

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号：31302

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2009～2012

課題番号：21360258

研究課題名（和文）

地球温暖化防止のための下水・排水処理における耐酸素性脱窒素微生物活用技術の研究

研究課題名（英文）

Study on utilization technology of oxygen-tolerant denitrifying microorganisms in sewage and wastewater treatment to prevent global warming

研究代表者

遠藤 銀朗 (ENDO GINRO)

東北学院大学・工学部・教授

研究者番号：80194033

研究成果の概要（和文）：

本研究では、 N_2OR 遺伝子 (*nosZ* 遺伝子) をターゲットとした定量 PCR 法 (リアルタイム PCR 法) による硝化脱窒素プロセス内でのこの遺伝子の消長を追跡する方法を確立した。ついで、耐酸素性脱窒素細菌として知られている *Pseudomonas stutzeri* TR2 株を硝化・脱窒素系に導入して、生残性や脱窒素活性を調べた。さらに、廃水処理システム由来の活性汚泥から、好気条件、亜硝酸存在下において脱窒素細菌をスクリーニングすることにより、*P. stutzeri* TR2 株と同様に酸素存在下でも高い脱窒能力を有する脱窒素細菌を 20 株単離した。これらの単離細菌のいくつかは溶存酸素存在下でも亜酸化窒素 (N_2O) を発生させずに優れた脱窒素能力を発揮し、かつ N_2O を電子受容体として与えた時に良好な生育を示したことから、活性汚泥から単離したこれらの脱窒素細菌は N_2O 削減技術に利用可能と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In this research project, we developed an effective method to monitor the behavior of nitrous oxide reductase gene (*nosZ*) in nitrification and denitrification processes by using quantitative PCR (realtime PCR) method. After the development, *Pseudomonas stutzeri* TR2 that was known as an oxygen tolerant bacterium was introduced into nitrification and denitrification systems, and its survival and denitrification activity were investigated. New denitrifying bacteria were isolated and selected under aerobic and nitrite-existing conditions from activated sludge obtained from a wastewater treatment plant. Among the 20 bacterial isolates, some of them were exhibited high denitrification capability with no emission of nitrous oxide under existing dissolved oxygen. These isolates also show high growth capability with nitrous oxide as a sole source of electron acceptor. Therefore, these isolates originated from activated sludge were considered to be applicable to the technology for reduction of nitrous oxide emission.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,700,000	1,100,000	4,800,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
総計	12,400,000	3,710,000	16,110,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：(1) 地球温暖化ガス排出削減 (2) 硝化脱窒 (3) 温室効果ガス (4) 亜酸化窒素 (N_2O) (5) 耐酸素性脱窒細菌 (6) 分子生物学的解析

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化の防止を実現するために多くの取り組みがなされてきている。地球温暖化は、地球大気中温室効果ガスの濃度の増加が主たる原因であるため、温室効果ガス発生量の削減と大気中濃度の減少をいかに実現するかが、全人類として取り組むべき重要な課題となっている。この課題を解決するために多方面からのアプローチがなされており、税制や財政などの政策的取り組み、温室効果ガス排出権取引やクリーン開発メカニズムの実施などというものから、市民生活における環境負荷削減活動などに至るまで、多様なレベルの多様な方策が実施されている。しかし、温室効果ガスの具体的削減については、そのための工学的研究と新しい削減技術の開発が必須とされている。

気候変動に関する政府間パネル (IPCC) は 2007 年に第 4 次評価報告書を発表しているが、地球温暖化の様々な要因を解析してかつそれらを精査し、温暖化促進の主たる原因となっている温室効果ガス増加の大半は人間活動に起因しており、また現在もなお人間活動はその増加を促進していると結論付けている。主たる原因温室効果ガスとして、二酸化炭素 (CO_2)、メタン (CH_4)、フロン類、そして亜酸化窒素 (N_2O 、一酸化二窒素に同じ) がある。IPCC の評価結果によれば、地球温暖化に最も大きい影響をもたらしているのが二酸化炭素の発生量の増加であるが、メタンは二酸化炭素の約 1/3~1/4 の影響を有しており、亜酸化窒素は二酸化炭素の約 1/10 の温暖化への影響を有し無視できないとされている。したがって、二酸化炭素以外の温室効果ガスの発生量削減についても十分な研究を行うことが必要であり、それによって人為起源温室効果ガスの発生量の総合的な削減に実質的に役立つ技術を開発することが必要と考えられる。

