

発表番号 24 (0518)

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

常田 聡 (早稲田大学理工学部)

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に、窒素に関わる排水規制が年々強化されている。産業廃水の中でも製錬廃水や水産加工廃水は塩濃度が高く、微生物による排水処理効率が低いことが知られているため、これらの排水を処理するには水道水などで希釈してから処理が行われている。しかし、希釈によるコストの増大、また、処理水の排出量の増加といった問題点が挙げられる。そこで、これらの廃水を希釈することなく、高塩濃度下において窒素を除去する技術の確立が求められている。

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、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。

我々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。また、この処理槽内には γ -*Proteobacteria*に属する

Halomonas 属および *Marinobacter* 属が優占化していたことから、これらの微生物種が高塩濃度下における高い窒素除去性能を担っていることが示唆された。しかし、これらの現象は製錬廃水処理プロセスに特有の現象であることが考えられる。そこで本研究では、高塩濃度の硝酸含有模擬廃水を用いた脱窒処理プロセスにおける脱窒処理性能、および処理プロセス内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、FISH法など)を用いて総合的に評価・解析することによって、高塩濃度条件下において高い脱窒能を有する有用微生物群の探索を行った。その結果、高塩濃度(10%)の脱窒処理プロセスの方が低塩濃度(1%)よりも良好な窒素除去効率を示し、これらの現象は製錬廃水処理プロセスに特有ではなく、一般的な現象であることが確認された。また、高塩濃度条件下では微生物の多様性が下がると同時に γ -*Proteobacteria*に属する*Halomonas*属が選択的に優占化することがわかった。さらに、高塩濃度条件下において塩の種類に関わらず、窒素除去速度が増加すると共に*Halomonas*属の占有率も増加していることが確認できたため、*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わかった。

助成番号 0518

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

常田 聡 (早稲田大学理工学部)

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に、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。産業廃水の中でも製錬廃水や水産加工廃水は塩濃度が高く、微生物による排水処理効率が低いことが知られているため、これらの排水を処理する際には水道水などで希釈してから処理が行われている。しかし、希釈によるコストの増大、また、処理水の排出量の増加といった問題点が挙げられる。そこで、これらの廃水を希釈することなく、高塩濃度下において窒素を除去する技術の確立が求められている。

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、処理を行っている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おらず、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。しかし、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、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。

我々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。また、この処理槽内には *γ-Proteobacteria* に属する *Halomonas* 属および *Marinobacter* 属が優占化していたことから、これらの微生物種が高塩濃度下における高い窒素除去性能を担っていることが示唆された^{1,2)}。しかし、これらの現象は製錬廃水処理プロセスに特有の現象であることが考えられる。そこで本研究では、実用化へ近づけるためにこれらの現象の一般化を目的とし、高塩濃度の硝酸含有模擬廃水を用いた脱窒処理プロセスにおける脱窒処理性能、および処理プロセス内の微生物叢を

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, FISH 法など)を用いて総合的に評価・解析することによって、高塩濃度条件下において高い脱窒能を有する有用微生物群の探索を行った。

2. 実験方法

2.1 硝酸含有模擬廃水を用いた連続脱窒処理実験

容積 0.5 L の攪拌型流動床を用い、供給液として水道水に NaNO_3 を添加して供給液の $\text{NO}_x\text{-N}$ 濃度は $1,500 \text{ g/m}^3$ とした(以前行った製錬廃水処理実験と同じ濃度)。炭素源として C/N 比 1.5 となるように CH_3COONa を添加し、また微生物の活性を維持するため微量の $\text{PO}_4\text{-P}$ を添加した。また塩としては Na_2SO_4 および NaCl の 2 種を用い、添加量を調節することで塩濃度を変化させて実験を行った。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	$\text{NO}_x\text{-N}$ [g/m^3]	CH_3COONa [g/m^3]	Salt conc. [%]	Salt
1	1,500	2,250	1	Na_2SO_4
2			10	
3				NaCl

種汚泥には、製錬廃水で長期間馴養していたことにより種汚泥に何らかのバイアスがかかっていた可能性を考慮して、下水処理場の返送汚泥を1ヶ月間脱窒馴養した汚泥(以下、下水処理汚泥)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に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に努め、連続的に処理を行った。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上げることで段階的に窒素負荷を上げた。

