

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

(2018年3月)

目次

第1章 緒論

- 第1節 日本の畜産と環境問題
- 第2節 畜産現場での臭気対策
- 第3節 生物脱臭における臭気除去メカニズム
- 第4節 生物脱臭装置内の窒素循環に関与する微生物種に関する既往研究
- 第5節 生物脱臭装置内の硝化・脱窒微生物群集を決定づける要因
- 第6節 本研究の目的と本論文の構成

第2章 畜産現場の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

- 第1節 アンモニア、メタンおよび一酸化二窒素ガス発生量
- 第2節 硝化・脱窒ポテンシャル活性の解析
- 第3節 要約

第3章 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

- 第1節 アンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌群集の解析
- 第2節 脱窒菌群集の解析
- 第3節 要約

第4章 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

- 第1節 窒素収支の解析
- 第2節 アンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌群集の解析
- 第3節 脱窒菌および一般細菌群集の解析
- 第4節 要約

第5章 総合考察

- 第1節 本研究の位置づけ
- 第2節 実規模のロックウール生物脱臭装置の窒素除去ポテンシャル
- 第3節 水循環条件下での窒素のマスバランスと窒素除去ポテンシャルの変化
- 第4節 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
- 第5節 残された課題

主論文の要約

Summary

引用文献

謝辞

第1章 緒論

第1節 日本の畜産と環境問題

日本の畜産の算出額は3兆1179億円(平成27年)であり、農業全体の35.4%を占め、卵、肉、乳製品といった栄養価の高い食品の安定供給に貢献している。その一方で、家畜の飼養に伴い様々な環境問題が発生している。これらの環境問題には、悪臭、水質汚濁、衛生害虫の発生、酸性雨、温室効果ガスの発生(牛のルーメンからのメタン(CH₄)、ふん尿処理によるCH₄と一酸化二窒素(N₂O))などがあり、その影響は広範囲に及ぶ(押田ら, 2012)。畜産に起因する環境問題の一部は、畜産経営に由来する苦情発生として表れている。なかでも悪臭関連については、畜産に由来する苦情のトップであり、平成28年においても51%を占めており(農林水産省, 2017)、畜産経営の存続に関わる問題となっている。苦情の発生件数は減少傾向にあるが、農家戸数の減少が顕著なため、苦情発生農家の割合は特に養豚農家において増加している。苦情発生の背景には、宅地開発により住宅地が新たに畜産農家の近くに来たことなどもあるが、ひとたび苦情が発生すると、感情的な問題もからみ解決が非常に困難なため、畜産農家は日ごろから臭気対策を意識した経営を行う必要がある。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、蛋白質のアミノ酸や脂肪酸の分解によって生じるものであるが、畜産における臭気は、その発生源が畜舎、家畜、家畜ふん尿処理施設、放牧場、牧草地など多岐にわたり、臭気成分も多種多様であるという特徴がある(田中, 1989)。

日本における家畜排せつ物の処理は畜種ごとに様々であるが、固分については主に堆肥化が行われている(Haga, 1998)。堆肥化は有機性廃棄物を肥料に変換し、資源循環の要となる重要な技術である一方、その過程では臭気や温室効果ガスといった環境負荷ガスが発生する(Kuroda *et al.*, 1996; Fukumoto *et al.*, 2003)。環境負荷ガスのなかでも、堆肥化過程では、アミノ酸の分解の過程で生じたアンモニア(NH₃)が大量に発生する。NH₃の発生量は、堆肥化原料や堆肥化方法により異なるものの、寶示戸ら(2003)によりまとめられている畜種とふん尿処理方式に対応したNH₃揮散割合、全国の頭数ベースの排泄物処理方法の調査データ(農林水産省生産局, 2011)、家畜ふん尿中の窒素排泄量の原単位(畜産環境整備機構, 1998; 寶示戸ら, 2003; Ogino *et al.*, 2017)、飼養頭羽数(農林水産省統計情報)を基に堆肥化の過程で揮散するNH₃量を試算すると、ふん尿に含まれる窒素に対して、乳牛で約6%、肉牛で約13%、豚で約8%、鶏で29~45%である。NH₃は悪臭防止法で規制されている22の特定悪臭物質の一つであるとともに(におい・かおり環境協会, 2012)、酸性雨や富栄養化、

河川の水質汚濁、温室効果ガスの増加などの環境汚染を引き起こす原因ともなる (Sutton *et al.* 2008; Hayashi and Yan, 2010)。なお、温室効果ガスインベントリー報告書では、NH₃ および窒素酸化物 (NO_x) として揮散した窒素が沈着した後にその 1% (0.2~5%) が、N₂O として環境中へ排出されるとしている (IPCC, 2006)。

第2節 畜産現場での臭気対策

畜産現場での臭気対策の基本は発生抑制であり、畜舎におけるふん尿の早期分離、早期搬出を初めとするさまざまな発生抑制方法がある。ふん尿を混合し、また、嫌気状態に放置することは、不快な臭気の原因を増やすことになる (田中, 1989)。臭気の排出口である換気扇の位置を高くし、排出後に上昇気流にのせることで臭気の拡散を図り、希釈効果により悪臭成分濃度を減らすといった対策もある。農家ではこの他に、散布型あるいは経口型の臭気低減効果を謳った微生物等の資材を混ぜるといった対策がとられることも多い。これらのことを行ってもなお臭気が問題になる場合に、脱臭技術が用いられる。畜産現場で比較的良好に用いられる脱臭技術を表 1-2-1 にまとめた (におい・かおり環境協会, 2012; 道宗, 2014)。

表1-2-1. 畜産現場で比較的良好に用いられる脱臭技術

分類	原理	利点	欠点	脱臭装置
物理的方法	水洗法	・ 設置コスト低い	・ 不溶性ガスには不適 ・ 水交換が必要 ・ 排水処理	水洗脱臭
	吸着法	吸着材 (おが屑、もみ殻、ゼオライト、炭など) に吸着させて除去 ・ 比較的簡易で設置コスト低い	・ 吸着材の交換が必要	炭脱臭装置など
化学的方法	薬液処理法	酸・アルカリ液、強酸化液に臭気ガスを接触させ、化学反応により除去 ・ 高濃度臭気に対応可能	・ 薬液の管理 ・ ランニングコストが高い ・ 廃液処理	酸スクラパー脱臭装置
	燃焼法	600~800℃で燃焼、酸化分解させて除去 ・ 高濃度臭気に対応可能	・ 燃料費、ランニングコストが高い ・ NO _x の発生 ・ 触媒劣化物質等が含まれる場合は前処理が必要	燃焼脱臭装置
生物学的的方法	生物脱臭法	臭気成分を吸収・吸着させた後に、微生物の働きにより分解除去 ・ 複合臭に対する脱臭性能高い ・ ランニングコスト低い	・ 設置面積、装置容積が大きく、設備費がかかる ・ 排水処理	土壌脱臭装置、ロックウール脱臭装置、ハニカム脱臭装置など

脱臭のメカニズムは、臭気成分の吸着・吸収による除去および酸化分解、微生物分解による除去であり、これらが一つあるいは複数組み合わせられている。畜産現場では、水への吸収や吸着材への吸着がメインとなる物理的な方法は、装置の設置コストが低いために導入されることが多いが、吸収液 (水) や吸着材の交換がなされず、脱臭性能が発揮されていないといった問題が生じているケースがしばしば見られる。化学的な方法は、高濃度で特定の臭気

を処理するには効果が高いが、薬液や燃焼のための燃料費などの運転コストが高い。生物脱臭は、物理的、化学的な脱臭技術と比較して運転コストが低く抑えられ、環境負荷の少ない方法であり、有用な技術である (e. g., Wani *et al.*, 1997)。生物脱臭技術は、下水処理過程で発生する硫化水素の処理に関する文献が 1920 年代前半にあり、産業利用に関しては 1950 年代にアメリカで土壌を用いた土壌脱臭法で特許が取得されたのが初めであろうと考えられている (Leson and Winer, 1991)。アメリカやヨーロッパで、初期には下水処理場、レンダリングプラント、堆肥化施設などで利用された。堆肥化施設の排気処理に土壌脱臭が使われている例もすでにあり、その後さまざまな種類の産業において用いられるようになってきた。生物脱臭装置には、Biofilter、Biotrickling filter (常時水が流れている散水ろ床あるいは濡れ棚タイプ)、Bioscrubber の 3 種類がある (van Groenestijn and Hesselink, 1993)。Biofilter は、脱臭担体を充填した槽に臭気ガスを通し、脱臭担体に生息している微生物による分解を行うものである。Biotrickling filter は、常時水を脱臭素材に掛け流している。Bioscrubber は、水に臭気ガスを溶解込ませるタイプであり、特に水への溶解度が高い成分が対象となる。日本の畜産現場では、土壌やロックウール、軽石、木材チップなどを充填した biofilter タイプおよび Biotrickling filter タイプが比較的良好に使われる形態である。これまでに生物脱臭装置で処理が可能であることが確認された物質の例を表 1-2-2 に示した。

表1-2-2. 生物脱臭技術の対象とする臭気および環境負荷ガスの例
化合物、物質名

アンモニア
アミン類 (メチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、メラミン (1-3-5トリアジン2-4-6トリアミン))
硫化水素
チオール (メチルメルカプタン、エチルメルカプタン (エタンチオール))
スルフィド類 (硫化メチル、硫化エチル、二硫化メチル)
硫化カルボニル
二硫化炭素
アルカン (メタン、プロパン、ブタン、ペンタン、ヘキサン)
アルケン (エチレン)
アルコール (メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、メチルエーテル酢酸プロピレングリコール、モノメチルエーテルジプロピレングリコール)
アルデヒド (ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、イソブチルアルデヒド)
ケトン (アセトン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン)
エステル類 (酢酸エチル、酢酸ブチル、酢酸メチル)
エーテル類 (ジメチルエーテル、メチル-ヒブチルエーテル (MTBE))
塩素化合物 (ジクロロメタン、トリクロロメタン、トリクロロエチレン)
有機酸 (酪酸、吉草酸)
芳香族化合物 (ベンゼン、エチルベンゼン、トリメチルベンゼン、クロロベンゼン、ジクロロベンゼン、トルエン、キシレン、スチレン、フェノール、クロロフェノール)
モノテルペン (α -ピネン)
シロキサン
ジオスミン
チオアニソール
ピリジン
水銀蒸気
フェノールホルムアルデヒド
酸化物 (一酸化窒素、一酸化炭素)

これらには NH_3 、アミン類のほかに、硫黄化合物である硫化水素、メチルメルカプタン、硫化メチル、二硫化メチル、硫化カルボニル、脂肪族化合物のプロパン、ブタン、アルコール、

アルデヒド、ケトン、エステル類、有機酸、芳香族化合物のベンゼン、トルエン、スチレン、フェノール、水不溶性の α -ピネンなど、微生物分解性、水への溶解度および pH 等の化学的性質が異なる多種類の物質が含まれる (Wani *et al.*, 1997; Ralebitso-Senior *et al.*, 2012)。複数種類の臭気成分が混ざった複合臭を処理対象とする場合は、土壌や活性汚泥、堆肥などに含まれる多種多様の微生物を有するものを微生物源として使用することが多い。生物脱臭装置は、多種多様の臭気成分を含む混合臭を低いランニングコストで脱臭可能なため、今後も畜産現場での普及が見込まれる。

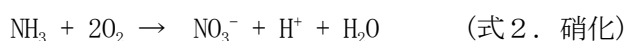
第3節 生物脱臭における臭気除去メカニズム

生物脱臭は、臭気成分の脱臭資材への吸着、水への吸収、微生物分解の複合作用により臭気を除去する方法である (本多ら, 1988; van Groenestijn and Hesselink, 1993)。処理対象ガスの水への溶解反応、微生物を保持する脱臭担体への吸着反応と、それに引き続く微生物分解反応それぞれが処理性能にかかわってくる。これらのプロセスを表す数学モデル式はいくつか提案されており、プロセスの最適化に向けた取り組みも行われている (e. g., Wani *et al.*, 1997; Devinny and Ramesh, 2005)。プロセスの反応速度は、微生物分解反応に依存しており、Monod あるいは Michaelis-Menten 速度論に従う (van Groenestijn and Hesselink, 1993)。基質となる処理対象ガス濃度が低いときは、最大除去能は濃度に比例して一次反応的に増加するが、ガス濃度が高いときは、零次反応となる。微生物反応速度を決定する装置内の基質濃度は、気相、液相、固相、バイオフィルム内の各部位の濃度が密接に関係したものであり、各部位の濃度は気液界面の移動係数、ヘンリー定数などによって計算される (Baquerizo *et al.*, 2005)。微生物反応は基質濃度のほかに、温度、水分、pH にも影響を受けるため、これらの環境要因を考慮したモデル式も提案されている (Morales *et al.*, 2003; Okkerse *et al.*, 1999)。

脱臭担体の物理的、化学的な性質は、脱臭槽内の水分、酸素濃度、栄養成分、pH などを変化させるため、微生物の増殖と活性に影響を与える。脱臭担体には、微生物保持機能、通気性、保水性、表面積、耐久性、強度、低コストであることなどが求められ、土壌は脱臭技術が開発された初期から利用されてきているが、他に、ピート、木材チップ、堆肥、多孔質粘土、ポリウレタン、セラミックなど種々のものが単独あるいは混合状態で使われる (e. g., van Groenestijn and Hesselink, 1993; Wani *et al.*, 1997; Andres *et al.*, 2009; Ralebitso-Senior *et al.*, 2012; Barbusinski *et al.*, 2017)。

堆肥化で生じる NH₃ (～数百 ppmv) を生物脱臭で処理するには、NH₃ の除去性能が低いために難しいと考えられていた (Williams and Miller, 1992)。一方、日本の畜産分野では、1967 年に土壌脱臭の検討が始まっている (福森・道宗, 1984)。ガスと脱臭素材の接触時間を長くし、通気抵抗を少なくすることで通気性を確保し、NH₃ の処理へ適用できることが示されている。国外においても、堆肥を使った堆肥化ガスの NH₃ 処理の報告があり (Park *et al.*, 2002)、また、担体の窒素吸着能を上げるなど、NH₃ の負荷を上げるための工夫がされている (Kim *et al.*, 2002)。

生物脱臭装置内での NH₃ の除去は、水への吸収、脱臭担体への吸着、および微生物による硝化により行われる。硝化能力を上回る NH₃ 容積負荷では、NH₃ の除去ができなくなること (Togashi *et al.*, 1986)、および、堆肥や剪定枝といった有機系の脱臭担体について、吸収と吸着の寄与を算定した試験では、NH₃ については吸収の寄与が高いという結果が示されており (Pagans *et al.*, 2007)、硝化と水への吸収がメインの反応であると考えられている。すなわち、理論的には以下に示す式 1、2 のように、約 50% が硝化されて、残りはアンモニウムイオン (NH₄⁺) となり、pH が中性に保たれ、NH₄⁺ と硝酸イオン (NO₃⁻) あるいは亜硝酸イオン (NO₂⁻) の形で窒素が蓄積する (Joshi *et al.*, 2000; Smet *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005; Ottosen *et al.*, 2011)。



このような塩類の蓄積は、生物脱臭での NH₃ 処理に付随する問題である。塩濃度が高まることにより硝化阻害が起きることが知られており (Hunik *et al.*, 1992)、脱臭装置内でも NH₄⁺ と NO₃⁻ あるいは NO₂⁻ の蓄積によって硝化が阻害され NH₃ 処理ができなくなるとの報告がある (Smet *et al.*, 2000)。ラボスケールの試験においても、pH7.5 では、循環水の NH₄⁺-N あるいは NO₃⁻-N の濃度が 2,000 mg/L を超えるとアンモニア酸化阻害が顕著になることが示されている (Kanagawa *et al.*, 2004)。

第 4 節 生物脱臭装置内の窒素循環に関与する微生物種に関する既往研究

窒素循環に関与する微生物種やその生態は、土壌などの陸域、海域、污水处理施設などを対象とした研究により、多くのことが明らかにされてきている。さらに、近年、アンモニア酸化を担う古細菌の存在が示されるなど (Könneke *et al.*, 2005)、新たな微生物種の発見も

相次いでいる。図 1-4-1 に微生物による窒素の循環の模式図をまとめた。

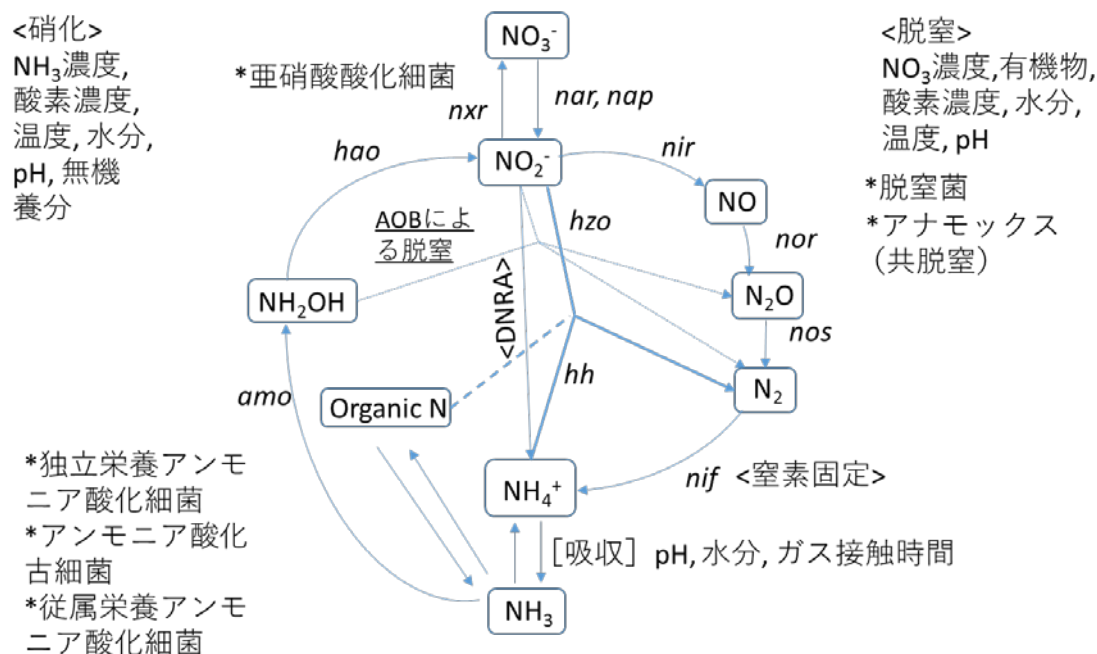


図 1-4-1. 微生物による窒素の循環の模式図

amo ammonia monooxygenase, *hao* hydroxylamine oxidoreductase, *nxr* nitrite oxidoreductase, *nar* membrane bound nitrate reductase, *nap* periplasmic nitrate reductase, *nir* nitrite reductase, *nor* nitric oxide reductase, *nos* nitrous oxide reductase, *hzo* hydrazine oxidoreductase, *hh* hydrazine hydrolase, *nif* nitrogen fixation enzyme, DNRA dissimilate nitrite reduction to ammonium

(Guo *et al.*, 2013 を元に作図)

生物脱臭装置内での NH_3 の微生物分解は、窒素循環に関わる微生物種が担っており、土壌におけるものと同様であると考えられているが (Nicolai *et al.*, 2006)、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る。硝化は、アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌の働きにより行われると考えられており (金川, 1997)、堆肥化ガスを処理する冷涼地のロックウール脱臭装置からも *Nitrosomonas* 属のアンモニア酸化細菌が分離されている (Satoh *et al.*, 2004)。しかし、アンモニア酸化を担う古細菌の生物脱臭装置での生態については全

く報告がない。分子生物学的な手法による微生物群集解析では、牛糞の堆肥化ガスを処理するパイロットスケールの Biotrickling filter の試験において、16S rRNA 遺伝子をターゲットにした DGGE 法により、*Nitrosospira* 属に近縁なアンモニア酸化細菌と *Nitrococcus* に近縁な亜硝酸酸化細菌の存在が示されている (Xue *et al.*, 2011)。豚舎臭気を処理する実規模の Biotrickling filter の菌叢解析では FISH 法により *Nitrosomonas eutropha* 様 (Juhler *et al.*, 2009) および 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたクローニング法により *N. eutropha*/*Nitrosococcus mobilis*-lineage のアンモニア酸化細菌の存在が示されている (Kristiansen *et al.*, 2011b)。なお、この装置からはアンモニア酸化古細菌の *amoA* 遺伝子は検出されていない。

前節で述べたように、生物脱臭装置では NH_3 の大部分が無機態窒素として蓄積するものの、 NH_3 を使ったラボスケールの脱臭装置の窒素のマスバランスを調べた結果では、窒素消失も見られており脱窒の存在が指摘されている。しかし、脱窒の寄与の程度および脱窒メカニズムは明らかではない (Gracian *et al.*, 2002; Malhautier *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005)。 NO 、 NO_2 、 N_2O の生成を検出している報告はわずかである (Joshi *et al.*, 2000)。生物脱臭装置内での脱窒に関与する微生物種については、animal-rendering plant のような NH_3 を含む臭気を処理する脱臭装置から分離された γ -Proteobacteria の Xanthomonadaceae 科に属する *Luteimonas* 属、*Pseudoxanthomonas* 属、*Stenotrophomonas* 属の菌が、 NO_2^- を N_2O まで還元できることが報告されている (Finkmann *et al.*, 2000)。揮発性脂肪酸類を処理する Biotrickling filter で、溶解度が高い臭気物質では、酸素の供給が律速となり硝酸が電子受容体として使われ、脱窒も起きており、16S rRNA 遺伝子をターゲットにした DGGE 法で、*Halomonas* 属、*Paracoccus* 属の菌の存在が指摘されている (Zhu *et al.*, 2004)。豚舎臭気を処理する実規模の Biotrickling filter の微生物群集解析では *Comamonas* 属に近縁な 16S rRNA 遺伝子の配列が得られており、揮発性脂肪酸の酸化および硝酸還元への関与が推察されている (Kristiansen *et al.*, 2011b)。窒素消失に関与する微生物としては、1990 年代に発見されたアナモックス菌も候補となる (Strous *et al.*, 1999a)。日本の畜産排水処理施設を調査した結果アナモックス菌が自生していることが明らかにされている (Waki *et al.*, 2010)。一方、畜産以外の産業で用いられる脱臭装置も含めて、アナモックス菌の存在の報告はない。

第 5 節 生物脱臭装置内の硝化・脱窒微生物群集を決定づける要因

生物脱臭装置内の微生物生態を解析する必要が指摘されており (van Groenestijn and

Hesselink, 1993)、装置の運転制御に対して、臭気分解に関与する微生物の種類や数がどのように変化し、臭気分解能が維持されるかといったことが研究対象となっている。NH₃ ガス単体を処理するラボスケールの Biofilter の解析では、16S rRNA 遺伝子をターゲットにしたクローンライブラリー法でアンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌は検出されず、*amoA* を対象にしたクローンライブラリー法が適用されている。その結果、*Nitrosomonas europaea/eutropha* と *Nitrospira* 属に近縁なものから *Nitrospira* 属に近縁なものへの群集変化および102日目において *Nitrosococcus* 属の *AmoA* のアミノ酸配列との相同性が76%の配列が得られており、脱臭装置内でのアンモニア酸化細菌群集の変化の様相が示されている (Sakano and Kerkhof, 1998)。また、汚水処理施設の汚泥および堆肥を脱臭担体に用いたラボスケールの Biofilter で、16S rRNA 遺伝子をターゲットとしてアンモニア酸化細菌群集の解析が行われており、汚泥では *Nitrosomonas eutropha* に、堆肥では *Nitrospira multiformis* に近縁な配列が得られ、脱臭担体によって群集構造が異なること、および運転期間中の変化が調べられている (Jun and Wenfeng, 2009)。しかし、これらの報告では装置の窒素の動態との関連性が十分に議論されておらず、群集変化を引き起こした環境要因は明らかではない。堆肥を充填した biofilter を用いたパイロットスケールの試験で、NH₃ 除去についても装置内の階層化が示されているが、微生物群集との対応は調べられていない (Liang *et al.*, 2000)。先に紹介した豚舎臭気を処理する Biotrickling filter においては、アンモニア酸化細菌が filter の外側に優占していることが示されている (Juhler *et al.*, 2009)。FISH 法、リアルタイム PCR 法、酸素のマイクロセンサー等を用い、アンモニア酸化細菌と従属栄養細菌の間で酸素の競合があること、亜硝酸酸化活性が阻害されることで亜硝酸が蓄積する可能性が指摘されている (Juhler *et al.*, 2009)。一方、脱窒菌群集の変化を解析した報告は見られない。

第6節 本研究の目的と本論文の構成

上述したように、畜産で特に問題となる NH₃ の処理に対して、既存の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た方法では、完成堆肥を脱臭担体として用い高窒素堆肥として窒素を再利用する堆肥脱臭 (田中, 2009) などが開発されてきている。脱臭廃水は肥料として利用することも可能である (濱戸ら, 2003)。しかし、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、排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、装置内での窒素除去を駆動する硝化ポテンシャルは、ラボスケールの装置において求められているが (e. g., Choi *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Blázquez *et al.*, 2017)、実規模の装置について脱臭担体のアンモニア酸化能の特徴をあらわすカイネティクスパラメーターを詳細に解析した研究は見当たらない。また、堆肥化ガスには脱窒の電子供与体となりうる粉塵や NH_3 以外の臭気成分が含まれるが、堆肥化ガスを処理する実規模の装置において脱窒ポテンシャルや脱窒菌群集は解析されていない。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おらず、実規模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、窒素除去を駆動する硝化と脱窒に関わる微生物群集を解明する必要がある。

そこで、本研究では土壌脱臭装置の改良型であり、 NH_3 に関する設計諸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、まず第2章において、解析対象とした堆積型堆肥発酵の排気を処理する実規模ロックウール生物脱臭装置について、脱臭微生物の生息場所としての装置内環境の特徴を明らかにするために、装置通過前後の NH_3 および微生物活性と密接に関わりを持つ二酸化炭素 (CO_2)、 CH_4 、 N_2O についてガス発生パターンを測定した。そして、実規模装置における硝化・脱窒活性ポテンシャルを測定した。特に窒素除去ポテンシャルを決定づけるアンモニア酸化については基質濃度が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ため、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、脱臭装置内では電子供与体の利用性が律速になると考えられるが、脱臭担体の硝酸還元反応に及ぼす電子供与体の利用性といった基礎的な知見が得られていなかったためその特徴を明らかにした。

第3章においては、第2章で解析した装置の脱臭担体について、アンモニア酸化細菌、アンモニア酸化古細菌、脱窒菌群集をそれぞれ解析し、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に関する知見を得た。また、硝化・脱窒微生物群集と、第2章で明らかにした堆肥化運転に伴う装置内環境の局在性が関連していることを示した。

第4章では、実規模装置では窒素のマスバランスを正確に把握するのが困難であるために、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 NH_3 処理メカニズムを確認した。窒素含有廃水の処理のために水を循環し、窒素が蓄積する環境下での窒

素の動態と硝化・脱窒に関わる微生物群集構造の変化を網羅的に解析し、アンモニア酸化微生物群集構造を決定する要因および水循環運転時に窒素消失に寄与していると考えられる脱窒菌群を明らかにした。

第5章では、一連の研究により得られた知見を位置づけ、装置の最適化にどう結びつけるのか、また、残された課題について考察を加えた。

<背景と目的>

生物脱臭装置での NH_3 の除去は、ラボスケールの装置を対象とした試験が多いが、実規模装置では、硝化および脱窒活性に影響を与えると考えられる基質濃度が一定ではない。実規模装置を対象として NH_3 酸化ポテンシャルを解析した報告はあるものの (Juhler *et al.*, 2009)、基質濃度に対するカイネティクスは調べられていない。また、脱窒については、実規模装置を対象として脱窒ポテンシャルを詳細に調べた報告は見当たらない。土壌脱臭装置は、ガス接触時間を確保するために広い設置面積を必要とするが、圧密に耐えうる素材として、ロックウールを用いることで、充填高を高くし、設置面積を小さくできるロックウール生物脱臭装置が開発された (全農 施設・資材部, 1990)。ロックウールは、岩石などを溶融し、繊維状に加工したもので、 SiO_2 を 35~45%、 Al_2O_3 を 10~20%、 CaO を 20~40%、 MgO を 3~10%、 $\text{Fe}_2\text{O}_3 + \text{FeO}$ を 0~12% 含む。これを基材として、ゼオライト、有機物 (穀殻等)、微生物源 (乾燥鶏糞等)、そして、通気性を確保するためにウレタンチップを混合したものが脱臭材料として用いられる。ロックウール脱臭装置は NH_3 除去に関する設計諸元が整備され、堆肥センター等で普及している。そこで、本研究では農研機構畜産研究部門 (つくば) で堆積型堆肥発酵の排気処理するために稼働しているロックウール生物脱臭装置を解析対象とし、本章ではまず、硝化と脱窒に関わる微生物群集の解析に先立ち、実規模装置の脱臭に関わる微生物活性の特徴を明らかにすることを目的とした。そのために、装置通過前後の NH_3 および微生物活性と密接に関わりを持つ CO_2 、 CH_4 、 N_2O のガス発生様式を調査した。続いて、窒素除去ポテンシャルに影響を与える微生物活性を把握するために、ロックウール脱臭担体の硝化、脱窒活性を測定した。

第1節 アンモニア、メタンおよび一酸化二窒素ガス発生量

1-1. 緒言

家畜ふんの堆肥化過程では、有機物分解の結果、 CO_2 の発生と同時に、原料の C/N 比が低いために NH_3 が大量に発生する。さらに、温室効果ガスである CH_4 と N_2O が発生し、これらの発生量および堆肥化過程での発生パターンが、ラボスケールおよびパイロットスケールでの試験により明らかにされている (Kuroda *et al.*, 1996; Osada *et al.*, 2000; Veeken *et al.*, 2002; Fukumoto *et al.*, 2003)。堆肥排気を処理する脱臭装置では、 NH_3 以外の臭気成分のほ

かに、 CH_4 と N_2O が供給され、装置内の微生物群集に影響を与えていると考えられる。比較的
低濃度(0.015-3%, v/v)の CH_4 の除去にメタン酸化細菌による biofiltration が有効である
という報告があり (Veillette *et al.*, 2012)、ロックウール生物脱臭装置内でも除去されて
いる可能性がある。反対に、 N_2O は硝化および脱窒のいずれの反応からも生成されることが
知られており (Braker and Conrad, 2011)、脱臭装置内で増加している可能性がある。そこ
で、本節では、 NH_3 および微生物活性と密接に関わりを持つ CO_2 、 CH_4 、 N_2O の通過前後の発生
パターンの変化を堆肥の切返し前後で調べた。

1-2. 材料および方法

1. ロックウール生物脱臭装置

1998年より実稼働しているロックウール生物脱臭装置(高さ3m(うちロックウール脱臭
資材充填部2.5m)、幅8m、奥行き5.8m)を対象とした。図2-1-1に脱臭装置の写真を、
図2-1-2に装置と堆肥化施設の模式図を示した。脱臭装置は上部に屋根がついており、脱臭
担体表面に設置してある12個の散水ノズルから、一日一回10分間、約 0.4 m^3 の水道水が散
水される。この間ブローアは30分間停止するようタイマー制御されている。

脱臭装置には、堆積型堆肥化発酵施設からのガスが3台の送風機(各約 $20\text{ m}^3/\text{min}$ (石橋,
2000); No. 3BLF, Tecno Wasino Co. Ltd., Japan)でガス接触時間は100~200秒となるよ
うに送風されている。堆肥化施設では、約3週間に一度、所内の牛舎エリアおよび豚舎エリ
アからの糞を中心に、固液分離後の固形物、所内にある畜舎排水を処理する活性汚泥処理施
設の余剰汚泥、敷料に用いたおが屑や稲わら、サイレージの残りなどが一部混入した原料が
投入される。投入の際に第1槽から2槽、3槽へと順に堆積物が移送され、堆肥の切り返し
が行われる。



図 2-1-1. ロックウール生物脱臭装置の全景

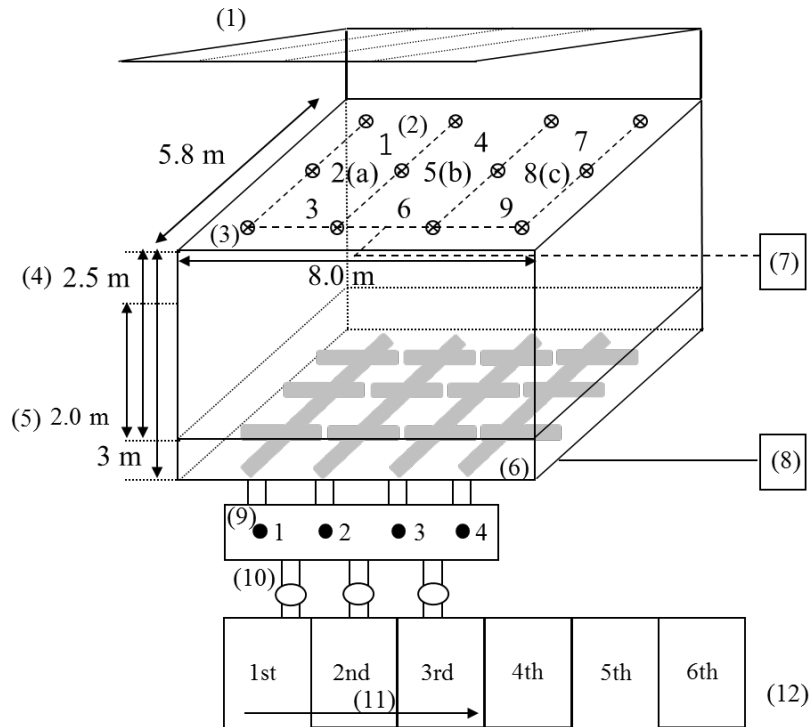


図 2-1-2. ロックウール生物脱臭装置と堆肥化施設の模式図.

