

畜産廃水処理システム由来の固形廃棄物の堆肥化における環境負荷低減化

Reducing Environmental Impact in Composting of Solid Wastes from Livestock Wastewater Treatment System

大坪和香子^{1*}, 進藤絵里香¹, 山田 剛史^{1,2}, 上田 英代³,
上田 裕一³, 渡辺 昭⁴, 宮内 啓介¹, 遠藤 銀朗¹

WAKAKO IKEDA-OHTSUBO^{1*}, ERIKA SHINDO¹, TAKESHI YAMADA^{1,2}, HIDEYO UEDA³, YASUICHI UEDA³, AKIRA WATANABE⁴,
KEISUKE MIYAUCHI¹ and GINRO ENDO¹

¹ 東北学院大学 工学総合研究所 〒985-8537 宮城県多賀城市中央1丁目13-1

² 豊橋技術科学大学 環境・生命工学系 〒441-8580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘1-1

³ 有限会社 日本ライフセンター 〒905-0426 沖縄県今帰仁村字諸志725

⁴ 水ing株式会社 〒108-8470 東京都港区港南1-7-18

* 東北大学大学院農学研究科 〒981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通兩宮町1-1

* TEL: 022-717-8713

* E-mail: wakako.ohtsubo.a7@tohoku.ac.jp

¹ Research Institute for Engineering and Technology, Tohoku Gakuin University,
1-13-1, Chuo, Tagajo, Miyagi 985-8537, Japan

² Toyohashi University of Technology, Department of Environmental and Life Sciences,
1-1, Hibiaraoka, Tempaku-cho, Toyohashi, Aichi 441-8580, Japan

³ Japan Life Center Co., 725, Nakizin, Okinawa 905-0212, Japan

⁴ Swing Corporation, 1-7-18, Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8470, Japan

* Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University,
1-1, Tsutsumidori Amamiyamachi, Aobaku, Sendai 981-8555, Japan

キーワード: 堆肥化, 亜酸化窒素 (N₂O), 家畜排せつ物, 廃水処理

Key words: composting, nitrous oxide (N₂O), livestock manure, wastewater treatment

(原稿受付 2015年8月3日/原稿受理 2015年8月10日)

1. はじめに

亜酸化窒素 (N₂O) は二酸化炭素 (CO₂), メタン (CH₄) と共に地球温暖化の要因となる主要な温室効果ガス (greenhouse gas, GHG) である。最近 10 年の大気中 N₂O 濃度は, 0.80 ppb/年のペースで増加しており, 現在の濃度は産業革命前の約 121% に達する¹⁾。N₂O の排出量は GHG 全体の約 6.2%²⁾ と比較的少ないが, CO₂ の約 310 倍の温室効果ポテンシャルや成層圏においてオゾン層破壊を誘発する性質から, 各国において削減が求められている。我が国では, アジピン酸製造プロセスにおける N₂O 分解装置の稼働率の増加や燃焼触媒の改善が普及したことにより, 工業分野における N₂O 発生量が大きく減少した一方で, 農業畜産分野および廃水処理分野における N₂O 発生量は減少していない³⁾。特に, 家畜排せつ物の管理プロセス (IPCC 排出区分 3.B.) における N₂O 発生量は, 1990 年度の排出量から 6.9% 増加しており, 当該分野における効果的な N₂O 低減方法の開発が遅れている現状を反映している。我々は, 家畜排せつ物の処理・管理プロセスにおける N₂O 発生量

の低減化を目指し, 養豚場由来廃水処理および固形廃棄物の堆肥化処理における N₂O 発生量の要因の解明および N₂O 抑制方法の開発を行ってきた。本稿では, 我々がこれまで研究してきた畜産廃水処理で生じる搾汁残渣や脱水汚泥を含む固形廃棄物の堆肥化について, N₂O 発生や堆肥の物理化学的性質の変化などの特徴を紹介し, それらの知見を利用した N₂O 低減化手法の提案を行う。

2. 家畜排せつ物の堆肥化における問題点と 高温前処理の効果

堆肥化 (composting) は, 生ゴミや家畜糞尿等に含まれる有機性廃棄物を分解発酵することにより有機肥料を製造するプロセスであり, 自治体・企業から家庭まで, 様々な規模で行われている。堆肥化プロセスでは, 有機物が土着の微生物により活発に分解されることにより発酵熱が生じ (高温発酵期, thermophilic phase), その温度は約 70°C にも達する。気候条件や不十分な切り返し (酸素の供給) により分解発酵の停滞や阻害が起こると, 堆肥の低質化につながるため, 初期の温度上昇と高温発

