

論文内容の要旨

論文題目 温室効果ガス抑止のための窒素バイオマス浄化システムの開発

氏 名 宮原 盛雄

亜酸化窒素 (N_2O) は主要な温室効果ガスの一つであり、その大気中濃度は炭酸ガスやメタンなど他の温室効果ガスとともに上昇の一途をたどっている。 N_2O は炭酸ガスの 300 倍の温室効果を持ち、フロンガスの生産が停止された現在、オゾン層破壊の最大の元凶にもなっている。 N_2O 濃度上昇は地球環境にとって最大の脅威の一つとなっており、その発生抑止は人類の緊急課題である。 N_2O は主に廃水処理の窒素除去工程で大量に発生する。窒素除去工程は、 NH_4^+ から NO_2^- を経て NO_3^- にまで酸化する好気的な硝化過程と、 NO_3^- を窒素ガス (N_2) にまで還元する嫌気的な脱窒過程よりなり、排水中の窒素は N_2 となって除かれる。しかし、これら硝化および脱窒の両過程において N_2O が副産物として発生するため、処理方法の改善が求められている。脱窒過程における N_2O 発生は、脱窒の最終段階を担う亜酸化窒素還元酵素 (NoS) が O_2 に弱いため、不十分な嫌気条件下での NoS の失活が主原因であると考えられている。高谷らは 2003 年に酸素耐性の NoS を有する好気脱窒細菌 *Pseudomonas stutzeri* TR2 (TR2 株) を単離した (引用文献 1)。TR2 株はある程度の好気条件 (溶存酸素濃度 1.25 mg L^{-1}) でも N_2O が発生しにくく、高い脱窒能を維持するという特徴を持つ。TR2 株を廃水処理過程において添加、定着させ、その機能を発揮させること (バイオオーグメンテーション) ができれば、 N_2O の発生を低減できる可能性がある。このような手法による N_2O 発生の低減の取り組みはなされていないため、本研究では高濃度のアンモニアを含む豚糞尿のメタン発酵後残渣を処理対象とし、TR2 株を用いて「低 N_2O 発生の窒素バイオマス浄化システムの構築」に取り組んだ。これに加え、「活性汚泥中での硝化細菌と N_2O 発生の関連」、「脱窒細菌と放線菌の共培養による脱窒活性増強因子」も明らかにした。

【第 1 章】 実際に現場で稼働している液量約 220 m^3 の硝化と脱窒をひとつの槽で繰り返し行う間欠曝気式硝化脱窒による浄化槽 (実機) の運転条件、液相の組成、 N_2O の発生量を調査した。その結果、浄化槽で検出された N_2O の濃度は、液中の NO_3^- と NO_2^- の増減と同様の挙動を示したことから、硝化や脱窒による生物反応で N_2O が発生していることが示唆された。この時の液相は、 NO_3^- や NH_4^+ の蓄積が確認され、 N_2O が発生した。これらの蓄積は脱窒工程の脱窒電子供与体 (炭素源) の不足や硝化工程の通気量の不足によることが示唆された。

【第 2 章】 実機の運転条件では NO_3^- 等の無機窒素が蓄積していたため、それらが蓄積していない“定常運転条件”でも N_2O 発生を調べる必要があった。そこで、より扱いやすいベンチスケール (液量 30 L) の膜分離回分型反応槽 (MSBR) を用いて定常運転条件を確立し、MSBR からの N_2O 発生量を測定した。廃水に $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ を添加した結果、MSBR の気相に ^{15}N として検出されたが $^{15}\text{N}_2\text{O}$ は検出されなかった。このことから、TR2

株の添加効果を検証するためには、実機を模した（ある程度定常運転条件を崩した）“モデル N₂O 発生系”の構築が必要であった。

【第3章】TR2 株を添加するモデル N₂O 発生系を構築するために、実機で確認された主な N₂O 発生条件である、脱窒工程を微好気（低通気）にした“微好気脱窒条件”と、炭素源の添加量を減らした“低 BOD/N 条件”で MSBR を運転した。その結果、微好気脱窒条件の方が低 BOD/N 条件よりも N₂O の発生量は多かった。その理由として、前者の方が後者よりも報告されている N₂O の発生に関与する因子（NoS の失活、アンモニア酸化細菌の脱窒、NO₂⁻の蓄積、溶存態の N₂O の気相への排出等）が多いことが考察された。このように実機の N₂O 発生条件が、MSBR の運転でも再現され、TR2 株添加のためのモデル N₂O 発生系となることが示された。

