

亜酸化窒素抑止型硝化脱窒処理に用いる好気脱窒細菌の生育条件 および脱窒活性の最適化

東北学院大学 工学部 学生会員 ○柴祐貴、東北学院大学 工学部 非会員 佐藤優太
東北学院大学 工学部 非会員 大坪和香子、東北学院大学 工学部 正会員 宮内啓介
東北学院大学 工学部 フェロー会員 遠藤銀朗

1. はじめに

亜酸化窒素 (N_2O) は CO_2 の約 310 倍もの温暖化効果をもつ温室効果ガスであり、成層圏のオゾン層の破壊の原因物質としても知られている。 N_2O 排出の多くが人為的活動に起因しているが、その中でも、有機性廃棄物の堆肥化や下・排水処理プロセスは N_2O の主要な発生源になっていると考えられている。

家畜糞尿の処理において、コストが抑えられることや管理が容易であることから、一槽式の間欠曝気式硝化・脱窒反応槽が一般的に用いられる。これは、一つの処理水槽の中で好気状態と嫌気状態を交互につくりだすことで、反応槽内の微生物による一連の硝化脱窒反応を行うことができるというシステムである。このシステムでは、好気状態から嫌気状態へと移行変わる際に、溶存酸素により反応槽内が微好気状態になってしまうことが多く、微生物による N_2O から N_2 への還元が抑制されることにより、脱窒の過程で大量の N_2O を発生すると推定されている。

このような問題の解決策の一つとして、脱窒の過程で N_2O を発生しない（完全な脱窒を行う）有用な脱窒細菌を反応槽内に導入（バイオオーグメンテーション）することにより、 N_2O 発生の抑止と効率的な脱窒処理を達成する方法が考えられる。そこで本研究では、微好気環境下で N_2O 抑止型の脱窒を行う能力をもつ特殊細菌 *Pseudomonas stutzeri* TR2 株に注目した。*P. stutzeri* TR2 をバイオオーグメンテーションに用いるためには、この菌株が脱窒槽内で生育・脱窒するための最適条件を明らかにする必要がある。そのため本研究では、脱窒基質濃度 (NO_3^- 濃度)、pH、温度、溶存酸素といった生理学的条件が *P. stutzeri* TR2 の生育にどのような影響があるのかを検討した。

2. 実験方法

2.1 *P. stutzeri* TR2 の脱窒による生育に及ぼす NO_3^- 濃度の影響を調べる試験

濃度が 20、25、35、50、75、100、150、200、300、400 mM となるように $NaNO_3$ を添加した DM 培地（脱窒培地、嫌気状態）を調製し、10 ml ずつ試験管（各濃度につき 3 本）に分注したものに *P. stutzeri* TR2 を植菌した。37℃のインキュベータ内で 5 日間静置培養し、その間 10 時間毎に吸光度 (OD_{600}) を測定した。濁度の対数値を培養時間に対してプロットした時の傾きから各条件における *P. stutzeri* TR2 の生育速度を算出した。

2.2 *P. stutzeri* TR2 の微好氣的生育に及ぼす pH の影響を調べる試験

pH5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.2、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5 となるように pH を調整した LB 培地を調製し、10 ml ずつ試験管（各 pH につき 3 本）に分注したものに *P. stutzeri* TR2 を植菌した。37℃のインキュベータ内で 24 時間静置培養し、2 時間毎に吸光度 (OD_{600}) を測定し、前述のように生育速度を算出した。

2.3 *P. stutzeri* TR2 の微好氣的生育に及ぼす培養温度の影響を調べる試験

LB 培地 (pH 7.2) を調製し、10 ml ずつ試験管（各温度につき 3 本）に分注したものに *P. stutzeri* TR2 を植菌し、15、20、25、30、35、37、40、45、50℃の各温度に設定したインキュベータ内で 24 時間振盪培養（好気条件）を行った。2 時間毎に吸光度 (OD_{600}) を測定し、その値をプロットした。前述のように生育速度を算出した。

2.4 *P. stutzeri* TR2 の好氣的生育または脱窒による生育に及ぼす培養温度の影響を比較する試験

1/5LB 培地および DM 培地（脱窒培地、嫌気状態）を調製し、10 ml ずつ試験管（各温度につき 3 本）に分注したものに *P. stutzeri* TR2 を植菌し、25、28、30、33、37℃の各温度に設定したインキュベータ内で 30 時間静置培養を行った。2 時間毎に濁度 (OD_{600}) を測定し、前述のように生育速度を算出した。