酵期の持続は堆肥化プロセスにおける重要なファクターとなっている。日本国内では、年間発生する家畜排せつ物約 70 万窒素トンのうち、80%以上（約 58 万窒素トン）が堆肥化または液肥化されている（農林水産省平成 16 年度データ）。窒素含量が多く C/N 比が低い家畜排せつ物の堆肥化では、有機物の不足により初期の温度上昇が抑制され、余剰の無機窒素化合物の揮発・溶出が起こりやすいため⁴⁾、病原菌や植物生育阻害物質の残存や環境中への窒素負荷量の増大が懸念される。

これらの問題点の解決法の一つとして、我々の研究グループにおいて以前開発した超高温前処理無臭堆肥化技術⁵⁾がある。本技術では、原材料（pH および水分量を調整したもの）を発酵槽（日本ライフセンター、うえだ式発酵処理システム「りぼんちゃん」）に投入し、モーターによる機械攪拌を行うことにより、摩擦熱を発生させ 100°C 程度まで加温する。この超高温前処理（hyperthermophilic pre-treatment, HTPRT）の効果として、家畜排せつ物由来の病原菌の不活化や悪臭の軽減が期待される他、腐植質の形成が促進されることも確認されている⁶⁾。また、HTPRT を実施後の堆肥化プロセスでは、初期の温度上昇と高温発酵期の持続が促進されるため、従来の野積み法（windrow）よりも効率的に堆肥を製造することが可能である⁷⁾（日本ライフセンターデータ）。

3. 養豚場廃水処理実証試験プラント (piggery wastewater treatment plant, PWTP) 由来の固形廃棄物を利用した堆肥化

廃水処理において生じる余剰汚泥は、国内で発生する産業廃棄物の最大の割合（約 43.4%）を占めているが⁸⁾、多くの場合焼却処分されているのが現状である。家畜排せつ物の処理プロセスにおいて、実地式の廃水処理プラントから生じた余剰汚泥を固形残渣と同時に堆肥化することは廃棄物減容化に貢献することが期待されるが、廃水処理汚泥由来の微生物の「持ち込み」が堆肥化にどのような影響を与えるのかを調べた例はほとんどない。特に、硝化脱窒処理槽に由来する微生物は、堆肥化における無機窒素化合物の変化、さらには N₂O 発生にも影響

を与えることが考えられ、適正な評価が必要となる。そこで本研究では、荏原製作所（現水 ing 株式会社）が設計・構築した養豚場のバイオマス再生型排水処理の実証試験プラント（PWTP、図 1）から発生した搾汁残渣（固液分離用スクリープレスの残渣）および脱水汚泥を合わせた固形廃棄物を原料とし、堆肥化実験を行った⁷⁾。PWTP 由来固形廃棄物を原料とした堆肥の C/N 比は 27 ~ 28% と豚糞を原料とした堆肥とほぼ同様に低く⁹⁾、高温発酵期の温度上昇が抑制される懸念があったことから（前項参照）、本研究では、従来の単純野積み法（A 法）に加えて、前述した高温前処理（HTPRT）を 2 時間、60 回転 / 分間実施した後に野積みを行う方法（B 法）により堆肥化を行った。切り返しは 1 週間に 1 度行い、切り返し直後の堆肥のサンプリングを継続して行った。図 2 に示したように、A 法の堆肥では明確な高温発酵期が観察されず、全行程を通して低い温度に維持されていた。一方、B 法の堆肥ではコンポスト化開始直後から 3 週目にかけて 60 ~ 70°C の高温発酵期が継続しており、HTPRT による効果的な高温化が起これたと考えられる。一方、堆肥山からの N₂O 発生量を比較すると、A 法の堆肥では堆肥化開始後 2 週間目において N₂O 発生が始まったのに対し、B 法の堆肥では 5 週目以降から N₂O が発生しており、N₂O 発生時期に 3 週間の差が見られた（図 3）。また、B 法の堆肥からの N₂O 発生量は A 法と比較して少なかった。また、各堆肥中に含まれる無機窒素化合物の濃度を測定したところ、A 法では 1~2 週目、B 法では 4~5 週目に急激なアンモニア態窒素（NH₄-N）の減少と硝酸態窒素（NO₃-N）の蓄積が起これており（図 4）、N₂O 発生時期の直前に硝化反応が起これていたことが示唆された。硝化と脱窒が同時に起こる条件において N₂O 発生が観察された例の報告は多く¹⁰⁾、硝化反応が起こる好氣的・微好氣的条件における不完全な脱窒、すなわち脱窒の中間還元産物である N₂O が N₂ に還元されずに放出されることが一因となっていることが考えられる。本研究の結果から、HTPRT は有機物の分解発酵だけではなく、堆肥中の無機窒素化合物の組成や N₂O 発生パターンに大きな影響を与えることが知られた。

