

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 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510089

研究課題名（和文）リン蓄積細菌の好氣的亜硝酸脱窒に起因する亜酸化窒素の生成特性

研究課題名（英文）Characteristics of Nitrous Oxide Production Originated from Aerobic Denitrification of Nitrite by Poly-Phosphate Accumulating Organisms

研究代表者

齋藤 利晃（SAITO TOSHIAKI）

日本大学・理工学部・教授

研究者番号：50277381

研究成果の概要（和文）：ポリリン酸蓄積細菌の N_2O 生成能を明らかにするための基礎的研究を行い、以下の結果を得た。(1) *Rhodocyclus* 属のポリリン酸蓄積細菌 (R-PAO) は亜硝酸の好気脱窒能を有しており、その最終生成物として一部を N_2O で放出する。一方、*Actinobacteria* 属のポリリン酸蓄積細菌は亜硝酸の好気脱窒能をほとんど有しておらず、それ故に、 N_2O 生成能も著しく小さい。(2) R-PAO の N_2O 生成条件を調べたところ、亜硝酸濃度や酸素分圧を低く保ち、かつ脱窒活性比を高く保つことが N_2O 転換率の抑制につながる。但し、 N_2O 生成量制御という観点からは、それらのバランスが重要である。

研究成果の概要（英文）：Potentials of Nitrous Oxide (N_2O) production by Poly-Phosphate Accumulating Organisms (PAOs) were examined to reduce N_2O emission from wastewater treatment plants. Acetic acid, peptone and their mixture were used as organic substrates to cultivate the sludge enriched with different types of PAOs having different denitrification capability. Several findings were obtained as follows; 1) *Rhodocyclus*-related PAO (R-PAO) can denitrify nitrite aerobically and produces N_2O as one of some final products. On the other hands, *Actinobacteria*-related PAO (A-PAO) does have little aerobic denitrification capability, hence, N_2O production is negligible. 2) Influencing factors on N_2O production by R-PAO are nitrite concentration, partial pressure of oxygen, and denitrification capability of R-PAO. The high nitrite concentration causes the higher aerobic denitrification rate of nitrite and the higher nitrite conversion to N_2O . The higher partial pressure of oxygen results in the higher nitrite conversion to N_2O and the lower aerobic denitrification rate of nitrite. Hence, the N_2O production rate depends on their balance. The higher denitrification capability of R-PAO results in the higher aerobic denitrification rate of nitrite and the lower nitrite conversion to N_2O . Hence, the N_2O production rate also depends on their balance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：環境負荷低減技術

1. 研究開始当初の背景

水処理プロセスに由来する亜酸化窒素の発生については、特に 90 年代より精力的な研究がなされ、低溶存酸素濃度条件下などに不完全な硝化脱窒が生じ、亜酸化窒素の発生量が増大することが報告されている。しかし、既存研究の多くは、現場調査に基づいた排出量実態の把握を主目的とするか、あるいは、硝化および脱窒細菌の亜酸化窒素生成能をバイアルビン内で回分的に調べる研究に留まり、亜酸化窒素の生成メカニズムを完全に解明するには至っていない。その原因として、申請者は、(1)リン蓄積細菌の寄与が未解明であること、(2)実験室レベルの連続反応槽を用いた研究例が少ないことの2点に着目した。

(1) リン蓄積細菌の寄与に関する研究の欠如
競合細菌であるグリコーゲン蓄積細菌について、微好気条件下における亜硝酸脱窒の最終生成物の多くが亜酸化窒素であるとの報告 (Zeng ら,2004) があるが、リン蓄積細菌に関する報告例は無い。しかし、申請者が連携研究者とともにやってきた『リン蓄積細菌の好氣的代謝に及ぼす亜硝酸の影響に関する研究』において、リン蓄積細菌の好氣的亜硝酸脱窒を世界に先駆けて見出しており (Yoshida ら,2006)、その生成物として亜酸化窒素の発生が強く懸念される状況にある。これまで効果的な抑制につながっていないのは、硝化細菌と通常の脱窒細菌の寄与に関する研究に偏り、リン蓄積細菌の寄与が見過ごされてきたためと考えられる。

(2) 実験室レベルの連続反応槽を用いた制御された系に於けるメカニズム研究の欠如
これまでに申請者を含め国内外で精力的に行われてきた亜酸化窒素発生量の実態調査と排出係数の導出は、メカニズムの解明には至っていない。また回分試験により、硝化細菌の亜酸化窒素生成能 (Schmidt ら,2004) や硝化細菌と脱窒細菌の寄与の推定 (Tallec ら,2006) がなされているが、実験室レベルの制御された連続反応槽において、影響因子を詳細に検討した例は少ない (国総研 H17 報告書など)。すなわち、詳細なメカニズムに至る研究がなされていない。申請者はその理由として、実験室規模の反応装置では酸素溶解効率が極度に低いため、排出ガス中の亜酸化窒素が希釈され、適切な実験系を設定できないためであると考えた。そこで、本研究に於いて、 kLa を指標とした内部ガス循環式反応槽を開発し、室内実験への適用を行う。

