

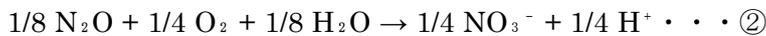
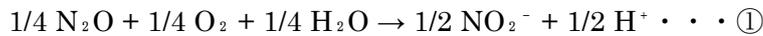
微生物による亜酸化窒素(N₂O)酸化分解能の調査

広島大学工学部 非会員 水嶋康介, 長岡技術科学大学大学院 学生会員 ○阿部憲一,
広島大学大学院 正会員 金田一智規, 正会員 尾崎則篤, 正会員 大橋晶良

1. はじめに

亜酸化窒素(N₂O)はCO₂の約310倍の温室効果をもち、現在地球温暖化に6%程度寄与する非常に強い温室効果ガスであり、京都議定書でも削減対象の一つとされた。排水処理施設で窒素除去プロセスとして用いられている生物学的硝化脱窒法からも多量のN₂Oが生成しており、その対策が急務とされている。

生物学的にN₂Oは脱窒反応の過程でN₂に還元することができるが、有機物の継続的な添加が必要である。N₂Oを生物学的に酸化することができれば有機物は不要となりN₂Oを除去する上で大幅なコスト削減になるが、そのような反応の報告例はない。もしN₂OがNO₂⁻もしくはNO₃⁻に酸化すれば以下のような式が導き出せる。



そこで、これらの反応式で右辺と左辺の自由エネルギーの差を計算してみると、①式では $\Delta G^{\circ} = -5.33(\text{kJ/mol}\cdot\text{e}^-)$ となり、②式では $\Delta G^{\circ} = -21.19(\text{kJ/mol}\cdot\text{e}^-)$ という結果が得られた。したがって、熱力学上生物学的酸化反応は進行可能であり、これらの反応を利用してエネルギーを獲得する何らかの微生物が存在している可能性がある。

本研究では、N₂Oを酸化させる微生物の存在の有無を確認し、NO₂⁻またはNO₃⁻に酸化除去できないか探ることを目的としている。

2. 実験方法

回分実験により微生物のN₂O酸化分解能の調査を行った。微生物の植種源としたのは、標準活性汚泥法で処理を行っている下水処理場の好気槽の活性汚泥である。124mlのバイアル瓶に上記の活性汚泥、同処理施設での下水道処理水、N₂Oを入れ、好気状態を保ち25°C、170rpmで7日間程度、振とう培養を行った。純水を入れた系を同条件で攪拌し対照系とした。培養前、培養中、培養後にガスクロマトグラフにより瓶中の気体濃度を測定し、N₂Oが減少

しなければpHなどの条件を変え、実験を繰り返す。減少すればN₂Oが酸化した可能性があるため、液量の1/2か1/4を取り出し、N₂Oの存在する同様の条件下に植え継ぐことで微生物の集積を試みる。また、イオンクロマトグラフにより培養前後にイオン態窒素濃度を測定し、窒素量の物質収支を取る。なお、各培養におけるバイアル瓶中の条件を表1に示し、以下に示す実験結果の条件はすべてvial番号で表記する。

3. 実験結果と考察

まず、pHを中性に調整し、瓶中の液量を40mlとした培養を行ったが、そのときの瓶気相中のN₂O濃度変化を図1に示す。微生物濃度の高いサンプルで0.3%程度減少するという結果が得られた。また、vial 2の窒素量の物質収支をとった結果を図2に示す。培養前後で収支は合い、N₂Oが酸化した可能性が確認された。N₂Oが酸化されればNO₂⁻となることが予想されるが、硝化反応によりNO₃⁻となりNO₃⁻が蓄積した可能性がある。

N₂Oの酸化分解能を持つ微生物が存在している可能性が考えられたことから、その微生物を集積しようと試みた。このとき、微生物量を増やすことでN₂Oの減少量を大きくしようと考え、vial 5のように瓶中の液量を100mlとすると、N₂Oの減少量が大幅に増大したため、酸化反応が起きているのではないかという期

表1 vial番号とその条件

| サンプル | 単位:ml | | | | 単位:mg | | |
|------------|-------|-------|-------|-----|------------------|----------------|--------------------|
| | 汚泥 | 処理水 | 純水 | Air | N ₂ O | O ₂ | NaHCO ₃ |
| vial 1 | 15 | 7.5 | 7.5 | 94 | 6 | 0 | 7.5 |
| vial 2 | 10 | 15 | 15 | 84 | 4 | 0 | 15 |
| vial 3 | 2.5 | 18.75 | 18.75 | 84 | 4 | 0 | 18.75 |
| vial 4 | 0 | 0 | 40 | 84 | 4 | 0 | 0 |
| vial 5 | 50 | 50 | 0 | 14 | 2 | 10 | 50 |
| vial 6 ※1 | 49 | 49 | 0 | 24 | 2 | 0 | 50 |
| vial 7 | 50 | 50 | 0 | 24 | 2 | 0 | 50 |
| vial 8 | 50 | 50 | 0 | 12 | 1 | 12 | 50 |
| vial 9 | 20 | 60 | 0 | 34 | 3 | 10 | 60 |
| vial 10 | 8 | 72 | 0 | 34 | 3 | 10 | 72 |
| vial 11 | 2 | 78 | 0 | 34 | 3 | 10 | 78 |
| vial 12 | 0 | 0 | 80 | 34 | 3 | 10 | 0 |
| vial 13 | 40 | 40 | 0 | 34 | 3 | 10 | 120 |
| vial 14 | 40 | 40 | 0 | 34 | 3 | 10 | 40 |
| vial 15 | 40 | 40 | 0 | 34 | 3 | 10 | 0 |
| vial 16 ※2 | 40 | 40 | 0 | 34 | 3 | 10 | 0 |

