

東京大学大学院新領域創成科学研究科
環境学専攻社会文化環境コース

平成 17 年度

修士論文

実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の FISH 法による
群集解析及び定量評価

Community Analysis of Phosphate Accumulating Organisms
in Full-scale Plants by FISH

2006 年 1 月提出

指導教員 佐藤 弘泰 助教授

46815 宇田 直樹

目次

第 1 章 はじめに	1
1.1 研究の背景.....	1
1.2 研究の目的.....	2
1.3 論文の構成.....	3
第 2 章 既存の研究	4
2.1 生物学的リン除去プロセス.....	4
2.1.1 生物学的リン除去プロセスの原理.....	4
2.1.2 生物学的リン除去の不安定性.....	5
2.1.3 生物学的リン除去プロセスに存在する微生物.....	6
2.1.4 生物学的リン除去を用いた処理方式.....	7
2.2 微生物群集解析手法.....	9
2.2.1 微生物群集解析手法の歴史.....	9
2.2.2 本研究に用いた分子生物学的手法.....	9
2.3 ポリリン酸蓄積細菌の系統分類.....	14
2.3.1 <i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphatis'.....	14
2.3.2 Actino1011/Actino658/Actino221 陽性細菌.....	15
2.3.3 その他のポリリン酸蓄積細菌.....	16
2.4 実処理場の生物学的リン除去プロセスを対象とした研究例.....	16
第 3 章 実験方法	18
3.1 概要.....	18
3.2 化学分析.....	18
3.2.1 MLSS・MLVSS.....	18
3.2.2 汚泥中の全リン・オルトリン酸の測定.....	18
3.2.3 低温の酸による低分子リン化合物の抽出方法.....	19
3.2.4 バッチ試験によるリンの摂取実験.....	21
3.2.5 溶存性 PO ₄ -P の測定.....	21
3.3 核酸抽出を伴う微生物群集解析.....	21
3.3.1 核酸抽出.....	21
3.3.2 PCR 法.....	22
3.3.3 DGGE 法.....	22

3.3.4	クローニング法.....	22
3.3.5	RFLP 法.....	23
3.3.6	塩基配列の解読.....	23
3.4	顕微鏡を用いた <i>in situ</i> での微生物群集解析.....	24
3.4.1	FISH 法.....	24
3.4.2	高濃度 DAPI 染色.....	27
3.4.3	FISH 法と高濃度 DAPI 染色の二重染色法.....	27
3.4.4	FISH 法を用いた定量の方法.....	28
3.4.5	FISH プローブの設計.....	29
3.4.6	グラム染色法 (Hucker の変法).....	29

第4章 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 31

4.1	第4章の概要.....	32
4.2	実験方法の検討.....	32
4.2.1	十分にリンを蓄積させる方法の検討.....	32
4.2.2	高濃度 DAPI と FISH の二重染色法の検討.....	34
4.3	実験方法.....	34
4.4	リン酸取り込み実験の結果.....	36
4.5	高濃度 DAPI と FISH の二重染色法による結果.....	37
4.6	各グループについての考察.....	40
4.6.1	ポリリン酸蓄積細菌が存在したグループ.....	40
4.6.2	ポリリン酸蓄積細菌が存在しなかったグループ.....	47
4.7	第4章のまとめ.....	47

第5章 クローニング法及び FISH 法による新規のポリリン酸蓄積細菌の同定

		49
5.1	第5章の概要.....	49
5.2	実験方法.....	50
5.3	Proteobacteria に属するポリリン酸蓄積細菌.....	51
5.3.1	プライマーの選定.....	51
5.3.2	クローニングの結果.....	54
5.3.3	オリゴヌクレオチドプローブの設計.....	56
5.3.4	活性汚泥への適用.....	57
5.4	Run13(グルタミン酸/アスパラギン酸系)/Run6(グルタミン酸系)に出現した球菌の同定.....	59
5.4.1	顕微鏡観察による同定.....	59

5.4.2	プライマーの選定.....	61
5.4.3	クローニングの結果.....	61
5.4.4	オリゴヌクレオチドプローブの設計.....	63
5.4.5	活性汚泥への適用.....	65
5.4.6	同定された細菌に関する考察.....	67
5.5	第5章のまとめ.....	69

第6章 実処理場活性汚泥のリン組成の解析及びポリリン酸蓄積細菌の定量評価 71

6.1	概要.....	69
6.2	実験方法.....	72
6.2.1	実験方法の概要.....	72
6.2.2	試料採取時のリンの溶出の影響の検討.....	73
6.2.3	汚泥中のリンの分画法の検討.....	73
6.3	活性汚泥試料について.....	76
6.4	実処理場活性汚泥のリン組成.....	78
6.5	<i>Candidatus</i> ‘ <i>Accumulibacter phosphates</i> ’及び <i>Actino1011</i> 陽性細菌の処理場ごとの分布.....	81
6.5.1	<i>Accumulibacter</i> 及び <i>Actino1011</i> 陽性細菌の定量結果.....	81
6.5.2	<i>Accumulibacter</i> と <i>Actino1011</i> 陽性細菌の競合関係.....	83
6.5.3	クラスター分析.....	83
6.6	ポリリン酸蓄積細菌の存在とリン含有率の相関関係.....	86
6.7	第6章のまとめ.....	88

第7章 総括 89

7.1	まとめ.....	89
7.2	今後の展望.....	90

第8章(補章) 実処理場活性汚泥中に存在する *Bacillus* 属細菌の同定 92

8.1	概要.....	92
8.2	実験方法.....	92
8.2.1	培養法による <i>Bacillus</i> 属細菌の同定.....	92
8.2.2	分子生物学的手法を用いた <i>Bacillus</i> 属細菌の同定.....	93
8.3	実験結果.....	93
8.3.1	単離の結果.....	93
8.3.2	DGGE 法による群集解析結果.....	93

8.3.3 クローニング法による結果.....	94
8.3.4 単離株の塩基配列の解読.....	96
8.3.5 FISH 法による検出.....	96
8.4 第 8 章のまとめ.....	98
謝辞	99
参考文献	100

第 1 章 はじめに

1.1 研究の背景

湖沼、内湾、内海等の閉鎖性水域における富栄養化を抑制するために栄養塩を排水から除去することは重要な課題である。富栄養(湖)化という言葉は、環境白書の前身である昭和 44 年版公害白書の時代から平成 17 年度版環境白書まで欠かさず使われてきており、30 年以上もの長い間、問題視されている。水域の富栄養化はアオコ、赤潮等を大量発生させ、水道水の異臭、漁業への影響、透明度の低下などの大きな被害をもたらし続けている。

本研究の対象であるリンはこの閉鎖性水域の富栄養化の原因物質であるため、公共水域に放流される前に排水から取り除く必要がある。現在、微生物を利用した排水からのリン除去プロセスが多く処理場で採用されている。例えば、閉鎖性水域の東京湾を抱える東京都では 21 箇所ある水再生センターのうち、標準活性汚泥法との併用も含めて 17 箇所では生物学的リン除去プロセスが既に導入されている。今後、このプロセスの更なる普及が予想される。しかし、生物学的リン除去プロセスはこのように実用段階に入った技術ではあるが、流入水の負荷変動などによるリン除去の不安定性が指摘されている。また、処理場ごとに嫌気・好気の時間がそれぞれ異なるなど処理法の最適化が行われていないのが実情である。さらに、将来的には生物学的リン除去プロセスはリン回収という新たな役割を担う可能性がある。生物学的リン除去プロセスによって汚泥中に高濃度に蓄積されたリンの回収技術が開発されてリンが再利用されれば、リン鉱石の枯渇を心配する必要がなくなる。リンの回収技術は様々な方面で研究されているが、下水処理場におけるリン回収が実現するためには、リン回収技術の革新とともに、汚泥のリン蓄積の安定性・効率性が求められる。そのためにも安定で効率的な生物学的リン除去プロセスの構築が必要である。

生物学的リン除去プロセスの安定性を確保するためには、生物学的リン除去プロセスのメカニズムを解明する必要がある。そのためには活性汚泥プロセス全体の代謝を形成している個々の微生物を種レベルで同定して、どのような代謝を行っているのかを把握する必要がある。さらに、個々の微生物間の相互関係がどのようになっているのかを解析することにより、生物学的リン除去プロセスの完全な理解と不安定性のメカニズムの解明に寄与することができる。これらの研究によって、安定的で効率的な生物学的リン除去プロセスの構築が望まれている。

1.2 本研究の目的

生物学的リン除去プロセスのメカニズムを解明するためには、リン除去を担う微生物が誰で、どのような代謝をしているのかを解明する必要がある。分子生物学的手法を用いた群集解析が盛んに行われてきており、*Candidatus* ‘*Accumulibacter*’ *phosphatis* や *Actinobacteria* に属するポリリン酸蓄積細菌などいくつかのリン除去を担う細菌は同定されてきた。しかし、ポリリン酸蓄積細菌は系統学的に多様であるため、その全体像が明らかになったとは言い難い。その上、実処理場を対象とした研究例が実験室リアクターを対象とした研究に比べて少なく、実下水を処理している微生物群集について明らかとなっていない部分が多い。

そこで、本研究では FISH 法を中心とする分子生物学的手法を用いて実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の群集解析及び定量評価を行った。本研究は以下の 3 つに大きく分けられる。

まず 1 つ目はポリリン酸を染色する高濃度 DAPI と FISH の二重染色法によってポリリン酸蓄積細菌だけを標的とした群集解析を行い、グループレベルでの種構成の解明及び定量を行った。個々のポリリン酸蓄積細菌を同定することはできないが、ポリリン酸蓄積細菌の全体像をおおまかに把握することができる。また、現在までに同定されている *Accumulibacter* や *Actinobacteria* に属するポリリン酸蓄積細菌と、まだ同定されていないポリリン酸蓄積細菌の定量を行い、それぞれの細菌が実処理場でどの程度の寄与を持っているのかを解析する。また、この研究により、現在まで同定されていないポリリン酸蓄積細菌のグループ、形態などの情報を得ることができる。新規のポリリン酸蓄積細菌の存在が明らかになれば、2 つ目として、PCR-クローニング法を用いてその細菌の系統学的な同定を目指した。ポリリン酸蓄積細菌を系統学的に同定することによって、その後の代謝を解明する研究につなげることができる。3 つ目は現在までに明らかにされたポリリン酸蓄積細菌の存在量と活性汚泥のリン除去活性の関連性を導くことを目的としている。すなわち、個々の既知のポリリン酸蓄積細菌の好気でのリン蓄積という代謝が実際に活性汚泥全体の代謝として機能しているのかを解析した。

これらの 3 つの研究で、実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の群集構造の解析を行い、そのポリリン酸蓄積細菌のリン蓄積という代謝が活性汚泥全体のリン除去能力の指標であるリン含有率に寄与していることを示す。このような研究を行うことによって、実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の群集像に関する知見を得ることが目的である。

1.3 論文の構成

本論文の各章の概略を以下に示す。第 1 章で背景と目的、第 2 章で既存の研究、第 3 章で実験手法を述べ、第 4 章から第 6 章に実験結果及び考察を述べた。そして、第 7 章に本研究で得られた成果及び今後の展望を述べた。また、第 8 章に補章として本論とはあまり関係ないが、実処理場の生物学的リン除去プロセスの興味深い対象であったので研究を進めた結果を示した。

第 1 章 はじめに

本研究の背景と目的及び論文の構成を述べた。

第 2 章 既存の研究

本研究に関わる現在までに行われてきた研究について知見の整理をした。

第 3 章 実験方法

本研究で行った実験方法についてまとめた。

第 4 章 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

実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌をグループレベルで解析した。

第 5 章 クローニング法及び FISH 法による新規のポリリン酸蓄積細菌の同定

Proteobacteria と Actinobacteria に属する新規のポリリン酸蓄積細菌の同定を行った。

第 6 章 実処理場活性汚泥のリン組成の解析及びポリリン酸蓄積細菌の定量評価

実処理場汚泥を対象として、Accumulibacter 及び Actino1011 陽性細菌の汚泥のリン蓄積への寄与について定量評価を行った。

第 7 章 総括

本研究の成果についてまとめ、今後の研究の展望を示した。

第 8 章 (補章) 実処理場活性汚泥中に存在する *Bacillus* 属細菌の同定

本研究の補章として、活性汚泥プロセスの安定化に貢献している可能性のある *Bacillus* 属細菌の同定を目指した。

第 2 章 既存の研究

2.1 生物学的リン除去プロセス

2.1.1 生物学的リン除去プロセスの原理

生物学的リン除去プロセスは曝気槽の前段に嫌気槽を設けることで、嫌気状態と好気状態を交互に繰り返し、汚泥中の微生物にリンを高濃度に蓄積させて上澄みからリンを取り除く技術である。1970年代、曝気槽の前段に嫌気槽を設けることで高リン含有汚泥を得られることが分かり、生物学的にリンと有機物を同時に除去できるプロセスが提案された(Barnard(1975))。嫌気状態と好気状態が繰り返される環境は、ポリリン酸蓄積細菌(PAOs; Polyphosphate Accumulating Organisms)と呼ばれる細菌にとって有利な環境で、この細菌が増殖してその機能を発揮することにより生物学的にリンが除去される。嫌気槽でポリリン酸蓄積細菌は体内のポリリン酸を加水分解してエネルギーを生産し、そのエネルギーを使って有機物を摂取する。摂取された有機物は PHA などの細胞内蓄積物質に変換され菌体内に蓄積される。そのため、嫌気槽では上澄み中のリン酸濃度は上昇し、有機物量は減少する。続く好気槽において、ポリリン酸蓄積細菌は蓄積した有機物を酸化分解することによって ATP を生産し、そのエネルギーでポリリン酸の再合成と菌体の増殖を行う。嫌気槽で放出した以上の量のリン酸を好気槽で取り込むため、上澄みからリン酸が除去される。そして、リンを高濃度に蓄積した状態でポリリン酸蓄積細菌を系外へ取り除くことで、上澄みからのリン除去が達成される。

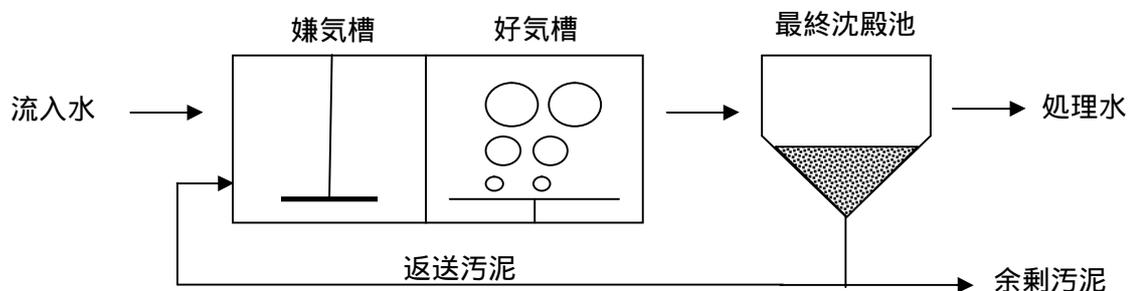


図 2.1 嫌気好気法(AO 法)のフロー

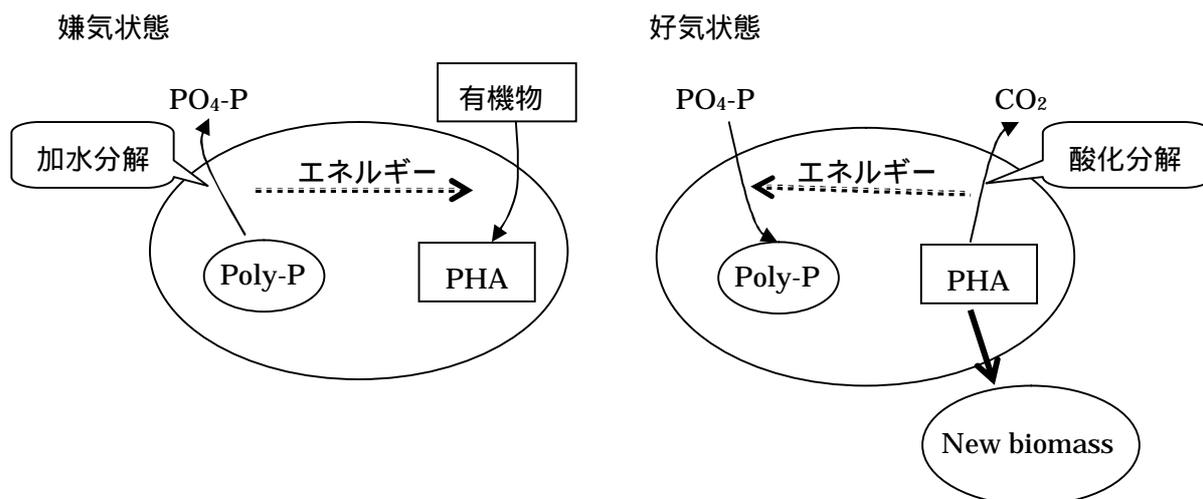


図 2.2 典型的なポリリン酸蓄積細菌の代謝(簡略図)

2.1.2 生物学的リン除去の不安定性

生物学的リン除去プロセスは実処理場でも採用され、実用段階に入っているもののまだまだ様々な問題点が指摘されている。その問題点の 1 つとして、リン除去プロセスの不安定性が指摘されており、リン除去活性の低下、消失が突如として起こってしまうことが挙げられる。実処理場においてリン除去活性が悪化した場合、嫌気槽でのリンの放出量が少なくなり、それとともにリンの過剰摂取も見られなくなる。そして、それに伴って処理水のリン濃度が上昇する。

この現象は、リンの放出や摂取は行わずに嫌気条件下で有機物を摂取する細菌が、ポリリン酸蓄積細菌と競合することによって起こる。この細菌は、嫌気条件下でポリリン酸蓄積細菌がポリリン酸をエネルギー源として代謝を行うのに対して、内部に蓄積したグリコーゲンをエネルギー源として利用するという点で異なっており、リン除去の役割を果たさない。嫌気条件下でグリコーゲンを加水分解して得られたエネルギーを利用して有機物を PHA の形で体内に蓄積し、次の好気槽でその PHA を利用して増殖するという代謝を行う。そのためポリリン酸蓄積細菌と競合する。このグリコーゲン蓄積能を有し、ポリリン酸蓄積細菌と競合する細菌を Mino et al.(1995)はポリリン酸蓄積細菌(PAOs)と対比をさせてグリコーゲン蓄積細菌(GAOs ; glycogen accumulating organisms)と名づけている。図 2.3 はポリリン酸蓄積細菌とグリコーゲン蓄積細菌の代謝の比較である。ポリリン酸蓄積細菌とグリコーゲン蓄積細菌の唯一の明らかな違いは嫌気での基質を摂取するためのエネルギー源である(Mino et al.(1998))。良好な生物学的リン除去プロセスを得るためには、ポリリン酸蓄積細菌がグリコーゲン蓄積細菌との競合に勝つ必要があるが、pH や温度の変化など何らかの理由で、ポリリン酸蓄積の代謝が非効率になったときグリコーゲン蓄積細菌による代謝が見られるようになる。

