

発表番号 22

耐塩性を有する硝化・脱窒細菌の獲得と産業廃水処理への適用

助成研究者：常田 聡（早稲田大学理工学部）

共同研究者：平田 彰（早稲田大学理工学部）

稲森悠平（国立環境研究所）

湖沼・内湾などの閉鎖性水域の富栄養化を防止するため、産業廃水中の窒素濃度に関わる規制が年々強化されている。産業廃水の中でも水産加工廃水や製錬廃水などは塩濃度が高く、微生物による排水処理効率が低いことが知られている。これらの排水中に含まれる高濃度のアンモニア・硝酸などを取り除くためには高塩濃度下で活性を示す脱窒細菌の利用が必須である。

従来、生物学的廃水処理プロセスにおいては、反応槽をブラックボックスとして扱い、微生物の挙動や群集構造については具体的な解析がほとんど行われていなく、排水の入力出力操作などにより運転条件を決定していた。処理プロセスの更なる高度効率化・省エネルギー・低コスト化を考慮すると、処理に携わる微生物個体群の変遷と、それら微生物の活性および排水処理特性を結びつけ、工学的に評価・解析することが重要であると考えられる。

高塩濃度産業廃水の一つである製錬廃水について、塩濃度条件を変えて窒素除去性能を評価した結果、塩濃度が4~10%の範囲で脱窒速度の向上が見られることがわかった。一般的に高塩濃度条件下では脱窒性能が低下するとされており、本研究のように低塩濃度条件下に比べて高塩濃度条件下の方が高い除去速度を示すという報告は初めてである。この原因として高塩濃度条件下で優占化している細菌群が特に高い脱窒能力を有する可能性が考えられた。そこで、異なる塩濃度条件下での微生物叢を分子生物学的手法（クローニング法，シーケンス解析，T-RFLP法）を用いて評価・解析した結果、高塩濃度条件下で γ -Proteobacteria に属する *Marinobacter* 属および *Halomonas* 属が選択的に優占化し、特に *Halomonas* 属が脱窒性能の安定化に繋がる働きを担っている可能性があることが示唆された。

21

助成番号 0421

耐塩性を有する硝化・脱窒細菌の獲得と産業廃水処理への適用

助成研究者： 常田 聡（早稲田大学理工学部）

共同研究者： 平田 彰（早稲田大学理工学部）

稲森悠平（国立環境研究所）

1. 研究目的

湖沼・内湾などの閉鎖性水域の富栄養化を防止するため、窒素に関わる排水規制が年々強化されている。現在この規制は濃度規制であるが、今後総量規制へと移行する動きを見せており、産業廃水中からの窒素除去技術の確立が早急に求められている。産業廃水の中でも水産加工廃水や製錬廃水などは塩濃度が高く、微生物による排水処理効率が低いことが知られている。水産加工廃水の場合、希釈のための淡水の獲得が困難であり、塩濃度を下げて排水処理を行うことは不可能に近い。これらの排水中に含まれる高濃度のアンモニア・硝酸などを取り除くためには高塩濃度下で活性を示す脱窒細菌の利用が必須である。

従来、生物学的廃水処理プロセスにおいては、反応槽をブラックボックスとして扱い、微生物の挙動や群集構造については具体的な解析がほとんど行われていなく、排水の入力出力操作などにより運転条件を決定していた。処理プロセスの更なる高度効率化・省エネルギー・低コスト化を考慮すると、処理に携わる微生物個体群の変遷と、それら微生物の活性および排水処理特性を結びつけ、工学的に評価・解析することが重要であると考えられる。しかしながら、既存の技術で単離・培養できる微生物は全体の数%に過ぎず、微生物の挙動や群集構造全体を把握することは困難であるため、単離・培養を必要としない分子生物学的手法の導入が重要な位置づけとなってくる。

われわれはこれまでに高塩濃度産業廃水の一つである製錬廃水について高い窒素除去性能を得ることに成功している。本研究の目的は、異なる塩濃度条件下にある排水処理システムの中の微生物叢を分子生物学的手法（クローニング法，シーケンス解析，T-RFLP 法など）を用いて評価・解析することによって、高塩濃度条件下で高い脱窒能を有する有用微生物を明らかにすることである。