2. 研究の目的

亜酸化窒素の生成に寄与する細菌群のう

ち、特にリン蓄積細菌の好氣的亜硝酸脱窒に伴う亜酸化窒素ガス生成に着目し、曝気風量削減などによる亜硝酸蓄積時の生成抑制法を確立することで、地球温暖化対策と生物学的リン除去の両立に貢献することを目的とした。そのため、具体的に以下の目標を立てて研究を遂行した。

(1) *Rhodocyclus* 属および *Actinobacteria* 属ポリリン酸蓄積細菌の亜酸化窒素生成能について、①好氣的亜硝酸脱窒に起因する亜酸化窒素生成能を明らかにすること、②それに与える影響因子 (亜硝酸濃度、溶存酸素濃度、酸化還元電位および蓄積有機物量) を明らかにすること、③以上の結果より、好氣的亜硝酸脱窒に起因する亜酸化窒素生成能を表現する数式モデルを構築すること、④連続処理装置を用いた実験により、好氣的亜硝酸脱窒に起因する亜酸化窒素の発生を抑制する運転方法を確立することを目的とした。

(2) kLa を指標とした実験室規模の内部ガス循環式反応槽を開発し、 kLa を指標とする亜酸化窒素揮散量の算出方法を確立すること

3. 研究の方法

PC 制御により、pH や流入基質を正確に制御し、DO や ORP を常時計測/記録可能な回分式反応槽を、酢酸、ペプトンおよび両者の混合物に順次基質を変更し、嫌気好気法および嫌気無酸素法で運転することで、多様な脱窒活性を有する *Rhodocyclus* 近縁のポリリン酸蓄積細菌、*Actinobacteria* 近縁のポリリン酸蓄積細菌、およびその共存汚泥を集積培養した。得られた汚泥を適宜採取し、バイアル実験により、好氣的亜硝酸脱窒による亜酸化窒素生成特性を調べた。気相部をヘリウムベースとし、酸素濃度を 0 から 100% まで数段階に調整し、pH 調整のために MOPS を用いて亜硝酸脱窒、リン摂取および亜酸化窒素生成を把握した。酸素の供給を制限しないように、気相部を全体の 80% に調整し、十分に震盪しながら反応を行わせた。得られた結果から、好氣的亜硝酸脱窒、好氣的リン摂取阻害および亜酸化窒素生成を表現する数式モデルの構築を行った。

また、両ポリリン酸蓄積細菌の競合関係を明らかにするため、適宜汚泥を採取して酢酸またはペプトンの摂取性能およびリン放出・摂取性能を調べるとともに、亜硝酸に対する阻害の大きさを把握した。これらの結果から両 PAOs の炭素源を廻る競合関係を明らかにするとともに、集積培養槽に直接亜硝酸を微量添加するなどして両 PAOs の消長を調べ、競合関係に影響を与える因子を調べた。

4. 研究成果

(1) *Rhodocyclus* 属および *Actinobacteria* 属のポリリン酸蓄積細菌 (R-PAO および A-PAO) の好氣的脱窒に起因する亜酸化窒素生成能を調べた。その結果, R-PAO は, 好気条件下において亜硝酸を脱窒し, 亜酸化窒素を生成することを明らかにした。一方, A-PAO は, 好氣的に亜硝酸を脱窒する能力に乏しいことから, 好気条件下においては亜酸化窒素生成能をほとんど有しないと結論付けた。

図 1 に亜硝酸の好気脱窒速度を亜硝酸初期濃度に対してプロットしたものを示す。

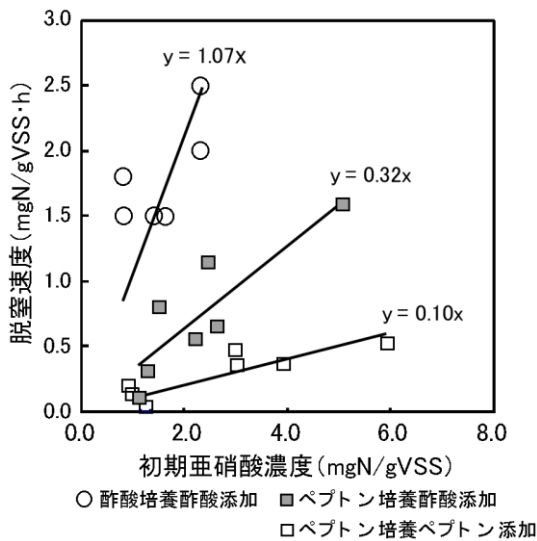


図 1 炭素源の相違による亜硝酸の好気脱窒速度への影響

図に示される通り, 酢酸培養された汚泥に酢酸基質を与えた場合に大きな脱窒速度を有しているのに対し, ペプトン基質で培養した汚泥にペプトンを与えた場合には脱窒速度は 10%程度である。前者は R-PAO が優占化した汚泥であり, 後者は A-PAO が優占した汚泥である。一方, ペプトン培養汚泥に酢酸を与えると, その中間の脱窒速度を有した。これはペプトン培養汚泥に共存する R-PAO によるものと, A-PAO の酢酸利用によるものと考えられる。

