

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 21 年度博士課程 進学
氏名 松岡 真生
指導教員名 若木 高善

論文題目 廃水処理場で発生する温室効果ガスである N_2O 発生抑止に関する研究

序論

窒素サイクルは、炭素サイクルと同様に地球環境において重要な物質循環系である。この窒素サイクルを形成する過程の中に、脱窒が存在する。脱窒とは、硝酸や亜硝酸を還元し、亜酸化窒素 (N_2O) や二原子窒素 (N_2) のようなガス状窒素化合物に変換する生物的反応であり、窒素固定や硝化と共に窒素サイクルを維持する上で重要な位置を占めている。脱窒の中間産物である N_2O は、温室効果ガスとしての能力が極めて高く、オゾン層破壊の最大要因とも言われている。廃水処理場では、主に微生物の活性汚泥を用いた硝化脱窒法により窒素処理を行っているが、近年、廃水処理場における窒素除去過程から N_2O の発生が報告されている。脱窒工程由来の N_2O の発生は、亜酸化窒素還元酵素 (N_2O_r) が酸素によって阻害されることや、亜硝酸の蓄積、低い C/N 比であること（電子供与体基質の不足）などが原因であると考えられている。特に養豚糞尿廃水処理場では、廃水が高濃度のアンモニアを含んでいるために大量の N_2O が放出されていることが報告されており、早急に対策を講じる必要性に迫られている。

この問題の解決策として、養豚糞尿廃水処理場の活性汚泥から N_2O 抑止効果をもたらす有用脱窒菌を単離し、 N_2O 発生抑止を目的としたバイオオーギュメ

ンテーションに利用するという手法が考えられた。現場での巨大なスケールでのバイオオーギュメンテーションを成功させるには、外部から添加する微生物が内在している微生物群との生存競争に駆逐されずに定着できるかが大きな鍵を握るとされるが、活性汚泥内の微生物を用いればその問題をクリアできるのではないかと考えた。

1. 養豚糞尿廃水処理場の活性汚泥からの微生物の単離

N_2O 発生抑止効果をもたらす有用脱窒菌を単離する条件として、硝化脱窒槽の環境に適応でき、その環境下で脱窒の最終過程である N_2O から N_2 への強い還元能力を示すことが大切であると考え、以下のような手法をとった。まず、硝化脱窒槽の環境に似た PM (Pig Manure) 培地を用い、気相を N_2O で置換した条件で 5 回集積培養を行った。そして、この 1 次スクリーニングにより得られたサンプルを PM ゲランガムプレートに塗布し、気相を N_2O に置換して 2 次スクリーニングを行った。その結果、5 株の微生物の単離 (M-01 株、M-07 株、M-08 株、M-11 株、M-13 株) に成功した。これらの単離株は、 N_2O で呼吸することにより生育する可能性が非常に高いと考えられる。16S rRNA 遺伝子に基づく系統学的解析から、M-01 株と M-11 株が *Gammaproteobacteria* 綱の *Pseudomonas* 属、M-07 株が *Betaproteobacteria* 綱の *Advenella* 属、M-13 株が *Alphaproteobacteria* 綱の *Paracoccus* 属に属していた。また、M-08 株は *Gammaproteobacteria* 綱の *Pseudomonadaceae* 科の新属である可能性が示唆された。

2. 単離株の N_2O 還元能・脱窒特性の解析

PM 培地を用いて単離株の N_2O 還元能と脱窒特性を調べ、廃水処理の N_2O 発生抑止に有用な微生物を探した。まず、気相を N_2O に置換した条件における培養では、5 株のうち M-07 株以外は、強い N_2O 還元能を有することが判明した。次に、脱窒基質や気相の条件を変えて脱窒特性を調べた。M-13 株は硝酸・亜硝酸からの脱窒能を有していたが、亜硝酸からの脱窒の際に大量の N_2O が放出された。M-07 株・M-08 株・M-11 株は亜硝酸からの脱窒能は有していたが、硝酸からは脱窒を行わなかった。M-07 株と M-08 株は亜硝酸からの脱窒で N_2O の放出が観察されたが、M-11 株は全く N_2O を放出しなかった。残りの M-01 株は、 N_2O 還元能は強いものの、硝酸及び亜硝酸からの脱窒能が非常に弱いという変わった特徴を有していた。そのうえ、どの条件下においても N_2O の放出は観察されなかった。

酸素による N_2O の不活性化が廃水処理場での N_2O 発生要因であることを受けて、 N_2O 還元に対する酸素の影響をみたところ、M-01 株と M-11 株が他の単離株に比べ、 N_2O 還元に対する酸素耐性があることが分かった。さらに、脱窒基質とし

て亜硝酸と N_2O が共存下にある培養では、M-01 株と M-11 株は亜硝酸よりも N_2O を優先的に消費した。特に、M-11 株に関しては、亜硝酸脱窒がおきているところに N_2O を添加すると、亜硝酸からの脱窒が阻害され N_2O 還元が優先されるという、今までにない現象が観察された。この、亜硝酸よりも N_2O を優先的に利用する脱窒特性は、廃水処理場の N_2O 抑止に重要な役割を示すのではないかと考えた。

