

博士論文審査報告書

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

2005年 2月

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，希釈水のコストが増大す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希釈水を得にくい条件にある等の問題を抱えている。したがって，以上の問題を解決し，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。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している。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，次に脱窒反応に関与する機能遺伝子に基づいた生態解析を行い，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ている。

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，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，意義および目的を明確にしている。

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，水道水で希釈した製錬廃水（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ている。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-Flavobacterium*，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 が重要であることを明らかにしている。さらに，これまでの製錬廃水の脱窒プロセスは，固定床型嫌気槽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攪拌型嫌気槽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てい

る。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嫌気槽の方が窒素除去率 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攪拌型嫌気槽では、廃水組成の変動に伴う脱窒性能の変動が頻繁に見られることを見出している。また、PCR-DGGE 法による解析結果より、固定床型嫌気槽に比べ、攪拌型嫌気槽では特定の微生物のみ優占化していると推察している。このように、本研究成果は、これまでその生態が不明瞭であった高塩濃度廃水の脱窒に関わる微生物群を分子生物学的手法により明らかにした点で、排水処理分野のみならず、環境微生物学の分野からも高く評価できる。

第 3 章では、第 2 章において、特に γ -*Proteobacteria* が高塩濃度廃水の脱窒において重要であることが示されたことから、*Pseudomonas* sp., *Colwellia* sp., *Halomonas* sp. の 3 つの微生物群をターゲットとし、それぞれの微生物群に特異的な PSMg437, Clw844, Hlm474 プローブの設計を試み、成功している。単離菌を用いて検出条件の最適化を行うことで、それぞれの微生物群を蛍光顕微鏡下で検出することを可能としている。さらに、設計した 3 つの蛍光遺伝子プローブおよび *Cytophaga-Flavobacterium*, Gram positive bacteria, β -*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ている。その結果、廃水組成（特に塩濃度）が変化しても、固定床型嫌気槽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、攪拌型嫌気槽では微生物群集構造も脱窒性能も大きく変動することを明らかにしている。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ことを見出している。このように、高塩濃度廃水の脱窒に関わる微生物群を特異的に検出する技術の開発は、廃水処理微生物生態系を明らかにする上で重要なツールと成り得ることから、高く評価できる。

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に取り組んでいる。一般に自然界では多種多様な細菌が脱窒能を持つと言われており、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を明らかにすることができない。これに対して、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。本論文では、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ている。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. 等であることを明らかにしている。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を明らかにし、一部の限られた微生物のみが高塩濃度条件下で脱窒を担うことを示唆している。

第5章では、製錬廃水（塩濃度1~3%）の脱窒プロセス内において、好塩性微生物と非好塩性微生物が混在しているために微生物生態系が不安定であると考え、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であると提案し、実証している。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、活性汚泥を用いた攪拌型嫌気槽で脱窒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 $2.5\text{kg-N}/(\text{m}^3 \text{ day})$ でも安定した脱窒性能を得ることに成功している。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を確認している。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結果、塩濃度4~10%の条件においては、*Halomonas sp.*, *Marinobacter sp.* が優占化し、従来の希釈水系より高い窒素除去性能が得られることを明らかにしている。このように、本論文では、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、好塩性微生物の特性を活用した高速脱窒プロセスを実現しており、高塩濃度産業廃水の処理技術に新しい活路を切り開いたという点で極めて意義深い。

第6章では、本論文の総括および展望を述べている。

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ている。また、解析結果を活用して、高塩濃度廃水の脱窒において脱窒反応の高速化を可能とする新しい技術の提案を行い、実現可能であることを示している。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と期待できる。よって本論文は、博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。

2005年1月

審査員（主査）	早稲田大学教授	工学博士（早稲田大学）	平田 彰
	早稲田大学教授	工学博士（早稲田大学）	酒井清孝
	早稲田大学教授	工学博士（早稲田大学）	平沢 泉
	早稲田大学助教授	工学博士（東京大学）	常田 聡
	独立行政法人国立環境研究所室長		
		理学博士（東北大学）	稲森悠平