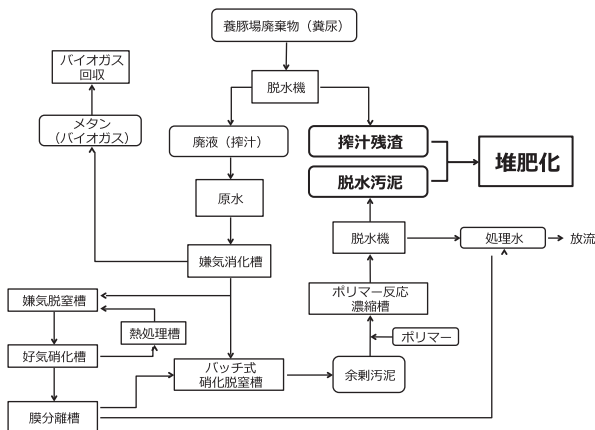


図 1. 本研究における堆肥化実験に使用した固形廃棄物が発生する養豚場のバイオマス再生型排水処理の実証試験プラント (PWTP) の模式図

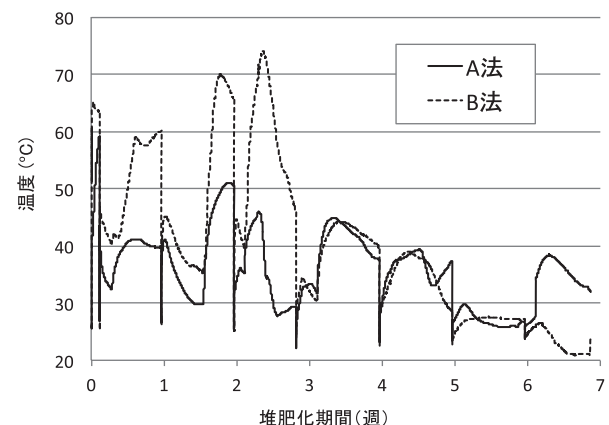


図 2. PWTP 由来の固形廃棄物の堆肥化プロセスにおける温度変化 (A 法：単純野積み法, B 法：HTPRT を実施した単純野積み法)

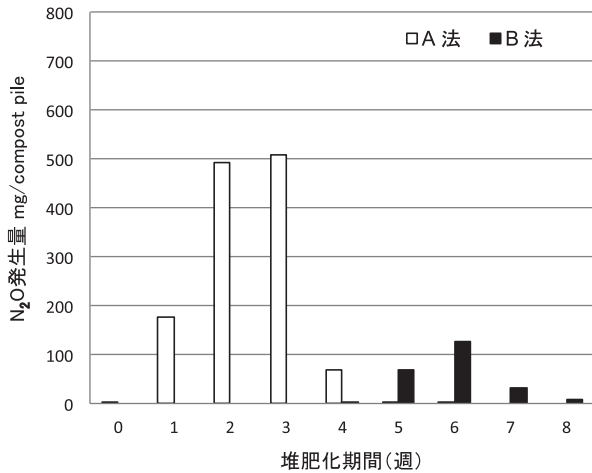


図3. PWTP 由来の固形廃棄物の堆肥化プロセスにおける N₂O 発生量の変化 (A 法: 単純野積み法, B 法: HTPRT を実施した単純野積み法)

4. PWTP 由来固形廃棄物の堆肥化プロセスにおける硝化細菌の影響

堆肥化プロセスでは、有機物の活発な分解発酵が起こる高温発酵期 (60~70°C) において高温耐性のある好熱性細菌が優勢化する¹¹⁾。これに対し、硝化・脱窒細菌は、温度が下がり始める中温期 (<50°C) 以降に堆肥中に含まれる無機窒素化合物の変換、すなわち硝化・脱窒反応を開始する⁹⁾。本研究において、アンモニア酸化細菌のマーカであるアンモニアモノオキシゲナーゼ遺伝子 (*amoA*) の定量的リアルタイム PCR 解析を行ったところ、HTPRT を行った B 法では中温期以降までアンモニア酸化細菌が検出されなかったのに対し、従来型の A 法では堆肥化開始直後の堆肥からもアンモニア酸化細菌が検出された (図5)。さらに我々は、定量 PCR 解析により得られた遺伝子断片のクローン解析を行い、A 法および B 法それぞれの堆肥化直後 (0 週目)、堆肥化中期 (4, 5 週目)、成熟堆肥 (9 週目) に含まれていたアンモニア酸化細菌の系統学的プロファイル、*amoA* の解析により調べた。図6が示す通り、A 法の堆肥山 (compost pile A) 由来の *amoA* クローンの多くが、*Nitrosomonas* 属に分類されるクラスター (37%, Cluster *amoA1*) と、*Nitrosospira* 属に分類される3つのクラスター (30%, Cluster *amoA2*, *amoA3*, *amoA4*) に含まれていたが、A 法の残りの *amoA* のクローン (32%) は系統樹全体に散らばっており、B 法よりも多様性が高いことが知られた。一方、B 法の堆肥山 (compost pile B) 由来の *amoA* クローンは、その大部分 (93%) が *Nitrosomonas* 属に分類される2つのクラスター (Cluster *amoB1*, *amoB2*) に局所化していた。A 法の堆肥において堆肥化直後から *amoA* が検出され、その多様性が明らかに B 法よりも高かった、という本研究の結果は、原料として用いた PWTP 由来の固形廃棄物中に既に存在していた活性汚泥由来の「持ち込み」のアンモニア酸化細菌が、温度上昇が抑制されていた A 法の堆肥において生残、増殖していた可能性を示唆している。一方、B 法において堆肥化中期以降に増殖したアンモニア酸化