2. 実験方法

2.1 塩濃度を振った連続脱窒処理実験

容積 0.5 L の攪拌型流動床を用い、供給液として製錬廃水を水道水で 8 倍に希釈し、

塩の添加量を変えることで塩濃度を振って実験を行った。製錬廃水は廃水の採取時期また貴金属回収工程の違いによって排水中の成分が異なるため廃水中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度も変化するが、条件を一定に保って実験を行うため $\text{NO}_3\text{-N}$ の不足分は NaNO_3 を添加して供給液の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度は $1,500 \text{ g/m}^3$ で統一した。炭素源として C/N 比 1.5 となるよう酢酸ナトリウムを添加し、また微生物の活性を維持するため 20 g/m^3 の $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ を添加した。また Na_2SO_4 の添加量を調節することで塩濃度を各系ごとに振って実験をおこなった。実験条件をまとめたものを Table 1 に示す。

Table 1 Conditions for continuous denitrification experiment

Run	$\text{NO}_3\text{-N}[\text{g/m}^3]$	$\text{CH}_3\text{COONa-C}[\text{g/m}^3]$	Salt conc. [%]
1	1,500	2,250	1
2			4
3			7
4			10
5			13

種汚泥にはパイロットスケールの嫌気・好気循環型連続処理システムの嫌気槽(50 L)から採取した汚泥、すなわち Table 1 の Run 1 と同じ条件(馴養中の廃水の成分は異なる)で3年間馴養したものをを用いた。また操作条件として菌体の流出をなるべく抑えるため反応槽の後段に沈降槽を設け、1日1回そこから汚泥を返送することで反応槽内に汚泥を高密度に保持するよう努め、連続的に処理をおこなった。なお実験自体は窒素負荷 $0.5 \text{ kg-N}/(\text{m}^3 \cdot \text{day})$ から始めて処理が安定した際には供給液の窒素濃度は一定に保ったまま供給液の流量を早めることで段階的に窒素負荷を上げた。

塩濃度および微生物群集構造の変化、脱窒性能の関係を評価・解析するために、Fig. 1 に示した装置を用いて塩濃度をふり(1%, 4%, 7%, 10%, 13%), 連続脱窒処理実験を行った。なお、炭素源として酢酸ナトリウムを用い、C/N 比を 1.5 とした。

2.2 DNA の抽出および 16S rRNA 遺伝子の検出

各系より汚泥をサンプリング・濃縮し、回収したチューブより ISOPLANT(NIPPON GENE)を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA に対して全真正細菌を検出するため、16S rRNA 遺伝子の全真正細菌に特異的な領域をターゲットとしたプライマー、Eub341f, Univ907r を用いて PCR (25 ng DNA, 10 μM primer, 2 mM deoxynucleoside triphosphate, 25 mM MgCl_2 , 5 U rTaq DNA polymerase (TOYOBO), rTaq 用 5 μL 10x PCR buffer, 50 μL に純水でメスアップ)を行った。PCR 条件は (94°C, 2 min), (94°C, 30 sec; 53°C, 30 sec; 72°C, 40 sec) $\times 30 + (72^\circ\text{C}, 2 \text{ min})$ とした。

2.3 クローニングおよび系統解析

各サンプルの 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした PCR 増幅産物について、

QIAGEN PCR cloning Kit (QIAGEN) を用いてサブクローニングを行った。得られたコロンニーを Insert check-Ready-solution (TOYOBO) に懸濁 , 再増幅を行った。得られた PCR 増幅産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製し , ABI PRISM BigDye v3.1 Terminator (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行った。サイクルシーケンス条件は(94°C, 10 sec; 50°C, 5 sec; 60°C, 4 min)×25 とした。得られたサンプルを SigmaSpin Post-Reaction Clean-Up Columns (Sigma) を用いて基質除去を行い , シーケンシング (ABI PRISM 3100-Avant DNA Sequencing System, Applied Biosystems) を行った。さらに , DDBJ (DNA Data Bank of Japan) の BLAST 検索を用いてそれぞれのクローンに対して相同性の高い菌の検索を行い , 得られたデータを基に DDBJ の CLUSTAL W および Tree View を用いて系統樹を作成した。

2.4 T-RFLP 法による微生物叢のモニタリング

各サンプルを濃縮し , 回収したチューブより 2.2 と同様に DNA を抽出し , 全真正細菌を検出するため , 16S rRNA 遺伝子の全真正細菌に特異的な領域をターゲットとしたプライマー , Eub8f , Univ927r を用いて 2.2 と同様に PCR を行った。なお , この T-RFLP に使用したプライマー Euf8f は 6-carboxyfluorescein により 5' 末端を蛍光標識した。得られた増幅産物を精製・濃縮後 , 制限酵素 *Hha* , *Msp* , *Xsp* (TAKARA) を用いて反応 (37°C , 4 h) を行い , 増幅産物の断片化を行った。さらにホルムアミドをおよび Gene Scan™ -500LIZ™- SizeStandard(Applied Biosystems) を加え , DNA の変性 (94°C , 5 min) を行い , シーケンサーを用いて T-RFLP 法による解析を行った。