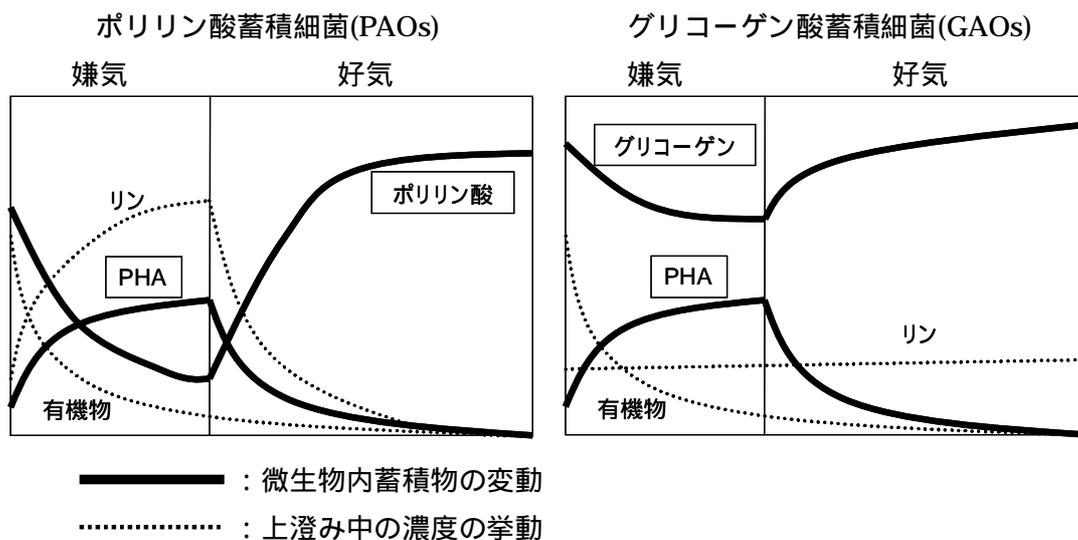


図 2.3 ポリリン酸蓄積細菌とグリコーゲン蓄積細菌の代謝パターンの比較

2.1.3 生物学的リン除去プロセスに存在する微生物

生物学的リン除去プロセスに存在する微生物は上記のような厳密の意味での PAOs や GAOs のほかに、それらの定義とは少し異なる代謝をする微生物も存在する。また、PAOs や GAOs とは全く異なる代謝をする微生物も存在しているはずである。

ポリリン酸蓄積細菌は「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短鎖脂肪酸を摂取して PHA を蓄積し、好気条件下で PHA を酸化分解して増殖、ポリリン酸合成を行う微生物」と考えられている(小貫ら(2005))。これらを小貫らは狭義の PAO と呼んでいる。広義の PAO としては、リンの放出・再吸収を示すものの、酢酸の利用特性がないものや有機物摂取量がモデル値とかけはなれているもの、嫌気で PHA 以外の別の蓄積物質を作るもの、リンの吐き出し、取り込みが見られないが、ポリリン酸の含有率が高いものなどが考えられ、このような代謝をする細菌の存在が明らかになっている。

グリコーゲン蓄積細菌とは「嫌気条件下でグリコーゲンを分解して酢酸(短鎖脂肪酸)を摂取し、好気条件下で蓄積した有機物(PHA)を好気呼吸により分解して増殖してグリコーゲンの再蓄積を行う微生物」で、小貫らはこれを狭義の GAO と呼んでいる。広義には嫌気条件下で有機物を摂取し PHA(または細胞内蓄積物)を蓄積する能力があるものを GAO と呼んでいる。

PAO や GAO 以外では、生物学的リン除去プロセスに存在する細菌に関する研究はあまり行われていない。Jeon et al.(2000)はグルコースを基質とした生物学的リン除去プロセスにおける乳酸生成細菌(LPO; Lactic acid Producing organisms)の存在を提唱している。LPO は通性の細菌で、嫌気槽においてグリコーゲンを蓄積するためのエネルギーを得るた

めに乳酸を生成し、基質のグルコースをグリコーゲンとして蓄積している。そして PAOs が嫌気槽において、その乳酸を PHA へ変換するという PAOs と共生する微生物が想定されている。このような PAO や GAO と共生するような細菌が存在することが考えられるが、この分野の研究はあまり進んでいないのが実態である。他にも、バルキングの要因となる糸状性細菌なども存在していることが分かっている (Erhart *et al.*(1997)、Blackall *et al.*(2000)、Kong *et al.*(2005))。

2.1.4 生物学的リン除去を用いた処理方式

生物学的リン除去を行うための必要条件是嫌気状態の反応槽と好気状態の反応槽をこの順序で持っていることである。近年、無酸素槽と組み合わせて、窒素・リンの同時除去を可能にした処理方式も提案されている。ここでは、生物学的リン除去法の主な処理方式について記述する。

a)嫌気好気法 (AO 法)

生物学的リン除去プロセスの最も基本的な形で、曝気槽の前段に嫌気槽を設けたプロセスで、通常、嫌気槽は機械攪拌が行われている。最終沈殿池から汚泥は嫌気槽に返送され、嫌気・好気のサイクルが厳密に繰り返されるため生物学的リン除去が効率的に行われる。

b)擬似嫌気好気法 (Pseudo-AO 法)

擬似嫌気好気法は、多くの処理場で採用されてい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濃度を極めて 0 に近づけて運転し、嫌気好気の状態を作り出す方式である。制限曝気とは攪拌を行うための曝気で、これによって、機械攪拌装置を必要とする嫌気槽の設置工事を行うことなしに従来の標準活性汚泥法の装置のまま嫌気好気法を運転することができる。また、制限曝気を行っていない標準活性汚泥法の処理場でも、流入 BOD 負荷が非常に高いと、前段の溶存酸素が消費され、意図せず擬似嫌気好気状態となっていることもある。一方、制限曝気はリン除去を意図せずに、バルキングの原因となる一部の糸状性細菌の抑制や返送汚泥に含まれる硝酸性窒素の制限曝気槽での脱窒を目的として採用される場合もある。

c)嫌気無酸素好気法 (A2O 法)

嫌気無酸素好気法は、嫌気槽・無酸素槽・好気槽の順に反応槽を並べて、嫌気好気法と循環式硝化脱窒法を組み合わせたものである。流入下水は嫌気槽においてポリリン酸蓄積細菌が一部の有機物を PHA の形で取り込む。次の無酸素槽には硝化液が循環され、有機物除去と脱窒が行われる。最後の好気槽で、リンのポリリン酸蓄積細菌による摂取、アンモニア性窒素の硝化、残った有機物の除去が行われる。これにより、有機物、リン、窒素の

同時除去を可能となる。

d) ケープタウン大学法 (UCT 法)

ケープタウン大学法とは A2O 法とほとんど同じ構成を持っているが、汚泥の返送方法のみが異なっている。返送汚泥には硝酸性窒素が含まれるため、嫌気状態を保つのを阻害する可能性がある。そこで、UCT 法では、最終沈殿池からの返送は無酸素槽に戻し、無酸素槽の末端で脱窒を終えた汚泥を嫌気槽へ循環させた。これにより、A2O 法より嫌気状態が保たれてリン除去能力が高まる一方で、内部循環量が増加するため、より費用のかかるシステムとなっている。そのため、海外では盛んに研究が行われているものの、日本の処理場での採用例はまだない。

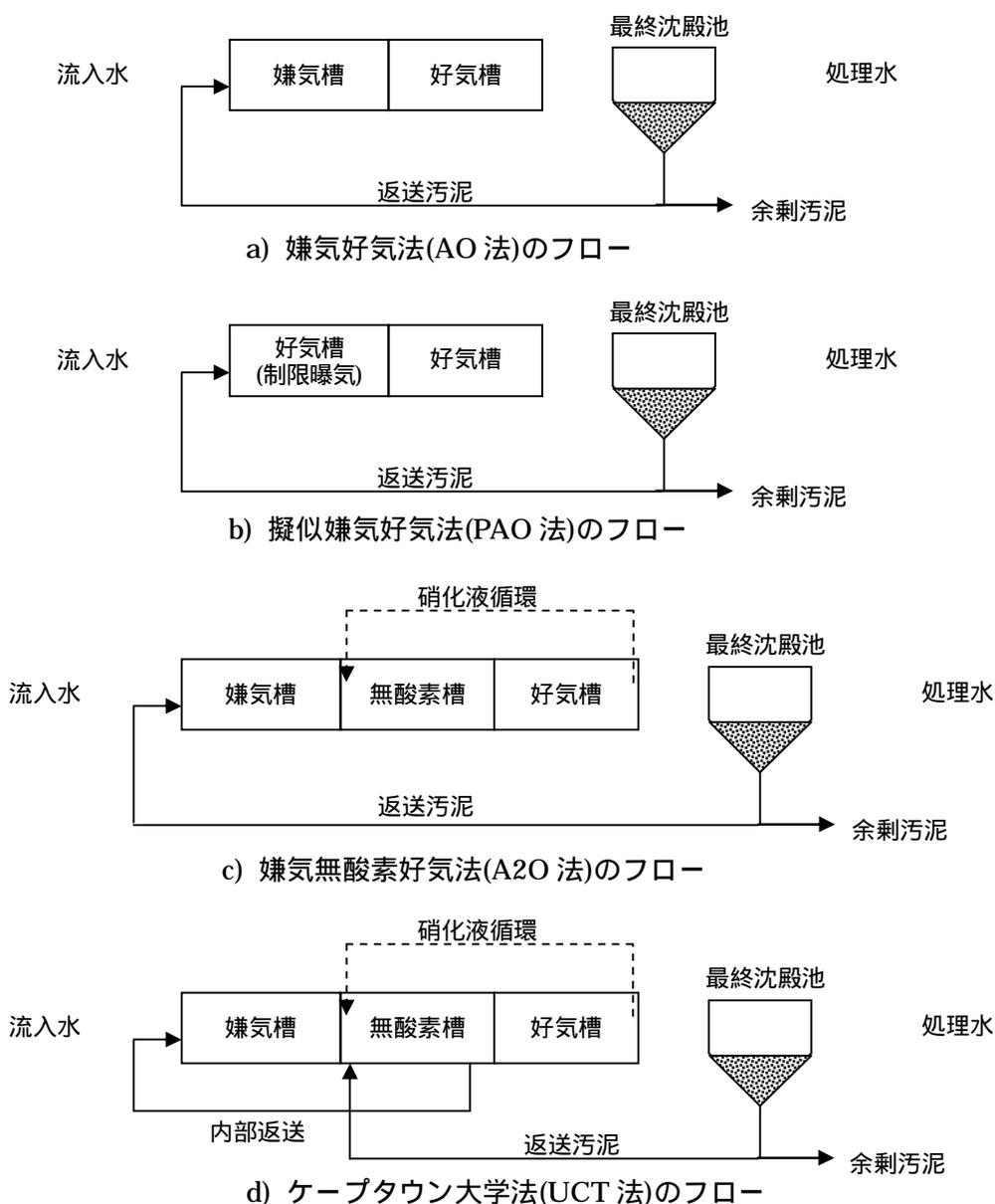


図 2.4 様々な生物学的リン除去プロセス

2.2 微生物群集解析手法

2.2.1 微生物群集解析手法について

従来、活性汚泥の微生物群集解析には顕微鏡観察による方法と単離培養法の 2 つの方法が用いられてきた。顕微鏡観察によってフロックの形成や糸状性細菌の存在などを明らかにすることが可能で、特にバルキングの原因となる糸状性細菌の同定は非常に重要であった。また、微生物の核酸を染色する技術であるアクリルオレンジや DAPI 染色、その他のグラム染色剤や Neisser 染色などの蛍光標識によって観察することができた。しかし、顕微鏡観察による方法では種の同定までには至れない。また、培養法では、個々の細菌を検出できるかどうかはそれぞれ培地に依存しているため、環境中の群集構造を反映することができないという欠点がある。これらの欠点を解消できる方法が近年利用されている分子生物学的手法である。

分子生物学的手法とは、微生物の持つ遺伝情報をもとに、微生物の検出、定量、群集解析などに用いられる方法である。遺伝学的情報の中で、リボソームを構成する rRNA をコードする rDNA の塩基配列は全ての生物が持っており、かつ系統分類上近い種ほど似た塩基配列を持っていることが知られている。その中でも、16SrRNA は全長が約 1500bp で、最も扱いやすかったため、16SrRNA が微生物分類に用いられるようになった。この rRNA を利用した微生物群集解析手法のうち、本研究で用いたものを次節に記述する。

2.2.2 本研究に用いた分子生物学的手法

本研究で用いた PCR 法、DGGE 法、クローニング法、RFLP 法、FISH 法について原理や特徴を以下に記述する。これらの関係は以下の図 2.5 の通りである。

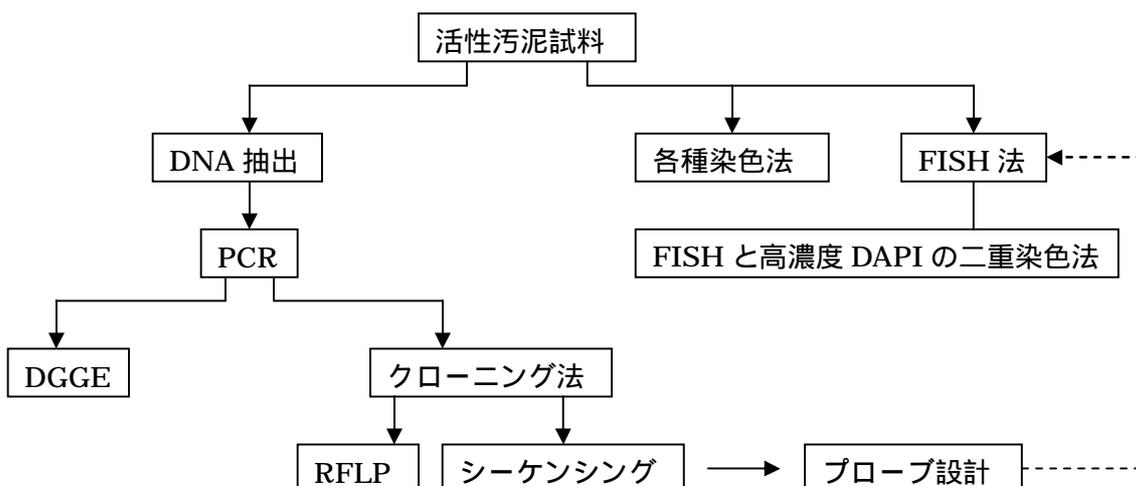


図 2.5 本研究で用いた分子生物学的手法の関連図

(1) PCR(Polymerase Chain Reaction)法

PCR 法は 2 本鎖の DNA を鋳型として特定領域を挟む 2 種類のオリゴヌクレオチドプライマーによって、プライマー間の DNA を選択的に増幅する技術である。鋳型 DNA の変性、アニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸張の 3 つのステップからなる一連のサイクルを繰り返すことによって、極少量の DNA を指数関数的に増幅することができる。

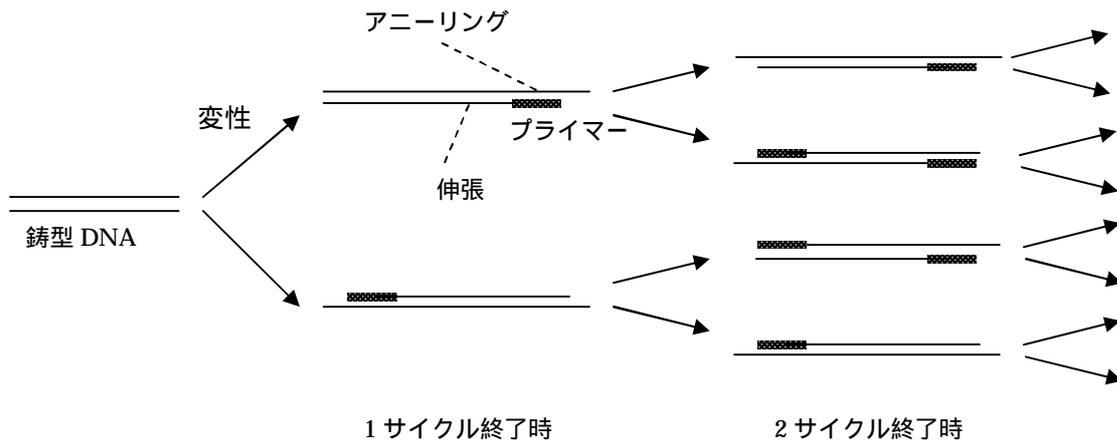


図 2.6 PCR 法の原理

(2) DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)法

DGGE 法は 2 本鎖の DNA 断片を変性させる濃度が配列に依存することを利用した技術である。GC クランプ付きのプライマーを用いた PCR によって増幅された 2 本鎖 DNA を、変性剤濃度勾配をつけたゲル上に電気泳動を行う。それぞれの 2 本鎖 DNA 断片は塩基配列に応じて変性する変性剤濃度が異なるため、電気泳動の方向に従って 2 本鎖 DNA 断片が変性する場所が決まる。ゲルの中で、2 本鎖 DNA が変性すると、GC クランプ部位は結合力が強いため 2 本鎖を維持するので、図 2.7 のように 3 方向に広がり泳動速度が急激に遅くなって、DNA 断片を泳動方向に分離することができる。2 本鎖 DNA が変性する変性剤濃度は A-T、G-C 間の水素結合及び配列の違いによって決まる。DGGE 法は様々な形で利用されている。温度による微生物群集構造の違いの比較やリン含有率の高い汚泥と低い汚泥の群集構造の比較など、複数の系を微生物群集の多様性を評価すること(Ferris et al.(1996)、Liu et al.(2000))や、同一系内の微生物群集構造の経時変化を追うこと(小貫(2001)、福島(2002)、岡本(2003))の 2 つを目的として主に用いられている。他にも、クローニングの後のスクリーニング手法として Liu et al.(2002)に提案され、RFLP よりも多くのクローンを扱いやすく、感度の良いスクリーニング手法として紹介された。しかし、DGGE 法にもい

