

## 熟成ろ材の長期保存のための アンモニア酸化微生物活性に及ぼす温度の影響

今井 正<sup>1,\*</sup>・出濱和弥<sup>2</sup>・坂見知子<sup>3</sup>・高志利宣<sup>4</sup>  
森田哲男<sup>1</sup>・今井 智<sup>5</sup>・岡 雅一<sup>6</sup>・山本義久<sup>7</sup>

### Effect of temperature on the ammonia oxidizing microorganism activity of filter materials with nitrification stored for a long time

Tadashi IMAI<sup>1,\*</sup>, Kazuya DEHAMA<sup>2</sup>, Tomoko SAKAMI<sup>3</sup>, Toshinori TAKASHI<sup>4</sup>  
Tetsuo MORITA<sup>1</sup>, Satoshi IMAI<sup>5</sup>, Masakazu OKA<sup>6</sup> and Yoshihisa YAMAMOTO<sup>7</sup>

**Abstract:** The propose of this study was to assess the suitable conditions to preserve filter materials which were attached nitrifying microorganisms for a long period. We investigated the effect of the preservation temperature on the ammonia oxidation activity of filter materials kept in saturated humidity in plastic bags. After the ammonia oxidation activity of filter materials was measured at 25°C, filter materials were removed from seawater and kept at eight temperatures (1–35°C) in plastic bags for 180 days. Ammonia oxidation activity of the filter material preserved at 1°C was similar to that of the initial activity value. In addition, the relative abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the filter materials preserved at 1°C exhibited only a slight decrease of 14% and 10% of the initial abundances, respectively. Activity of filter materials preserved at 5–20°C decreased to about 50%. Greater decrease of activity was recognized in filter materials preserved at over 25°C. An additional preservation experiment over a three year period at 1°C showed that the activity of filter materials remained at 33%. Therefore, highest retention of the ammonia oxidizing microorganism for long preservation of filter materials with nitrification was 1°C in the designed temperature.

**Key words:** Filter material; Preservation; Temperature; Biological filter

---

2020年12月1日受付；2021年3月4日受理。

<sup>1</sup> 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所養殖部門生産技術部 (Production Engineering Division, Aquaculture Research Department, Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, Takamatsu, Kagawa 761-0111, Japan).

<sup>2</sup> 日本水工設計株式会社大阪支社技術部 (Nihon Suiko Sekkei Co. Ltd., Osaka, Osaka 542-0081, Japan).

<sup>3</sup> 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所養殖部門 (Aquaculture Research Department, Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, Minami-ise, Mie 516-0193, Japan).

<sup>4</sup> 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所養殖部門まぐろ養殖部 (Tuna Aquaculture Division, Aquaculture Research Department, Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, Nagasaki, Nagasaki 851-2213, Japan).

<sup>5</sup> 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所養殖部門生産技術部 (Production Engineering Division, Aquaculture Research Department, Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency, Miyako, Iwate 027-0097, Japan).

<sup>6</sup> 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産大学校校務部 (Administration Office, National Fisheries University, Japan Fisheries Research and Education Agency, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).

<sup>7</sup> 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産大学校水産流通経営学科 (Department of Fisheries Distribution and Management, National Fisheries University, Japan Fisheries Research and Education Agency, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).

\*連絡先 (Corresponding author): Tel, (+81)87-841-9241; Fax, (+81)87-841-9242; E-mail, imait@fra.affrc.go.jp (T. Imai).

循環式飼育における生物ろ過槽の役割は、水生生物にとって有毒なアンモニアをろ材に付着した硝化微生物によって毒性の低い硝酸に変換することである。この処理が正常に働いている硝化作用を有するろ材の状態を“熟成”と称し、これまでに著者らは熟成状態の維持に及ぼす乾燥、アンモニア供給、ろ材の洗浄の影響を調査してきた（今井ら 2016, 2018, 2019）。その結果、熟成ろ材のアンモニア酸化能力は、ろ材の洗浄またはアンモニアの供給停止によって低下はするが、完全に失活はしないことが示された。一方、ろ材を乾燥させるとアンモニア酸化能力は失われ、ろ材が乾燥しないように袋に入れて密封し保存すると30日後でもアンモニア酸化能力が維持されることも明らかにした。この密封による保湿保存方法は手間をかけずに管理できるため、ろ材の保存方法として優れている。この試験は常温（25℃）下で行ったが、ろ材の活性は温度によって影響を受けることが示されており（河合ら 1965）、密封保湿保存の場合も温度を変えることでより高いアンモニア酸化能力を維持できる可能性が考えられる。

そこで密封保存による熟成ろ材のアンモニア酸化能力を維持するためのより簡単な方法を探索するために、袋に入れた保湿条件下において温度がアンモニア酸化能力に及ぼす影響を調査した。

### 材料および方法

#### ろ材の熟成とアンモニア酸化能力の測定

ろ材としては塩素殺菌済みの親水性セラミックス（FB-4、フィルテック株式会社）を用い、ろ材の熟成は前報（今井ら 2016）と同様に塩分を約32 psu に調整した人工海水中（テトラマリンソルトプロ、テトラジャパン）で、毎週、塩化アンモニウムを約5 mg-N/l の濃度で添加し、通気を行いながら自然水温で行った。塩化アンモニウムを添加した3日後に三態窒素を測定し、アンモニア態と亜硝酸態の窒素がほとんど検出されず、大部分が硝酸態であった場合をろ材が熟成状態にあると判断した。