3. 結果および考察

3.1 異なる塩濃度条件下における脱窒性能

異なる塩濃度条件下における脱窒性能を比較した。代表例として塩濃度 1% および 10% の系 (すなわち Run 1 と Run 4) における NO_x-N 除去率のグラフを Fig. 1 に示す。Run 1 は種汚泥馴養時と同じ塩濃度 1% で連続処理実験を行ったものである。窒素負荷を上げる各段階で直後に NO_x-N 除去率が低下し , 窒素負荷 1.25 kg-N/(m³·day) に上げた際には NO_x-N 除去率が 19% まで悪化した , 15 日で 84% まで回復した。しかし安定して処理がおこなわれたのはここままで , 窒素負荷 1.5 kg-N/(m³·day) まで上げたところ処理が次第に悪化し , 210 日目には NO_x-N 除去率が 5% 以下まで低下した。一方 , 塩濃度 10% で連続処理実験を行った Run 4 は大幅に塩濃度を上げた初期は処理が安定しなかったものの , 次第に回復し , 20 日目には 100% の NO_x-N 除去率を達成した。その後窒素負荷 1.25 kg-N/(m³·day) に上げた際に処理が悪化し一時は NO_x-N 除去率は 46% まで下がったが , 30 日程度で処理は再び安定し最終的には製錬廃水を

実際に処理するために必要な実用域窒素負荷 $2.5 \text{ kg-N}/(\text{m}^3 \cdot \text{day})$ での安定した処理を得ることができた。

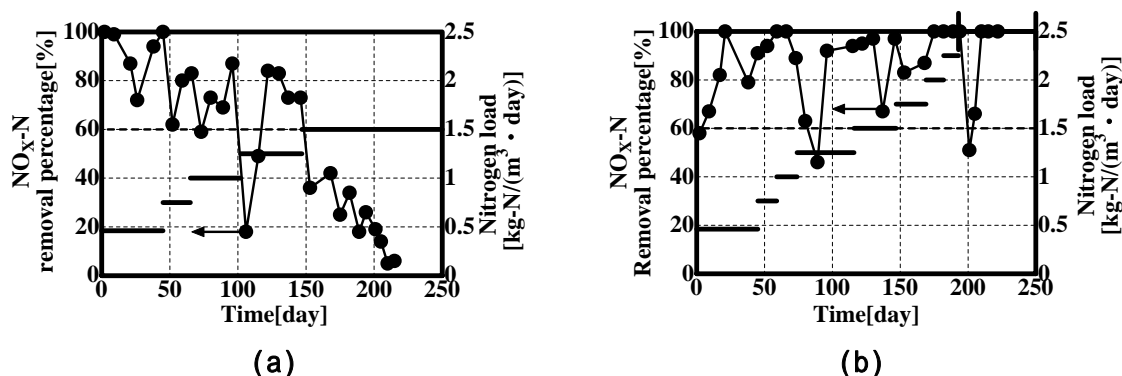


Fig.1 Time course of NO_x-N removal percentage in continuous denitrification experiment. Closed circles: NO_x-N removal percentage; Line: Nitrogen load. (a) Run 1 (salt conc. 1%); (b) Run 4 (salt conc. 10%).

これまで Glass ら¹⁾は SBR を用いた実験で段階的に塩濃度を上げることでイオン強度 3.0 の条件下でも脱窒処理が起こることを確認しており,また Vredendregt ら²⁾は USB (Upflow Sludge Blanket) を用いた連続脱窒処理実験で NaCl 濃度を 4.5%まで上げて処理は可能と報告している。また脱窒速度でみれば Carrera ら³⁾は Na₂SO₄ 濃度 1.5 ~ 2%で $2.3 \text{ kg-N}/(\text{m}^3 \cdot \text{day})$ の脱窒速度を得ており, Vredendregt ら²⁾は NaCl 濃度 3.6%で窒素負荷 $0.96 \text{ kg-N}/(\text{m}^3 \cdot \text{day})$ において 80%以上の硝酸態窒素除去率を得ている。しかしながら, いずれの報告においても高塩濃度条件下の方が脱窒性能が低下するとされていて, 本研究のように低塩濃度条件下に比べて高塩濃度条件下の方が高い除去速度を示すという報告はない。この原因として優占化している細菌群が全く異なる可能性が考えられる。