【第4章】MSBR で浄化処理した処理水を主成分とする ML 培地中での TR2 株の生育と、脱窒特性を試験管スケールで検討した（引用文献2）。その結果、(i) 微好気条件でも脱窒活性が強く、N₂O 発生量が低い、(ii) 脱窒条件下の増殖速度は好気条件下の増殖速度に匹敵するほど高い、(iii) 毒性があり、かつ N₂O 発生

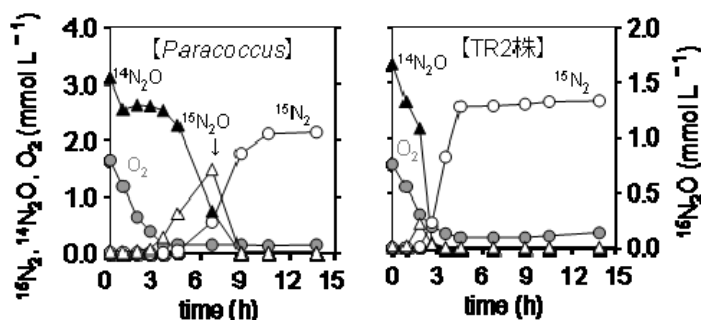


図1. ¹⁴N₂Oと¹⁵NO₂⁻の両基質が存在する時の脱窒

因子である亜硝酸に対して耐性であり、それを至適の脱窒基質として利用する、(iv) 脱窒基質として N₂O と NO₂⁻の両基質が存在する時、N₂O を優先的に脱窒する（図1）、(v) 活性汚泥から発生する N₂O を低減する、などの特徴が示された。その理由として、興味深いことに NoS 遺伝子が非脱窒条件下でも構成的に発現すること、脱窒関連遺伝子の発現が脱窒条件により速やかに誘導されることが明らかとなった。そして、脱窒細菌の中には、TR2 株のように酸素呼吸よりも脱窒を好むことで生存する適応戦略を有する細菌が存在することを証明した。

【第5章】TR2 株の効果を活性汚泥内で発揮させるためには、微生物群集内で優占化させることも重要となる。そこで、試験管スケールで TR2 株を ML 培地中で活性汚泥と共培養し、5 回の継代培養を行い評価した（図2）（引用文献3）。その結果、(i) ML 培地は脱窒条件で TR2 株およびその近縁な種の増殖に適していた、(ii) 脱窒基質の中では NO₂⁻の方が NO₃⁻よりも TR2 株の生残は良かった、(iii) 連続的な好気条件下でも、この培地中の TR2 株はある程度生残していたが、5 回目の継代培養ではほぼ消失していた。

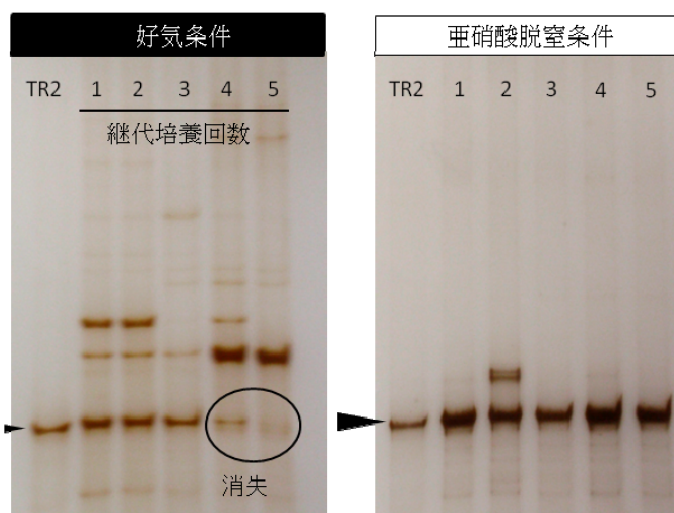


図2. 活性汚泥との共培養液中のTR2株の生残（一つのバンドは一つの細菌を示す）

【第6章】第3章で検討した MSBR でのモデル N₂O 発生系に、第4、5章で明らかとなった TR2 株の生残条件を組み合わせた間欠曝気式硝化脱窒による運転系を構築し、そこに TR2 株の添加を試みた。MSBR から活性汚泥を一定量引き抜くことによって NO₃⁻の蓄積条件から NO₂⁻の蓄積条件に変化させることが可能にな

