

# Nitrite Reductase 遺伝子を標的としたPCR-DGGE法 によるコークス炉廃水処理活性汚泥中の脱窒細菌群 集構造の解析

著者	新田見 匡, 山崎 恵美, 佐藤 弘泰, 味埜 俊, 伊藤 公夫, 三木 理
著者別表示	Nittami Tadashi, Yamazaki Emi, Satoh Hiroyasu, Mino Takashi, Miki Osamu
雑誌名	水環境学会誌
巻	27
号	4
ページ	249-254
発行年	2004-04-10
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00064531">http://doi.org/10.24517/00064531</a>

doi: 10.2965/jswe.27.249



## Nitrite Reductase遺伝子を標的としたPCR-DGGE法による コークス炉廃水処理活性汚泥中の脱窒細菌群集構造の解析

新田 見 匡\* 山崎 恵美\* 佐藤 弘 泰\*  
 味 埜 俊\* 伊藤 公 夫\*\* 三木 理\*\*

### Analysis of Denitrifying Bacterial Population in Coke-Oven Wastewater Treatment Plant by PCR-DGGE Method Targeting Nitrite Reductase Genes

Tadashi NITTAMI\*, Emi YAMAZAKI\*, Hiroyasu SATOH\*  
 Takashi MINO\*, Kimio ITO\*\* and Osamu MIKI\*\*

\* Institute of Environmental Studies, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

\*\* Advanced Technology Research Laboratories, Nippon Steel Corporation, Shintomi 20-1, Futtsu, Chiba 293-8511, Japan

#### Abstract

We analyzed denitrifying bacterial population dynamics in two wastewater treatment plants. For analyzing the population dynamics, we applied the PCR-DGGE method for targeting *nirS* genes, which code cytochrome cd1-type nitrite reductase. One plant treats Coke-oven wastewater (CW) and the other treats synthetic wastewater (SW) such as CW. The CW and SW mainly contained phenol, thiocyanic ion (SCN<sup>-</sup>) and thiosulfuric acid (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>), and the 2 plants were configured with anoxic and aerobic tanks, respectively. Bacteria in the plants could denitrify using phenol, SCN<sup>-</sup> and S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> as electron acceptors. By analyzing *nirS* genes in the plants for a few months, we determined the partial denitrifying bacterial population in the plant and deduced bacteria that actually denitrify using phenol, SCN<sup>-</sup> and S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>. As far as we know, this is the first study on the analysis of the bacterial community in a CW treatment plant.

**Key words:** coke-oven wastewater, activated sludge, denitrifying bacteria, *nirS*, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

#### 1. はじめに

製鉄所では鉄鉱石中の酸化鉄を還元するためにコークスを使用している。コークスは石炭をコークス炉で乾留して製造されるものであるが、その際発生する水蒸気および石炭中の固有水分・付着水分とがコークス炉ガスに同伴される。このガスの冷却・精製工程で凝縮分離されるコークス炉廃水を安水という。安水中にはアンモニア、フェノール類、polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs)、シアン、硫化水素、油分などの成分が含まれている<sup>1)</sup>。安水処理の中核となるプロセスは標準活性汚泥法であるが、上記の成分により活性汚泥微生物の代謝機能は阻害されやすい<sup>2)</sup>。よって活性汚泥法に先立ち前処理システムが必要となる。工業的なシステムでは、凝集沈殿による脱油工程とアンモニアストリッピング法による脱安工程により、過剰の油分、シアン、硫化水素、アンモニアを除去している<sup>2)</sup>。しかしアンモニアストリッピング法によるアンモニア除去はコスト高という問題点もある<sup>3)</sup>。そこでアンモニアストリッ

ピング法によるアンモニア除去は極力抑え、硝化脱窒プロセスの活性汚泥法を適用し、生物処理で可能な限りのアンモニアを除去しようという研究が行われている<sup>1,3)</sup>。本研究は、安水処理に導入された硝化脱窒型活性汚泥実験プラントについて、微生物群集構造の面からその性能を解析しようとした研究であった。安水という特殊な廃水を処理する2機の硝化脱窒型活性汚泥実験プラントの脱窒細菌群集を把握すると共に、安水の主成分であるフェノール、チオシアン(SCN<sup>-</sup>)、チオ硫酸(S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>)を電子供与体とした脱窒を行う細菌種の探索を目的とした。

生物による脱窒とは、一般に硝酸イオン(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)から亜硝酸イオン(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)、酸化窒素(NO)、亜酸化窒素(N<sub>2</sub>O)、窒素ガス(N<sub>2</sub>)までの一連の還元反応を指すが、多くの脱窒細菌はこの一連の反応を単独で行うことができる。そしてNO<sub>2</sub><sup>-</sup>→NOという反応は、窒素を溶存体から気体に変えることや、細菌では脱窒細菌に特有であることから、この反応を促進する亜硝酸還元酵素(NIR)は、重要な酵素とされる。NIRには*nirS*遺伝子にコードされ、活性中心にヘム鉄をも

