

学位論文

生物学的リン除去プロセスにおけるポリリン酸蓄積細菌の
新規定量手法の確立とその生理・生態学的研究への応用

(Development of Novel Quantitative Methods for Polyphosphate Accumulating
Organisms in Enhanced Biological Phosphorus Removal Process and Its
Application to Study of Their Ecophysiology)

福島 寿和

目次

1章 序論	1
1.1 研究の背景	2
1.1.1 富栄養化	2
1.1.2 枯渇資源としてのリン	2
1.1.3 下水におけるリン除去	4
1.1.4 生物学的リン除去プロセスの課題	5
1.2 研究の目的	6
1.3 論文の構成	7
2章 知見の整理	9
2.1 本研究に関わる知見	10
2.2 生物学的リン除去プロセス	10
2.2.1 プロセスの原理	10
2.2.2 リン除去の悪化	14
2.2.2.1 リン除去悪化のパターン	14
2.2.2.2 リン除去の悪化に影響する因子	16
2.3 微生物解析手法	19
2.3.1 PCR-Cloning法	19
2.3.2 PCR-DGGE法	20
2.3.3 FISH法	21
2.3.4 定量PCR法	22
2.3.5 MAR-FISH法	25
2.3.6 SIP法	25
2.4 生物学的リン除去プロセス内の細菌群集	27
2.4.1 ポリリン酸蓄積細菌 (PAOs)	27
2.4.1.1 分離株	27
2.4.1.2 微生物解析手法で同定された細菌種	28
2.4.2 グリコーゲン蓄積細菌 (GAOs)	30
2.4.2.1 分離株	30
2.4.2.2 微生物解析手法で同定された細菌種	31
2.5 活性汚泥モデル	32
2.5.1 IWA活性汚泥モデルの概要	32
2.5.2 活性汚泥モデルNo.2 (ASM2)	32
2.6 まとめ	36
3章 <i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphatis'の定量手法の確立と活性汚泥試料への適用	37
3.1 背景と目的	38
3.2 実験方法	38
3.2.1 活性汚泥試料	38
3.2.1.1 実験室規模EBPRリアクター	38
3.2.1.2 実下水処理場汚泥	40
3.2.2 FISH法を用いた定量	40
3.2.2.1 FISH法	40
3.2.2.2 顕微鏡観察および面積定量	42
3.2.3 定量PCR法を用いた定量	43
3.2.3.1 DNAサンプル	43
3.2.3.2 定量PCR法	44
3.3 実験結果	50
3.3.1 定量PCR法の確立	50

3.3.1.1 QPrimer PCR法	50
3.3.1.2 QProbe PCR法	56
3.3.1.3 インターカレーター法	58
3.3.2 活性汚泥試料への適用	61
3.3.2.1 実験室規模EBPRリアクターにおける定量	61
3.3.2.2 実下水処理場汚泥中の‘Accumulibacter’の定量	64
3.3.2.3 FISH法および定量PCR法による定量結果の比較	64
3.4 考察	66
3.4.1 インターカレーター法による定量の迅速性および定量限界	66
3.4.2 インターカレーター法およびFISH法によって得られた定量値の相関	67
3.5 まとめ	69
4章 <i>Microlunatus phosphovor</i>の定量手法の確立と活性汚泥試料への適用	70
4.1 背景と目的	71
4.2 実験方法	72
4.2.1 活性汚泥試料	72
4.2.2 定量PCR法	72
4.2.2.1 検量線DNAの調製	72
4.2.2.2 活性汚泥試料からのDNA抽出	73
4.2.2.3 プライマーの設計	73
4.2.2.4 PCR条件	75
4.2.2.5 PCR産物の特異性の確認	75
4.2.2.6 定量性の検討	76
4.3 実験結果	77
4.3.1 定量PCR法の確立	77
4.3.1.1 PCR産物の特異性の確認	77
4.3.1.2 検量線の作成および活性汚泥試料における定量値のばらつき	78
4.3.2 活性汚泥試料への適用	79
4.3.2.1 実験室規模リアクターの汚泥中の <i>M. phosphovor</i> 16S rRNA遺伝子の定	79
4.3.2.2 実下水処理場汚泥中の <i>M. phosphovor</i> 16S rRNA遺伝子の定量	83
4.4 考察	84
4.4.1 定量PCR法の確立	84
4.4.2 活性汚泥中の <i>M. phosphovor</i> の存在量とその経時的変化	84
4.4.3 <i>M. phosphovor</i> のリン除去への寄与	85
4.5 まとめ	87
5章 <i>Candidatus</i> ‘Accumulibacter phosphatis’の好気培養における増殖条件の探索と分離の試み	88
5.1 背景と目的	89
5.2 実験方法	90
5.2.1 活性汚泥試料	90
5.2.2 定量PCR法	90
5.2.2.1 DNAサンプル	90
5.2.2.2 ‘Accumulibacter’の定量PCR法の修正	90
5.2.2.3 全細菌の定量PCR法の確立	91
5.2.3 Percollを用いた密度分離法	92
5.2.3.1 Percollを用いた密度分離	92
5.2.3.2 密度分離による‘Accumulibacter’濃縮の確認	93
5.2.4 プレート培養法での増殖条件の探索	93
5.2.4.1 プレート培養	93
5.2.4.2 プレートウォッシュ法	94
5.2.5 液体培養法での増殖条件の探索	94
5.2.5.1 汚泥試料	95
5.2.5.2 液体培地の組成	95

5.2.5.3 液体培養	95
5.2.5.4 水質分析	95
5.2.5.5 'Accumulibacter' の定量	95
5.2.6 分離方法	96
5.2.6.1 プレート培養法における分離	96
5.2.6.2 液体培養法における分離	96
5.3 実験結果	97
5.3.1 全細菌に対する定量PCR法の検討	97
5.3.1.1 PCR条件の検討	97
5.3.1.2 定量性および再現性の確認	98
5.3.2 'Accumulibacter' の濃縮	99
5.3.3 プレート培養法での増殖条件の探索	101
5.3.3.1 定量PCR条件を変更する前における検討	101
5.3.3.2 定量PCR条件を変更した後における検討	105
5.3.4 液体培養法での増殖条件の探索	107
5.3.4.1 培地の炭素源濃度の検討	107
5.3.4.2 増殖条件の検討	108
5.3.5 分離の試み	119
5.4 考察	120
5.4.1 全細菌に対する定量PCR法の検討	120
5.4.2 'Accumulibacter' の濃縮	121
5.4.3 プレート培養法での増殖条件の探索	122
5.4.4 液体培養法での増殖条件の探索	123
5.4.5 分離の試み	125
5.5 まとめ	126
6章 リン除去悪化時における <i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphatis' の挙動	127
6.1 背景と目的	128
6.2 実験方法	128
6.2.1 リアクターの運転	128
6.2.2 活性汚泥試料の採取および水質モニタリング	130
6.2.2.1 活性汚泥試料の採取	130
6.2.2.2 水質モニタリング	130
6.2.3 定量PCR法	130
6.2.3.1 DNA抽出	130
6.2.3.2 定量PCR法	131
6.2.4 PCR-DGGE法	131
6.2.4.1 PCR	131
6.2.4.2 DGGE	131
6.2.5 FISH法およびポリリン酸染色法	131
6.3 実験結果	134
6.3.1 pH低下型リアクター1; R14 (pH7.5 ± 0.1 6.5 ± 0.1)	134
6.3.1.1 リアクターの水質モニタリング結果	134
6.3.1.2 'Accumulibacter' の挙動	134
6.3.1.3 細菌群集構造の変化	137
6.3.2 pH低下型リアクター2; R18 (pH7.9 ± 0.1 6.5 ± 0.1)	138
6.3.2.1 リアクターの水質モニタリング結果	138
6.3.2.2 'Accumulibacter' の挙動	138
6.3.2.3 細菌群集構造の変化	142
6.3.3 pH低下型リアクター3; R21 (pH7.9 ± 0.1 6.5 ± 0.1)	143
6.3.3.1 リアクターの水質モニタリング結果	143
6.3.3.2 'Accumulibacter' の挙動	143
6.3.3.3 細菌群集構造の変化	147
6.3.4 pH低下型リアクター4; R20 (pH6.5 ± 0.1 6.0 ± 0.1 7.5 ± 0.1)	148
6.3.4.1 リアクターのモニタリング結果	148

目次

6.3.4.2 ‘Accumulibacter’の挙動	149
6.3.4.3 細菌群集構造の変化	153
6.3.5 対照リアクター1; R16 (pH7.5 ± 0.1)	154
6.3.5.1 リアクターのモニタリング結果	154
6.3.5.2 ‘Accumulibacter’の挙動	154
6.3.5.3 細菌群集構造の変化	157
6.3.6 対照リアクター2; R19 (pH7.9 ± 0.1)	158
6.3.6.1 リアクターのモニタリング結果	158
6.3.6.2 ‘Accumulibacter’の挙動	158
6.3.6.3 細菌群集構造の変化	162
6.3.7 ‘Accumulibacter’減少時におけるPAOsの探索	163
6.3.7.1 R18における‘Accumulibacter’以外のPAOs	163
6.3.7.2 R14およびR21における‘Accumulibacter’以外のPAOs	164
6.4 考察	165
6.4.1 リアクターの運転状況	165
6.4.2 ‘Accumulibacter’の存在量および挙動	166
6.4.3 ‘Accumulibacter’以外の細菌	168
6.5 まとめ	169
7章 定量PCR法による<i>Candidatus</i> ‘Accumulibacter phosphatis’の 定量結果によるモデル評価	170
7.1 背景と目的	171
7.2 方法	171
7.2.1 リアクター(R18)の処理性能および‘Accumulibacter’の実測値	171
7.2.2 ASM2	172
7.2.2.1 成分、反応速度定数および化学量論係数	172
7.2.2.2 反応速度式	174
7.2.3 解析方法	175
7.2.3.1 入力条件	175
7.2.3.2 数値シミュレーションの実行	176
7.2.3.3 感度解析およびキャリブレーション	176
7.3 結果	177
7.3.1 X_{PP} , S_{PO4} および S_A のモデル解析	177
7.3.1.1 定数を推奨値に設定した場合の計算結果	177
7.3.1.2 感度解析	178
7.3.1.3 キャリブレーション	182
7.3.2 X_{PAO} のモデル解析	185
7.4 考察	186
7.4.1 X_{PP} , S_{PO4} および S_A のモデル解析	186
7.4.2 X_{PAO} のモデル解析	187
7.5 まとめ	190
8章 総括	191
8.1 総括	192
8.1.1 定量手法の確立	192
8.1.2 ‘Accumulibacter’の生理・生態学的知見の収集	193
8.2 今後の展望	194
参考文献	196
謝辞	212
Appendix 定量RT-PCR法による<i>Candidatus</i> ‘Accumulibacter phosphatis’の16S rRNA定量手法の確立と活性汚泥試料への適用	214

略語一覧

略語	正式名（英名）	正式名（和名）
'Accumulibacter'	<i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphatis'	
AO	Anaerobic–Aerobic	嫌気-好気
A2O	Anaerobic–Anoxic–Aerobic	嫌気-無酸素-好気
ASM	Activated Sludge Model	活性汚泥モデル
ATP	Adenosine Triphosphate	アデノシン三リン酸
BSA	Bovine Serum Albumin	ウシ血清アルブミン
CIA	Capillary Ion Analyzer	
COD	Chemical Oxygen Demand	化学的酸素要求量
Ct	Threshold Cycle	
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole	
DGGE	Denaturing Gradient Gel	変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DNA	Deoxyribonucleic Acid	デオキシリボ核酸
DNase	Deoxyribonuclease	デオキシリボヌクレアーゼ
EBPR	Enhanced Biological Phosphorus Removal	生物学的リン除去
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization	
GAOs	Glycogen Accumulating Organisms	グリコーゲン蓄積細菌
HRT	Hydrolic Retention Time	水理学的滞留時間
MAR	Microautoradiography	
<i>M. phosphovor</i>	<i>Microlunatus phosphovor</i>	
MLSS	Mixed Liquor Suspended Solids	
MLVSS	Mixed Liquor Volatile Suspended	
PAOs	Polyphosphate Accumulating	ポリリン酸蓄積細菌
PBS	Phosphate Buffered Saline	
PCR	Polymerase Chain Reaction	
PHA	Polyhydroxyalkanoates	ポリハイドロキシアлкаノエイト
QPrimer	Quenching Primer	
Qprobe	Quenching Probe	
RNA	Ribo Nucleic Acid	リボ核酸
RO	Reverse Osmosis	逆浸透
RT	Reverse Transcription	逆転写
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	ドデシル硫酸ナトリウム
SIP	Stable Isotope Probing	
SRT	Sludge Retention Time	汚泥滞留時間
TE	Tris-EDTA	
T-RFLP	Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphisms	制限酵素切断断片長多型法
UCT	University of Cape Town	ケープタウン大学

図表一覧

1章 序論

図1.1 リンの循環	3
図1.2 論文の構成	8

2章 知見の整理

表2.1 PAOsに関わるプロセスの化学量論マトリクス	34
図2.1 EBPRプロセスの基本構造	11
図2.2 PAOsの代謝	12
図2.3 リン除去が良好なプロセスにおける水質（リン、有機物）の挙動	12
図2.4 A0法以外のEBPRプロセス	13
図2.5 嫌気での有機物摂取が見られるリン除去悪化のパターン	14
図2.6 嫌気での有機物摂取が見られないリン除去悪化のパターン	15
図2.7 微生物解析手法	19
図2.8 PCR-DGGE法の原理	21
図2.9 FISH法の原理	22
図2.10 定量PCR法による定量の基本原則	22
図2.11 各定量PCR法の原理	24
図2.12 ASM2におけるPAOsの代謝反応	33

3章 *Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'*の定量手法の確立と活性汚泥試料への適用

表3.1 実験室規模リアクターの基質組成	40
表3.2 FISHプローブ	41
表3.3 定量PCR法で検討したプライマーおよびプローブ	45
表3.4 各定量PCR法におけるPCR条件の検討項目	47
表3.5 Touchdown PCRのプログラム	54
図3.1 リアクター概略図	39
図3.2 リアクター写真	39
図3.3 1サイクルのタイムシーケンス	39
図3.4 Betaproteobacterialに属する細菌の系統樹	46
図3.5 アガロース電気泳動	50
図3.6 Ampli Taq Goldを用いた場合の増幅曲線および検量線	52
図3.7 KOD plus-を用いた場合の増幅曲線および検量線	52
図3.8 Ampli Taq GoldおよびKOD plus-を用いたPCR産物の解離曲線	53
図3.9 Touchdown PCRによるPCR産物の解離曲線	55
図3.10 アガロース電気泳動	56
図3.11 各サイクルにおけるQProbeの消光率	57
図3.12 PCR増幅曲線	59
図3.13 インターカレーター法によるPCR産物の解離曲線	59
図3.14 インターカレーター法による定量PCRの検量線	60
図3.15 実験室規模EBPRリアクターにおける ' <i>Accumulibacter</i> ' の定量結果	62-63
図3.16 実下水処理場汚泥における ' <i>Accumulibacter</i> ' の定量結果	64
図3.17 FISH法および定量PCR法による ' <i>Accumulibacter</i> ' の定量結果の比較	65
図3.18 両対数グラフによるFISH法および定量PCR法による ' <i>Accumulibacter</i> ' の定量結果の比較	67

4章 *Microtholunatus phosphovorius*の定量手法の確立と活性汚泥試料への適用

図4.1	Actinobacteriaに属する細菌の系統樹	74
図4.2	解離曲線解析	77
図4.3	検量線	78
図4.4	各リアクターにおけるリン含有率および <i>M. phosphovorius</i> の定量結果	80-81
図4.5	R6（グルタミン酸・酵母エキス）におけるリン含有率（%/MLVSS）の経時的変動	82
図4.6	各処理方式の実下水処理場汚泥における <i>M. phosphovorius</i> の定量結果	83
図4.7	R5およびR6における <i>M. phosphovorius</i> および‘ <i>Accumulibacter</i> ’の定量結果	86

5章 *Candidatus ‘Accumulibacter phosphatis’*の好気培養における増殖条件の探索と分離の試み

表5.1	全細菌を対象としたプライマー	91
表5.2	各濃度のPercolI溶液の組成	92
表5.3	シーケンシング反応に用いたプライマー	96
表5.4	異なる炭素源を用いた培養後の基質濃度	108
表5.5	異なるpHによる培養後のpHおよび基質濃度	110
表5.6	異なる培養温度による培養後の基質濃度	112
表5.7	各条件における培養後のpH	116
図5.1	357fおよび907rCをプライマーとした定量PCRによる解離曲線	97
図5.2	全細菌を対象とした定量PCRによる検量線	98
図5.3	各PercolI濃度によって分離した汚泥中の全細菌に対する‘ <i>Accumulibacter</i> ’の割合	100
図5.4	各PercolI濃度によって分離した汚泥における‘ <i>Accumulibacter</i> ’の濃縮倍率	100
図5.5	各pHおよび汚泥の希釈倍率によって培養したプレートにおける‘ <i>Accumulibacter</i> ’の定量PCR法による定量結果	102
図5.6	分離株のFISH画像	103
図5.7	各アニーリング条件における定量値の相関	105
図5.8	各濃度の酢酸培地における基質摂取	107
図5.9	異なる炭素源を用いて培養した汚泥試料の定量結果	109
図5.10	異なるpHによって培養した汚泥試料の定量結果	111
図5.11	異なる培養温度によって培養した汚泥試料の定量結果	113
図5.12	グルコースおよびその発酵産物によって培養した汚泥試料の定量結果	115
図5.13	異なる培養時間およびpH緩衝材の有無による条件で培養した汚泥試料の定量結果	117
図5.14	異なるpHにおける <i>M. phosphovorius</i> の増殖	124

6章 リン除去悪化時における*Candidatus ‘Accumulibacter phosphatis’*の挙動

表6.1	各リアクターの基質組成	129
表6.2	FISH法で使用したプローブ	133
図6.1	各リアクターのpH	129
図6.2	MLSSおよびMLVSS（R14）	135
図6.3	嫌気および好気終了時の溶存態リン（R14）	135
図6.4	嫌気および好気終了時の酢酸（R14）	135
図6.5	好気終了時のMLVSSに対するリン含有率（R14）	136

図表一覧

図6.6	‘ Accumulibacter ’ の定量結果 (R14)	136
図6.7	全細菌に対する ‘ Accumulibacter ’ の割合 (R14)	136
図6.8	PCR-DGGE法による群集解析結果 (R14)	137
図6.9	MLSSおよびMLVSS (R18)	139
図6.10	嫌気および好気終了時の溶存態リン (R18)	139
図6.11	嫌気および好気終了時の酢酸 (R18)	139
図6.12	好気終了時のMLVSSに対するリン含有率 (R18)	140
図6.13	‘ Accumulibacter ’ の定量結果 (R18)	140
図6.14	全細菌に対する ‘ Accumulibacter ’ の割合 (R18)	140
図6.15	1サイクルにおける溶存態リンおよび酢酸の挙動 (R18)	141
図6.16	PCR-DGGE法による群集解析結果 (R18)	142
図6.17	MLSSおよびMLVSS (R21)	144
図6.18	嫌気および好気終了時の溶存態リン (R21)	144
図6.19	嫌気および好気終了時の酢酸 (R21)	144
図6.20	好気終了時のMLVSSに対するリン含有率 (R21)	145
図6.21	‘ Accumulibacter ’ の定量結果 (R21)	145
図6.22	全細菌に対する ‘ Accumulibacter ’ の割合 (R21)	145
図6.23	1サイクルにおける溶存態リンおよび酢酸の挙動 (R21)	146
図6.24	PCR-DGGE法による群集解析結果 (R21)	147
図6.25	MLSSおよびMLVSS (R20)	150
図6.26	嫌気および好気終了時の溶存態リン (R20)	150
図6.27	嫌気および好気終了時の酢酸 (R20)	150
図6.28	好気終了時のMLVSSに対するリン含有率 (R20)	151
図6.29	‘ Accumulibacter ’ の定量結果 (R20)	151
図6.30	全細菌に対する ‘ Accumulibacter ’ の割合 (R20)	151
図6.31	1サイクルにおける溶存態リンおよび酢酸の挙動 (R20)	152
図6.32	PCR-DGGE法による群集解析結果 (R20)	153
図6.33	MLSSおよびMLVSS (R16)	155
図6.34	嫌気および好気終了時の溶存態リン (R16)	155
図6.35	嫌気および好気終了時の酢酸 (R16)	155
図6.36	好気終了時のMLVSSに対するリン含有率 (R16)	156
図6.37	‘ Accumulibacter ’ の定量結果 (R16)	156
図6.38	全細菌に対する ‘ Accumulibacter ’ の割合 (R16)	156
図6.39	PCR-DGGE法による群集解析結果 (R16)	157
図6.40	MLSSおよびMLVSS (R19)	159
図6.41	嫌気および好気終了時の溶存態リン (R19)	159
図6.42	嫌気および好気終了時の酢酸 (R19)	159
図6.43	好気終了時のMLVSSに対するリン含有率 (R19)	160
図6.44	‘ Accumulibacter ’ の定量結果 (R19)	160
図6.45	全細菌に対する ‘ Accumulibacter ’ の割合 (R19)	160
図6.46	1サイクルにおける溶存態リンおよび酢酸の挙動 (R19)	161
図6.47	PCR-DGGE法による群集解析結果 (R19)	162
図6.48	Gammaproteobacteriaに属するPAOs	163
図6.49	R18のリン含有率および ‘ Accumulibacter ’ の挙動	167

7章 定量PCR法による *Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'* の定量結果によるモデル評価

表7.1	成分の定義	172
表7.2	反応速度定数の定義および推奨値 (20)	173
表7.3	化学量論係数の定義および推奨値	173
表7.4	各プロセスの反応速度式	174

図表一覧

図7.1	定数を推奨値に設定した場合の X_{pp} の計算結果および実測値	177
図7.2	定数を推奨値に設定した場合の S_{p04} の計算結果および実測値	177
図7.3	定数を推奨値に設定した場合の S_A の計算結果および実測値	178
図7.4	q_{pp} の感度解析の結果	179
図7.5	q_{PHA} の感度解析の結果	181
図7.6	キャリブレーションの結果	183
図7.7	運転1サイクル目における X_{pp} および S_{p04} の計算結果	184
図7.8	X_{PA0} の計算結果	185
図7.9	運転開始時の汚泥中の X_{PA0} を117mgCOD/Lに設定した計算結果	188
図7.10	X_{PA0} を117mgCOD/Lに設定した場合の処理性能の計算結果	189

1 章 序論

1 章目次

1.1 研究の背景

1.1.1 富栄養化

1.1.2 枯渇資源としてのリン

1.1.3 下水におけるリン除去

1.1.4 生物学的リン除去プロセスの課題

1.2 研究の目的

1.3 論文の構成

1.1 研究の背景

研究の背景を本節にて述べる。まず、リンに関わる社会的問題として、富栄養化およびリン資源の枯渇についてまとめ、下水からリンを除去することの重要性について確認した。つづいて、下水からリンを除去する手法をまとめ、本研究で対象とした生物学的リン除去プロセスをそのほかの手法と比較した。最後に生物学的リン除去プロセスについて、今後改善していくべき課題をまとめた。

1.1.1 富栄養化

湖沼などの閉鎖性水域における富栄養化は世界的に問題となっており、当然わが国日本においても深刻な問題となっている。日本の湖沼の多くは、都市下水、工場排水および農業排水などの流入によって、その清浄さを失い、植物プランクトンの大増殖を引き起こすようになった。流入する排水によって湖水中の窒素やリンといった栄養塩類の濃度が上昇する現象を富栄養化と呼び、上述のようにこの原因が人間活動に起因する場合は人為的富栄養化と呼ばれている。

富栄養化状態となった湖沼では、植物プランクトンが大増殖を起こすなど、累進的に水質が悪化する。この結果、水道水に異臭味がつく、魚が斃死する、などといった利水上の様々な障害を生じてしまう。

富栄養化の主な要因として、窒素およびリンが挙げられるが、この中でもリンによる影響は非常に大きいと考えられている。窒素は大気中から固定することが可能であるが、リンは上流からの流入が大部分であり、その点で律速因子となるケースが多いからである。また、リンの富栄養化への影響については Schindler が 1970 年代に詳細に検討している。Schindler (1974) は炭素源、窒素およびリンを単独もしくは組み合わせて湖に投入することで、富栄養化に影響する要因を検討した。この結果、リンを単独で投入する湖で最も早く富栄養化が見られ、また逆に、リンの投入を中止することで急速に元の状態に戻ることが明らかになった。さらに Schindler (1978) の研究では、湖水中の全リンと植物プランクトン量の指標となるクロロフィル a との間に高い相関があることを報告されている。

このように近年問題となっている富栄養化の主たる要因の一つはリンであると考えられており、湖沼のような閉鎖性水域に、人間活動によって排出されるリンを流入させないようにすることが重要な課題となっている。

1.1.2 枯渇資源としてのリン

リンは農業肥料等に必要な資源であり、近年は枯渇の危機に瀕している。特に、全てを輸入に頼っている日本においては今後深刻な問題となる可能性が高い。立見(1986a-d, 1987)によると、利用可能なリン資源は 100 年以内に枯渇してしまうとの試算も出ている。

リン資源の地球上での循環を図 1.1 に示す。リン資源の原材料はほとんどがリン鉱石であり、化学肥料や工業製品などに加工されている。製品に加工された後は、様々な経緯をた

どり、最終的には海洋の堆積物となる。堆積物となったリンはまたリン鉱石として理論的には循環するものの、リン鉱石にたどり着くまでに長時間を要するため、現実的には非循環となってしまう。すなわち、リンの循環はおこなわれないため資源として枯渇していく。

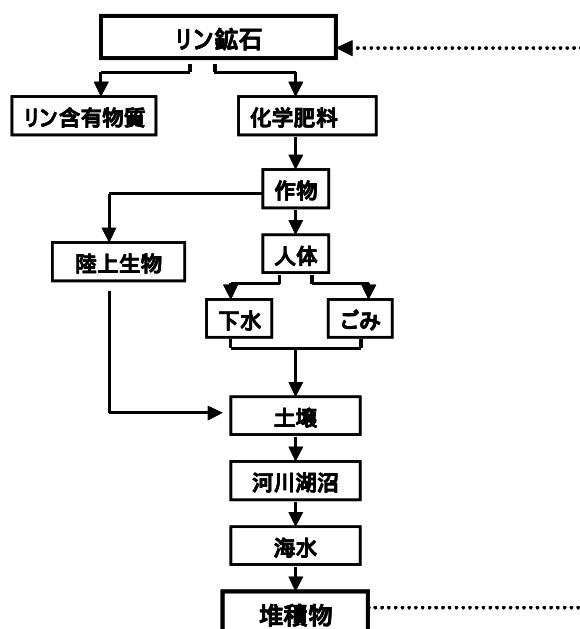


図 1.1 リンの循環（金澤、1997）

このような状況の中、リン資源をリサイクルする必要性が高まっている。水谷（1998）は日本におけるリンの物質循環図を作成した上で、下水汚泥や食物由来の廃棄物からリンをリサイクルすることの重要性を提唱している。また、スウェーデンの Environmental Protection Agency（EPA）においても、下水汚泥からのリンのリサイクルを推進している。

下水汚泥からのリンのリサイクルについては様々な研究がおこなわれている。Kuroda et al.（2002）はポリリン酸の形でリンを蓄積している活性汚泥に熱処理を加えることで、汚泥からリンを分離できることを発見した。その分離したリンを、カルシウムを用いて沈殿させることで回収できることが実証されている（Takiguchi et al., 2003）。この手法では凝集にカルシウムを使用するため、重金属による汚染を心配する必要はない。その他ジルコニウムメゾ構造体を用いた回収方法（巽、2004）など、様々な手法が開発されている。

このように、リンは枯渇資源としての一面を持ち、下水汚泥からのリン資源回収はその解決策の一つとして挙げられ、研究が進められている。一方で、汚泥等の廃棄物には重金属や病原菌が含まれているため、それらによるリスクを低減することが今後の課題となっている。

1.1.3 下水におけるリン除去

これまで述べてきたように下水に含まれるリンは、人為的富栄養化の原因物質となるため、下水から除去する必要がある。また将来的には、除去したリンをリサイクルするシステムの構築が必要である。以下に、化学的処理と生物学的処理（生物学的リン除去プロセス）によるリン除去法についてまとめ、それらを比較する。

リンの化学的処理には、金属(鉄やアルミニウム)を含む凝集剤を用いる。一般的には、ポリ塩化アルミニウムが汎用されており、有機物や窒素を除去するための活性汚泥法と組み合わせられている。このポリ塩化アルミニウムが下水中に溶けているリンと結合すると、水に溶けないリン酸アルミニウムとなり、最終沈殿池で活性汚泥とともに沈降し、下水から取り除かれる。

リンの生物学的処理では、生物学的リン除去（EBPR; Enhanced Biological Phosphorus Removal）プロセスと呼ばれる活性汚泥処理法を用いる。EBPR プロセスは、標準活性汚泥法の前段に嫌気槽を設ける。嫌気と好気の状態を交互に繰り返すことによって、汚泥にリンを高濃度に蓄積させることが可能になり、下水からリンを除去できる。EBPR プロセスの詳細は 2.2 に示すが、ポリリン酸蓄積細菌（PAOs; Polyphosphate Accumulating Organisms）がリン除去を担っているとされている。また、リンと同時に有機物も除去できる。

一般的に化学的処理は確実にリンを除去できるが、コストが高いとされている。一方で生物学的処理はコスト面で有利であるが、雨天等流入水質の変動によって処理性能が不安定になりやすく、化学的処理と併用して用いられているケースが多い。なお、コスト面について、一日の平均処水量が 500,000m³/日の処理場を想定すると、以下のような費用が推定される（日本下水道協会、1999）。建設費においては化学的処理（但し、有機物処理のために標準活性汚泥法は用いる）が約 35 億円であり、生物学的処理の約半分でよい。一方で 1 年間に必要な維持管理費は、化学的処理で約 6 億円と、生物学的処理の約 2 億円よりも高くなる。このため、9 年以上維持すると生物学的処理のほうがコスト面で有利となる。但し、前述のように生物学的処理においても化学処理を併用するケースが多く、凝集剤の使用頻度によってはコストが高くなる。このように処理性能の不安定性が克服されれば、生物学的処理は非常に有効な処理法であるといえる。

リン回収については、重金属や病原性によるリスクやコスト面で問題があるため、実処理場レベルにおいて実施しているケースはまだ少ない。但し、1.1.2 に示したとおり、汚泥からリンを回収する技術は小規模レベルでは既に確立されつつあり、今後実処理場レベルでの技術確立が期待される。

1.1.4 生物学的リン除去プロセスの課題

1.1.3 で述べたように、EBPR プロセスは下水からリンを除去する手法として有効な手段であるが、不安定な処理性能が重大な問題となっている。安定した処理性能を実現するためには、プロセス内にてリン除去を担っている微生物、特に PAOs について十分に理解する必要がある。PAOs についての知見を得ることによって、PAOs がリン除去をおこなうためにふさわしい条件を設定することが可能になるからである。実際、これまでの研究で PAOs を中心とした微生物の同定や代謝、機能について、その一部が明らかになってきた。しかしながら、それらの結果がプロセスの最適化に直結するようなケースはこれまでほとんどない。これまでに得られている知見についての詳細は 2 章にてまとめるが、以下に、EBPR プロセスにおける課題について、簡潔にまとめる。

これまでにプロセスの最適化に必要な PAOs に関する知見が得られていない理由として、技術的、戦略的な問題がまだ残っていることが挙げられる。まず、EBPR プロセスにおける PAOs の挙動を詳細に把握する手法が確立されていない。PAOs の挙動を詳細に把握することができれば、リン除去能と PAOs との関係をより明確に比較することが可能になる。次に、リン除去悪化と PAOs との関係があまり明らかになっていない。先に述べたように、EBPR プロセスにおいて重要な課題はリン除去不安定性の克服である。にもかかわらず、リン除去が悪化するケースにおける PAOs の生態学的知見はほとんど得られていない。最後に、主要な PAOs が分離されていないため、詳細な代謝や機能があまり解析されていないことが挙げられる。これまで、数種の細菌が PAOs として提案されているが、その中で主要な PAOs と考えられている *Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphatis*’ (Hesseltmann et al., 1999) (以下 ‘*Accumulibacter*’ と記す) はいまだ分離されていない。主要な PAOs である ‘*Accumulibacter*’ の機能や代謝を把握することは、より安定したプロセスの構築にとって非常に有用な知見となる。

ここまでミクロな視点における課題を述べてきたが、EBPR プロセスにおける微生物反応の全体像を把握することも、プロセス安定化のために重要な知見となる。全体像を把握するために微生物の反応をモデル化する検討も盛んにおこなわれている。モデル化することによって、活性汚泥プロセスの挙動を定量的に表現でき、さらにはプロセスの挙動を予測することも可能になるからである。当然、EBPR プロセスを対象としたモデルの構築も盛んに検討されている。但し、モデル化にはプロセス内で活躍する微生物の反応や生物量を把握することが必要であるが、正確な生物量がわからないままモデルが構築されているのが現状である。このため、EBPR プロセスにおける PAOs の生物量を正確に把握する手法を確立することが必要となる。これが実現されれば、モデルによってプロセス内の挙動を正確に表現し、予測することが可能となる。

このように、EBPR プロセスにおける処理性能の不安定性を克服するためには、プロセス内で活躍する微生物について、ミクロおよびマクロの視点から知見を得ることが重要である。

1.2 研究の目的

以上のような背景を踏まえて、生物学的リン除去プロセスにおいてリン除去を担っている PAOs の生理・生態学的知見を得ることを本研究の目的とした。これらの知見は、より安定的且つ効率的なプロセスの構築のために必要不可欠なものである。

本研究ではまず、生理・生態学的知見を得るための手法として、PAOs を迅速且つ正確に定量できる新たな手法を定量 PCR 法によって確立した。PAOs として、‘Accumulibacter’および *Microlunatus phosphovorus* (以下、*M. phosphovorus* と記す) を選択した。それらの定量手法を確立した後に、活性汚泥試料への適用性を検証した。また、リン除去への寄与度が明らかになっていない *M. phosphovorus* については、確立した手法を用いてそのリン除去への寄与を推定した。なお、細菌種および手法を選んだ理由は 2 章にて詳細に記す。

続いて確立した手法を用いて、2 つのアプローチから生理・生態学的知見を得るための検討をおこなった。これらの検討は‘Accumulibacter’を中心におこない、*M. phosphovorus* については、リン除去への寄与が大きいと考えられた場合にのみ、検討することとした。

1 つ目のアプローチでは、‘Accumulibacter’の好気培養における増殖条件を探索し、分離を試みた。‘Accumulibacter’の増殖条件を探索することで、この細菌の生理学的知見が得られることが期待される。また分離されれば、生理や生態をさらに詳細に明らかにすることが可能となり、プロセス最適化へのノウハウが蓄積できる。さらには、分離株を担体として工業的に利用することも可能となる。

2 つ目のアプローチでは、運転途中で pH を低下させた実験室規模 EBPR リアクターにおける‘Accumulibacter’の挙動を解析した。EBPR プロセスの欠点はリンの処理性能が不安定な点であり、リン除去が悪化する要因の一つとして、pH による影響がこれまで報告されている。そこで、運転途中で pH を低下させたリアクターにおける‘Accumulibacter’の挙動を調査した。これにより、リン除去の悪化に関与するとされている pH と‘Accumulibacter’との関係を明らかにできる。また、上述の検討で得られたデータを用いて、処理性能と PAOs の存在量を数値モデルによって再現することを試みた。

1.3 論文の構成

本論文の構成を図 1.2 示す。以下に各章について説明する。

1 章 序論

本研究の背景、目的および論文の構成について述べた。

2 章 知見の整理

本研究に関わる知見についてまとめた。

3 章 *Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'* の定量手法の確立と活性汚泥試料への適用

定量 PCR 法による '*Accumulibacter*' 存在量の定量手法を確立した。また、活性汚泥内の '*Accumulibacter*' を定量 PCR 法と FISH 法を用いて定量し、その定量結果を比較することで、活性汚泥試料への適用性を評価した。

4 章 *Microthrix phosphovorans* の定量手法の確立と活性汚泥試料への適用

定量 PCR 法による *M. phosphovorans* 存在量の定量手法を確立し、これまで明らかになっていなかった活性汚泥中の *M. phosphovorans* のリン除去への寄与を評価した。

5 章 *Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'* の好気培養における増殖条件の探索と分離の試み

'*Accumulibacter*' の好気培養における増殖条件を定量 PCR 法によって探索した。また、活性汚泥試料中の '*Accumulibacter*' を濃縮する手法を検討した。これらの検討から得られた条件を用いて '*Accumulibacter*' の分離を試みた。

6 章 定量 PCR 法による *Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'* の挙動解析

6 系列の実験室規模 EBPR リアクターにおける '*Accumulibacter*' の挙動を定量 PCR 法を用いて解析した。特に、pH を低下させて運転した実験室規模 EBPR リアクターにおけるリン除去および '*Accumulibacter*' の挙動を詳細に把握することで、pH 低下による影響について検討した。

7 章 実験室規模 EBPR リアクターにおける処理性能および PAOs の数値モデル評価

活性汚泥モデルによる PAOs のモデル解析について、有効性と問題点を明らかにした。

まず、6 章で運転したリアクターの処理性能を再現するためにモデルのキャリブレーションをおこなった。処理性能を再現できたモデルを用いた PAOs の計算結果と、定量 PCR 法で得られた '*Accumulibacter*' の定量結果を比較することで有効性および問題点を明らかにした。

8 章 総括

7 章までに得られた知見を総括し、今後の展望を記した。

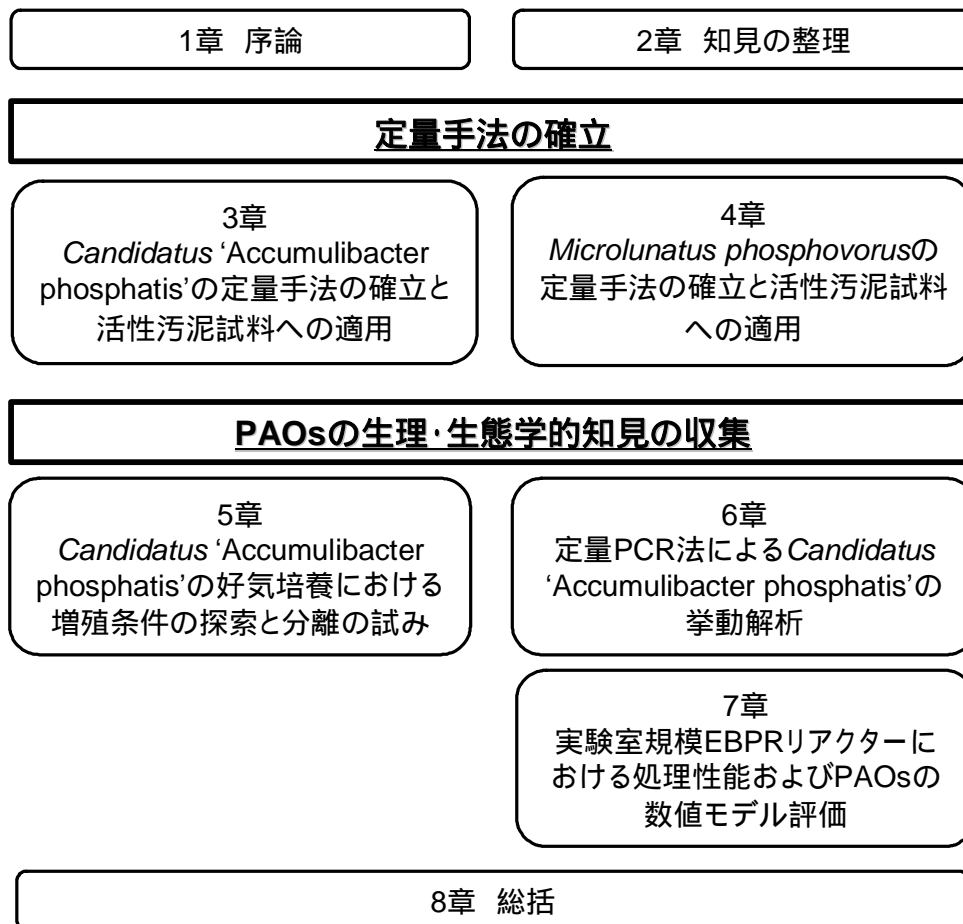


図 1.2 論文の構成

2 章 知見の整理

2 章目次

- 2.1 本研究に関わる知見
 - 2.2 生物学的リン除去プロセス
 - 2.2.1 プロセスの原理
 - 2.2.2 リン除去の悪化
 - 2.3 微生物解析手法
 - 2.3.1 PCR-Cloning 法
 - 2.3.2 PCR-DGGE 法
 - 2.3.3 FISH 法
 - 2.3.4 定量 PCR 法
 - 2.3.5 MAR-FISH 法
 - 2.3.6 SIP 法
 - 2.4 生物学的リン除去プロセス内の細菌群集
 - 2.4.1 ポリリン酸蓄積細菌 (PAOs)
 - 2.4.2 グリコーゲン蓄積細菌 (GAOs)
 - 2.5 活性汚泥モデル
 - 2.5.1 IWA 活性汚泥モデルの概要
 - 2.5.2 活性汚泥モデル No.2 (ASM2)
 - 2.6 まとめ
-

2.1 本研究に関わる知見

本研究に関わる知見を 2.2～2.5 にまとめた。2.2 では、本研究で対象とした生物学的リン除去プロセスについてまとめた。ここでは、プロセスの原理およびリン除去の悪化について述べた。特にリン除去の悪化については、どのような因子が影響しているかについて詳細にまとめた。これらの知見は、本研究で運転した実験室規模 EBPR リアクターの運転条件決定に活用した。

2.3 ではプロセス内に存在する微生物の群集構造や機能を解析するための手法を整理した。それぞれの手法における原理や特徴を把握し、本研究の目的に合致した手法を選択するための情報とした。

2.4 では生物学的リン除去プロセスにてリン除去を担うとされているポリリン酸蓄積細菌、およびその競合細菌であるグリコーゲン蓄積細菌についてまとめた。ここでは分離株および、分離はされていないものの 2.3 にて述べた手法を用いて解析された細菌種に分けて述べた。この情報をもとに、本研究で対象とすべき細菌種を決定した。

最後に、本研究で用いた活性汚泥モデルについて知見をまとめた。まず、活性汚泥モデルの概要について整理し、生物学的リン除去プロセスに用いるモデルについてまとめた。

2.2 生物学的リン除去プロセス

2.2.1 プロセスの原理

生物学的リン除去（以下、EBPR と記す）プロセスの起源は 30 年以上前に遡り、Barnard（1975）による実証実験によってリン除去能が実証された。既に実用段階にあり、多くの専門書にてその原理が説明されている。ここでは、村田（1992）によってまとめられている内容を中心に、プロセスの原理について簡単に紹介する。なお、本論文での「無酸素」および「嫌気」の定義は次の通りとする。「無酸素」は遊離の酸素分子（ O_2 ）は存在しないが、硝酸等の結合性酸素は存在する状態、「嫌気」は遊離の酸素分子および結合性酸素のいずれも存在しない状態を示す。

EBPR プロセスの基本構造は図 2.1 に示したとおり、好気槽の前段に嫌気槽を設ける。嫌気と好気の状態を交互に繰り返すことによって、污泥にリンを高濃度に蓄積させることが可能になる。このリンを蓄積した污泥を沈殿池で固液分離することで、処理水からリンが除去される。また有機物についても除去が可能であり、主に嫌気工程内にて分解される。EBPR プロセスの SRT は処理施設によって幅があるが 10 日程度である。また、回分式での一般的な 1 サイクル（6 時間）のタイムシーケンスは、嫌気 1.5 時間、好気 2.5 時間程度である。

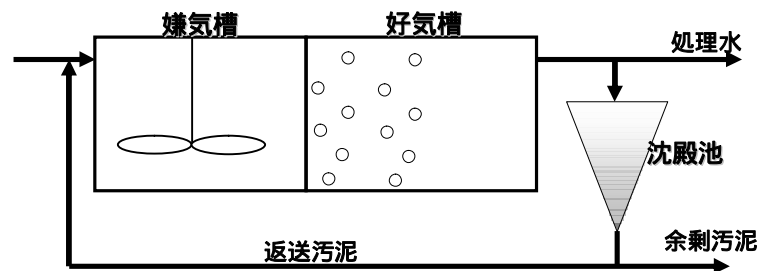


図 2.1 EBPR プロセスの基本構造

EBPR プロセスにおけるリン除去は、ポリリン酸蓄積細菌（以下、PAOs と記す）が担っていると考えられている。PAOs は EBPR プロセスにおいて、図 2.2 のような代謝を持つ細菌であると定義されている（Mino et al., 1998）。嫌気工程では、ポリリン酸（図では Poly-P）を加水分解して得たエネルギー（ATP; アデノシン三リン酸）を用いて有機物を摂取する。摂取した有機物は増殖には使わず、PHA（Polyhydroxy alkanoate）という物質として菌体内に蓄積される。なお、この有機物摂取および PHA 合成のためには、ポリリン酸から得られるエネルギーに加えて、還元力が必要となる。還元力については TCA サイクルもしくはグリコーゲンの解糖という二つの説がある。前者は Comeau/Wentzel モデル（Comeau et al., 1986, Wentzel et al., 1986）、後者は Mino モデル（Mino et al., 1987）としてそれぞれ生化学モデルが提唱されている。一般的に、PAOs はいずれかもしくは、両方の代謝を備えていると考えられている。なお、このグリコーゲンはポリリン酸同様にエネルギー源としても用いられると考えられている。

続く好気工程では、PHA を用いて増殖をおこなう。また、PHA を分解し、得られた acetyl-CoA や Propionyl-CoA から、TCA サイクルを介してエネルギーを得る。このエネルギーはポリリン酸やグリコーゲンの再合成に用いられる。

このように、PAOs は嫌気工程で PHA を蓄積することで、好気条件下で細胞外の有機物が無くとも増殖することが可能である。すなわち、嫌気-好気工程からなる EBPR プロセス内では、PAOs が優先的に増殖することが可能となる。

PAOs が優占し、良好なリン除去がおこなわれているプロセスにおいては、図 2.3 のような水質の挙動が見られる。嫌気槽においては、ポリリン酸によって加水分解されたリン酸によって水中のリン濃度は上昇する。一方で下水に含まれる有機物は PAOs が摂取、蓄積するために、濃度が減少する。続く好気槽内においては、PHA を分解することによって得られたエネルギーを用いて、リン摂取がおこなわれる。このため、水中のリンの濃度が減少する。

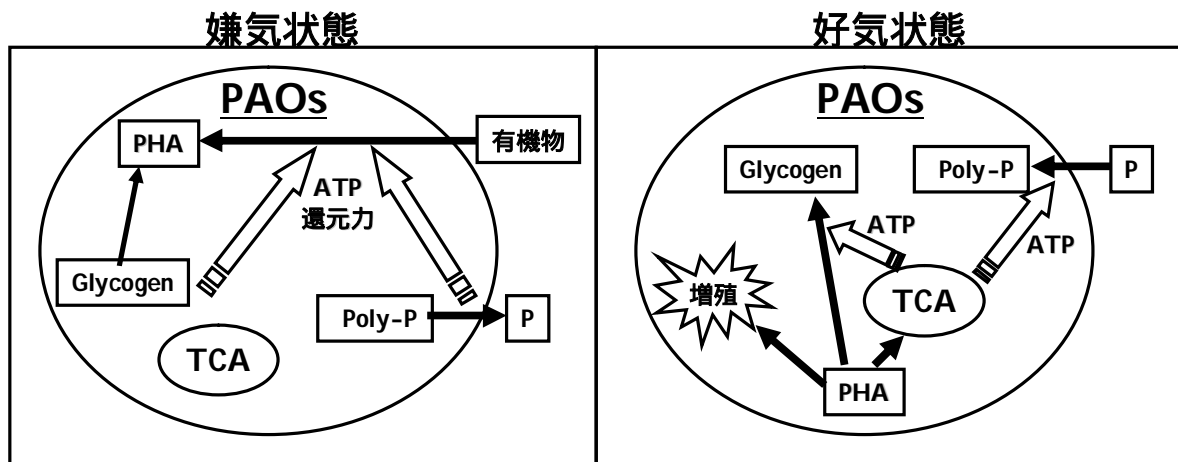


図 2.2 PAOs の代謝

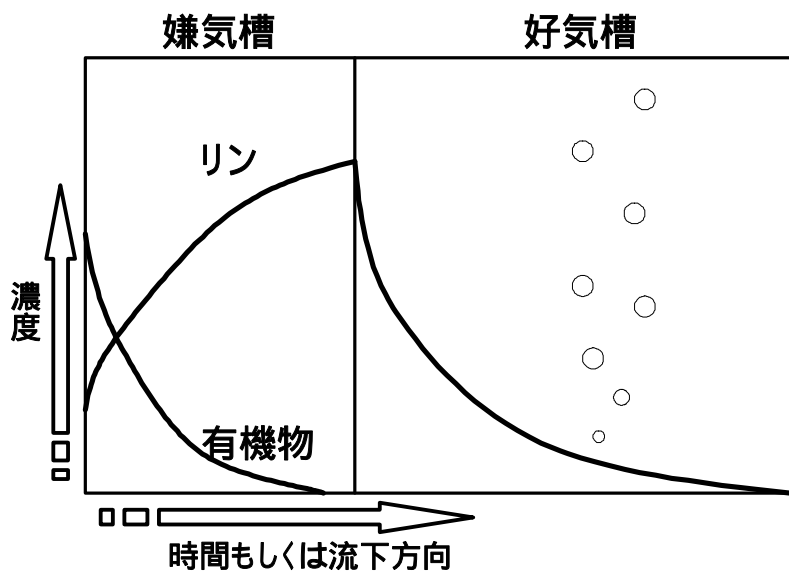


図 2.3 リン除去が良好なプロセスにおける水質（リン、有機物）の挙動

EBPR プロセスは図 2.1 のような嫌気槽と好気槽からなる嫌気好気法 (AO 法) 以外にも、図 2.4 に示したプロセスが提案されている。各プロセスの詳細を以下に示す。

(A) 嫌気無酸素好気法 (A2O 法)

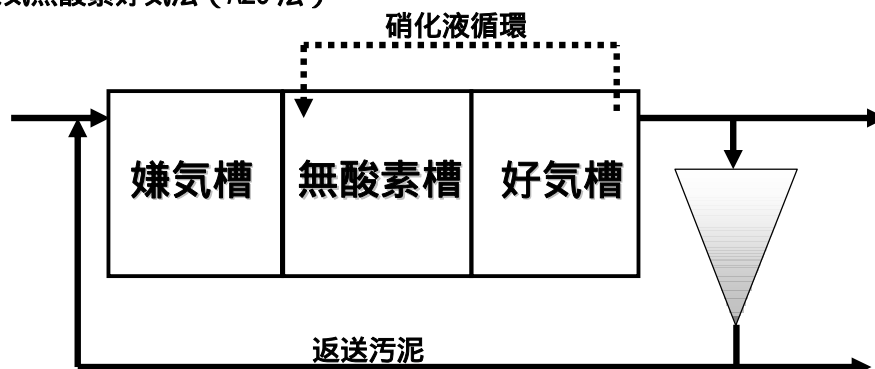
リン除去法である AO 法と窒素除去法である循環式硝化脱窒法を組み合わせた方法で、有機物、リンに加えて、AO 法では処理が難しい窒素も除去できる手法として注目されている。A2O 法は嫌気、無酸素、好気の順で処理槽を並べ、好気槽から無酸素槽に硝化液を循環させる。下水から流入する有機物、リンおよび窒素は次のように除去される。まず、嫌気槽では PAOs によって有機物の一部が除去される。続く無酸素槽では硝化液が循環され、有機物の除去と脱窒がおこなわれる。最後の好気槽においては、アンモニア性窒素の硝化、PAOs によるリンの除去がおこなわれる。ここで硝化された窒素は無酸素槽に循環されて除去される。

(B) ケープタウン大学法 (UCT 法)

ほとんど A2O 法と同じであるが、汚泥の返送方法が異なる。沈殿池から発生する汚泥を無酸素槽に返送し、無酸素槽の末端から嫌気槽に汚泥の一部を返送する。これは、沈殿池にある汚泥には硝酸性窒素が含まれているため、嫌気槽へ直接返送すると嫌気状態を保つのが困難になるからである。このため、一度無酸素槽に返送し、脱窒をした後に一部の汚泥を嫌気槽に返送する。A2O 法と比べて嫌気槽に流入する硝酸性窒素の量を減らすことができるため、脱窒細菌の有機物摂取を防ぐことができる。この結果、PAOs が優占的に有機物を摂取可能になり、リン除去能力が高まる。

この他に擬似嫌気好気法 (Pseudo-AO 法) と呼ばれるものがある。標準活性汚泥法の前段の曝気量を制限することによって、溶存酸素が 0 に近い状態となり、擬似的に嫌気好気状態にすることができる。Pseudo-AO 法は、バルキング現象 (糸状菌が増殖することによって汚泥の沈降性が悪くなる現象) の抑制を目的として用いられることが多い。また、下水中の有機物が多い場合には、曝気制限をせずとも擬似嫌気好気状態になることがある。このような場合においても EBPR プロセスのようなリン除去がおこなわれる。

(A) 嫌気無酸素好気法 (A2O 法)



(B) ケープタウン大学法 (UCT 法)

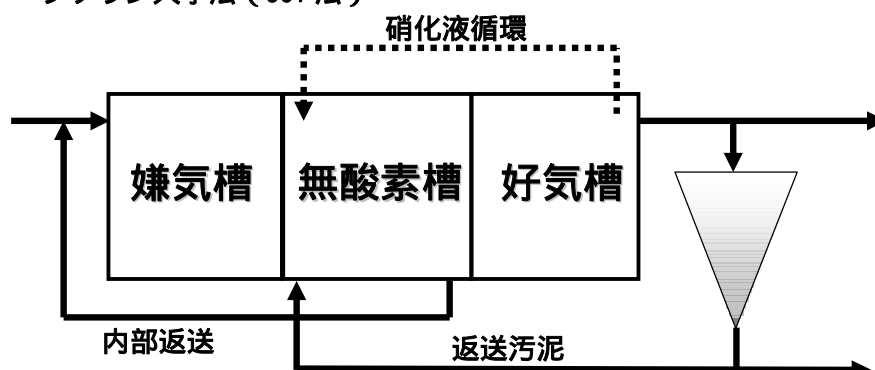


図 2.4 A0 法以外の EBPR プロセス

2.2.2 リン除去の悪化

1 章で述べたように EBPR プロセスは化学的処理に比べて利点が多いものの、処理能力の不安定性が大きな課題となっている。ここでは、リン除去悪化のパターンおよび悪化に関わる運転、環境因子についてまとめる。

2.2.2.1 リン除去悪化のパターン

リン除去悪化のパターンは大きく分けて以下の 2 つに分けられる。一つ目は嫌気での有機物摂取が見られるが、リンの放出が見られず、好気においてもリンの取り込みが見られないパターンである。もう一つは嫌気での有機物の摂取も見られないパターンである。

嫌気での有機物摂取が見られるパターン

リン除去の悪化パターンとして、図 2.5 のように嫌気状態で有機物は摂取されているが、リンの放出、摂取が見られないという挙動がしばしば確認されている。このパターンは 2.2.2.2 に述べるように、様々な原因によって引き起こされることが報告されている。このパターンでは、グリコーゲン蓄積細菌（GAOs; glycogen accumulating organisms）と命名された細菌の存在が PAOs に代わって優占していると考えられている（Mino et al., 1995）。

GAOs は好気条件下でポリリン酸を蓄積するかわりに、グリコーゲンを蓄積し、嫌気条件下でこのグリコーゲンをエネルギー源および還元力として有機物摂取をおこなう。したがって GAOs は PAOs 同様、嫌気条件下でエネルギーを生産して有機物を得ることができるため、EBPR プロセスにおいて PAOs と競合することが可能となる。

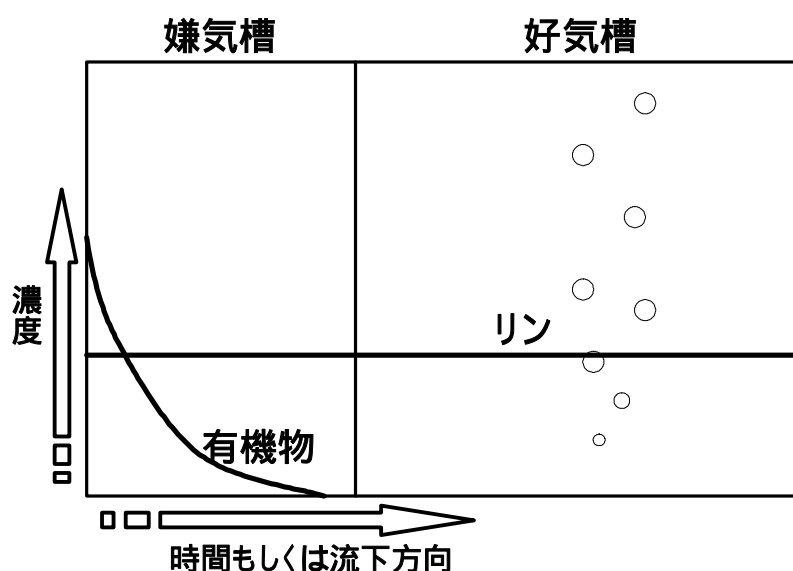


図 2.5 嫌気での有機物摂取が見られるリン除去悪化のパターン

嫌気での有機物摂取が見られないパターン

もう一つのリン除去悪化のパターンとして、図 2.6 に示すように、嫌気状態で有機物の摂取がおこなわれず、リンの放出、摂取も見られないという挙動が確認されている。このパターンは福島(2003)によって運転された実験室規模 EBPR リアクターで頻繁に見られた。このうち、いくつかのリアクターにおいてはバルキング現象が起こるとともにこのような挙動をしめした。

このようなパターンにおいては PAOs や GAOs などといった嫌気状態で有機物を摂取できる細菌がいないため、好気状態になるまで有機物が残る。それを従属栄養細菌が摂取するといった状態である。このような場合には従属栄養細菌が有機物を好気状態で摂取するのみで、リンは増殖に用いられた微量のみが除去される。

EBPR プロセスは嫌気状態で有機物を摂取する細菌が優占しやすい条件であるが、実験室規模 EBPR リアクターにおいてこのパターンにおけるリン除去の悪化がたびたび見られた。このパターンについてはあまり研究がされておらず、どのような微生物が関与しているかについてはよくわかっていない。

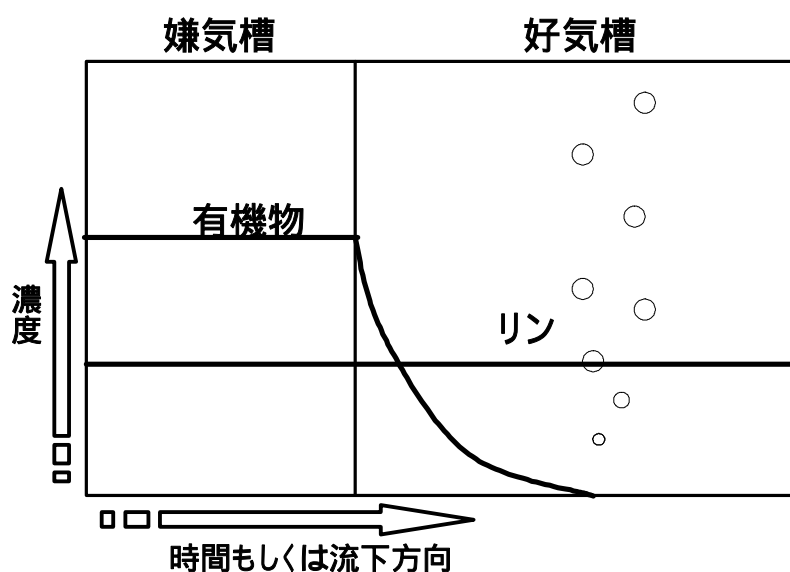


図 2.6 嫌気での有機物摂取が見られないリン除去悪化のパターン

2.2.2.2 リン除去の悪化に影響する因子

リン除去の悪化に影響する因子として、pH、温度および炭素源についての研究が数多く報告されている。以下にそれぞれの因子における影響についてまとめる。これらの報告では多くの場合、GAOs が PAOs よりも優占し、2.2.2.1 に述べた「嫌気での有機物摂取が見られるパターン」におけるリン除去の悪化となっている。

また、嫌気槽内における硝酸の存在 (Kuba et al., 1994) 過度の曝気 (Brdjanovic et al., 1998b) や、マグネシウムやカリウムの不足 (Imai et al., 1988、Rickard et al., 1992) といった運転トラブルによっても、リン除去が悪化することが報告されている。ポリリン酸を安定させるためには、対イオンであるマグネシウムやカリウムが必要であり、排水中の濃度が低下することによって、リン除去が不安定になる。但し、過剰な濃度においても適切なリン除去はおこなわれず、高濃度のカルシウム存在下において不活性なポリリン酸が生成し、リンの放出および摂取を阻害することも報告されている (Barat et al., 2006)。

pH による影響

リン除去の pH による影響については多くの研究例が報告されており、主に酢酸を中心とした VFA (Volatile Fatty Acid) を炭素源としたバッチ試験または実験室規模 EBPR リアクターにおいて、PAOs と GAOs の競合を評価している。多くの報告において pH を 8 程度まで上昇させると PAOs が優占しやすくなるとされている。

Filipe et al. (2001a) は好気条件における pH の影響を調べるために、pH を 6.5、7.0 および 7.5 に設定し、評価した。この結果、pH を 6.5 に下げると PAOs のリンの摂取、PHA の消費および増殖が阻害されることがわかった。一方で GAOs の増殖や PHA の消費には pH はほとんど影響しない結果となった。また、Filipe et al. (2001b) は嫌気条件における酢酸摂取を各 pH において比較した。この結果、pH が 7.25 未満における酢酸摂取速度は GAOs の方が速く、7.5 を超えると PAOs の方が速いことがわかった。

このほか多くの論文において、嫌気、好気条件の両方もしくは一方の pH を上げることによって良好なリン除去が見られることが報告されている (Bond et al., 1999、Jeon et al., 2001、Schuler et al., 2002、Serafim et al., 2002)。但し、pH を 8 よりも高くしてしまうと逆にリン除去は悪化することも報告されている (Liu et al., 1996、Oehmen et al., 2005a)。

温度による影響

温度による影響について検討した報告の多くが、温度を下げる方が良好なリン除去が見られるとしている。

Whang et al. (2002) は、20 で運転したリアクターにおいては良好なリン除去が見られたが、30 で運転したリアクターでは嫌気での酢酸摂取は見られるものの、リンの放出および摂取が減少し、リン除去が悪化したことを報告している。Panswad et al. (2003) は 20 から 35 に温度を上げると嫌気でのリンの放出量は増えるが、リンの取り込み量が減るこ

とを報告した。Panswad et al. (2003) および Bradjanovic et al. (1997, 1998) は嫌気におけるリンの放出量と酢酸の摂取量から PAOs と GAOs の生物量を推定した結果、PAOs の化学量論は温度に依存しないとしている。すなわち、温度上昇によるリン除去の悪化は GAOs の増殖速度が速くなったことに起因すると推測している。

Brdjanovic et al. (1998a) や Erdal (2003) は、5 °C のような低い温度においても良好な EBPR を運転できることを示している。また、温度を下げることによって、リン除去が改善することも報告されている。

炭素源による影響

様々な炭素源を用いて実験室規模 EBPR リアクターを運転した研究例が、数多く報告されている。グルコースを炭素源として用いた場合においては、リン除去が見られたケースと見られないケースの両方が報告されている。逆に、VFA である酢酸またはプロピオン酸を炭素源とすると、良好なリン除去が得られると報告されている。但し、GAOs との競合の面において、PAOs が有利に増殖する炭素源であるかについては不明な点が多い。以下に各炭素源について検討した報告をまとめる。

グルコースを炭素源とした場合、運転条件に大きな違いが無いにも関わらず、良好なリン除去が見られたケース (Jeon et al., 2000, Wang et al., 2002) とリン除去がうまくいかなかったケース (Cech et al., 1990, Tashi et al., 1997) の両方が報告されている。なお、Kong et al. (2004) は、主要な PAOs である ‘*Accumulibacter*’ がグルコースを直接摂取することができないことを MAR-FISH 法によって示している。さらに Kong et al. (2004) は、‘*Accumulibacter*’ はグルコースの発酵により生成した酢酸やプロピオン酸等の VFA を取り込むと推測している。

既存の研究において最も適用例が多い炭素源は酢酸である。酢酸を主要な炭素源として実験室規模 EBPR リアクターを運転すると、良好なリン除去が確認されとの報告が多くされている (Hesselmann et al., 1999, Crocetti et al., 2000)。一方で酢酸は GAOs も同様に摂取可能であることが近年明らかになっており (Kong et al., 2006)、pH の変化などによっては、GAOs が PAOs に代わって優占するケースも報告されている (Oehmen et al., 2005a, Oehmen et al., 2006)。このように、酢酸は PAOs だけでなく様々な細菌が摂取可能であることから、優占的に PAOs が増殖するための条件となるかについては疑問がもたれている。

近年、プロピオン酸を用いた実験室規模 EBPR リアクターにおいて、PAOs が GAOs よりも優占するとの報告がされている (Oehmen et al., 2005a, Oehmen et al., 2005b, Oehmen et al., 2006)。これらの報告では、酢酸と比較してもプロピオン酸を用いた方が、より PAOs が優占しやすいと結論付けている。Kong et al. (2006) は MAR-FISH 法によって主要な GAOs の一種である *Candidatus* ‘*Competibacter phosphatis*’ の基質摂取特性を検討したところ、一部の *Candidatus* ‘*Competibacter phosphatis*’ のみがプロピオン酸を摂取していたことを報告している。すなわちプロピオン酸を摂取可能ではあるが、その摂取能は低いと考えられている。

しかしながら、*Candidatus 'Competibacter phosphatis'*同様に、主要な GAOs として考えられている Alphaproteobacteria に属する細菌は、活発にプロピオン酸を摂取可能であると報告 (Meyer et al., 2006) されている。このため、プロピオン酸を用いることによって、本当に PAOs が GAOs よりも優占的に増殖できるか否かについてはさらなる検討が必要となる。

そのほかの炭素源として、福島 (2003) は酢酸、グルコースに加え、アミノ酸であるアスパラギン酸およびグルタミン酸を唯一もしくは主たる炭素源として実験室規模 EBPR リアクターを運転している。その結果、全てのリアクターにおいてリン除去が確認され、且つ、*'Accumulibacter'* がリンを蓄積していたことを報告している。但し、リン除去能は酢酸を炭素源としたリアクターが最も高い結果となっている。また、炭素源の種類のほか、流入水に含まれる炭素とリンの比率 (P/C 比) が PAOs の代謝に多大な影響をおよぼすことが報告されている。Kong et al. (2002a) は酢酸を炭素源として運転した実験室規模 EBPR リアクターにおいて P/C 比を 1 : 10 から 1 : 50 に変更することで、リンの放出量が激減したことを示している。

2.3 微生物解析手法

本研究に関連のある微生物解析手法についてまとめた。本節では、図 2.7 に示すように、微生物群集構造の全体像を定性的に解析する手法、特定細菌を定量的に評価する手法、および細菌の機能を解析する手法について紹介する。これらの手法は分離を必要とせずに情報を得ることができる。

なお、図 2.7 に示す手法のほかに T-RFLP 法 (Liu et al., 1997、Osborn et al., 2000) や DNA Microarray 法 (Loy et al., 2002) が、微生物解析手法として用いられているが、本論文では割愛する。

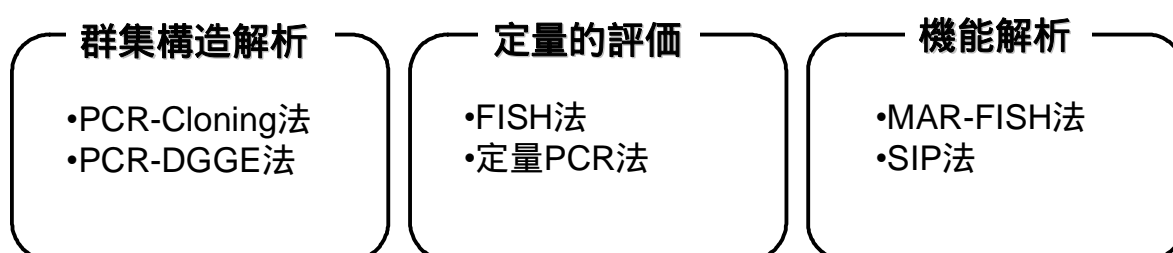


図 2.7 微生物解析手法

2.3.1 PCR Cloning 法

PCR-Cloning 法とは、PCR 法と Cloning 法を組み合わせた手法である。各々の手法について述べた後に、PCR-Cloning 法についてまとめる。なお、PCR 法および Cloning 法は分子生物学の分野においては一般的な手法となっており、多くの専門書にその詳細が記述されている。ここでは中山 (1996) によって記述されている内容を簡単にまとめる。

PCR 法とは Polymerase Chain Reaction 法の略で、極微量の DNA から数時間で目的とする DNA 領域を数十億倍にも増幅可能な方法である。PCR 反応は、鋳型 DNA の変性、プライマーのアニーリングおよび DNA ポリメラーゼによる伸長の 3 つのステップからなる。変性にて 2 本鎖の DNA を 1 本鎖にし、アニーリングステップにて増幅したい DNA 領域の両端に、相補的な 2 種類のオリゴヌクレオチド (プライマー) をアニールさせる。最後に伸長ステップにて、DNA 合成基質のデオキシヌクレオシド 3 リン酸 (dNTP) と DNA ポリメラーゼを作用させて、プライマーがアニールした結合部位から DNA 相補鎖を合成する。一連のサイクルを繰り返すことによって、目的とした DNA 領域が増幅される。

Cloning 法とは、目的とする配列を環状 DNA 分子 (ベクター) に挿入し、宿主に組み換えることで、目的配列を増幅する方法である。原理的には、1 つの宿主には 1 つのベクターしか入らないため、雑多な遺伝子プールを構成するサンプルから得た DNA を異なるベクターに挿入し、分けることが可能となる。分けられた DNA はベクターにより個々の宿主細胞に取り込まれ、その宿主の増殖と共にベクターはプラスミド複製によって増産される。宿主細胞には取り扱いやすさや増幅速度の速さから、操作された大腸菌コンピテントセルが用いられることが多い。

活性汚泥試料の微生物群集解析手法として、細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR-Cloning 法が頻繁におこなわれている (Bond et al., 1995、Crocetti et al., 2000)。16S rRNA 遺伝子は微生物を系統学的に分類するために用いられており、データベースが豊富である。活性汚泥内の細菌群集を系統学的に把握するためには、16S rRNA を対象とした PCR-Cloning 法をおこない、分離した各細菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列をシーケンシングによって解読する。得られた塩基配列をデータベースと比較することで系統学的に近縁な種を推定することが可能である。また、定性的ではあるが、同じ配列を持つクローンの数を比較することで、どの種の細菌が優占しているのかを予測することが可能である。

一般的に PCR-Cloning 法では 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長 (約 1500bp) を対象とするため、正確に細菌を系統学的に分類することができる。また、FISH 法のプローブや、PCR 法のプライマーの設計に得られた情報を活用できる。一方で、莫大な量の塩基配列を解読する必要があるため、時間とコストがかかり、多くのサンプルを評価するには不向きである。

2.3.2 PCR-DGGE 法

PCR-DGGE 法とは、PCR 法と変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE; denaturing gradient gel electrophoresis) 法を組み合わせた手法である。PCR-DGGE 法の原理を図 2.8 に示す。

まず、GC クランブ (GC に富む配列) つきプライマーセットを用いて、PCR 反応をおこなう。この PCR 産物 (2 本鎖 DNA) を、DNA 変性剤 (尿素とホルムアミド) の濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルで泳動すると、DNA 変性剤の濃度上昇とともに 2 本鎖 DNA 間の水素結合が切断され、二重らせん構造から 1 本鎖 DNA に変性する。但し、GC クランブ部位は結合力が強いために 2 本鎖を維持し、その DNA は 3 方に伸びた形になる。そのような形に変性した DNA は、ゲルの網目を移動する速度が著しく小さくなるため、その地点に集まり、バンドを形成する。GC クランブ以外の 2 本鎖 DNA の解離は、配列の違いに依存するため、配列の違う DNA は異なる位置にバンドが形成される (石井ら、2000)。このようにして、塩基配列の異なる 2 本鎖 DNA を分類することが可能となる。

PCR-DGGE 法は、Muyzer et al. (1993) によって微生物生態分野への適用が紹介されて以来、広く用いられるようになった。なぜならば、PCR-DGGE 法は 2.3.1 で述べた PCR-Cloning 法に比べて短時間且つ安価で群集構造を把握できるからである。このため、活性汚泥プロセスの時系列的な変化を把握するための手法として用いられるケースが多い。

但し、PCR 反応を用いる手法であるため、PCR バイアスに依存する問題があるとされている (Sekiguchi et al., 2001)。このため、バンド強度 (濃さ) を用いての定量的な議論は一般的にはおこなわれていない。

また、DGGE ゲルからバンドを切り出し、精製することによって塩基配列を解読することが可能である。PCR-DGGE 法で用いる PCR 産物の塩基長は 500 塩基以下とされているため、16S rRNA 遺伝子の全長を解読することは不可能であるが、大まかに近縁種を推定することは可能である。

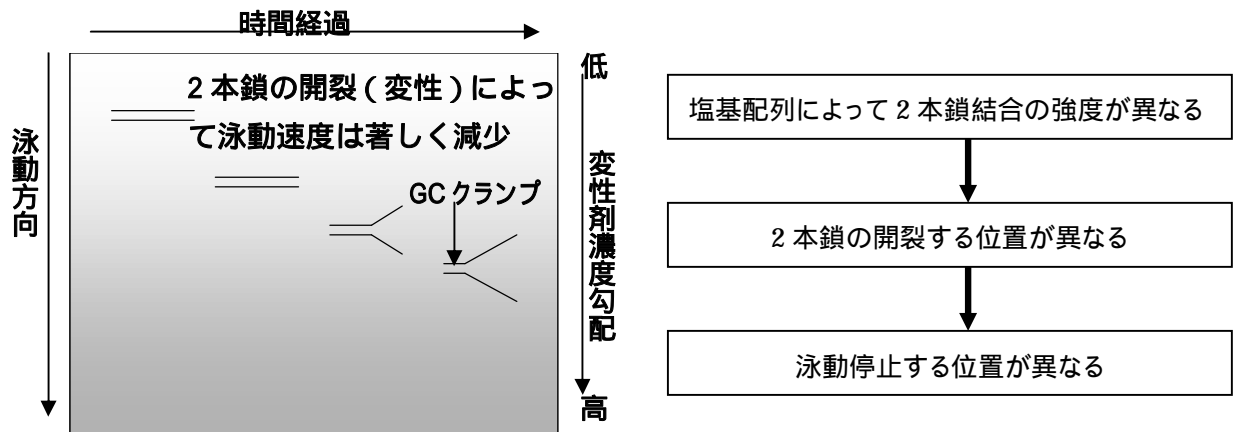


図 2.8 PCR-DGGE 法の原理

2.3.3 FISH 法

FISH 法とは Fluorescent *in situ* Hybridization 法の略である (Amann et al. (1995))。FISH 法では標的とする核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチドに蛍光標識したもの (プローブ) を用いる。このプローブをサンプルに加え、標的核酸のみに結合 (ハイブリダイズ) させたのち、サンプルを蛍光顕微鏡下で観察する。顕微鏡下においてはプローブがハイブリダイズした核酸を有する細菌のみが蛍光を発する。

FISH 法を細菌の検出に用いる際には多くの場合、リボソームにある rRNA を標的とする。rRNA は 1 つの細胞に $10^3 \sim 10^5$ 存在しており、プローブもそれだけの量が菌体に入ることになるため、菌体 1 つあたりの蛍光が大きくなって蛍光顕微鏡で観察が可能となる (図 2.9)。

FISH 法を用いる目的として、検出された菌体数を定量することによりサンプル中の標的種の存在割合を調べる、生物膜など菌体が集塊となっているサンプルにおける *in situ* での標的種の存在位置を調べる、といった 2 つの方向性が考えられる。細菌の定量には、菌体数を計数する方法と、面積として定量する方法がおこなわれている。前者は菌体を顕微鏡で観察しながら、もしくは撮像した画像を見ながら計数するため、比較的正確にその菌数を把握できるが、非常に時間がかかる。一方の面積定量は、画像解析ソフトウェアを用いるため、計数法に比べると時間がかからないが、自家蛍光を定量値に含んでしまうなど定量性に問題がある。このため、面積定量については、「Semi-quantitative」という表現が使われることもある (Beer et al., 2006)。

また、FISH 法では rRNA を標的とするため、生菌であるが rRNA が少ない細胞は検出されない等、様々な問題点が挙げられている (Harmsen et al., 1996, Amann et al., 2000)。但し、このような問題点はあるものの、特定の細菌を顕微鏡下で視覚的に確認しながら数えられることは、大きな利点である。