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、Eub8f・Univ926r を用いて PCR (25 ng DNA, 10 μM primer, 2 mM deoxynucleoside triphosphate, 25 mM MgCl₂, 5U rTaq DNA polymerase (TOYOBO), rTaq 用 5 μL 10×PCR buffer, 50 μL に滅菌水でメスアップ) を行った。なお、得られた DNA 増幅産物を T-RFLP 法に用いる場合には、Eub8f プライマーの 5'末端を 6-carboxyfluorescein にて蛍光標識しておいた。また、PCR の反応条件は (94°C, 120 sec: 熱変性) + (94°C, 30 sec: 熱変性; 53°C, 30 sec: アニール; 72°C, 30 sec: 伸長反応) × 30 + (72°C, 120 sec: 伸長反応) とした。

2.3 T-RFLP 法による微生物叢のモニタリング

2.2 によって得られた DNA 増幅産物を精製・濃縮後、制限酵素 *Hha* I, *Xsp* I (TAKARA) を用いて制限酵素反応 (37°C, 4 時間) を行い、増幅産物の断片化を行った。さらにホルムアミドおよび GeneScan™-500 LIZ™-Size standard (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。

2.4 クローニングおよび系統解析

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。ライゲーション・トランスフォーメーションを経て得られたコロニーをピックアップし、Insert check-Ready-solution (TOYOBO) を用いて DNA のインサートを確認後、PCR で再増幅を行った。得られた PCR 増幅産物に対し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンスを行った。サイ

クルシーケンスの反応条件は (96°C, 60 sec) + (96°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種の検索を行い、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。

2.5 FISH 法による定量的評価

高塩濃度脱窒処理槽内において、塩の種類の違い (RUN 2 および RUN 3) による微生物群集構造の変化について検討を行うために FISH 法を行った。今回ターゲットとして、α-, β-, γ-Proteobacteria を選び、それぞれに特異的なプローブを用いてダイレクトカウントによる定量的評価を行った。また 2.3, 2.4 の T-RFLP および系統解析結果より高塩濃度脱窒処理槽内に優占化していると考えられる微生物種に対しても同様に、その微生物種に特異的なプローブを用いて FISH 法を行い、定量的評価を行うことで、この微生物種の占有率と脱窒処理能との関係について検討を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 硝酸含有模擬廃水を用いた連続脱窒処理実験

製錬廃水処理実験における“高塩濃度条件下において良好な脱窒処理が行われた”という現象が製錬廃水処理に特有ではなく、一般的な現象であることを示すために硝酸含有模擬廃水を用いた脱窒処理実験を行った。各系における NOx-N 除去率の変化のグラフを Fig. 1 に示す。

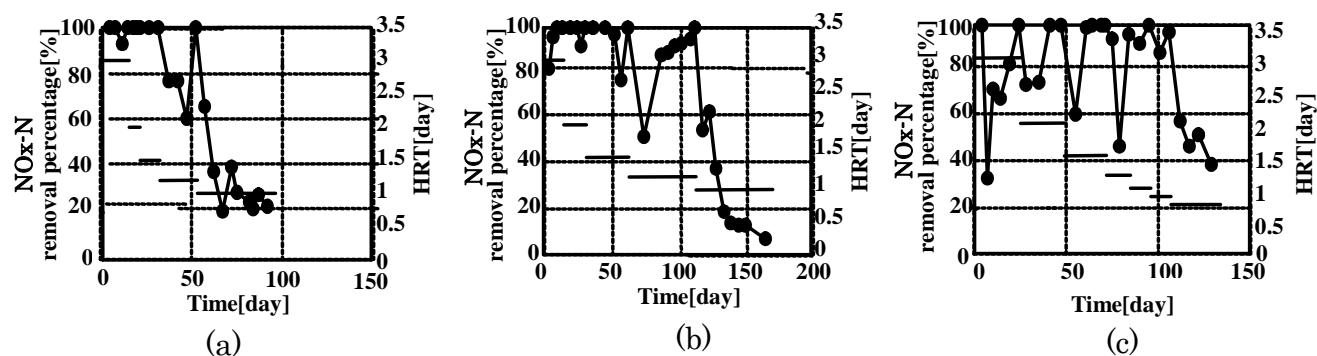


Fig. 1 Time course of NOx-N removal percentage in continuous denitrification experiment. Closed circles: NOx-N removal percentage ; Line: Nitrogen load.

(a) RUN 1 (salt conc. 1%), (b) RUN 2 (salt conc. 10%, Na₂SO₄), (c) RUN 3 (salt conc. 10%, NaCl).