2.5 *P. stutzeri* TR2 の脱窒による生育に及ぼす培養開始時の酸素濃度の影響を調べる試験

DM 培地（脱窒培地、嫌気状態）を調製し、10 ml ずつ試験管（各酸素濃度につき 3 本）に分注したものに、ヘッドスペース（約 16.5 ml）の 0、1、5、10、20%量となるように、酸素標準ガスをガスタイトシリンジで注入した。各試験管に *P. stutzeri* TR2 を植菌し、30℃に設定したインキュベータ内で 40 時間静置培養を行った。2 時間毎に濁度 (OD_{600}) を測定し、その値を培養時間に対してプロットした。

3. 実験結果と考察

3.1 *P. stutzeri* TR2 の生育至適 NO_3^- 濃度

今回調べた NO_3^- 濃度の範囲では、培地中の NO_3^- 濃度が 150 mM の条件において *P. stutzeri* TR2 株の増殖速度が最大になることが明らかになった。一方、培地中の NO_3^- 濃度が 0~35 の低濃度や 300 および 400 mM の高濃度である場合は、*P. stutzeri* TR2 の生育が全く見られなかった。50 または 200 mM の NO_3^- 濃度においては、*P. stutzeri* TR2 の増殖は見られたが、増殖速度は抑えられていた。全体的には、*P. stutzeri* TR2 は NO_3^- 濃度が 75 mM を越えると高い増殖が見られ、200 mM を越えると増殖が抑えられることから、*P. stutzeri* TR2 が脱窒反応槽内で効率的な生育・脱窒を行うためには、反応槽内の NO_3^- 濃度を 75 mM~150 mM の範囲で調節することが望ましいと考えられる。

3.2 *P. stutzeri* TR2 の生育至適 pH

Fig. 1 に示したように、*P. stutzeri* TR2 株の好気条件における生育速度は中性 pH 付近で最大になることが明らかになった。一方、培地が弱い酸性 (pH5.0~6.5) または弱いアルカリ性 (pH8.5~9.5) である場合、ある程度の増殖は見られたが、最適 pH 条件時の生育速度とは明らかな差が見

られた。以上の結果により *P. stutzeri* TR2 株が脱窒反応槽内で効率的な生育・脱窒を行うためには、反応槽内の pH を pH7.0~8.0 の範囲で調節することが望ましいと考えられる。

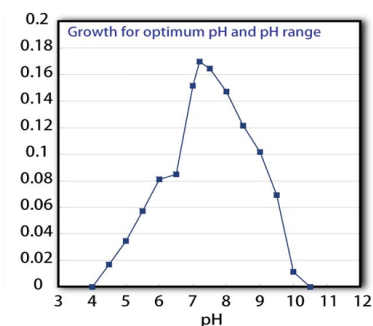


Fig. 1 *P. stutzeri* TR2 の生育特性 (pH による変化)

3.3 *P. stutzeri* TR2 の生育至適温度

Fig. 2 に示したように、*P. stutzeri* TR2 の好気条件における生育速度は培養温度が 40℃の時に最大になることが明らかになった。15℃という低温や 45、50℃の高温条件では、*P. stutzeri* TR2 の生育は全く見られなかった。25℃から 40℃の温度範囲では安定した生育速度で増殖するという性質は、他の多くの *Pseudomonas* 属細菌と一致する性質である。以上の結果から、*P. stutzeri* TR2 が脱窒反応槽内で効率的な生育・脱窒を行うためには、反応槽内の温度を 30℃から 40℃の範囲で設定することが望ましいと考えられる。

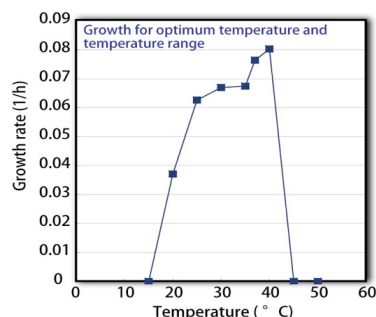


Fig. 2 *P. stutzeri* TR2 の生育特性 (温度による変化)

