

ビール廃棄物を給餌した錦鯉幼魚飼育試験で観察された無機態窒素の消失について

新潟食料農業大学 非会員 ○ 田上 陽菜 正会員 阿部 憲一

1. はじめに

ビール製造時には、ビール 1 kLあたり 100 kg 以上のモルトフィード（麦汁搾り滓）と 1 kg 程度の余剰酵母が発生する¹⁾。一定規模以上の工場から排出される麦汁搾り滓の大半は家畜飼料や、精製して麦芽タンパク質として魚粉代替飼料として利用されているが、近年急増している小規模の醸造所ではそのような安定した再利用フローの構築に苦慮している現状がある。この課題解決の一つの選択肢になり得るとして、我々は未精製の麦汁搾り滓とおからを給餌した錦鯉幼魚の飼育試験に取組んでいる²⁾。この飼育試験中に、水中の亜硝酸・硝酸態窒素濃度が低下する現象が観察された。本発表では、錦鯉幼魚の飼育環境と微生物群集解析の結果から、無機態窒素の消失についての一考察を報告する。

2. 実験方法

2.1 錦鯉幼魚の飼育試験

麦汁搾り滓とおからを 4:1（非乾燥重量）で混合・乾燥して作製した飼料と、市販飼料（乳酸菌配合の鯉のエサ；TREBIO, 吉田飼料）を用いた。作製飼料は市販品と比べて、乾物あたりのタンパク質含有量は約半分の 24.4% であった。一方、炭水化物（食物纖維も含む）は 63.7% と約 2 倍、脂質も 9.4% と市販飼料より高い値を示した。飼育試験では、作製飼料と沈殿酵母液を投入した試験区 A、作製飼料のみを投入した試験区 B、市販飼料を投入した試験区 C（対照区）の 3 つの試験区を設けた。各試験区には錦鯉幼魚を一水槽あたり 6 匹収容した。試験区 A には沈殿酵母液を 30 日間で 2 回、飼育水 1 L あたり 1.0 mL 添加した。飼育期間は試験区 A, C を 100 日間で、試験区 B

を 160 日間とし、0 日目、25 日目、56 日目、93 日目、136 日目に各個体の体重を測定した。各水槽は水量 11 L とし、底部にはろ材（BioRing; GEX）を敷き詰めた。さらに、容積約 1 L の外付けフィルターを設置し、ろ材として BioRing を充填した。また、水槽内にはヒーターを設置し、水温を 18°C 以上に保持した。

2.2 水質分析

水質分析用の試料を採取する際には、水槽内の蒸発による水量減少を確認し、水道水を用いて蒸発分を補給した。水質分析用試料は、パックテスト（（株）共立理化学研究所）により、 NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- の各態窒素濃度を測定した。 pH については、 pH メーター（（株）堀場製作所）を用いて測定した。

2.3 コイの糞とフィルター固形物の微生物群集解析

試験終了時には、試験区ごとに全個体を水量 1 L の小型水槽に移し、室温 23°C 条件下で一晩の曝気飼育を行った。その間に排出された目視で確認できる糞様固形物を飼育水と共にスポットで採取し、破碎用ビーズ入りの 2.0 mL スクリューキャップチューブに移した。10,000×g で 5 分間遠心分離した後、上清を除去して -30°C で冷凍保存した。BioRing フィルターに捕捉された固形物は、水道水中に揉み洗いして懸濁させて採取した後、同様に固液分離・冷凍保存した。これらの冷凍試料は、生物技研株式会社にて 16S rRNA 遺伝子の V4 領域を標的としたアンプリコンシーケンス解析を実施した。得られた遺伝子配列データ（以下、便宜的に ASV と称す）は、blastn 検索により NCBI データベースと照合し、既知種との相同性 97% 以上の ASV については同属と推定した。