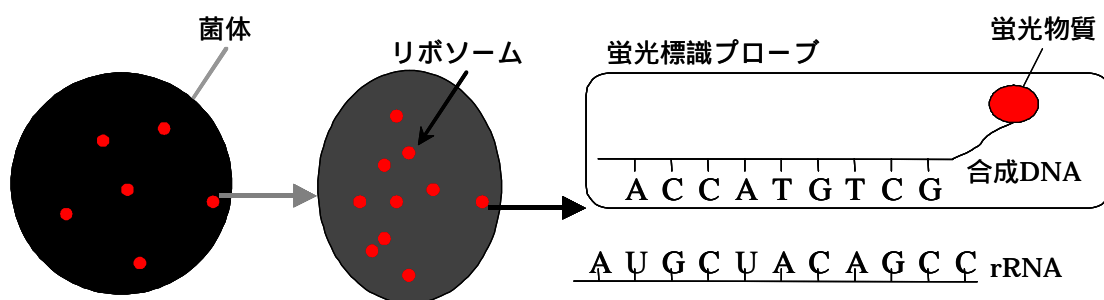


図 2.9 FISH 法の原理

2.3.4 定量 PCR 法

定量 PCR 法とは、PCR を定量目的で用いる手法である。活性汚泥試料において特定の細菌を定量する手法として近年用いられている (Vervaeke et al., 2005)。Real Time PCR や Real Time Quantitative PCR 等とも呼ばれるが、本論文では目的を直接的に表現するため、定量 PCR 法と呼ぶことにする。定量 PCR 法には様々な手法があるが、いずれも蛍光色素を用いることによって各 PCR サイクルにて増幅される PCR 産物の量を蛍光強度として検出する。

定量 PCR 法による定量の基本原則を図 2.10 に示す。はじめの数サイクルにおいては蛍光強度の変化は見られないが、PCR 産物が一定レベルまで増幅されると、蛍光強度が指数的に増加し、やがてプラトーに達する。ここで、蛍光強度の閾値を決定し、増加曲線と交わるサイクル数を Ct (Threshold Cycle) 値とする。試料の定量においては、遺伝子量 (コピー数) が既知の DNA を検量線用 DNA として Ct 値を算出し、検量線を作成する。測定したい試料から得られた Ct をこの検量線に当てはめることによって、PCR 反応前の初期遺伝子量を算出できる。

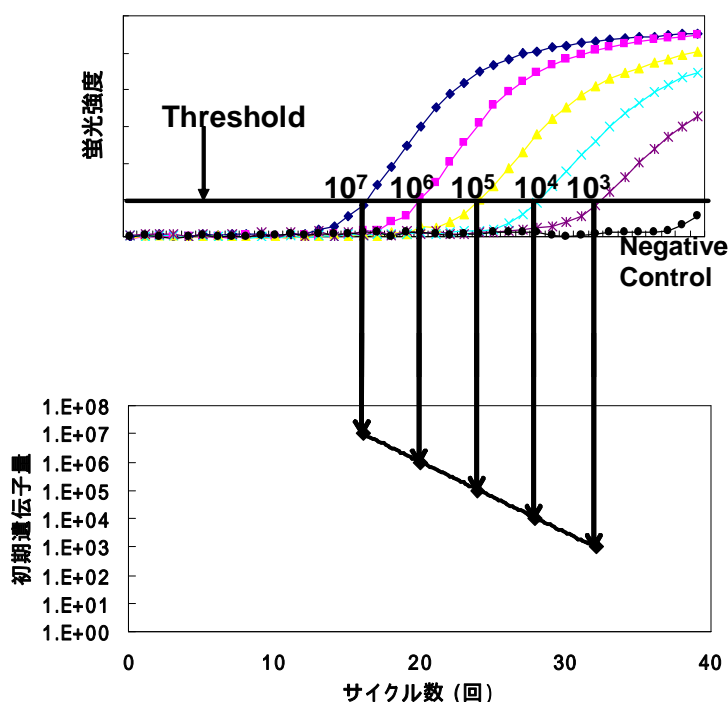


図 2.10 定量 PCR 法による定量の基本原則

以下に、本研究で用いた Quenching Primer PCR(QPrimer PCR)法、Quenching Probe(QProbe PCR)法(Kurata et al., 2001)および SYBR GREEN を用いたインターカレーター法(Wittwer et al., 1997) について説明する。各方法の原理については図 2.11 にまとめた。

QPrimer PCR 法

QPrimer PCR 法はプライマー配列の 5'末端のシトシン(C)に BODIPY と呼ばれる蛍光色素を修飾した Quenching Primer を用いる。Quenching Primer はフォワード、リバースプライマーのどちらでも良いが、必ず 5' 末端はシトシンになるように設計する。

BODIPY は、DNA を構成するシトシンとグアニン(G)との相互作用によって蛍光が消える性質を持つ(Torimura et al., 2001)。したがって、伸長の際に Quenching Primer の 5'末端に位置するシトシンが相補的な位置にあるグアニンと反応することで BODIPY が消光する。

上述の原理を基に、QPrimer PCR 法では各 PCR サイクルの変性および伸長ステップの最後に蛍光強度を検出する。PCR 産物が少ないサイクルにおいてはほとんどの BODIPY が蛍光を発しているままであるが、PCR 産物が増えるにつれて、消光する BODIPY が増える。この消光率を各サイクルで算出し、ある一定の消光率に達したサイクル数を Ct 値として初期遺伝子量を定量する。

なお、Quenching Primer を設計する際には以下の点に注意しなくてはならない。(J-Bio21, 2005)

- 1 . BODIPY を修飾するシトシンの隣に、グアニンが 2 塩基以上続かないようにする。
- 2 . GC 含量が 70%を超える配列、グアニンが特に多い配列は避ける。
- 3 . 蛍光標識した末端は、3 塩基以上連続して相補的なヘアピン構造をとらないようにする。
- 4 . 4 塩基以上連続して相補的なヘアピン構造をとらないようにする。
- 5 . 3'末端の配列が極力相補的にならないようにする。
- 6 . 3'末端が 3 塩基以上連続して相補的なヘアピン構造をとらないようにする。

1. ~ 3.は Quenching Primer が単独で自己消光することで、検出感度が低下する場合があるためである。4.は標的配列への結合効率が低下する場合があるためである。5.はプライマーダイマーを生成してしまう可能性が高まるためである。6.はプライマーがヘアピン構造をとった場合にプライマーの 3'末端から伸長が始まり、自己消光する場合があるためである。

QProbe PCR 法

QProbe PCR 法でも QPrimer PCR 法同様、BODIPY の消光反応を利用して定量をおこなう。但し、プライマーではなく、配列末端のシトシンに BODIPY を修飾した Quenching Probe を用いる。なお、BODIPY の修飾は 5'および 3'末端のいずれでもよいが、5'末端に修飾する際は伸長を防ぐため、3'末端をリン酸化する必要がある(J-Bio21, 2005)。

QProbe PCR 法における BODIPY の消光はアニーリング時に Quenching Probe が相補鎖に結合することで起こる。続く伸長にてポリメラーゼが DNA を複製する際に、Quenching Probe

が相補鎖からはずされる。このため、蛍光強度の測定は各サイクルの変性およびアニーリングの最後におこなう。

なお、Quenching Probe を設計する際には以下の点に注意しなくてはならない。(J-Bio21, 2005)

1. BODIPY を修飾するシトシンの隣に、グアニンが2塩基以上続かないようにする。
2. GC 含量が70%を超える配列、グアニンが特に多い配列は避ける。
3. 蛍光標識した末端は、3塩基以上連続して相補的なヘアピン構造をとらないようにする。
4. 4塩基以上連続して相補的なヘアピン構造をとらないようにする。
5. T_m がプライマーよりも5以上高くなるようにする。
6. ポリメラーゼは5'エキソヌクレアーゼ活性を持つものを選択する。
6. は伸長時に Quenching Probe が壊されるのを避けるためである。

インターカレーター法

インターカレーター法は通常の PCR 反応液にインターカレーターと呼ばれる蛍光色素を添加して PCR 反応をおこなう。一般的には SYBR GREEN I がインターカレーターとして用いられる。インターカレーターは通常の状態においては蛍光を発しないが、伸長にて合成された二本鎖 DNA に結合すると、励起光の照射により蛍光を発する。このため、蛍光強度の測定は各サイクルの伸長の最後におこなう。

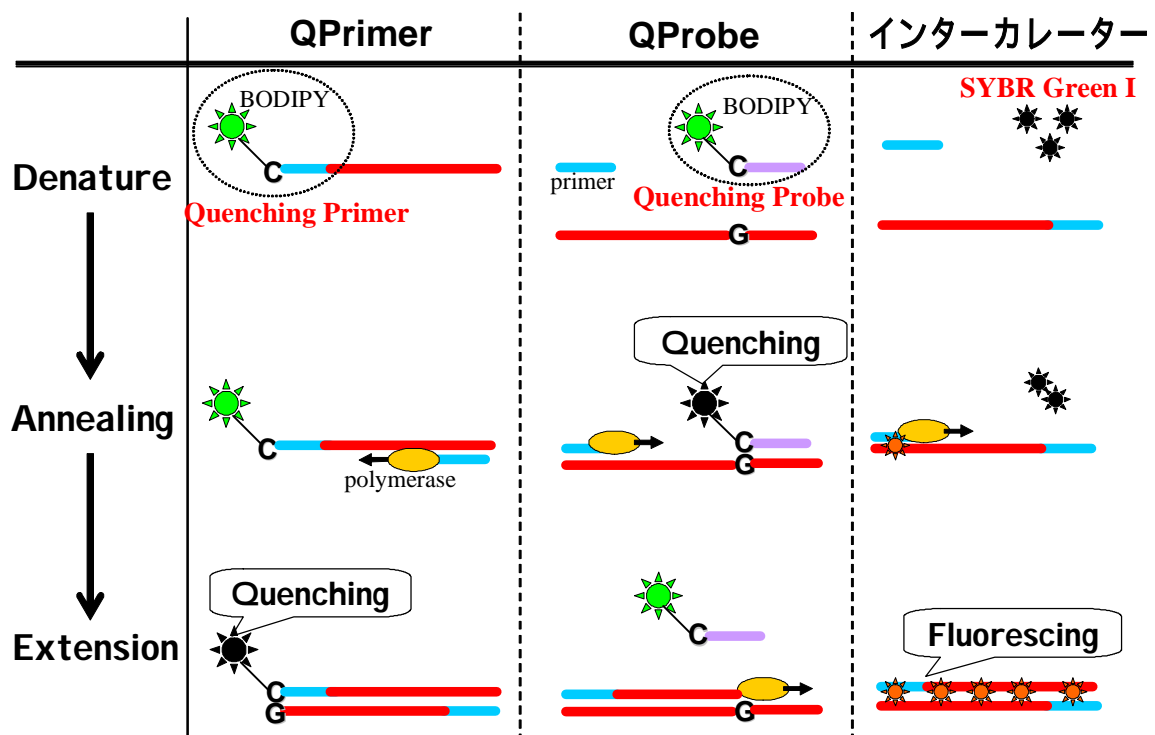


図 2.11 各定量 PCR 法の原理

3種の定量PCR法のうち、特異性はQProbe PCR法が最も高い。これは、標的遺伝子に特異的な2つのPCRプライマーに加えプローブを用いるためである。なお、プローブを用いるもう一つの定量PCR法としてTaqMan プローブ法(Heid et al., 1996)があり、QProbe PCR法と同様の特異性を有する。但し、プローブ設計の際の塩基配列選択の自由度はQProbe PCR法の方が高い。このため、QProbe PCR法の方が、より容易に良好なプローブを設計することが可能となる。

QPrimer PCR法とインターカレーター法はいずれもプローブを用いないため、プローブを用いる定量PCR法に比べると特異性は低い。但し、プローブを用いる定量PCR法に比べて、制約が少ないため、容易にプライマーを設計できる。さらに、QPrimer PCR法およびインターカレーター法では、PCR産物を解離曲線解析することによって、PCR反応の特異性を確認することができる。

2.3.5 MAR FISH 法

MAR-FISH法とは、Microautoradiography (MAR)法とFISH法を組み合わせることによって、標的とした細菌がどのような物質を菌体内に取り込めるかを把握する手法である。

Microautoradiography (MAR)法の原理は次の通りである。まず、放射性同位元素で標識した基質(炭素(^{14}C)やリン(^{32}P)など)を微生物に取り込ませた後、スライドガラスに固定する。このスライドに臭化銀の結晶を含む感光乳剤を塗布し、標識した基質を取り込んだ微生物から発せられる放射線を乳剤に曝露させる。その後、明視野において顕微鏡観察すると、放射線に曝露された箇所に銀粒子が確認され、基質を取り込んだ細菌を同定することができる。

MAR-FISH法はLee et al. (1999)によって開発された。この手法はMAR法を特定の細菌に対して適用することが可能であり、活性汚泥のような複合微生物系において標的とした細菌を分離培養することなく、代謝、機能を把握することができる。但し、標識した基質の代謝産物(発酵産物等)を取り込んだ際においてもMARでポジティブとなってしまうため、クロスフィーディングがこの手法の問題となっている。

近年では、MARの結果を用いて基質の取り込み量を定量的に評価する試み(Nielsen et al., 2003)もおこなわれており、FISHの定量と組み合わせることによって「どの細菌がどれだけ存在し、どの基質をどれだけ摂取しているのか」を評価できるようになりつつある。

2.3.6 SIP 法

SIP (Stable Isotope Probing)法とは、特定の基質を摂取する細菌を同定する方法である。SIP法では ^{13}C 等の安定同位体で標識された基質を用いる。 ^{13}C で標識された基質を用いて細菌を培養することによって、その基質を摂取可能な細菌は核酸の一部が ^{13}C で標識される。自然界における炭素は ^{12}C が大部分を占めるため、基質を摂取した細胞の核酸はそのほかの細菌よりも僅かに重くなる。この僅かに重くなった核酸を密度勾配超遠心分離によって分

離し、 ^{13}C で標識された細菌の核酸を選択的に評価することが可能となる。評価手法としては PCR-Cloning 法や PCR-DGGE 法といった方法で系統学的分類をおこなう。

SIP 法では、DNA (DNA-SIP 法) および RNA (RNA-SIP 法) を対象とした研究例が報告されている。Radajewski et al. (2000) は土壌のメタノール利用細菌を、 ^{13}C で標識されたメタノールを用いた DNA-SIP 法によって解析している。その 2 年後に Manefield et al. (2002) は 16S rRNA 遺伝子ではなく、16S rRNA を対象とした RNA-SIP 法を報告している。RNA-SIP 法の利点として、DNA よりも感度が良いことが挙げられる。これは、RNA の方が代謝回転速度が速く、さらに、1 細胞あたりの RNA のコピー数が DNA よりも多いためである。

この手法の課題として、MAR-FISH 法同様、基質のクロスフィーディングがある。一般的に MAR-FISH 法よりも培養期間が長いため、この問題は顕著に現れる。また、安定同位体が高価であるため、コスト面での課題もある。

なお、SIP 法で同定した細菌の基質摂取を確認するために、MAR-FISH 法と組み合わせるケースも多い。

2.4 生物学的リン除去プロセス内の細菌群集

EBPR プロセスにおける細菌群集のうち、リン除去に関与する PAOs および、PAOs と競合しリン除去の悪化を引き起こすとされる GAOs について、報告されている細菌種をまとめた。

2.4.1 ポリリン酸蓄積細菌 (PAOs)

PAOs とは、「嫌気条件下でポリリン酸を加水分解して得たエネルギーで VFA を摂取して PHA を蓄積し、好気条件下で PHA を酸化分解して増殖、ポリリン酸合成をおこなうポリリン酸蓄積微生物 (小貫ら、2005)」と考えられている。本論文で紹介する PAOs はポリリン酸の代謝は同様であるが、そのほかの炭素源摂取、蓄積に関する代謝については上述の範疇に限らないものとした。すなわち、ポリリン酸を蓄積し、リン除去に貢献すると考えられる細菌を PAOs としてまとめた。

2.4.1.1 分離株

Acinetobacter 属

Fuhs et al. (1975) によって EBPR プロセスから分離され、その後同プロセスから検出が相次いだ。このため、主要な PAOs であると期待され、研究が盛んにおこなわれた (Streichan et al., 1990、Beacham et al., 1992)。ほとんどの分離株が、好気におけるポリリン酸および PHA の合成をおこなっていた。一方でいずれの分離株からも、嫌気での酢酸、すなわち VFA 摂取および PHA 蓄積は確認されなかった。また、この *Acinetobacter* 属する細菌に特異的なプローブを用いた FISH を活性汚泥に適用した結果、これら細菌のリン除去への寄与は大きくないことが Wagner et al. (1994) によって確認された。

Microthrix 属

Nakamura et al. (1995a, b) は、ショ糖密度勾配遠心分離により、活性汚泥から高リン含有汚泥を分離し、その汚泥から細菌を分離、培養した。その結果、リン放出やリン摂取の代謝を示す *Microthrix phosphovorus* (以下、*M. phosphovorus* と記す) を分離した。但し *M. phosphovorus* は、一般的にポリリン酸蓄積の有機物源として考えられている酢酸の利用性に乏しく、グルコースがその有機物源であった。PHA は蓄積せず、グルコースをポリグルコースとして蓄積している。また、沈降性が低いことから、一般的な活性汚泥にはほとんど存在しない可能性が示唆された。Kawaharasaki et al. (1998) は、*M. phosphovorus* に特異的なプローブを設計し、ポリリン酸染色法を目的とした DAPI 染色とあわせて活性汚泥試料に適用した。この結果、ポリリン酸を含有する細菌のうち、*M. phosphovorus* は約 9% 程度であった。

また、*M. phosphovorus* は PAOs のモデル細菌として扱われ、分離株を用いて様々な検討がおこなわれている。Lee et al. (2006) は、*M. phosphovorus* を特異的に溶菌するバクテリオフ

ァージをグルコースを基質とする実験室規模リアクターから分離した。小田和(2007)は、このバクテリオファージと *M. phosphovorus* を播種した実験室規模 EBPR リアクターをモニタリングすることによって、それらのプロセス内における挙動を評価している。

Tetrasphaera 属

*Tetrasphaera*に属するPAOsは数種が分離されている。いずれもグラム陽性の細菌で、リン染色法の一つであるNeisser染色法によってポリリン酸を蓄積することが確認されているが、PAOsとしての詳細な代謝(リン放出等)は明らかになっていない。これら細菌の形態は2種類あり、*Tetrasphaera australiensis*および *Tetrasphaera japonica* (Maszenan et al., 2000) は球菌、*Tetrasphaera elongata* (Hanada et al., 2002) は桿菌である。

Lampropedia 属

Stante et al. (1997) は *Lampropedia* 属に属する細菌を酪農排水を処理する EBPR プロセスから分離した。この細菌は、嫌気条件下で酢酸を摂取して PHA として蓄積し、さらにリンを放出する能力を持つことが報告されている。しかし、酢酸摂取とリンの放出がモデルと大きく異なるため、実処理場でリン除去を担う重要な種であるとは考えられていない。

Gemmatimonas aurantiaca

Zhang et al. (2003) によって分離されたグラム陰性の桿菌で、高濃度 DAPI を用いたリン染色法によってポリリン酸を蓄積することが報告されている。嫌気でのリン放出等の代謝についてはまだ検討されていない。門 (phylum) レベルで新規な系統群に属している。低速度の遠心分離で濃縮し、低栄養の培地によって長期培養した結果、分離された。*Gemmatimonas aurantiaca* の培養における最適 pH は中性の 7.0 である。最適温度は 30 °C であり、20 °C 以下においては増殖できないことが報告されている。

Malikia granosa

Spring et al. (2005) によって都市下水処理場から分離された *Comamonas* 属に属する分離株で、グラム陰性の桿菌である。PHA 蓄積能およびポリリン酸蓄積能の双方を有していることが確認されている。尚、嫌気でのリン放出およびリン摂取についてはまだ検討されていない。

2.4.1.2 微生物解析手法で同定された細菌種

Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'

Candidatus 'Accumulibacter phosphatis' は *Rhodocyclus* 属に近縁な種で、現在のところ、最も主要な PAOs として考えられている。以下に、発見の経緯をまとめる。

Bond et al. (1995) は、実下水を処理する EBPR プロセスの汚泥を対象に PCR-Cloning 法

をおこなったところ、リン除去活性が高い汚泥からはリン除去活性が低い汚泥に比べて、*Rhodocyclus* 属が多く検出されたことを報告した。さらに、Hesselmann et al. (1999) や Crocetti et al. (2000) は酢酸を主とした人工下水を処理する実験室規模 EBPR リアクターにおける活性汚泥から、同様に *Rhodocyclus* 属に近縁なグループを検出した。これらの細菌群に特異的なプローブを設計し、FISH 法およびリン染色法をおこなった結果、これらの細菌群が実際にポリリン酸を蓄積していることが確認された。さらに Crocetti et al. (2000) は、このリアクターにおける汚泥のリン含有率とこの細菌群の存在量には高い相関関係 ($R^2=0.937$) があったことを報告した。この細菌群は *Rhodocyclus* 属に近縁であることから、*Rhodocyclus* related organism (bacteria)、もしくは R-PAO と呼ばれている。一方で、Hesselmann et al. (1999) は、新属 *Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'* を提案している。このように、様々な呼び方があるが、本論文では '*Accumulibacter*' と記述する。

'*Accumulibacter*' は、酢酸を主たる炭素源とした実験室規模 EBPR リアクターにおいて優占し、時には全細菌の 80% 近く存在することが報告されている (Crocetti et al., 2000)。様々な国や処理方式における実下水処理場汚泥においても、4 ~ 22% の '*Accumulibacter*' が存在することが報告されている (Zilles et al., 2002、Wong et al., 2005、He et al., 2005)。一方で、Wong et al. (2005) は日本の実下水処理場を対象にして、'*Accumulibacter*' の存在量とリン含有率の関係を評価したところ、相関関係は見られなかったと報告している。福島 (2003) は酢酸のほかに様々な炭素源を用いて実験室規模リアクターを運転した結果、全てのリアクターにおいて '*Accumulibacter*' がポリリン酸を蓄積していたことを確認した。但し、'*Accumulibacter*' の存在量がリン含有率と類似した変動を示していたのは酢酸、アスパラギン酸またはグルコースを用いた場合のみであった。このように、'*Accumulibacter*' が主要な PAOs であることはほぼ明白ではあるが、'*Accumulibacter*' のみでリン除去の全てが説明できるわけではなく、そのほかの PAOs とともにリン除去をおこなっていると考えられる。

近年の研究においては、'*Accumulibacter*' の基質摂取能や全ゲノムの解析がおこなわれている。Kong et al. (2004) および Chua et al. (2006) は、嫌気における '*Accumulibacter*' の基質摂取特性を MAR-FISH 法を用いて評価している。この結果、酢酸やプロピオン酸等の VFA に加え、グルタミン酸等のアミノ酸類を摂取可能であることを示している。グルコースについては直接摂取するのではなく、VFA に発酵された後にそれらを摂取すると結論付けられている。Martin et al. (2006) は '*Accumulibacter*' のメタゲノム解析によって、全ゲノムを解読した。これは、VFA を用いて運転した実験室規模リアクターによって '*Accumulibacter*' を高レベルに集積し、その汚泥に対してメタゲノム解析をおこなっている。ゲノム解析から得られた機能遺伝子情報によって、これまで知られていなかった特性を持つ可能性が示唆されている。

Actinobacteria に属する PAOs

Kawaharasaki et al. (1999) はポリリン酸染色法として用いた高濃度 DAPI 染色 (50 ~ 100mg/L) によって、Actinobacteria に属する細菌が EBPR プロセス内においてポリリン酸を蓄積していることを報告した。Liu et al. (2001) は *Tetrasphaera* 属に近縁な細菌および *Candidatus Nostcoidia limicola* (Blackall et al., 2000) を特異的に捕らえるプローブ (Actino_1011) を設計し、それらの細菌がポリリン酸を蓄積していることを DAPI 染色によって確認した。一方でこれらの細菌は、PHA 蓄積能は有しておらず、狭義における PAOs の代謝とは異なっていることも示している。宇田ら (2005) は実下水処理場において、これらの細菌が 'Accumulibacter' とほぼ同等の存在量を示していると報告している。

Kong et al. (2005) は Actino_1011 プローブで捉える細菌を形態学的に二つに分けてプローブを作成した。短桿菌を捉える Actino-658 プローブおよび球菌を捉える Actino-221 プローブを設計し、実下水処理場内における存在量を評価した結果、両者をあわせると全細菌の 3 ~ 35% の存在量を示し、処理場によっては 'Accumulibacter' よりも多かったことを示している。また、短桿菌の細菌の方が球菌よりも高い割合で存在していたことを報告している。さらに Kong はこれらのプローブを用いた MAR-FISH 法によって、下水由来の有機物や混合アミノ酸は摂取するが、酢酸は摂取しないことを確認している。このため、'Accumulibacter' とは基質摂取特性が異なる可能性が考えられている。

2.4.2 グリコーゲン蓄積細菌 (GAOs)

グリコーゲン蓄積細菌 (GAOs) は 2.2.2.1 に示したとおり、嫌気における有機物摂取を PAOs と競合するため、GAOs が優占する汚泥においては、嫌気での有機物摂取は見られるものの、リン除去は悪化する。

GAOs の定義は「嫌気条件下でグリコーゲンを分解して VFA を摂取し、好気条件下で蓄積した有機物 (PHA) を好気呼吸によって分解して増殖し、グリコーゲンの再蓄積をおこなう微生物 (小貫ら、2005)」とされている。しかしながら、分離されていない細菌のグリコーゲン蓄積能を評価することは困難であるため、本論文における GAOs は嫌気条件下で有機物を摂取し、PAOs と競合関係になりうる細菌とする。

2.4.2.1 分離株

Micropruina glycogenica

Micropruina glycogenica はグラム陽性の Actinobacteria に属する細菌で、Shintani et al. (2000) によって EBPR プロセスから分離された。嫌気または好気条件下においてグルコースを摂取し、グリコーゲンとして蓄積することが確認されている。系統学的に PAOs として分離された *Microlunatus phosphovorus* に近縁である。

酢酸およびグルコースを炭素源とし、リン除去が悪化した実験室規模 EBPR リアクターにおいて、*Micropruina glycogenica* が全細菌の 22% まで優占したことが報告されている (Kong

et al, 2001)。また、日本の処理場においても広く分布していることが報告されている (Wong et al., 2005)。

Defluvicoccus vanus

Maszenan et al. (2005) によって活性汚泥から分離された Alphaproteobacteria に属する細菌である。ポリリン酸は蓄積しないものの、PHA を蓄積することが確認されているため、GAOs 候補となる。また、酢酸等の VFA やグルコースを摂取することがわかっている。

2.4.2.2 微生物解析手法で同定された細菌種

Candidatus 'Competibacter phosphatis' および GB バクテリア

Crocetti et al. (2002) により命名された Gammaproteobacteria に属する比較的大きな球菌である。また、Kong et al. (2002b) は *Candidatus 'Competibacter phosphatis'* に非常に系統学的に近い細菌群を GB バクテリアとして報告している。これらは非常に近縁な種であるが、呼び名は統一されていない。GB バクテリアは、ポリリン酸を蓄積はしないが、PHA は蓄積することが確認されている (Kong et al., 2002b)。さらに、MAR-FISH 法によって、嫌気条件下で酢酸等の VFA を摂取することが報告 (Kong et al., 2006) されていることから、'Accumulibacter' と基質摂取において競合することが示唆されている。また、実下水処理場においても広く分布し、'Accumulibacter' とほぼ同等の存在量であることが報告されている (Kong et al., 2006、Wong et al., 2005)。

これらの結果から、*Candidatus 'Competibacter phosphatis'* および GB バクテリアが主要な GAOs の一種であると考えられている。

Alfaproteobacteria に属する GAOs

Wong et al. (2004) は嫌気好気法の生物膜リアクターを酢酸を炭素源として運転し、リン除去が悪化した時の汚泥における細菌群集構造を解析した。この結果、Alfaproteobacteria が優占しており、これらの細菌の多くが GAOs 候補として分離された *Defluvicoccus vanus* に近縁な種であったことを報告している。また、Meyer et al. (2006) はプロピオン酸を炭素源として、GAOs を優占させた実験室規模 EBPR リアクターを運転し、この汚泥に対してプロピオン酸を用いた SIP 法を適用した。この結果、Alfaproteobacteria、特に *Defluvicoccus vanus* に近縁な種が数多く発見された。

この *Defluvicoccus* に近縁な種は酢酸等の VFA およびグルコースを摂取することが MAR-FISH 法によって確認されている (Burow et al., 2007)。一方で、実下水処理場における存在量はあまり調べられておらず、主要な GAOs であるかは、今後の検討が必要である。

2.5 活性汚泥モデル

活性汚泥モデルとは、活性汚泥プロセス中で生じている現象を原理的に理解した上でその原理を数式として表現した「構造モデル」である。この構造モデルを用いることによって、プロセスの挙動を定量的に表現することを可能にし、さらにはプロセスの挙動を予測することも可能である。

本節では、活性汚泥モデルの代表格である IWA 活性汚泥モデル (ASM; Activated Sludge Model) の概要を記し、生物学的リン除去プロセスを記述するために最も利用されている ASM2d についてまとめた。なお、本節は専門書 (味埜、2005) に記述されている内容を参考にしてまとめた。

2.5.1 IWA 活性汚泥モデルの概要

1983 年、国際水質汚濁研究協会 (IAWPRC、現在は国際水学会: IWA) は生物学的排水処理法の効率的な設計および運転のための数学モデルの開発、実用化を促進するために、活性汚泥数学モデルに関するタスクグループを発足させた。タスクグループは 1986 年に、最初のモデルである活性汚泥モデル No.1 (ASM1) (Henze et al., 1986) を発表した。ASM1 は有機物と窒素を除去するプロセスを記述したモデルであり、モデル構造を記述するために、マトリクス表示という表示方法を提示している。その後、活性汚泥モデル No.2 (ASM2) (Henze et al., 1995) を完成し、ASM1 では含まれていなかったリン除去プロセスを導入した。活性汚泥モデル No.2d (ASM2d) (Henze et al., 1998) は ASM2 の修正版であり、PAOs に脱窒能力を持たせた。さらに、1998 年には ASM1 の基本的な問題点を整理し、今後の活性汚泥モデルの規準となるべき「コア」モデルとして活性汚泥モデル No.3 (ASM3) (Gujer et al., 1998) を発表した。ASM3 は ASM1 の改善版であるため、リン除去は含まれていないが、ASM3 を「コア」として ASM2 もしくは 2d で記述されている PAOs の関わるプロセスを付加することで、EBPR プロセスについて記述することが可能となる。

2.5.2 活性汚泥モデル No.2 (ASM2)

4 種類の活性汚泥モデルのうち、EBPR プロセスを対象として活用されている活性汚泥モデル ASM2 についてまとめる。以下に、ASM2 で記述されている反応とその化学量論および速度式について、PAOs に関わるものを中心に述べる。

PAOs に関わる反応

PAOs の代謝に関して定義されている反応を図 2.12 に示す。

ASM2 では VFA のような発酵産物 (S_A) を PAOs の唯一の炭素源と仮定している。嫌気において取り込まれた S_A は PHA (X_{PHA}) として菌体内に貯蔵される。Mino モデル (Mino et al., 1987) では PHA を合成する際にグリコーゲンが必要であるとしているが、ASM2 ではモデルの複雑化を避けるために、グリコーゲンは導入していない。

好気条件下においては溶存酸素 (S_O) を電子受容体として X_{PHA} (PHA) を分解することで、エネルギーを得る。 X_{PHA} の一部は増殖に用いられる。また、 S_{PO4} (リン酸) が取り込まれ、 X_{PP} (ポリリン酸) として蓄積される。

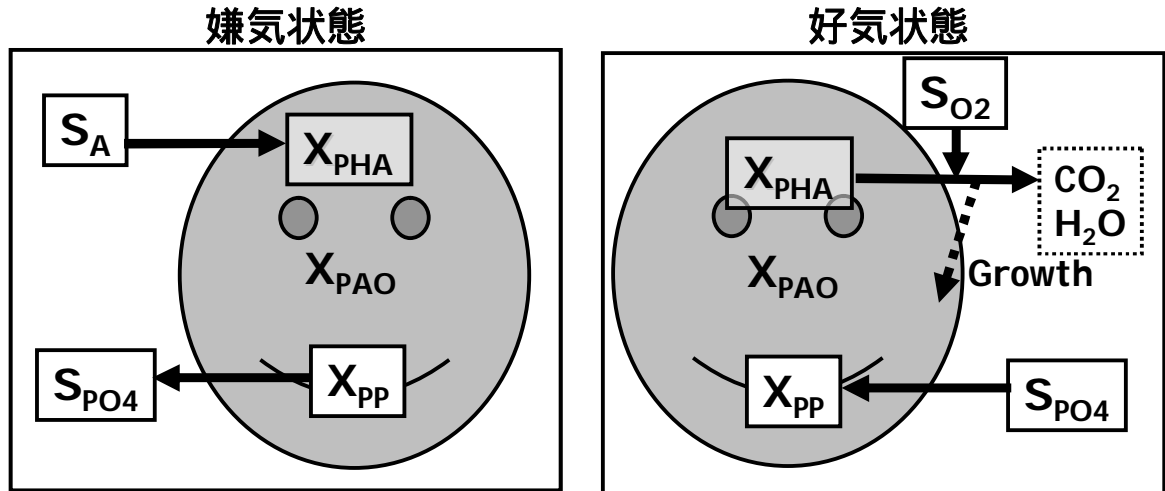


図 2.12 ASM2 における PAOs の代謝反応

(S_A : 発酵産物、 S_{PO4} : リン酸、 S_{O2} : 溶存酸素 X_{PHA} : PHA、 X_{PP} : ポリリン酸、 X_{PAO} : PAOs)

化学量論

化学量論 (Stoichiometry) とは各反応における関与物質間の量論関係を意味するが、ASM では「マトリクス表示」という方式を用いて化学量論を表現している。表 2.1 に ASM2 にて記載されている PAOs に関わるプロセスの化学量論マトリクスを示す。

ここで、例として PAOs の PHA 貯蔵に関する化学量論マトリクスについて説明する。PAOs は PHA (X_{PHA}) を「1」合成するために、発酵産物 (S_A) を 1 必要とする。このため、 S_A は「-1」で表記される。また S_A を摂取するためのエネルギーは、ポリリン酸 (X_{PP}) をリン酸に (S_{PO4}) 加水分解し、放出することによって得られる。ここで、 X_{PHA} を「1」貯蔵するために必要な S_{PO4} の放出量を Y_{PO4} とすると、放出する S_{PO4} は「 Y_{PO4} 」となり、 X_{PP} は Y_{PO4} の減少となるため、「 $-Y_{PO4}$ 」となる。

このように様々なプロセスの量論関係がマトリクスという形で表現される。

表 2.1 PAOs に関わるプロセスの化学量論マトリクス

プロセス	S_{O_2}	S_A	S_{PO_4}	X_I	X_S	X_{PAO}	X_{PP}	X_{PHA}
X_{PAO} による X_{PHA} の貯蔵		-1	Y_{PO_4}				$-Y_{PO_4}$	1
X_{PAO} による好気条件下での X_{PP} の貯蔵	$-Y_{PHA}$		-1				1	$-Y_{PHA}$
X_{PAO} の好気条件下での増殖	V_{13,O_2}		$-i_{PBM}$			1		$-1/Y_{PAO}$
X_{PAO} の自己分解			V_{15, PO_4}	f_{XI}	$1-f_{XI}$	-1		
X_{PP} の自己分解			1				-1	
X_{PHA} の自己分解		1						-1

X_I : 浮遊不活性有機物、 X_S : 遅分解性有機物、 Y_{PHA} : ポリリン酸の貯蔵に必要な PHA 量に関する化学量論係数、 Y_{PAO} : PHA あたりの PAOs の増殖収率、 i_{PBM} : 生物中のリン含有率、 V_{13, O_2} 、 V_{15, PO_4} : 物質保存式から算出

反応速度式

ASM における反応速度式 (Process rate equation) は Monod 型の速度式が基本的に用いられている。反応速度式中の速度定数の単位は、マトリクス上で「1」が与えられている成分の単位にあわせて定義されている。例えば表 2.1 に示した、PAOs による PHA 貯蔵についての速度式は以下の式 2.1 で表される。

$$\frac{dX_{PHA}}{dt} = q_{PHA} \frac{S_A}{K_A + S_A} \cdot \frac{S_{ALK}}{K_{ALK} + S_{ALK}} \cdot \frac{X_{PP} / X_{PAO}}{K_{PP} + X_{PP} / X_{PAO}} \cdot X_{PAO} \quad \dots \text{式 2.1}$$

ここで、 q_{PHA} は PHA の最大比貯蔵速度、 K_A は S_A (発酵産物) に対する飽和定数、 K_{ALK} は S_{ALK} (アルカリ度) に対する飽和定数、 K_{PP} は X_{PP} (ポリリン酸) / X_{PAO} (PAOs) に対する飽和定数を示している。

ASM では、上述の式のように複数のパラメーターの反応速度に対する影響が Monod 式の積によって表現されている。ここで、例として式 2.1 のうち S_A に関する項に注目する。20 における K_A は 4.0 gCOD/m^3 が推奨されているが、実際の反応における S_A が K_A よりも十分に大きい値となると、 S_A に関する項は限りなく 1 に近くなり、反応速度が減少しない。逆に小さい値となると、反応速度は減少する。

上述の PHA 貯蔵に加え、ポリリン酸の貯蔵、PAOs の増殖、そして PAOs、ポリリン酸および PHA の自己分解に関する反応速度式が ASM2d に記述されている。

モデルのシミュレーション解析においては、これら反応式に実測値または推奨値が必要

となる。全てにおいて実測値を用いることがより正確な解析をおこなう上で重要となるが、PAOs の生物量については実測値を得られないことができない。より正確なモデルを構築する上で、この問題を解決することが重要となる。

2.6 まとめ

2.2 から 2.5 にかけて本研究に関わる知見をまとめた。これらの知見は、本研究を遂行するための参考とした。以下に、その概要について述べる。

2.2 では EBPR プロセスの概要、問題となっているリン除去悪化の因子についてまとめた。様々な因子がリン除去悪化に関わっているが、特に pH については、pH7~8 程度の小さな変化によって悪化することが報告されており、このような pH の変動は実下水処理場においても十分考えられるものである。このような背景を踏まえて、pH によるリン除去悪化について本研究で詳細に検討することとした。リン除去を悪化させる実験室規模 EBPR リアクターの運転における pH 条件はこれらの知見を参考にした。

2.3 では、微生物群集解析手法についてまとめた。多くの手法が EBPR プロセスに適用されているが、定量 PCR 法についてはいまだ報告例がない。定量 PCR 法は、特定の細菌種を迅速に定量するための手法として近年注目されている。このような背景を受け、PAOs を定量するための新規手法として定量 PCR 法を確立することとした。

2.4 では、EBPR プロセスに関わる細菌についてまとめた。様々な細菌が PAOs 候補として報告されている中、‘*Accumulibacter*’が主要な PAOs として受け入れられつつある。しかしながら、‘*Accumulibacter*’はいまだ分離されておらず、機能や代謝といった詳細な検討が困難な状況にある。このように、‘*Accumulibacter*’について研究することの意義は大きいと考えられる。また、*M. phosphovor*us は数少ない分離株であり、モデル細菌として扱われているが、プロセス内におけるリン除去への寄与を評価した研究例は少ない。このため、*M. phosphovor*us についても知見を得ることとした。

2.5 では、活性汚泥モデルについて概要をまとめた。活性汚泥モデルはプロセスの挙動を定量的に表現することを可能にし、さらにはプロセスの挙動を予測することも可能である。しかしながら、モデルで扱われている PAOs の生物量は正確な実測値が得られないまま使用されているのが現状である。PAOs の定量値を用いることで、より正確なモデルを構築することは、社会的意義のある研究であると考えられる。このため、新たに確立した定量 PCR 法によって PAOs の存在量を実測し、その値を用いてモデルの有効性や問題点を明らかにすることとした。

3 章 *Candidatus* 'Accumulibacter phosphatis'の定量手法の確立と 活性汚泥試料への適用

3 章目次

- 3.1 背景と目的
 - 3.2 実験方法
 - 3.2.1 活性汚泥試料
 - 3.2.2 FISH 法を用いた定量
 - 3.2.3 定量 PCR 法を用いた定量
 - 3.3 実験結果
 - 3.3.1 定量 PCR 法の確立
 - 3.3.2 活性汚泥試料への適用
 - 3.4 考察
 - 3.4.1 インターカレーター法による定量の迅速性および定量限界
 - 3.4.2 インターカレーター法および FISH 法によって得られた定量値の
相関
 - 3.5 まとめ
-

3.1 背景と目的

Candidatus 'Accumulibacter phosphatis' (以下、'Accumulibacter'と記す)は、生物学的リン除去(EBPR)プロセスにおける主要なリン除去細菌、すなわちポリリン酸蓄積細菌(PAOs)であると考えられている(Seviour et al., 2003)。*'Accumulibacter'*は*Rhodocyclus*属に近縁な種であり、酢酸を主とした炭素源で馴養した実験室規模EBPRリアクター内で優占し、リン除去を担っていることが報告されている(Hesselmann et al., 1999、Crocetti et al., 2000)。実下水処理場においてもその存在およびリン除去能を有していることが確認されている(Wong et al., 2005、Beer et al., 2006)。なお、これらの報告の多くは、FISH法を用いて'*Accumulibacter*'の存在を確認し、定量解析をおこなっている。

主要なPAOsである'*Accumulibacter*'のプロセス内における挙動を把握することは、EBPRプロセスをより安定且つ効率的に運転するために重要な知見となる。'*Accumulibacter*'の挙動を把握する手法として、上述のFISH法を用いた定量方法があるが、この定量操作には非常に時間がかかり、顕微鏡観察等の技術を要する。すなわち、プロセス内における'*Accumulibacter*'の日変動のような詳細な挙動を把握することは技術的に困難である。

近年、標的細菌を迅速且つ簡便に定量できる手法として、16S rRNA遺伝子を対象とした定量PCR法が注目されている。活性汚泥試料への適用例も報告されている(Vervaeren et al., 2005、Boon et al., 2003)が、'*Accumulibacter*'の定量についてはいまだ報告例がない。'*Accumulibacter*'に対する定量PCR法が確立されれば、より詳細な挙動を把握することが可能になる。

そこで本章では、'*Accumulibacter*'の16S rRNA遺伝子を対象とした定量PCR法を確立し、活性汚泥試料への適用性を検討した。定量PCR法の確立では、'*Accumulibacter*'の16S rRNA遺伝子のみを特異的にPCR増幅し、且つ、定量値に再現性がある条件について検討した。続いて、実験室規模EBPRリアクターおよび実下水処理場の汚泥内に存在する'*Accumulibacter*'の存在量を、FISH法および定量PCR法によって定量した。両者の結果を比較することで、定量PCR法によって活性汚泥内の'*Accumulibacter*'を定量可能であるかを検討した。

3.2 実験方法

3.2.1 活性汚泥試料

活性汚泥試料は5系列の実験室規模EBPRリアクターおよび10箇所の実下水処理場から採取した。詳細を以下に示す。

3.2.1.1 実験室規模EBPRリアクター

筆者が修士研究(福島、2003)にて運転した5系列(R5~9)の実験室規模EBPRリアクターの汚泥を用いた。運転詳細は以下に示したとおりであり、炭素源のみを変えて運転した。

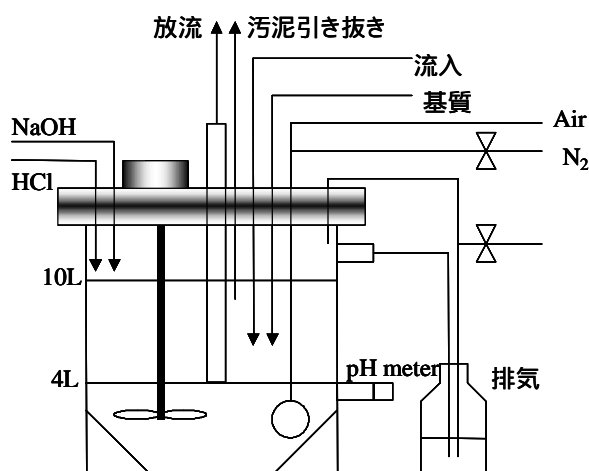


図 3.1 リアクター概略図



図 3.2 リアクター写真

図3.1および図3.2に示した容量10Lのリアクターを実験室内に設置して、放流30分、水道水流入20分、基質流入10分、嫌気工程90分、好気工程150分、沈殿60分を1サイクルとして運転した（図3.3）。水道水流入と基質流入の30分間に窒素パージをおこなって溶存酸素を除去した。pHはpHコントローラーによって 7.1 ± 0.1 に調整した。各サイクルの放流工程において6Lの上澄みを排水することによってHRTを10時間に調整した。同様に各サイクルの好気工程の最後の30分で約300mlの汚泥混合液を引き抜くことによってSRTを約8日に調整した。なお、リアクター運転に用いた汚泥は、採取日は異なるが、同じ実下水処理場の返送汚泥を用いた。

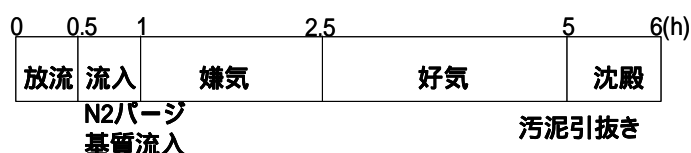


図 3.3 1サイクルのタイムシーケンス

各リアクターの基質組成は表3.1に示すように、炭素源のみが異なる。R5は酵母エキス（炭素換算で50%）、ペプトン（40%）および酢酸（10%）、R6はグルタミン酸（94%）および酵母エキス（6%）を炭素源とした。R7は酢酸、R8はアスパラギン酸、R9はグルコースを唯一の炭素源として運転した。

活性汚泥試料は各リアクターからリン除去が異なる時期に試料を採取し、直ちに液体窒素内に凍結保存した。

表 3.1 実験室規模リアクターの基質組成

mg/L	R5	R6	R7	R8	R9
ペプトン	34.6				
酵母エキス	46.2	5.0			
グルタミン酸ナトリウム 一水和物		124.7			
酢酸			0.5		
酢酸ナトリウム 三水和物	22.7		160.0		
L(+)-アスパラギン酸ナトリウム 一水和物				120.0	
D(+)-グルコース					100.0
塩化カルシウム 二水和物	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4
塩化マグネシウム 六水和物	45.4	45.4	45.4	45.4	45.4
塩化カリウム	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0
塩化アンモニウム	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8
硫酸アンモニウム	10.8	10.8	10.8	10.8	10.8
リン酸水素二カリウム	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
リン酸二水素カリウム	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
アリルチオ尿素	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

3.2.1.2 実下水処理場汚泥

標準活性汚泥法（標準法）、嫌気-好気法（AO法）および嫌気-無酸素-好気法（A2O法）にて運転している実下水処理場の活性汚泥を、それぞれ6、3および1試料採取した。活性汚泥試料は採取後、直ちに-80℃にて凍結保存した。

3.2.2 FISH 法を用いた定量

FISH 法を用いた面積定量によって、'Accumulibacter'の全細菌に対する割合を算出した。なお、FISH 法は基本的に Amann et al. (1995) にしたがっておこなった。詳細を以下に示す。

3.2.2.1 FISH 法

蛍光プローブの合成

本章で用いたプローブを表 3.2 に示す。蛍光プローブの合成は SIGMA-ALDRICH JAPAN に委託注文した。PAOMIX プローブは Cy3 標識した PAO462、PAO651 および PAO846 プローブが各々 10 pmol/μL になるように混合することで調製した。EUBMIX プローブは FITC 標識した EUB338、EUB338- および EUB338- プローブが各々 10 pmol/μL になるように混合することで調製した。これらの調製には滅菌した超純水を用いた。

表 3.2 FISH プローブ

Probe name	Probe sequence (5'-3')	Reported specificity	FA (%) ^a	Reference
PAO462 ^b	CCGTCATCTACWCAG GGTATTAAC	<i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphatis'	35	Crocetti et al. (2000)
PAO651 ^b	CCCTCTGCCAAACTC CAG	<i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphatis'	35	Crocetti et al. (2000)
PAO846 ^b	GTTAGCTACGGCACT AAAAGG	<i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphatis'	35	Crocetti et al. (2000)
EUB338 ^c	GCTGCCCTCCCGTAG GAGT	Most Bacteria	35	Amann et al. (1995)
EUB338-II ^c	GCAGCCACCCGTAG GTGT	Planctomycetales	35	Daims et al. (1999)
EUB338-III ^c	GCTGCCACCCGTAG GTGT	Verrucomicrobiales	35	Daims et al. (1999)

^a ホルムアミド濃度

^b PAO462、PAO651およびPAO846を混合したものをPAOMIXプローブとした。

^c EUB338、EUB338-IIおよびEUB-IIIを混合したものをEUBMIXプローブとした。

スライドガラスの前処理

温めた超純水に中性洗剤を少量加えた溶液に、スライドガラス（CEL Line 14well、Erie scientific）を1時間漬けて洗浄した。洗浄後、超純水で十分にリンスし、0.1%のゼラチン溶液（70℃）に数秒浸して空気乾燥した。

サンプルの固定

‘Accumulibacter’はグラム陰性であるため、4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて固定をおこなった。なお、グラム陽性細菌に対してはエタノール固定が有効であるとされ（Roller et al., 1994）、さらにリゾチーム等の酵素処理を要する場合もある（Beimhohr et al., 1993）。

パラホルムアルデヒド溶液は、次の手順で調製した。60℃に加熱した超純水 32.5mL にパラホルムアルデヒドを 2g、2M 水酸化ナトリウムを 1 滴加えた後、溶液がほぼ透明になるまで攪拌した。3×PBS 16.5mL を加え、0.1M 程度の塩酸で pH7.2 に調整した。この溶液を 0.2μm のシリンジフィルターでろ過した後、4℃で急冷した。パラホルムアルデヒド溶液は必ず、固定の当日に調製した。

解凍した汚泥サンプル 1 容に対して 4%パラホルムアルデヒド溶液 3 容を加えて、4℃で 1～3 時間固定した。固定後、遠心分離（約 5000g）によって固定液を除いた後、PBS に懸濁、再度遠心分離をおこない、上澄みを除いた。最後に、適当な汚泥濃度になるように、PBS を加えた。

固定したサンプルを冷やしながら、超音波処理（4W 程度、1 分間）によって汚泥試料を分散させた。分散条件は汚泥試料によって異なるが、より強固なフロックが存在している場合においては、出力を上げるのではなく、処理時間を延長した。これは、高出力処理によって、細胞が破壊するのを防ぐためである。

分散処理したサンプルをゼラチンコートしたスライドガラスのウェルにプロットし、自

然乾燥した。乾燥したスライドガラスを 50%、80%、98%のエタノールに順次各 3 分間つけることでサンプルを脱水させた後、自然乾燥した。サンプルを定着したスライドガラスは、ハイブリダイゼーションをおこなうまで常温で保存した。

ハイブリダイゼーションおよび洗浄

表 3.2 に示すように、ホルムアミド濃度が 35%のハイブリダイゼーションバッファー (0.9M NaCl、20mM Tris/HCl (pH7.2)、0.01% SDS、35%ホルムアミド)を調製した。適当な大きさに切りそろえたキムワイプもしくはろ紙に 500 μ L 程度のハイブリダイゼーションバッファーを浸し、50mL ポリプロピレン遠沈管に入れた。この遠沈管を 46 にて数分放置することで、遠沈管内の気相液相を平衡状態にした。

汚泥試料を定着させたスライドガラスの各ウェルに、PAOMIX プローブ、EUBMIX プローブおよびハイブリダイゼーションバッファーを 1:1:8 の割合で混合した溶液を 9 μ L ずつ滴下した。このスライドガラスを気相液相が平衡状態になっている遠沈管に入れ、46 にて 2 時間、遮光状態でハイブリダイゼーションをおこなった。

ハイブリダイゼーション中に、NaCl 濃度が 39.8mM のウォッシングバッファー (39.8mM NaCl、20mM Tris/HCl (pH7.2)、0.01% SDS) を調製した。作製したウォッシングバッファーは 50mL ポリプロピレン遠沈管に約 50mL 入れ、48 に設定したウォーターバス内で使用時まで温めておいた。

2 時間のハイブリダイゼーションの後、スライドガラスをウォッシングバッファーで素早く洗い流した。このスライドガラスをウォッシングバッファーを充填した遠沈管に挿入し、48 で 20 分間浸すことでハイブリダイズしなかったプローブを洗い流した。その後スライドガラスを超純水で洗い、スライドを振るなどして素早く水を切った後、自然乾燥させた。自然乾燥させたスライドガラスは退色防止剤 (SlowFade Light もしくは SlowFade Gold、Invitrogen) を添加し、カバーガラスをかぶせ、検鏡するまで暗所にて保存した。

3.2.2.2 顕微鏡観察および面積定量

顕微鏡観察および撮像

上述の FISH の処理をおこない作成したスライドガラスを蛍光顕微鏡 (BX-51、Olympus) を用いて観察した。各汚泥試料について、ランダムに 20 視野以上を選択し、WIG (Cy3 ; PAOMIX プローブ) および NIBA (FITC ; EUBMIX プローブ) フィルターを使用した画像を撮像した。撮像には顕微鏡デジタルカメラ (DP-50、Olympus)を用いた。

面積定量

面積定量には画像解析アプリケーションソフト (Qwin、Leica) を用いた。各視野において、PAOMIX および EUBMIX プローブで陽性となった細菌の面積をそれぞれ求めた。面積として認識するかどうかは、RGB 各色調につき 256 段階における閾値をマニュアルで指定

できる。このため、自家蛍光を含まず、かつ細菌からの蛍光を全て網羅できるような閾値を各視野に対して設定した。

各汚泥試料において少なくとも 20 視野に対して、上述の処理をおこない全ての面積を足し合わせた上で、EUBMIX プローブにて陽性となった細菌の面積あたりの、PAOMIX プローブにて陽性となった細菌の面積の割合を求めた。すなわち、全細菌 (EUBMIX) あたりの 'Accumulibacter' (PAOMIX) の割合を求めた。

3.2.3 定量 PCR 法を用いた定量

定量 PCR 法を用いて 'Accumulibacter' の 16S rRNA 遺伝子を定量した。最終的に SYBR GREEN を用いたインターカレーター法を用いることとしたが、ここでは、検討した全ての定量 PCR 法の条件について紹介する。

3.2.3.1 DNA サンプル

活性汚泥試料からの DNA 抽出

本章では FastDNA SPIN Kit for Soil (QBiogene) を用いて汚泥試料から DNA を抽出した。抽出操作は基本的にマニュアルにしたがっておこなった。

活性汚泥試料を 1.5mg/mLSS となるように採取し、12000g (15,000rpm) にて 3 分間遠心分離をした後、上澄みを取り除いて TE バッファー (10mM Tris/HCl (pH8.0) 1mM EDTA) に再懸濁した。再度遠心分離 (12000g、3 分間) した後に上澄みを取り除いて汚泥をペレット状にした。

汚泥ペレットからの DNA 抽出操作はマニュアルにしたがっておこなった。抽出した DNA サンプルを滅菌した超純水に溶解し、その DNA 濃度を分光光度計 (NanoDrop ND-1000、NanoDrop Technologies) を用いて測定した。また、凍結融解による DNA の分解を防ぐために、適宜 DNA サンプルを小分けして -20℃ にて保存した。

検量線用 DNA の調製

検量線のための標準試料として、'Accumulibacter' の 16S rRNA 遺伝子のクローンを PCR 増幅したものをを用いた。用いたクローンは (クローン名: UTFS-OF09-d22-93、Accession No.: AB200295) 大江 (2005) が実験室規模 EBPR リアクターの活性汚泥試料から PCR-Cloning 法を用いて得たものである。このクローンを 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') および 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') プライマー (Lane., 1991) を用いて PCR 増幅した。

PCR 反応では、DNA polymerase として Ampli Taq Gold DNA polymerase (PE Applied Biosystem) を、サーマルサイクラーとして T3 Thermocycler (Biometra) を用いた。PCR 反応は次の条件でおこなった。95℃ 10 分で Hot Start、その後、94℃ 30 秒 (変性)、50℃ 30 秒 (アニーリング)、72℃ 2 分 (伸長) のサイクルを 30 回、さらに最後に 72℃ 10 分間の伸長。

得られたPCR産物はQIAquick PCR Purification kitを用いて精製した。精製したPCR産物のDNA濃度を分光光度計で定量し、以下に示した式3.1(Whelan et al., 2003)を用いて16S rRNA 遺伝子のコピー数 (copy/μL) を算出した。そのPCR産物を滅菌した超純水で適宜希釈して検量線用DNAとして用いた。式中 6.02×10^{23} はアボガドロ定数で660は2本鎖DNAの塩基長1あたりの平均分子量である。

$$\text{DNA コピー数(copy/μl)} = \frac{\text{DNA濃度.(ng/μl)} \times 10^{-9} \times (6.02 \times 10^{23})}{\text{塩基長(bp)} \times 660} \quad \dots \text{式 3.1}$$

3.2.3.2 定量 PCR 法

ここでは、Quenching Primer (QPrimer) PCR 法および Quenching Probe (QProbe) PCR 法 (Kurata et al., 2001) およびインターカレーター法 (Wittwer et al., 1997) による 'Accumulibacter' の定量法の概要について述べる。各手法の原理は 2.3.4 に示す。全ての定量 PCR は LightCycler(Roche)を使用して検討したが、条件の最適化に関する一部の実験では、通常のサーマルサイクラーである T3 Thermocycler (Biometra) を用いた。

なお、これら 3 つの方法のうち、最終的にはインターカレーター法だけが良好な結果を得たことから、3.3.2 ではインターカレーター法により定量をおこなうこととした。

(1) プライマーおよびプローブの設計

当初、ARB ソフトウェア (Ludwig et al., 2004) を用いて 'Accumulibacter' に特異的な配列をもつ新規プライマーまたはプローブの設計を試みたが、有望なプライマーおよびプローブを得ることはできなかった。このため、既存の FISH もしくは Microarray 用プローブの配列を使用することとした。

表 3.3 に設計したプライマーおよびプローブの配列を示す。表中、QPrimer、あるいは QProbe とあるのは、いずれかの末端を BODIPY により修飾したオリゴヌクレオチドである。各定量 PCR 法で用いたプライマーおよびプローブは次の通りである。QPrimer PCR 法では PAO846f と RHC + 1289r、QProbe PCR 法では PAO651f、PAO846p と RHC + 1289r、インターカレーター法では PAO651f と PAO846r を用いた。

PAO651f は FISH 用プローブ PAO651 (Crocetti et al., 2000) と逆相補となる配列とした。PAO846p および PAO846f は FISH 用プローブ PAO846 (Crocetti et al., 2000) と逆相補となる配列とし、PAO846p は QProbe として配列の 3'末端に、PAO846f は QPrimer として配列の 5'末端に BODIPY をそれぞれ修飾した。RHC + 1289r は Microarray 用のプローブ (Loy et al., 2002) の配列をそのまま用いた。なお、PAO651f については BODIPY 修飾しなかった。これは、5'側末端の CTG と、5'末端から 12~14 番目の配列である CAG が結合し、ヘアピン構造をとる可能性があったためである。

良好な結果が得られたインターカレーター法で用いた PAO651f と PAO846r の各塩基配列に対して特異的な 16S rRNA 遺伝子配列を持つ細菌、およびミスマッチが 1 塩基の細菌の中

心として作成した Betaproteobacteria に属する細菌の系統樹を図 3.4 に示す。系統樹は次のように作成した。まず、各プライマー配列と特異的またはミスマッチが 1 塩基の細菌を、Ribosomal Database Project (Maidak et al., 2001 ; <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) の Probe Match 機能を用いて検索した。それら細菌を含め Betaproteobacteria に属する細菌を対象とした系統樹を DDBJ (DNA Data Bank of Japan; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>) の Clustal W 機能を用いて作成した。

PAO651f および PAO846r の設計の際に用いた FISH 用プローブ PAO651 および PAO846 は、図中、太字および下線のある細菌を特異的に捕らえるように設計されている (Crocetti et al., 2000)。両プライマーに対して特異的な配列を持つ細菌は、上述のプローブ設計に用いられた細菌およびそれらの非常に近縁な細菌のみであった。また各プライマーの配列に対してミスマッチが 1 塩基の細菌が存在していたが、図のように両プライマーにおいてミスマッチが 1 である細菌はなかった。

表 3.3 定量 PCR 法で検討したプライマーおよびプローブ

Name	Primer or Probe	Sequence (5'-3')	Specificity
PAO651f	Forward primer	CTGGAGTTTGGCA GAGGG	<i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphatis'
PAO846p [*]	Qprobe	CCTTTTAGTGCCGTA GCTAAC-BODIPY	<i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphatis'
PAO846f [*]	Qprimer (forward)	BODIPY-CCTTTT AGTGCCGTAGCTAAC	<i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphatis'
PAO846r	Reverse primer	GTTAGCTACGGCACT AAAAGG	<i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphatis'
RHC+1289r	Reverse primer	TCCGGACTACGATC GGCT	<i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphatis' and other bacteria

^{*}塩基配列は同じ

3章 *Candidatus* 'Accumulibacter phosphatis'の定量手法の確立と
活性汚泥試料への適用

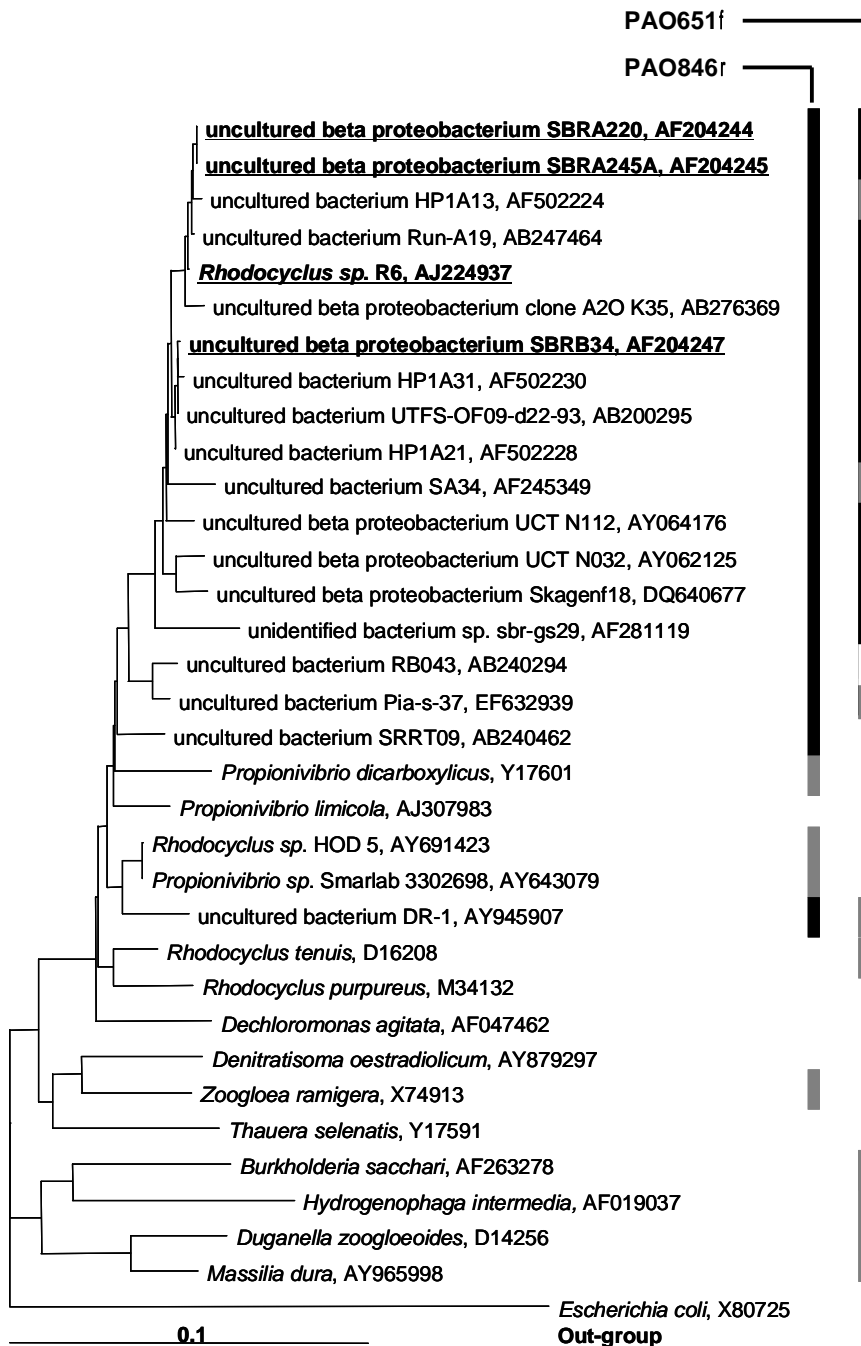


図 3.4 Betaproteobacteria に属する細菌の系統樹
(各プライマーに特異的な配列を有する細菌種を黒い実線、
ミスマッチが1塩基の細菌を灰色の実線で示している。)
(下線、太字の細菌種は FISH 用プローブ (PA0651 および
PA0846) の設計に用いられた細菌種。)

(2) PCR 条件の検討

各定量 PCR 法において、検討した項目を表 3.4 に示す。1～4 はサーマルサイクル、5～7 は PCR 反応液に関わる検討項目である。なお、表中 1 以外の項目では、LightCycler を用いて検討した。以下に、各項目における詳細を述べる。

表 3.4 各定量 PCR 法における PCR 条件の検討項目（ : 実施、 : 未実施）

検討項目	QPrimer PCR法	QProbe PCR法	インターカレーター法
1 アニーリングの温度 (通常のサーマルサイクラー)		-	-
2 アニーリングの温度			
3 各サイクルにおける変性、アニーリングおよび伸長の時間			
4 Touchdown PCR		-	-
5 DNA polymeraseの種類			
6 PCRエンハンサーの添加	-		
7 マグネシウム濃度の影響		-	-

項目 1 にあるように、QPrimer PCR 法の条件検討において、まずは、通常のサーマルサイクラーである T3 Thermocycler(Biometra)を用いてアニーリング温度を最適化した。QPrimer は高価であるため、ここでは BODIPY を修飾しないプライマーを用いて大まかにアニーリング温度を決定した。アニーリング温度について検討した理由は次の通りである。一般的に、アニーリング温度を上げることによって、PCR 産物の特異性を上げることができる。このため、標的配列のみを増幅できるようなアニーリング温度を決定することができる。PCR 産物の特異性については、アガロース電気泳動法によって確認した。

全ての定量 PCR 法において、項目 2 および 3 の検討をおこなった。これらの検討では LightCycler を用いた。項目 2 であるアニーリング温度について検討する理由は、上述の通りである。なお、より確実に期するため、QPrimer PCR 法においても再度アニーリング温度の検討をおこなった。項目 3 を検討した理由は次の通りである。通常のサーマルサイクラーでは、反応容器にプラスチック製のチューブを用いるが、LightCycler ではガラスキャピラリーを反応容器とする。ガラスキャピラリーは熱伝導が良いので、温度変化が迅速であり、反応時間を短縮できるといわれている。そのため、通常のサーマルサイクラーを用いる場合は DNA polymerase の説明書に記載されている反応時間でよいが、LightCycler を用いる場合、反応時間よりも短縮する必要がある。

項目 4 の Touchdown PCR 法 (Hecker et al., 1996) については、通常の PCR プログラムにおいて非特異的な増幅産物が生成される場合に検討した。Touchdown PCR 法は QPrimer PCR 法においてのみ検討した。Touchdown PCR 法では、アニーリング温度をプライマーの T_m 値よりも数 高めに設定し、PCR サイクルを経るにつれ、徐々にアニーリング温度を下げていく方法で、特異性を高めることができるとされている。

項目 5 では Ampli Taq Gold DNA polymerase (PE Applied Biosystem) および KOD-plus- (TOYOBO) について検討した。なお、QProbe PCR 法では 5'エキソヌクレアーゼ活性を持っている DNA polymerase を使用する必要があるため、KOD-plus-のみを検討した。

項目 6 については DMSO および BSA について検討した。これらは PCR エンハンサーと呼ばれ、GC 含有率の高いテンプレート等、PCR 増幅が困難な試料の増幅を改善する効果があるとされている。

項目 7 については、PCR 産物が見られない場合において、PCR 反応液中のマグネシウム濃度を上げると改善がみられる場合がある。また、逆にマグネシウム濃度を下げることによって特異性を高められる場合がある。

(3) 特異性の確認

各種条件において検討した PCR 産物はアガロースゲル電気泳動法、解離曲線解析もしくは塩基配列の解読によってその特異性を確認した。

蛍光修飾していないプライマーを用いて PCR 増幅した PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動法によってその特異性を確認した。アガロースゲル電気泳動は次のようにおこなった。2% のアガロースゲルを用いて PCR 産物および DNA サイズマーカーを電気泳動した (100V、15 分)。泳動したゲルを、1 µg/mL に調製したエチジウムブロマイド溶液に 15 分以上漬けて、DNA を染色した。UV トランスイルミネーター (FAS- 、東洋紡) を用いて、染色したゲルを撮像した。

撮像したゲルに映し出されたバンドの数が 1 本であるか複数であるか、また、サイズマーカーから推測できるバンドの塩基長が適切なものであるかを確認した。バンドが複数の場合は、標的配列以外の配列も増幅していることが考えられる。また、PCR 産物の塩基長はリバースプライマーの名前にある数字とフォワードプライマーの名前にある数字の差になる。サイズマーカーから推測された塩基長が異なるものであれば、標的配列以外を増幅していると考えられる。

解離曲線解析は次のようにおこなった。'Accumulibacter' の 16S rRNA 遺伝子を有するクローンライブラリーから得た検量線用 DNA (陽性対照)、活性汚泥試料から抽出した DNA、および滅菌蒸留水を DNA の代わりに添加した陰性対照を PCR して得た PCR 産物に対しておこなった。解離曲線解析は PCR 反応に続いて、95 30 秒、40 120 秒の反応の後、0.2 /秒の割合で 95 まで昇温し、連続的に蛍光を検出した。この結果から、LightCycler Software version 3.5 (Roche) を用いて解離曲線を作成した。

解離曲線の解釈には次の判断基準を用いた。解離曲線のピークが 1 本であるか複数であるか、および陽性対照として用いた検量線用 DNA サンプルと活性汚泥試料における解離曲線のピークが同じ温度であるかである。数本のピークが見られる場合においては、標的配列以外の配列も増幅していることが考えられ、また、温度が異なる場合、異なる配列を増幅していると考えられるためである。

解離曲線解析において、ピークが 1 本のみであり、そのピークが陽性対照と同じ温度であった場合は、特異的な増幅がおこなわれていることをさらに確認するために、その PCR 産物の塩基配列を解読し、'Accumulibacter' の 16S rRNA 遺伝子の標的配列であることを確認した。

塩基配列を解読するために、ABI Big dye terminator kit version 3.1 (Applied Biosystems) およびリバースプライマー (PAO846rもしくはRHC + 1289r) を用い、またオートシーケンサー ABI3100 (Applied Biosystems) を使用した。得られた塩基配列が‘Accumulibacter’の16S rRNA 遺伝子の標的部位と一致するかどうかを確認するために、DDBJ (DNA Data Bank of Japan ; <http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) のBLAST (Altschul et al., 1990) ツールを用いた。

(4) 定量性および再現性の確認

(1)~(3)の検討の結果、特異性について最もよい結果が得られた定量 PCR 条件について、定量性および定量値の再現性を確認した。

最初に各濃度に調製した検量線用 DNA を用いて定量 PCR をおこない、検量線を作成するとともに、定量下限を決定した。定量下限は陰性対照の Ct 値 (Threshold Cycle; 蛍光強度の変化が閾値に達するまでの増幅回数) よりも 3.3 サイクル以上高い値、すなわち定量値として 10 倍以上高い値とした。

続いて検量線用 DNA サンプルにおける増幅効率を検討した。増幅効率は以下の式 3.2 (Smith et al., 2006) に従い、1 サイクルでコピー数が 2 倍に増える場合を 100% として、評価した。

$$= (10^{1/m} - 1) \times 100 \quad \dots \text{式 3.2}$$

ここで、E は増幅効率 (%) を、m は片対数軸 (x 軸に Ct 値、y 軸に初期 DNA コピー数の 10 を底とする対数) の傾きを示す。傾きは LightCycler Software version 3.5 (Roche) にて算出される値を使用した。

最後に、DNA 抽出を含む全ての実験工程における定量値のばらつきを把握するため、同一汚泥を 5 試料以上用いて、‘Accumulibacter’の 16S rRNA 遺伝子を定量し、定量値の変動係数を求めた。変動係数は、各試料の定量結果における標準偏差を平均値で除することで求めた。

3.3 実験結果

3.3.1 定量 PCR 法の確立

各定量 PCR 法を用いて検討した結果について以下に示す。なお、結果的にインターカレーター法による定量 PCR 法だけが満足な結果を与え、一方、QPrimer PCR 法および QProbe PCR 法を用いた定量 PCR 法は確立することができなかった。

3.3.1.1 QPrimer PCR 法

(1) 通常のサーマルサイクラーを用いての検討

PAO846f および RHC + 1289r のプライマーセットによって正確に PCR 増幅がおこなわれるかを確認した。ここでは、BODIPY を修飾しない PAO846f プライマーを用いて検討した。最初に通常のサーマルサイクラーを用いてアニーリング温度を検討した。DNA polymerase として、Ampli Taq Gold DNA polymerase (PE Applied Biosystem) を用いた。PCR 反応液の組成は同社のプロトコルに従い、DNA テンプレートは 10^7 および 10^8 copies/ μ L の検量線用 DNA サンプルを添加した。また、PCR 条件は、95 10 分で Hot Start をおこなった後、94 30 秒 (変性) 54~62 1 分 (アニーリング) 72 1 分 (伸長) のサイクルを 30 回おこない、最後に 72 10 分間の伸長をおこなった。

上述条件にて検討した PCR 産物のアガロース電気泳動の結果を図 3.5 に示す。全てのアニーリング温度にて PCR 増幅が認められており、かつアニーリングを 54 でおこなった陰性対照においては PCR 産物の生成が確認されなかった。これらの結果と、プライマーの T_m 値が 62 程度であることを踏まえて、アニーリング温度を 62 とすることにした。

図 3.5 アガロース電気泳動

- ・ 1~5 は 10^7 copies/ μ L、6~10 は 10^8 copies/ μ L をテンプレートとした。M はマーカー、N は陰性対照。
- ・ 1 および 6 のアニーリング温度は 54 。数字が増えるごとに 2 ずつ上昇。

(2) LightCycler を用いた QPrimer PCR 法の検討

上述の結果を踏まえて、LightCycler を用いた QPrimer PCR 法による検討をおこなった。ここでは、表 3.3 にあるとおり、PAO846f の 5' 末端に BODIPY を蛍光修飾した。最初に DNA polymerase の比較を Ampli Taq Gold および KOD-plus-を用いておこなった。なお、LightCycler では PCR 反応液への熱伝導が非常に早いため、メーカーはサーマルサイクルの反応時間を短縮することができるとしている。それにしたがって、PCR サイクルは 94 30 秒

3章 *Candidatus*'Accumulibacter phosphatis'の定量手法の確立と 活性汚泥試料への適用

(変性) 62 30 秒 (アニーリング) 72 30 秒 (伸長) と通常のサーマルサイクラーの半分の時間に設定した。各 DNA polymerase における PCR 反応を検量線用 DNA (10^5 、 10^3 および 10^1 copies/ μ L) および陰性対照に対しておこない、作成した増幅曲線および検量線を図 3.6 (Ampli Taq Gold) および 3.7 (KOD -plus-) に示す。いずれの結果においても良好な検量線が作成できていたが、Ampli Taq Gold を用いた結果のほうが増幅曲線の立ち上がりが遅い結果となった。