本研究は、主要な温室効果ガスの一つである亜酸化窒素に着目し、環境保全上重要な下水処理や産業廃棄物処理における硝化・脱窒過程において大量に発生することが知られている亜酸化窒素の、新規な削減技術を開発することを目的として実施する。亜酸化窒素は温暖化係数 (同量気体あたりの二酸化炭素を基準とする温室効果の大きさ) が 310 (倍) とされ、その発生量削減による温室効果を防止する効果

は大きいと考えられる。亜酸化窒素ガスの温暖化寄与率は全体として二酸化炭素の 1/10 程度であるとはいえ、発生の殆どが下・排水や廃棄物等からの人為起源と考えられることから、その削減は人為的に可能なものが多いと考えられており、また発生削減の実現による温暖化防止効果は決して小さいとは言えない。たとえば、亜酸化窒素ガスの発生量を人為的に 1 割削減できたとすれば、これは約 1% の全二酸化炭素発生量の削減に相当するため、1990 年比で 6% の二酸化炭素排出量の削減を国際的に約束しているわが国においては、亜酸化窒素の削減によるそれと等価の二酸化炭素削減率達成への貢献は十分に大きいものがあると言える。

2. 研究の目的

大量の亜酸化窒素ガス発生を誘発すると考えられる脱窒素反応に焦点を絞って、それに関与する微生物 (特に細菌) の窒素代謝の特性を調べ、その特性に応じた微生物利用技術とプロセス制御による亜酸化窒素発生量の削減の研究に取り組むことにした。特に、分子状酸素の残存する条件下においても、中間代謝産物としての亜酸化窒素を発生することなく最終産物である窒素ガスの生成 (完全脱窒素反応) を行うことのできる微生物 (このような微生物を「耐酸素性脱窒素微生物」と称する) の探索、特性評価および活用技術の開発を目的とする。

3. 研究の方法

地球温暖化防止のためにまず温室効果ガス発生抑制技術の開発が求められているが、温室効果ガスの一つである亜酸化窒素は地球温暖化の原因物質として同量あたり二酸化炭素の 310 倍の温室効果をもたらす、その削減の効果は大きいと考えられる。亜酸化窒素ガス発生源として下排水処理場は最大のものであるとされ、特に窒素化合物の硝化脱窒素反応から発生する亜酸化窒素の削減技術の開発は緊急な課題となっている。水域環境保全のためになされる下排水の生物学的硝化脱窒素処理において、好気・嫌気条件の遷移状態の出現は避けられず、そのような条件下で大量の亜酸化窒素ガスが発生していると見なされる。本研究を通して、亜酸化窒素ガス発生を誘発する脱窒素反応に関与する微生物 (特に細菌) の特性に応じた微生物利用技術とプロセス制御による亜酸化窒素発生量の削減を実現するために、

微好気条件でも亜酸化窒素を発生させることなく完全脱窒素を行い得る新規な生物学的硝化脱窒素技術について以下の計画および方法に従って研究を行う。

(1) 亜酸化窒素発生削減を可能にする耐酸素性脱窒素微生物生態系の選出：

下排水および下排水汚泥嫌気性消化脱離液そして嫌気性硝化汚泥等は高濃度のアンモニアを含むが、大学の実験室において研究を実施するため、微生物源として実稼働の下排水処理場および汚泥コンポスト化処理場から得られた実験試料および人工的に合成した下水（硝酸イオンを含む）を用いて研究を開始する。溶存酸素濃度 0.01mg/L～1.0mg/L および酸化還元電位 0mV～+50mV に制御した微好気脱窒素微生物反応系を作り、その中から亜酸化窒素生成量の少ない耐酸素性脱窒素微生物系を選出する。

(2) 耐酸素性脱窒素微生物集積培養系の構築：

安定した耐酸素性脱窒素微生物反応系が得られたことを確認した後に、微好気脱窒素培養系の同一条件での植継ぎ培養（基本的には 1/100 植種による継代培養法を用いる）を行い、耐酸素性脱窒素微生物集積培養(enrichment culture)を得る。

(3) 耐酸素性脱窒素微生物の純粋培養の取得：

上記によって得られた集積培養から耐酸素性脱窒素微生物の寒天平板分離法等による純粋分離を行い、低濃度の酸素存在下でも完全脱窒素反応を行う微生物の純粋培養 (pure culture) を取得する。