種汚泥馴養時と同条件の塩濃度 1%で運転した RUN 1 では、窒素負荷を上げた各段階で直後に NO_x-N 除去率が低下し、窒素負荷を 1.25 kg-N/(m³・day) に上げた際には NO_x-N 除去率が 77%まで悪化したのが、すぐに処理能が回復した。しかし、窒素負荷を 1.5 kg-N/(m³・day) に上げたところ処理が次第に悪化し、その後処理能が回復することはなかった。一方、低塩濃度より脱窒性能が悪化すると知られている高塩濃度の RUN 2 (Na₂SO₄ 10%) では、RUN 1 の場合と同様に窒素負荷を 1.25 kg-N/(m³・day) に上げた際に NO_x-N 除去率が 52%まで悪化した後、20 日程で処理能が 90%以上に回復したが、窒素負荷を 1.5 kg-N/(m³・day) に上げたところ処理が次第に悪化し、最終的には NO_x-N 除去率が 7%まで低下した。また、同じく高塩濃度の RUN 3 (NaCl 10%) では、他の 2 系と同様に窒素負荷を上げた各段階で直後に NO_x-N 除去率が低下したものの、窒素負荷 1.75 kg-N/(m³・day) まで良好な NO_x-N 除去率を示した。

これらの水質測定結果から、高塩濃度条件下における脱窒性能は低塩濃度条件下と同程度またはそれ以上の脱窒性能を示すことが確認された。以上より、この現象は製錬廃水で馴養された汚泥(以下、製錬馴養汚泥)を用いた製錬廃水処理プロセスに特有の現象ではなく、硝酸含有模擬廃水および下水処理汚泥を用いた脱窒処理プロセスにおいても同様の現象が確認され、一般的な高塩濃度廃水処理に見られる現象であることが示唆された。

3.2 T-RFLP 法による微生物叢のモニタリング

各系から汚泥をサンプリングし(14, 36, 75 日)、DNA を抽出後、PCR を行い、DNA を増幅した。得られた PCR 増幅産物に対し、制限酵素 *Hha* I を用いて DNA を断片化し、T-RFLP 法による微生物叢のモニタリングを行った。その結果を Fig. 2 に示す。

水質データ(Fig. 1)と T-RFLP 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 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のにも関わらず、高い脱窒処理効率を安定に保っていた RUN 2 および 3 では、205 bp および 565 bp のピークが顕著に現れていることが確認できる。

そこで、全体のピーク面積に対するこれらのピーク面積の占有率について算出した結果(Fig. 3)、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 RUN 1 では、2つのピーク面積の占有率が減少した。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のにも関わらず、高い脱窒処理効率を安定に保っていた RUN 2 および 3 では、占有率は一定または増大していることが確認できた。この結果から、高塩濃度条件下において安定した脱窒処理を担う微生物種が優占化していたことが示唆された。

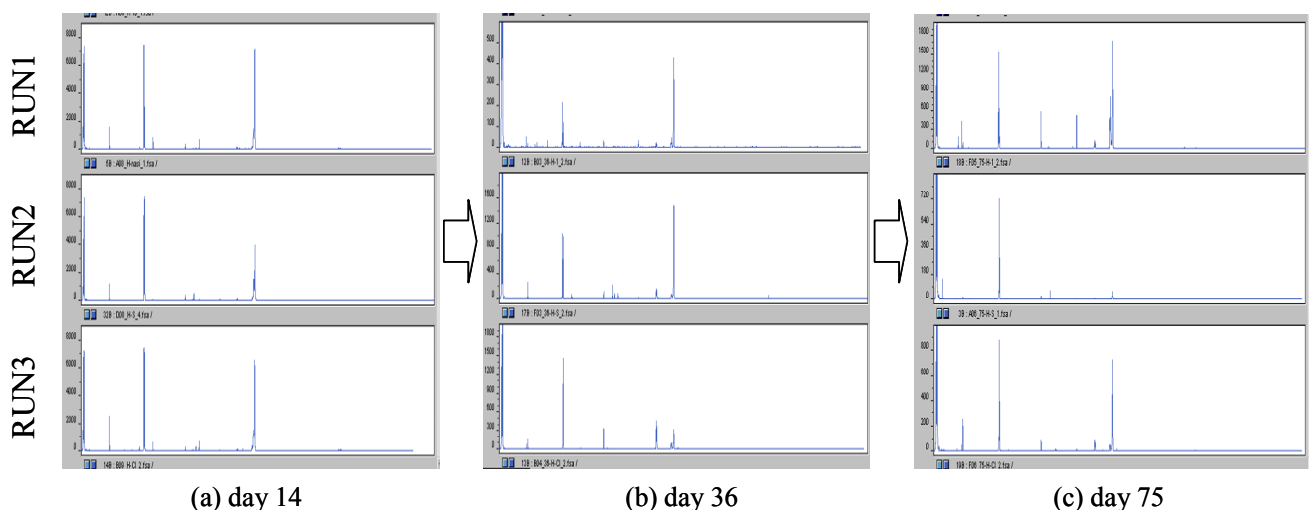


Fig. 2 The 16S rRNA gene-targeted T-RFLP profiles with restriction enzyme *Hha* I