熟成ろ材のアンモニア酸化能力の測定は今井ら（2016）に従った。底面に穴を17箇所空けたポリプロピレン製500 ml ビーカー（ポリビーカー）に熟成ろ材を湿重量で350 g 入れた。これを2 l ガラスビーカーに収容して、塩化アンモニウムを添加した塩分30.2 ~ 33.2 psu, pH 7.5 ~ 8.7の人工海水（テトラマリンソルトプロ、テトラジャパン）を1.8 l 入れた。塩化アンモニウムの添加濃度は、実験結果を考慮してアンモニア濃度の減少速度が適切に測定できるように1 ~ 14 mg-N/l の範囲とした。ガラスビーカーには蒸発や異物の混入を防ぐためにラップを被せた。ガラスビー

カーを25℃の恒温水槽に静置し、ポリビーカー底面からエアーストーンで通気して実験を開始した。開始時および9時間後まで3時間ごと、あるいは6時間後まで2時間ごとにガラスビーカーから45 ml を採水した。これらのアンモニア態窒素濃度は、吸光光度計（DR5000, Hach）を用いてDR5000分析手順マニュアル（東亜ディーケーケー株式会社 2006）に従ってサリチル酸法で測定した。測定値から回帰直線式を算出し、その傾きを1時間あたりのアンモニア態窒素濃度の減少量（mg-N/l/h）とした。塩分とpHはそれぞれ塩分計（Model 30, ワイエスアイ・ナノテック（株））とpHメーター（D-51, HORIBA）を用いて測定した。

#### 温度が保存したろ材のアンモニア酸化能力に及ぼす影響

実験には上述したようにポリビーカーに入れてアンモニア酸化能力を測定した熟成ろ材を各温度条件につき12個用いた。アンモニア酸化能力測定の翌日に、ろ材をポリビーカーに入れた状態でガラスビーカーから取り出して、水気をよく切り、湿重量を測定した。ろ材の水分を維持した状態で保存するため、ポリビーカーごと個々にジッパー付き袋（ジップロック®フリーザーバック大、旭化成ホームプロダクツ株式会社）に入れて密封した。袋は恒温室に静置して保存した。保存温度は、1℃および5℃ずつ5 ~ 35℃の範囲の8条件とした。各温度で保存したろ材は、180日後まで30日毎にポリビーカーを2個ずつ取り出して湿重量を求めた後、再度アンモニア酸化能力を25℃の恒温水槽内で測定した。実験は繰り返し2回行ったことにより、各温度で30日毎に使用したポリビーカー数は4個ずつであった。

#### アンモニア酸化古細菌（Ammonia-oxidizing archaea, AOA）とアンモニア酸化細菌（Ammonia-oxidizing bacteria, AOB）の組成解析と定量

上述の熟成水槽から取り出した1℃および35℃での実験に用いた熟成ろ材およびこれらを用いて180日間保存した後に実験を行った4つのポリビーカーのろ材をそれぞれ50 ml 遠沈管（Violamo）に採取した。

ろ材中のアンモニア酸化微生物の解析手順は今井ら（2016）に従った。すなわち、DNAの抽出はキット（Fast DNA SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals LLC）を用い、AOBとAOAの群集組成解析は、ammonia monooxygenase alpha subunit 遺伝子（*amoA*）を標的としたクローンライブラリー法を用いた。PCRのプライマーは*amoA* 1Fと*amoA* 2R（Rotthauwe et al. 1997）またはarch *amoA* Fとarch *amoA* R（Francis et al. 2005）を用いた。PCR産物をpTAC-2（BioDynamics Laboratory Inc, Tokyo）を用いてク

**Table 1.** Changes in the moisture content of filter materials maintain in plastic bags to keep the humidity saturated at eight temperatures after the removal of seawater

Temperature (°C)	Preservation period (days)					
	30	60	90	120	150	180
1	100±0.0	100±0.0	99.6±0.1	98.6±0.2	98.5±0.1	98.6±0.1
5	99.6±0.1	99.4±0.1	99.4±0.1	99.2±0.1	98.7±0.1	98.2±0.4
10	99.0±0.2	98.9±0.2	98.4±0.1	97.7±0.5	98.2±0.2	97.9±0.2
15	99.6±0.1	99.1±0.2	98.6±0.3	98.2±0.4	97.7±0.3	97.9±0.3
20	99.6±0.1	99.4±0.1	99.1±0.1	98.6±0.2	98.5±0.2	98.2±0.1
25	99.0±0.2	98.4±0.2	97.9±0.1	97.0±0.1	95.7±0.1	94.2±0.1
30	98.4±0.1	97.0±0.2	95.5±0.3	94.2±0.2	92.7±0.2	91.1±0.1
35	97.0±0.0	94.2±0.1	91.4±0.4	88.6±0.2	85.7±0.3	82.0±0.2

Values represent mean ± standard error ( $n = 4$ ).

