

堆肥化と排水処理における亜酸化窒素発生削減システムの構築

東北学院大学工学部 遠藤銀朗研究室

1. 固形廃棄物の処理や排水の処理 における亜酸化窒素 (N_2O) の発生と環境保全上の問題

亜酸化窒素(N_2O)は、等量の二酸化炭素の約310倍の温室効果を有しており、温室効果ガスとしての地球温暖化への寄与度は2007年度で全ガスの約8%を占めています。また、その比率は現在も徐々に増加しています。これに加えて、 N_2O はオゾン分解反応サイクルを促進することが知られるようになり、成層圏オゾン層破壊物質としても放出量の抑制が重要な世界的環境課題になってきています。 N_2O の発生は湿地、草地、森林などの自然起源のものもありますが、主な発生源として過剰に施肥がなされた農地土壌や、有機性廃棄物および廃水の処理・処分プロセスなど、人為由来のものが大きな割合を占めています。 N_2O は窒素化合物の生物による代謝過程において発生しますが、特に有機窒素化合物が分解してできるアンモニアの硝化過程や硝酸・亜硝酸からの脱窒過程において、中間代謝産物として生成され大気中に放出されます。自然起源の N_2O とは異なり、上記の人為由来の N_2O の発生は人間による制御が可能なものも多いと考えられるのです。

当研究室では、窒素化合物を高濃度に含有する畜産廃棄物の堆肥化プロセスと、同じく窒素化合物を高濃度に含有する廃水の硝化脱窒素プロセスにおける N_2O の発生メカニズムの解明と、発生抑制のための技術の開発を行っています。それらの研究結果から、有機性廃棄物および廃水の処理・処分プロセスから発生する N_2O は、ある一定の操作条件下で増加すること、およびそのような操作条件の回避や特殊な能力を持つ微生物の利用によって技術的に削減可能であることを知ることができました。