くつか問題点がある。まず1つ目は、他の遺伝子を用いた方法にも同様のことが言えるが、DNA抽出やPCR効率に左右されるという点である。すなわちバンドが濃くても、それが優占種であると決め付けることはできない。DGGE自体の問題点としては、異種複合体(hetero duplex)が生じて実際よりも多くのバンドが検出されることや異なる遺伝子配列でも同じ高さのバンドを形成することなどがあげられる。DGGE法と他の分子生物学的手法を組み合わせる用いられることが多く(大江(2004))、組み合わせることによりバイアスや問題点を減らして実際の微生物群集構造の把握が可能となる(Muyzer(1999))。

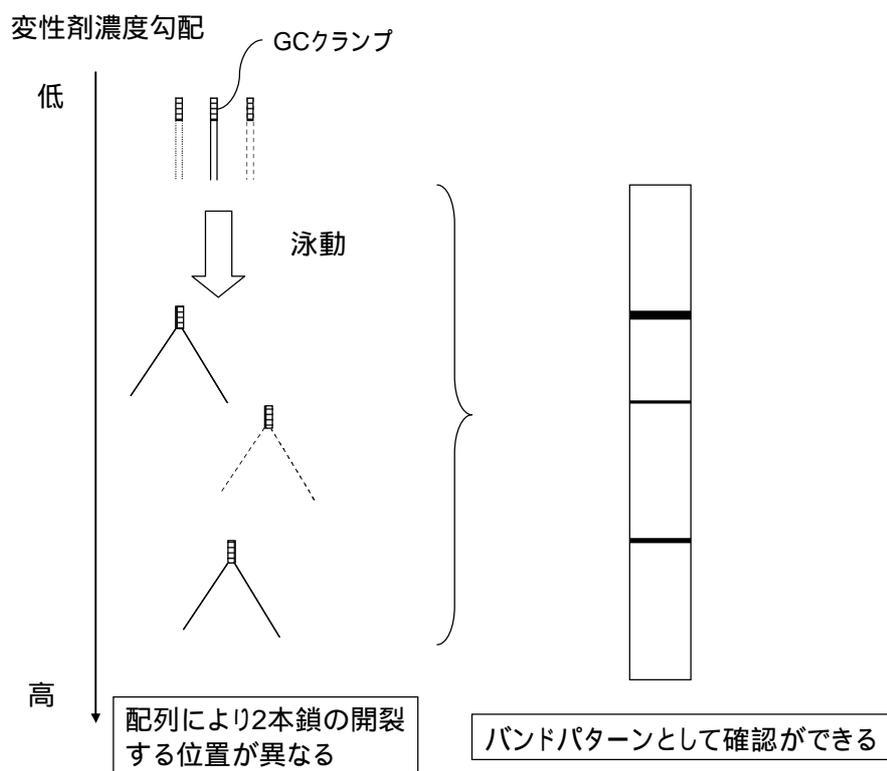


図 2.7 DGGE 法の原理

(3) クローニング法

混合微生物系からのDNA抽出物を鋳型としてPCRを行った場合、そのPCR産物は様々な微生物から由来するDNA断片の混合物である。この混合されたDNA断片を直接、一本一本に分離する方法がクローニング法である。基本的な操作は、増幅したDNA断片を一本ずつ一つの大腸菌の細胞に組み込み、その大腸菌を増殖させることによって、DNA断片の混合物の中の本から由来したDNA断片を大量に得るという流れである。この方法により混合微生物系のPCR産物を一本ずつ解析することが可能となる。

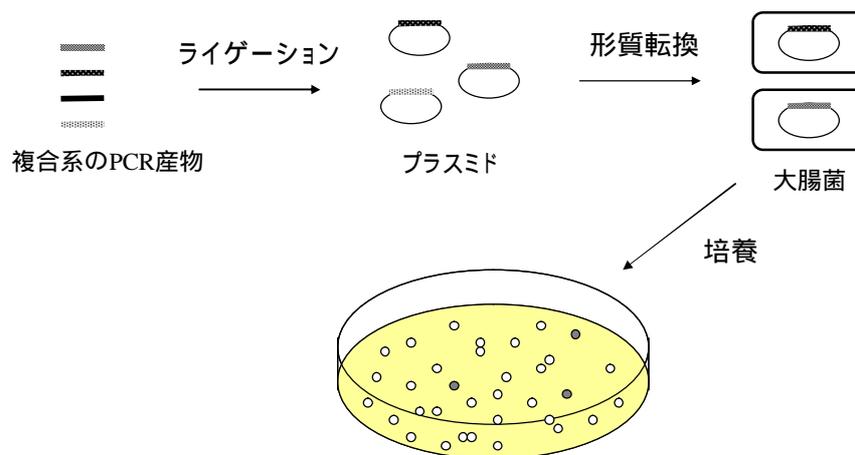


図 2.8 クローニング法の原理

(4) RFLP 法(Restricted Fragment Length Polymorphism)

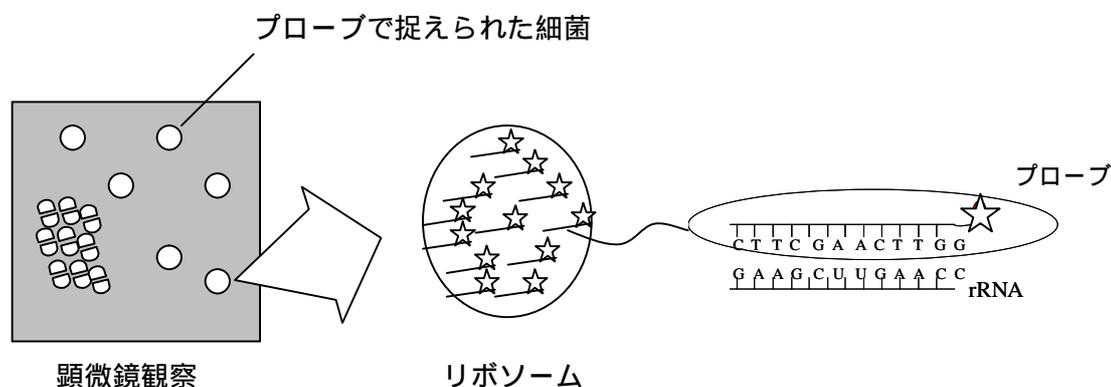
PCR で増幅した DNA を特定の制限酵素で切断し、切断された断片を電気泳動によって分離し、切断長の泳動パターンから微生物種を同定する技術である。複合系の解析には向かず、微生物種の差異を簡単に識別する方法として用いられる。培養法から得られた単離株やクローニング法を用いて得られたクローンには同一の塩基配列が得られることが多いため、それを判別するためのスクリーニング法として用いられることが多い。RFLP 法はその制限酵素を選ぶのが非常に重要で、Moyer et al.(1996)はシミュレーションによって様々な制限酵素を試し、標的によって有効な制限酵素の種類を分類している。

(5) FISH 法(Fluorescence in situ Hybridization)

FISH 法とは蛍光ヌクレオチドを利用した特定微生物又は特定微生物群の検出法のことである。特定の微生物の持っている rRNA 塩基配列と特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブを設計して完全に相補的な rRNA には結合するが、1塩基でも異なる rRNA には結合しない。励起波長によって、プローブが結合した細菌だけが蛍光を発するため蛍光顕微鏡で確認することができる。rDNA ではなく、rRNA がターゲットとなっている理由として、rRNA は rDNA と相補的な配列を持っていること、rDNA は 1セルあたりの1つ又は数個程度しか存在しないが、rRNA 数千個~10万個程度と非常に多く、それだけ強い蛍光を観察できるということの2点に基づいている。

FISH 法は、rDNA の塩基配列の分かっている細菌に対してしか適用することができないのが欠点であるが、単離・培養することなく顕微鏡下で混合微生物系において高い精度で標的とする細菌を同定できる。FISH 法によって真正細菌に対する標的細菌の割合の定量、

高濃度 DAPI 染色によって染色されるポリリン酸蓄積細菌に対する割合の定量、系統的に特定できた細菌の検出、などが可能である。



各細菌のリボソームの中の rRNA にプローブが結合し、蛍光を発している

図 2.9 FISH 法の原理

(6) ポリリン酸染色法

細菌が蓄積したリンを染色する方法がいくつか提案されているのでそれらを紹介する。

Neisser 法

Neisser 法は下水試験法(1997)にも載っている方法で、ポリリン酸グラニューールは位相差観察で黒い顆粒として観察される。

高濃度 DAPI 染色法

DAPI は本来、全菌を染色する方法として DNA 染色剤で、紫外光励起で核酸が青白い蛍光を発するとされる。しかし、DAPI を本来よりも高濃度で用いるとポリリン酸顆粒を染色することができる(Tijssen *et al.*(1982)、Streichen *et al.*(1990))。DNA は青白く蛍光を発し、ポリリン酸は黄色く蛍光を発する。脂質も弱く黄色く染色されるが、2、3 秒で消えると報告されている。そのため、高濃度 DAPI 染色によって、ポリリン酸を蓄積した細菌を簡単に色と蛍光強度から区別することができる。また、Liu *et al.*(2001)は、高濃度 DAPI が細菌に蓄積されたポリリン酸を染色していることを示すために、透過型電子顕微鏡を用いて、黄色い蛍光を発する細菌が P、Ca、Na の元素が含有されていたことを、直接示した。FISH 法と組み合わせて、標的とする細菌がポリリン酸を蓄積しているのかを高濃度 DAPI 染色によって確認する研究は数多くなされている (Kawaharazaki *et al.*(1999)、Liu *et*

al.(2001)、Wong *et al.*(2005)、Liu *et al.*(2005)、小貫(2001)、福島(2002)、岡本(2003))、

MAR 法

MAR は放射性同位元素を用いる方法で、FISH 法と組み合わせることで誰がどの基質を摂取したのかを判別することが可能である(Lee *et al.*(1999))。

Lee *et al.*(2003)はリンの放射性同位元素 ^{33}P i を用いて MAR-FISH を行い、ポリリン酸蓄積細菌の群集解析を行っている。Kong *et al.*(2005)は ^{33}P i を用いた MAR-FISH 法により嫌気で実下水により馴致した汚泥では *Accumulibacter* の他に多くの HGC69a 又は *Actino1011* に陽性な細菌がリンを蓄積していたことを明らかにして研究を行っている。

高濃度 DAPI 染色と ^{33}P i 標識した MAR の比較について記述する。Lee *et al.*(2003)は高濃度 DAPI 染色と MAR を同時に用いて、高濃度 DAPI によって黄色く染色される細菌と ^{33}P i を摂取した細菌が必ずしも一致していなかったと報告している。その理由として、
() ^{33}P i によるインキュベーションを行う前からリンを蓄積していた、
()高濃度 DAPI がポリリン酸とは異なるものを捉えていた、
()細菌の活性がなくなっていた、の 3 種類の理由を挙げている。また、考察の中で、MAR と高濃度 DAPI のどちらの方法にも欠点があり、高濃度 DAPI は脂質などの異なるものを捉える可能性があり、MAR では厳密に嫌気好気を行わなければ、ポリリン酸蓄積細菌によるリン摂取以外の通常のリン摂取も含む可能性もある。

MAR は嫌気好気のインキュベーションが必要なため、リアクターなどの嫌気で利用する有機物の種類が明らかになっていて、厳密に行う場合には非常に利点大きいと考えられる。高濃度 DAPI は他のものも捉える可能性はあるが、狭義の PAO、広義の PA を含めて、網羅的に解析をしたい場合などには扱いやすく安価な方法として利点がある。

2.3 ポリリン酸蓄積細菌の系統分類

生物学的リン除去プロセスでリン除去を担うポリリン酸蓄積細菌を同定する研究は培養法あるいは分子生物学的手法を用いて盛んに行われている。ポリリン酸蓄積細菌は単一の種ではなく、複数の主要な種で構成されていると考えられている(Mino *et al.*(1998))。

2.3.1 *Candidatus* 'Accumulibacter phosphatis'

単離はされていないものの、分子生物学的手法を用いた同定法によって、主要なポリリン酸蓄積細菌として認められているのが *Candidatus* 'Accumulibacter phosphatis'である(Seviour *et al.*(2003))。 *Candidatus* 'Accumulibacter phosphatis'は Proteobacteria の

Rhodocyclus 属に近縁なグループで、Hesselmann *et al.*(1999)が新属新種のポリリン酸蓄積細菌として名付けた。Bond *et al.*(1995)はリン除去能の高い汚泥と低い汚泥をクローニングを行った結果、リン除去の高い汚泥から *Rhodocyclus* 属を多く検出した。その後、Hesselmann *et al.*(1999)や Crocetti *et al.*(2000)も同様に酢酸を主要な炭素源とするリアクターから *Rhodocyclus* 属に近縁なグループを検出し、特異的なプローブを設計して、リン染色法と同時染色ではないが、リンを蓄積していることを FISH 法で確認した。また、Crocetti *et al.*はその存在割合が酢酸で馴致した汚泥のリン含有率と非常に相関が高いことを示した。さらに小貫(2001)、Liu *et al.*(2001)は高濃度 DAPI 染色と FISH による二重染色法を開発し、同一視野によって *Accumulibacter* がリンを蓄積していることを顕微鏡下で直接確認した。また、嫌気条件下では、Liu *et al.*(2001)は *Accumulibacter* が PHA を蓄積していることも確認し、Kong *et al.*(2004)は MAR-FISH 法により *Accumulibacter* の短鎖脂肪酸の利用特性を明らかにしている。*Accumulibacter* は嫌気条件下で短鎖脂肪酸を摂取して PHA を蓄積し、好気条件下でポリリン酸を蓄積するというポリリン酸蓄積細菌の定義と合致している。

2.3.2 Actino1011/Actino658/Actino221 陽性細菌

Actinobacteria に属する細菌も *Accumulibacter* と同様にポリリン酸蓄積細菌として提案されている。Wagner *et al.*(1994)や Bond *et al.*(1999)によると、生物学的リン除去を行っている汚泥に Actinobacteria が多く存在していた。さらに、Kawaharazaki *et al.*(1999)は高濃度 DAPI 染色で染まる細菌の中に Actinobacteria が存在したと報告している。そして、Liu *et al.*(2001)は *Tetrasphaera* に近縁な細長い形をした細菌と *Candidatus Nostocoidia limicola* を特異的に捉える Actino1011 プローブを設計し、これらの細菌がポリリン酸を蓄積していたことを確認した。しかし、この細菌群は PHA の蓄積はなかった。その後、Actino1011 プローブは形態的に様々な種を捉えるプローブであることが明らかになったため、Kong *et al.*(2005)は、short-rod な細菌を捉える Actino658 プローブと tetrad を形成する球菌を捉える Actino221 プローブを設計した。これらのプローブを用いて、基質特性を調べたところ、酢酸などの短鎖脂肪酸やグルコースは摂取せず、カザミノ酸などのアミノ酸を摂取したと報告している。すなわち、Liu *et al.*(2001)によって同定された種は、アミノ酸などを摂取して PHA 以外の蓄積産物を蓄積し、好気条件下でポリリン酸を蓄積するという *Accumulibacter* とは異なる代謝を行っている。また、Kong *et al.*は実下水処理場におけるこれらの微生物群の定量を行っており、Actino221、Actino658 の両方を合わせて、3% ~ 35% 存在し、*Accumulibacter* よりも多く存在した処理場もあったと報告している。

2.3.3 その他のポリリン酸蓄積細菌

Micrococcus Phosphovorax は Nakamura *et al.*(1995)によって単離され、嫌気でポリリン酸を放出し、好気でポリリン酸を蓄積することが確認された。しかし、嫌気条件下で、酢酸の利用性はなくグルコースを摂取する。PHA も合成せず、ポリグルコースの形で蓄積する。また、Kawaharasaki *et al.*(1998)は *Micrococcus Phosphovorax* に特異的なプローブを設計し、FISH 法で確認したところ真生細菌全体の約 3%であった。

単離株としては、酪農排水を処理する生物学的リン除去プロセスから単離された *Lamprospira* に属する細菌(Stante *et al.*(1997))やグラム陽性で球菌の *Tetrasphaera japonica* や *Tetrasphaera australiensis*(Maszenan *et al.*(2000))、グラム陽性の long-rod の形態の *Tetrasphaera elongata*(Hanada *et al.*(2002))などはポリリン酸を蓄積することが確認されている。また、Spring *et al.*(2005)は Proteobacteria の *Comamonas* 属に属する *Malikia spinosa* を都市下水処理場から単離し、PHA、ポリリン酸の蓄積能力を持っていることを確認した。

また、バルキングの原因となる糸状性細菌についてもいくつかの種はポリリン酸の蓄積能力を持つものが存在している。生物学的リン除去プロセスによく見られる *Microthrix parvicella* や *Nostocoida limicola* のような糸状性細菌はポリリン酸を蓄積することが確認されている(Erhart *et al.*(1997)、Blackall *et al.*(2000))。

さらに、Liu *et al.*(2001)は Nielsen *et al.*(1999)がリン除去悪化時に検出した G バクテリアである GAM1019 プローブで捉えられる細菌のポリリン酸蓄積及び PHB 蓄積を確認した。また、Kawaharasaki *et al.*(1999)は Proteobacteria に属する細菌がポリリン酸を蓄積していたことを高濃度 DAPI と FISH の二重染色法により示している。

2.4 実処理場の生物学的リン除去プロセスを対象とした研究例

実処理場の生物学的リン除去プロセスを対象とした研究は実験室汚泥を対象としたものに比べて少ない。実下水を対象として研究が行われた例として、Zilles *et al.*(2002)は FISH 法によって、実処理場汚泥中の *Accumulibacter*(*Rhodocyclus* 近縁種)に対する解析を行っている。実処理場の生物学的リン除去プロセスにおいて *Accumulibacter* 13~18%存在し、重要な役割を果たしていた。UCT 法では高濃度 DAPI で染色される細菌の 73%、全菌の 26%が *Accumulibacter* であったのに対して、A2O 法では、高濃度 DAPI で染色される細菌のうちわずか 26%、全菌に対する割合では 6%しか占めていなかった。また、約 50%の *Accumulibacter* はリンを蓄積していなかった。この理由として、A2O 法は嫌気状態が厳密にできていないことを挙げ、ポリリン酸蓄積細菌のコミュニティは処理方式に依存していたと報告している。

また、Wong et al.(2005)は、日本の実下水処理場を対象として、これまでに生物学的リン除去プロセスから同定された種から設計されたプローブを用いて、実下水処理場における分布を調査し、真正細菌のうち Accumulibacter が 4～18%、GAOs 候補である GB プローブ陽性細菌が 10～31%存在していたと報告している。

Kong et al.(2005)は実処理場に存在する Accumulibacter 及び Actino-PAO の定量を行っている。10 の実処理場において、Accumulibacter は 0～19%程度、Actino-PAO は 3～35%程度存在していた。定量値の合計は最大で 38%に達し、実処理場での有機物、窒素、リンの除去及びフロックの形成など実処理場プロセスの運転に対してこれらの細菌が非常に重要な役割を果たしていると考えられている。