3章 *Candidatus*'Accumulibacter phosphatis'の定量手法の確立と
活性汚泥試料への適用

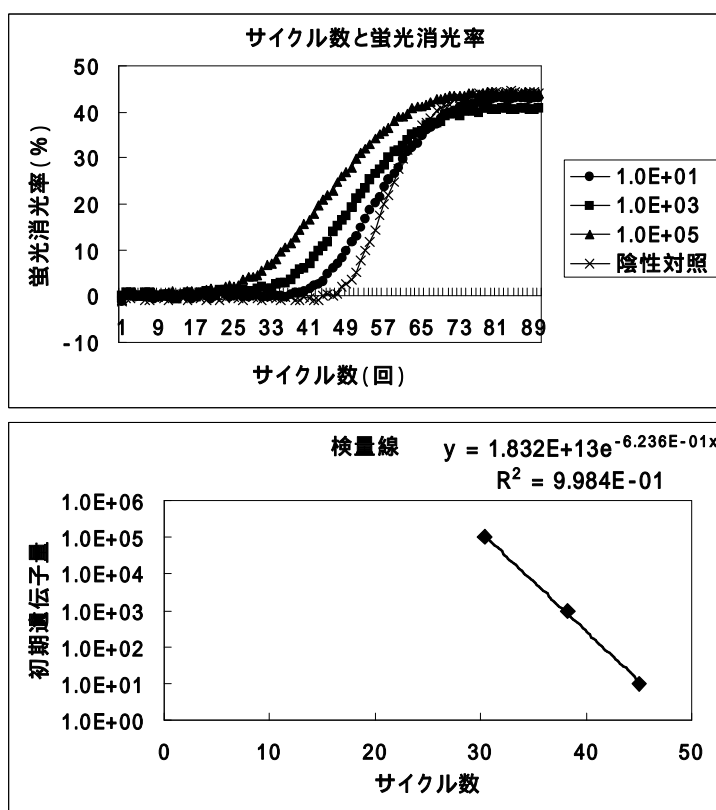


図 3.6 Ampli Taq Gold を用いた場合の増幅曲線（上図）および検量線（下図）

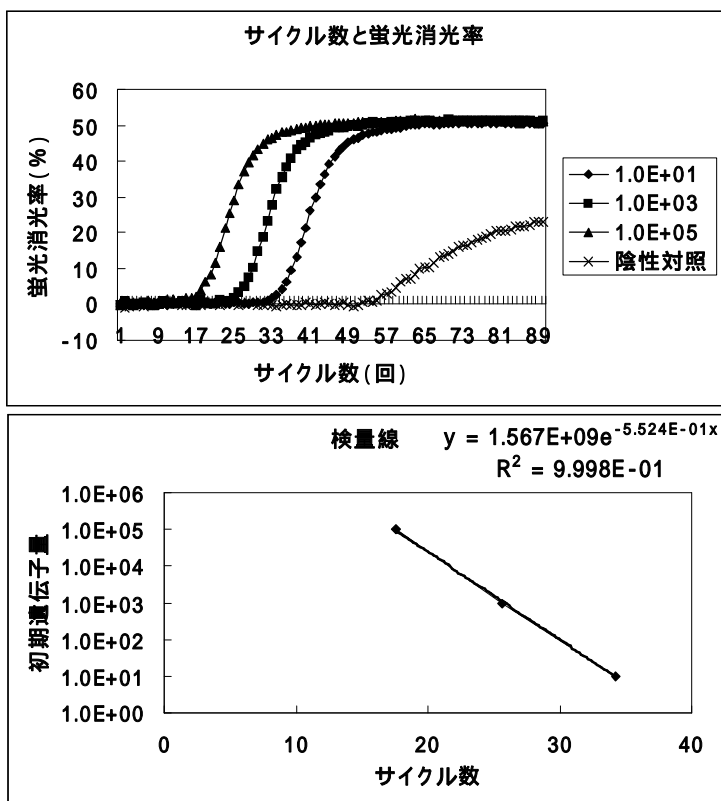


図 3.7 KOD plus を用いた場合の増幅曲線（上図）および検量線（下図）

続いて解離曲線解析によってPCR反応の特異性を検討した結果を図3.8に示す。Ampli Taq Goldを用いた増幅産物については、74 から 88 付近にかけて数本のピークが確認された。また、KOD-plus-を用いた結果では 86 付近に明瞭なピークが一本見られるが、ピーク幅が大きく、74 付近から徐々にPCR産物の解離が起きており、純度の高い反応物が生成されていたとは判断しがたい。これらの結果から、両者のDNA polymeraseを用いたPCRによって様々な塩基長のPCR産物を生成してしまっていたと考えられた。すなわち、標的配列に特異的なPCR反応はおこなわれていなかった。なお、T3 Thermocyclerを用いて決定したPCRサイクルによりPCR反応を試みたが、解離曲線に改善は見られなかった。

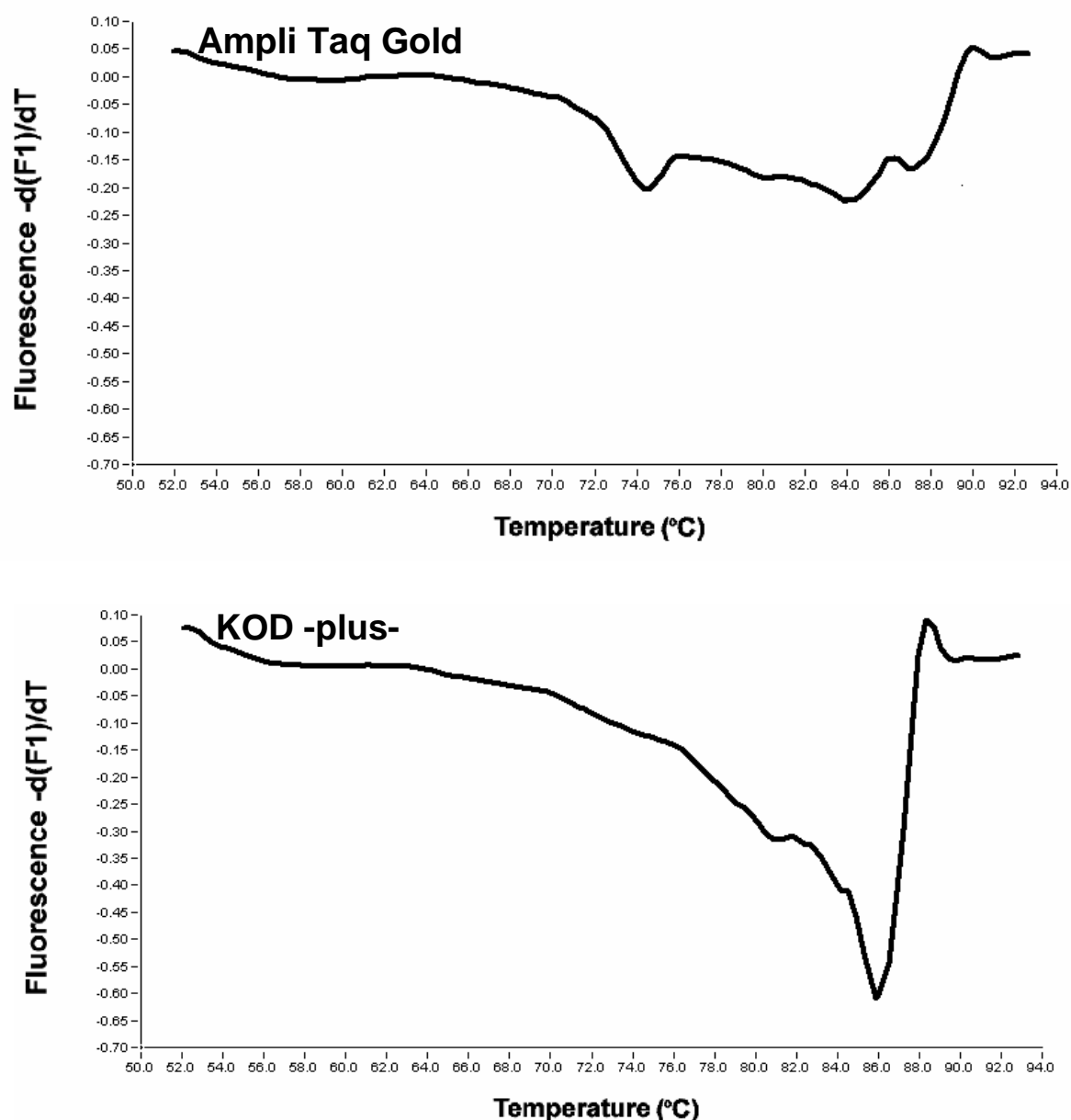


図 3.8 Ampli Taq Gold (上図) および KOD plus - (下図) を用いた PCR 産物の解離曲線

図 3.8 に示した解離曲線に関する検討結果に基づき、DNA polymerase は図 3.8 にて比較的美丽なピークが確認された KOD-plus-を用いることとし、PCR 反応の特異性を改善するために以下の検討をおこなった。

- 1 . アニーリングの温度
- 2 . Touchdown PCR
- 3 . マグネシウム濃度

特異性を改善するために、まずアニーリング温度を 64 および 66 に変更した。この結果、アニーリング温度を高めることによって、図 3.8 にある 86 未満のピークが徐々に減る傾向が確認された。しかし、あらかじめ FISH 法によって‘Accumulibacter’が存在することが確認されている活性汚泥について、アニーリング温度 66 で定量 PCR 反応をおこなったところ、増幅が見られなくなった。そこで、アニーリング温度を高めることによって特異性を改善することは困難と判断した。

つづいて、Touchdown PCR による改善について検討した。表 3.5 に検討したサーマルサイクルのプログラムを示す。各プログラムにおいて 2~3 サイクルで次のステップへと進み、最後に Final Step の条件にて 20~30 サイクルの反応をおこなった。

表 3.5 Touchdown PCR のプログラム

	Program 1	Program 2	Program 3	Program 4	Program 5
Step 1	68	73	67	67	68
Step 2	66	70	66	66	67
Step 3	64	67	65	65	66
Step 4	62	64	64	64	65
Step 5	60	61	63	63	64
Step 6				62	63
Step 7				61	62
Step 8				60	61
Step 9				59	
Final Step	58	58	62	58	60

Touchdown PCR を検討した結果、図 3.9 に示すとおり、85 未満のピークが減少しており、改善がみられた。しかしながら、72.5 付近および 77.5 付近にも小さなピークが見られ、完全に 1 本のピークとなることはなかった。また、PCR 反応液中のマグネシウム濃度を下げて PCR をおこなったが、あまり改善は認められなかった。

これらの結果から、QPrimer PCR 法によって‘Accumulibacter’の 16S rRNA 遺伝子の特異的に PCR 増幅することは困難と判断した。正確な検量線を作成することは可能であったが、標的配列以外の配列も増幅しており、特異性を改善することはできなかった。

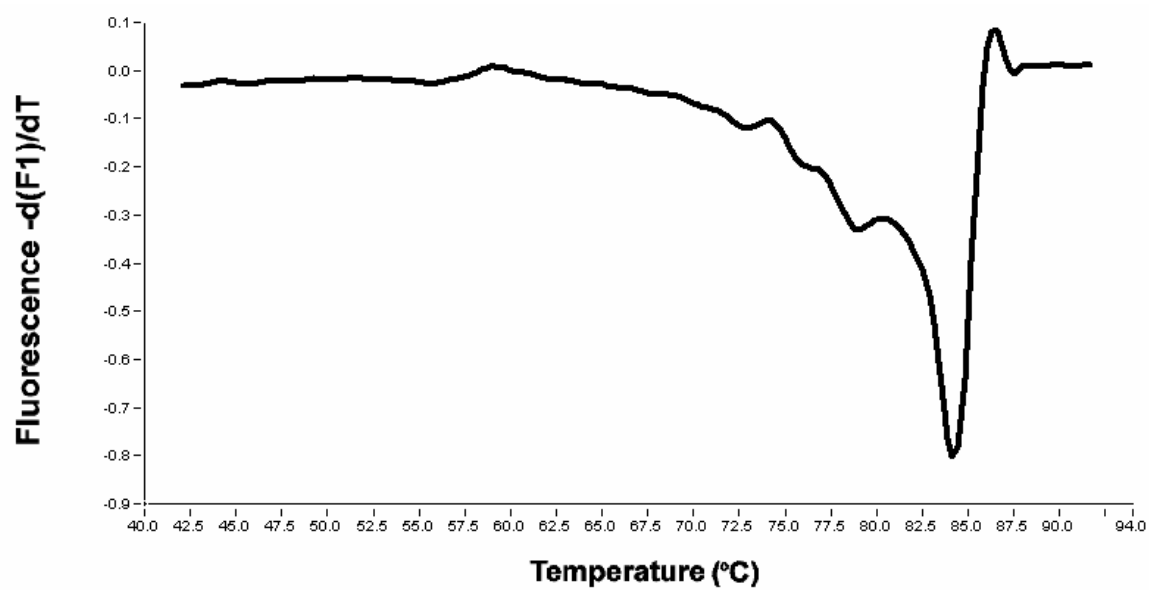


図 3.9 Touchdown PCR による PCR 産物の解離曲線

3.3.1.2 QProbe PCR 法

(1) PCR 反応による増幅の確認

QPrimer PCR 法の検討にて、同じ条件においても通常のサーマルサイクラーと LightCycler における PCR 増幅が異なることが明らかになったため、今回は LightCycler を用いて PCR 増幅の確認をおこなった。ここでは PCR 増幅のみを検討するため、QProbe は用いなかった。

アニーリングを 55 に設定して PCR 反応をおこない、増幅産物の有無をアガロースゲル電気泳動法によって確認した。この結果、図 3.10 に示すとおり、検量線用 DNA および活性汚泥試料から同じ長さのバンドを検出された。また陰性対照では、PCR 産物は確認されなかった。

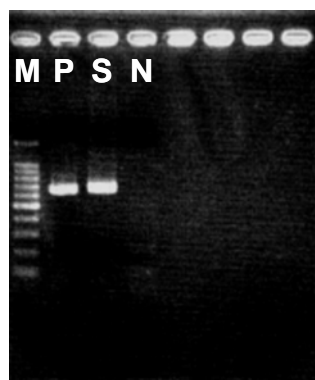


図 3.10 アガロース電気泳動

M : マーカー

P : 検量線 DNA

S : 活性汚泥試料

N : 陰性対照

(2) QProbe PCR 法の検討

続いて、QProbe PCR 法の条件検討をおこなった。QProbe の消光は、各 PCR サイクルの変性およびアニーリングの最後の蛍光強度の差に現れる。

(1) で決定したアニーリング温度 55 にて PCR 反応をおこない、QProbe の消光の有無を検討した。この結果、図 3.11 に示すとおり、QProbe の結合は確認できず、定量は不可能であった。図は各 PCR サイクルにおける QProbe の消光率を示している。消光率は各サイクルの変性における蛍光値を 100% として、アニーリングの最後に測定した蛍光値がどれだけ減少しているかを求めたものである。18 サイクル目以降、消光率が徐々に増加しているが、消光率が 5% 以上に増えることはなかった。Ct 値を決定するための閾値は通常 1 ~ 10% 程度の範囲内である。このことから、図における結果では有意な消光が認められたとは判断できず、定量は不可能と結論付けた。

PCR エンハンサー (DMSO または BSA) を PCR 反応液に添加して、再度検討したが、十分な消光率を得ることはできなかった。

(1) の検討にて正確に PCR 反応はおこなわれており、PCR 産物が得られていることは確認できている。このため、QProbe に問題がある可能性が高いと考えられた。しかしながら、PAO846p に変わる QProbe の候補がなかったため、QProbe PCR 法による定量は断念した。

3章 *Candidatus*'Accumulibacter phosphatis'の定量手法の確立と
活性汚泥試料への適用

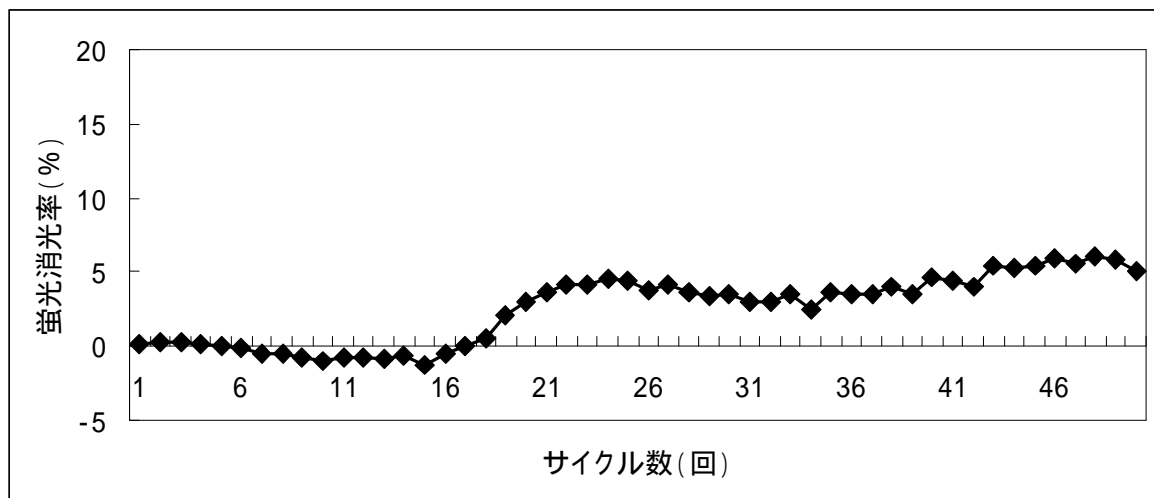


図 3.11 各サイクルにおける QProbe の消光率

3.3.1.3 インターカレーター法

ここでは、検討の全ての段階で、SYBR GREEN を加えて PCR 反応の条件を検討した。

PCR 条件および反応液の組成の決定

PCR 条件および反応液の組成について、LightCycler を用いて以下の項目を検討した。

1 . アニーリング温度

2 . PCR エンハンサー (DMSO および BSA) の添加

1 . については PAO651f プライマーの T_m が 58 であったため、57 を上限として検討した。この結果、57 においても PCR 増幅が認められたため、57 をアニーリング温度とした。続いて、PCR エンハンサーの添加による PCR 増幅および特異性の違いを検討した。ここでは、PCR エンハンサーの濃度上限を 5%とし、BSA 5%、DMSO 5%、BSA 2.5% + DMSO 2.5%および 添加なしについて検討した。この結果、 においては、活性汚泥試料の一部で PCR 増幅が認められないケースがあった。 については、活性汚泥試料において良好な PCR 増幅が認められていたが、陰性対照も比較的早いサイクルで増幅するケースがあり、特異性に問題があった。

および についてはいずれも活性汚泥試料において良好な PCR 増幅が認められ、陰性対照においても 30 サイクルを超えるまで増幅が見られなかった。但し、図 3.12 に示すように、 の方が、低い蛍光値にてプラトーに達する様子がみられた。これは、 の方が PCR 産物の量が多いことを意味する。この結果を踏まえて、 BSA 2.5% + DMSO 2.5%の条件にて PCR をおこなうことにした。また、 の条件にて作成した解離曲線の一例を図 3.13 に示す。図のように、1 本のシャープなピークのみが 86 付近に確認された。

増幅産物の特異性をより確実に確認するために、活性汚泥から抽出した DNA サンプルから得られた増幅産物について塩基配列を解読した。活性汚泥は R7 の運転 33 日目の汚泥を用いた。シーケンシングは 3.2.3.2 (3)に記したものと同一方法でおこなった。この結果、解読された塩基配列は、*Rhodocyclus* sp. R6. (詳細は図 3.4 参照) と 100%配列が一致していた。

3章 *Candidatus*'Accumulibacter phosphatis'の定量手法の確立と 活性汚泥試料への適用

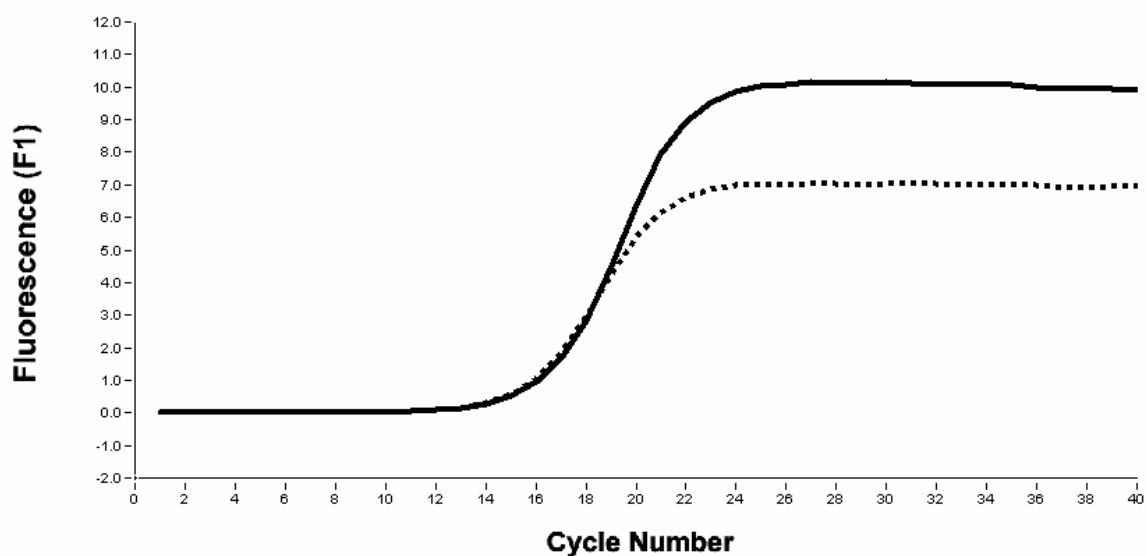


図 3.12 PCR 増幅曲線
(実線は BSA 2.5% + DMSO 2.5%、破線は BSA 5%)

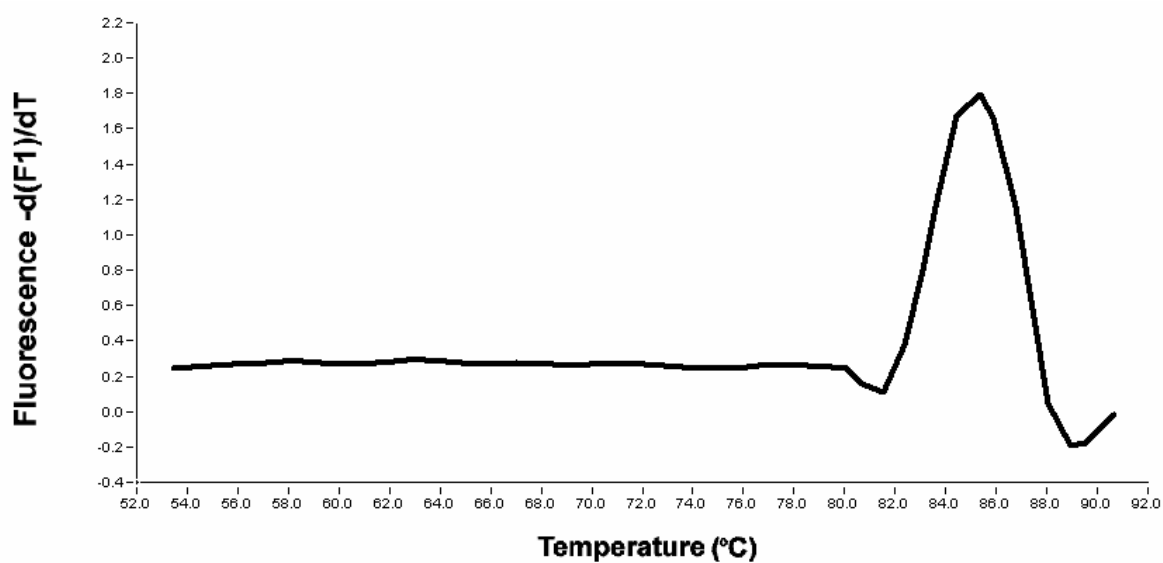


図 3.13 インターカレーター法による PCR 産物の解離曲線

これらの結果を踏まえて、以下の PCR 条件および反応液の組成にて定量 PCR をおこなうことにした。

・ PCR 反応液

1.0U KOD -plus-, 1×PCR バッファー、0.2mM (each) dNTP、0.3μM (each) プライマー、1mM MgSO₄、25μg/μL BSA、25μL/μL DMSO、200pL/μL SYBR Green および DNA サンプル (5ng)

・ サーマルサイクル条件

94 5 分 (Hot Start)

94 15 秒 (変性) 57 20 秒 (アニーリング) 68 15 秒 (伸長); 35 サイクル

なお、活性汚泥試料から抽出した DNA の添加量は 5ng に設定した。これは、5ng を超えると PCR 増幅が見られなかったためである。また、特異性を確認するために、PCR 反応の後に解離曲線解析を毎回おこなうこととした。

定量性および再現性の確認

上述条件にて作成した検量線を図 3.14 に示す。 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^7$ copies/reaction の範囲において良好な検量線を作成することができた。陰性対照については、多くの場合において 30 サイクルを超えるまで蛍光値は上昇せず、Ct 値は算出できなかった。一方で、 1.0×10^3 copies/reaction における Ct 値は 27 サイクル付近であった。このことから、少なくとも陰性対照よりも Ct 値として 3.3 サイクル以上、すなわちコピー数に換算して 10 倍以上の差がある 1.0×10^3 copies/reaction を検出下限として設定した。また、検量線を 2 回作成した結果、決定係数 (R^2) の平均は $R^2=0.9998$ であった。増幅効率 (E) の平均は 97% であった。

続いて同一の活性汚泥試料について、DNA 抽出を含む全ての実験工程における定量値のばらつきを 6 回の繰り返しで評価したところ、変動係数は 11% であった。また、同一の DNA 試料 5 試料に対して、定量 PCR の操作のみで生じる変動係数を求めた結果、7.5% であった。

これらの結果から、 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^7$ copies/reaction の範囲において特異的かつ、定量的な PCR がおこなわれていることが確認でき、そのばらつきは DNA 抽出を含む全ての実験工程において約 11% であることがわかった。この結果を踏まえて、その後の活性汚泥試料の測定では検量線用 DNA および活性汚泥試料は全て 1 連にて測定することとした。

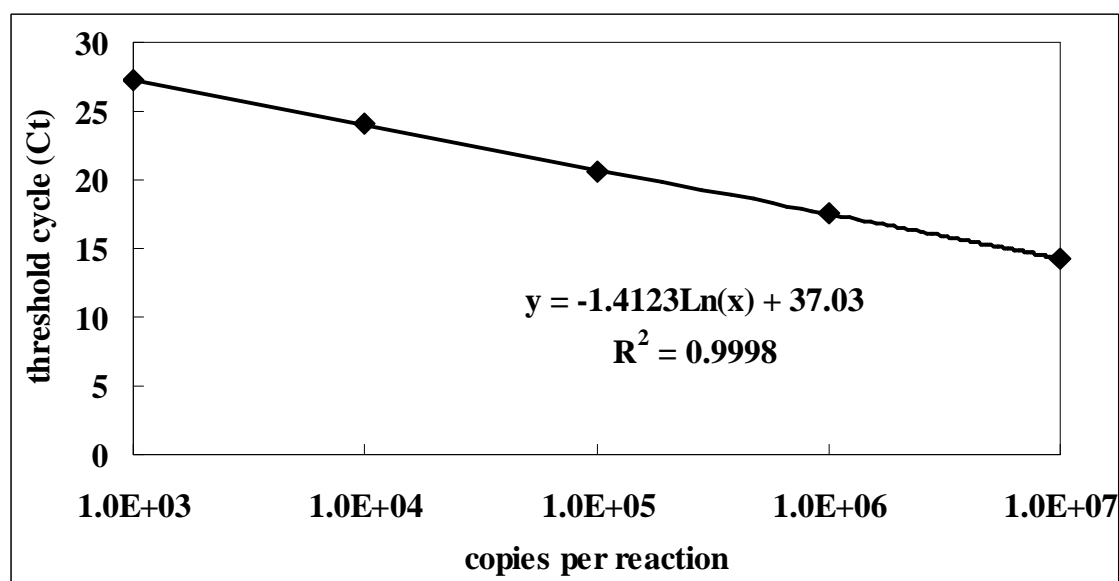


図 3.14 インターカレーター法による定量 PCR の検量線

3.3.2 活性汚泥試料への適用

3.3.2.1 実験室規模EBPRリアクターにおける定量

炭素源の異なる 5 系列の実験室規模 EBPR リアクター (R5 ~ 9) における 'Accumulibacter' を、FISH法および確立した定量PCR法によって定量し、得られた定量値の相関を検討した。活性汚泥試料は R5、R6 は 4 試料、R7 は 6 試料、R8、R9 は 3 試料をそれぞれ採取した。'Accumulibacter'の存在量ができるだけ異なる試料を用意した方が相関を調べやすい。そこで、これらのリアクターからはリン除去の性能の異なる時期(良好な時期、悪化した時期等)に試料を採取した。

図 3.15 に各リアクターにおける定量結果を示す。全てのリアクターにおいて FISH 法および定量 PCR 法による定量結果が類似した挙動を示していた。例えば R6 では、67 日目には FISH 法および定量 PCR 法の定量結果が増加し、その後はともに減少していく様子が見られた。しかし、R9 においては両者の定量結果で異なる挙動が見られた。

なお、検出された DNA は全て 'Accumulibacter' の 16S rRNA 遺伝子であることを解離曲線解析にて確認した。また、定量 PCR 法による定量結果は試料から抽出された DNA 1ng あたりのコピー数で表記した。

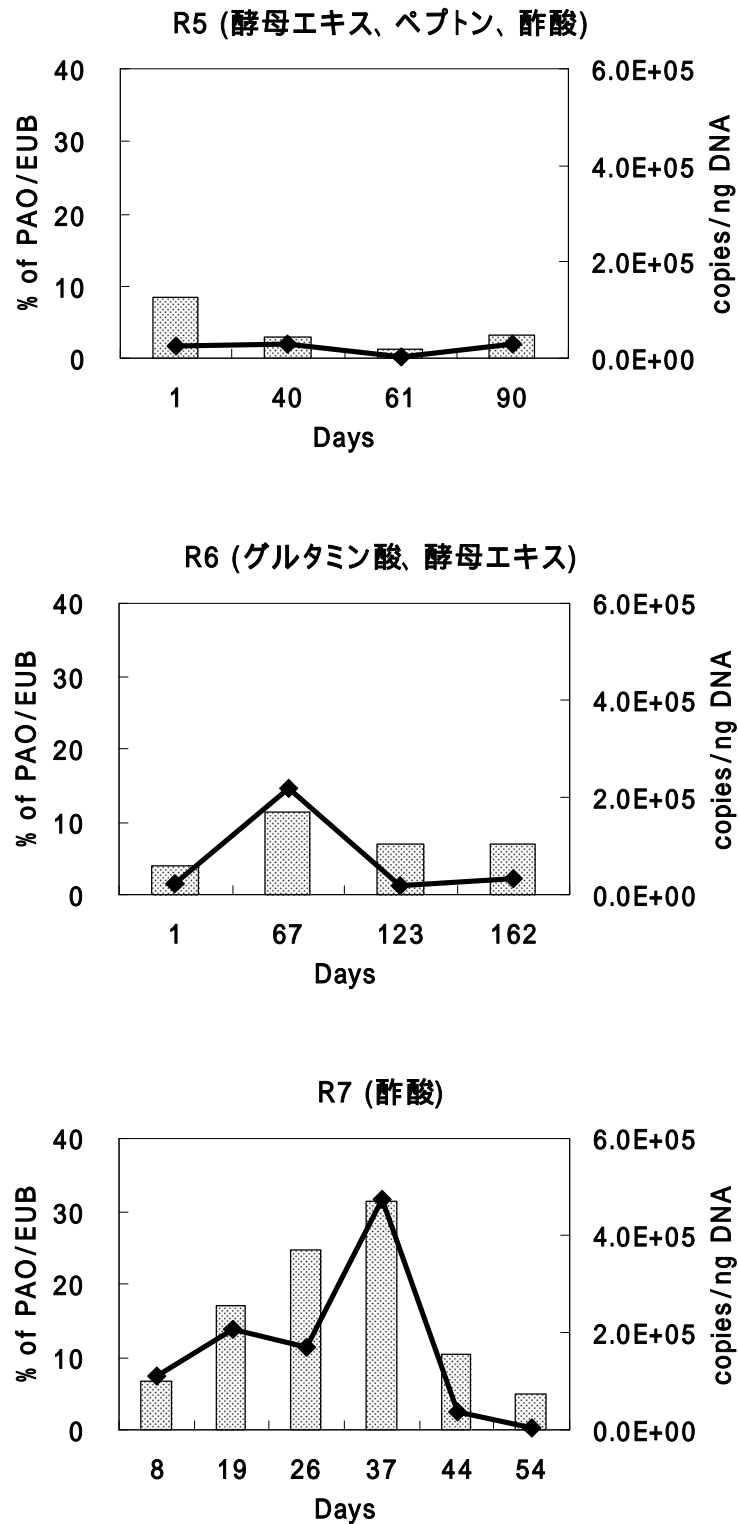


図 3.15 実験室規模 EBPR リアクターにおける '*Accumulibacter*' の定量結果
(折れ線グラフ：定量 PCR 法 (copies/ng DNA)、棒グラフ：FISH 法 (% of PAO/EUB))

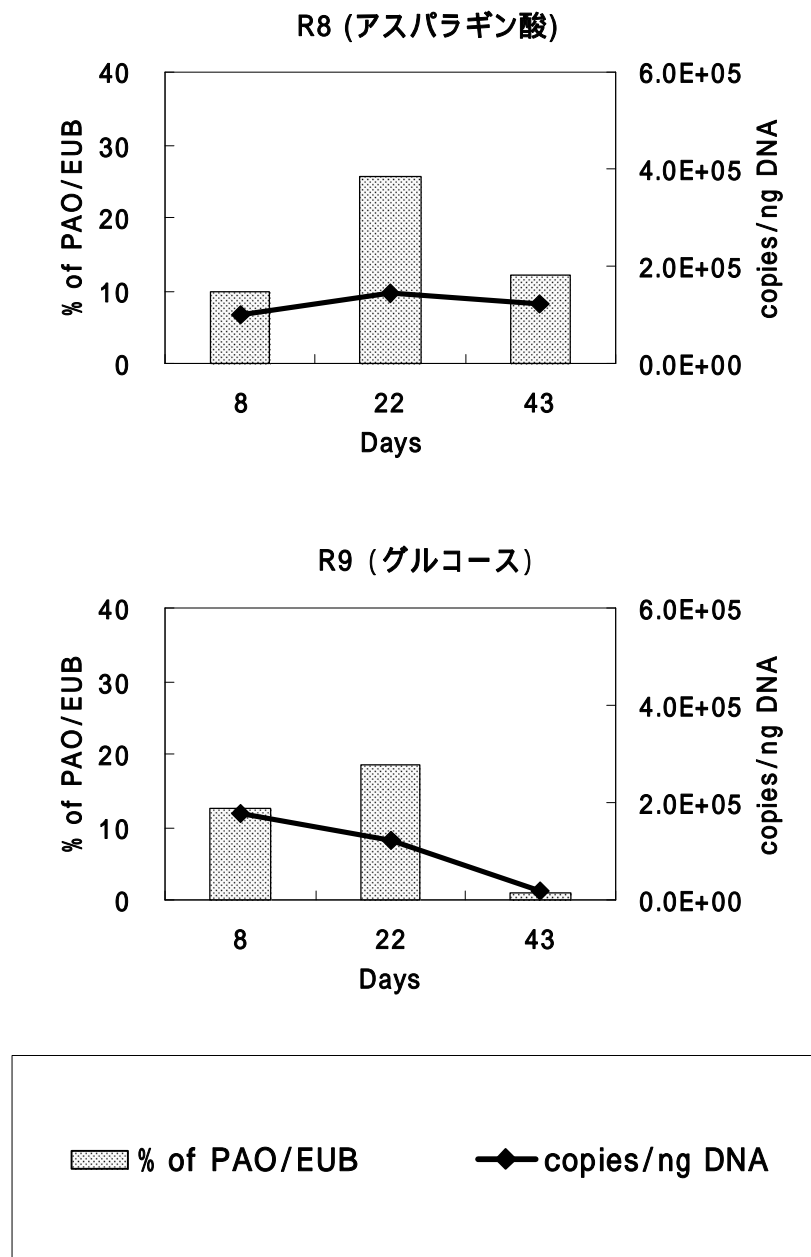


図 3.15 実験室規模 EBPR リアクターにおける 'Accumulibacter' の定量結果
(折れ線グラフ：定量 PCR 法 (copies/ng DNA)、棒グラフ：FISH 法 (% of PAO/EUB))

3.3.2.2 実下水処理場汚泥中の 'Accumulibacter' の定量

処理法式の異なる実下水処理場汚泥（標準法：6 試料、AO 法：3 試料および A2O 法:1 試料）における 'Accumulibacter' を FISH 法および確立した定量 PCR 法によって定量した。

図 3.16 に各汚泥試料中の 'Accumulibacter' の定量結果を示す。定量 PCR 法および FISH 法の結果はここでも類似していた。なお、解離曲線解析をおこなった結果、ここでも検出された DNA は全て 'Accumulibacter' の 16S rRNA 遺伝子であることを確認した。

各処理法式における 'Accumulibacter' の量には、大きな違いは見られなかった。また、標準法では 'Accumulibacter' の存在量に大きなばらつきがあった。

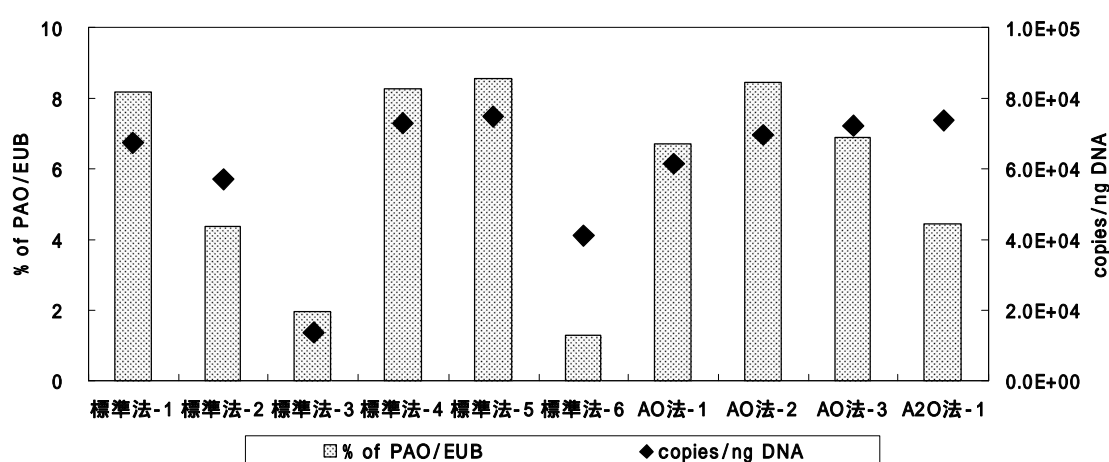


図 3.16 実下水処理場汚泥における 'Accumulibacter' の定量結果

3.3.2.3 FISH法および定量PCR法による定量結果の比較

3.3.2.1 および 3.3.2.2 に記した結果を用い、各試料中の 'Accumulibacter' の FISH 法による定量結果および定量 PCR 法による定量結果を比較した。両者の相関を図 3.17 に示す。両手法による定量結果には、 $R^2=0.687$ と有意な相関関係 ($p=0.001$, $n=30$) があることが確認された。なおここで、定量 PCR 法による定量値の範囲は $2.4 \times 10^3 \sim 4.7 \times 10^5$ copies/ng DNA、FISH 法では 0.9 ~ 31.5 %であった。なお、ほとんどの試料の定量値は、定量 PCR 法では 1.0×10^5 copies/ng DNA 以下、また、FISH 法では 10%以内であった。

実験室規模 EBPR リアクターおよび実下水処理場汚泥での定量結果を個別に相関解析した結果、実験室規模 EBPR リアクターでは $R^2=0.682$ ($n=20$)、実下水処理場汚泥では $R^2=0.629$ ($n=10$) と僅かながら実験室規模 EBPR リアクターの方が相関が高かった。

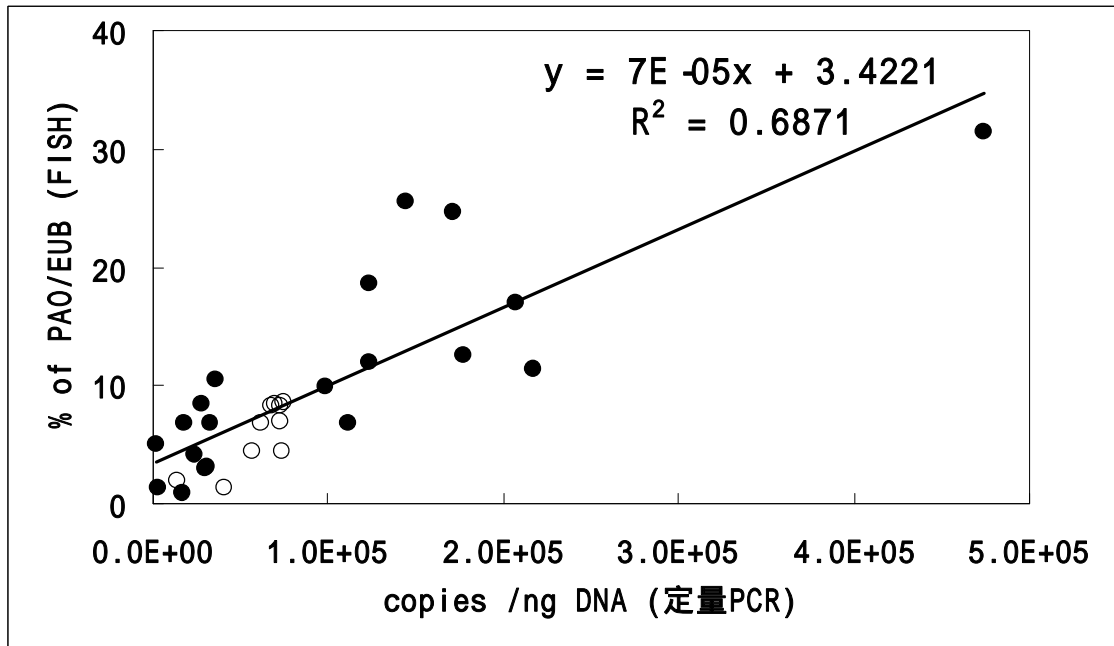


図 3.17 FISH 法および定量 PCR 法による '*Accumulibacter*' の定量結果の比較
(は実験室規模 EBPR リアクター汚泥、 は実下水処理場汚泥)

3.4 考察

3.4.1 インターカレーター法による定量の迅速性および定量限界

QPrimer PCR 法、QProbe PCR 法および SYBR GREEN を用いたインターカレーター法によって、'Accumulibacter'の 16S rRNA 遺伝子に対する定量 PCR 法を検討した結果、最終的にインターカレーター法にて定量手法を確立することができた。確立したインターカレーター法による'Accumulibacter'の定量における迅速性および定量限界について FISH 法と比較し、以下に考察した。

インターカレーター法では、FISH 法と比べて'Accumulibacter'を迅速に定量することができた。例えば、汚泥 26 試料における定量結果を得るのに必要な時間は、インターカレーター法は約 1 日であり、FISH 法では、技術の習熟度に大きく依存するが、約 1 週間である。具体的には、インターカレーター法では、DNA 抽出に約 3 時間、DNA 濃度の定量および希釈操作に約 1 時間、定量 PCR に約 2 時間を要する。一方で、FISH 法では、26 試料を同時に定量することは困難で、1 回に 8 試料程度が限界である。1 回につき、FISH および顕微鏡観察に 1 日、面積定量に 1 日を要する。このように定量 PCR 法を用いることで、FISH 法と比べて迅速に定量が可能になり、より詳細な'Accumulibacter'の挙動を評価することができる。

続いて、今回確立したインターカレーター法によって、全細菌に対して何%の'Accumulibacter'が存在すれば定量可能であるかを、FISH 法の結果と比較して推定した。図 3.18 に、3.3.2.1 および 3.3.2.2 に記した結果を、両対数グラフを用いて示す。図から定量 PCR 法による定量結果が 10^4 copies/ng DNA のオーダーであると、FISH 法による定量では'Accumulibacter'が全細菌の 1%のオーダーで存在していることがわかる。 10^5 copies/ng DNA のオーダーでは 10%のオーダーである。インターカレーター法による定量下限は 2×10^2 copies/ng DNA であったため、'Accumulibacter'が全細菌の 0.01 ~ 0.1%のオーダーまで定量可能であると考えられる。筆者の経験上、FISH 法による定量限界は全細菌の 1%のオーダーである。このように、インターカレーター法では、FISH 法の 10 ~ 100 倍程度低いオーダーまで定量可能であると考えられた。

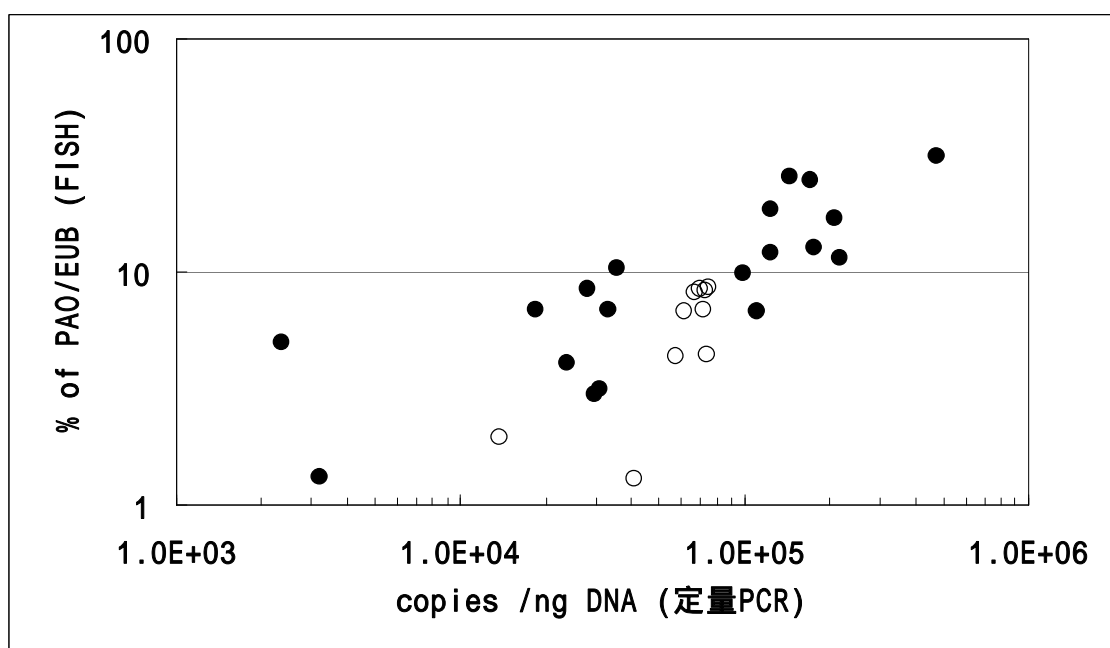


図 3.18 両対数グラフによる FISH 法および定量 PCR 法による '*Accumulibacter*' の定量結果の比較

3.4.2 インターカレーター法および FISH 法によって得られた定量値の相関

3.3.2.3 にて、実験室規模 EBPR リアクターおよび実下水処理場汚泥における '*Accumulibacter*' をインターカレーター法による定量 PCR 法および FISH 法を用いて定量し、その定量値の相関を検討した。その結果、 $R^2=0.687$ と若干弱いながらも有意な相関が得られた。このため、インターカレーター法によって活性汚泥内の '*Accumulibacter*' を定量可能であると考えられた。

ここでは、 $R^2=0.687$ と相関が若干低い結果となった理由について考察する。一番の要因として、'*Accumulibacter*' の存在量が全細菌の 10% 以下である試料が非常に多かった点が挙げられる。経験上、存在量が 10% 以下の汚泥に対する FISH 法を用いた面積定量では自家蛍光の影響を受けやすく、正確な定量が若干困難となる。特に実下水処理場汚泥では、細菌のフロックのほかに無機物質由来と思われる非生物の自家蛍光が多く見られる。このような汚泥試料における正確な定量はさらに困難となる。この証拠に、実下水処理場汚泥を対象とした FISH 法とインターカレーター法による定量結果の相関が、実験室規模 EBPR リアクターと比べ若干下がっていた。

また逆に、'*Accumulibacter*' の存在量が全細菌の 10% を超える試料が少なかったため、数 10% のオーダーの存在量における相関関係が正確に評価されていなかった可能性も考慮しなくてはならない。実際、図 3.17 にて '*Accumulibacter*' が 30% を超えている試料の定量結果のプロットを 1 つ除くと全体の R^2 値が 0.6 弱まで下がった。今後、'*Accumulibacter*' が数 10% 存在するような試料を多くそろえて再度検討する必要性も考えられた。

そのほかの理由として、FISH 法およびインターカレーター法を含む定量 PCR 法における定量対象が異なることが挙げられる。FISH 法では全細菌あたりの割合として '*Accumulibacter*' を定量しているのに対して、定量 PCR 法では単位 DNA 量あたりのコピー数で定量結果を示している。活性汚泥から抽出した DNA には古細菌や真核生物由来の DNA も当然含まれるため、インターカレーター法では、全生物あたりのコピー数を算出していることになる。さらに、FISH 法では主に RNA、定量 PCR 法では DNA を対象としていることも理由の一つとして挙げられる。FISH 法では主として RNA に結合した蛍光を検出するため、DNA は存在しているものの RNA 量が少ない、またはまったくない細胞を検出することができない。一方で定量 PCR 法では、DNA を対象とするため、活性汚泥試料に含まれる死細胞から溶出した DNA も定量してしまう。このように、FISH 法および定量 PCR 法の検出メカニズムも相関関係を下げる要因になっていると考えられる。

3.5 まとめ

本章では SYBR GREEN を用いたインターカレーター法を用いて 'Accumulibacter' の 16S rRNA 遺伝子を定量する手法を確立し、活性汚泥試料への適用性を検討した。本研究で得られた成果を以下に示す。

- SYBR GREEN を用いたインターカレーター法による定量を検討した結果、 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^7$ copies/reaction の範囲において良好な検量線を作成することができた。また、DNA 抽出を含む定量 PCR の実験工程によっておこる定量値のばらつきは 11%であった。
- インターカレーター法による定量では、FISH 法よりも迅速に結果を得ることができた。
- インターカレーター法による 'Accumulibacter' の定量限界は、全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合として 0.01 ~ 0.1%であった。
- 実験室規模 EBPR リアクターおよび実下水処理場汚泥における 'Accumulibacter' を FISH 法および定量 PCR 法によって定量し、比較した結果、 $R^2=0.687$ ($p=0.001$, $n=30$) と有意な相関関係を得ることができた。

このように、インターカレーター法を用いた定量 PCR 法によって 'Accumulibacter' を迅速かつ高感度に定量する手法を確立することができた。なお、本章の成果の一部は Fukushima et al. (accepted) にて公表予定である。

4 章 *Microlunatus phosphovorus* の 定量手法の確立と活性汚泥試料への 適用

4 章目次

- 4.1 背景と目的
 - 4.2 実験方法
 - 4.2.1 活性汚泥試料
 - 4.2.2 定量 PCR 法
 - 4.3 実験結果
 - 4.3.1 定量 PCR 法の確立
 - 4.3.2 活性汚泥試料への適用
 - 4.4 考察
 - 4.4.1 定量 PCR 法の確立
 - 4.4.2 活性汚泥中の *M. phosphovorus* の存在量とその経時的変化
 - 4.4.3 *M. phosphovorus* のリン除去への寄与
 - 4.5 まとめ
-

4.1 背景と目的

Microthrix phosphovorae (以下、*M. phosphovorae* と記す) は活性汚泥から分離された細菌で、好気条件下でポリリン酸を蓄積し、嫌気条件下でこのポリリン酸を用いてグルコース等の炭素源を摂取することが報告されている (Nakamura et al., 1995a, 1995b)。酢酸の利用性に乏しい点を除けば、EBPR プロセスにおいて主要な役割を担う PAOs と共通する代謝能を持っている。

EBPR プロセスにおける PAOs の系統遺伝学的分類や存在量を把握するために、FISH 法を用いた定量評価がおこなわれている。しかしながら、*M. phosphovorae* はグラム陽性細菌であることから、FISH 法における固定の際にリゾチーム処理を要する。グラム陽性細菌の強固な細胞壁を加水分解し、FISH 用のプローブが菌体内に浸透し、核酸にハイブリダイズしやすくするためである。リゾチーム処理はグラム陽性細菌を FISH 法により検出するためには有効だが、一部のグラム陰性細菌の細胞壁は加水分解されすぎて、核酸が流出してしまう。これにより、全細菌の定量結果が過小評価になってしまうため、活性汚泥中に占める *M. phosphovorae* の正確な割合を定量することが困難となる。このため、EBPR プロセスを中心とした活性汚泥内における *M. phosphovorae* の存在量や挙動に関する知見は、これまであまり得られていない。

一方近年、標的細菌の活性汚泥中の挙動を迅速かつ簡便に把握する手法として、定量 PCR 法が用いられている。定量に用いる DNA 試料を汚泥から抽出する際に、ガラスビーズ等を用いて細胞壁を破碎することによって、グラム陽性細菌においても高い DNA 収率を得ることができる。このため、定量 PCR 法を用いることにより、グラム陽性、陰性に関わらず正確な定量が可能となる。

そこで本章では、*M. phosphovorae* を定量的に評価する手法を確立すること、および確立した手法を用いて活性汚泥内における *M. phosphovorae* の存在量およびその経時的な変動を明らかにすることを目的とした。また、*M. phosphovorae* のリン除去への寄与を評価した。まず、Kurata et al. (2000) によって確立された定量 PCR 法、Quenching Primer PCR 法 (以下、QPrimer PCR と記す) を用いて *M. phosphovorae* の 16S rRNA 遺伝子の定量手法を確立した。続いて、確立した定量 PCR 法を用いて、異なる炭素源を用いて運転した 5 系列の実験室規模 EBPR リアクターにおける *M. phosphovorae* の存在量およびその経時的な変動を把握した。炭素源の種類によって存在量および経時的な変動がどのように異なるかを調べ、さらに、リン除去性能と比較することで、*M. phosphovorae* のリン除去への寄与を評価した。

4.2 実験方法

4.2.1 活性汚泥試料

本章の実験では5系列の実験室規模EBPRリアクターおよび12箇所の実下水処理場汚泥を用いた。

実験室規模EBPRリアクターは3章で使用したものと同一である。運転条件詳細は3.2.1に記載したとおり、炭素源のみ異なる条件で運転した。R5は酵母エキス（炭素換算で50%）ペプトン（40%）および酢酸（10%）、R6はグルタミン酸（94%）および酵母エキス（6%）を炭素源とした。R7は酢酸、R8はアスパラギン酸、R9はグルコースを唯一の炭素源として運転した。

また、これら実験室規模EBPRリアクターにおいては、試料を採取した時のリン除去状態を把握するため、好気終了時におけるリン含有率（% MLVSS）を算出した。リン含有率は以下の式4.1から求めた。

$$\text{リン含有率 (\% MLVSS)} = \frac{\text{全リン} - \text{溶存態リン}}{\text{MLVSS}} \times 100 \quad \cdots \text{式 4.1}$$

全リン、溶存態リンおよび MLVSS は下水道試験法(1997)にしたがって測定した。なお、リン含有率は福島(2003)にて報告した。

実下水処理場の汚泥は、標準活性汚泥法（標準法）、嫌気-好気法（AO 法）および嫌気-無酸素-好気法（A2O 法）にて運転している反応槽の活性汚泥を、それぞれ 7、3 および 2 試料を採取した。

4.2.2 定量 PCR 法

4.2.2.1 検量線用DNAの調製

凍結保存しておいた *M. phosphovorius* JCM9379 (Accession No.: D26170) から DNA を Isoil for Beads Beading (NIPPON GENE) により抽出した。抽出方法は同社のプロトコルにしたがった。得られた DNA から 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') および 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') プライマーを用いて PCR 増幅した。PCR 反応では、DNA polymerase として、Ampli Taq Gold DNA polymerase (PE Applied Biosystem) を、サーマルサイクラーとして、T3 Thermocycler (Biometra) を用いた。PCR 反応は、95 10 分で Hot Start をおこなった後、94 30 秒（変性）、50 30 秒（アニーリング）、72 2 分（伸長）のサイクルを 30 回おこない、最後に 72 10 分間の伸長をおこなった。PCR 産物の DNA 濃度を分光光度計（NanoDrop ND-1000、NanoDrop Technologies）で定量し、16S rRNA 遺伝子のコピー数（copy/μL）を算出した。コピー数は式 3.1（3 章）から算出した。その PCR 産物を滅菌超純水で適宜希釈して検量線用 DNA として用いた。

4.2.2.2 活性汚泥試料からのDNA抽出

各活性汚泥試料から、3 章に記したように FastDNA SPIN Kit for Soil (QBiogene) を用いて DNA を抽出した (3.2.3.1)。分光光度計を用いて抽出した DNA の濃度を測定し、5ng/μL になるように滅菌した超純水で希釈して、定量 PCR に供した。

4.2.2.3 プライマーの設計

QPrimer PCR 法によって、*M. phosphovorius* の 16S rRNA 遺伝子を特異的に PCR 増幅するためのプライマーを設計した。MP81f (5'-BODIPY-CTTGCTCTTTTGATCAGTGGCG-3'、配列部位:81-102) をフォワードプライマーとし、MP482r (5'-TCCTTCTTCTGCTCCTACCG-3'、配列部位:482-501) をリバースプライマーとした。なお、フォワードプライマーである MP81f の 5'末端に BODIPY を修飾することで Quenching Primer (QPrimer) とした。以下に、各プライマーの設計戦略を示す。

フォワードプライマーとして、MP81f を設計した。MP81f の配列は、Kawaharasaki et al. (1998) によって設計された FISH 用プローブ (MP2) を参考とした。まず、MP2 プローブの配列を逆相補にした配列をフォワードプライマーとして検討した。MP2 プローブの配列は、5'-CGGTTTCAGAAGAGCTTGCTC-3' であり、5'末端の C (シトシン) に G (グアニン) が 2 塩基続く。このような配列において、5'末端の C に BODIPY を修飾して QPrimer としても、QPrimer 単独で消光してしまう可能性がある (2.3.4 参照)。このため、MP2 プローブの 5'末端から 14 番目の C (上述配列にて下線がある C) を 5'末端として、そこから始めて *M. phosphovorius* の 16S rRNA 遺伝子に逆相補な配列 22 塩基分を MP81f プライマーとした。

リバースプライマーについては MP482r を設計した。設計には ARB ソフトウェア (Ludwig et al., 2004) を用いた。設計ではまず、18 ~ 22 の塩基長において *M. phosphovorius* のみに特異的な配列を検索した。しかし、*M. phosphovorius* のみに特異的な配列が見つからなかったため、*M. phosphovorius* 以外の細菌がなるべく少なくなるように検索した。その結果、MP482r が候補としてあがった。

MP81f と MP482r の各塩基配列に対して特異的な 16S rRNA 遺伝子配列を持つ細菌およびミスマッチが 1 塩基の細菌を中心に作成した、Actinobacteria に属する細菌の系統樹を図 4.1 に示す。系統樹は 3.2.3.2 に示したとおりに作成した。両プライマーの塩基配列に対して特異的な配列は、*Microthricus phosphovorius* NM-1、NM-2 および DCM である。NM-1 および NM-2 は Nakamura et al. (1995a) によって分離された株であり、MP2 プローブは、これらの分離株の配列から設計された。*Microthricus phosphovorius* DCM については、リン除去能について報告されていないが、NM-1、NM-2 の塩基配列との相同性が 99% であることから、ほぼ同じ種であると考えられる。ミスマッチが 1 塩基の細菌は数種存在したが、それらの細菌種は図中に示すとおり、片方のプライマー配列とのミスマッチが 1 塩基であるが、もう一方のプライマーとのミスマッチは 2 塩基以上であった。このように、設計したプライマーセットによって *M. phosphovorius* の 16S rRNA 遺伝子のみを PCR 増幅することを確認した。

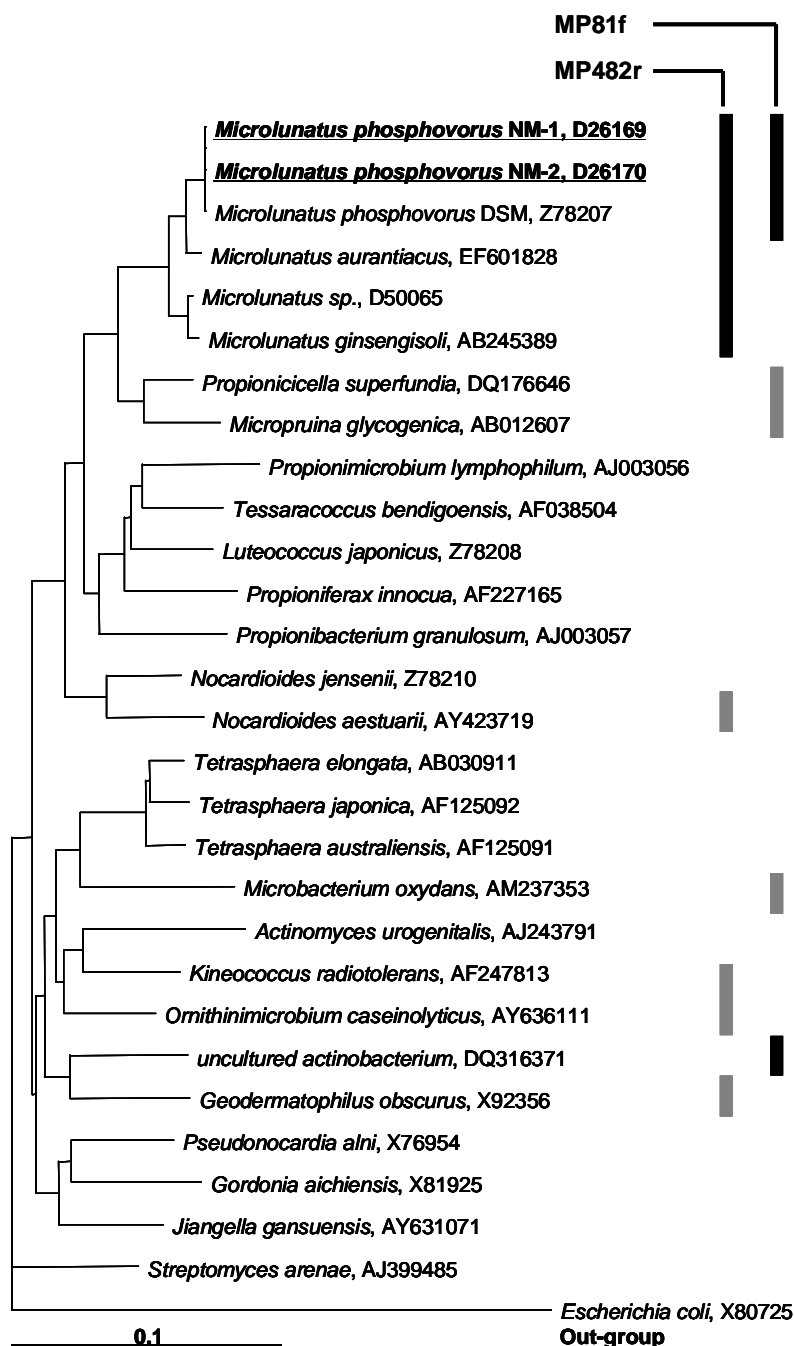


図 4.1 Actinobacteria に属する細菌の系統樹
 (各プライマーに特異的な配列を有する細菌種を黒い実線、
 ミスマッチが 1 塩基の細菌を灰色の実線で示している。)
 (下線、太字の細菌種は FISH 用プローブ (MP2) 設計に用いられた細菌種。)

4.2.2.4 PCR 条件

PCR 反応液(20 μ L)の組成は、1.0U KOD -plus-, 1 \times PCR バッファー、0.2mM(each)dNTP、1mM MgSO₄、25 μ g/ μ L BSA、0.1 μ M (each) プライマーとし、テンプレートとして各濃度の検量線用 DNA もしくは 50ng の DNA を添加した。PCR 反応は LightCycler (Roche) を用いて、94 5 分で Hot Start をおこなった後、94 15 秒 (変性)、62 30 秒 (アニール)、68 30 秒 (伸長) のサイクルを 40 回おこなった。PCR 反応のプログラムについては、次のように検討した。伸長については KOD -plus-購入の際に付属していたマニュアルを参考にした。KOD を使用する場合には温度 68 に設定する必要がある。また、伸長の時間は KOD の一般的な伸長速度である 1 分/kb を参考とした。アニール温度については、使用するフォワードおよびリバースプライマーの T_m (Melting Temperature) 値うち、低いほうをとった。なお、T_m 値はプライマー購入時に付属してくるデータシートに記載されている値を使用した。

4.2.2.5 PCR産物の特異性の確認

上述の条件でのPCR反応の特異性を確認するために、解離曲線解析および塩基配列の解読をおこなった。

解離曲線解析は次のようにおこなった。検量線用DNA (陽性対照)、活性汚泥試料から抽出したDNA、および滅菌超純水をDNAの代わりに添加した陰性対照を用いて得られたPCR産物に対して解離曲線解析をおこなった。なお、用いた汚泥試料は実験室規模EBPRリアクターから採取したものであり、PCR-Cloning法によって、*M. phosphovorus*が存在していたことを確認している。解離曲線解析はPCR反応に続いて、95 30秒、40 120秒の反応の後、0.1 /秒の割合で95 まで昇温し、連続的に蛍光を検出した。この結果から、LightCycler Software version 3.5 (Roche) を用いて解離曲線を作成した。

解離曲線は主としてピークの本数、および、陽性対象と活性汚泥試料からのPCR産物の解離曲線のピークの温度に基づいて評価した。数本のピークが見られる場合においては、標的配列以外の配列も増幅していることが考えられ、また、陽性対照と活性汚泥試料からのPCR産物の解離曲線のピーク温度が異なる場合、異なる配列をPCR増幅していると考えられるからである。

解離曲線解析において、ピークが 1 本のみであり、そのピークが陽性対照と同じ温度であることを確認したうえで、その PCR 産物の塩基配列が、*M. phosphovorus* の 16S rRNA 遺伝子の標的配列であることを塩基配列の解読によって確認した。塩基配列解読におけるシーケンシング反応には、ABI Big dye terminator kit version 3.1 (Applied Biosystems) およびリバースプライマー(MP482r)を用いた。シーケンサーはオートシーケンサーABI3100(Applied Biosystems)を使用し、それぞれ同社のプロトコルにしたがった。解読した塩基配列は DDBJ (DNA Data Bank of Japan ; <http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) の BLAST(Altschul et al. (1990)) ツールを用いて、*M. phosphovorus* の 16S rRNA 遺伝子の標的配列と一致することを確認した。

4.2.2.6 定量性の検討

検量線作成には 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 および 10^3 copies/reactionの検量線用DNAを用いた。検量線用DNAおよび活性汚泥試料の測定結果はMacro for LightCycler Ver 2.2 for win (J-Bio 21) を用いて解析した。

DNA 抽出を含む全ての実験工程における定量値のばらつきを把握するため、同一汚泥について試料抽出から *M. phosphovorus* の 16S rRNA 遺伝子の定量までの操作を 6 回繰り返し、定量値の変動係数を求めた。また、同一の DNA サンプルを 6 試料用いて、PCR 操作のみの定量値のばらつきも同時に把握した。変動係数は、6 試料の定量結果における標準偏差を平均値で除することで求めた。

4.3 実験結果

4.3.1 定量 PCR 法の確立

4.3.1.1 PCR産物の特異性の確認

活性汚泥試料から抽出したDNAおよび陰性対照に対しておこなった解離曲線解析の結果を図4.2に示す。活性汚泥試料では、83 付近に1本のみのピークが検出された。塩基配列解読の結果、PCR産物のプライマー配列を除いた領域で*M. phosphovorius*の16S rRNA遺伝子と配列が100%一致していた。なお、検量線用DNAに対しても同様の結果が得られた。これらの結果から、検討に用いた活性汚泥試料中の*M. phosphovorius*の16S rRNA遺伝子が特異的に増幅されたことが確認された。

一方で、陰性対照においても増幅が認められたが、解離曲線のピークは73 付近であった。すなわち、検量線用DNAや活性汚泥試料におけるPCR産物とは異なるものであった。このPCR産物は濃度が低く、ゲル電気泳動では検出することができず、したがってサイズを特定することは不可能であったが、解離温度が低いことから、産物の塩基長は短いと考えられた。おそらく、プライマーダイマー等が生成していた可能性が考えられた。

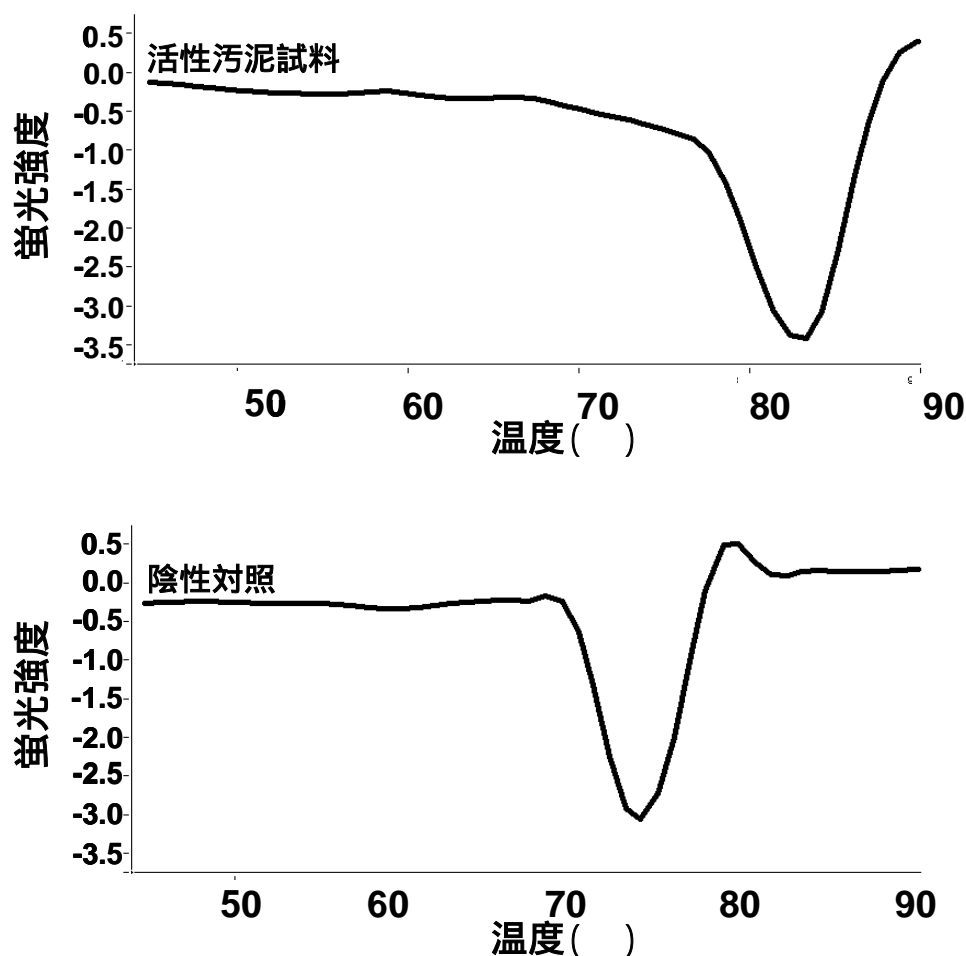


図 4.2 解離曲線解析（上図：活性汚泥試料、下図：陰性対照）

4.3.1.2 検量線の作成および活性汚泥試料における定量値のばらつき

図4.3に 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 および 10^3 copies/reactionの検量線用DNAを用いて作成した検量線を示す。この結果、 R^2 値が0.9996と良好な結果が得られた。他の試験においても常に0.999以上の値を示していた。

なお、陰性対照においてもPCR増幅が認められ、Ct値は36サイクル付近であった。一方、検量線用DNAの最低濃度である 10^3 copies/reactionのCt値は約30サイクル付近であった。両者のCt値は3.3サイクル以上、すなわちコピー数に換算して10倍以上の差があり、図4.2のように異なる解離曲線を示していたことから、 10^3 copies/reactionを定量下限値とした。

また、実験行程における定量値のばらつきを把握するため、同一汚泥試料を6試料用いて算出した定量値の変動係数は12%であった。また、定量PCRの操作によるばらつきは7%であった。この結果を踏まえて、その後の活性汚泥試料の測定では検量線用DNAおよび活性汚泥試料は全て1連にて測定することとした。

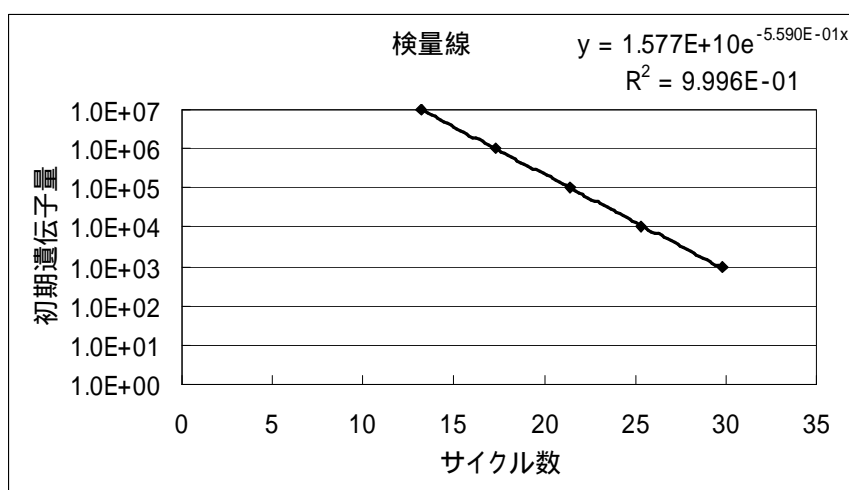


図 4.3 検量線

4.3.2 活性汚泥試料への適用

4.3.2.1 実験室規模リアクターの汚泥中の*M. phosphovorus* 16S rRNA遺伝子の定量

図4.4に各リアクターにおけるリン含有率および*M. phosphovorus*の16S rRNA遺伝子の定量結果を示す。なお、検出されたDNAは全て*M. phosphovorus*の16S rRNA遺伝子であることを解離曲線解析にて確認した。R5（酵母エキス，ペプトンおよび酢酸）R6（グルタミン酸および酵母エキス）およびR9（グルコース）において*M. phosphovorus*の16S rRNA遺伝子が検出されることを確認した。

R5では、高いリン含有率を示した61日目において*M. phosphovorus*の16S rRNA遺伝子の量が最高値を示したように、リン含有率と検出されたコピー数が類似した挙動を示していた。R6においても高いリン含有率を示した67日目においてコピー数が増加し、123日目ではリン含有率の低下に伴いコピー数も減少した。その後162日目では、リン含有率が低下しているにもかかわらずコピー数は増加し、最も高い値となった。一見、162日目においてリン含有率が低下し、リン除去が悪化しているように捉えられるが、図4.5に示すとおり、144日目以降リン除去が回復し、187日目では7%程度までリン含有率が上昇する様子が確認された。すなわち、リン除去能の復活に伴い*M. phosphovorus*が増加していた可能性が考えられた。また、R9においては、コピー数が少ないものの、リン含有率と類似した挙動を示していた。

一方でR7（酢酸）およびR8（アスパラギン酸）においては、リン含有率が上昇し、やがて低下していたものの、*M. phosphovorus*のコピー数は全ての試料で定量下限値以下であった。

以上の結果から、*M. phosphovorus* は炭素源の種類によって、その存在量が異なることが明らかになった。酵母エキス、ペプトン、グルタミン酸およびグルコースにおいてはリン含有率の上昇に伴いその存在量が増加していたが、酢酸、アスパラギン酸においては定量下限以下であった。

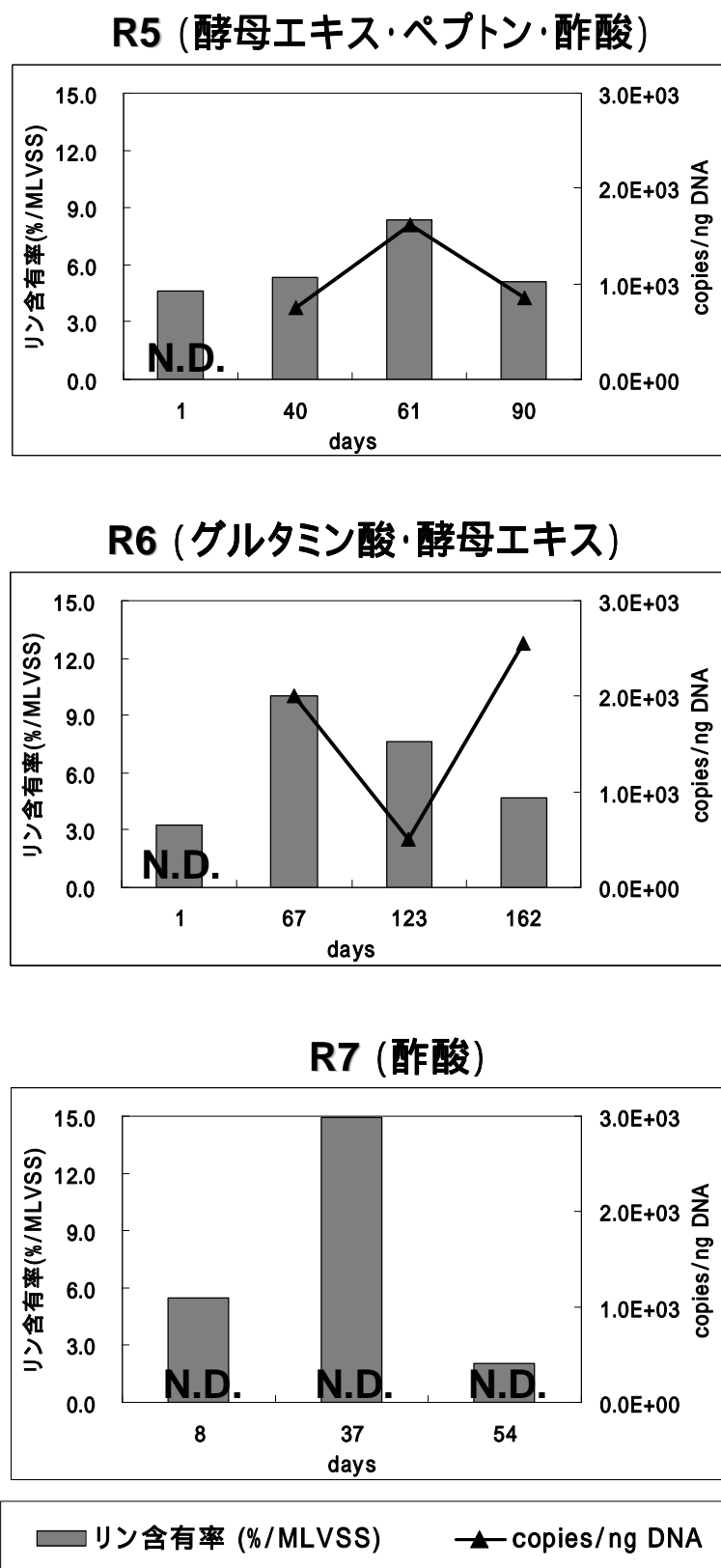


図 4.4 各リアクター中の汚泥リン含有率および *M. phosphovorus* の 16S rRNA 遺伝子の定量結果 (N.D. は定量下限以下)

