

# 博士論文概要

## 論文題目

Microbial community analysis in denitrification process under high salinity conditions and development of denitrification system for metal refinery wastewater

高塩濃度条件下での脱窒に関わる微生物の生態解析と貴金属回収工程廃水処理技術の開発

## 申請者

氏名

吉江	幸子
Sachiko	Yoshie

専攻・研究指導  
(課程内のみ)

応用化学専攻 化学工学研究

硝化反応，脱窒反応によってなされる生物学的窒素除去は，排水処理において非常に重要なプロセスの一つである。産業の多様化に伴い，様々な成分を含む産業廃水が排出される中，塩濃度の高い廃水については，耐塩性を持つ微生物を有効に活用した窒素除去技術が確立されておらず，生物学的窒素除去が困難であるとされてきた。そのため，これまでは，排水を希釈し，微生物への塩による阻害を緩和することによって，高塩濃度廃水の窒素除去プロセスが構築されてきた。しかしながら，実用化にあたり，希釈に要する水道水のコストがかかるのに加え総排水量が増加することや，高塩濃度廃水が排出される場所が淡水を得にくい条件にある等の問題を抱えている。よって，このような問題を解決し，高塩濃度廃水の窒素除去技術の高度化を目指すためには，まず，耐塩性を有し，しかも高い窒素除去能を有する微生物群を明らかにすることが重要である。一方，近年の分子生物学的手法の発達によって，培養操作を伴うことなく，様々な微生物が雑多に存在する複合微生物生態系の解析が可能になりつつある。窒素除去に関わる微生物については，硝化細菌についての研究が多くなされている。しかし，高塩濃度条件下での脱窒細菌の生態学的な知見を得た例はない。

上記の点を踏まえ，本論文では，高塩濃度産業廃水の一つであり，資源リサイクルの一環として貴金属を回収する際に排出される高塩濃度・高硝酸含有廃水（以下，製錬廃水と称する）の脱窒プロセスにおける微生物生態系を明らかにし，高塩濃度廃水の高度な脱窒技術の開発を行うことを目的とする。具体的には，各種分子生物学的手法を活用することによって，既存の脱窒プロセス内に存在する微生物を明らかにした上で，窒素除去性能の変動に伴う生態構造の変遷を定量的に追跡し，次に脱窒という機能に基づいた解析を行い，最終的に耐塩性を有する脱窒細菌を活用した処理技術の開発を行った。

本論文は6章より構成されている。以下に各章の概要を述べる。

第1章では，各種分子生物学的手法の特徴やそれらを活用した微生物生態解析の現状について，また，脱窒細菌の生態解析について過去の研究動向を整理して，本論文の研究背景をまとめるとともに，意義および目的を述べた。

第2章では，Polymerase chain reaction-Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) 法および平板培養法を用いて，水道水希釈された製錬廃水（塩濃度：1～3%程度）の脱窒プロセス内に存在する微生物群の解明を行った。16S rRNA 遺伝子に基づいた解析の結果，脱窒プロセス内に存在する微生物群は，*Cytophaga-Flabobacterium*，Gram positive bacteria，*Alcaligenes* sp.を含むβ-Proteobacteria，*Pseudomonas* sp.，*Marinobacter* sp.，*Colwellia* sp.，*Halomonas* sp.等を含むγ-Proteobacteriaから構成され，高塩濃度廃水の脱窒においては，特に多くの微生物が検出されたγ-Proteobacteriaが重要であることが示唆された。また，平板培養法とPCR-DGGE法によって検出された微生物を比較すると，平板培養法で検出された微生物の種類が少ないことから，本サンプルへの分子生物学的

手法の適用が有効であることが示された。さらに、これまでの製錬廃水の脱窒プロセスは、固定床型での開発がなされてきたが、メンテナンスの手間がかからず実用性の高い流動床型の適用を検討するため、両者の窒素除去性能および微生物群集構造の比較を行った。その結果、多くの微生物が生物膜の状態が存在していた固定床型の方が窒素除去率 97%という安定した脱窒性能を示したのに対し、浮遊微生物の多かった流動床型では、廃水組成の変動に伴う脱窒性能の変動が頻繁に見られた。PCR-DGGE 法による解析結果より、固定床型に比べ、流動床型では特定の微生物のみ優占化していることが推察された。