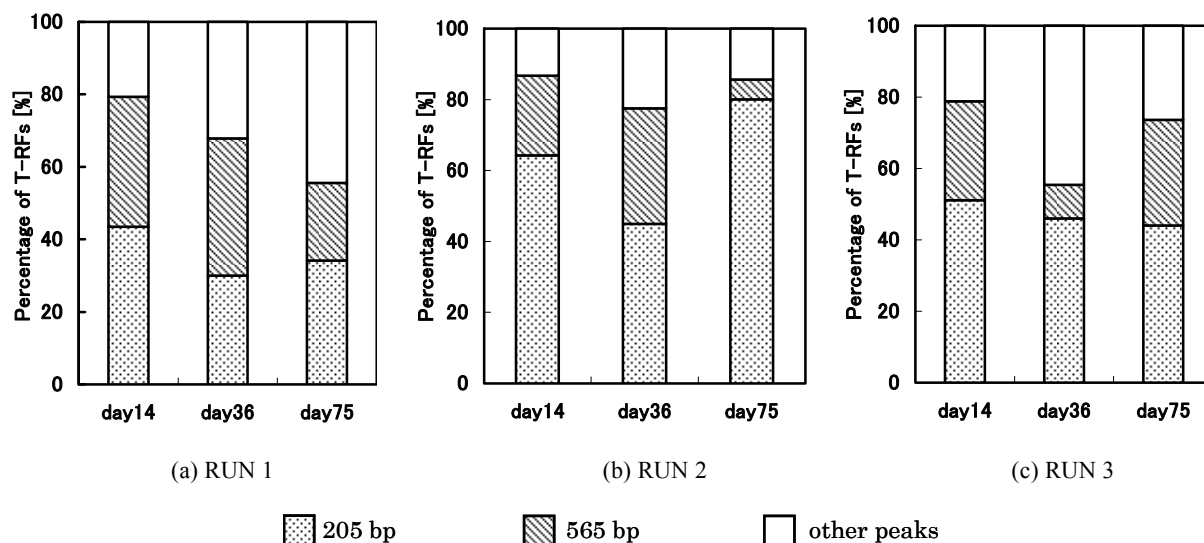


Fig. 3 Percentages of T-RFs of 205 bp and 565 bp calculated from T-RFLP data using *Hha* I

3. 3 高塩濃度条件下での優占種の同定

水質データ (Fig. 1) および T-RFLP 結果 (Fig. 2) より RUN 3 の系では処理も良好でかつ微生物叢も安定していることが確認できたため、75 日目の汚泥サンプル (脱窒処理効率 94%, 窒素負荷 1.25 kg-N/(m³・day), 塩濃度 10%, NaCl) 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化する微生物種の同定を行った。その結果を Fig. 4 に示す。また、高塩濃度条件下において塩の種類が異なることによって、脱窒処理槽内で優占化する微生物種に変化が現れるのかどうかについて検討を行うために、同程度の条件下で脱窒処理を行っている RUN 2 の 110 日目の汚泥サンプル (脱窒処理効率 95%, 窒素負荷 1.25 kg-N/(m³・day), 塩濃度 10%, Na₂SO₄) についても同様にクローニングおよび系統解析を行った。その結果を Fig. 5 に示す。

まず Fig. 4 に示すように、NaCl を用いた高塩濃度脱窒処理槽内は主に γ -Proteobacteria に属する *Halomonas* 属、および β -Proteobacteria に属する *Azoarcus* 属に近縁な微生物種 (uncultured β -Proteobacterium) で構成されていることが確認できた。一方、塩として Na₂SO₄ を用いた高塩濃度脱窒処理槽内は、Fig. 5 に示すように主に *Halomonas* 属で構成されていることが確認できた。これらの微生物種を T-RFLP 結果 (Fig. 2) と照らし合わせると、*Halomonas* 属は 205 bp のピークに、また *Azoarcus* 属に近縁な微生物種は 565 bp のピークに帰属することが確認でき、Fig. 3 に示すようにこれらの微生物種が高塩濃度条件下の脱窒処理槽内に優占化していることが確認

された。

ここで以前行った製錬廃水処理実験の結果と合わせて考察すると、製錬馴養汚泥を用いた高塩濃度の製錬廃水処理槽内には *Halomonas* 属および *Marinobacter* 属が優占化、一方、下水処理汚泥を用いた模擬廃水処理槽内には *Halomonas* 属および *Azoarcus* 属に近縁な微生物種が優占化していたことから、いずれの処理槽内にも存在していた *Halomonas* 属が高塩濃度条件下において高い脱窒処理を担っている可能性が高いことが示唆された。また今回の結果から、*Halomonas* 属は塩の種類に関わらず、高塩濃度条件下において脱窒処理を担っていると考えられる。