※1・・・1005mg/LのKNO₃を2ml加えた ※2・・・塩酸を数滴加えた

待が膨らんだ。しかし、すべての瓶で植え継ぎを行った後は N_2O の減少は見られず、集積できなかつた。

後に、液量を 100ml とすると瓶中のほとんどを液体で占めることになってしまい、攪拌中でもバイオマスが沈殿してしまうことがわかつた。沈殿するとその部分が嫌気状態となって脱窒反応が起きてしまう可能性がある。本研究でも vial 6、7 の培養で嫌気状態では脱窒反応によって、即座に N_2O が還元除去されることがわかつている。

そこで、vial 8 を 3 日間培養したが、そのときの N_2O 濃度と酸素濃度の経日変化を図 3 に示す。酸素濃度の減少がなくなるにつれて N_2O 濃度の減少は大きくなった。反応式①、②より N_2O が酸化されたなら N_2O と同量以上の酸素が消費されるはずであることと、今回の培養後にはごく少量の NO_3^- しか蓄積していなかつたことから、やはり脱窒反応による減少であると考えられた。一部分でも嫌気状態になってしまうと、本研究では培地として下水道処理水を用いているため、有機物が含まれており脱窒反応が起こってしまう。したがって、 N_2O が酸化された可能性があるとした実験でも脱窒による減少であった可能性が疑われるようになった。

その後、瓶中の液量を 80ml とし攪拌時に瓶をほぼ水平に倒せば、瓶中を完全に好気状態とできることに気づき、改めて中性にて vial 9~12 の培養を行ったが N_2O は減少することはなかつた。そこで vial 13~16 のように NaHCO_3 の添加する量を変え初期の pH を変化させて培養を行ったが、 N_2O が減少するサンプルは見られなかつた。ここで、vial 15 の窒素量の物質収支をとった結果を図 4 に示す。 N_2O が減少しなかつたにも関わらず、培養後には、培養前の総量よりも多い NH_4^+ と NO_3^- が生成しており、瓶中で死滅した微生物がアンモニア化により NH_4^+ となったと考えられる。図 2 でも、 N_2O が酸化したのではなく、同様の現象により培養後の NO_3^- が増えた可能性がある。したがって、酸化反応が起きたと考えていた vial 1、2 の結果も微生物濃度が高かつたことにより、ミクロ的に嫌気状態となる部分ができ、その結果脱窒反応によって N_2O が微量に減少したのではないかと考えた。

これらの結果から本研究では、 N_2O が減少したのは脱窒反応による可能性が高く、完全に好気状態を保つと pH を変化させたいずれの環境下でも N_2O が減少することはなかつたため、 N_2O 酸化分解能を持つ微生物の存在を確認することができなかつた。

4. 今後の課題

今回活性汚泥を対象に N_2O 酸化分解能を持つ微生物の探索を行ったが、他の地域の活性汚泥、森林や耕地の土壌などは未確認である。これらの場所からサンプルを採取し、同様に調査を試みる必要がある。また有機物を含まない人工培地を用い、脱窒反応が起こりにくい条件で培養を試みるとよいと考えられる。

なお、本研究の一部は独立行政法人新エネルギー・産業総合開発機構(NEDO)の研究開発助成を受けて実施しています。ここに記して謝意を表します。

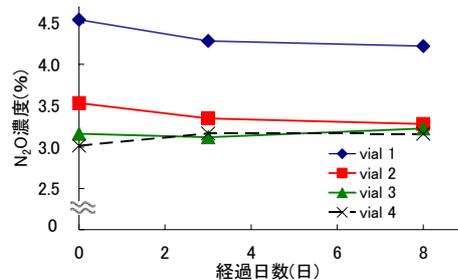


図 1 瓶気相中 N_2O 濃度変化

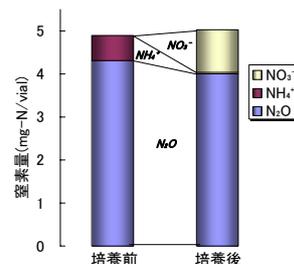


図 2 培養前後での物質収支

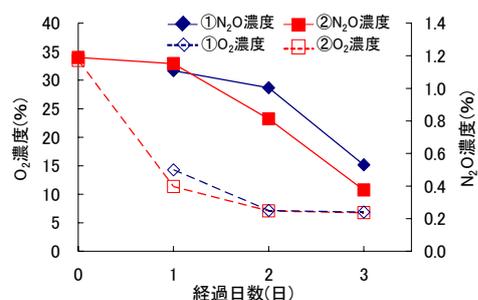


図 3 N_2O と酸素濃度変化

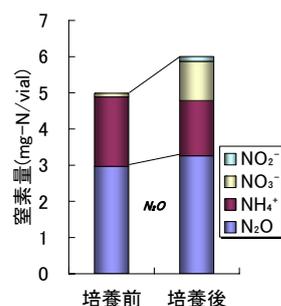


図 4 培養前後での物質収支