第 3 章 実験方法

3.1 概要

本研究では、FISH 法を中心とする分子生物学的手法による微生物群集解析を行った。さらに、汚泥の持つリン除去能力を測定するための化学分析も行うことによって、微生物学的側面と化学的側面の両面からの解析も目的としている。化学分析としては汚泥のリン含有率の測定とバッチ試験によるリン摂取実験を行った。汚泥中のリンは化学的凝集に由来するものと微生物による蓄積に由来するものを低温の酸による抽出法によって分画した。微生物群集解析では、DNA 抽出を必要とする方法とそれらを必要としない FISH を中心とする顕微鏡を用いる方法の 2 つのアプローチから行った。

3.2 化学分析

3.2.1 MLSS・MLVSS

MLSS (活性汚泥浮遊物質)は遠心分離法、MLVSS(活性汚泥有機性浮遊物質)は強熱減量法により測定した。試験操作は基本的に下水試験方法(1997)に従った。採取した活性汚泥試料を遠心分離し、上澄みを捨て、純水で再び懸濁させる。再び上澄みを除き、残った汚泥ペレットをあらかじめ秤量した蒸発皿に移してウォーターバスにより水分を十分にとばした後、110 °C で 2 時間以上置いて水分を完全に飛ばす。デシケータ中で 20 分以上置き、室温に戻して秤量する。その値と空皿との差が MLSS(mg/L)となる。そして、600 °C で強熱減量をして 110 °C オープン、デシケータと順に移して室温に戻して再度秤量する。MLSS と強熱減量の残留物の差が MLVSS(mg/L)となる。

3.2.2 汚泥中の全リン・オルトリン酸の測定

方法は下水試験方法(1997)に従った。オルトリン酸の測定はモリブデン青 - アスコルビン酸法によって濃度の測定を行った。また、全リンの測定はペルオキシ二硫酸カリウム分解法により試料中の全てのリンをオルトリン酸に分解して、モリブデン青 - アスコルビン酸法によりオルトリン酸を測定した。測定はまとめて行ったため、活性汚泥 5ml を硫酸酸性にして超純水で 100ml に希釈し冷蔵保存したものをを用いた。

3.2.3 低温の酸による低分子リン化合物(金属性リン/低分子ポリリン酸)の抽出方法

この抽出方法は STS 法 (Schmidt-Thannhauser-Schneider 法) と呼ばれる分画法の一部である。STS 法とは生体内リンを分離抽出するリン化合物の分画定量法である。生体内のリン化合物組成を分析する方法であった STS 法を味埜(1982)が活性汚泥に適用し、汚泥内リン組成を分析する方法として確立した。味埜が確立した活性汚泥に対する STS 法では以下の表 3.1 のように分画される。

表 3.1 STS 法による汚泥内リンの分画(味埜ら(1983-b)より引用)

抽出順	画分名	抽出溶媒	抽出される主な化合物	定量物質	備考
1	C-PCA画分	Cold PCA(低温)	金属性塩 生体内低分子ポリリン酸	PO ₄ -P	金属性リンを含む
				non PO ₄ -P	(T-P)-(PO ₄ -P) 低分子ポリリン酸を含む
2	エタノール画分	エタノール	アルコール可溶性の 低分子化合物	T-P	
3	脂質画分	エタノール;エーテル	脂質	T-P	リン脂質
4	核酸画分	PCA	核酸(DNA,RNA) 高分子ポリリン酸 多糖類	DNA-P	ジフェニルアミン法によるDNA値に、 DNA中のリン含有率9%をかけて求めた。
				TNA-P	UV吸収測定法によるTNA(全核酸)値に、 核酸中のリン含有率9%をかけて求めた。
				高分子ポリリン酸	活性炭処理後 1N1 H ₂ SO ₄ 100 7分分解法による
5	タンパク画分	熱NaOH	タンパク質	T-P	リンタンパクの他に4までに抽出されなかった アルカリ可溶性リンを含む
6	残留画分			T-P	すべての抽出後の残留リン

本研究で用いた分画法は STS 法のうち、C-PCA 画分のみである。C-PCA とは Cold-Perchloric acid(低温の過塩素酸)をさし、今回用いた手法は低温の酸による抽出法とも呼ぶことができる。C-PCA 画分により抽出されるのは、金属性リンと生体内低分子ポリリン酸である。まず、金属性リンは PO₄-P の測定で分析される。多くの金属リン酸塩はオルトリン酸塩の形と考えられ、これらは酸に可溶であるから STS 法では C-PCA 画分の PO₄-P として定量されるのが常識的である。Fe、Ca のリン酸塩については、その大部分が C-PCA 画分に抽出され、PO₄-P として定量される(Mino *et al.*(1984))。また、C-PCA 画分では抽出される画分に低分子ポリリン酸があるが、ここでいう低分子という表現は曖昧で、その縮合度の違いに基づく細胞内たんぱく質との結合性の強弱に由来するとされている。ポリリン酸が高分子であればたんぱく質と結合しているが、たんぱく質と結合していないため低分子のポリリン酸が C-PCA 画分に抽出されると考えられている(味埜(1982))。生物学的リン除去プロセスにおける高リン蓄積は低分子ポリリン酸及び高分子ポリリン酸によって行われる。低分子ポリリン酸は嫌気条件下でのエネルギー源として用いられ、高分子ポリリン酸は増殖反応のリン源として用いられている(Mino *et al.*(1984))。さらに Mino *et al.*(1985)はそのリン代謝に関するモデルの構築している。

C-PCA 画分(低温の酸による抽出法)の手法の流れは、以下のとおりである。

・サンプリングおよび集菌

活性汚泥混合液の 25ml を 50ml テフロン遠沈管にとり、3500rpm で 5 分遠心分離を行う。上澄みは回収し、溶存物質の分析用サンプルとし、残渣を超純水に再溶解し、同条件で遠心分離して、残渣を用いて、以下の抽出に回す。

・冷酸可溶画分の抽出(Cold-PCA 画分)

残渣の入った遠沈管を冷凍庫(-20℃)にて急冷し、2~3 分で遠沈管が冷えたら、冷却した汚泥に 5 ml 0.5N PCA(過塩素酸)1ml を加え、均一になるようにガラス棒で攪拌する。ついで、約 1ml の同 PCA を用い、2~3 回に分けてガラス棒に付着した汚泥を管内に流し落とす。さらに約 2ml の PCA で遠沈管壁面の汚泥も底に流し落とす。終了後、汚泥を 4 ml で、20 分放置する。次に、冷却遠心機にて、0~5 8000rpm で 10 分間遠心分離を行う。分離後、上澄み部分をピペットで静かに集め、50ml 比色管にとる。この操作を 3 回繰り返す、集めた上澄み及びその残渣を超純水で、もとのサンプル量(25ml)にメスアップする。

・リン分析

C-PCA 画分による抽出物は PO₄-P (モリブデン青 - アスコルビン酸法) 及び T-P (ペルオキシ二硫酸カリウム分解法) の測定を行い、残渣は T-P の測定を行った。

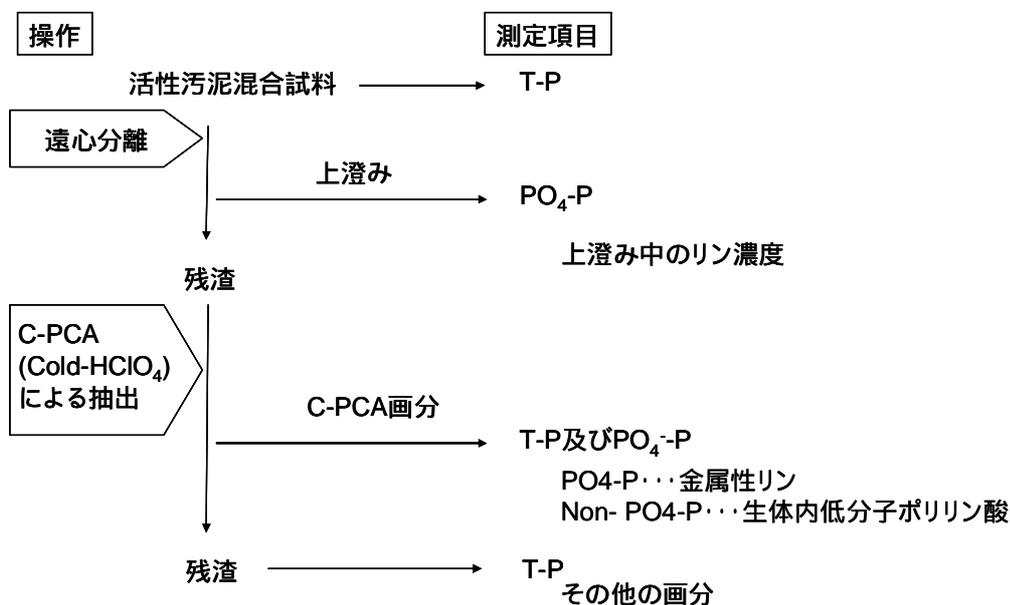


図 3.1 低温の酸による抽出法の手順

3.2.4 バッチ試験によるリンの摂取実験

本実験は、ポリリン酸蓄積細菌にリンを十分に摂取させるために行った。実処理場の嫌気槽又は無酸素槽の末端より活性汚泥を採取し、リン酸を含む基質を加え、嫌気 2 時間・好気 8 時間のバッチ試験を行った。実験装置は、1L の広口共栓ガラス瓶を容器として用いた。嫌気条件は、採取した活性汚泥を容器に移した後、10 分程度窒素ガスによる曝気を行い、酸素を追い出し、その後はスターラーにより攪拌して嫌気状態を作った。好気条件は酸素供給にはエアポンプを用いた。

3.2.5 溶溶性 PO₄-P の測定

モリブデン青 - アスコルビン酸法又はイオンクロマトグラフ法によって測定した。イオンクロマトグラフ法は 0、30、50、100mgPO₄-P/L の標準液によって検量線を作成して測定値を算出した。

3.3 核酸抽出を伴う微生物群集解析

3.3.1 核酸抽出

核酸抽出は FastDNA SPIN Kit for Soil(Q-BIOgene)を用い、付属のマニュアルに従って実験を行った。Lysing Matrix E Tube に活性汚泥のペレットを入れ、Sodium Phosphate buffer978 μl と MT buffer122 μl を添加し、Fast Prep(Q-BIOgene)を用いてホモジナイズ処理を行って細胞を破碎した。遠心分離 (15000rpm、10 分間) を行った後、上澄みを新しいチューブに移し、PPS250 μl を加えて振り、遠心分離をかけ、上澄みを 15ml チューブに移して Binding Matrix1ml と混和させた。2 分間反転振とうした後、3 分間静置して Binding Matrix を沈降させ、沈降した Binding Matrix を Spin Filter に移し、遠心分離によってフィルタ上に捉え、SEWS-M を 500 μl を加えて再度、遠心分離にかけて SEWS-M を取り除いた。Spin Filter を新しい Catch Tube に移し、5 分間乾燥させた。その後、DES (Dnase/Pyrogen Free Water) 50 μl を加えて攪拌し、3 分静置後、遠心分離によって核酸抽出液を得た。抽出した核酸は分光光度計によって濃度と純度を評価して、抽出した核酸は -20 で保存した。

3.3.2 PCR 法

DNA ポリメラーゼには AmpliTaq Gold(Applied Biosystems)を用い、PCR buffer、dNTP は付属のものを用いた。PCR 混合液 100 μ l 中で、2.5U/reaction Taq polymerase、1 \times buffer、0.2mMdNTP、0.2mM のフォワード/リバースのプライマー、50ng のテンプレートとなるように調整し、温度制御を行うサーマルサイクラー(Biometra 社 T3/T-gradient))によってプライマーごとに最適なサイクルを行って DNA の増幅を行った。PCR 産物はアガロースゲルの電気泳動で目的の長さの産物が得られていることを確認した。本研究で用いた全てのプライマー(シーケンシング用のプライマーも含む)を表 3.2 に示す。

表 3.2 本研究で用いたプライマーとその配列

Name	Target site	Sequence(5'-3')	Reference
27f	8-27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane <i>et al.</i> (1991)
357f	341-357	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
517f	517-533	GCCAGCAGCCGCCGTAA	Lane <i>et al.</i> (1991)
1099f	1099-1114	GYAACGAGCGCAACCC	Lane <i>et al.</i> (1991)
518r(=534r)	518-534	ATTACCGCGGCTGCTGG	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
907r	907-926	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	Lane <i>et al.</i> (1991)
1114r	1099-1114	GGGTTGCGCTCGTTTC	Lane <i>et al.</i> (1991)
1392r	1392-1406	ACGGGCGGTGTGTRC	Lane <i>et al.</i> (1991)
1492r	1492-1510	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Lane <i>et al.</i> (1991)
Hgc-1	420-440	TTCGGGTTGTAAACCTCTTTC	Oyaizu <i>et al.</i> (2000)
SP6	SP6領域	CATTTAGGTGACACTATAG	
T7	T7領域	GTAATACGACTCACTATAG	
357fGC	341-357	gc-CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
968fGC	968-984	gc-AACGCGAAGAACCCTTAC	Nubel <i>et al.</i> (1996)
gc-	GCクランプ	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGG CGGGGCGGGGACGGGGGG	Muyzer <i>et al.</i> (1993)

3.3.3 DGGE 法

基本的には Muyzer *et al.*(1993)に従った。GC クランプ付きのプライマーを用いて PCR 法を行い、GC クランプ付きの増幅産物を得て、それらを DGGE 法に供した。DGGE は Dcode システム(Bio-Rad)を使用し、プロトコルに準拠して濃度勾配を持つゲルの作成及び電気泳動を行った。8%ポリアクリルアミドゲル中で変性剤の濃度勾配を 30~60%とし、TEMED 10 μ l と 10%APS 80 μ l を 14ml の Gel solution に添加して一晩かけて固めた。プロトコルでは 10%APS は 100 μ l であるが、ゲルを固める際にはゆっくり固めた方が勾配がきれいにかかるため 10%APS の量を少し減らした(福島(2002))。

泳動条件は、357fGC - 518r のプライマーを用いた場合は 60 、130V、5 時間(福島 2002)

という条件で、968fGC - 1392r プライマーを用いた場合は 60 V、180V、6 時間(Schuler *et al.*)という条件で、それぞれ泳動を行った。プライマーの選定は目的に応じて決める必要があるが、Yu *et al.*(2004)によると、バンドプロファイルが最も良いのが V3 でその次が V3-V5 と V6-V8 であると報告している。泳動終了後、1 万倍希釈した VistraGreen(アマシャム社)を用いてゲルを 15 分間染色し、FluorImager595(アマシャム社)によって画像を取り込んだ。

3.3.4 クローニング法

PCR 産物のクローニングは QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit(QIAGEN)を用い、基本的には付属のマニュアルに従って行った。PCR 産物のプラスミド DNA へのライゲーション及びコンピテントセルへの形質転換、プラスミドを組み込んだ大腸菌の単離・培養というステップからなる。

PCR 産物を精製、濃縮後、pdrive Cloning Vector、Ligation Master Mix をマニュアルに従って混合し、10⁶ CFU で 2 時間~24 時間ライゲーション反応を行った。その後、付属の competent cell を用いて形質転換を行い、LB 培地(アンピシリン 100mg/L、X-gal80mg/L、IPTG50mM を含む)に塗布して 37^oC で 15~18 時間培養した。白色のコロニーのみを滅菌した楊枝で採取し、新しい LB 培地に植えかえて再度 15~18 時間培養した。その後、SP6 - T7 プライマーを用いて、コロニーダイレクト PCR 法により増幅させた。アガロース電気泳動により目的産物が正しくインサートされているか産物の長さにより確認した。

3.3.5 RFLP 法

基本的には Promega 社の付属のプロトコルに従って、制限酵素処理を行った。最適温度で 2 時間のインキュベーション後、アガロースゲル電気泳動を行った。本研究ではクローニング後の PCR 産物のスクリーニング手法として用いた。制限酵素による泳動パターンが同じであれば、そのクローンは同一種であると判断することが可能であるが、異なる種でも、同じ位置に同じ配列を持っていれば同一種と判断されてしまうため、いくつかの制限酵素を試す必要がある。

3.3.6 塩基配列の解読

塩基配列の解読はマクロジェン社に外注した。

3.4 顕微鏡を用いた *in situ* での微生物群集解析

3.4.1 FISH 法

基本的には Amann (1995-b)⁽²⁾に従った。本研究で用いたプローブを表 3.3 に示す。

蛍光プローブの合成

蛍光プローブの合成はプロリゴジャパンに外注した。蛍光ラベルは Amann に従い、5' 末端に標識した。プローブは滅菌水で 10pmol/ μ l に調整して 10 μ l ずつ分注し、-20 で保存しておいたものを使用した。

スライドガラスの前処理

スライドガラスは温かい石鹼液に 1 時間漬けた後、超純水で洗浄し 0.1%ゼラチン溶液に浸してコートして空気乾燥したものをを用いた。なお、Amann はゼラチン溶液の中に 0.01% クロムミョウバンを加えているが、これを除いても問題ないことが分かったため、物質の環境影響を考え、本研究では用いていない。

試料の固定及び定着

試料の固定は Amann が推奨している、数多くの研究で実際に用いられている 4%パラホルムアルデヒドを用いた。しかし、この 4%ホルムアルデヒド固定はグラム陰性細菌の検出のために最適化された方法で、*Acetivomycetes* や *Streptococci* などのある種のグラム陽性細菌には効果がないことがある。そのため、グラム陽性細菌の固定にはエタノール固定が有効であるとされている(Roller et al.(1994))。また、それでもプローブが浸透しない場合の細胞壁処理の方法として、リゾチウムなどを用いた酵素処理も有効である(Beimhohr et al.(1993))。本研究ではそれぞれのプローブを設計した論文のプロトコルに従って 4%パラホルムアルデヒド又はエタノールによる固定を行った。

パラホルムアルデヒド溶液は、以下の手順で作成した。加熱した超純水 6.5ml にパラホルムアルデヒド 0.4g、2M 水酸化ナトリウム一滴加えて溶解させ、3×PBS(phosphate buffered saline)を 3.3ml 加えた。薄い塩酸を用いて pH7.2 に調整して 0.2 μ m フィルタに通して、4%ホルムアルデヒド溶液 10ml(pH7.2)とした。

