

硝化脱窒プロセスからの亜酸化窒素還元酵素保有細菌の単離に関する研究

東北学院大学 工学部 学生会員 ○佐賀武
同上 非会員 大坪和香子
同上 正会員 宮内 啓介
同上 フェロー会員 遠藤銀朗

1.はじめに

廃水処理プロセス等から発生する亜酸化窒素(N_2O)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。 N_2O は同量の二酸化炭素の約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、結果的に主要なオゾン層の破壊物質となることが指摘されている。

廃水処理場では、循環式間欠曝気式の硝化・脱窒反応槽が広く用いられており、これらの反応槽では酸素—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が避けられず、脱窒槽内の溶存酸素の存在は通常の脱窒細菌が保有する N_2O 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 N_2O 発生の要因となると考えられている。

脱窒反応槽における N_2O 発生抑制をするために、好気環境下においても高い N_2O 還元能力を有し、 N_2 までの完全脱窒を行う脱窒細菌として*Pseudomonas stutzeri* TR2株が知られている。しかし、*P. stutzeri* TR2株は水田土壌より単離された脱窒細菌であり、富栄養培地における形質の変化や、污水处理システムへの導入の際の脆弱性が懸念されている。

本研究では、排水処理システム由来の活性汚泥から、脱窒細菌を好気条件、亜硝酸存在下においてスクリーニングすることにより、TR2株と同様に亜硝酸に耐性があり、酸素存在下において高い脱窒能力を有するだけでなく、リアクター中の生残能が高い脱窒細菌株を単離・同定することを目的とした。また、TR2株と比較することにより N_2O 発生抑制能力に優れた脱窒細菌を発見を目的とした。

2.実験方法

2-1 *Pseudomonas stutzeri* TR2株の生育特性の確認

N_2O を脱窒源基質(電子受容体)として与えた場合の*P. stutzeri* TR2株の生育特性を明らかにすること

により、本菌株の N_2O 還元除去能力の評価をした。

TR2株を N_2O 、硝酸、亜硝酸を電子受容体として添加した培地を用いて好気条件下で培養し、培養液の吸光度(OD)を測定し増殖曲線を求めた。各培養条件から得られた増殖曲線の対数増殖が開始するまでの時間、対数増殖期における増殖速度(傾き)および到達最大濁度を比較することにより、本菌株の N_2O を電子受容体とした場合の増殖特性を明らかにした。

2-2 酸素存在下においても優れた脱窒能力を有する新規脱窒細菌株の単離と同定

排水処理システム由来の活性汚泥から、脱窒細菌を好気条件、亜硝酸存在下においてスクリーニングすることにより、TR2株と同様に亜硝酸に耐性があり、酸素存在下において高い脱窒能力を有するだけでなく、リアクター中の生残能が高い脱窒細菌株を単離し保存した。単離した脱窒細菌の16S rRNA遺伝子のPCR増幅および塩基配列決定により脱窒細菌の種を特定し、*nosZ*遺伝子のPCR増幅および塩基配列決定により N_2O 還元酵素の有無について調べた。

2-3

単離した*Ochrobactrum*属新規脱窒細菌の生育特性

活性汚泥から亜硝酸に耐性があり、酸素存在下でも脱窒を行い、 N_2O を還元する新規に単離した*Ochrobactrum*属の脱窒細菌株(株名:OD3、OD6、OD18、P4-2)を、 N_2O 、硝酸および亜硝酸を電子受容体として添加した培地を用いて好気条件下で培養し、培養液の吸光度(OD)を測定し増殖曲線を求めた。各培養条件から得られた増殖曲線の対数増殖が開始するまでの時間、対数増殖期における増殖速度(傾き)および到達最大濁度を比較することにより、*P. stutzeri* TR2株と新規に単離した*Ochrobactrum*属の脱窒細菌株のざうしょく特性の相違点について考察した。

3. 実験結果と考察

3-1 *Pseudomonas stutzeri* TR2 株の生育特性の確認

3 種の脱窒基質を与えた場合の TR2 株の増殖を Fig.1 に示す。TR2 株は脱窒の際に N_2O を発生させないだけではなく、積極的に外部の N_2O を取り込み還元する能力を有することが明らかになった。この結果は、本菌株が N_2O 除去技術への利用に適しているという過去の知見を裏付けるだけではなく、好氣的脱窒細菌の生育特性に関する新知見であると考えられる。

今後の課題としては、*P. stutzeri* TR2 株は連続的な培養システムにおいて脱窒および亜酸化窒素からの窒素変換を効率よく行う事が出来るかになるだろう。