(1) 屋根、(2) 脱臭槽流出ガスの採取地点 (1~9)、(3) 散水ノズル、(4) ロックウール脱臭担体充填部、(5) ウレタン混合部分、(6) 通気溝、(7) 水道水タンク、(8) 浸透水槽、(9) 脱臭槽流入ガスの採取地点 (1~4)、(10) ブロアー、(11) 堆肥化の進行方向、(12) 堆肥化施設. (Yasuda *et al.*, 2009 より改変)

2. ガス採取および分析方法

ガスの採取は堆肥の切り返し作業に合わせて行った。脱臭槽への流入ガスは、脱臭槽に送風するブロアーの後段に設置したダクトの 4 箇所から採取した。脱臭槽からの流出ガスは、脱臭装置上部に直径 24 cm、高さ 20 cm のプラスチック製ろうとを逆さにしばらくおいた後に、ガスを採取した。NH₃ は気体採取器 (GV-100、ガステック) にアンモニア用検知管を接続し測定した。検知管の検知限界は 0.2 ppmv (20°C、1atm) である。CH₄、N₂O、CO₂ の測定用には、真空引きしたバイアル瓶 (約 10 mL 容、ブチルゴム栓) にシリンジでバイアル瓶の容量に対

し 1.5 倍程度ガスを注入し、陽圧状態になるよう採取した後（長田ら，2002）、ガスクログラフを用いて以下の条件で測定した。

CH₄ の測定には水素炎イオン化検出器（FID）つきガスクロマトグラフ（6890 Series GC system, Agilent Technologies, USA）を用いた。カラムは Molecular Sieve-13X, 2.0 m×1/8 inch ID、オープン温度 50℃、インジェクション温度 80℃、検出器温度 160℃、キャリアーはヘリウムガス、ガス流量は約 30 ml/min とした。N₂O の測定は、⁶³Ni を用いた電子捕獲検出器（ECD）つきガスクロマトグラフ（GC-14A、島津）を使用した。カラムは Porapak Q 80/100 mesh, 1/8 inch ID, 2.0 m、オープン温度 45℃、インジェクション温度 70℃、検出器温度 348℃、キャリアーは 5% CH₄ (Ar ベース)、ガス流量は約 40 ml/min とした。メインカラムの前後にダミーのカラムを接続したプレカット、バックカット方式により N₂O ピークのみを検出した。CO₂ の測定には熱伝導度検出器（TCD）つきガスクロマトグラフ（model 802T、大倉理研）を用いた。カラムは Porapak Q 50/80 mesh、2.0 m×3.0 mm ID、Molecular Sieve 5A 30/60 mesh、3.0 m×3.0 mm ID、オープン、インジェクション、検出器温度はいずれも 50℃、キャリアーガスは He、ガス流量は約 30 ml/min とした。それぞれ、標準ガスを用いて検量線を作成し、サンプル濃度を求めた。脱臭槽流出ガスの採取地点間の値の差の検定は SAS (ver. 9.1、SAS Institute Inc.、USA) の GLM プロシジャの Bonferroni 法を用いた。

1-3. 結果および考察

脱臭槽からの排気中の測定箇所による濃度の違いを調べた。NH₃ は、いずれの箇所でも検知管の検出限界以下であった。図 2-1-3 に 2004 年 11 月に採取した CH₄、N₂O、CO₂ 濃度を示した。CH₄ は、地点間で濃度に幅があったが、地点 1～3、地点 4～6、地点 7～9 の順に濃度が低くなる傾向が見られた。N₂O は、装置の奥行き方向の濃度は類似しており、地点 1～3、地点 4～6、地点 7～9 それぞれの変動係数は 2.4～7.2、1.0～7.3、1.1～8.6% であった（図 2-1-4）。地点 7～9 でいずれのサンプリング時点でも濃度が高かった。CO₂ については、地点間の差において傾向が認められなかった。これらの結果と装置の構造（図 2-1-2）を考慮して、排気ガスについては地点 2、5、8 の 3 箇所について測定することとした。

図 2-1-5～2-1-8 に 2004 年 11 月と 2006 年 5～6 月の切り返し前後の NH₃、CH₄、N₂O、CO₂ 濃度の経時変化を示した。NH₃ は、堆肥の切り返し後に上昇し、その後徐々に低下するというパターンを示した。切り返し後の濃度ピークは時期により異なるが、最大 150 ppmv まで上昇した。流入地点別に濃度変化を見ると、流入地点 2 と 3 でいずれの時期でもピーク濃度が高か

った。2004年11月では流入地点4で高かった。地点1は常に低めであった。地点1は堆肥舎第1槽の排気、地点2は第1、2槽の排気、地点3は第2、3槽の排気、地点4は第3槽の排気を主に含んでいる(図2-1-2(模式図))。NH₃の発生は、堆肥化による温度上昇と同様に堆肥化が始まると速やかに始まり、切り返し時には堆積物内部に貯まっていたNH₃が発生し、発酵が進み有機物の分解の進行が緩やかになるにつれ、発生量は減少していくが(Kuroda *et al.* 1996; Osada *et al.*, 2000)、実規模装置においては、初めの3週間の切り返し後に有機物分解がさらに進み、第2槽で最もNH₃の発生が大きくなりその排気を含む流入地点2および3でNH₃濃度が高くなっていることが予想された。2004年11月では、有機物の分解が遅れ、NH₃の発生がさらに長期にわたり第3槽でも続いていたと考えられた。脱臭装置上部ではNH₃は検知管の検出限界以下にまで除去されていた。

CH₄濃度は2004年11月と2006年の2回目の切り返し後で、流入地点1で濃度が高く、地点2~4で低い傾向が見られた(図2-1-6)。堆肥化ではCH₄の発生は主に初期に起こるとのラボスケールでの過去の報告と一致していた(Kuroda *et al.*, 1996; Osada *et al.*, 2000; Veeken *et al.*, 2002; Fukumoto *et al.*, 2003)。流入ガス中の平均濃度は430 ppmv (281 mg/m³; 25°C換算、以下同じ); 0~2127 ppmv)であり、流出ガス中では301 ppmv (197 mg/m³; 0~1158 ppmv)であった。

N₂O濃度は2006年の2回目の切返し直後は流入地点4が地点2,3より低くなったものの、その他のデータでは流入地点4で高く、地点1で低くなる傾向が見られた(図2-1-7)。堆肥化では上述のCH₄とは異なり、N₂O発生は堆肥化開始直後よりも、発酵が進んだころに発生量が増え、発酵後期まで継続する(Kuroda *et al.*, 1996; Fukumoto *et al.*, 2003)。さらに、通気量が低下すると、N₂Oの発生量が増え(Osada *et al.*, 2000)、強制通気を行わない条件下で堆積量が多いとN₂Oの発生量および発生する期間が増大する(Fukumoto *et al.*, 2003)。これらの既往研究結果を考慮すると、実規模の堆積型発酵において、堆肥化の後半でN₂O発生が増えることが予想された。流入ガス中の平均N₂O濃度は4.0 ppmv (7.3 mg/m³; 0.7~9.7 ppmv)であり、流出ガス中では3.7 ppmv (6.7 mg/m³; 0.1~8.0 ppmv)であった。

CO₂濃度は2004年11月に比べ、2006年5~6月では高いピークが検出された。酸素の消費が多いときにCO₂の発生が増えるという可能性が示されており(Veeken *et al.*, 2002)、測定した時期の微生物活性の違いを反映した結果が要因の一つであることが考えられた。しかし、2連データでの濃度差が大きく、流入地点間の傾向は認められなかった(図2-1-8)。流入ガス中の平均濃度は0.43% (v/v, CO₂濃度について以下同じ) (7800 mg/m³; 0~5.0%)、流

出ガス中では 0.40% (7420 mg/m³; 0~5.7%) であった。

CH₄ と N₂O、CO₂ は温室効果ガスであり、大気中濃度はそれぞれ約 1.8ppmv、0.32ppmv、390ppmv である (いずれも 2011 年の大気中濃度; Hartmann *et al.* (2013))。2005~2011 年の平均で見ると、CH₄、N₂O、CO₂ は年間それぞれ 4.5~4.8 ppbv、約 0.8 ppbv、2.0 ppmv ずつ上昇している。N₂O は他にも成層圏のオゾン層の破壊を引き起こす原因物質である。CH₄ と N₂O のガスの発生は、微生物活動と密接な関係があり、土壌においては発生量が吸収量を上回るとされている (Conrad, 1996)。本試験ではロックウール生物脱臭装置を通過することで、これらのガス濃度の上昇は確認されなかった。CH₄ については、発生量の変化が有意なものであるかは今回の試験では明らかにできていないが、減少の傾向が見られた。実規模の脱臭装置を対象とした文献では、一般廃棄物の堆肥化施設を処理する wood bark を充填した biofilter で、CH₄ の発生量は変化せず、N₂O は増加しており、N₂O-N 発生量は除去された NH₃-N の 26% に相当すると試算されている (Clemens and Cuhls, 2003)。木材チップを充填した豚舎臭気を処理する biofilter においても脱臭槽通過後に N₂O 濃度が増加しており、NH₃-N の 10~40% が N₂O-N に変換されるとの報告がある (Dumont *et al.*, 2014)。今回調査したロックウール脱臭装置では水を循環しておらず硝化産物の蓄積が少ないために、N₂O 発生量が脱臭装置内で増加していない可能性が考えられた。

CH₄ を処理する生物脱臭装置は、除去率を上げるためには 7~33 分という長い接触時間が必要であり (Veillette *et al.*, 2012)、今回解析を行ったロックウール脱臭装置では 100~200 秒であるので、CH₄ の大半は通り抜けていると考えられるが、装置に供給された CH₄ の一部がメタン酸化反応により酸化されている可能性は否定できない。第 4 章で、本章で解析した脱臭装置から採取した脱臭担体の微生物叢解析を行ったが、Type I のメタン酸化細菌に属する *Methylobacterium* 属、*Methylosarcina* 属、および、Type II に属する *Methylocystis* 属、*Methylosinus* 属の 16S rRNA 遺伝子に近縁な配列が得られている。また、アンモニア酸化細菌は NH₃ の代わりに CH₄ を酸化できることが知られており (Jones and Morita, 1983)、土壌においても、アンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌が CH₄ 酸化に関与している可能性が示されている (Akiyama *et al.*, 2014)。逆に、メタン酸化細菌はアンモニアを酸化できることが報告されている (Dalton, 1977)。ロックウール生物脱臭装置に供給される CH₄ 濃度は NH₃ 濃度に比べ高いため、NH₃ に加え CH₄ 濃度の流入地点による濃度勾配はアンモニア酸化のカイネティクスに影響を与える可能性が考えられた。

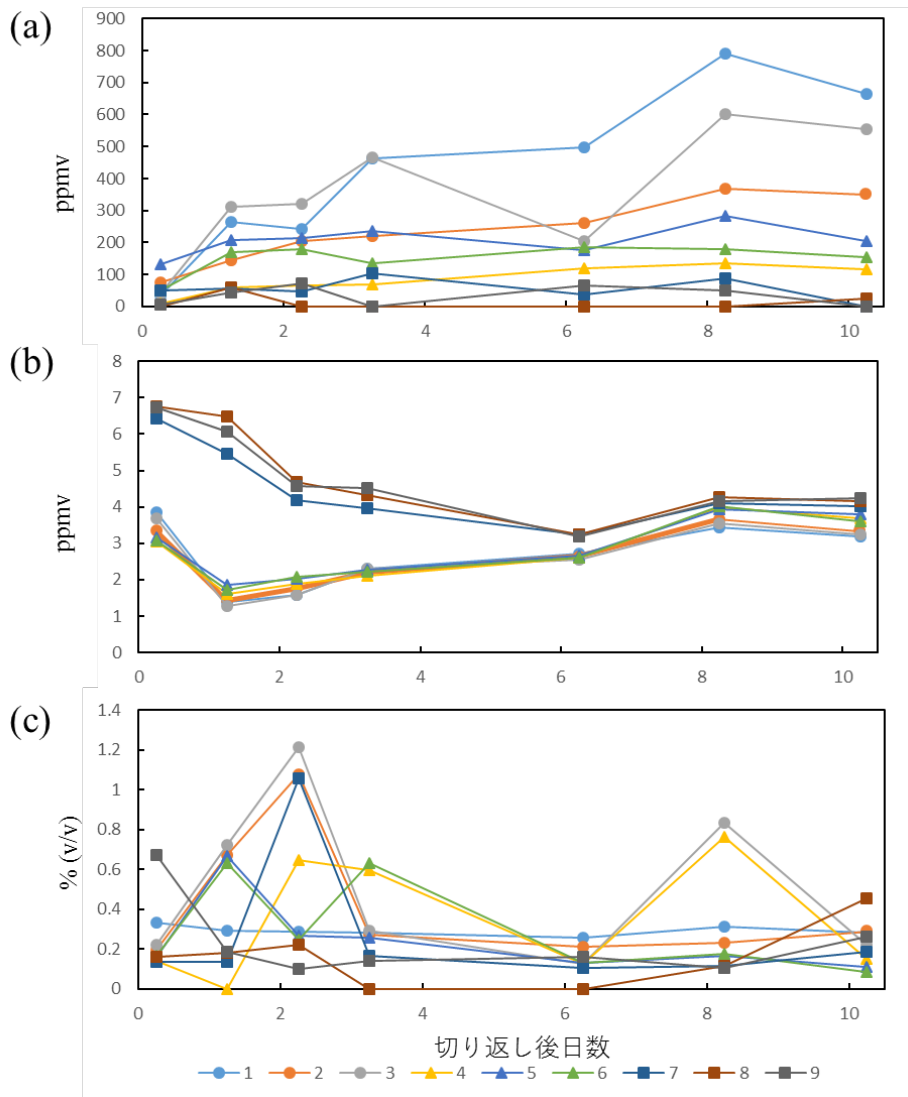


図 2-1-3. 脱臭槽流出ガスの採取地点による濃度の違い.
 ((a) CH₄, (b) N₂O, (c) CO₂)

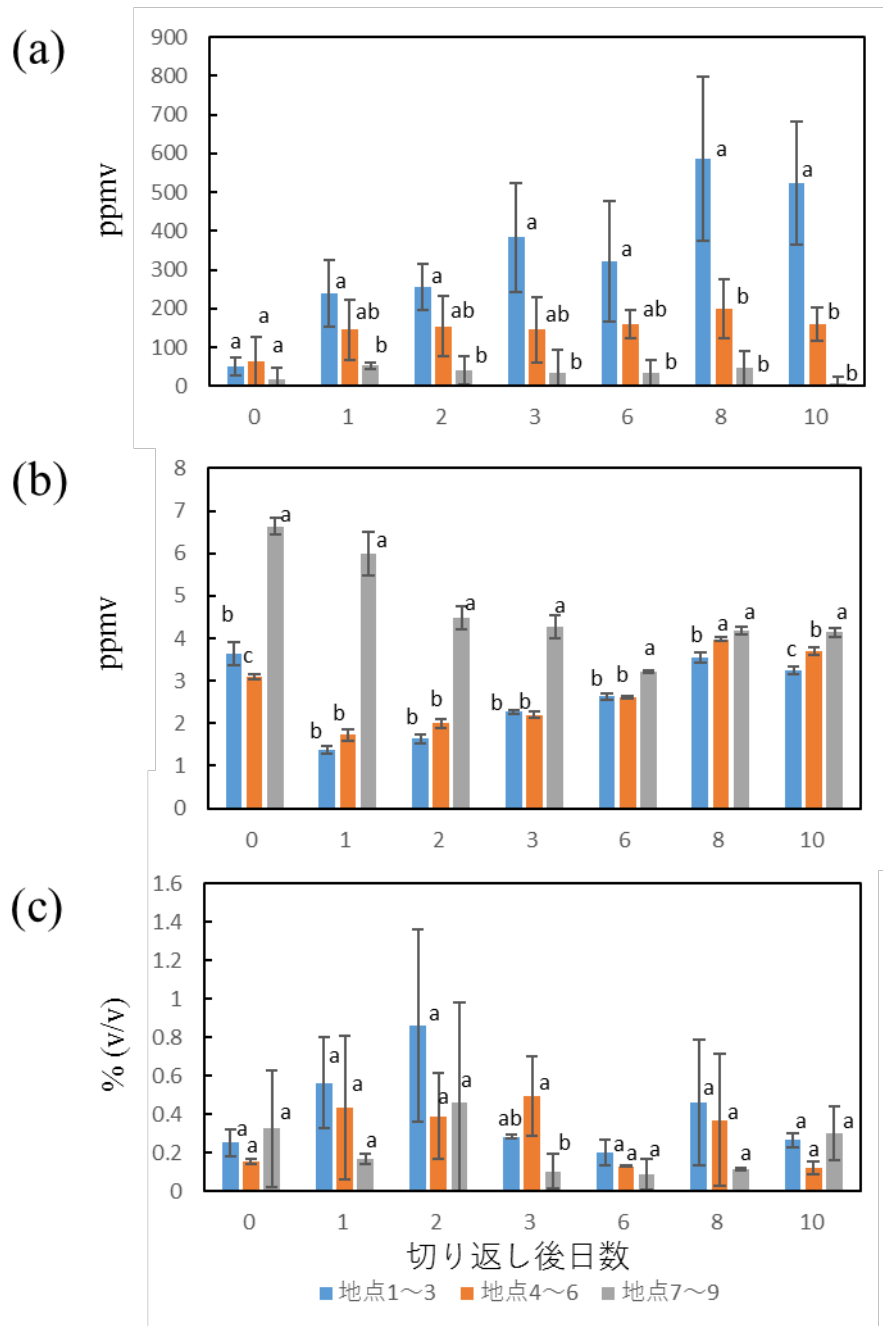


図 2-1-4. 脱臭槽流出ガスの採取地点による濃度の違い。

((a) CH₄, (b) N₂O, (c) CO₂)

図 2-1-3 に示した地点 1~3、4~6 および 7~9 の平均値±標準誤差。各サンプリング日それぞれにおいて、Bonferroni 法により図中の異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)

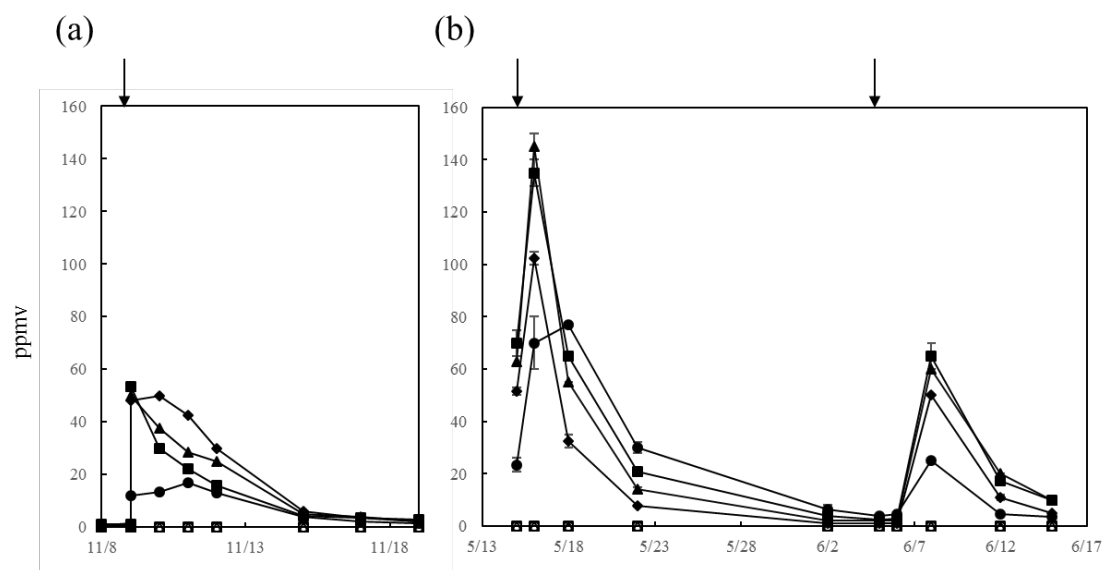


図 2-1-5. 脱臭槽通過前後の NH_3 濃度の経時変化

((a) 2004 年、(b) 2006 年. 流入 1 (●)、流入 2 (■)、流入 3 (▲)、流入 4 (◆)、流出 2 (○)、流出 5 (□)、流出 8 (△). 矢印は堆肥の切り返し時を示す。2006 年のデータについては 2 連の平均値とレンジを示した。) (Yasuda *et al.*, 2009 より改変)

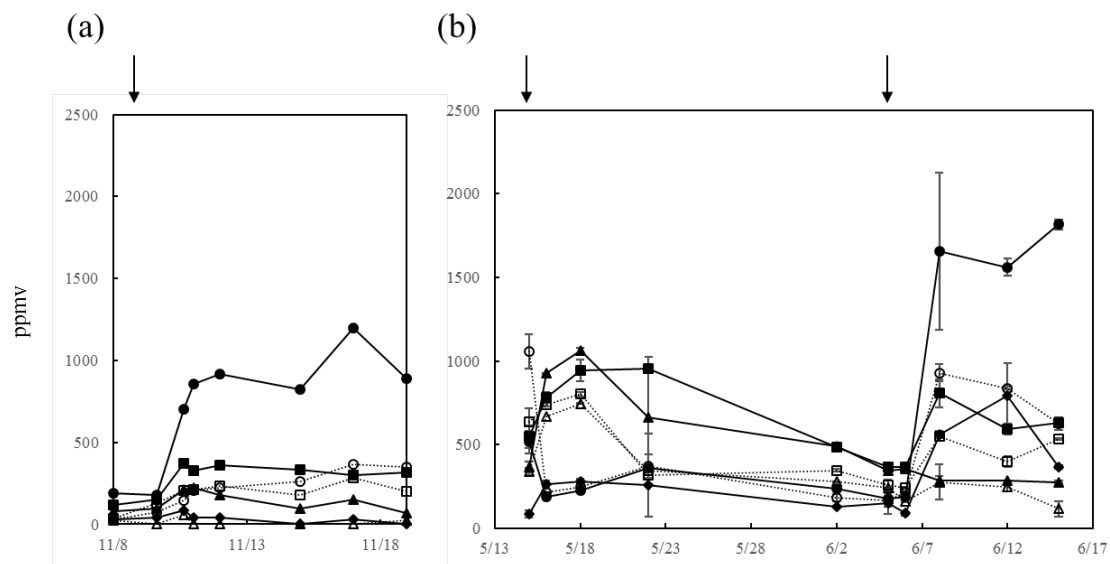


図 2-1-6. 脱臭槽通過前後の CH_4 濃度の経時変化

((a) 2004 年、(b) 2006 年. 流入 1 (●)、流入 2 (■)、流入 3 (▲)、流入 4 (◆)、流出 2 (○)、流出 5 (□)、流出 8 (△). 矢印は堆肥の切り返し時を示す。2006 年のデータについては 2 連の平均値とレンジを示した。) (Yasuda *et al.*, 2009 より改変)

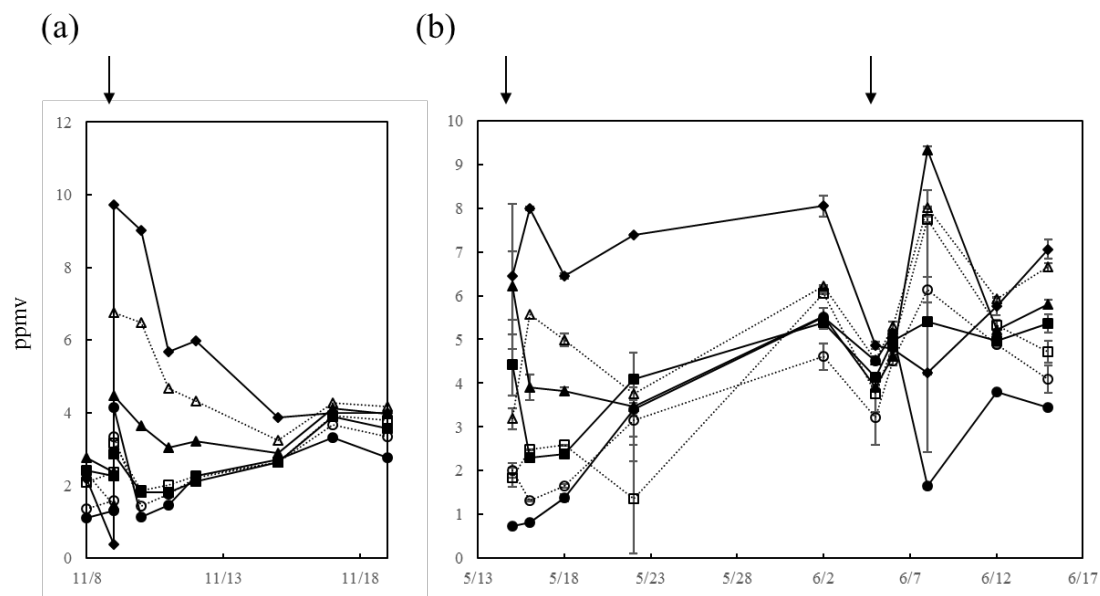


図 2-1-7. 脱臭槽通過前後の N_2O 濃度の経時変化

((a) 2004 年、(b) 2006 年. 流入 1 (●)、流入 2 (■)、流入 3 (▲)、流入 4 (◆)、流出 2 (○)、流出 5 (□)、流出 8 (△). 矢印は堆肥の切り返し時を示す。2006 年のデータについては 2 連の平均値とレンジを示した。) (Yasuda *et al.*, 2009 より改変)

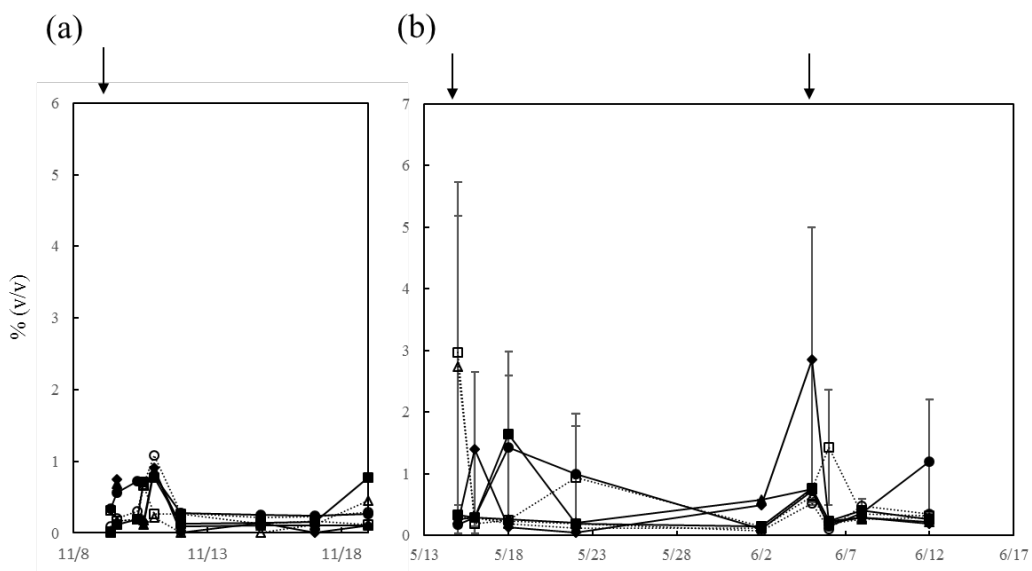


図 2-1-8. 脱臭槽通過前後の CO_2 濃度の経時変化

((a) 2004 年、(b) 2006 年. 流入 1 (●)、流入 2 (■)、流入 3 (▲)、流入 4 (◆)、流出 2 (○)、流出 5 (□)、流出 8 (△). 矢印は堆肥の切り返し時を示す。2006 年のデータについては 2 連の平均値とレンジを示した。) (Yasuda *et al.*, 2009 より改変)

第2節 硝化・脱窒ポテンシャル活性の解析

2-1. 緒言

脱臭担体の硝化ポテンシャルはラボスケールの試験で得られたものが多いが (e. g., Choi *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Blázquez *et al.*, 2017)、実規模装置では、第1節で見てきたように、装置に流入する NH_3 濃度は一定ではなく、硝化活性は様々な要因によって制御されていると考えられる。Juhler らは、豚舎臭気を処理する実規模の Biotrickling filter について、アンモニア酸化細菌と従属栄養細菌との間で酸素の競合があり、装置内の部位でアンモニア酸化ポテンシャルが異なることを示している (Juhler *et al.*, 2009)。しかし、アンモニア酸化能を特徴づけるカイネティクスパラメーターについては、実規模装置の脱臭担体について調べられていない。

また、脱臭装置における窒素のマスバランスを解析した結果から、脱窒の関与が示唆されているが (Gracian *et al.*, 2002; Malhautier *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005)、脱窒活性のポテンシャルは明らかでない。脱臭装置では硝化産物が蓄積することから、脱臭装置内での脱窒反応は電子供与体の利用が律速になると予想された。堆肥ガス中には粉じん等の電子供与体となりうる成分が含まれるため、ロックウール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。

2-2. 材料および方法

1. ロックウール脱臭担体、浸透水の採取および分析方法

第1節で調査した脱臭装置において、ライナー採土器 (DIK-110B, 大起理化工業) を用い、堆肥切り返し後 NH_3 濃度が低下した脱臭担体を採取した (図 2-2-1)。2004 年 12 月には、図 2-1-2 の地点 1、2、3、5、8 の 5 箇所について表層から 30 cm、90 cm、140 cm の深さから、2006 年 6 月には、地点 2(a)、5(b)、8(c) の 3 箇所について表層から 50 cm および 140 cm の高さから採取した。脱窒の電子供与体の利用性については、2013 年 11 月に地点 8(b) 付近の表層から採取した担体を用いた。比較のために、部門内で稼動している畜舎排水処理施設 (複合ラグーン) から引き抜き汚泥を採取して活性測定に供試した。浸透水は、2004 年 11 月に 6 回、2006 年 6 月に 3 回、図 2-1-2 の (8) の浸透水槽内の排水口にバケツをセットして採取した。

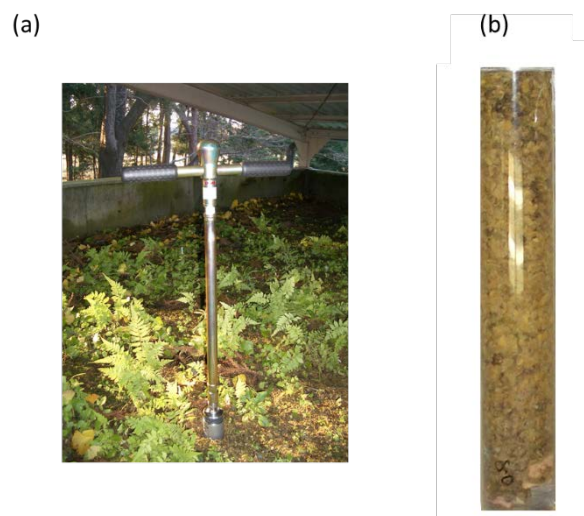


図 2-2-1. (a) ライナー採土器によるロックウール脱臭担体の採取風景.
(b) ロックウール脱臭担体サンプル.

脱臭担体の水分 (%) は、105°Cで一晩乾燥した後の重量の減少量から算出した。pH は湿重サンプル 1 に対して 9 倍量の 2 mol/l の KCl 溶液を混合し、30 分振とうした後のろ液についてガラス電極法 (B-211、Horiba) により測定した。無機態窒素は pH を測定したろ液について、フローインジェクション法 (Aquatec 5400、Tecator, Sweden) によりマニュアルに従って測定した。2006 年 6 月のサンプルについて、全窒素および全炭素を NC アナライザー (NC-220F、SCAS) を用いて測定した。浸透水の NO_2^- と NO_3^- はイオンクロマトグラフ (IC 7000 analyzer、横河あるいは HIC-VP super system、島津) により、 NH_4^+ はイオンクロマトグラフ (DX-120 analyzer、Dionex) を用いて測定した。全炭素および全有機炭素は TC/TOCanalyzer (TOC-VCSN、島津) を用いて測定した。サンプル間の値の差の検定は SAS (ver. 9.1、SAS Institute Inc.、USA) の GLM プロシジャの Bonferroni 法を用いた。

2. 硝化活性

硝化活性ポテンシャルは、200 ml コニカルビーカーに脱臭担体 (20~30 g) を入れ、最大容水量の 60% になるように蒸留水を添加し、2004 年 12 月のサンプルについては、30°C で培養 3、6、15 日後、2006 年 6 月のサンプルについては 30°C で 8 日間培養した後の NO_2^- -N、 NO_3^- -N の生成量から求めた。 NO_2^- -N、 NO_3^- -N は上記の項目 1. に記載した方法と同様の方法で測定した。培養は 2004 年 12 月のサンプルは 1 連で、2006 年 6 月のサンプルは 3 連で行った。

アンモニア酸化カイネティクスを調べるため、振とう培養による硝化活性測定を行った。2006年6月に採取したサンプル15g(湿重)を3日間暗所で、30°Cで前培養した。サンプル(2g)を0.2 µm Millipore フィルターの上におき、吸引ろ過により蒸留水でサンプル中の無機態窒素を洗い流した。その後、20 ml の1 mM リン酸バッファー (pH7.4) に懸濁し、300 ml の三角フラスコで、25°C、120 rpm で振とう培養した。このとき、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度が0、1、3、5、8、10、20 mM になるように $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加した。培養は1連で行った。培養1、3.5、6、24時間後にサンプリングし、 NO_2^- と NO_3^- をイオンクロマトグラフ (LC-10AD、島津) により測定した。 NO_2^- -N と NO_3^- -N の生成速度と NH_4^+ -N 濃度の関係を KaleidaGraph 4(Hulinks) を用いて Levenberg-Marquardt アルゴリズムにより Michaelis-Menten 式に当てはめ、Michaelis-Menten 定数と最大速度を求めた。

3. 脱窒活性

脱窒活性ポテンシャルは、アセチレン阻害法により測定した (Tiedje, 1994)。30 mL 容のブチル栓つきネジ口試験管にサンプル2gを入れ、1 mM KNO_3 と1 mM グルコースを含む5 ml の5 mM リン酸バッファーに懸濁した後、10%アセチレン (C_2H_2) /Ar ベースを5分間パージし、25°Cで培養した。培養24時間後の N_2O 生成量を ECD 付きガスクロマトグラフで前節の方法で測定し、生成速度を求めた。培養は2連で行った。

脱窒の電子供与体の利用性については、 ^{15}N トレーサー法を用いて解析した。サンプルを1 mM リン酸バッファー (pH7.4) に懸濁後、遠心分離 (3000 g、5分) を4回繰り返し、サンプル中の有機物、 NH_4^+ 、 NO_3^- を洗った後、再度リン酸バッファーに懸濁した (ロックウール脱臭担体:リン酸バッファー=1:19 (w/v); 活性汚泥:リン酸バッファー=1:199 (v/v))。アルゴンガスをパージした後、嫌気条件下 (嫌気チャンバー内) で26 ml 容バイアル瓶に15 ml ずつ分注した。ブチル栓でフタをした後、ヘッドスペースを He で置換し、一晩28°C、120 rpm で振とう培養を行った。その後、 $^{15}\text{NO}_3^-$ を最終濃度5 mM になるように添加した。電子供与体として H_2S 、プロピオン酸、堆肥の水抽出物、 NH_4^+ (NH_4Cl)、酢酸塩 (酢酸ナトリウム) のいずれかを、全酸素要求量 (TOD) が1 mM に相当する量を添加した。ただし、 H_2S については、0.65 mMTOD に相当する量を添加した。すなわち、 H_2S は0.32 mM、プロピオン酸は0.28 mM、堆肥の水抽出物は生物化学的酸素要求量 (BOD) で1 mM、 NH_4^+ は0.67 mM、酢酸塩は0.5 mM とした。培養は、無添加については4連、電子供与体を添加したバイアルは2連で行った。堆肥のBODは、クーロメーター (OM3100、大倉電気) を用いて測定した。堆肥の水抽出物は、堆

肥：滅菌水=1:1.85になるよう懸濁し、30分間振とうした後、13000 gで30分遠心し、No. 5Aのろ紙 (Advantec) でろ過した後、さらに 0.22 μm のメンブレンフィルター (Millex GV、Millipore、USA) でろ過したものを供試した。培養4日間のヘッドスペースの N_2 と N_2O の同位体比をガスクロマトグラフ四重極質量分析計 (GC-2010、GC-MS QP2010plus、島津) を用いて測定した (Waki *et al.*, 2013)。カラムは CP-PoraBOND Q (FUSED SILICA、25 m \times 0.32 mm、Varian、USA) を使用した。サンプルの強熱減量は 600 $^{\circ}\text{C}$ で燃焼した後の減量とし、汚泥量の指標として用いた。活性汚泥の浮遊汚泥の強熱減量は APHA の standard methods に従った (APHA 1998)。

2-3. 結果および考察

2004年12月については、脱臭担体の水分、pH、無機態窒素の含量、硝化・脱窒活性ポテンシャルと、浸透水の pH、無機態窒素濃度を予備的に調査した。その結果を表 2-2-1 にまとめて示した。2006年6月の脱臭担体の理化学性を表 2-2-2、浸透水の性状を表 2-2-3 に示した。水分は2004年12月のサンプルでは 50~57%、2006年6月では 45~50% で、pH (KCl) はいずれも中性付近 (2004年、6.3~7.4; 2006年、6.9~7.2) であった。2004年の気温は測定していないが、アメダスデータ (つくば) によると2004年のガスサンプリング時の気温は 8.9~16.6 $^{\circ}\text{C}$ 、2006年では 15.7~23.3 $^{\circ}\text{C}$ であった。熱電対により測定した2006年のガスサンプリング時の気温は 19.2 $^{\circ}\text{C}$ (10.3~27.8 $^{\circ}\text{C}$) で、担体中 (深さ 50cm) の温度は 25.5 $^{\circ}\text{C}$ (20.2~31.6 $^{\circ}\text{C}$) であり、担体中では気温より温度の低下が抑えられているものの、日内変動が見られ、外気温の変動の影響を受けることが予想される。堆肥排気中の水蒸気が脱臭槽内で冷やされることで、冬場のサンプルで水分が高めであったと考えられた。浸透水の pH も担体と同様の値であった (表 2-2-1、表 2-2-3)。浸透水中にはいずれの時期でも $\text{NH}_4^+\text{-N}$ が 1036~1283 mg/1、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ が 1562~2031 mg/1 含まれており、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ は2004年では 3.23~87.1 mg/1、2006年では 119~286 mg/1 であった。污水处理施設では、20 $^{\circ}\text{C}$ 程度以下ではアンモニア酸化細菌より亜硝酸酸化細菌の増殖が早く、速やかに亜硝酸酸化が進むことが知られている (Hellings *et al.*, 1998)。浸透水中にも $\text{NO}_2^-\text{-N}$ より $\text{NO}_3^-\text{-N}$ を多く含むことから、亜硝酸酸化が速やかに進んでいることがうかがえた。2006年6月に2004年11月採取時より $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 濃度が高めであった理由として、流入 NH_3 濃度が高いこと、および温度の影響が考えられた。ラボスケールの脱臭試験で、 NH_3 の負荷が高いと亜硝酸酸化が抑制されることが示されている (Baquerizo *et al.*, 2009)。温度の影響としては、アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌と

も、10～30℃にかけて活性が増加するが、増加の傾きがアンモニア酸化細菌の方が高いため (Bae *et al.*, 2002)、10℃から 25℃程度の範囲内での温度上昇下では、アンモニア酸化細菌の活性の増加の方が相対的に高くなり、NO₂⁻-N が蓄積しやすくなると考えられた。これらの硝化反応は、担体では、2004 年 12 月と 2006 年 6 月のサンプルで NO₂⁻-N 濃度に違いが見られなかったことから、浸透後に浸透水槽内でも生じている可能性が考えられた。浸透水中には高濃度の無機態窒素が含まれるため、肥料として利用する、あるいは排水処理を別途行うことができない場合は、脱臭廃水の窒素濃度を下げるための窒素除去などの運転管理が必要であることが確認された。

脱臭担体では、NH₄⁺-N は 2004 年では地点によっては下層で濃度が高い傾向は見られたが、2006 年では地点間の違いはあったものの、深さ方向の差はなかった。一方、NO₃⁻-N 濃度は 2006 年で、下層で有意に高く、浸出により下層にたまっていることが示唆された。下層で NO₃⁻-N 濃度が高い傾向は地点 1 を除いて 2004 年のサンプルについても見られた (表 2-2-1)。NO₂⁻-N はどのサンプルにおいても低かった。2006 年 6 月のサンプルで、全窒素と全炭素は下層で高かったが、下層にのみ尿素が含まれていた影響と考えられた。

表 2-2-1. ロックウール脱臭担体の理化学性・硝化活性および浸透水の性状 (2004年11~12月採取)

サンプル (地点-深さ cm)	水分 (%, wt/wt)	pH	無機態窒素 (mg [乾物 100 g] ⁻¹)			培養15日間のNO _x -N生成速度		脱窒活性 mg [乾物 100g] ⁻¹ 日 ⁻¹
			NH ₄ ⁺ -N	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N	傾き (mg [乾物 100g] ⁻¹ 日 ⁻¹)	R ²	
1-30	53.2	6.5	1.31	0.13	0.04	0.76	0.92	1.50
1-90	54.1	7.2	1.24	0.17	0.02	1.05	0.96	0.75
1-140	53.4	7.3	1.08	0.13	0.01	1.65	0.99	1.33
2(a)-30	56.5	6.6	1.05	0.14	0.02	0.64	0.90	1.60
2(a)-90	54.6	6.6	0.71	0.11	0.03	1.55	0.96	1.96
2(a)-140	55.0	6.6	1.75	0.13	4.56	3.34	0.99	2.72
3-50	56.3	6.3	1.51	0.14	0.04	0.44	0.88	1.05
3-90	55.4	6.9	0.84	0.09	0.04	1.41	0.99	1.52
3-140	52.9	6.9	3.84	0.16	2.86	2.99	0.99	1.44
5(b)-30	54.1	6.6	1.71	0.15	0.02	0.98	0.96	2.15
5(b)-90	53.6	7.4	1.73	0.12	0.67	1.93	1.00	1.30
5(b)-140	53.2	6.6	7.37	0.13	24.2	4.37	0.98	3.28
8(c)-30	50.0	6.4	0.71	0.15	0.02	0.99	0.95	0.54
8(c)-90	50.8	7.1	1.14	0.13	13.2	1.86	0.98	1.68
8(c)-140	53.5	6.6	1.91	0.13	26.3	2.47	1.00	1.67
浸透水*	—	6.6±0.8	1283±121**	39.4±28.6**	1849±132**	—	—	—

* 平均値±SD, ** mg/l

表 2-2-2. ロックウール脱臭担体の理化学性(2006年6月採取)

サンプル (地点-深さ cm)	水分 (%, wt/wt) ^a	pH	無機態窒素 (mg [乾物 100 g] ⁻¹) ^a			全炭素 (%, wt/wt) ^a	全窒素 (%, wt/wt) ^a
			NH ₄ ⁺ -N	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N		
a-50	45.2	7.0	14.1 (0.79) ^A	0.14 (0.01) ^A	1.07 (0.01) ^A	2.70 (0.09) ^A	0.55 (0.03) ^A
a-140	46.0	7.0	15.6 (2.84) ^A	0.12 (0.01) ^B	18.4 (0.48) ^B	12.2 (1.18) ^B	1.38 (0.10) ^B
b-50	47.8	6.9	3.54 (0.90) ^B	0.14 (0.01) ^A	7.22 (0.26) ^C	2.65 (0.16) ^A	0.45 (0.05) ^A
b-140	46.2	7.2	2.74 (0.79) ^B	0.12 (0.005) ^B	26.0 (0.01) ^D	8.73 (1.23) ^B	0.97 (0.13) ^B
c-50	50.4	7.2	18.0 (5.57) ^A	0.15 (0.01) ^A	8.43 (0.19) ^C	2.73 (0.38) ^A	0.61 (0.10) ^A
c-140	47.7	6.9	15.1 (2.43) ^A	0.10 (0.004) ^B	39.0 (0.38) ^E	8.89 (2.14) ^B	1.09 (0.25) ^B

^a 平均値 (SE; n=3). 同列内の異なる符号間で有意差あり (P<0.05).