(2) 異なる脱窒能力を有する R-PAO を培養し, 亜硝酸の好気脱窒由来の N_2O 生成に与える影響因子を調べたところ, 亜硝酸濃度, 酸素分圧および脱窒活性比について, その影響を明らかにすることができた。

図 2 は, 硝酸脱窒能力を有しない (脱窒活性比 0%) の R-PAO について酸素分圧の影響を調べたものである。 N_2O 転換率は酸素 40%程度までは変わらず, それより大きな酸素分圧下では, 分圧とともに低下した。一方,

N_2O 生成速度は酸素分圧の上昇とともに低下しており, このことは亜硝酸の好気脱窒速度そのものが低下していることを示している。いずれにせよ, 硝酸脱窒能力を有しない R-PAO については, N_2O 生成速度を考える上で酸素分圧は非常に大きな影響因子であると言える。

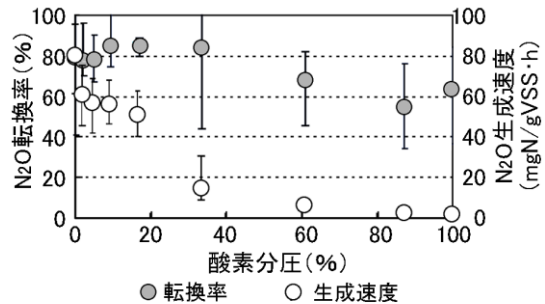


図 2 酸素分圧と N_2O の生成
汚泥: 酢酸培養, 脱窒活性比 0%
条件: 亜硝酸 5mgN/L

一方, 脱窒能力を有する R-PAO について調べた結果を図 3 にまとめる。脱窒活性比が低くなるほど, 転換率が高くなる傾向みられ, また, 酸素分圧 5%と 10%には差がないことが示された。

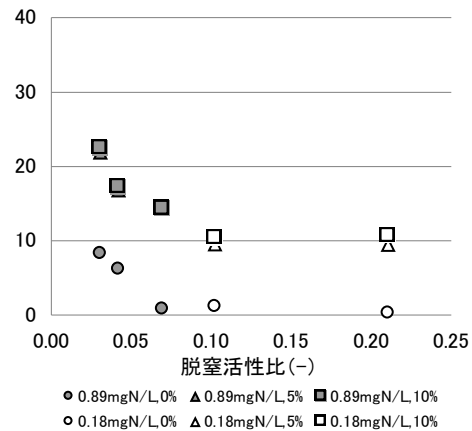


図 3 脱窒活性比と N_2O 転換率
凡例 (左: 亜硝酸濃度, 右: 酸素分圧)

(3) 以上の結果, 並びに図 4 に示す亜硝酸濃度依存性について調べた結果をもとに, R-PAO による亜硝酸の好氣的脱窒に起因する亜酸化窒素生成能を表現する簡易な数式モデルを構築した。すなわち, 次式に示すように N_2O 生成速度が亜硝酸の好気脱窒速度と亜硝酸からの転換率の積によって表されると考え, それぞれに対する亜硝酸濃度依存性を Monod 式にもとづいて解析した。

$$r_{N_2O} = \gamma_{NO_2} \cdot r_{NO_2}$$

r_{NO_2} : 亜硝酸の好気脱窒速度

γ_{NO_2} : 亜硝酸からの転換率

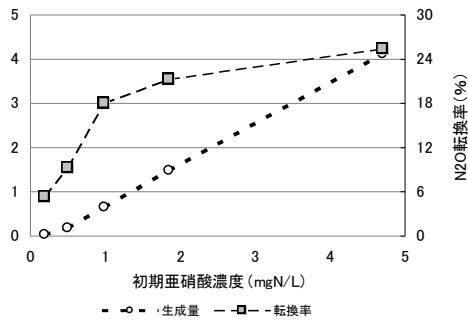


図4 N₂O生成速度およびN₂O転換率の亜硝酸濃度依存性
汚泥：酢酸培養，脱窒活性比21%
条件：酸素分圧5%

① 亜硝酸の好気脱窒速度に及ぼす亜硝酸濃度の影響

$$r_{NO_2} = r_{NO_2, \max} \cdot \frac{C_{NO_2}}{K_{NO_2} + C_{NO_2}}$$

$$r_{NO_2, \max} = 41.3 \text{ mgN} \cdot \text{gVSS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

