

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 安田 知子

論 文 題 目

畜産現場で利用される生物脱臭装置の最適化に向けたアンモニア分解微生物群集の解析

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	浅川	晋
委員	名古屋大学教授	小林	哲夫
委員	名古屋大学教授	渡邊	彰
委員	名古屋大学准教授	村瀬	潤
委員	名古屋大学講師	渡邊	健史

論文審査の結果の要旨

畜産現場で問題となるアンモニアの処理に対して、生物脱臭装置では窒素が蓄積するため、脱臭担体の交換あるいは窒素廃水の処理が必要となる。脱臭担体の交換を前提としていない場合、近隣に肥料としての利用先が確保できない、あるいは、脱臭廃水を処理できる施設を持たない、廃水処理施設があっても窒素負荷に余裕がないというような現場では有効な手段が確立していないというのが現状である。脱臭装置の排水対策を考える上で、窒素のマスバランスと窒素除去のポテンシャルを把握し、窒素除去を駆動する微生物メカニズムの理解を深めることが必要となる。

これまでに、生物脱臭装置での窒素消失は見られているが、脱窒の寄与は十分に明らかにされていない。また、実規模装置内でのアンモニア酸化および脱窒を担う微生物群集を決定する要因は十分に理解されていない。さらに、窒素のマスバランスと硝化と脱窒に関わる微生物群集との関係を解析した研究も行われてきていない。

本研究では、現状の装置における窒素のマスバランスと窒素除去のポテンシャルを把握し、窒素除去への硝化と脱窒の寄与を見積もること、および硝化と脱窒に関わる微生物群集を解析することを目的とした。そのために、堆肥化ガスを処理する実規模のロックウール生物脱臭装置の解析と、窒素のマスバランスをより正確に評価するためにラボスケールの脱臭装置を用いた試験を行った。

1) 土壌脱臭装置の改良型であり、アンモニアに関する設計緒元が整備され堆肥センター等で普及しているロックウール生物脱臭装置を対象とし、脱臭に関わる微生物活性の特徴を明らかにするために、装置通過前後のアンモニアおよび微生物活性と密接に関わりを持つメタン、一酸化二窒素のガス発生様式を調査した。また、ロックウール脱臭担体の硝化、脱窒活性を測定した。アンモニア、メタン、一酸化二窒素は、堆肥化の過程で発生パターンが異なるため、実規模装置においても脱臭装置の流入箇所により濃度勾配があることが明らかとなった。すなわち、アンモニアは脱臭装置の中央でピーク濃度が高かった。メタンは堆肥化前半のガスが流入する地点で高く、堆肥化後半のガスが流入する地点で低い傾向が、一酸化二窒素は逆に堆肥化後半のガスが流入する地点で高い傾向が見られた。これらのガスの濃度勾配により、硝化活性が影響を受ける可能性が示された。装置内では装置中央の下層で硝化活性が高く、装置の下層で脱窒活性が高い傾向が示された。硝化と脱窒反応いずれに対しても基質濃度が飽和している環境ではないと推察された。脱窒に関しては、堆肥化ガスを処理する実規模の脱臭装置内では、粉じん由来の易分解性有機物が電子供与体となりうると考えられた。実規模装置を対照とした調査結果と文献値から、現状のロックウール生物脱臭装置のアンモニア容積負荷に対して、硝化活性ポテンシャルは流入アンモニアの半量を処理するのに十分であるが、脱窒活性は不足している可能性が示唆された。

2) 実規模装置におけるアンモニア酸化および脱窒を担う微生物種、および堆肥化の進行に伴う装置への流入ガス組成の変化が微生物群集構造に与える影響を解析し

た。アンモニア酸化細菌群集の構成種は *Nitrosomonas europaea* lineage と *Nitrosospira* cluster 3 に属するものであることが示唆された。さらに、*Nitrosopumilus maritimus* と 84% の相同性を示す *amoA* 配列、および Thaumarchaeotal Group I.1b の soil/sediment group に属するアンモニア酸化古細菌の *amoA* 配列が検出された。実規模装置内でのアンモニア酸化細菌の分布は均一ではなく、流入するアンモニア濃度の影響を受け、アンモニアに対する親和性および細胞あたりの活性が異なるアンモニア酸化細菌が優占した群集が形成される可能性が示唆された。アンモニア酸化微生物群集とアンモニア酸化カイネティクスの関係から、現状ではアンモニア酸化古細菌よりもアンモニア酸化細菌がよりダイレクトに硝化に関わっている可能性が高いと考えられた。脱窒菌の酵素遺伝子の解析により、 α 、 β -Proteobacteria に属する菌および環境サンプルから得られたクローンの酵素遺伝子との相同性の高い配列、および *Oligotropha carboxidovorans* の *nosZ* 遺伝子と 99% の相同性を示す配列が得られた。*nirK* 遺伝子の解析結果からは、微好気環境を好む脱窒菌の存在が示唆された。脱窒遺伝子の DGGE パターンから、脱窒菌群の装置内の分布の様相に堆肥化排気の組成や装置内の硝酸濃度の偏在が影響していることが予想された。