(Yasuda *et al.*, 2009 より引用)

表 2-2-3. ロックウール脱臭装置の浸透水の性状(2006年6月採取)

採取日	pH	無機態窒素 (mg/l)			全炭素 (mg/l)	全有機炭素 (mg/l)	
		NH ₄ ⁺ -N	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N			
2006	6/6	6.9	1186	119	1692	70.8	58.4
	6/9	7.4	1036	209	1562	77.5	57.9
	6/13	6.6	1223	286	2031	71.2	61.8

(Yasuda *et al.*, 2009 より引用)

予備的に測定を行った 2004 年 12 月のサンプルでは、硝化・脱窒活性ポテンシャルはそれぞれ 0.44~4.37 mg N/100 g 乾物/日、0.54~3.28 mg N/100 g 乾物/日であった (表 2-2-1)。硝化活性の測定において、15 日間の培養中の NO₂⁻-N、NO₃⁻-N の生成量はほぼ直線的に増加したため、2006 年 6 月のサンプルでは、8 日間培養した後の NO₂⁻-N、NO₃⁻-N の生成量から硝化活性ポテンシャルを求めた。2006 年 6 月のサンプルの硝化・脱窒活性ポテンシャルはそれぞれ 8.2~12.2 mg N/100 g 乾物/日、1.42~4.69 mg N/100 g 乾物/日と見積もられた (図 2-2-2 および図 2-2-4)。硝化活性ポテンシャルはいずれの時期でも、地点 b の下層で高かった。第 1 節で見たように、装置に流入する NH₃ 濃度ピークは脱臭担体の地点 b の下層に近い流入地点 2 と 3 で高かった。また、脱窒活性ポテンシャルは下層で高い傾向が見られたが、下層では NO₃⁻-N 濃度が高かった。これらから、硝化・脱窒いずれについても基質濃度が高い地点で活性が高い傾向が見られ、装置内では基質濃度が飽和している環境ではないと推察された。火山灰土壌のアンモニア態窒素の吸着量は土壌 100 g 当たり 1600 mg 程度、硝化能力は 10 mg NH₄-N/100 g 土壌/日程度とされている (福森, 1997)。ロックウール脱臭担体の硝化能力は火山灰土壌と同等程度と考えられる。

アンモニア酸化に関するカイネティクスのパラメーターを図 2-2-3 のデータから算出した。K_m (mM, NH₄⁺) は地点 a で 0.05~0.09、地点 b で 0.24~0.32、地点 c で 0.68~1.05 であり、装置の水平方向で、堆肥化の第 1 槽に近い地点ほど親和性が高く、地点 a~c にかけて順に低

くなる傾向が見られた。本章の第1節で見たように、 CH_4 濃度は地点 a で高い傾向があり、同様に地点 a~c にかけて低くなる傾向があった。ロックウール生物脱臭装置には NH_3 より高い濃度の CH_4 が流入している。アンモニア酸化細菌は NH_3 の変わりに CH_4 を酸化できることが知られており (Jones and Morita, 1983)、土壌においても、アンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌が CH_4 酸化に関与している可能性が示されている (Akiyama *et al.*, 2014)。 CH_4 の存在はアンモニア酸化微生物の代謝に影響を与える。ロックウール脱臭装置内のアンモニア酸化のカイネティクスは NH_3 のみならず CH_4 の影響も受けている可能性が考えられた。 V_{\max} は中央の下層である地点 b の 140cm のサンプルで $0.36 \mu\text{mol/g/h}$ (0.12 g/kg/d) と最も高く、他は $0.19\sim 0.29$ であった。硝化活性ポテンシャルでも地点 b の下層で最も高い結果であったことと一致していた。アンモニア除去速度は、堆肥を用いたラボスケールの biofilter で 1.77 g N/kg/d 、汚泥を用いた biofilter で 0.57 g N/kg/d (Chen *et al.*, 2005)、有機物を充填した biofilter で 1.79 g N/kg/d である (Choi *et al.*, 2003)。Blázquez ら (2017) はポリウレタンフォームを充填した Biotrickling filter で、アンモニア酸化活性を装置の気相 NH_3 および液相中の NH_4^+ 濃度の減少から求めているが、その結果では、最大アンモニア酸化活性は約 $70 \text{ g N/m}^3/\text{h}$ であった。ロックウール脱臭担体の見かけ密度を約 400 kg/m^3 (全農 施設・資材部, 1990) として最大アンモニア酸化活性を計算すると、 $2 \text{ g N/m}^3/\text{h}$ となり、実規模装置のロックウール脱臭担体はこれらと比較すると低く、ピートに硝化菌を接種した担体についての硝化活性 ($0.091\sim 0.523 \text{ g/kg/d}$; Togashi *et al.*, 1986) に近い値であった。

^{15}N トレーサー法により測定した脱窒活性ポテンシャルは、ロックウール脱臭担体で $0.38 \mu\text{mol/g 乾物/h}$ で、比較測定を行った畜舎排水を処理する活性汚泥のわずか 8.6% と低かった。さらに、ロックウール脱臭担体では N_2O が検出されたが、活性汚泥では検出されなかった (図 2-2-5)。培養 1 日後では、 $^{46}\text{N}_2\text{O}/^{30}\text{N}_2+^{46}\text{N}_2\text{O}$ 比は電子供与体無添加で 29.4% であり、堆肥抽出物添加で 8.2% であった。 H_2S 添加では、ロックウール担体の脱窒活性は阻害され、 N_2O のみが検出されたが、培養 4 日後では脱窒活性が増加した。異なる電子供与体を添加した培養試験の結果は、ロックウール脱臭担体では活性汚泥と異なり、堆肥抽出物を添加した場合に無添加と比べて活性が 2 倍になり、調査した電子供与体の中で最も利用性が高かった。脱臭装置には、 $0.3\sim 25 \mu\text{m}$ 径の微粒子が流入しており、流出ガス中で減少することが確認されている (安田ら, 2012)。電子供与体の利用性の結果は、堆肥化ガスを処理する実規模の脱臭装置内で、粉じん由来の易分解有機物が電子供与体となりうることを示していると考えられた。一方、活性汚泥では、酢酸塩の添加で 6.4 倍に活性が上昇した。ロックウール脱臭担体にお

いても、培養時間を長くすると、プロピオン酸、酢酸塩を利用した脱窒活性が高くなった。硝酸存在下での土壌の有機化合物の利用性は有機物の種類により分類でき、土壌の種類によらず基本的に同じであることが示されている（佐藤ら, 1989, 1990）。本試験で用いた堆肥抽出物は易分解性有機物を含み、佐藤らが指摘している単糖類・少糖類等に相当し、プロピオン酸、酢酸塩は低級脂肪酸等に相当する。これらに対するロックウール脱臭担体の反応は佐藤らの結果に類似している。一方、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唆された。

なお、アナモックス菌が存在していれば NH_4^+ 添加区で $^{29}\text{N}_2$ が生成する可能性があるが、今回の試験条件下では $^{29}\text{N}_2$ の生成は確認されなかった。

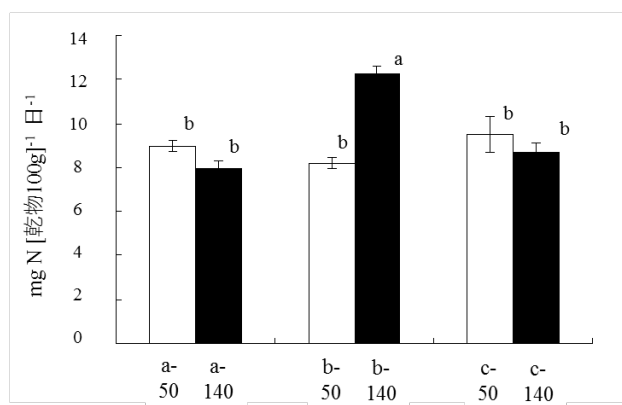


図 2-2-2. ロックウール脱臭担体のアンモニア酸化活性。

(バーは SE を示す。Bonferroni の多重比較により異なる符号間で有意差あり (P<0.05))

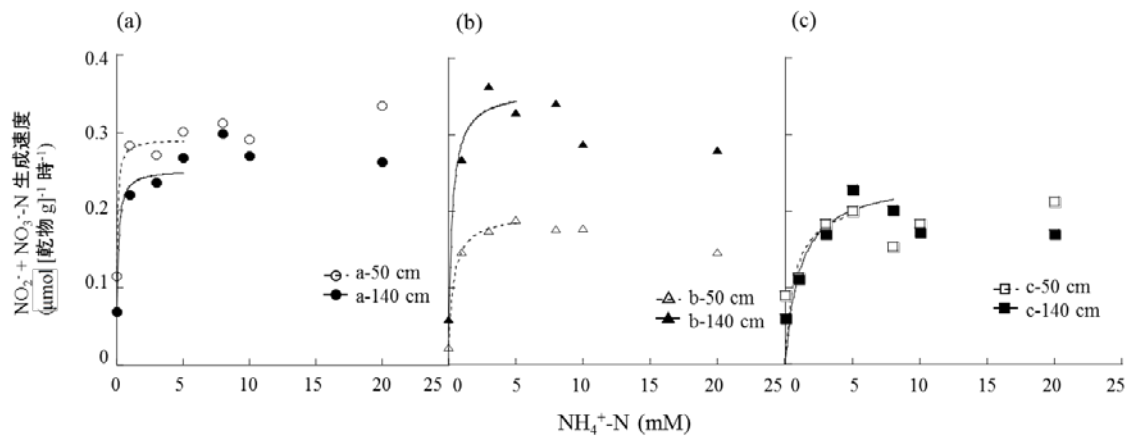


図 2-2-3. ロックウール脱臭担体のアンモニア酸化活性に与える $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度の影響.

(a) ~ (c) はそれぞれ地点 a~c のサンプルを示す. 図中に Michaelis-Menten 式の近似曲線を示した.)

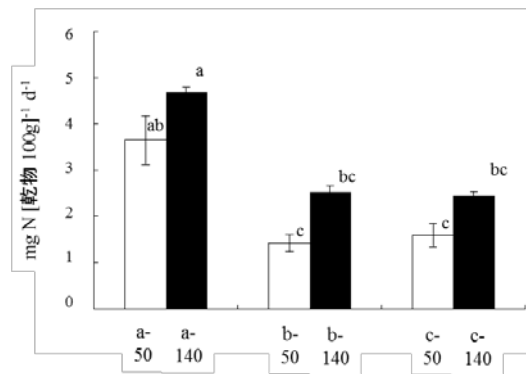


図 2-2-4. ロックウール脱臭担体の脱窒活性.

(バーは SE を示す. Bonfferoni の多重比較により異なる符号間で有意差あり ($P < 0.05$))

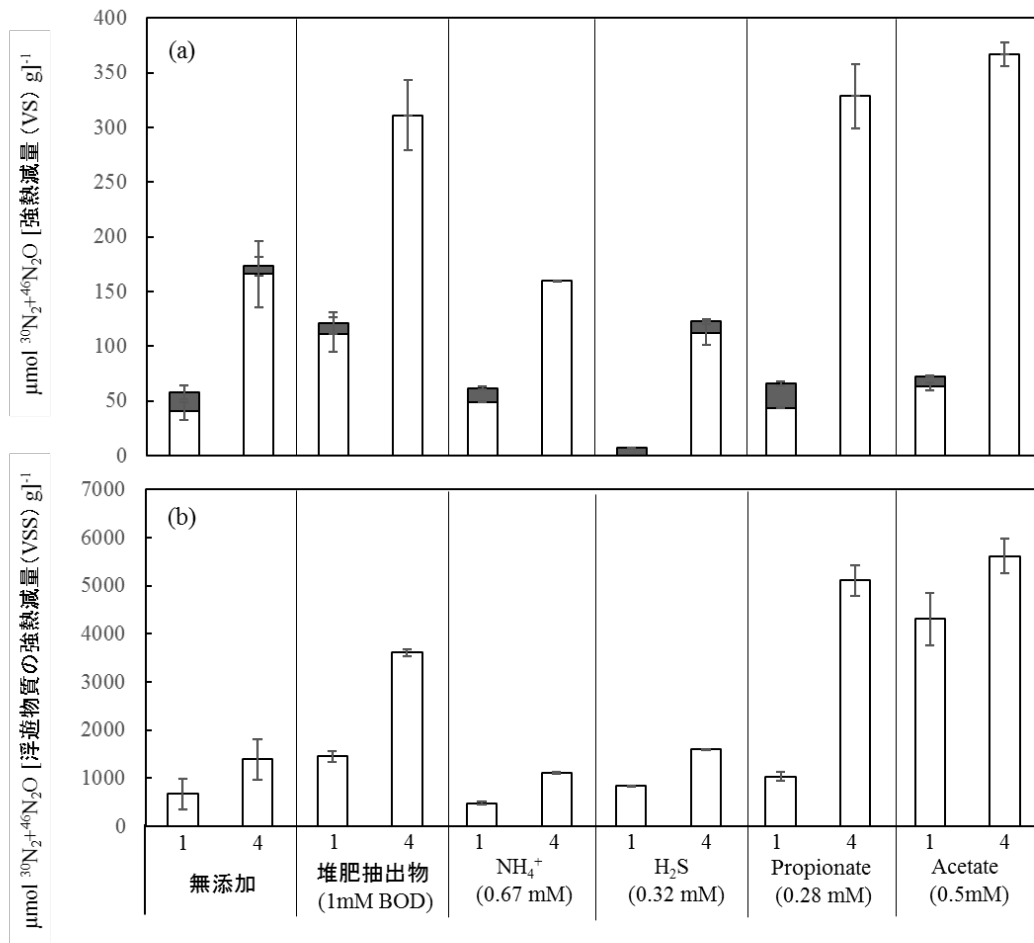


図 2-2-5. 異なる電子供与体を添加した培養 1 日後および 4 日後の $^{30}\text{N}_2 + ^{46}\text{N}_2\text{O}$ 生成量. (a) ロックウール脱臭担体 (b) 活性汚泥. (白, $^{30}\text{N}_2$; 黒, $^{46}\text{N}_2\text{O}$. バーは無添加では SD、その他はレンジを示す。)

第 3 節 要約

設計諸元が確立され、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て、 NH_3 および微生物活性と密接に関わりを持つ CO_2 、 CH_4 、 N_2O の装置通過前後の発生パターンを調査した。 NH_3 、 CH_4 、 N_2O 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、 NH_3 は脱臭装置の中央にあたる流入地点 2 と 3 でピーク濃度が高く、 CH_4 は地点 1 で濃度が高く、地点 2~4 で低い傾向が、 N_2O は逆に地点 4 で高く、地点 1 で低くなる傾向が見られた。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 CH_4 と N_2O 濃度が増加することなく、 NH_3 を除去可能であった。脱臭担体の硝化活性ポテンシャルは 8.2~12.2 mg N/100 g 乾物/日、アセチレン阻害法により測定した脱窒活性ポテンシャルは 1.42~4.69 mg N/100 g 乾物/日と見積もられた。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。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有機物が電子供与体となりうることが示された。 ^{15}N トレーサー法による脱窒活性ポテンシャルの測定では、 NH_4^+ 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細菌の関与は示されなかった。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。

第3章 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

<背景と目的>

実規模の生物脱臭装置内でアンモニア酸化および脱窒を担う微生物として、これまでに実規模装置から *Nitrosomonas* 属のアンモニア酸化細菌 (Sato *et al.*, 2004) および NO_2^- 還元能を持つ *Luteimonas* 属、*Pseudoxanthomonas* 属、*Stenotrophomonas* 属の菌が分離されている (Finkmann *et al.*, 2000)。また、分子生物学的手法を用いた研究により、*Nitrosomonas eutropha*/*Nitrosococcus mobilis*-lineage のアンモニア酸化細菌が優占していることが報告されている (Juhler *et al.*, 2009; Kristiansen *et al.*, 2011b)。また、一般細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象としたクローニング解析で、脱窒菌として知られている *Mesorhizobium* 属、*Alcaligenes* 属、*Stenotrophomonas* 属などに近縁な配列が得られている (Friedrich *et al.*, 2002)。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これらの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ことが必要であるが、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は十分に理解されていない。本章では、第2章で解析した脱臭担体について、アンモニア酸化細菌、アンモニア酸化古細菌、脱窒菌群集をそれぞれ解析し、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。

第1節 アンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌群集の解析

1-1. 緒言

生物脱臭装置内で、 NH_3 はアンモニア酸化細菌により亜硝酸まで酸化され、その後亜硝酸酸化細菌により硝酸まで酸化されると考えられており、装置内での窒素除去を駆動するのはアンモニア酸化反応である。第2章において、ロックウール脱臭担体のアンモニア酸化活性は、装置内の地点で異なることが示唆された。特に堆積発酵による堆肥化の一回目の切返し後の高濃度の NH_3 が導入される装置中央の下部でアンモニア酸化活性が高いことが示唆された。アンモニア酸化細菌については、その種類によって NH_3 酸化のカイネティクスおよび NH_3 耐性が異なることが知られている (Suwa *et al.*, 1994)。アンモニア酸化細菌群集とアンモニア酸化のカイネティクスの関係を明らかにすることで、実規模装置内でのアンモニア酸化に寄

与する微生物群の理解を深めることができる。さらに、近年アンモニア酸化を行う古細菌の存在が明らかにされている (Könneke *et al.*, 2005)。これまでに土壌や海洋、汚水処理施設など様々な環境中における存在が調べられてきているが (e.g., Francis *et al.*, 2005; Leininger *et al.* 2006; Park *et al.*, 2006)、脱臭装置での存在は報告されていない。そこで、本節では、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て変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法を用いて微生物群集を解析した。

1-2. 材料および方法

1. サンプルからの DNA 抽出

ロックウール脱臭担体からの DNA の抽出は、土壌サンプルからの direct 法による抽出方法に準じて行った (Watanabe *et al.* 2004)。第 2 章第 2 節で 2006 年 6 月に採取したサンプル約 0.5 g を 2 ml スクリューキャップチューブに量り取り、720 μ l の抽出バッファー (100 mM Tris-HCl [pH8.0]、100 mM EDTA-2Na、1.5 M NaCl、1% hexadecylmethylammonium bromide)、1.0 g ジルコニアビーズ (ϕ 0.2 mm、ニッカトー)、180 μ l の 10% SDS を加えた。6 分間水平方向に 2500 rpm で振とう培養機 (M・BR-022、タイテック) で振とうした後、65°C で 30 分間インキュベートした。その間 10 分ごとにチューブの内容物を混合した。遠心分離により上清を取り、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1、v/v/v) を加え、2500 rpm の振とうを 10 秒行った。上清を取った後抽出バッファーを再度添加し、10 秒振とうした。この作業をさらに 3 回繰り返した。上清はクロロホルム:イソアミルアルコール (24:1) 混合液と混和し、フェノールを除いた。上清中の核酸を 0.6 倍量のイソプロパノールにより沈殿させ、70% エタノールで沈殿をリンスした後、TE (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) に溶解した。2 ml チューブ 3 本分の粗抽出 DNA 溶液を混合し、RNase A (Wako) を最終濃度 0.1 g/l になるように添加し、37°C で 30 分インキュベートした (Nakamura *et al.*, 2004)。DNA は 2 \times PEG (20% ポリエチレングリコール 6000、0.6 M NaCl) を加え、4°C で 2 時間インキュベートした後、沈殿させ、再度 TE に溶解した。上述の操作を 2 連で行った。

2. PCR-DGGE

表 3-1-1 に PCR に用いたプライマーセットおよび PCR 反応条件をまとめた。アンモニア酸化細菌の *amoA* 遺伝子をターゲットとした PCR は 5 μ l の 10 \times PCR Gold Buffer (Applied Biosystems, USA)、各 0.2 mM の dNTP ミックス、2.5 mM の MgCl₂、1U の AmpliTaq Gold (Applied

Biosystems)、20 µg bovine serum albumin、10ng の鑄型 DNA、各 0.5 µM のプライマーを含む 50 µl の反応系で iCycler (Bio-Rad, USA) を用いて行った。PCR 産物の電気泳動は DCode Universal Mutation Detection System (Bio-rad) を用い、変性剤の濃度勾配を 45% から 65% (100% は 7 M 尿素、40% ホルムアミド) とした 6% のポリアクリルアミドゲルで、0.5×TAE (20 mM Tris-acetate、0.5 mM EDTA) バッファーで 100 V、17 時間、60°C の条件で行った。アンモニア酸化古細菌の *amoA* 遺伝子の DGGE 条件は、以下に述べたクローン解析により得られたクローンを用いて検討を行った。変性剤の濃度勾配を 35% から 55% とした 6% のポリアクリルアミドゲルで、0.5×TAE バッファーで 120V、8 時間、60°C の条件で PCR 産物を分離した。バンドは SYBR Green I (Molecular Probes, USA) で染色をし、UV 励起下でゲルの写真を取得した。特徴的な DGGE バンドを切り出し、TE に溶解した後、同じプライマーセットを用いて PCR を行った。切り出したバンドの DGGE ゲル上の泳動位置を確認し、目的のバンドのシーケンスを行った。得られた塩基配列は DDBJ の BLAST プログラムにより相同性検索を行った。アンモニア酸化細菌、アンモニア酸化古細菌それぞれについて、得られた塩基配列および近縁の配列を用い、MEGA ソフト (ver. 3.1, Kumar *et al.*, 2004) を用いて ClustalW によりアライメントを行った後、近隣結合法により系統樹を作成した。

DGGE バンドの統計解析のために、バンドを目視で 4 段階に分類した (0、バンドなし; 1、薄い; 2、中間の濃さ; 3、濃い)。SAS (ver. 9.1, SAS Institute) の CORRESP プロシジャを用いて、DGGE バンドとサンプルについて対応分析を行った。得られた DGGE バンドの塩基配列を DDBJ に登録し、アンモニア酸化細菌については AB303315-17、AB303324-26、AB303328-30、アンモニア酸化古細菌については AB525381-86 のアクセッション番号をそれぞれ取得した。

3. アンモニア酸化古細菌の *amoA* 遺伝子のクローン解析

アンモニア酸化古細菌の *amoA* 遺伝子の解析では、プライマーセット (*amoA*19F (Leininger *et al.*, 2006) / *amoA*643R (Treusch *et al.*, 2005)) を用いて得られた PCR 産物のクローン解析を行った。PCR は 2.5 µl の 10×PCR Gold Buffer (Applied Biosystems, USA)、各 0.2 mM の dNTP ミックス、2.5 mM の MgCl₂、1 U の AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)、10 µg bovine serum albumin、5 ng の鑄型 DNA (サンプル地点 b-50cm)、各 0.5 µM のプライマーを含む 25 µl の反応系で iCycler (Bio-Rad, USA) を用いて行った。PCR 産物は PCR 精製キット (QIAGEN, Germany) を用いて精製した後、pGEM T-easy vector (Promega, USA) にライゲーションし、*Escherichia coli* JM109 のコンピテントセル (Zymo research, USA) に形質転換した。イン

サートの有無は上述のプライマーによるダイレクト PCR により確認した。PCR 産物を制限酵素 *RsaI* (Nippon Gene、Japan) 処理により異なる配列を持つクローンを選んだ。プラスミド DNA は QIA prep Spin Miniprep kit (QIAGEN、USA) を用いて抽出し、Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit (Beckman Coulter、USA) を用いてシークエンシング反応を行い、シークエンサー (CEQ8000、Beckman Coulter) を用いて塩基配列を解析した。得られた塩基配列を DDBJ に登録し、アンモニア酸化古細菌のクローンについて AB525377-80 のアクセッション番号を取得した。

表 3-1-1. プライマーおよび PCR 反応条件

ターゲット	プライマー	塩基配列 (5'-3')	文献	PCR 反応条件
アンモニア酸化細菌 (<i>amoA</i>)	amoA-1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	Avrahami <i>et al.</i> 2003	94°C 5分 → (94°C 45秒、57°C 30秒、72°C 1分) × 40 → 72°C 7分
	amoAR1	CCCCTCGGAAAGCCTTCTTC	Avrahami <i>et al.</i> 2003	
	amoA-1F-GC	<u>CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCCGCCCCGC</u> <u>GCCCCGCCCCGGGTTTCTACTGGTGGT</u>	Avrahami <i>et al.</i> 2003	
アンモニア酸化古細菌 (<i>amoA</i>)	amoA19F	ATGGTCTGGCTWAGACG	Leininger <i>et al.</i> 2006	94°C 10分 → (95°C 1分、55°C 1分、72°C 40秒) × 35 → 72°C 10分
	amo643R	TCCCCTTGWACCARGCGCCATCCA	Treusch <i>et al.</i> 2005	
	amoA19F1-GC	<u>CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCCGTC</u> <u>GCCCCGCCCCGATGGTCTGGCTTAGACG</u>	Leininger <i>et al.</i> 2006 をもとに変更	94°C 10分 → (95°C 1分、55°C 1分、72°C 40秒) × 35 → 72°C 10分
	amo247Ry1	CAAACCATGCGCCTTTTGCACCCA	Treusch <i>et al.</i> 2005 をもとに変更	
	CrenamoA23F* (=amoA19F)	ATGGTCTGGCTWAGACG	Tourna <i>et al.</i> 2008	95°C 5分 → (94°C 30秒、55°C 30秒、72°C 1分) × 35 → 72°C 10分
	CrenamoA616r*	GCCATCCATCTGTATGTCCA	Tourna <i>et al.</i> 2008	

*第4章第2節で使用。

1-3. 結果および考察

図 3-1-1 に DGGE のバンドプロファイルを示した。アンモニア酸化細菌、アンモニア酸化古細菌ともに、DNA 抽出と PCR を独立して行った 2 連のパターンには再現性がみられた。アンモニア酸化細菌のバンドはサンプルあたり 2~14 本と異なり、共通のバンドがなかったが、アンモニア酸化古細菌ではバンドの本数は 2~7 本であり、バンド A6 はすべてのサンプルに共通していた。サンプル間のバンドパターンを比較するために、DGGE バンドの対応分析を行った (図 3-1-2)。その結果、アンモニア酸化細菌の地点 b の深さ 140 cm のサンプルは他のサンプルと異なる群集構造を示し、バンド B6 がこの群集を特徴づけることが示された。地点 a と c はそれぞれ深さ方向でサンプルのバンドパターンは類似していた。アンモニア酸化古細菌では地点 b は 50 cm と 140 cm のサンプル間で特にパターンが似ていた。

アンモニア酸化細菌の *amoA* 遺伝子の系統樹を図 3-1-3 に示した。DGGE バンド B2、B3 が *Nitrosomonas europaea* lineage に、バンド B4、B6-9 が *Nitrosospira* cluster 3 に属するものであった。サンプル b-140 に特徴的なバンド B6 の塩基配列は *Nitrosospira multiformis* ATCC25196 と 93% の相同性を示した。バンド B4 は b-140 と b-50-1 以外に共通して現れたも

のであるが、*Nitrosospira* sp. Np39-19 に近縁であった。バンド B3 は地点 c のサンプルに共通して濃いバンドであったが、*Nitrosomonas* sp. GH22 と 99% の相同性を示した。

アンモニア酸化古細菌の *amoA* 遺伝子のクローニングにより 28 個のクローンを得、制限酵素 *RsaI* で処理した結果 4 種類のパターンを示した (clone RW-1、RW-2、RW-3、RW-4)。各クローンと同じパターンのクローン数はそれぞれ 1、3、23、1 個であった。これらの塩基配列の系統関係を *amoA* の系統樹の中に示した (図 3-1-4)。RW-1、RW-3、RW-4 はいずれも soil/sediment クラスタ内でも同一のクラスタを形成した。一方、RW-2 は marine グループを含む sediments クラスタに属し、系統的に異なる種類であることが示唆された。DGGE のバンド A6 は、シーケンスとゲル上の位置から、クローン RW-3 と同一であると考えられた。クローンを得た b-50 のサンプルの中でバンド A6 は最も濃く、クローン RW-3 が得られた 28 クローン中の多数である 23 クローンを占めたことと一致する結果であった。同様に、バンド A1 はクローン RW-2 と塩基配列の相同性が 98.7% であり、A3 はクローン RW-4 と 99.6% の相同性を示した。バンド A1 と A3 はサンプル b-50 のの中では薄く、クローン中に占める割合が低いことと一致していた。バンド A2-6 はいずれも *Candidatus Nitrososphaera gargensis* と 86-92% の相同性を示した。

アンモニア酸化は、生物脱臭装置内で重要な反応である。第 2 章で述べたように、実規模ロックウール脱臭装置内では地点 b-140 でアンモニア酸化活性が他の地点より高かったが、本章で明らかとなったアンモニア酸化細菌群集は、地点 b-140 で他の地点と異なる群集構造を示しており、硝化活性との関連性が示唆された。地点 b-140 に特徴的なバンド B6 は *Nitrosospira* cluster 3 の中でも *N. multiformis* に近縁であり、地点 a と b-50 に特徴的なバンドである B7-9 は *N. briensis* と同じクラスタを形成していた。*N. multiformis* は *N. briensis* と比べ、細胞あたりの活性が高い (Belser, 1979)。また、 K_m が比較的高かった地点 c に特徴的なバンド B3 は、基質親和性の低いことが知られている *Nitrosomonas* sp. GH22 (Suwa *et al.*, 1994) の配列との相同性が高かった。一方、アンモニア酸化古細菌の群集については、アンモニア酸化活性およびカイネティクスとの関連性が認められなかった。アンモニア酸化活性の測定系はアンモニア酸化古細菌に最適化された培養条件ではないが、ロックウール脱臭担体の pH および温度はカイネティクスを測定した条件に近いものであり、現場においても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。

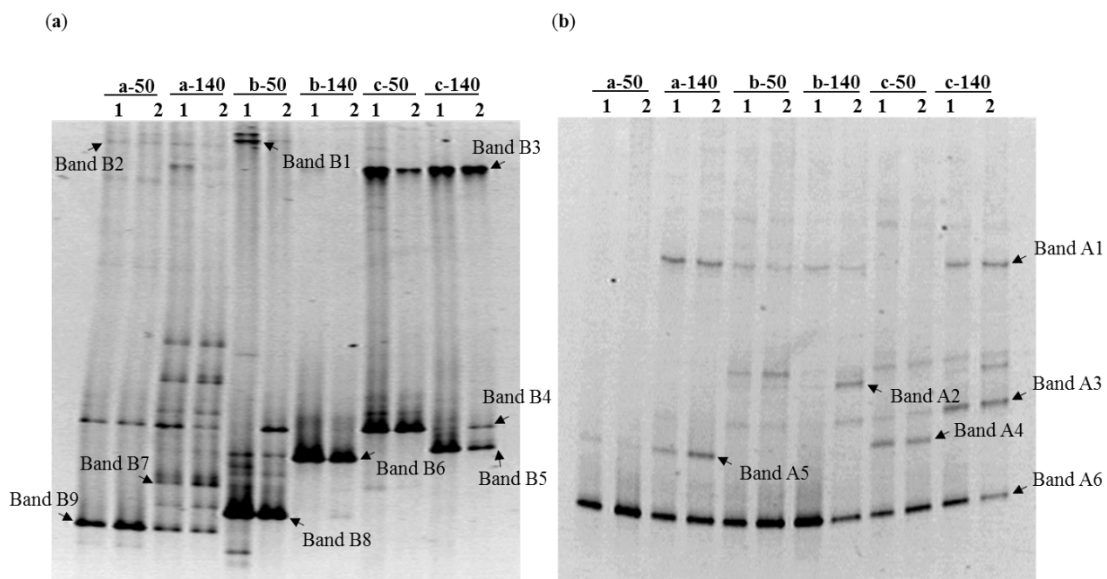


図 3-1-1. アンモニア酸化細菌 (a) およびアンモニア酸化古細菌 (b) の *amoA* 遺伝子の増幅産物の DGGE バンドプロファイル. ゲル上の記号はサンプル採取地点および深さを示し、同一サンプルについて 2 連で行った結果を示す.

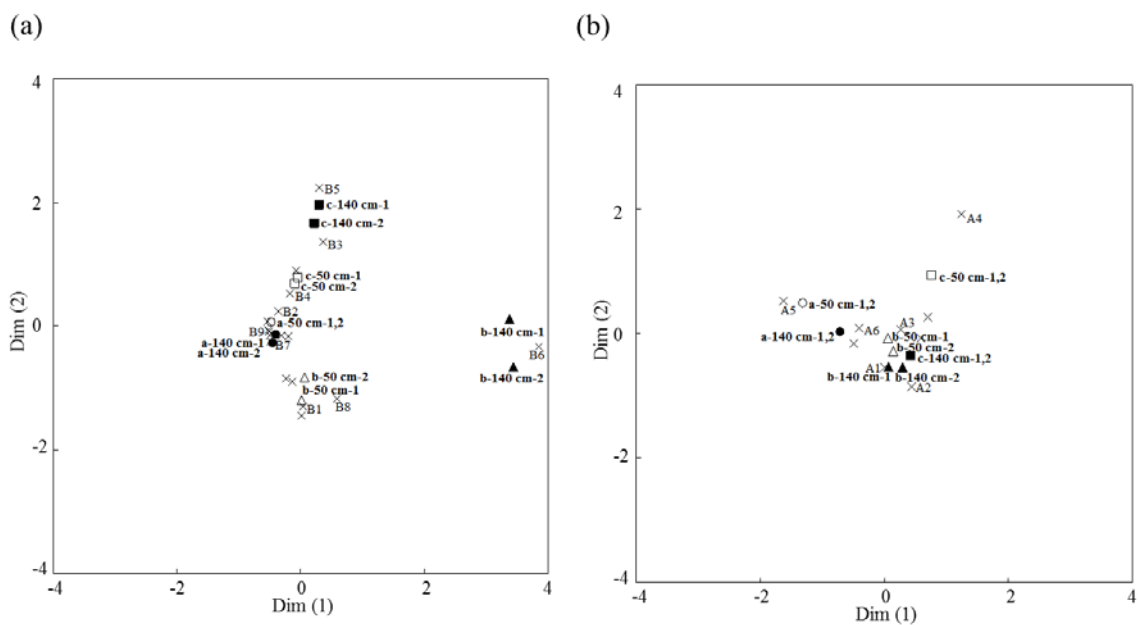


図 3-1-2. DGGE バンドプロファイル (図 3-1-1) の対応分析結果. (a) アンモニア酸化細菌 (b) アンモニア酸化古細菌. ×はバンドを示す.

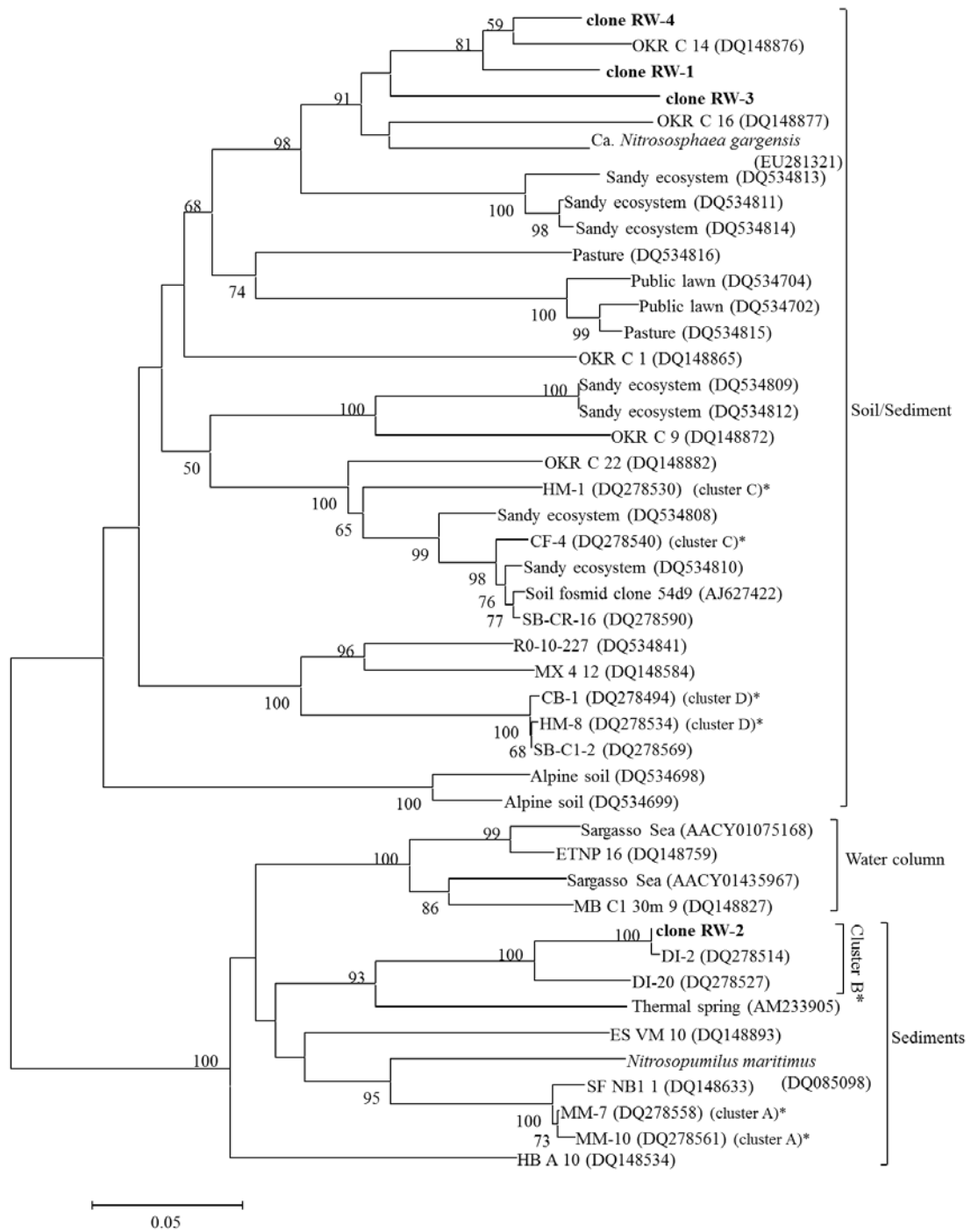


図 3-1-4. アンモニア酸化古細菌の *amoA* 遺伝子の系統樹.