3.4 電子受容体の違いによる *P. stutzeri* TR2 の生育至適温度の変化

Fig. 3 に示したように、*P. stutzeri* TR2 の好気条件において、培養温度が 30℃から 37℃にかけて生育速度が上昇し、30℃以下の培養温度では生育速度の低下が見られた。これに対し、嫌気脱窒条件では *P. stutzeri* TR2 の生育速度は 25℃から 30℃の培養温度において最大になり、30℃を越えると生育速度が著しく低下することが観察された。これにより、*P. stutzeri* TR2 は酸素を電子受容体として生育する場合 (好気条件) と硝酸 (HNO_3) を電子受容体として生育する場合 (脱窒条件) とでは、至適生育温度が異なることが明らかになった。以上の結果から、好気条件と嫌気脱窒条件が繰り返される反応槽では、*P. stutzeri* TR2 の生育条件に応じた温度の調整が必要である可能性が示唆された。

3.5 *P. stutzeri* TR2 の生育に及ぼす酸素濃度の影響

Fig. 4 に示したように、試験管のヘッドスペースに添加した酸素濃度が 10%までの範囲においては、*P. stutzeri* TR2 の増殖開始が酸素濃度が高くなるにつれて早くなり、生育後の菌体量も多くなることが明らかになった。一方、

培養開始時の酸素濃度がほぼ大気中と同じであるような (20%) 条件では、酸素濃度が 10%の時と同程度の良好な生育が見られる一方で、増殖曲線が 2 段階になっていることから、*P. stutzeri* TR2 の好気呼吸から脱窒 (無酸素硝酸呼吸) への迅速な切り替えが起こっていた可能性もある。以上の結果から、酸素の存在が *P. stutzeri* TR2 の脱窒条件における増殖を促進することが明らかになった。これは反応槽の酸素濃度が *P. stutzeri* TR2 の生育に大きな影響を与える可能性を示唆している。

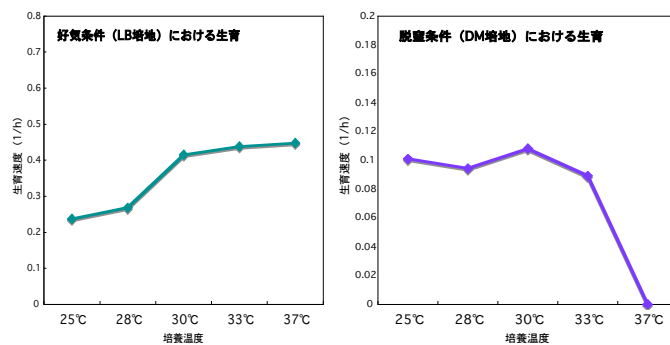


Fig. 3 *P. stutzeri* TR2 の好気条件 (左) および無酸素硝酸呼吸条件 (右) における生育特性の違い (温度の影響)

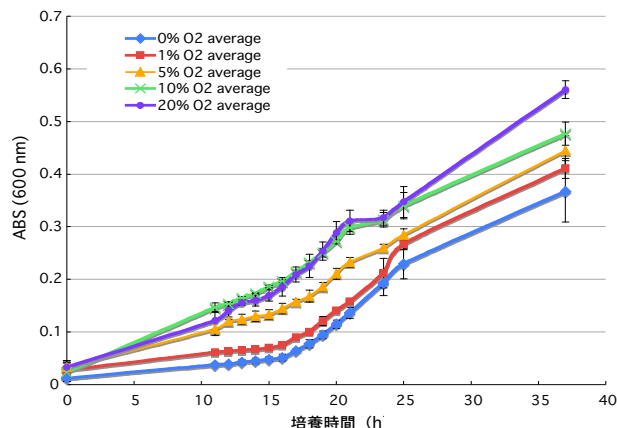


Fig. 4 *P. stutzeri* TR2 の硝酸還元による生育の特性 (培養開始時の酸素濃度の影響)

4. おわりに

本研究では、*P. stutzeri* TR2 の脱窒反応槽内における生育最適条件を検討し、基本的な条件を明らかにすることができた。今後の研究では、実際に *P. stutzeri* TR2 を硝化脱窒反応槽にオーグメンテーションし、本研究で得られた条件で反応槽を運転することにより、酸素残存条件下でも N_2O の発生抑制と効果的な脱窒処理が可能であるかどうかを検討する予定である。

5. 謝辞

本研究は、生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業「温室ガス抑止のための窒素バイオマス再生・浄化システムの構築」の助成を受けて行われたことを記し、感謝の意を表します。

参考文献

- 1) N. Takaya, M. A. B. Catalan-Sakairi, Y. Sakaguchi, I. Kato, Z. Zhou, and H. Shoun. (2003) Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. Appl Environ Microbiol 69(6): 3152–3157