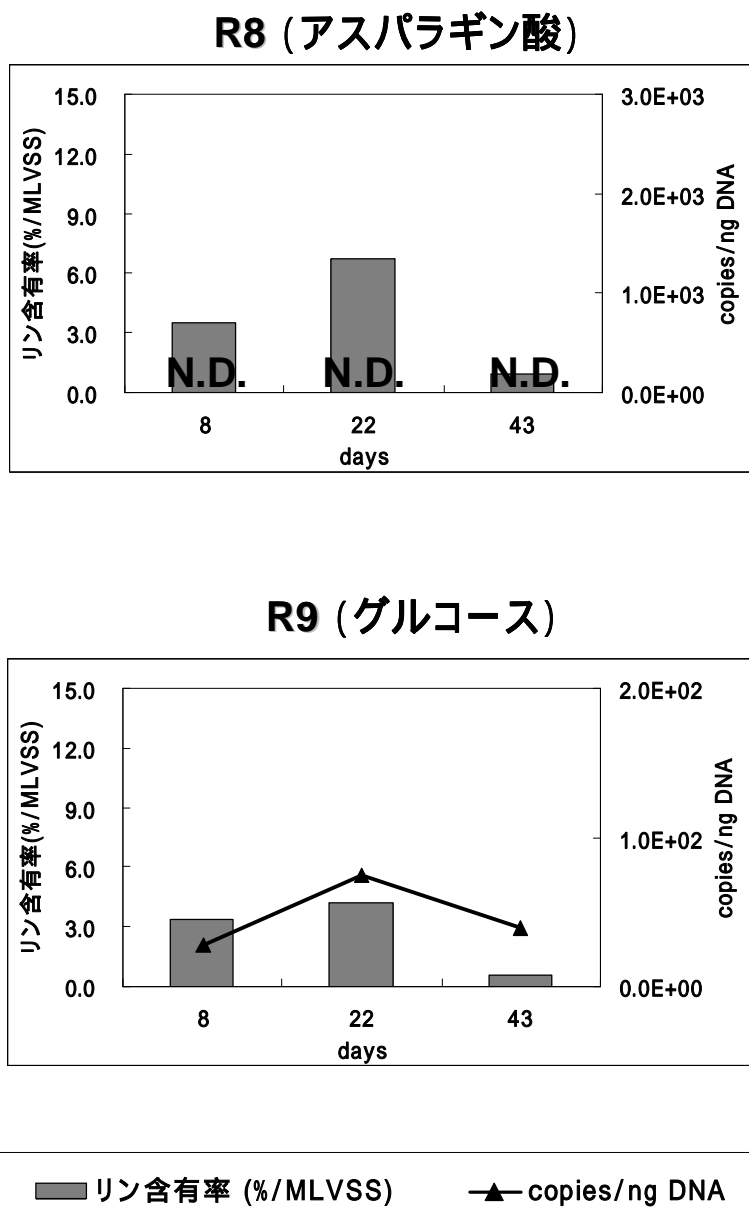


図 4.4 各リアクター中の汚泥リン含有率および *M. phosphovorius* の 16S rRNA 遺伝子の定量結果（先の図と同じ）
 （N.D. は定量下限以下）
 （R9 のみ *M. phosphovorius* の定量値（Y 軸、右側）の範囲が異なっている）

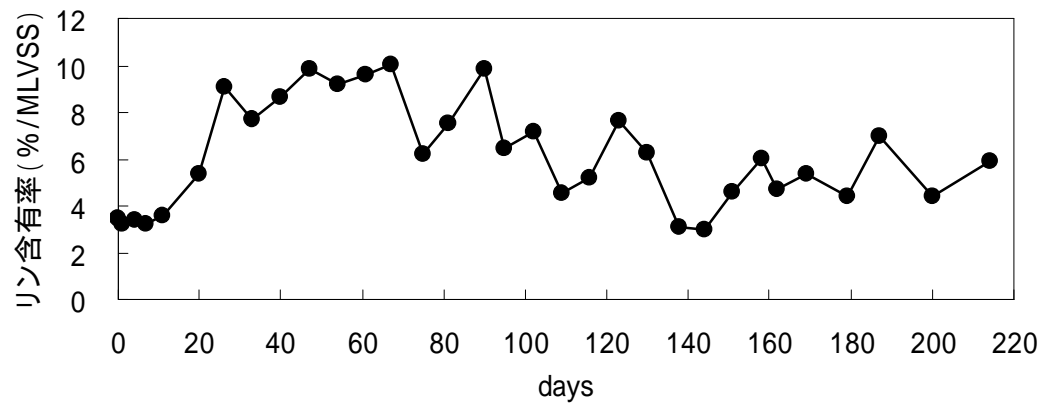


図 4.5 R6 (グルタミン酸・酵母エキス) における汚泥リン含有率 (%/MLVSS) の経時的変動

4.3.2.2 実下水処理場汚泥中の*M. phosphovorus* 16S rRNA遺伝子の定量

図4.6に各処理方式の実下水処理場汚泥における*M. phosphovorus*の16S rRNA遺伝子の定量結果を示す。全ての実下水処理場汚泥において、 3×10^2 copies/ngDNA程度が確認された。また、解離曲線解析の結果から、検出されたDNAは全て*M. phosphovorus*の16S rRNA遺伝子であったことが確認された。

各処理方式におけるコピー数の平均値は標準法で 3.2×10^2 copies/ngDNA、AO 法で 3.7×10^2 copies/ngDNA、A2O 法で 3.1×10^2 copies/ngDNA と、ほぼ同程度であった。

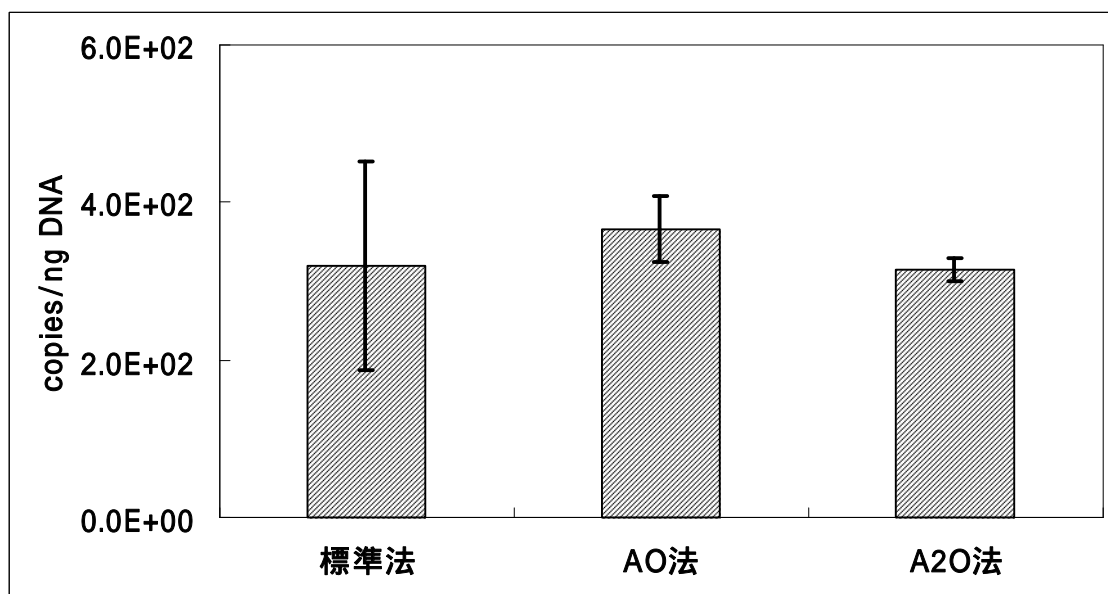


図 4.6 各処理方式の実下水処理場汚泥中の *M. phosphovorus* の定量結果
 (グラフのバーは標準偏差を示す)
 (標準法 : 7 試料、AO 法 : 3 試料、A2O 法 2 試料)

4.4 考察

4.4.1 定量PCR法の確立

QPrimer PCR法を用いて*M. phosphovorius*の16S rRNA遺伝子の定量手法を確立した。定量下限については、3章と同様に 10^3 copies/reactionであったが、PCR反応をおこなう際に添加するDNA量は50ngであり、3章で確立した定量PCR法（添加DNA量：5ng）と比べて10倍とすることができた。

活性汚泥試料における定量誤差のばらつきを検討した結果、DNA抽出を含む全ての操作による変動係数は12%であった。3章において、‘*Accumulibacter*’の定量誤差を同様に検討した結果が11%程度であり、誤差の大きさはほぼ同様であった。3章および本章で用いているFastDNA SPIN Kit for SoilはDNA抽出の際、ガラスビーズによる物理的な破碎処理をおこなう。ガラスビーズやジルコニアビーズを用いることによって細胞壁が厚いグラム陽性細菌からも容易にDNAを抽出することができる（Rantakokko-Jalava et al., 2002）。本章の結果からもガラスビーズを用いたDNA抽出によって、効率よく*M. phosphovorius*のDNAが抽出されたと考えられた。このように、グラム陽性細菌であることから、FISH法による定量が困難であった*M. phosphovorius*を定量する手法を確立することができた。

4.4.2 活性汚泥中の*M. phosphovorius*の存在量とその経時的変化

異なる炭素源を用いて運転した実験室規模EBPRリアクターにおける定量結果では、炭素源の種類によって存在量の明確な違いが認められた。Nakamura et al. (1995b)は各炭素源における嫌気状態での基質摂取能を検討し、酵母エキス、ペプトン、グルタミン酸およびグルコースは摂取していたが、乳酸および酢酸は摂取困難であったと報告している。本研究のリアクターにおいても、摂取可能と報告されている炭素源を用いたR5（酵母エキス、ペプトンおよび酢酸）、R6（グルタミン酸および酵母エキス）およびR9（グルコース）においては*M. phosphovorius*が検出された。また、リン含有率と類似した変動を*M. phosphovorius* 16S rRNA遺伝子のコピー数が示していたため、R5、R6およびR9では、*M. phosphovorius*がリン除去に寄与していることが推察された。一方で、R7（酢酸）およびR8（アスパラギン酸）を与えた系においては定量下限値以下であった。酢酸を用いたR7で*M. phosphovorius*が定量下限以下だったのは、*M. phosphovorius*は嫌気における酢酸の利用性に乏しいとのNakamura et al. (1995b)の報告と矛盾しない結果である。アスパラギン酸の利用性については報告が無いが、嫌気条件下ではこれらの炭素源を摂取困難であることが示唆された。

実下水処理場汚泥の定量結果では、処理方式による違いは認められなかった。この要因として、*M. phosphovorius*は好気条件下においても様々な炭素源を摂取可能であることから、処理方式に関わらず生存は可能であることが考えられた。

4.4.3 *M. phosphovorius* のリン除去への寄与

今回対象とした全ての実下水処理場から *M. phosphovorius* の存在が確認された。また、実験室規模 EBPR リアクターにおいては、R5 (酵母エキス、ペプトンおよび酢酸)、R6 (グルタミン酸および酵母エキス) および R9 (グルコース) において *M. phosphovorius* が検出され、リン除去と類似した挙動を示していた。そこで、*M. phosphovorius* のリン除去への寄与について、3 章で得られた‘*Accumulibacter*’の定量結果と比較しながら考察する。

最初に、実下水処理場におけるリン除去への寄与を推測するために、PAOs に対する *M. phosphovorius* の割合を概算した。AO 法もしくは A2O 法にて運転している実下水処理場における‘*Accumulibacter*’の PAOs に対する割合は約 20 ~ 60% と報告されている(宇田ら、2006)。第 3 章において、AO および A2O 法にて運転している実下水処理場における‘*Accumulibacter*’ 16S rRNA 遺伝子のコピー数は $6.2 \sim 7.4 \times 10^4$ copies/ng DNA であった。これらの実下水処理場の汚泥においても‘*Accumulibacter*’の PAOs に対する割合は約 20 ~ 60% であったと仮定すると、‘*Accumulibacter*’のコピー数が 10^4 copies/ng DNA のオーダーで存在すれば、PAOs に対する割合は数 10% のオーダーになると推定できる。一方で、本章で対象とした AO 法および A2O 法の実下水処理場汚泥における *M. phosphovorius* のコピー数は、 10^2 copies/ng DNA のオーダーであり、‘*Accumulibacter*’よりも 100 倍程度低い値であった。1 細胞あたりの 16S rRNA 遺伝子のコピー数が‘*Accumulibacter*’と *M. phosphovorius* とで変わらないと仮定すると、本章で対象とした実下水処理場汚泥における *M. phosphovorius* の PAOs に対する割合は‘*Accumulibacter*’よりも 100 倍低い、0.1% のオーダーであったと推測できる。このように、実下水処理場における *M. phosphovorius* のリン除去への寄与は非常に小さいと考えられた。

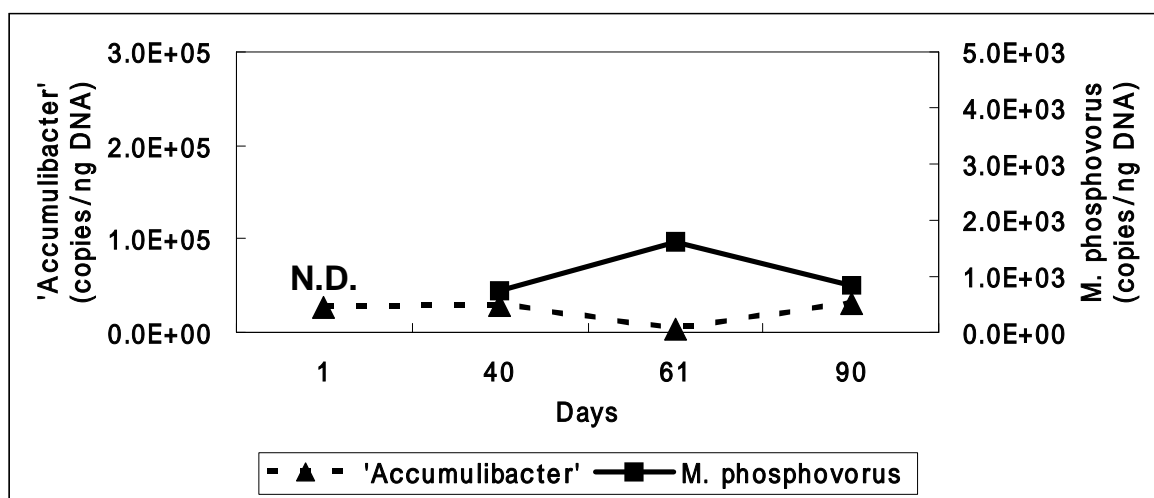
続いて、今回検討した実験室規模 EBPR リアクターにおける *M. phosphovorius* のリン除去への寄与について考察する。R5 および R6 における *M. phosphovorius* と‘*Accumulibacter*’の挙動を図 4.7 に示す。なお、‘*Accumulibacter*’の定量結果は図 3.14、*M. phosphovorius* の結果は図 4.4 で示したものと同一である。また、R5 および R6 におけるリン除去性能は、図 4.4 に示した汚泥のリン含有率から判断した。

R5 においてはリン除去が最も良好な 61 日目において *M. phosphovorius* の存在量が最も増加しているのに対して、‘*Accumulibacter*’は逆に減少していた。R6 においては、リン除去が良好な 67 日にて、*M. phosphovorius*、‘*Accumulibacter*’はともにその存在量が増加していたが、162 日目のリン除去の復活時期においては‘*Accumulibacter*’が微増したのに対して、*M. phosphovorius* は 5 倍程度も増加していた。このように、一部のリアクター(酵母エキス、ペプトンまたはグルタミン酸を炭素源として用いたリアクター)では、‘*Accumulibacter*’よりも *M. phosphovorius* のほうが、リン除去状態の変化に対応した挙動を示していることがわかった。しかしながら、これらのリアクター中の *M. phosphovorius* の 16S rRNA 遺伝子のコピー数は多くても 2.6×10^3 copies/ng DNA であった。すなわち、PAOs に対する割合は最大でも数%程度であったと考えられる。また、R7、R8 および R9 においては、*M. phosphovorius* はほとんど存在していなかったのに対して、‘*Accumulibacter*’は汚泥のリン含有率と類似した

挙動を示していた（福島、2003）。

このように、実下水処理場および実験室規模 EBPR リアクターにおける *M. phosphovor* のリン除去への寄与は非常に小さく、主要な PAOs ではないと考えられた。但し、一部の炭素源を用いたリアクターにおいては、存在量は少ないものの、リン除去と類似した挙動を示しており、小さいながらもリン除去に貢献している可能性が考えられた。

R5 (酵母エキス・ペプトン・酢酸)



R6 (グルタミン酸・酵母エキス)

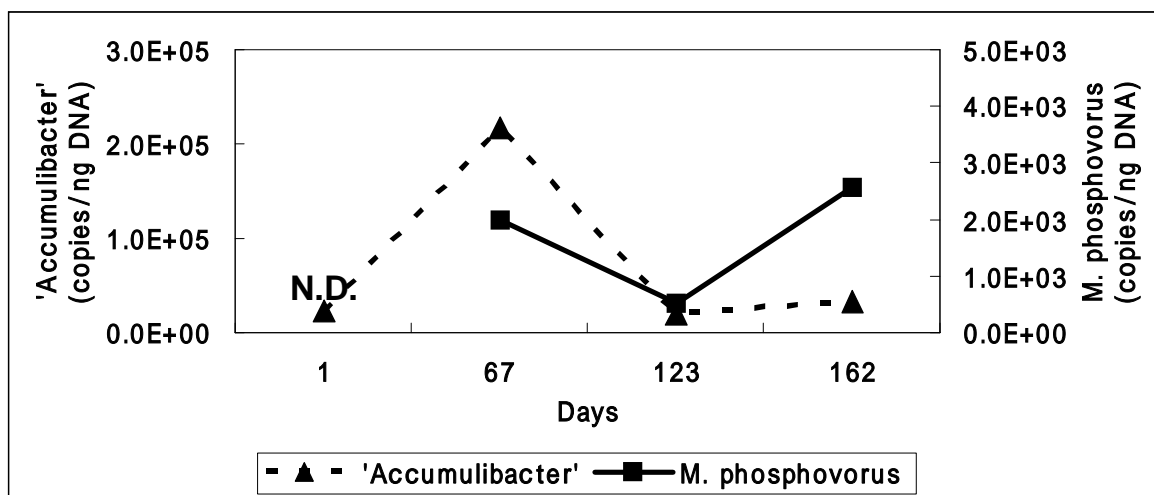


図 4.7 R5 および R6 における *M. phosphovor* および 'Accumulibacter' の定量結果
(N.D. は検出下限以下)

4.5 まとめ

本章では定量 PCR 法を用いて *M. phosphovorius* の 16S rRNA 遺伝子を定量する手法を確立し、活性汚泥試料への適用性を検討した。本研究で得られた成果を以下に示す。

- QPrimer PCR 法を用いた定量を検討した結果、 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^7$ copies/reaction の範囲において良好な検量線を作成することができた。
- DNA 抽出を含む定量 PCR の実験行程によっておこる定量値のばらつきは 12% であり、細胞壁の厚いグラム陽性細菌においても正確な定量をおこなうことができた。
- 実験室規模 EBPR リアクターにおける挙動を評価し、リン除去状態と比較した結果、R5 (酵母エキス, ペプトンおよび酢酸) R6 (グルタミン酸および酵母エキス) および R9 (グルコース) においてリン除去と類似した変動を示していた。
- 処理方式の異なる実下水処理場における挙動を評価した結果、処理方式による有意な違いは認められなかった。
- 実験室規模 EBPR リアクターおよび実下水処理場汚泥における *M. phosphovorius* のリン除去への寄与を推定した結果、最大でも PAOs の数%のポピュレーションでしかなく、リン除去への寄与は小さいと考えられた。

このように、QPrimer PCR 法を用いた定量 PCR 法によって、これまで定量困難であった *M. phosphovorius* を定量する手法を確立することができ、*M. phosphovorius* のリン除去への寄与を推定することができた。なお、本章の成果の一部は、福島 (2006) にて報告されている。

5 章 *Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphatis*’ の好気培養における増殖条件の探索と分離の試み

5 章目次

5.1 背景と目的

5.2 実験方法

5.2.1 活性汚泥試料

5.2.2 定量 PCR 法

5.2.3 Percoll を用いた密度分離法

5.2.4 プレート培養法での増殖条件の探索

5.2.5 液体培養法での増殖条件の探索

5.2.6 分離方法

5.3 実験結果

5.3.1 全細菌に対する定量 PCR 法の検討

5.3.2 ‘*Accumulibacter*’ の濃縮

5.3.3 プレート培養法での増殖条件の探索

5.3.4 液体培養法での増殖条件の探索

5.3.5 分離の試み

5.4 考察

5.4.1 全細菌に対する定量 PCR 法の検討

5.4.2 ‘*Accumulibacter*’ の濃縮

5.4.3 プレート培養法での増殖条件の探索

5.4.4 液体培養法での増殖条件の探索

5.4.5 分離の試み

5.5 まとめ

5.1 背景と目的

2 章で述べたように、これまでの研究によって、'Accumulibacter' が EBPR プロセスにおける主要な PAOs であることが明らかになってきた。EBPR プロセスのリン除去性能をより高めるためには、'Accumulibacter' の機能や代謝といった詳細な情報を得ていくことが重要となる。近年、'Accumulibacter' を集積させた実験室規模 EBPR リアクターの汚泥を用いたメタゲノム解析によって、'Accumulibacter' の全ゲノム配列が解読された (Martin et al., 2006)。それらの情報から、これまで知られていなかった機能や代謝を推測することができるようになった。

その一方、分離をすることの意義は依然として存在する。遺伝子情報からの代謝や機能の推測は、あくまでも推測にすぎず、より確実な情報を得るためには 'Accumulibacter' の分離が必要不可欠である。分離株を得ることができれば、より詳細に機能、代謝を把握することが可能となる。また、分離株を担体のような形で直接処理施設に投入するといったような工業的利用も可能となる。しかしながら、これまで多くの研究者が 'Accumulibacter' の分離を目指しているにも関わらず、成功例はいまだない。

そこで本章では、'Accumulibacter' を分離することを目指し、次のようなことを試みた。まずプレート培養および液体培養により、好気条件下での 'Accumulibacter' の増殖の有無を調べた。'Accumulibacter' は嫌気好気条件下で増殖することは知られているが、好気条件のみでの培養で増殖するかどうか、未だ知られていない。その一方、嫌気好気式活性汚泥は好気条件下でも酢酸を摂取し PHA を合成する。さらに、MAR-FISH 法を用いた検討によって、'Accumulibacter' が好気条件下で有機物を摂取することが確認されている (Kong et al., 2004)。このような背景から、好気培養において、'Accumulibacter' の増殖条件を探索し、分離を目指すこととした。もしも好気条件下で 'Accumulibacter' が増殖するのであれば、分離を試みるにあたり、技術的に煩雑な嫌気好気条件ではなく、好気条件下で分離できる可能性がある、ということにつながる。

従来、混合系内で増殖する特定の細菌の増殖の有無を確認するのは容易ではなかった。しかし、ここでは 3 章において開発した定量 PCR 法を用いることができる。さまざまな条件で活性汚泥を短期間 (数日 ~ 数週間) 培養し、'Accumulibacter' の増殖の有無を定量 PCR 法によって確認した。さらに、検討した中でもっとも 'Accumulibacter' の増殖に適した培養条件を用いて、液体培地を用いて分離を試みた。

また、分離の際に用いる活性汚泥試料は 'Accumulibacter' の存在割合ができるだけ高い方が望ましい。そこで、Percoll を用いた密度分離法を応用することとした。密度分離法とは、浮遊密度が異なる細菌を Percoll 溶液のような比重の高い溶液に懸濁させることで、分離する方法である。'Accumulibacter' を含め PAOs は PHA もしくはポリリン酸を蓄積することで、高い浮遊密度をもつため、密度分離法で分離することが可能であると考えられている (Zilles et al., 2002)。本章では、Percoll を用いた密度分離法で 'Accumulibacter' を濃縮可能であるか、適切な Percoll 濃度は何% か、について定量 PCR 法を用いて検討した。

5.2 実験方法

5.2.1 活性汚泥試料

活性汚泥試料は酢酸を主たる炭素源とした実験室規模 EBPR リアクターから採取した。採取した汚泥は保存せず、採取後すぐに 5.2.3 ~ 5.2.6 に述べる試験に供した。

5.2.2 定量 PCR 法

‘Accumulibacter’および全細菌の定量を、定量 PCR 法を用いておこなった。全細菌の定量は次の理由でおこなった。全細菌に対する‘Accumulibacter’の割合を大まかに把握したかったため、液体培養の試験 (5.2.5 参照) で‘Accumulibacter’以外の細菌の増殖を確認するため、である。‘Accumulibacter’の定量 PCR 法については、3 章にて確立した手法のアニーリング温度を変更した。全細菌の定量 PCR 法は、本章にて PCR 条件を検討し、確立した。

5.2.2.1 DNA サンプル

‘Accumulibacter’および全細菌の定量 PCR で用いた検量線用 DNA は、‘Accumulibacter’の 16S rRNA 遺伝子のクローンから調製した。調製方法は 3.2.3.1 に示したとおりである。

各汚泥試料からの DNA 抽出は MORA-EXTRACT (極東製薬工業) を用いた。実験操作は基本的に同社のプロトコルにしたがったが、熱処理は全て 70 °C でおこなった。抽出した DNA サンプルは滅菌した超純水に溶解した後、分光光度計 (NanoDrop ND-1000、NanoDrop Technologies) を用いて DNA 濃度を測定し、0.5ng/μL になるように希釈した。

5.2.2.2 ‘Accumulibacter’の定量 PCR 法の修正

‘Accumulibacter’の定量 PCR 法は、基本的に 3 章にて確立したものをを用いた。3 章に述べたように、手法の開発途上では、PCR 反応が特異的におこなわれていたことを PCR 産物の塩基配列の解読によって確認していた。しかしながら、5.3.3.1 に述べるように、本章の検討では、フォワード、リバースプライマーとのミスマッチの数が 2 または 3 塩基である細菌の 16S rRNA 遺伝子も増幅されてしまうことがわかった。そのため、再度反応の特異性を高めるために検討をおこない、3 章で確立した条件を基本とし、アニーリングの温度と時間を 66 °C、15 秒に変更した。

ここで用いた条件を以下に示す。

・PCR 反応液

1.0U KOD -plus-, 1×PCR バッファー、0.2mM (each) dNTP、0.3μM (each) プライマー、1mM MgSO₄、25μg/μL BSA、25μL/μL DMSO、200pL/μL SYBR Green および DNA サンプル (5ng)

・PCR 条件

94 °C 5 分 (Hot Start)

94 °C 15 秒 (変性) \ 66 °C 15 秒 (アニーリング) \ 68 °C 15 秒 (伸長); 35 サイクル

なお、アニーリング条件変更についての検討内容は 5.3.3.1 にて述べる。

5.2.2.3 全細菌の定量 PCR 法の確立

全細菌に対する定量 PCR 法は、Hiraishi et al. (2005)、Skovhus et al. (2004) および Kaetzke et al. (2005) によって報告されている条件をそれぞれ検討した。なお、これらの報告ではインターカレーター法を用いている。以下に検討した条件をまとめる。最終的に決定した条件については 5.3.1 にて示す。

・PCR プライマー

各プライマーの配列を表 5.1 に示す。Hiraishi et al. (2005) では 357f および 518r を、Skovhus et al. (2004) では 357f および 907rC を、Kaetzke et al. (2005) では 509f および 784r を用いている。なお、907rC プライマーは 907r プライマー (Lane, 1991) の混合塩基部分 (表 5.1 にて下線のある塩基) を C のみに代えた配列である。

表 5.1 全細菌を対象としたプライマー

Primer	Sequence (5' 3')
357f	CCTACGGGAGGCAGCAG
518r	ATTACCGCGGCTGCTGG
907rC	CCGTCAATTC <u>C</u> TTTGAGTTT
509f	ACTACGTGCCAGCAGCC
784r	GGACTACCAGGGTATCTAATCC

・PCR 反応液の組成

5.2.2.2 に示した組成または、マグネシウムおよびプライマー濃度を 3.0mM および 0.5 μ M に変更した組成についてそれぞれ検討した。

各文献の条件においては、DNA polymerase の異なる PCR 反応液を用いていたが、ここでは、KOD -plus- に統一した。但し、Skovhus et al. (2004) および Kaetzke et al. (2005) では、マグネシウム濃度 (1.0→3.0mM) およびプライマー濃度 (0.3→0.5 μ M) がそれぞれ高濃度に設定されていたため、マグネシウムおよびプライマー濃度を変更した組成においても検討することとした。

・PCR 条件

以下のとおり、伸長以外の PCR 条件は各文献に記載されている条件を基本的にそのまま用いた。伸長は 68 に設定した。これは、DNA polymerase として、KOD -plus- を用いたためである。なお、文献で用いられていた DNA polymerase は、LightCycler FastStart DNA Master SYBR GREEN I kit (Roche) (Hiraishi et al., 2005、Skovhus et al., 2004) または Euro-Taq DNA polymerase (EuroClone) (Kaetzke et al., 2005) であった。

Hiraishi et al. (2005):

95 15 秒 (変性) 60 10 秒 (アニーリング) 68 20 秒 (伸長) 35 サイクル

Skovhus et al. (2004):

94 10 秒 (変性) 57 10 秒 (アニーリング) 68 20 秒 (伸長) 84 6 秒 30 サイクル

Kaetzke et al. (2005):

94 10 秒 (変性) 60 20 秒 (アニーリング) 68 20 秒 (伸長) 86 15 秒 35 サイクル

Skovhus et al. (2004) および Kaetzke et al. (2005) では、伸長ステップの後、84 もしくは 86 で定温放置するステップを設け、伸長の最後ではなくこれらのステップの最後に蛍光を検出している。これは、温度を上げて非特異的な PCR 産物を解離させた状態で定量するためである。このため、Skovhus et al. (2004) および Kaetzke et al. (2005) の条件を検討する際には報告にならない、伸長ステップ後に定温放置のステップを設けた。

5.2.3 Percoll を用いた密度分離法

Percoll を用いた密度分離法を用いて汚泥中の 'Accumulibacter' を濃縮可能であるかを検討した。濃縮の有無は、'Accumulibacter' および全細菌に対する定量 PCR 法を用いて、全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合を算出することで確認した。

5.2.3.1 Percoll を用いた密度分離

ポリリン酸もしくは PHA を蓄積した 'Accumulibacter' を集積するため、Percoll を用いた密度分離法を検討した。方法は押木 (2006) に従った。

最適な Percoll 濃度を検討するために、10 ~ 約 70% に調製した Percoll 溶液を作製した。各濃度における Percoll 溶液の組成を表 5.2 に示す。

表 5.2 各濃度の Percoll 溶液の組成

Percoll濃度	10%	20%	30%	40%	50%	60%	約70%
Percoll (μL)	150	300	450	600	750	900	1050
1.5M NaCl (μL)	150	150	150	150	150	150	150
分散済み汚泥懸濁液 (μL)	380	380	380	380	380	380	380
超純水 (μL)	820	670	520	370	220	70	-
合計 (μL)	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1580
密度溶液の比重 (g/cm^3)	1.019	1.032	1.045	1.058	1.071	1.084	1.091

以下に示した密度分離の実験操作を各濃度の Percoll 溶液を用いておこなった。

1. 表 5.2 で汚泥懸濁液を除いた組成の Percoll 溶液を各濃度につき、3 連で調製し、4 日に保存。なお、各 Percoll 溶液は、1.5mL チューブを用いて調製する。
2. 実験室規模 EBPR リアクターから、嫌気もしくは好気終了時の汚泥試料を 45mL 採取。
3. 汚泥試料を約 2000g で 5 分間遠心した後、上澄みを取り除き、10mL 程度の TE buffer を加える。
4. 超音波分散 (4W、5 分程度) をおこない、Percoll 溶液の入ったチューブに 380 μL ずつ分注し、反転混和する。

5. 分散済み汚泥懸濁液を加えた Percoll 溶液を 4000g で 5 分間遠心する。(各 Percoll 濃度に対して 3 連でおこなう。)

6. 上層の汚泥を可能な限り取り除き、各 Percoll 濃度 3 連で密度分離した汚泥を 1 つのチューブにまとめて、100 μ L 程度の PBS バッファーに懸濁させる。

なお、3.の操作では MLSS が 5000mg/L 以上に濃縮されるように TE buffer の量を適宜調整した。また、嫌気終了時の汚泥は PHA を高濃度に蓄積している汚泥、好気終了時の汚泥はポリリン酸を高濃度に蓄積している汚泥とした。

5.2.3.2 密度分離による 'Accumulibacter' 濃縮の確認

Percoll を用いた密度分離によって 'Accumulibacter' が濃縮されているかを確認した。各濃度の Percoll 溶液によって分離された汚泥および分離前の汚泥における、'Accumulibacter' および全細菌の 16S rRNA 遺伝子のコピー数を定量 PCR 法によって定量した。それらの定量値から検出された 'Accumulibacter' の 16S rRNA 遺伝子のコピー数の、全細菌の 16S rRNA 遺伝子のコピー数に対する割合を算出した。簡単のため、以降、この比を「全細菌のコピー数に対する 'Accumulibacter' のコピー数に対する割合」、さらに簡単に、「全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合」と呼ぶ。この割合をもとに濃縮されているかを評価した。

5.2.4 プレート培養法での増殖条件の探索

プレート培養における 'Accumulibacter' の好気条件下での増殖条件を探索した。各条件において培養したプレート上のコロニー全てを、プレートウォッシュ法によって回収した。回収したコロニーから DNA を抽出し、定量 PCR 法によって 'Accumulibacter' の存在の有無を確認した。

5.2.4.1 プレート培養

汚泥試料

実験室規模 EBPR リアクターから、嫌気もしくは好気終了時の汚泥を採取した。採取した汚泥は、適宜希釈して用いた。また、一部のプレート培養では、Percoll を用いた密度分離によって、'Accumulibacter' を濃縮した汚泥を適宜希釈して用いた。

培地組成

支持体は Agar もしくは Gellan gum を用い、それぞれ 1.5% とした。炭素源は、酢酸、プロピオン酸、グルコース、アスパラギン酸もしくはグルタミン酸を 100mgC/L となるように調製した。

そのほかの培地成分については、塩化カルシウム二水和物 ; 100mg/L、塩化マグネシウム六水和物 ; 90.8mg/L、塩化カリウム ; 42.0mg/L、塩化アンモニウム ; 17.6mg/L、硫酸アンモニウム ; 21.6mg/L、リン酸水素二カリウム ; 18.0mg/L およびリン酸二水素カリウム 14.0mg/L

とした。これらは、塩化カルシウム二水和物を除いて、3 章に記載されている実験室規模 EBPR リアクターの 2 倍濃度の組成である。塩化カルシウムについては、Gellan gum を固化させるために 2 価のカチオンが十分量必要であることから、添加量を増やした。また、アリルチオ尿素は入れなかった。

上述の組成の培地は RO 水にて調製し、うすい塩酸もしくは水酸化ナトリウム溶液を用いて pH を 6、7、8、9 もしくは 10 に調整した。その後、オートクレーブで滅菌処理をおこない、滅菌シャーレに適量注いで固化させて、プレートを作製した。

一部の培地については、上述の 2 倍濃度の組成になるように RO 水を用いて調製、オートクレーブ滅菌した後に、ろ過滅菌し、暖めておいたリアクターの放流水を 1 : 1 になるように混合したものをを用いた。

培養

クリーンベンチ内にて、 $10^3 \sim 10^5$ 倍に希釈した汚泥試料 200 μ L をプレートに播種し、スプレッターで均一になるように広げた。播種したプレートは室温（20～26℃）好気条件下にて 2～4 週間程度培養した。

5.2.4.2 プレートウォッシュ法

以下に、プレートウォッシュ法の実験操作を示す。基本的には Stevenson et al. (2004)の方法に従ったが、若干の変更を加えた。

1. 培養後のプレートに 2mL の滅菌超純水を添加し、スプレッターを用いてコロニーを懸濁させる。
2. 先端を切って口を大きくしたピペットチップでコロニー懸濁液を回収する。
3. MORA-EXTRACT を用いて DNA を抽出する。

Stevenson et al.の報告では 1. のステップでガラスビーズ含有の溶液を添加して、コロニーを回収しているが、本研究では滅菌超純水を添加し、スプレッターで根気よくコロニーをはがした。

最後に、抽出した DNA サンプルに対して 'Accumulibacter' の定量 PCR 法をおこない、'Accumulibacter' 存在の有無を確認した。

5.2.5 液体培養法での増殖条件の探索

好気・液体培養における増殖条件の探索をおこなった。各種条件にて汚泥を液体培養し、培養前後における 'Accumulibacter' を定量 PCR 法によって定量することで、最も 'Accumulibacter' が増殖する条件を探索した。検討した培養条件は以下の通りである。

炭素源：酢酸、プロピオン酸、乳酸、グルコースおよびグルタミン酸

pH：6.0、7.0、8.0、9.0 および 10.0

温度：10、15、20、24、30 および 37

これら各条件および炭素源を添加しない陰性対照において、活性汚泥を 48 時間、好氣的に培養した。培養前後において 'Accumulibacter' のコピー数が最も増えている条件に適した増殖条件とした。なお、各条件は 3 連で試験をおこない、その平均値を用いて評価した。

5.2.5.1 汚泥試料

汚泥試料は飢餓状態の汚泥を用いるため、実験室規模 EBPR リアクターから好気終了時の汚泥を採取し、MLSS が 1000mg/L になるように希釈した。

5.2.5.2 液体培地の組成

炭素源については、酢酸、プロピオン酸、乳酸、グルコース、およびグルタミン酸を用いた。炭素源の濃度は培養期間内にぎりぎり摂取しきれない濃度を検討し、500mgC/L とした。炭素源の濃度の検討については、結果 5.3.4.1 にて述べる。

そのほかの培地成分については、塩化カルシウム二水和物；17.6mg/L、塩化マグネシウム六水和物；181.6mg/L、塩化カリウム；84.0mg/L、塩化アンモニウム；35.2mg/L、硫酸アンモニウム；42.2mg/L、リン酸水素二カリウム；36.0mg/L およびリン酸二水素カリウム 28.0mg/L とした。

液体培地 9mL に対して 1mL の汚泥液を加えておこなったので、培地（汚泥懸濁液を加える前の培地）は、上述の 10/9 倍の濃度になるように調製した。培地の調製には超純水を用い、うすい塩酸もしくは水酸化ナトリウム溶液を用いて各々の pH に調整した。また陰性対照として、炭素源を添加しない培地を別途調製した。

5.2.5.3 液体培養

50mL ポリプロピレン遠沈管に MLSS を 1000mg/L になるように希釈した汚泥 1mL と、液体培地を 9mL 添加し、シリコセンでふたをした。すなわち、培養時の MLSS は 100mg/L となる。またこの際、試験に供した汚泥を 1mL 採取し、-80℃ にて保存した。この汚泥と培地を添加した遠沈管を振とう器に配置し、150rpm で 48 時間振とうした。

培養後、培養した汚泥の pH を測定した。測定後、3500rpm で 5 分間遠心し、上澄みを取り除き、汚泥を全量回収した。また、上澄みは水質分析試料とした。

5.2.5.4 水質分析

培養後の上澄みを 0.45 μ m のシリンジフィルターでろ過し、TOC-V (SHIMADZU) を用いて炭素源の摂取量を把握した。また、グルコースを炭素源として培養した上澄みにおいては、CIA (Capillary Ion Analyzer、Waters) を用いて有機酸が生成されているかを確認した。

5.2.5.5 'Accumulibacter' の定量

培養前および培養後の汚泥から MORA-EXTRACT を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を用いて、'Accumulibacter' を定量 PCR 法によって定量した。また、同一の DNA を用いて全細菌を定量 PCR 法によって定量した。

5.2.6 分離方法

5.2.6.1 プレート培養法における分離

まず、5.2.4 の検討にて得られた '*Accumulibacter*' が増殖する培養条件を用いて、プレート培養をおこなった。2~4 週間の培養の後、コロニーをピックアップし、新しいプレートに画線播種した。この際、コロニーの一部を滅菌超純水に懸濁し、定量 PCR 法によって PCR 増幅が確認できたコロニーのみを選択的に培養した。この操作を数回繰り返し、目視上、単一形態のコロニーのみに分離できた段階で、FISH 法もしくは定量 PCR 法によって '*Accumulibacter*' が否かを確認した。定量 PCR 法は、単一形態のコロニーとなったプレートから全てのコロニーをプレートウォッシュ法で回収し、DNA を抽出した試料もしくは、滅菌超純水にコロニーを懸濁させた溶液を用いておこなった。

さらに、確実に '*Accumulibacter*' であることを確認するため、FISH 法もしくは定量 PCR 法によって陽性となった分離株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列全長を解読した。塩基配列の解読はバイオマトリックス社に委託した。なお、シーケンシング反応には、表 5.3 に示すプライマーをそれぞれ用いた。

表 5.3 シーケンシング反応に用いたプライマー

Primer	Sequence (5' 3')
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
357f	CCTACGGGAGGCAGCAG
517f	GCCAGCAGCCGCCGTAA
1099f	GYAACGAGCGCAACCC
534r	ATTACCGCGGCTGCTGG
907r	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT
1114r	GGGTTGCGCTCGTTTC
1492r	TACGGYTACCTTGTTACGACTT

5.2.6.2 液体培養法における分離

5.2.5 の検討にて得られた、'*Accumulibacter*' の増殖に適した条件を用いて、分離をおこなった。但し培地の調製では、実験室規模 EBPR リアクターの放流水を溶媒として用いた。調製後の培地は pH を調整し、0.2 μ m のフィルターでろ過滅菌した。この培地を、滅菌済みの 20mL の試験管もしくは 50mL ポリプロピレン遠沈管に 5~10mL 程度分注した。

活性汚泥試料は Percoll 溶液を用いた密度分離によって '*Accumulibacter*' を濃縮させた汚泥を用いた。各試験管におおよそ 0.1~1cell が入るように希釈した汚泥を播種し、150rpm で 1 ヶ月以上好氣的に培養した。

懸濁が認められた試料に対して、FISH 法もしくは定量 PCR 法によって '*Accumulibacter*' が否かを確認した。

5.3 実験結果

5.3.1 全細菌に対する定量 PCR 法の検討

5.3.1.1 PCR 条件の検討

5.2.2.3 に示した PCR 条件 (PCR サイクル、プライマーおよび反応液) を用いて、全細菌に対する定量 PCR 法の適用性を検討した。

各条件において検討した結果、図 5.1 に示すとおり、357f および 907rC プライマーを用いた系で 1 本のピークのみが確認され、プライマーダイマー等の生成は無かった。PCR 反応液についてはいずれの組成においても良好な解離曲線を作成できたが、プライマー (0.3→0.5 μ M) およびマグネシウム (1.0→3.0mM) を高濃度にした反応液の方が、PCR 増幅の立ち上がりが早かった。

509f および 784r プライマーを用いた系においても良好な検量線は作成できたが、357f および 907rC プライマーを用いた系に比べて PCR 増幅の立ち上がりが遅かった。357f および 518r プライマーを用いた系においては PCR 増幅が確認できなかった。

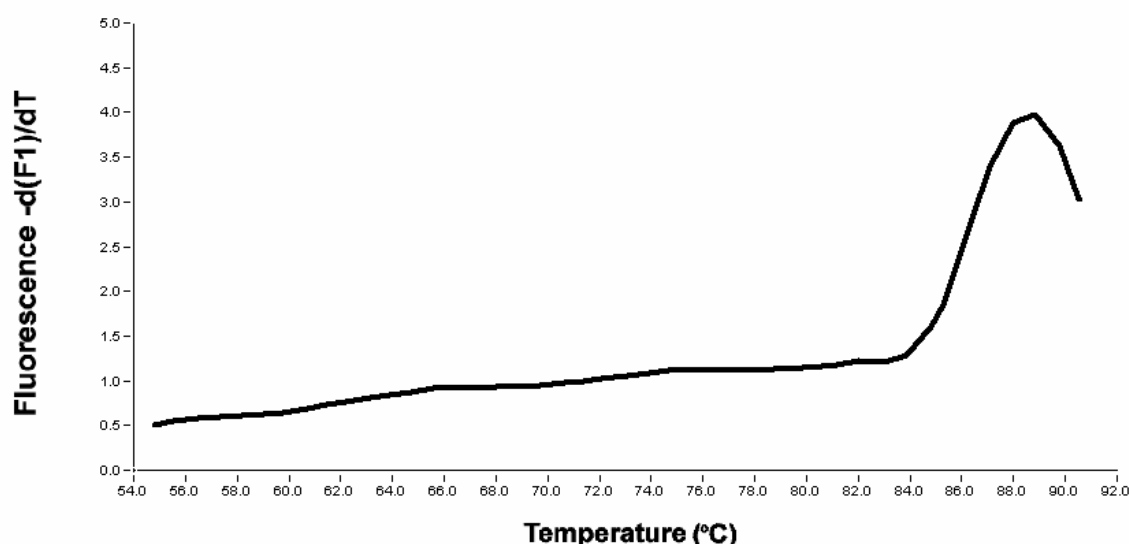


図 5.1 357f および 907rC をプライマーとした定量 PCR による解離曲線 (活性汚泥試料)

これらの結果に基づき、全細菌に対する定量 PCR 法は以下の条件でおこなうこととした。

PCR 条件 : 94 5 分 (Hot Start)

94 10 秒 (変性) 57 10 秒 (アニーリング) 68 20 秒 (伸長)

84 6 秒 30 サイクル

PCR 反応液 : 1.0U KOD -plus-, 1×PCR バッファー、0.2mM (each) dNTP、0.5 μ M (each) プライマー (357f および 907rC) 3mM MgSO₄、25 μ g/ μ L BSA、25 μ L/ μ L DMSO、200pL/ μ L SYBR Green および DNA サンプル (5ng)

5.3.1.2 定量性および再現性の確認

5.3.1.1 において決定した条件における定量性および再現性を確認した。

定量性は 'Accumulibacter' の検量線用 DNA を用いて PCR をおこない、検量線を作成して検討した。図 5.2 に示すとおり、 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^8$ copies/reaction において良好な検量線が作成できた ($R^2=0.9998$)。 1.0×10^3 copies/reaction の検量線用 DNA については 30 サイクル内では Ct 値を決定することができなかった。

続いて、活性汚泥試料から抽出した同一の DNA を 6 回の繰り返しで分析し、変動係数を求めた結果、7.1%であった。3.3.1 に示したとおり、'Accumulibacter' の定量 PCR 法における変動係数は 7.5% (n=5) であったことから、同程度の再現性であると考えられた。

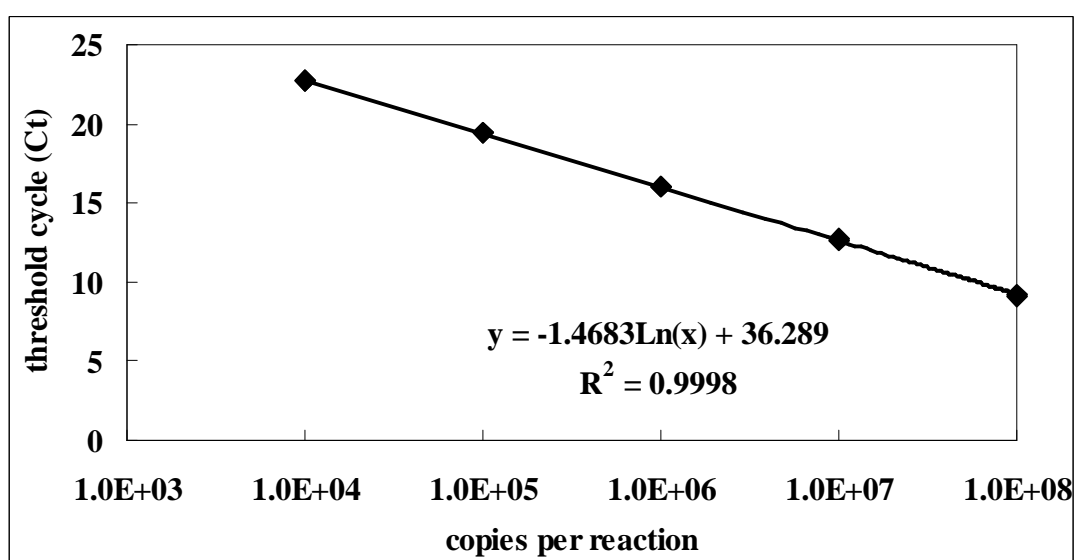


図 5.2 全細菌を対象とした定量 PCR による検量線

5.3.2 ‘*Accumulibacter*’ の濃縮

実験室規模 EBPR リアクターの活性汚泥試料について、Percoll を用いた密度分離をおこない、‘*Accumulibacter*’を濃縮することを試みた。嫌気および好気終了時の汚泥試料をそれぞれ 3 試料ずつ採取した。汚泥試料は 6 章にて記す R20 または R21 から採取したが、これらのリアクターの運転条件は異なる。また、同じリアクターでも異なる日に汚泥を採取した。なお、‘*Accumulibacter*’の定量 PCR 法はアニーリング条件を 66 °C、15 秒に変更した条件を用いた。

図 5.3 に Percoll 濃度 20 ~ 約 70% を用いて分離した汚泥中の、全細菌のコピー数に対する ‘*Accumulibacter*’ のコピー数の割合を示す。Percoll 濃度 20% で分離した汚泥において ‘*Accumulibacter*’ は 3.3 ~ 6.9% であったが、濃い Percoll 濃度で分離するにつれ ‘*Accumulibacter*’ の割合が増加し、Percoll 濃度約 70% においては、23 ~ 74% にまで増加した。なお、Percoll 濃度 10 および 20% においては Percoll 分離後に、上層に残る汚泥が目視で確認できなかったため、Percoll 濃度 10 および 20% では ‘*Accumulibacter*’ を濃縮することはできないと判断した。

図 5.4 に各 Percoll 濃度における ‘*Accumulibacter*’ の濃縮倍率を示す。濃縮倍率は、Percoll 濃度 20% にて分離した汚泥における ‘*Accumulibacter*’ の割合を 1 として算出した。Percoll 濃度約 70% においては 3.7 ~ 22.4 倍にまで ‘*Accumulibacter*’ の割合が増加していた。嫌気終了時の汚泥 3 試料における濃縮倍率の平均値は 11.2 倍であり、好気終了時における汚泥の平均値、7.5 倍よりも高い結果となった。しかし、これらの差はばらつきが大きく、t 検定をおこなったところその差は有意ではなかった。

このように、約 70% の Percoll 溶液を用いて、嫌気および好気終了時の活性汚泥試料における ‘*Accumulibacter*’ を濃縮できることがわかった。

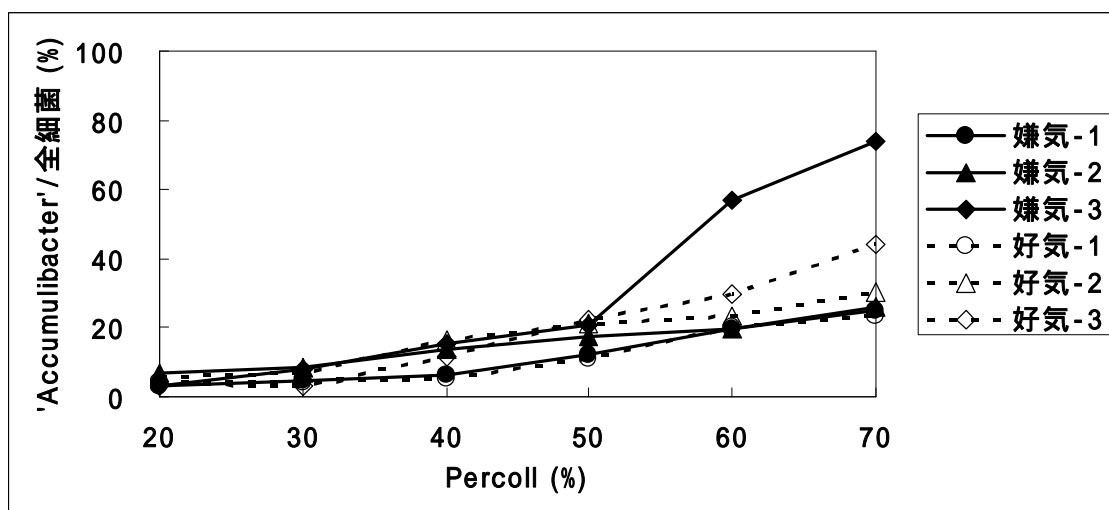


図 5.3 各 Percoll 濃度によって分離した汚泥中の
全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合

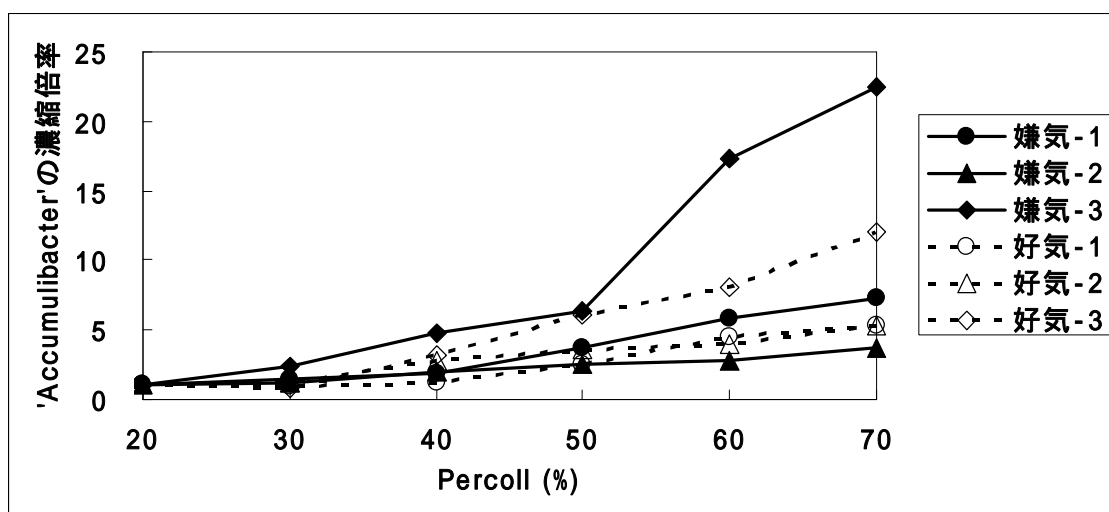


図 5.4 各 Percoll 濃度によって分離した汚泥における
'Accumulibacter' の濃縮倍率
(Pecoll 濃度 20%における濃縮倍率を 1 とする)

5.3.3 プレート培養法での増殖条件の探索

5.2.2.2 で記したように、本章では 'Accumulibacter' の増殖条件を検討する過程で、3 章で決定した定量 PCR 法では十分に特異的な増幅ができないことが判明した。本項 5.3.3.1 の後半で述べるが、結果的には、アニーリングの条件を 57 、20 秒から 66 、15 秒に変更することでその問題を解決することができた。

5.3.3.1 では、定量 PCR 条件を変更する前の検討結果について述べる。一時は 'Accumulibacter' が効果的に増殖する条件を見つけることができたかもしれないと思われたが、増殖した細菌の遺伝子塩基配列を詳しく調べたところ、'Accumulibacter' に近縁であるが、'Accumulibacter' とは異なる細菌が増殖していた。そこで、定量 PCR の条件を改良し、この近縁細菌と 'Accumulibacter' とを明確に区別できるようにした。

5.3.3.2 では、改良した定量 PCR 法を用いて、'Accumulibacter' の増殖条件を再度検討した。

5.3.3.1 定量 PCR 条件を変更する前における検討

ここでは、5.3.3 の冒頭に述べたように、'Accumulibacter' に対する定量 PCR 法の条件を最適化する以前の結果について述べる。

プレートウォッシュ法による増殖条件の探索

最初に培地の pH および播種する汚泥の希釈倍率について、検討をおこなった。培地は酢酸 (100mgC/L) を唯一の炭素源とし、支持体として Gellan gum を用いた。その他の培地組成は 5.2.4.1 にて述べたものにしがった。Gellan gum を除く培地成分を RO 水に溶解した後、pH を 6、7、8、9 および 10 に調整した。pH 調整後に Gellan gum を加え、オートクレーブ処理をおこない、プレートを作成した。作成したプレートに 10^3 、 10^4 および 10^5 倍に希釈した汚泥を播種し、2 週間培養した。なお、播種した汚泥は、実験室規模 EBPR リアクターから好気終了時に採取し、滅菌した生理食塩水で希釈した。

図 5.5 に各 pH および希釈倍率の汚泥を用いて 2 週間培養したプレートにおける 'Accumulibacter' の定量結果を示す。この結果、培地の pH を 10 に設定し、 10^4 倍に希釈した汚泥を播種したプレートが、最も高い定量値を示した。なお、 10^5 倍に希釈した汚泥試料を用いた場合、2 週間の培養後にほとんどコロニーを確認することができなかった。

続いて、支持体および炭素源の違いによる影響について検討した。支持体は Agar または Gellan gum を用いた。検討した炭素源は、酢酸、プロピオン酸、グルコース、グルタミン酸およびアスパラギン酸である。そのほかの培地組成は 5.2.4.1 に示したとおりであり、pH は 10 に調整し、 10^4 倍に希釈した汚泥試料を播種した。

2 週間の培養後、各プレートから抽出した DNA を 'Accumulibacter' の定量 PCR 法を用いて定量した結果、Gellan gum を支持体とした培地では全ての炭素源において同程度の定量値が得られた(データ示さず)。一方、Agar を支持体とした培地では全て定量下限以下であった。

これらの結果を踏まえ、Gellan gum を支持体とし、リアクターと同じ酢酸を炭素源として

分離を試みることにした。

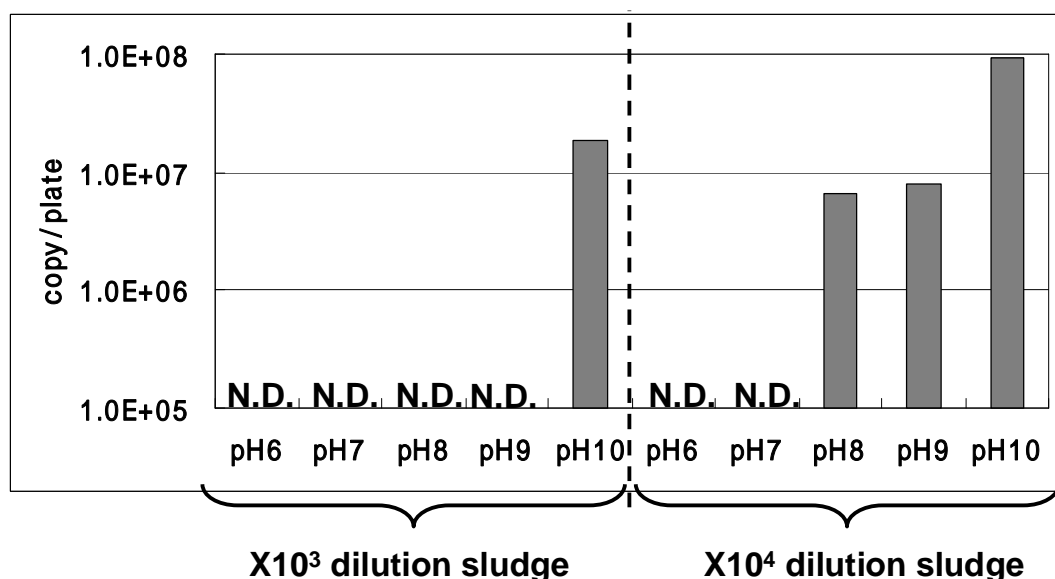


図 5.5 各 pH および汚泥の希釈倍率によって培養したプレートにおける ‘*Accumulibacter*’ の定量 PCR 法による定量結果

プレート培養による ‘*Accumulibacter*’ の分離

上述で得られた条件で分離を試みた。Gellan gum を支持体とし、酢酸を炭素源として分離をおこなった。培地の pH は 10 に調整し、 10^4 倍に希釈した汚泥を播種した。この条件にて分離された分離株について、FISH 法および定量 PCR 法によって ‘*Accumulibacter*’ が否かを確認した。

数回の分離の後、60 株の分離株が得られ、FISH 法および定量 PCR 法の両方で陽性となった分離株は 3 株であった。FISH 法による顕微鏡観察の結果を図 5.6 に示す。図のとおり、FISH で陰性となった株と比べて明らかにプローブがハイブリダイズしていることがわかる。

この 3 種の株について表 5.3 に示したプライマーを用いて、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の全長を解読し、2 株については塩基配列を解読することができた。これら 2 株について、得られた塩基配列（約 1400bp）から DDBJ の Blast ツールを用いて近縁種を推定した。この結果、‘*Accumulibacter*’（Uncultured beta proteobacterium SBRA220、AF204244）との相同性は 93.7 および 81.5% と低く、分離した 2 株は ‘*Accumulibacter*’ ではないと考えられた。両株の近縁種を DDBJ で探索したところ、*Dechloromonas* 属（*Dechloromonas* sp. EMB 50、DQ413149、相同性：99%）および *Zoogloea* 属（*Zoogloea ramigera*, X74915、相同性：98%）に近縁な種であることがわかった。このように、‘*Accumulibacter*’ を分離することはできなかった。さらに、3 章で確立した定量 PCR 法の条件では、‘*Accumulibacter*’ ではなく、*Dechloromonas* 属および *Zoogloea* 属に近縁な種の 16S rRNA 遺伝子も増幅することが判明し、非特異的な PCR 増幅をしてしまうことが明らかになった。

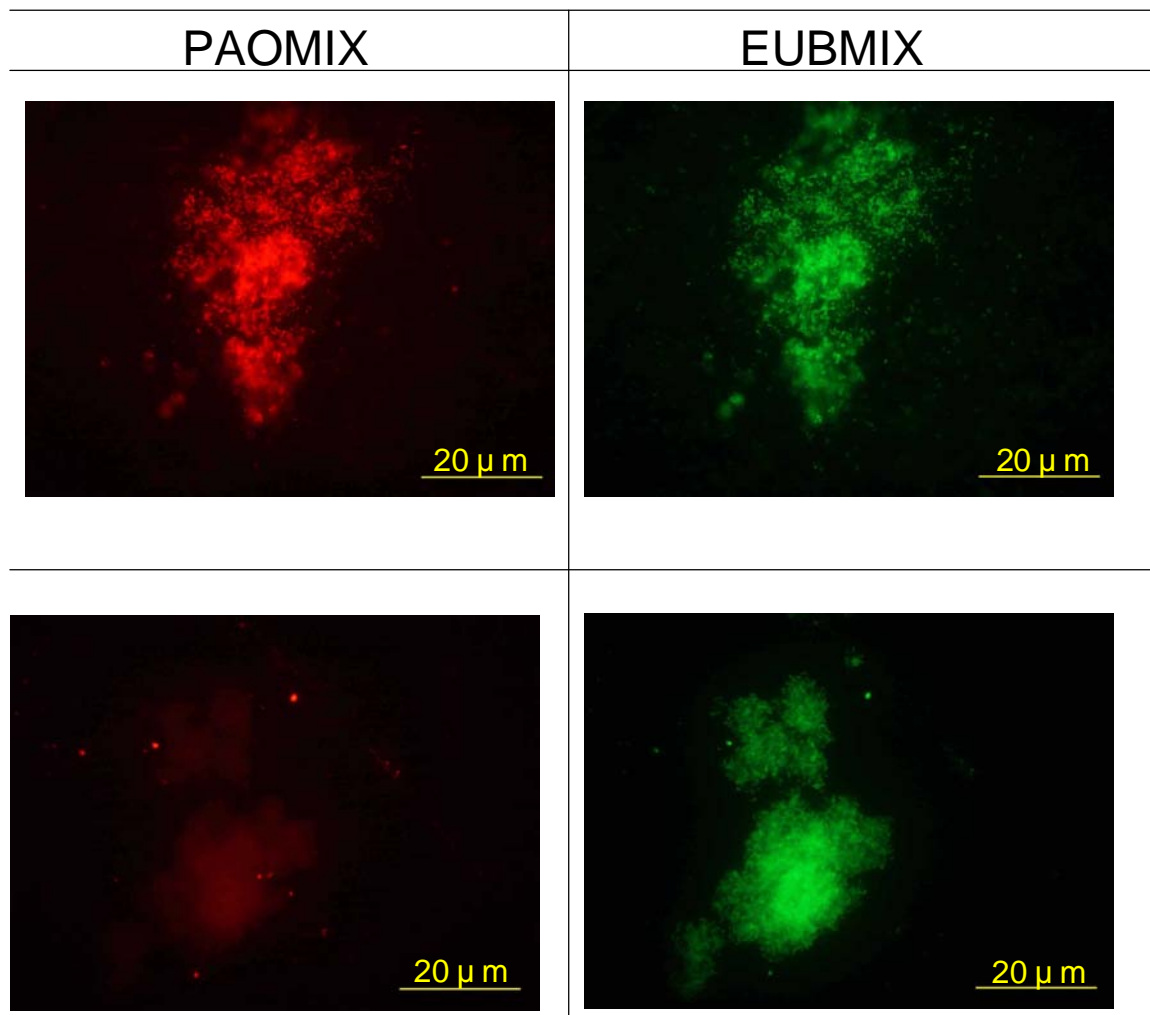


図 5.6 分離株の FISH 画像

(上図：PAOMIX プローブで陽性の分離株、下図：PAOMIX プローブで陰性の分離株)

定量 PCR 法の改良

前述のとおり、非特異的な PCR 増幅が認められたため、'Accumulibacter' の定量 PCR 法の条件改良をおこなった。非特異的な PCR 増幅が見られた分離株から抽出した DNA において、PCR 増幅が起こらない条件を検討した。なお、分離株とプライマーの塩基配列のミスマッチの数は PAO651f、PAO846r とともに 2 塩基であった。検討では、アニーリング条件を 57 15 秒、60 15 秒、63 15 秒および 66 15 秒に変更した。この結果、アニーリングを 66 15 秒に変更した条件のみにおいて分離株から抽出した DNA の PCR 増幅を防ぐことができた。

続いて、アニーリング温度を変更した条件における定量性の検討をおこなった。 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 および 10^3 copies/reaction の検量線用 DNA に対して、3 章で確立したアニーリング条件である 57 20 秒および、今回検討した 66 15 秒による定量 PCR をおこない、比較した。この結果、いずれの条件においても良好な検量線が作成でき、各濃度の検量線用 DNA の Ct 値も両者のアニーリング条件で違いはなかった。なお、増幅効率 (E) は 102% であった。

一方で、活性汚泥から抽出した DNA、25 試料に対して両者のアニーリング条件で定量 PCR をおこなった結果、66 15 秒による結果では、57 20 秒にくらべて、定量値が平均で 68% 程度まで減少していた。但し、両アニーリング条件における定量値の相関を確認したところ、図 5.7 に示すとおり $R^2=0.9568$ であった。

このように、アニーリング温度を変更したことで、検量線用 DNA における定量値に違いはなかったものの、活性汚泥試料における定量値は、68% 程度まで減少した。しかしながら、ばらつきも小さく、全ての試料において平均的に定量値が減少していた。すなわち、3 章で示した定量結果でも 'Accumulibacter' の変動は把握できていたと考えられた。但し、今後の検討においては、正確な定量をおこなうためにアニーリングを 66 15 秒に変更することにした。

なお、MORA-EXTRACT を用いて抽出した DNA を、今回決定したアニーリング条件で定量 PCR した場合における定量値の変動係数は 15% (n=6) であった。

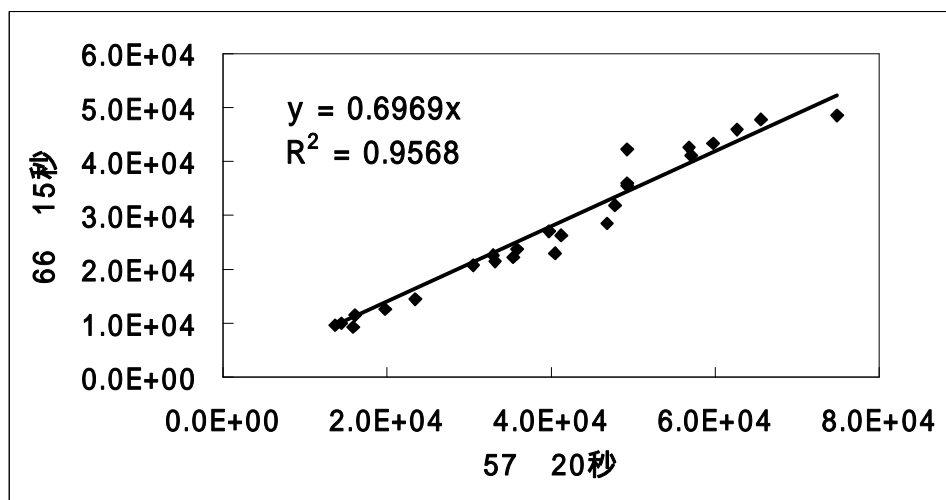


図 5.7 各アニーリング条件における定量値の相関

5.3.3.2 定量 PCR 条件を変更した後における検討

改良した定量 PCR 条件を用いて、5.3.3.1 において培養したプレート中の‘*Accumulibacter*’の定量を再度やり直したが、全ての条件において‘*Accumulibacter*’は検出されなかった。

続いて以下の条件で、プレート法による培養を再度試みた。‘*Accumulibacter*’の濃度をはじめから高めておくために、密度分離をした汚泥を用いた。微生物間相互作用における影響も考慮し、培地作製の際、ろ過滅菌したリアクターの放流水を加えた。また、培養期間を4週間に延長した。

- ・ 支持体：Gellan gum
- ・ pH：8 および 10
- ・ 炭素源：酢酸およびグルコース
- ・ 汚泥試料：Percoll を用いて密度分離した嫌気および好気終了時の汚泥
- ・ 汚泥希釈： 10^3 倍希釈（密度分離後）
- ・ 培地溶媒：ろ過滅菌した実験室規模 EBPR リアクターの放流水および RO 水
- ・ 培養期間：4 週間

しかし、上述の条件で培養したプレートの全てにおいて‘*Accumulibacter*’は検出されなかった。

5.3.4 液体培養法での増殖条件の探索

好気条件下における '*Accumulibacter*' の増殖条件について、プレート法では上手くいかなかったため、液体培養を用いて探索した。まず、事前検討として、添加する炭素源の濃度を決定した。続いて、様々な炭素源を用いて培養し、増殖に適した炭素源を探索した。続いて適した炭素源を用いて、pH 条件を検討した。最後に温度条件について検討した。

5.3.4.1 培地の炭素源濃度の検討

事前検討として、培地に添加する炭素源の濃度を検討した。ここでは、酢酸を用いて 48 時間好気培養をおこない、培養期間内でぎりぎり摂取しきれない程度の濃度を求め、それを目安とすることとした。これは、濃度が高すぎると炭素源の摂取障害が起こる可能性があり、逆に低すぎると、飢餓状態になり、DNA が減少する可能性が考えられたためである。

酢酸を炭素源として、100、500、1000、5000 および 10000mgC/L の条件において 48 時間活性汚泥を培養し、培養後に残存した炭素源の濃度を測定した。なお、活性汚泥は MLSS として 100mg/L になるように希釈し、培地の pH は 8.0 に調整した。この結果、100、500 および 1000mgC/L にて培養した試料については 50~200mgC/L 程度の炭素源が摂取されていることがわかった。5000 および 10000mgC/L にて培養した試料についてはほとんど基質濃度に変化がなく、摂取の有無が確認できなかった。

続いて、培養 12、24 および 48 時間後における基質摂取を、酢酸 100 および 500mgC/L に調製した培地を用いて検討した。検討結果を図 5.8 に示す。酢酸 100mgC/L においては、培養 12 時間後までにほとんどの基質が摂取されていた。一方酢酸 500mgC/L においては培養期間中連続的に基質の摂取が確認され、最終的に 300mgC/L 程度が摂取されていた。この結果に基づき、以降の検討では基質初期濃度を 500mgC/L に設定することとした。

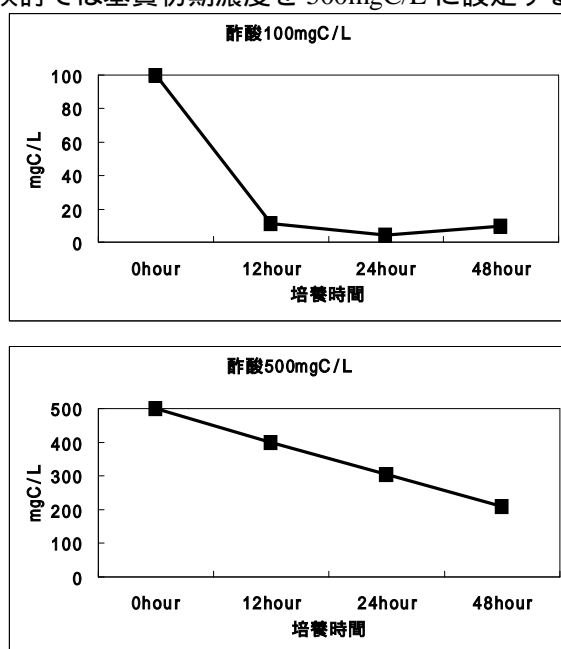


図 5.8 各濃度の酢酸培地における基質摂取

5.3.4.2 増殖条件の検討

異なる炭素源、pH および培養温度において液体培養をおこない、培養前後の汚泥試料中の 'Accumulibacter' を定量 PCR 法によって定量することで、'Accumulibacter' の増殖に適している条件を検討した。また、全細菌に対する定量も同時におこない、全細菌の増殖についても評価した。さらに、これらの結果を用いて全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合についても評価した。

炭素源の種類

酢酸、プロピオン酸、グルコース、グルタミン酸をそれぞれ唯一の炭素源として液体培養をおこない、培養前後の汚泥試料中の 'Accumulibacter' および全細菌を定量 PCR 法によって定量した。なお、pH および培養温度は採取した実験室規模 EBPR リアクターの条件にならない、pH8.0 および 20 ℃ に調整した。培養は全て 3 連でおこない、各連における定量結果から平均値および標準偏差を求めた。

図 5.9 に各炭素源を用いて培養した汚泥中の 'Accumulibacter' の定量結果を示す。用いた全ての炭素源で、'Accumulibacter' が増加していたが、陰性対照の場合においても増加していた。陰性対照よりも増加していたのは、グルコースを炭素源として培養した場合のみであった。

全細菌を定量した結果、グルタミン酸、グルコース、酢酸、プロピオン酸の順で増加し、一方で陰性対照では、減少した。さらに、全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合は、グルコースでは増加していたが、むしろ陰性対照の方が大きく増加していた。

また、表 5.4 に培養後に残存していた炭素源の濃度を示す。全ての基質において 200mgC/L 前後の基質摂取が見られ、基質摂取がない、もしくは培養中に全てを摂取してしまうことはなかった。

これらの結果から、本試験系においてグルコースが最も 'Accumulibacter' の増殖に適していると考えられた。このため、今後の pH および培養温度についての検討では、グルコースを炭素源とすることとした。