2. 畜産廃棄物の堆肥化プロセスにおける N_2O 発生抑制に関する研究

畜産廃棄物の堆肥化プロセスについて調べたところ、図-1に示したように堆肥化過程の特定の時期に N_2O が多く発生することが分かりました。

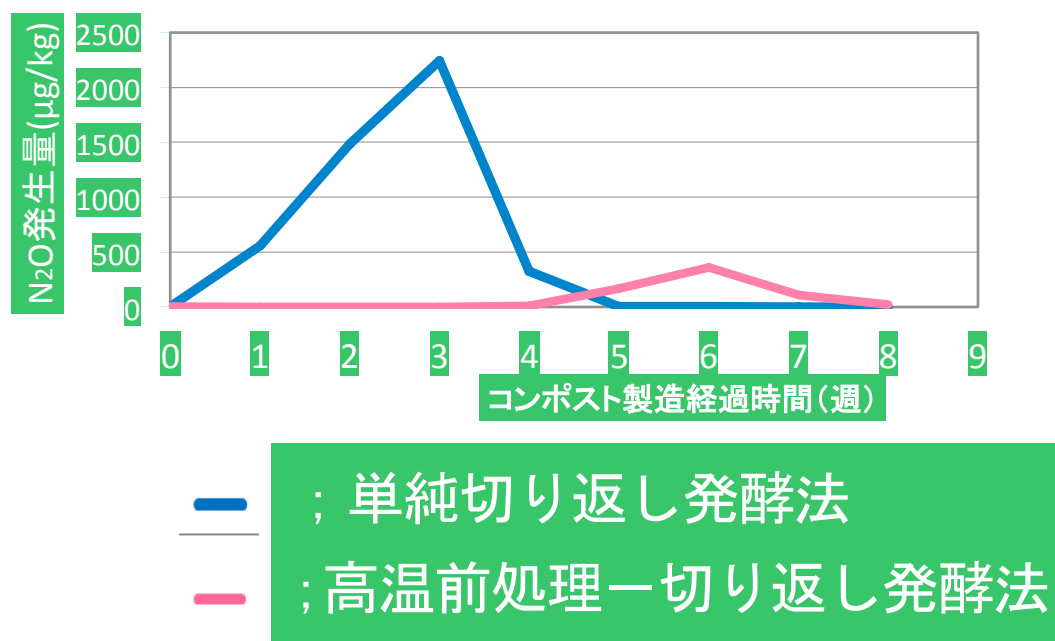


図-1 堆肥発酵方法の違いによる堆肥化過程における N_2O の発生の事件的経過

また、コンポスト発酵細菌群が持つ脱窒遺伝子である *nirS* および *nosZ* の多様性は非常に高く、かつ堆肥化初期から後期にかけて優勢となる遺伝子タイプが大きく変化することが知られました。本研究では、まず豚糞尿処理プロセス由来の廃棄物（主に搾汁残渣および脱水汚泥）の堆肥化プロセスにおける無機窒素化合物量の形態変化とそれに関与する微生物群集の解析を行いました。また、無機窒素化合物量の形態変化に関与する微生物遺伝子である *amoA*、*nirS* および *nosZ* の存在状況を調べました。得られた結果を図-2 に示します。一旦高温条件となる堆肥化初期においては、アンモニア酸化酵素遺伝子である *amoA* のコピー数が一旦消失しますが、約 4 週後に回復してきました。一方、 N_2O 還元酵素の遺伝子である *nosZ* は 1 週間ほどで回復しその後はほぼ安定して推移しました。また、コンポスト原料の前処理方法によってもこれらの脱窒遺伝子の存在状態は大きく異なることが知られました。これらの結果から、コンポスト製造方法の工夫や特定の遺伝子を持つ種菌の導入等によって、コンポスト製造プロセスにおける N_2O 発生抑制は可能であると考えられました。

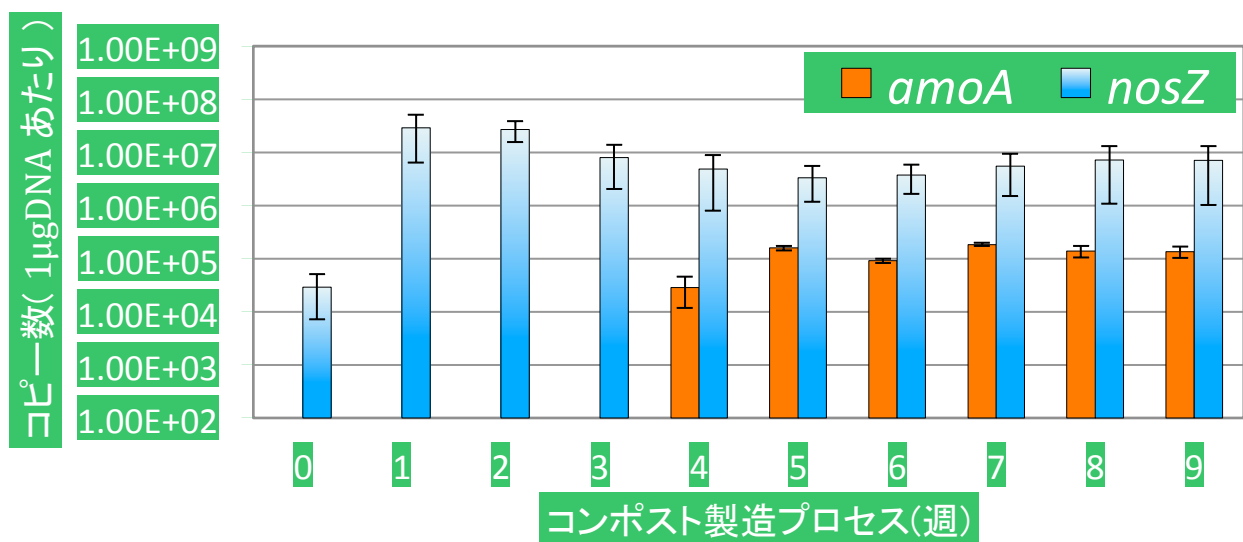


図-2 堆肥製造過程におけるアンモニア酸化酵素遺伝子と N_2O 還元酵素遺伝子の存在数の時間的推移

N_2O を N_2 に還元する N_2O 還元酵素をもたない脱窒微生物は N_2O を脱窒の最終産物として放出するため、 N_2O 発生を促進すると考えられます。また、 N_2O 還元酵素やその遺伝子である *nosZ* の発現機構は、酸素に対する耐性が弱いことが知られており、 N_2O 還元酵素の存在や活性が、脱窒反応プロセス全体からの N_2O 発生に大きく影響すると考えられます。したがって、堆肥化プロセスにおける N_2O の発生を抑制するためには、複雑な脱窒反応系の酵素とその遺伝子の発現システムをコントロールできるようになることが必要であるという結論に達しました。