第 2 節 脱窒菌群集の解析

2-1. 緒言

脱窒能を有する微生物は系統的に様々な種類の分類群に属することが知られており、脱窒菌群集の解析には酵素遺伝子がターゲットにされることが多い(e. g., Braker *et al.*, 2012)。これまでに報告のある生物脱臭装置内の脱窒に関わる微生物群は、分離の他には 16S rRNA 遺伝子をターゲットにした研究によりその存在が示唆されているのみである (Friedrich *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2004)。そこで、本節では、脱窒菌の酵素遺伝子である *nirK*、*nirS*、*nosZ* 遺伝子をターゲットとした PCR-DGGE 法により脱窒菌群集の解析を行った。

2-2. 材料および方法

第 1 節の解析に用いた DNA サンプルについて、脱窒菌の *nirS*、*nirK*、*nosZ* 遺伝子をターゲットとし、PCR-DGGE 法により群集構造を解析した。用いたプライマーおよび反応条件を表 3-2-1 に示した。PCR は 5 μ l の 10 \times PCR Gold Buffer (Applied Biosystems, USA)、各 0.2 mM の dNTP ミックス、1.5 mM の MgCl₂、2.5 U の AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)、bovine serum albumin、10-20 ng の鋳型 DNA、プライマーを含む 50 μ l の反応系で iCycler (Bio-Rad, USA) を用いて行った。プライマーと bovine serum albumin の濃度は、*nirK*、*nirS*、*nosZ* それぞれ、1 μ M と 1000 ng/ μ l、1 μ M と 400 ng/ μ l、0.5 μ M と 600 ng/ μ l とした。PCR 産物の電気泳動は DCode Universal Mutation Detection System (Bio-rad) を用い、7% のポリアクリルアミドゲルの変性剤の濃度勾配は *nirK*、*nirS*、*nosZ* それぞれ、50-70%、60-80%、45-75% (100% は 7 M 尿素、40% ホルムアミド) とした。電気泳動条件は 0.5 \times TAE バッファーで *nirK* は 100 V、13 時間、*nirS* は 100 V、17 時間、*nosZ* は 130 V、17 時間、いずれも 60 $^{\circ}$ C の条件で行った。バンドは SYBR Green I (Molecular Probes, USA) で染色をし、UV 励起下でゲルの写真を取得した。特徴的なバンドの切り出しおよび *nirK* と *nirS* バンドのシークエンスは前節と同様に行った。*nosZ* バンドのシークエンスはマクロジェンジャパンの依頼分析にて行った。すなわち DNA Engine Dyad PTC-220 Peltier Thermal Cycler を用い、ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いてシークエンシング反応を行い、シークエンサー (ABI 3730x1、Applied Biosystems) を用いて塩基配列を解析した。得られた塩基配列は第 1 節と同様に DDBJ の BLAST プログラムにより相同性検索を行った。得られた塩基配列から翻訳したアミノ酸配列と、データベース上の配列を用い、MEGA ソフト (ver. 5.1、Tamura *et al.*, 2011) を用いて ClustalW によりアライメントを行った後、ポアソン補正距離につい

で近隣結合法により系統樹を作成した。DGGE バンドの統計解析のために、ゲルの写真を Luminous Imager (Aisin Cosmos R&D Co., Ltd., Japan) で読み込み、バンドの濃さを数値化した。バンドの濃さから各バンドの P_i を計算した ($P_i = n_i/N$ (n_i , バンド i の濃さ; N , サンプル中のバンドの濃さの合計))。 P_i を用いて Shannon の多様性指数 H を計算した ($H = -\sum P_i \ln P_i$; Magurran, 1988)。さらに、 P_i をもとに、SAS の PRINCOMP および CORR プロシジャを用いて主成分分析を行った。t 検定は TTEST プロシジャを用いて行った。得られた DGGE バンドの塩基配列を DDBJ に登録し、*nirK* については LC095668-72、*nirS* については LC095665-67、*nosZ* については LC093888-90、LC093892、LC093893 のアクセッション番号をそれぞれ取得した。

表 3-2-1. プライマーおよびPCR反応条件

ターゲット	プライマー	塩基配列(5'-3')	文献	PCR反応条件
脱窒菌 (<i>nirK</i>)	FlaCu	ATCATGGTCTGCCGCG	Throbäck <i>et al.</i> 2004	94°C2分→(94°C30秒、63°C1分、72°C1分)×35→72°C10分
	R3Cu	GCCTCGATCAGRITGTGGTT	Throbäck <i>et al.</i> 2004	
	R3Cu-GC	<u>GGCGGCGCGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGC</u> GCCCGCTCGATCAGRITGTGGTT	Throbäck <i>et al.</i> 2004	
脱窒菌 (<i>nirS</i>)	cd3aF	GTSAACGTSAAAGGARACSGG	Throbäck <i>et al.</i> 2004	94°C2分→(94°C30秒、58°C1分、72°C1分)×35→72°C7分
	R3cd	GASTTCGGRTGSGTCTTGA	Throbäck <i>et al.</i> 2004	
	R3cd-GC	<u>GGCGGCGCGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGC</u> GCCCGASTTCGGRTGSGTCTTGA	Throbäck <i>et al.</i> 2004	
脱窒菌 (<i>nosZ</i>)	nosZF	CGYTGTTTCMTCGACAGCCAG	Enwall <i>et al.</i> 2005	94°C2分→(94°C30秒、58°C30秒、72°C1分)×10→(94°C30秒、53°C30秒、72°C1分)×25→72°C10分
	nosZ1622R	CGSACCTTSTTGCCSTYGCG	Enwall <i>et al.</i> 2005	
	nosZ1622R-GC	<u>GGCGGCGCGCCGCCCGCCCGCCCGCCCGC</u> GCCCGSACCTTSTTGCCSTYGCG	Enwall <i>et al.</i> 2005	

2-3. 結果および考察

図 3-2-1 に *nirK*, *nirS*, *nosZ* 遺伝子の PCR-DGGE バンドプロファイルを、図 3-2-2 に DGGE バンドの主成分分析結果を示した。主成分分析の結果、*nirK* 遺伝子では第 2 主成分で上層と下層のサンプルに分けられた。第 1 主成分には地点の違いが示されていると考えられたが、地点別での分類はできなかった。一方、*nosZ* 遺伝子では、第 1 主成分でまず地点 a と b、c が分かれ、さらに地点 b、c は第 2 主成分でそれぞれの地点で分かれ、地点間でバンドプロファイル进行分类できた。*nirS* 遺伝子については、第 1 主成分では地点 b については下層のサンプルが他の上層のサンプルに近いものの、a~c それぞれの地点について上層は正の方向、下層は負の方向に分かれる傾向が見られた。これらの結果は、脱臭装置内で、脱窒の酵素遺伝子の種類により分布の様相が異なることを示していると考えられた。さらに、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、流入ガスの入気地点 1~4 にかけて生じている N_2O に濃度勾配を反映したものと考えられた。DGGE のバンドプロファイルから算出した Shannon の多様性指数を表 3-2-2 に示した。

表3-2-2. Shannonの多様性指数 (H)

ターゲット	サンプル (地点-深さcm)					
	a-50	a-140	b-50	b-140	c-50	c-140
<i>nirK</i>	1.90	2.06	2.68	2.77	2.01	2.37
<i>nirS</i>	1.31	0.61	1.87	1.29	1.30	0.69
<i>nosZ</i>	1.32	1.51	1.59	2.14	2.05	1.93

全サンプルを合わせてみると、*nirK*では1.90~2.77、*nirS*では0.61~1.87で、*nirK*で*nirS*より有意に高かった($p < 0.05$; t-test, $n=6$)。また、*nirK*では上層より下層のサンプルで指数が高く、*nirS*では逆に上層の方が高かった。

特徴的なバンドのシーケンスを行い、得られた配列から翻訳したアミノ酸配列と、データベース上配列との系統樹を図3-2-3~3-2-5に示した。シーケンスを行った*nirK*のバンドは、4つのクラスターに分かれた。バンドK4、K5は農耕地土壌および活性汚泥から得られたクローンと同じクラスターに位置し、連続曝気をしている粒状汚泥から得られたクローンと高い相同性を示した。バンドK1は、土壌、河口の堆積物、河口域の水から得たクローンと同じクラスターに位置した。地点a-140のサンプル以外で共通して見られたバンドK3は、メタン酸化脱窒のために微好気条件で集積をした汚泥から得られたクローンとの高い相同性を示した。このバンドは第2主成分の因子負荷量が有意に高く(表3-2-3)、上層サンプルを特徴づけるバンドでもある。バンドK2は第1主成分の因子負荷量が有意に高いバンドであるが、*Mesorhizobium* sp. 4FB11、活性汚泥、農耕地土壌、河口域の水に由来するクローンと同じクラスターに属した。*Mesorhizobium*属は、微好気条件下でメタン酸化細菌と共存して酢酸を利用した脱窒を行う可能性が指摘されている(Costa *et al.*, 2000)。第2章第1節で解析したように、脱臭装置には平均430ppmvの CH_4 が導入されているため、 CH_4 の酸化産物を利用した脱窒が起きている可能性がある。

*nirS*のDGGEバンドの塩基配列は、純粋分離された脱窒菌との相同性が低かったが、いずれも*nirS*がコードする亜硝酸還元酵素(シトクロム cd_1)の d_1 へムとの水素結合サイトの一つであるアミノ酸残基(Arg-391; Fülöp *et al.*, 1995)をコードする配列を有していることを確認した。*nirS*のアミノ酸配列は、農耕地土壌、川の堆積物、污水处理施設から得られたクローンの配列と94-99%の相同性を示した。

*nosZ*のDGGEバンドは、4つのクラスターに分かれた。このうち、3つのクラスター(A~C)は、いずれも α -Proteobacteriaに属する菌を含んでいた。このうち、バンドZ3のアミノ酸

配列は *Oligotropha carboxidovorans* と 100% の相同性を示した。バンド Z4 のみ β -Proteobacteria に由来する配列である *Castellaniella* 属の *nosZ* のアミノ酸配列との相同性が高かった。バンド Z2 と Z5 は第 1 主成分の因子負荷量が低く (表 3-2-3)、地点 a に特徴的なバンドであるが、根分泌物を添加した土壌や、昆虫の幼虫の消化管内容物から得られたクローンと近縁であった。これらは易分解性有機物の利用性が比較的高い環境と考えられる。地点 a は堆肥化前半のガスが導入される場所であり (図 2-1-2)、易分解性の有機物を含む粉塵が多く流れ込んでいる可能性が考えられた。

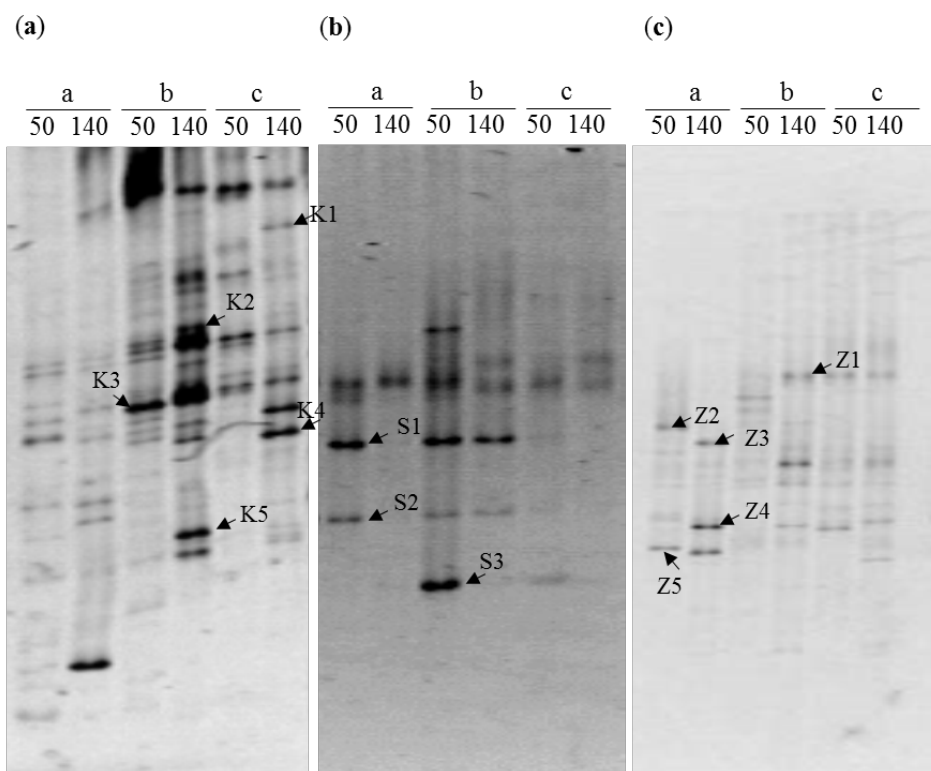


図 3-2-1. 脱窒菌の *nirK* (a)、*nirS* (b) および *nosZ* (c) 遺伝子の増幅産物の DGGE バンドプロファイル。ゲル上の記号はサンプル採取地点および深さを示す。

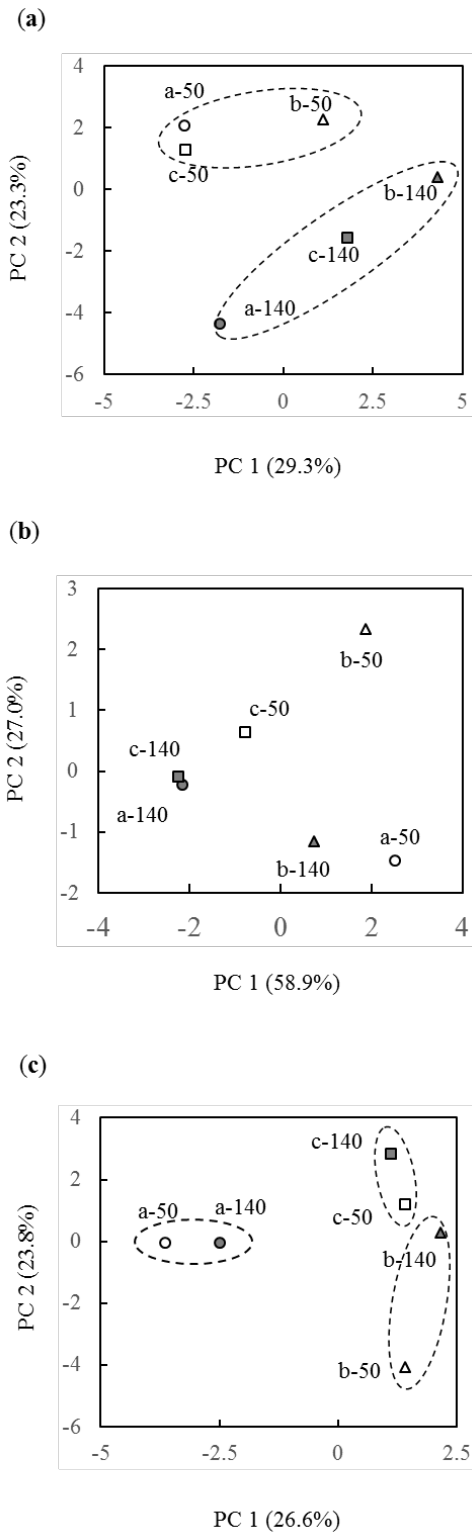


図 3-2-2. DGGE バンドプロファイル (図 3-2-1) の主成分分析結果. (a) *nirK*, (b) *nirS*, (c) *nosZ* 遺伝子.

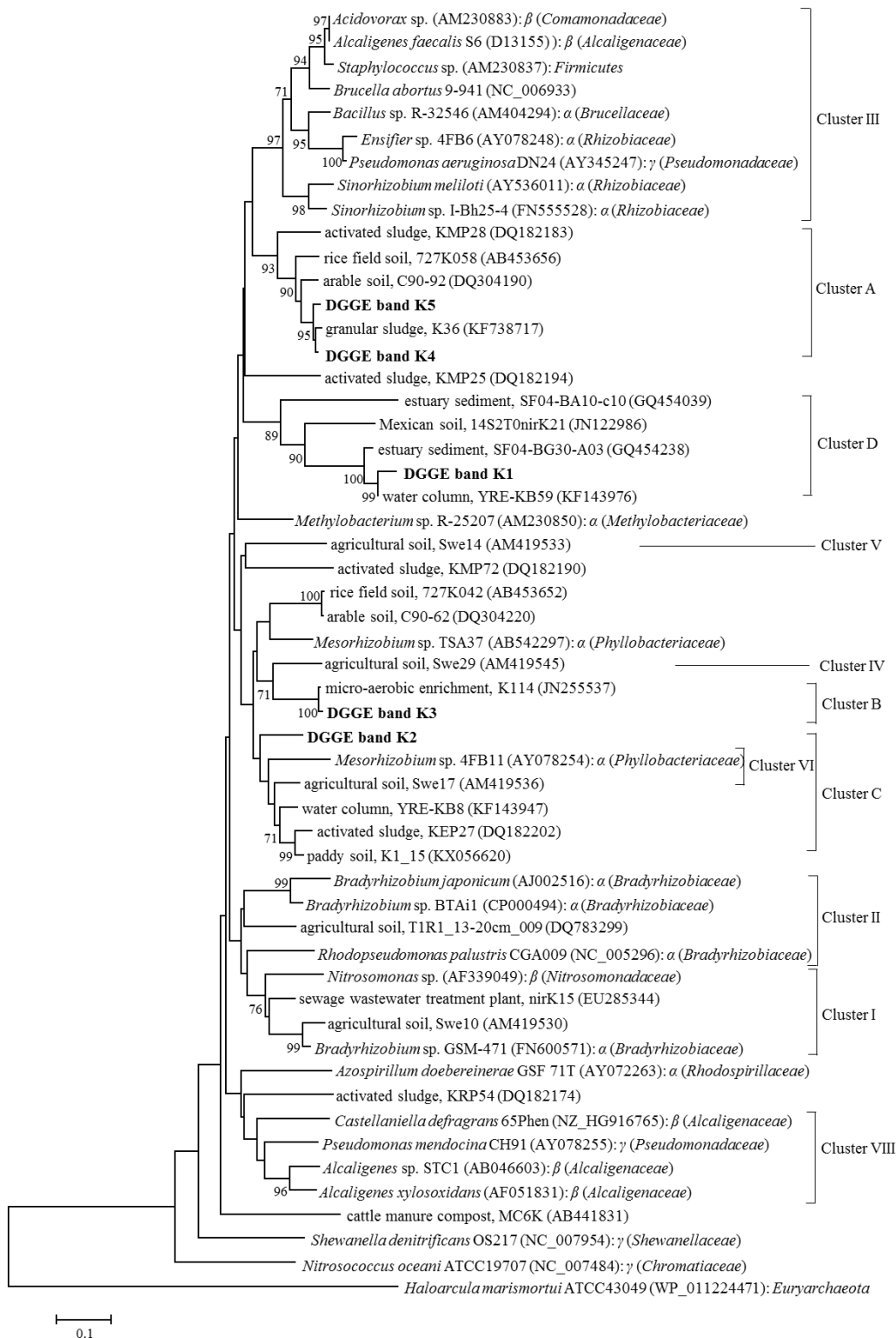


図 3-2-3. 脱窒菌の NirK 配列の系統樹.

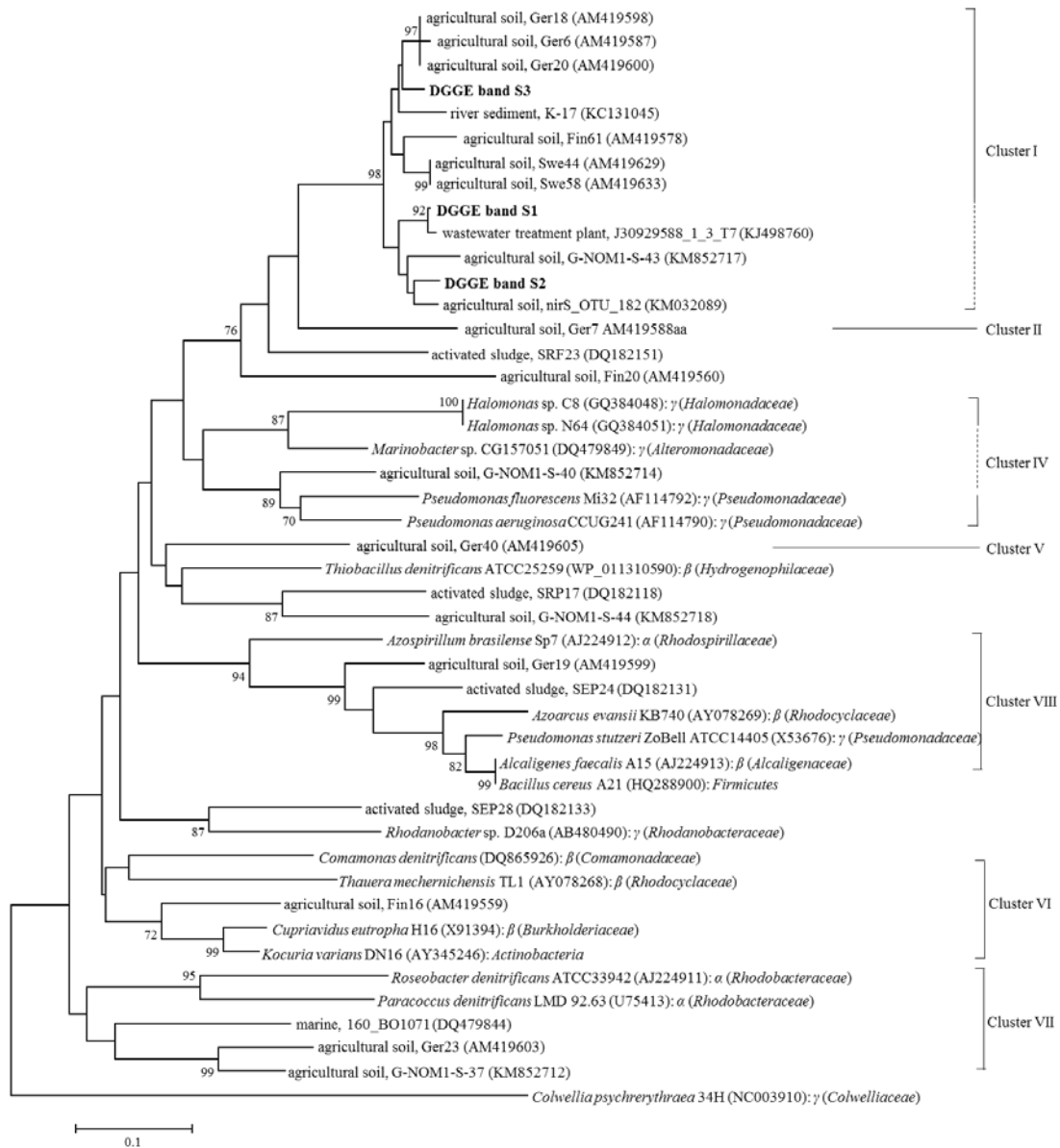


図 3-2-4. 脱窒菌の NirS 配列の系統樹.

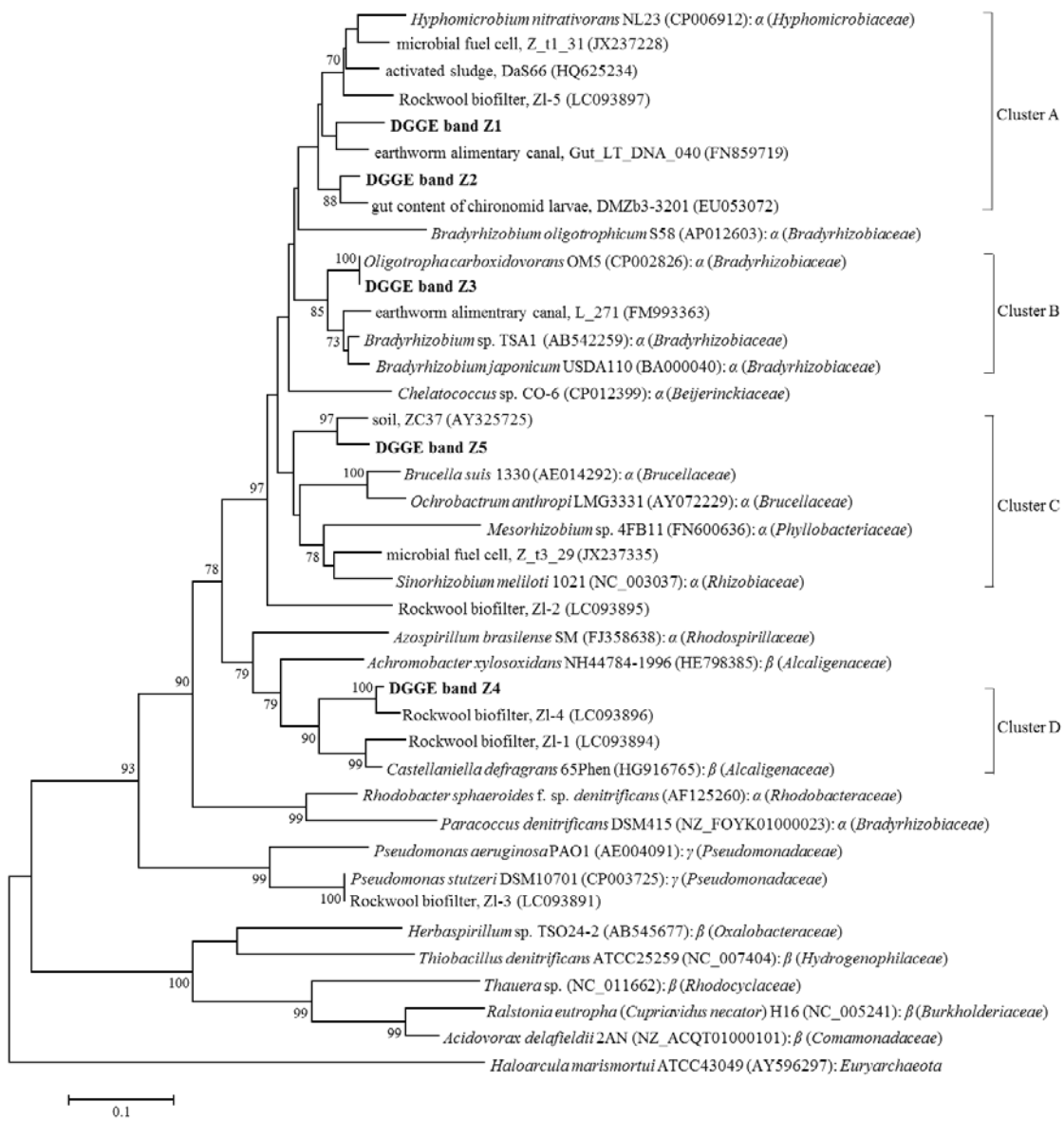


図 3-2-5. 脱窒菌の NosZ 配列の系統樹。

表3-2-3. DGGEバンドプロファイルから算出した各バンドの P_i および、第1、2主成分の因子負荷量

脱窒遺伝子	バンド ¹	サンプル						Pearson correlation coefficients	
		a-50	a-140	b-50	b-140	c-50	c-140	PC1	PC2
<i>nirK</i>	1	0.000	0.106	0.123	0.075	0.207	0.108	-0.097	-0.078
	2 (K1)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.067	0.308	-0.307
	3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.068	0.000	-0.464	0.241
	4	0.000	0.000	0.040	0.037	0.000	0.000	0.716	0.412
	5	0.000	0.000	0.043	0.000	0.000	0.000	0.193	0.435
	6	0.000	0.000	0.000	0.065	0.000	0.046	0.864*	-0.130
	7	0.000	0.000	0.040	0.000	0.095	0.000	-0.381	0.423
	8	0.000	0.000	0.039	0.052	0.000	0.045	0.967*	0.113
	9	0.000	0.000	0.039	0.040	0.000	0.000	0.739	0.398
	10 (K2)	0.000	0.000	0.044	0.077	0.000	0.049	0.992*	0.121
	11	0.000	0.000	0.079	0.000	0.000	0.000	0.193	0.435
	12	0.138	0.073	0.087	0.082	0.189	0.082	-0.644	0.513
	13	0.167	0.070	0.062	0.000	0.121	0.000	-0.887*	0.391
	14	0.000	0.000	0.000	0.048	0.000	0.000	0.735	0.073
	15	0.114	0.000	0.058	0.065	0.084	0.066	-0.144	0.814*
	16	0.000	0.087	0.073	0.084	0.130	0.115	0.222	-0.350
	17 (K3)	0.149	0.000	0.128	0.085	0.105	0.062	-0.095	0.977*
	18	0.231	0.000	0.053	0.000	0.000	0.000	-0.434	0.503
	19	0.000	0.084	0.045	0.047	0.000	0.145	0.464	-0.680
	20	0.000	0.000	0.048	0.000	0.000	0.000	0.193	0.435
	21	0.000	0.000	0.000	0.060	0.000	0.000	0.735	0.073
	22 (K4)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.173	0.308	-0.307
	23	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.303	-0.836*
	24	0.120	0.107	0.000	0.023	0.000	0.000	-0.519	-0.293
	25	0.000	0.101	0.000	0.022	0.000	0.000	-0.146	-0.837*
	26 (K5)	0.000	0.000	0.000	0.080	0.000	0.000	0.735	0.073
	27	0.081	0.000	0.000	0.057	0.000	0.044	0.202	0.261
	28	0.000	0.301	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.303	-0.836*
<i>nirS</i>	1	0.000	0.000	0.136	0.000	0.000	0.000	0.452	0.832*
	2	0.000	0.304	0.102	0.214	0.238	0.512	-0.911*	0.017
	3	0.236	0.696	0.153	0.242	0.429	0.488	-0.900*	-0.149
	4	0.178	0.000	0.099	0.000	0.000	0.000	0.826*	-0.063
	5 (S1)	0.422	0.000	0.218	0.424	0.185	0.000	0.856*	-0.377
	6 (S2)	0.165	0.000	0.069	0.120	0.000	0.000	0.876*	-0.453
	7 (S3)	0.000	0.000	0.224	0.000	0.148	0.000	0.306	0.906*
<i>nosZ</i>	1 (Z1)	0.000	0.000	0.000	0.135	0.170	0.162	0.685	0.702
	2	0.000	0.000	0.167	0.116	0.105	0.000	0.712	-0.628
	3	0.000	0.000	0.265	0.000	0.000	0.000	0.289	-0.878*
	4	0.000	0.000	0.224	0.000	0.000	0.000	0.289	-0.878*
	5	0.000	0.000	0.174	0.080	0.000	0.000	0.483	-0.842*
	6 (Z2)	0.370	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.734	-0.017
	7	0.000	0.000	0.000	0.073	0.000	0.000	0.437	0.053
	8 (Z3)	0.000	0.211	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.505	-0.015
	9	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.130	0.498	0.567
	10	0.153	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.734	-0.017
	11	0.000	0.000	0.170	0.000	0.105	0.177	0.565	-0.076
	12	0.000	0.000	0.000	0.214	0.000	0.000	0.437	0.053
	13	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.163	0.228	0.601
	14	0.000	0.000	0.000	0.000	0.132	0.000	0.285	0.256
	15	0.000	0.085	0.000	0.089	0.109	0.000	0.211	0.244
	16	0.000	0.000	0.000	0.104	0.102	0.107	0.706	0.685
	17	0.173	0.121	0.000	0.000	0.100	0.156	-0.670	0.619
	18 (Z4)	0.000	0.335	0.000	0.090	0.000	0.000	-0.394	-0.001
	19	0.000	0.000	0.000	0.000	0.176	0.000	0.285	0.256
	20 (Z5)	0.304	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.734	-0.017
	21	0.000	0.247	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.505	-0.015
	22	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.106	0.228	0.601

¹ 括弧内に図4-2-1に示したバンド名を表示した。

* $p < 0.05$.

第3節 要約

実規模装置においてアンモニア酸化および脱窒を担う微生物種についての知見を得た。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* 配列を含め、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 NH_3 濃度の影響を受け、 NH_3 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由来の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、脱窒菌群の装置内の分布の様相に堆肥化排気の組成や硝酸濃度が影響していることが予想された。本章の結果は、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を示唆している。

第4章 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

<背景と目的>

第2章、第3章において、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した。脱臭装置の排水対策を考える上では、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必要がある。実規模のBiotrickling filterでは、不確実性は大きくなるものの、入気および排気、循環水、排水中の窒素から、窒素のマスバランスを見積もることは可能である(Melse *et al.*, 2012)。Biofilterにおいても、長期間運転を行い定常状態となった装置であれば実規模装置で窒素のマスバランスをおおまかに見積もることは可能であるが、実規模装置で風量、散水量、排水量、脱臭担体への蓄積分などを正確に求めて窒素のマスバランスを把握するのは困難である。これまでラボスケールの脱臭装置で窒素のマスバランスを調べた試験では、窒素消失に対する脱窒の寄与は明らかにされていない。そこで、本章では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。そのために窒素含有廃水の処理のために水を循環し、窒素が蓄積する環境下での窒素の動態と硝化・脱窒に関わる微生物群集構造の変化を網羅的に解析した。

第1節 窒素収支の解析

1-1. 緒言

ロックウール生物脱臭装置では、高濃度の窒素を含む排水が生じるが、水を循環利用することで排水の外部流出量を減らすことができる(佐藤、2000)。しかしこのような運転条件下では循環水中に窒素が蓄積し、無機態窒素濃度で1%を超える高濃度の状態で装置の運転が行われることになる。高窒素濃度下では、一般的に微生物の活性は阻害されると考えられる。一方、循環水中の窒素濃度が増加しない時期があり、佐藤(2000)は水循環運転を行うと脱臭槽での脱窒が促進されると推測しているが、その理由は明らかにされていない。本節では、実規模のロックウール脱臭装置をスケールダウンさせたラボスケールの試験装置を試作し、NH₃ガスを用いて脱臭運転を行い、窒素収支を調査した。そしてNH₃除去プロセスを確認すると共に、窒素消失に対する脱窒とアナモックスの寄与を評価した。

1-2. 材料および方法

1. ラボスケール装置の運転

図 4-1-1 に示したようなラボスケールのロックウール生物脱臭装置を試作した。微生物を馴養する期間を設けないために、第 2 および 3 章で解析したロックウール脱臭装置から 2007 年 11 月に採取した脱臭担体（水分 53.6%）を用いた。内径 8 cm、高さ 30 cm の透明プラスチック製円筒容器にロックウール脱臭担体を 0.8 l（乾物 223g）充填し、28°C の恒温槽の中に設置した。5000 ppmv の NH₃ ガスをコンプレッサーにより大気で約 110 ppmv 程度まで希釈し、装置下部から毎分 0.4L で通気し、436 日間運転した。ガス流量は面積式の精密ニードルバルブ付フローメータ（RK1250; コフロック）を用いて調整し、乾式ガスメータ（DC-1; シナガワ）により試験開始時、脱臭担体サンプリング時、試験終了時に流量の確認を行った。循環水を上部から 4 時間ごとに 1 分間（8 ml）滴下した。流入 NH₃ 量を把握するため、流路を分岐させ、1.5 M 硫酸トラップにより NH₃ を回収した。流出ガスについても 1.5 M 硫酸トラップで回収した。リアクターの運転は 20°C の恒温室内で行った。

2. サンプリングと分析

経時的にガスを採取し、第 2 章第 1 節で示した方法により NH₃ および N₂O 濃度を測定した。運転開始後 0、32、150、317、436 日目に脱臭担体を表層 1cm から採取した。循環水は経時的に採取し、NH₄⁺-N、NO₂⁻-N、NO₃⁻-N をイオンクロマトグラフ（DX-120、Dionex; および HIC-VP super、島津）を用いて分析した。pH と電気伝導率（EC）はそれぞれコンパクト pH メーター（Twin pH、Horiba）、EC メーター（Twin Cond、Horiba）を用いて測定した。脱臭担体の理化学性の解析は第 2 章第 2 節に示した方法と同様に測定した。全窒素については、NH₃ の揮散を防止するために、5%塩酸を噴霧した上で、48 時間 55°C で乾燥させた後（石橋、2001）、乳鉢で粉砕したものを NC アナライザーの測定に供試した。

窒素バランスの計算は以下のように行った。

$$N_{in} = \sum (N-NH_3) \text{ 流入ガス} + \sum N (\text{ロックウール脱臭担体} + \text{循環水}) \text{ 持ち込み}$$

$$N_{out} = \sum (N-NH_3) \text{ 流出ガス} + \sum (N- N_2O) \text{ 流出ガス} \\ + \sum N (\text{ロックウール脱臭担体} + \text{循環水}) \text{ 回収分} + \sum N \text{ サンプリングロス}$$

ここで、NO と NO_x は測定していない。

$$\text{不明窒素 (\%)} = (N_{in} - N_{out}) / N_{in} \times 100$$

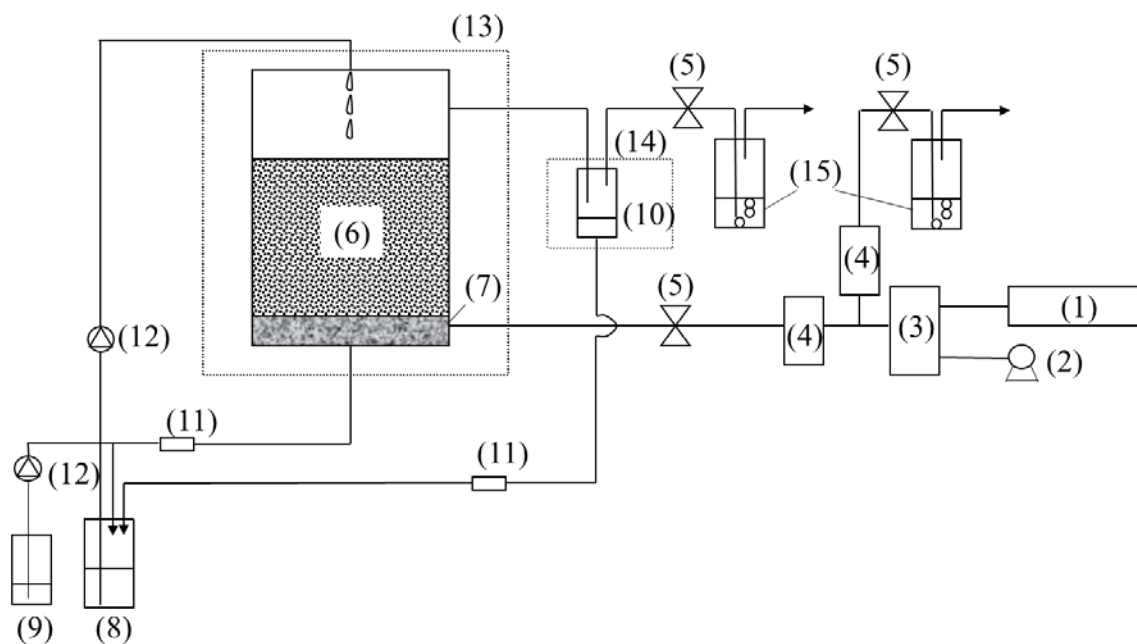


図 4-1-1. ラボスケール脱臭試験装置の概要図

(1) NH_3 ガスボンベ、(2) コンプレッサー、(3) ガス混合装置、(4) ニードルバルブ付きフロー式流量計、(5) ガスサンプリング口、(6) ロックウール脱臭担体、(7) 小石、(8) 循環水貯め、(9) 加水用水貯め、(10) 水トラップ、(11) 電磁弁、(12) ポンプ、(13) 恒温槽、(14) 冷蔵庫、(15) 硫酸トラップ (Yasuda *et al.*, 2013 より引用).