表 5.4 異なる炭素源を用いた培養後の基質濃度

培養条件	培養後の基質濃度 (mgC/L)
陰性対照	-
酢酸	252.8
プロピオン酸	380.9
グルコース	305
グルタミン酸	323.1

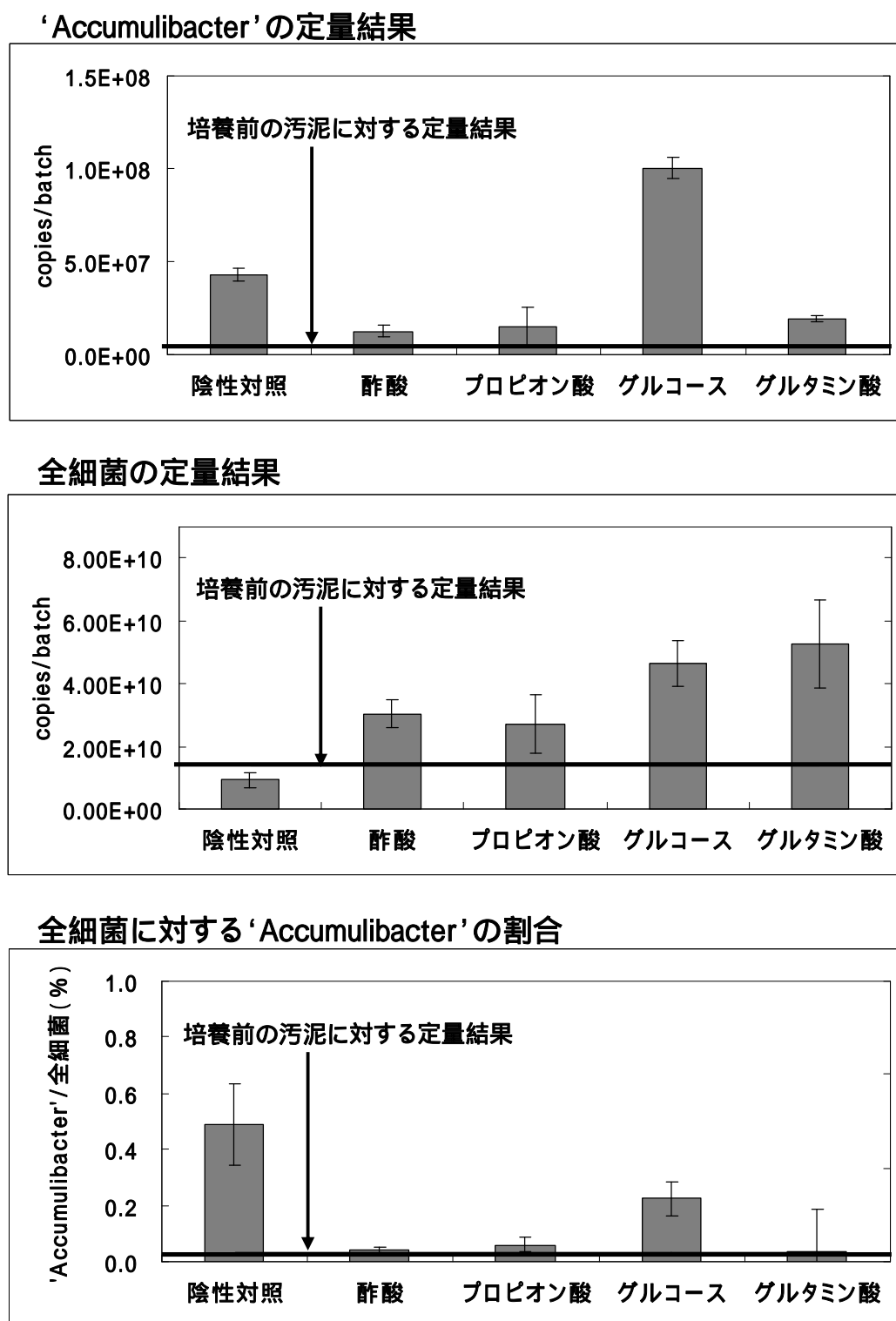


図5.9 異なる炭素源を用いて培養した汚泥試料の定量結果

pH の影響

初期の pH を 6.0、7.0、8.0、9.0 および 10.0 に調整した培地を用いて、‘*Accumulibacter*’の増殖に適している pH 条件を検討した。炭素源は前述の結果にしたがい、グルコースを唯一の炭素源とした。培養温度は 20 に設定した。なお、培養期間中における pH 調整はしなかった。

図 5.10 に各 pH に調整した培地を用いて培養した汚泥における定量結果を示す。pH7.0、9.0 および 10.0 において‘*Accumulibacter*’が培養前と比較して増加しており、pH が高くなるにつれ‘*Accumulibacter*’が増加する傾向が見られた。また、陰性対照は培養前と比較して若干減少していた。

全細菌を定量した結果、全ての pH で増加しており、全細菌に対する‘*Accumulibacter*’の割合は全ての pH で培養前よりも低い結果となった。一方で陰性対照では培養前よりも全細菌が減少しており、‘*Accumulibacter*’の割合は高くなっていた。

表 5.5 に培養後の pH および基質濃度を示す。全ての pH 条件において、培養後に pH が著しく低下している様子が見られた。基質の摂取量は、pH6.0、7.0 および 8.0 においては 400mgC/L 程度であったが、pH9.0 および 10.0 においては 300mgC/L 程度と、他の pH に比べて少なかった。また、培養後における有機酸の生成を CIA によって確認したところ、酢酸およびプロピオン酸が検出された。但し、培養後の DO は 2～4mg/L であり、好気状態を保っていた。

このように、全細菌に対する割合は低下したものの、培養後において pH が高いほど‘*Accumulibacter*’が増加する傾向がみられた。この結果から、培養温度の検討では pH を 10.0 に調整し、グルコースを唯一の炭素源とした培地を用いることとした。

表 5.5 異なる pH による培養後の pH および基質濃度

培養条件	培養後のpH	培養後の基質濃度(mgC/L)
陰性対照	6.95	-
pH6.0	3.14	113.3
pH7.0	3.22	96.4
pH8.0	3.39	93.1
pH9.0	3.85	194.3
pH10.0	5.99	218.8

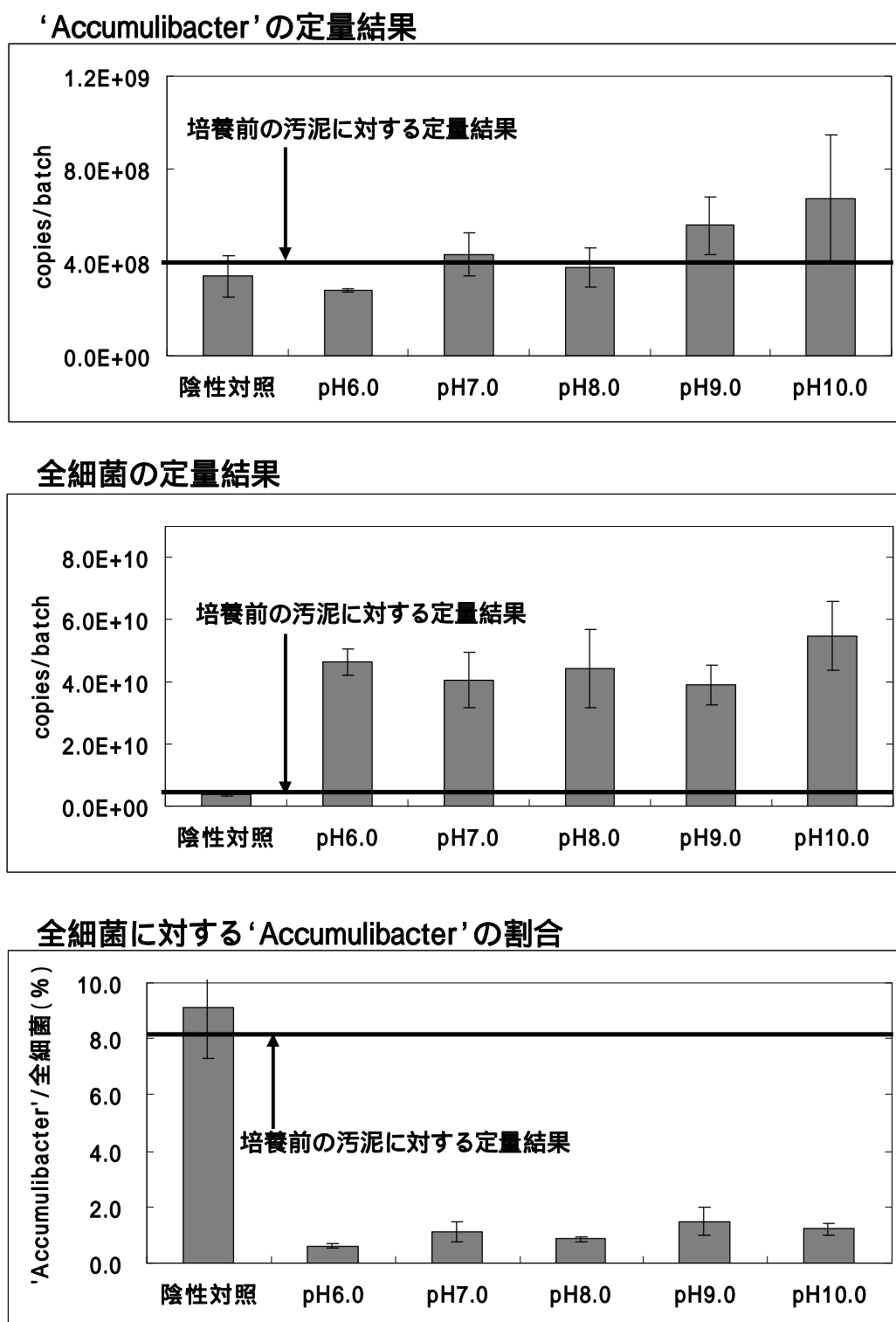


図5.10 異なるpHによって培養した汚泥試料の定量結果

培養温度の影響

培養温度を 10、15、20、24、30 および 37 に設定し、培養することによって、‘*Accumulibacter*’ の増殖に適している温度を探索した。これまでに得られた結果から、グルコースを唯一の炭素源とし、pH10.0 に設定した培地を用いた。

図 5.11 に 10、15 および 20 に設定し、培養した汚泥における定量結果を示す。全ての条件で、培養前よりも‘*Accumulibacter*’が増加しており、温度が高くなるにつれて増加する傾向が見られた。陰性対照と比較して増加していたのは、15 および 20 で、20 で最も増加していた。一方で、さらに高温域である 24、30 および 37 においては、全ての条件で‘*Accumulibacter*’が減少していた（データ示さず）。

一方、全細菌は温度が高くなるにつれ増加する傾向がみられ、10 においては陰性対照同様、微増であった。全細菌に対する‘*Accumulibacter*’の割合は、全ての温度条件で培養前よりも低い結果となったが、温度が低いほうがその割合が高くなる傾向が見られた。但し、全ての条件において‘*Accumulibacter*’の全細菌に対する割合は陰性対照よりも低い結果となった。

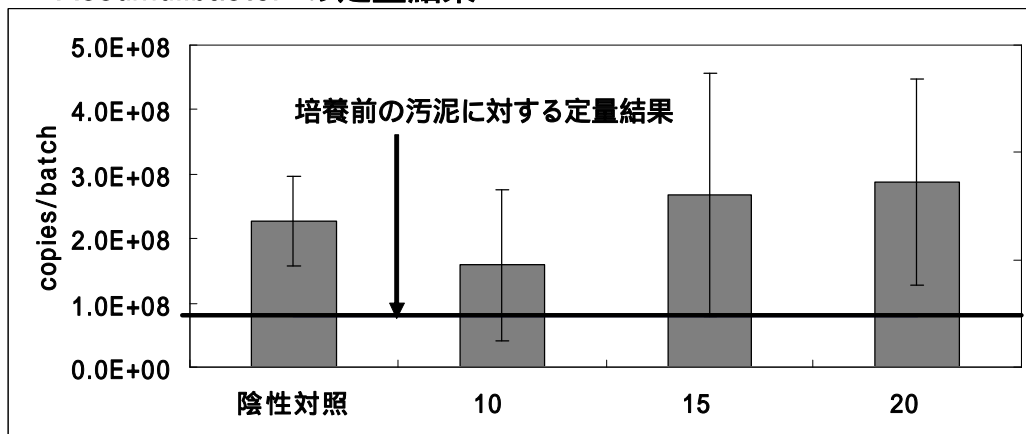
表 5.6 に 10、15、20 の条件における培養後の基質濃度を示す。温度が高くなるにつれ、摂取される基質の量が増加する傾向が見られた。

以上の結果から、分離を目的として‘*Accumulibacter*’の培養をおこなう場合に適している温度は、最も増殖が見られた 20 であることがわかった。

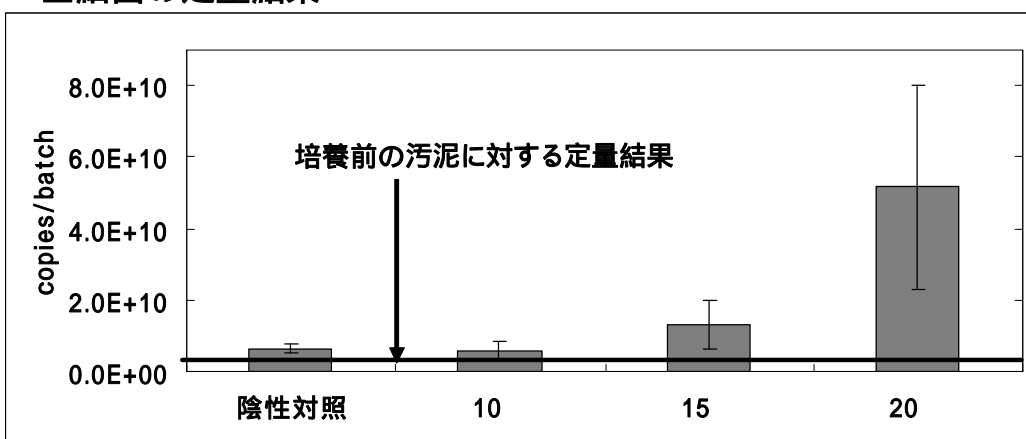
表 5.6 異なる培養温度による培養後の基質濃度

培養条件	培養後の基質濃度 (mgC/L)
陰性対照	-
10	458.8
15	439.9
20	400.5

'Accumulibacter' の定量結果



全細菌の定量結果



全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合

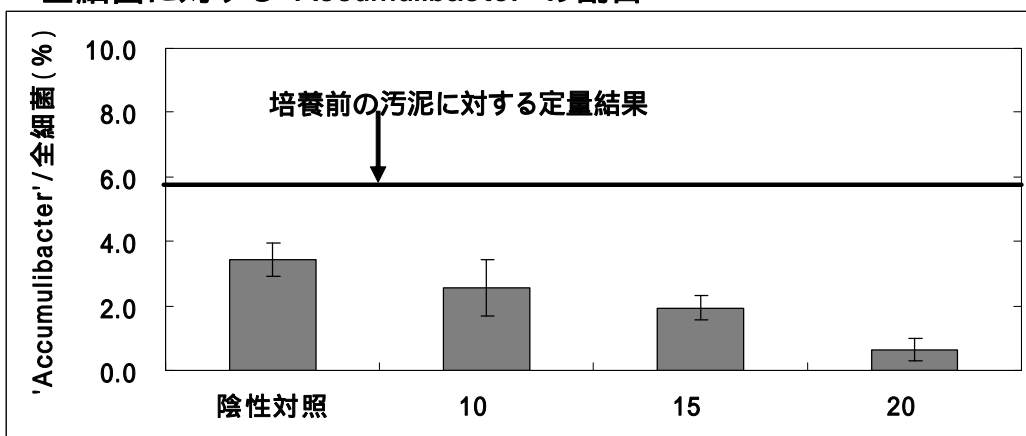


図5.11 異なる培養温度によって培養した汚泥試料の定量結果

グルコースおよびその発酵産物に関する検討

これまでの結果から、グルコースを炭素源として、pH10.0 および 20 の条件における液体培養が 'Accumulibacter' の増殖に適している条件であることがわかった。一方で、好氣的に培養していたものの、グルコースを用いた培養では酢酸やプロピオン酸といった発酵産物が培養後に検出された。炭素源の検討にて、酢酸やプロピオン酸を用いた場合において、'Accumulibacter' が増殖しないことを確認したが、この検討は pH を 8.0 に設定していた。このため、ここでは pH10.0 における検討をおこなった。また、酢酸、プロピオン酸に加えて、グルコースからの代表的な発酵産物の一つである乳酸についても検討した。

図 5.12 に各炭素源を用いて培養した汚泥の定量結果を示す。グルコースを炭素源として用いた培養においてのみ、'Accumulibacter' の増加が確認された。そのほかの炭素源、すなわち発酵産物においては 'Accumulibacter' の増加は確認されなかった。

全細菌は全ての炭素源において増加しており、全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合は培養前よりも全ての条件で低い結果となった

このように、グルコースを与えた場合においてのみ、'Accumulibacter' が増加しており、発酵産物を与えた場合では、その増加は認められなかった。

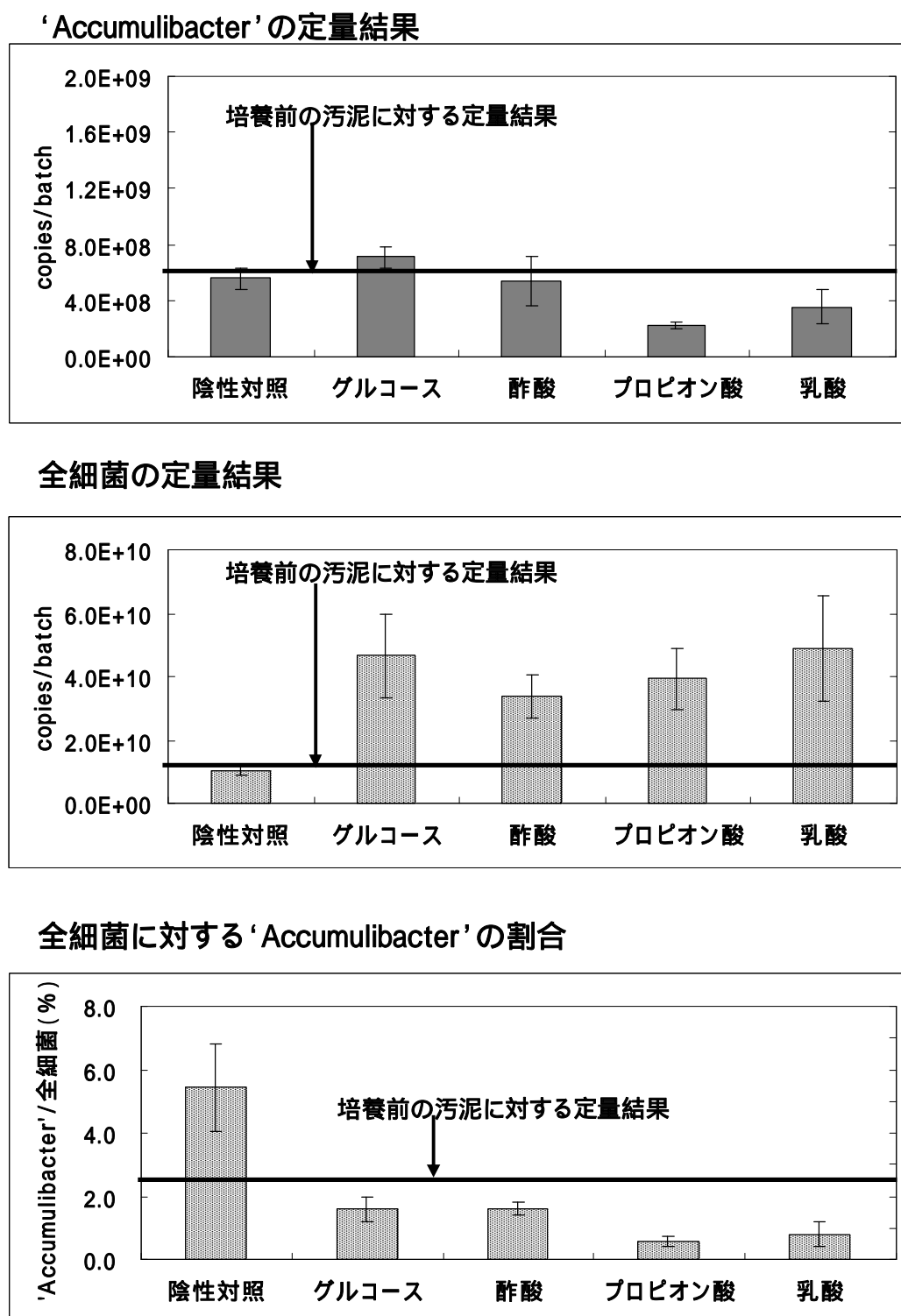


図5.12 グルコースおよびその発酵産物によって培養した汚泥試料の定量結果

培養時間の延長および pH 緩衝剤の導入

48 時間の培養において、グルコースを炭素源として、pH10.0 および 20 の条件における液体培養が 'Accumulibacter' の増殖に適している条件であることがわかった。ここでは培養時間を 96 時間に延長することで、さらに 'Accumulibacter' が増加するか検討した。また、培養期間中に pH の低下が認められたため、pH 緩衝剤の導入を検討した。

培養時間を 48 時間または 96 時間とし、それぞれの培養時間について、陰性対照、pH 緩衝剤なし、pH 緩衝剤ありの条件について検討した。96 時間の培養では、48 時間の培養の後、遠心分離（3500rpm、5 分）によって上澄みを取り除き、再度新しい培地を添加して、残りの 48 時間の培養をおこなった。また、pH 緩衝剤として HEPES を 0.1M となるように添加した。

図 5.13 に各条件で培養した汚泥の定量結果を示す。これまでどおり、pH 緩衝剤を添加せずに 48 時間培養した汚泥において 'Accumulibacter' の増加が認められたが、96 時間に延長した汚泥においては、培養前よりも増加はしていたものの、培養 48 時間後よりも低い値となった。

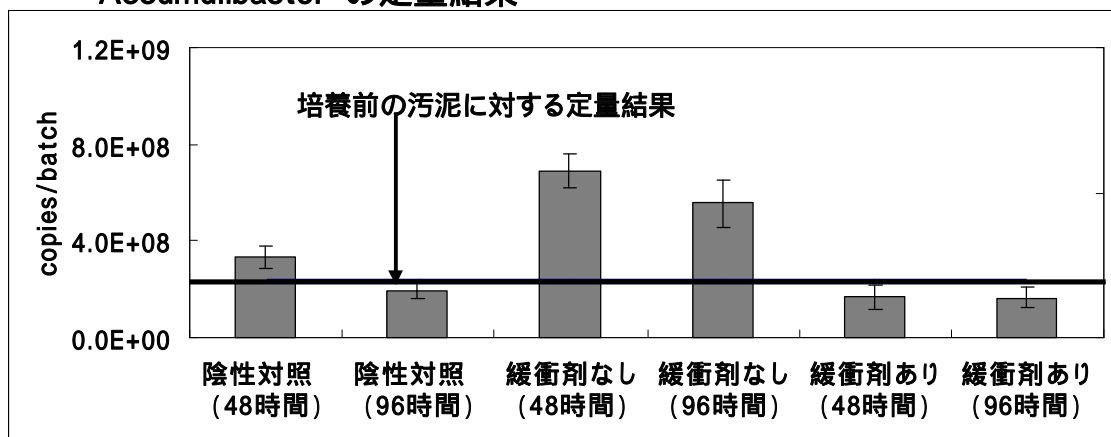
また、pH 緩衝剤を加えて培養した汚泥試料においては、表 5.7 に示したとおり、緩衝剤を添加しない汚泥に比べて高い pH を維持していた。しかし図 5.13 に示したとおり、48、96 時間で培養した汚泥ともに、'Accumulibacter' の増加は認められなかった。

このように、培養時間を 96 時間に延長した結果、さらなる 'Accumulibacter' の増加は確認できなかった。また、pH 緩衝剤（HEPES）を添加し、安定した pH 条件にて培養したが、'Accumulibacter' の増加は認められなかった。

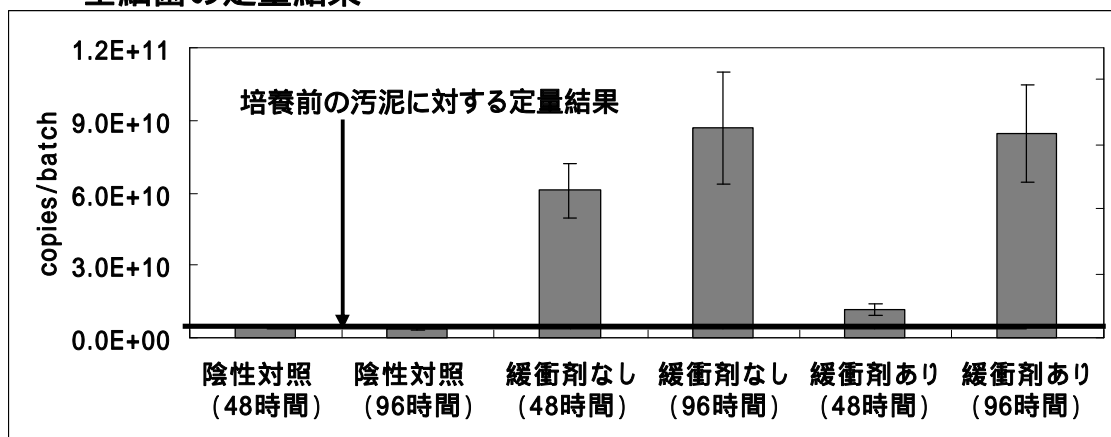
表 5.7 各条件における培養後の pH

培養条件	培養後の pH
陰性対照 (48時間)	7.50
陰性対照 (96時間)	7.74
緩衝剤なし (48時間)	6.45
緩衝剤なし (96時間)	3.39
緩衝剤あり (48時間)	8.34
緩衝剤あり (96時間)	8.52

'Accumulibacter' の定量結果



全細菌の定量結果



全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合

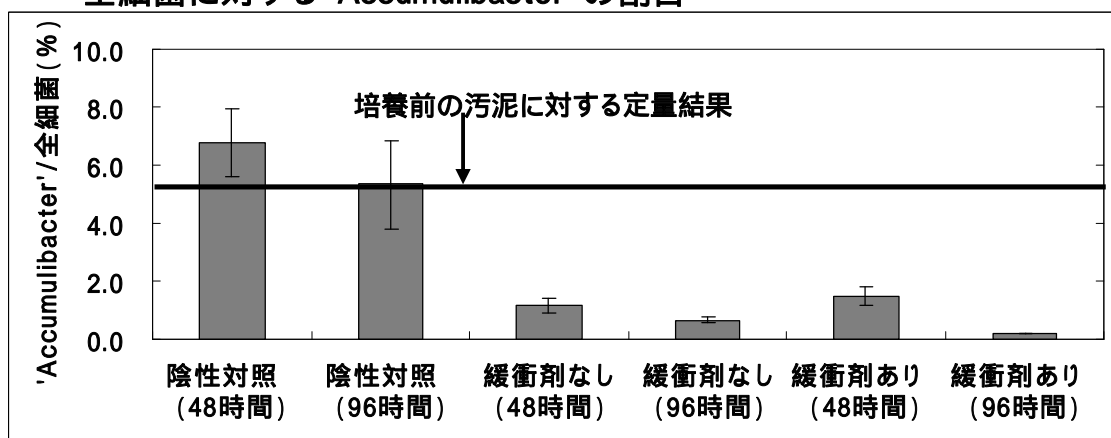


図5.13 異なる培養時間およびpH緩衝剤の有無による条件で培養した汚泥試料の定量結果

t 検定による増殖の確認

これまでの検討で、グルコースを炭素源として pH10.0、20 の培養条件が増殖に適していることがわかった。この条件において計 3 回の試験をそれぞれ 3 連でおこなった。これらの試験の定量結果を用いて、'Accumulibacter' の増殖が統計的に有意とみなすことができるかどうか、Microsoft Excel 2002 の t 検定を用いて評価した。

3 回の試験では培養前の汚泥中の 'Accumulibacter' のコピー数が異なるため、t 検定では次のような操作をおこなった。まず、上述の培養条件および陰性対照の条件にて培養した後の 'Accumulibacter' のコピー数を培養前のコピー数で除したものを増加倍率とした。上述条件における増加倍率が有意に 1 を超えるか、さらには陰性対照における増加倍率よりも有意に大きいかを t 検定によって評価した。

この結果、上述の培養条件で培養した場合の増加倍率は有意に 1 を超えており、陰性対照の増加倍率よりも有意に大きかった（有意水準 5%）。すなわち、グルコースを炭素源として pH10.0、20 の培養条件にて、統計的に有意な 'Accumulibacter' の増殖がみられたことがわかった。

'Accumulibacter' の倍加時間

上述の増加倍率の値を用いて、グルコースを炭素源として pH10.0、20 の条件にて培養した場合における 'Accumulibacter' の倍加時間を求めた。培養前の汚泥内に含まれる 'Accumulibacter' を 1 とすると、各試験における培養後の 'Accumulibacter' の平均値は 1.47 となった。すなわち 48 時間で 1.47 倍に増殖していた。この値から倍加時間を算出すると、3.63 日となった。

5.3.5 分離の試み

5.3.4.2 にて決定した条件（グルコース、pH10.0 および 20 ）にて‘*Accumulibacter*’の分離を試みた。汚泥試料は、R21 の嫌気および好気終了時の汚泥を約 70% の Percoll を用いて密度分離し、0.1 ~ 1cell/試験管となるように希釈したものをを用いた。25mL の試験管を用い、5mL 程度の培地を各試験管に添加した。試験管は約 100 本用意した。

1 ~ 2 ヶ月の培養の後、いくつかの試験管で懸濁が目視で確認できた。これらの試験管から試料を採取し、FISH 法によって‘*Accumulibacter*’が増殖しているか否かを確認した。この結果、‘*Accumulibacter*’は確認できなかった。なお、嫌気終了時の試料においてのみ、若干弱いながらも FISH によって蛍光を発する細菌が確認された。但し、蛍光が弱いことからこの細菌は、図 5.6 に示したように、‘*Accumulibacter*’以外の細菌である可能性が高いと考えられた。

また、ほとんどの試料において、異なる形態の細菌が同一試験管に存在しており、糸状菌の存在も確認された。

5.4 考察

5.4.1 全細菌に対する定量 PCR 法の検討

Hiraishi et al. (2005)、Skovhus et al. (2004) および Kaetzke et al. (2005) によって報告されている PCR 条件をもとに検討をおこなった結果、全細菌に対する定量 PCR 法を確立できた。これら 3 報はいずれも、インターカレーター法で定量している。全細菌を対象とした定量 PCR 法には、Taq Man probe を用いた方法 (Bach et al., 2002、Harms et al., 2003) も数多く報告されているが、定量下限が 1.0×10^4 copies/reaction 程度で十分であったこと、また、コストが比較的安いことを理由に、インターカレーター法に注目した。

Hiraishi et al. (2005) にて報告されている条件においては PCR 増幅を確認できなかった。条件の相違としては、唯一 DNA polymerase を変更したのみであり、それ以外の条件はまったく同様である。Hiraishi et al. (2005) は、5.2.2.3 に示したとおり、LightCycler FastStart DNA Master SYBR GREEN I kit (Roche) を用いていた。このため、今回 PCR 増幅が確認されなかった理由は DNA polymerase によるものと考えられる。また、購入時に DNA polymerase に付属してくる PCR バッファー等の組成も異なると思われるため、それらも影響していた可能性がある。

各社の DNA polymerase の特性は異なっており、また、PCR バッファーの組成もまた製品ごとに微妙に異なっている。DNA polymerase を変更すると異なる結果が得られることは、しばしばある。

本研究で導入した定量 PCR 法による全細菌の定量は、次の二つの点で注意が必要である。

まず一つ目は、本研究で用いたプライマーでは、大部分の細菌を捉えたと考えられているものの、全てを網羅するものではないということである。MICA (Microbial Community Analysis; <http://mica.ibest.uidaho.edu/>) の Primer Sequence Prevalence 機能を用いて、データベースに登録されている細菌の 16S rRNA 遺伝子配列 (RDP release 9.51 Good Quality (>1200bp) bacterial 16S) のうち、各プライマーセットで捉える配列の数を確認した。この結果、本研究で用いたプライマーセット (357f-918rC) を用いた場合に捉える配列の数は 68059 であった。このような不完全性は、他のプライマーセットでも同様であり、(357f-518r で 118336、509f-784r で 42613) その点ではどのプライマーセットを用いても一長一短であるといえる。

二つ目は細菌種によって 16S rRNA 遺伝子のコピー数が異なることである。このため、本章で示した全細菌のコピー数に対する '*Accumulibacter*' のコピー数の割合は、細胞数の割合を示すものではない。

しかし、こうした注意点があるにせよ、全細菌に対する定量 PCR 法は使い方によっては有用である。本章では、'*Accumulibacter*' の増減を定量 PCR 法を用いて検討したが、同時に全細菌の挙動を把握する必要があった。そのためには、定量 PCR 法は簡便且つ、実験の目的を達するために、十分に精度が高かった。

5.4.2 'Accumulibacter' の濃縮

Percoll を用いた密度分離法によって、活性汚泥試料中における 'Accumulibacter' の濃縮を検討した結果、3.7 ~ 22.4 倍に濃縮できることがわかった。PHA を蓄積した状態 (嫌気終了時) およびポリリン酸を蓄積した状態 (好気終了時) の両方において濃縮が可能であった。若干、PHA を蓄積させた汚泥からのほうがより濃縮できていたが、両者に有意な差はなかった。

押木 (2006) は実下水処理場の汚泥に対して、酢酸を唯一の炭素源として好気培養をおこない、PHA を蓄積させた後に Percoll を用いた密度分離をおこなった。この結果、PHA 蓄積細菌を約 9 倍に濃縮することに成功している。また、Zilles et al. (2002) の報告では濃縮率は不明であるが、実下水処理場の汚泥に対して Percoll を用いた密度分離をおこない、ポリリン酸を蓄積した 'Accumulibacter' を濃縮している。そのほかにも Percoll を用いることによって、PHA を蓄積した細菌 (Mas et al., 1995) やポリリン酸を蓄積した細菌 (Suresh et al., 1985) を濃縮している報告例は多数あり、これらの細菌を濃縮するために有効な手法であることがわかる。また Percoll 以外にもショ糖を用いた密度分離による PAOs の濃縮が報告されている (Nakamura et al., 1991)。

今回の検討では、活性汚泥 6 試料に対して密度分離の検討をおこない、全ての試料において 'Accumulibacter' の濃縮が確認されたが、その濃縮倍率には大きな差が見られた。この原因のひとつとして、分離後の汚泥回収操作があげられる。Percoll 濃度約 70% において、沈殿した汚泥における全細菌のコピー数は、濃縮前の汚泥の 10 ~ 20% 程度であった。すなわち、Percoll 濃度約 70% で密度分離した場合、僅かな量の汚泥しか沈殿しない。このため、分離後上層に残った汚泥も回収してしまうと、濃縮倍率に多大な影響をあたえてしまう。また、沈殿した汚泥には、完全に沈殿しチューブの底面にくっついている汚泥のほかに、下層に沈殿しているものの、もやもやとした雲状のように存在する汚泥が見られた。この雲状に存在する汚泥を完全に上澄みとしてとりきるかどうかによっても濃縮倍率が異なってくると考えられた。このように、汚泥の回収作業に起因して濃縮倍率がばらついてしまうことが考えられた。

また、本研究では定量 PCR 法によってその濃縮倍率を検討したが、DNA の抽出に十分な汚泥量を得るために、同じ Percoll 濃度のチューブを 3 連で用意し、分離後それらをあわせて DNA 抽出の試料とした。当初 1 連で検討していたが、汚泥の量が少なく、効率的な DNA 抽出が困難であった。このため、多数のサンプルを濃縮する場合は、大量のチューブを用意することが必要で、実験操作が若干煩雑になる。

最後に、密度分離をおこなった汚泥は分離に用いるため、密度分離前の汚泥はできる限り弱い条件において分散をおこなった。これは、細胞へのダメージを減らすためである。但し、密度分離操作における細胞への影響は少なからずあると考えられるため、分離した汚泥を本章で得られた増殖条件を用いて液体培養し、'Accumulibacter' が増殖するか否かを確認する必要性があると考えられた。

5.4.3 プレート培養法での増殖条件の探索

プレート培養法を用いて、以下の培養条件を変更のもと、'Accumulibacter'が増殖する条件を検討したが、今回検討した培養条件においては'Accumulibacter'の増殖を確認することはできなかった。

- ・ 支持体：Gellan gum および Agar
- ・ pH：6、7、8、9 および 10
- ・ 炭素源：酢酸、プロピオン酸、グルコース、グルタミン酸およびアスパラギン酸
- ・ 汚泥試料：好気終了時および密度分離した嫌気および好気終了時の汚泥試料
- ・ 汚泥希釈： 10^3 、 10^4 および 10^5 倍希釈
- ・ 培地溶媒：ろ過滅菌した実験室規模 EBPR リアクターの放流水および RO 水
- ・ 培養期間：2 および 4 週間

本研究においては嫌気条件における培養は検討しなかった。これは、EBPR プロセスにおいて PAOs は嫌気で炭素源を摂取するものの、増殖は好気でおこなわれるためであり、また、MAR-FISH を用いた研究により、'Accumulibacter'が好気条件下で炭素源を摂取することが報告されているためである (Kong et al., 2004)。

続いて培養期間が十分であったかを考察する。まず、プレートに播く汚泥に含まれる 'Accumulibacter' のコピー数を概算する。活性汚泥試料 1mL に存在する 'Accumulibacter' のコピー数はこれまでの定量 PCR の結果から推測すると 10^8 copy のオーダーである。これを 10^4 倍に希釈し、200 μ L 播種すると、プレートに存在する 'Accumulibacter' のコピー数は 10^3 copy のオーダーとなる。続いて、定量 PCR 法で検出するために必要なコピー数を考える。抽出した DNA 試料を定量 PCR に用いる場合、100 倍程度の希釈を要する。定量 PCR 法の定量下限 10^3 copy であることから、希釈倍率の 100 を掛けた 10^5 copy がプレート上に存在すれば検出可能となる。すなわち、培養期間中に 'Accumulibacter' が 100 倍に増殖すれば、定量 PCR 法によって検出が可能となる。

5.3.4.2 に示したとおり、液体培養における 'Accumulibacter' の倍加時間は 3.63 日であった。この場合は 100 倍に増殖するのに 25 日を要するために、2 週間では培養期間が不足していたことになる。但し、定量 PCR 法のアニーリング条件変更後の検討においては 4 週間の培養をおこなっているため、培養期間は十分であった可能性が高い。このように 4 週間の培養であれば、十分であると考えられるが、プレートにおける増殖速度が液体培養よりもさらに遅いことも考えられるため、今後検討する場合においては、より長期間の培養が望ましいと考えられた。

続いて、プレート培養における検討において、3 章にて確立した定量 PCR 法では、非特異的な PCR 増幅が確認されることが明らかになった。このため、アニーリング条件の変更をおこなった。非特異的に増幅された *Dechloromonas* 属等に近縁な種の塩基配列を確認したところ、フォワード、リバースプライマーとのミスマッチの数は 2 または 3 塩基であった。このように、2 塩基以上のミスマッチがあったにもかかわらず PCR 増幅してしまっている

ことがわかった。また、これらの分離株は FISH 法によっても検出された。定量 PCR で用いたプライマーは FISH 法のプローブと同じ配列であり、これらの分離株とは 2 塩基以上のミスマッチを持つ。このため、FISH 法においてもハイブリダイゼーションの条件等の改良が今後必要になる可能性が示唆された。

なお、3 章で対象とした汚泥に対しては、57 20 秒のアニーリング条件においても解離曲線解析および PCR 産物の塩基配列解読の結果では非特異的な PCR 増幅は確認されなかった。これは、非特異的な PCR 増幅をしてしまう配列を持つ細菌に比べて 'Accumulibacter' の存在量が圧倒的に多かったことに起因すると考えられる。一方でプレート培養した試料においては 'Accumulibacter' が増殖せず、非特異的な PCR 増幅をしてしまう配列を持つ細菌が増殖したために、非特異的な PCR 増幅がおこなわれてしまったと考えられた。また、図 5.7 に示したとおり、3 章のアニーリング条件 (57 20 秒) での定量結果に対して、本章でのアニーリング条件 (66 15 秒) での定量結果は全体的に値が低くなったものの、両者の定量結果には良好な相関関係が得られた。すなわち、'Accumulibacter' の 16S rRNA 遺伝子の変動を把握する上ではどちらのアニーリング条件でも問題はないと考えられた。

5.4.4 液体培養法での増殖条件の探索

液体培養法によって好気条件下における 'Accumulibacter' の増殖条件を探索した結果、グルコース (500mgC/L) を唯一の炭素源とし、pH を 10.0、培養温度を 20 に設置して培養することが増殖に適していることがわかった。但し前述のように、本条件における 'Accumulibacter' の倍加時間は 3.63 日であった。これは、活性汚泥モデル ASM2d において PAOs の倍加時間として一般的に用いられている 0.69 日に比べ 5 倍程度遅いものであった。

好気条件下における 'Accumulibacter' の基質応答についての報告例はほとんどないが、Kong et al. (2004) は MAR-FISH を用いた解析によって、酢酸、プロピオン酸、ピルビン酸、およびグルタミン酸を好気および嫌気条件下において摂取可能であると報告している。好気条件下におけるグルコース摂取は確認できず、嫌気条件下においてもグルコースが酢酸やプロピオン酸などの有機酸に発酵された後に、それらが摂取されると報告している。今回の検討において、好気で摂取可能であると報告された酢酸、プロピオン酸およびグルタミン酸を用いたが、'Accumulibacter' の増殖は確認されなかった。その一方で、グルコースを用いた培養においてのみ 'Accumulibacter' の増殖が確認された。培養期間中、酢酸やプロピオン酸の生成が確認されたものの、これら発酵産物である酢酸、プロピオン酸および乳酸を炭素源としておこなった液体培養において 'Accumulibacter' の増殖は認められなかった。

また、Kong et al. (2004) は炭素源濃度を 50mgC/L 程度に設定して MAR-FISH をおこなっている。これは、本研究における炭素源濃度よりも 10 倍低い値である。このため、今回の検討では 500mgC/L と高濃度の炭素源を用いたことによって、汚泥全体としては基質を摂取していたが、'Accumulibacter' は摂取できていなかった可能性がある。一方、グルコースによる培養では徐々に有機酸が生成されていたことが予想されるため、常に低濃度の有機

酸が供給され、それを 'Accumulibacter' が摂取していた可能性も考えられる。今後は、このような低濃度の炭素源を用いた培養における 'Accumulibacter' の増殖を確認する必要がある。

また、前述のようにグルコースを添加した培養においては好気条件にもかかわらず有機酸が検出された。培養後の DO を測定した結果では、好氣的であることを確認しているが、汚泥フロックの内部など、一部嫌氣的な場が存在し、その中で有機酸が生成されたと考えられた。

培養期間を 96 時間に延長した結果、'Accumulibacter' のさらなる増加は認められなかった。その原因はいくつか考えられる。前半の 48 時間の培養によって 'Accumulibacter' 以上にその他の細菌が増殖するため、群集構造の変化が何らかの影響を与えてしまったという可能性、48 から 96 時間の培養において 'Accumulibacter' が死滅期に入ってしまった可能性、などである。

なお、の可能性を示唆する情報がある。図 5.14 は *M. phosphovorus* を異なる pH によって培養した際のコピー数の変動を示している。なお、*M. phosphovorus* の増殖に最適な pH は 7 であり、pH4 においては増殖できないと報告されている (Nakamura et al., 1995a)。図 5.14 に示されているとおり、最適な条件である pH7 においては、培養 24 時間後までは他の pH よりも増加している様子が見られたが、その後は減少していた。*M. phosphovorus* と 'Accumulibacter' の増殖速度は異なると考えられ、一概にこの結果から結論付けられるものではないが、96 時間に培養時間を延長したことによって、'Accumulibacter' が死滅期に入ってしまったことも可能性として考えられた。

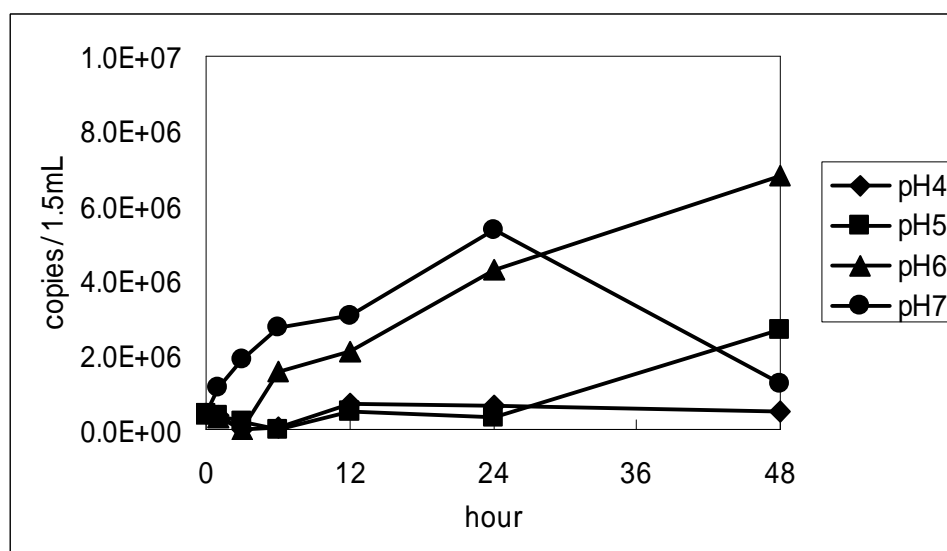


図 5.14 異なる pH における *M. phosphovorus* の増殖

5.4.5 分離の試み

5.3.5 にて述べたように、'Accumulibacter'を濃縮した汚泥を、検討から得られた増殖条件にて培養することで'Accumulibacter'の分離を試みたが、分離株を得ることはできなかった。今回の結果を踏まえて、今後検討すべき課題について以下に列挙し、考察する。

1．増殖条件

2．'Accumulibacter'の濃縮

3．共培養

1 については 5.4.4 にて示したとおり、'Accumulibacter'がグルコースを直接摂取し、増殖しているのかについては、疑問が残ったままである。また、増殖速度も 3.63 日と遅かったため、さらに適した培養条件がある可能性についても検討していく必要がある。

2 については、5.3.5 にて示したとおり、培養後の試料において、複数の細菌が混在している様子が見られた。Percoll を用いて'Accumulibacter'を濃縮し、理論上 0.1 ~ 1cell/試験管となるように調整して分離を試みたため、'Accumulibacter'1 細胞のみが試験管に入る可能性は当然高まっていたはずである。しかしながら、実際には複数の細菌が一つの試験管で増殖していた。この要因として、汚泥のフロックが完全に分散せずに残っていた可能性が考えられる。今後は、'Accumulibacter'の 1 細胞のみが試験管に入る確率をより高めるために、マイクロマニピレーションなどの手法を検討していく必要がある。

3 については、細菌によっては増殖に、他の細菌が生成する物質等を必要とする場合がある。このような場合においては、1 種類の細菌のみで増殖することができず、共培養による分離をおこなう必要がある (Kamagata et al., 2005)。今回の検討においては、この問題を解決するために、分離における基質調製にはリアクター放流水を溶媒として用いた。しかしながら、増殖に必要な物質が放流水に含まれていたかは不明である。現時点では不明であるが、'Accumulibacter'が共培養を必要とする場合においては、そのような試験系を構築する必要がある。

上述のように、いくつかの課題が挙げられた。今後はこれらを解決することで、新たな分離戦略を構築していくことが必要である。

5.5 まとめ

本章では好気条件下でのプレート培養および液体培養法における 'Accumulibacter' の増殖条件を、定量 PCR 法を用いて探索し、'Accumulibacter' の分離を目指した。本章で得られた成果を以下に示す。

- 全細菌に対する定量 PCR 法を確立した。
- 全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合を、定量 PCR 法を用いて評価することを可能にした。
- Percoll を用いた密度分離法によって、活性汚泥試料中の 'Accumulibacter' を濃縮することができた。
- プレート培養をおこなった試料において 'Accumulibacter' の定量 PCR 法を用いた結果、非特異的な PCR 増幅が認められたため、PCR 条件を改良した。
- プレート培養における 'Accumulibacter' の増殖条件を検討したところ、本研究で用いた培養条件においては 'Accumulibacter' の増殖が確認できなかった。
- 液体培養における 'Accumulibacter' の増殖条件を検討したところ、炭素源としてグルコース、pH10.0 および 20 の条件において有意に増殖していることが確認された。
- 'Accumulibacter' を濃縮した汚泥試料を用いて、上述の増殖条件によって分離を試みたが、今回の結果においては分離することはできなかった。

このように、定量 PCR 法によって好気培養における 'Accumulibacter' の増殖条件を把握することができたが、'Accumulibacter' を分離することはできなかった。

6 章 定量 PCR 法による *Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphatis*’ の挙動解析

6 章目次

6.1 背景と目的

6.2 実験方法

6.2.1 リアクターの運転

6.2.2 活性汚泥試料の採取および水質モニタリング

6.2.3 定量 PCR 法

6.2.4 PCR-DGGE 法

6.2.5 FISH 法およびポリリン酸染色法

6.3 実験結果

6.3.1 pH 低下型リアクター 1 ; R14 (pH7.5 \pm 0.1 6.5 \pm 0.1)

6.3.2 pH 低下型リアクター 2 ; R18 (pH7.9 \pm 0.1 6.5 \pm 0.1)

6.3.3 pH 低下型リアクター 3 ; R21 (pH7.9 \pm 0.1 6.5 \pm 0.1)

6.3.4 pH 低下型リアクター 4 ; R20 (pH6.5 \pm 0.1 6.0 \pm 0.1 7.5 \pm 0.1)

6.3.5 対照リアクター 1 ; R16 (pH7.5 \pm 0.1)

6.3.6 対照リアクター 2 ; R19 (pH7.9 \pm 0.1)

6.3.7 ‘*Accumulibacter*’ 減少時における PAOs の探索

6.4 考察

6.4.1 リアクターの運転状況

6.4.2 ‘*Accumulibacter*’ の存在量および挙動

6.4.3 ‘*Accumulibacter*’ 以外の細菌

6.5 まとめ

6.1 背景と目的

EBPR プロセスは下水からリンを除去する手法として有効な手段であるが、不安定な処理性能が課題となっている。リン除去が悪化する要因として、pH、温度、または、流入水に含まれる有機物の種類による影響がこれまで報告されている。特に pH は、中性付近における小さな変化によって悪化することが報告されており、このような pH の変動は実下水処理場においても十分考えられるものである。

2.2.2.2 にてまとめたように、pH とプロセスのリン除去、もしくは PAOs に関わる知見については、いくつかの報告がある。しかし、主要な PAOs である‘*Accumulibacter*’と pH との関係について研究した報告例はまだ少ない。Zhang et al. (2005) は実験室規模 EBPR リアクターの pH を 7.0 から 6.5 に下げたことによって、リン除去が急速に悪化したことを報告している。PCR-Cloning 法によって細菌群集の変化を追ったところ、‘*Accumulibacter*’とほぼ一致する配列をもつクローンは pH を 6.5 に下げたことによって見られなくなったと報告している。但し、PCR-Cloning 法では、‘*Accumulibacter*’の挙動を定量的に把握することはできないため、pH の低下が‘*Accumulibacter*’に与える影響の詳細は不明である。

このような背景を踏まえて、本章では‘*Accumulibacter*’の挙動を、特に pH の低下との関連で調査することを目的とした。本章では 6 系列の実験室規模 EBPR リアクターを運転した。そのうち、4 系列は運転途中に pH を低下させた。また、残る 2 系列は対照系として、pH を変化させなかった。これら 6 系列のリアクターについて、リン除去の性能と汚泥中の‘*Accumulibacter*’の量を経時的にモニタリングした。

また、運転した 6 系列のリアクターにおける細菌群集構造の変化を把握するため、PCR-DGGE 法による解析をおこなった。さらに、FISH 法およびポリリン酸染色法を用いて‘*Accumulibacter*’以外の PAOs の存在についても検討した。

6.2 実験方法

6.2.1 リアクターの運転

実験室規模 EBPR リアクターは 3.2.1.1 で述べたものと同じデザインの連続回分式リアクターを用いて運転した。運転サイクルは放流 30 分、水道水流入 20 分、基質流入 10 分、嫌気工程 90 分、好気工程 150 分、沈殿 60 分を 1 サイクルとした。本章で運転したリアクターについては窒素パージをおこなわなかった。リアクター運転に用いた種汚泥は R16 を除き、嫌気-好気法にて運転している実下水処理場の返送汚泥を用いた。R16 のみ標準法で運転している実下水処理場の返送汚泥を用いた。HRT は 10 時間、SRT は約 8 日に調整した。

基質は表 6.1 に示すとおり、酢酸を主たる炭素源として運転した。R14 および R16 は 80mgC/L、R18、19、20 および 21 は 50mgC/L の炭素源が 1 サイクルに流入するように設定し、C/P 比は全てのリアクターで一定とした。

表 6.1 各リアクターの基質組成

mg/L	R14, 16	R18, 19, 20, 21
酢酸ナトリウム 三水和物	408.0	283.3
酵母エキス	10.0	
ペプトン	10.0	
塩化カルシウム 二水和物	7.0	4.4
塩化マグネシウム 六水和物	72.6	45.4
塩化カリウム	33.6	21.0
塩化アンモニウム	14.1	8.8
硫酸アンモニウム	17.3	10.8
リン酸水素二カリウム	14.4	9.0
リン酸二水素カリウム	11.2	7.0
アリルチオ尿素	3.2	2.0

各リアクターは図 6.1 に示すように pH を設定した。なお、pH の制御は設定値 ± 0.1 になるように pH コントローラー（mk-250、ASR）を用いて制御した。pH 調整には 0.5N の塩酸および水酸化ナトリウム溶液を用いた。1 週間に 1 回程度ポータブル pH 計を用いて pH が正確に制御されているかを確認した。なお、R14 においては pH 変更後からモニタリングを開始したため、それ以前の運転日数はマイナスで表記した。

	運転日数						
	-49	0	27	30	51	53	62
R14	7.5		6.5				
R16		7.5					
R18		7.9	6.5				
R19		7.9					
R20		6.5	6.0			7.5	
R21		7.9	6.5				

図 6.1 各リアクターの pH（全て表記の ± 0.1 に設定）

6.2.2 活性汚泥試料の採取および水質モニタリング

6.2.2.1 活性汚泥試料の採取

定量 PCR 法、PCR-DGGE 法および FISH 法に用いた汚泥試料は好気終了時に採取した。採取した汚泥は直ちに -80 °C にて保存した。汚泥試料は原則 2 日に 1 回の頻度で採取した。

6.2.2.2 水質モニタリング

以下の項目においてモニタリングをおこない、リアクターの運転およびリンの処理状況を把握した。水質モニタリングは原則 2 日に 1 回の頻度でおこなった。

溶存態リンおよび酢酸

採取した汚泥試料を遠心分離 (3500rpm、5 分) し、上澄みを 0.45 μ m のシリンジフィルターでろ過した。この試料を、キャピラリー電気泳動 (CIA、Waters) を用いて測定した。検量線は測定毎に調製した標準液を用いて作成し、各試料の測定値を算出した。2 日に 1 回のモニタリングでは、嫌気および好気終了時に試料を採取し、測定した。さらに 1 週間に 1 回程度、1 サイクルにおける詳細な挙動を把握するため、嫌気 0、15、30、45、90 分および好気 15、30、45、150 分に試料を採取し、測定した。

MLSS および MLVSS

下水道試験法 (1997) に従い MLSS は遠心分離法、MLVSS は強熱減量法を用いて測定した。

リン含有率

MLVSS に対するリン含有率を測定した。リン含有率の算出は式 4.1 (4 章) にしたがった。全リンは下水道試験法 (1997) に従い、ペルオキシ二硫酸カリウム分解法により分解し、アスコルビン酸法によって測定した。溶存態リンは上述の通り CIA を用いて測定した。

6.2.3 定量 PCR 法

6.2.3.1 DNA 抽出

-80 °C に保存しておいた汚泥試料を解凍し、1mg MLVSS となるように必要量の汚泥を採取して、12000g (15,000rpm) 3 分間遠心分離をした後、上澄みを取り除いた。このペレット状になった汚泥から、MORA-EXTRACT (極東製薬工業) を用いて DNA を抽出した。抽出操作は基本的に同社のプロトコルにしたがったが、熱処理は全て 70 °C でおこなった。抽出した DNA サンプルを滅菌した超純水に溶解し、分光光度計 (NanoDrop ND-1000、NanoDrop Technologies) を用いてその DNA 濃度を測定した。

6.2.3.2 定量 PCR 法

6.2.3.1 に示した方法で抽出した DNA 試料を用いて、‘*Accumulibacter*’および全細菌を定量 PCR 法によって定量した。‘*Accumulibacter*’および全細菌の定量 PCR 法は 5.2.2.2 および、5.3.1 に示した条件でおこなった。

なお、同一のリアクターから抽出した DNA 試料の定量 PCR 法による測定は、すべて同じ日に測定をした。検量線は測定毎に作成した。また、解離曲線解析によって、全ての試料が正確に PCR 増幅されていることを確認した。

6.2.4 PCR-DGGE 法

6.2.4.1 PCR

PCR 法によって 16S rRNA 遺伝子の 341 ~ 534 (*E. coli* position) 領域 (V3 領域を含む領域) を増幅した。プライマーは全細菌に特異的なプライマーである 357fGC : 5'-GC クランプ -CCTACgggAggCAgCAg-3' (GC ク ラ ン プ : 5'-CgCCCgCCgCgCgCgggCggggCgggggCACgggggg-3') および全生物に特異的な 518r : 5'-ATTACCGCggCTgCTgg3'を用いた。

DNA polymerase は Ampli Taq Gold DNA polymerase (PE Applied Biosystems 社)を用い、PCR 反応液の組成は、同社のプロトコルにしたがった。DNA 試料は、6.2.3.1 にて抽出した DNA を、PCR 反応液における DNA の濃度が 1ng/μl となるように希釈して、添加した。

サーマルサイクラーは T3 Thermocycler (Biometra)を用いた。PCR 反応として、95 10 分で Hot Start をおこなった後、94 30 秒、53 30 秒、72 30 秒のサイクルを 30 回おこなひ、最後に 72 10 分間の伸長をおこなった。

6.2.4.2 DGGE

DGGE は基本的には Muyzer et al. (1993) の方法にしたがっておこなった。詳しいプロトコルは福島 (2003) に記した。DGGE 法のグラジエントゲルの作成と泳動には、Bio-Rad 社の Dcode システムを用いた。ゲルの濃度勾配は 30% ~ 60% とし、泳動条件は 130V、60 分で 5 時間または 6 時間とした。泳動後のゲルは SYBR GREEN で 15 分以上染色し、UV トランスイルミネーター (FAS- 、TOYOBO) で撮像した。

6.2.5 FISH 法およびポリリン酸染色法

FISH 法およびポリリン酸染色法である高濃度 DAPI 染色法 (Kawaharasaki et al., 1999) を組み合わせることで、ポリリン酸を蓄積している細菌を探索した。表 6.2 に用いた FISH プローブをまとめた。

高濃度 DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) 染色法では、まず、スライドガラスに固定した汚泥試料に、50 ~ 100mg/L に調製した DAPI 溶液を適当量添加し、染色する。ついで紫外光にて励起すると、ポリリン酸グラニューールが黄色い蛍光を発する。なお、DNA は青白

い蛍光を発する。

FISH 法と高濃度 DAPI 染色法を組み合わせる方法は 2 通りの方法がある。一つは 3.2.2.1 に示したとおりに FISH をおこない、その後乾燥させたスライドに高濃度 DAPI を添加する方法である。しかしながら、この方法では細菌がポリリン酸を蓄積しているにも関わらず黄色い蛍光が検出されない場合がある。この原因として、ハイブリダイゼーションをおこなう際にポリリン酸グラニューールが菌体から溶出してしまう可能性が指摘されている（小貫、2001）。

そこで、もう一つの方法では、先に高濃度 DAPI 染色したスライドを観察した後に、FISH をおこなう。この方法の手順を以下に示す。

- 1 . 80 °C で保存しておいた汚泥サンプルを解凍し、固定を 30 分から 1 時間の間でおこなう。
- 2 . 固定したサンプルをスライドグラス上に定着させ、エタノール脱水を各エタノール濃度（50、80 および 98%）につき数秒でおこなう。
- 3 . 定着したスライドに高濃度 DAPI 染色をおこなう。
- 4 . 退色防止剤を添加したスライドを検鏡し、ポリリン酸グラニューールを蓄積している細菌を撮像し、その際の視野の位置を確認しておく。
- 5 . 検鏡の後、カバーグラスをはずし超純水で軽く洗浄する。
- 6 . 洗浄したスライドグラスを自然乾燥させ、ハイブリダイゼーションおよび洗浄を通常の FISH 法と同じ操作をおこなう。
- 7 . 退色防止剤を添加したスライドを検鏡し、3. で撮像したのと同じ視野を探して、撮像する。
- 8 . 高濃度 DAPI 染色法、および FISH 法で撮像した画像を画像解析ソフト（Adobe Photoshop など）を用いて重ねあわせることによって、ポリリン酸を蓄積している細菌を同定する。

この方法の欠点は、手順が煩雑であること、また、FISH 法の洗浄操作の際にプレパラート上の細胞が流出してしまうことが多いことである。しかし、1 番目の方法と比べると、細胞がプレパラート上に残っていさえすれば、ポリリン酸の蓄積の有無をより確実に判別することができる。そこで、本章では、基本的に DAPI 染色を先におこなう方法で検討した。また、細胞の流出に対処するために、1 つのサンプルにつき 20 視野程度画像を撮っておこなった。

表 6.2 FISH 法で使用したプローブ

Probe name	Probe sequence (5'-3')	Reported specificity	FA (%) ^a	Reference
Actino_1011	TTGCGGGGCACCCAT CTCT	Actino-PAOs	30	Lie et al. (2001)
ALF968	GGTAAGGTTCTGCGC GTT	Alphaproteobacteria	20	Neef (1997)
Bet42a	GCCTTCCCACATTCGT TT	Betaproteobacteria	35	Manz et al. (1992)
Bet42a competitor ^b	GCCTTCCCACATTCGT TT	-	35	Manz et al. (1992)
Gam42a	GCCTTCCCACATTCGT TT	Gammaproteobacteria	35	Manz et al. (1992)
Gam42a competitor ^b	GCCTTCCCACATTCGT TT	-	35	Manz et al. (1992)
HGC69a	TATAGTTACCACCGC CGT	Actinobacteria	25	Roller et al. (1994)
HGC69a competitor ^b	TATAGTTACGGCCGC CGT	-	25	Roller et al. (1994)
LGC354A ^c	TGGAAGATTCCCTAC TGC	Firmicutes	35	Meier et al. (1999)
LGC354B ^c	CGGAAGATTCCCTAC TGC	Firmicutes	35	Meier et al. (1999)
LGC354C ^c	CCGAAGATTCCCTAC TGC	Firmicutes	35	Meier et al. (1999)
CF319a	TGGTCCGTGTCTCAG TAC	most Flavobacteria, some Bacteroidetes, some Sphingobacteria	35	Manz et al. (1996)
GNSB_941	AAACCACACGCTCC GCT	green nonsulfur bacteria	35	Gich et al. (2001)
EUB338 ^d	GCTGCCTCCCGTAG GAGT	Most Bacteria	35	Amann et al. (1995)
EUB338-IIId	GCAGCCACCCGTAG GTGT	Planctomycetales	35	Daims et al. (1999)
EUB338-IIId	GCTGCCACCCGTAG GTGT	Verrucomicrobiales	35	Daims et al. (1999)

^a ホルムアミド濃度^b 蛍光標識しないプローブをcompetitorとした。^c 混合したものをLGC MIX プローブとした。^d 混合したものをEUB MIX プローブとした。

6.3 実験結果

6.3.1 pH 低下型リアクター 1 ; R14 ($\text{pH}7.5 \pm 0.1$ 6.5 ± 0.1)

図 6.1 に示すとおり、R14 では $\text{pH}7.5 \pm 0.1$ にて 49 日間運転した後に、 $\text{pH}6.5 \pm 0.1$ に変更して 51 日間運転した。本節においては $\text{pH}6.5 \pm 0.1$ に変更する前日を 0 日目として、変更後の結果について説明する。

6.3.1.1 リアクターの水質モニタリング結果

各項目の経日変化 (MLSS、MLVSS、溶存リン酸イオン、酢酸およびリン含有率) を図 6.2 ~ 6.5 に示した。

図 6.2 に示したとおり、MLSS は 2500mg/L 程度、MLVSS は 2000mg/L 弱とともに 18 日目までは安定していたが、その後徐々に減少する様子が見られ、51 日目には 1000 以下まで減少した。

溶存態リンのモニタリング結果を図 6.3 に示す。0 日目すなわち pH 低下前では、嫌気終了時のリン濃度は 86.3mgP/L、好気工程においては完全にリンを摂取しており、非常に良好なリン除去が見られていた。pH 低下後は嫌気終了時のリン濃度が 50mgP/L まで下がったものの、6 日目までは完全にリンを摂取していた。しかしながら、その後は嫌気でのリンの吐出量が徐々に低下し、好気においてもリンの取り残しが見られるようになった。

酢酸のモニタリング結果を図 6.4 に示す。20 日目までは嫌気工程でほとんどが摂取されていたが、それ以降は嫌気での酢酸摂取は見られなくなった。

図 6.5 に示したとおり、リン含有率 (%/MLVSS) は 20 日目までは 10% 前後と高い値で安定していたが、その後はリン含有率が低下し、33 日目以降は 3% 以下の低い値で安定した。

6.3.1.2 ‘*Accumulibacter*’ の挙動

‘*Accumulibacter*’ の定量結果を図 6.6 に、全細菌に対する割合を図 6.7 に示す。pH を変更する前の 0 日目においては、‘*Accumulibacter*’ のコピー数は $7.7 \times 10^8 \text{copies/mgMLVSS}$ であったが、pH 変更後は急激に減少し、20 日目以降は 0 日目の 10 分の 1 程度まで減少した。全細菌に対する割合についても同様の傾向が見られ、0 日目では 18% と高い値を示していたが、20 日目以降は 1% 前後まで減少した。

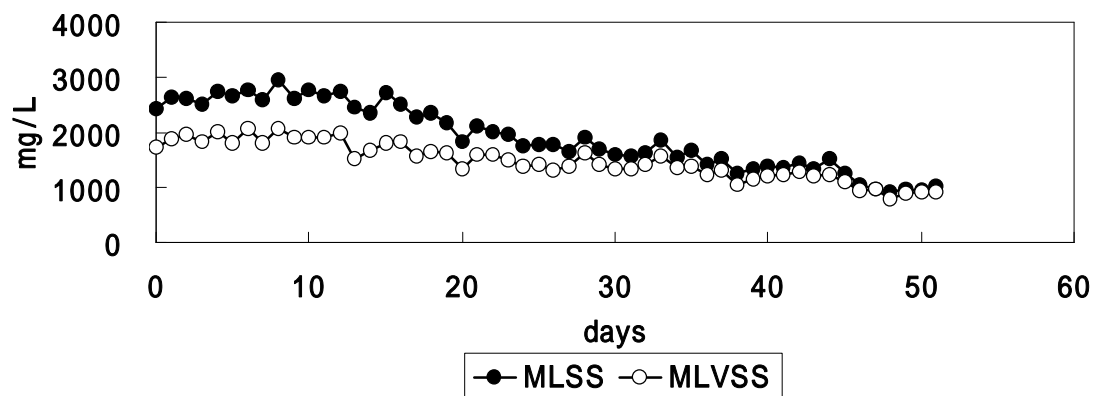


図 6.2 MLSS および MLVSS (R14)

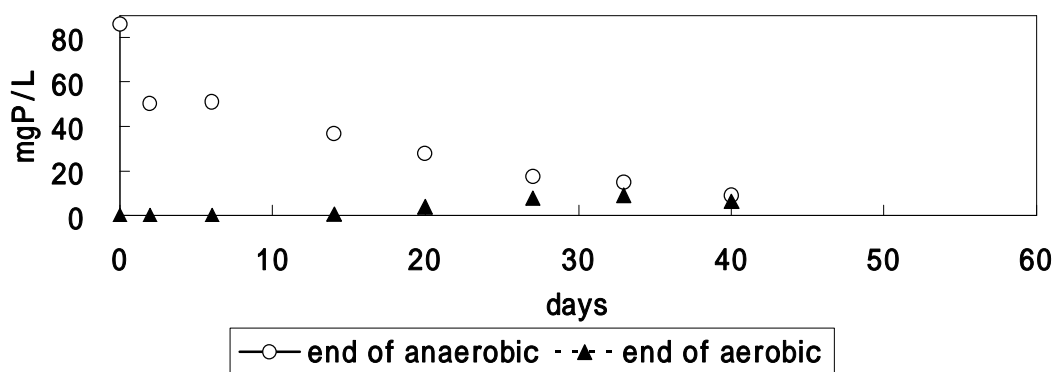


図 6.3 嫌気および好気終了時の溶存態リン (R14)

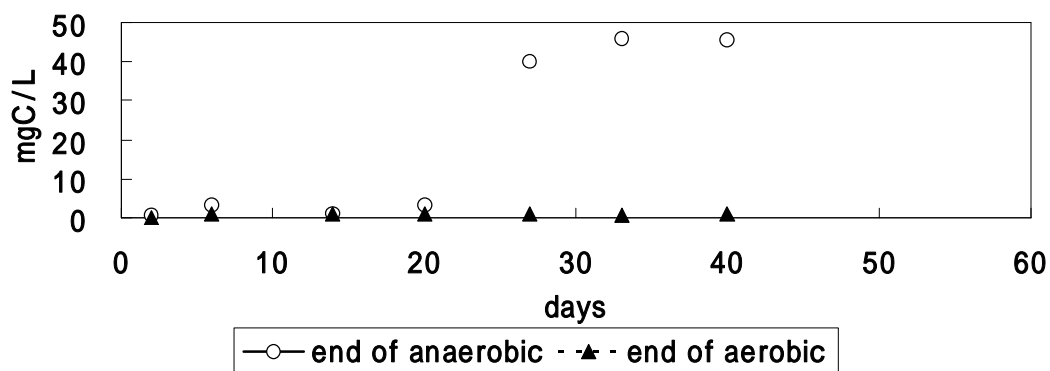


図 6.4 嫌気および好気終了時の酢酸 (R14)

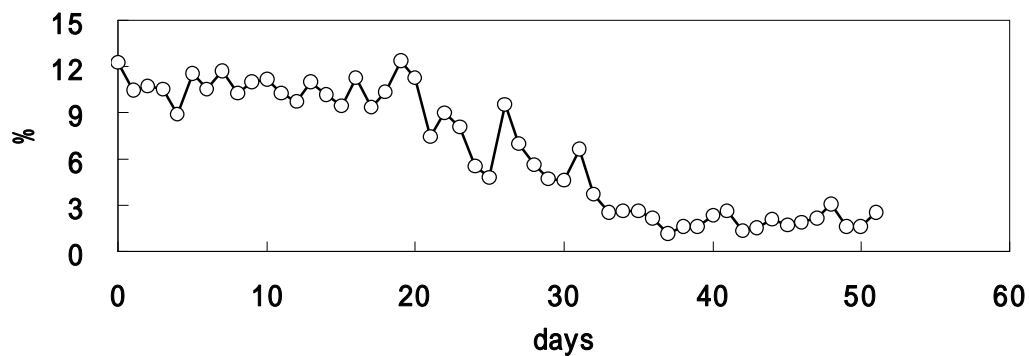


図 6.5 好気終了時の MLVSS に対するリン含有率 (R14)

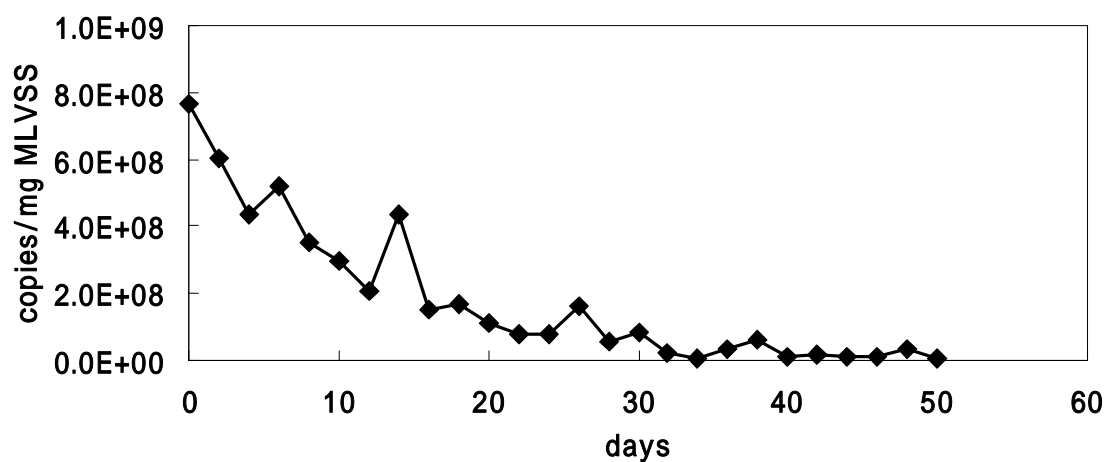


図 6.6 'Accumulibacter' の定量結果 (R14)

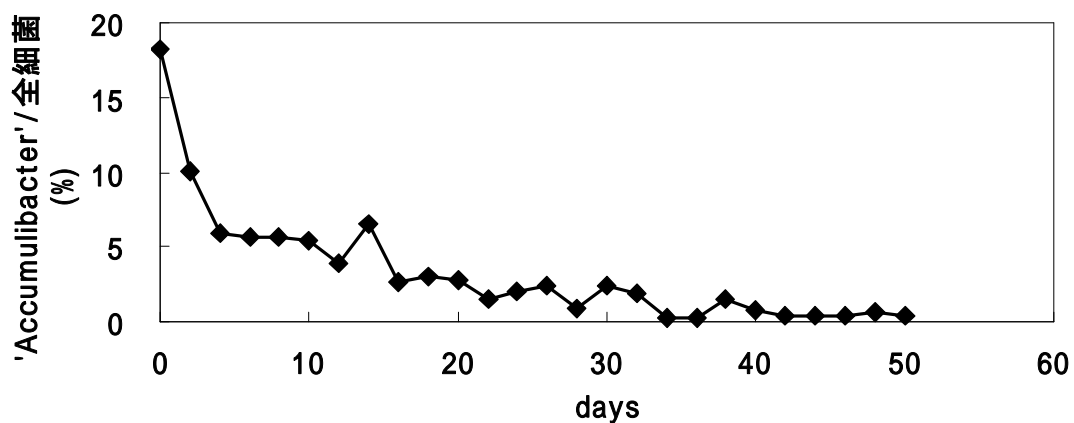


図 6.7 全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合 (R14)

6.3.1.3 細菌群集構造の変化

PCR-DGGE 法によって R14 の細菌群集構造の変化を解析した結果を図 6.8 に示す。バンド A は 'Accumulibacter' の検量線用 DNA の PCR 産物と同じ位置を示しており、運転日数を経るにつれて、バンドが薄くなる様子が見られた。一方で、バンド B は 16 日目から 32 日目に最も強度が強かった。

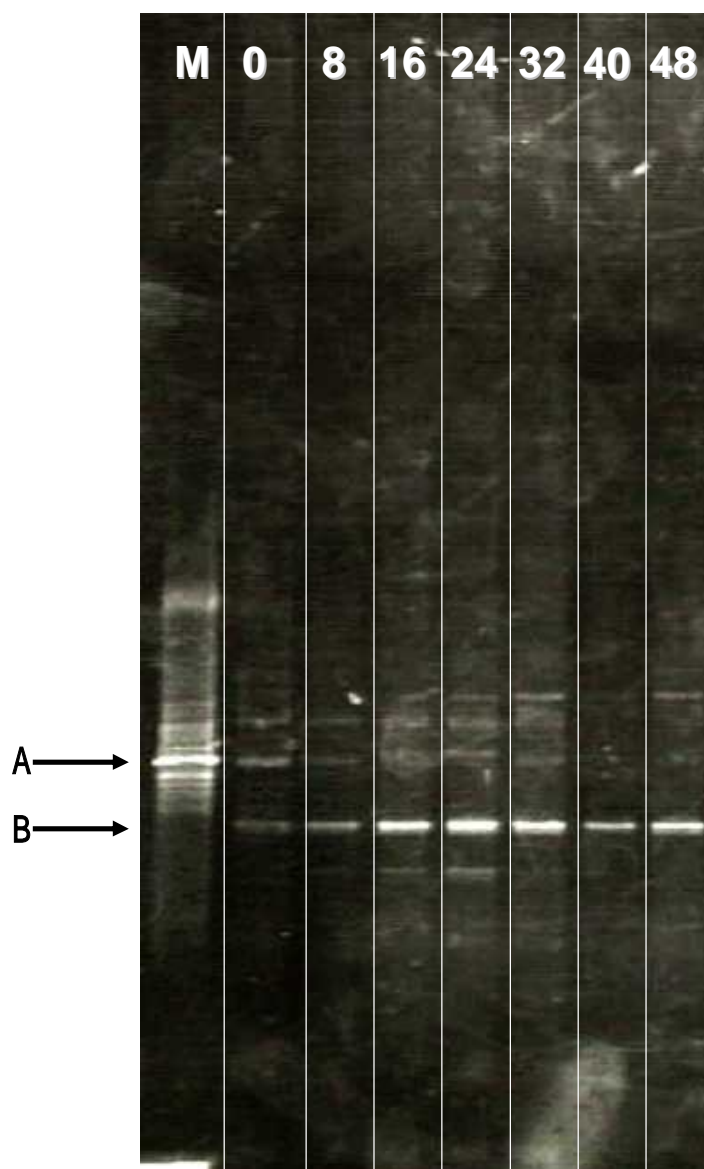


図 6.8 PCR-DGGE 法による群集解析結果 (R14)