った。TR2 株を一定期間ごとに添加し（湿重量に対して 1%）、 N_2O 発生の低減効果と TR2 株の生残性を検討した。この時、硝化工程、脱窒工程の通気量は最低限にした。その結果、 N_2O の発生量は、TR2 株を添加してもほとんど変化しなかったものの、 NO_2^- 蓄積条件では、TR2 株添加条件で NO_3^- と NO_2^- の除去量が増加したため、 N_2O への転換率は低減された。また、TR2 株の生残性は、 NO_3^- よりも NO_2^- 蓄積条件が良く、汚泥濃度が低い方が良かった。しかし、全体的に添加後の TR2 株の菌数は減少傾向にあり定着が確認されなかった。活性汚泥に原生動物が存在していたことから、TR2 株が定着せず N_2O 低減効果が低い原因として原生動物による捕食が示唆された。

【第 7 章】TR2 株の N_2O 低減効果をより明確に示すため、亜硝酸を外部から添加した模擬脱窒槽（液量約 1 L）への TR2 株の添加、連続培養を試みた（図 3）。この時、汚泥滞留時間を短く（5 日間）して捕食性原生動物を洗い流し、汚泥濃度を低く維持した。その結果、TR2 株添加による N_2O 低減効果が明確に示され、かつ同細菌の生残性も維持された。特に、少量の添加（汚泥湿重量の 0.1% 添加）で TR2 株が約 100 倍に増殖していた。TR2 株の至適条件（低い汚泥濃度、低い原生動物数、亜硝酸脱窒条件）を満たしたことが、定着と顕著な N_2O 低減につながったと考えられる。

【第 8 章】本研究の集大成として約 10 m^3 のプラントスケールの浄化槽へ TR2 株を添加し、 N_2O 低減効果と生残性を検証した。TR2 株は NO_2^- を脱窒基質とした時は 40°C 前後でも生育可能であり、この特徴を利用して系内の原生動物の捕食活動を抑えることを試みた。硝化槽と脱窒槽が別々にある二槽液循環式の亜硝酸型硝化脱窒法と熱処理を組み合わせた運転によって亜硝酸を蓄積（または外部から亜硝酸を添加）させ、 N_2O を発生させた。そこに TR2 株の濃縮培養液を脱窒槽に添加した（活性汚泥重量の 0.2%）。 N_2O の発生は一旦上昇したもののすぐに低下し、TR2 株は長期間（32 日間）生残を維持していた。このことから、TR2 株の添加による持続的な N_2O 抑止効果が示唆された。そして、系内の水温を通常よりも高く（約 40°C ）保つことによって捕食性原生生物も増加しなかった。 NO_2^- の蓄積と高温状態の維持という 2 つの選択圧が、TR2 株の生残性の維持と原生生物の増加抑制に効果的であることが示唆された。

TR2 株を用いた「低 N_2O 発生の窒素バイオマス浄化システムの構築」では、亜硝酸型硝化で NO_2^- が蓄積した脱窒槽からの N_2O 発生を、TR2 株の添加によって低減できることを示した。亜硝酸型硝化脱窒法は効率的な窒素除去であり近年注目されているが、 N_2O 発生が増大しやすい点が懸念される。この技術に適用可能な N_2O 発生の低減対策を示した例は知る限りは他に無く、このような技術の更なる改善していきたい。

【第 9 章】実機（第 1 章）や MSBR（第 3 章）の運転過程で硝化由来の N_2O 発生が確認された。しかしながら、活性汚泥中での硝化細菌と N_2O 発生の関連については明らかではない。そこで、モデル硝化系（容積 1 L の反応槽を使用）を構築し、その N_2O 発生のメカニズムを明らかにした（引用文献 4）。モデル硝化系（通気