(4) 純粋分離できた耐酸素性脱窒素微生物の分類・同定：

研究初年度において取得できた耐酸素性脱窒素微生物の純粋分離株（複数株になると予想）の最適培養条件等の生理的特徴の評価・把握、および小サブユニット rRNA 遺伝子塩基配列などによる微生物としての分類・同定を行う。

(5) 耐酸素性脱窒素微生物の分子検出マーカー開発：

耐酸素性脱窒素微生物が保有する特徴的な亜酸化窒素還元遺伝子(*nosZ*)の塩基配列の解析と、この塩基配列を標的とした微生物の分子検出マーカーを決定する。これは、*nosZ* の遺伝子産物である亜酸化窒素還元酵素タンパク質(NosZ) (N₂O を N₂ に還元する酵素タンパク質) は一般的には分子状酸素(O₂)によって強く阻害されるが、特殊な一次構造を持つことによって O₂ にある程度まで耐性な NosZ を保有していると予想されるこ

とによる。また、(1)で決定した小サブユニット rRNA 遺伝子(16SrRNA 遺伝子など)などの分類・同定に用いられる遺伝子マーカーを併用して、耐酸素性脱窒素微生物の分子生物学的検出用 PCR プライマーと DNA プローブを開発する

(6) 下排水処理微生物生態系における耐酸素性脱窒素微生物の挙動解析手法の開発：

活性汚泥や硝化脱窒素生物反応汚泥などの微生物生態系はきわめて複雑な微生物の混合培養系となっている。そのような生態系において必要十分量の耐酸素性脱窒素微生物が生存し活性を保ち続けているかについて、この特別な微生物の挙動を把握するための手法を開発しておくことは、本研究において特に重要な研究要目である。そのために、以下のような分子生物学的微生物生態解析技術による手法を混合微生物系における耐酸素性脱窒素微生物の生態挙動解析と活性評価に適用できる検出・評価手法を確立する。

- ・リアルタイム PCR 法 (mRNA の検出を標的とするリアルタイム RT-PCR 法を含む)
- ・ T-RFLP 法 (小サブユニット rRNA 遺伝子を標的とする)

(7) 低濃度酸素存在下における脱窒素生物反応槽における耐酸素性脱窒素微生物の挙動解析：

非亜酸化窒素発生型の脱窒素生物反応を行わせるために、集積培養した耐酸素性脱窒素微生物または純粋培養によって得られた耐酸素性脱窒素微生物を導入した脱窒素生物反応リアクターについて、(3)の研究によって確立できた各種分子生物学的微生物生態解析手法を適用し、非亜酸化窒素発生型脱窒素機能を発揮している脱窒素微生物の増殖状況を評価する。また、特に亜酸化窒素還元酵素遺伝子である *nosZ* 遺伝子の転写発現の状況を定量的に評価するために、NosZ 酵素タンパク質情報をコードする mRNA を定量し、脱窒素活性および亜酸化窒素生成抑制との関連を解析する。この mRNA の定量には、主として上記で開発したリアルタイム RT-PCR 法を用いる。

(8) 非亜酸化窒素発生型脱窒素機能を安定的に発揮するための脱窒素生物リアクター制御諸元の解明：

本研究の最終年度においては、「地球温暖化防止のための下水・排水処理における耐酸素性脱窒素微生物活用技術の研究」の成果のまとめとなる研究として、完全には避けられない微好気条件においても亜酸化窒素を発生させることのない脱窒素生物リアクターの制御条件を明らかにする。耐酸素性脱窒素微生物の優先増殖

条件、特に硝酸からの脱窒素過程においてより有利に増殖のためのエネルギーを獲得するための生理的条件（酸素濃度、酸化還元電位、温度、pH、BOD濃度、C/N比、など）を明らかにし、耐酸素性脱窒素微生物の増殖速度に応じた脱窒素生物リアクターの最適固形物滞留時間(SRT)および水理的滞留時間(HRT)の運転操作条件を決定する。