ローニングを行ない、得られたコロニーから無作為に48～60個を釣菌してサンガー法により塩基配列を決定した。塩基配列は MEGA 7 (Kumar et al. 2016) でアライメントをし、Mothur (Schloss et al. 2009) を用いて塩基配列95%相同を閾値とした Operational Taxonomic Unit (OTU) に分けた。各 OTU を代表する塩基配列は NCBI の BLAST 相同性検索プログラムを用いて近似種を検索し MEGA 7 を用いて最尤法による系統樹を作成した。各 OTU を代表する塩基配列は DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した (Acc. Nos. LC227789 - LC227790)。

*amoA* の定量 PCR は、AOB は *amoA* 1F と *amoA* 2R のプライマーセット、AOA は *amoA* 19F1 と *amoA* 247Ry1 (Yasuda et al. 2013) のプライマーセットを用い、SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ株式会社) による増幅を行った。測定は ABI StepOne™ System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用い、標準 DNA にはろ材から採取された *amoA* 部分配列 (Acc. Nos. AB571246 および AB571283) を含むプラスミド (pTAC-2) の精製物を用いた。

#### 長期冷蔵保存がろ材のアンモニア酸化能力に及ぼす影響

上述した実験と同様にアンモニア酸化能力と湿重量を測定した熟成ろ材を12個用いた。ポリビーカーごと個々にジッパー付き袋に入れた後、袋は1℃の恒温室に静置して保存した。保存したろ材は、180、360、720、1080日後にポリビーカーを3個ずつ袋から取り出して湿重量を求めた後、再度アンモニア酸化能力を測定した。さらに、1080日後の実験では亜硝酸酸化能力が残っているかどうかを確認するため、48時間毎に144時間後まで継続して採水を行った。アンモニア態と亜硝酸態の窒素濃度を DR5000分析手順マニュアル (東亜ディーケーケー株式会社 2006) に従って吸光度計 (DR5000, Hach) を用いて測定した。

#### データの取り扱いと統計処理

最初に測定した熟成ろ材の1時間あたりのアンモニ

ア態窒素濃度の減少量 (アンモニア酸化能力) をアンモニア酸化活性100%とした。保存後に測定した数値は、保存前と比較した割合で示した。これらのデータは、実験で使用したポリビーカー毎にまとめ、平均値と標準誤差を算出した。

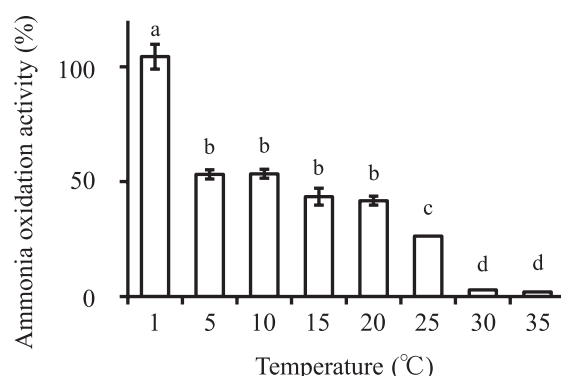
ろ材のアンモニア酸化活性の比較は Tukey-Kramer multiple comparison test を用いて行った。これらの統計処理は清水 (2004) に従って、MS-Excel を使用して行った。

## 結 果

#### 異なる温度で180日間保存したろ材のアンモニア酸化活性の推移

密封して保湿状態で保存した熟成ろ材の180日後の含水率は、いずれの温度でも80%以上であったが、1～20℃では約98%、25℃では94%、30℃では91%、35℃では82%と温度が高いほど低下した (Table 1)。