\* 東京大学大学院新領域創成科学研究科 〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1

\*\* 新日鐵(株)技術開発本部先端技術研究所 〒293-8511 千葉県富津市新富20-1

つもの、*nirK*遺伝子にコードされ、活性中心に銅を持つもの2種類が存在する<sup>4)</sup>。これまでに調べられた脱窒細菌は、*nirS*、*K*2種類のいずれか一方のみを保有することが分かっている<sup>5)</sup>。本研究では*nirS*遺伝子を標的としたプライマーセットによるPCR-DGGEを行い、安水処理活性汚泥中の*nirS*を保有した脱窒細菌の群集構造を解析することとした。

## 2. 方法

### 2.1 2機の安水処理プラントの運転条件

製鉄所内に設置された1機の安水処理の実験プラント(PP)は、Fig. 1のような実験室規模の循環型硝化脱窒プロセスの装置である。アンモニアストリッピング法により、予めある程度のアンモニアを除去した安水を海水と1:2の割合で混合し、PPへの流入原水とした(Table 1)。硝化槽から脱窒槽への硝化液循環率は200%、沈降槽から脱窒槽への汚泥返送率は100%である。脱窒槽、硝化槽ともにpHは無調整、水温は35°Cに調整されている。また滞留時間は、水学的滞留時間(HRT)が脱窒槽で12h、硝化槽で36hとした。

同製鉄所に設置されたもう1機の実験プラント(MP)も、PPとスケールは異なるが、Fig. 1のような循環型硝化脱窒プロセスの装置である。PPが安定運転を続けるのに対し、MPは運転条件を変化させ、微生物相をダイナミックに変化させることを目的としたプラントであった。流入水には安水組成を真似た人工安水を海水で2.5倍に希釈したもの(Table 1)を使用した。途中(2002年11月12日)からフェノールの添加を無くした。硝化槽から脱窒槽への硝化液循環率は200%、沈降槽から脱窒槽への汚泥返送率は100%である。pHは脱窒槽が8.0-8.5、硝化槽が7.0-7.5に制御され、水温は25-30°Cに調整された。また系内の汚泥滞留時間(SRT)は51d、HRTが脱窒槽で18h、硝化槽で54hとした。なお両プラントともに、種汚泥には安水を処理する標準活性汚泥プロセスの汚泥を使用した。

### 2.2 水質分析

測定した水質項目は、TOC、TN、フェノール、SCN<sup>-</sup>、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>である。TOCは赤外線式TOC分析法(JIS-K-0102:22.1)、TNはJIS-K-102記載の総和法、フェノールはGC-MS、SCN<sup>-</sup>は

Table 1 Characteristic of influent water to each plant (mg·l<sup>-1</sup>)

	pH	D-TN <sup>1)</sup>	D-TOC	D-phenol	D-SCN <sup>-</sup>	D-S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
PP	8.5-9.0	500-850	300-510	100-250 <sup>2)</sup>	80-120	230-360
MP <sup>3)</sup>	7.8-8.6	530-700	350-400	530-600	100-110	140-300

1) "D" means dissolved.

2) Derivatives of phenols included.

3) Influent wastewater to PP was added by 5% (v/v).

Table 2 Sequences of primers applied in this study

#	Name	Sequence (5'-3')
1	<i>nirS</i> 2F <sup>a</sup>	TACCACCC (C/G) GA (A/G) CCGCGCGT
2	<i>nirS</i> 2F(C,G)	TACCACCC ( C ) GA ( G ) CCGCGCGT
3	<i>nirS</i> 2F(G,A)	TACCACCC ( G ) GA ( A ) CCGCGCGT
4	<i>nirS</i> 3R <sup>b</sup>	GCCGCCGTC (A/G) TG (A/C/G) AGGAA
5	<i>nirS</i> 3R(G,C)	GCCGCCGTC ( G ) TG ( C ) AGGAA
6	GC clamp <sup>c</sup>	CGCCCGCCCGCCCGCCCGCCGTC CGCCCGCCCGCCCGCCCG

a,b: These primers are original primers designed by Braker *et al.*

c: The GC clamp is attached to the 5' end of each forward primer.

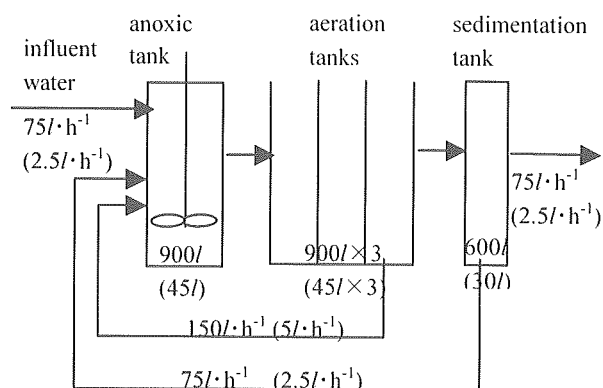


Fig. 1 Diagram of pilot and mini plants. Values show pilot plant scale and values in parentheses show mini plant scale. Anoxic tanks have a paddle for agitation. Aeration tanks are divided into three tanks.