パラホルムアルデヒド固定の場合は、活性汚泥試料 1 容に対して 4%パラホルムアルデヒド溶液を 3 容、エタノール固定の場合は試料 1 容に対して 98%エタノールを 1 容加え、4 で 1~3 時間放置して固定した。その後、遠心分離で固定液を除いて 1×PBS で懸濁し、再び遠心分離にかけて上澄みを捨てて固定液を洗浄した。1×PBS とエタノールを等量ずつ加えて再懸濁させ、固定したサンプルを氷水などで冷やしながら 10W 程度で 4 分程度超音波分散をかけた。スライドガラスのウェルに滴下し、空気乾燥させた後、このスライドガラスを 50%、80%、100%のエタノールに順次 3 分ずつ漬けて脱水した。

ハイブリダイゼーション、ウォッシング

使用するプローブに応じたホルムアミド濃度をもった hybridization buffer(0.9M NaCl、20mM Tris/HCl(pH7.2)、0.01%SDS、x% ホルムアミド)を調整した。10pmol/ μ l プローブを 1:8 の割合で hybridization buffer と混合し、試料を定着させたスライドガラスにプローブを滴下した。このスライドガラスを hybridization buffer によって気液平衡を保ったチャンバー内に 46 で 2 時間放置し、プローブとサンプルのハイブリダイゼーションを行った。実際の操作は 1 枚のスライドガラスをハイブリダイゼーションに供するにあたって、hybridization buffer を 0.6ml 作成し、プローブの混合に用いた残りをチャンバー内の気液平衡のために用いた。

その後、Washing buffer を hybridization buffer と同じ stringency を持つように調整し、48 で 20 分間浸すことで結合しなかったプロ - ブを洗い流した。最後に、washing buffer を超純水で洗い流し、すばやく乾燥させ、後処理として退色防止剤 Slow Fade-Light Antifade Kit 又は Slow Fade-Light Antifade Gold Kit(Molecular Probes 社)をたらし、空気が入らないようにカバーガラスをかぶせて標本が完成させた。

顕微鏡観察

標本の完成したスライドガラスを蛍光顕微鏡(Olympus 社 , DP70)によって観察し、画像を取得した。

EUB 及びグループレベルプローブ

Probe	Sequence(5'-3')	Target site	Specificity	FA(%)	Reference
EUB338 I	GCTGCCCTCCCGTAGGAGT	16S 338-355	Eubacteria	20-35	Amann <i>et al.</i> (1990)
EUB338 II	GOAGCCACCCTAGGTGT	16S 338-355	Eubacteria Planctomycetales	20-35	Daims <i>et al.</i> (1999)
EUB338 III	GCTGCCACCCTAGGTGT	16S 338-355	Eubacteria Verrucomicrobiales	20-35	Daims <i>et al.</i> (1999)
ALF1 b	CGTTGGYCTGAGCCAG	16S 19-35	α proteobacteria	20	Manz <i>et al.</i> (1992)
BET42a	GCCTTCCCACCTGGTTT	23S 1027-1043	β proteobacteria	35	Manz <i>et al.</i> (1992)
GAM42a	GCCTTCCCACATGGTTT	23S 1027-1043	γ proteobacteria	35	Manz <i>et al.</i> (1992)
HGC89a	TATAGTTACCACCCTGGT	23S 1901-1918	Actinobacteria	25	Roller <i>et al.</i> (1994)
CF319a	TGGTCCGTGTCTAGTAC	16S 319-336	Cytophaga-Flavobacter-Bacteroidetes	35	Manz <i>et al.</i> (1996)
GNSB 941	AAACCACACGCTCCGCT	16S 941-957	Green non-sulfur bacteria	35	Björnsson <i>et al.</i> (2002)
LGC354A	TGSSSGATTCCCTACTGC	16S 354-361	Firmucutes	35	Meier <i>et al.</i> (1999)
LGC354B	CGGAAGATTCCCTACTGC	16S 354-361	Firmucutes	35	Meier <i>et al.</i> (2000)
LGC354C	CCGAAGATTCCCTACTGC	16S 354-361	Firmucutes	35	Meier <i>et al.</i> (2001)
TM7	CCGTCAAATTCCTTTATGTTTTA	16S 905-926	TM7	20	Hugenholtz <i>et al.</i> (2001)

PAO 及び GAO プローブ

Name	Sequence(5'-3')	Target site	Reported specificity	FA(%)	Reference
PAO462	CCGTCATCTACWCAGGATTTAAC	16S 462-485	<i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphate'	35	Crocetti <i>et al.</i> (2000)
PAO651	CCCTCTGCCAAACTCCAG	16S 651-668	<i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphate'	35	Crocetti <i>et al.</i> (2000)
PAO846	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	16S 846-866	<i>Candidatus</i> 'Accumulibacter phosphate'	35	Crocetti <i>et al.</i> (2000)
Actino_1011	TTGCGGGCACCCATCTCT	16S 1011-1029	<i>T. elongata</i> clones Ebp19 and 20 Actinobacteria	30	Liu <i>et al.</i> (2001)
MP2	GAGCAAGCTCTTCTGAACCG	16S 68-87	<i>Microtholunatus phosphovorius</i>	10	Kawaharasaki <i>et al.</i> (1998)
GB	CGATCCCTACGCCACT	16S 612-628	γ proteobacteria GAO?	35	Kong <i>et al.</i> (2002)
GAM1019	GGTCCCTTGCGGCACTC	16S 1019-1036	γ proteobacteria PAO?/GAO?	30	Nielsen <i>et al.</i> (1999)
GAM1278	ACGAGCGGCTTTTGGGATT	16S 1278-1297	γ proteobacteria PAO?/GAO?	33	Nielsen <i>et al.</i> (1999)

3.4.2 高濃度 DAPI 染色

DNA 染色剤としての DAPI は $2\ \mu\text{g/ml}$ で用いているのに対して、ポリリン酸染色剤としては $50\sim 100\ \mu\text{g/ml}$ の濃度で用いる。方法は、Stereichen et al.(1990)に従い、DAPI を 0.025M Tris/HCl(pH7.0)に溶かして作成した。

3.4.3 FISH 法と高濃度 DAPI 染色の二重染色法

高濃度 DAPI 染色と FISH 法と組み合わせることが可能である。しかし、小貫(2001)により、ハイブリダイゼーションによってポリリン酸が溶出してしまうということと、固定の際やエタノール脱水などの FISH 法の各工程においてもポリリン酸顆粒の縮小が見られるという結果が報告されている。高濃度 DAPI 染色を行った後で FISH 法を行う方法を小貫(2001)が開発しているため、これに従って行った。サンプルの固定及び定着までの操作は、固定時間を 30 分、スライドガラスへの定着後のエタノール脱水を数秒で行うなど、素早く行った。定着したスライドガラスに高濃度 DAPI をスポットし、5 分経過後、超純水でよく洗い流してすばやく乾燥させた。退色防止剤を添加してカバーガラスをかぶせて標本を完成させた。顕微鏡でポリリン酸を蓄積して黄色い蛍光を発する細菌を含む画像を $20\sim 40$ 視野程度取得し、その際に視野の位置を記録しておく。観察後、カバーガラスをはずして超純水で洗浄し、空気乾燥させる。そして、ハイブリダイゼーション・ウォッシングと FISH 法と同様の操作を行い、スライドガラスを完成させた。そして顕微鏡観察の際に、記録した位置をもとに同一の視野を探してプローブの蛍光の画像を取り込んだ。高濃度 DAPI 染色による画像と FISH 法による画像を比較することでプローブの標的細菌がポリリン酸を蓄積しているかを確認できる。記録した位置をもとに同一の視野を探すのは労力のかかる場合が多いが、本研究では、発見が容易な視野（活性汚泥が固まって存在するなど特異的な視野）の位置をまず記録した上で、それをもとに上下又は左右のみの位置移動のみで他の視野を探した。

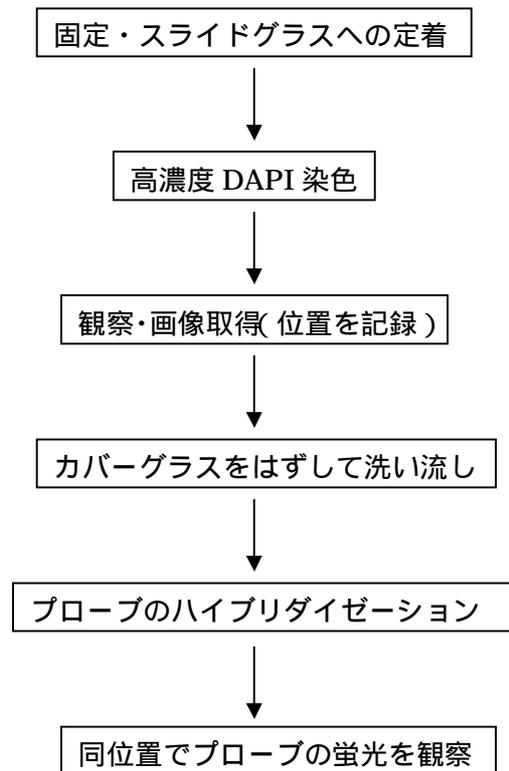


図 3.2 高濃度 DAPI 染色と FISH の二重染色法

3.4.4 FISH 法を用いた定量の方法

顕微鏡を利用した細菌種の定量方法には 直接計数法、面積定量法の 2 通りの方法がある。まず、直接計数法とは、蛍光写真からセルの個数を計数する方法で、微生物の「数」を議論しているため理解が得やすい。しかし、計数は実際に目で見て数えるため、大量の視野を扱うのは労力がかかる。面積定量とは、Leica 社の Qwin というアプリケーションソフトを用いて定量する方法で、蛍光を発している面積、言い換えると rRNA に結合したプローブの蛍光量を議論していることになる。面積定量の長所は 1 枚の写真に対してかかる時間が短くてすむため、大量分析が可能である点である。計数法では視野数が少なくならざるを得ず、視野ごとのばらつきの大い試料を扱うときには注意が必要である。

本研究では真正細菌のうちの標的細菌の割合を求める場合など、比較する対象がともに FISH による蛍光の場合には面積定量で行った。逆に、高濃度 DAPI 染色と FISH の蛍光のように染色しているものが違う場合は直接計数法で行った。直接計数法は分母が 1000 になるように数えた。面積定量は 1 サンプルにつき 20 視野ずつ行った。

LeicaQwinによる面積定量法について

面積定量にも欠点があり、まず先ほど述べたように rRNA 量を議論しているため微生物学的に一般的でないことが挙げられる。また、閾値の決め方が観察者に任されており、恣意性が入ってしまうということがある。これは、LeicaQwin によって、赤・緑・青の各色調につき 256 段階で定量することができるのであるが、画像ごとに画像の色調に微妙に違いがあるので、マニュアルで閾値を決める必要があるという点に起因している。閾値を決めるとき、蛍光部分を全て網羅しようとする、ノイズが入りすぎてしまう。すなわち、クラスターを形成して蛍光を放つとそれによるノイズの方が、細菌が単体で蛍光を放つ場合よりも蛍光が強くなってしまいノイズを蛍光面積に多く含んでしまう。その解決策として、超音波分散をかけることである程度は防ぐことができる。

また、自家蛍光による影響も問題である。自家蛍光というのは自然界に存在する構成物そのものから発する光で、プローブの蛍光と同じくらいかそれ以上の強さで蛍光を発する。自家蛍光は位相差で確認しながら取捨選択して画像を取りこめば影響を減らすことが可能である。

3.4.5 FISH プローブの設計

プローブの設計は塩基配列データベースツールの ARB によって行った。ARB にシーケンシングによって得られた塩基配列のアライメントをかけ、系統樹上に入力した。得られた配列にいくつかの既知の種を含めて、特異的に捉えるプローブの設計を行った。このとき、プローブの長さは 18 として検索した。ここで得られたプローブの配列で mismatches の弱いもの、1 塩基違いがプローブの両端にあるものなどは除いた。プローブに存在する 1 塩基違いを、プローブの長さを変えるなどして mismatches の位置をずらした。得られたプローブ配列を RDP の Check_probe にかけ配列に問題ないかを確認し、最適なプローブを決定した。プローブ設計の方法は Hugenholtz et al.(2001)、栗栖(1997)に従った。

3.4.6 グラム染色法 (Hucker の変法)

グラム染色とは、染色液に対する細菌の染色性の違いを利用してグラム陽性細菌とグラム陰性細菌に分類する方法である。クリスタルバイオレットにより染色すると、グラム陰性細菌は細胞壁が薄いため、エタノール処理によってクリスタルバイオレットが脱色されるが、グラム陽性細菌はエタノール処理をしても脱色されないことを利用している。

方法は下水道試験法(1997)に従った。スライドグラス上に試料を塗布し乾燥させ、Hucker の液 (クリスタルバイオレット溶液及びシュウ酸アンモニウム溶液の混合液) をスライドグラス上に滴下し、1 分間染色した後、流水で染色面を水洗する。その後、ルゴール溶液を 1 分間作用させ、水で洗い、エタノールによって約 30 秒間脱色させる。そしてサフラン

溶液を滴下して 1 分間染色し、水洗、乾燥させる。このスライドガラスを顕微鏡で観察すると、グラム陽性細菌は青紫色、グラム陰性細菌は淡紅色に染色される。

第 4 章 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

4.1 第 4 章の概要

生物学的リン除去プロセスを対象とする分子生物学的手法を用いた群集解析から、*Candidatus 'Accumulibacter phosphates'* (Crosetti *et al.*(2000)、Hesseleman *et al.*(1999)) や *Actinobacteria* に属する細菌(Liu *et al.*(2001)、Kong *et al.*(2005))などが主要なポリリン酸蓄積細菌として同定されている。

Accumulibacter は *Proteobacteria* に属する *Rhodocyclus* 属に近縁な細菌で、実験室リアクターにおいて人工下水によって馴致した活性汚泥 (Crosetti *et al.*(2000)、Hesseleman *et al.*(1999)) や実下水処理場活性汚泥に関する研究(Zilles *et al.*(2002))によって重要な役割を果たしていることが分かっている。一方、グラム陽性の *Actinobacteria* に属するいくつかの細菌もポリリン酸蓄積細菌として同定されている。Liu *et al.* (2001)、Kong *et al.*(2005)は *Tetrarasphaera* に近縁な種がポリリン酸を蓄積して、活性汚泥中に多く存在していたと報告している。Nakamura *et al.*(1995)はポリリン酸を蓄積する *Microlunatus phosphovorius* を単離している。また、*Proteobacteria* (Liu *et al.*(2001))や *Proteobacteria* (Kawaharsaki *et al.*(1999))に属する細菌もポリリン酸蓄積細菌として報告があり、ポリリン酸蓄積細菌は系統学的に非常に多様であることが知られている(Seviour *et al.*(2003))。このように、現在までポリリン酸蓄積細菌の系統学的同定に関する研究が行われてきたが、ポリリン酸蓄積細菌の全体像が十分に明らかになったとは言い難い。

本章では、どのグループにポリリン酸蓄積細菌が存在しているのかを大まかに全体像を捉えることを目的として、ポリリン酸を染色する高濃度 DAPI とグループレベルプローブを用いた FISH の二重染色法を用いてポリリン酸蓄積細菌の群集解析を行った。高濃度 DAPI 染色法は、リンを放射性同位元素で標識する MAR 法に比べて安価であるため、多くのサンプルを扱うのに適しており、また細菌そのものを蛍光することができるので定量にも適している。

本研究では、各処理場におけるポリリン酸蓄積細菌の種構成やグループレベルでの定量を行った。また、実処理場で既知のポリリン酸蓄積細菌である *Accumulibacter* と *Actino1011* 陽性細菌の寄与についても解析した。新規のポリリン酸蓄積細菌に関しては、塩基配列を得ることはできないが、どこのグループにいるどのような形態の細菌であるのか、またはどの程度存在しているのかという情報を得ることができる。*Accumulibacter* と *Actino1011* 陽性細菌など既知のポリリン酸蓄積細菌を含めたポリリン酸蓄積細菌の群集構造の大まかな把握を目的とする。

4.2 実験方法の検討

本章の研究を行うにあたって、2つの検討を行った。汚泥に十分にリンを蓄積させる方法と高濃度 DAPI 染色と FISH の二重染色法を検討した。以下にそれを記述する。

4.2.1 十分にリンを蓄積させる方法の検討

高濃度 DAPI 染色法により細胞内に蓄積されたポリリン酸を染色させるためにはリンを高濃度に蓄積させる必要がある。実処理場試料の採取では好気槽の最終回路で行ったとしても持ち帰る際のリンの溶出が考えられる。また、試料採取時に流入水のリン濃度が低く、ポリリン酸蓄積細菌が存在するにもかかわらずリンを蓄積できないということも考えられる。そのため、本研究では嫌気槽の最終回路より試料採取を行い、実験室内でバッチによりリンを過剰に与えることにした。用いたリン基質の組成は福島(2002)がリアクターの運転の際に与えていたリン基質と同様にした。表 4.1 のとおりである。バッチの時間は嫌気 2 時間好気 8 時間で行った。

バッチでリンを過剰に加えてポリリン酸を十分に蓄積させる方法として、以下の 2 つの方法が考えられた。

() リンを含む基質を加える方法

バッチを始める前にリン基質を加えてから運転を始める。

() 上澄みを人工のリン基質に入れ替える方法

上澄み中に残る有機物を充分に取り込ませるために嫌気工程はそのまま行い、好気工程に入る直前に遠心分離を行って上澄みを取り除き、希釈したリン基質に入れ替えて、好気工程を開始する。

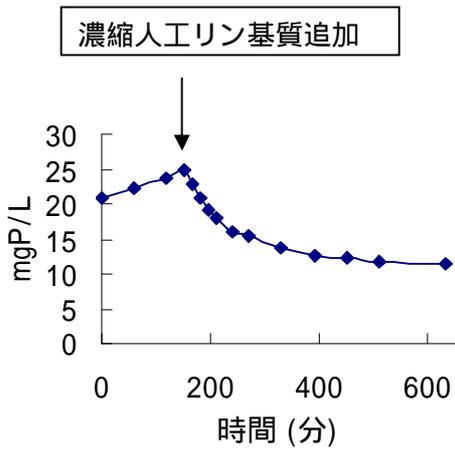
この 2 つの方法について、K 処理場 AO の汚泥を用いて検討を行った(図 4.1)。その結果、表 4.2 の通り、取り込み速度、取り込み量などは()のリン基質投入型の方が少し良い結果が得られたが、顕著な差は見られなかった。上澄みを取り除いて人工リン酸に入れ替える方法は 1 L 程度の汚泥を遠心分離にかけて上澄みを取り除く作業を要するため糸状性細菌などの沈降性の悪い細菌を流出させてしまう恐れがある。実際、作業上の問題もあったためか、汚泥があまり沈降せず流出させてしまっていた。上澄みを人工的に作られた基質に交換することがリン蓄積にそれほど寄与しないことが分かったので上澄みの交換という煩雑な方法は行わず、バッチ試験開始前に、リン基質を過剰に加えてバッチ実験を行ってリンを蓄積させるという方法を採用した。