3.2 クローンライブラリーの作成

微生物叢の経時的な変化を T-RFLP 法を用いて解析する際にピークの帰属を明らかにしておいた方がよいという観点から, 初期汚泥のクローンライブラリーを作成した。その結果を Fig. 2 に示す

Fig. 2 に示すように, 塩濃度 1%の製錬廃水で 3 年間馴養した汚泥中には主に α , β , γ -Proteobacteria および *Cytophaga-Flavobacteria* 等を確認することができた。また, 特にそれぞれの微生物群に注目して相同性を整理した結果, α -Proteobacteria としては *Roseobacter* 属および *Rodobaca* 属, β -Proteobacteria としては *Alcaligenes* 属および *Thauera* 属, γ -Proteobacteria としては *Halomonas* 属および *Pseudomonas* 属, *Marinobacter* 属などが優占化しており, 製錬廃水を用いて馴養することで好塩性微生物

物を含む微生物群が優占化することが確認された。

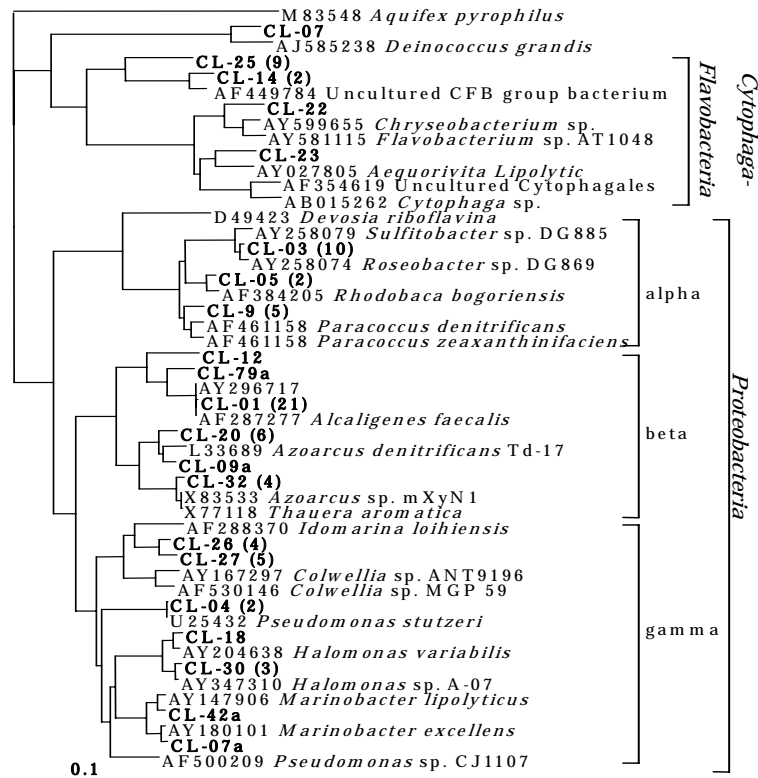


Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences. Abbreviations for the phylogenetic tree: CL, clones from Run1 on day 21. Sequences which had a similarity more than 97 % were considered to belong to the same group and the sample numbers are shown in the brackets.

3.3 T-RFLP 法による微生物叢のモニタリング

塩濃度 1%および 10%の系内の汚泥を回収し (21, 38, 66, 96, 115, 130 日目), 制限酵素 *Hha* を用いて T-RFLP を行った。その結果を Fig. 3 に示す。水質データ (Fig. 1) と T-RFLP の結果を照らし合わせてみると, 低塩濃度条件下 (塩濃度 1%) で窒素負荷を上昇させると共に処理の悪化した (i)Run 1 では, 複数のピークが確認できる。一方, 高塩濃度条件下 (塩濃度 10%) で窒素負荷を上昇させているにもかかわらず, 高い脱窒処理効率を安定に保っていた (ii)Run 4 では, γ -Proteobacteria に帰属する一本の鋭いピークが確認でき, 高塩濃度条件下で安定した脱窒処理を担う微生物種が優占化したと示唆された。