3. 排水処理の硝化脱窒プロセスにおける N_2O 発生抑制に関する研究

排水の硝化脱窒プロセスにおける N_2O の発生については、微好気性条件下でも脱窒素機能を失わず、かつ N_2O を N_2 に変換できる特殊な細菌を探索して、*Ochrobactrum* sp. TS-6 株という細菌と *Pusillimonas* sp. S-14 株という細菌を発見しました。これらの細菌は、酸素分圧が 1/20 程度存在している条件下でも酸素によって脱窒の最終段階の N_2O 還元反応が阻害されることなく、硝酸や亜硝酸を窒素ガスにまで変換できることが知られました。私たちはこのような特別な能力を持つ細菌を微好気性完全脱窒細菌と名付けました。これらの細菌は分子状酸素が存在しても活性を失わない耐酸素性の N_2O 還元酵素を保有していると考えています。

このような細菌を硝化脱窒プロセスに導入して（バイオオーグメンテーション） N_2O 発生を抑制することが可能

だと考えられるため、実際にフラスコレベルでの研究とパイロットレベルの実験装置を用いてこれらの細菌（筑波大学の高谷直樹教授らによって単離され、従来から耐酸素性脱窒細菌として知られていた *Pseudomonas stutzeri* TR2 株もご了解を得て使わせてもらいました）のバイオオーグメンテーション実験を行いました。その結果、これらの特殊能力をもつ細菌は N_2O の発生を抑制するだけでなく、他の細菌によって発生した N_2O を取り込んで N_2 に変換できることも分かりました。