(M は 'Accumulibacter' の検量線用 DNA の PCR 産物、そのほかの数字は運転日数)

6.3.2 pH 低下型リアクター 2 ; R18 (pH7.9±0.1 6.5±0.1)

R18 は図 6.1 に示すとおり、pH7.9±0.1 にて 27 日間運転した後に、pH6.5±0.1 に変更して 35 日間運転した。

6.3.2.1 リアクターの水質モニタリング結果

R18 における各項目の経日変化 (MLSS、MLVSS、溶存態リン、酢酸およびリン含有率) を図 6.9 ~ 6.12 に示した。また、図 6.15 に 1 サイクルにおける溶存態リンおよび酢酸の挙動を示した。

MLSS は図 6.9 に示したとおり、運転開始時は 3000mg/L 程度であったが、その後は減少し 2000mg/L 弱程度で安定した。MLVSS についても MLSS と同様の挙動を示し、1500mg/L 付近にて安定した。

溶存態リン (図 6.10) については、運転開始時から良好なリン除去を示していた。pH を変更するまで (27 日目) は、嫌気終了時のリン濃度は 60mgP/L 程度で安定し、好気で完全にリンを摂取していた。また、図 6.15 に示すとおり、27 日目までの嫌気におけるリンの放出は各サイクルの嫌気 45 分後までにほぼ終了していた。pH 変更後 (28 日目以降) は嫌気終了時のリン濃度が 30mgP/L 程度まで低下したが、好気で完全にリンを摂取しており、その後しばらくは安定していた。しかしながら、44 日目以降は好気にてリンを完全に摂取しきれなくなり、好気終了時におけるリン濃度が徐々に増加していく様子が見られた。これらの期間においても図 6.15 に示すとおり、リンの放出は嫌気 45 分後までにほぼ終了していた。

酢酸については、図 6.11 に示すとおり運転の全期間を通じて嫌気で全量摂取されていた。また、図 6.15 に示すとおり、運転の全期間を通じて、嫌気 45 分後までに全ての酢酸を摂取していた。

リン含有率 (%/MLVSS) は図 6.12 に示すとおり、運転開始から徐々に増加する傾向が見られ、20 日目以降は 10% 程度で安定した。しかし、53 日目以降は徐々にリン含有率が低下していく様子が見られた。

6.3.2.2 ‘*Accumulibacter*’ の挙動

‘*Accumulibacter*’ の定量結果を図 6.13 に示す。またその全細菌に対する割合を図 6.14 に示す。‘*Accumulibacter*’ のコピー数は運転開始後、徐々に増えていく様子が見られ、10 日目以降、 3×10^8 copies/mgMLVSS 程度で安定していた。23 日目以降、再びコピー数が増加する様子が見られ、30 日目から 38 日目の間は 5×10^8 copies/mgMLVSS 程度で安定した。しかしながら、38 日目以降は、減少していく様子が見られ、58 日目には 3×10^7 copies/mgMLVSS まで減少した。その後は、運転を終了する 62 日目まで若干コピー数が増加する様子が見られた。

全細菌に対する割合は、11 日目まで増加し、その後ややばらついたが 6% 程度で安定した。44 日目以降減少し、58 日目には 0.9% まで減少し、その後は僅かならが増加した。

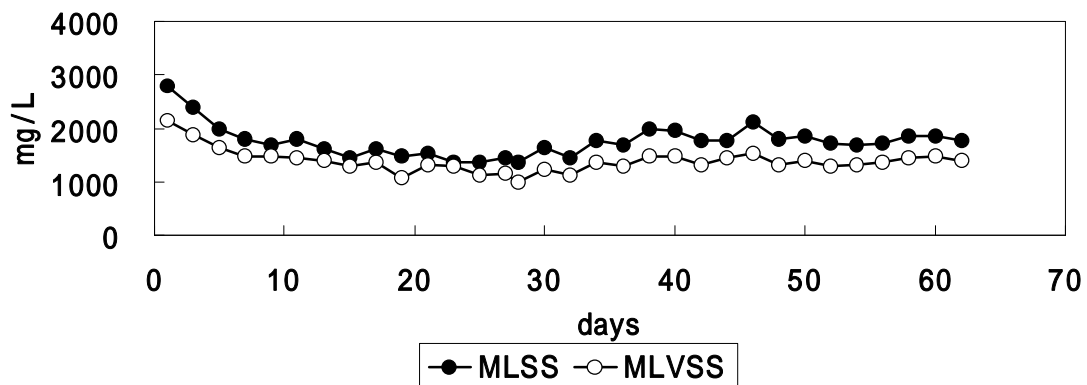


図 6.9 MLSS および MLVSS (R18)

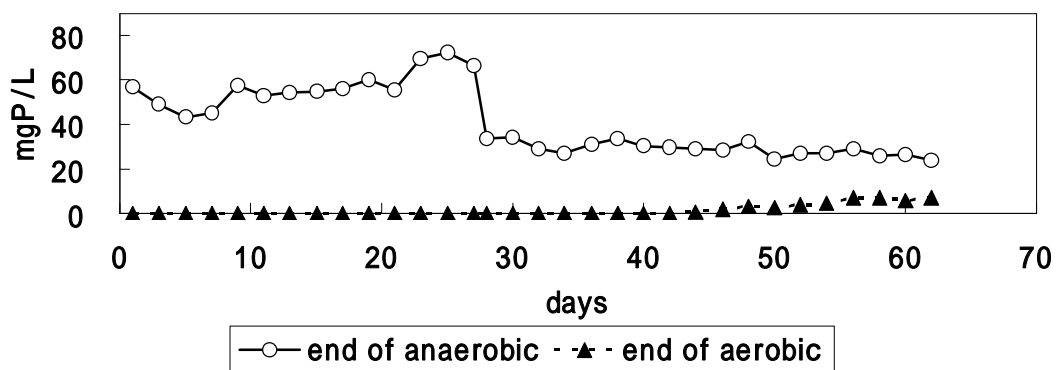


図 6.10 嫌気および好気終了時の溶存態リン (R18)

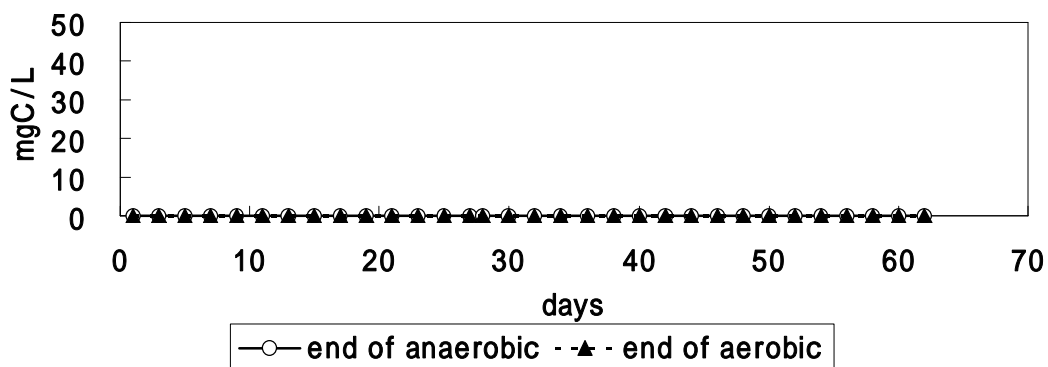


図 6.11 嫌気および好気終了時の酢酸 (R18)

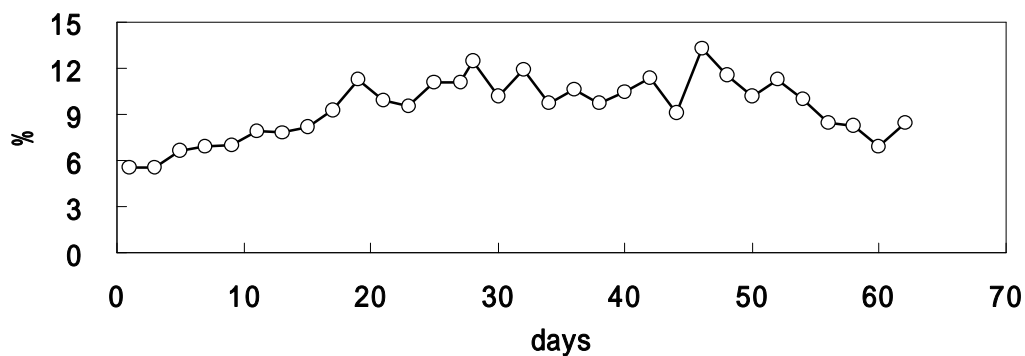


図 6.12 好気終了時の MLVSS に対するリン含有率 (R18)

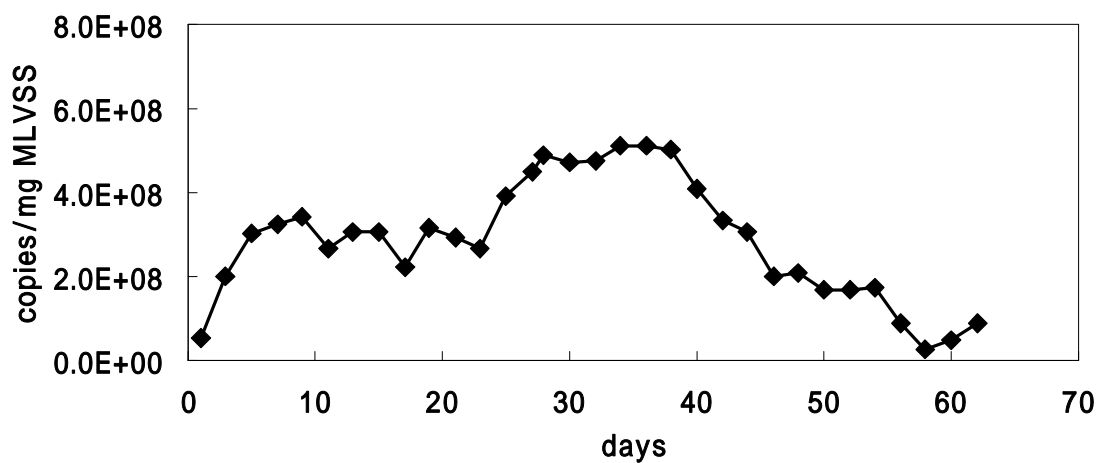


図 6.13 'Accumulibacter' の定量結果 (R18)

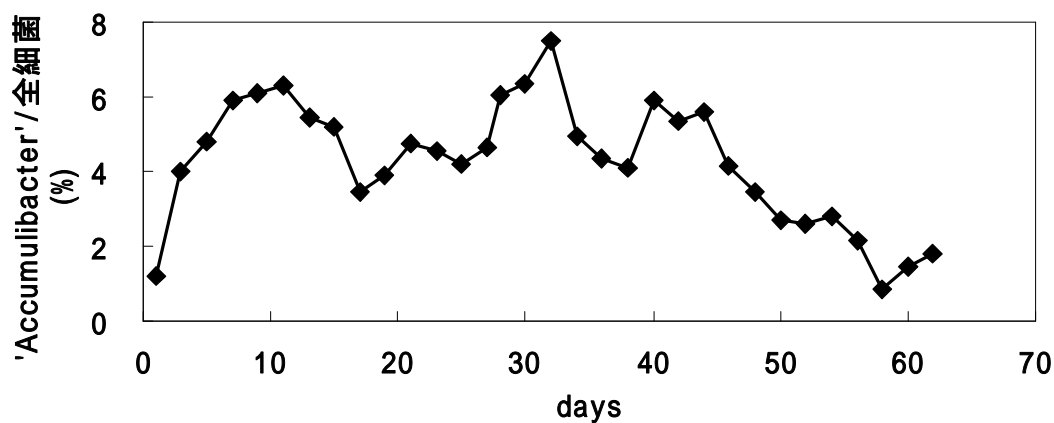


図 6.14 全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合 (R18)

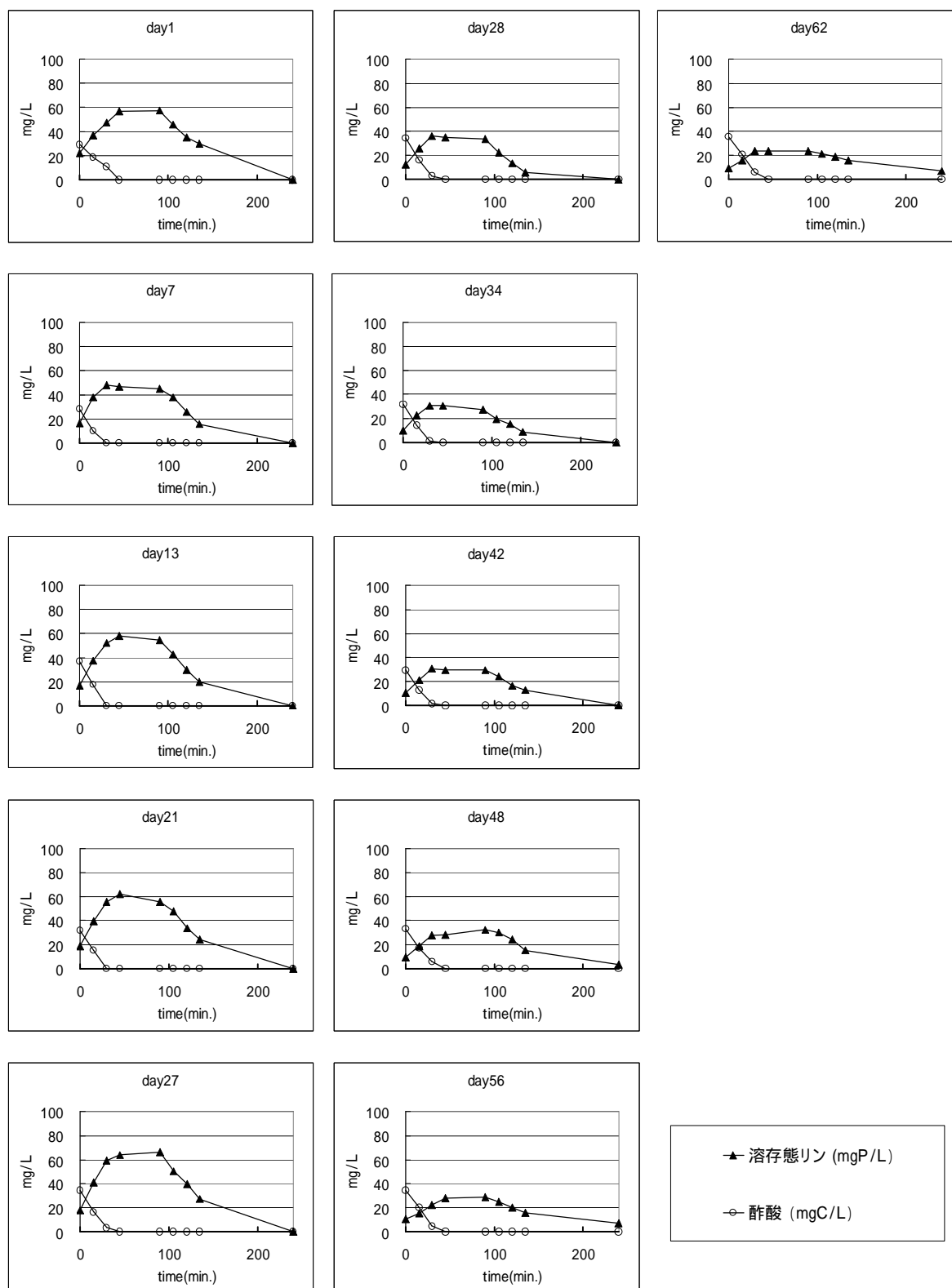


図 6.15 1 サイクルにおける溶存態リンおよび酢酸の挙動 (R18)

6.3.2.3 細菌群集構造の変化

PCR-DGGE 法によって R18 の細菌群集構造の変化を解析した結果を図 6.16 に示す。試験期間を通じて、‘*Accumulibacter*’と同じ位置にあるバンドは目視においては見られなかった。但しこれは、トランスイルミネーターによるバンドの検出感度等が起因しており、実際には図 6.13 に示した通り ‘*Accumulibacter*’ は存在していると考えられる。また、バンド A は 40 日目以降、強度を増した。

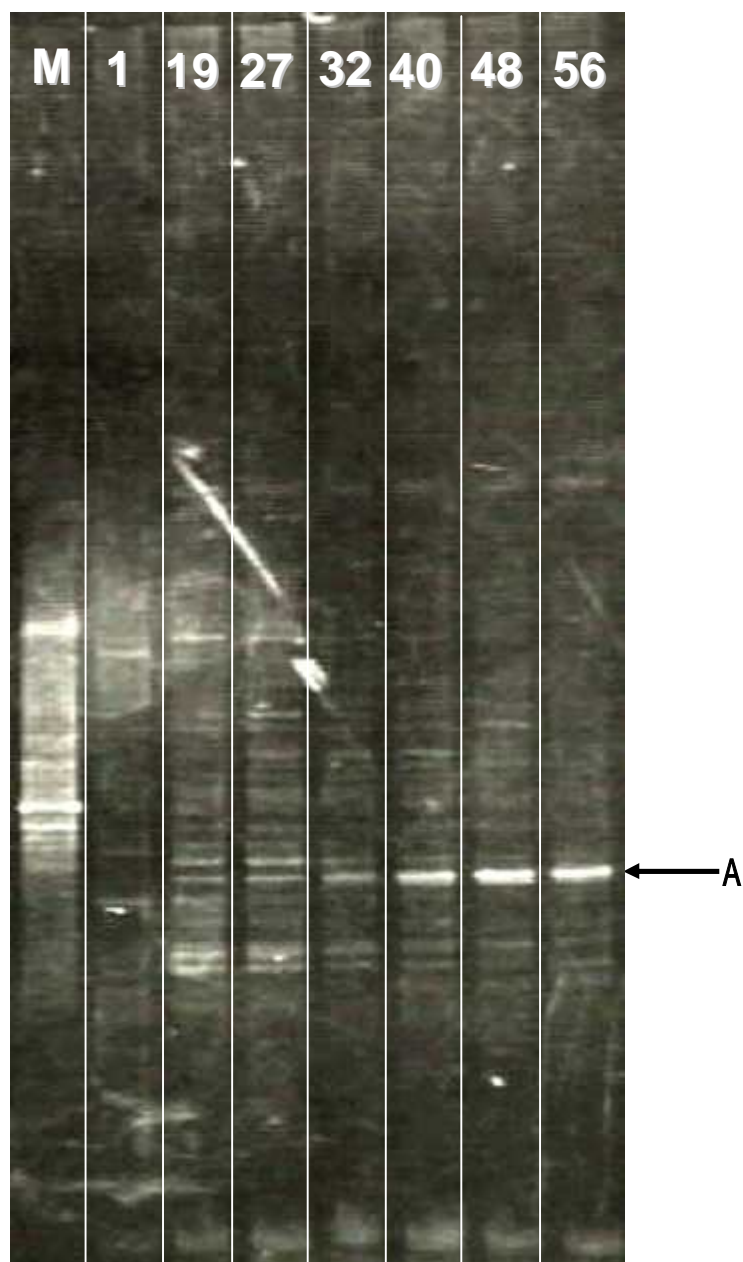


図 6.16 PCR-DGGE 法による群集解析結果 (R18)

(M は ‘*Accumulibacter*’ の検量線用 DNA の増幅産物、そのほかの数字は運転日数)

6.3.3 pH 低下型リアクター 3 ; R21 ($\text{pH}7.9 \pm 0.1$ 6.5 ± 0.1)

R21 は図 6.1 に示すとおり、R18 と同じ pH 条件にて運転した。また、そのほかの運転条件についても、運転開始日および種汚泥の採取日を除いて全て同じ条件とした。

6.3.3.1 リアクターの水質モニタリング結果

R21 における各項目の経日変化 (MLSS、MLVSS、溶存態リン、酢酸およびリン含有率) を図 6.17 ~ 6.20 に示した。また、図 6.23 に 1 サイクルにおける溶存態リンおよび酢酸の挙動を示した。

MLSS および MLVSS は図 6.17 に示したとおり、運転開始時から 11 日目まで増加した。これは汚泥引抜のチューブにトラブルがあり、この期間、適切な量の汚泥が引き抜かれていなかったことに起因する。その後は MLSS、MLVSS とともに減少していく様子がみられ、20 日目以降においては、MLSS は 2000mg/L 弱、MLVSS は 1500mg/L 付近にて安定した。

溶存態リンの挙動を図 6.18 に示す。運転開始時においては嫌気終了時のリン濃度は 30mgP/L 程度であり、好気では僅かながらリンを摂取しきれていなかった。その後徐々に嫌気終了時におけるリン濃度が上昇し、60 ~ 80mgP/L 程度で安定した。pH 変更前 (27 日目) までは、好気にてリンを完全に摂取していた。図 6.23 に示したとおり、27 日目までにおける嫌気でのリンの挙動は、R18 とは異なり、嫌気工程の 90 分間において常にリンを吐き出していた。pH 変更後 (28 日目以降) においては、嫌気終了時のリン濃度が 40mgP/L 程度まで低下したが、50 日目までは安定しており、好気においてもリンを完全に摂取していた。50 日目以降においては、リンの吐出し量が 30mgP/L 程度まで低下し、56 日目以降は好気でリンを摂取しきれなくなった。

酢酸については図 6.19 に示すとおり、運転開始から 7 日目までは嫌気において取り残しが見られたが、それ以降は嫌気で完全に摂取していた。

リン含有率 (%/MLVSS) は図 6.20 に示したとおり、運転開始から徐々に増加する傾向が見られ、10%程度で安定したが、53 日目以降は徐々にリン含有率が低下した。

6.3.3.2 ‘*Accumulibacter*’ の挙動

‘*Accumulibacter*’の定量結果を図 6.21 に、全細菌に対する割合を図 6.22 にそれぞれ示す。‘*Accumulibacter*’のコピー数は、運転開始後徐々に増えていった。その後、 4×10^8 copies/mgMLVSS 程度でしばらく安定していたが、46 日目以降は減少した。全細菌に対する割合は、11 日目まで増加し、その後 8%程度で安定した。その後 30 ~ 34 日目にかけ急激に減少し、34 日目以降は徐々に減少した。但し、34 ~ 48 日目における全細菌のコピー数は、他の期間の 2 倍程度の値となっていたため、それらの期間においては、正確な定量ができていなかった可能性がある。

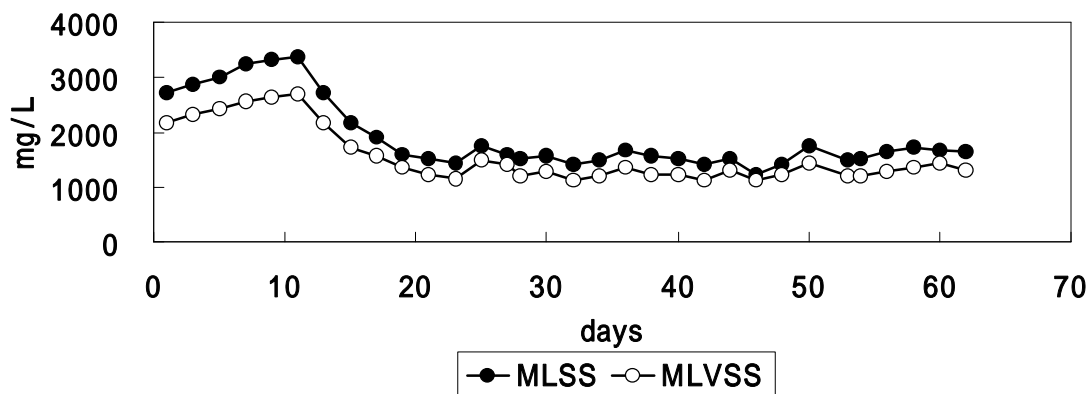


図 6.17 MLSS および MLVSS (R21)

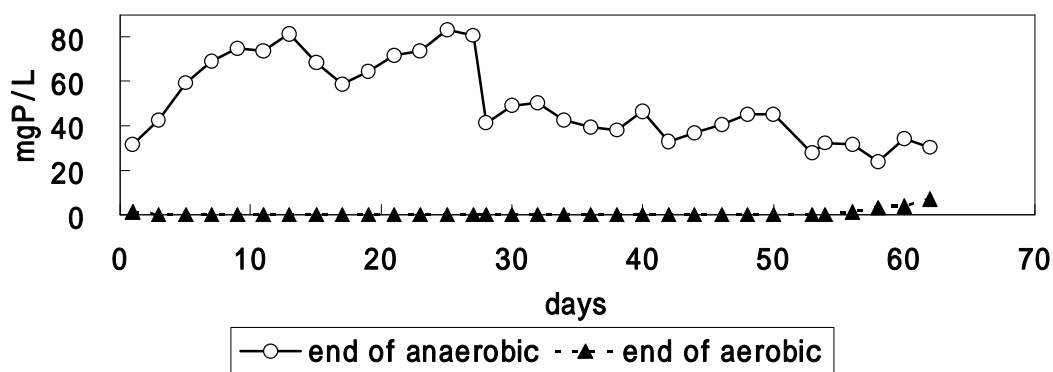


図 6.18 嫌気および好気終了時の溶存態リン (R21)

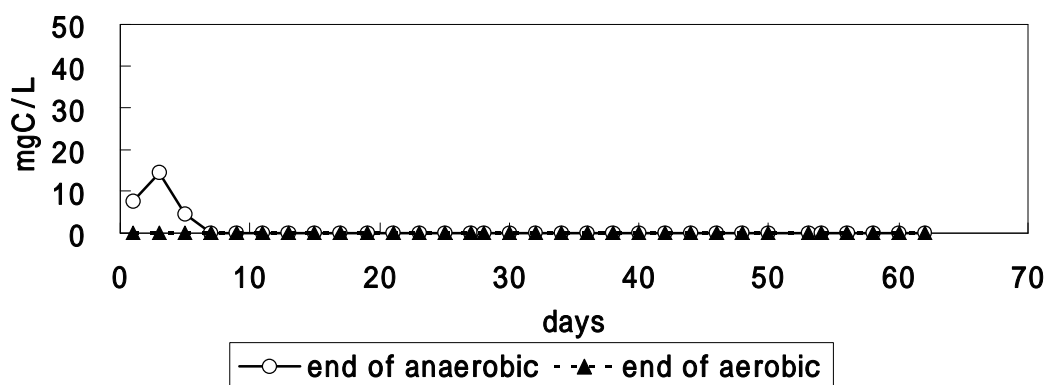


図 6.19 嫌気および好気終了時の酢酸 (R21)

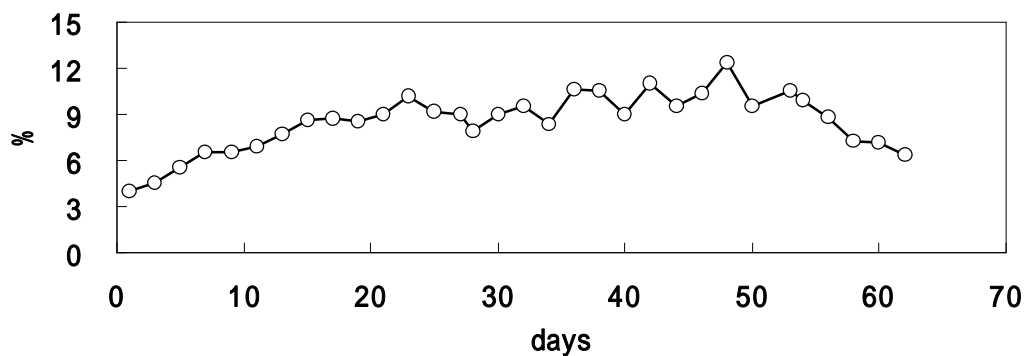


図 6.20 好気終了時の MLVSS に対するリン含有率 (R21)

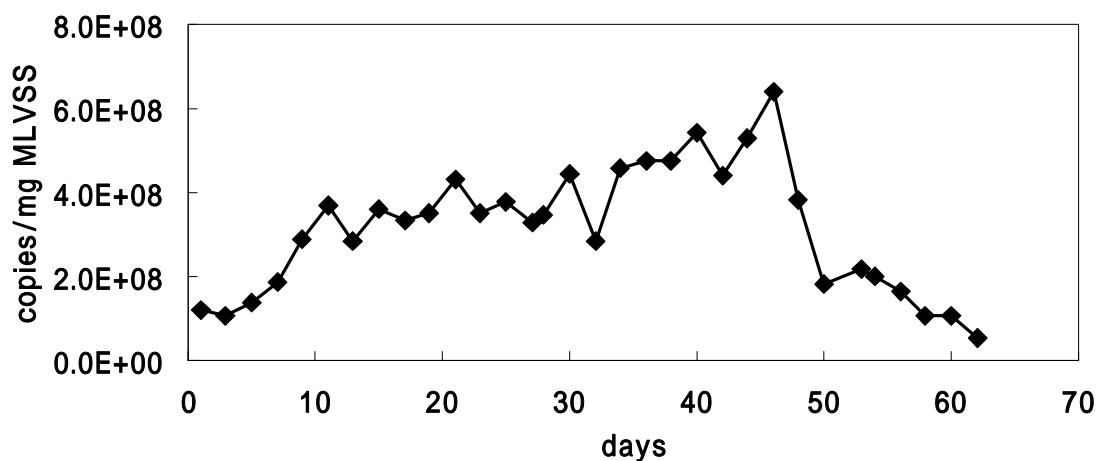


図 6.21 'Accumulibacter' の定量結果 (R21)

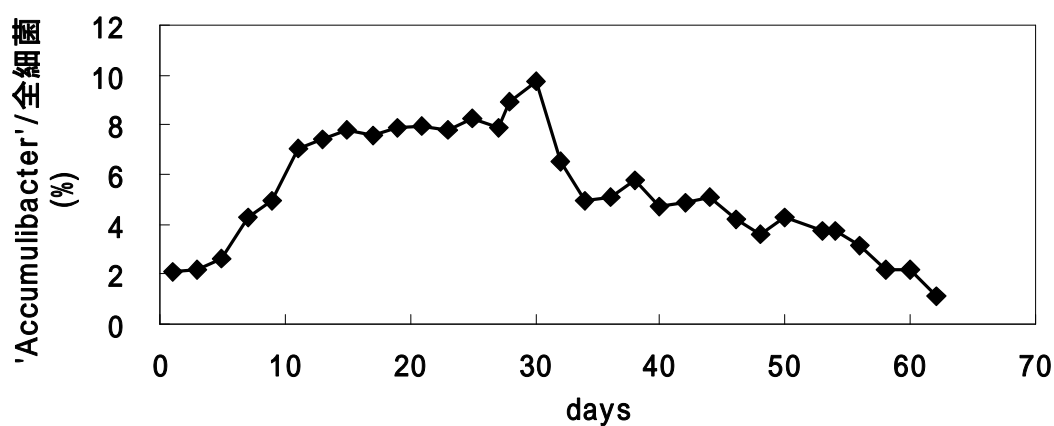


図 6.22 全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合 (R21)

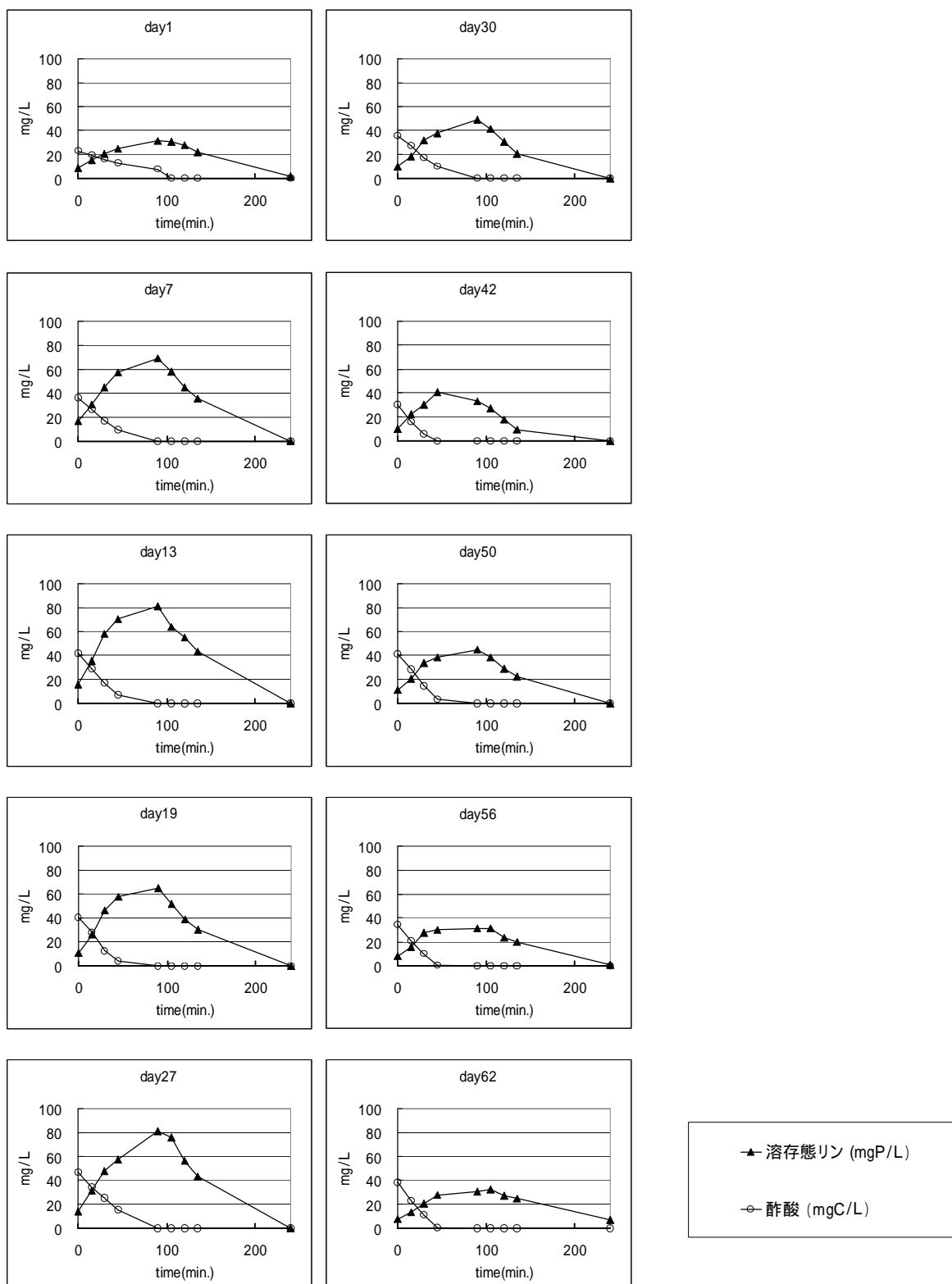


図 6.23 1 サイクルにおける溶存態リンおよび酢酸の挙動 (R21)

6.3.3.3 細菌群集構造の変化

PCR-DGGE 法によって R21 の細菌群集構造の変化を解析した結果を図 6.24 に示す。バンド A およびバンド B は運転開始から徐々に強度を増した。バンド A は 40 日目が最も強度が強く、その後はバンドが薄くなっていった。バンド B は 25、33 および 40 日にはっきりとみられ、その後は薄くなっていった。また、バンド C は 60 日目に強い強度で見られた。

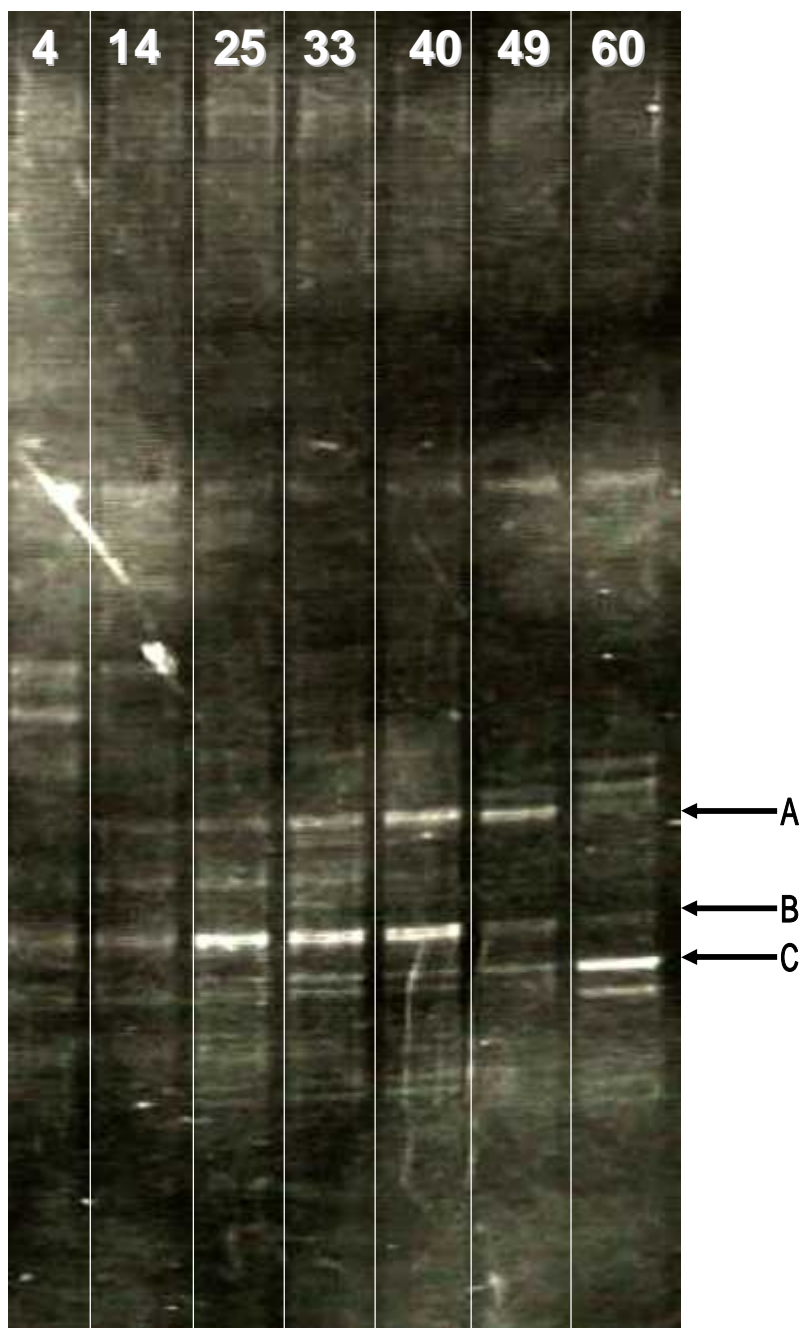


図 6.24 PCR-DGGE 法による群集解析結果 (R21)
(数字は運転日数)

6.3.4 pH 低下型リアクター 4 ; R20 ($\text{pH}6.5 \pm 0.1$ 6.0 ± 0.1 7.5 ± 0.1)

R20 は図 6.1 に示すとおり、 $\text{pH}6.5 \pm 0.1$ にて 27 日間運転した後に、 $\text{pH}6.0 \pm 0.1$ に変更して 53 日目まで運転した。その後は pH を 7.5 ± 0.1 に変更して 62 日目まで運転した。このように、R20 ではリン除去に悪影響を及ぼすと考えられる $\text{pH}6.5$ にて運転を開始することで、リン除去の立ち上がりの有無を検討した。28 日目以降さらに pH を下げた後、53 日目に pH を 7.5 に上げることでリン除去能が復活するかを検討した。なお、本系は R21 と同じ種汚泥を用いて、同日に運転を開始した。

6.3.4.1 リアクターのモニタリング結果

R20 における各項目の経日変化 (MLSS、MLVSS、溶存態リン、酢酸およびリン含有率) を図 6.25 ~ 6.28 に示した。また、図 6.31 に 1 サイクルにおける溶存態リンおよび酢酸の挙動を示した。なお、50 日目に pH コントローラーのトラブルがあり、同日においては正確に pH を制御することができなかった。

MLSS および MLVSS は図 6.25 に示したとおり、運転開始後徐々に低下していった。20 日目以降は、MLSS は 2000mg/L 弱、MLVSS は 1500mg/L 程度にて安定していた。なお、25 日目に MLSS、MLVSS が増加しているが、これはリアクターの内壁に付着していた汚泥をはがしたためである。

溶存態リンの挙動を図 6.26 に示す。運転開始時、嫌気終了時のリン濃度は 30mgP/L 程度であり、好気にて完全にリンを摂取していた。R18 や R21 とは異なり、嫌気終了時のリン濃度が増加していく様子は見られず、 30mgP/L 程度で安定していた。但し、好気では完全にリンを摂取していた。pH 変更後 (28 日目以降) においては徐々に嫌気終了時のリン濃度が減少し、40 日目以降においては好気でリンを摂取しきれなくなった。53 日目以降は pH を 7.5 に上昇させたが、変化は見られず、リン除去の改善は見られなかった。また、図 6.31 に示したとおり、運転開始後、嫌気終了時のリン濃度は変化が無かったものの、嫌気におけるリンの吐き出し速度が上がる様子がみられ、19 および 27 日目においてはリンの吐き出しのほとんどは嫌気開始後 45 分間におこなわれていた。

嫌気での酢酸の摂取については、図 6.27 に示すとおり運転開始から 7 日目までは取り残しが見られたが、それ以降は完全に摂取していた。50 日目は上述のとおり、正確に pH が制御できなかったこともあり、嫌気で酢酸をほとんど摂取できなかった。53 日目以降は、徐々に嫌気で摂取しきれない酢酸の量が増えていった。

リン含有率 (%/MLVSS) は図 6.28 に示したとおり、運転開始から徐々に増加する傾向が見られ、10%程度で安定したが、40 日目以降は急激にリン含有率が低下していく様子が見られた。50 日目以降は 2%程度で安定した。

6.3.4.2 ‘*Accumulibacter*’ の挙動

‘*Accumulibacter*’の定量結果を図 6.29 に、全細菌に対する割合を図 6.30 にそれぞれ示す。‘*Accumulibacter*’のコピー数は運転開始後徐々に増えていく様子が見られた。ややばらついた結果となったが、27 日目には 4.5×10^8 copies/mgMLVSS まで増加した。28 日目以降は徐々に減少し、44 日目からは、急激に減少した。その後は低い値で推移した。全細菌に対する割合は 11 日目にかけて上昇し、その後、8%付近で安定した。25 日目以降、その割合が徐々に低下した。pH を 7.5 に上げた 53 日目以降においても、‘*Accumulibacter*’のコピー数および全細菌に対する割合は増加しなかった。

また、27 日目における‘*Accumulibacter*’のコピー数および全細菌に対する割合は、R21 の 27 日目とほぼ同じ値であった。

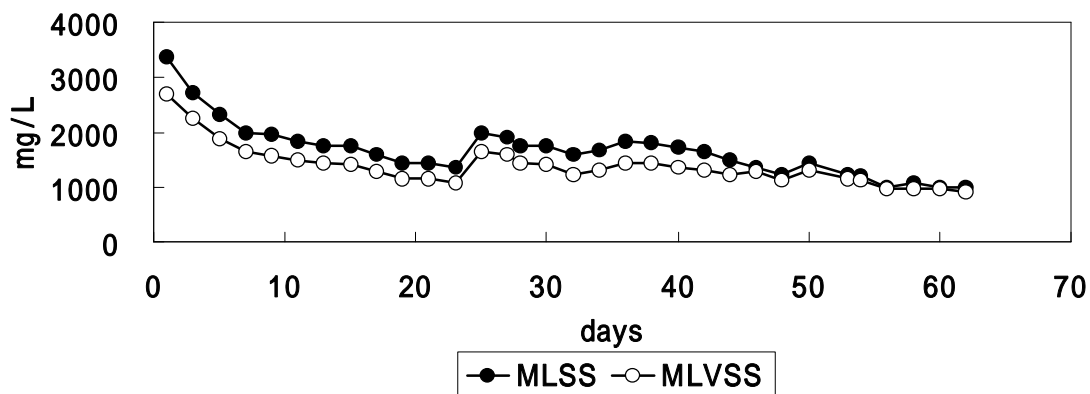


図 6.25 MLSS および MLVSS (R20)

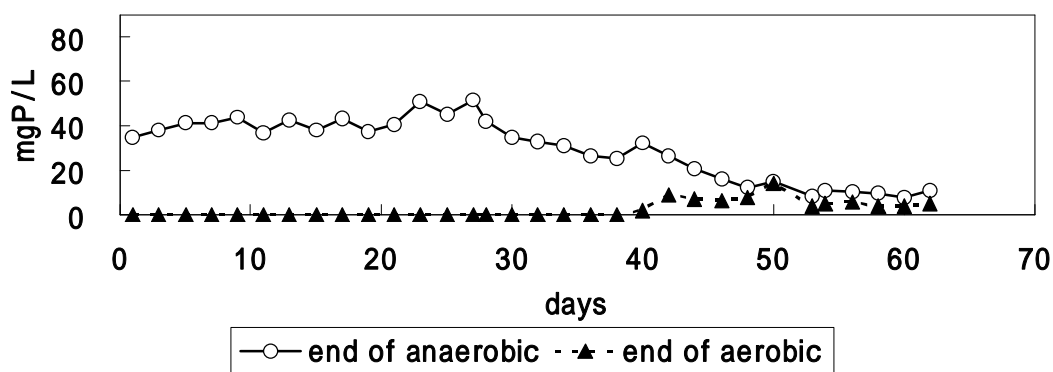


図 6.26 嫌気および好気終了時の溶存態リン (R20)

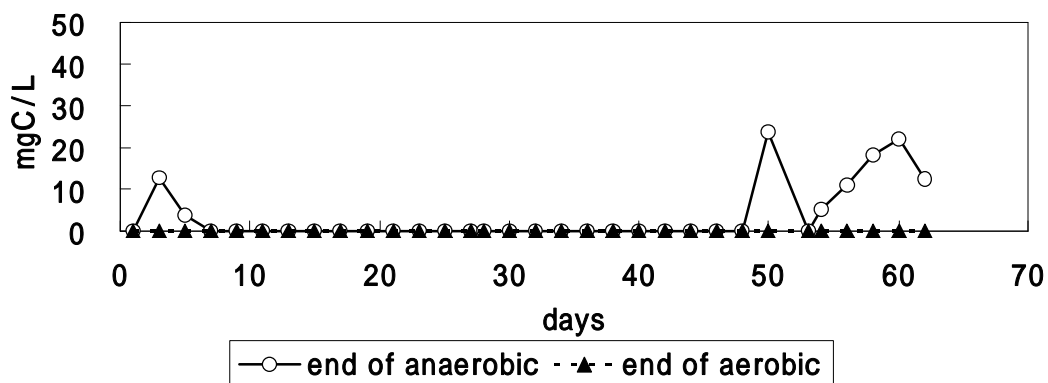


図 6.27 嫌気および好気終了時の酢酸 (R20)

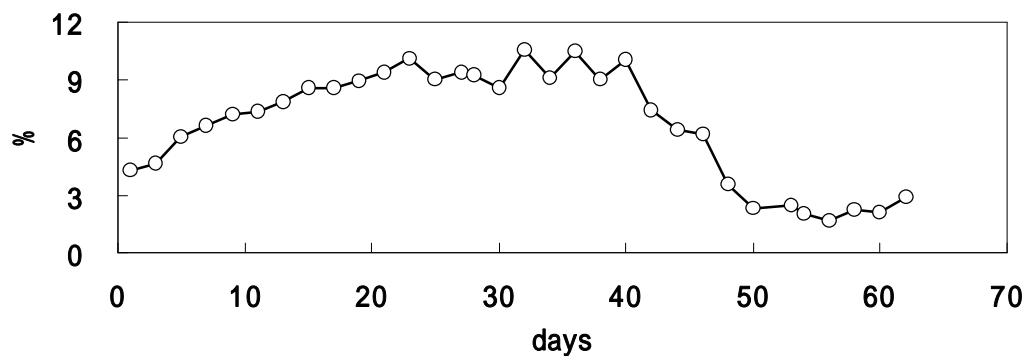


図 6.28 好気終了時の MLVSS に対するリン含有率 (R20)

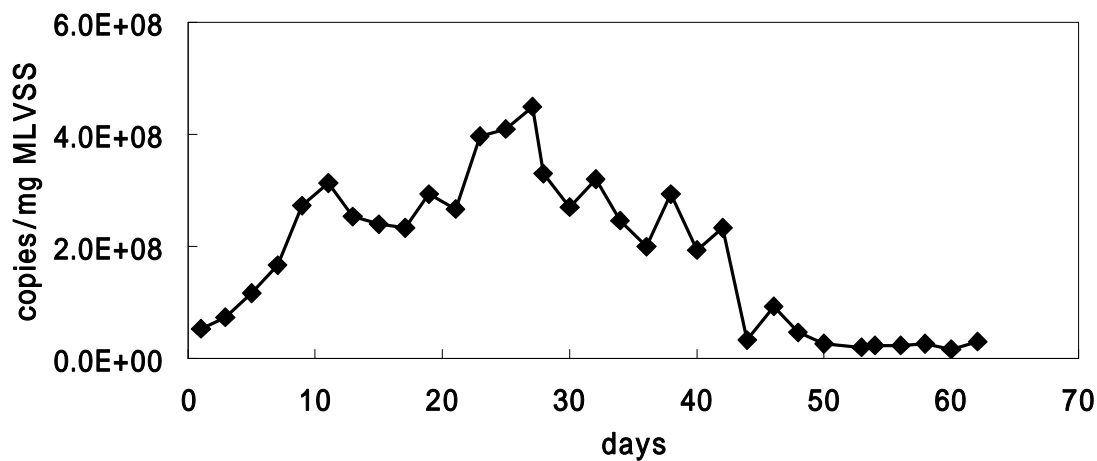


図 6.29 'Accumulibacter' の定量結果 (R20)

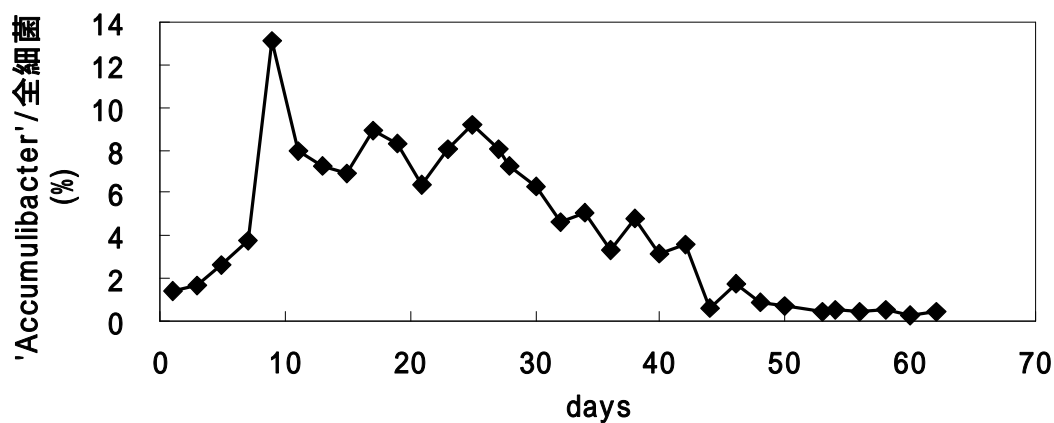


図 6.30 全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合 (R20)

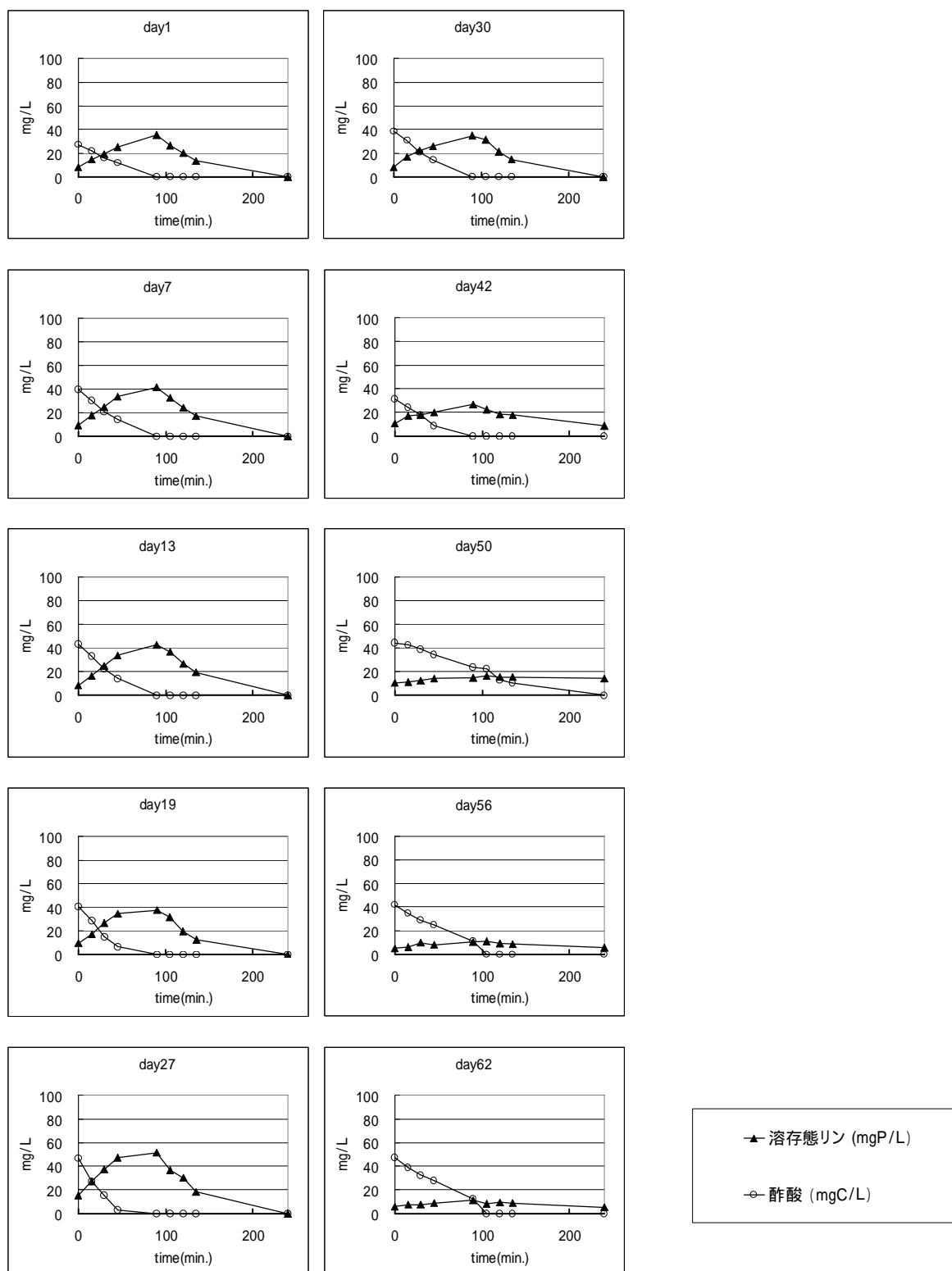


図 6.31 1 サイクルにおける溶存態リンおよび酢酸の挙動 (R20)

6.3.4.3 細菌群集構造の変化

PCR-DGGE 法によって R20 の細菌群集構造の変化を解析した結果を図 6.32 に示す。バンド A は運転開始から強度を増し、25 日目に最も強度が強くなり、その後は薄くなっていった。バンド B は 40 日以降徐々にバンド強度を増した。

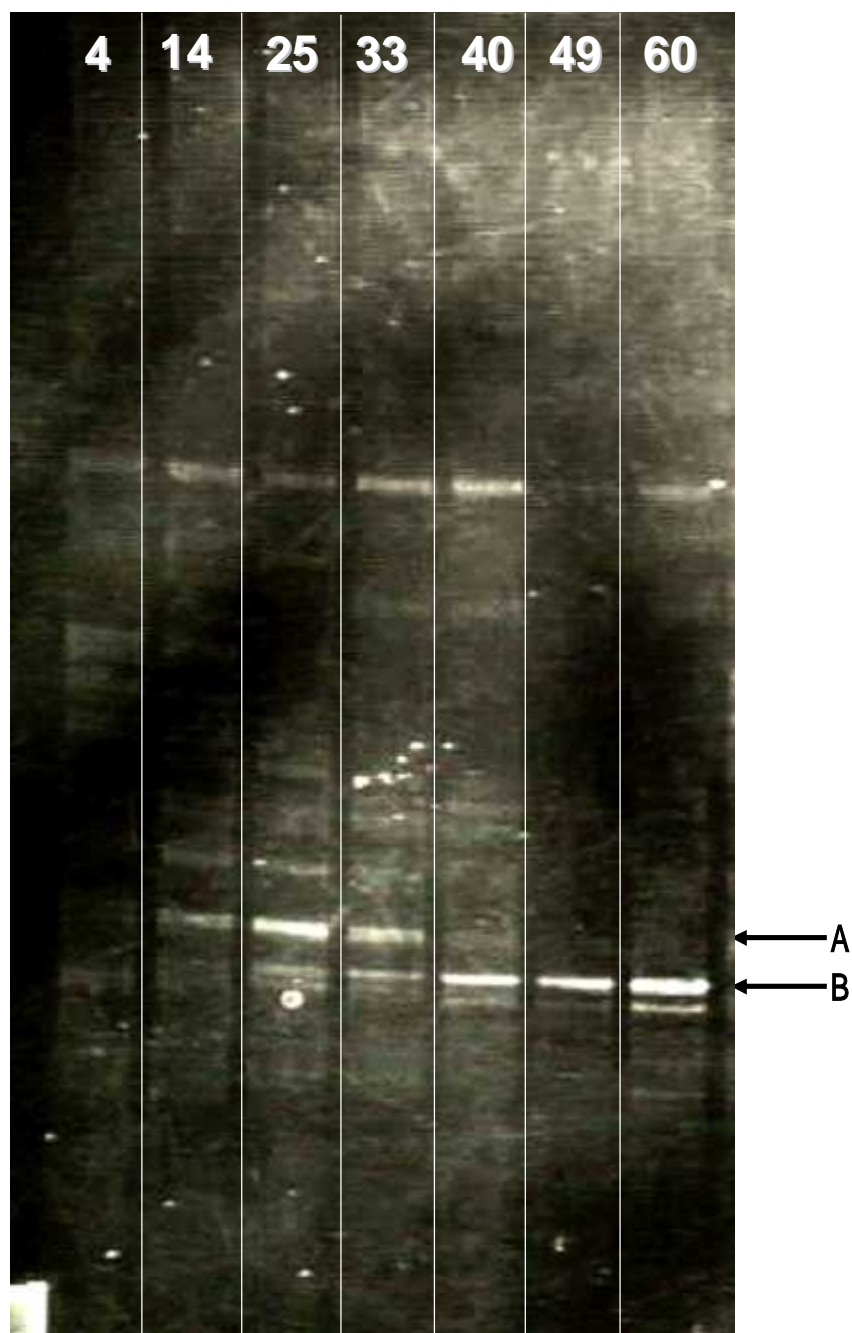


図 6.32 PCR-DGGE 法による群集解析結果 (R20)
(数字は運転日数)

6.3.5 対照リアクター 1 ; R16 (pH7.5±0.1)

R16 は図 6.1 に示すとおり、pH7.5±0.1 にて 30 日間運転した。基質組成は R14 と同じものとした。種汚泥は嫌気-好気法ではなく、標準活性汚泥法にて運転している実下水処理場の汚泥を用いた。

6.3.5.1 リアクターのモニタリング結果

R16 における各項目の経日変化 (MLSS、MLVSS、溶存態リン、酢酸およびリン含有率) を図 6.33 ~ 6.36 に示した。

MLSS および MLVSS は図 6.33 に示したとおり、運転開始時から 8 日目にかけて緩やかに減少した。8 日目以降は、MLSS は 2200mg/L 程度、MLVSS は 1800mg/L 程度にて安定した。しかしながら、25 日目以降 MLSS、MLVSS が急激に低下し、30 日目においてはいずれも 1000mg/L 以下となった。なお、25 日目以降はバルキング現象が見られ、沈殿工程の 1 時間において十分な沈殿ができず、汚泥が放流水とともに流出していた。

溶存態リンの挙動を図 6.34 に示す。運転開始直後 (2 日目) においては嫌気におけるリンの吐出し、および好気におけるリンの摂取はほとんど見られなかった。その後は完全にリンを摂取することはなかったものの、リンの吐出し量が徐々に増えていく様子が見られた。

酢酸の摂取については、図 6.35 に示すとおり運転期間を通じて嫌気での摂取はあまり見られず、ほとんどが好気において摂取されていた。

リン含有率 (%/MLVSS) は図 6.36 に示したとおり、運転開始から緩やかに増加する傾向が見られ、19 日目には 6% に達したが、その後は緩やかに減少していく様子が見られた。

6.3.5.2 ‘*Accumulibacter*’ の挙動

‘*Accumulibacter*’ の定量結果を図 6.37 に、全細菌に対する割合を図 6.38 にそれぞれ示す。‘*Accumulibacter*’ のコピー数は運転開始後徐々に増えていく様子が見られたが、18 日目以降は減少していく様子が見られた。全細菌に対する割合も同様に、18 日目にかけて増加したが、その後は減少した。

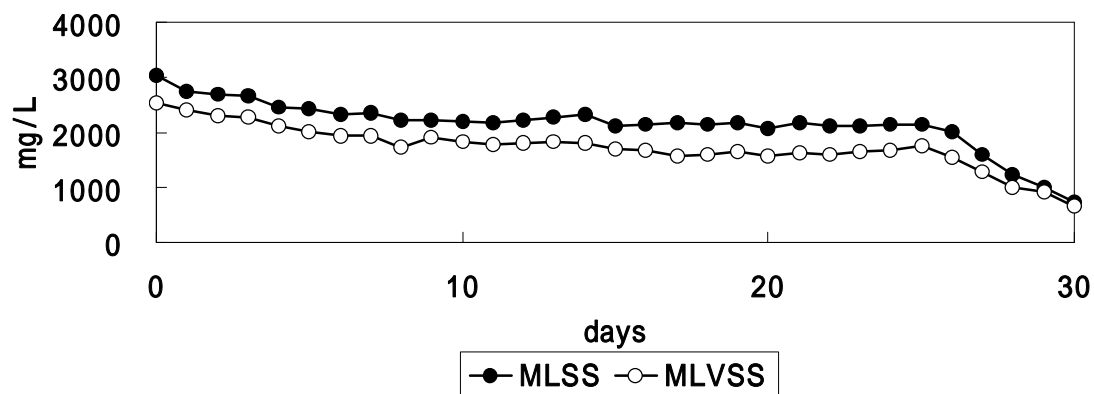


図 6.33 MLSS および MLVSS (R16)

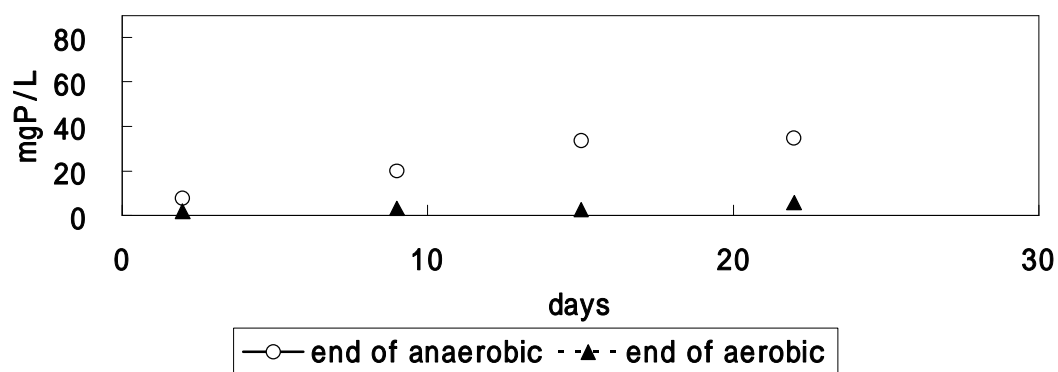


図 6.34 嫌気および好気終了時の溶存態リン (R16)

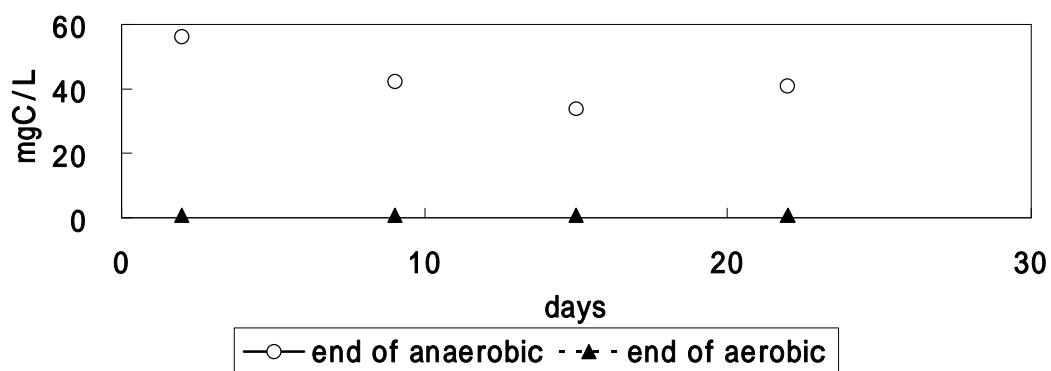


図 6.35 嫌気および好気終了時の酢酸 (R16)

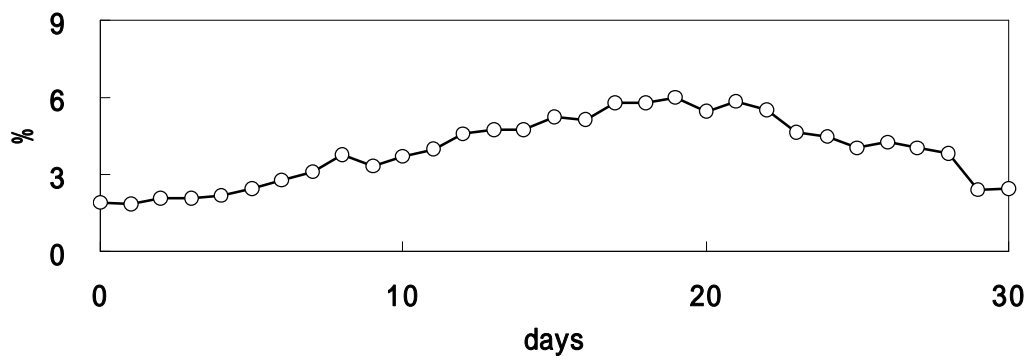


図 6.36 好気終了時の MLVSS に対するリン含有率 (R16)

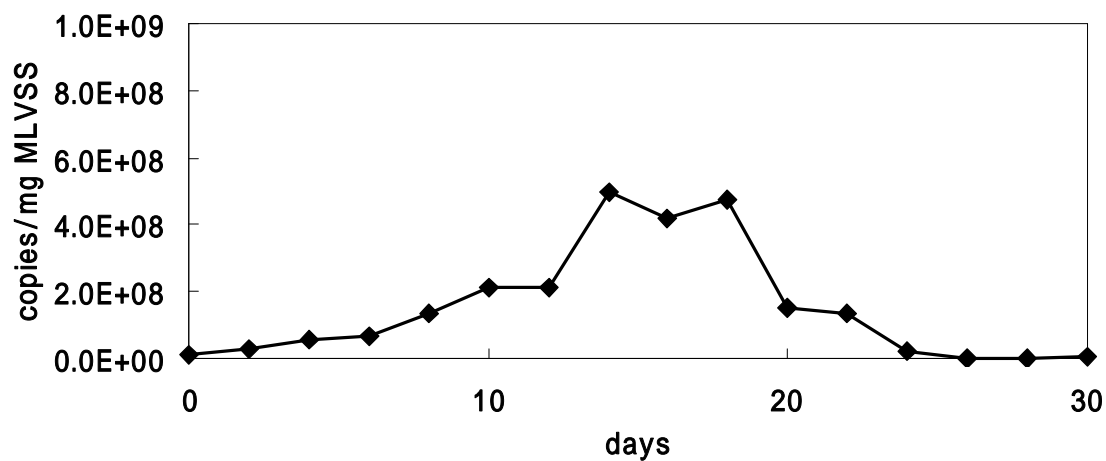


図 6.37 'Accumulibacter' の定量結果 (R16)

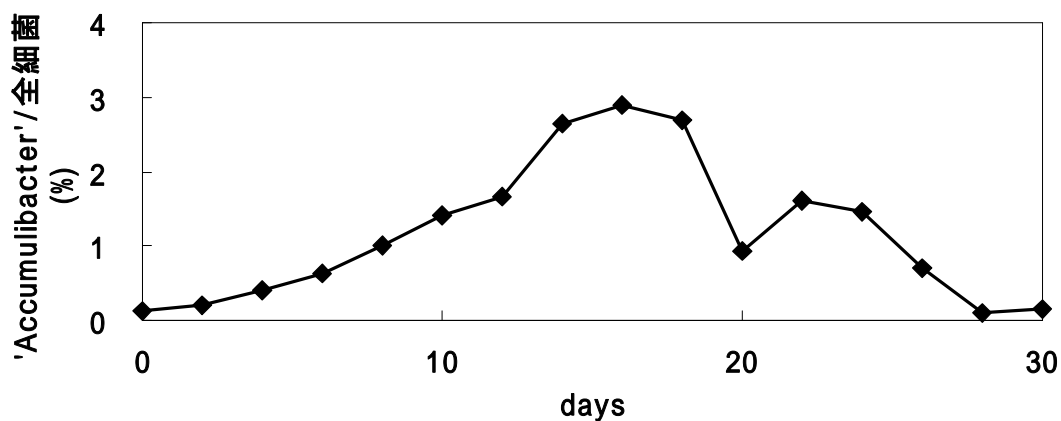


図 6.38 全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合 (R16)

6.3.5.3 細菌群集構造の変化

PCR-DGGE 法によって R16 の細菌群集構造の変化を解析した結果を図 6.39 に示す。バンド A は運転開始から徐々に強度を増し、16 日目に最も強度が強くなり、その後は薄くなっていった。バンド B は 24 日以降徐々に強度を増した。

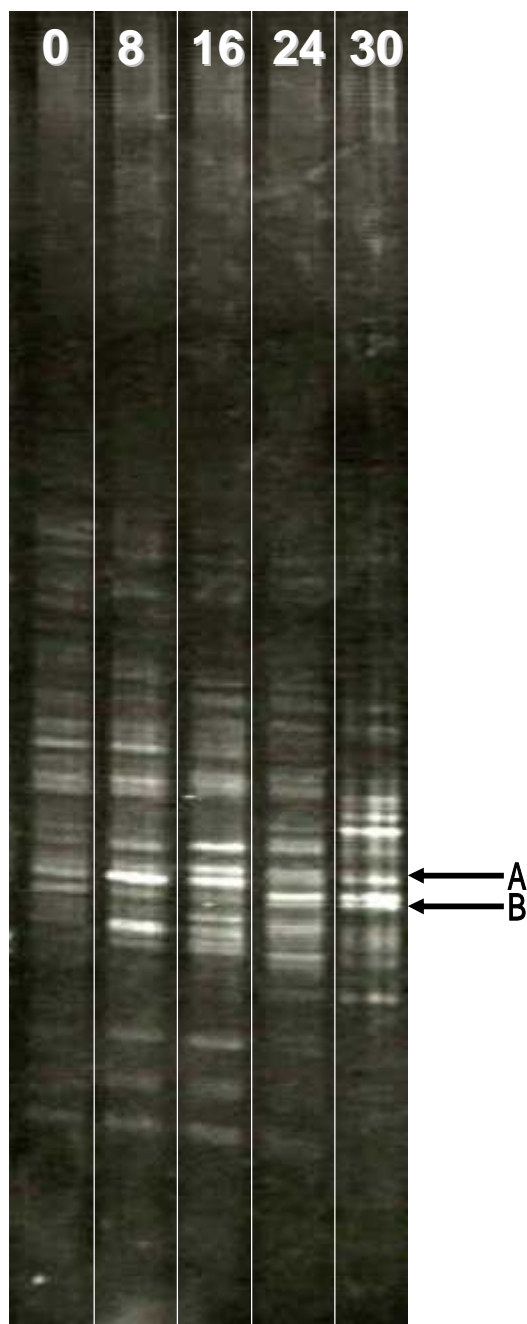


図 6.39 PCR-DGGE 法による群集解析結果 (R16)
(数字は運転日数)

6.3.6 対照リアクター 2 ; R19 (pH7.9±0.1)

R19 は図 6.1 に示すとおり、pH7.9±0.1 にて 62 日間運転した。基質組成、種汚泥は R18 と全く同じものであり、R18 と同時に運転を開始した。

6.3.6.1 リアクターのモニタリング結果

R19 における各項目の経日変化 (MLSS、MLVSS、溶存態リン、酢酸およびリン含有率) を図 6.40 ~ 6.43 に示した。また、図 6.46 に 1 サイクルにおける溶存態リンおよび酢酸の挙動を示した。

MLSS および MLVSS は図 6.40 に示したとおり、運転開始時後から徐々に低下し、10 日目以降、MLSS は 1600mg/L 程度、MLVSS は 1400mg/L 程度にて安定した。しかしながら、46 日目以降バルキングが発生し、MLSS、MLVSS が急激に低下した。

溶存態リンの挙動を図 6.41 に示す。運転開始時において、嫌気終了時のリン濃度は 60mgP/L 程度であり、好気にて完全にリンを摂取していた。その後も良好なリン除去が続いていたが、36 日目以降、取り残しが見られるようになった。また、38 日目以降は嫌気終了時のリン濃度が減少していった。図 6.46 に示すとおり、7 日目から 34 日目にかけては嫌気 45 分間においてほとんどのリンが吐き出されていたが、それ以降はリンを吐き出す速度が減少した。

酢酸については図 6.42 に示すとおり、運転開始時から 44 日目までは嫌気において全ての酢酸が摂取されていたが、46 日目以降は嫌気での取り残しが確認された。

リン含有率 (%/MLVSS) は図 6.43 に示したとおり、運転開始から徐々に増加する傾向が見られ、10%程度で安定していたが、32 日目以降は減少する様子が見られた。

6.3.6.2 ‘*Accumulibacter*’ の挙動

‘*Accumulibacter*’の定量結果を図 6.44 に、全細菌に対する割合を図 6.45 にそれぞれ示す。‘*Accumulibacter*’のコピー数は運転開始後徐々に増えていく様子が見られたが、10 日目以降は一度減少した。その後、20 日目から再び増加する様子がみられた。34 日目以降、再び減少し、それ以降は増加する様子は見られなかった。全細菌に対する割合も同様の挙動がみられ、運転開始後に一時増加したが、10 日目以降減少、20 日目から再び増加、そして 34 日目以降減少した。

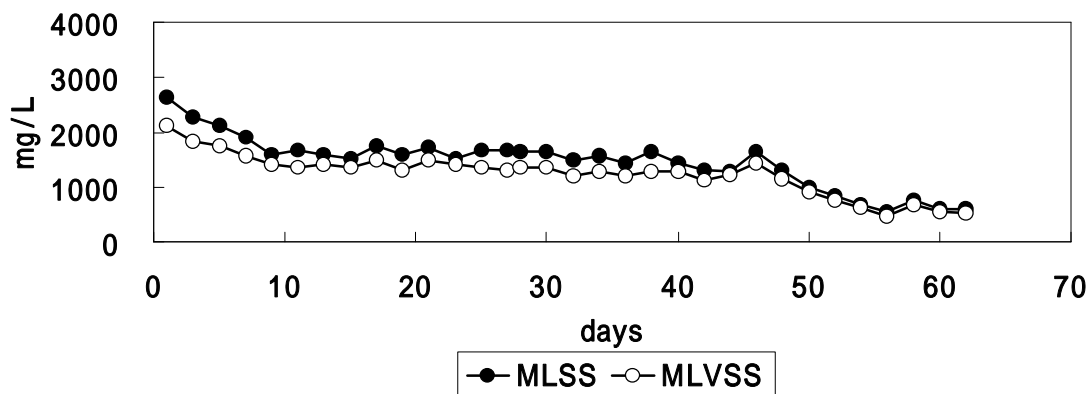


図 6.40 MLSS および MLVSS (R19)

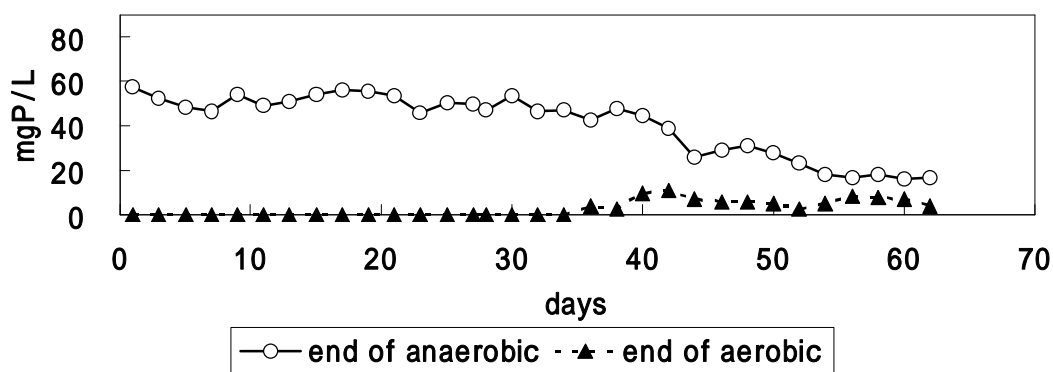


図 6.41 嫌気および好気終了時の溶存態リン (R19)

