

高い N₂O 還元能力を有する脱窒細菌の酸素存在下における N₂O 発生の抑制に関する研究

東北学院大学 工学部 学生会員 ○鈴木 拓磨

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 (N₂O) は、全温暖化要因の 7.9% を占める主要な温室効果ガスである。N₂O は等量の二酸化炭素 (CO₂) と比較した場合に約 310 倍の温室効果があるだけではなく、対流圏における寿命が約 100 年と長く安定であるため成層圏へ輸送され、オゾン層の破壊物質とも成り得ることが指摘されており、早急な発生量削減が求められている。

廃水処理システムでは、小規模の廃水処理場で広く用いられる間欠曝気式の硝化・脱窒反応槽が N₂O の発生源の一つとなっている。この反応槽では、酸素一無酸素環境が交互に形成されるため、硝化槽から脱窒槽へ流入した溶存酸素が脱窒細菌の N₂O 還元活性を阻害し、N₂O の発生を引き起こすと考えられている。

そこで我々は、微好気環境下においても高い N₂O 還元能力を有する脱窒細菌を脱窒反応槽に投入するバイオオーグメンテーションによる N₂O 発生抑制について検討し、これまでに好気脱窒細菌 *Pseudomonas stutzeri* TR2 株を用いたパイロット実験を行ってきた (Ikeda-Ohtsubo et al., 2013)。しかし、本菌株は水田土壌より単離された脱窒細菌であるため、富栄養条件下における形質発現の不安定性や、汚水処理システムにおける生残性の低さが課題となった。そこで我々は、廃水処理槽の活性汚泥から、*P. stutzeri* TR2 株と同等またはより優れた N₂O 還元能力を有する *Ochrobactrum* sp. TS6 株を単離した (平成 24 年度土木学会東北支部技術研究発表会、佐賀ら)。本研究は、本菌株の脱窒条件における生育特性を明らかにし、N₂O 発生抑制手法への利用における適性を評価することを目的とした。

2. 実験方法

2-1 電子受容体として亜硝酸および N₂O を与えた条件における *Ochrobactrum* sp. TS6 株の生育特性

バイアル瓶内に液体 DM 培地 (組成: コハク酸ナトリウム 0.47%、KH₂PO₄ 0.15%、Na₂HPO₄ 0.04%、NH₄Cl 0.06%、カザミノ酸 0.50%、Trace Element Solution 0.2%) を調製し、ヘッドスペースをアルゴンガスで置換後にブチルゴム栓で密閉することにより、嫌気条件とした。オートクレーブ滅菌後に、脱窒源基質 (電子受容体) として何も添加しないもの (比較対照)、亜硝酸 (NaNO₂) を添加したもの、および N₂O を添加したものを準備した。微好気条件にする場合は純酸素をヘッドスペースの 1%、完全嫌気条件の場合は塩酸システイン溶液をさらに添加した。培養実験は、*Ochrobactrum* sp. TS6 株の前培養液を体積比で 1% 添加し、自動 OD 測定装置 (ADVANTEC 社) にセットした後、660 nm の濁度 (OD) の変化を 72 時間計測することにより行った。生育特性の評価は、対数増殖の開始時期、対数増殖期の増殖速度、および最大到達 OD から評価した。

2-2 *Ochrobactrum* sp. TS6 株の亜硝酸への耐性評価

DM 培地の調製を上記と同様に行い、脱窒源基質 (電子受容体) として、亜硝酸 (NaNO₂) を 5 mM、10 mM、20 mM、50 mM、100 mM となるように添加した。培養実験は、上記と同様に行った。

2-3 *Ochrobactrum* sp. TS6 株の保有する N₂O 還元酵素遺伝子 *nosZ* のクローニング

TS6 株の培養液から、DNA 抽出キット (QIAGEN 社) を用いてゲノム DNA を調製した。この抽出 DNA を鋳型とし、Fw プライマー: *nosZ* 1RM (0.5 pmol) と Rv プライマー: *nosZ* UNIVFw (0.5 pmol) を用いて、N₂O 還元酵素遺伝子 *nosZ* を PCR 増幅した。

キーワード: 微生物 N₂O 脱窒

連絡先: 宮城県多賀城市中央 1 丁目 13 番 1 号東北学院大学 遠藤銀朗研究室

TEL: 022-368-7493

PCR 産物を DynaExpress クローニングシステム (Biodynamics 社) を用いて大腸菌にクローニングし、コロニーPCR を行うことにより、TS6 株の *nosZ* を保有するクローンを選択した。得られたクローンの *nosZ* の塩基配列をシーケンス解析により決定し、既知の配列と BLASTX 検索により比較し、近縁種および分類学的位置付けを決定した。