第 3 章では、第 2 章で得られた製錬廃水脱窒プロセス内に存在する各微生物群の 16S rRNA 遺伝子配列に基づき、各微生物群をそれぞれ特異的に検出することが可能な蛍光遺伝子プローブの設計を行った。第 2 章で、特に  $\gamma$ -*Proteobacteria* が高塩濃度廃水の脱窒において重要であることが示唆されたことから、*Pseudomonas* sp., *Colwellia* sp., *Halomonas* sp. の 3 つの微生物群をターゲットとした。その結果、*Colwellia* sp., *Halomonas* sp. にそれぞれ特異的な Clw844, Hlm474 プローブ、また、*Pseudomonas* sp. については、既に設計されていた PSMg に相補的な 16S rRNA の領域をずらすことによって、本研究で明らかになった微生物群も検出可能な PSMg437 プローブの設計に成功した。単離菌を用いて検出条件の最適化を行ったところ、それぞれの微生物群を蛍光顕微鏡下で検出することが可能となった。さらに、設計した 3 つの蛍光遺伝子プローブおよび *Cytophaga-Flabobacterium*, Gram positive bacteria,  $\beta$ -*Proteobacteria* にそれぞれ特異的な蛍光遺伝子プローブを用いて、各微生物群の計数を行い、廃水組成の変動に伴う各微生物群の変遷を定量的に解析した。その結果、廃水組成（特に塩濃度）が変化しても、固定床型では微生物群集構造および脱窒性能の変動が小さいのに対し、流動床型では微生物群集構造も脱窒性能も大きく変動した。このことから、安定した脱窒性能を得るためには、安定した微生物群集構造を維持する必要があると考えられた。

第 4 章では、脱窒に関わる機能遺伝子を指標とした微生物群集構造解析を行った。多くの種類の細菌が脱窒能を持つことが知られており、細菌分類の指標である 16S rRNA に基づいた系統解析のみでは、検出された微生物が脱窒細菌であるかどうか明らかにはできない。そこで、機能遺伝子を指標とすることにより、複合微生物系から脱窒という機能を持つ微生物のみを検出することが可能になる。本研究では、高塩濃度条件下での脱窒反応において、亜硝酸還元反応が律速となることから、亜硝酸還元酵素をコードする遺伝子 *nirS* および *nirK* に基づく微生物群集構造解析を行った。その結果、製錬廃水の脱窒プロセスにおいて脱窒を担っているのは、*nirK* を有する *Alcaligenes* sp., *nirS* を有する *Pseudomonas* sp., *Halomonas* sp., *Marinobacter* sp. 等であることが示唆された。また、高塩濃度条件下では、一般の排水処理プロセスや自然環境中に比べ、亜硝酸還元酵素遺伝

子の多様性が低いことが明らかとなったことから、このような条件下で脱窒を担う微生物は限られた微生物であることが考えられた。

第5章では、第2、4章で製錬廃水の脱窒を担っていると示唆された微生物群のうち、単離菌が得られているものに対して、塩濃度に対する増殖特性を調べた。その結果、水道水希釈された製錬廃水（塩濃度：1～3%）の脱窒プロセス内に存在する微生物群は、高塩濃度条件下で生育可能な細菌とそうでない細菌が混在して成り立っていることがわかった。したがって、塩濃度1～3%という条件下では、塩濃度の小さな変動が、微生物群集構造の大きな変動を引き起こし、プロセス全体の脱窒性能にも影響を及ぼしていることが推察された。そこで、本研究では、好塩性微生物のみが優占化するような条件を創り出すことによって、微生物生態系を安定させることができれば、安定な脱窒性能を維持することが可能なのではないかと考えた。窒素成分を含まない高塩濃度廃水（模擬廃水）で製錬廃水を希釈した系（塩濃度10%）と従来通り水道水で希釈した系（塩濃度1%）について、流動床型の脱窒プロセスを用いて、窒素除去性能の比較を行ったところ、塩濃度1%の系では、窒素負荷  $1.5\text{kg-N}/(\text{m}^3 \text{ day})$  で脱窒活性が損なわれたのに対し、塩濃度10%の系では、窒素負荷  $2.5\text{kg-N}/(\text{m}^3 \text{ day})$  でも安定した窒素除去性能を得ることに成功した。これらの系に対し、Terminal-Restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法により微生物群集構造の変遷のモニタリングを行った結果、塩濃度10%の系では好塩性微生物の *Halomonas* sp., *Marinobacter* sp. が顕著に優占化していることが確認された。さらに、高塩濃度廃水の脱窒を行う際に最適な塩濃度条件を明らかにするために、様々な塩濃度の廃水を流入させた脱窒プロセスの運転を行った。その結果、塩濃度4～10%の条件においては、*Halomonas* sp., *Marinobacter* sp. が優占化することにより、窒素負荷  $2.5\text{kg-N}/(\text{m}^3 \text{ day})$  で安定した窒素除去性能が得られることがわかった。このように、本研究では、廃水の塩濃度をできるだけ低くするという従来の技術から脱却し、高塩濃度廃水の窒素成分濃度のみを希釈することによって、好塩性微生物の特性を活用した高速脱窒プロセスが実現できることを示した。