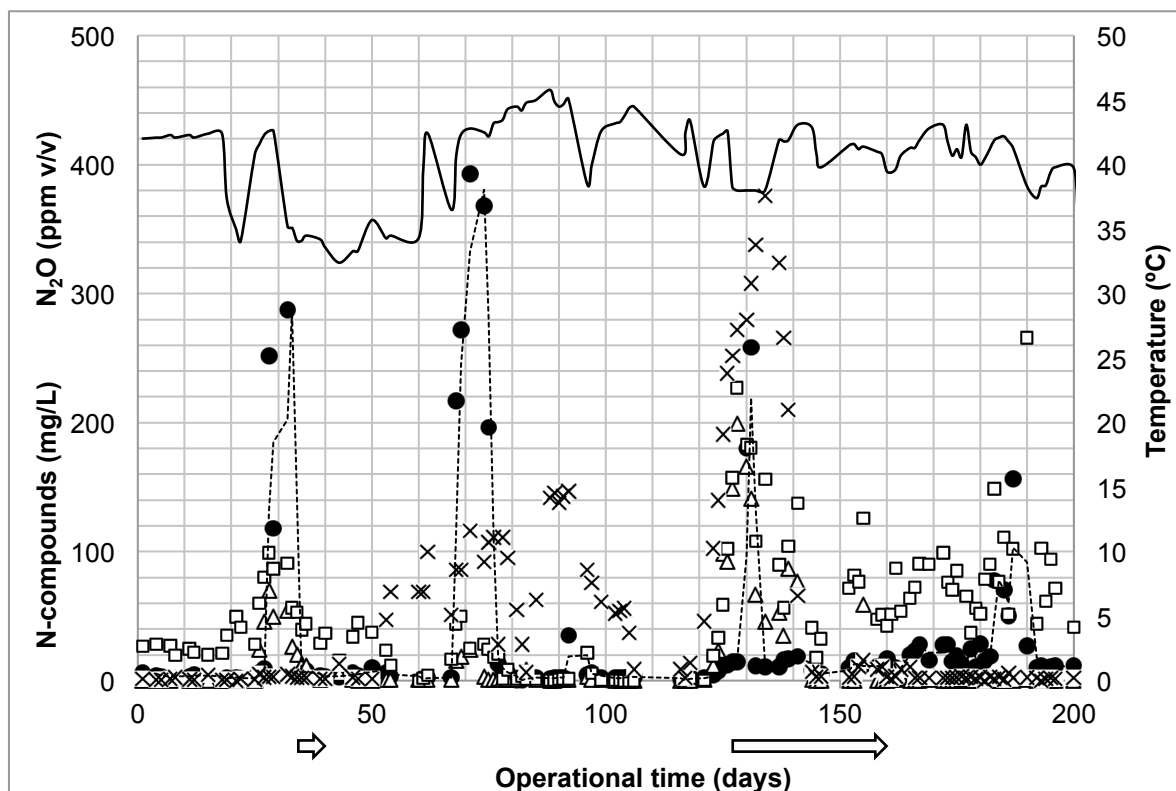
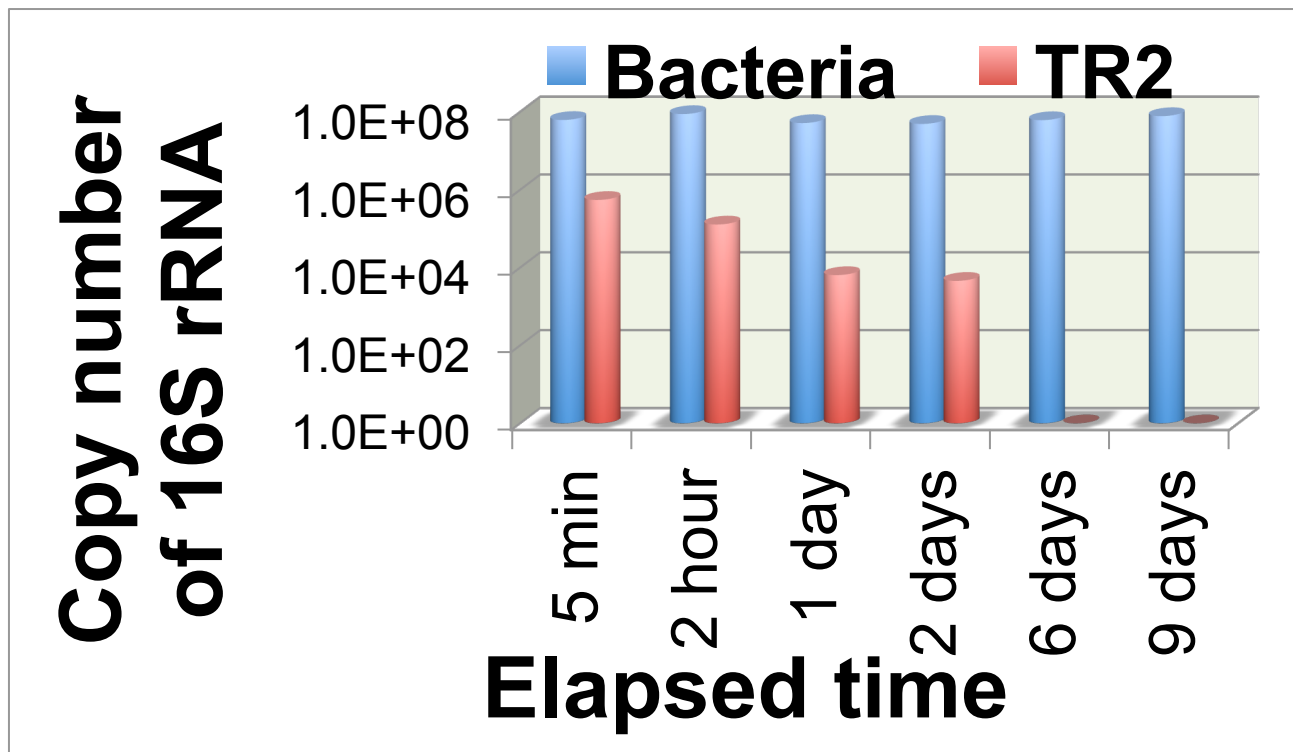