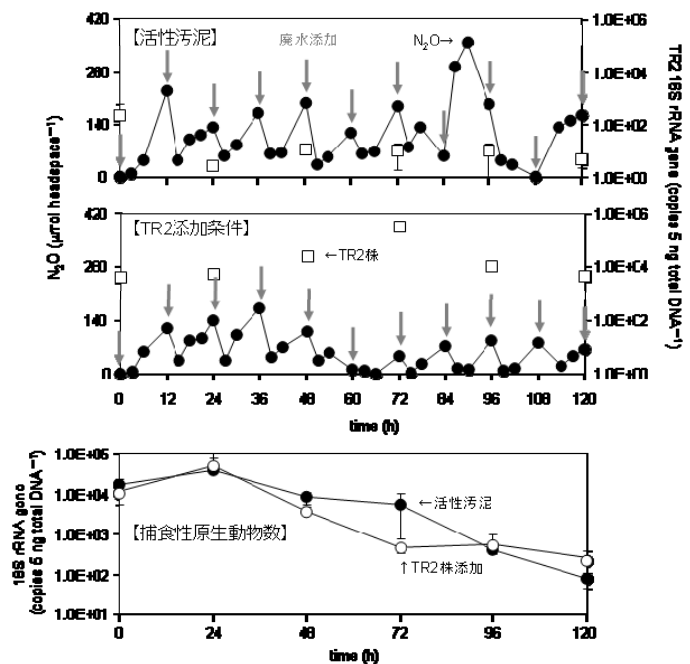


図3. 亜硝酸蓄積模擬脱窒槽におけるTR2株添加による N_2O 発生抑止効果

条件) における N_2O の発生は、硝化基質 [NH_4^+ または NH_2OH (ヒドロキシルアミン)] が消費されていくにつれて減少した。また、 NO_2^- をモデル硝化系に添加すると、 N_2O 発生は大幅に促進されたことから、 N_2O は脱窒由来の反応で生じていることが示唆された。実際に N_2O 発生が脱窒由来であることを確認するため、銅含有亜硝酸還元酵素 (NirK) の阻害剤である diethyldithiocarbamate を添加した。その結果、 NH_2OH 酸化由来の N_2O が発生しなくなった。さらに、アンモニア酸化細菌の NirK をコードする遺伝子の発現が硝化条件の活性汚泥から確認された。以上の結果は、硝化過程からの N_2O 発生は活性汚泥内に生息するアンモニア酸化細菌による脱窒、という強い根拠となった。

【第 10 章】バイオオーグメンテーションをした細菌の栄養条件が合わずに十分な脱窒をしにくいことがある。これを他の微生物との共添加をすることで克服できることを発見した。それは *Ralstonia pickettii* K50 (K50 株) は人工廃水 (AWW) 培地を用いて *Streptomyces griseus* と共培養することで、K50 株の脱窒活性が大きく促進されることである (引用文献 5)。この活性を促進する多くの因子は *S. griseus* の無細胞培養液に含まれる高分子画分であり、それは細胞外プロテアーゼであることが示唆された。さらに調べていくと、プロテアーゼ処理した AWW 培地で K50 株を培養した時、十分に脱窒を促進し培地中のアミノ酸の関与が示唆された。そこで、20 種類のアミノ酸添加の脱窒への影響を試したところ、ヒスチジンが特に K50 株の脱窒を促進した。以上の結果はヒスチジンが細菌の脱窒の新しい促進物質である事を示した。

【引用文献】

1. Takaya, N., M. A. Catalan-Sakairi, Y. Sakaguchi, I. Kato, Z. Zhou, and H. Shoun. (2003) Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3152-3157.
2. Miyahara, M., S. W. Kim, S. Fushinobu, K. Takaki, T. Yamada, A. Watanabe, K. Miyauchi, G. Endo, T. Wakagi, and H. Shoun. (2010) Potential of aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* TR2 to reduce nitrous oxide emissions from wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 4619-4625.
3. Miyahara, M., S. W. Kim, S. Zhou, S. Fushinobu, T. Yamada, W. Ikeda-Ohtsubo, A. Watanabe, K. Miyauchi, G. Endo, T. Wakagi, and H. Shoun. (2011) Survival of the aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2 during co-culturing with activated sludge under the denitrifying conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.
4. Kim, S. W., M. Miyahara, S. Fushinobu, T. Wakagi, and H. Shoun. (2010) Nitrous oxide emission from nitrifying activated sludge dependent on denitrification by ammonia-oxidizing bacteria. *Biores. Technol.* **101**, 3958-3963.
5. Takaki, K., S. Fushinobu, S. W. Kim, M. Miyahara, T. Wakagi, and H. Shoun. (2008) *Streptomyces griseus* enhances denitrification by *Ralstonia pickettii* K50, which is possibly mediated by histidine produced during co-culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 163-170.