第6章では、本論文の総括および展望を述べた。

以上、本論文では、各種分子生物学的手法を用いて、高塩濃度廃水の脱窒プロセスにおける微生物群集構造を種類と機能に基づいて明らかにした。また、解析結果を活用して、高塩濃度廃水の脱窒において新しいコンセプトに基づき、脱窒反応の高速化を可能とする新しい技術の提案を行った。これらの成果は、産業廃水の窒素除去技術開発のみならず微生物生態学の分野に大いに貢献するものである。

# 研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○ (1) (報文) <u>S. Yoshie</u>, N. Noda, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Inamori, Design of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and microbial community analysis in the denitrification process of a saline industrial wastewater treatment system, <i>FEMS Microbiology Letters</i>, 235, 183-189 (2004)</p> <p>○ (2) (報文) <u>S. Yoshie</u>, N. Noda, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Inamori, Salinity decreases nitrite reductase gene diversity in denitrifying bacteria of wastewater treatment systems, <i>Applied and Environmental Microbiology</i>, 70 [5], 3152-3157 (2004)</p> <p>○ (3) (報文) <u>S. Yoshie</u>, N. Noda, T. Miyano, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Inamori, Characterization of microbial community in nitrogen removal process of metallurgic wastewater by PCR-DGGE, <i>Water Science and Technology</i>, 46 [11-12], 93-98 (2002)</p> <p>○ (4) (報文) N. Noda, <u>S. Yoshie</u>, T. Miyano, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Inamori, PCR-DGGE analysis of denitrifying bacteria in a metallurgic wastewater treatment system, <i>Water Science and Technology</i>, 46 [1-2], 333-336 (2002)</p> <p>○ (5) (報文) <u>S. Yoshie</u>, N. Noda, T. Miyano, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Inamori, Microbial community analysis in the denitrification process of saline-wastewater by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and the cultivation methods, <i>Journal of Bioscience and Bioengineering</i>, 92 [4], 346-353 (2001)</p> <p>(6) (報文) 常田聡, 宮野知子, 小川知幸, <u>吉江幸子</u>, 平田彰, 太田有香, 磯部公信, 稲垣肇, 片山卓, 貴金属回収工程から排出される硝酸含有廃水の生物学的窒素除去, <i>日本水処理生物学会誌</i>, 37 [4], 141-149 (2001)</p>
講演	<p>国際学会</p> <p>(1) <u>S. Yoshie</u>, N. Noda, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Inamori, Molecular diversity of nitrite reductase genes (<i>nirK</i> and <i>nirS</i>) in the denitrification reactor of saline wastewater treatment system, 10th International Symposium on Microbial Ecology, Cancun, 22-27, August, 2004</p> <p>(2) <u>S. Yoshie</u>, N. Noda, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Inamori, Characterization of denitrifying bacteria in saline and nitrate containing industrial wastewater treatment system based on 16S rRNA and nitrite reductase gene, 103rd American Society for Microbiology General meeting, Washington D. C., 18-23, May, 2003</p> <p>(3) <u>S. Yoshie</u>, N. Noda, T. Miyano, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Inamori, Quantitative analysis of microbial community in the denitrification process of saline-wastewater treatment system using new 16S rRNA- targeted oligonucleotide probes, 7th Simposium on Bacterial Genetics and Ecology, Bergen, 15-19, June, 2002</p> <p>(4) <u>S. Yoshie</u>, N. Noda, T. Miyano, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Inamori, Characterization of microbial community in nitrogen removal process of metallurgic wastewater by PCR-DGGE, Asian Waterqual 2001, Fukuoka, 12-14, September, 2001</p> <p>(5) <u>S. Yoshie</u>, N. Noda, T. Miyano, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Inamori, Characterization of microbial community in nitrogen removal process of metallurgic wastewater by cultivation and non-cultivation methods, 9th International Symposium on Microbial Ecology, Amsterdam, 16-31, August, 2001</p> <p>(6) N. Noda, <u>S. Yoshie</u>, T. Miyano, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Inamori, PCR-DGGE analysis of denitrifying bacteria in a metallurgic wastewater treatment system, 3rd IWA International Specialized Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, Roma, 13-15, June, 2001</p>