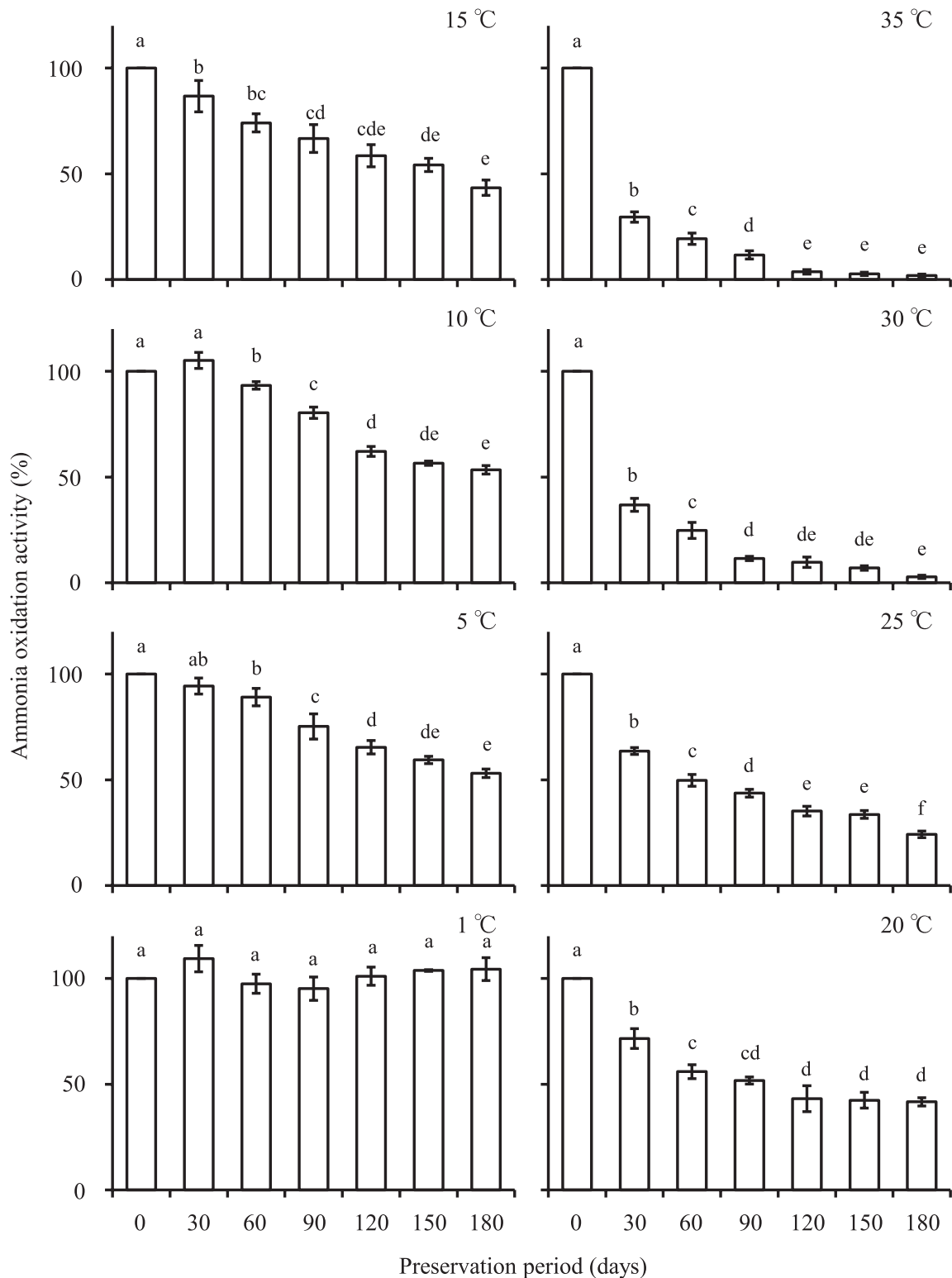
180日後のろ材のアンモニア酸化活性は、1℃で保存した場合が104%と最も高かった (Fig. 1)。5～20℃



**Fig. 1.** Ammonia oxidation activity of filter materials preserved in plastic bags to maintain the humidity saturated for 180 days at eight temperatures. Measurements of the ammonia oxidation activity were conducted at water temperature 25°C. Columns and bars represent mean and standard error, respectively ( $n = 4$ ). Different superscripted letters show significant differences ( $P < 0.05$ ).

では42～53%と約半分にまで低下し、1℃とは有意な差が見られた ( $P < 0.05$ )。25℃では24%, 30℃と35℃では3%以下と温度が高いほどさらに活性が低下した ( $P < 0.05$ )。保存期間中のアンモニア酸化活性の低下の傾向を見ると、5℃と10℃では30日後ではそれぞれ

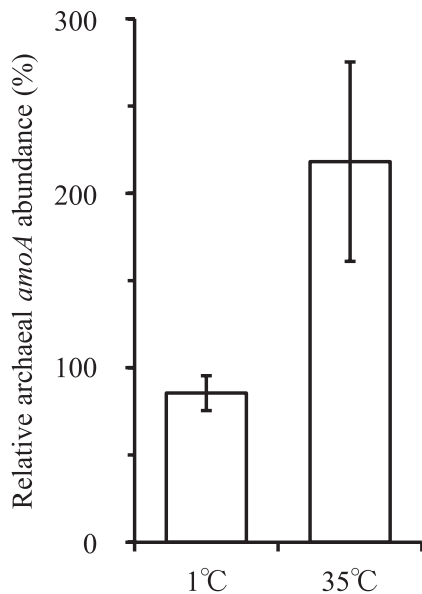
94%と105%と実験開始時と比較して有意に低下しなかったが、その後徐々に低下した (Fig. 2)。15℃以上では、30日後に30～87%と実験開始時と比較して有意な活性の低下が見られた ( $P < 0.05$ )。特に30℃と35℃ではそれぞれ37%と30%と大きく低下した。



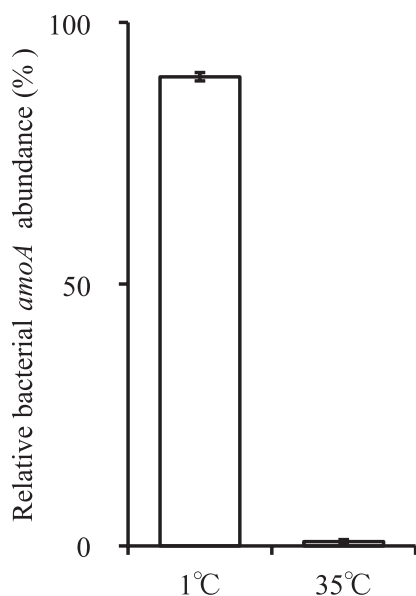
**Fig. 2.** Changes measured at 30 days intervals in the ammonia oxidation activity of filter materials preserved in plastic bags to maintain the humidity saturated at eight temperatures. Measurements of the ammonia oxidation activity were conducted at 25°C. Columns and bars represent mean and standard error, respectively (day 0:  $n = 24$ ; others:  $n = 4$ ). Different superscripted letters show significant differences ( $P < 0.05$ ).