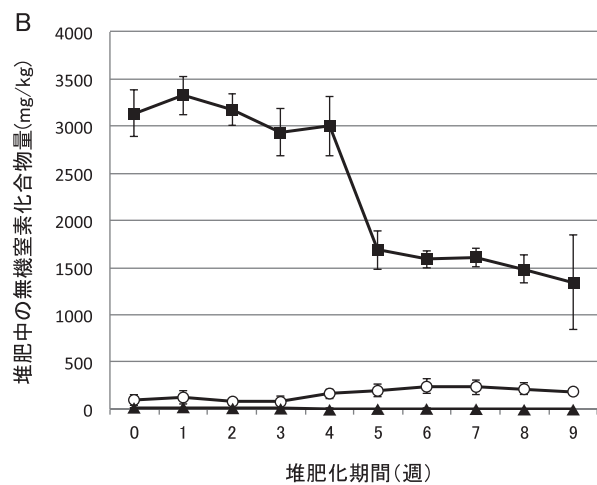
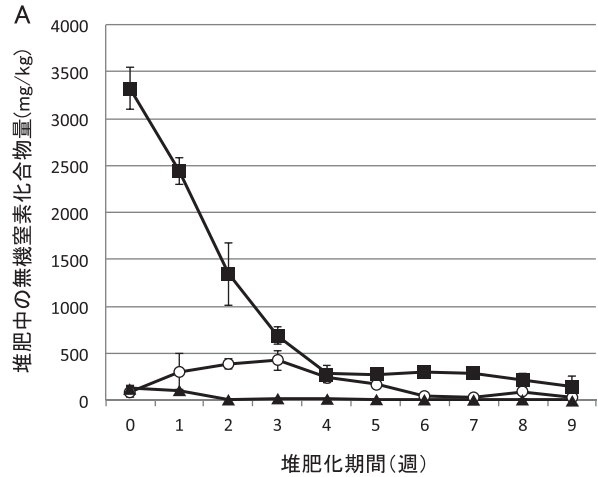


図4. PWTP 由来の固形廃棄物の堆肥化プロセスにおける無機窒素化合物量の変化 (A: A 法, 単純野積み法; B: B 法, HTPRT を実施した単純野積み法)

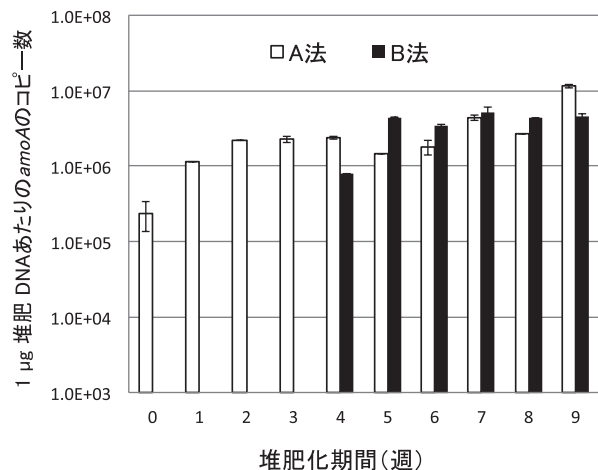


図5. PWTP 由来の固形廃棄物の堆肥化プロセスに存在していたアンモニア酸化細菌が保有する *amoA* 遺伝子のコピー数の変化

細菌は、おそらく土着の菌叢から獲得されたものだと考えられ、本稿では紹介していない別時期に行った同サイトにおける堆肥化実験においても、Cluster *amoB1*, *amoB2* と同じ系統型の *amoA* が検出されている (Ikeda-