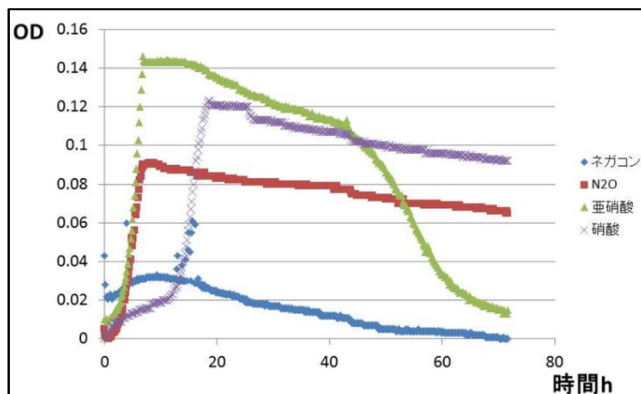


Fig1. N_2O 、亜硝酸、硝酸を電子受容体として与えて生育した TR2 の生育曲線

3-2 酸素存在下においても優れた脱窒能力を有する新規脱窒細菌株の単離と同定

排水処理システム由来の活性汚泥から、好気条件、亜硝酸存在下においてスクリーニングすることにより、*P. stutzeri* TR2 株と同様に亜硝酸に耐性があり、酸素存在下において高い脱窒能力を有するだけではなく、リアクター中の生残能が高いと考えられる脱窒細菌株を 20 株、および能力が未知数である脱窒細菌を 3 株単離することができた。また、各脱窒細菌から単離した 16S rRNA 遺伝子と *nosZ* 遺伝子のほとんどは、*Ochrobactrum* という脱窒細菌が持つ 16S rRNA 遺伝子および *nosZ* と近縁であることが判明した。

3-3 単離した *Ochrobactrum* 属新規脱窒細菌の生育特性

Fig2. に示すように、活性汚泥から本研究で単離した *Ochrobactrum* 属新規脱窒細菌は、微好気条件下においても硝酸、亜硝酸、 N_2O を電子受容体として

優れた脱窒能力を発揮できることが明らかになった。 N_2O を電子受容体として与えた時に良好な生育が見られた OD3、OD6、OD18 の 3 菌株は、将来的な N_2O 削減技術への利用が期待される。一方、亜硝酸や硝酸を脱窒気質とした場合 P4-2 株は、OD3、OD6、OD18 の 3 菌株よりも最大 OD 値が高く、これらの電子受容体が高濃度で含まれる排水処理系では高い脱窒還元能力を示すことが期待される。P4-2 株 OD3、OD6、OD18 の 3 菌株では N_2O を電子受容体とした生育に明らかな差異が見られたが、P4-2 株は亜硝酸耐性細菌を汚泥中から選別・単離したものに対し、OD3、OD6、OD18 の 3 菌株はさらに N_2O を唯一の電子受容体として生育できる脱窒細菌を選別し、単離した結果だと考えられる。

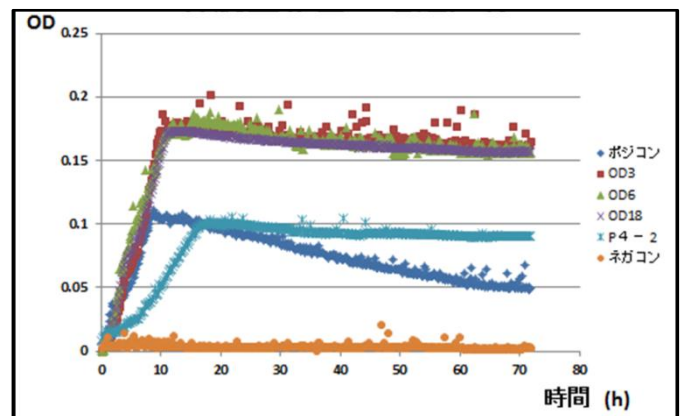


Fig2. N_2O を電子受容体として生育させた時の TR2 株と、新規に単離した *Ochrobactrum* 属脱窒細菌の生育曲線

4. おわりに

本研究で新規に単離した *Ochrobactrum* 属脱窒細菌は、微好気条件下においても硝酸、亜硝酸および N_2O を電子受容体として、優れた脱窒能力を発揮できることが明らかになった。

今後の課題としては、生育特性を明らかにした *Ochrobactrum* 属細菌の OD3、OD6、OD18、P4-2 のリアクタースケールの培養を行うことにより、各脱窒細菌が実際の污水处理システムに近い条件で微好気条件下において、硝酸、亜硝酸および N_2O を電子受容体として優れた脱窒能力を発揮できるかを検討することが必要だと考えられる。