

亜酸化窒素発生を抑制する微生物の増殖特性解析と活用に関する研究

東北学院大学 工学部 学生会員 ○佐藤安希、東北学院大学 工学部 非会員 本多俊樹
東北学院大学 工学部 非会員 山家拓朗、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 フェロー会員 遠藤銀朗

1. はじめに

亜酸化窒素(N_2O)は、同量の二酸化炭素(CO_2)の約310倍の温室効果をもっており、主要な温室効果ガスとして全温暖化要因の6.2%を占めると言われている^[1]。 N_2O は非常に安定した性質で大気中に約100年と長く滞留するため、対流圏内ではほとんど消滅せずに成層圏へ輸送され、結果としてオゾン層の破壊物質となることが指摘されている^[2]。これらのことより、 N_2O 発生削減技術の開発が必要とされている。

工業廃水や畜産廃水などの廃水処理場では、生物学的硝化・脱窒反応法が広く用いられているが、この方法では酸素-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 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 発生の要因と考えられている。

本研究は、 N_2O を N_2 に還元する能力を持つ脱窒細菌を利用した N_2O 除去技術の開発に必要な知見を得ることを目的として行った。本発表では、 N_2O の除去に有効と考えられる脱窒細菌 *Bacillus* sp.SS1株・*Ocrobactrum* sp.TS6株・*Pusilimonas* sp.S-14株の3種について、脱窒基質による増殖特性、 N_2O の還元除去特性、脱窒基質消費特性および N_2O 発生抑制の効果に関する研究の結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 脱窒基質の違いによる増殖特性の解析

微好気条件化でも脱窒を行う細菌として単離されたSS1株・TS6株・S-14株の3種の各菌株に、脱窒基質(電子受容体)として硝酸・亜硝酸・ N_2O を与えた場合の増殖特性を明らかにするために以下の実験を行った。

各菌株を、硝酸・亜硝酸・ N_2O を電子受容体として添加した培地を用いて30℃で微好気条件下により振とう培養し、培養液の吸光度(OD_{660})を測定し、各条件における増殖曲線を求めた。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および最大ODを比較することにより、上記3菌株の増殖特性を調べた。

2.2 N_2O の還元能の確認

硝酸・亜硝酸・ N_2O の3種の脱窒基質を含む培地に単離菌株を添加した場合 N_2O 発生と減少の有無について、ヘッドスペースガスをガスクロマトグラフィーによって分析した。

2.3 活性汚泥に添加した各菌株の N_2O 発生抑制能の評価

スキムミルクを基質として20日間ほど活性汚泥を培養し、微生物が正常に増殖していることを顕微鏡にて確認した。その活性汚泥250mLを500mL三角フラスコに移し、脱窒基質として硝酸カリウム5mLを加え、脱窒用還元基質としてコハク酸二ナトリウム1.25gを与えて一晚培養し、窒素ガスの発生を確認した。脱窒活性が十分であるものについて、ODが約0.35となるように液体培養したTS6株とS-14株を2.5mL添加し、Arガス置換して完全嫌気状態にした場合と、Arガス置換後の250mLのヘッドスペースに50mLの空気を注入して微好気状態にした場合の2つの条件において脱窒反応を開始させた。その後、25℃で攪拌しながら培養し、窒素ガスと N_2O の発生量を測定した。

3. 結果および考察

3.1 脱窒基質による増殖特性解析

SS1株は、硝酸を脱窒基質とした場合のみ生育が

キーワード：亜酸化窒素 脱窒 亜硝酸 硝酸

連絡先：〒985-8537 宮城県多賀城市中央1-13-1 東北学院大学工学部 遠藤銀朗研究室

TEL：022-368-7493 FAX：022-368-7070

可能であることがわかった。亜硝酸を脱窒基質とした場合には生育しなかった。

TS6 株は、硝酸・亜硝酸・ N_2O のいずれの脱窒基質においても増殖が可能であった。特に硝酸を用いた際の増殖が良好であった。微好気条件ではさらに増殖が良好であったことから、この細菌は好氣的脱窒細菌であると考えられる。また、脱窒基質の種類に拘わらず増殖速度が他の単離菌株に比較して速かった。S-14 株は、いずれの脱窒基質においても生育可能であった。脱窒基質が亜硝酸の場合は最大 OD への到達時間は短かったが、最大到達 OD 値は硝酸を脱窒基質とした場合の方が大きかった。また、嫌気条件より微好気条件下の方が OD 値が大きいことがわかった。結果として、 N_2O での増殖では TS6 株が最も優れていたが、微量の酸素存在下では硝酸・亜硝酸での増殖は S-14 株の方が優れていることが分かった。