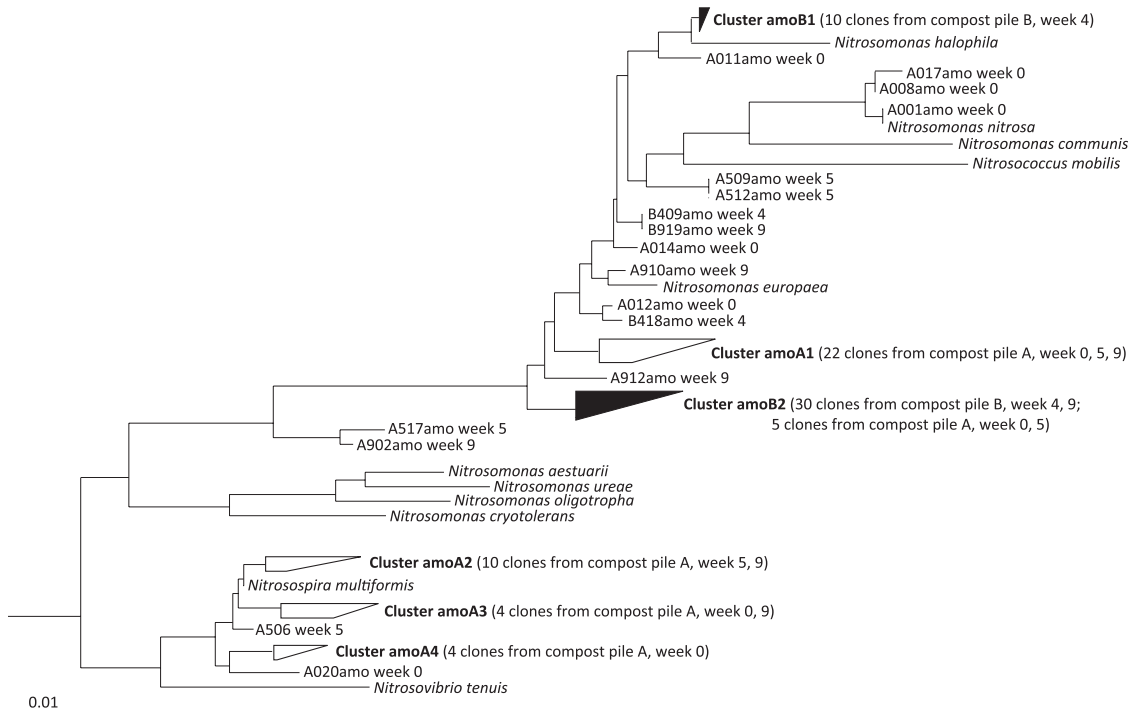


図 6. PWTP 由来の固形廃棄物の堆肥化プロセスに存在していたアンモニア酸化細菌が保有する *amoA* 遺伝子の分子系統型を示した *amoA* の系統樹

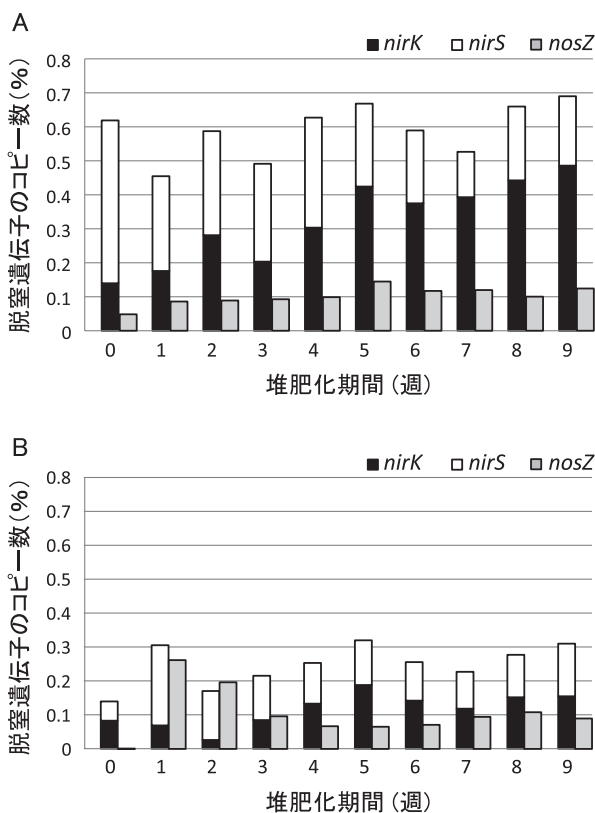


図 7. PWTP 由来の固形廃棄物の堆肥化プロセスに存在していた脱窒細菌が保有する脱窒関連遺伝子 (*nirS*, *nirK*, *nosZ*) のコピー数 (16S rRNA 遺伝子のコピー数に対する割合% で表示) の変化

Ohtsubo et al., submitted).