3. 実験結果と考察

3-1. 電子受容体として亜硝酸および N_2O を与えた条件における *Ochrobactrum* sp. TS6 株の生育特性

TS6 株は亜硝酸および N_2O を電子受容体として良好に生育した (Fig. 3-1.)。亜硝酸を電子受容体とした場合の最大到達 OD は、0.2 以上であり、*P. stutzeri* TR2 株よりも高い増殖収率が得られた。また、 N_2O を電子受容体にした場合には、亜硝酸を電子受容体とした条件に比べて生育速度は低下したものの、最大到達 OD は 0.14 に達し、定常状態も安定していた。

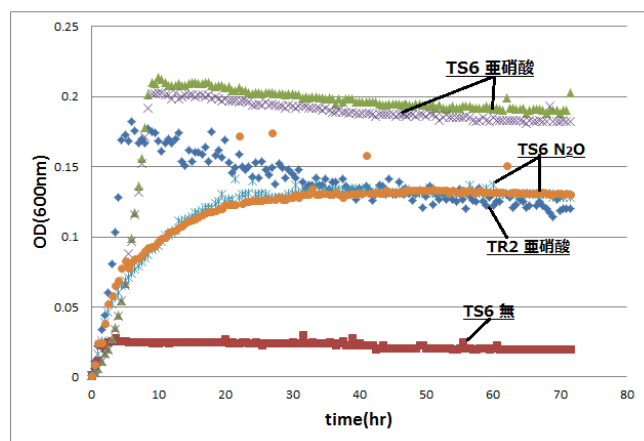


Fig.3-1. TS6 株の亜硝酸、 N_2O を電子受容体とした生育曲線

3-2 *Ochrobactrum* sp. TS6 株の亜硝酸への耐性評価

TS6 株は一般的な脱窒細菌の生育を阻害する 50 mM 以上の高い亜硝酸濃度においても良好に生育することが明らかとなった (Fig. 3-2.)。この結果は、ヘッドスペース中の酸素濃度を変化させた場合 (0% ~ 3%) も変わらなかったため、本菌株が嫌気状態、微好機状態においても亜硝酸を電子受容体として良好に生育できることが知られた。

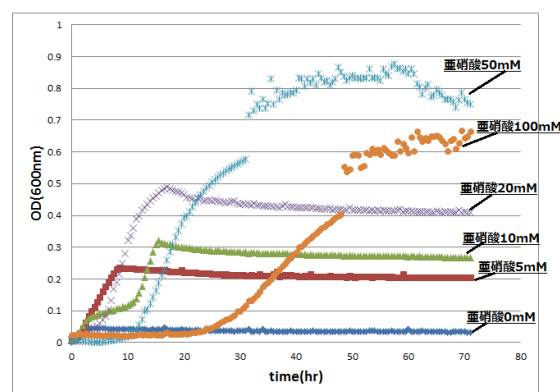


Fig.3-2. TS6 株の亜硝酸を電子受容体とした際の生育曲線

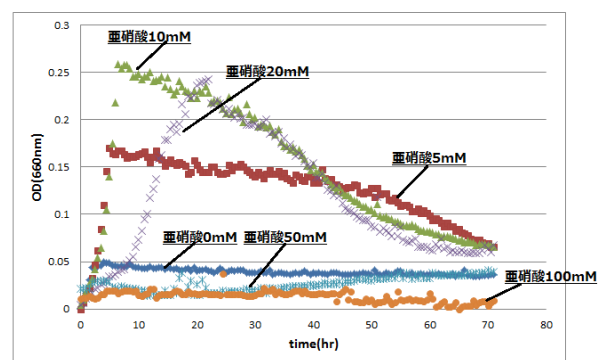


Fig.3-3. TR2 株の亜硝酸を電子受容体とした際の生育曲線

3-3 *Ochrobactrum* sp. TS6 株の *nosZ* 遺伝子の同定

Ochrobactrum sp. TS6 株の *nosZ* 遺伝子約 200bp の塩基配列を決定したところ、日和見感染の原因ともなる環境細菌 *Ochrobactrum anthropi* の保有する *nosZ* と 98% の相同性を示した。*O. anthropi* は脱窒細菌としての生態はほとんど知られていないが、本研究結果から、 N_2O 還元酵素が *Ochrobactrum* 属細菌において保存されていることが知られた。

4. おわりに

本研究では、*Ochrobactrum* sp. TS6 株が、微好気条件下においても亜硝酸、 N_2O を電子受容体として良好に生育し、高濃度の亜硝酸にも耐性を示すことを明らかにした。これらの結果から、TS6 株は TR2 株よりも優れた脱窒細菌であり、 N_2O 発生抑制を目的としたバイオオーグメンテーションへの利用が期待できることが知らされた。今後の課題として、TS6 株を実際の污水处理システムに導入した際の N_2O 還元能力を評価し、本菌株を用いた N_2O 発生抑制システムの開発に有効に活用できるかどうかを確認する必要がある。