3. 4 塩の種類による微生物叢の比較

高塩濃度条件下の脱窒処理槽内において、塩の種類が異なることによって微生物叢に変化が現れているのかどうかについて検討を行うために FISH 法による定量的評価を行った。今回ターゲットとして、 α -、 β -、 γ -Proteobacteria を選び、それぞれに特異的なプローブを用いてダイレクトカウントによる定量的評価を行った。また 3. 2 および 3. 3 の T-RFLP および系統解析結果より高塩濃度脱窒処理槽内には *Halomonas* 属が優占化していると考えられるため、*Halomonas* 属に特異的なプローブを用いて同様に FISH 法を行い、定量的評価を行うことで *Halomonas* 属の占有率と脱窒速度との関係について検討を行った。用いたプローブを Table 2、FISH 法の結果を Fig. 6、*Halomonas* 属の占有率と脱窒速度との関係を Fig. 7 に示す。

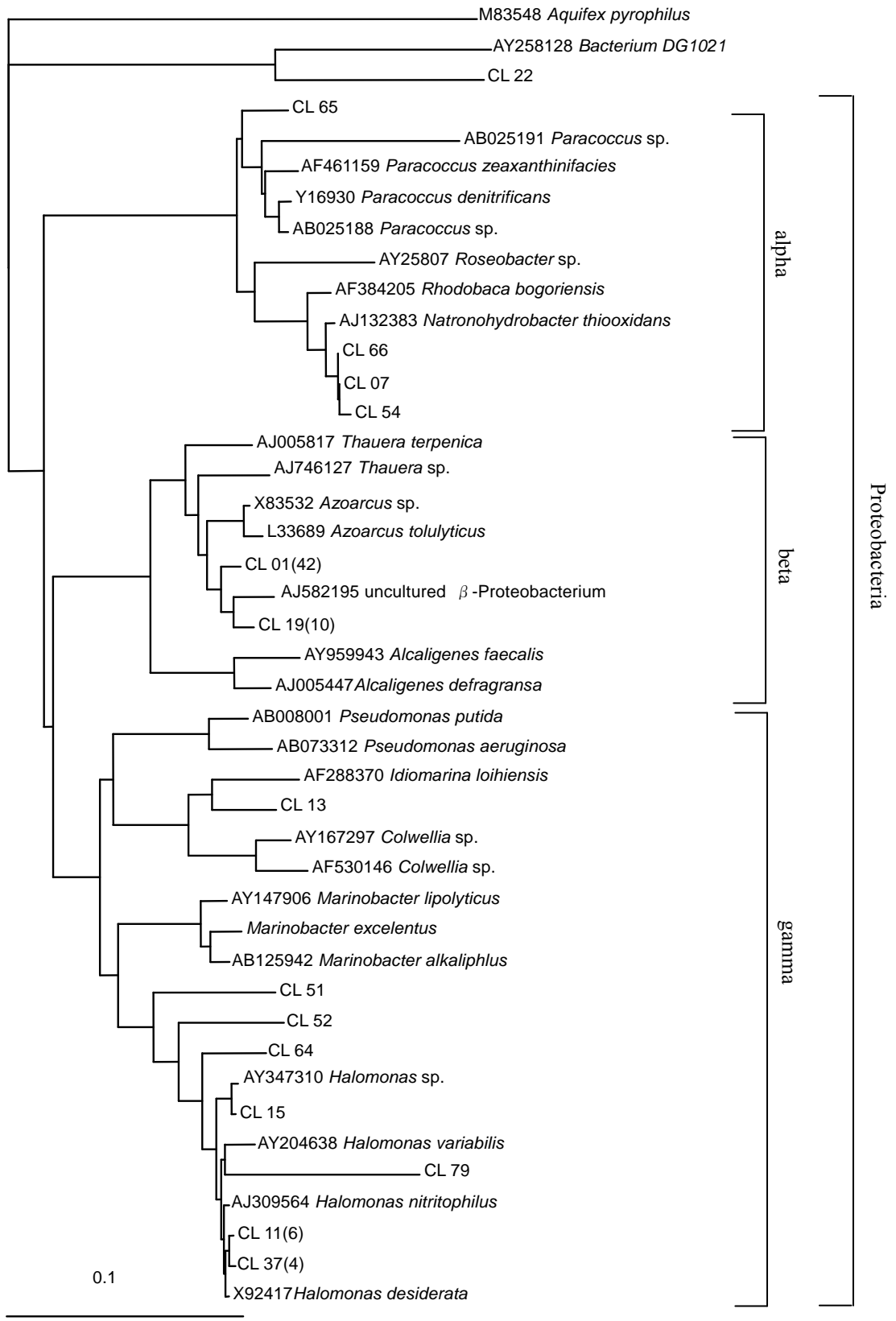


Fig. 4 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences. Abbreviations for the phylogenetic tree: CL, clones from samples of day 75 of RUN 3.