これらの結果は、PWTP 由来の固形廃棄物の堆肥化においては、堆肥化初期における活性汚泥由来の硝化細菌の増殖が、早期の脱窒基質の生成や N_2O 発生量増加の一因となっている可能性を示唆しており、HTPRT による硝化細菌の熱による死滅化は、それらの抑制に効果的であると考えられる。

5. PWTP 由来固形廃棄物の堆肥化プロセスにおける脱窒細菌群集の変遷

N_2O を N_2 に還元する N_2O 還元酵素をもたない脱窒微生物は N_2O を脱窒の最終産物として放出するため、 N_2O 発生の直接的な要因となっている。また、 N_2O 還元酵素やその遺伝子 *nosZ* の発現機構は、酸素に対する耐性が弱いことが知られており、 N_2O 還元酵素の存在や活性が、脱窒反応プロセス全体からの N_2O 発生に大きく影響すると考えられる。我々は、PWTP 由来の固形廃棄物の堆肥化における脱窒細菌群集の存在量や変遷を明らかにするため、脱窒の鍵酵素である硝酸還元酵素をコードする遺伝子 *nirS* および *nirK*、 N_2O 還元酵素遺伝子 *nosZ* の定量的リアルタイム PCR 解析を行った。図 7 に示す通り、*nirS* と *nirK* のコピー数の和から推測される脱窒細菌の存在量 (数値は細菌全体に対する存在比) は、A 法が B 法に比べて圧倒的に多く、硝化細菌の場合と同様に、活性汚泥由来の「持ち込み」の脱窒細菌が残留していたことが知られた。興味深いことに、*nosZ* の存在量は A 法と B 法に大きな差はなかったが、これに関しては (i) A 法の堆肥中に存在する脱窒細菌の *nosZ* の保有率が低い、(ii) A 法の堆肥中に存在する

脱窒細菌の多くが、*nosZ* のユニバーサルプライマーによって増幅されない *nosZ* を保有する、という2つの解釈が可能である。いずれの解釈においても、A法の堆肥中に存在する脱窒細菌は「従来型」の *nosZ* の保有率が低く、これらが N_2O 発生パターンに影響を与えている可能性もある。また、A法の堆肥山では、*nirS* に対する *nirK* の割合が堆肥化開始後0~9週目で増加しており、明らかに脱窒細菌の菌叢が大きく変化していることが推測される。異種間における水平伝搬が起こりやすいと言われる *nirS* と *nirK* については系統学的な解釈が困難であるため¹²⁾、本研究では、前述した *amoA* と同様に、*nosZ* のクローン解析により、A法とB法の堆肥山に含まれていた脱窒細菌群集の系統学的プロファイル調べた。その結果、A法の堆肥山 (compost pile A) とB法の堆肥山 (compost pile B) 由来の *nosZ* はどちらも高い多様性を示し、また両方の堆肥山由来のクローンを共通に含むクラスターが6つ (Cluster nosM1-6) 存在していた (図8)。*Pseudomonas* 属をはじめとした γ プロテオバクテリア綱に含まれるクラスター (Cluster nosM1) や、*Sinorhizobium* 属をはじめとした α プロテオバクテリア綱に含まれるクラスター (Cluster nosM4) は、AとB両手法の堆肥化直後から存在していたことから、活性汚泥に由来し、HTPRTの熱処理に耐えて生残していた可能性もある。一方、*Achromobacter* 属をはじめとした β プロテオバクテリア綱に含まれるクラスター (Cluster nosM5, nosM6) は、AとB両手法において堆肥化開始後3週目以降から堆肥山中出现していたところから、土着の脱窒細菌であることが考えられる。*Achromobacter* 属や *Bordetella* 属などの β プロテオバクテリア綱に分類される脱窒細菌は、同サイトにおける堆肥化実験において堆肥化中期以降に優勢化する傾向にあることが *nosZ* の系統解析で明らかになっており、また

本研究において堆肥化中期以降の堆肥から単離された脱窒細菌のほとんどが β プロテオバクテリア綱に分類された (未発表データ)。これらの脱窒細菌が堆肥山からの N_2O 発生にどのような影響を与えるかどうかは未だ明らかではないが、本研究で成熟堆肥から単離された *Bordetella petrii* T-3 株や *Pusillimonas* sp. S-14 株は酸素存在下においても、脱窒による生育を行うことが可能であったことから (Ikeda-Ohtsubo et al., submitted), 含水率が低く酸素供給量が多い成熟堆肥のような条件において脱窒を行う能力を有する可能性は高い。

本研究において対象としたグラム陰性脱窒細菌の他にも、PWTP由来固形廃棄物の堆肥化プロセスではカビ等の菌類や脱窒能を有するグラム陽性細菌が存在していることを確認しており (未発表データ)、これらの脱窒反応が堆肥山からの N_2O 発生パターンに大きな影響を与えている可能性もある。カビやグラム陽性脱窒細菌の保有する脱窒関連遺伝子はデータベースが乏しく多様性が高いため共通プライマーの構築や特異的検出が困難であると考えられてきたが、最近ではカビの *nirK* 遺伝子が N_2O 発生ポテンシャルおよび分子系統と関連性があることを明らかにした研究もあり¹³⁾、このような新規の検出方法を用いた今後の発展が期待される。