4. 研究成果

平成 21 年度の研究においては以下の成果を得た。

亜酸化窒素ガス発生源として下排水処理場は最大のものであるとされ、特に窒素化合物の硝化脱窒素反応から発生する亜酸化窒素の削減技術の開発は緊急な課題となっている。水域環境保全のためになされる下排水の生物学的硝化脱窒素処理において、好気・嫌気条件の遷移状態の出現は避けられず、そのような条件で大量の亜酸化窒素ガスが発生していると見なされる。したがって、本研究では亜酸化窒素発生の削減を実現するために、微好気条件でも亜酸化窒素を発生させることなく完全脱窒素を行い得る新規な生物学的硝化脱窒素技術の開発に焦点を当てて研究を行った。

平成 21 年度の研究においては、微生物分離源として実証規模排水処理パイロットプラントから得た実験試料を用いて、微好気脱窒培養条件での植継ぎ培養を開始したが、耐酸素性脱窒素微生物の集積培養を得るまでには至らなかった。ただし、既存の研究において分離されている耐酸素性脱窒素微生物の 16SrRNA 遺伝子および N_2OR 遺伝子 (*nosZ* 遺伝子) をターゲットとした定量 PCR 法(リアルタイム PCR 法)による硝化脱窒プロセス内でのこの遺伝子の消長を追跡する技術を確立することができた。

平成 22 年度の研究においては以下の成果を得た

分子生物学的微生物生態解析手法を混合微生物系における耐酸素性脱窒素微生物の挙動解析と活性評価に適用する方法として、亜酸化窒素還元酵素遺伝子である *nosZ* 遺伝子のリアルタイム PCR 法 (*NosZ* (N_2OR) mRNA の検出を標的とする定量法 RT-PCR 法を含む) を確立した。また、耐酸素性脱窒素細菌として知られている *Pseudomonas stutzeri* TR2 株を硝化・脱窒系に導入して、一般的な脱窒細菌との増殖特性の差異を調べると共に、いくつかの条件における増殖特性と亜酸化窒素発生の関係を明らかにした。その結果、TR2 株は脱窒基質濃度 5 mM の亜硝酸を脱窒基質と

して与えた場合に他の一般的脱窒細菌よりも優勢的に増殖でき、 N_2O を発生させずに完全脱窒する可能性を明らかにできた。

平成 23 年度の研究においては以下の成果を得た。

微好気条件下でも活性が阻害されない耐酸素性 N_2O 還元酵素を保有する特殊脱窒細菌 *Pseudomonas stutzeri* TR2 株を用いて、この細菌の生育特性および活性汚泥に導入するモデル実験を行い、 N_2O 抑制効果について検証した。その結果、耐酸素性脱窒細菌 *P. stutzeri* TR2 株は微好気条件下で亜硝酸および硝酸を脱窒源基質として脱窒反応条件下で同等の増殖が可能であることが知られた。バイアル瓶実験では、TR2 株を加えると N_2O の濃度の減少を確認することができ抑制効果があることを確認することができた。活性汚泥に TR2 株を加えることで N_2O を抑制する可能性を確認できた。

アンモニア酸化細菌および N_2O 還元能を有する脱窒細菌がコンポスト化の進行に伴ってどのように変化するかを明らかにすることを目的とし、実験および解析を行った。養豚廃棄物を原料としたコンポスト製造プロセスにおける、コンポストの物理化学的性状の解析や、 NH_3 酸化酵素遺伝子 (*amoA*) および N_2O 還元酵素遺伝子 (*nosZ*) の定量およびクローン解析を行い、コンポスト中の硝化脱窒細菌の存在量および多様性について調査した。その結果、一般的なコンポスト製造法である単純繰り返し発酵法と高温前処理一繰り返し発酵法を比較すると、 N_2O の発生時期や無機窒素化合物量の変化のパターン、*amoA* および *nosZ* の存在比や各系統型の存在比が大きく異なることが明らかになった。

平成 24 年度の研究においては以下の成果を得た。

廃水処理システム由来の活性汚泥から、好気条件、亜硝酸存在下において脱窒細菌をスクリーニングすることにより、*Pseudomonas stutzeri* TR2 株と同様に亜硝酸に耐性があり、酸素存在下において高い脱窒能力を有するだけでなく、リアクター中の生残能が高いと考えられる脱窒細菌株を 20 株、および能力が未知である脱窒細菌を 3 株単離することができた。これらの単離細菌は、溶存酸素存在下でも亜酸化窒素 (N_2O) を発生させることなく脱窒反応を進行することができた。単離できた各耐酸素性脱窒細菌の 16S rRNA 遺伝子と *nosZ* 遺伝子の多くは *Ochrobactrum* 属の脱窒細菌が持つ 16SrRNA 遺伝子および *nosZ* 遺伝子と相同性が高かった。これらの新規脱窒細菌は、微好気条件下においても硝酸、亜硝酸、 N_2O を電子受容体として優れた脱窒能力を発揮できることが知られた。 N_2O を電子受容体として与えた時に良好な生育

