responsible for each denitrification step using hydrogen may be different.

### 1. 研究背景と目的

水環境の窒素汚染は世界的な課題であり、人や畜産動物の健康リスクになる可能性がある<sup>1)</sup>。特に地下水に関して、農作物への窒素肥料の過剰施肥や畜産業からの浸透によって窒素酸化物濃度が上昇している箇所が存在する。一般的な排水処理システムではアンモニアを好気環境下で亜硝酸( $\text{NO}_2^-$ )や硝酸( $\text{NO}_3^-$ )に硝化し、従属栄養的な脱窒反応や嫌気性アンモニア酸化反応によって窒素( $\text{N}_2$ )へと除去するが、貧栄養的な環境、且つ後段の用途を考慮して有機物等の余計な添加物を極力避ける必要がある。本研究では、水素( $\text{H}_2$ )を電子供与体として用いる独立栄養的な脱窒反応に着目した。無機物質を電子供与体とする独立栄養脱窒は、有機物を利用する従属栄養脱窒に比べ、添加物の除去が容易、不用意な細菌増殖を抑えるメリットがある。しかし、この反応を担う細菌群の特定は十分ではなく、さらに不完全な脱窒反応により有害な反応中間体である $\text{NO}_2^-$ や亜酸化窒素( $\text{N}_2\text{O}$ )が放出されてしまう可能性がある<sup>2)</sup>。そこで、 $\text{H}_2$ 利用脱窒を行える細菌群の活性の検出と探索を目的とした。まず、(I)一般下水を処理する活性汚泥においてこの活性が見られるのか調査した。そして、(II)中空糸ガス透過膜を介した $\text{H}_2$ 供給により $\text{H}_2$ を電子供与体として $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ をそれぞれ脱窒可能な細菌群の選択的集積培養を試みた。

### 2. 実験方法

**2.1.  $\text{H}_2$ と $\text{NO}_3^-$ を添加した活性汚泥を用いた回分試験：**生理食塩水で洗浄した活性汚泥を100 mLガスバイアルに封入、窒素曝気により嫌気状態とし $\text{NO}_3^-$ 存在下で3日間静置し持ち込み有機物を消費させた。その後再度曝気し、窒素酸化物として硝酸( $\text{NO}_3^-$ )を再添加した。電子供与体として $\text{H}_2$ 添加系と無添加系をそれぞれ用意することで、 $\text{H}_2$ の有無による脱窒反応試験を行った。経時的に液相と気相をサンプリングし、 $\text{H}_2$ 濃度をそれぞれGC-TCDにて測定、液相サンプルは $\text{NO}_3^-$ 濃度をイオンクロマトグラフィにて測定した。

**2.2. 集積培養装置の作製と運転：**添加する窒素酸化物を変えた3つの培養装置( $\text{NO}_3^-$ - $\text{H}_2$ 系、 $\text{NO}_2^-$ - $\text{H}_2$ 系、 $\text{N}_2\text{O}$ - $\text{H}_2$ 系)を作製した。培養装置は中空糸ガス透過膜を内封した上向流式となっており(図1)、 $\text{NO}_3^-$ と $\text{NO}_2^-$ は液体培地に溶解し、 $\text{N}_2\text{O}$ - $\text{H}_2$ 系は5%  $\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2$ を4%  $\text{H}_2/\text{N}_2$ を1:4の割合で混合して中空糸ガス透過膜に通気することで供給した。運転期間中、流入水と流出水をサンプリングし $\text{NO}_3^-$ と $\text{NO}_2^-$ 濃度を測定した。また、流出液中の溶存 $\text{N}_2\text{O}$ 濃度をヘッドスペース法によりGC-ECDを用いて測定した。培養30日経った段階で、培養装置内部のバイオフィーム様のバイオマスをサンプリング

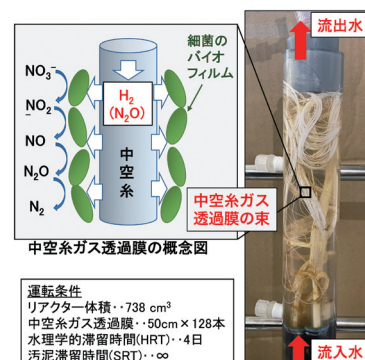


図1 集積培養装置の様子。

2023年3月3日 受理

\* 豊田理研スカラー

広島大学大学院先進理工系科学研究科化学工学プログラム

し、DNAを抽出した。抽出DNA中の16S rRNA遺伝子をPCRにて増幅し、DNAシーケンサ (iSeq, Illumina) でシーケンスし微生物群集構造解析を行うことで、培養装置内に優占化した細菌群を明らかにした。

### 3. 結果と考察

#### 3.1. H<sub>2</sub>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>を添加した活性汚泥を用いた回分試験

まず、下水処理場からサンプリングして24時間以内の活性汚泥を回分試験に用いたところ、H<sub>2</sub>添加系と未添加系で脱窒活性に違いが見られなかった (図2a)。生理食塩水により持ち込みの栄養塩や有機物を除去していたが、電子供与体となる物質が除去しきれておらず、従属栄養的な脱窒が支配的であることが示唆された。よって、2.1に記載した方法で、汚泥中に残存する電子供与体を消費させた後に、H<sub>2</sub>添加系と未添加系で活性を比較したところ、H<sub>2</sub>添加系ではH<sub>2</sub>濃度の減少が確認され、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の消費量が未添加系より大きくなった (図2b)。一方で、20時間以降はNO<sub>3</sub><sup>-</sup>濃度の減少は停滞した。