塩化亜鉛を加えて、シアン化物をマスクし、塩化第二鉄を加えてチオシアン酸鉄(III)を形成させ、450nmの吸光光度で測定、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>はIS-K-0102よう素滴定法に準じ、それぞれ分析した。

### 2.3 活性汚泥からのDNA抽出

各プラントの脱窒槽から採取した活性汚泥は、エタノールを添加(活性汚泥:エタノール=9:1)した後、DNAの抽出操作を行うまで4°Cで冷蔵保存した。DNAの抽出は、FastDNA SPIN Kit for Soil(Qbiogene)を使用し、マニュアルに従って行った。

### 2.4 PCR-DGGE

新田見らの報告<sup>6)</sup>に従い、Brakerらがデザインした*nirS*2F-3Rプライマーセット(Table 2)を混合塩基配列のない24セットに分けて適用し、PCR-DGGEを行った。解析当初は24セット全てを適用したが、最終的にはTable 2に示したnumber2-5(A set),3-5(B set)の2セットのみを適用し、PCR-DGGEを行った。なお8%(wt/vol)ポリアクリルアミドゲル中の変性剤の濃度勾配は35-65%(A set用)または40-70%(B set用)とした。DGGEにより検出したバンドの一部に関しては、ImageQuantソフトウェア(Molecular Dynamics)によりピクセル強度を測定した。この測定値をバンド強度と定義した。

### 2.5 Sequencing

得られたDGGEのバンドをカッターナイフにより切り出してチューブに入れ、50 μlの滅菌したmilliQ水を加え、凍結融解することにより、バンドを形成するDNA断片を回収した。回収したDNA断片をtemplate DNAとして、2.4の条件で再びPCR-DGGEを行った(PCRのサイクル数は適宜設定した)。このバンド切り出しからDGGEまでの作業は、検出されるバンドが目的のもの1本となるまで繰り返した。DGGEで1本のバンドとなることを確認したPCR productsは、Microcon(Millipore)でプライマーとdNTPを除去してシーケンシングサンプルとし、塩基配列を解読した。なおシーケンシング反応にはABI Big dye terminator kit version 3.1(Applied Biosystems)、シーケンサーにはオートシーケンサーABI310(Applied Biosystems)を使用し、それぞれ同社のプロトコルに従い作業を行った。

## 2.6 系統解析

解読した塩基配列については、相同性検索プログラム BLAST (WU-BLAST2, DNA Data Bank of Japan [DDBJ] <http://www.blast.genome.ad.jp>) を使用して、近縁な既知配列を検索した。系統解析には、2.5で解読した *nirS* 塩基配列から推定した、52個のアミノ酸配列を使用した。系統樹は Tree View program version. 1.1.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) を使用し、Neighbor-Joining distance matrix 法により作成した。Bootstrap values は、1000回の系統樹作成において再現された値を使用した。

## 2.7 データベースへの登録

2.5において解読した *nirS* 遺伝子の配列はDDBJに登録した。アクセッションナンバーはAB112875-AB112894である。

## 3. 結果および考察

### 3.1 PPの解析結果

2002年2月に運転を開始したPP(Fig.1)から、2月から6月にかけて、活性汚泥を計10回採取し、2.3.で記述したようにDNAを抽出した。得られたDNAを鋳型として2.4.に示した方法でPCR-DGGE法を行い、脱窒細菌群集構造の解析をした。全てのサンプルを解析する前に、PP馴致時の汚泥(2001年7月に採取)に対し、2.4で述べた24セットを適用したが、DGGEでバンドが得られたのはそのうち8セットのみであった。さらに8セット中の2セットのみで、8セットで得られるバンドの約7割を得ることができたため、解析を簡便にする目的で、適用するプライマーセットをその2セット(2.4のA,B)に絞った。DGGEの結果をFig.2,3に示す。プライマーA setによる結果(Fig.2)およびB setによる結果(Fig.3)ともに、各サンプルから10以上のDGGEバンドが検出できた。また各バンドの強度は、解析開始(2月)から終了(6月)にかけて、それぞれ増加、減少傾向を鮮明に示した。次に2002年2月から6月における、PP脱窒槽内でのフェノール、SCN<sup>-</sup>、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>、TNの濃度の減少分をFig. 4に示した。なお脱窒槽内での各物質濃度の減少値は、以下の計算式により求めた。

$$\text{脱窒槽内での濃度減少値} = (\text{流入水中の濃度} + \text{処理水中の濃度} \times 3) / 4 - \text{脱窒槽出口の濃度} \quad \dots \text{式(1)}$$