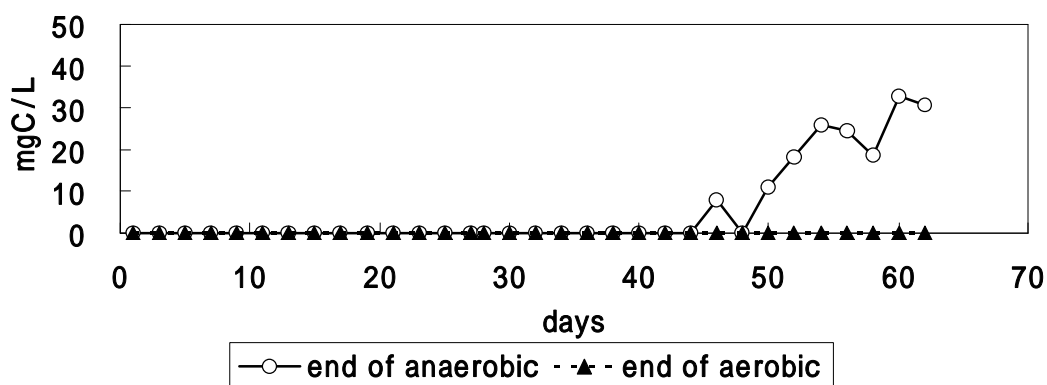


図 6.42 嫌気および好気終了時の酢酸 (R19)

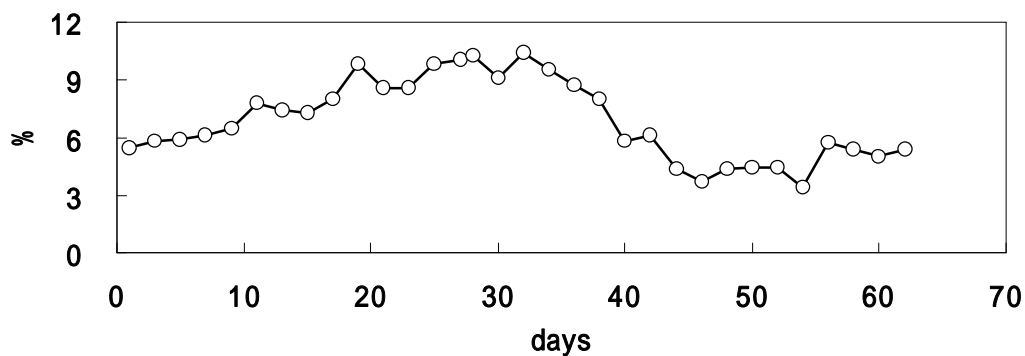


図 6.43 好気終了時の MLVSS に対するリン含有率 (R19)

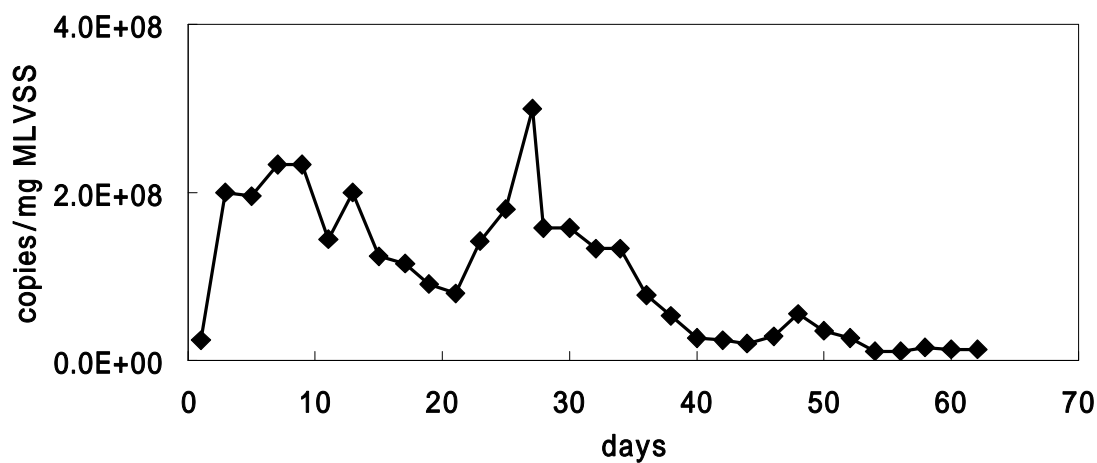


図 6.44 'Accumulibacter' の定量結果 (R19)

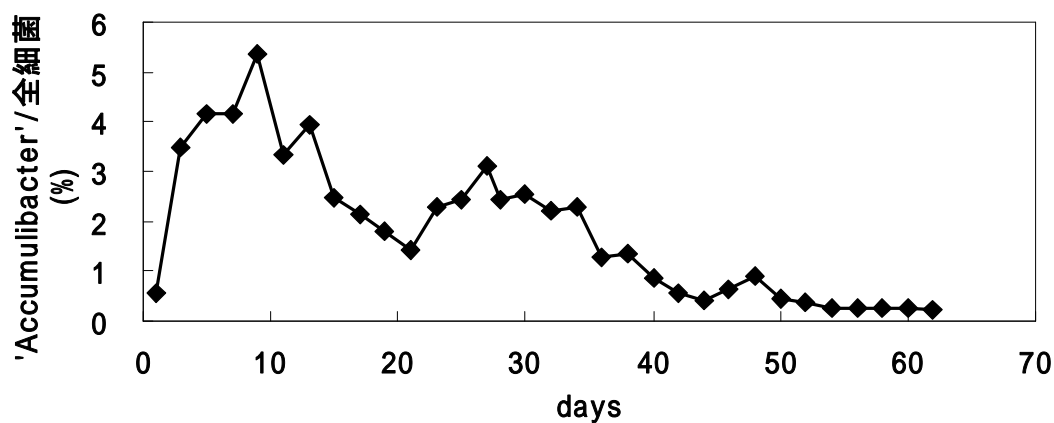


図 6.45 全細菌に対する 'Accumulibacter' の割合 (R19)

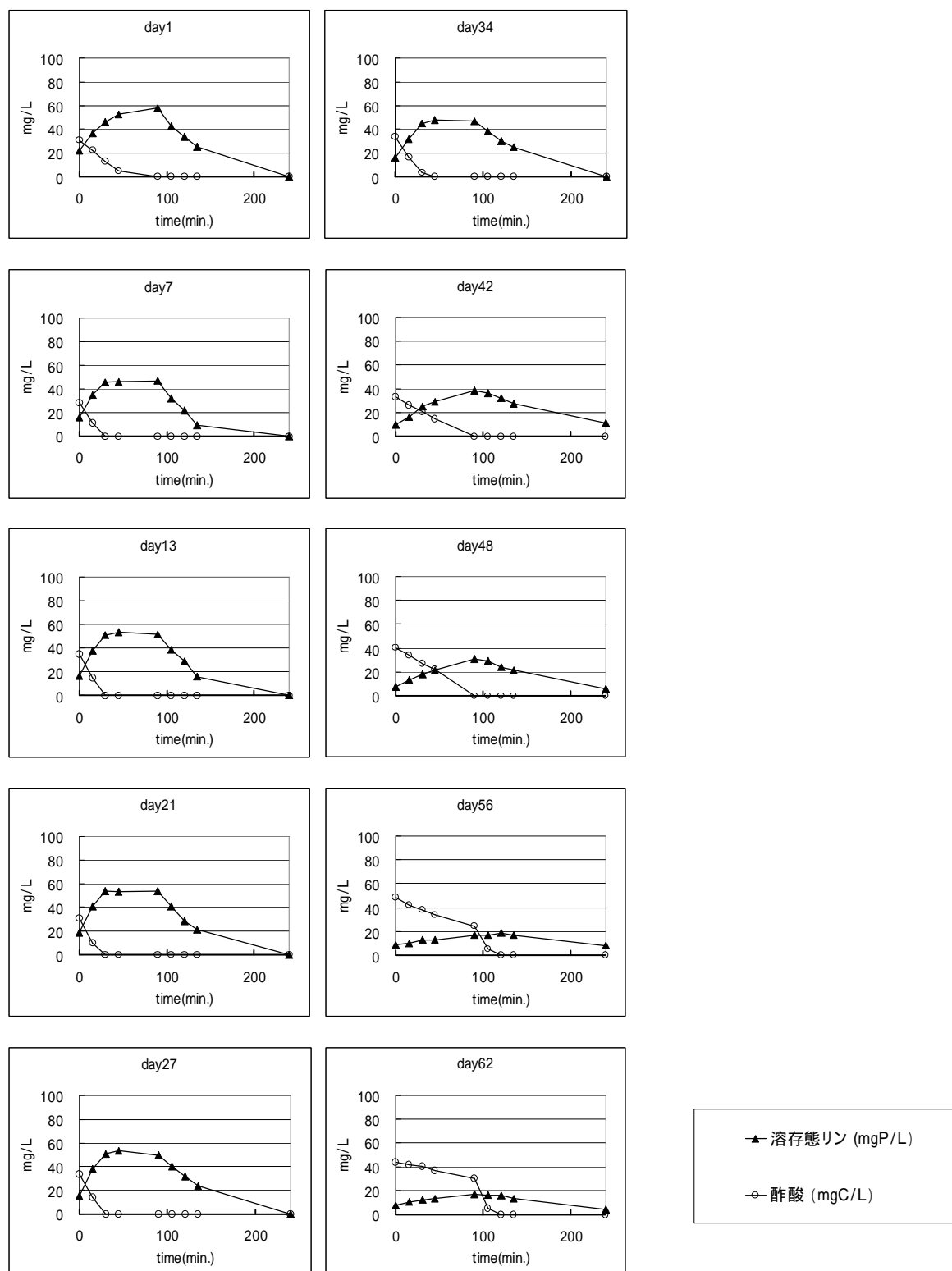


図 6.46 1 サイクルにおける溶存態リンおよび酢酸の挙動 (R19)

6.3.6.3 細菌群集構造の変化

PCR-DGGE 法によって R19 の細菌群集構造の変化を解析した結果を図 6.47 に示す。バンド A は運転開始から徐々に強度が強くなり、27 日目には最も強くなって、その後徐々に薄くなっていった。バンド B は 32 日以降徐々に強度を増した。

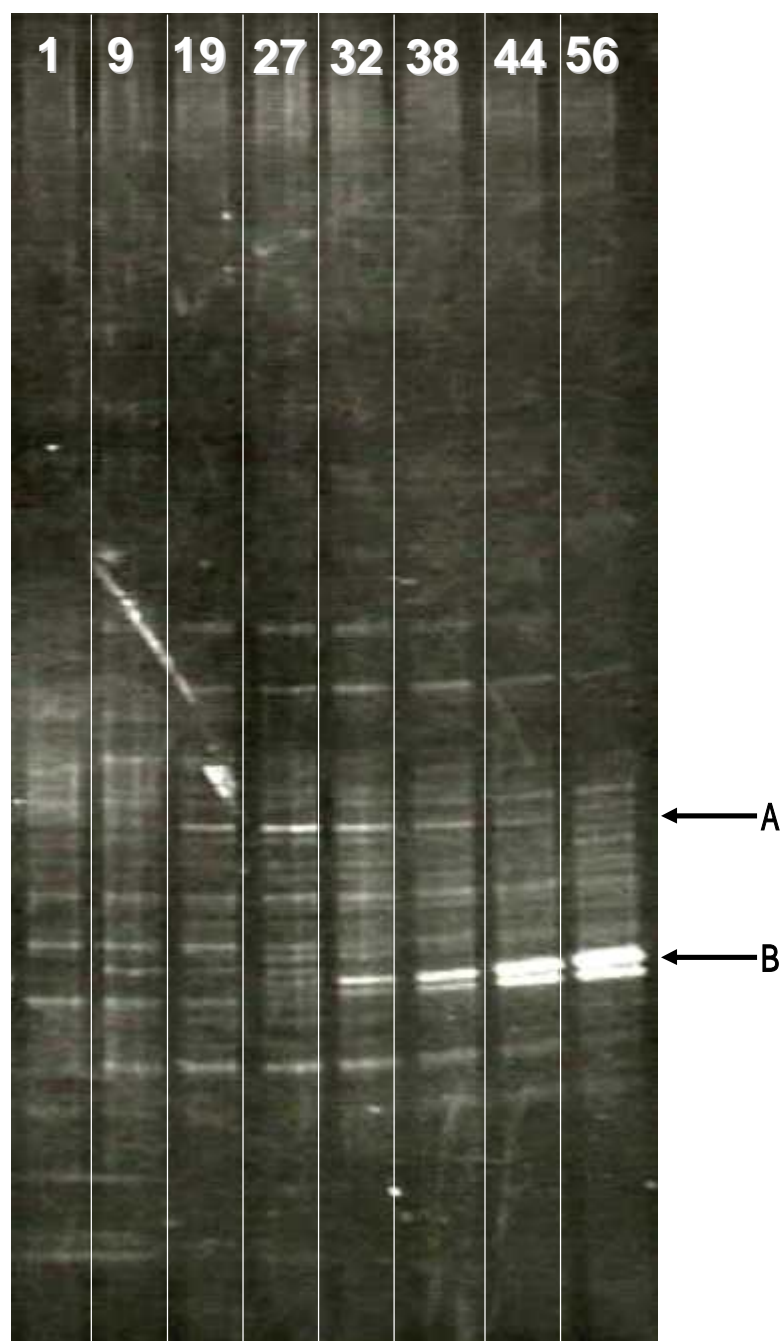


図 6.47 PCR-DGGE 法による群集解析結果 (R19)
(数字は運転日数)

6.3.7 ‘*Accumulibacter*’ 減少時における PAOs の探索

運転途中に pH を低下させたリアクター（R14、18、20 および 21）において、リン含有率が低下する前に‘*Accumulibacter*’が減少する様子が、以下の期間においてみられた。このような、「リン含有率は低下しないが、‘*Accumulibacter*’が減少していた期間」において、‘*Accumulibacter*’以外の PAOs が一時的にリン除去を担っている可能性が考えられた。本節では、表 6.2 に示したプローブを用いた FISH 法および高濃度 DAPI 染色法によって、‘*Accumulibacter*’以外の PAOs を探索した。

リン含有率は低下しないが、‘*Accumulibacter*’ が減少していた期間

- ・ R14：0～18 日目
- ・ R18：38～53 日目
- ・ R21：46～53 日目
- ・ R20：28～40 日目

6.3.7.1 R18 における ‘*Accumulibacter*’ 以外の PAOs

48 日目の汚泥試料を用いて PAOs の探索をおこなった。48 日目は図 6.12 および 6.13 に示したように、「リン含有率は低下しないが、‘*Accumulibacter*’が減少していた期間」であった。この結果、図 6.48 に示すように、Gammaproteobacteria に属する糸状菌が、若干弱い蛍光ながらも黄色い蛍光を発していた。また、‘*Accumulibacter*’およびリン含有率が高いレベルで安定していた 32 日目の汚泥試料と比較して、48 日目にはこの糸状菌が増加しているようであった。

その他、Green nonsulfur bacteria に属する糸状菌や Actino_1011 プローブ陽性細菌が黄色い蛍光を発していたが、その数は少なく、32 日目の汚泥試料と比べて増加しているようには見られなかった。

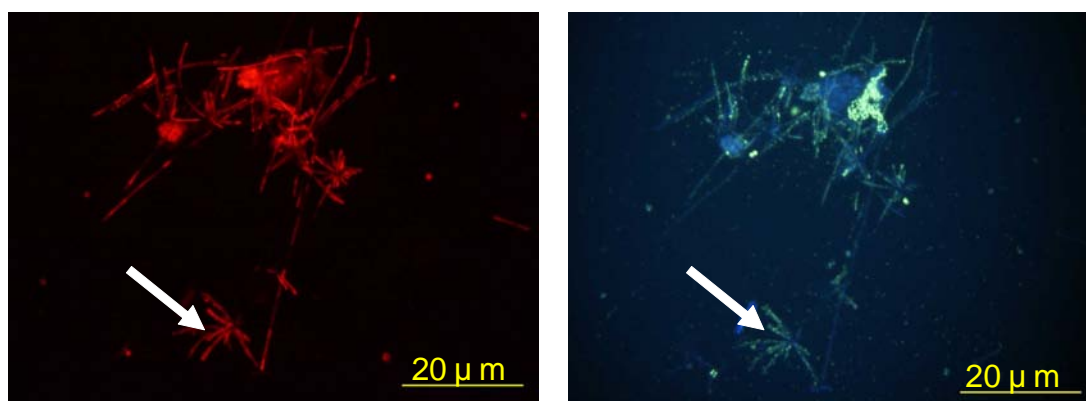


図 6.48 Gammaproteobacteria に属する PAOs
(左図：FISH 画像、右図：高濃度 DAPI 画像)

6.3.7.2 R14 および R21 における ‘*Accumulibacter*’ 以外の PAOs

R18 で確認された Gammaproteobacteria に属する糸状菌が R14 および R21 においても存在し、ポリリン酸を蓄積しているかを確認した。汚泥試料は、R14 の 10 日目および R21 の 50 日目に採取したものをを用いた。これらはいずれも、「リン含有率は低下しないが、‘*Accumulibacter*’が減少していた期間」であった。

この結果、R14 では、Gammaproteobacteria に属する糸状菌が、若干弱い蛍光ながらも黄色い蛍光を発しており、その数も多かった。一方、R21 については、この Gammaproteobacteria に属する糸状菌はほとんど存在していなかった。

6.4 考察

6.4.1 リアクターの運転状況

本章で運転した 6 系列のリアクターにおける運転状況について、以下にまとめ、考察する。

最初に、pH とリン除去との関係について、本研究で得られた結果をもとに考察する。なお、本研究では、好気終了時におけるリン含有率をリン除去の指標とした。

2.2.2.2 にて述べたように、多くの論文において、pH を 8 付近まで上げることによって良好なリン除去が見られると報告されている。本研究においても、pH を 7.5 ± 0.1 (R16) または 7.9 ± 0.1 (R18、19 および 21) に設定して運転したリアクターにて、運転開始から徐々にリン含有率が上昇する様子が見られ、良好なリン除去を得ることができた。

一方で、逆に pH を 6.5 まで下げるとリン除去が悪化することが報告されている。Zhang et al. (2005) の報告では、pH を下げた翌日にはすでに好気でリンを摂取しきれなくなり、14 日目にはリン放出および摂取は全くみられなくなっていた。しかしながら本研究では、pH を 6.5 に低下してもリン含有率がすぐに低下する様子は見られなかった。これは、異なる時期に運転した 3 系列のリアクター (R14、18 および 21) において、再現性のある結果となった。これらのリアクターにおいては、pH を低下させてから 20 日程度が経過した後にリン含有率が低下していたが、pH を低下させずに運転した R16 や R19 においても、20 日を越えたあたりからリン含有率が低下していく様子が見られた。このため、R14、18 および 21 でみられたリン含有率の低下は pH の低下によるものとは考えにくい。pH6.5 におけるリン除去への影響をさらに検討するために、R20 では運転開始から pH を 6.5 ± 0.1 に設定して運転した。この結果、R20 においてもリン除去が立ち上がる様子が見られた。これら 6 系列の結果を踏まえると、pH6.5 に低下させることによる、リン除去悪化への影響はほとんどないと考えられた。

続いて、嫌気における酢酸摂取単位量あたりのリンの放出量に与える pH の影響について考察する。既存の報告と比較するため、R18 および 21 の運転 27 日目 ($\text{pH} 7.9 \pm 0.1$) および 28 日目 ($\text{pH} 6.5 \pm 0.1$) における酢酸摂取量あたりのリンの放出量を算出した。この結果、R18 では 0.47 から 0.21 P-mol/C-mol、R21 では 0.57 から 0.27 P-mol/C-mol と、pH が低下することで酢酸摂取量あたりのリン放出量が半分以下にまで減っていることがわかった。若干値は異なるものの、Smolder et al. (1994) や Oehmen et al. (2005a) の結果においても、pH が低下することで酢酸摂取量あたりのリン放出量が減少することが報告されている。このように、嫌気条件下におけるリンおよび酢酸の挙動は、既存の研究と類似した結果となった。

上述のように、6 系列の実験室規模 EBPR リアクターを運転し、モニタリングした結果、嫌気工程における水質変動は既存の報告と同様の挙動を示していた。しかしながら、リン除去については既存の報告と大きく異なる結果となった。すなわち、リアクターの pH を低下することで、嫌気での酢酸摂取多量あたりのリンの放出量が減ることは既存の報告と同じであったが、リン含有率の低下、すなわちリン除去が悪化する様子はすぐには見られな

かった。こうした結果は再現性をもってみられた。本章の結果に基づくと、pH6.5 程度の低 pH がリン除去の悪化の直接的な引き金になるとは考えにくい。

6.4.2 ‘*Accumulibacter*’ の存在量および挙動

本章で運転した 6 系列のリアクターにおける‘*Accumulibacter*’の存在量および挙動について、以下にまとめ、考察する。

最初に、リアクターの pH と‘*Accumulibacter*’の関連について考察する。このために、運転開始時における pH を 7.9 ± 0.1 に設定した R18、19 および 21、および pH を 6.5 ± 0.1 に設定した R20 の 27 日目における‘*Accumulibacter*’のコピー数を比較した。

R18、19 および R21 においては、運転開始から‘*Accumulibacter*’のコピー数が増加する様子が見られ、27 日目における‘*Accumulibacter*’のコピー数は、 $3.0 \sim 4.5 \times 10^8$ copies/mgMLVSS であった。pH を 6.5 ± 0.1 に設定して運転した R20 においても運転開始後、‘*Accumulibacter*’のコピー数が増加してく様子がみられ、27 日目におけるコピー数は 4.5×10^8 copies/mgMLVSS であった。このように、異なる pH で運転したにも関わらず、27 日目における‘*Accumulibacter*’のコピー数はほぼ同等であった。このため、pH6.5 における、‘*Accumulibacter*’の増殖に与える影響はほとんどないと考えられた。但し、各リアクターにおける定量は異なる PCR の Run でおこなったため、若干検量線が異なっている可能性がある。より確実を期すため、今後同じ Run にて再定量することが望ましい。

続いて、pH 低下後における‘*Accumulibacter*’の挙動について考察する。pH を 6.5 に低下させた R14、18 および 21 において、‘*Accumulibacter*’はリン含有率が低下する前に減少しはじめた。代表的な例として R18 のリン含有率と‘*Accumulibacter*’の定量結果を図 6.49 に示す。R20 においても、pH を 6.5 から 6.0 に下げたところ、その直後に‘*Accumulibacter*’は減少し、その 13 日後にリン含有率が低下する様子がみられた。一方で、pH を一定にして運転した R16 や 19 ではそのような現象は見られなかった。このように、pH を下げることによって、「リン含有率は低下しないが、‘*Accumulibacter*’が減少していた期間」がみられることがわかった。但し、上述の期間は、R14 では約 20 日間、R18 では約 10 日間、R21 では約 7 日間と異なっていた。また、この期間においてはリン含有率が低下していないため、‘*Accumulibacter*’以外の PAOs が一時的にリン除去を担っていた可能性、および、‘*Accumulibacter*’のリン含有率が一時的に上がった可能性、が考えられた。この可能性については、6.4.3 で考察する。

このように、異なる pH でリアクターを運転した際における‘*Accumulibacter*’の存在量を比較した結果、pH を 6.5 ± 0.1 に設定しても‘*Accumulibacter*’に与える影響はほとんどないと考えられた。但し、pH を 6.5 に低下させた場合、「リン含有率は低下しないが、‘*Accumulibacter*’が減少していた期間」が見られ、この期間においては‘*Accumulibacter*’以外の PAOs が一時的にリン除去を担っている可能性などが考えられた。

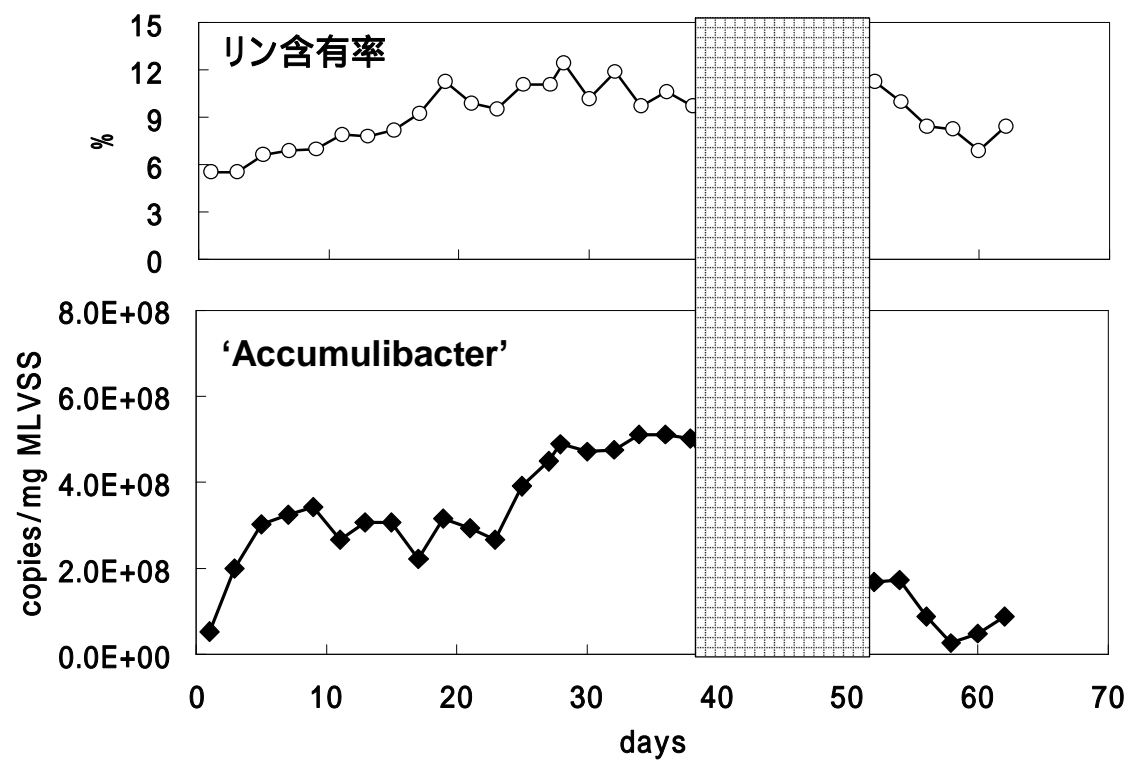


図 6.49 R18 のリン含有率および 'Accumulibacter' の挙動
(格子で囲われている期間が「リン含有率は低下しないが、
'Accumulibacter' が減少していた期間」)

6.4.3 ‘*Accumulibacter*’ 以外の細菌

本節では、本研究で運転した 6 系列のリアクターにおける‘*Accumulibacter*’以外の細菌について、結果をまとめ、考察する。

まず、pH を低下させて運転した全てのリアクターにおいてみられた、「リン含有率は低下しないが、‘*Accumulibacter*’が減少していた期間」において、一時的にリン除去を担っていると考えられる‘*Accumulibacter*’以外の PAOs について考察する。FISH 法および高濃度 DAPI 染色法によって、PAOs を探索したところ、R14 および 18 においては、Gammaproteobacteria に属する糸状菌がポリリン酸を蓄積しており、その数も増えているようにみられた。なお、定量評価はおこなっていないため、「増えているように見られた」というのはあくまでも定性的な評価である。

EBPR プロセスにおいて Gammaproteobacteria に属する糸状菌がポリリン酸を蓄積しているとの報告はこれまでにない。また、高濃度 DAPI 染色によって黄色い蛍光を観察したものの、微弱な蛍光であった。さらに、R18 と同じ条件で運転した R21 においては、この糸状菌はほとんど存在していなかった。これらの知見を踏まえると、この Gammaproteobacteria に属する糸状菌がリン除去を担っていた、と結論付けることは現段階ではできない。今後は PCR-Cloning 法などによって細菌種を同定し、この糸状菌のみを捉えるプローブを設計し、定量的に評価していく必要がある。

続いて、PCR-DGGE 法によって解析した細菌群集構造の変化について考察する。PCR-DGGE 法による解析の結果、R21 を除いて、リン除去が悪化する時期に顕在化するバンドが確認された。バンド位置のみで議論することは困難であるが、それらのバンドはほぼ同位置に現れていた。今後は、このバンドから塩基配列を解読し、細菌種を同定していく必要がある。このような細菌をモニタリングすることによって、リン除去悪化の指標として活用できる可能性が考えられた。

6.5 まとめ

本章では、pH を低下させて運転した実験室規模 EBPR リアクターにおけるリン除去および‘*Accumulibacter*’の挙動を詳細に把握することで、pH 低下による影響について検討した。本研究で得られた成果を以下に示す。

- 定量 PCR 法を用いることで、リアクター内における‘*Accumulibacter*’の詳細な挙動を把握することができた。
- pH を低下させた 1、2 週間の後にリン除去が悪化した。低 pH がリン除去悪化につながったことはつながったが、pH6.5 程度の低 pH がリン除去悪化の直接的な引き金になるとは考えにくいことを示唆する結果でもあった。
- リン除去が悪化していく際、汚泥のリン含有率の低下に先立って‘*Accumulibacter*’が減少した。‘*Accumulibacter*’が減少しはじめる時期はリアクターによって異なっていた。
- 上述のような‘*Accumulibacter*’の減少時期において、他の PAOs が一時的にリン除去を担っていた可能性があり、Gammaproteobacteria に属する糸状菌がその候補の一つとして考えられた。
- PCR-DGGE 法による解析の結果、リン除去悪化時において顕在化するバンドが、R21 を除いて確認された。

このように、pH を低下させたリアクターにおけるリン除去および‘*Accumulibacter*’の詳細な挙動を把握した結果、リン除去の悪化に先立ち‘*Accumulibacter*’が減少するといった、新たな知見を得ることができた。

7 章 実験室規模 EBPR リアクターに おける処理性能および PAOs の 数値モデル評価

7 章目次

7.1 背景と目的

7.2 方法

7.2.1 リアクターの処理性能および ‘ Accumulibacter ’ の実測値

7.2.2 ASM2

7.2.3 解析方法

7.3 結果

7.3.1 X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A のモデル解析

7.3.2 X_{PAO} のモデル解析

7.4 考察

7.4.1 X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A のモデル解析

7.4.2 X_{PAO} のモデル解析

7.5 まとめ

7.1 背景と目的

国際水学会（IWA）が提案した活性汚泥モデル（ASM）は活性汚泥処理プロセス内で生じている現象を大まかに理解した上で、主要なプロセスを数式として表現した「構造モデル」である。この構造モデルは、活性汚泥法の設計の合理化や運転管理の最適化のために有用なツールとなり得る。実際にヨーロッパを中心にその実務的利用が図られ、成果が示されている。

AMS2 および ASM2d（Henze et al., 1998）は、有機物・窒素除去に加えてリン除去に関わるプロセスが導入されていることから、EBPR プロセスのモデルとして様々な研究がおこなわれている。その研究の大半は、流入下水、処理水質、汚泥濃度、汚泥リン含有率などの数値データを用いてモデルの各パラメーターを決定する、または、有効性や適用限界について検討するものである（Dudley et al., 2002、Larrea et al., 2002）。一方で、EBPR プロセスにおいて中心的な役割を担っている PAOs に関わるパラメーターがモデルに設定されているにもかかわらず、PAOs そのものの実プロセス内での挙動を数値モデルによる計算結果と比較した事例はほとんど無い。なぜならば、既存の手法では PAOs を高い頻度で定量することが困難なためである。

6 章に記したとおり、本研究では主要な PAOs である‘Accumulibacter’の挙動を、定量 PCR 法を用いることによって把握することができた。この結果を用いることによって、PAOs の実際の挙動とモデルによりシミュレートした結果を比較することが可能になった。

そこで本章では、実験室規模 EBPR リアクター、R18 において pH を 7.9 ± 0.1 に設定した期間（運転 27 日目まで）における PAOs の挙動について、ASM を用いてシミュレーションを試み、有効性および問題点を検討した。なお本章では、主要な PAOs である‘Accumulibacter’を唯一の PAOs と仮定して検討した。

詳細な検討に先だって、R18 におけるリン含有率、溶存態リンおよび酢酸といった処理性能を示す項目を正確に再現するために、モデルのキャリブレーションをおこなった。パラメーターの値を標準的な値（ASM の推奨値）から変更した場合、その影響について感度解析をおこなった。

続いて、上述のようにキャリブレーションをおこなったモデルから計算された PAOs の挙動と、6 章にて定量した‘Accumulibacter’の挙動を比較し、得られた PAOs の計算結果の妥当性および問題点について検討した。

7.2 方法

7.2.1 リアクター（R18）の処理性能および‘Accumulibacter’の実測値

R18 の運転開始から 27 日目における溶存態リン、酢酸およびリン含有率の分析結果および、‘Accumulibacter’の定量結果を用いた。溶存態リン、酢酸およびリン含有率の分析方法は 6.2.2.2 に記した。‘Accumulibacter’の定量方法は 6.2.3 に記した。なお、本章における酢

酸の分析結果は、モデルの単位に合わせるために COD 換算した値に変更した。

また、‘Accumulibacter’の定量結果についても、モデルで用いている単位である mgCOD/L に変更する必要がある。しかし、この換算は容易ではない。ここでは、簡単のため、16S rRNA 遺伝子のコピー数から COD への換算においては、次のような方法をとった。まず、6.3.2.2 に記した定量結果からリアクター1L あたりのコピー数を算出した。つづいて、運転 1 日目におけるコピー数とキャリブレーションしたモデルから算出された運転 1 日目の PAOs の量 (mgCOD/L) とが大体同じになるように、単位 COD 量あたりのコピー数を求めた。詳細は 7.3.2 に示す。

7.2.2 ASM2

本項では、ASM2 を用いて、リン含有率、溶存態リンおよび酢酸および PAOs の挙動を解析した。これらに關係する成分や反応についてのみ抜粋し、以下にまとめる。また、これ以降は、モデルで用いられている成分 (S_A など) と同じ表記とする。

7.2.2.1 成分、反応速度定数および化学量論係数

ASM2 で定義されている成分を表 7.1 に示す。また、反応速度定数および化学量論係数の定義および推奨値を表 7.2 および表 7.3 にそれぞれ示す。

表 7.1 成分の定義

成分	定義	単位
S_A	発酵生成物(酢酸)	mgCOD/L
S_F	発酵性易分解性有機物	mgCOD/L
S_{O_2}	溶存酸素	mg/L
S_{PO_4}	溶存態リン	mgP/L
X_H	従属栄養生物	mgCOD/L
X_S	遅分解性有機物	mgCOD/L
X_{PAO}	PAOs	mgCOD/L
X_{PHA}	PAOsの細胞内蓄積物質(PHAなど)	mgCOD/L
X_{PP}	ポリリン酸	mgP/L

表 7.2 反応速度定数の定義および推奨値 (20)

反応速度定数	定義	推奨値 (20)	単位
q_{fe}	X_H による最大比発酵速度	3.00	$gS_F/gX_H/d$
q_{PHA}	X_{PHA} の最大比貯蔵速度	3.00	$gX_{PHA}/gX_{PAO}/d$
q_{PP}	X_{PP} の最大比貯蔵速度	1.50	$gX_{PP}/gX_{PAO}/d$
μ_H	X_H の最大比増殖速度	6.00	$gXs/gXH/d$
μ_{PAO}	X_{PAO} の最大比増殖速度	1.00	/d
b_H	X_H の比自己分解速度	0.40	/d
b_{PAO}	X_{PAO} の比自己分解速度	0.20	/d
b_{PP}	X_{PP} の比自己分解速度	0.20	/d
b_{PHA}	X_{PHA} の比自己分解速度	0.20	/d
K_{O_2}	S_{O_2} に対する飽和・阻害定数	0.20	gO_2/m^3
K_{fe}	発酵における S_F に対する飽和定数	4.00	$gCOD/m^3$
K_A	X_H の増殖における S_A に対する飽和定数	4.00	$gCOD/m^3$
K_{PS}	X_{PP} の貯蔵における S_{PO_4} に対する飽和定数	0.20	gP/m^3
K_P	S_{PO_4} に対する飽和定数	0.01	gP/m^3
K_{PP}	X_{PP}/X_{PAO} に対する飽和定数	0.01	$gX_{PP}/gX_{PAO}/d$
K_{MAX}	X_{PAO} の最大ポリリン酸含有率	0.34	$gX_{PP}/gX_{PAO}/d$
K_{IPP}	X_{PP} の貯蔵における阻害定数	0.02	$gX_{PP}/gX_{PAO}/d$
K_{MAX}	X_{PHA}/X_{PAO} に対する飽和定数	0.01	$gX_{PHA}/gX_{PAO}/d$

表 7.3 化学量論係数の定義および推奨値

化学量論係数	定義	推奨値	単位
Y_H	X_H の増殖収率	0.625	$gCOD/gCOD$
Y_{PAO}	X_{PAO} の増殖収率(X_{PHA} あたり)	0.625	$gCOD/gCOD$
Y_{PO_4}	X_{PHA} の貯蔵に必要な S_{PO_4} 放出量	0.40	$gP/gCOD$
Y_{PHA}	X_{PP} の貯蔵に必要な X_{PHA}	0.20	$gCOD/gCOD$

7.2.2.2 反応速度式

X_{PAO} 、 X_{PP} 、 S_{PO4} または S_A に関わる反応速度式を表 7.4 に示す。但し、表 7.4 に示した反応速度式では、以下に示す成分に関する項は反応の律速にならないと仮定し、削除した。

- 1．アルカリ度（式番号： 、 、 、 および ）
- 2．アンモニア性窒素（式番号： および ）
- 3．硝酸性窒素および亜硝酸性窒素（ ）
- 4．増殖に必要な溶存態リン（ および ）

表 7.4 各プロセスの反応速度式

番号	プロセス	反応速度式
	S_A を基質とした X_H の好気条件下での増殖	$\mu_H \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \cdot \frac{S_A}{K_A + S_A} \cdot \frac{S_F}{S_F + S_A} \cdot X_H$
	発酵	$q_{fc} \cdot \frac{K_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \cdot \frac{S_F}{K_{fc} + S_F} \cdot X_H$
	X_H の自己分解	$b_H \cdot X_H$
	X_{PAO} による X_{PHA} の貯蔵	$q_{PHA} \cdot \frac{S_A}{K_A + S_A} \cdot \frac{X_{PP} / X_{PAO}}{K_{PP} + X_{PP} / X_{PAO}} \cdot X_{PAO}$
	X_{PAO} による好気条件下での X_{PP} の貯蔵	$q_{PP} \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \cdot \frac{S_{PO_4}}{K_{PS} + S_{PO_4}} \cdot \frac{X_{PHA} / X_{PAO}}{K_{PHA} + X_{PHA} / X_{PAO}} \cdot \frac{K_{MAX} - X_{PP} / X_{PAO}}{K_{IPP} + K_{MAX} - X_{PP} / X_{PAO}} \cdot X_{PAO}$
	X_{PAO} の好気条件下での増殖	$\mu_{PAO} \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \cdot \frac{X_{PHA} / X_{PAO}}{K_{PHA} + X_{PHA} / X_{PAO}} \cdot X_{PAO}$
	X_{PAO} の自己分解	$b_{PAO} \cdot X_{PAO}$
	X_{PP} の自己分解	$b_{PP} \cdot X_{PP}$

X_{PAO} 、 X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A の反応速度式を、式 7.1～7.4 に示す。なお、式中の番号は表 7.4 に示した反応速度式を表す。

 X_{PAO} の増殖速度

$$\frac{dX_{PAO}}{dt} = \quad - \quad \dots \text{式 7.1}$$

X_{PP} の増加速度

$$\frac{dX_{PP}}{dt} = - \quad - Y_{PAO} \bullet \quad \dots \text{式 7.2}$$

S_{PO4} の反応速度

$$\frac{dS_{PO4}}{dt} = Y_{PO4} \bullet \quad + \quad + 0.01(\quad + \quad + \quad) - \quad \dots \text{式 7.3}$$

ここで、0.01 は自己分解や発酵の際に生成される S_{PO4} の割合である。

S_A の反応速度

$$\frac{dS_A}{dt} = - \frac{1}{Y_H} \bullet \quad - \quad \dots \text{式 7.4}$$

7.2.3 解析方法**7.2.3.1 入力条件**

モデルによる計算のために必要な入力項目は、リアクターの運転条件、流入下水成分、反応速度定数および化学量論係数、および汚泥成分の初期濃度である。以下にこれらの入力条件について述べる。

リアクターの運転条件

SRT、HRT、1 サイクルのタイムシーケンスおよび S_{O2} を入力した。R18 の SRT、HRT およびタイムシーケンスは 6.2.1 に示した値を用いた。S_{O2} は嫌気工程では 0mg/L、好気工程では 7mg/L、沈殿および放流工程では 1mg/L と設定した。これらの値は、実測データではなく、次の理由のもとに設定した。R18 における運転開始から 27 日目までは 6.3.2.1 に記したように良好なリン除去が見られていることから、嫌気工程では完全に嫌気であり、好気工程において S_{O2} が不足していなかったと考えられる。また、沈殿、放流期間においては、好気工程における S_{O2} が若干残っていると考えられるためである。

流入下水成分

流入下水成分は、6.2.1 に記した基質組成にしたがい、S_A は 127mgCOD/L、S_{PO4} は 3.2mgP/L とした。

反応速度定数および化学量論係数

表 7.2 および表 7.3 に記した推奨値を初期設定値とした。

汚泥成分の初期濃度

運転開始時における汚泥成分の濃度は次のように設定した。 X_H および X_{PAO} は、津嶋ら (2006) が AO 法にて運転している実下水処理場の汚泥について推定した値である 211 および 234mgCOD/L とした。なお津嶋ら (2006) は、対象とした処理場におけるリン濃度および発酵産物濃度の経時変化をモデル計算で再現できた際の X_{PAO} の値を、推定値として報告している。 X_{PP} は R18 の運転 1 日目の測定値である 115mgP/L とした。 X_{PHA} は花田ら (1999) が実下水処理場の汚泥に対して測定した値である 5mgCOD/L とした。

7.2.3.2 数値シミュレーションの実行

X_{PAO} 、 X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A についてモデルの計算をおこなった。 X_{PAO} および X_{PP} については、運転開始から 27 日目までの挙動について計算した。 S_{PO4} および S_A については、運転 27 日目における 1 サイクルの挙動について計算した。モデルの計算には、Microsoft Excel を使用した。また、計算アルゴリズムには、4 次のルンゲ・クッタ法を用いた。また、計算は 1 ステップ 0.047 時間とした。また、基質の濃度や微生物の濃度等、本来正であるべき数字が計算誤差のために負の値となると、計算が発散してしまう場合がある。そこで、そのような状況を避けるために、非負であるべきパラメーターが計算上負になる場合には、If 関数を用いて 0 を代入することにより、計算の発散を防いだ。

7.2.3.3 感度解析およびキャリブレーション

7.2.3.1 の条件にてモデルの計算をおこなった際の X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A の結果が実測値と大きく異なった場合において、感度解析およびキャリブレーションをおこなった。

X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A の計算結果に大きな影響をおよぼす反応速度定数あるいは化学量論係数を調べるために感度解析をおこなった。すなわち、各定数および係数を 2 倍もしくは半分に変更してモデルの計算をおこない、 X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A の値に大きな影響を与える定数を決定した。なお、定数および係数を変動した際に計算結果が発散してしまった場合は、変動幅を小さくして再度検討した。

感度解析において影響が大きいと考えられた定数を変更してモデルのキャリブレーションをおこなった。各定数の値を変更してモデルを計算することで、実測値をよりよく再現する定数を決定した。

7.3 結果

7.3.1 X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A のモデル解析

7.3.1.1 定数を推奨値に設定した場合の計算結果

反応速度定数および化学量論係数を推奨値に設定して X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A のモデルの計算をおこない、実測値と比較した。なお、汚泥濃度等は 7.2.3.1 にて示した入力値を用いた。図 7.1 に X_{PP} の計算結果および実測値を示す。実測値については大きな変動はみられなかったのに対して、モデルの計算結果では、運転開始から X_{PP} が減少していく様子がみられた。このように、定数および係数を推奨値に設定して計算した結果では、実測値と大きく異なる挙動を示していた。

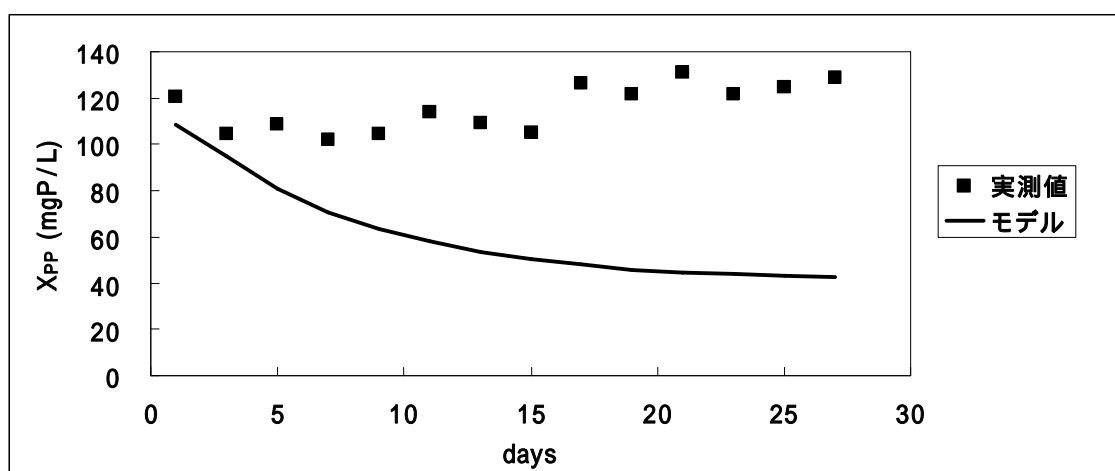


図 7.1 定数を推奨値に設定した場合の X_{PP} の計算結果および実測値

図 7.2 に運転 27 日目の S_{PO4} の計算結果および実測値を示す。嫌気終了時 (90 分) における S_{PO4} が実測値で 66mgP/L であったのに対して、計算結果では 31mgP/L であった。このように、嫌気における S_{PO4} の放出量が大きく異なっていた。また、嫌気における S_{PO4} の放出速度が実際の速度よりも遅かった。

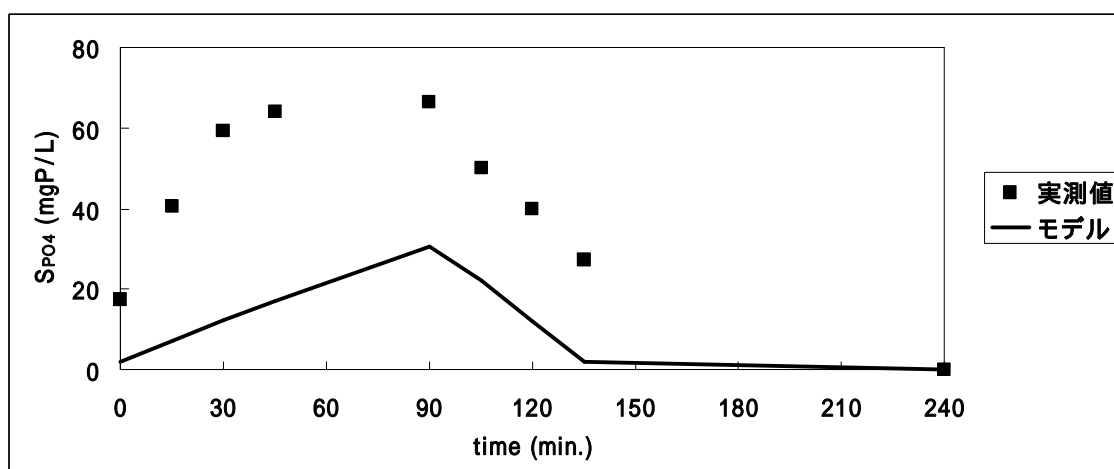


図 7.2 定数を推奨値に設定した場合の S_{PO4} の計算結果および実測値

図 7.3 に S_A の計算結果および実測値を示す。嫌気における S_A の摂取速度が実際よりも遅かった。

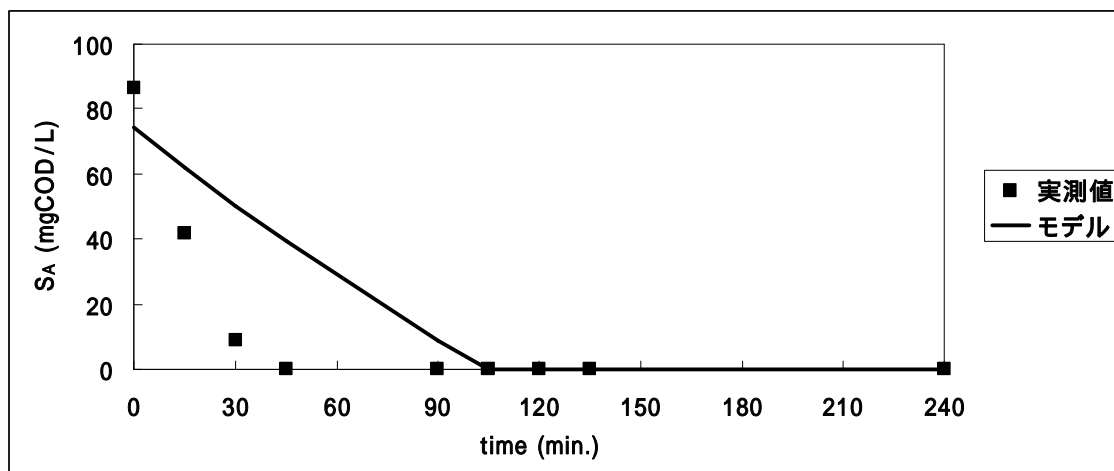


図 7.3 定数を推奨値に設定した場合の S_A の計算結果および実測値

7.3.1.2 感度解析

7.3.1.1 にて述べたように、反応速度定数および化学量論係数を推奨値に設定して数値計算をおこなった結果、実測値と大きく異なる挙動を示していた。実測値と同じ挙動を示すためには、以下の点について改善する必要がある。

1. X_{PP} がほとんど変動しないようにする。
2. 嫌気終了時における S_{PO4} の放出量を増やし、且つ放出速度を上げる。
3. 嫌気工程における S_A の摂取速度を上げる。

これらを実現するためには、反応速度定数および化学量論係数を修正する必要がある。そこで、各定数および係数について感度解析をおこない、1～3 の達成に大きな影響を与える定数を探索した。

感度解析の結果、 q_{PP} 、 q_{PHA} が 1～3 の達成に大きな影響をもっており、それらを増やすことによって 1～3 が改善されることがわかった。以下に、 q_{PP} 、 q_{PHA} についておこなった感度解析の結果について詳細に述べる。

q_{PP} の値を 1.0、1.5 (推奨値) および 3.0 とした場合の、 X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A の計算結果および実測値を図 7.4 に示す。なお、最初 q_{PP} を 0.75 まで下げたところ、計算結果が発散してしまったため、1.0 に設定して計算した。この結果、 q_{PP} を 3.0 に設定することによって、 X_{PP} がほぼ実測値に近い結果となった。また、嫌気における S_{PO4} の放出速度および S_A の摂取速度も若干速くなる様子が見られた。

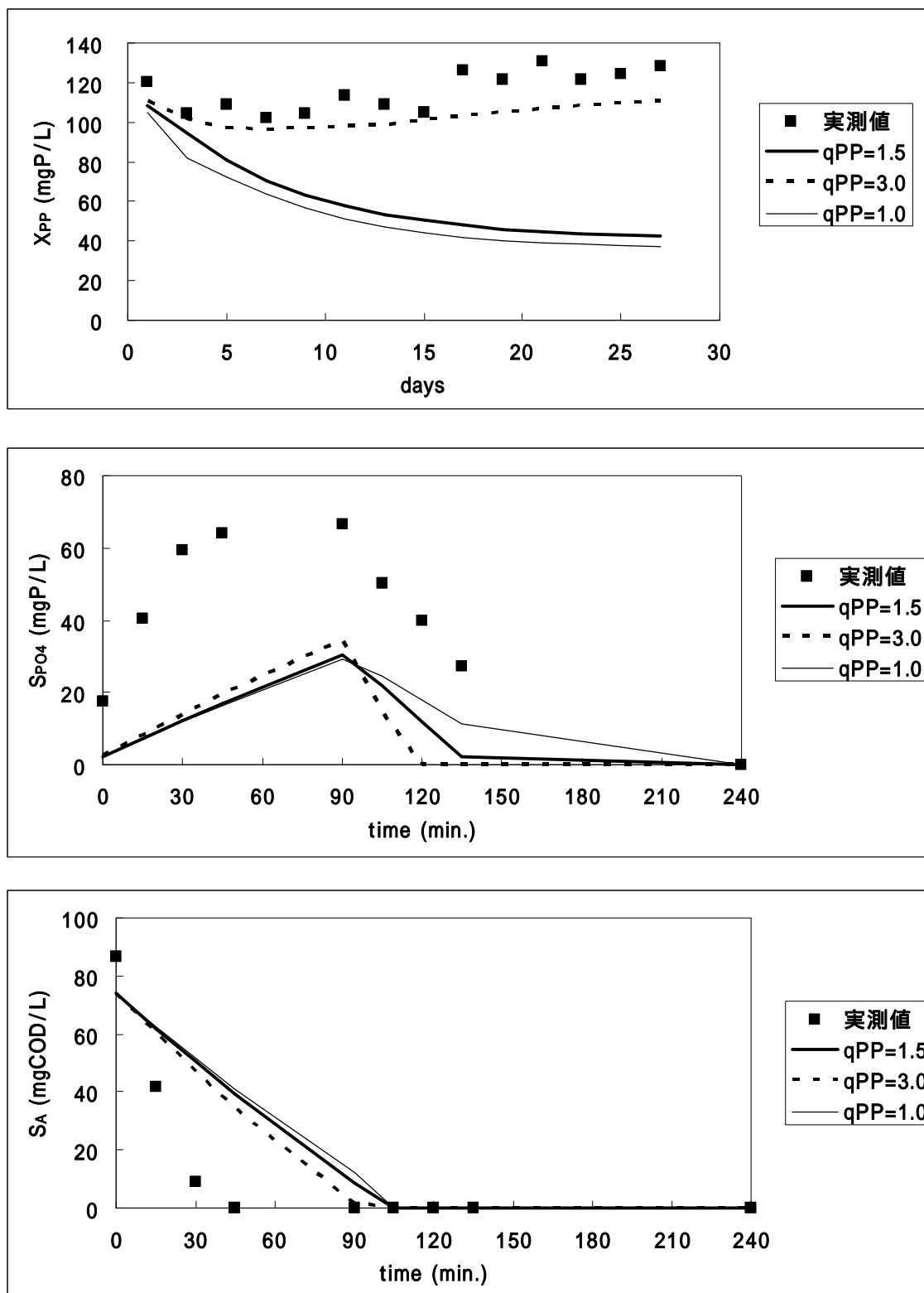


図 7.4 q_{PP} の感度解析の結果 (q_{PP} の推奨値は 1.5)
(上段: X_{PP} 、中段: S_{PO4} 、下段: S_A)

続いて、 q_{PHA} を 2.0、3.0 (推奨値) および 6.0 に設定した場合の、 X_{PP} 、 S_{PO4} および S_{A} の計算結果および実測値を図 7.5 に示す。なお、 q_{PHA} を 1.5 まで下げたところ、計算結果が発散してしまったため、2.0 にて評価した。この結果、 q_{PHA} を 6.0 に設定することによって、嫌気における S_{PO4} の放出速度および S_{A} の摂取速度が速くなることがわかった。また、 X_{PP} については減少幅が若干小さくなった。

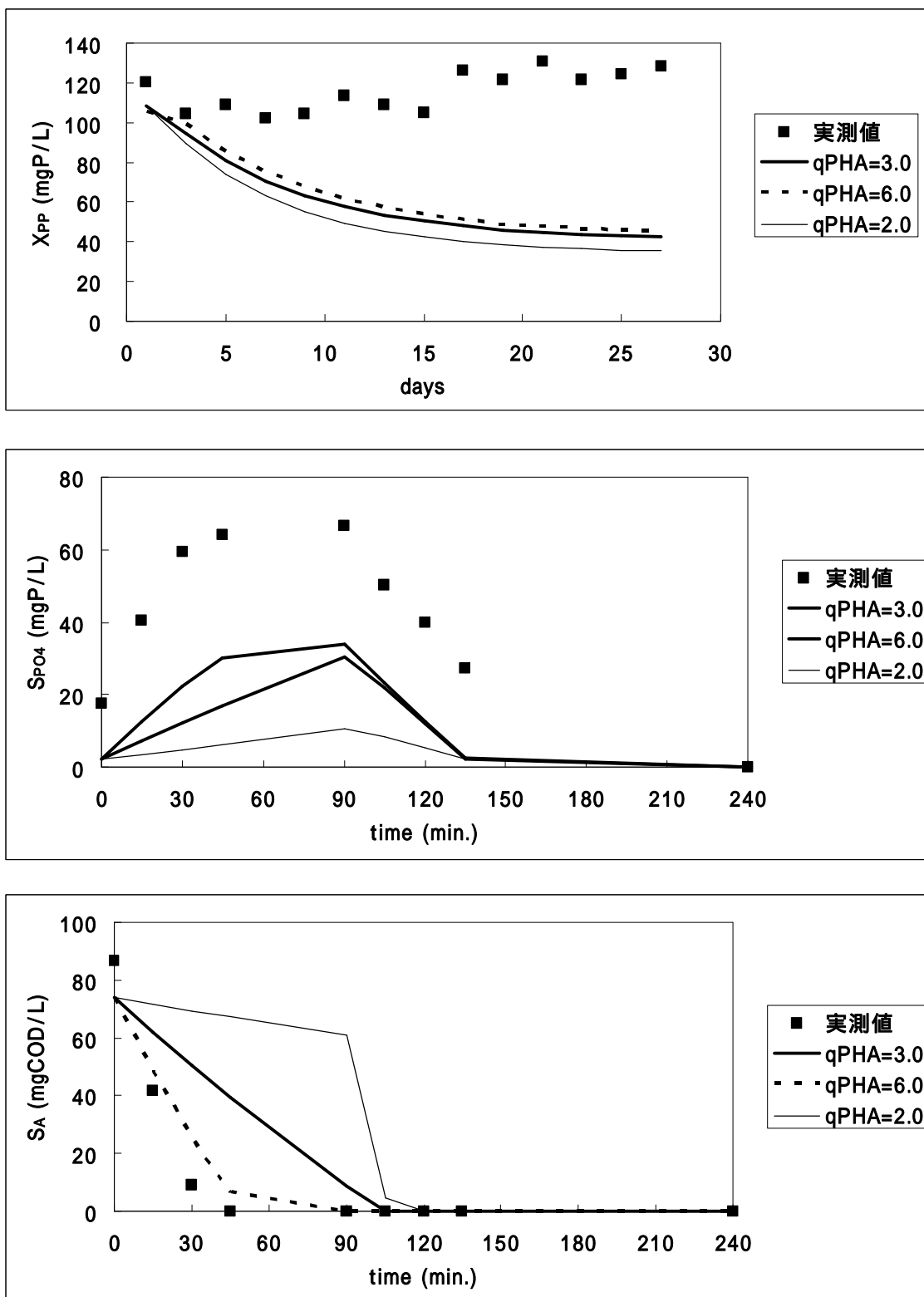


図 7.5 q_{PHA} の感度解析の結果 (q_{PHA} の推奨値は 1.5)
(上段: X_{PP} 、中段: S_{PO4} 、下段: S_A)

7.3.1.3 キャリブレーション

7.3.1.2 の結果から、 q_{PP} 、 q_{PHA} が X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A の解析結果に大きな影響を与える定数であることがわかった。そこで、これらの定数の変更を中心にキャリブレーションをおこない、実測値を再現することを目指した。

q_{PP} および q_{PHA} を推奨値の倍である 3.0 および 6.0 に設定した結果、 S_A および X_{PP} の挙動はほぼ実測値と同じになったが、嫌気終了時の S_{PO4} は依然低いままであった。さらに q_{PP} および q_{PHA} の値を増やしたが、改善することはできなかった。

嫌気終了時の S_{PO4} の値を増やすためには、嫌気における S_A の摂取単位量あたりの S_{PO4} の放出量を増やす必要があると考えられた。R18 の運転 27 日目までは、pH を 7.9 ± 0.1 に設定している。6.4.1 に記したように、pH を上げることで、嫌気における酢酸摂取量あたりのリンの放出量が上がることがわかっている。そこで、 S_{PO4} の放出量に関係する化学量論係数である Y_{PO4} の値を増やした。また、この際に、 q_{PP} 、 q_{PHA} についても数値を若干変更した。

上記の修正をおこなった結果を図 7.6 に示す。ここで、 Y_{PO4} を 0.76、 q_{PP} を 3.7、 q_{PHA} を 7.0、 K_{MAX} を 0.45 に設定した。この結果、 X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A の全てにおいて、実測値とほぼ同等の挙動を示すことができた。

なお、 K_{MAX} の値を変更したのは次のような理由による。 Y_{PO4} を 0.76、 q_{PP} を 3.7、 q_{PHA} を 7.0 に設定した結果、図 7.7 に示すように、運転 1 サイクル目の好気における X_{PP} の蓄積および S_{PO4} の摂取がみられず、1 サイクル目の終了時に X_{PP} が汚泥の引き抜きによって減少していた。これを補正するために、 K_{MAX} を変更した。

このように、 Y_{PO4} を 0.76、 q_{PP} を 3.7、 q_{PHA} を 7.0、 K_{MAX} を 0.45 に設定することで、モデルの計算結果がほぼ実測値と同じ挙動を示すようになった。

このようにパラメーターを変更したことの意味については、7.4 で考察する。

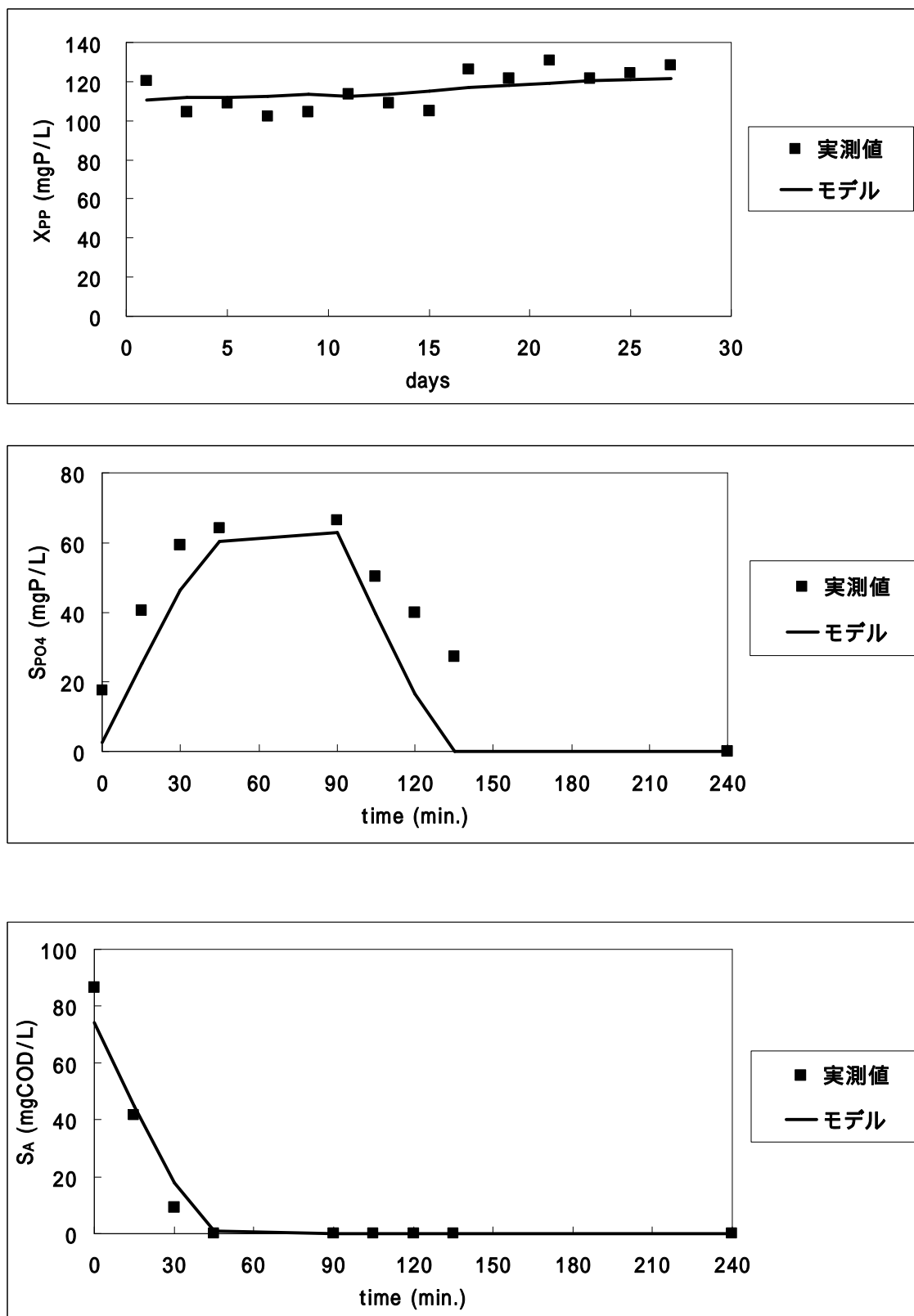


図 7.6 キャリブレーションの結果
(上段: X_{PP} 、中段: S_{PO4} 、下段: S_A)

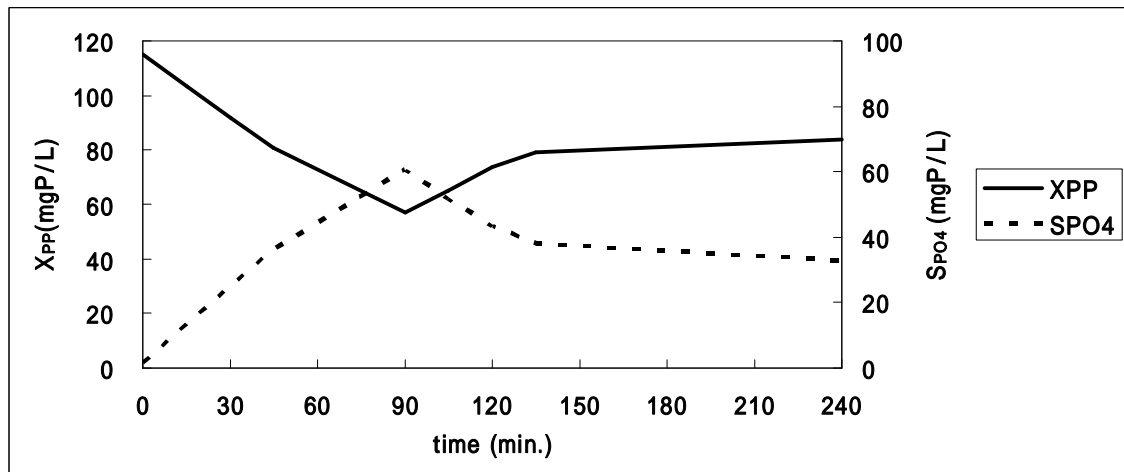


図 7.7 運転 1 サイクル目における X_{PP} および S_{PO4} の計算結果
(Y_{PO4} :0.76、 q_{PP} :3.7、 q_{PHA} :7.0 に設定)

7.3.2 X_{PAO} のモデル解析

7.3.1.3 で決定した各定数の値を用いて計算した X_{PAO} の計算値を、実測値と比較した。なお、7.2.1 で述べたように、実測値はコピー数であり、COD 量としての値への変換は容易ではない。そこで、運転 1 日目の実測値および計算値がほぼ同じになるように、実測値（コピー数 (copies/L)）を 5×10^8 で除することで X_{PAO} に変換した。すなわち 1 コピーあたり、 $1/(5 \times 10^8)$ mg COD という換算である。

X_{PAO} の計算結果、および定量 PCR 法の結果から換算して求めた実測値を図 7.8 に示す。図に示すとおり、モデルの計算結果および換算した実測値はともに、運転開始後から 5 日目くらいにかけて増加する様子がみられた。

一方で計算結果では実測値よりもはるかに増加速度が遅く、増加幅も小さかった。キャリブレーションをおこなった結果、 μ_{PAO} および Y_{PAO} の値を増やすことでキャリブレーションは可能であった。しかしながら、 Y_{PAO} を 1.0 に設定する必要があった。すなわち、 X_{PAO} の増殖収率（ X_{PHA} あたり）が 100% と、非現実的な設定を要した。このため、モデルのキャリブレーションは困難と結論付けた。

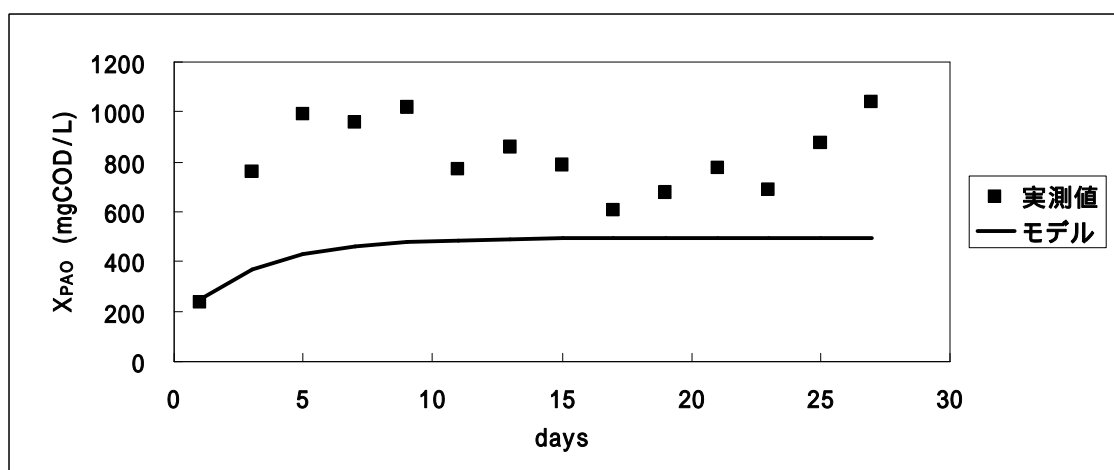


図 7.8 X_{PAO} の計算結果

7.4 考察

7.4.1 X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A のモデル解析

本章では pH を 7.9 ± 0.1 に設定して運転した R18 の、運転開始から 27 日目までにおける X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A のシミュレーションをおこなった。反応速度定数および化学量論係数を推奨値に設定して計算した結果、 X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A の挙動は実測値と大きく異なっていた。実測値の X_{PP} は、運転開始から 27 日目において大きな変動はみられなかったが、計算結果では、運転開始から徐々に減少した。 S_{PO4} については、嫌気での放出速度が実際よりも遅く、嫌気終了時における値も実測値の半分程度でしかなかった。 S_A については、嫌気での摂取速度が実際よりも遅かった。

感度解析によって X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A の計算結果に大きな影響をあたえる反応速度定数および化学量論係数を探索した結果、 q_{PP} および q_{PHA} がそれらの計算結果に大きな影響を与えることがわかった。但し、 q_{PP} および q_{PHA} を変更することによりキャリブレーションをおこなったところ、これら 2 つの定数を変更するのみでは実測値を再現することはできなかった。そこで、 Y_{PO4} および K_{MAX} の値も変更することでキャリブレーションをおこなった結果、実測値と類似した挙動を再現することができた。これらの定数を変更したことの妥当性について、以下に考察する。

Y_{PO4} は推奨値である 0.4 から 0.76 に変更した。これは、リアクターの pH が大きく影響していたと考えられる。ASM2 がデフォルトで想定している pH は 6.86 であり、リアクターの pH である 7.9 ± 0.1 よりも低い。6.4.1 に記したように、本研究で運転したリアクターでは、pH があがると嫌気における酢酸摂取量あたりのリンの放出量が増えていた。Smolder et al. (1994a) や Oehmen et al. (2005a) の報告においても同様の結果が得られている。

q_{PP} は推奨値である 1.5 から 3.7、 q_{PHA} は 3.0 から 7.0 に変更した。既存の報告においても、これらの反応速度定数は、酢酸を炭素源として運転した実験室規模 EBPR リアクターにおけるモデル解析において、しばしば値を上げている (Pijuan et al., 2004、Yaguci et al., 2005)。これは、リアクターにおける PAOs と GAOs の存在割合に起因していると考えられる (Yaguci et al., 2005)。ASM2 では GAOs について定義がされておらず、嫌気工程の S_A は PAOs のみがおこなうと設定されている。GAOs はポリリン酸を利用することなく嫌気条件かで有機物を摂取する (Satoh et al., 1994)。従って、GAOs が存在することにより、単位量の基質が摂取される時に放出されるリン酸の量は、見かけ上低くなる。モデルにおける反応速度定数および化学量論係数の推奨値は、都市下水処理場で得られた情報に基づいて決定されているが、そのような処理場では PAOs と GAOs が共存している場合があることが報告されている。そのため、リン除去が良好な実験室規模 EBPR リアクターにおいては、より PAOs が優占していると予想され、 q_{PP} および q_{PHA} の値を増やす必要があると考えられる。R18 は運転開始から 27 日目においても良好なリン除去を示し、PAOs が優占していたと推測できるため、 q_{PP} および q_{PHA} の値が推奨値よりも高い値となったと考えられた。この仮説が正しいかどうか確認するためには今後 GAOs を定量する手法を確立し、PAOs と GAOs の存在割合が及ぼ

す影響について、議論していく必要がある。

K_{MAX} は推奨値である 0.34 から 0.45 に変更した。これは、 q_{PP} 、 q_{PHA} および Y_{PO4} を上述のように変更した結果、運転 1 サイクル目の好気工程において X_{PP} の蓄積および S_{PO4} の摂取がみられず、1 サイクル目の終了時に X_{PP} の汚泥の引き抜きによって減少していたためである。但し、 K_{MAX} を変更している報告はこれまでにほとんどないため、 K_{MAX} の妥当性については、今後検討する必要がある。

このように、 q_{PP} 、 q_{PHA} 、 Y_{PO4} および K_{MAX} を変更することで実測値に近い挙動を数値計算で再現することができた。 q_{PP} 、 q_{PHA} については、PAOs と GAOs の存在比率が影響していたため、 Y_{PO4} はリアクターの pH が影響していたために、変更する必要があったと考えられた。一方で、 K_{MAX} についてはその妥当性を今後検討していく必要性が考えられた。

7.4.2 X_{PAO} のモデル解析

R18 における X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A の挙動を再現するためのキャリブレーションによって決定した定数を用いて、 X_{PAO} のモデル解析をおこなった。

この結果、7.3.2 に記したとおり、運転開始から X_{PAO} が増加する様子は実測値およびモデルの計算結果の両方においてみられた。しかしながら、 X_{PAO} の増加速度は実際よりも遅く、さらに、増加が止まったあとの X_{PAO} は実測値の半分程度であった。キャリブレーションには Y_{PAO} を 1.0 に設定するという、非現実的な設定をする必要があった。このようにモデルの定数を変更することによって、 X_{PAO} の挙動を再現することは、難しいと考えられた。

但し今回の検討では、反応速度定数および化学量論係数についてキャリブレーションをおこなったのみであり、運転開始時の汚泥に含まれる X_{PAO} の量についての検討をおこなわなかった。図 7.9 に示したとおり、汚泥に含まれる X_{PAO} を今回用いた入力値の半分である 117mgCOD/L に設定した場合、 X_{PAO} の計算結果は、実測値とほぼ類似した挙動となった。なお、図 7.8 では運転 1 日目の実測値および計算値がほぼ同じになるように、実測値（コピー数 (copies/L)）を 1×10^9 で除することで X_{PAO} に変換している。また、運転開始時の X_{PAO} を 117mgCOD/L に変更しても運転開始から 27 日目までの X_{PP} の挙動、運転 27 日目の S_A および S_{PO4} の挙動についてはモデル計算で実測値を再現できていた（図 7.10）。このように、運転開始時の汚泥に含まれる X_{PAO} の値に問題があった可能性が考えられた。

本章では運転開始時の汚泥に含まれる X_{PAO} は、文献値（津嶋ら、2006）に設定したが、R18 で用いた汚泥と文献で報告された汚泥における X_{PAO} が同じであったとは考えにくい。実際、Beer et al. (2006) は様々な実下水処理場の汚泥において全細菌あたりの PAOs の割合を定量し、その割合が処理場によって 3 倍程度異なることを報告している。また、そもそも文献値についても、実測の値ではなく推定された値であるため、正しい値であったかは断定できない。

このように、運転開始時の汚泥に含まれる X_{PAO} を文献値とすることは妥当ではないと考えられ、キャリブレーションによって推定する必要があると考えられた。運転開始時の汚