Sequences which had a similarity more than 97% were considered to belong to the same group and sample numbers are shown in brackets.

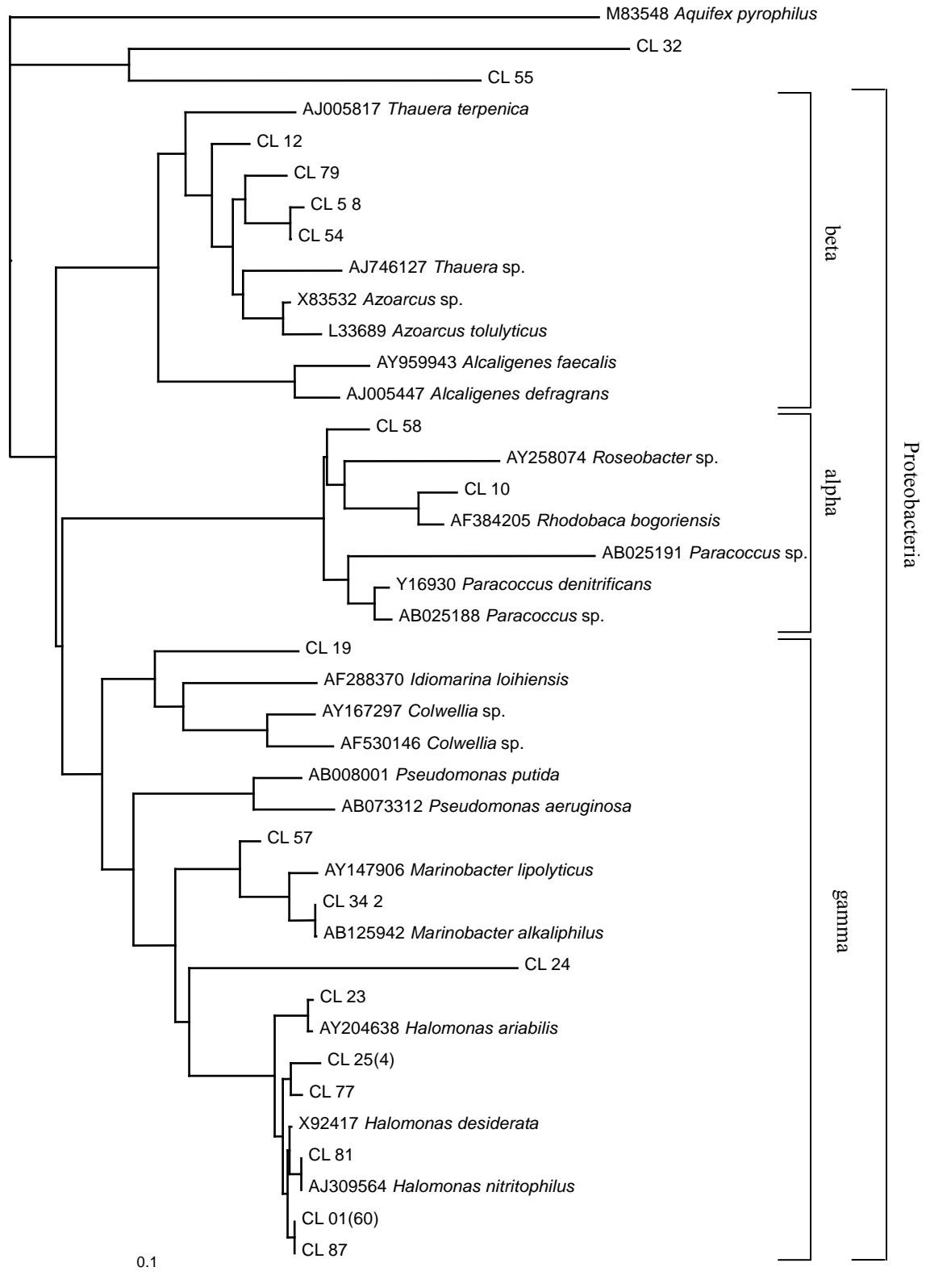


Fig. 5 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences. Abbreviations for the phylogenetic tree: CL, clones from samples of day 110 of RUN 2.

Sequences which had a similarity more than 97% were considered to belong to the same group and sample numbers are shown in brackets.