Fig.4より、解析期間中、TNの消費量が徐々に高い値で安定していくのが確認できた。またフェノールの消費量は一貫して減少していた。つまり脱窒槽内では徐々に脱窒が行われるようになったが、脱窒の電子供与体として利用されるフェノールは減少していたことが分かった。よってFig.2,3において解析期間中増加傾向を示したバンド{P1-CG14, P1-CG15, P2-CG16 (Fig.2), P2-GA8, P2-GA9(Fig.3)}は、フェノール以外の基質を利用した脱窒を行う細菌由来のバンドではないかという推測ができた。一方、減少傾向を示したバンドのうちすぐに消えてしまったもの{P2-CG3,8(Fig.2)}は、標準プロセスから硝化脱窒プロセスになったことで環境に適合できなくなった、安水中の基質を脱窒の電子供与体として利用できない細菌由来のバンドであると考えた。また減少傾向を示しながらも消えなかったバンド{P2-CG2,5,10, P2-CG6,11, P2-CG7,12 (Fig.2), P2-GA2,6,11, P2-GA7,12(Fig.3)}に関しては、脱窒

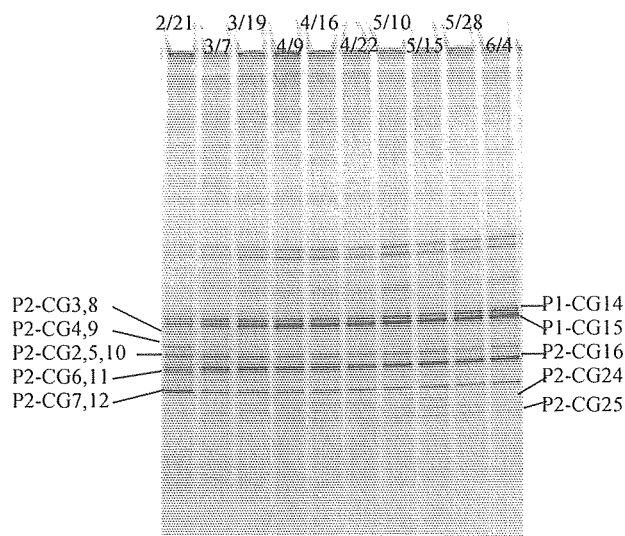


Fig. 2 DGGE analysis of PP with primer set A.

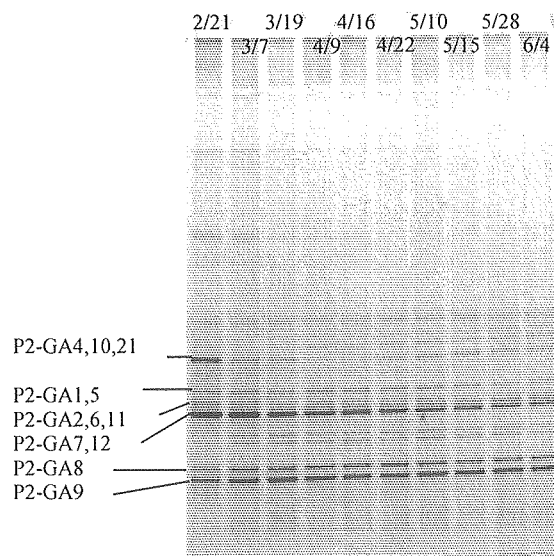


Fig. 3 DGGE analysis of PP with primer set B.

に利用する基質の減少した細菌由来のバンド、つまりフェノールを利用した脱窒を行う細菌由来のバンドではないかと考えた。そこでFig.5に各DGGEバンド強度の値とanoxic tankにおけるフェノール消費量の関係を示した。Fig.5より、フェノールを利用した脱窒を行う細菌由来だと推測した各バンドの強度は、anoxic tankにおけるフェノールの消費量が少ないときに弱くなる傾向が明確となった。特にP2-CG7,12のバンド強度とフェノールの消費量は、比例関係に近かった。Fig.4からはまたSCN<sup>-</sup>の消費量がほぼ一定であることも分かる。解析期間中、強度を一定に保ったバンド{P2-GA1,5(Fig. 3)}は、SCN<sup>-</sup>を電子受容体とした脱窒を行う細菌由来のバンドではないかと考えた。

### 3.2 MPの解析結果

2002年8月に運転を開始したMPから、10月から12月において活性汚泥を計13回採取し、2.3で記述したようにDNAを抽出した。得られたDNAを鋳型として2.4に示した方法でPCR-DGGE法を行い、脱窒細菌群集構造の解析をした。結果をFig.6,7に示す。Fig.6,7には比較のためPPのサンプル(6/4)も同時に並べたが、プライマーA setによる結果(Fig.6)