表 4.1 リン基質の組成

基質	(/ 1L)
K ₂ HPO ₄	1.8g
KH ₂ PO ₄	1.4g
ATU	0.4g

基質	(/ 1L)
CaCl ₂ (2H ₂ O)	0.88g
MgCl ₂ (6H ₂ O)	9.07g
KCl	4.2g
NH ₄ Cl	1.76g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.16g

()



()

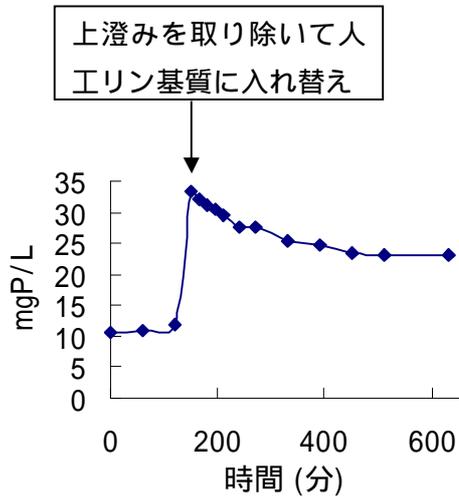


図 4.1 バッチ試験の結果比較

表 4.2 バッチ試験の検討結果の比較

	リン酸基質投入	リン酸基質入れ替え
MLSS	1102mg/L	893mg/L
MLVSS	862mg/L	694mg/L
リンの摂取速度	9.8mgP/gVSS/h	7.4mgP/gVSS/h
リンの摂取量	15.6mgP/gVSS	14.8mgP/gVSS
リン含有率(SSベース)	3.3%	3.4%

4.2.2 高濃度 DAPI と FISH の二重染色法の検討

FISH&DAPI 法では、3.4.3 で述べたように FISH 法の工程中によるリンを溶出してしまふ。小貫(2001)の検討によって、固定は高濃度 DAPI 染色の前に行い、ハイブリダイゼーションは高濃度 DAPI 染色の後に行う方法が開発された。本研究でも、同様にハイブリダイゼーションによる影響と固定による影響の検討を行った。

酢酸で馴致された汚泥を用いて、主要なポリリン酸蓄積細菌である *Accumulibacter* のうち、どの程度がリンを溶出してしまふのかを観察した。

固定時間の検討

固定時間を 30 分、1 時間、3 時間、8 時間、24 時間で行って、高濃度 DAPI 染色の観察をしたところ、8 時間や 24 時間の固定を行っても高濃度 DAPI 染色の黄色い蛍光は観察された。しかし、固定によるポリリン酸の溶出と思われる黄色い蛍光の縮小又は消失が見られる視野もあった。従って、固定の時間はできるだけ短い方が望ましい。また、固定時間を 30 分としてもハイブリダイゼーションに問題はなかったため、固定時間は 30 分とした。

ハイブリダイゼーションの影響

ハイブリダイゼーションによるポリリン酸の溶出の影響を観察したところ、小貫(2001)の報告の通り、ポリリン酸顆粒を示す黄色い蛍光が著しく減少した。PAOmix プローブで捉えられる細菌のほとんどはリンを溶出し、高濃度 DAPI で黄色い蛍光を示さなかった。なかには高濃度 DAPI で黄色い蛍光を示すものも見られたが、固定の影響に比べると著しい黄色い蛍光の縮小が観察された。本研究のように高濃度 DAPI によって捉えられるポリリン酸蓄積細菌を網羅的に探索することを目的としている研究にはハイブリダイゼーション後の高濃度 DAPI 染色の方法は向かない。そのため、高濃度 DAPI 染色は Liu et al.(2001)、小貫(2001)、Wong et al.(2005)が行っているように、高濃度 DAPI 染色を先に染色して観察後、カバーガラスを外してハイブリダイゼーションを行う方法を採用した。

4.3 実験方法

活性汚泥試料は実処理場の好気工程に入る直前の汚泥、すなわち AO 法では嫌気槽の最終回路から、A2O 法の無酸素槽の最終回路から採取した。それらを冷却して実験室に持ち帰り、人工リン基質を加えて容量 1 L のバッチ装置で嫌気を 2 時間 MK 処理場 O、K 処理場 AO のみ 2.5 時間)、好気を 8 時間のバッチ試験を行って、十分にリンを蓄積させた。嫌気は最初の 10~20 分間を窒素に曝し、その後はスターラーによって攪拌した。それらの上澄みを嫌気 0、60、120(分)で、好気 0、15、30、45、60、90、120、150、180、240、300、360、480(分)でそれぞれ採取し、上澄み中のリン濃度を測定することで汚泥がリンを蓄積

しているか確認した。

好気 360 分又は 480 分の十分にリンを蓄積させた汚泥に対して、高濃度 DAPI と FISH の二重染色法を用いてポリリン酸蓄積細菌に対する各グループレベルプローブで捉えられる細菌の割合を直接計数法で定量した。また、主要なポリリン酸蓄積細菌として PAOmix、Actino1011 プローブも用いた。用いたプローブは表 4.3 の通りである。

実処理場活性汚泥試料として用いたのは、MK 処理場 AO、K 処理場 AO、SU 処理場 AO、HG 処理場 AO、NG 処理場 A2O、T 処理場 PAO の 6 試料である。また、人工基質によって馴致されたりアクターの汚泥も 3 種類行った。実験室汚泥については十分にポリリン酸を蓄積していると考えられるのでバッチによる摂取実験は行わず、高濃度 DAPI と FISH の二重染色法の試料として供した。人工基質によって馴致された汚泥の詳細は表 4.4 に示す。

表 4.3 本章の研究に用いたプローブ

	Probe	Specificity
Group specific probe	ALF1b	Proteobacteria
	BET42a	Proteobacteria
	GAM42a	Proteobacteria
	HGC69a	Actinobacteria
	CF319a	Cytophaga-Flavobacteria-bacteroides
	GNSB_941	Green-non-sulfur-Bacteria
	LGC354mix	Firmucutes
	TM7905	TM7
PAO probe	PAOmix	Accumulibacter
	Actino1011	Actino-PAO

(配列などの情報は本論文第 3 章)

(LGCmix ; LGC354A、LGC354B、LGC354C を混合

PAOmix ; PAO462、PAO651、PAO846 を混合)

表 4.4 人工下水によって馴致された汚泥について

試料名	炭素源(炭素換算(%))	馴致期間
Run14	酢酸(90%)・ペプトン(5%)・酵母エキス(5%)	32日
Run5	ペプトン(50%)・酵母エキス(50%)	61日
Run13	グルタミン酸(45%)・アスパラギン酸(45%)・グルコース(10%)	not data

4.4 リン摂取実験の結果

汚泥のリンの摂取実験の結果を以下の図 4.2 に示す。なお、MK 処理場 AO についてはリンを加えていない。また、バッチに供した活性汚泥 1 L に対して、K 処理場 AO は表 4.1 の濃縮リン基質を 10ml、それ以外の試料には 1 L に対して 5ml ずつ加えている。

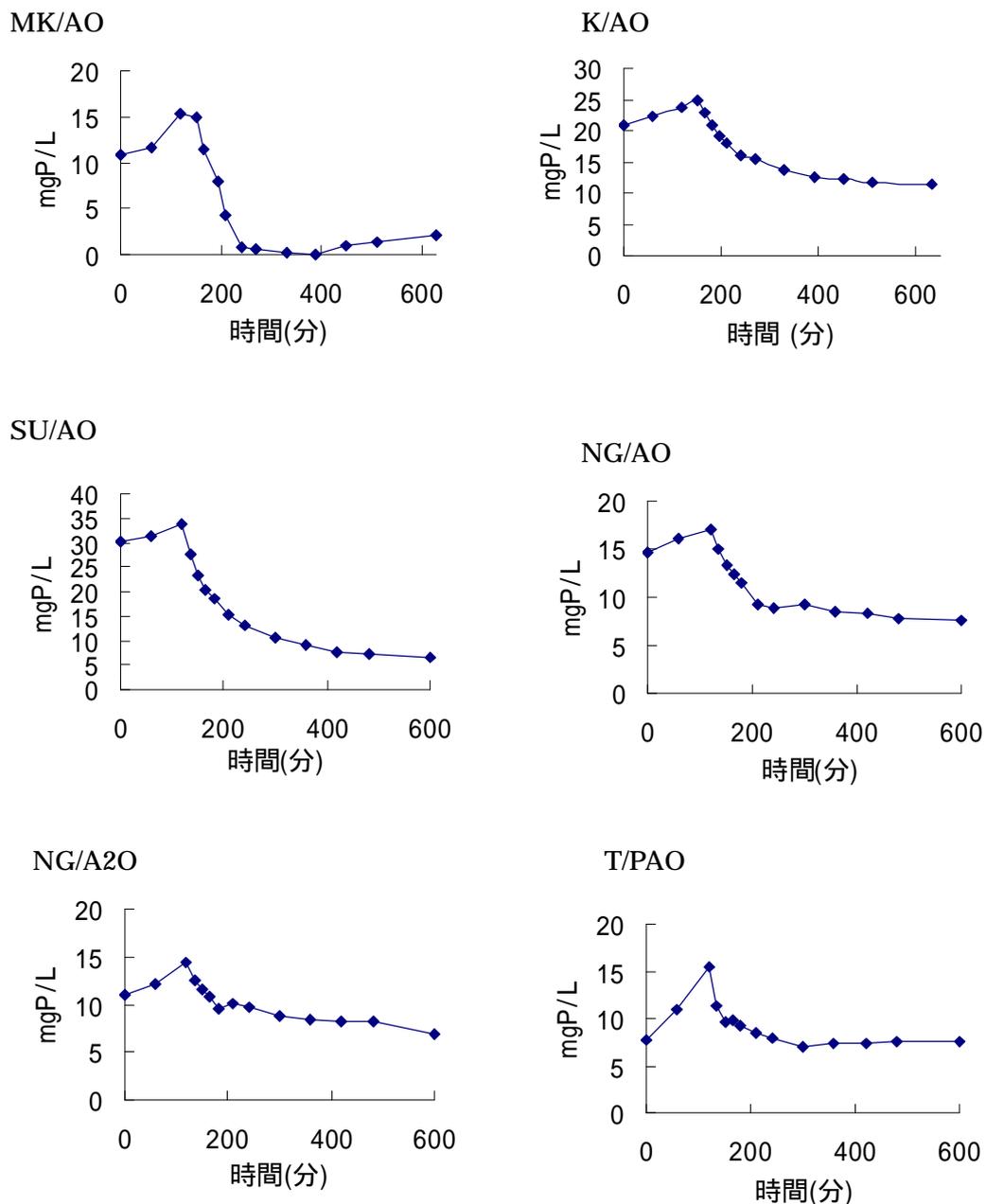


図 4.2 実処理場試料のバッチ試験の結果

リンの取り込みは全てのサンプルについて良好であった。バッチ試験のデータをまとめたものが表 4.5 である。嫌気の終わりから好気の終わりまでのリンの摂取量は最大で SU 処理場 AO の 19.0mgP/gVSS で、最小は T 処理場 PAO の 4.8mgP/gVSS であった。また、その他のサンプルは 9mgP/gVSS ~ 15mgP/gVSS 程度であった。リンの取り込み速度も 9mgP/gVSS/h ~ 17mgP/gVSS/h と良好であった。

表 4.5 実処理場試料のバッチ試験の結果

試料名	MLSS (mg/L)	MLVSS (mg/L)	取り込み速度 (mgP/gVSS/h)	取り込み量 (mgP/gVSS)
MK/AO	1214	986	14.4	15.5
K/AO	1102	862	9.8	15.6
SU/AO	1730	1422	17.2	19.0
NG/AO	1160	938	8.9	10.0
NG/A2O	940	782	9.5	9.4
T/PAO	2437	1757	9.6	4.8

4.5 高濃度 DAPI と FISH の二重染色法による結果

実処理場汚泥 6 試料と実験室汚泥 3 試料に存在するポリリン酸蓄積細菌のうち各グループレベルプローブで蛍光を発する細菌を定量したところ、表 4.6 のようになった。基本的には高濃度 DAPI 染色で蛍光を発する細菌を 1000 個数えて、そのうちで各プローブによって蛍光を発する細菌の数を数えて、それぞれの割合を求めた。各視野のばらつきを 95%値変動係数として示した。また、図 4.3 にそれらを積み上げ型の棒グラフによって試料ごとの定量値の比較を行った。

表 4.6 ポリリン酸蓄積細菌のうち各プローブに陽性な細菌の割合

試料名	グループレベルプローブ				
	ALF1b	BET42a	GAM42a	HGC69a	CF319a
MK/AO	0	21.5 ± 8.8	<0.1	65.1 ± 7.7	0
K/AO	0	47.7 ± 12.6	0	31.5 ± 7.4	0
SU/AO	0	57.7 ± 7.2	<0.1	25.5 ± 4.9	not data
NG/AO	0	33.0 ± 6.3	0	40.6 ± 4.8	0
NG/A2O	0	29.6 ± 7.1	2.7 ± 0.5	39.2 ± 9.1	0
T/PAO	0	39.6 ± 7.9	9.8 ± 2.3	28.0 ± 6.6	0
Run14	0	84.2 ± 6.0	<0.1	10.1 ± 2.9	0
Run5	0	<0.1	0	84.4 ± 6.0	0
Run13	0	2.3 ± 0.8	0	6.9 ± 2.1	0

試料名	グループレベルプローブ			PAOプローブ	
	GNSB 941	LGC354	TM7905	PAOmix	Actino1011
MK/AO	0	0	0	21.4 ± 8.8	56.8 ± 8.5
K/AO	0	0	0	47.7 ± 13.7	20.0 ± 5.0
SU/AO	not data	not data	not data	56.7 ± 7.3	15.8 ± 3.3
NG/AO	0	0	0	27.6 ± 6.8	27.9 ± 4.7
NG/A2O	0	0	0	21.6 ± 4.8	23.7 ± 3.5
T/PAO	0	0	0	32.6 ± 9.3	18.7 ± 5.6
Run14	0	0	0	80.4 ± 4.6	3.0 ± 1.2
Run5	many	0	0	<0.1	82.1 ± 5.4
Run13	0	0	0	2.2 ± 0.7	not data

many : 糸状性細菌のため定量はしていない

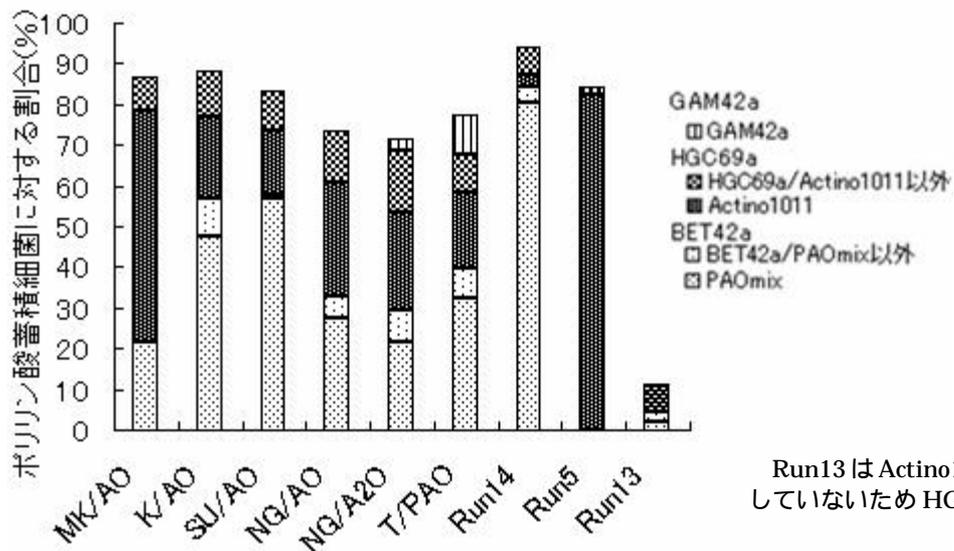


図 4.3 ポリリン酸蓄積細菌の定量値の比較

実処理場汚泥

実処理場汚泥 6 試料に存在するポリリン酸を蓄積している細菌のうち各グループレベルのプロープで蛍光を発した細菌は、Proteobacteria (Bet42a)、Actinobacteria(HGC69a)、Proteobacteria (GAM42a)に属する細菌のみであった。一方、Proteobacteria (ALF1b)、Cytophaga-flavobacterium- bacteroides(CF319a)、Green non-sulfur bacteria (GNSB_941)、Firmucutes(LGC354)、TM7(TM7905)に属する細菌のポリリン酸蓄積は確認することができなかった。そのため、実処理場でポリリン酸を蓄積する種構成はグループレベルで見ると似通っていた。

ポリリン酸を蓄積する細菌のうちで、Proteobacteria に属する細菌は 22% ~ 58% で、そのうちの 7 割以上は Accumulibacter であった。Actinobacteria は、MK 処理場 AO のみ 65% と高かったが、それ以外の試料では全体の 26% ~ 41% 程度であった。Actino1011 陽性細菌は 16% ~ 57% 存在し、それ以外の Actinobacteria も全ての試料で同じような形態の種が観察され、8% ~ 15% 存在していた。また、Proteobacteria に属する球菌では G バクテリアに類似した形状を持つポリリン酸蓄積細菌が存在していた。この 3 グループによって実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の 71% ~ 88% を捉えることができた。

処理場ごとの比較では、K 処理場 AO、SU 処理場 AO では Proteobacteria に属するポリリン酸蓄積細菌が 5 割程度を占めているのに対して、MK 処理場 AO では Actinobacteria が 5 割程度を占めた。また、Proteobacteria はいくつかの試料で見られたが、定量可能なレベルで存在したのは NG 処理場 A2O と T 処理場 PAO のみであった。特に T 処理場 PAO では 10% 近くを占めていた。実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌は、グループレベルで見たとき、Proteobacteria 、 Proteobacteria 、 Actinobacteria に属する細菌のみで、グループレベルでのその種構成は似通っていたが、その存在割合は処理場ごとにばらつきがあることが分かった。