Table 2 Sequencing and specificity of probes

プローブ名	ターゲット	Sequencing (5'-3')	FA 濃度
ALF1b	<i>α-Proteobacteria</i>	CGTTCGYTCTGAGCCAG	20%
BET42a	<i>β-Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACATTCGTTT	35%
GAM42a	<i>γ-Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACATTCGTTT	35%
Hlm474a	<i>Halomonas</i> sp.	CTGTGGGTGATGTCCTTCT	45%

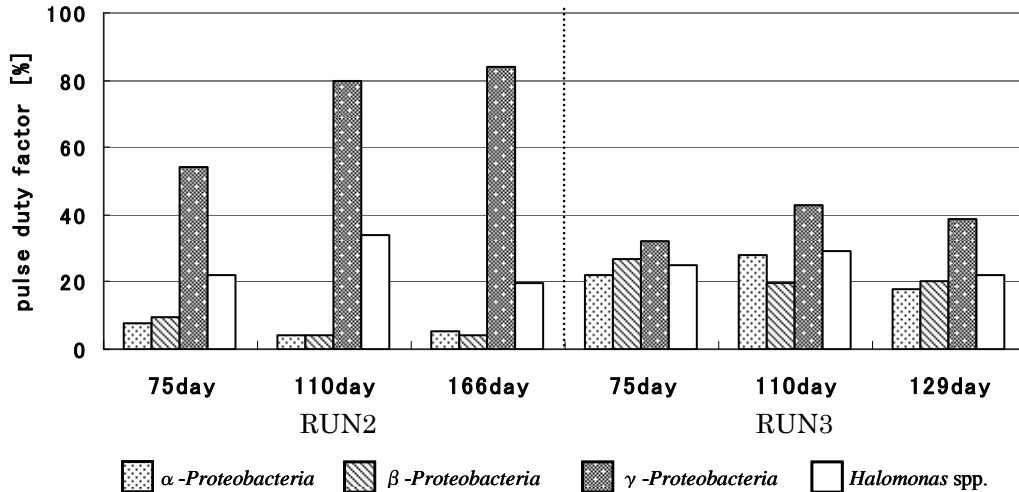


Fig. 6 Percentages of *Proteobacteria* and *Halomonas* spp., that were counted by FISH

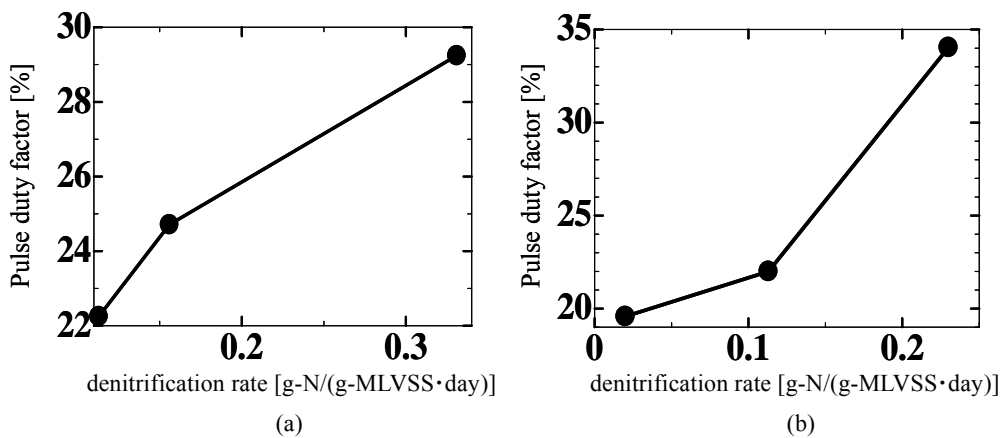


Fig. 7 The relationship between pulse duty factor of *Halomonas* spp. and denitrification rate (a): RUN 1 (b): RUN 3

Fig. 6 に示すように高塩濃度条件下において *Proteobacteria* に着目すると、塩として Na_2SO_4 を用いた脱窒処理槽内(RUN 2)には *γ-Proteobacteria* が優占化していることが確認できた。一方、塩として NaCl を用いた脱窒処理槽内(RUN 3)では *α*-, *β*-, *γ-Proteobacteria* がほとんど同程度の占有率を示した。このように、塩の種類が異なることにより微生物叢が大きく変化しているが、これは塩濃度 10%において生育可能な中度好塩性細菌の中には NaCl 以外の塩類を含む環境中でも生育可能

な微生物種が存在すれば、 NaCl を特異的に要求する微生物種も存在していることが知られており、本実験のように Na_2SO_4 および NaCl と塩の種類を変化させたことにより、高塩濃度脱窒処理槽内において生育可能な微生物種に違いが現れたものと考えられる。