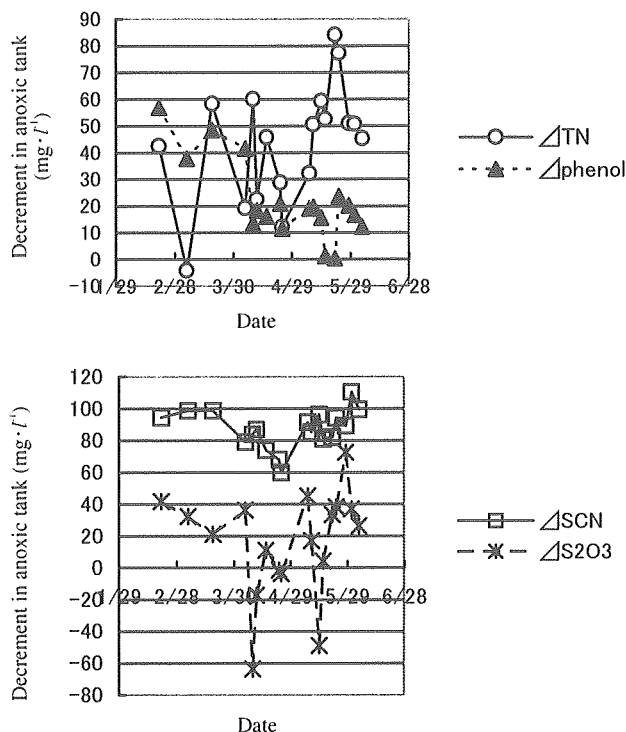


Fig.4 Concentration of 3 substrates and TN digested in anoxic tank.

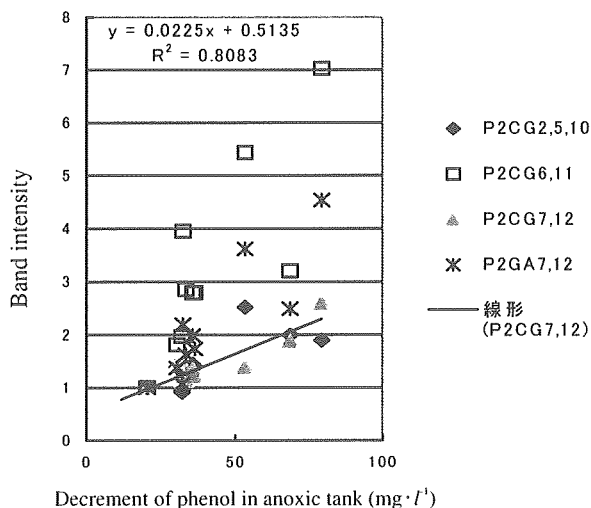


Fig.5 Relationship between digested phenol in the anoxic tank and intensity of DGGE bands. The horizontal axis shows the concentration of phenol, and the vertical axis shows the ratio of the DGGE band intensity. We decided the DGGE band intensity on June 4 as one

およびB setによる結果(Fig.7)ともに、PPの結果に比べ単純なパターンであった。また検出したバンドの多くが、PPの活性汚泥サンプルから得られたバンドと同じ位置に出現した。解析開始(10月)から終了(12月)にかけて、ほぼ一定の強度を示すバンドが多い中、Fig.6におけるM1-CG10は、流入水からフェノールを抜いた11月12日以降に出現したバンドであった。Fig.8は2002年10月から12月におけるMP脱窒槽内でのフェノール、SCN、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、TNの濃度の減少分を3.1.の式1)で計算した結果であるが、フェノールを抜いた後、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>の消費が急激に増えていることが分かった。これよりM1-CG10は、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>を電子供与体とした脱窒を行う細菌由来のバンドではないかと推定した。Fig.9にM1-CG10

のバンド強度の値とanoxic tankにおけるS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>消費量の関係を示した。Fig.9よりS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>消費量が多いとき、バンド強度も増加していることが読み取れた。またM1-CG10はPPからは検出されないバンドであり(Fig.6)、MPでもフェノールを抜いた後に検出されたことから考えて、フェノールによる代謝阻害を受けやすい細菌由来のバンドではないかと推測できた。次にM1-CG4,6は、流入水からフェノールを抜いた後、強度が徐々に減少した。Fig.10にM1-CG4,6のバンド強度の値とanoxic tankにおけるフェノールの消費量の関係を示した。Fig.10より、M1-CG4,6のバンド強度は、anoxic tankにおけるフェノールの消費量と比例関係に近いことが分かった。またM1-CG4,6の塩基配列は、解析の結果PPのP2-CG7,12と同じであった。Fig.5において、P2-CG7,12のバンド強度はフェノール消費量と比例に近い関係を示した。よってPP、MP両プラントにおいて、フェノールの消費量と相関のある結果がえられたこのM1-CG4,6 (P2-CG7,12)は、フェノールを利用した脱窒を行う細菌由来のバンドであることが強く予想できた。最後に、Fig.7において検出した