実験室汚泥

実験室汚泥として用いたのは 3 種類で、主な炭素源はそれぞれ酢酸(Run14)、ペプトン/酵母エキス(Run5)、グルタミン酸/アスパラギン酸(Run13)である。図 4.3 に示したようにそれぞれが非常に特徴的な群集構造していた。酢酸で馴致した Run14 では Accumulibacter が優占化しており、ペプトン/酵母エキスで馴致した Run5 では Actino1011 陽性細菌が優占していた。また、グルタミン酸/アスパラギン酸で馴致した Run13 では捕捉できたのはわずか 9.2% で、通常の細胞壁処理では蛍光を発しない球菌が優占化していた。それぞれの系で、それぞれの細菌の基質利用特性によって優占化したと考えられる。数多くの研究が行われている酢酸を主要な炭素源として馴致した汚泥にも、Accumulibacter や Actino1011 陽性細菌ではない新規と思われる種が観察された。また、Run5 では他の汚泥では見られなかった Green-non-sulfur bacteria に属する糸状性細菌のポリリン酸蓄積が多く存在していた。

4.6 各グループについての考察

4.6.1 ポリリン酸蓄積細菌が存在したグループ

ポリリン酸蓄積細菌が存在したグループは Proteobacteria、Actinobacteria、Proteobacteria、Green-non-sulfur-bacteria のみであった。以下にそれぞれの考察を行う。

Proteobacteria

実処理場試料において、Proteobacteria に属するポリリン酸蓄積細菌は 22% ~ 58% を占め、主要なポリリン酸蓄積細菌を含有するグループであった。その中でも Accumulibacter の寄与は大きく、SU 処理場 AO でポリリン酸蓄積細菌のうち 57%、K 処理場 AO では 48% を占めていた(図 4.4)。Proteobacteria の中で、Accumulibacter 以外でもポリリン酸を蓄積する球菌や long-rod な形態を持つ細菌の存在も確認されている(図 4.5、図 4.6)。また、Accumulibacter によって説明がつくと考えられている酢酸を主要な炭素源として馴致した試料中にも Accumulibacter 以外のポリリン酸を蓄積する小さい球菌が存在した(図 4.7)。

Actinobacteria

実処理場試料において、Actinobacteria は 26% ~ 65% 存在しており、主要なポリリン酸蓄積細菌のグループの 1 つであった。Actino1011 陽性細菌は、MK 処理場 AO はポリリン酸蓄積細菌のうち、57% と非常に高い寄与であったが、これを除けば 16% ~ 28% 程度存在していた。Actino1011 陽性細菌は様々な形態の種で構成されており、球菌や long-rod な形態を持つ細菌、糸状性細菌が捉えられていた(図 4.8)。また、Actino1011 陽性細菌以外の Actinobacteria も全ての試料に 10% 程度存在していた。特に図 4.9 に示すような Actino1011 陽性細菌と同様の long-rod 又は糸状性細菌の切れ端のような形態をした細菌が非常に多かった。その他にも、Actino1011 陽性細菌と形態の類似したポリリン酸を蓄積する球菌や桿菌の存在が確認された(図 4.10)。

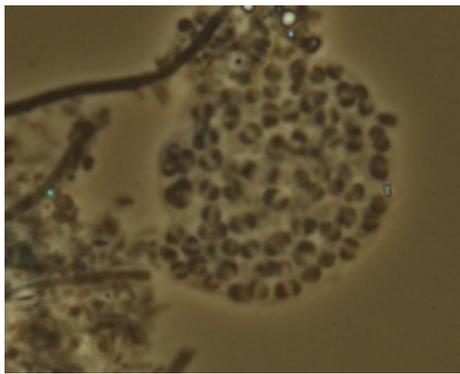
Proteobacteria

ほとんどの実処理場試料中で確認はされたものの、定量できる程度に存在したのは NG 処理場 A2O と T 処理場 PAO のみであった。Liu *et al.*(2001)は GAM1278/GAM1019 プロープに陽性な細菌がポリリン酸を蓄積していたと報告している。GAM1019 は GAM42a では捉えられないグループを含むため、GAM1278 によって GAM42a で捉えられたポリリン酸蓄積の探索を行ったが、ポリリン酸蓄積を確認することはできなかった。同一の細菌であっても、異なる環境下では異なる代謝を行っている可能性がある(Liu *et al.*(2000)、Liu *et al.*(2001))。また、GB プロープについては、SU 処理場 AO 試料に適用したところ、ポリ

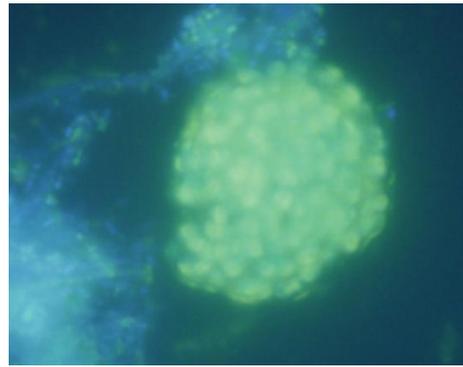
リン酸蓄積を確認できたものも存在した(図 4.11)。しかし、捉えた GB プローブ陽性細菌 76 セルのうち、ポリリン酸を蓄積していたのは 1 セルのみと、GB のうちの 2% に満たなかった。しかし、ポリリン酸蓄積機能を持った細菌が GB プローブに含まれることは確認された。また、T 処理場 PAO にはポリリン酸蓄積細菌のうちの 10% 近くを占めていたが、GB プローブとは関係のない G バクテリアに形態の似た細菌が特に存在していた(図 4.12)。

Green-non-sulfur-bacteria

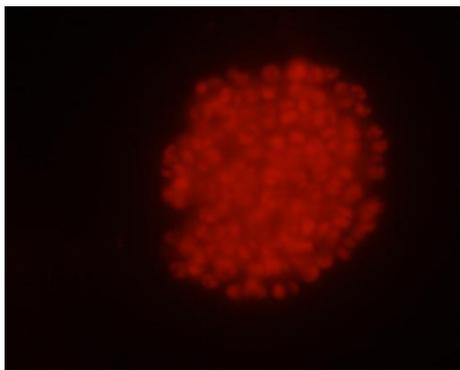
Green-non-sulfur-bacteria は実処理場にも多く存在する糸状性細菌であるが、実処理場に存在する Green-non-sulfur-bacteria はポリリン酸を蓄積していなかった。しかし、Run5(ペプトン・酵母エキス系)ではポリリン酸を蓄積していることが確認された(図 4.13)。糸状性細菌であるため、カウント法では定量は行っていないが、占める面積としては大きく、寄与は大きいことが考えられた。Run5 に生息していた Green-non-sulfur-bacteria と実処理場に存在するものが異なる種であるのか、又は同じ種だが Run5 という人工下水という特別な環境下に置かれたためにリンを蓄積することになったのか、は系統的に解析する必要があり、本研究では明らかにできていない。福島(2002)の研究である Run5 の DGGE の結果から見るかぎり、このポリリン酸を蓄積している糸状性細菌は Eikelboom Type 1851 Ben52 の可能性が高い。



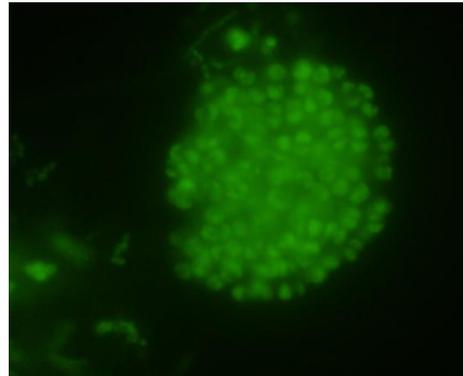
位相差図



高濃度 DAPI

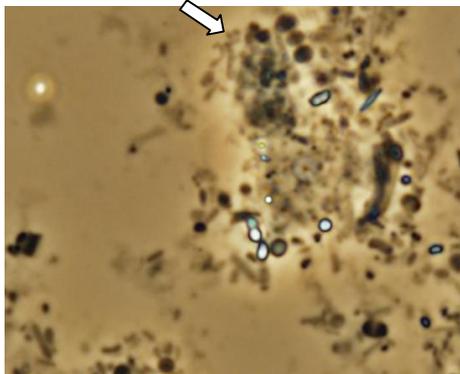


PAOmix(cy3)

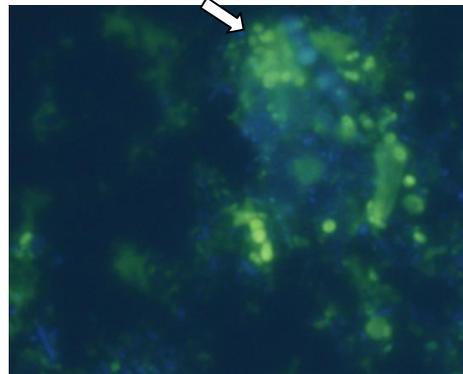


BET42a(FITC)

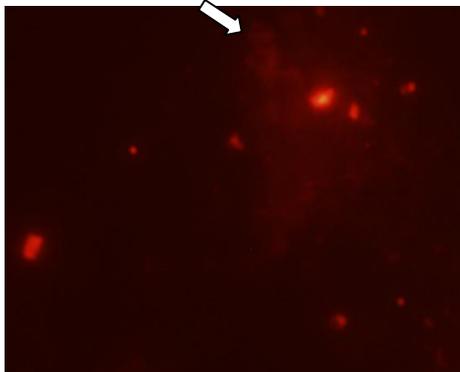
図 4.4 Accumulibacter のポリリン酸蓄積 (K 処理場 AO)



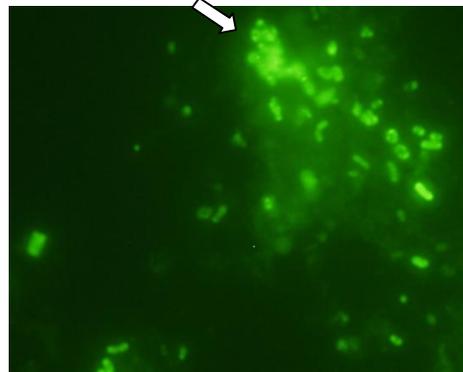
位相差図



高濃度 DAPI

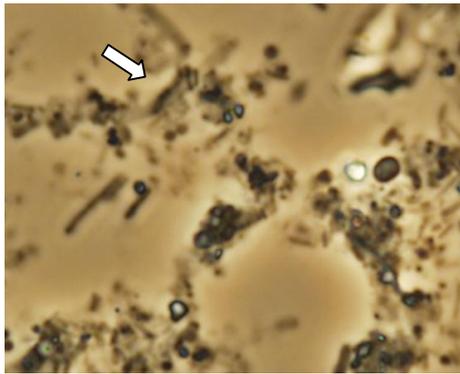


PAOmix(cy3)

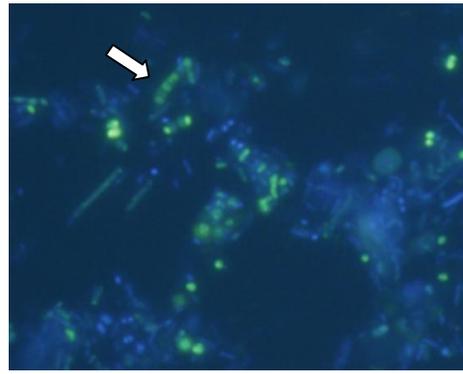


BET42a(FITC)

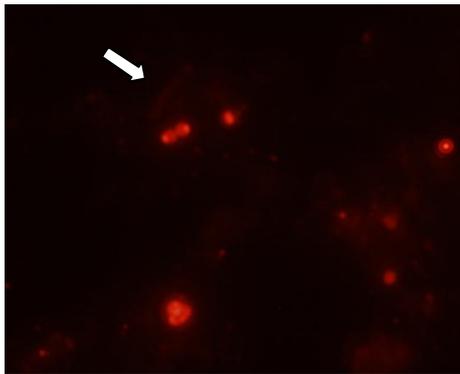
図 4.5 Accumulibacter 以外の Proteobacteria に属する球菌 (NG 処理場 AO)



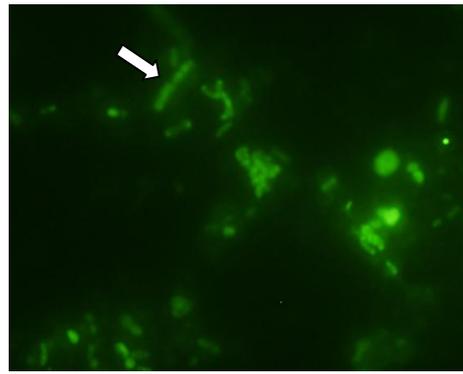
位相差図



高濃度 DAPI

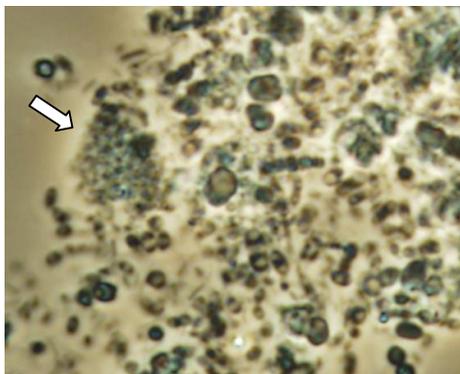


PAOmix(cy3)

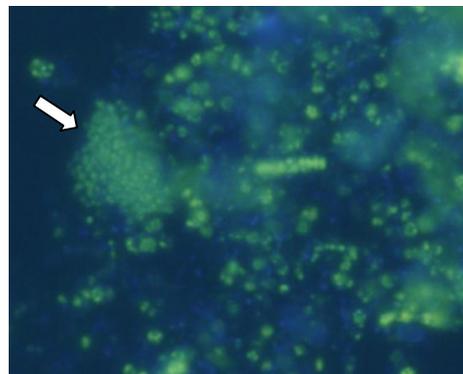


BET42a(FITC)

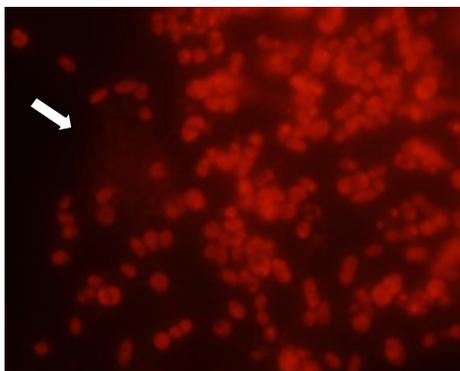
図 4.6 Accumulibacter 以外の Proteobacteria に属する long-rod な細菌(NG 処理場 AO)



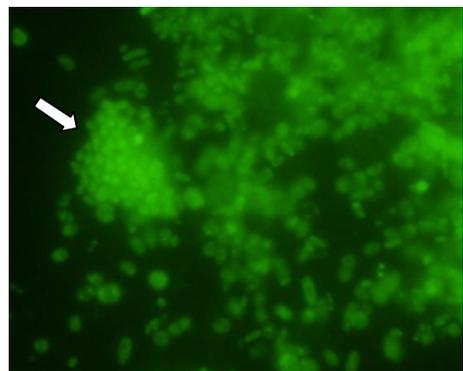
位相差図



高濃度 DAPI

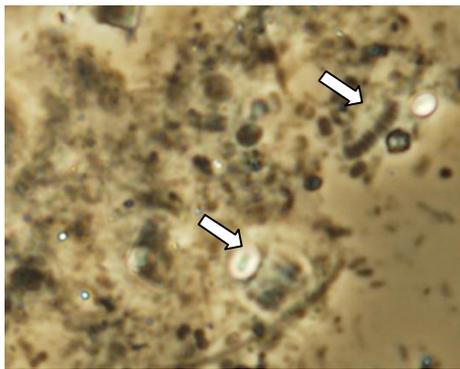


PAOmix(cy3)

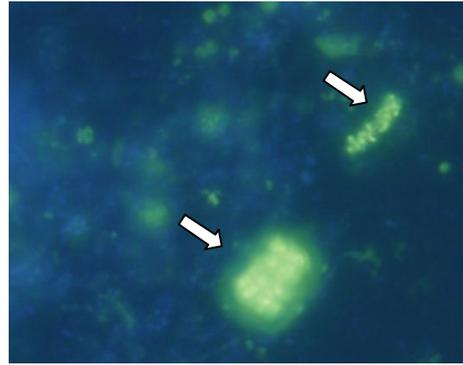


BET42a(FITC)

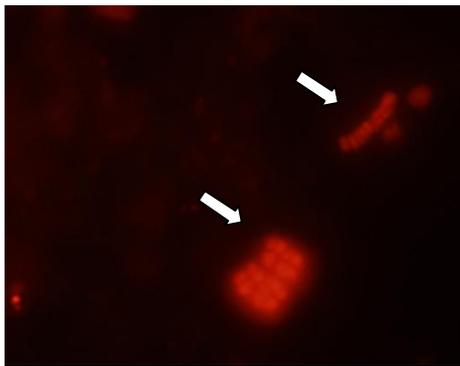
図 4.7 Accumulibacter 以外の Proteobacteria に属する球菌 (Run14)



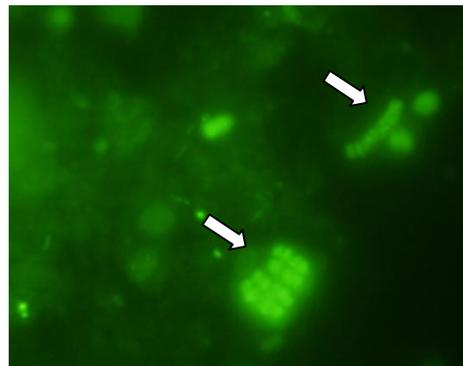
位相差図



高濃度 DAPI

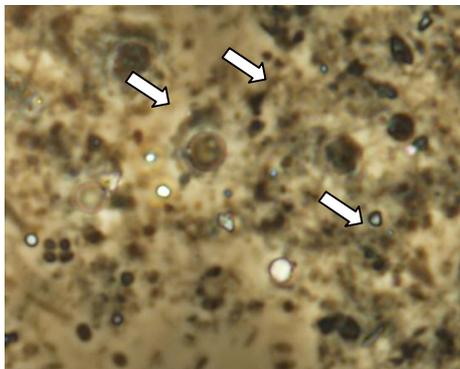


Actino1011(cy3)

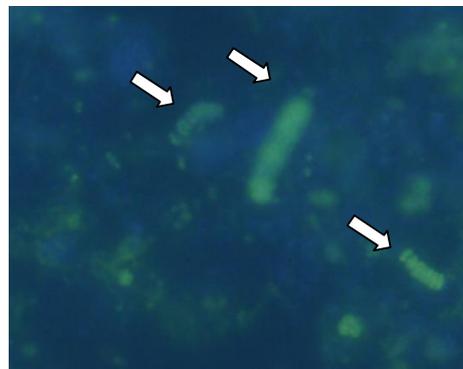


HGC69a(FITC)