1℃と35℃で180日間保存したろ材中の AOA および AOB の *amoA* 量

保存前のろ材中の AOA と AOB の *amoA* 量は、それぞれ  $1.3 \times 10^5$  copies/g および  $3.4 \times 10^3$  copies/g であった。保存前の *amoA* 量を100%として比較すると、1℃で保存したろ材の180日後の AOA と AOB の *amoA* 量は、それぞれ  $86 \pm 10\%$  と  $90 \pm 11\%$  と保存前と同程度であった (Figs. 3 and 4)。一方、35℃で保存した場合には、AOA の *amoA* 量は  $218 \pm 57\%$  と約 2 倍に増加したが、AOB は1%と大きく減少した。



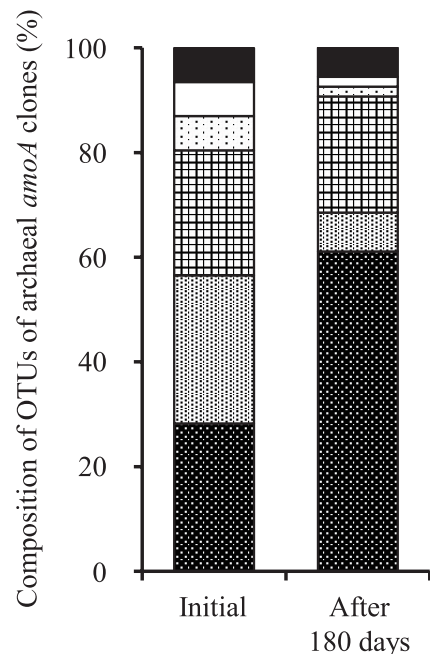
**Fig. 3.** Relative archaeal *amoA* gene abundances in filter materials kept in plastic bags to maintain the humidity saturated at 1 and 35°C for 180 days. Columns and bars represent mean and standard error, respectively ( $n = 4$ ).



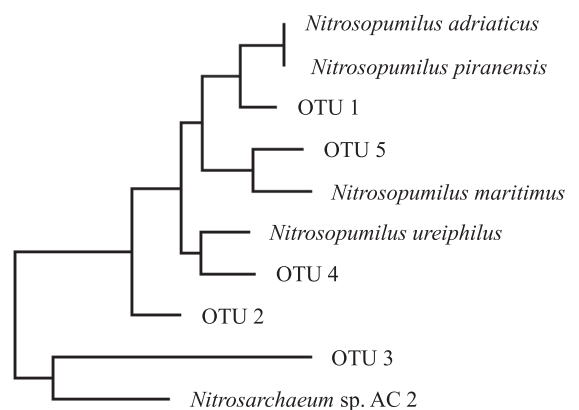
**Fig. 4.** Relative bacterial *amoA* gene abundances in filter materials kept in plastic bags to maintain the humidity saturated at 1 and 35°C for 180 days. Columns and bars represent mean and standard error, respectively ( $n = 4$ ).

1℃で180日間保存したろ材中の AOA および AOB の組成

AOA では1℃での保存前および180日保存後のろ材から、それぞれ46個と54個、計100クローンを解析した結果、9個の OTU が得られた。このうち 6%以上の割合で出現した OTU は5個であった (Fig. 5)。保存前では OTU 1～3 が24～28%と割合が高かった。保存後には OTU 1 が61%に増加し、OTU 3 は22%とほとんど変わらなかった。一方、OTU 2 は7%に減少した。OTU 1, 2, 4, 5 は *Nitrosopumilus* の塩基配列とクラスターを形成し、OTU 3 は *Nitrosarchaeum* とクラスターを形成した (Fig. 6)。



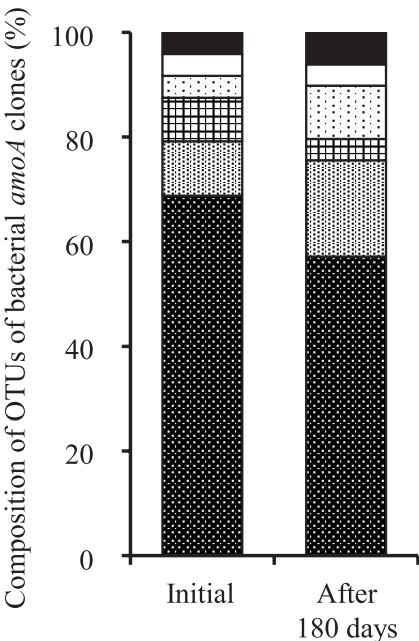
**Fig. 5.** Changes of archaeal *amoA* gene compositions in filter materials kept in plastic bags to maintain the humidity saturated at 1°C for 180 days. Operational Taxonomic Unit (OTU): ■, OTU 1; ▨, OTU 2; ▩, OTU 3; ▪, OTU 4; □, OTU 5; ■, others.