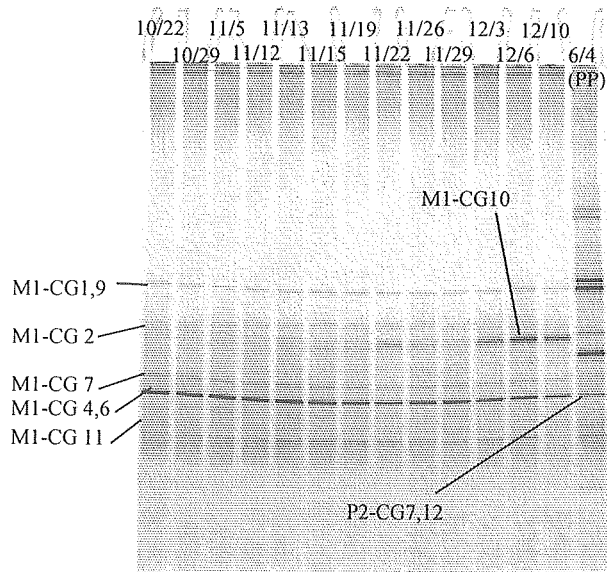


Fig. 6 DGGE analysis of MP with primer set A.

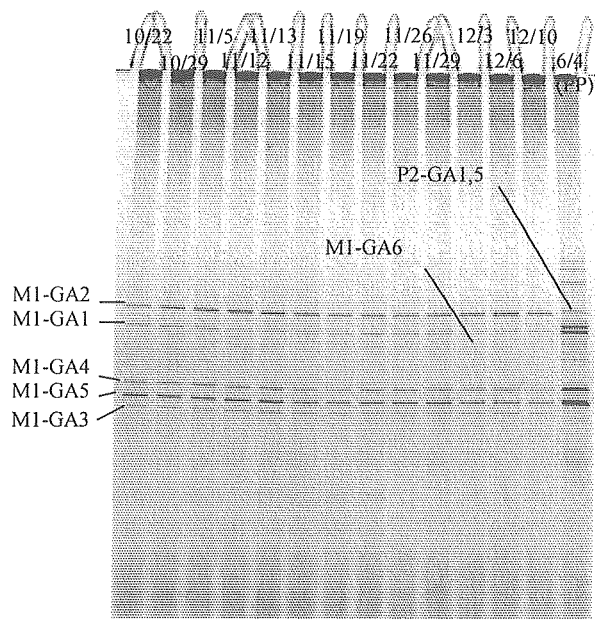


Fig. 7 DGGE analysis of MP with primer set B.

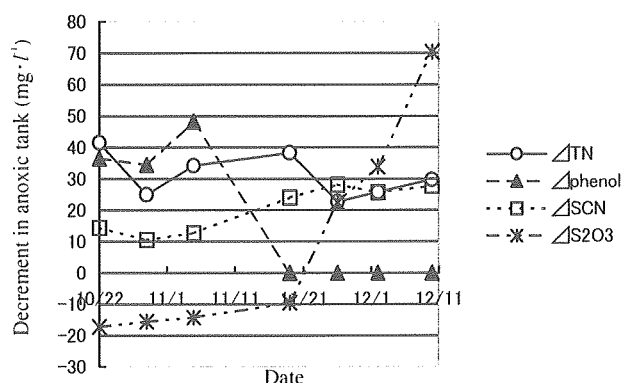


Fig. 8 Concentration of 3 substrates and TN digested in anoxic tank.

全バンドは解析期間中強度の変化が無かったが、このうち M1-GA2はPPでSCNを基質とした脱窒を行っている細菌のバンドと推測したP2-GA1,5(Fig.3)と同位置に検出された(M1-GA2の塩基配列は未解読)。MPにおいて、M1-GA2がフェノールを抜いたことに全く影響を受けなかったことを考えると、フェノールからSCN、 $S_2O_3$ に基質を転換するのが容易であるか、元来SCN、 $S_2O_3$ のみを基質として利用する脱窒細菌由来のバンドであることが予想できる。両プラントの解析結果から考えて、P2-GA1,5、M1-GA2は少なくともSCNを基質として利用できる脱窒細菌由来のバンドであると予想できた。

### 3.3 PPおよびMPから検出されたバンドの塩基配列の解読と系統樹の作成

Fig.2,3,6,7において記号をつけたバンドは、2.5で述べたとおり塩基配列を解読し、データベース上の近縁な配列とあわせて、系統樹を作成した(Fig.11)。3.1でフェノール以外の基質を利用した脱窒を行う細菌由来のバンドではないかと推測したP2-CG16であるが、今回検出したDGGEバンドの中で唯一、単離された既知の細菌 (*Azoarcus*属、*Thauera*属)のクラスターに属す*nirS*配列であることが分かった。また最近縁な配列として挙げた、*Azoarcus toluovorans*の*nirS*遺伝子とは、93%(151bp/162bp)の類似性を示した。*Azoarcus*、*Thauera*という細菌属は、土壌、底泥などの環境サンプルから単離され、フェノール、安息香酸化化合物などの芳香族化合物を炭素源とした脱窒を行うことが確認されている<sup>79)</sup>。また両属の細菌は興味深いことに、好気条件下では利用できない芳香族化合物種も、脱窒条件下では利用できるという報告もある<sup>79)</sup>。P2-CG16のバンドは、Fig.6においては検出されないことから、フェノールを利用した脱窒を行う細菌由来である可能性は低いが、Fig.2において好気条件下で汚泥からは検出されなかったものが、脱窒条件下のPPでは徐々に強度が増加したことから、安水に含まれるフェノール以外の芳香族化合物を脱窒条件下でのみ利用できる細菌由来の可能性はある。