(但し，酸素分圧5%，脱窒活性比0.21)

$$K_{NO_2} = 11.1 \text{ mgN/L}$$

② 亜硝酸からのN₂O転換率に及ぼす亜硝酸濃度の影響

$$\gamma_{NO_2} = \gamma_{NO_2, \max} \cdot \frac{C_{NO_2}}{K_{NO_2} + C_{NO_2}}$$

$$\gamma_{NO_2, \max} = 30.8\% \quad K_{\gamma_{NO_2}} = 0.44 \text{ mgN/L}$$

(但し，酸素分圧5%，脱窒活性比0.21)

(4) A-PAO については好気条件下における亜酸化窒素生成能を有しないが，実処理系においては R-PAO とともにリン除去に寄与していることから，A-PAO の存在を無視することはできない。実処理系における亜酸化窒素生成に対する R-PAO の寄与を推定し，制御するためには，両ポリリン酸蓄積細菌の競合関係を明らかにすることが重要である。その視点に基づき，両者の競合関係を炭素源の種類（酢酸およびペプトン）並びに亜硝酸の存在による影響を調べ，以下の結果を得た。

① 両 PAO は酢酸を廻って基質の摂取競争を生じうるが，一般的な条件下では酢酸培養時は R-PAO が圧倒的に優占化（99%以上）する。

② ペプトンを用いて培養した場合には，A-PAO が優占化するが，R-PAO も共存す

ることから，アミノ酸の一部を R-PAO も摂取していることが考えられた。

③ 酢酸とペプトンの混合基質で培養しているところに亜硝酸を投入したところ，両 PAO の存在量に変化が表れた。すなわち，R-PAO が減少し，A-PAO が増加した。また，その際，リン除去性能は低下した。

(5) kLa を指標とする亜酸化窒素揮散量の算出方法について，理論的な解析を行い，幾つかその手法を提案した。実データとの比較検討による解析方法の妥当性の検証については，今後行うことにしている。

(6) 以上の知見をまとめて記す。

① R-PAO は亜硝酸の好気脱窒能を有しており，その最終生成物の一部は N₂O である。一方，A-PAO は亜硝酸の好気脱窒能をわずかしか有しておらず，それ故に，N₂O 生成能も著しく小さい。

② R-PAO と A-PAO の競合関係について調査したところ，酢酸およびペプトン中のアミノ酸を廻って競合しうることが分かった。また，それらを加味した数式モデルを開発し，将来的な予測のための基礎式を構築した。また，両者の競合関係に影響を与える因子として，基質の組成の他に亜硝酸の存在が挙げられた。従って，地球温暖化防止の観点から望ましいと考えられる A-PAO を利用してリン除去および回収を行うことが提案されるが，アミノ酸系の基質の場合，酢酸を利用する場合と比べてリン除去能が制限されることは避けられない。リン除去と N₂O 発生のパランスが重要となる。

③ R-PAO に対し，N₂O 生成を抑制させるための環境条件を調べたところ，亜硝酸濃度を低く保つことと，酸素分圧を低く保つこと，脱窒活性比を高く保つことが N₂O 転換率の抑制につながることを示された。但し，酸素分圧を低く抑えることや脱窒活性比を高くすることは，亜硝酸の好気脱窒速度を高めることになり，転換率を押さえることができて，結果的に大きな生成量に至る可能性があるため注意を要する。

④ R-PAO に対し N₂O 生成を引き起こす亜硝酸の好気脱窒速度および N₂O 転換率について，数式モデルを構築した。今後，実処理施設における適用性の検討が必要であるが，これにより生物反応槽から排出される N₂O に対するポリリン酸蓄積細菌の寄与を推定することができ，将来的な自動制御につながる基礎式を構築することができた。

⑤ 溶解態 N₂O と排出ガス中の N₂O の関係を数式的に表現する方法を検討した。実処理場への適用については今後の課題であるが，これにより実験室規模の反応槽における N₂O 収支を押さえることが可能になることが期

待されることから、 N_2O 生成メカニズムの検討が更に進展すると期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

① 齋藤利晃 リン蓄積細菌の亜酸化窒素生成に及ぼす溶存酸素濃度の影響, 土木学会第 65 回年次学術講演会, 平成 22 年 9 月 3 日, 北海道大学

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 利晃 (SAITO TOSHIAKI)

日本大学・理工学部・教授

研究者番号: 50277381

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

吉田 征史 (YOSHIDA YUKIHITO)

日本大学・理工学部・教授

研究者番号: 40434120