以上の結果を踏まえ、M-01 株と M-11 株は N_2O 発生抑止を目的としたバイオオーギュメンテーションに利用する有用脱窒菌に適していると判断した。

3. 活性汚泥へのバイオオーギュメンテーションによる N_2O 抑止効果の検証

まず、試験管レベルで、単離株をバイオオーギュメンテーションに利用し、 N_2O 発生抑止効果の検証を行った。脱窒基質として亜硝酸を用いた。その結果、M-01 株と M-11 株で高い N_2O 抑止効果が認められた。それ以外の単離株では N_2O 抑止効果が確認されなかった。

続いて、廃水処理場への添加を想定し、嫌気的な脱窒槽の運転に倣ったメスシリンダーでの連続培養において、長期間で M-01 株と M-11 株の N_2O 抑止効果を検証した。脱窒基質として亜硝酸を用いた。両株とも長期にわたって高い N_2O 抑止効果が実証された。さらに、M-01 株と M-11 株の 16S rRNA 遺伝子を特異的に増幅するプライマーを作成し、連続培養中の動向をモニタリングしたところ、M-11 株は培養終盤で占有率が少し低下したのに対し、M-01 株は培養を通して生存性を維持していた。つまり M-01 株の方がより廃水環境に適応できることを表しており、長期に渡って廃水処理場で N_2O 抑止に貢献できる可能性が示唆された。

4. 単離株の脱窒遺伝子構造

ゲノムウォーキング法により、M-01 株と M-11 株の脱窒酵素の触媒サブユニットをコードする脱窒遺伝子の同定と塩基配列全長を決定し、そして脱窒遺伝子構造を部分的に決定した。両株とも、亜硝酸還元酵素 (Nir) 遺伝子 *nirS*、一酸化窒素還元酵素 (Nor) 遺伝子 *norCB*、亜酸化窒素還元酵素 (N_2O r) 遺伝子 *nosZ* を 1 種類ずつ有しており、アミノ酸配列に基づいた分子系統樹では両株の NirS・NosZ とともに *Pseudomonas* 属の NirS・NosZ と同一のクラスターを形成していた。また、両株とも一般的な脱窒細菌に見られるような *nos* クラスター (*nosRZDFYL*) を有していた。

同時並行して M-08 株も脱窒遺伝子構造の解析を進めたところ、この菌は、*nirS* と *nosZ* を 2 種類ずつ持っていることが判明した。これら 2 種類の NirS と NosZ は、それぞれお互いに 52%、76% のアミノ酸配列同一性を示していた。また、2

種類の *nosZ* の近傍にはいずれも *nos* クラスター (*nosRZDFYL*) が形成されていることが分かり、両方とも *nosZ* が機能的に働くであろうと予想された。現時点で、複数の *nosZ* が機能的に働くという報告は今までされていない。一方、*nirS* に関しては、1つの大きな *nir* クラスター (約 20 kbp) の中に *nirS* が2つ存在した。このクラスター内で Nir に関わる他のコンポーネントは1種類ずつしか持ち合わせていないことを考えれば、この事実は非常に奇異である。この2種類の *nirS* がどう働くのか、興味深い。

5. 単離株の系統分類学的研究

M-07 株は、*Alcaligenaceae* 科の *Advenella mimigardefordensis* と 97.3% の 16S rRNA 遺伝子塩基配列同一性を示し、既知種との DNA-DNA 相同値が 10% 以下であることや GC 含量の違いなどから M-07 株を type strain とした *Advenella* 属の新種として提案した。また、M-08 株は、*Pseudomonadaceae* 科の *Pseudomonas caeni* と 93.6% の 16S rRNA 遺伝子塩基配列類似度を示し、*Pseudomonas* 属とは異なるクラスターに位置していることやイソプレノイドキノン組成の違いなどから、M-08 株を type strain とした *Pseudomonadaceae* 科の新属新種として提案した。

6. 総括

N₂O による集積培養という手法を用いて活性汚泥から単離した M-01 株と M-11 株は、ラボスケールで N₂O 抑止効果をもたらすことが判明し、廃水処理の N₂O 発生抑止に大きな期待が持てる結果となった。

近年、亜硝酸型硝化脱窒処理といった新たな処理方法が考案されている。これは、硝化工程で廃水中のアンモニアからの硝化を亜硝酸の状態までにとどめ、蓄積した亜硝酸から脱窒工程で窒素除去を行う方法で、省エネルギーかつ低コストといった利点が挙げられる。特に、この方法は、養豚糞尿廃水のような、高濃度のアンモニアを含む廃水や低い C/N 比の廃水を処理するには好都合である。一方、N₂O 発生が増大するという欠点も存在する。しかし、M-01 株と M-11 株の、N₂O 還元 of 酸素耐性が高く亜硝酸よりも N₂O を優先的に利用する脱窒特性を利用すれば、この問題もクリアできる可能性がある。実際の廃水処理場でのバイオオーギュメンテーションによる N₂O 発生抑止の成功例がないことから、本実験結果は地球環境の保全に向けた N₂O 発生抑止への大きな一歩となるであろう。