

耐酸素性脱窒細菌の活用による N₂O 発生抑制型 脱窒素プロセスの開発に関する研究

東北学院大学工学部学生会員○白取早恵、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

高濃度の窒素成分を含む廃水処理系において、主要な温室効果ガスである亜酸化窒素 (N₂O) が発生することが問題視されている。N₂O は、他の温室効果ガスと比べて排出量は 7.9% と少ないが、二酸化炭素 (CO₂) の約 310 倍の温室効果を持つため、その排出量増加は地球温暖化に大きく寄与する。

廃水処理系では、間欠曝気式の硝化・脱窒反応槽が広く用いられており、酸素—無酸素環境が交互に形成される。このようなシステムでは、硝化槽から脱窒槽への酸素の混入は避けられず、脱窒槽内の微量溶存酸素は脱窒細菌の保有する N₂O 還元酵素の活性を阻害し、大量の N₂O 発生の要因となる。このため、本研究では、微量酸素存在下においても、効率的な N₂O 還元を行う脱窒細菌を利用することにより、新規の N₂O 発生抑制型のバイオリアクターを構築することを目的とした。本講演では、将来的にバイオオーグメンテーションへの利用を予定されている特殊脱窒細菌 *Pseudomonas stutzeri* TR2 株の生育特性および N₂O 抑止効果に関する研究結果を発表する。

2. 実験方法

2.1 耐酸素性脱窒細菌 *Pseudomonas stutzeri* TR2 株の生育特性と N₂O 発生の比

異なる濃度 (1 mM, 5 mM, 10 mM) の硝酸塩または亜硝酸塩を加えた 1/5LB 液体培地を用いて無酸素条件下で TR2 株を培養した。事前に前培養と本培養を行い、嫌気状態にした試験管に本培養液 (TR2 株) を加え、30℃ のインキュベーターで静置状態で 1 時間または 30 分おきに濁度を測定した (O.D.600)。対数増殖期後期にヘッドスペースの気体をガスクロマトグラフィー (TCD) に注入し N₂O 発生量を測定経過時間に伴う濁度の変化について得られた増殖曲線と N₂O 発生量を比較し、TR2 株が優勢的に生育可能であり N₂O の発生が少ない培養条件を明らかにした。

2.2 *Pseudomonas stutzeri* TR2 株と対照株 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株の混合培養における生育特性と N₂O 発生率の比較

バイオオーグメンテーション実験の前段階として TR2 株と同じ *Pseudomonas* 属の好気性脱窒細菌 *Pseudomonas*

aeruginosa PAO1 株を比較対象として混合培養した。TR2 株と PAO1 株を加えて、2.1 と同様の手順で TR2 株が優勢的に生育可能であり N₂O の発生が少ない培養条件を明らかにした。

3. 実験結果と考察

3.1 耐酸素性脱窒細菌 *Pseudomonas stutzeri* TR2 株の生育特性と N₂O 発生率の比較

亜硝酸を脱窒基質として与えた方が増殖し易く、硝酸を脱窒基質として与えた場合には誘導期から対数期に移行するまでの挙動は異なるが、対数増殖期ではほぼ同じ速度で増殖し O.D. 値も高かった。しかし、脱窒基質濃度を変えることで O.D. の最大値が変化することが示唆された。

亜硝酸を脱窒基質として与えた場合の O.D. の最大値は濃度に比例して高くなるが、硝酸を脱窒基質として与えた場合の O.D. の最大値は濃度に反比例して低くなることから、TR2 株は硝酸の毒性に対する耐性が弱いことが示唆された。