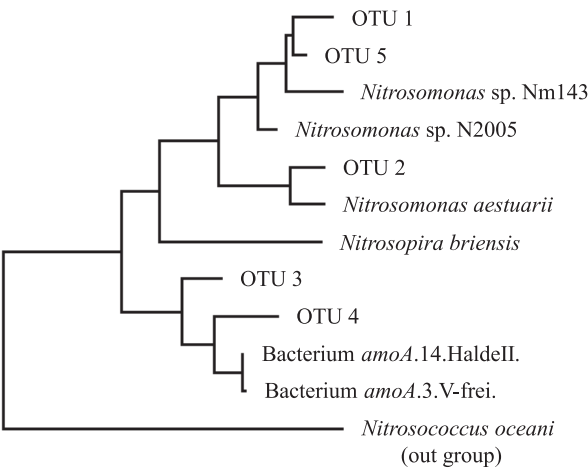
**Fig. 6.** Phylogenetic position of archaeal *amoA* gene in filter materials kept in plastic bags to maintain the humidity saturated at 1°C for 180 days.



同様に AOB では48個と49個、計97クローンを解析し、9 個の OTU が得られた。このうち 4%以上の割合で出現した OTU は 5 個であった (Fig. 7)。1℃保存前では OTU 1 が69%と優占し、他は11%未満であった。180日保存後では OTU 1 が57%に、OTU 3 が8%から4%に減少した。一方、OTU 2 は10%から18%、OTU 4 が4%から10%に増加した。OTU 5 は4%とほとんど変わらなかった。OTU 1, 2, 5 は *Nitrosomonas* の塩基配列とクラスターを形成し、OTU 3, 4 は別の属名不明配列とクラスターを形成した (Fig. 8)。



**Fig. 7.** Changes of bacterial *amoA* gene compositions in filter materials kept in plastic bags to maintain the humidity saturated at 1℃ for 180 days. Operational Taxonomic Unit (OTU): ■, OTU 1; □, OTU 2; ▨, OTU 3; ▩, OTU 4; ▤, OTU 5; ■, others.



**Fig. 8.** Phylogenetic position of bacterial *amoA* gene in filter materials kept in plastic bags to maintain the humidity saturated at 1℃ for 180 days.

1080日間1℃で冷蔵保存したろ材のアンモニア酸化活性

密封して1℃で保存した熟成ろ材の含水率は87～97%であり、1080日後でも高い状態であった (Table 2)。ろ材のアンモニア酸化活性は、保存前を活性100%とすると前述の実験と同様に180日後でも90%と有意な低下はなかった (Fig. 9)。360日後と720日後ではそれぞれ58%と47%まで低下し、保存前だけでなく180日後とも有意な差が認められた ( $P < 0.01$ )。1080日後には33%とさらに低下し、他のすべてと有意な差が認められた ( $P < 0.01$ )。144時間後まで測定を行った1080日後の実験では、アンモニア態窒素濃度は48時間後に 0 mg-N/l となり、亜硝酸態窒素濃度は144時間後に 0.01 mg-N/l 未満となった (Fig. 10)。

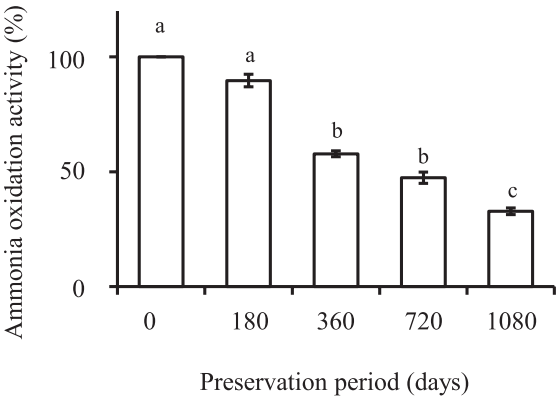
考 察

水生生物を飼育している生物ろ過槽には様々な硝化細菌が生息していることが知られている (Urakawa et al. 2008; Foessel et al. 2008; Sakami et al. 2012; Brown et al. 2013; Bagchi et al. 2014)。硝化細菌の分離株を得るには大変な労力と時間を要するだけでなく、分

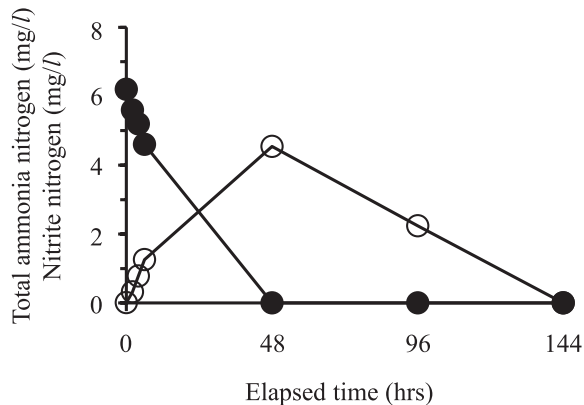
**Table 2.** Changes in the moisture content of filter materials kept in plastic bags to maintain the humidity saturated at 1℃ after the removal of seawater

Preservation period (days)	Moisture content (%)
180	96.8 ± 0.3
360	94.4 ± 0.2
720	91.5 ± 0.1
1080	86.9 ± 0.5

Values represent mean ± standard error ( $n = 3$ ).