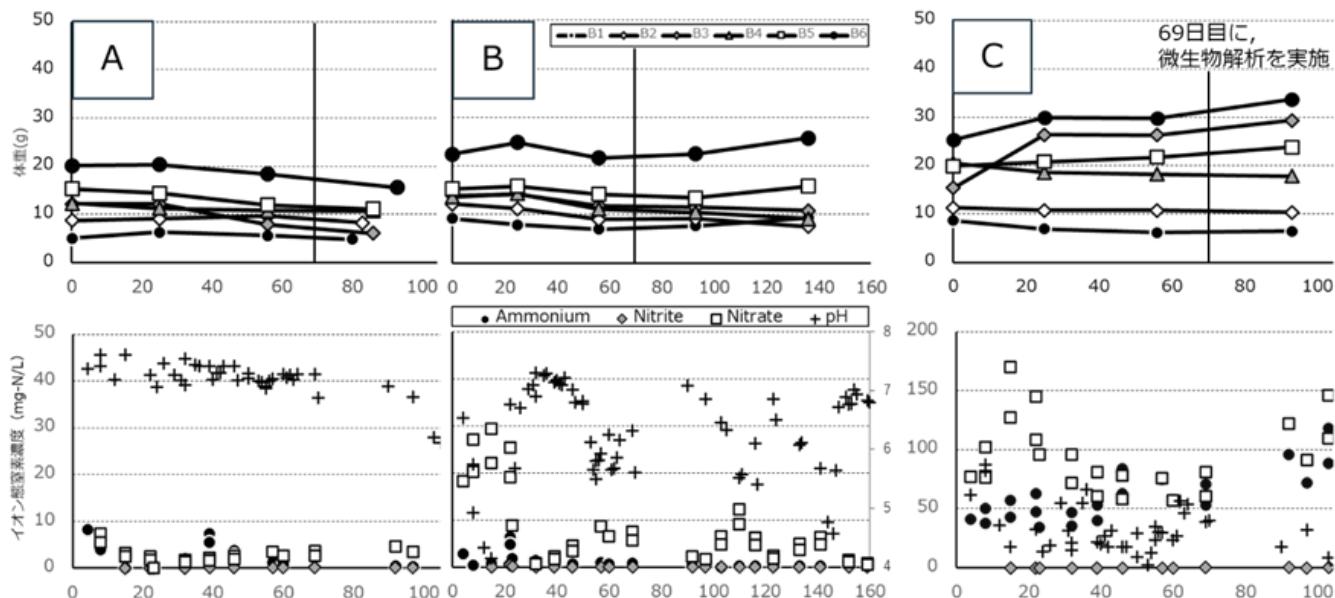


図-1 各試験区における錦鯉幼魚の体重変化および水質の推移

3. 実験結果

3.1 錦鯉幼魚の飼育試験・飼育水質

各試験区における錦鯉幼魚の体重変化および水質の推移を示した(図-1)。試験区Aでは80~86日目に6個体中5個体が死亡したため飼育試験を打ち切った。試験区Bでは150日目まで死亡した個体はなかった。試験区Cでは98~112日目に4個体が死亡したため飼育試験を終了した。水質変化については、試験区AはpHが7.5以上から6.5程度に減少し、50日目以降はNH₄⁺およびNO₂⁻がほぼ検出されず、NO₃⁻も5mg-N/L以下で推移した。試験区BではpHが7.5から6未満まで幾度か変動したが、150日目以降は7付近で安定した。NO₂⁻はほぼ検出されず、NH₄⁺およびNO₃⁻は一時的に10mg-N/Lを超えることもあったが、概ね低濃度で維持された。また、20日目あたりでNO₃⁻濃度が顕著に低下する現象がみられた。試験区CではpHが5未満を示す期間もあり、NO₂⁻はほぼ検出されなかつた一方で、NH₄⁺およびNO₃⁻は50mg-N/Lを超える濃度で推移した。

3.2 微生物群集解析(脱窒細菌既知種の推定)

69日目にコイ糞とフィルター固形物の微生物群集解析を行った。各試料とも全ASVの99%以上が細菌であり、既知種との相同意97%以上であったASVの割合は、糞試料で91~95%，フィルター試料で64~78%であった。属レベルで細菌名が推定されたASVについて、脱窒能を有する菌種が含まれる細菌属名の一覧を表-1に示す。コイ糞試料では55~65%のASVが潜在的に脱窒反応に関与することが示された。AeromonasとCetobacteriumがいずれも試験区でも大きな相対的存在割合を占めた他、試験区CではChyseobacteriumも10%以上の割合であった。一方のフィルター試料では、脱窒反応に関与している可能性があるASVは全ASVに対して、試験区Aで27.7%，試験区Bで7.4%，試験区Cで26.1%であり、試験区Bのみで割合が小さい傾向にあった。また表-1に掲載されたうち、AeromonasとFlavobacteriumは好気性脱窒能を有することが知られている。