3.2 N_2O の還元能の確認

N_2O を脱窒基質として TS6 株を加えた場合、ガスクロマトグラフィーの測定結果より N_2O の濃度は 12 時間でほぼ消失し、OD 値は増加していた。これより、TS6 株は N_2O を還元する能力があることが分かった。菌株添加なし(NC)の場合、OD 値に変化は見られなかったが、 N_2O の濃度の減少が 12 時間で 3%ほど見られた。これは測定のため 1 時間置きに気体を 100 μ L 取り出したためにヘッドスペース内の N_2O の割合が減少したことによるものと考えられる。

また、脱窒基質を硝酸・亜硝酸とした場合、OD 値の増加は見られたが、 N_2O を検出することは出来なかった。それぞれの脱窒基質での OD 値を比較すると、硝酸の場合に最も TS6 株の増殖が優れていた。

3.3 活性汚泥に添加した各菌株の N_2O 発生抑制能の評価

三角フラスコ内を嫌気状態にして TS6 株を加えた場合、図 1 に示したように N_2O の最大発生量は減少し、NC と比較して N_2O の発生を抑制できることが確認できた。しかし、S-14 株を添加した場合の N_2O の発生速度や初期における発生量は、NC を上回っているため N_2O 発生抑制効果はないと考えられた。一方、図 2 に示したようにフラスコ内を微好気にした時には、S-14 株および TS6 株を添加した実験系で

は NC よりも N_2O の最大発生量は少なかったが、その削減効果は S-14 株を添加した場合に最も大きかった。

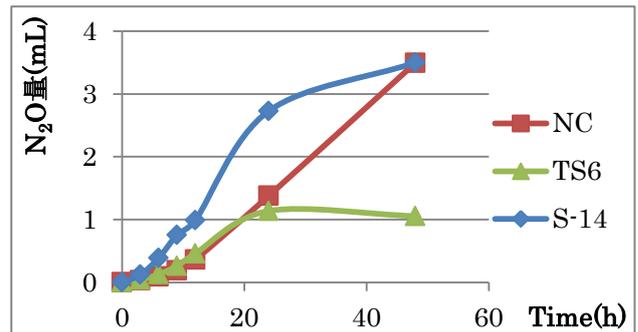


図 1. 嫌気条件下での N_2O 発生量

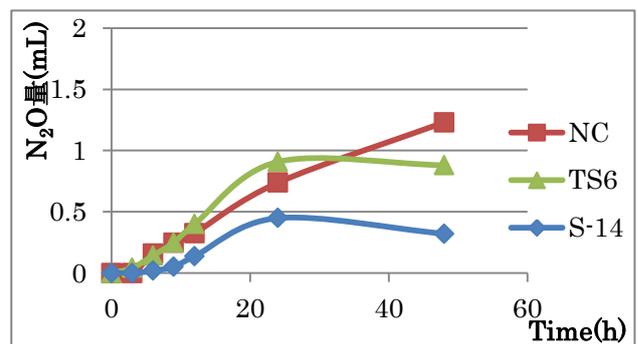


図 2. 微好気条件下での N_2O 発生量

4. おわりに

脱窒基質として硝酸を用いた場合、本研究で用いた 3 種の細菌株いずれにおいても増殖が確認できた。中でも、硝酸・亜硝酸での増殖は S-14 株が優れていたが、 N_2O での増殖は TS6 株が優れていた。したがって TS6 株は N_2O 還元能力を持つ細菌であると言える。フラスコリアクターにおける N_2O 発生抑制実験からは、嫌気条件下では TS6 株が N_2O 発生抑制効果を発揮するが、微好気条件下では S-14 株がより高い N_2O 発生抑制効果を示すことが知られた。

今後は、活性汚泥への添加実験を繰り返し行い、各菌株の N_2O 抑制の効果をさらに確認する必要があると思われる。また、このような N_2O 発生抑制能力を有する脱窒菌の活用方法について検討することが必要と考えられる。

参考文献

- [1]気候変動に関する政府間パネル(IPCC) 第 5 次評価報告書
- [2] 気候変動に関する国際連合枠組条約の京都議定書