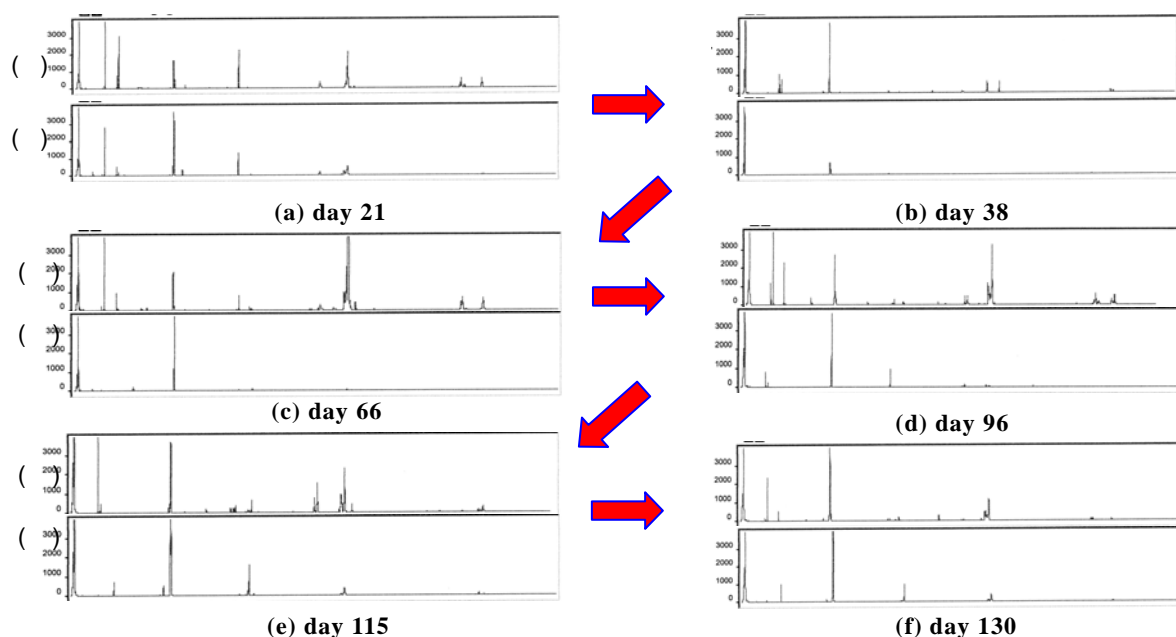


Fig. 3 Results of T-RFLP analysis using *HhaI*. Numbers for T-RFLP: (i) 1 % salt concentration; (ii) 10 % salt concentration.

3.4 高塩濃度条件下での優占種の同定

Fig. 1 および Fig. 3 より塩濃度 10% の系では処理も良好でかつ微生物叢の変動も安定していることが確認できたため、130 日目の汚泥サンプルを用いてクローニングおよび系統解析を行い、脱窒処理が良好な高塩濃度条件下で優占する菌種の同定を行った。その結果を Fig. 4 に示す。Fig. 4 に示すように、高塩濃度条件下の処理槽内に主に *γ-Proteobacteria* および CFB group (Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides), Low G+C Gram Positive (*Bacillus/Clostridium*) 等で構成されていることが確認できた。これらの菌種は好塩性で知られており、塩湖や海から検出されている報告がされている。特に *γ-Proteobacteria* が 74% と高い優占率を示していることが分かり、これらの菌種が高塩濃度条件下で優占していることが示唆された。さらに詳しく、属レベルでの優占種を確認すると、*γ-Proteobacteria* に属する *Marinobacter* 属が 30%、*Halomonas* 属が 40% と高い優占率を示していることが確認できた。

3.5 塩濃度による微生物叢の比較

上述の結果より、微生物種が選択的に優占することで脱窒処理が良好になっていることから、微生物の多様性と脱窒性能に関連性があることが示唆された。そこで、塩濃度および微生物群集構造の変化、脱窒性能の関係を評価・解析するために、塩濃度をふった各系 (1%、4%、7%、10%、13%) の微生物の経時的变化を T-RFLP 法を用いて解析した。その結果を Fig. 5 および Table 2 に示す。