3) 実規模装置で送風量、散水量、脱臭担体への蓄積分を正確に把握することは困難であるために、ラボスケールの脱臭装置を試作し、実規模装置から採取した脱臭担体を用いて窒素のマスバランスを調査した上で、脱窒の寄与を明らかにすることを試みた。畜産現場では、排水処理のために水循環をしていることが多いため、水循環運転の場合を想定した試験を行った。脱臭装置内でアンモニアが硝化され、イオンバランスを保つために一部は吸収されるが、硝酸の生成がアンモニアの吸収を上回り pH の低下が起こるといった理論的な除去プロセスを再現できた。運転期間中に確認された窒素消失は最大 39% であり、この窒素消失に対して、アナモックスの寄与は認められず、脱窒の寄与が示唆された。脱窒の酵素遺伝子である *nosZ* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子をターゲットにした解析においても水循環に伴う脱窒菌の存在量の増加が示唆された。水循環の過程で重要な脱窒菌種として、*nosZ* 遺伝子をターゲットにした DGGE の結果からは β -Proteobacteria の Alcaligenaceae 科、16S rRNA 遺伝子をターゲットにした次世代シーケンスの結果からは、 γ -Proteobacteria に属する *Rhodanobacter* 属と α -Proteobacteria に属する *Bradyrhizobium* 属が候補種として示された。水循環運転下で、遊離態アンモニア濃度の上昇はアンモニア酸化微生物群集の変化を引き起こす要因となり、特に、アンモニア酸化細菌の多様性が減少する可能性が考えられた。また、アンモニア酸化古細菌群集にもなんらかの影響を与えており、種類の遷移が生じていたことが示唆された。窒素が蓄積していった運転後半では pH の低下により遊離態アンモニア濃度は低く保たれており、電気伝導度が 24.4 から

84.7 mS/cm に上昇していく過程で γ -Proteobacteria に属するアンモニア酸化細菌への変遷が起こり、アンモニウム塩の形態で高濃度に窒素が蓄積してもアンモニア酸化能が維持された可能性が考えられた。

実規模装置を対照とした解析から、現状のロックウール生物脱臭装置のアンモニア容積負荷に対して、実規模装置では硝化活性ポテンシャルは、流入アンモニアの半量を処理するのに十分であるが、脱窒活性は不足している可能性が示唆された。ラボスケールの試験では、水循環条件下での窒素除去ポテンシャルは変動があり、最大で約 39% と考えられた。脱窒ポテンシャルによる消失は最大で流入アンモニア窒素の約 40% と見積もられた。本試験の窒素の動態解析では、ガス態の窒素酸化物である NO_x を把握できていないため、今後も微生物による窒素除去のポテンシャルをより正確に把握するために、精度の高いマスバランスの解析を進めていく必要がある。実規模のロックウール生物脱臭装置の硝化と脱窒に関わる微生物群集の解析により、装置の運転管理方法によって基質濃度を制御することで、アンモニア酸化と脱窒を担う微生物群集が変化する可能性が示された。水循環運転により窒素が蓄積していく過程では、 γ -Proteobacteria に属するアンモニア酸化細菌と同様に、耐塩機構を持つアンモニア酸化細菌がアンモニア酸化機能を補完しうる可能性、および装置内環境の変化にアンモニア酸化細菌のみならずアンモニア酸化古細菌群集が応答している可能性が示唆された。

以上より、本研究はロックウール生物脱臭装置の窒素除去ポテンシャルと、装置内環境の変化に対する硝化・脱窒微生物群集の応答の様相を明らかにし、ロックウール生物脱臭装置に新たな機能を付与する際の重要な知見を得た。これらの成果は新規性と独自性の観点から高い学術的価値を有すると認められ、さらに、畜産現場で問題となるアンモニアの処理に関わる生物脱臭技術の高度化へ活用されることが期待される。学位審査委員会は本論文について慎重に審査し、博士（農学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判定した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	安田 知子
試験担当者	主査 浅川 晋 副査 小林 哲夫、渡邊 彰、村瀬 潤、渡邊 健史			
(試験の結果の要旨)				
平成30年 2月 9日学位審査委員会において、主論文の内容を中心 としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した 結果、合格と判定した。				