図-3 高濃度窒素含有排水の硝化脱窒パイロットプラントにおける *P.stutzeri* TR2 株のバイオオーグメンテーション実験の結果
 実線グラフ；温度 (°C), ●；ガス中の N_2O 濃度 (ppm)、△；脱窒槽混合液の NO_2-N 濃度 (mg/L)、□；硝化槽の NO_2-N 濃度 (mg/L)、×；脱窒槽混合液の NO_3-N 濃度 (mg/L)。⇒；脱窒槽に導入した *P. stutzeri* strain TR2 i の存在が確認された期間

しかし、このような特殊細菌をバイオオーグメンテーション微生物として導入した初期には、十分な効果を発揮できませんが、いずれ硝化脱窒プロセス活性汚泥の中に存在している細菌捕食性原生生物によって捕食され消滅してしまうこともわかりました。そこで、培養した特殊細菌を導入後のプロセスにおける特殊脱窒細菌の挙動解析方法と、細菌捕食性原生生物によるこのバイオオーグメンテーションの失敗を回避するために、硝化槽と脱窒槽の硝化液循環経路の途中に 42 °C まで微生物混合液を加温するための加温槽を設け、それによって細菌捕食性の原生生物を駆除する方法を考案しました。

この硝化液循環系の途中で加温を行う方式を採用した結果、パイロットプラント実験のオーグメンテーションに用いた *P. stutzeri* TR2 株は、図-4(B)に示したように長期間硝化脱窒プロセスの中に留まることができ、 N_2O 発生を抑制する能力を発揮できるようになりました。

(A)



(B)