**Fig. 9.** Changes in the ammonia oxidation activity of filter materials preserved in plastic bags at 1℃. Measurements of the ammonia oxidation activity were conducted at 25℃. Columns and bars represent mean and standard error, respectively (day 0:  $n = 12$ ; others:  $n = 3$ ). Different superscripted letters show significant differences ( $P < 0.01$ ).



**Fig. 10.** An example of changes of total ammonia and nitrite nitrogen concentrations in the experiment using filter materials preserved in plastic bags for 1080 days at 1°C. Solid and open circles represent total ammonia and nitrite, respectively.

離株の培養・保存や管理が難しいため、分類学的基準株の研究の妨げとなっている（内野 2008）。一方、循環飼育に用いる硝化細菌は分離株とは異なり、生物ろ過槽全体で硝化能力を保有していれば良いので、飼育中に近い条件、すなわち 1 週間に 1 回の定期的なアンモニアを供給すれば、アンモニア酸化能力を損なうことなく維持できることが分かっている（今井ら 2018）。しかしながら週に 1 回のアンモニア添加とはいえ多少の手間がかかることから、飼育に使用しない熟成ろ材をさらに簡単に維持できれば便利である。また熟成ろ材の冷凍保存は予備実験の結果、保存 30 日後にはアンモニア酸化能力が失われた。そこで今回、保湿条件下における温度の影響を調査したところ、低温環境ほどアンモニア酸化活性の低下が抑えられることが分かった。冷蔵による長期間保存では、半年間はアンモニア酸化活性が維持され、アンモニア酸化を行う微生物の数や組成にも大きな変化はなかった。1 年以上経過すると活性低下が認められたが、このことはアンモニアが供給されない状態の継続が影響したと考えられる。しかし、アンモニア酸化活性を有したまま熟成ろ材を 3 年間保存できたことは、冷蔵は手間をかけずに保存できる有効な手段と考えられた。

熟成ろ材を冷蔵保存する場合、生物ろ過槽内のろ材をすべて保存するのは、冷蔵庫の容量の問題もあり難しい。ろ材を熟成させるには 2 カ月程度を要するとされるが（菊池 2004; 佐藤・増本 2004）、熟成ろ材を元種として接種した場合には熟成期間が短縮されることが知られている（Carmignani and Bennett 1977; Bower and Turner 1981）。このことから、冷蔵保存の利用方法としては、元種用熟成ろ材の保存が考えられる。飼育中のトラブル、例えば疾病発生により殺菌による熟成ろ材の全滅を回避するためにも、飼育に用い

る生物ろ過槽以外の場所で熟成ろ材を維持しておくことは重要である。

以上の結果から、熟成ろ材の冷蔵保存は、冷蔵庫の容量に余裕があれば有効であり、容量に余裕がないのであれば、熟成に使用する元種ろ材の保存に利用できると考えられた。

## 要 約

本研究の目的は長期間、硝化作用を有する熟成状態のろ材を保存するための安定状態を評価することである。密封して保湿状態にしたろ材のアンモニア酸化活性に及ぼす保存温度の影響を調査した。ろ材のアンモニア酸化活性を 25°C で測定した後、これらを海水から取り出してジッパー付き袋に入れて、1～35°C の 8 段階の温度で 180 日間管理した。1°C で保存したろ材のアンモニア酸化活性は最初と同様であった。加えて、アンモニア酸化古細菌とアンモニア酸化細菌の現存量は、それぞれ 14% と 10% でわずかな減少であった。5～20°C で保存したろ材の活性は約 50% まで減少した。活性のさらなる減少は 25°C 以上で保存したろ材で認められた。また、1°C で約 3 年間保存した場合でも、ろ材の活性が 33% 残っていることが示された。ゆえに、硝化作用を有する熟成ろ材の長期間保存のためのアンモニア酸化微生物の保持は、設定温度範囲内では 1°C で最も高かった。

## 謝 辞

本研究の一部は農林水産技術会議委託プロジェクト研究「持続可能な養殖・漁業生産技術の開発」に基づく成果である。本研究を行うにあたり、三態窒素の測定にご協力いただいた今井真弓並びに文谷貴美子の諸氏に御礼申し上げる。

## 文 献

- Bagchi, S., S. E. Vlaeminck, L. A. Sauder, M. Mosquera, J. D. Neufeld and N. Boon (2014) Temporal and spatial stability of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofilters. *PLoS ONE*, **9**, e113515.
- Bower, C. E. and D. T. Turner (1981) Accelerated nitrification in new seawater culture systems: Effectiveness of commercial additives and seed media from established systems. *Aquaculture*, **24**, 1-9.
- Brown, M. N., A. Briones, J. Diana and L. Raskin (2013) Ammonia-oxidizing archaea and nitrite-oxidizing nitrospiras in the biofilter of a shrimp recirculating aquaculture system. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **83**, 17-25.