図 4-1-2. ラボスケール脱臭試験装置のロックウール脱臭担体充填部 (図 4-1-1 の (6)).

3. 脱窒活性およびアナモックス活性測定

第2章第2節に示した¹⁵Nトレーサー法と同様の方法を用いて、150日目と317日目のサンプルについて測定した。アナモックスの活性測定はYoshinagaら(2011)およびYasudaら(2011)に準じて行った。すなわち、サンプルは10倍に希釈した無機塩培地(van de Graaf *et al.*, 1996を改変; 5 mM KHCO₃の代わりに5 mM NaHCO₃を使用)に懸濁後、遠心分離(4400 g、5分)を3回繰り返し、サンプル中のNH₄⁺、NO₃⁻を洗った後、再度無機塩培地に懸濁した(サンプル:培地=1:50 (w/v))。アルゴンガスをパージした後、嫌気条件下(嫌気チャンバー内)で26 ml容バイアル瓶に15 mlずつ分注した。ブチル栓でフタをした後、ヘッドスペースをHeで置換し、一晚25°C、160 rpmで振とう培養を行った。その後、脱窒活性測定用にNH₄⁺と¹⁵NO₂⁻を、アナモックス活性測定用に¹⁵NH₄⁺とNO₂⁻をそれぞれ、最終濃度1 mMになるように添加し、25°C、160 rpmでスターラー攪拌をしながら培養した。ヘッドスペースのN₂の同位体をガスクロマトグラフ四重極質量分析計を用いて測定した(Yoshinaga *et al.*, 2011)。アナモックス活性用にはGC-IRMSを用いた(Yasuda *et al.*, 2011)。培養は2連で行った。

1-3. 結果および考察

図4-1-3に、リアクターのNH₃の除去性能、循環水中の窒素成分濃度とpHの経時変化を示した。流入NH₃は約100~120 ppmvで推移していた。循環水中にはNH₄⁺-NとNO₃⁻-Nが徐々に蓄積し、運転終了時にはそれぞれ9567、15792 mg/lであった。NO₂⁻-Nは運転開始後9日目にピークがあり、その後は減少し、再び182日目に2回目のピークがあった。循環水中の無機態窒素濃度が2%を超えてもNH₃は良好に処理できていたが運転開始後158日目に流出ガス中のNH₃濃度が8 ppmvまで増加した。循環水中のpHは、運転開始時は7.8であったが、徐々に低下していき、150日付近では再び上昇し7以上であった。この間、遊離態のNH₃(FA)濃度が25 mg/lを超えるまで増加した。流出ガス中にNH₃が検出され除去率が低下した時期とFA濃度が上昇した時期が一致しており、NH₃除去性能の低下はFA濃度の上昇と関係していることが推察された。この後、NO₃⁻-Nの蓄積により188日目以降pHが5.1以下まで低下しており、脱臭装置内でNH₃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、NO₃⁻の生成がNH₃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していると考えられた。

ECはこの間徐々に増加し、無機態窒素との関係は、 $EC \text{ (mS/cm)} = 4.8 \times \text{無機態窒素 (g N/L)} - 1.1$ ($R^2=0.93$)で表された。NH₄⁺、NO₂⁻、NO₃⁻の当量イオン伝導度($S \cdot \text{cm}^2/\text{mol}$)はそれ

ぞれ 73.5、72.0、71.5 (25°C) である (化学便覧, 1966)。これらの値から計算される電気伝導率はそれぞれ 5.3、5.1、5.1 mS/cm/(g N/L) となり、得られた回帰式の傾きより高いものの、循環水中の EC の 9 割以上が無機態窒素濃度で説明できると考えられた。これは、豚舎臭気を対象にした Biotrickling filter の循環水において示された 4.6 mS/cm/(g N/L) という値に近かった (Melse *et al.*, 2012)。

遊離態の亜硝酸 (FNA) 濃度は、pH が低下した 186 日から 253 日にかけて 0.2 mg/l 以上まで増加した。FA と FNA は硝化を阻害することが知られており、Anthonisen ら (1976) によると、アンモニア酸化の阻害が始まる下限の FA 濃度は 10 mg/l、硝化の阻害が始まる下限の FNA 濃度は 0.2 mg/l である。上述した FA 濃度の上昇は硝化の阻害を引き起こした可能性が考えられた。Schmidt ら (2004) は *Nitrosomoas europaea* などのアンモニア酸化細菌が、1 M もの NH_4^+ を細胞内に蓄積できると報告している。 NH_4^+ 塩の蓄積した運転後半においても pH の低下により FA 濃度は低く保たれており、 NH_3 除去性能が維持されたと考えられた。一方、FNA による阻害は亜硝酸酸化細菌に対して先に起きると考えられている (Anthonisen *et al.*, 1976)。2 回目の NO_2^- -N のピークは FNA の増加した時期とずれており、FNA 濃度の影響については明確ではなかった。

図 4-1-4 にロックウール脱臭担体と循環水への一日当たりの無機態窒素の蓄積量を示した。0~32 日の期間では NH_4^+ -N と NO_3^- -N の蓄積量が同程度であったのに対し、32~150 日ではいずれも蓄積量は減少した。特に NH_4^+ -N が減少し NH_4^+ -N と NO_3^- -N の比が高くなっていた。150~317 日の期間では、 NH_4^+ -N の蓄積量が再度増加し、 NO_3^- -N の蓄積と同程度になったが無機態窒素の蓄積量としては少なく、また、 NO_3^- -N については、循環水への蓄積が増加していた。これらの NH_4^+ -N と NO_3^- -N の蓄積量の変動には、硝化と脱窒活性のバランスが影響しているものと予想された。317~436 日の期間では NH_4^+ -N と NO_3^- -N の蓄積量は再び増加し、EC 濃度の増加による微生物活性の低下が推察された。

図 4-1-5 に N_2O 濃度の経時変化を示した。流出ガス中の濃度は平均 0.81 ppmv (0.42~4.10 ppmv) で、流入ガスの 0.39 ppmv (0.35~0.46 ppmv) より増加しており、変動が見られた。第 2 章第 1 節で調査した実規模装置とは異なり、脱臭槽からの N_2O の生成が認められたが、窒素バランスに占める割合は 0.4~0.6% と少なかった。

運転に伴う窒素バランスの変化を表 4-1-1 に示した。32 日目に流入アンモニアの大半は脱臭材料に保持されていたが、その後、脱臭材料に約 50%、循環水中に約 10% の窒素が含まれた。150 日以降、29.6~39.1% が不明であった。不明分に対する脱窒活性およびアナモック

ス活性の寄与を、 ^{15}N トレーサー試験により調べた結果を図 4-1-6、4-1-7 に示した。 NH_4^+ と $^{15}\text{NO}_2^-$ を添加して嫌気培養を行ったサンプルでは、培養前にサンプルを培地で洗っているが、 $^{14}\text{NO}_x^-$ を完全に除去することができず、 $^{29}\text{N}_2$ と $^{30}\text{N}_2$ の直線的な増加が見られた(図 4-1-6)。アナモックス活性を測定するために $^{15}\text{NH}_4^+$ と NO_2^- を添加し嫌気培養を行ったサンプルでは、培養時間を長くしてもアナモックス反応が起きるときに生成される $^{29}\text{N}_2$ が認められなかった(図 4-1-7)。 $^{29}\text{N}_2$ と $^{30}\text{N}_2$ の生成量から算出した脱窒活性ポテンシャルは 0.24、0.22 mg $\text{N}_2/\text{g}/\text{日}$ であった。不明窒素分がすべて脱窒されたと仮定して、脱窒量を見積もったところ、150 日では 0.07 mg $\text{N}/\text{g}/\text{日}$ 、317 日では 0.08 mg $\text{N}/\text{g}/\text{日}$ 、436 日では 0.003 mg $\text{N}/\text{g}/\text{日}$ であり、脱窒活性ポテンシャルは窒素消失を説明しうる量であると判断した。第 2 章第 2 節で解析した結果から、実規模装置から採取した脱臭担体でもアナモックスの寄与は見られず、ロックウール脱臭担体にアナモックス細菌が存在していないか、存在していてもごくわずかであることが考えられた。塩濃度を徐々に上げていくことで、3%の高塩環境にアナモックス細菌を適応させることができることが示されている(Kartal *et al.*, 2006)。しかし、アナモックスプロセスが阻害されない $\text{NH}_4^+\text{-N}$ と $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 濃度として 1 g/l が示されており(Strous *et al.*, 1999b)、本試験条件下のような高濃度の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ と $\text{NO}_3^-\text{-N}$ により阻害が起きた可能性がある。また、脱臭担体の内部の酸素分圧は、絶対嫌気性で増殖の遅いアナモックス細菌が増えるのに適したものではなかったと考えられた。

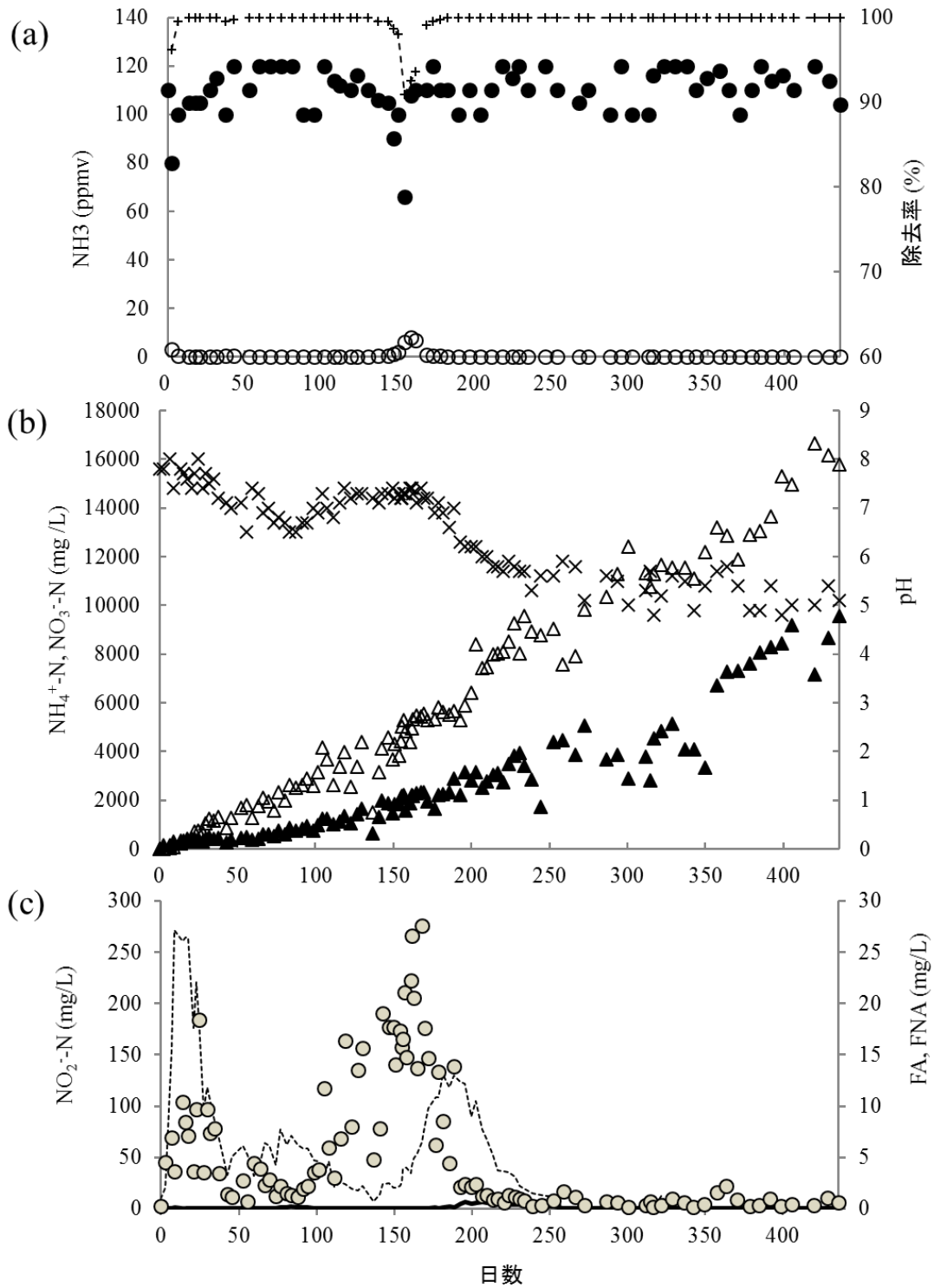


図 4-1-3. NH₃ 除去性能と循環水中の窒素成分濃度および pH の経時変化.

(a) NH₃ 除去性能 (● 流入ガスの NH₃ 濃度、○ 流出ガスの NH₃ 濃度、+ 除去率). (b) ▲ NH₄⁺-N 濃度、△ NO₃⁻-N 濃度、× pH. (c) --- NO₂⁻-N 濃度、— 遊離態の亜硝酸 (FNA) 濃度、● 遊離態の NH₃ (FA) 濃度 (Yasuda *et al.*, 2013 より引用).

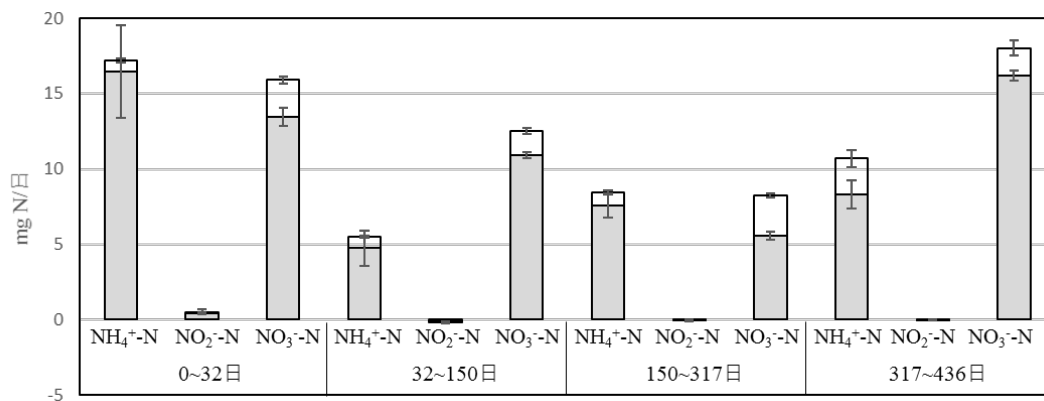


図 4-1-4. ロックウール脱臭担体および循環水中への一日当たりの $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ および $\text{NO}_3\text{-N}$ の蓄積量の変化. (グレイ、ロックウール脱臭担体；白、循環水). (Yasuda *et al.*, 2017b より引用)

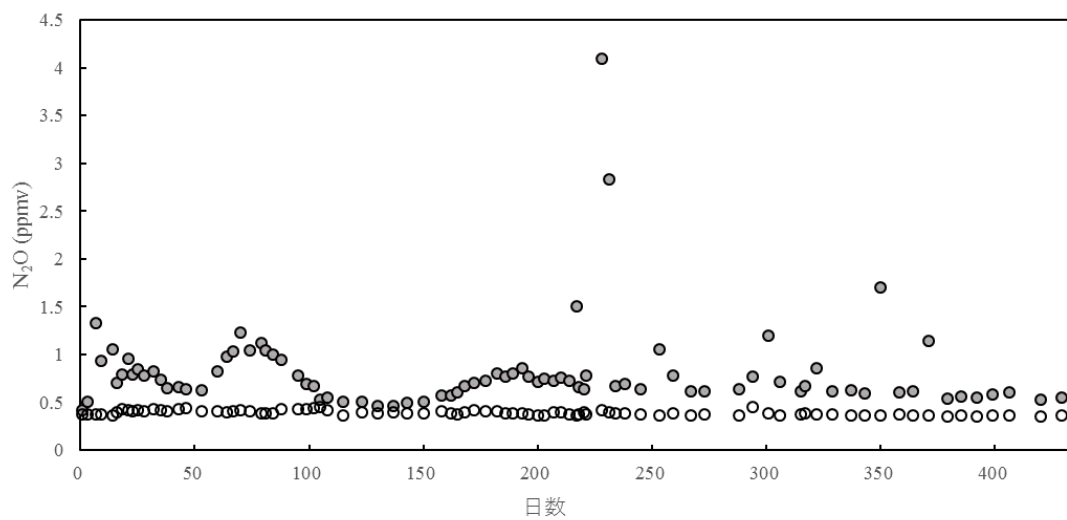


図 4-1-5. N_2O 濃度の経時変化.

(グレイ 流出；白丸 流入) (Yasuda *et al.*, 2017b より引用)

表 4-1-1. ラボスケール装置の運転に伴う窒素バランスとpHの変化

	Day 0	Day 32	Day 150	Day 317	Day 436
NH ₃ 容積負荷 (g NH ₃ m ⁻³ d ⁻¹)	49	52	55	59	63
流入 (NH ₃ -N; g) *	0.00	1.24	5.11	10.88	14.89
流出 (NH ₃ -N; mg)	0.00	5.99	10.77	37.10	43.89
ロックウール脱臭担体 (RW) (total; g)	1.07	2.21	3.79	5.62	7.96
RW (NH ₄ ⁺ -N; g)	0.0025	0.53	1.09	2.36	3.37
RW (NO ₂ ⁻ -N; mg)	0.52	14.09	0.54	0.36	0.34
RW (NO ₃ ⁻ -N; g)	0.018	0.45	1.74	2.67	4.59
循環水 (total; g) †	0.0019	0.12	0.34	0.99	1.64
循環水 (NH ₄ ⁺ -N; g)	0.00053	0.033	0.098	0.28	0.62
循環水 (NO ₂ ⁻ -N; mg)	0.59	6.98	1.36	nd†	nd†
循環水 (NO ₃ ⁻ -N; g)	0.00082	0.082	0.24	0.70	1.02
N ₂ O-N; mg	0.00	12.11	35.04	95.15	121.1
サンプリングロス; g §	0.00	0.0015	0.17	0.54	1.45
不明 (%)¶	-	-1.8	29.6	39.1	29.7
RW pH (KCl)	6.1	7.0	6.4	4.4	4.6
循環水 pH	7.8	7.5	7.4	4.8	5.1

* 期間中の流入NH₃-Nの合計.

† nd=not detected.

‡ 循環水チューブと水貯めの合計. ロックウール脱臭担体に含まれる水中の窒素分はRWの分類に含む.

§ 電磁弁を開いたときに放出されるNH₃-Nと、ロックウール脱臭担体および循環水のサンプリングにより減少した窒素分の合計.

¶ 0日サンプルの窒素 (持ち込み分) に流入NH₃-Nを加えた量を100%とした場合の割合.

(Yasuda *et al.*, 2013 より引用)

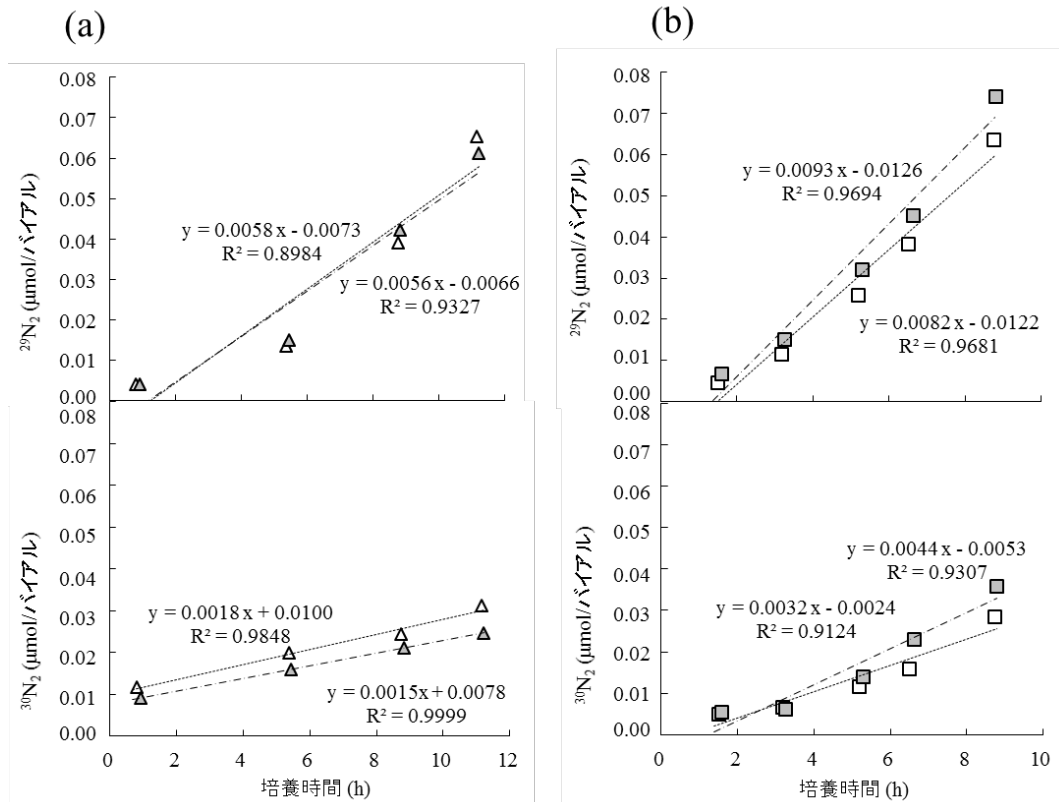
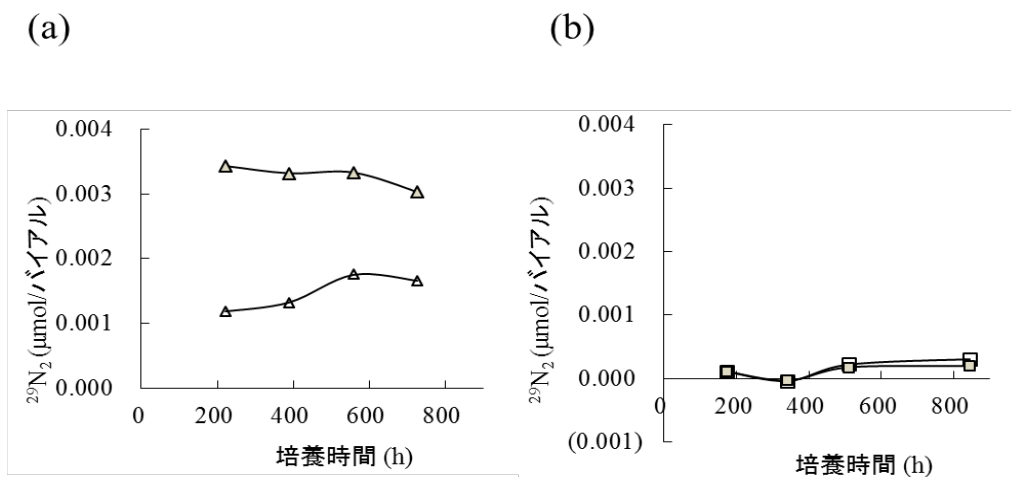


図 4-1-6. NH_4^+ と $^{15}\text{NO}_3^-$ 添加嫌気培養時のバイアル当たりの $^{29}\text{N}_2$ および $^{30}\text{N}_2$ の経時変化 ((a) 150 日目、(b) 317 日目のサンプル、白とグレイは 2 連のサンプルを示す。) (Yasuda *et al.*,



2013 より引用)

図 4-1-7. $^{15}\text{NH}_4^+$ と NO_2^- 添加嫌気培養時のバイアル当たりの $^{29}\text{N}_2$ の経時変化 ((a) 150 日目、(b) 317 日目のサンプル、白とグレイは 2 連のサンプルを示す。) (Yasuda *et al.*, 2013 よ

り引用)

第2節 アンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌群集の解析

2-1. 緒言

第1節において、ラボスケールの脱臭装置の窒素バランスを詳細に調べたところ、窒素は蓄積の傾向にあるものの、その蓄積程度は運転期間で異なることが明らかとなった。*Nitrosomonas europaea* を用いた試験では、塩濃度が上昇すると、活性が減少することが示されている (Hunik *et al.*, 1992)。また、*Nitrosomonas* 属に属するアンモニア酸化細菌の種類により、NH₃の耐性が異なることが知られている (Suwa *et al.*, 1994)。第3章で、ロックウール脱臭担体のアンモニア酸化を担うアンモニア酸化細菌群集の構成種は *Nitrosomonas europaea* lineage と *Nitrospira* sp. の cluster 3 に属するものであること、アンモニア酸化古細菌群集の構成種は主に soil/sediment group である Group I. 1b に属するものであることが明らかにされた。アンモニア酸化細菌とアンモニア酸化古細菌群集は NH₃ のほかに、塩濃度、pH、NO₂⁻濃度、溶存酸素濃度などの影響を受けて変化することが示されている (e.g., Limpiyakorn *et al.*, 2005; Tourna *et al.*, 2008; Erguder *et al.*, 2009)。そこで、窒素が蓄積する生物脱臭環境下で存在するアンモニア酸化細菌とアンモニア酸化古細菌の種類と数の変化を調べるために、*amoA* 遺伝子をターゲットとした DGGE 法とリアルタイム PCR 法により群集構造の変化を解析した。

2-2. 材料および方法

第1節で試作したラボスケールから採取した脱臭担体サンプルを用いた。運転終了時にあたる 436 日目には、表層 1 cm に加え深さ 4.5-4.4 cm、9-10 cm の担体を採取し供試した。アンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌群集を PCR-DGGE 法とリアルタイム PCR 法により解析した。DNA の抽出、および PCR-DGGE は第3章第1節に示した方法で行った。317 日および 436 日に採取した循環水について、3300 g で 20 分間の遠心により微生物を回収し供試した。リアルタイム PCR には、436 日目は表層 1 cm のサンプルのみ供試した。

リアルタイム PCR には、アンモニア酸化細菌は *amoA*-1F/*amoA*R1、アンモニア酸化古細菌は *amoA*19F/*amoA*247Ry1 のプライマーセットを用いた。アンモニア酸化細菌は 10 μl の 2×mix (Sso-Fast EvaGreen; Bio-Rad)、0.5 μM の各プライマー、4μg bovine serum albumin、1.2 ~4.4 ng の鋳型 DNA を含む 20 μl の反応系で、アンモニア酸化古細菌は 5 μl の 2×mix

(Sso-Fast EvaGreen; Bio-Rad)、0.5 μM の各プライマー、2 μg bovine serum albumin、1.2 ~4.4 ng の鋳型 DNA 10 μl を含む 10 μl の反応系で、MyiQ2 real-time PCR systems (Bio-Rad) を用いて行った。98°C 2 分の熱変性後、98°C 5 秒、57°C (アンモニア酸化細菌) あるいは 55°C (アンモニア酸化古細菌) 10 秒を 45 サイクル行い、その後 95°C 1 分、50°C 1 分、55-95°C まで 0.5°C ずつ 10 秒ごとに 0.5°C ずつ上昇させる融解曲線解析を行った。反応は各サンプル 2 ~3 連で行った。検量線は、アンモニア酸化細菌については *Nitrosomonas europaea* (NBRC14298) の *amoA* 遺伝子を導入したプラスミド pGEM-T Easy vector (Promega) を使用し、アンモニア酸化古細菌については、第 3 章第 1 節で得られた clone RW-1 (accession number AB525377) を用いて作成した (増幅効率は 70~97%、検量線の $r^2 > 0.98$)。サンプル間の値の差の検定は SAS (ver. 9.1, SAS Institute Inc., USA) の GLM プロシジャの Bonferroni 法を用いた。

DGGE 解析により得られたバンドの塩基配列は DDBJ に登録し、アンモニア酸化細菌については AB702697-706、アンモニア酸化古細菌については AB702707-14 のアクセッション番号をそれぞれ取得した。得られた塩基配列および近縁の配列を用い、MEGA ソフト (ver. 5.1, Tamura *et al.*, 2011) を用いて ClustalW によりアライメントを行った後、近隣接合法により系統樹を作成した。

2-3. 結果および考察

図 4-2-1 に DGGE バンドプロファイルを、図 4-2-2 に主成分分析結果を示した。運転期間中のアンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌の群集変化は異なる様相を示した。アンモニア酸化細菌は 0、32、150 日とそれぞれ群集が変化し、その後は群集構造が類似していたのに対し、アンモニア酸化古細菌では 32 日から 150 日にかけて群集が変化し、さらに 150 日から 317 日にかけて変化していた。また、担体と循環水の群集を比較すると、アンモニア酸化細菌では多くのバンドが共通して存在していたが、アンモニア酸化古細菌では、担体では 9~10 本なのに対し循環水のバンドは 2 本であった。アンモニア酸化古細菌については、異なるプライマーセット (*amoA19F1-GC/amo247Ry1* および *CrenamoA23f/CrenamoA616r*) について、同様の群集変化を確認した (図 4-2-3)。 *amoA* 遺伝子のコピー数の結果を図 4-2-4 に示した。アンモニア酸化細菌の *amoA* コピー数は $1.7 \times 10^6 \sim 1.6 \times 10^9/\text{g}$ の範囲で、32 日目に増加し、その後 317 日まで減少し、ふたたび増加するといった変動を示した。一方、アンモニア酸化古細菌は $1.5 \times 10^6 \sim 5.2 \times 10^7/\text{g}$ の範囲で、アンモニア酸化細菌と同様に 32 日で増加し、その後 150 日まで減少した後、横ばいという変動を示した。表 4-2-1 に群集変化と循環

水水質との関係を解析した結果を示した。群集変化を Shannon の多様性指数および主成分得点で示した場合、アンモニア酸化細菌では、多様性指数および第一主成分の得点と、循環水中の FA 濃度 (*amoA* コピー数当たり) の間でそれぞれ負の相関が認められた。また、アンモニア酸化古細菌では、第二主成分の得点と循環水中の FA 濃度 (*amoA* コピー数当たり) の間で正の相関が認められた。これらの結果から、循環水中の *amoA* コピー数当たりの FA 濃度が増加すると、アンモニア酸化細菌の多様性が減少するという関係が示された。*amoA* コピー数当たりの FA 濃度はアンモニア酸化古細菌の群集にも何らかの影響を与えていることが示唆された。Weckhuysen ら (1994) は、Biofilter において、アンモニア除去能が FA 濃度の影響を受けることを示している。

図 4-2-5、4-2-6 にアンモニア酸化細菌とアンモニア酸化古細菌の *amoA* 遺伝子の系統樹を示した。アンモニア酸化細菌の DGGE バンドの多くは、実規模装置から得られた配列と類似しており、*Nitrosospira* cluster 3 と *Nitrosomonas europaea* lineage に属した。アンモニア酸化細菌の群集で 32 日のサンプルに特徴的なバンド RB5 は実規模装置で硝化活性が高かった地点 b-140 に特徴的なバンドに近縁であった。150 日以降に特徴的なバンド RB6~10 はバンド RB5 と同様に *Nitrosospira* cluster 3 の中で *N. multiformis* と同じクラスターであったが、バンド RB5 とはさらに異なるサブクラスターに属していた。バンド RB3、4、8 は循環水と共通したバンドであるが、*Nitrosospira* cluster 3 の中で *N. briensis* を含むクラスターに属した。担体と循環水で、異なるアンモニア酸化細菌種のすみわけが起きていることが示唆された。

アンモニア酸化古細菌についても DGGE バンドの多くは、実規模装置から得られた配列と類似していた。0 日、32 日に特徴的なバンド RA2 は Thaumarchaeotal Group I.1a に属していたが、150 日以降はこのバンドは薄くなった。他のバンドはすべて Thaumarchaeotal Group I.1b に属していたが、この中で、バンド RA3~5 は実規模装置から得られた配列とは異なるクラスターを形成していた。さらに、317 日以降の担体および循環水に特徴的なバンドである RA1 は Thaumarchaeotal Group I.1b に属する水族館の海水水槽から得られたクローンと近縁であり、窒素が蓄積する生物脱臭環境下で、アンモニア酸化古細菌についても異なる種類の遷移が生じていたことが示された。

表 4-2-1. アンモニア酸化細菌およびアンモニア酸化古細菌の*amoA*遺伝子のDGGEバンドプロファイルから算出したShannonの多様性指数および主成分スコアと循環水水質に関するSpearman 順位相関係数

Parameter	アンモニア酸化細菌			アンモニア酸化古細菌		
	<i>H</i>	1st PC scores	2nd PC scores	<i>H</i>	1st PC scores	2nd PC scores
specific FA (mg L ⁻¹ [AOA <i>amoA</i> 遺伝子コピー数] ⁻¹)	-	-	-	0.60	0.20	0.90*
specific FA (mg L ⁻¹ [AOB <i>amoA</i> 遺伝子コピー数] ⁻¹)	-0.90*	-1.00*	0.00	-	-	-
pH	0.30	0.60	-0.10	-0.50	0.20	-0.60
NH ₄ ⁺ -N (mg L ⁻¹)	-0.10	-0.50	0.00	0.30	-0.40	0.70
NO ₂ ⁻ -N (mg L ⁻¹)	0.21	0.36	0.67	0.21	0.82	-0.15
NO ₃ ⁻ -N (mg L ⁻¹)	-0.10	-0.50	0.00	0.30	-0.40	0.70
N ₂ O-N (ppm)	0.50	0.30	0.70	0.30	0.50	0.00

* $p < 0.05$, $n = 5$

(Yasuda *et al.*, 2013 より引用)

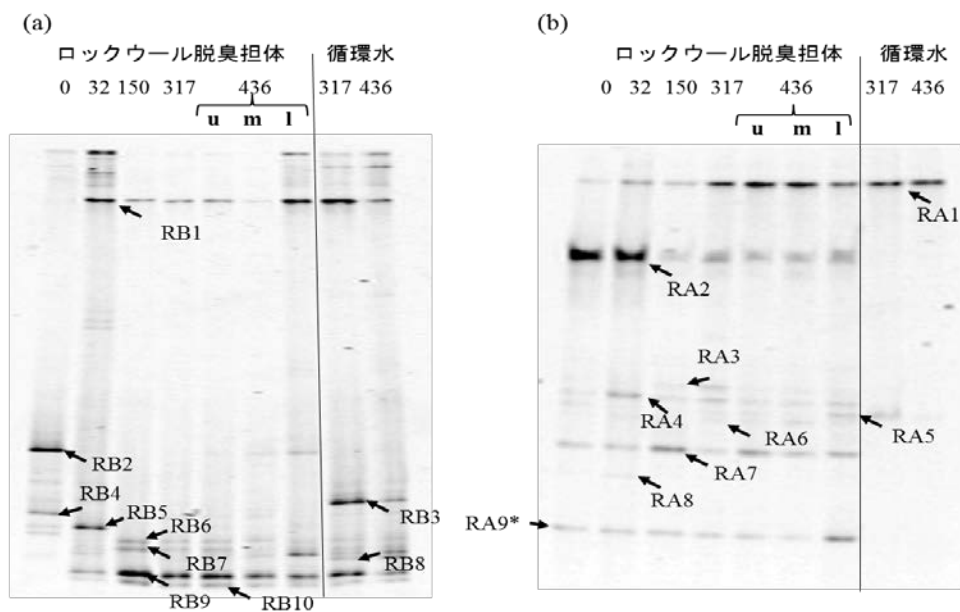


図 4-2-1. アンモニア酸化細菌 (a) およびアンモニア酸化古細菌 (b) の *amoA* 遺伝子の増幅産物の DGGE バンドプロファイル. ゲル上の数字はサンプリング日数を示す. (436 日目の u, m, l はそれぞれ表層 1cm, 4.5-5.5cm, 9-10cm から採取したサンプルを示す). (b) の RA9*は、第3節第1節で得られたクローン RW-3 と泳動位置が同じバンドであることを示す) (Yasuda *et al.*, 2013 より引用)