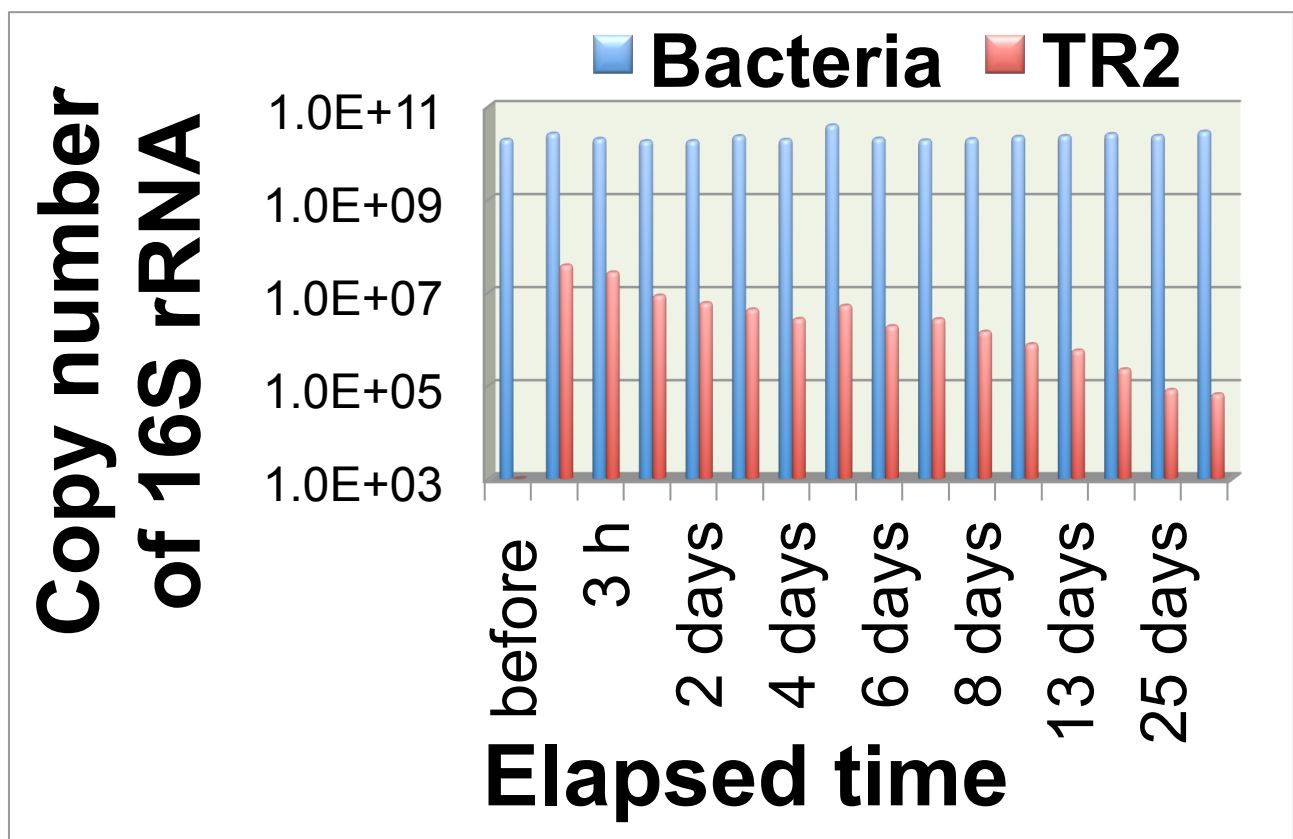
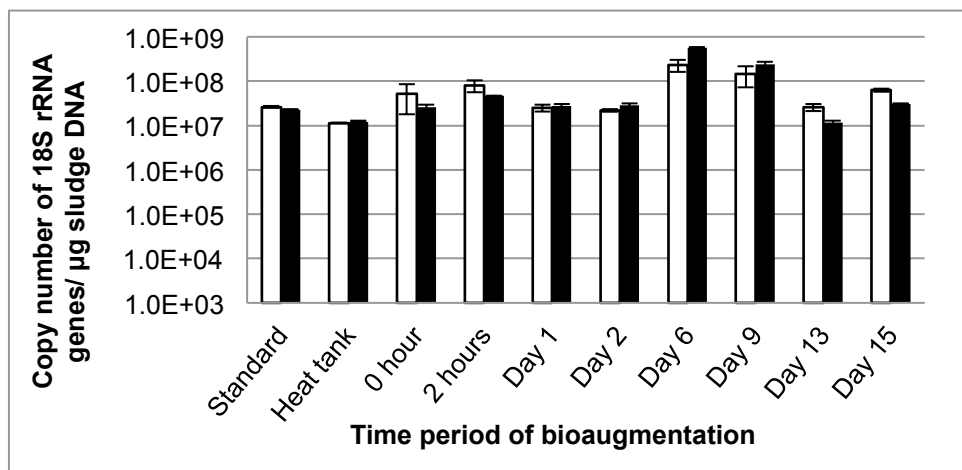


図4 消化液循環経路に中間加熱槽(42℃加熱)を設ける前 (A) と設けた後 (B) における *P. Stutzeri* TR2 の生残性

この時の、脱窒槽活性汚泥中の原生生物の濃度を 18S rRNA 遺伝子のコピー数で追跡した結果は、図-5 のようになり硝化液循環系の中で加温を行う方式を採用した場合には、活性汚泥中の原生生物は安定して低濃度のレベルを維持し、中間加温槽を設けなかった場合に見られた導入した特殊能力細菌を捕食して増殖する様子は見られませんでした。

(A)



(B)