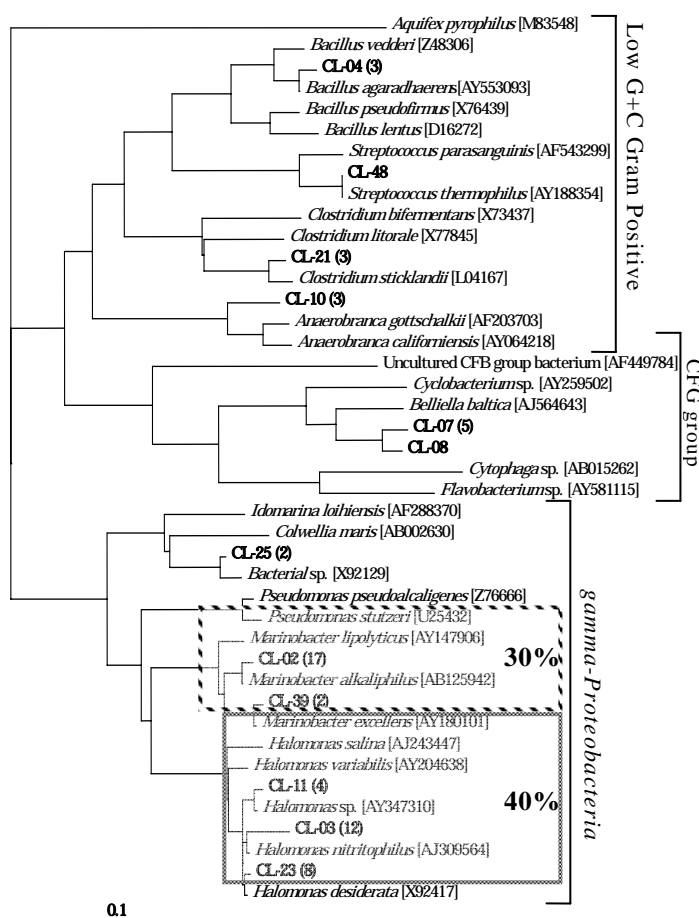


Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences. Abbreviations for the phylogenetic tree: CL, clones from samples of day 130. Sequences which had a similarity more than 97 % were considered to belong to the same group and the sample numbers are shown in brackets.

Table 2 Dominance of γ -Proteobacteria for each salt concentration sample

Salt conc. [%]	Dominance of γ -Proteobacteria [%]
1	15.40
4	34.35
7	86.27
10	81.76
13	89.96

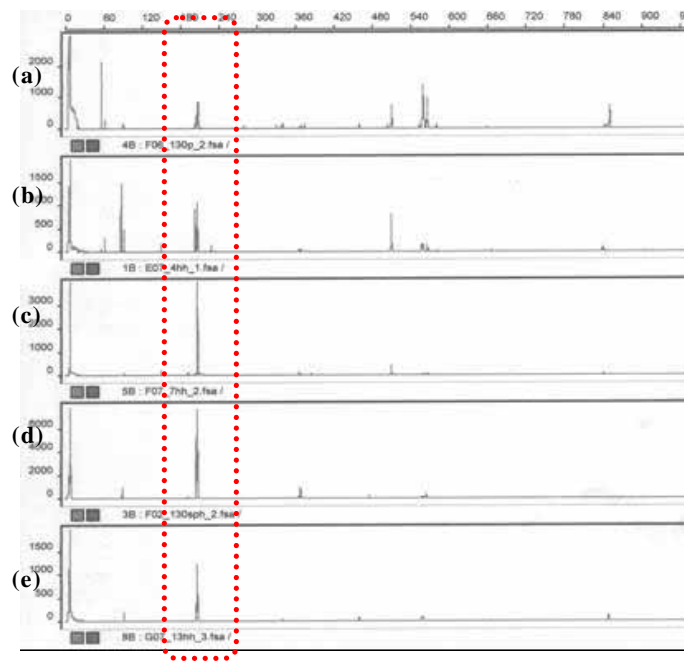


Fig. 5 Results of T-RFLP analysis of samples with different salt concentrations. *HhaI* was used as a restriction enzyme. Numbers for T-RFLP: (a) 1 % salt concentration; (b) 4 % salt concentration; (c) 7 % salt concentration; (d) 10 % salt concentration; (e) 13 % salt concentration.