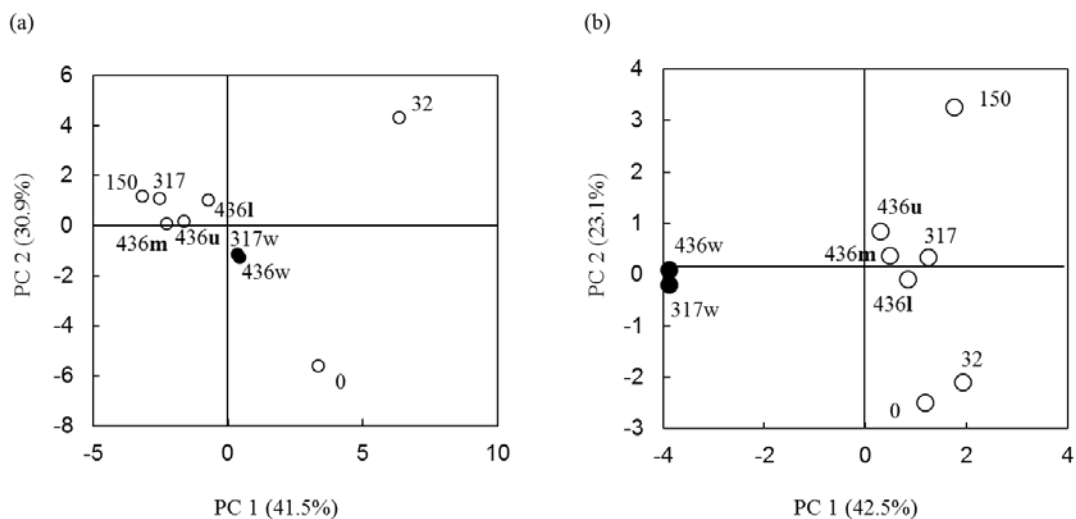


図 4-2-2. DGGE バンドプロファイル (図 4-2-1) の主成分分析結果. (a) アンモニア酸化細菌 (b) アンモニア酸化古細菌. 数字はサンプリング日数、w は循環水、436 日目の u, m, l はそれぞれ表層 1cm, 4.5-5.5cm, 9-10cm から採取したサンプルを示す) (Yasuda *et al.*, 2013 より引用)

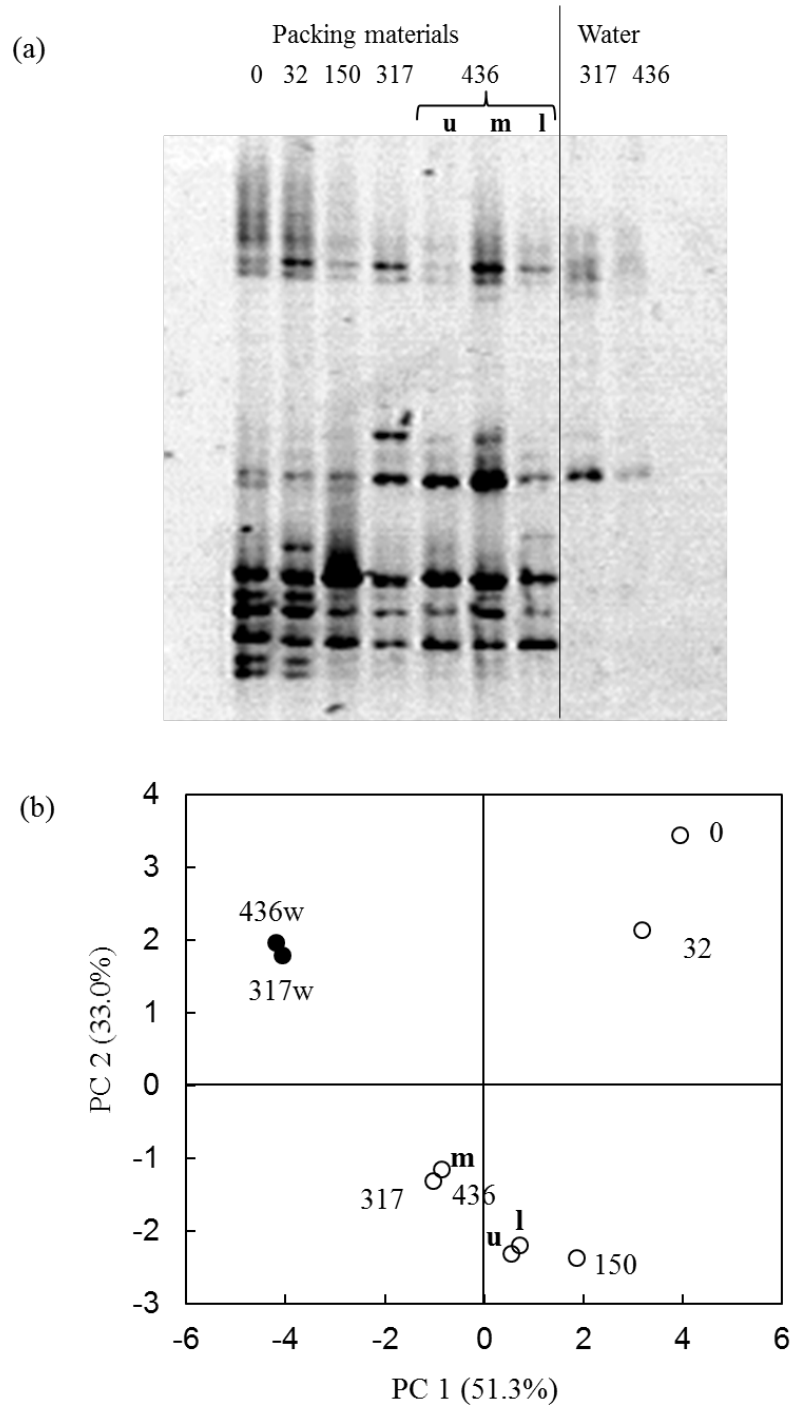


図 4-2-3. アンモニア酸化古細菌の *amoA* 遺伝子に特異的なプライマーセット CrenamoA23f/CrenamoA616r を用いて増幅した PCR 産物の DGGE バンドプロファイル (a) および DGGE バンドの主成分分析結果 (b) (数字はサンプリング日数、w は循環水、436 日目の u、m、l はそれぞれ表層 1cm、4.5-5.5cm、9-10cm から採取したサンプルを示す) (Yasuda *et al.*, 2013 より引用)

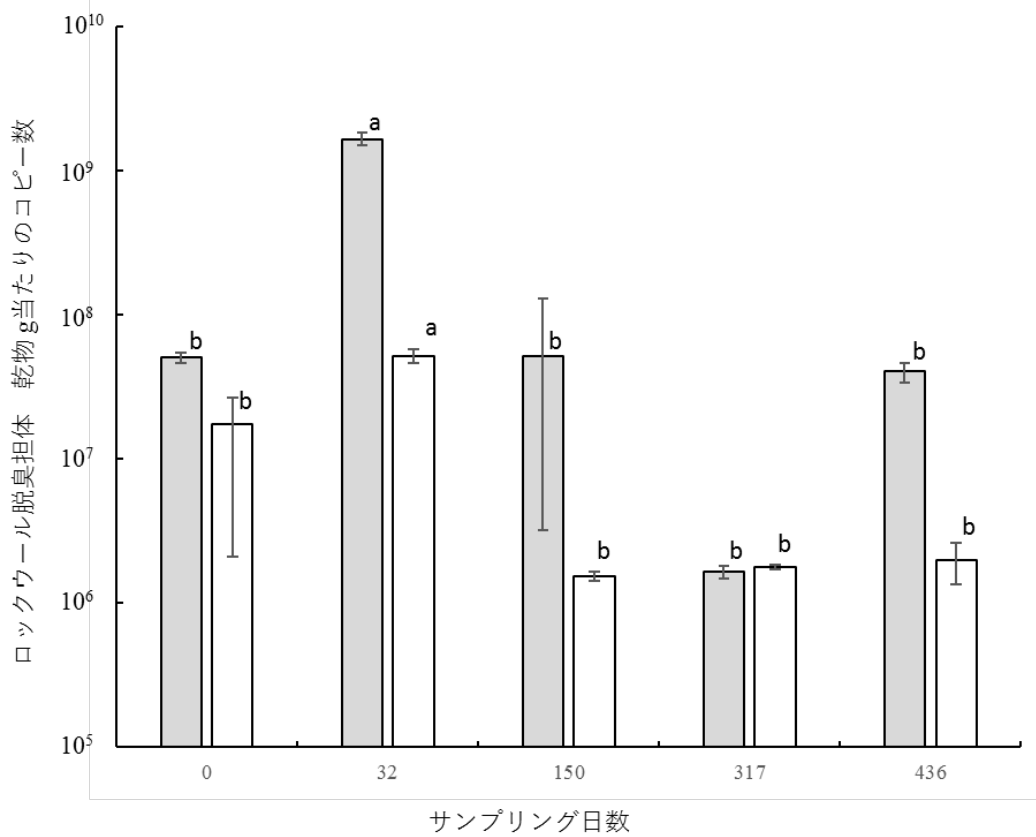


図 4-2-4. ロックウール脱臭担体中の *amoA* 遺伝子コピー数の変化.

(グレイ アンモニア酸化細菌、白 アンモニア酸化古細菌；

アンモニア酸化細菌、アンモニア酸化古細菌それぞれについて、Bonferroni の多重比較により図中の異なる符号間で有意差あり (P<0.05)) (Yasuda *et al.*, 2013 より改変)

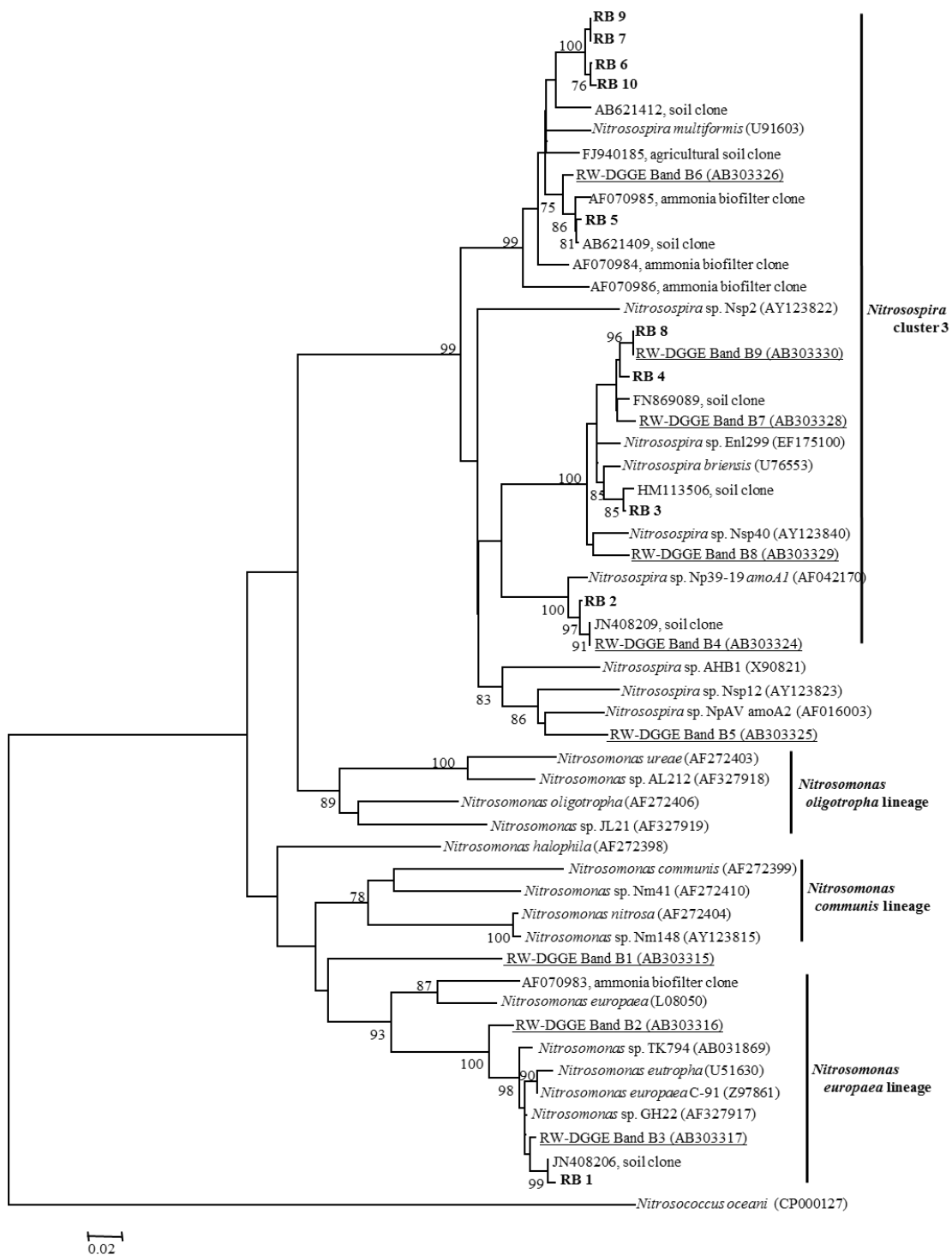


図 4-2-5. アンモニア酸化細菌の *amoA* 遺伝子の系統樹.

(Yasuda *et al.*, 2013 より引用)

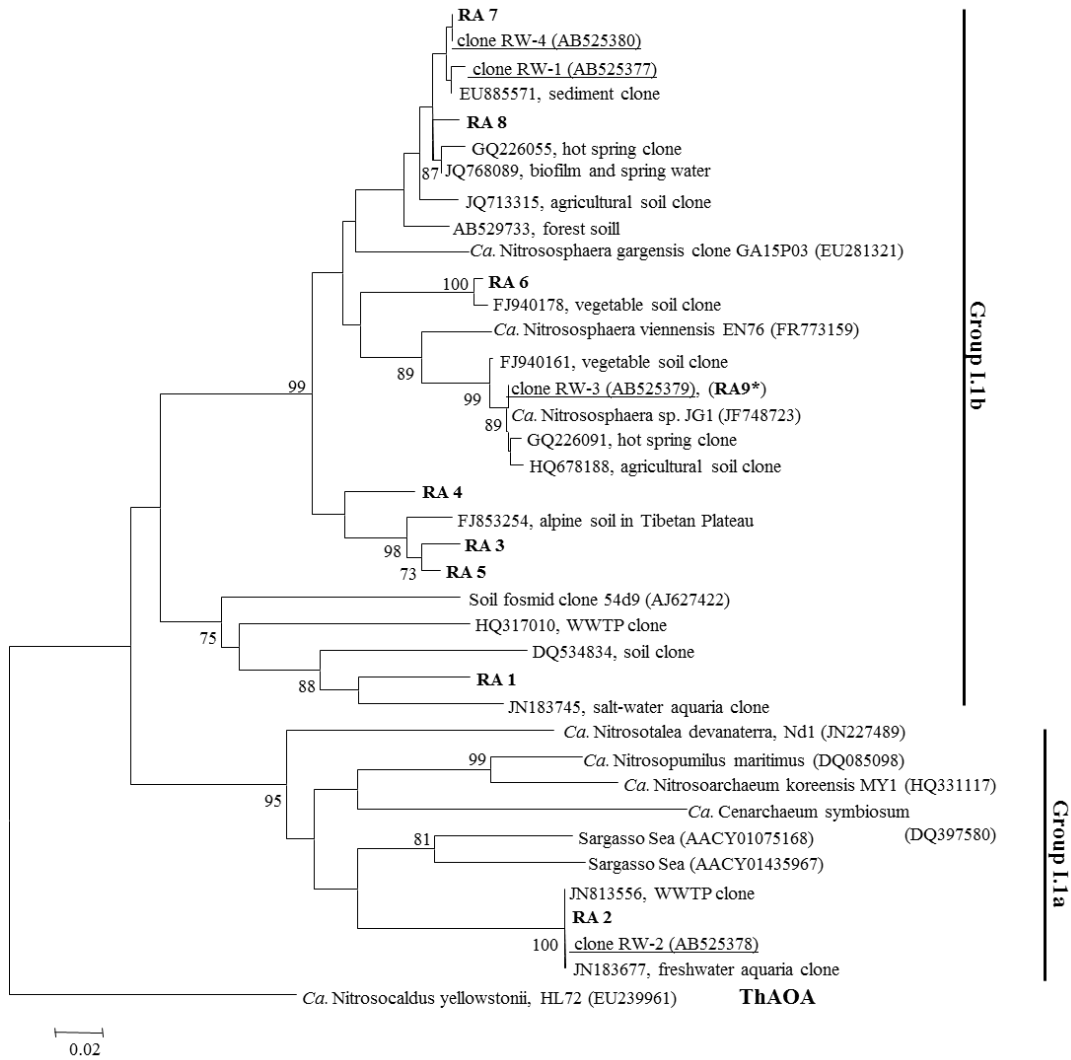


図 4-2-6. アンモニア酸化古細菌の *amoA* 遺伝子の系統樹.

(Yasuda *et al.*, 2013 より引用)

第3節 脱窒菌および一般細菌群集の解析

3-1. 緒言

第1節において、不明窒素消失が見られたが、¹⁵N トレーサー試験ではアナモックス活性は認められなかった。そこで、本節では窒素消失に関わる脱窒菌の群集変化について、*nosZ* 遺伝子をターゲットにして第3章で用いたものと同じプライマーを用いて解析を行った。第3章第1節、第4章第2節で用いた *amoA* 遺伝子に特異的なプライマーは、 β -Proteobacteria に属するアンモニア酸化細菌をターゲットにしたもので、 γ -Proteobacteria に属するアンモニア酸化細菌を検出することはできない。 γ -Proteobacteria に属するアンモニア酸化細菌は海洋などの高塩濃度環境に生息しており (Guo *et al.*, 2013)、淡水環境では通常検出されないが、ラボスケールの Biofilter を用いた試験で、運転日数を経たサンプルで γ -Proteobacteria に属する *Nitrosococcus* 属の *AmoA* のアミノ酸と 76% の相同性を持つ配列が得られており (Sakano and Kerkhof, 1998)、本試験においても、窒素が高濃度に蓄積した環境下で γ -Proteobacteria に属するアンモニア酸化細菌が出現していた可能性が考えられる。脱窒の酵素遺伝子に特異的なプライマーについても、第3章で用いたプライマーでは検出されない脱窒菌の存在が近年明らかにされている (Sanford *et al.*, 2012)。そこで、装置の窒素の動態と硝化・脱窒にかかわる微生物群集を網羅的に解析するため、一般細菌群集の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした次世代シーケンスによる解析を行った。

3-2. 材料および方法

1. PCR-DGGE および次世代シーケンスによる群集解析

第2節と同じ DNA サンプルを用い、脱窒菌群集の変化を、第3章第2節に示した方法で *nosZ* 遺伝子をターゲットとした PCR-DGGE 法で解析した。DGGE 解析で得られたバンドの塩基配列を DDBJ に登録し、LC093891、LC093894-97 のアクセッション番号を取得した。

一般細菌群集の次世代シーケンス用の 16S rRNA 遺伝子の PCR は、V4 領域をターゲットとした 563F/R1-4 (Zhang *et al.*, 2012) を用い、10×PCR Gold Buffer (Applied Biosystems)、各 0.2 mM の dNTP ミックス、1.5 mM の MgCl₂、1.25 U の AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)、200 ng/ μ l の bovine serum albumin、0.6-1.7 ng の鋳型 DNA、各 0.5 μ M のプライマーを含む 50 μ l の反応系で iCycler (Bio-Rad) を用いて行った。PCR 反応条件は 95°C 5 分の熱変性後、95°C 30 秒、56°C 60 秒、72°C 60 秒を 32 サイクル行い、その後 72°C 10 分で伸長反応を行った。

各サンプルにつき 6 本の PCR 産物を混合し、精製キット (QIAGEN) を用いて精製した。次世代シーケンス反応および得られた塩基配列の OTU 解析は、農研機構次世代作物開発研究センターのゲノム解析支援を受け実施した。すなわち、Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Life Technologies) を用い PCR 産物にアダプターを付け、Ion PGM sequencing kit を用い、IonPGM system (Thermo Fisher Scientific)によりシーケンスを行った。150 bp 未満のリードを除き、クオリティスコアの低いリードは Btrim を用いて除去した (Kong, 2011)。Chimera Slayer (Haas *et al.*, 2011) によりキメラ配列を検出し、その後の解析から除いた。OTU 解析および Shannon の多様性指数 H' は QIIME を用いて行った (Caporaso *et al.*, 2010)。各 OTU の代表配列について、RDP pipeline classifier を用いて、分類群の帰属を行った (Wang *et al.*, 2007)。得られたシーケンスリードは DDBJ に登録し、DRA004708 のアクセッション番号を取得した。

2. *nosZ* および 16S rRNA 遺伝子の定量的 PCR

nosZ の定量は MPN-PCR を用いた (Braker *et al.*, 2012)。*nos2F/nosZ2R* (Henry *et al.*, 2006) を用いて、2.5 μ l の 10 \times PCR Gold Buffer (Applied Biosystems)、各 0.2 mM の dNTP ミックス、1.5 mM の $MgCl_2$ 、1.25 U の AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)、鋳型 DNA、各 0.5 μ M のプライマーを含む 25 μ l の反応系で、10 倍希釈系列 3 連で iCycler (Bio-Rad) を用いて行った。PCR 反応条件は 94 $^{\circ}C$ 2 分の熱変性後、94 $^{\circ}C$ 30 秒、60 $^{\circ}C$ 30 秒、72 $^{\circ}C$ 60 秒を 10 サイクルでアニーリング温度を 1 サイクルごとに 0.5 $^{\circ}C$ ずつ下げ、その後 94 $^{\circ}C$ 30 秒、55 $^{\circ}C$ 30 秒、72 $^{\circ}C$ 60 秒を 30 サイクル、その後 72 $^{\circ}C$ 10 分で伸長反応を行った。*Achromobacter denitrificans* (NBRC15125) のゲノム DNA から同じプライマーを用いて増幅した *nosZ* の PCR 産物を精製した後、Fluorescent DNA Quantification Kit (Bio-Rad) で DNA 濃度を測定し、DNA のコピー数を算出したものを用いて、MPN-PCR の反応系の検出限界を評価した (約 6 コピー/ μ l)。

16S rRNA 遺伝子のリアルタイム PCR は、357f/517r (primers p1/p3; Muyzer *et al.*, 1993) を用いた。2 \times iQ SYBR Green Super mix (Bio-Rad)、0.2 μ M の各プライマー、400 ng/ μ l bovine serum albumin、0.2~0.4 ng の鋳型 DNA を含む 12.5 μ l の反応系で、95 $^{\circ}C$ 3 分の熱変性後、95 $^{\circ}C$ 20 秒、55 $^{\circ}C$ 30 秒、72 $^{\circ}C$ 30 秒を 30 サイクル行った。その後 65-95 $^{\circ}C$ まで 10 秒ごとに 0.5 $^{\circ}C$ ずつ上昇させ融解曲線解析を行った。検量線の作成には、*Achromobacter denitrificans* (NBRC15125) の DNA から増幅した 16S rRNA 遺伝子を用いた。検量線の増幅効率 は 94%、 $R^2 > 0.99$ であった。*Achromobacter denitrificans* (NBRC15125) の DNA から増幅した 16S rRNA 遺伝子

に 32 日のサンプル DNA を添加した場合と、添加しなかった場合の値の比較から、約 15% の PCR 反応阻害が認められたため、定量的 PCR で得られた値はすべてのサンプルについて補正係数として 1.18 をかけて補正した。

3-3. 結果および考察

運転期間中の *nosZ* 遺伝子コピー数は、0、32、150、317、436 日でそれぞれ 6.59×10^6 、 5.74×10^7 、 5.18×10^7 、 3.33×10^8 、 1.72×10^8 コピー/g 乾物と変化しており、運転に伴う増加が見られた。16S rRNA 遺伝子コピー数は、それぞれ 2.83×10^9 、 4.02×10^9 、 3.78×10^9 、 1.76×10^9 、 1.64×10^9 コピー/g 乾物であり、運転期間中の全細菌数の変化は少ないと推察された。図 4-3-1 に *nosZ* 遺伝子の増幅産物の DGGE バンドプロファイルおよび主成分分析結果を示した。*nosZ* バンドのプロファイルは運転開始から 32 日の間に大きく変化していた。このとき、*nosZ* のコピー数も増加していたので、運転開始後早い時期に脱窒菌群集の変化が起きたと推察された。その後のバンドプロファイルの変化は少なかった。バンドプロファイルが変化した後特徴的なバンド Z1-4 および循環水に特徴的な Z1-1 は、*Castellaniella defragrans* の *nosZ* 遺伝子配列との相同性が 87% と 94% であった。バンド Z1-3 は *Pseudomonas stutzeri* の *nosZ* 遺伝子配列との相同性が 99% であった (図 4-3-2)。

次世代シーケンスの結果では、11965 の OTU が得られた。細菌菌群集の多様性の変化を OTU 数、Shannon の多様性指数からみた結果を図 4-3-3 に示した。OTU と多様性指数はともに 150 日で最も低くなっているが、多様性指数は運転開始時より増加しており、*nosZ* の DGGE バンドとは異なる変化を示していた。図 4-3-4 に門レベルの細菌菌群集の変化を示した。運転開始時のサンプルは実規模装置から採取したロックウール脱臭担体であるが、Acidobacteria 門の割合が 57.9% と最も高かった。運転に伴い、この割合は 33.8% まで減少したが、常に多数を占めていた。図 4-3-5 に Acidobacteria 門の属レベルの存在割合を示した。属レベルでは、Gp4 と Gp6 がほとんどを占めていたが、これらは土壌サンプルにおいても優占しているグループであり、存在量と pH に相関があることが示されている (Jones *et al.*, 2009)。ゲノム解析と分離された菌の特徴から、Acidobacteria 門に属する細菌は、増殖が遅く、低栄養の環境での炭素や窒素の代謝に寄与していることが示唆されているが (Ward *et al.*, 2009)、ロックウール脱臭担体で多数を占めていた理由は不明である。Proteobacteria 門は 6.6% から 150 日目まで 26.2% まで増加し、その後 18.0% に減少した。運転開始時に他に多数を占めていたのは Chloroflexi 門 (8.7%)、Verrucomicrobia 門 (7.2%) であった。Chloroflexi

門は 150 日には 4.1%まで減少したがその後 23. %まで増加した。Proteobacteria 門の中では、 α グループが最も多かった (2.7~13.6%)。 β グループは 0.2~0.3%であった。

脱窒能あるいは *nosZ* 遺伝子の保有が確認された菌を含む属を文献から抽出し (e. g., Philippot et al., 2007; Jones et al., 2008; Sanford et al., 2012)、存在割合の変化を調べた (表 4-3-1)。その結果、運転開始時に 0.62%であったものが、150 日目に 8.34%に増加していた。その後は 3.84%まで減少した。150 日目の増加に寄与していたのは、 γ -Proteobacteria に属する *Rhodanobacter* 属と α -Proteobacteria に属する *Bradyrhizobium* 属であった。特に *Rhodanobacter* 属が 150 日では 62.8%を占めていた。脱窒能あるいは *nosZ* 遺伝子の保有が確認された菌を含む属の変化は、本章の第 1 節で見た窒素の蓄積量の変化 (図 4-1-4) と対応があるように思われた。一方で、先に示した *nosZ* 遺伝子のコピー数の変化とは異なっていた。本試験で使用した *nosZ* プライマーはこれまでに知られている脱窒菌に特異的なプライマーとしてよく用いられるものであるが、*Rhodanobacter thiooxydans* の *nosZ* 遺伝子とは、1~5 の mismatches の配列を持っている。*nosZ* 遺伝子のコピー数の変化と一致していなかった理由として、プライマーの特異性および増幅効率の違いが影響している可能性が考えられた。第 1 節で調べた脱窒活性は、窒素の消失を説明するに足りる量である。*nosZ* コピー数の変化は窒素消失と必ずしも一致していないが、運転に伴い増加していることから、水循環に伴い脱窒量が増えた可能性が考えられた。水を循環しているためにバイオマスが装置外に出ないで利用されることのほかに、硝酸濃度の増加により、バイオフィーム内での硝酸の利用性があがったことがその理由として考えられる。気相中と液相中のバイオフィーム内の酸素濃度の分布を、マイクロセンサーを用いて解析した結果では、液相中ではバイオフィーム内の酸素濃度が低いという結果が示されている (Zhu et al. 2001)。本試験において、散水頻度が増えたことにより、脱臭担体上の液相部分が増えて、酸素の移動速度が低下する効果があったことも考えられた。水を常時流している Biotrickling filter では、Juhler ら (2009) もアンモニア酸化細菌と従属栄養細菌で酸素の競合が起きていることを示唆しており、バイオフィーム上に液相が存在すると、酸素分圧の低い部位が増えることが予想される。

次世代シーケンスで検出されたアンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌の存在割合の変化を表 4-3-2 に示した。アンモニア酸化細菌は、運転開始から 150 日までは β -Proteobacteria のみであったが、317 日以降、 γ -Proteobacteria の *Nitrosococcus* に帰属された割合が増加していた。16S rRNA 遺伝子コピー数に対する *amoA* コピー数の割合から予想される量と比べると、次世代シーケンス解析で検出された β -Proteobacteria の存在割

合は非常に少なかったが、 β -Proteobacteria の存在割合の変化は第 2 節で調べた *amoA* 遺伝子のコピー数の変化と比較的よく一致していた。317 日から 436 日にかけて $\text{NH}_4^+\text{-N}$ に対して $\text{NO}_3^-\text{-N}$ の蓄積量が増えているが、このとき循環水の窒素濃度は $\text{NO}_3^-\text{-N}$ が 10000 mg/L を超えており、EC が高い環境である。 γ -Proteobacteria への変遷が起こったことで本試験のような高濃度の窒素環境下でアンモニア酸化が維持された可能性が考えられた。16S rRNA 遺伝子で γ -Proteobacteria が検出されるようになったのは 317 日目のサンプル以降であるが、150 から 317 日の間に無機態窒素濃度は 5169 から 15810 mg/L に、また EC は 24.4 から 84.7 mS/cm に増加していた。なお、第 2 節で述べたように、アンモニア酸化古細菌についても 317 日以降に特徴的なバンド RA1 は海水環境から得られたクローンに近縁であったことから、アンモニア酸化細菌と同様にアンモニア酸化古細菌群集も EC の上昇に応じて、耐塩性の菌種への変化が起きており、耐塩性の菌種への変遷が起きる EC 濃度範囲も近いことが推察された。亜硝酸酸化細菌に関しては、一般に知られている *Nitrospira* 属と *Nitrobacter* 属では、*Nitrobacter* 属の存在割合が高かったが、それ以上に高い割合で、近年亜硝酸酸化能が報告された Chloroflexi 門に属する *Nitrolancea* 属 (Sorokin *et al.*, 2014) の存在が示唆された。

表 4-3-1. 脱窒能あるいは*nosZ*遺伝子の保有が確認された菌の属するGenusに帰属されたシークエンスリード数の割合(%)。

Phylum	Genus	脱窒菌の存在が確認された属名の文献		保有脱窒遺伝子		文献		運転日数					
		Jones et al. 2008	Sanford et al. 2012	Sanford et al. 2008	Sanford et al. 2012	0	32	150	317	436			
Actinobacteria	<i>Iamia</i>					Kurahashi et al. 2009		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
Chloroflexi	<i>Sphaerobacter</i>			atypical, <i>nirK</i>				nd	nd	0.00	0.03	0.06	0.06
Firmicutes	<i>Desulfotomaculum</i>			atypical				nd	nd	0.00	0.01	0.00	0.00
Gemmatimonadetes	<i>Gemmatimonas</i>			atypical, <i>nirK</i>				0.22	0.15	0.17	0.19	0.27	0.27
Proteobacteria (α)	<i>Azospirillum</i>		Philippot et al. 2007	typical, <i>nirK</i>	<i>nirS, nosZ</i>			0.01	0.00	0.01	0.03	0.02	0.02
Proteobacteria (α)	<i>Bradyrhizobium</i>		Philippot et al. 2007	typical, <i>nirK</i>	<i>nirK, norB, nosZ</i>			0.14	1.22	2.00	1.79	1.25	1.25
Proteobacteria (α)	<i>Mesorhizobium</i>		Philippot et al. 2007	typical, <i>nirK</i>	<i>nirK</i>			nd	nd	0.00	0.01	0.03	0.03
Proteobacteria (α)	<i>Hyphomicrobium</i>		Philippot et al. 2007	typical, <i>nirK</i>				0.00	nd	nd	0.00	0.01	0.01
Proteobacteria (α)	<i>Rhodopseudomonas</i>		Philippot et al. 2007	typical, <i>nirK</i>	<i>nirK, norB, nosZ</i>			0.04	0.33	0.65	0.36	0.29	0.29
Proteobacteria (α)	<i>Bosea</i>			typical, <i>nirK</i>	<i>nirK, nosZ</i>			0.02	0.03	0.05	0.06	0.04	0.04
Proteobacteria (β)	<i>Bordetella</i>			typical, <i>nirS</i>		Dandie et al. 2007		0.02	0.01	0.04	0.04	0.03	0.03
Proteobacteria (β)	<i>Comamonas</i>		Philippot et al. 2007	nd	<i>nirS or norB</i>			nd	0.01	0.00	0.03	0.00	0.00
Proteobacteria (β)	<i>Oligella</i>		Zumft, 1997					0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
Proteobacteria (β)	<i>Castellaniella</i>							nd	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01
Proteobacteria (γ)	<i>Luteimonas</i>		Philippot et al. 2007					0.01	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02
Proteobacteria (γ)	<i>Rhodanobacter</i>			typical, <i>nirK</i>				0.02	0.70	5.23	3.85	1.78	1.78
Verrucomicrobia	<i>Opitutus</i>			atypical, <i>nirK</i>				0.12	0.07	0.14	0.09	0.01	0.01
	Minor genera*							0.00	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01
		Total (%)						0.62	2.55	8.34	6.54	3.84	3.84

**Brucella*, *Rhodobacter*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Oligotropha*, *Nisaea*, *Hydrogenophaga*, *Ensifer*, *Herbaspirillum*, *Leptospira*, *Desulfotobacterium*. nd; not detected.

(Yasuda et al., 2017b から引用)

表4-3-2. ロックウール脱臭担体のアンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌の存在割合の変化.

	Phylum	Genus	運転日数				
			0	32	150	317	436
アンモニア酸化細菌	Proteobacteria (β)	<i>Nitrosomonas</i>	0.00	0.09	0.03	0.01	0.01
	Proteobacteria (β)	<i>Nitrospira</i>	0.00	nd	0.00	0.01	0.01
	Proteobacteria (γ)	<i>Nitrosococcus</i>	nd	nd	nd	0.94	2.62
	total		0.00	0.09	0.03	0.96	2.64
亜硝酸酸化細菌	Chloroflexi	<i>Nitrolancea</i>	0.01	0.02	0.08	0.26	0.18
	Nitrospirae	<i>Nitrospira</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Proteobacteria (α)	<i>Nitrobacter</i>	0.00	0.03	0.07	0.05	0.02
	Proteobacteria (γ)	<i>Nitrococcus</i>	nd	nd	nd	nd	0.00
	total		0.01	0.05	0.15	0.32	0.2

nd; not detected.