# 研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>（国際学会続き）</p> <p>(7) N. Noda, <u>S. Yoshie</u>, T. Miyano, S. Tsuneda, A. Hirata, Y. Inamori, Application of PCR-DGGE technique to analysis of microbial population in metallurgic wastewater treatment system, 5th International Symposium on Environmental Biotechnology, Kyoto, 9-13, July, 2000</p> <p>国内学会</p> <p>(1) <u>吉江幸子</u>, 常田聡, 平田彰, 井坂和一, 角野立夫, 稲森悠平, 高分子ゲルに包括固定化された硝化細菌群の低温条件下における挙動, 第 38 回日本水環境学会年会, 北海道, 2004 年 3 月</p> <p>(2)大坂利文, <u>吉江幸子</u>, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, SIP 法によって明らかになった活性汚泥中のアクティブな脱窒細菌 -メタノールと酢酸を添加した場合の違い-, 第 38 回日本水環境学会年会, 北海道, 2004 年 3 月</p> <p>(3) <u>吉江幸子</u>, 野田尚宏, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 亜硝酸還元酵素遺伝子 (<i>nirS</i>, <i>nirK</i>) に基づいた高塩・高硝酸産業廃水処理プロセス内の微生物群集構造解析, 日本水処理生物学会第 40 回大会, 熊本, 2003 年 11 月</p> <p>(4)大坂利文, <u>吉江幸子</u>, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 基質資化特性と亜硝酸還元酵素遺伝子に基づいた排水処理微生物の群集構造解析, 日本水処理生物学会第 40 回大会, 熊本, 2003 年 11 月</p> <p>(5) <u>吉江幸子</u>, 野田尚宏, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 高塩濃度産業廃水の脱窒プロセスにおける微生物群集構造解析 - 亜硝酸還元酵素遺伝子 (<i>nirS</i>, <i>nirK</i>) の多様性-, 日本微生物生態学会第 19 回大会, 大阪, 2003 年 10 月</p> <p>(6) 大坂利文, <u>吉江幸子</u>, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, Stable Isotope Probing (SIP) 法を利用した脱窒細菌群集構造解析, 日本微生物生態学会第 19 回大会, 大阪, 2003 年 10 月</p> <p>(7) <u>吉江幸子</u>, 野田尚宏, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 16S rDNA および <i>nirS</i> に基づく脱窒細菌のポピュレーション解析, 化学工学会第 68 回年会, 東京, 2003 年 3 月</p> <p>(8) <u>吉江幸子</u>, 野田尚宏, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 混合状態の異なる脱窒リアクターに存在する亜硝酸還元酵素遺伝子群の比較解析, 第 37 回日本水環境学会年会, 熊本, 2003 年 3 月</p> <p>(9) 大坂利文, <u>吉江幸子</u>, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 分子生物学的手法を導入した脱窒細菌の基質資化特性に基づいた群集構造解析, 第 37 回日本水環境学会年会, 熊本, 2003 年 3 月</p> <p>(10) <u>吉江幸子</u>, 野田尚宏, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 高塩分含有産業廃水からの脱窒プロセスにおける亜硝酸還元酵素遺伝子の多様性解析, 日本水処理生物学会第 39 回大会, 大宮, 2002 年 11 月</p> <p>(11) 大坂利文, <u>吉江幸子</u>, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 分子生物学的手法を用いた排水処理プロセスにおける脱窒細菌の解析, 日本水処理生物学会第 39 回大会, 大宮, 2002 年 11 月</p> <p>(12) <u>吉江幸子</u>, 野田尚宏, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 分子生物学的手法と培養法による産業廃水脱窒プロセス内微生物群集構造解析の比較, 第 36 回日本水環境学会年会, 岡山, 2002 年 3 月</p> <p>(13) 野田尚宏, <u>吉江幸子</u>, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 亜硝酸還元酵素 NirS に基づいた微生物群集構造解析, 第 36 回日本水環境学会年会, 岡山, 2002 年 3 月</p> <p>(14) 小川知幸, <u>吉江幸子</u>, 常田聡, 平田彰, 太田有香, 片山卓, 高濃度硝酸含有廃水の窒素除去に有効な脱窒微生物群 -微生物の多様性は必要か-, 第 36 回日本水環境学会年会, 岡山, 2002 年 3 月</p> <p>(15) <u>吉江幸子</u>, 野田尚宏, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 高塩濃度産業廃水の脱窒プロセスにおける微生物群集構造解析 -分子生物学的手法および培養法による検出結果の比較-, 日本微生物生態学会第 36 回大会, 静岡, 2001 年 11 月</p>