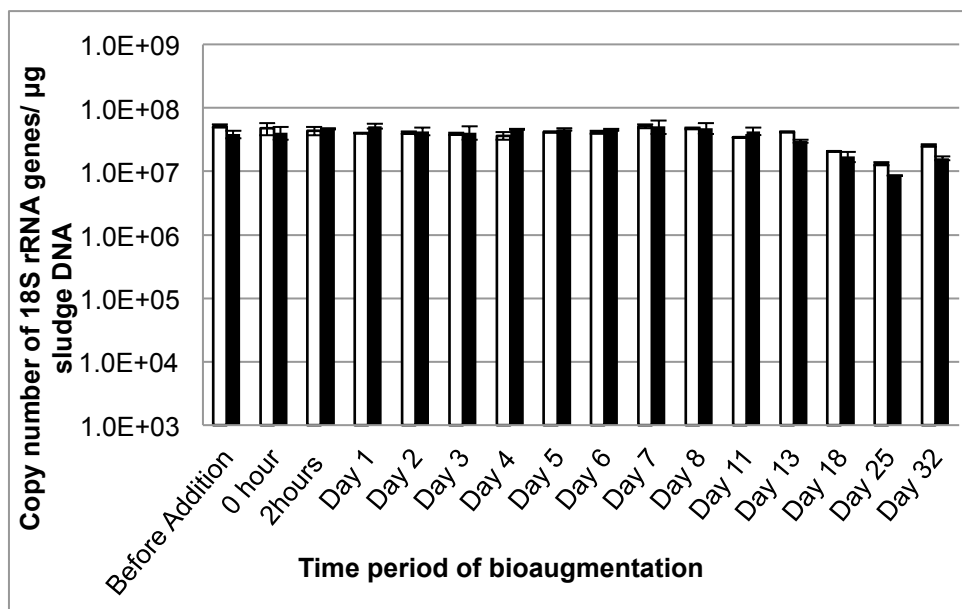


図-5 消化液循環経路に中間加熱槽(42℃加熱)を設ける前 (A) と設けた後 (B) における *P. stutzeri* TR2 株を導入後の活性汚泥中の原生生物存在量の推移

以上の結果から、適切な方法によって細菌捕食性の原生生物の増殖を抑制しながら、微好気性条件下でも脱窒素機能を失わずかつ N_2O を N_2 に変換できる特殊な細菌を培養して脱窒バイオリアクターに導入するか、あるいは脱窒バイオリアクターの中で優先的に増殖できるような条件を与えることによって、高濃度な窒素化合物を含む排水の窒素除去プロセスから発生する N_2O の量を減少することは可能であるとの結論が得られました。

本研究による発表論文の一覧

T. Yamada, K. Miyauchi, H. Ueda, Y. Ueda, H. Sugawara, Y. Nakai, and G. Endo: Composting cattle dung wastes by using a hyperthermophilic pre-treatment process: characterization by physicochemical and molecular biological analysis, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.104, No. 5, pp.408-415 (2007)

山田剛史、宮内啓介、上田裕一、上田英世、遠藤銀朗： 有機資源の循環利用に必要な環境保全型コンポスト製造技術の開発、*環境バイオテクノロジー学会誌*、Vol. 7, No. 2, pp. 111-117 (2007)

Takeshi Yamada, Atsushi Suzuki, Yasuichi Ueda, Hideyo Ueda, Keisuke Miyauchi and Ginro Endo: Successions of Bacterial Community in Composting Cow Dung Wastes with or without Hyperthermophilic Pre-treatment, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 81, No. 4, pp. 771-781 (2008)

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*, Vol. 76, No. 14, pp. 4619-4625 (2010)

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関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)* , Vol. 67, No. 7, pp. III 441-448 (2011)

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*, Vol. 76, No. 3, pp. 495-500 (2012)

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*, Vol. 115, No. 1, pp. 37-42 (2013)

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*, Vol. 36, No. 5, pp. 359-367 (2013)

Wakako Ikeda-Ohtsubo, Morio Miyahara, Takeshi Yamada, Akira Watanabe, Shinya Fushinobu, Takayoshi Wakagi, Hirofumi Shoun, Keisuke Miyauchi, and Ginro Endo: Effectiveness of heat treatment to protect introduced denitrifying bacteria from eukaryotic predatory microorganisms in a pilot-scale bioreactor, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 116, No. 6, pp. 722-724 (2013)

大坪和香子、進藤絵里香、山田剛史、上田英代、上田裕一、渡辺昭、宮内啓介、遠藤銀朗：畜産廃水処理由来の固形廃棄物の堆肥化における環境負荷低減化、Journal of Environmental Biotechnology (環境バイオテクノロジー学会誌), Vol. 15, No. 1, 1-6 (2015)