

好気脱窒細菌 *P.stutzeri* TR2 株の導入による N₂O 発生抑制技術の開発に関する研究

東北学院大学	工学部	学生会員	齋藤邦仁
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

排水処理プロセス等からの N₂O の発生は、主要な温室効果ガスによる温暖化要因の 7.9% を占めると言われている。N₂O 同量の二酸化炭素(CO₂)の約 310 倍の温室効果をもっている。またその寿命は約 100 年と長く化学的に安定なため対流圏内ではほとんど消滅せず、成層圏へ輸送され結果的にオゾン層の破壊物質となることが指摘されている。

小規模の廃水処理場では、間欠曝気式の硝化・脱窒反応槽が広く用いられており、この反応槽では酸素一無酸素環境が交互に形成される。このような条件下では、硝化槽から脱窒槽への溶存酸素の流入は避けられず、脱窒槽内の溶存酸素の存在は脱窒細菌が保有する N₂O 還元酵素の活性を阻害する。このことが脱窒反応槽における N₂O 発生の要因となると考えられる。

本研究では、微量酸素存在下においても、効率的に N₂O の還元を行う脱窒細菌を利用することにより、新規の N₂O 発生抑制型バイオリクターを開発することを目的とした。本発表では、微好気条件下でも活性が阻害されない耐酸素性 N₂O 還元酵素を保有する特殊脱窒細菌 *Pseudomonas stutzeri* TR2 株を用いて、その生育特性および活性汚泥に導入するモデル実験を行い、N₂O 抑制効果に関する研究結果を紹介する。

2. 実験方法

2.1 好気脱窒細菌 *P.stutzeri* TR2 株の異なる脱窒気質条件下での生育特性

異なる濃度(0 mM、0.2 mM、1 mM、5 mM、10 mM、20 mM)の硝酸塩または亜硝酸塩の 1/5LB 液体培地を用いて TR2 株の培養実験を行った。TR2 株は事前に前培養と本培養を行い、バイアルビン(5 ml)の中は Ar ガスで置換し嫌気状態にした。バイアルビンに本

培養した TR2 株培養液 100 μl と酸素 100 μl 加え、自動 O.D.測定器で測定を行い TR2 株の生育特性を調べた。

2.2 *P.stutzeri* TR2 株による N₂O 除去能の評価

TR2 株を液体培養したものとグランガムによって固定化した TR2 株を使用し N₂O が除去されるか検討した。他の脱窒菌と TR2 株を混ぜたもの、TR2 株だけのもの、TR2 株を固定化したものと 3 つの細菌培養を用意し、脱窒基質として硝酸塩または亜硝酸塩を加えた 1/5LB 液体培地で培養し、N₂O 発生の有無をヘッドスペースガスの成分をガスクロマトグラフィーによって確認した。

2.3 活性汚泥に添加した TR2 株の N₂O 発生抑制

20 日間ほどスキムミルクを投入して増殖させた活性汚泥を使用し、正常に微生物が育っていることを顕微鏡により確認した。その活性汚泥を三角フラスコに移し、脱窒基質として硝酸カリウムまたは亜硝酸カリウムを加え、脱窒用還元基質としてコハク酸二ナトリウムを与えて 1 夜培養し、窒素ガスの発生を確認した。脱窒活性が十分であることを確認できたものについて、液体培養した TR2 株を加えてヘッドスペースをアルゴンガスで置換した後に 25°C で攪拌しながら培養して、その後の窒素ガスと N₂O の発生量を測定した。

結果および考察

3.1 好気脱窒細菌 *P.stutzeri* TR2 株の生育特性の比較の結果

亜硝酸を脱窒基質として与えた場合は増殖の立ち上がりが高く、硝酸を脱窒基質として与えた場合には増殖の立ち上がりが遅かった。ただし硝酸を与えた場合の方が O.D の到達値は高かった。

また脱窒基質の濃度が濃いものほど O.D の値は高くなり、硝酸で培養を続けていても O.D の値は保ったままだったが、亜硝酸で培養した TR2 は長時間培養してピークを過ぎた後は O.D の低下が見られた。