- Carmignani, G. M. and J. P. Bennett (1977) Rapid start-up of a biological filter in a closed aquaculture system. *Aquaculture*, **11**, 85-88.
- Foesel, B. U., A. Gieseke, C. Schwermer, P. Stief, L. Koch, E. Cytryn, J. R. de la Torre, J. van Rijn, D. Minz, H. L. Drake and A. Schramm (2008) *Nitrosomonas* Nm143-like ammonia oxidizers and *Nitrospira marina*-like nitrite oxidizers dominate the nitrifier community in a marine aquaculture biofilm. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **63**, 192-204.
- Francis, C. A., K. J. Roberts, J. M. Beman, A. E. Santoro and B. B. Oakley (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *PNAS*, **102**, 14683-14688.
- 今井 正・出演和弥・坂見知子・高志利宣・森田哲男・今井 智・山本義久・岡 雅一 (2016) 海水型生物ろ過槽のろ材のアンモニア酸化活性に及ぼす乾燥の影響. 水産増殖, **64**, 273-280. [Imai, T., K. Dehama, T. Sakami, T. Takashi, T. Morita, S. Imai, Y. Yamamoto and M. Oka (2016) Effect of desiccation on ammonia oxidation activity of filter materials in marine biological filters. *Aquacult. Sci.*, **64**, 273-280 (in Japanese with English abstract).]
- 今井 正・出演和弥・坂見知子・高志利宣・森田哲男・今井 智・山本義久・岡 雅一 (2018) 海水型生物ろ過槽のろ材のアンモニア酸化活性とアンモニア酸化微生物に及ぼすアンモニア供給不足の影響. 水産増殖, **66**, 243-250. [Imai, T., K. Dehama, T. Sakami, T. Takashi, T. Morita, S. Imai, Y. Yamamoto and M. Oka (2018) Effects of ammonium supply deprivation on ammonia oxidation activity and ammonia oxidizing microorganisms in filter materials used in a marine bioreactor. *Aquacult. Sci.*, **66**, 243-250 (in Japanese with English abstract).]
- 今井 正・坂見知子・高志利宣・森田哲男・今井 智・山本義久・岡 雅一 (2019) 多孔質ろ材の洗浄がアンモニア酸化活性とアンモニア酸化微生物に及ぼす影響. 水産増殖, **67**, 233-240. [Imai, T., T. Sakami, T. Takashi, T. Morita, S. Imai, Y. Yamamoto and M. Oka (2019) Effect of washing porous filter materials on ammonia oxidation activity and ammonia oxidizing microorganisms. *Aquacult. Sci.*, **67**, 233-240 (in Japanese with English abstract).]
- 河合 章・吉田陽一・木俣正夫 (1965) 循環ろ過式飼育水槽の微生物化学的研究 - II. ろ過砂の硝酸化成作用について. 日水誌, **31**, 65-71. [Kawai, A., Y. Yoshida and M. Kimata (1965) Biochemical studies on the bacteria in the aquarium with a circulating system-II. Nitrifying activity of the filter-sand. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **31**, 65-71 (in Japanese with English abstract).]
- 菊池弘太郎 (2004) 閉鎖循環型養殖における水処理技術. 養殖・蓄養システムと水管理 (矢田貞美編). 恒星社厚生閣, 東京, pp. 39-67.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 1870-1874.
- Rothauwe, J. H., K. P. Witzel and W. Liesack (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4704-4712.
- Sakami, T., T. Andoh, T. Morita and Y. Yamamoto (2012) Phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in biofilters of recirculating aquaculture systems. *Mar. Genomics*, **7**, 27-31.
- 佐藤順幸・増本輝男 (2004) 活魚の蓄養水槽の水管理システム. 養殖・蓄養システムと水管理 (矢田貞美編). 恒星社厚生閣, 東京, pp. 97-129.
- Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn and C. F. Weber (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 7537-7541.
- 清水信博 (2004) もう悩まない! 論文が書ける統計. オーエムエス出版, 東京, 150 pp.
- 東亜ディーケーケー株式会社 (2006) DR5000分析手順マニュアル (CD-ROM 版).
- 内野佳仁 (2008) 独立栄養細菌の保存法について. 日本微生物資源学会誌, **24**, 9-13. [Uchino, Y. (2008) Preservation of lithoautotrophic bacteria. *Microbiol. Cult. Coll.*, **24**, 9-13 (in Japanese with English title).]
- Urakawa, H., Y. Tajima, Y. Numata and S. Tsuneda (2008) Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 894-900.
- Yasuda, T., M. Waki, K. Kuroda, D. Hanajima, Y. Fukumoto, T. Yamagishi, Y. Suwa and K. Suzuki (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. *J. Appl. Microbiol.*, **114**, 746-761.