

## 主論文の要約

### 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

安田 知子

#### 1. 背景および目的

畜産経営に由来する苦情のトップは、悪臭関連であり、畜産経営の存続に関わる問題となっている。畜産現場で問題となる臭気はふん尿や餌に由来しており、発生源、臭気成分が多種多様であるという特徴がある。日本においては家畜排泄物の固形分の処理には主に堆肥化が利用されているが、堆肥化の過程では有機物分解に伴い、アンモニアが大量に発生する。アンモニアは悪臭防止法で規制されている特定悪臭物質の一つであるとともに、環境汚染を引き起こす原因ともなりうるため、適切な処理が必要となる。畜産現場で用いられる脱臭技術のうち、生物脱臭技術は多種多様の臭気成分を含む混合臭を比較的低いランニングコストで除去可能なため、今後も畜産現場での普及が見込まれる。

生物脱臭装置内でのアンモニアの除去は、水への吸収、脱臭担体への吸着、微生物による硝化により行われるが、理論的には、約 50%が硝化されると残りはイオンバランスをとるためにアンモニウム塩として固定され、無機態窒素が蓄積する。そのため、脱臭担体の交換あるいは窒素廃水の処理が必要となる。畜産現場では、脱臭担体の交換を前提としていない装置において、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場合に、現状では有効な手段が確立していない。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。装置内で窒素循環を担う微生物種に関する情報は断片的であり、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は行われてきていない。

そこで、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。

## 2. 堆積型堆肥発酵排気を対象としたロックウール生物脱臭装置の解析

土壌脱臭装置の改良型であり、アンモニアの除去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二酸化炭素、メタン、一酸化二窒素のガス発生様式の変化を堆肥の切返し前後で調査した。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、アンモニアは堆肥の切返し後に上昇し、その後徐々に低下するというパターンを示したが、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。調査したロックウール生物脱臭装置ではメタンと一酸化二窒素濃度が増加することなく、アンモニアを除去することが可能であることが示された。

次に、ロックウール脱臭担体の硝化、脱窒活性を装置内の部位別に測定した。アンモニア酸化について、活性と微生物群集構造に影響を与える主要な要因である基質濃度に対するカイネティクスを解析した。脱窒活性については、堆肥化ガス中に含まれる粉じん等の成分が電子供与体となりうると考えられたため、脱臭担体の硝酸還元反応に及ぼす電子供与体の利用性の特徴を明らかにすることを試みた。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。アンモニア酸化の基質親和性は堆肥化前半のガスが流入する地点ほど高い傾向が見られ、実規模装置においては、アンモニアのみならずメタン濃度の勾配との関連性が予想された。硝酸還元における電子供与体の利用性については、ロックウール脱臭担体では、調査した電子供与体の中で堆肥抽出物の利用性が最も高く、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。一方、比較として供試した活性汚泥では酢酸塩の利用性が高く、ロックウール脱臭担体の脱窒菌群集は活性汚泥と異なることが示された。 $^{15}\text{N}$  トレーサー法試験による脱窒活性ポテンシャルの測定では、 $^{14}\text{NH}_4$  と  $^{15}\text{NO}_3$  添加区で  $^{29}\text{N}_2$  の生成は確認されず、今回の試験条件下ではアナモックス菌の関与は認められなかった。脱臭槽の浸透水中には高濃度の無機態窒素が含まれるため、窒素除去を行う必要があることを確認した。実規模装置を対象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。

### 3. 実規模ロックウール生物脱臭装置のアンモニア分解微生物群集の解析

実規模の生物脱臭装置内で窒素除去ポテンシャルを上げるためには、装置の運転制御に対して硝化と脱窒に関わる微生物群集がどのように変化し、微生物活性が維持されるかといったことを理解する必要があるが、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に関する理解は十分ではない。実規模装置において、装置の部位別のアンモニア酸化の基質濃度に対するカイネティクス、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示されたので、これらがアンモニア酸化および脱窒を担う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およびアンモニア酸化古細菌について、*amoA* 遺伝子をターゲットとした PCR-DGGE 法により微生物群集を解析した結果、アンモニア酸化細菌群集の構成種は *Nitrosomonas europaea* lineage と *Nitrospira* 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種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。

脱窒菌については、亜硝酸還元酵素をコードする遺伝子 *nirK* と *nirS*、および一酸化二窒素還元酵素をコードする *nosZ* 遺伝子をターゲットとした PCR-DGGE 法により群集構造を解析した。その結果、 $\alpha$ 、 $\beta$ -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を保有する脱窒菌種の存在が示唆された。*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。さらに、脱窒遺伝子の DGGE パターンから、*nirK*、*nirS* 遺伝子では上層と下層で、*nosZ* 遺伝子では地点間でバンドプロファイルが異なる傾向が見られた。これらの違いは装置内で下層に硝酸が蓄積していること、および流入ガス中の一酸化二窒素に流入地点で濃度勾配が生じていることを反映したものであると考えられた。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、アンモニア酸化および脱窒を担う微生物群集が変化する可能性が示された。

#### 4. ラボスケールの水循環式ロックウール生物脱臭装置の微生物群集解析

実規模装置における硝化・脱窒を担う微生物の活性と群集について解析を行ったが、窒素のマスバランスと窒素消失に対する脱窒の寄与を明らかにするためには、送風量、散水量、脱臭担体への蓄積分を正確に求める必要がある。実規模装置でこれらを正確に把握することは困難であるため、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う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、 $^{15}\text{N}$  トレーサー試験により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。また、トレーサー試験により求めた脱窒活性ポテンシャルは、不明窒素分がすべて脱窒されたと仮定して見積もった脱窒量を説明しうる量であると判断された。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、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  $\beta$ -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、 $\gamma$ -Proteobacteria に属する *Rhodanobacter* 属と  $\alpha$ -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示された。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、 $\gamma$ -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。

#### 5. まとめ

実規模装置を対象とした解析および文献値を基にした試算から、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、また、脱窒ポテンシャルによる消失は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  $\text{NO}_x$  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。実規模ロックウール脱臭装置内のアンモニア分解に関わる微生物メ

カニズムの結果では、 $\beta$ -Proteobacteria に属するアンモニア酸化細菌のほかに、アンモニア酸化古細菌の *amoA* 遺伝子も検出されたが、アンモニア酸化のカイネティクスの解析から、現状ではアンモニア酸化細菌が主にアンモニア酸化に寄与していると推察された。脱窒菌の酵素遺伝子の解析結果からは、 $\alpha$ 、 $\beta$ -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由来の遺伝子に相同性の高い配列および *Oligotropha carboxidovorans* に 99% の相同性を示す配列が得られた。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。装置環境を変えることにより微生物群の変化を引き起こすことができる可能性が示唆された。水循環運転により窒素が蓄積していく過程では、 $\gamma$ -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。本研究の結果、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が明らかとなった。これらの成果は装置に新たな機能を付与する際に重要な示唆を与えるものと期待される。