が見られた TS3、TS6、TS18 の 3 菌株は、将来的な N₂O 削減技術への適用が期待できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Morio Miyahara, Sang-Wan Kim, Shinya Fushinobu, Koki Takaki, Takeshi Yamada, Akira Watanabe, Keisuke Miyauchi, Ginro Endo, Takayoshi Wakagi, and Hirofumi Shoun: Aerobic denitrification by *Pseudomonas stutzeri* TR2 has the potential to reduce nitrous oxide emission from wastewater treatment plants, *Applied and Environmental Microbiology*, 査読有, Vol. 76, No. 14, pp. 4619-4625 (2010) (doi:10.1128/AEM.01983-09)

② 進藤絵里香、大坪和香子、上田裕一、上田英代、宮内啓介、遠藤銀朗：コンポスト製造過程において発生する亜酸化窒素の削減に關与する脱窒細菌遺伝子の多様性と消長、*土木学会論文集 G (環境)*, 査読有, Vol. 67, NO. 7, PP. III 441- 448 (2011)

③ Morio Miyahara, Sang-Wan Kim, Shengmin Zhou, Shinya Fushinobu, Takeshi Yamada, Wakako Ikeda-Ohtsubo, Akira Watanabe, Keisuke Miyauchi, Ginro Endo, Takayoshi Wakagi, and Hirofumi Shoun: Survival of the aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2 during co-cultures with activated sludge under the denitrifying conditions, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 査読有, Vol. 76, No. 3, pp. 495-500 (2012) (doi: doi:10.1271/bbb.110785)

④ Wakako Ikeda-Ohtsubo, Morio Miyahara, Sang-Wan Kim, Takeshi Yamada, Masaki Matsuoka, Akira Watanabe, Shinya Fushinobu, Takayoshi Wakagi, Hirofumi Shoun, Keisuke Miyauchi, Ginro Endo: Bioaugmentation of a wastewater bioreactor system with the nitrous oxide-reducing denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain TR2, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, Vol. 115, No. 1, pp. 37-42 (2013) (doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.08.015

)

⑤ Takeshi Yamada, Shinya Araki, Wakako Ikeda-Ohtsubo, Keiko Okamura, Akira Hiraishi, Hideyo Ueda, Yasuichi Ueda, Keisuke Miyauchi, and Ginro Endo: Community structure and population dynamics of ammonia oxidizers in composting processes of ammonia-rich livestock waste, *Systematic and Applied Microbiology*, 査読有, Vol. , No. (2013) (<http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.02.001>)

[学会発表] (計 22 件)

① W. Ikeda-ohtsubo, M. Miyahara, K. Sang-Wan, A. Watanabe, S. Fushinobu, T. Wakagi, H. Shoun, K. Miyauchi, G. Endo: Pilot scale bioaugmentation for removing nitrous oxide (N₂O) using denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* strain TR2; a case study, *Environmental Microbiology and Biotechnology* 2012, *Environmental Microbiology and Biotechnology* 2012, 2012.04.11, School of Engineering, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Bologna, Italy

② 遠藤銀朗：窒素化合物を高濃度に含む有機性廃水・廃棄物のバイオ処理プロセスにおける亜酸化窒素の発生メカニズムと発生抑制に関する研究、第 20 回北海道大学衛生工学シンポジウム、2012 年 12 月 4 日、北海道大学学術交流会館、北海道札幌市

他、20 件

[図書] (計 1 件)

遠藤銀朗、他、培風館、IFO 微生物学概論、2010、執筆ページ数 15 ISBN978-4-563-07811-9

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 銀朗 (ENDO GINRO)
東北学院大学・工学部・教授
研究者番号：80194033

(2) 研究分担者

中村 寛治 (NAKAMURA KANJI)
東北学院大学・工学部・教授
研究者番号：90382655

宮内 啓介 (MIYAUCHI KEISUKE)
東北学院大学・工学部・教授
研究者番号：20324014