

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 松岡 真生

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物質と言われている。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除去を行っているが、近年、廃水処理場における窒素除去過程から  $N_2O$  の放出が問題となっている。その中でも、脱窒工程由来の  $N_2O$  の発生は、亜酸化窒素還元酵素 ( $N_2Or$ ) 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、早急な解決が迫られている。

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  $N_2O$  発生抑制効果をもたらす有用脱窒菌を単離し、 $N_2O$  発生抑制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、廃水処理への応用に大きな期待が持てると考えられる。本論文は、バイオオーギュメンテーションによる、廃水処理場から放出される温室効果ガス  $N_2O$  の発生抑制を目的とした。

まず、序章では本論文に関連する分野の既知の知見や事実、そして研究背景について述べている。

第1章では、廃水処理環境に似た PM (Pig Manure) 培地を用いた  $N_2O$  集積培養により、養豚糞尿廃水処理場の活性汚泥から  $N_2O$  発生抑制効果をもたらす有用脱窒菌の単離を遂行した。その結果、5 株の微生物の獲得 (M-01 株、M-07 株、M-08 株、M-11 株、M-13 株) に至った。

第2章では、PM 培地を用いて単離株の  $N_2O$  還元能と脱窒特性を調べ、その結果、M-01 株と M-11 株が廃水処理場の  $N_2O$  発生抑制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可能性を示した。これら両株は、 $N_2O$  還元能が強く、そして、 $N_2O$  が放出されやすい条件であるとされる酸素や亜硝酸存在下において  $N_2O$  を全く放出しないという特徴を有していることが示された。さらには、これら両株は、 $N_2O$  還元能に酸素耐性があり、亜硝酸よりも  $N_2O$  を優先的に消費する脱窒特性を有していることも明らかになり、これらの脱窒特性が廃水処理場の  $N_2O$  発生抑制に貢献できるものと考えられた。

第3章では、M-01 株と M-11 株をラボスケールでのバイオオーギュメンテーションに利用し、両株の  $N_2O$  発生抑制の有用性を示した。特に、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運転では、長期にわたって両株の高い  $\text{N}_2\text{O}$  発生抑制効果が実証され、廃水処理場での  $\text{N}_2\text{O}$  発生抑制に大きな期待を抱かせるものであった。また、16S rRNA 遺伝子を特異的に増幅するプライマーを用いた両株の生残性に関する実験から、M-01 株の方がより廃水処理環境に適応できることが示された。

第 4 章では、M-01 株と M-11 株、新属である M-08 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を同定し、その塩基配列全長と脱窒遺伝子構造を決定した。そのなかで M-08 株は亜硝酸還元酵素 (Nir) 遺伝子 *nirS*、亜酸化窒素還元酵素 ( $\text{N}_2\text{Or}$ ) 遺伝子 *nosZ* を 2 種類ずつ有しているという珍しい事実が明らかになった。

第 5 章では、第 1 章で  $\text{N}_2\text{O}$  集積培養により獲得した単離株のうち、M-07 株を *Advenella* 属の新種として、M-08 株を *Pseudomonadaceae* 科の新属新種として提案した。

以上、 $\text{N}_2\text{O}$  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、ラボスケールにおけるバイオオーギュメンテーションで  $\text{N}_2\text{O}$  発生抑制効果をもたらすことが実証された。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  $\text{N}_2\text{O}$  発生抑制の成功例がまだないことから、本研究結果は廃水処理場での  $\text{N}_2\text{O}$  発生抑制の新たな可能性を示すものと言える。よって審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。