6. おわりに

本稿では、PWTP由来固形廃棄物を堆肥化する際には、反応槽の活性汚泥由来の硝化・脱窒細菌が堆肥化開始後も生残し、堆肥山からの N_2O 発生パターンに大きな影響を与える可能性を考慮する必要がある、ということを示した。HTPRTによる堆肥試料および堆肥山の高温化が硝化細菌を死滅させ、脱窒の基質となる硝酸や亜硝酸の生成・蓄積とそれに伴う N_2O 発生が抑制された、

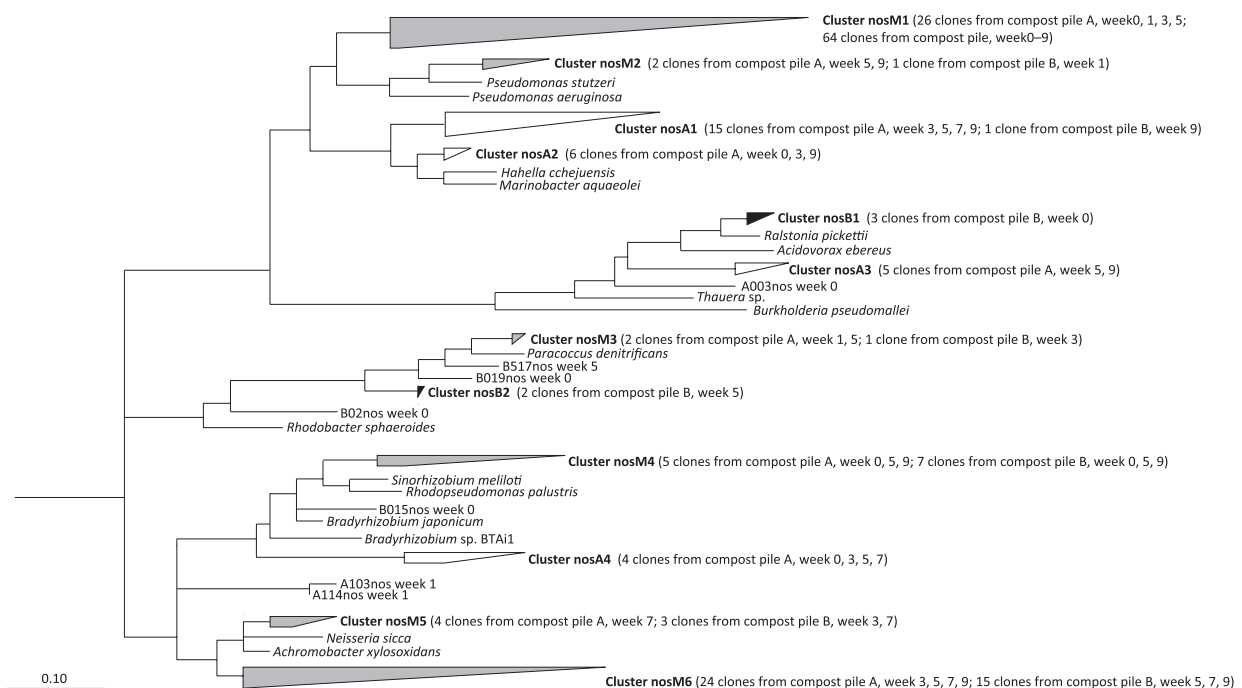


図8. PWTP由来の固形廃棄物の堆肥化プロセスに存在していた脱窒細菌が保有する *nosZ* 遺伝子の分子系統型を示した *nosZ* の系統樹

という本研究の成果は、ケーススタディであり、今後 N_2O 発生削減技術として応用化するためには、今後 HTPRT が堆肥の pH, 含水率, 酸素透過率, カビ等菌類の群集構造, 原料に含まれる有機物組成など様々な要素に与える影響を適切に評価し、堆肥中の無機窒素化合物を N_2O ではなく無害な N_2 として排出させる最適条件を追求する必要があるであろう。また、本研究では、堆肥化実験 (3 回) を沖縄県 (日本ライフセンター), 堆肥の物理化学的性質や遺伝子解析を宮城県 (東北学院大学) で行ったが、気候 (台風など), サンプル条件や輸送・保管条件が試料の均質性や性質に与えた影響によるデータのばらつきが大きく、3 回の実験に共通するエビデンスを見つけることが大変困難であった。また、現場の堆肥山に亜硝酸検出用の試験紙を差し込んだところ、堆肥山の表面および内部の両方で 100 mg/kg の亜硝酸濃度が検出されたにも関わらず、それをサンプリングして研究室に持ち帰った堆肥にほとんど亜硝酸が検出されなかったこともあり、研究室のデータから現場のデータを解釈することが非常に困難であることを実感した。このため、堆肥プロセスの N_2O 発生削減技術の開発には堆肥の物理化学的性状や無機窒素化合物量の測定を現地でモニタリングできることが重要であり、それを踏まえたパイロット試験のデザインや現場と研究室の協力体制が必要になると考えられる。