塩濃度 1%の系に着目してみると， γ -*Proteobacteria* に限らず， α -*Proteobacteria* および β -*Proteobacteria*，*Cytophaga-Flavobacteria* など多種の微生物種の存在が確認された。一方，4%以上の系に着目してみると，塩濃度が上がるにつれ微生物の多様性が減ると同時に， γ -*Proteobacteria*（点線で囲まれたピーク）が増えていることがわかる。

3.6 塩濃度による *Marinobacter* 属および *Halomonas* 属の比較

これまでのクローニング解析によって，*Marinobacter* 属および *Halomonas* 属が脱窒性能の安定化に繋がる働きに大きく関わっていることが示唆された。しかしながら，T-RFLP 実験でこれまでに用いてきた制限酵素 *HhaI* および *MspI* では，系統樹上近縁な *Marinobacter* 属および *Halomonas* 属は同じ遺伝子配列部位で切れてしまっていたので，両者の優占率の変化を正確に分けてモニタリングすることが不可能であった。そこで，これらの菌種を分ける制限酵素 *XspI* を用いて塩濃度の違い（1%，4%，7%，10%，13%）による 2 種の細菌の優占率を比較・解析した。その結果を Fig.6 に示す。さらに，これまでの実験データのまとめとして，各塩濃度条件下における脱窒速度と γ -*Proteobacteria* および *Halomonas* 属の優占率との関係を Fig. 7 に示す。

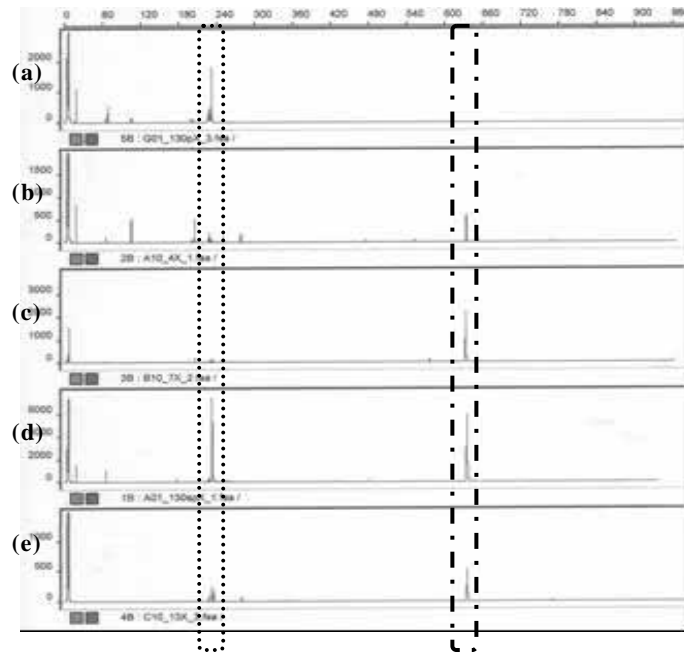


Fig. 6 Results of T-RFLP analysis of samples with different salt concentrations. *XspI* was used as a restriction enzyme. Numbers for T-RFLP: (a) 1 % salt concentration; (b) 4 % salt concentration; (c) 7 % salt concentration; (d) 10 % salt concentration; (e) 13 % salt concentration. *Marinobacter* spp.; - · · *Halomonas* spp.