4. 考察・まとめ

16S rRNA遺伝子を標的とした微生物群集解析結果からは、試験区A、Bでの無機態窒素の消失の理由を、脱窒反応に寄与する細菌群の存在割合のみで説明できなかった。また、無酸素条件化で進行する通常の脱窒反応の他に、近年再注目されている好気的脱窒反応の寄与についても考慮する必要がある。上村らは³⁾、溶存酸素濃度が変化すると好気性脱窒菌の優占種も変わること、また好気性脱窒菌が従属栄養アンモニア酸化にも関与していることを報告している(但し、優占した細菌種は、本飼育試験とは異なる)。麦汁搾り滓とおからを混合して作製した飼料を給餌した試験区A、Bは、市販飼料の試験区Cと比べて、水槽中に蓄積する目視で確認できる固形物が多く、フィルターが詰まる頻度も早く(詳細データ無)、

表-1 潜在的な脱窒細菌と推定されたASV一覧

推定属(相対性97%以上)	A-V4	B-V4	C-V4	AF-V4	BF-V4	CF-V4
<i>Acidovorax</i>	0.36	0.76	0.00	2.49	0.80	0.00
<i>Aeromonas</i>	23.43	38.19	19.98	1.55	2.88	1.46
<i>Cetobacterium</i>	21.32	17.87	30.73	0.98	0.94	4.11
<i>Chryseobacterium</i>	0.03	0.61	12.19	0.01	0.01	1.57
<i>Cloacibacterium</i>	1.69	0.13	0.11	3.74	0.03	0.00
<i>Dechloromonas</i>	0.71	0.37	0.02	4.27	0.46	0.00
<i>Elstera</i>	1.55	0.00	0.00	5.99	0.06	0.00
<i>Ensifer</i>	0.24	0.69	0.03	0.00	0.00	0.00
<i>Flavobacterium</i>	2.85	2.31	0.07	3.85	0.68	0.02
<i>Hanamia</i>	0.00	0.00	0.00	0.02	0.05	7.66
<i>Klebsiella</i>	1.34	2.57	2.16	0.00	0.00	0.00
<i>Lysobacter</i>	0.00	0.00	0.00	0.01	0.48	4.69
<i>Mesorhizobium</i>	0.00	0.00	0.00	0.09	0.05	0.69
<i>Propionivibrio</i>	0.00	0.00	0.00	1.28	0.42	0.00
<i>Prosthecobacter</i>	0.00	0.00	0.00	1.03	0.06	0.00
<i>Pseudomonas</i>	0.82	1.63	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Rhodanobacter</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	4.74
<i>Shinella</i>	1.01	0.06	0.10	1.40	0.14	0.44
<i>Sphingomonas</i>	0.00	0.00	0.00	0.02	0.08	0.72
<i>Zoogloea</i>	0.00	0.00	0.00	0.91	0.23	0.00
全ASVに占める割合(%)	55.35	65.18	65.37	27.66	7.41	26.10

1~2週間に毎にフィルターに蓄積した固形物を系外へ取り除かなければならなかった。この固形物は、①コイの残餌や未消化の有機物と②水槽内で繁殖した(細菌から原生生物までを含む)微生物群などから成ると考えられる。①はすなわち、従属栄養的脱窒に必要な電子供与体になり得る有機物が相対的に豊富に存在していることを意味する。②については、消失した無機態窒素は脱窒(エネルギーを得るための異化反応)ではなく、微生物の増殖(同化反応)に利用されて、菌体として液中から“消失”している可能性を意味している。今後、この固形物の脱窒活性の測定と、その時に発現する脱窒関連遺伝子の解析を行い、水槽内での無機態窒素の消失のメカニズムの解明に取り組む予定である。

5. 参考文献

- 魏錦、佐藤茂夫(2012)ビール工場の有機性残渣からのエネルギー回収。第23回廃棄物資源循環学会研究発表会講演集
- 田上陽菜、阿部憲一、福島唯暉、鷺見真平、比良松道一、林尚紀: クラフトビール製造時に発生する廃棄物の水耕栽培および観賞魚飼育への活用、第25回環境技術学会年次大会研究発表会[予稿集]。
- 上村光輝、川上周司、押木守、青木仁孝、土田勝範、渡利高大、荒木信夫: 異なる溶存酸素条件が複合微生物系における好気性脱窒細菌群に与える影響、土木学会論文集、Vol. 79, No. 25, 2023.

謝辞: 本実験の一部は、2024年度一般財団法人東洋水産財団学術研究助成を受けて実施した。