以上のことから、TR2 株と PAO1 株の混合培地で培養する場合には脱窒基質濃度 5 mM の場合に N₂O の発生を抑えられる可能性が示唆された。

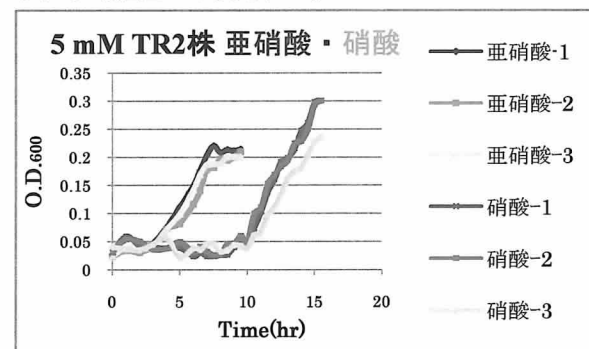


Fig.1 5 mM の TR2 株の増殖曲線

3.2 TR2 株と対照株 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株の混合培養における生育特性と N₂O 発生率の比較

誘導期の増殖速度はほぼ同じだが、対数期の増殖速度は硝酸を脱窒基質として与えた場合の方が速かった。1mM の亜硝酸を加えた場合にはあまり増殖しなかったが 10mM の硝酸を脱窒基質として与えた場合には TR2 株よりも PAO1 株の方が増殖し易いことが分かった。したがって、亜硝酸を脱窒基質として与えた場合に増殖し易い TR2 株

にとって脱窒基質濃度が低いと生育障害が起こり、脱窒基質濃度が高いと増殖速度に反比例して定常期に入る O.D. 値が低くなるため脱窒基質である硝酸の毒性の影響または栄養源である脱窒基質を全て吸収したなどの可能性が示唆された。また、ガスクロマトグラフィーの結果より TR2 株と PAO1 株を加えて亜硝酸を脱窒基質として与えた培地の場合にのみ N_2O は発生しなかった。

以上のことから、TR2 株と PAO1 株の混合培地では 5mM の亜硝酸を脱窒基質として与えた場合には N_2O を発生させずに完全脱窒を終了し TR2 株が優勢に活動できる環境下である可能性が示唆された。

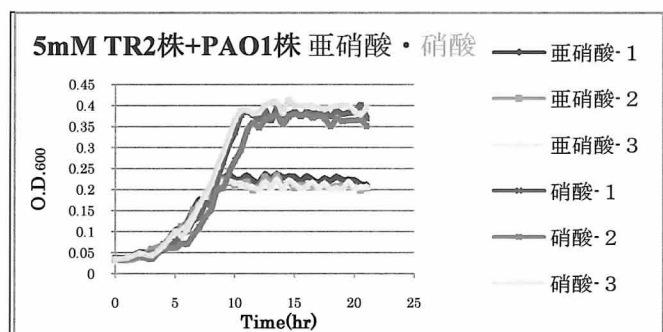


Fig2 5mMのTR2株+PAO1株の増殖曲線

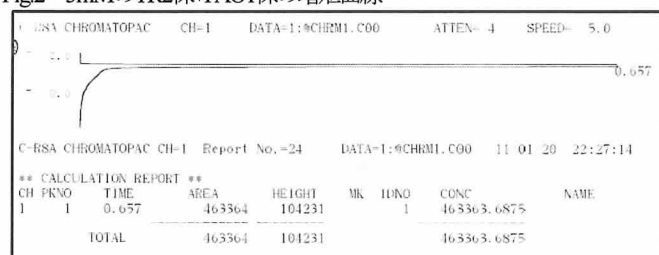


Fig3 ガスクロマトグラフィー結果 (TR2株+PAO1株)

4. おわりに

本研究では、微生物を用いた廃水処理システムにおいて脱窒基質濃度 5 mM で亜硝酸を脱窒基質として与えた場合に最も TR2 株が優勢的に活動できる環境下である可能性が示唆された。今後の研究では、バイオオーグメンテーション実験を行うにあたり、更に細かく培養条件について検討し明らかにしていく予定である。

5. 謝辞

本研究は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業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

- Takaya et al(2003), Aerobic Denitrifying Bacteria That Produce Low Levels of Nitrous Oxide, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 69, 6, p. 3152-3159
- Miyahara et al (2010), Potential of Aerobic Denitrification by *Pseudomonas stutzeri* TR2 To Reduce Nitrous Oxide Emissions

from Wastewater Treatment Plants, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 76, 14, p. 4619-4625