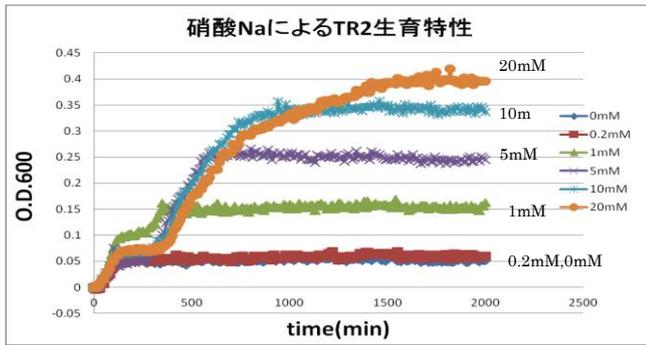


Fig.1-1 硝酸 Na を基質とした場合の TR2 株の生育特性

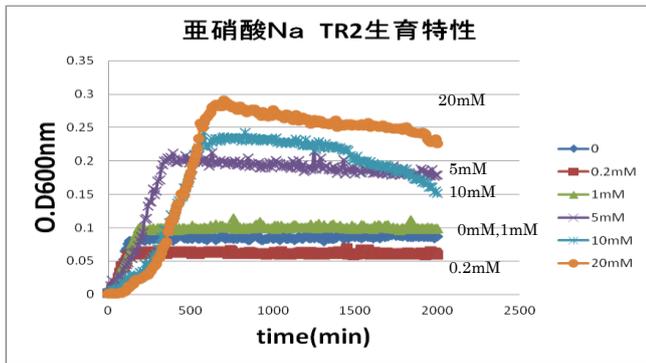


Fig.1-2 亜硝酸 Na を基質とした場合の TR2 株の生育特性

3-2P. stutzeri TR2株による N₂O 除去能の評価の結果

他の脱窒菌に TR2 株を添加して脱窒反応を行わせた場合、亜硝酸塩を脱窒基質として与えたものは N₂O が検出されず発生が抑制された。硝酸を脱窒基質として与えた際には N₂O が検出され発生の抑制はみられなかった。

次に、TR2 株が脱窒過程において N₂O を吸収し脱窒によって N₂O を N₂ に変換できるかどうか調べた。その結果、TR2 株は用いた脱窒基質に関係なく事前に加えた N₂O を N₂ に変換する能力を有すると考えられた。(Fig.2-1 および Fig.2-2)

脱窒反応槽内での菌体量維持を目的として TR2 株をゲランガムによって固定化した場合にはどの条件でも N₂O の減少はみられなかった。

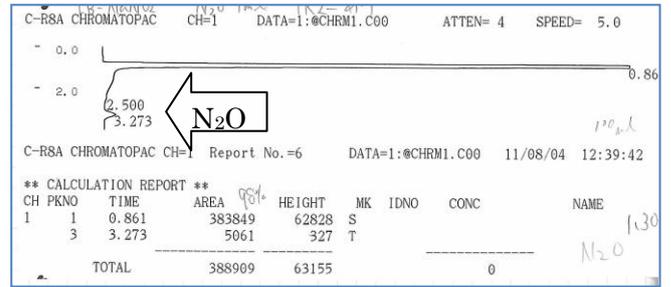


Fig. 2-1 ガスクロによる N₂O 分析結果(TR2 株添加の場合)

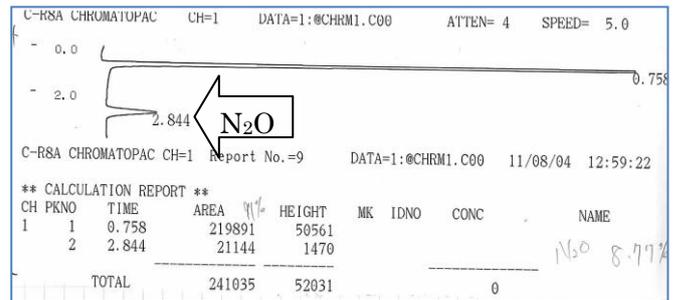


Fig. 2-2 ガスクロによる N₂O 分析結果(TR2 株なしの場合)

3-3 活性汚泥に添加した TR2 株の N₂O 発生抑制の評価結果

硝酸塩を基質とした場合に活性汚泥の TR2 株の添加により脱窒過程での N₂O 発生の抑制がみられた。これ以外の結果については、発表時に報告したい

3. おわりに

微好気条件下でも脱窒機能を発揮することができる特殊脱窒細菌である P. stutzeri TR2 株は、亜硝酸および硝酸を脱窒基質として脱窒反応条件下で同等の増殖が可能であった。特に、亜硝酸からの脱窒においては N₂O の発生を伴うことなく脱窒を行い、N₂O 発生抑制型脱窒を行うことが知られた。

また、N₂O 存在下ではその N₂O を取り込み N₂ にまで変換することから、TR2 株は N₂O の除去にも役立つと考えられる。

今後は、このような能力を持つ TR2 株を硝化脱窒活性汚泥中に導入して、N₂O 発生抑制型の生物学的硝化脱窒プロセスを構成するなど、その有効な活用方法について研究を行いたいと考えている。