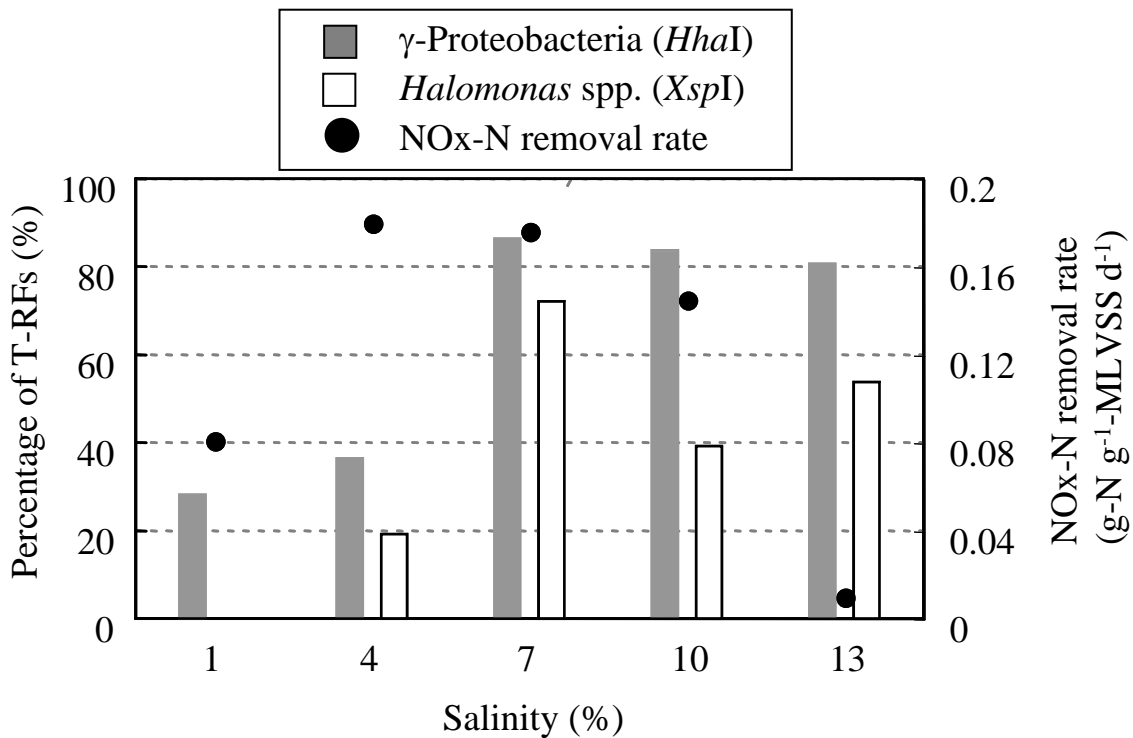


Fig. 7 Percentages of γ -Proteobacteria and *Halomonas* spp., that were calculated from T-RFLP data using *HhaI* and *XspI*, respectively, and NOx-N removal rate per sludge amount under various salinity conditions.

Fig. 6 より , 塩濃度が上がるにつれ , *Halomonas* 属の優占化が確認された。また Fig. 7 より *Halomonas* 属の優占率は脱窒速度と正の相関があることがわかる。以上の結果から *Halomonas* 属が脱窒処理の高速化・安定化に繋がる働きを担っている可能性が高い。

4. 結論

高塩濃度産業廃水の一つである製錬廃水について , 塩濃度条件を変えて窒素除去性能および微生物叢を評価した結果 , 下記の知見が得られた。

- ✓ 塩濃度が 4 ~ 10% の範囲で脱窒速度の向上が見られる。
- ✓ 塩濃度が上がるにつれ , 微生物の多様性が減ると同時に γ -*Proteobacteria* に属する微生物が選択的に優占化する。
- ✓ 高塩濃度条件下では γ -*Proteobacteria* に属する *Marinobacter* 属および *Halomonas* 属が選択的に優占化し , 特に *Halomonas* 属が脱窒性能の安定化に繋がる働きを担っている可能性がある。

引用文献

- 1) C. Glass, J. Silverstein, “Denitrification of high-nitrate high-salinity wastewater”, *Water Res.*, **33**, 223-229 (1999).
- 2) L.H.J. Vredenburg, K. Nielsen, A.A. Potma, G. Holm, K.C. Sund, “Fluid bed biological nitrification and denitrification in high salinity wastewater”, *Water Sci. Technol.*, **36**, 93-100 (1997).
- 3) J. Carrera, J.A. Baeza, T. Vicent, J. Lafuente, “Biological nitrogen removal of high-strength ammonium industrial wastewater with two-sludge system”, *Water Res.*, **37**, 4211-4221 (2001).

Halophilic denitrifying bacteria for high-rate denitrification of saline industrial wastewater

Satoshi Tsuneda, Akira Hirata

Department of Chemical Engineering, Waseda University

Yuhei Inamori

National Institute for Environmental Studies

Summary

A denitrification system for saline wastewater utilizing halophilic denitrifying bacteria has not been developed so far. In this study, denitrification performance and microbial community under various saline conditions were investigated using denitrifying sludge acclimated under low-salinity condition for a few years as seed sludge. A continuous denitrification experiment showed that denitrification performance at 10 % salinity was higher than that at 1 % salinity. The microbial community in the denitrification system of saline wastewater was monitored by terminal-restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) analysis during acclimation to high-salinity condition. T-RFLP profiles and clone analysis based on 16S rRNA encoding gene in the sludge of the denitrification system with 10 % salinity indicated that *γ-Proteobacteria*, particularly *Halomonas* spp., were predominant species, suggesting that these bacterial members showed a high denitrification activity under high-salinity condition. Furthermore, the investigation of denitrification performance under various saline conditions revealed that 4-10 % salinity result in the highest denitrification rate, indicating that this salinity was optimal for predominant bacterial species to exhibit denitrification ability. These results indicate the possibility that an appropriate denitrification system for saline wastewater can be designed using acclimated sludge with a halophilic community.