(Yasuda *et al.*, 2017b から引用)

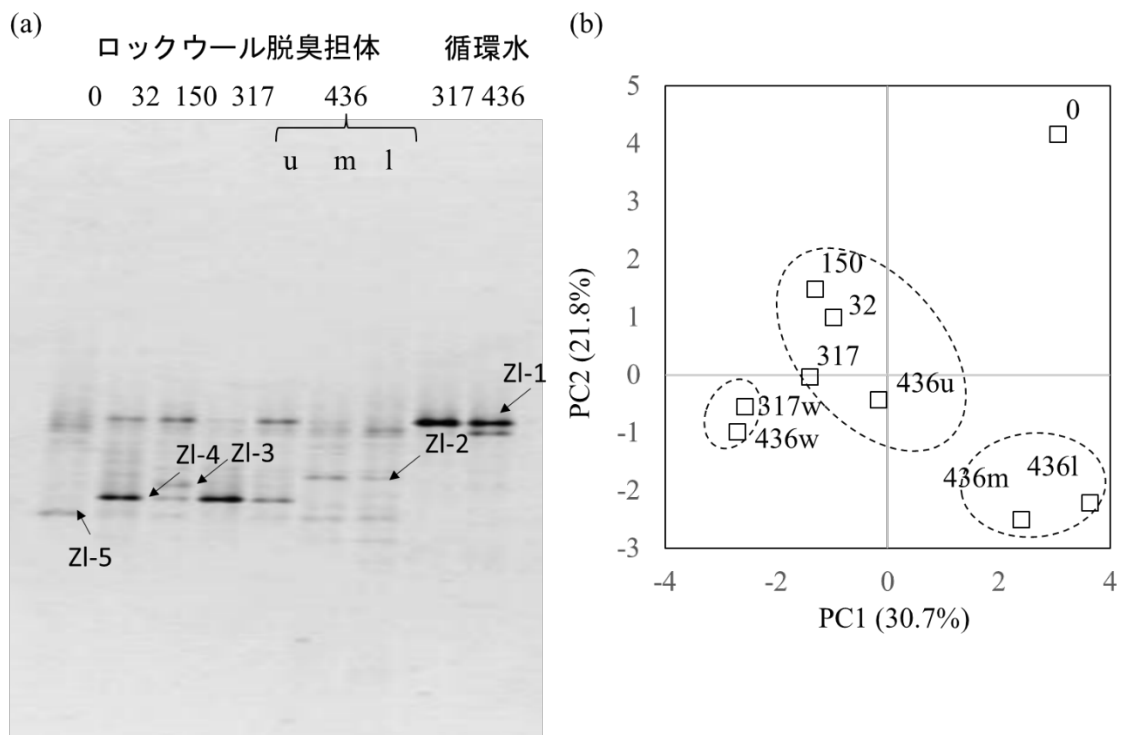


図 4-3-1. 脱窒菌の *nosZ* 遺伝子の増幅産物の DGGE バンドプロファイル (a) と主成分分析結果 (b). (ゲル上および座標上の数字はサンプリング日数、w は循環水、436 日目の u、m、l はそれぞれ表層 1cm、4.5-5.5cm、9-10cm から採取したサンプルを示す) (Yasuda *et al.*, 2017b から引用)

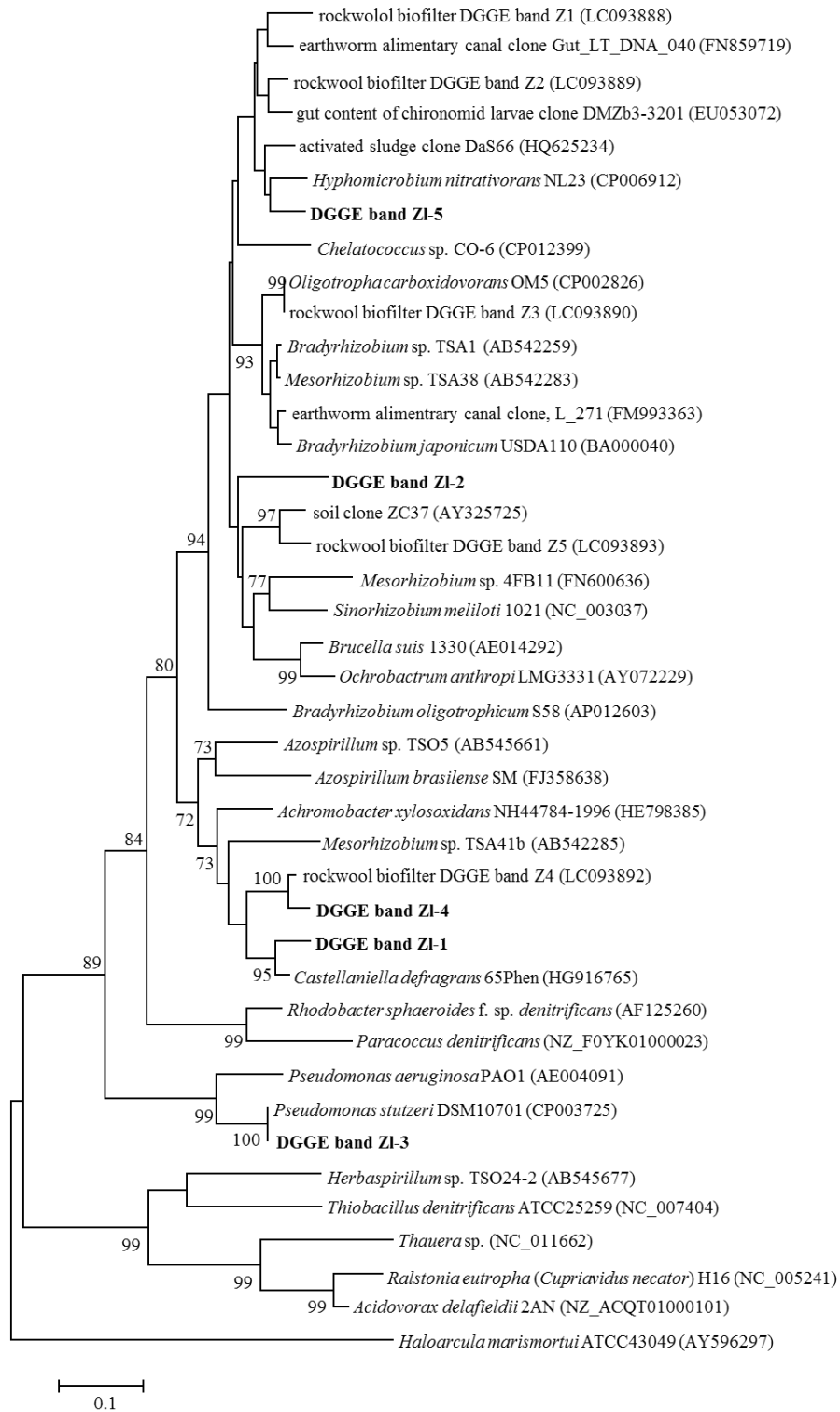


図 4-3-2. 脱窒菌の NosZ 配列の系統樹.

(Yasuda *et al.*, 2017b から引用)

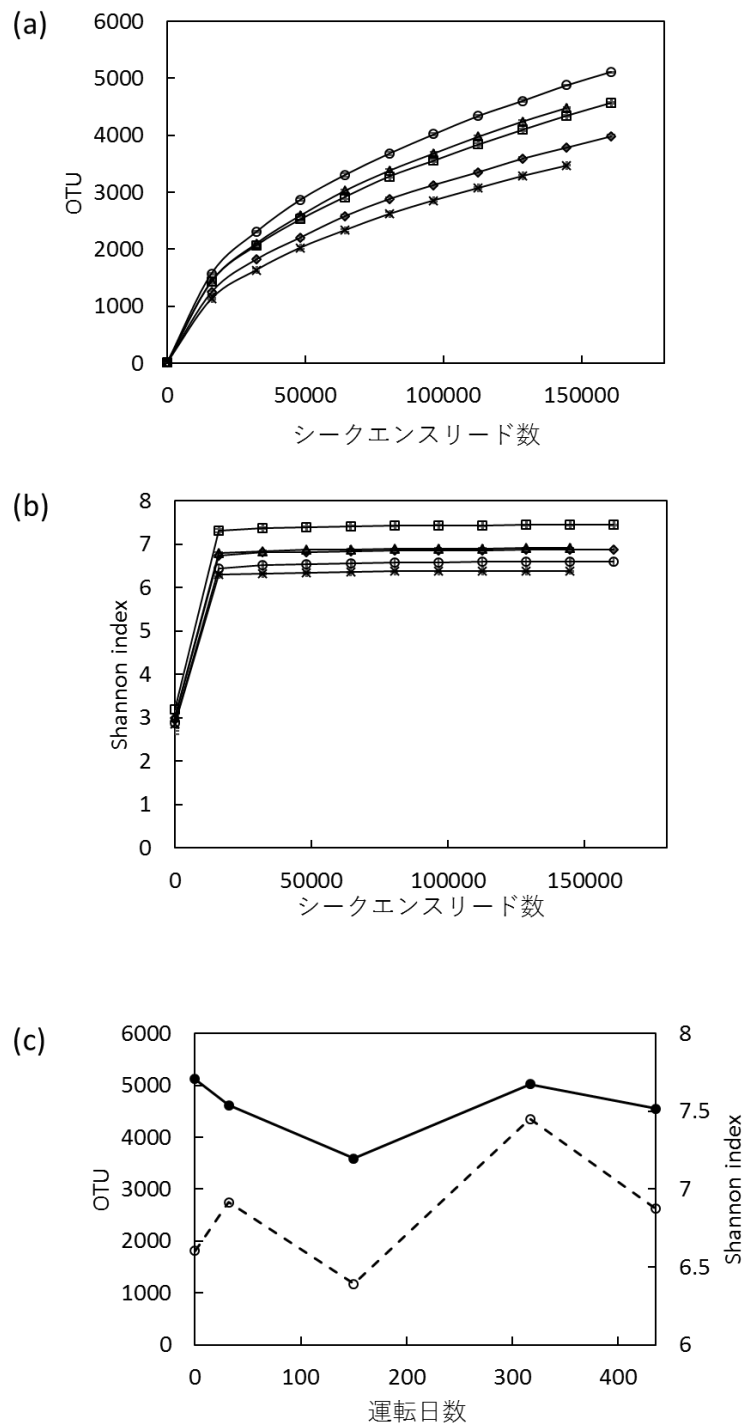


図 4-3-3. 16S rRNA 遺伝子産物の次世代シーケンス解析による細菌群集の多様性の変化。
 (a) OTU についての rarefaction curve、(b) Shannon の多様性指数(○ 0 日、△ 32 日、×
 150 日、□ 317 日、◇ 436 日)、(c) OTU 数(●)と Shannon の多様性指数(○)の変化。(Yasuda
et al., 2017b から引用)

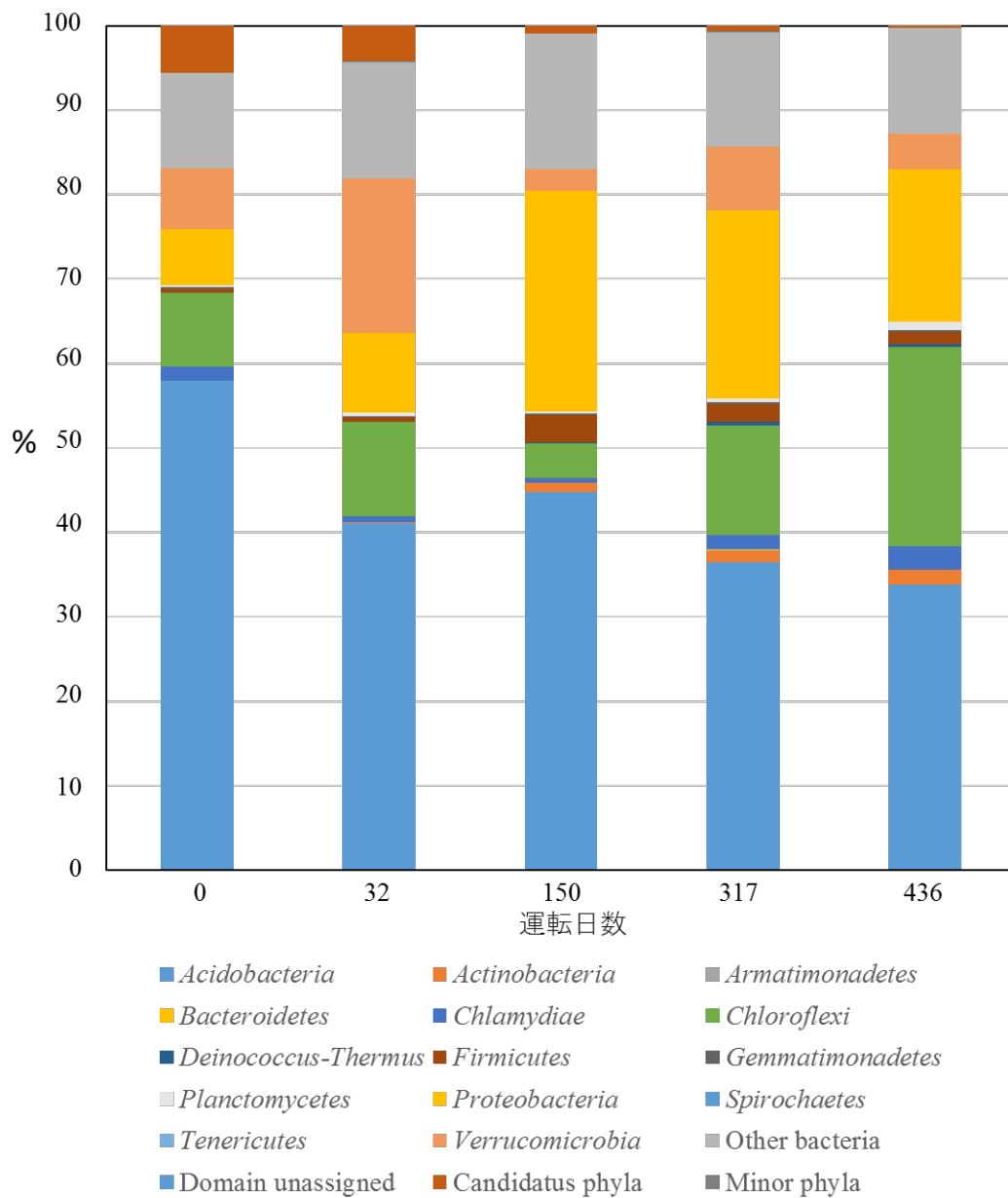


図 4-3-4. 16S rRNA 遺伝子産物の次世代シーケンス解析による門レベルの細菌群集の変化.

(Yasuda *et al.*, 2017b から引用)

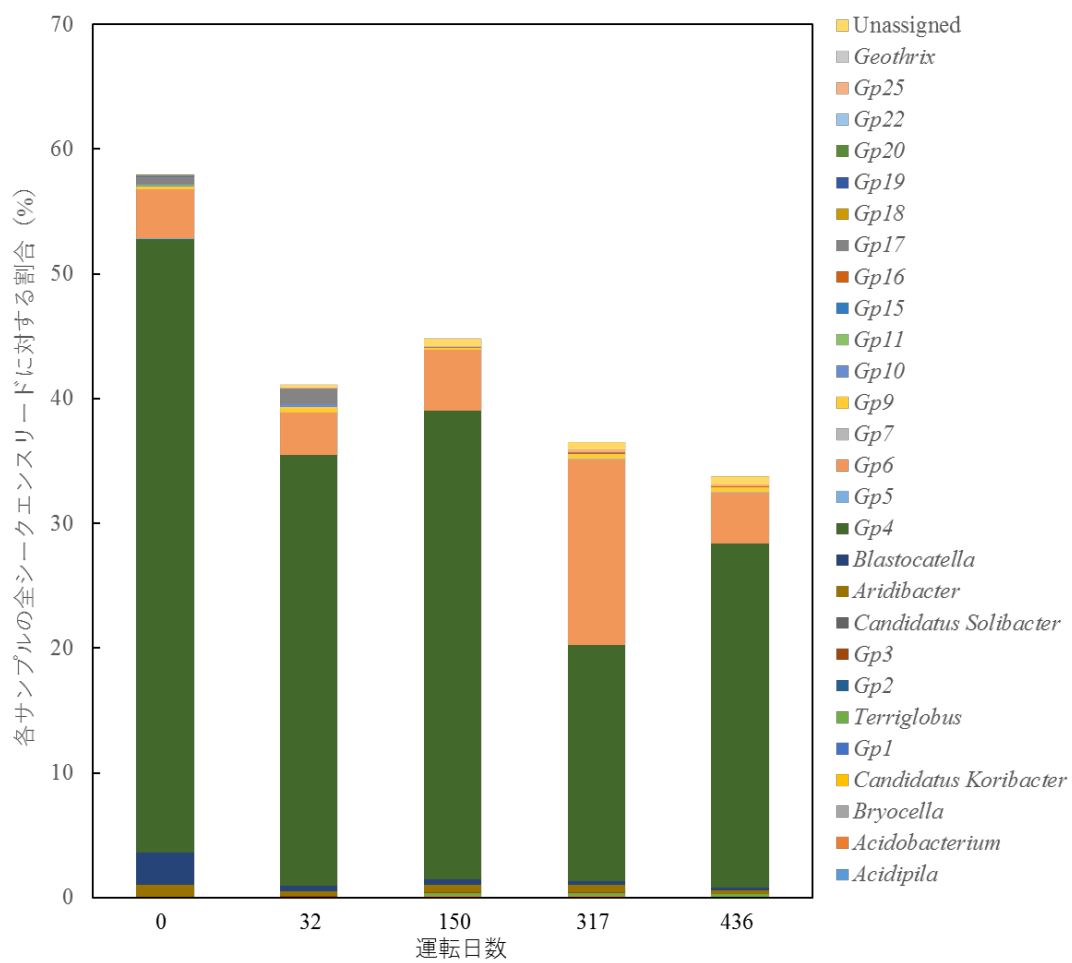


図 4-3-5. Acidobacteria 門における属レベルの存在割合の変化.

(Yasuda *et al.*, 2017b から引用)

第4節 要約

ラボスケールの水循環式ロックウール生物脱臭装置を試作し、脱臭装置内で NH_3 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、 NO_3^- の生成が NH_3 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。

試作した装置を用いて、実規模装置で把握することが困難な窒素マスバランスを精査した。運転期間中に確認された窒素消失は最大 39.1% 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、水循環に伴う脱窒菌の存在量の増加が見られ、水循環の過程で脱窒により窒素の消失が増えることが示唆された。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、FA 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、FA 濃度はアンモニア酸化古細菌の群集にも何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 FA 濃度は低く保たれており、 γ -Proteobacteria に属するアンモニア酸化細菌への変遷が起こり、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 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。

第5章 総合考察

第1節 本研究の位置づけ

本研究は、生物脱臭での NH_3 処理に付随する装置内への塩類の蓄積に対して、脱臭担体の交換を行わず脱臭排水の処理が必要となる場合を念頭に行った。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を理解することが重要であると考えた。

これまでの生物脱臭装置の研究において、ラボスケールの脱臭装置を用いた窒素のマスバランスの解析により、窒素の消失が見られていたが (e. g., Gracian *et al.*, 2002; Malhautier *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005)、脱窒の寄与は明らかにされていなかった。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明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。

第2節 実規模のロックウール生物脱臭装置の窒素除去ポテンシャル

まず、実規模のロックウール生物脱臭装置を対象として、2006年6月のデータを用いて現状の窒素のマスバランスと窒素除去ポテンシャルを試算する。ロックウール脱臭担体の硝化活性ポテンシャルは、 $8.2 \sim 12.2 \text{ mg N}/100\text{g 乾物}/\text{日}$ で、火山灰土壌と同程度であった(福森、1997)。脱臭装置の送風機の風量 ($20\text{m}^3/\text{min} \times 3$ 台)、送風機稼働時間 (23.5 時間/日) と本調査結果による入気ガス中の NH_3 濃度の平均 (32 ppmv) から脱臭装置に流入する $\text{NH}_3\text{-N}$ を試算すると、約 $1.58 \text{ kg}/\text{日}$ であった。一方、ロックウール脱臭担体の硝化活性ポテンシャルは、脱臭担体 (充填容積 116 m^3) の見かけ密度を約 $400 \text{ kg}/\text{m}^3$ (全農 施設・資材部, 1990)、採取した脱臭担体の平均値より水分 47% として計算すると $2.00 \sim 2.98 \text{ kg}/\text{日}$ となった。豚舎臭気を対象とした実規模の Biotrickling filter で、循環水の引き抜きにより減少した NO_x^- と、バイオフィルムの N_2O 生成量から計算した脱窒活性の合計を装置内での硝化活性とし、装置内の硝化活性はポテンシャルの約半分程度であると試算されている (Juhler *et al.*, 2009)。Togashi ら (1986) は、安全を見越して、硝化活性の 70% 程度の負荷を推奨している。本研究で調査したロックウール脱臭担体は、基質濃度が高い箇所で硝化活性ポテンシャルが高い

傾向が見られ、装置内では基質濃度が飽和した環境ではないと推察される。流入 NH_3 濃度や気温の変動などを考慮して、現場では安全を見越して低負荷で運転しており、流入 NH_3 をすべて硝化できるポテンシャルを有すると考えられた。一方、アセチレン阻害法で求めた実規模装置の脱窒活性ポテンシャルは 1.42~4.69 mg N/100g 乾物/日、 ^{15}N トレーサー法で求めた脱窒活性ポテンシャルは 25.4 mg N/100g 乾物/日であった。 ^{15}N トレーサー法では、一晩前培養を行っているので、アセチレン法で求めた値がより現場に近いものと考えられるが、その場合は硝化活性ポテンシャルの約 29%と見積もられた。第 1 章で述べたように、理論的には生物脱臭装置内では流入 NH_3 の 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るので (Joshi *et al.*, 2000; Smet *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005; Ottosen *et al.*, 2011)、アルカリ度を供給することがなければ、それ以上硝化は進まないと考えられる。そこで流入 $\text{NH}_3\text{-N}$ の半分が硝化されると仮定すると、硝化される窒素は約 0.79 kg/日であり、これに対して脱窒活性ポテンシャル (約 0.66 kg/日) は約 16%不足していた。ロックウールには毎日約 0.4 m^3 散水され、蒸発散により排水量は約 0.3 m^3 となる (石橋, 2000)。排水中の窒素濃度を本調査結果の無機態窒素濃度の平均である約 3.1 g/L とすると、一日当たり約 0.93 kg の窒素が排出される計算となる。 N_2O に由来する窒素は NH_3 と同様に計算すると流入量は約 0.47 kg/日、流出量は約 0.43 kg/日となる。流入窒素 (約 1.58 + 約 0.47 kg/日) と排水中および N_2O として排出される窒素 (約 0.93 + 約 0.43 kg/日) の差は約 0.69 kg/日であり、本試験で得られた脱窒活性と同等、もしくは少し上回っていた。流入と流出の差として、脱窒以外に脱臭担体への蓄積および NO , NO_2 などの窒素含有ガスとしての揮散などが考えられる。脱窒活性ポテンシャルは、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ 濃度が高い箇所では活性が高い傾向が見られた。さらに、脱窒反応の過程では、好気条件から嫌気条件へ移行した際に N_2O 還元酵素の発現が遅れることで N_2O が発生すると考えられるため (Stief *et al.*, 2009)、ロックウール脱臭担体のバッチ培養 1 日後に N_2O の発生が見られ、培養日数を伸ばすと N_2O の発生量が減っていたことから、ロックウール脱臭担体に存在する脱窒菌の N_2O 還元酵素の発現が始まるのに時間がかかることを示唆していると考えられた。これらのことをまとめると、調査したロックウール生物脱臭装置では少なくとも流入 $\text{NH}_3\text{-N}$ の半分を硝化できるポテンシャルを持つが、脱窒活性ポテンシャルは硝化された窒素の全量除去するには不足している可能性があり、その理由として、主に装置内では $\text{NO}_3^- \text{-N}$ の利用性が低いこと、および、酸素分圧が高いことにより脱窒活性が抑制されるためと考察された。

第3節 水循環条件下での窒素のマスバランスと窒素除去ポテンシャルの変化

実規模装置を対象とした解析から、現状のロックウール生物脱臭装置の NH_3 容積負荷に対して、実規模装置では硝化活性のポテンシャルは、流入 NH_3 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。しかし、第2節の実規模装置を対象とした窒素のマスバランスの見積もりは送風量、蒸発散量、脱臭担体の見かけ密度について文献値を用いており、調査点数も限られているため、不確実性を多大に含む。また、脱臭担体への蓄積分を評価できておらず、脱窒の寄与を明らかにすることは困難であった。送風量および散水量について制御された環境下でのラボスケールの試験では、窒素のマスバランスをより正確に把握できる。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、第4章において、ラボスケールの装置を用い、水循環運転の場合を想定した試験を行った。32日目に流入 NH_3 の大半は脱臭材料に保持されていたが、その後、脱臭材料に約50%、循環水中に約10%の窒素が含まれた。運転32日目では窒素の消失がほとんど見られなかったが、脱臭担体の持ち込み分に流入 $\text{NH}_3\text{-N}$ を含めた窒素量を100%とすると、150日目以降に29.6~39.1%の窒素の消失が見られた。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39%であると考えられた。不明窒素分がすべて脱窒されたと仮定して、脱窒量を見積もったところ、150日では0.07 mg N/g/日、317日では0.08 mg N/g/日、436日では0.003 mg N/g/日であった。一方、 $^{29}\text{N}_2$ と $^{30}\text{N}_2$ の生成量から算出した脱窒活性ポテンシャルは150日、317日でそれぞれ0.12、0.11 mg N/g/日であったので、不明窒素分を説明できるだけの脱窒活性ポテンシャルを有すると考えられた。但し、この試験ではアナモックス活性の寄与を同時に評価するためにサンプルを遠心分離により無機塩培地で洗った後、一晩前培養を行った上で活性を評価している。流入 $\text{NH}_3\text{-N}$ は運転期間を通じて34~39 mg/日で、脱窒ポテンシャルによる消失は、乾物重から150日、317日ではそれぞれ14.7、15.7 mg/日となり、流入 $\text{NH}_3\text{-N}$ の約40%と見積もられた。水循環中の担体の水分は59%であり、実規模装置と比較して増加しており、担体内の水分量が10%近く増加していた。バイオマスの流出がないこと、 $\text{NO}_3^- \text{-N}$ の蓄積により利用性が上がったこと、液相分が増えたことなどから、実規模装置の運転条件下よりも水循環により脱窒の寄与が増加している可能性が考えられた。32日で窒素消失が見られなかった理由は今のところはっきりしないが、Gilbert ら (2008) は、豚糞の希釈液を処理する Biofilter で硝化活性が先に現れ、嫌気部分の構築に時間を有し、脱窒活性が現れるのに30日以上を有することを示している。ロックウール脱臭担体でも32日目には *amoA* 遺伝子コピー数が増加しており、その後150日にかけて減少しており、脱窒活性がその後現れた

可能性が考えられた。本試験の窒素の動態解析では、酸化物である NO 、 NO_2 を把握できていない。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、今後もこれらのガス態も含め、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。

第4節 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

実規模装置内で硝化・脱窒を担う微生物群集に関して、図 5-4-1 に、本研究の結果から推定される微生物メカニズムをまとめた。

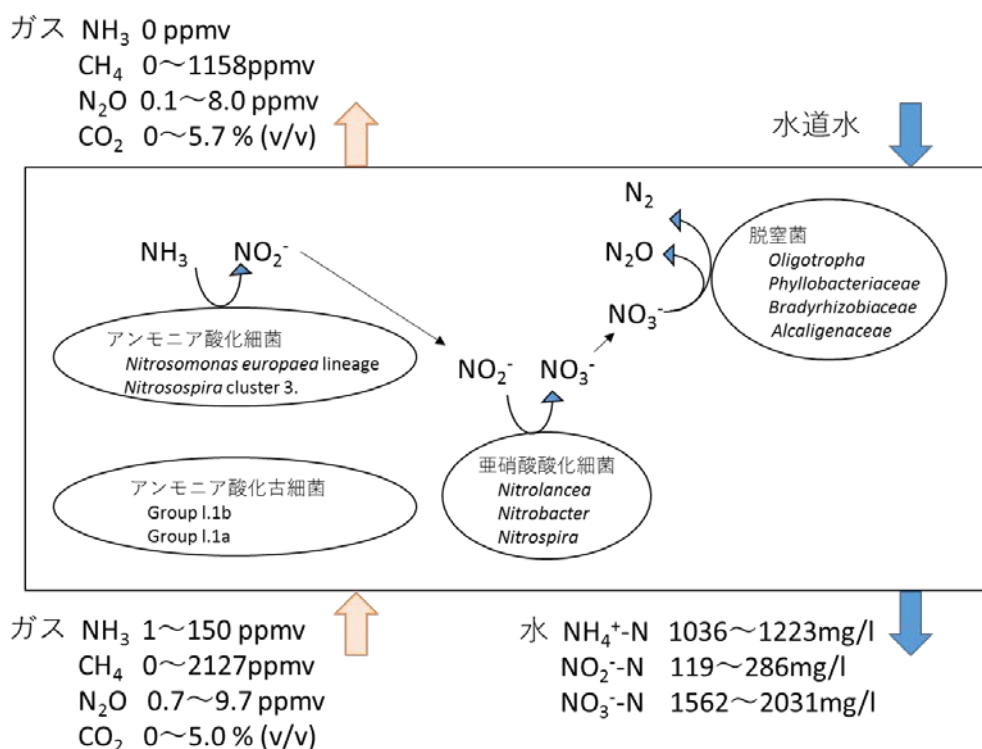


図 5-4-1. 実規模ロックウール脱臭装置内の NH_3 分解に関わる微生物メカニズムの推定
 (水循環なし)

ロックウール生物脱臭装置内には β -Proteobacteria に属するアンモニア酸化細菌の他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、 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由来の遺伝子に相同性の高い配列が得られた。さらに

Oligotropha carboxidovorans に 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、微好気環境を好む脱窒菌の存在が示唆され、脱臭担体のバイオフィーム内の酸素分圧が高いことを支持する結果であると考えられた。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 NO_3^- -N 濃度が影響していることが予想された。

γ -Proteobacteria に属するアンモニア酸化細菌の 16S rRNA 遺伝子は実規模装置から採取した担体からは検出されなかったが、水循環運転を行ったラボスケールの装置で EC が 24.4 から 84.7 mS/cm に徐々に上昇していく過程で出現した。第 4 章第 1 節でみたように、このときの EC の 9 割以上は無機態窒素濃度で説明できると考えられた。通常 γ -Proteobacteria に属する *Nitrosococcus* 属のアンモニア酸化細菌は海水環境下でのみ検出されると考えられているが (Klotz *et al.*, 2006)、 NH_3 を処理する Biofilter から、推定アミノ酸配列が γ -Proteobacteria に属するアンモニア酸化細菌の *AmoA* と 76% の相同性を持つ *amoA* 遺伝子が検出されている (Sakano and Kerkhof, 1998)。排水を出さないタイプのラボスケールの Biofilter においても担体内への無機態窒素の蓄積が示されている (Jun and Wenfeng, 2009)。生物脱臭装置は淡水環境であるものの、無機態窒素が蓄積した際に、海水環境に生息する 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が考えられた。一方、アンモニア酸化古細菌は、これまで脱臭装置内での報告はなかったが、本研究の結果では、水循環運転を行ったラボスケールの試験で EC が上昇し、pH が低下した際にアンモニア酸化古細菌の *amoA* 遺伝子の DGGE プロファイルの変化が見られ、こうした装置内環境の変化に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。

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 に属する *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。亜硝酸酸化細菌についても *Nitrolancea* 属の存在が示唆され、窒素負荷が高い脱臭環境下での亜硝酸酸化反応を理解する上で重要な知見が得られた。図 5-4-2 に、本研究の結果から推定される窒素蓄積環境下での NH_3 分解に関わる微生物群集の変化をまとめた。

NH_3 の処理は、微生物分解が律速となっていることが示されており (Cabrol *et al.*, 2012)、装置の運転制御に対して、 NH_3 分解を担う微生物の種類や数がどのように変化するかといったことを理解することは NH_3 除去を維持するうえで重要となる。アンモニア酸化、亜硝酸酸化、

脱窒の各反応について、これまで脱臭装置内での活性が確認されていない複数の微生物種の関与が示された。環境中で実際に機能している微生物種を特定する手法としては、酵素遺伝子の発現量を調べる方法や (Watanabe *et al.*, 2009; Pastorelli *et al.*, 2011)、安定同位体で標識した基質の資化を調べる方法があり (Murase and Frenzel, 2007; Kristiansen *et al.*, 2011a)、このような手法を適用し脱臭装置内で実際に機能しているかを検証する必要がある。また、本研究に用いた手法は、既に知られている微生物種をターゲットとしている。未だその存在が知られていない微生物種が生物脱臭装置内で硝化・脱窒反応に関与している可能性も否定できない。

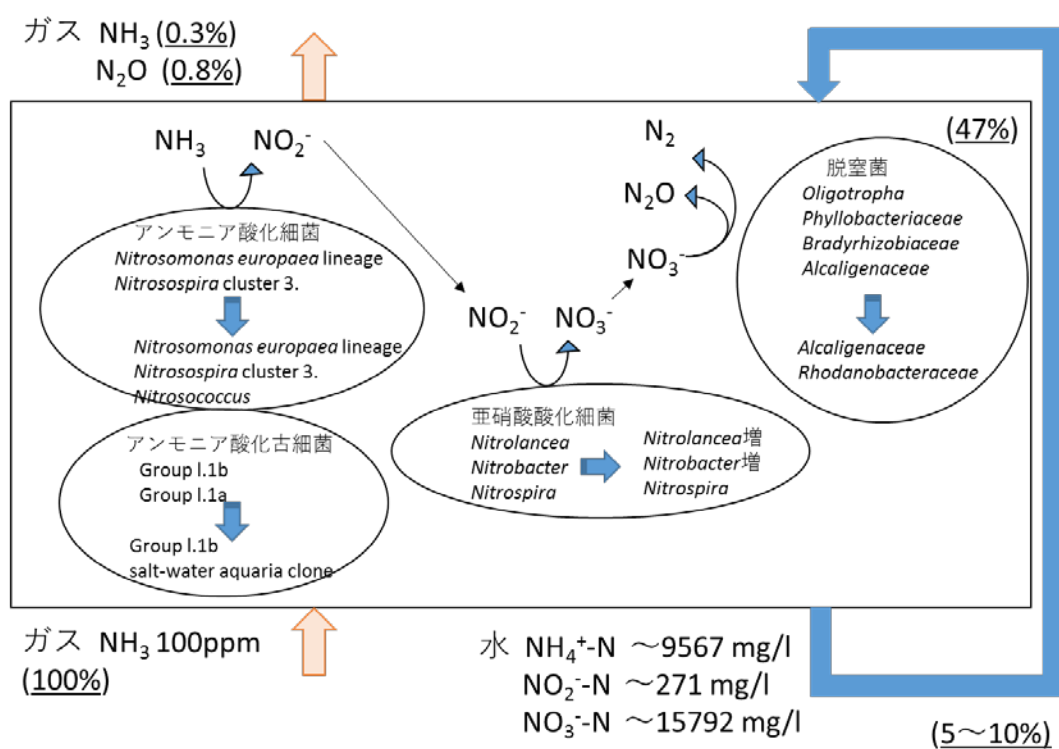


図 5-4-2. 窒素蓄積環境下での NH_3 分解に関わる微生物群集の変化

第 5 節 残された課題

生物脱臭技術の高度化の一つとして、高濃度 NH_3 への対応 (NH_3 許容容積負荷を上げること) が目標となっている (e.g., Kawase *et al.*, 2014; Blázquez *et al.*, 2017)。第 4 章の結果では、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の形態であればアンモニア酸化活性が維持できることが示唆され、気液接触の向上により NH_3 負荷を上げることは可能であると予想される。一方で、装置内のアンモニア

酸化能と同時に脱窒能を上げない限り、高濃度の窒素含有水を発生させることになり、水処理の負担がより大きくなる。窒素除去ポテンシャルはアルカリ度を添加しないかぎり現状では50%であるので、残存 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の除去率を上げるためにアナモックス菌の利用は有用であると考えられた。De Clippeleir ら (2012) は污水处理装置由来のアンモニア酸化細菌とアナモックス菌のグラニューールを NH_3 の Biofilter に適用し、その可能性と同時に、亜硝酸酸化細菌との競合が起きるため、アナモックス反応を持続するために精密な運転条件のコントロールが必要なことを示している。現状のロックウール脱臭担体はアナモックス菌が自生する環境ではなく、亜硝酸酸化細菌のみならず、実規模装置においては従属栄養細菌との競合が大きな課題となることが予想された。脱臭装置内での溶存酸素および窒素濃度を制御し、アナモックス反応を生かした装置の開発が今後の課題となるであろう。本研究の結果、硝化と脱窒に関わる微生物群集が装置内の環境に応答して変化していること、また、その変化の様相が微生物種により異なることが明らかとなった。アンモニアの除去性能のみを見てはわからない微生物叢の水面下での変化は、生物脱臭装置内では微生物叢は一定ではなく、装置に新たな機能を付与する際には、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を示しており、脱臭技術の高度化において重要な示唆を与えるものと期待される。

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。¹⁵N 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、¹⁴NH₄ と ¹⁵NO₃ 添加区で ²⁹N₂ 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 *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、 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、¹⁵N 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 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、 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。

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、 β -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、 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、 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。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。

Summary

1. Introduction

In livestock farms, biological deodorization facilities are often used to treat ammonia-loaded gases emitted from the livestock composting process because of its high elimination efficiency, low operational cost, and modest environmental impact. With biofiltration system, ammonia removal is achieved partly by absorption and partly by nitrification; that is, theoretically half of the incoming ammonia is converted to nitrite or nitrate by nitrifying microorganisms and the other half is absorbed into water as ammonium in order to achieve an ion balance. The accumulation of nitrogen in the biofiltration system causes the deterioration of ammonia removal performance and increases the treatment cost of percolating effluent water because the effluent water cannot be discarded without further wastewater treatment in many cases. On the other hand, nitrogen losses in biofilters have often been reported previously. For example, nitrogen loss amounted to 22-35% of the inlet nitrogen in biofilters packed with sludge or compost. Enhancing nitrogen removal from the biofiltration process helps to avoid the above-mentioned problems relating to ammonia removal in the biofiltration system. However, nitrogen removal is incomplete and has to be optimized. Nitrification plays an important role in long-term effective ammonia removal, and denitrification could contribute to the nitrogen losses and affect nitrogen balance in the biofiltration system. The relationship between ammonia removal and the diversity of ammonia-oxidizing microorganisms in the biofiltration system has not been clearly demonstrated. Furthermore, few studies have examined the denitrifying bacterial community and relationships between these microbes and the nitrogen loss in gas purification systems, probably because a biofilter is generally considered to be a strongly aerobic ecosystem.

In this study, ammonia removal by a full-scale biofilter with rockwool packing material treating waste gas from livestock manure composting was evaluated. Nitrification and denitrification activities, and their community structure were examined in order to investigate the relationship between the activity and community structure of microbes in a full-scale rockwool biofilter. In addition, a laboratory-scale biofilter with intermittent water recirculation was used to

investigate the relationships between the community structure of microbes responsible for ammonia oxidation and denitrification and nitrogen loss because it is difficult to estimate nitrogen balance of the full-scale reactor. Water circulation types of biofiltration systems are often used for the purpose of minimizing wastewater volume in livestock industry.

2. Evaluation of a full-scale rockwool biofilter for compost waste-gas treatment

Rockwool is a manufactured mineral fiber produced from igneous rocks and a biofilter packed with a mixture of rockwool, urethane, zeolite, dried chicken feces, and rice husks has been developed as a replacement of soil biofilter. Ammonia removal by a full-scale biofilter was studied by measuring the gases and potential nitrification and denitrification activities of those materials. The rockwool biofilter was a durable and effective system for removing ammonia, which was varied with the turning of manure composts. Furthermore, ammonia could be treated in the absence of an extra increase in two greenhouse gases, nitrous oxide and methane. Nitrous oxide was continuously emitted during the composting process whereas methane was emitted much more than at the initial composting. The results of an estimation of potential nitrification and denitrification activities of the packing material suggested that the potential nitrification and denitrification activities would increase in the biofilter where substrates, ammonia or nitrate, have accumulated as a result of its operation. As for denitrification, anoxic batch incubation with ^{15}N -labeled nitrate in the presence of different electron donors (compost extract, ammonium, hydrogen sulfide, propionate, and acetate) showed that potential denitrification activity for the rockwool samples was higher with added compost extract than with others. Since percolate water contained high concentrations of ammonium and nitrate, further improvement is required by reducing nitrogenous compounds within both the biofilter and percolate water. The potential nitrification activity was estimated to be sufficient to oxidize at least the half of incoming ammonia. On the other hand, the potential denitrification activity was considered to be deficient in the complete removal of the nitrified nitrogen in the biofilter.