また 3. 2 および 3. 3 の T-RFLP および系統解析結果より高塩濃度脱窒処理槽内において優占化していると考えられた *Halomonas* 属の占有率と VSS 窒素除去速度の関係について検討を行ったところ、Fig. 7 に示す

ように塩の種類に関わらず、VSS 窒素除去速度が増加すると共に *Halomonas* 属の占有率も増加していることが確認できた。このことから、*Halomonas* 属は塩の種類に関わらず高塩濃度条件下における脱窒反応に大きく関与していることが示唆された。

これまで Brentら³⁾は塩濃度 12.5% (NaCl) の高塩濃度条件下における *Halomonas Campisalis* の窒素除去速度について検討を行っている。Brentらの実験では、様々な炭素源を用いたときの窒素除去速度について検討しており、炭素源としてメタノール・エタノールを利用した場合は脱窒反応が進行しなかったが、酢酸塩・グリセロール・乳酸塩を利用した場合には良好な脱窒反応が起こることを確認している。これら3つの炭素源の中でも特に酢酸塩を用いた場合は、窒素除去速度係数が最も大きく、菌体増殖量が最も少ない、さらに低コストであることから、フルスケールの高塩濃度脱窒処理プロセスを構築した場合には酢酸塩を利用することが最良であるとしている。しかしながら、炭素源の種類は変化させていても塩の種類を変化させた研究例はまだ報告されていない。これは NaCl が海洋に存在しているなど、地球上で最も一般的な塩として認識されているため、他の塩を用いた研究がほとんど行われていないものと考えられる。

4. 結論

製錬廃水という特殊な高塩濃度産業廃水ではなく、硝酸を含有した模擬廃水を用いて連続脱窒処理実験を行い、高塩濃度条件下における窒素除去性能および微生物叢について評価・解析を行った結果、下記の知見が得

られた。

- (i) 高塩濃度(10%)の脱窒処理プロセスの方が低塩濃度(1%)よりも良好な窒素除去効率を示し、これらの現象は製錬廃水処理プロセスに特有ではなく、一般的な現象であることが確認された。
- (ii) 高塩濃度条件下では微生物の多様性が下がると同時に γ -Proteobacteria に属する *Halomonas* 属が選択的に優占化する。
- (iii) 高塩濃度条件下において塩の種類に関わらず、VSS 窒素除去速度が増加すると共に *Halomonas* 属の占有率も増加していることが確認できたため、*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) S.Yoshie, T.Ogawa, H.Makino, H.Hirosawa, S.Tsuneda and A.Hirata, "Characteristics of bacteria showing high denitrification activity in saline wastewater", *Lett. Appl. Microbiol.*, **42**, 277-283(2006)
- 2) S.Yoshie, H.Makino, H.Hirosawa, K.Shivotani, S.Tsuneda and A.Hirata, "Molecular analysis of halophilic bacterial community for high-rate denitrification of saline industrial wastewater", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press)
- 3) B. M. Peyton, M. R. Mormile, and J. N. Petersen, "Nitrate reduction with *Halomonas Campisalis* : kinetics of denitrification at pH 9 and 12.5% NaCl", *Water Res.*, **35**, 4237-4242 (2001)

0518

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

Denitrification system for saline wastewater utilizing halophilic denitrifying bacteria has not been developed so far. Our previous study revealed that denitrification performance at 10% salinity was higher than that at 1% salinity in denitrification system for saline metal refinery wastewater. Terminal restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) profiles and clone analysis based on 16S rRNA encoding gene in sludge of denitrification system with 10% salinity indicated that γ -Proteobacteria, especially *Halomonas* spp., was predominant, suggesting that these bacterial member showed high denitrification activity under high saline condition. However, these phenomena have prospects of particularity at denitrification system for saline metal refinery wastewater. In this study, to examine whether these phenomena are general, denitrification performance and microbial community of denitrification system using Na₂SO₄- and NaCl-based synthetic wastewater under low and high saline conditions were investigated. Continuous denitrification experiment showed that denitrification performance at 10% salinity was higher than that at 1% salinity in the same manner as saline metal refinery wastewater. T-RFLP profiles and clone analysis indicated that *Halomonas* spp. was predominant. The direct counting of cells stained by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) revealed that the percentages of *Halomonas* spp. increased with an increment of the denitrification rate in the system irrespective of salt components at 10% salinity. These results indicated that the phenomenon that *Halomonas* spp. is predominant under high saline condition is not specific for saline metal refinery wastewater, suggesting that these bacterial members show high denitrification activity under high saline condition irrespective of salt components in the industrial wastewaters.