HTPRT は、 N_2O 発生量を抑制するだけではなく、事業所ごとの低コスト低エネルギー廃棄物処理の実現化、密閉化アンモニアストリップングによる窒素化合物の回収など、多方面の環境負荷低減化に利用可能な技術である⁹⁾。前項でも触れたが、国内で発生する産業廃棄物は廃水処理における余剰汚泥が約 43.4% (1 億 6,464 万トン) を占め、それに続くのは動物のふん尿 (約 8,543 万トン, 22.5%) である⁸⁾。これらの処理を効率化、減容化するためには、HTPRT をはじめとした新しい発想の堆肥化技術の開発と発展が必須であり、この度の日本農芸化学会 2015 年度岡山大会における環境バイオテクノロジー学会共催シンポジウムのような研究分野を超えた活動が、情報交換や新しい発想の生まれる場として今後も継続していくことを願っている。

文 献

- World Meteorological Organization (世界気象機関) 編. 2014. WMO Greenhouse Gas Bulletin No.10, The state of greenhouse gases in the atmosphere using global observations through 2013. http://www.wmo.int/pages/prog/arep/gaw/ghg/documents/GHG_Bulletin_10_Nov2014_EN.pdf
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) 編. 2007. Climate Change 2007: Synthesis report: Contribution of Working Groups I, II, and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 温室効果ガスインベントリオフィス (GIO) 編. 2015. 日本国温室効果ガスインベントリ報告書. 地球環境研究センター. http://www-gio.nies.go.jp/aboutghg/nir/2015/NIR-JPN-2015-v3.0_J_web.pdf
- Bernal, M.P., J.A. Alburquerque, and R. Moral. 2009. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresour. Technol.* 100: 5444–5453.
- Yamada, T., K. Miyauchi, H. Ueda, Y. Ueda, H. Sugawara, Y. Nakai, and G. Endo. 2007. Composting cattle dung wastes by using a hyperthermophilic pre-treatment process: characterization by physicochemical and molecular biological analysis. *J. Biosci. Bioeng.* 104: 408–415.
- 山田剛史, 宮内啓介, 上田裕一, 上田英代, 遠藤銀朗. 2007. 有機資源の循環利用に必要な環境保全型コンポスト製造技術の開発. *環境バイオテクノロジー学会誌.* 7: 111–117.
- 進藤絵里香, 大坪和香子, 上田裕一, 上田英代, 宮内啓介, 遠藤銀朗. 2011. コンポスト製造過程において発生する亜酸化窒素の削減に関与する脱窒細菌遺伝子の多様性と消長. *土木学会論文集 G (環境).* 67: 441–448.
- 環境省編. 2014. 平成 24 年度産業廃棄物の排出及び処理状況等. https://www.env.go.jp/recycle/sangyo_h24.pdf
- Yamada, T., S. Araki, W. Ikeda-Ohtsubo, K. Okamura, A. Hiraishi, H. Ueda, Y. Ueda, K. Miyauchi, and G. Endo. 2013. Community structure and population dynamics of ammonia oxidizers in composting processes of ammonia-rich livestock waste. *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 359–367.
- Maeda, K., S. Toyoda, R. Shimojima, T. Osada, D. Hanajima, R. Morioka, and N. Yoshida. 2010. Source of nitrous oxide emissions during the cow manure composting process as revealed by isotopomer analysis of and *amoA* abundance in betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 1555–1562.
- Yamada, T., A. Suzuki, H. Ueda, Y. Ueda, K. Miyauchi, and G. Endo. 2008. Successions of bacterial community in composting cow dung wastes with or without hyperthermophilic pre-treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81: 771–781.
- Heylen, K., B. Vanparys, D. Gevers, L. Wittebolle, N. Boon, and P. De Vos. 2006. Nitric oxide reductase (*norB*) gene sequence analysis reveals discrepancies with nitrite reductase (*nir*) gene phylogeny in cultivated denitrifiers. *Environ. Microbiol.* 9: 1072–1077.
- Maeda, K., A. Spor, V. Edel-Hermann, C. Heraud, M.-C. Breuil, F. Bizouard, S. Toyoda, N. Yoshida, C. Steinberg, and L. Philippot. 2015. N_2O production, a widespread trait in fungi. *Sci. Rep.* 5: 9697.