P2-CG16以外のバンドは、Fig.11において既存の細菌種とクラスターを形成せず、新たなクラスターを構成するのがほとんどであった。特に3.1においてフェノール利用の脱窒細菌ではないかと推測したバンド(P2-CG7,12、P2-CG6、11、P2-GA2,6,11、P2-GA7,12)の多くは、今回の研究で検出されたバンドのみで形成されるクラスターに属するものであった。よって安水中でフェノール脱窒を担う細菌種の多くは、これまで単離が行われていない未知の種か、脱窒能を

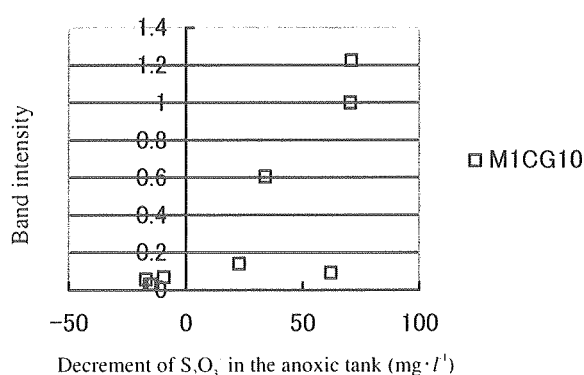


Fig. 9 Relationships between digested  $S_2O_3$  in the anoxic tank and intensity of DGGE bands. The horizontal axis shows the concentration of  $S_2O_3$ , and the vertical axis shows the ratio of the DGGE band intensity. We decided the DGGE band intensity on Dec. 10 as one.

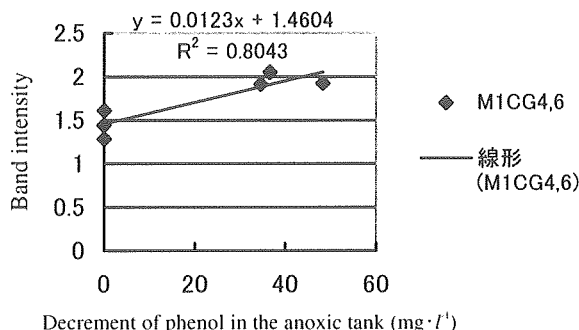


Fig. 10 Relationships between digested phenol in the anoxic tank and intensity of DGGE bands. The horizontal axis shows the concentration of phenol, and the vertical axis shows the ratio of the DGGE band intensity. We decided the DGGE band intensity on Dec. 10 as one.

確認されていない既知の種であると考え。

## 4. まとめ

本研究は、安水を処理する活性汚泥微生物群集を解析した報告であると共に、同一プラント内における脱窒細菌の群集構造の変化を、脱窒細菌の機能遺伝子を標的としたPCR-DGGE法で追跡した研究であった。以下に本研究で得られた知見についてまとめる。

1) *nirS*遺伝子を標的としたPCR-DGGE法により、脱窒細菌群集の変化の一端を鮮明な画像で表現することができた。

2) 脱窒槽内で消費された各基質の量と、DGGEのバンド強度を比較することで、フェノール、SCN、 $S_2O_3$ を利用する脱窒細菌の*nirS*遺伝子配列を推定した。またPP、MPという2つの異なるプラントにおいて、フェノールの量の変化と相関のあった各DGGEバンドは、*nirS*遺伝子の塩基配列が同一であった。

3) 安水を処理する活性汚泥中の脱窒細菌が保有する*nirS*遺伝子のうち、今回のPCR-DGGE法で検出した*nirS*の塩基配列は、既知の脱窒細菌の*nirS*遺伝子とはクラスターを形成しないものがほとんどであった。安水処理の活性汚泥中には、特殊な基質(フェノール、SCN、 $S_2O_3$ )を利用