# 研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>(16) <u>吉江幸子</u>, 野田尚宏, 宮野知子, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 分子生物学的手法と培養法を用いた産業廃水処理プロセスにおける微生物群集構造の比較解析, 日本水処理生物学会第 38 回大会, 神戸, 2001 年 11 月</p> <p>(17) 野田尚宏, <u>吉江幸子</u>, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 亜硝酸還元酵素の多様性に基づいた産業排水処理プロセス内汚泥の微生物群集構造解析, 日本水処理生物学会第 38 回大会, 神戸, 2001 年 11 月</p> <p>(18) <u>吉江幸子</u>, 野田尚宏, 宮野知子, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 難処理性産業廃水の脱窒プロセスに有効な微生物群集構造の追跡, 第 35 回日本水環境学会年会, 岐阜, 2001 年 3 月</p> <p>(19) 野田尚宏, <u>吉江幸子</u>, 宮野知子, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 分子生物学的手法を用いた好塩性脱窒細菌群の多様性解析, 第 35 回日本水環境学会年会, 岐阜, 2001 年 3 月</p> <p>(20) <u>吉江幸子</u>, 野田尚宏, 宮野知子, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 蛭江美孝, 高塩製錬廃水処理システムの微生物群集構造に関する分子生物学的評価・解析, 日本水処理生物学会第 37 回大会, 神奈川, 2000 年 11 月</p> <p>(21) 野田尚宏, <u>吉江幸子</u>, 宮野知子, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 高塩分含有排水の生物学的脱窒プロセスにおける微生物群集構造解析, 日本微生物生態学会第 16 回大会, 茨城, 2000 年 11 月</p> <p>(22) 野田尚宏, <u>吉江幸子</u>, 宮野知子, 蛭江美孝, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 好塩性細菌群の脱窒活性に関する分子生物学的評価・解析, 日本水処理生物学会第 37 回大会, 神奈川, 2000 年 11 月</p> <p>(23) 常田聡, 野田尚宏, <u>吉江幸子</u>, 宮野知子, 平田彰, 稲森悠平, PCR-DGGE 法による高塩濃度産業廃水処理プロセス内の微生物群集構造解析, 化学工学会第 33 回秋季大会, 静岡, 2000 年 9 月</p> <p>(24) 野田尚宏, <u>吉江幸子</u>, 星野辰彦, 三浦英智, 常田聡, 平田彰, 生田創, 蛭江美孝, 松村正利, 稲森悠平, 生物膜法を用いた排水処理と有用生物の認識技術, 第 3 回日本水環境学会シンポジウム, 大阪, 2000 年 9 月</p> <p>(25) <u>吉江幸子</u>, 野田尚宏, 宮野知子, 蛭江美孝, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 分子生物学的手法による製錬廃水処理装置内の微生物群集構造解析, 化学工学会つくば大会, 茨城, 2000 年 7 月</p> <p>(26) 稲森悠平, <u>吉江幸子</u>, 野田尚宏, 宮野知子, 常田聡, 平田彰, 蛭江美孝, PCR-DGGE 法を用いた生物処理反応槽内における微生物群集構造の評価・解析, 第 34 回日本水環境学会年会, 京都, 2000 年 3 月</p> <p>(27) 宮野知子, <u>吉江幸子</u>, 野田尚宏, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 硝酸を含む産業廃水の生物学的脱窒処理および PCR-DGGE 法による微生物相の解析, 化学工学会第 65 回年会, 東京, 2000 年 3 月</p> <p>(28) 野田尚宏, 蛭江美孝, <u>吉江幸子</u>, 宮野知子, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平, 分子生物学的手法を用いた排水処理プロセスにおける微生物群集構造の解析, 第 7 回生物利用新技術研究シンポジウム論文集, 173-177, 大阪, 2000 年 1 月</p> <p>(29) 稲森悠平, <u>吉江幸子</u>, 野田尚宏, 常田聡, 平田彰, 宮野知子, 蛭江美孝, PCR-DGGE 法を用いた排水処理プロセスにおける微生物群集構造の評価・解析, 日本水処理生物学会第 36 回大会, 大阪, 1999 年 11 月</p>