3. Characterization of the microbial community associated with ammonia oxidation and denitrification in the full-scale rockwool biofilter

The relationship between the activity and community structure of microbes associated with the oxidation of ammonia in a full-scale rockwool biofilter was examined by kinetic, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), and sequence analyses. Estimated K_m values were similar among depths at the same sampling sites and also tended to increase in the order of the site exposed to gas emitted from the initial stages of the composting process through the site exposed to gas from the later stages of the composting process. The lower depth of the mid-point site had the highest V_{max} . A correspondence analysis showed the DGGE profile of *amoA* of beta-proteobacterial ammonia-oxidizing bacteria of the lower depth of the mid-point sample to be distinguishable from the others. The results suggested an association between the ammonia-oxidizing bacterial community's composition and ammonia oxidation kinetics in samples. Sequence analysis indicated that the ammonia-oxidizing bacterial community mainly belonged to the *Nitrosomonas europaea* lineage and *Nitrosospira* cluster 3. The ammonia-oxidizing archaeal *amoA*-like sequences were related to those belonging to soil and sediment groups, including one with 84% nucleotide similarity with *Nitrosopumilus maritimus*.

DGGE analysis targeting genes encoding denitrifying enzymes, *nirK*, *nirS*, and *nosZ* genes, indicated that the distribution of *nir* genes was spread in a vertical direction and the distribution of *nosZ* genes was spread horizontally within the biofilter. The corresponding denitrifying enzymes were mainly related to those from Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae, and Alcaligenaceae bacteria and to environmental clones retrieved from agricultural soil, activated sludge, freshwater environments, and guts of earthworms or other invertebrates. Some *nirK* fragments were related to *nirK* from micro-aerobic environments. Changes in the types of composting facilities may also affect the microbial consortia in biofiltration system.

4. Responses of community structure of total bacteria and that of microbes responsible for ammonia oxidation, denitrification during nitrogen accumulation in an

ammonia-loaded biofilter

A laboratory-scale biofilter with rockwool mixtures was operated with an ammonia loading rate of 49–63 g per m³ per day. The ammonia oxidizing archaeal and bacterial communities were investigated by PCR-DGGE, sequencing and real-time PCR analysis based on *amoA* genes. The results indicated that changes in abundance and community compositions occurred in a different manner between archaeal and bacterial *amoA* during the operation. However, both microbial community structures mainly varied when free ammonia concentrations in circulation water were increasing, which caused a temporal decline in reactor performance. Dominant *amoA* sequences after this transition were related to Thaumarchaeotal Group I.1b, *Nitrosomonas europaea* lineages and one subcluster within *Nitrosospira* sp. cluster 3, for archaea and bacteria, respectively.

Approximately 29.6–39.1% of the inlet nitrogen was unrecovered after day 150. Based on a batchwise ¹⁵N tracer experiment for the examination of the presence of anammox and denitrification activity in the packing material, the unknown nitrogen was considered to be mainly denitrified. The *nosZ* gene abundance increased over the 436 days of operation. The *nosZ* sequences associated with the genera *Castellaniella*, *Hyphomicrobium* and *Pseudomonas* were detected. Metabarcoding sequencing analysis indicated that the proportions of the genera for which at least one denitrifying strain or species possessing *nosZ* had been characterized corresponded well to the nitrogen loss. In addition, the genus *Nitrosococcus* (gamma proteobacteria) increased its relative abundance at days 316 and 436, when electron conductivity gradually increased from 24.4 to 84.7 mS per cm. This bacterial group could also contribute to ammonia oxidization during the later period of reactor operation.

5. Conclusion

From the analysis of the full-scale rockwool biofilter, the potential nitrification activity was estimated to be sufficient to oxidize the inlet ammonia during the sampling period and more ammonia was also removed by absorption into the water. The results obtained in this study suggest that denitrification could occur within the biofilter

under the appropriate conditions. Substrate concentrations for both nitrification and denitrification are not saturated. Denitrification in the full-scale rockwool biofilter might be depressed by both the substrate availability and intense aeration. The nitrogen removal potential could be up to 39% in the laboratory-scale biofilter with intermittent water recirculation. It was estimated that approximately 40% of the inlet nitrogen was removed via denitrification at the maximum. The results of this study also revealed the adaptation of microbes to the environmental changes, especially the gradual accumulation of nitrogenous compounds. As for nitrification, a shift from beta proteobacterial ammonia oxidizing bacteria to gamma proteobacterial ammonia oxidizing bacteria were noted. This bacterial community shift reflected adaptation to the surrounding environment and functional redundancy in the reactor. The findings of this study improve our understanding of the microbial fluctuations and complex behavior of nitrifiers and denitrifiers within the ammonia-loaded biofiltration system. These results will help us to better control the nitrogen balance.

引用文献

Akiyama H., Morimoto S., Tago K., Hoshino Y. T., Nagaoka K., Yamasaki M., Karasawa T., Takenaka M., Hayatsu M. (2014) Relationships between ammonia oxidizers and N₂O and CH₄ fluxes in agricultural fields with different soil types. Soil Science and Plant Nutrition 60:520-529.

- Andres Y., Dumont E., Gerente C. (2009) Characterization techniques of packing material colonization in gas biofiltration processes. Canadian Journal of Civil Engineering 36:1895-1902.
- Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasam T.B.S., Srinath E.G. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. Journal (Water Pollution Control Federation) 48:835-852.
- APHA (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edn. American Public Health Association, Washington, DC.
- Avrahami S., Liesack W., Conrad R. (2003) Effects of temperature and fertilizer on activity and community structure of soil ammonia oxidizers. Environmental Microbiology 5:691-705.
- Bae W., Baek S., Chung J., Lee Y. (2002) Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactors. Biodegradation 12:359-366.
- Baquerizo G., Maestre J.P., Sakuma T., Deshusses M.A., Gamisans X., Gabriel D., Lafuente J. (2005) A detailed model of a biofilter for ammonia removal: model parameters analysis and model validation. Chemical Engineering Journal 113:205-214.
- Baquerizo G., Maestre J.P., Machado V.C., Gamisans X., Gabriel D. (2009) Long-term ammonia removal in a coconut fiber-packed biofilter: analysis of N fractionation and reactor performance under steady-state and transient conditions. Water Research 43:2293-2301.
- Barbusinski K., Kalembe K., Kasperczyk D., Urbaniec K., Kozik V. (2017) Biological methods for odor treatment — A review. Journal of Cleaner Production 152:223-241.
- Belser L.W. (1979) Population ecology of nitrifying bacteria. Annual Review of Microbiology 33:309-333.
- Blázquez E., Bezerra T., Lafuente J., Gabriel D. (2017) Performance, limitations and microbial diversity of a biotrickling filter for the treatment of high loads of ammonia. Chemical Engineering Journal 331:91-99.
- Braker G., Conrad R. (2011) Ch.2 Diversity, structure, and size of N₂O-producing microbial communities in soils—What matters for their functioning? Advances in

Applied Microbiology 75:33-70.

- Braker G., Dörsch P., Bakken L.R. (2012) Genetic characterization of denitrifier communities with contrasting intrinsic functional traits. FEMS Microbiology Ecology 79:542-554.
- Cabrol L., Malhautier L. Poly F., Le Roux X., Lepeuple A. S., Fanlo J.L. (2012) Resistance and resilience of removal efficiency and bacterial community structure of gas biofilters exposed to repeated shock loads. Bioresource Technology 123:548-557.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunencko T., Zaneveld J. Knight R. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature Methods 7:335-336.
- Chen Y.X., Yin J., Wang K.X. (2005) Long-term operation of biofilters for biological removal of ammonia. Chemosphere 58:1023-1030.
- 畜産環境整備機構 (1998) 家畜ふん尿処理・利用の手引き. 畜産環境整備機構. 東京. pp202.
- Choi J.H., Kim Y.H., Joo D.J., Choi S.J., Ha T.W., Lee D.H., Park I.H., Jeong Y.S. (2003) Removal of ammonia by biofilters: a study with flow-modified system and kinetics. Journal of the Air and Waste Management Association 53:92-101.
- Clemens J., Cuhls C. (2003) Greenhouse gas emissions from mechanical and biological waste treatment of municipal waste. Environmental Technology 24:745-754.
- Conrad R. (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). Microbiological Reviews 60:609-640.
- Costa C., Dijkema C., Friedrich M., García-Encina P., Fernández-Polance F., Stams A. J.M. (2000) Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors. Applied Microbiology and Biotechnology 53:754-762.
- Dalton H. (1977) Ammonia oxidation by the methane oxidising bacterium *Methylococcus capsulatus* strain bath. Archives of Microbiology 114:273-279.
- Dandie C.E., Burton D.L., Zebarth B.J., Trevors J.T., Goyer C. (2007) Analysis of denitrification genes and comparison of *nosZ*, *cnorB* and 16S rDNA from culturable

- denitrifying bacteria in potato cropping systems. Systematic and Applied Microbiology 30:128-138.
- De Clippeleir H., Courtens E., Mosquera M., Vlaeminck S.E., Smets B.F., Boon N., Verstraete W. (2012) Efficient total nitrogen removal in an ammonia gas biofilter through high-rate OLAND. Environmental Science and Technology 46:8826-8833.
- Devanny J.S., Ramesh J. (2005) A phenomenological review of biofilter models. Chemical Engineering Journal 113:187-196.
- 道宗直昭 (2014) 畜産におけるこれからの脱臭技術の考え方ーわが国の畜産に適した臭気対策をー 畜産コンサルタント 50:12-16.
- Dumont E., Lagadec S., Landrain P., Landrain B., Andrès Y. (2014) N₂O generation resulting from piggery air biofiltration. Chemical Engineering Journal 248:337-341.
- Enwall K., Philippot L., Hallin S. (2005) Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. Applied and Environmental Microbiology 71:8335-8343.
- Erguder T.H., Boon N., Wittebolle L., Marzorati M., Verstraete W. (2009) Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing archaea. FEMS Microbiology Reviews 33:855-869.
- Finkmann W., Altendorf K., Stackebrandt E., Lipski A. (2000) Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50:273-282.
- Francis C.A., Roberts K.J., Beman J.M., Santoro A.E., Oakley B.B. (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 102:14683-14688.
- Friedrich U., Prior K., Altendorf K., Lipski A. (2002) High bacterial diversity of a waste gas-degrading community in an industrial biofilter as shown by a 16S rDNA clone library. Environmental Microbiology 4:721-734.
- 福森 功 (1997) 第7章 生物脱臭法、第2節 土壌脱臭法. 最新 防脱臭技術集成 (監修

- 石黒辰吉). (株) エヌ・ティー・エス、東京. pp. 371-384.
- 福森 功・道宗直昭 (1984) 土壌脱臭法の研究と応用. 農業機械化研究所研究成績 58-1. pp. 1-101.
- Fukumoto Y., Osada T., Hanajima D., Haga K. (2003) Patterns and quantities of NH₃, N₂O and CH₄ emissions during swine manure composting without forced aeration—effect of compost pile scale. Bioresource Technology 89:109-114.
- Fülöp V., Moir J.W.B., Ferguson S.J., Hajdu J. (1995) The anatomy of a bifunctional enzyme: structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome *cd₁*. Cell 81:369-377.
- Gilbert Y., Le Bihan Y., Aubry G., Veillette M., Duchaine C., Lessard P. (2008) Microbiological and molecular characterization of denitrification in biofilters treating pig manure. Bioresource Technology 99:4495-4502.
- Gracian C., Malhautier L., Fanlo J.L., Le Cloirec P. (2002) Biofiltration of air loaded with ammonia by granulated sludge. Environmental Progress 21:237-245.
- Green S. J., Prakash O., Gihring T. M., Akob D. M., Jasrotia P., Jardine P. M., Watson D. B., Brown S. D., Palumbo A. V., Kostka J. E. (2010) Denitrifying bacteria isolated from terrestrial subsurface sediments exposed to mixed-waste contamination. Applied and Environmental Microbiology 76:3244-3254.
- Gumaelius L., Magnusson G., Pettersson B., Dalhammar G. (2001) *Comamonas denitrificans* sp. nov., and efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51:999-1006.
- Guo J., Peng Y., Wang S., Ma B., Ge S., Wang Z., Huang H., Zhang J., Zhang L. (2013) Pathways and organisms involved in ammonia oxidation and nitrous oxide emission. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 43:2213-2296.
- Haas B. J., Gevers D., Earl A. M., Feldgarden M., Ward D. V., Giannoukos G., Ciulla D., Tabbaa D., Highlander S. K., Sodergren E., Methé B., DeSantis T. Z. The human microbiome consortium, Petrosino J. F., Knight R. Birren B. W. (2011) Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. Genome Research 21:494-504.
- Haga K. (1998) Animal waste problems and their solution from the technological point

- of view in Japan. Japan Agricultural Research Quarterly 32:203-210.
- 濱戸もえぎ・川畑茂樹・佐藤直人 (2003) ロックウール脱臭装置排水のオーチャードグラスに対する液肥施用効果. 東北農業研究 56:107-108.
- Hartmann D. L., Klein Tank A. M. G., Rusticucci M., Alexander L. V., Brönnimann S., Charabi Y., Dentener F. J., Dlugokencky E. J., Easterling D. R., Kaplan A., Soden B. J., Thorne P. W., Wild M., Zhai P. M. (2013) Observations: Atmosphere and Surface. *In*: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Hayashi K., Yan X. (2010) Airborne nitrogen load in Japanese and Chinese agroecosystems. Soil Science and Plant Nutrition 56:2-18.
- Hellinga C., Schellen A. A. J. C., Mulder J. W., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J. (1998) The sharon process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. Water Science and Technology 37:135-142.
- Henry S., Bru D., Stres B., Hallet S., Philippot L. (2006) Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. Applied and Environmental Microbiology 72:5181-5189.
- 本多淳裕・福森 功・垣屋高文・福山丈二・金刺博康・青木茂樹・平井光代・竹内忠雄・樋浦はるを (1988) 生物脱臭の基礎と応用. (社) 臭気対策研究協会. 東京. pp244.
- 寶示戸雅之・池口厚男・神山和則・島田和宏・荻野暁史・三島慎一郎・賀来康一 (2003) わが国農耕地における窒素負荷の都道府県別評価と改善シナリオ. 日本土壤肥料学雑誌 74:467-474.
- Hunik J. H., Meijer H. J. G., Tramper J. (1992) Kinetics of *Nitrosomonas europaea* at extreme substrate, product and salt concentrations. Applied Microbiology and Biotechnology 37:802-807.
- IPCC (2006) Ch. 11 N₂O emissions from managed soils, and CO₂ emissions from lime and urea application. *In* Vol. 4: Agriculture, forestry and other land use. 2006 IPCC

Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, prepared by the National Greenhouse Gas Inventories Programme, Eggleston H. S., Buendia L., Miwa K., Ngara T., Tanabe K. (eds). IGES, Japan.

[cited 15 Feb 2018] Available from URL:

http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/pdf/4_Volume4/V4_11_Ch11_N20&CO2.pdf.

石橋 晃監修 (2001) 新編 動物栄養試験法. 養賢堂、東京. pp642.

石橋 誠 (2000) ロックウール脱臭装置の性能評価. 平成12年度農林水産省依頼研究員研修報告書. pp30.

Jones R.D., Morita R.Y. (1983) Methane oxidation by *Nitrosococcus oceanus* and *Nitrosomonas europaea*. Applied and Environmental Microbiology 45:401-410.

Jones C.M., Stres B., Rosenquist M., Hallin S. (2008) Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. Molecular Biology and Evolution 25:1955-1966.

Jones R.T., Robeson M.S., Lauber C.L., Hamady M., Knight R., Fierer N. (2009) A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. The ISME Journal 3:442-453.

Joshi J.A., Hogan J.A., Cowan R.M., Strom P.F., Finstein M.S. (2000) Biological removal of gaseous ammonia in biofilters: space travel and earth-based applications. Journal of the Air and Waste Management Association 50:1647-1654.

Juhler S., Revsbech N.P., Schramm A., Herrmann M., Ottosen L.D.M., Nielsen L.P. (2009) Distribution and rate of microbial processes in an ammonia-loaded air filter biofilm. Applied and Environmental Microbiology 75:3705-3713.

Jun Y., Wenfeng X. (2009) Ammonia biofiltration and community analysis of ammonia-oxidizing bacteria in biofilters. Bioresource Technology 100:3869-3876.

化学便覧 (1966) 9.8.2 当量イオン伝導度. 化学便覧 基礎編. 日本化学会. 丸善、東京. p1042.

Kämpfer P., Denger K., Cook A.M., Lee S.T., Jäckel U., Denner E.B.M., Busse H.J. (2006) *Castellaniella* gen. nov., to accommodate the phylogenetic lineage of *Alcaligenes defragrans*, and proposal of *Castellaniella defragrans* gen. nov., comb. nov. and

Castellaniella denitrificans sp. nov. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology 56:815-819.

金川貴博 (1997) 第7章 生物脱臭法、第1節 生物脱臭法の概要、基本原理および特性.

最新 防脱臭技術集成 (監修 石黒辰吉). (株) エヌ・ティー・エス、東京. pp. 349-370.

Kanagawa T., Qi H.W., Okubo T., Tokura N. (2004) Biological treatment of ammonia gas at high loading. Water Science and Technology 50:283-290.

Kartal B., Koleva M., Arsov R., van der Star W., Jetten M.S.M., Strous M. (2006) Adaptation of a freshwater anammox population to high salinity wastewater. Journal of Biotechnology 126:546-553.

Kawase Y., Hirata A., Kojima T., Ohmori S., Akutagawa H., Uehara K., Iwata K., Nakajima T., Yamamoto K. (2014) Improvement of biodegradation in compact co-current biotrickling filter by high recycle liquid flow rate: performance and biodegradation kinetics of ammonia removal. Process Biochemistry 49:1733-1740.

Kim H., Xie Q., Kim Y.J., Chung J.S. (2002) Biofiltration of ammonia gas with sponge cubes coated with mixtures of activated carbon and zeolite. Environmental Technology 23:839-847.

Klotz M.G., Arp D.J., Chain P.S.G., El-Sheikh A.F., Hauser L.J., Hommes N.G., Larimer F.W., Malfatti S.A., Norton J.M., Poret-Peterson A.T., Vergez L.M., Ward B.B. (2006) Complete genome sequence of the marine, chemolithoautotrophic, ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707. Applied and Environmental Microbiology 72:6299-6315.

Kong Y. (2011) Btrim: a fast, lightweight adapter and quality trimming program for next-generation sequencing technologies. Genomics 98:152-153.

Könneke M., Bernhard A.E., de la Torre J.R., Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D.A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. Nature 437:543-546.

Kostka J.E., Green S.J., Rishishwar L., Prakash O., Katz L.S., Mariño-Ramírez L., Jordan I.K., Munk C., Ivanova N., Mikhailova N., Watson D.B., Brown S.D., Palumbo A.V., Books S.C. (2012) Genome sequences for six *Rhodanobacter* strains, isolated from soils and the terrestrial subsurface, with variable denitrification

- capabilities. Journal of Bacteriology 194:4461-4462.
- Kristiansen A., Lindholm S., Feilberg A., Nielsen P.H., Neufeld J.D., Nielsen J.L. (2011a) Butyric acid- and dimethyl disulfide-assimilating microorganisms in a biofilter treating air emissions from a livestock facility. Applied and Environmental Microbiology 77:8595-8604.
- Kristiansen A., Pedersen K.H., Nielsen P.H., Nielsen L.P., Nielsen J.L., Schramm A. (2011b) Bacterial community structure of a full-scale biofilter treating pig house exhaust air. Systematic and Applied Microbiology 34:344-352.
- Kumar S., Tamura K., Nei M. (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5:150-163.
- Kurahashi M., Fukunaga Y., Sakiyama Y., Harayama S., Yokota A. (2009) *Iamia majanohamensis* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from sea cucumber *Holothuria edulis*, and proposal of *Iamiaceae* fam. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59:869-873.
- Kuroda K., Osada T., Yonaga M., Kanematu A., Nitta T., Mouri S., Kojima T. (1996) Emissions of malodorous compounds and greenhouse gases from composting swine feces. Bioresource Technology 56:265-271.
- Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J., Nicol G.W., Prosser J.I., Schuster S.C., Schleper C. (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature 442:806-809.
- Leson G., Winer A.M. (1991) Biofiltration: an innovative air pollution control technology for VOC emissions. Journal of the Air and Waste Management Association 41:1045-1054.
- Liang Y., Quan X., Chen J., Chung J.S., Sung J.Y., Chen S., Xue D., Zhao Y. (2000) Long-term results of ammonia removal and transformation by biofiltration. Journal of Hazardous Materials B80:259-269.
- Limpiyakorn T., Shinohara Y., Kurisu F., Yagi O. (2005) Communities of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge of various sewage treatment plants in Tokyo. FEMS Microbiology Ecology 54:205-217.
- Magurran A.E. (1988) Ecological diversity and its measurement. Croom Helm, London.

pp34-41.

Malhautier L., Gracian C., Roux J.C., Fanlo J.L., Le Cloirec P. (2003) Biological treatment process of air loaded with an ammonia and hydrogen sulfide mixture. Chemosphere 50:145-153.

Melse R.W., Ploegaert J.P.M., Ogink N.W.M. (2012) Biotrickling filter for the treatment of exhaust air from a pig rearing building: ammonia removal performance and its fluctuations. Biosystems Engineering 113:242-252.

Morales M., Hernández S., Cornabé T., Revah S., Auria R. (2003) Effect of drying on biofilter performance: modeling and experimental approach. Environmental Science and Technology 37:985-992.

Murase J., Frenzel P. (2007) A methane-driven microbial food web in a wetland rice soil. Environmental Microbiology 9:3025-3034.

Muyzer G., De Waal E.C. Uitterlinden A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 59:695-700.

Nakamura K., Haruta S., Nguyen H.L., Ishii M., Igarashi Y. (2004) Enzyme production-based approach for determining the functions of microorganisms within a community. Applied and Environmental Microbiology 70:3329-3337.

におい・かおり環境協会 (2012) 悪臭防止法ハンドブック 六訂版. (株)ぎょうせい. 東京. pp394.

Nicolai R.E., Clanton C.J., Janni K.A., Malzer G.L. (2006) Ammonia removal during biofiltration as affected by inlet air temperature and media moisture content. Transactions of the ASABE 49:1125-1138.

農林水産省 (2011) 家畜排せつ物処理状況調査結果. 農林水産省生産局畜産部畜産企画課畜産環境・経営安定対策室, 東京. [cited 17 Oct 2017] Available from URL: <http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/pdf/syori-joukyou.pdf>.

農林水産省 (2017) 畜産経営に起因する苦情発生状況. 農林水産省生産局畜産部畜産振興課環境計画班, 東京. [cited 17 Oct 2017] Available from URL: http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kankyo/taisaku/pdf/kujou28_02.pdf.

農林水産省統計情報 畜産統計調査. 農林水産省統計, 東京. [cited 17 Oct 2017] Available from URL:

<http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tikusan/index.html>.

Ogino A., Murakami H., Yamashita T., Furuya M., Kawahara H., Ohkubo T., Osada T. (2017) Estimation of nutrient excretion factors of broiler and layer chickens in Japan. Animal Science Journal 88:659-668.

Okkerse W.J.H., Ottengraf S.P.P., Osinga-Kuipers B., Okkerse M. (1999) Biomass accumulation and clogging in biotrickling filters for waste gas treatment. Evaluation of a dynamic model using dichloromethane as a model pollutant. Biotechnology and Bioengineering 63:418-430.

Osada T., Kuroda K., Yonaga M. (2000) Determination of nitrous oxide, methane, and ammonia emissions from a swine waste composting process. Journal of Material Cycles and Waste Management 2:51-56.

長田 隆・田中康男・和木美代子 (2002) バイアル瓶を採気容器としたガスサンプリングによる温室効果ガス測定. 畜産草地研究所 2002 年成果情報.

[cited 24 Oct 2017] Available from URL:

<https://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/nilgs/2002/nilgs02-24.html>.

押田敏雄・柿市徳英・羽賀清典 (2012) 新編 畜産環境保全論. 養賢堂. 東京. pp276.

Ottosen L.D.M., Juhler S., Guldborg L.B., Feilberg A., Revsbech N.P., Nielsen L.P. (2011) Regulation of ammonia oxidation in biotrickling airfilters with high ammonium load. Chemical Engineering Journal 167:198-205.

Pagans E., Font X., Sánchez A. (2007) Adsorption, absorption, and biological degradation of ammonia in different biofilter organic media. Biotechnology and Bioengineering 97:515-525.

Park K. J., Choi M. H., Hong J. H. (2002) Control of composting odor using biofiltration. Compost Science and Utilization 10:356-362.

Park H. D., Wells G. F., Bae H., Criddle C. S., Francis C. A. (2006) Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. Applied and

- Environmental Microbiology 72:5643-5647.
- Pastorelli R., Landi S., Trabelsi D., Piccolo R., Mengoni A., Bazzicalupo M., Pagliai M. (2011) Effects of soil management on structure and activity of denitrifying bacterial communities. Applied Soil Ecology 49:46-58.
- Philippot L., Hallin S., Schloter M. (2007) Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. Advances in Agronomy 96:249-305.
- Ralebitso-Senior T.K., Senior E., di Felice R., Jarvis K. (2012) Waste gas biofiltration: advances and limitations of current approaches in microbiology. Environmental Science and Technology 46:8542-8573.
- Rossau R., Kersters K., Falsen E., Jantzen E., Segers P., Union A., Nehls L., De Ley J. (1987) *Oligella*, a new genus including *Oligella urethralis* comb. nov. (formerly *Moraxella urethralis*) and *Oligella ureolytica* sp. nov. (formerly CDC group IVe): relationship to *Taylorella equigenitalis* and related taxa. International Journal of Systematic Bacteriology 37:198-210.
- Sakano Y., Kerkhof L. (1998) Assessment of changes in microbial community structure during operation of an ammonia biofilter with molecular tools. Applied and Environmental Microbiology 64:4877-4882.
- Sanford R.A., Wagner D.D., Wu Q., Chee-Sanford J.C., Thomas S.H., Cruz-García C., Rodríguez G., Massol-Deyá A., Krishnani K.K., Ritalahti K.M., Nissen S., Konstantinidis K.T., Löffler F.E. (2012) Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 109:19709-19714.
- Satoh K., Takizawa R., Sarai M., Sato N., Takahashi R., Tokuyama T. (2004) Two kinds of ammonia-oxidizing bacteria isolated from biologically deodorizing plants in cold district. Journal of Bioscience and Bioengineering 98:207-210.
- 佐藤直人 (2000) ロックウール脱臭装置における循環法による排水対策. 東北農業研究 53:117-118.
- 佐藤立夫・関根靖彦・和田秀徳 (1989) 添加有機物の種類と量が湛水土壌の硝酸代謝に及ぼす影響. 日本土壌肥料学雑誌 60:134-139.
- 佐藤立夫・松本 聡・和田秀徳 (1990) 添加有機物の種類と量が黒ボク水田土壌の硝酸代謝

- に及ぼす影響. 日本土壤肥料学雑誌 61:390-395.
- Schmidt I., Look C., Bock E., Jetten M. S. M. (2004) Ammonium and hydroxylamine uptake and accumulation in *Nitrosomonas*. Microbiology 150:1405-1412.
- Smet E., Van Langenhove H., Maes K. (2000) Abatement of high concentrated ammonia loaded waste gases in compost biofilters. Water, Air, and Soil Pollution 119:177-190.
- Sorokin D. Y., Vejmekova D., Lückner S., Streshinskaya G. M., Rijpstra W. I. C., Damsté J. S. S., Kleebezem R., van Loosdrecht M., Muyzer G., Daims H. (2014) *Nitrolancea hollandica* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium isolated from a bioreactor belonging to the phylum *Chloroflexi*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64:1859-1865.
- Stief P., Poulsen M., Nielsen L. P., Brix H., Schramm A. (2009) Nitrous oxide emission by aquatic macrofauna. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 106:4296-4300.
- Strous M., Fuerst J. A., Kramer E. H. M., Logemann S., Muyzer G., van de Pas-Schoonen K. T., Webb R., Kuenen J. G., Jetten M. S. M. (1999a) Missing lithotroph identified as new planctomycete. Nature 400:446-449.
- Strous M., Kuenen J. G., Jetten M. S. M. (1999b) Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. Applied and Environmental Microbiology 65:3248-3250.
- Sutton M. A., Erisman J. W., Dentener F., Möller D. (2008) Ammonia in the environment: from ancient times to the present. Environmental Pollution 156:583-604.
- Suwa Y., Imamura Y., Suzuki T., Tashiro T., Urushigawa Y. (1994) Ammonia-oxidizing bacteria with different sensitivities to $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in activated sludges. Water Research 28:1523-1532.
- 田中 博 (1989) 畜産臭気の特徴について. 農業機械学会誌 51:99-104.
- 田中章浩 (2009) 出来上がり堆肥による悪臭の除去と堆肥の窒素成分調整. におい・かおり環境学会誌 40:229-234.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28:2731-2739.
- Throback I. N., Enwall K., Jarvis Å., Hallin S. (2004) Reassessing PCR primers targeting

- nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. FEMS Microbiology Ecology 49:401-417.
- Tiedje J.M. (1994) Denitrifiers. *In*: Weaver R., Angle J.S. Bottomley P.J. (Eds.), Methods of Soil Analysis, Part 2, Microbiological and Biochemical Properties. Social Science Society of America, Madison, WI, pp245-267.
- Togashi I., Suzuki M., Hirai M., Shoda M., Kubota H. (1986) Removal of NH₃ by a peat biofilter without and with nitrifier. Journal of Fermentation Technology 64:425-432.
- Tourna M., Freitag T.E., Nicol G.W., Prosser J.I. (2008) Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. Environmental Microbiology 10:1357-1364.
- Treusch A.H., Leininger S., Kletzin A., Schuster S.C., Klenk H.P., Schleper C. (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. Environmental Microbiology 7:1985-1995.
- van de Graaf A.A., de Bruijn P., Robertson L.A., Jetten M.S.M., Kuenen J.G. (1996) Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. Microbiology 142:2187-2196.
- van Groenstijn J.W., Hesselink P.G.M., (1993) Biotechniques for air pollution control. Biodegradation 4:283-301.
- Veeken A., de Wilde V., Szanto G., Hamelers B. (2002) Passively aerated composting of straw-rich organic pig manure. *In*: Insam H., Riddech N., Klammer S. (Eds.), Microbiology of Composting. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp.607-621.
- Veillette M., Girard M., Viens P., Brzezinski R., Heitz M. (2012) Function and limits of biofilters for the removal of methane in exhaust gases from the pig industry. Applied Microbiology and Biotechnology 94:601-611.
- Waki M., Yasuda T., Suzuki K., Sakai T., Suzuki N., Suzuki R., Matsuba K., Yokoyama H., Ogino A., Tanaka Y., Ueno S., Takeuchi M., Yamagishi T., Suwa Y. (2010) Rate determination and distribution of anammox activity in activated sludge treating swine wastewater. Bioresource Technology 101:2685-2690.

- Waki M., Yasuda T., Fukumoto Y., Kuroda K., Suzuki K. (2013) Effect of electron donors on anammox coupling with nitrate reduction for removing nitrogen from nitrate and ammonium. Bioresource Technology 130:592–598.
- Wani A.H., Branion R.M.R., Lau A.K. (1997) Biofiltration: a promising and cost-effective control technology for odors, VOCs and air toxics. Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology 32:2027–2055.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M. Cole J. R. (2007) Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied and Environmental Microbiology 73:5261–5267.
- Ward N.L., Challacombe J.F., Janssen P.H., Henrissat B., Coutinho P.M., Wu M., Xie G., Haft D.H., Sait M., Badger J., Barabote R.D., Bradley B., Brettin T.S., Brinkac L.M., Bruce D., Creasy T., Daugherty S.C., Davidsen T.M., DeBoy R.T., Detter J.C., Dodson R.J., Durkin A.S., Ganapathy A., Gwinn-Giglio M., Han C.S., Khouri H., Kiss H., Kothari S.P., Madupu R., Nelson K.E., Nelson W.C., Paulsen I., Penn K., Ren Q., Rosovitz M.J., Selengut J.D., Shrivastava S., Sullivan S.A., Tapia R., Thompson L.S., Watkins K.L., Yang Q., Yu C., Zafar N., Zhou L., Kuske C.R. (2009) Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. Applied and Environmental Microbiology 75:2046–2056.
- Watanabe T., Asakawa S., Nakamura A, Nagaoka K, Kimura M. (2004) DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. FEMS Microbiology Letters 232:153–163.
- Watanabe T., Kimura M., Asakawa S. (2009) Distinct members of a stable methanogenic archaeal community transcribe *mcrA* genes under flooded and drained conditions in Japanese paddy field soil. Soil Biology and Biochemistry 41:276–285.
- Weckhuysen B., Vriens L., Verachtert H. (1994) Biotreatment of ammonia- and butanal-containing waste gases. Applied Microbiology and Biotechnology 42:147–152.
- Williams T.O., Miller F.C., (1992) Biofilters and facility operations. BioCycle 33:75–79.

- Xue N., Wang Q., Wu C., Zhao P., Xie W. (2011) Elimination of NH₃ and odor from composting by biotrickling filter and preliminary exploration on molecular biology. Water Science and Technology 63:747-753.
- 安田知子・鈴木一好・和木美代子・福本泰之・池口厚男・石田三佳 (2012) ロックウール生物脱臭装置の流入・流出ガス中微生物の評価に関する基礎的検討. 日本畜産学会第 115 回大会講演要旨 p.180.
- Yasuda T., Waki M., Yoshinaga I., Amano T., Suzuki K., Tanaka Y., Yamagishi T., Suwa Y. (2011) Evidence of exponential growth of an anammox population in an anaerobic batch culture. Microbes and Environments 26:266-269.
- Yoshinaga I., Amano T., Yamagishi T., Okada K., Ueda S., Sako Y. Suwa Y. (2011) Distribution and diversity of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria in the sediment of a eutrophic freshwater lake, lake Kitaura, Japan. Microbes and Environments 26:189-197.
- 全農 施設・資材部 (1990) ロックウール脱臭装置の設計・施工マニュアル. 全国農業協同組合連合会 施設・資材部. 東京. pp139.
- Zhang T., Shao M.F., Ye L. (2012) 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. The ISME Journal 6:1137-1147.
- Zhu X., Suidan M. T., Pruden A., Yang C., Alonso C. (2004) Effect of substrate Henry' s constant on biofilter performance. Journal of the Air and Waste Management Association 54:409-418.
- Zhu X., Suidan M. T., Alonso C., Yu T., Kim B. J., Kim B. R. (2001) Biofilm structure and mass transfer in a gas phase trickle-bed biofilter. Water Science and Technology 43:285-293.
- Zumft W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61:533-616.

なお、本文の内容は以下の投稿論文において発表済みであり、図表の転載許可を受けている。

- Yasuda T., Kuroda K., Fukumoto Y., Hanajima D., Suzuki K. (2009) Evaluation of full-scale biofilter with rockwool mixture treating ammonia gas from livestock manure composting. Bioresource Technology 100:1568-1572.

- Yasuda T., Kuroda K., Hanajima D., Fukumoto Y., Waki M., Suzuki K. (2010) Characteristics of the microbial community associated with ammonia oxidation in a full-scale rockwool biofilter treating malodors from livestock manure composting. Microbes and Environments 25:111-119.
- Yasuda T., Waki M., Kuroda K., Hanajima D., Fukumoto Y., Yamagishi T., Suwa Y., Suzuki K. (2013) Responses of community structure of *amoA*-encoding archaea and ammonia-oxidizing bacteria in ammonia biofilter with rockwool mixtures to the gradual increases in ammonium and nitrate. Journal of Applied Microbiology 114:746-761.
- Yasuda T., Waki M., Fukumoto Y., Hanajima D., Kuroda K., Suzuki K. (2017a) Characterization of the denitrifying bacterial community in a full-scale rockwool biofilter for compost waste-gas treatment. Applied Microbiology and Biotechnology 101:6779-6792.
- Yasuda T., Waki M., Fukumoto Y., Hanajima D., Kuroda K., Suzuki K., Matsumoto T., Uenishi H. (2017b) Community structure of denitrifying and total bacteria during nitrogen accumulation in an ammonia-loaded biofilter. Journal of Applied Microbiology 123:1498-1511.

謝辞

本研究を取り纏めるにあたり、終始温かく懇切なるご指導を賜りました名古屋大学大学院生命農学研究科土壌生物化学研究室 浅川晋教授に深く感謝いたします。また、土壌微生物生態の研究についてご教授いただきました同研究室前教授 木村真人博士に深く感謝いたします。本研究の審査を快くお引き受けくださいました、名古屋大学大学院生命農学研究科小林哲夫教授、渡邊彰教授、村瀬潤准教授、渡邊健史講師に深く感謝いたします。

中央大学 諏訪裕一教授、産業技術総合研究所 山岸昂夫博士には、嫌気性微生物の培養方法およびガスクロマトグラフ質量分析計による微生物活性測定手法をご教授いただきました。ここに深く感謝いたします。また、このような技術研修のきっかけを与えていただきました三上榮一博士に深く感謝いたします。畜産環境整備機構 道宗直昭研究統括監には、ラボスケール装置の試作にあたってご助言いただき深く感謝いたします。次世代シーケンス解析は、農研機構次世代作物開発研究センターのゲノム解析支援を受けて実施しました。上西博英博士、松本敏美博士には多くのご支援をいただき深く感謝いたします。

本論文は農研機構畜産研究部門（旧 畜産草地研究所）にて実施した研究の成果を取り纏

めたものであり、研究の推進にあたり鈴木一好博士には多大なるご指導ご助言をいただきましたことを深く感謝いたします。また、研究に着手した当時から今まで変わらず、研究の遂行にあたり多くのことを懇切丁寧に教えていただきました黒田和孝博士（現 九州沖縄農業研究センター）、花島大博士（現 北海道農業研究センター）、福本泰之博士、和木美代子博士に深く感謝いたします。実規模装置の試験では業務第1科の皆様にご支援ご協力をいただき深く感謝いたします。さらに、研究を進めるにあたり常に有益なご助言ご協力をいただきました羽賀清典博士（現 畜産環境整備機構）、田中康男博士（現 畜産環境整備機構）、長田隆博士、石田三佳博士、横山浩博士、様々な形でご協力いただきました赤阪典子氏、遠藤朋子氏ならびに職場の皆様にも深く感謝いたします。

最後に、いつも応援し支えとなっている家族に深く感謝いたします。