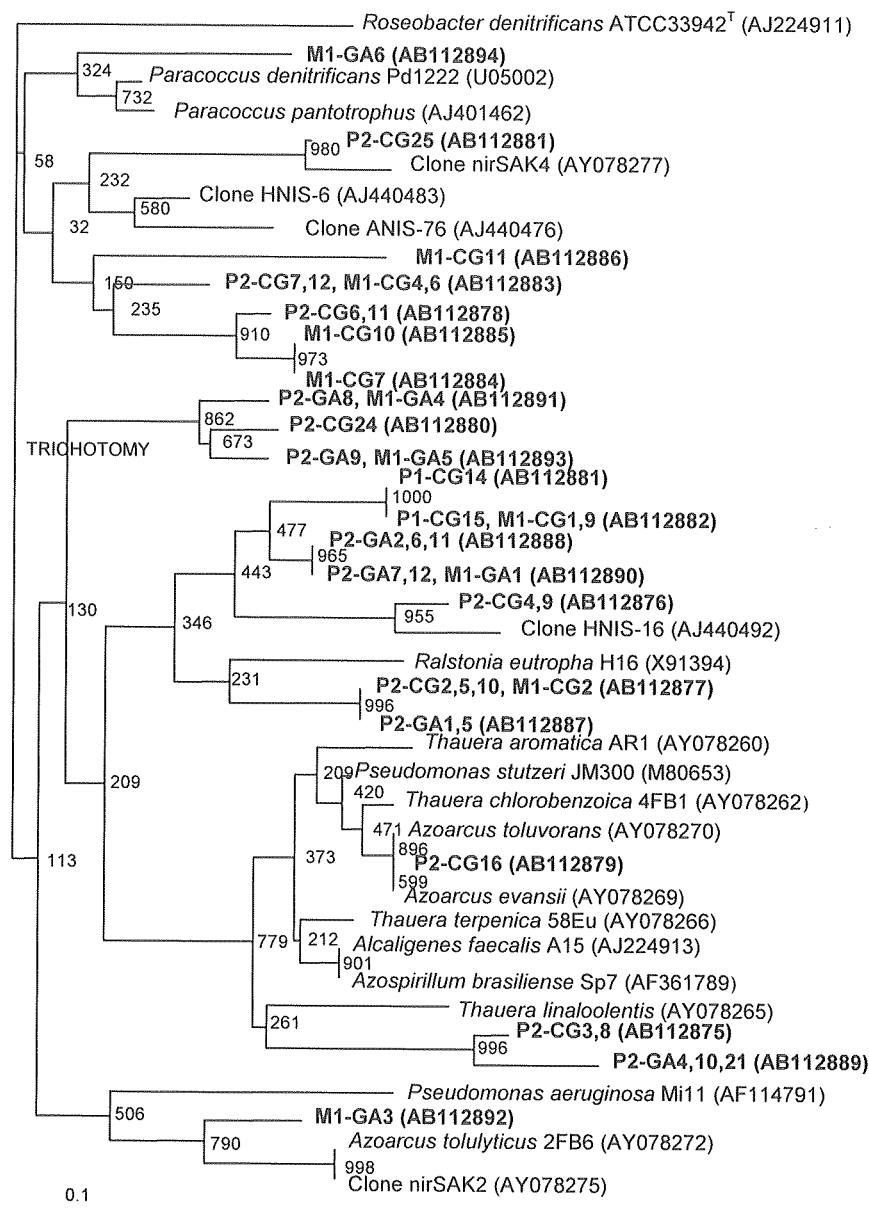


Fig.11 Phylogenetic tree of *nirS* sequences on the basis of 52 amino acids. Scale bar represents 10 amino acids difference in 100. All bootstrap values are reported above. DGGE bands obtained from this study are shown in boldface.

できる未知の脱窒細菌が存在する可能性がある。

(原稿受付 2003年7月18日)

(原稿受理 2004年1月15日)

#### 参考文献

- Lee, M. W. and Park, J. M. (1998) Biological nitrogen removal from coke plant wastewater with external carbon addition, *Water Environ. Res.*, **70**, 1090-1095.
- 村井洋一, 小川重徳, 田原年英, 中村洋一 (1999) 安水処理プロセスの改善, *アロマティックス*, **51**, 18-22.
- Shaw, K. C. (1993) Biological treatment of full-strength coke plant wastewater at Genova Steel, *Iron and Steel Engineer*, 29-32.
- Braker, G., Fesefeldt, A. and Witzel, K.-P. (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3769-3775.
- Hallin, S. and Lindgren, P.-E. (1999) PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1652-1657.
- 新田見匡, 栗栖太, 佐藤弘泰, 味埜俊 (2003) *nirS*遺伝子をターゲットとしたPCR-DGGE法による活性汚泥中脱窒細菌群集構造の解析, *水環境学会誌*, **26**, 583-588.
- Schie, P. M. and Young, L. Y. (1998) Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 2432-2438.
- Shinoda, Y., Sakai, Y., Ue, M., Hiraishi, A., and Kato, N. (2000) Isolation and characterization of a new denitrifying spirillum capable of anaerobic degradation of phenol, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1286-1291.
- Song, B., Palleroni, N. J. and Haggblom, M. M. (2000) Isolation and Characterization of diverse halobenzoate degrading denitrifying bacteria from soils and sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 3446-3453.
- Song, B., Palleroni, N. J., Kerkhof, L. J. and Haggblom, M. M. (2001) Characterization of halobenzoate-degrading, denitrifying *Azoarcus* and *Thauera* isolates and description of *Thauera chlorobenzoica* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 589-60.