泥に含まれる X_{PAO} をキャリブレーションした上で、数値計算で X_{PAO} の挙動を再現できるかを再度検討していく必要がある。

最後に、本章では‘Accumulibacter’を唯一の PAOs としてシミュレーションをおこなった。酢酸を炭素源として実験室規模リアクターを運転した場合、‘Accumulibacter’が全細菌の 80% 近くにも達すると報告されており (Crocetti et al., 2000) R18 においても PAOs の大部分を占めていると予想される。但し、本章で対象とした R18 においても‘Accumulibacter’が PAOs の大部分を占めていたかについては、確証がない。このため、今後は‘Accumulibacter’の PAOs に対する割合を FISH 法およびポリリン酸染色法 (高濃度 DAPI) を用いた定量などによって評価したうえで、シミュレーションをすることがより望ましい。

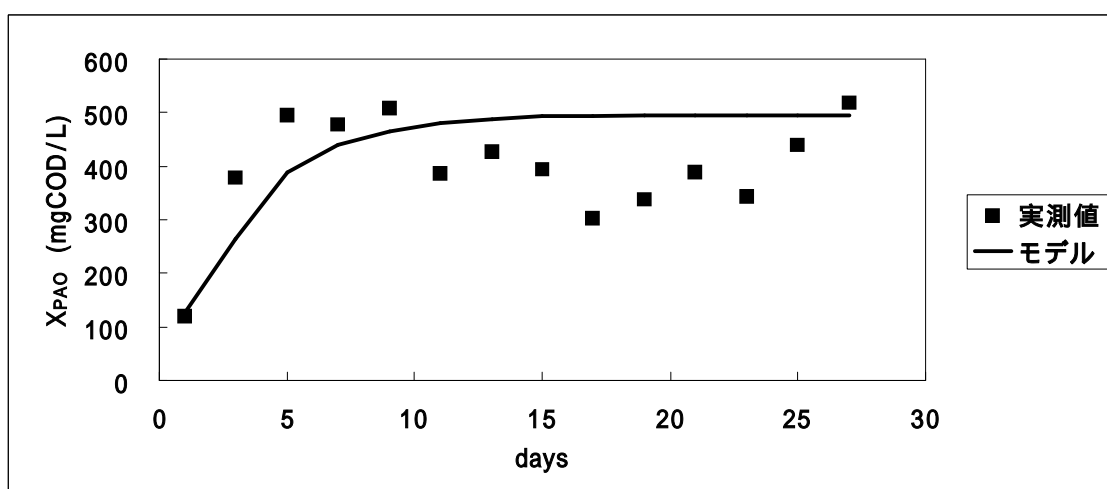


図 7.9 運転開始時の汚泥中の X_{PAO} を 117mgCOD/L に設定した計算結果

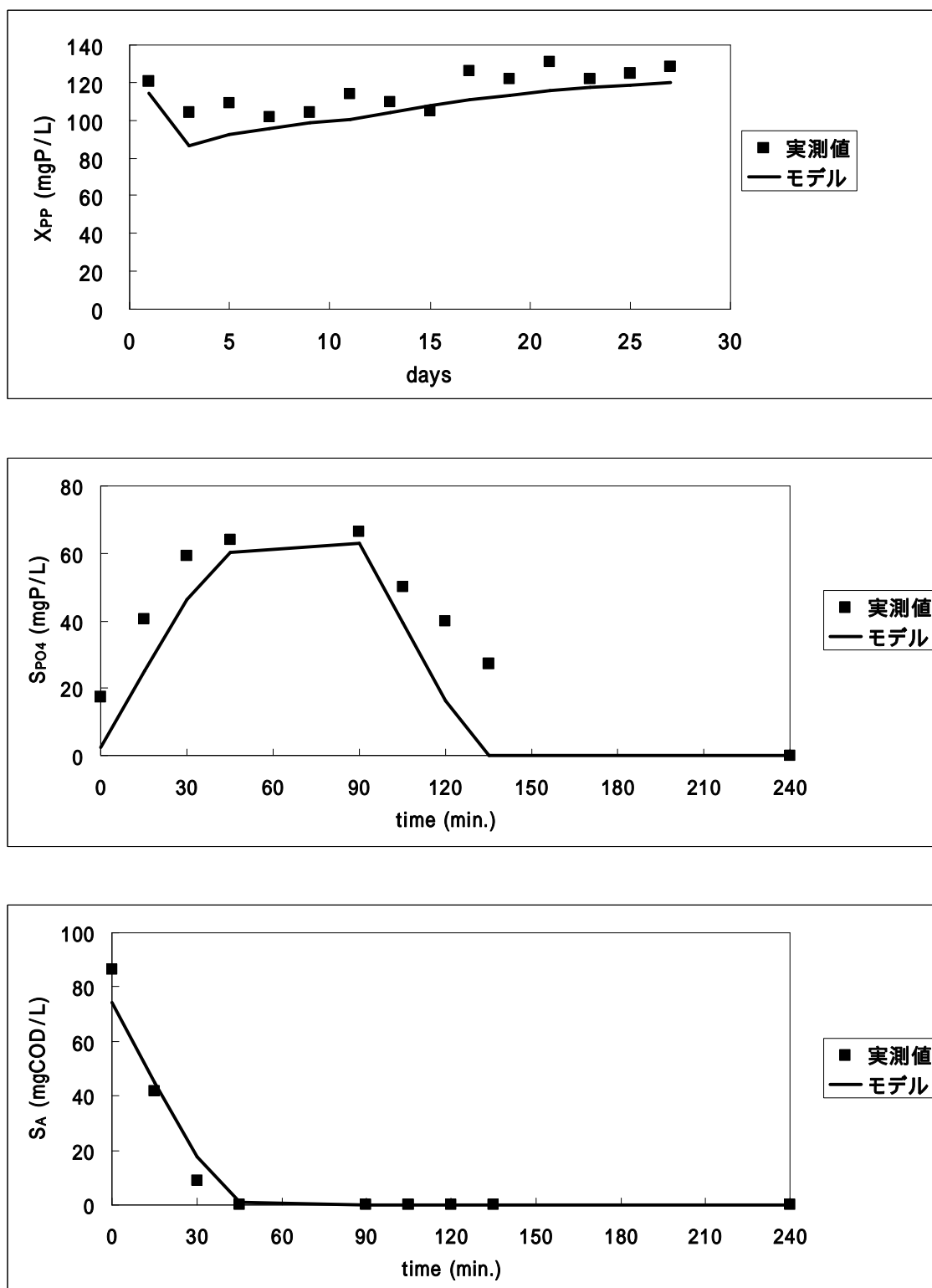


図 7.10 X_{PAO} を 117mgCOD/L に設定した場合の処理性能の計算結果
(上段： X_{PP} 、中段： S_{PO4} 、下段： S_A)

7.5 まとめ

本章では、実験室規模 EBPR リアクター (R18) におけるモデル解析をおこなった。まず、 X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A を正確にモデルで再現するためにキャリブレーションをおこなった。その後、 X_{PAO} のモデルによる計算結果と定量 PCR 法によって得られた‘Accumulibacter’の定量結果を比較することで、 X_{PAO} のモデル解析における有効性と問題点について検討した。本研究で得られた成果を以下に示す。

- X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A を正確にモデルで表現するために、キャリブレーションをおこなった結果、 Y_{PO4} 、 q_{PP} 、 q_{PHA} および K_{MAX} の値を変更することによって実際と類似した挙動を再現することができた。
- Y_{PO4} を変更する必要があった理由は、pH を 7.9 ± 0.1 と中性よりやや高い値でリアクターを運転したことにより、嫌気における酢酸摂取量あたりのリンの放出量が上がったためであると考えられた。
- q_{PP} 、 q_{PHA} を変更する必要があった理由は、R18 における PAOs の GAOs に対する存在比率が一般的な実下水処理場の割合よりも高いと推測されるためと考えられた。
- Y_{PO4} 、 q_{PP} 、 q_{PHA} および K_{MAX} を変更したモデルを用いて、 X_{PAO} を計算した結果、実際とは異なる挙動をしめしていた。
- X_{PAO} の挙動を再現するために、反応速度定数および化学量論係数についてキャリブレーションをしたが、挙動を再現することはできなかった。
- X_{PAO} の挙動を再現するためには、運転開始時における X_{PAO} の値をキャリブレーションによって推定する必要があることがわかった。

このように、キャリブレーションをおこなった結果、R18 の X_{PP} 、 S_{PO4} および S_A の挙動を正確に再現できた。 X_{PAO} の挙動は再現することができなかったが、改善すべき問題点を明らかにすることができた。

8 章 総括

8 章目次

8.1 総括

8.1.1 定量手法の確立

8.1.2 ‘ Accumulibacter ’ の生理・生態学的知見の収集

8.2 今後の展望

8.1 総括

本論文では、EBPR プロセスにおいてリン除去を担っている PAOs を迅速且つ正確に定量する手法を定量 PCR 法によって確立し、その手法を用いて PAOs の生理や生態に関する知見を収集した。以下に本研究の成果をまとめる。

8.1.1 定量手法の確立

本研究では 3 章および 4 章において、定量 PCR 法を用いて PAOs である‘*Accumulibacter*’と *M. phosphovorius* の 16S rRNA 遺伝子を定量する手法を確立した。

3 章では、‘*Accumulibacter*’の 16S rRNA 遺伝子を対象とした定量 PCR 法を確立し、活性汚泥試料への適用性を検討した。QPrimer PCR 法、QProbe PCR 法および SYBR GREEN I を用いたインターカレーター法について検討した結果、インターカレーター法によって、‘*Accumulibacter*’の 16S rRNA 遺伝子を定量することができた。活性汚泥中の‘*Accumulibacter*’を、確立したインターカレーター法および既存の定量方法である FISH 法によって定量した。その結果、両手法による定量結果には若干弱いながらも有意な相関関係 ($R^2=0.687$) が認められた。また、インターカレーター法は FISH 法にくらべて、迅速且つ高感度に定量できることがわかった。インターカレーター法による‘*Accumulibacter*’の定量限界は、全細菌に対する‘*Accumulibacter*’の割合として 0.01 ~ 0.1% であると考えられた。

4 章では、定量 PCR 法を用いて *M. phosphovorius* の 16S rRNA 遺伝子を定量する手法を確立し、EBPR プロセス中における *M. phosphovorius* のリン除去への寄与を推定した。この結果、QPrimer PCR 法によって *M. phosphovorius* の 16S rRNA 遺伝子を定量することができた。定量値の再現性を検討した結果、変動係数は 12% であり、3 章で確立した‘*Accumulibacter*’の定量 PCR 法とほぼ同等であった。異なる炭素源を与えて運転した実験室規模 EBPR リアクターの汚泥試料に対して、*M. phosphovorius* の 16S rRNA 遺伝子を定量したところ、そのコピー数はリアクターごとに大きく異なっていた。R5 (酵母エキス, ペプトンおよび酢酸) R6 (グルタミン酸および酵母エキス) および R9 (グルコース) では、*M. phosphovorius* のコピー数がリン除去と類似した挙動を示していたが、R7 (酢酸) および R8 (アスパラギン酸) においては、定量下限値以下であった。また、実下水処理場の汚泥について定量した結果、処理方式による 16SrRNA 遺伝子コピー数の違いは認められなかった。最後に、上述の実験室規模 EBPR リアクターにおける *M. phosphovorius* のリン除去への寄与を推定した結果、最大でも PAOs の数% のポピュレーションでしかなく、リン除去への寄与は小さいと考えられた。

このように、定量 PCR 法を用いることによって、主要な PAOs である‘*Accumulibacter*’を迅速に定量する手法を確立することができた。また、PAOs のモデル細菌として扱われている *M. phosphovorius* についても定量手法を確立でき、リン除去への寄与を推測することができた。このように時間的に密に PAOs の定量を行った研究は、これまでなかった。

8.1.2 ‘Accumulibacter’の生理・生態学的知見の収集

確立した定量 PCR 法を用いて‘Accumulibacter’の生理や生態に関する知見を収集した。なお、*M. phosphovorius* は 4 章の結果からリン除去への寄与は小さいと考えられたため、研究の対象としなかった。

5 章では、好気培養における‘Accumulibacter’の増殖条件を、定量 PCR 法を用いて探索した。培養方法としては、プレート培養法および液体培養法を選択した。この結果、プレート培養法による検討では、‘Accumulibacter’の増殖を確認できなかったが、液体培養法においては、グルコース (500mgC/L) を炭素源として、pH10.0 および 20 の条件において有意に増殖していることが確認された。この液体培養の条件を用いて、‘Accumulibacter’の分離を試みた。まず、より確実に分離をおこなうために、活性汚泥試料中の‘Accumulibacter’を濃縮する方法を検討した。この結果、Percoll を用いた密度分離法によって、‘Accumulibacter’を濃縮することができた。そこで、密度分離法によって濃縮した汚泥を用いて、上述の液体培養の条件にて分離を試みたが、‘Accumulibacter’を分離することはできなかった。

6 章では、pH を運転途中で低下させた実験室規模 EBPR リアクターにおけるリン除去および‘Accumulibacter’の変動を詳細に把握し、比較した。pH を 7.5 ± 0.1 (R14) または 7.9 ± 0.1 (R18 および R21) から 6.5 ± 0.1 に変更したリアクターにおいて、リン除去および‘Accumulibacter’の変動を把握した結果、‘Accumulibacter’がリン除去の悪化に先立って減少していく様子が見られた。但し、リン除去の悪化や‘Accumulibacter’の減少は pH 低下後すぐに起こるのではなく、リン除去の悪化は pH 低下から 20 ~ 26 日後、‘Accumulibacter’の減少は 0 ~ 19 日後にみられた。また、運転期間を通して pH を 6.5 ± 0.1 に設定して運転したリアクター (R20) でも良好なリン除去がみられ、‘Accumulibacter’が増加する様子が見られた。こうした結果から、リアクターの pH を 6.5 ± 0.1 に設定することで、リン除去および‘Accumulibacter’の増殖に即座に大きな影響は与えることはないが、運転途中で pH を 6.5 ± 0.1 に下げることによって、0 ~ 19 日の後に‘Accumulibacter’が減少し、さらに、それを追ってリン除去が悪化することがわかった。このような変動はこれまでに報告されておらず、定量 PCR 法を用いて詳細に挙動を把握することで初めて得られた知見である。

最後に 7 章では、活性汚泥モデルの一つである ASM2 による PAOs のモデル解析について、有効性と問題点を検討した。なお、6 章で運転した実験室規模 EBPR リアクター (R18) の pH を 7.9 ± 0.1 に設定していた期間における処理性能および‘Accumulibacter’の変動をモデルの解析対象とした。また、‘Accumulibacter’を唯一の PAOs と仮定した。

まず、実際の処理性能を正確に再現するために、モデルのキャリブレーションをおこなった。この結果、以下の反応速度定数および化学量論係数についてキャリブレーションすることで、処理性能を再現することができた。

- 1 . 嫌気における PHA 貯蔵に必要なリン酸の放出量 (Y_{PO4})
- 2 . ポリリン酸の最大比貯蔵速度 (q_{PP})
- 3 . PHA の最大比貯蔵速度 (q_{PHA})

4. PAOs の最大ポリリン酸含有率 (K_{MAX})

(カッコ内はモデルにおける表記)

つづいて、R18 における処理性能を再現できるようにキャリブレーションをおこなったモデルを用いて、PAOs の変動を計算し、定量 PCR 法によって定量したコピー数と比較した。この結果、PAOs が増加しプラトーに達するまでの様子は、計算結果およびコピー数の両方で見られた。しかしながら、モデルの計算結果では増加幅が小さく、プラトーにおける値がコピー数の半分くらいであった。反応速度定数および化学量論係数に対してキャリブレーションをおこなっても再現することはできなかった。これは、運転開始時の汚泥に含まれる PAOs の量の入力値に問題があったと考えられ、キャリブレーションによって入力値を推定する必要性が考えられた。このように、PAOs の変動をモデルで再現することはできなかったが、改善すべき問題点を明らかにすることができた。

上述のように、確立した定量 PCR 法を用いることで、これまで知られていなかった好気培養における増殖条件および、pH 低下時における‘Accumulibacter’の変動を把握することができた。活性汚泥モデルについては、PAOs の変動を再現することはできなかったが、改善すべき問題点を明らかにすることができた。

8.2 今後の展望

本研究では確立した定量 PCR 法を用いることによって、主要な PAOs である‘Accumulibacter’について多くの知見を得ることができた。しかしながら、EBPR プロセスにおける最大の課題はリン除去の不安定性の克服であり、今回の知見からこの課題を解決するための情報を得ることはできなかった。そこで、よりリン除去の安定した EBPR プロセスを構築するために、おこなうべき検討内容を以下に述べる。

まず、主要な PAOs である‘Accumulibacter’を分離することは、重要な検討課題である。‘Accumulibacter’を分離できれば、機能や代謝等をより詳細に把握することができ、その知見は安定した EBPR プロセスの構築のために有用な情報となる。また、分離株を担体として工業的に利用することも可能である。5 章において、好気培養における‘Accumulibacter’の増殖条件を明らかにすることができたが、増殖速度が遅かったことから、今回得られた条件における培養が最も適しているとは考えられなかった。5 章では、炭素源の種類、pH および培養温度が増殖に与える影響のみを検討したが、炭素源の濃度、必須微量元素や培養方法等についても詳細に検討し、さらに増殖に適した条件を探索していく必要がある。また、分離できる確率を上げるため、Percoll による濃縮ではなく、‘Accumulibacter’を 1 細胞のみを培地に播種できるような方法を考えていく必要がある。この方法の一つとしてマイクロマニピレーションが挙げられる。このように、分離条件についてはさらなる検討をおこなっていく必要がある。

つづいて、リン除去悪化時における‘Accumulibacter’の挙動についてさらに知見を収集し

ていく必要がある。どのような運転・環境因子が、どの程度変動すると、‘Accumulibacter’が減少し、リン除去が悪化するかを把握することで、安定したリン除去をおこなうための運転条件を決定することができる。6 章では pH を低下させた実験室規模 EBPR リアクターにおける‘Accumulibacter’の挙動を詳細に把握したが、そもそも明確なリン除去の悪化は見られなかった。今後はさらに pH を下げるなどして、明確にリン除去が悪化させたリアクターにおける‘Accumulibacter’の挙動を評価していく必要がある。また、pH の影響が大きな時間差をもって現れたことは、pH が直接的に‘Accumulibacter’に影響を与えたのではなく、もっと複雑な現象が汚泥中で起きていることを示唆していると考えられる。pH 以外のリン除去悪化に関わる運転・環境因子について、同様の検討をおこなっていくことも重要である。このように、さらなるデータを蓄積することで、リン除去悪化に関わる要因と‘Accumulibacter’の関係が明らかにされることが期待される。

最後に、PAOs を正確に再現するモデルを構築する必要がある。本研究ではもっともモデルにより再現しやすいと考えられたリン除去の立ち上がりについて検討し、ある程度は実験結果とつじつまのあうシミュレーションをおこなうことができた。その一方、リン除去が悪化していく様子については、どのようにしてモデルを組めばよいのか、見当もつかない。前節で述べたように、リン除去の悪化を起こすより直接的な原因がわかれば、それをモデルに組み込むことで悪化の様子を再現できるようになるであろう。

このように、EBPR プロセスの課題であるリン除去の不安定性の克服にはさらなる検討が必要であると考えられる。それらの検討においては、今回確立した定量 PCR 法が非常に有効なツールとして利用されることが期待される。

参考文献

英文

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59: 143-169.

Amann, R.I. and Wolfgang, L. (2000) Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microb. Rev.* 24: 555–565.

Bach, H.-J., Tomanova, J., Schlöter, M. and Munch, J.C. (2002) Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *J. Microbiol. Methods.* 49: 235–245.

Barat, R., Montoya, T., Borrás, L., Seco, A. and Ferrer, J. (2006) Calcium effect on enhanced biological phosphorus removal. *Water. Sci. Technol.* 53(12): 29-37.

Barnard, J.L. (1975) Biological nutrient removal without the addition of chemicals. *Water Res.* 9: 485-490.

Beauchamp, A.M., Seviour, R.J., and Lindrea, K.C. (1992) Polyphosphate accumulating abilities of *Acinetobacter* isolates from a biological nutrient removal pilot plant. *Water Res.* 9: 485-490.

Beimhohr, C., Krause, A., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1993) In situ identification of Lactococci, Enterococci and Streptococci. *Syst. Appl. Microbiol.* 16: 450-456.

Beer, M., Stratton, H.M., Griffiths, P.C. and Seviour, R.J. (2006) Which are the polyphosphate accumulating organisms in full-scale activated sludge enhanced biological phosphate removal systems in Australia? *J. Appl. Microbiol.* 100: 233–243.

- Blackall, L.L., Seviour, E.M., Bradford, D., Rossetti, S., Tandoi, V. and Seviour, R.J.** (2000) ‘*Candidatus Nostocoida limicola*’, a filamentous bacterium from activated sludge. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 703-709.
- Boon, N., Top, E.M., Verstraete, W., Siciliano, S.D.** (2003) Bioaugmentation as a tool to protect the structure and function of an activated sludge microbial community against a 3-chloroaniline shock load. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1511–1520.
- Bond, P.L., Hugenholtz, P., Keller, J., and Blackall, L.L.** (1995) Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludge from sequencing batch reactors, *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1910-1916.
- Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M.C.M., Hooijmans, C.M., Alaerts, G.J. and Heijnen, J.J.** (1997) Temperature effects on physiology of biological phosphorus removal. *J. Environ. Eng.-ASCE* 123 (2): 144–153.
- Brdjanovic, D., Logemann, S., Van Loosdrecht, M.C.M., Hooijmans, C.M., Alaerts, G.J. and Heijnen, J.J.** (1998a) Influence of temperature on biological phosphorus removal: process and molecular ecological studies. *Water Res.* 32: 1035–1048.
- Brdjanovic, D., Slamet, A., van Loosdrecht, M.C.M., Hooijmans, C.M., Alaerts, G.J. and Heijnen, J.J.** (1998b) Impact of excessive aeration on biological phosphorus removal from wastewater. *Water Res.* 32: 200–208.
- Bond, P.L., Erhart, R., Wagner, M., Keller, J., Blackall, L.L.** (1999) Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and non efficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4077-4084.
- Burow, L.C., Kong, Y., Nielsen, J.L., Blackall, L.L. and Nielsen, P.H.** (2007) Abundance and ecophysiology of *Defluviicoccus* spp., glycogen-accumulating organisms in full-scale wastewater treatment processes *Microbiology* 153: 178-185
- Cech, J.S. and Hartman, P.** (1990) Glucose induced break down of enhanced biological phosphate removal. *Environ. Technol.* 11: 651–656.

- Chua, A.S., Onuki, M., Satoh, H. and Mino, T.** (2006) Examining substrate uptake patterns of *Rhodocyclus*-related PAO in full-scale EBPR plants by using the MAR-FISH technique. *Water Sci. Technol.* 54: 63-70.
- Comeau, Y., Hall, K.J., Hancock, R.E.W. and Oldham W.K.** (1986) Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Water Res.* 20: 1511-1521.
- Crocetti, G.R., Hugenholtz, P., Bond, P.L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D. and Blackall, L.L.** (2000) Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16SrRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1175-1182.
- Crocetti, G.R., Banfield, J.F., Keller, J., Bond, P.L. and Blackall, L.L.** (2002) Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology* 148: 3353–3364.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H. and Wagner, M.** (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 434-444.
- Dudley, J., Buck, G., Ashley, R. and Jack, A.** (2002) Experience and extensions to the ASM2 family of models. *Water Sci. Tech.* 45(6): 177-186.
- Erdal, U.G., Erdal, Z.K. and Randall, C.W.** (2003) The competition between PAOs (phosphorus accumulating organisms) and GAOs (glycogen accumulating organisms) in EBPR (enhanced biological phosphorus removal) systems at different temperatures and the effects on system performance. *Water Sci. Technol.* 47 (11): 1–8.
- Filipe, C.D.M., Daigger, G.T. and Grady, C.P.L.** (2001a) Effects of pH on the rates of aerobic metabolism of phosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms. *Water Environ. Res.* 73: 213-222.
- Filipe, C.D.M., Daigger, G.T. and Grady, C.P.L.** (2001b) pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating and phosphate-accumulating organisms. *Water Environ. Res.* 73: 223-232.

- Fuhs, G.W., and Chen, M.** (1975) Microbial basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of waste water *Microbial. Ecol.* 2: 119-138.
- Fukushima, T., Uda, N., Onuki, M., Satoh, H. and Mino, T.** Development of the quantitative PCR method for *Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'* and its application to activated sludge *Journal of Water and Environment Technology* (accepted)
- Gich F., Garcia-Gil J. and Overmann J.** (2001) Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green nonsulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Arch. Microbiol.* 177: 1-10.
- Gujer W., Henze, M., Mino, T., Matsuo, T., Wentzel, M.C., Marais, G.v.R. and van Loosdrecht, M.C.M.** (1998) Activated Sludge Model No.3. *Water Sci. Tech.* 39: 183-193
- Hanada, S., Liu, W.T., Shintani, T., Kamagata, Y. and Nakamura, K.** (2002) *Tetrasphaera elongata* sp. nov., a polyphosphate-accumulating bacterium from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 883-887.
- Harms, G., A. Layton, H. Dionisi, I. Gregory, V. Garrett, S. Hawkins, K. Robinson, and G. Sayler.** (2003) Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 37:343-351.
- Harmsen, H.J.M., Kengen, H.M.P., Akkermans, A.D.L., Stams A.J.M. and De Vos, W.M.** (1996) Detection and localization of syntrophic propionate oxidizing bacteria in granular sludge by in situ hybridization using 16S rRNA-based oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1656-1663.
- He, S., Gu, A.Z. and McMahon, K.D.** (2006) Fine-scale differences between Accumulibacter-like bacteria in enhanced biological phosphorus removal activated sludge. *Water Sci. Technol.* 54 (1): 111-117.
- Hecker, K.H. and Roux, K.H.** (1996) High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *BioTechniques* 20: 478-485.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M.** (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6(10): 986-994.

Henze, M., Grady, C.P.L., Gujer, W., Marais, G.v.R. and Matsuo, T. (1986) Activated Sludge Model No.1. *IAWPRC Scientific and Technical Report*, No.1

Henze, M., Gujer, W., Mino, T., Matsuo, T., Wentzel, M.C. and Marais, G.v.R. (1995) Activated Sludge Model No.2, *IWAQ Scientific and Technical Report*, No.3

Henze, M., Gujer, W., Mino, T., Matsuo, T., Wentzel, M.C. and Marais, G.v.R. (1998) Activated Sludge Model No.2d. *Water Sci. Tech.* 39: 165-182.

Hesselmann, R.P.X., Werlen, C., Hahn, D., van der Meer, J.R. and Zehnder, A.J.B. (1999) Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* 22:454-465.

Hiraishi, A., Kaiya, S., Miyakoda, H. and Futamata, H. (2005) Biotransformation of polychlorinated dioxins and microbial community dynamics in sediment microcosms at different contamination levels. *Microbes Environ.* 20: 227-242.

Imai, H., Endoh, K. and Kozuka, T. (1988) Magnesium requirement for biological removal of phosphate by activated sludge. *J. Ferment. Technol.* 66: 657-666.

Jeon, C.O. and Park, J.M. (2000) Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor supplied with glucose as a sole carbon source. *Water Res.* 34: 2160-2170.

Jeon, C.O., Lee, D.S., Lee, M.W. and Park, J.M. (2001) Enhanced biological phosphorus removal in an anaerobic-aerobic sequencing batch reactor: effect of pH. *Water Environ. Res.* 73: 301-306.

Kaetzke, A., Jentsch, D., and Eschrich, K. (2005) Quantification of *Microthrix parvicella* in activated sludge bacterial communities by real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 207-211.

Kamagata, Y. and Tamaki, H. (2005) "Cultivation of uncultured fastidious microbes". *Microb. Environ.* 20: 85-91.

Kawaharasaki, M., Kanagawa, T., Tanaka, H. and Nakamura, K. (1998) Development and application of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe for detection of the phosphate-accumulating bacterium *Microthrix parvicella* in an enhanced biological phosphorus removal process. *Water Sci. Technol.* 37(4-5): 481-484.

- Kawaharasaki, M., Tanaka, H., Kanagawa, T., and Nakamura, K.** (1999) In situ identification of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA-targeted oligonucleotide probes and 4',6-diamidino-2-phenylindol(DAPI) at a polyphosphate-probing concentration. *Water Res.* 33: 257-265.
- Kong, Y., Beer, M., Seviour, R.J., Lindrea, K.C. and Rees, G.N.** (2001) Structure and functional analysis of the microbial community in an aerobic: anaerobic sequencing batch reactor (SBR) with no phosphorus removal. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 597-609.
- Kong, Y.H., Beer, M., Rees, G.N. and Seviour, R.J.** (2002a) Functional analysis of microbial communities in aerobic-anaerobic sequencing batch reactors fed with different phosphorus/carbon (P/C) ratios. *Microbiology* 148: 2299–2307.
- Kong, Y.H., Ong, S.L., Ng, W.J. and Liu, W.T.** (2002b) Diversity and distribution of a deeply branched novel proteobacterial group found in anaerobic–aerobic activated sludge processes. *Environ. Microbiol.* 4: 753–757.
- Kong, Y., Nielsen, J.L. and Nielsen, P.H.** (2004) Microautoradiographic study of *Rhodocyclus*-related polyphosphate-accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5383-5390.
- Kong, Y.H., Nielsen, J.L. and Nielsen, P.H.** (2005) Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4076–4085.
- Kong, Y.H., Xia, Y., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H.** (2006) Ecophysiology of a group of uncultured Gammaproteobacterial glycogenaccumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal wastewater treatment plants. *Environ. Microbiol.* 8, 479–489.
- Kuba, T., Wachtmeister, A., Vanloosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J.** (1994) Effect of nitrate on phosphorus release in biological phosphorus removal systems. *Water Sci. Technol.* 30(6): 263–269.
- Kurata, S., Kanagawa, T., Yamada, K., Torimura, M., Yokomaku, T., Kamagata, Y. and Kurane, R.** (2001) Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY FL-labeled probe or primer, *Nucleic Acids Res.* 29(6): e34.

- Kuroda, A., Takiguchi, N., Gotanda, T., Nomura, K., Kato, J., Ikeda, T. and Ohtake, H.** (2002) A simple method to release polyphosphate from activated sludge for phosphorus reuse and recycling, *Biotechnol. Bioeng.* 78: 333-338.
- Lane D.J.** (1991) 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.). New York, NY, John Wiley and Sons: 115-175.
- Larrea, L., Irizar, I. and Hidalgo, M.E.** (2002) Improving the predictions of ASM2d through modeling in practice. *Water Sci. Tech.* 45(6): 199-208.
- Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K. H. Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K. -H., and Wagner, M.** (1999) Combination of fluorescent in situ hybridization and microbiology – a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1289-1297.
- Lee, S. H., Onuki, M., Satoh, H., and Mino, T.** (2006) Isolation, characterization of bacteriophages specific to *Micrococcus phosphovorans* and their application for rapid host detection. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 259–264.
- Liu, W.T., Mino, T., Matsuo, T. and Nakamura, K.** (1996) Biological phosphorus removal processes—effect of pH on anaerobic substrate metabolism. *Water Sci. Technol.* 34(1–2): 25–32.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. and Forney, L.J.** (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516-4522.
- Liu, W.T., Nielsen, A.T., Wu, J.H., Tsai, C.S., Matsuo, Y. and Molin, S.** (2001) In situ identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process. *Environ. Microbiol.* 3: 110-122.
- Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K.-H. and Wagner, M.** (2002) Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5064–5081.
- Loy, A., Maixner, F., Wagner, M. and Horn, M.** (2007) probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res.* 35: D800-D804.

- Ludwig W., Strunk O., Westram R. and 29 other authors.** (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32(4): 1363-1371.
- Maidak,B.L., Cole,J.R., Lilburn,T.G., Parker,C.T., Jr., Saxman,P.R., Farris,R.J., Garrity,G.M., Olsen,G.J., Schmidt,T.M. and Tiedje,J.M.** (2001) The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 29: 173–174.
- Manefield, M., Whiteley, A.S., Griffiths, R.I. and Bailey, M.J.** (2002) RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5367-5373.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M. and Schleifer K.-H.** (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 593-600.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Vancanneyt M. and Schleifer K.-H.** (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* 142: 1097-1106.
- Martin, H.G., Ivanova, N., Kunin, V., Warnecke, F., Barry, K., McHardy, A.C., Yeates, C., He, S., Salamov, A., Szeto, E., Dalin, E., Putnam, N., Shapiro, H.J., Pangilinan, J.L., Rigoutsos, I., Kyrpides, N.C., Blackall, L.L., McMahon, K.D. and Hugenholtz, P.** (2006) Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. *Nat. Biotechnol.* 24(10): 1263–1269.
- Mas, J., Pedrós-Alió, C., Guerrero, R.** (1985) A mathematical model to determine the effects of intracytoplasmic inclusions on volume and density of microorganic. *J. Bacteriol.* 164: 749-756.
- Maszenan, A. M., Seviour, R. J., Patel, B. K. C., Janssen, P. H. and Wanner, J.** (2005) *Defluvicoccus vanus* gen. nov. sp. nov., a novel Gram-negative coccus/coccobacillus in the Alphaproteobacteria from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 2105–2111.

- Maszenan, A.M., Seviour, R.J., Patel, B.K.C., Schumann, P., Burghardt, Y., Tokiwa, Y. and Stratton, H.M.** (2000) Three isolates of novel polyphosphate accumulating gram positive cocci, obtained from activated sludge belong to a new genus *Tetrasphaera* gen. nov. and description of two new species *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 593-603.
- Meier, H., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer K.-H.** (1999) Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 186-196.
- Meyer, R.L., Saunders, A.M. and Blackall, L.L.** (2006) Putative glycogen accumulating organisms belonging to Alphaproteobacteria identified through rRNA-based stable isotope probing. *Microbiology* 152: 419–429.
- Mino, T., Arun, V., Tsuzuki, Y. and Matsuo, T.** (1987) Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process. *In: Ramadori, R. (Ed.), Biological Phosphate Removal from Wastewaters.* Pergamon Press, Oxford, 27–38.
- Mino, T., Liu, W.T., Kurisu, F. and Matsuo, T.** (1995) Modeling glycogen storage and identification capability of microorganisms in enhanced biological phosphate removal process, *Water Sci. Tech.* 31(2): 25-34.
- Mino, T., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J.** (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Res.* 32: 3193-3207.
- Muyzer, G., Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G.** (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16SrRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Nakamura, K., Masuda, K. and Mikami, E.** (1991) Isolation of a new type of polyphosphate accumulating bacterium and its phosphate removal characteristics. *J. Ferment. Bioeng.* 71:258-263.
- Nakamura, K., Hiraishi, A., Yoshimi, Y., Kawaharasaki, M., Masuda, K. and Kamagata, Y.** (1995a) *Microthrix phosphovorus* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 45: 17-22.

- Nakamura, K., Ishikawa, S. and Kawaharasaki, M.** (1995b) Phosphate uptake and release activity in immobilized poly-phosphate accumulating bacterium *Microtholunatus phosphovorus* strain NM-1 *J. Ferment. Bioeng.* 80: 377-382.
- Neef A.** (1997). Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Doctoral thesis (Technische Universität München).
- Nielsen, J.L., Christensen, D., Kloppenborg, M. and Nielsen, P.H.** (2003) Quantification of cell-specific substrate uptake by probe-defined bacteria under in situ conditions by microautoradiography and fluorescence in situ hybridization. *Environ. Microbiol.* 5: 202-211.
- Oehmen, A., Vives, M.T., Lu, H., Yuan, Z. and Keller, J.** (2005a) The effect of pH on the competition between polyphosphate accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms. *Water Res.* 39: 3727–3737.
- Oehmen, A., Yuan, Z.G., Blackall, L.L. and Keller, J.** (2005b) Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnol. Bioeng.* 91(2): 162–168.
- Oehmen, A., Saunders, A.M., Vives, M.T., Yuan, Z. and Keller, J.** (2006) Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources. *J. Biotechnol.* 123: 22–32.
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B. and Timmis, K.N.** (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 2: 39-50.
- Panswad, T., Doungchai, A., Anotai, J.** (2003) Temperature effect on microbial community of enhanced biological phosphorus removal system. *Water Res.* 37: 409–415.
- Pijuan, M., Saunders, A.M., Guisasola, A., Baeza, J.A., Casas, C. and Blackall, L.L.** (2004) Enhanced biological phosphorus removal in sequencing batch reactor using propionate as the sole carbon source. *Biotechnol. Bioeng.* 85: 56-67.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N.R. and Murrell, J.C.** (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403:646-649.

- Rantakokko-Jalava, K., and Jalava, J.** (2002) Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4211-4217.
- Rickard, L.F. and McClintock, S.A.** (1992) Potassium and magnesium requirements for enhanced biological phosphorus removal from wastewater. *Water Sci. Technol.* 26: 2203-2206.
- Roller C., Wagner M., Amann R., Ludwig W. and Schleifer K.-H.** (1994) In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA- targeted oligonucleotides. *Microbiology* 140: 2849-2858.
- Satoh, H., Mino, T. and Matsuo, T.** (1994) Deterioration of enhanced biological phosphorus removal by the domination of microorganism without polyphosphate accumulation. *Water Sci. Technol.* 30(6):203–211.
- Schindler, D.W.** (1974) Eutrophication and recovery in experimental lakes: implications for lake management. *Science* 184: 897–899.
- Schindler, D.W.** (1978) Factors regulating phytoplankton production and standing crop in the world's freshwaters. *Limnol. Oceanogr.* 23: 478–486.
- Schuler, A.J. and Jenkins, D.** (2002) Effects of pH on enhanced biological phosphorus removal metabolisms. *Water Sci. Technol.* 46 (4–5): 171–178.
- Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T. and Uchiyama, H.** (2001) A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol. Lett.* 23: 1205-1208.
- Serafim, L.S., Lemos, P.C. and Reis, M.A.M.** (2002) Effect of pH control on EBPR stability and efficiency. *Water Sci. Technol.* 46 (4–5): 179–184.
- Seviour, R.J., Mino, T. and Onuki, M.** (2003) The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 99-127.
- Shintani, T., Liu, W.T., Hanada, S., Kamagata, Y., Miyaoka, S., Suzuki, T. and Nakamura, K.** (2000) *Micropruina glycogenica* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive glycogen-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 201–207.

- Skovhus, T. L., Ramsing, N. B., Holmstrom, C., Kjelleberg, S. and Dahllof, I.** (2004) Real-time quantitative PCR for assessment of abundance of *Pseudoalteromonas* species in marine samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2373-2382.
- Smith, C.J., Nedwell, D.B., Dong L.F. and Osborn A.M.** (2006) Evaluation of quantitative polymerase chain reaction based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environ. Microbiol.* 8(5): 804–815.
- Smolders, G.J.F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J.** (1994a) Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process - stoichiometry and pH influence. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 461-470.
- Smolders, G.J.F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J.** (1994b) Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 837-848.
- Spring, S., Wagner, M., Schumann, P. and Kämpfer, P.** (2005) *Malikia granosa* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate- and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, and reclassification of *Pseudomonas spinosa* as *Malikia spinosa* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 55: 621-629.
- Stante, L., Cellamare, C. M., Malaspina, F., Bortone, G. and Tilche, A.** (1997) Biological phosphorus removal by pure culture of *Lamproedia* spp. *Water Res.* 31:1317-1324.
- Stevenson, B.S., Eichorst, S.A., Wertz, J.T., Schmidt, T.M. and J.T. Breznak, J.T.** (2004) New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4748-4755.
- Streichan, M., Gokecki, J.R., and Schoen, G.** (1990) Polyphosphate-accumulating bacteria from sewage plants with different process for biological phosphorus removal. *FEMS Microb. Ecol.* 73(2): 113-124.
- Suresh, N., Warburg, R., Timmerman, M., Wells, J. and Coccia, M.** (1985) New strategies for the isolation of microorganisms responsible for phosphate accumulation. *Water Sci. Technol.* 17(11-12): 43-56.

- Takiguchi, N., Kuroda, A., Kato, J., Nukanobu, K. and Ohtake, H.** (2003) Pilot plant tests on the novel process for phosphorus recovery from municipal wastewater. *J. Chem. Eng. Jpn.* 36: 1143-1146.
- Tasli, R., Artan, N. and Orhon, D.** (1997) The influence of different substrates on enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor. *Water Sci. Technol.* 35(1): 75–80.
- Torimura, M., Kurata, S., Yamada, K., Yokomaku, T., Kamagata, Y., Kanagawa, T. and Kurane, R.** (2001) Fluorescence-quenching phenomenon by photoinduced electron transfer between a fluorescent dye and nucleotide base. *Anal. Sci.* 17(1): 155-160.
- Vervaeeren, H., De Wilde, K., Matthys, J., Boon, N., Raskin, L. and Verstraete, W.** (2005) Quantification of an Eikelboom type 021N bulking event with fluorescence *in situ* hybridization and real-time PCR, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 695-704.
- Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D. and Schleifer, K.-H.** (1994) Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 792-800.
- Wang, N.D., Peng, J. and Hill, G.** (2002) Biochemical model of glucose induced enhanced biological phosphorus removal under anaerobic condition. *Water Res.* 36(1): 49–58.
- Wentzel, M.C., Lotter, L.H., Loewenthal, R.E. and Marais, G.v.R.** (1986) Metabolic behavior of *Acinetobacter* spp. In enhanced biological phosphorus removal –a biochemical model. *Water S. A.* 12: 209-244.
- Whang, L.M. and Park, J.K.** (2002) Competition between polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms in biological phosphorus removal systems—effect of temperature. *Water Sci. Technol.* 46(1-2): 191–194.
- Whelan, J.A., Russell, N.B. and Whelan, M.A.** (2003) A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol. Methods* 278: 261– 269.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. and Rasmussen, R.P.** (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Bio Techniques* 22(1): 130-138.

Wong, M.T., Mino, T., Seviour, R.J., Onuki, M. and Liu, W.T. (2005). In situ identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorous removal plants in Japan. *Water Res.* 39: 2901–2914.

Wong, M.T., Tan, F.M., Ng, W.J. and Liu, W.T. (2004) Identification and occurrence of tetrad-forming Alphaproteobacteria in anaerobic–aerobic activated sludge processes. *Microbiology* 150: 3741–3748.

Wong, M.T., Mino, T., Seviour, R.J., Onuki, M. and Liu, W.T. (2005) In situ identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorous removal plants in Japan. *Water Res.* 39(13): 2901–2914.

Yagci, Y., Insel, G., Tasli, R., Artan, N., Randall, C.W. and Orhon, D. (2005) A new interpretation of ASM2d for modeling of SBR performance for enhanced biological phosphorus removal under different P/HAc ratios. *Biotechnol. Bioeng.* 93: 258-270.

Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y. and Nakamura, K. (2003) *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *Int. J. Syst. E vol. Microbiol.* 53:1155-1163.

Zhang, T., Liu, Y. and Fang, H.H. (2005) Effect of pH change on the performance and microbial community of enhanced biological phosphate removal process. *Biotechnol. Bioeng.* 92:173-182.

Zilles, J.L., Peccia, J., Kim, M.W., Hung, C.H. and Noguera, D.R. (2002) Involvement of *Rhodocyclus*-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2763–2769.

和文

石井浩介、中川達功、福井学（2000）微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用、Microbes and Environments、15、59-73

宇田直樹、小貫元治、佐藤弘泰、味埜俊（2005）実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の FISH 法による群集解析、第 40 回日本水環境学会年会 講演集、469

大江華（2005）アミノ酸を主要炭素源として馴養した生物学的リン除去プロセスに出現する主要細菌の挙動解析、東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学研究系 修士論文

押木守（2006）活性汚泥中の PHA 蓄積細菌群集の分子生物学的手法による解析、東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学研究系 修士論文

小田和賢一（2007）分子生物学的手法による活性汚泥中バクテリオファージの分布および挙動の解析、東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学研究系 博士論文

小貫元治、味埜俊、佐藤弘泰（2005）生物学的リン除去プロセスにおける微生物群集像：現状と展望、日本水環境学会誌、28、479-483

金澤孝文（1997）リン 謎の元素は機能の宝庫 、研成社

立見辰雄（1986a）鉍物資源を考える（1）地質ニュース、380、6-17

立見辰雄（1986b）鉍物資源を考える（2）地質ニュース、382、13-27

立見辰雄（1986c）鉍物資源を考える（3）地質ニュース、384、26-38

立見辰雄（1986d）鉍物資源を考える（4）地質ニュース、387、16-37

立見辰雄（1987）鉍物資源を考える（5）地質ニュース、392、34-55

巽善彦、岡部聡、渡辺義公（2004）ジルコニウムメゾ構造体による下水汚泥からのリン回収、第 38 回日本水環境学会、年会講演集、196

津嶋倫也、矢口淳一（2006）IWA 活性汚泥モデルによる従属栄養細菌、硝化細菌、リン蓄積菌の菌体量の推定、下水道協会誌、43、115-129

中山広樹（1996）バイオ実験イラストレイテッド 本当にふえる PCR

日本下水道協会（1997）下水道試験方法

日本下水道協会（1999）流域別下水道整備総合計画調査指針と解説 平成 11 年度版

花田茂久、佐藤弘泰、味埜俊（1999）都市下水処理場活性汚泥における蓄積基質の挙動、環境工学研究論文集、36、179-186

福島寿和（2003）生物学的リン除去プロセスにおける微生物群集解析 - 炭素源の種類による群集構造の差異に関する検討 - 、東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学研究系 修士論文

福島寿和、小貫元治、佐藤弘泰、味埜俊（2006）定量 PCR 法による *Microthrix phosphovorus* の定量手法の確立と活性汚泥試料への適用、環境工学研究論文集、43、181-186

水谷潤太郎（1998）総窒素・総リン物質循環の視点からみた環境に調和した下水道の可能性、下水道協会誌、35 (424)、81-96

味埜俊（2005）活性汚泥モデル、環境新聞社

村田恒夫（1992）下水の高度処理技術、理工図書株式会社

J-Bio 21（2005）QProbe 設計の注意点、私信

謝辞

本論文は 2004 年 10 月から 2007 年 6 月までの私の博士研究の成果をまとめたものです。3 年間の博士研究をおこなうにあたり、多くの方々にお世話になりました。

指導教官である味埜 俊 教授（東京大学大学院 新領域創成科学研究科 社会文化環境学専攻）には、様々な場面でご指導いただきました。研究面では、リン除去を長年研究されてきた経験から、私では考えつかないようなアイデアを数多く提示していただきました。また、外部に提出する書類等で、文章の書き方を綿密に指導していただきました。先生に例示していただいた文章の美しさにはいつも感服させられていました。

佐藤 弘泰 准教授（本学 新領域創成科学研究科 社会文化環境学専攻）には研究の細部にまでわたり、ご指導いただきました。先生のご指導なくしては本論文を完成できなかった、と言っても過言ではありません。例を挙げるときりがありませんが、活性汚泥モデルについて何もわからなかった私に対して丸一日かけてご教授いただいたこと、本論文や投稿論文を深夜遅くまで添削していただいたこと等々、本当にお世話になりっぱなしでした。また、柏キャンパスへの移転では、機能的な実験室の設計、アレンジをして頂き、私を含む学生全員がスムーズに新生活を始めることができました。

木暮 一啓 教授（本学 海洋研究所）、栗栖 太 講師（本学 工学系研究科 都市工学専攻）、鯉淵 幸生 講師（本学 新領域創成科学研究科 社会文化環境学専攻）にはお忙しい中、本論文の審査委員を快諾していただきまして心よりお礼申し上げます。先生方のご助言によって、本論文がよりよいものとなりました。

小貫 元治 講師（本学 サステイナビリティ学連携研究機構）は、EBPR プロセス研究の先輩として、多くの貴重なご助言をいただきました。また、卒業後の進路相談等、研究に関係ないことについても様々なご助言をいただきました。これからも人生の師として小貫先生の背中を追っていきたいと思います。

Faizal Bux 准教授（Durban University of Technology 南アフリカ）には Visiting Scientist として研究交流させていただく機会を与えていただきました。4 週間と短い期間でしたが、とても刺激的な時間を過ごすことができました。先生および研究室のスタッフ、学生には、大変お世話になりました。

矢野 雅賢さん（エーベル・バイオクリーン株式会社）には、液体培養法における‘Accumulibacter’の増殖条件の検討を手伝っていただきました。いつも丁寧に実験をおこない、疑わしい結果がでたときには、すぐに再実験をおこなう矢野さんの姿勢には、いつも感心していました。研究を手伝っていただき本当にありがとうございました。

宇田 直樹君（現 みずほ証券）には、3 章で用いた実下水処理場の汚泥を分けていただき、また、FISH 法による‘Accumulibacter’の定量結果を供与していただきました。

道中 敦子博士（現 キリンビール株式会社）には、本研究の核である定量 PCR 法の基礎を一から教えていただきました。忙しい時期だったにも関わらず、共に実験をしていただいたことを感謝しております。今後ともよろしくお願い申し上げます。

小田和 賢一博士（現 東北大学大学院 農学研究科）、末岡 一男君そして押木 守君とは博士研究の苦楽を共にしました。博士課程の 3 年間を共に過ごし、お互いに切磋琢磨できたことを誇りに思います。その他、味埜・佐藤研究室の現メンバーおよび OB・OG の皆様には、飲み会等で楽しい時間を過ごさせていただいたことを感謝いたします。この他書ききれませんが、様々な人に支え、励ましていただきました。

最後に、再び学生に戻ることを許可し、影で支えてくれた両親、家族に感謝いたします。ありがとうございました。

2007 年 8 月 福島 寿和

Appendix

定量 RT-PCR 法による *Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphatis*’ の 16S rRNA 定量手法の確立と活性汚泥試料 への適用

ここでの検討では、6 章と同じリアクターを対象としているが、‘*Accumulibacter*’の定量 PCR 条件を 5 章で改善した条件（アニーリング；66 °C、15 秒）ではなく、3 章で確立した条件（57 °C、20 秒）でおこなったため、DNA の定量値結果は異なる。このため、ここで述べる結果は Appendix としてまとめる。

1 背景と目的

EBPR プロセス内における ‘*Accumulibacter*’ の挙動をより詳細に把握するために、‘*Accumulibacter*’ の 16S rRNA を対象とした定量 RT-PCR 法を確立し、活性汚泥試料へ適用した。

細菌の 16S rRNA 遺伝子は種によって数が異なるものの、同種であれば 1 細胞あたりのコピー数は一定である。このため、16S rRNA 遺伝子数を定量することによって細菌の数を定量することが理論上可能であり、3 章においてもそれが立証されている。一方で RNA は活性を反映しており、特に 16S rRNA は growth activity の指標となると考えられている。すなわち 16S rRNA を定量することによって標的細菌の増殖活性を評価することが可能となる。

Vervaeren et al. (2005) はバルキング現象が見られた汚泥に対して、糸状菌の 16S rRNA 遺伝子および 16S rRNA を定量 PCR 法によってモニタリングしたところ、16S rRNA 遺伝子が増加する数日前に 16S rRNA が増加していた。この結果は、糸状菌が実際に増殖しバルキングが起こる前に、増殖活性が上がっていることを意味している。このため、糸状菌の 16S rRNA がバルキングを予測する指標としての可能性を秘めていることを報告している。

‘*Accumulibacter*’ についても同様の知見が得られるのであれば、‘*Accumulibacter*’ の 16S rRNA をモニタリングすることで、リン除去悪化、もしくは回復の予測が可能になることが

期待される。そこで先ず、‘*Accumulibacter*’の 16S rRNA を定量する手法を確立した。RNA を直接定量することは困難であるため、逆転写 (RT; Reverse Transcription) 反応によって得られた cDNA を定量した。cDNA の定量は、3 章で確立した定量 PCR 法を適用した。この際に、核酸中の DNA 除去や逆転写反応について、条件の最適化をおこなった。

続いて、pH の低下によるリン除去悪化リアクター (R14) および通常の運転による EBPR リアクター (R16) をそれぞれ運転し、‘*Accumulibacter*’の 16S rRNA、16S rRNA 遺伝子およびリン含有率をモニタリングした。それらの結果を比較することで RNA 定量の有用性について検討した。尚、16S rRNA を RNA、16S rRNA 遺伝子を DNA と表記する。

2 実験方法

2.1 活性汚泥試料

2系列の実験室規模EBPRリアクター (R14およびR16) から活性汚泥試料を採取した。汚泥試料は2日に1度採取し、採取後直ちに-80 °Cにて保存した。

両リアクターの運転条件詳細は6.2.1にて示した通りである。R14はpH7.5±0.1で49日間運転した後、pH6.5±0.1に変更した。pHを6.5±0.1に変更した後の試料を採取した。R16はpH7.5±0.1で運転した。

2.2 水質モニタリング

リン除去の状態を把握するため、リン含有率を測定した。リン含有率測定についての詳細は6.2.2.2にて示す。

2.3 DNA および RNA 試料の調製

6.2.3.1に示してあるとおり、MORA-EXTRACTを用いて核酸を抽出した。抽出した核酸はそれぞれ分注し、一方はDNA試料としてそのまま使用した。もう一方は、RNA試料として、DNase処理によってDNAを除去した。DNase処理は以下の通りおこなった。

RNA試料をNano Drop (分光光度計) の核酸モードで濃度測定した後、100ng/μLになるように希釈した。希釈後、DNAを分解するためにTURBO DNA-free(Ambion)を用いて、DNase処理をおこなった。DNase処理は、DNaseとInactivatorの添加量を除いて、同社のマニュアルにしたがった。DNaseはマニュアル記載されている量の3倍量を、Inactivatorは2倍量を添加した。

2.4 逆転写 (RT) 反応

DNase処理したRNA試料から、逆転写反応によってcDNAを合成した。逆転写反応はReverTra -plus- (TOYOBO) を用いた。実験操作は同社のマニュアルにしたがっておこなった。反応の際に用いるプライマーについては、PAO846r (5'-GTTAGCTACGGCACTAAAAGG-3')、1492r(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') および、キットに含まれているランダムプライマーについてそれぞれ検討し、合成されたcDNAの量が多く、ばらつきが少なかったPAO846rを用いることとした。

2.5 定量 PCR 法および定量 RT-PCR 法

3章にて確立した定量PCR法を用いて、‘Accumulibacter’のDNAを定量した。条件の詳細は3.3.1に示している。DNA試料は1反応あたりの添加量が5ngになるように希釈した。

‘Accumulibacter’のRNAの定量には、定量RT-PCR法を用いた。PCR反応はDNAの定量とまったく同じ条件でおこなった。試料は、RT反応によって合成したcDNAを1000倍に希釈したものを10 μ L用いた。また、DNase処理によって完全にDNAが分解されていることを確認するため、DNase処理をしたRNA試料を陰性対照としてPCR反応をおこなった。

3 実験結果

3.1 定量 RT-PCR 法の確立

定量RT-PCR法の確立のために、DNase処理の条件およびRT反応に用いるプライマーについて検討した。

DNase処理の条件

定量RT-PCR法によって、RNAのみを定量するためにはDNAを全て分解処理する必要がある。そこで、完全にDNAを分解するためのDNase処理条件を決定した。DNase処理にはTURBO DNA-free (Ambion) を用いた。

まず、MORA-EXTRACTを用いて抽出した試料を希釈せずに、DNase処理を同社のマニュアルにしたがっておこなった。尚、試料における核酸濃度は約300ng/ μ Lであった。処理後の試料を100倍もしくは1000倍に希釈し、定量PCRをおこなった結果、Ct値は滅菌蒸留水を添加した陰性対照よりも数サイクル早かった。このため、完全にDNAを分解できていないことがわかった。

続いて、抽出した試料を100ng/ μ Lに希釈して検討した。この希釈した試料に対して、マニュアルに従ったDNase処理または、マニュアルの3倍量のDNaseを加えた処理をおこない、定量PCR法によって、DNA残存の有無を検討した。この結果、3倍量のDNaseを加えた場合においてのみ、DNAが完全に分解されていることが確認された。

これらの結果から、DNase処理は100ng/ μ Lに希釈した試料を通常の3倍量のDNaseを加えておこなうことにした。また、DNaseの量を増やしたため、DNaseを失活させるために加えるInactivatorを通常の2倍量添加した。

RT反応のプライマー選択

活性汚泥試料から抽出した試料に対して、PAO846r、1492rおよびランダムプライマーによるRT反応をおこない、合成されたcDNAの量が多く、ばらつきが少ないプライマーを決定した。尚、1492rおよびランダムプライマーを検討した理由は、それらのプライマーを用いることによって、他の細菌や16S rRNA以外のRNAにおいても同一の反応試料を用いることが可能となり、RT反応のばらつきを無視することができるためである。検討は各プライマーにつき、3連で検討した。

各プライマーによるRT反応をおこない、定量PCR法によって定量した結果を表1に示す。この結果、PAO846rを用いた場合において、他のプライマーと比較して10倍以上のcDNAが合成されていた。またばらつき (CV: coefficient of variation) も2.9%程度と非常に低いものであった。尚、このばらつきは、RT反応および定量PCRの操作に起因するものである。

これらの結果から、RT反応にはPAO846rを用いることに決定した。

表1 各プライマーを用いた RT 反応サンプルの定量結果

プライマー	平均値 (copies/reaction)	CV (%)
PAO846r (‘ <i>Accumulibacter</i> ’ に特異的なプライマー)	6.0×10^6	2.9
1492r (全細菌を対象としたプライマー)	1.2×10^5	13.9
ランダムプライマー	1.9×10^5	5.7

3.2 活性汚泥試料への適用

R14における‘*Accumulibacter*’のRNA、DNAおよびリン含有率の挙動を図1に示す。RNAはDNAよりも 10^3 倍程度高い値を示していたが、その挙動はほぼ類似しているものであった。RNA、DNAともにリン除去が悪化するよりも前に減少している様子が見られた。RNAは4日目まで若干の増加を見せた後、急激に減少している様子が見られた。DNAについても同様に、4日目以降急激に減少していた。

R16における‘*Accumulibacter*’のRNA、DNAおよびリン含有率の挙動を図2に示す。R14と同様にRNAはDNAよりも 10^3 倍程度高い値を示していたが、その挙動はほぼ類似していた。RNA、DNAともに徐々に18日目程度までは増加していく様子が見られ、その後低下した。リン含有率については、R14と異なり、RNA、DNAと類似した挙動を示し、20日目くらいから、減少していく様子が見られた。

Appendix 定量 RT-PCR 法による *Candidatus* 'Accumulibacter phosphatis' の
16S rRNA 定量手法の確立と活性汚泥試料への適用

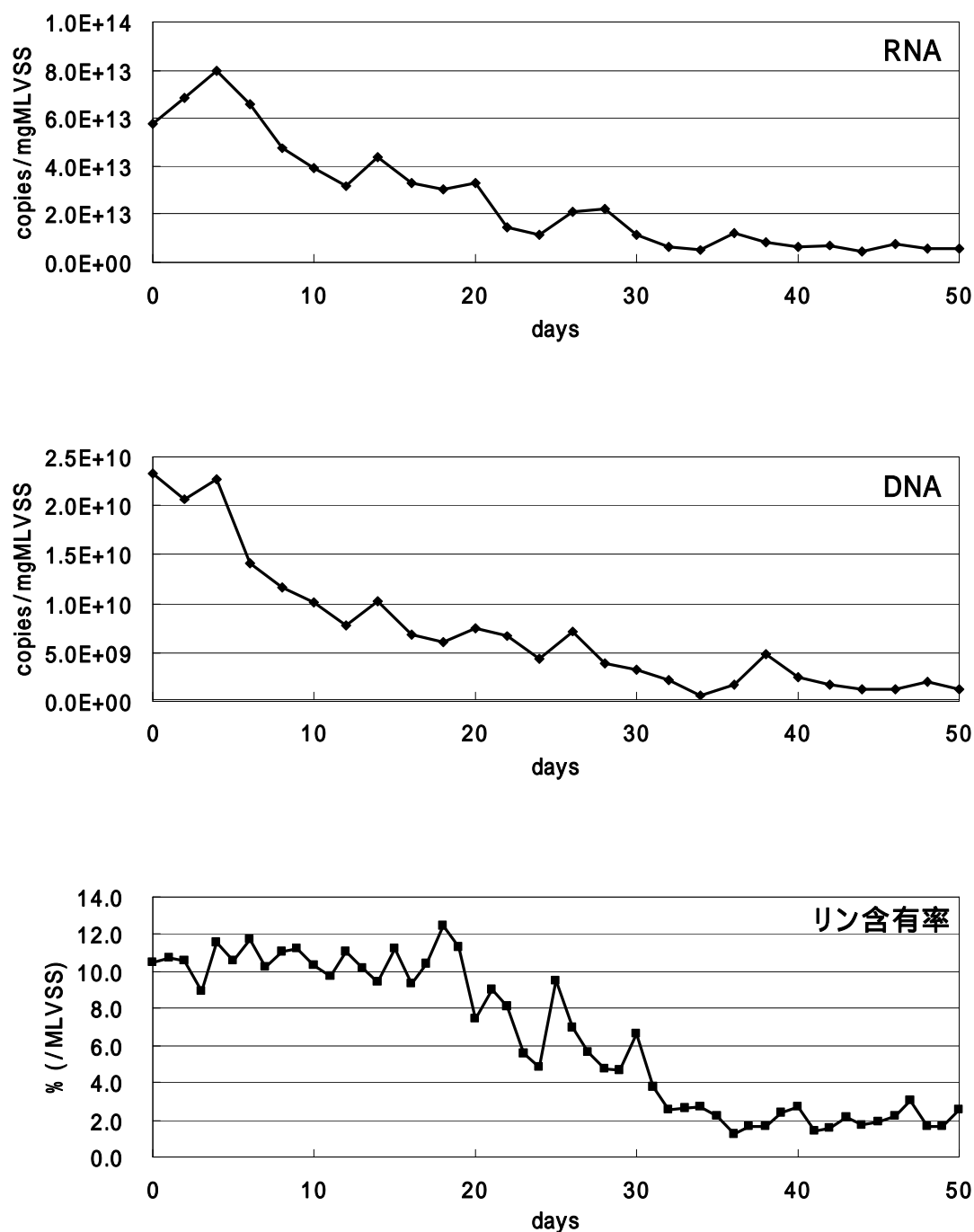


図1 R14における16S rRNA (RNA)、16S rRNA 遺伝子 (DNA) およびリン含有率の挙動

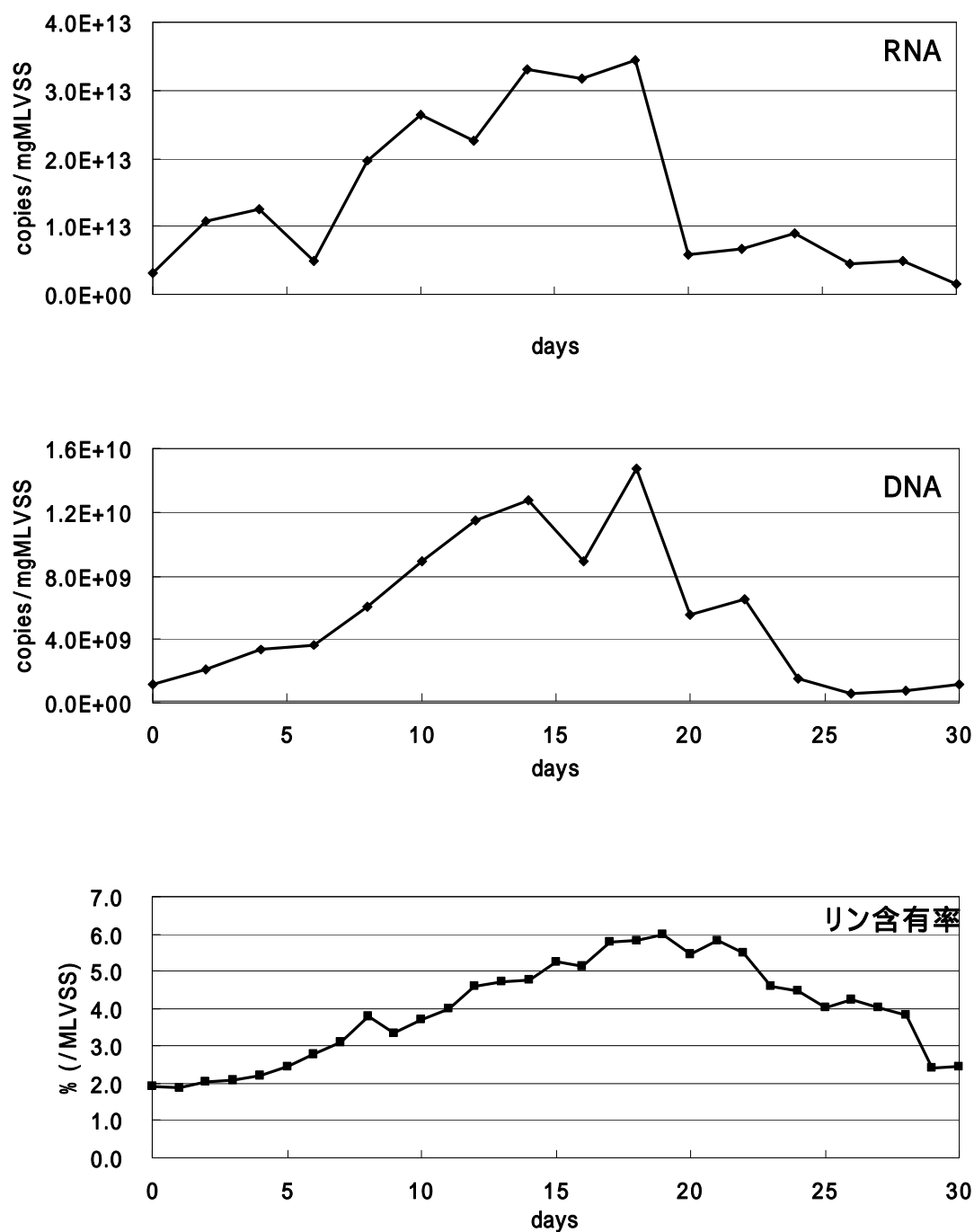


図2 R16 における 16S rRNA (RNA)、16S rRNA 遺伝子 (DNA) およびリン含有率の挙動

RNA と DNA の挙動をより詳細に検討するために、各試料について DNA に対する RNA の割合 (RNA/DNA 比) を求めた。R14 における RNA/DNA 比の挙動を図 3 に、R16 の RNA/DNA 比を図 4 に示す。R14 については、RNA/DNA 比が 0 日目から 8 日目にかけて徐々に上昇し、4000 程度で安定した。22 日目には 2000 程度までに低下し、その後は不安定な状態が続いた。特に 34 から 36 日目に急激に上昇する様子が見られた。これは、図 1 に示すとおり、RNA は 36 日目に若干の増加を見せたのに対して、DNA は少し遅れて、38 日目に増加したためであった。

R16 については、RNA/DNA 比が 2 日目に 5000 程度まで一時的に上昇し、その後 3000 程度で安定していた。その後、16 日目以降値が低下し、24~26 日目に 8000 程度まで急激に上昇する様子が見られた。これは図 2 にて示したとおり、RNA は 18 日目から 20 日目にかけて急激に減少し、その後安定したのに対して、DNA は 18 日目から 26 日目にかけて RNA よりは緩やかに減少したためであると考えられた。

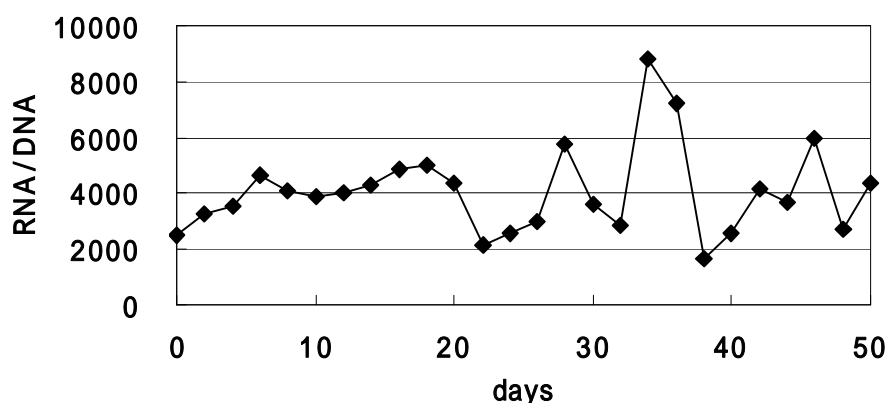


図 3 R14 における RNA/DNA 比の挙動

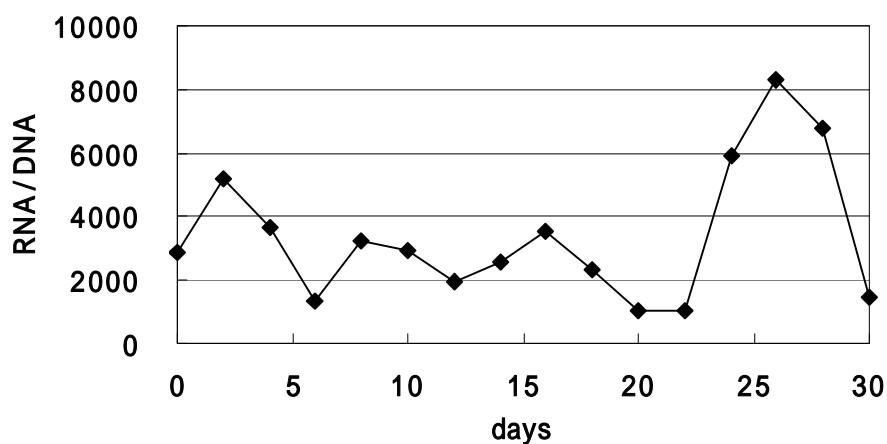


図 4 R16 における RNA/DNA 比の挙動

4 考察

4.1 定量 RT-PCR 法の確立

定量 RT-PCR 法の確立では、DNase 処理による RNA サンプルの調製、および逆転写反応におけるプライマーの種類を検討した。PCR については、すでに‘*Accumulibacter*’の定量 PCR 法を確立しているため、同じ条件を採用した。

DNase 処理については、TURBO DNA free (Ambion) を用いて、プロトコールの 3 倍量の DNase を添加することで完全に DNA を分解することができた。プロトコールの 3 倍量を必要とした理由については、抽出した核酸サンプルに DNase を阻害する物質が混入していたことが考えられる。抽出過程にフェノールやエタノールを用いた精製をおこなっているが、活性汚泥中に存在する DNase 阻害物質が残っていた可能性は否定できない。また、残存 DNA の有無を定量 PCR 法によって確認したため、アガロースチェックよりも感度よく検出されたことも一因として考えられる。

逆転写反応に用いるプライマーとして、‘*Accumulibacter*’を対象とした PAO846r、全細菌を対象とした 1492r、およびランダムプライマーについて検討した。この結果、PAO846r を用いた場合、そのほかのプライマーと比較して cDNA の合成量が多く、定量値のばらつきが小さいことがわかった。以下に、1492r およびランダムプライマーを用いた場合において、合成量が少なく、且つ、ばらつきが大きくなった理由を考察する。

1492r については定量 PCR に必要な配列を含む cDNA 合成の効率が PAO846r よりも悪かったことが考えられる。定量 PCR に必要な配列は PAO651f および PAO846r のアニール部位に挟まれた領域である。PAO846r を逆転写反応に用いた場合は、PAO846r の結合部位から約 200 塩基ほど合成すればよいことになる。一方で、1492r を用いた場合は約 800 塩基の合成が必要となり、途中で合成が止まってしまう可能性も考えられる。そのため、合成量に違いが出たと考えられる。また、PAO846r を用いた場合は基本的に‘*Accumulibacter*’の 16S rRNA のみを逆転写するが、1492r を用いた場合においては、ほとんど全ての細菌の 16S rRNA を逆転写する。このため、‘*Accumulibacter*’の 16S rRNA にプライマーが結合する確率が下がり、合成量が減少した可能性も考えられた。

ランダムプライマーは A、T、G、C の全ての塩基を含む混合塩基 (N) が 6 塩基続いた配列であり、基本的に配列のどこにでも結合することが可能となる。すなわち、定量 PCR で増幅する配列 (PAO651f-PAO846r) を含む cDNA を合成する割合は減少する。PAO846r を用いた場合との合成量の差はこのためであると考えられる。

今回の検討では、PAO846r が‘*Accumulibacter*’の 16S rRNA を定量するために、最も適した逆転写プライマーであった。但し、様々な細菌種や 16S 以外の RNA を対象とした場合においては、今回のように特定の遺伝子配列のみを対象としたプライマーを用いることは不可能となる。このような場合においては今回検討したランダムプライマーを用いることが必要となる。今回の検討では、PAO846r を用いた場合に比べ、cDNA の合成量は 10 分の一程度であったが、定量値のばらつきは、6%程度と小さいものであった。

また、確立した定量 RT-PCR 法を実験室規模 EBPR リアクターに適用した結果、活性汚泥試料における RNA/DNA 比は、変動はあったものの 3000 ~ 4000 程度であった。Vervaeren et al. (2005) は活性汚泥内における糸状菌の RNA および DNA を測定した結果、RNA/DNA 比は 2000 前後であったと報告している。本研究と大きな違いはないことから、両者の研究において、逆転写反応を含めた定量操作には問題が無かったと考えられる。

4.2 活性汚泥試料への適用

2 系列の実験室規模 EBPR リアクターについて、‘*Accumulibacter*’ の RNA、DNA およびリン含有率の挙動を評価し、比較した。この結果、RNA と DNA の挙動は大まかには類似していたが、RNA と DNA の比 (RNA/DNA 比) を求めたところ、RNA/DNA 比が急激に上昇、もしくは低下する時期があることがわかった。このような RNA/DNA 比の挙動をモニタリングすることによって、リン除去の悪化もしくは復活を予測できるかについて、以下に考察する。

R14 の 34 ~ 36 日目、R16 の 2 日目および 24 ~ 26 日目において、RNA/DNA 比が一時的に上昇する様子が見られた。R16 の 2 日目においては、良好なリン除去が立ち上がるのに先立って RNA/DNA 比が上昇したように捉えられた。しかしながら、RNA/DNA 比の上昇は 2 倍程度であり、それほど顕著ではなかった。

R14 の 34 ~ 36 日目および R16 の 24 ~ 26 日目における RNA/DNA 比の上昇は、R16 の 2 日目に比べ、著しいものであった。R14 については、36 日目に RNA 量が一時的に増加し、その 2 日後に DNA が増加していた。リン含有率はさらに 2 日遅れて、40 日目に僅かながら増加している。このように、RNA (活性)、DNA (存在量)、リン含有率 (リン除去能) の順番で一時的に回復しているように見られた。一方で、R16 の 24 ~ 26 日目では、RNA は若干増加したが、DNA およびリン含有率が遅れて増加する様子は見られなかった。このように、RNA/DNA 比が急激に上昇する時期において、リン除去が回復するか否かについては、再現性のある結果を得ることができなかった。

つづいて、RNA/DNA 比の低下がリン除去悪化の予測ツールになりうるかを考察する。RNA/DNA 比が低下、もしくは低い値を示した点は、R14 の 0、20 および 38 日目と R16 の 6、20 および 22 日目であった。しかしながら、これらの点における RNA/DNA 比の低下は小さいものであり、リン除去能および ‘*Accumulibacter*’ の存在量との関連性は見出せなかった。このため、RNA/DNA 比の低下とリン除去悪化の関係については不明であった。

上述のように、RNA/DNA 比の変動とリン除去状態との関係について明確な結果を得ることはできず、予測ツールとしての有用性を示すことはできなかった。しかしながら、再現性は無かったものの、R14 の 34 ~ 36 日目や R16 の 2 日目のようにリン除去能の変化を事前に示しているかのような結果も見ることができた。加えて、Vervaeren et al. (2005) は糸状菌に対して同様の検討をおこない、バルキングが起こる前に RNA/DNA 比が上昇することを報告している。このような状況から、RNA の予測指標として可能性は完全に否定すること

は現時点ではできない。今後、さらにデータを蓄積し、再現性のある結果が得られるかを
確認していく必要がある。

5 まとめ

定量 RT-PCR 法を用いて‘*Accumulibacter*’の 16S rRNA を定量する手法を確立し、活性汚泥試料への適用性を検討した。本研究で得られた成果を以下に示す。

- DNase 処理の条件について検討し、活性汚泥から抽出した核酸試料中の DNA を完全に分解する条件を決定できた。
- 逆転写反応に用いるプライマーについて検討し、cDNA の合成量が多く、ばらつきが少ないプライマーを選択することができた。
- 上述 2 点の検討により、‘*Accumulibacter*’の 16S rRNA を定量するための定量 RT-PCR 法を確立できた。
- 実験室規模 EBPR リアクターにおける‘*Accumulibacter*’の RNA および DNA の挙動を評価した結果、大まかには類似したが、DNA に対する RNA の割合 (RNA/DNA 比) が一時的に上昇もしくは低下する様子が数回見られた。
- RNA を測定することで、リン除去能の変化を予測できるか否かについては、不明であった。

このように、定量 RT-PCR 法によって‘*Accumulibacter*’の 16S rRNA を定量する手法を確立することができた。EBPR にプロセスにおける‘*Accumulibacter*’の DNA および RNA の挙動については、今後さらなるデータを蓄積していく必要がある。