この結果より、H<sub>2</sub>を電子供与体とする脱窒活性の検出に成功したと言えるが、通常の活性汚泥ではH<sub>2</sub>利用脱窒の活性が非常に低いことが示唆された。通常の活性汚泥中には主に従属栄養脱窒細菌が優占していると考えられ、集積培養による目的細菌群の集積化の重要性が確認された。

#### 3.2. 集積培養装置の運転結果

集積培養装置からの流出水の分析結果より、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-H<sub>2</sub>系とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>-H<sub>2</sub>系では、流出液中のNO<sub>3</sub><sup>-</sup>とNO<sub>2</sub><sup>-</sup>の濃度が減少し、20-25日以降では流出水に検出されず供給された窒素酸化物のほぼ全てが消費されていた。N<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>系でも流出水の溶存N<sub>2</sub>O濃度が初期と比較して大幅に減少した。これらの結果より、培養装置に供給した窒素酸化物が脱窒により還元されていることが分かった。また中空糸ガス透過膜の表面上にバイオフィルムの形成が確認された (図1)。

形成されたバイオフィルムの微生物群集構造解析を行った結果、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-H<sub>2</sub>系とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>-H<sub>2</sub>系では *Chromatiaceae* 科の相対存在率が接種活性汚泥では0.0%であったのに対し、10-30%と大きく伸びていることが確認された。一方で、N<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>系では興味深いことに *Chromatiaceae* 科はほぼ存在せず、*Rhodocyclaceae* 科が接種活性汚泥の9.8%から25%と優占化していることが確認された。つまり、H<sub>2</sub>を用いた脱窒では、工程 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>→NO<sub>2</sub><sup>-</sup>→NO→N<sub>2</sub>O→N<sub>2</sub>) のうち *Chromatiaceae* 科に属する細菌種がNO<sub>3</sub><sup>-</sup>→NOまでの脱窒を担い、N<sub>2</sub>O→N<sub>2</sub>は *Rhodocyclaceae* 科が担うという、活性のある種それぞれ異なる可能性が示唆された。特に *Chromatiaceae* 科に関しては、接種した活性汚泥中では検出されない程の存在率 (0.01%以下) だったことを鑑みると、3.1の実験の裏付けとなる結果であるといえる。現在これらの細菌種の更なる解析と、集積バイオマスによる活性試験を行っている。

### 4. 結論・今後の展望

H<sub>2</sub>を電子供与体とする脱窒反応に関して、一般的な活性汚泥に用いてまず活性の検出を試みたところ、活性汚泥中の持ち込み有機物が除去された状態で、辛うじてNO<sub>3</sub><sup>-</sup>の脱窒活性の兆候を掴んだが、その活性は非常に低い可能性が示唆された。活性汚泥を種汚泥として、各窒素酸化物を連続供給した集積培養装置を運転したところ、それぞれの集積培養装置の流出水中の窒素酸化物濃度は有意に減少し、培養装置内で脱窒反応が起きていることが確認された。培養装置内に形成されたバイオフィルムの微生物群集構造解析を行った結果、それぞれの培養装置内でユニークな微生物叢を形成しており、各脱窒ステップを担う細菌種が異なることが示唆されている。

今後これらの集積培養装置のバイオマスから、優占種の純粋培養を試みることで、水素利用脱窒を担う細菌種の特定と生理活性の解明を行う予定である。これにより、微生物による脱窒反応のメカニズム解明はもとより、新たな栄養塩除去技術としての利用や展開が期待できる。

### REFERENCES

- 1) Galloway, *et al.*, *Science*, **320** (2008) 889-892.
- 2) Chang, *et al.*, *Biores. Technol.*, **69** (1998) 53-58.

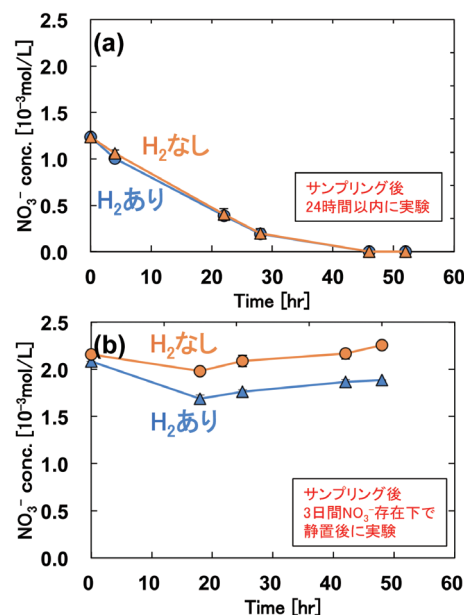


図2 H<sub>2</sub>添加によるNO<sub>3</sub>脱窒試験結果。

(a) フレッシュな汚泥。(b) 3日間静置後の汚泥をそれぞれ用いた。