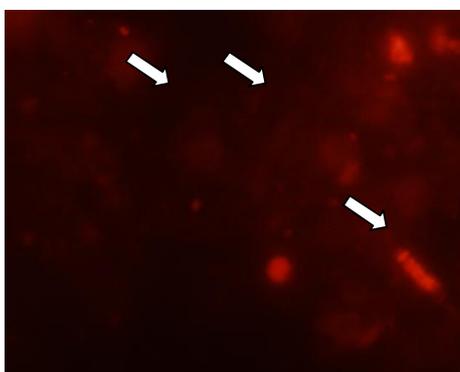
図 4.8 Actino1011 陽性細菌のポリリン酸蓄積 (SU 処理場 AO)



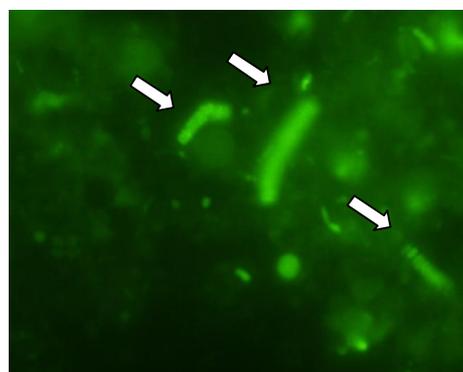
位相差図



高濃度 DAPI

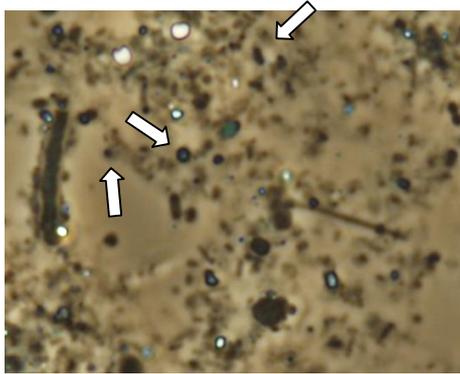


Actino1011(cy3)

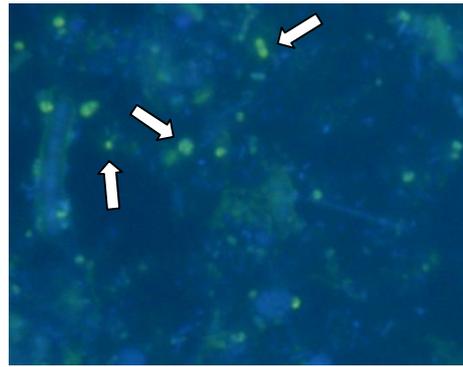


HGC69a(FITC)

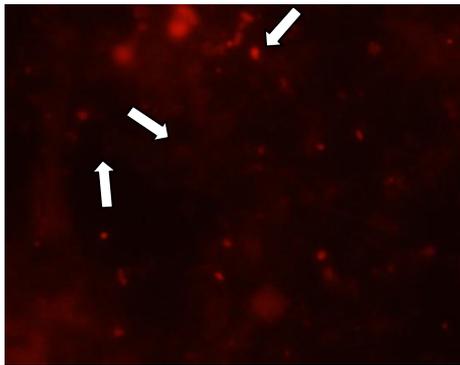
図 4.9 Actino1011 以外の Actinobacteria に属する long-rod な細菌 (SU 処理場 AO)



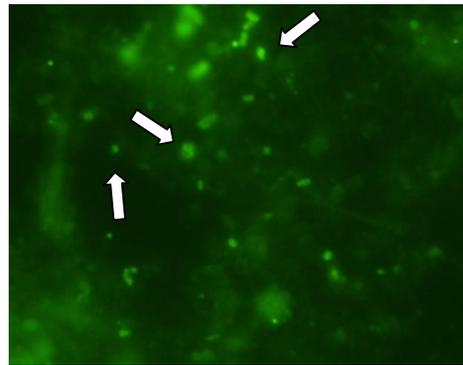
位相差図



高濃度 DAPI

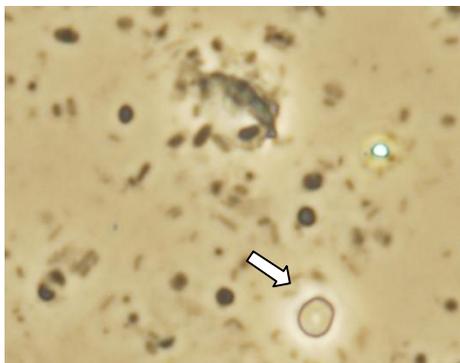


Actino1011(cy3)

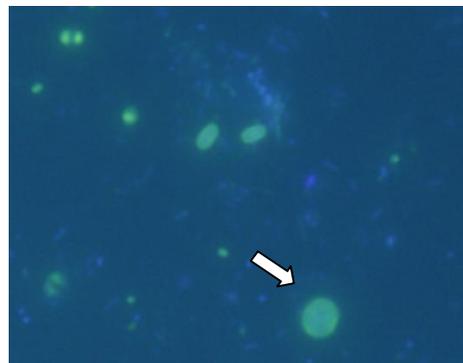


HGC69a(FITC)

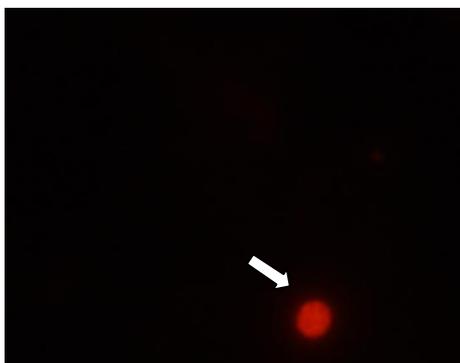
図 4.10 Actinobacteria に属するポリリン酸蓄積細菌(NG 処理場 AO)



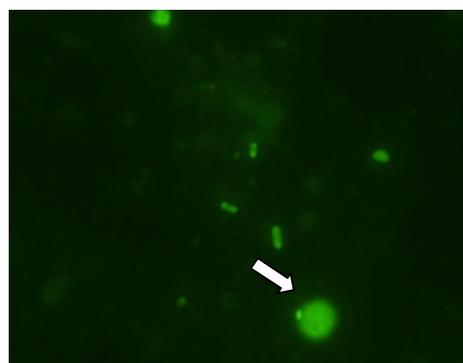
位相差図



高濃度 DAPI

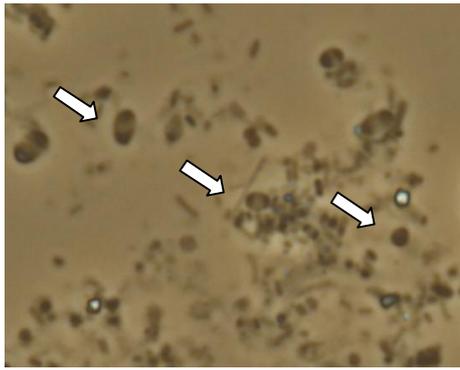


GB(cy3)

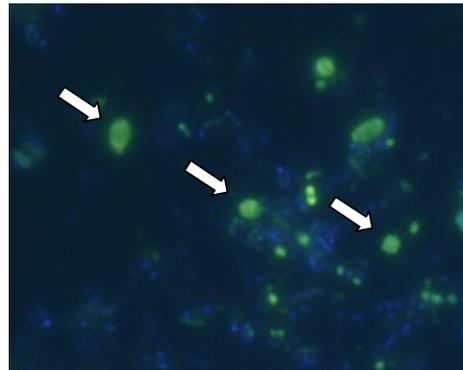


GAM42a(FITC)

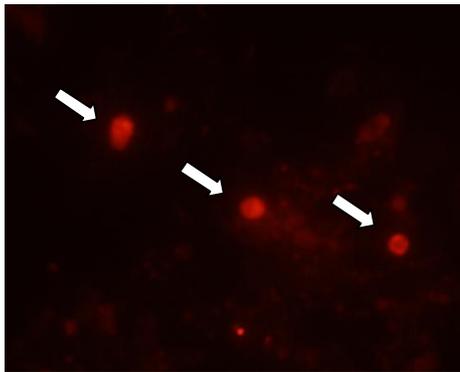
図 4.11 GB プローブ陽性細菌のポリリン酸蓄積(SU 処理場 AO)



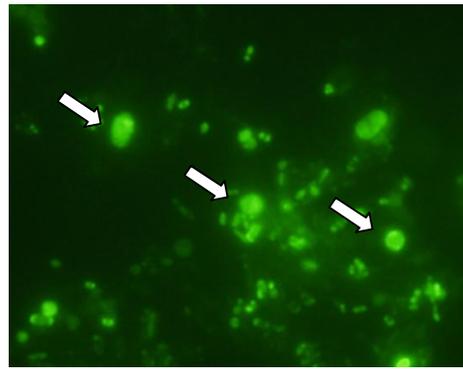
位相差図



高濃度 DAPI

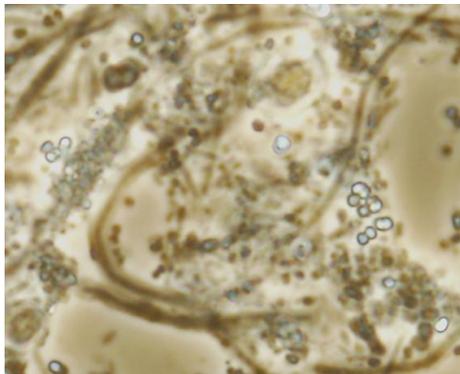


GAM42a(cy3)

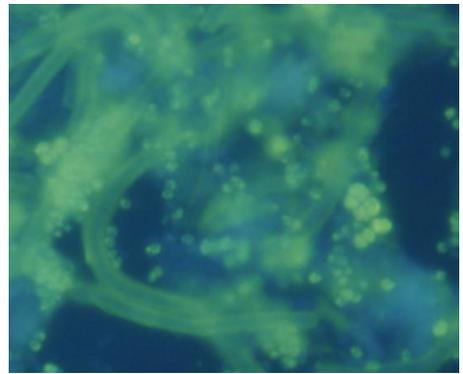


EUBmix(FITC)

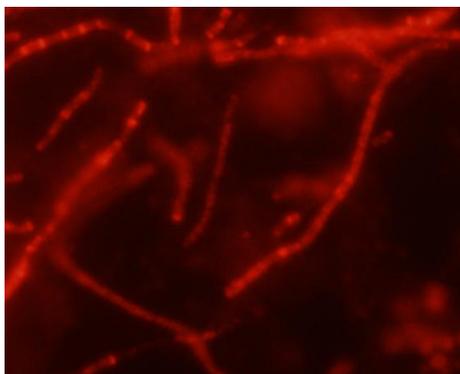
図 4.12 Proteobacteria に属するポリリン酸蓄積細菌 (T 処理場 PAO)



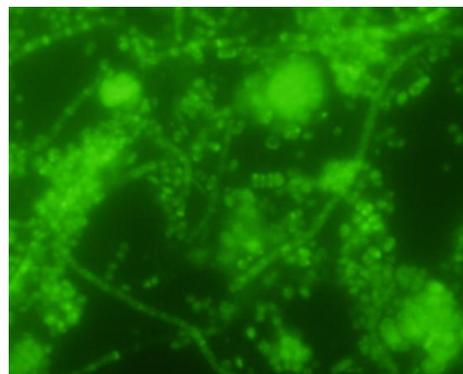
位相差図



高濃度 DAPI



GNSB_941(cy3)



EUBmix(FITC)

図 4.13 Green-non-sulfur-bacteria に属する細菌のポリリン酸蓄積 (Run5)

4.6.2 ポリリン酸蓄積細菌が存在しなかったグループ

Proteobacteria、Cytophaga-flavobacteria-bacteroides、Firmucutes、TM7 に属する細菌のポリリン酸蓄積は確認することができなかった。

実処理場 6 試料を解析した結果、Proteobacteria はいずれの処理場にも多く存在していたが、Proteobacteria に属する細菌群はポリリン酸を蓄積していなかった。Kawaharazaki *et al.*(1998)では、酢酸及びペプトンを主要な炭素源として馴致した嫌気好気汚泥で、Proteobacteria (ALF1b)と Actinobacteria (HGC69a) に属する細菌がポリリン酸を蓄積していたと報告している。しかし、本研究で同時に行った酢酸又はペプトンを主要な炭素源とする 2 試料からも Proteobacteria に属するポリリン酸蓄積細菌の存在は確認されていない。

CFB に属する細菌も活性汚泥中にある程度存在していたが、確認することはできなかった。CFB を捉えるプローブとして Mantz *et al.*(1996)が設計した CF319a プローブを用いたがこれは CFB グループ全体を包括できるプローブではないためとも考えられる(Weller *et al.*(2000))。CFB グループはクローニングを用いた群集解析ではよく検出されている(Dabert *et al.*(2001))。

Firmucutes、TM7 については、このグループに属する細菌は今回解析した活性汚泥中にあまり存在していなかった。

4.7 第 4 章のまとめ

実処理場汚泥 6 試料に存在するポリリン酸蓄積細菌のうち各グループレベルのプローブで蛍光を発した細菌は、グループレベルで見るとき、Proteobacteria、Proteobacteria、Actinobacteria に属する細菌のみで、その種構成はグループレベルで見ると似通っていた。この 3 グループによって実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の 71% ~ 88% を捉えることができた。しかし、グループレベルで見ても、ポリリン酸を蓄積する細菌の種の存在割合は処理場ごとにばらつきがあることが分かった。

ポリリン酸蓄積細菌のうち、Accumulibacter は 21% ~ 57%、Actino1011 陽性細菌は 16% ~ 57% を占めており、これら 2 種ともに実処理場において主要なポリリン酸蓄積細菌であった。Accumulibacter と Actino1011 陽性細菌の合計値はポリリン酸蓄積細菌のうちの 45% ~ 78% を占めていた。Proteobacteria 及び Actinobacteria に属する細菌では、この 2 種以外にも球菌、long-rod な形態を持つ細菌などが捉えられた。また、Proteobacteria に属する球菌では G バクテリアに類似した形状を持つポリリン酸蓄積細菌が存在していた。また、グリコーゲン蓄積細菌候補と考えられている GB プローブ陽性細菌の一部がポリリン酸を蓄積していることも確認できた。ただ、Proteobacteria の中では、この種以外の寄

与が大きいことが観察から分かった。

酢酸で馴致した汚泥では *Accumulibacter* が優占化しており、ペプトン/酵母エキスで馴致した汚泥では *Actino1011* 陽性細菌が優占していた。また、グルタミン酸/アスパラギン酸で馴致した汚泥では通常の細胞壁処理では蛍光を発しない球菌が非常に優占していた。それぞれ基質ごとに異なる群集構造が作られていた。また、Run5 では他の汚泥では見られなかった Green-non-sulfur bacteria に属する糸状性細菌のポリリン酸蓄積が存在していた。

また、ポリリン酸蓄積細菌は図 4.4~図 4.13 に示したように実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌はグループレベルで見ても多様性があり、また形態的にも非常に多様である。これらの中にはまだ系統学的に同定されていないポリリン酸蓄積細菌もあり、新規のポリリン酸蓄積細菌がまだ実処理場には存在しているということが証明された。ポリリン酸蓄積細菌の系統学的大まかな位置と形態、どの程度存在するのかという知見を得られたのは非常に大きい成果であった。これらはポリリン酸蓄積細菌の系統学的な同定を行うための手がかりとなりうる情報でもある。*Accumulibacter* と *Actino1011* 陽性細菌などの既知のポリリン酸蓄積細菌と新規のポリリン酸蓄積細菌を合わせて、それらがどのような働きをして実処理場に存在しているのかを解明することによって、実処理場で起こっている生物学的リン除去のメカニズムの解明に貢献できると考えられる。

第 5 章 クローニング法及び FISH 法による

新規のポリリン酸蓄積細菌の同定

5.1 第 5 章の概要

第 2 章に記述した通り、ポリリン酸蓄積細菌の同定を目的とした研究は、培養法や分子生物学的手法を用いて盛んに行われている。本研究第 4 章より、Proteobacteria と Proteobacteria、Actinobacteria、Green-non-sulfur bacteria に属する細菌及び通常の細胞壁処理では蛍光を発しない細菌がポリリン酸を蓄積していることが分かった。このうち、本章では Proteobacteria と通常の細胞壁処理では蛍光を発しない細菌の系統学的な同定を試みた。生物学的リン除去プロセスの中で、Proteobacteria に属する細菌は非常に興味深い対象であると考えられる。G バクテリアとして GB プロープによって同定されている種は GAO であるという報告(Kong *et al.*(2002)、Crocetti *et al.*(2002)、Nielsen *et al.*(1999))がある一方で、Liu *et al.*(2001)は Proteobacteria に属する球菌(GAM1019 プロープ)が嫌気中で PHA を蓄積し、好気でポリリン酸を蓄積していたことを報告している。また、GB プロープが捉える細菌群は実処理場で 10~31%存在しており、非常に多く存在している(Wong *et al.*(2005))。そのため、これらの細菌がどういう働きをしているのかを明らかにすることは非常に意義が大きい。第 4 章から津田沼 PAO 試料にはポリリン酸を蓄積する細菌のうち約 10%程度を Proteobacteria に属する細菌が占めていたので、解析には津田沼 PAO 試料を用いた。

次に、パラホルムアルデヒド固定やエタノール固定では FISH によって蛍光を得られなかった細菌についても系統学的な同定を試みた。第 4 章でポリリン酸蓄積細菌に対するグループレベルプロープで蛍光を発する細菌を同定している際に、真正細菌全体を捉えるプロープ(EUBmix)でも蛍光を発しない細菌が Run13(グルタミン酸/アスパラギン酸を主要な炭素源とした人工下水で馴致した汚泥)で見られた。主要なポリリン酸蓄積細菌と認められている Accumulibacter も Actino1011 陽性細菌も人工下水リアクターから同定された種である(Hesselmann *et al.*(1999)、Liu *et al.*(2001))。そのため、この細菌も主要なポリリン酸蓄積細菌の 1 種である可能性がある。また、実処理場においてグループレベルプロープで捉えられなかった細菌の中に含まれる可能性もある。Run13 ではこの細菌が優占化しており、各グループレベルプロープで捉えられたポリリン酸蓄積細菌の合計は約 9%と非常に少なかった。Run13 と同じようなプロープの蛍光を発しにくい細菌群がポリリン酸を蓄積している例を福島(2002)が Run6(グルタミン酸系)で報告しており、この Run6 についても同時に解析を行った。

5.2 実験方法

実験は以下の図 5.1 の手順で行った。ポリリン酸蓄積細菌のグループが特定できれば、そのグループに特異的なプライマーを用いて群集解析を行うことができる。そのため、FISH 法により蛍光を得られていない細菌はまずは FISH 法でグループレベルを特定することを目指した。その後、グループ特異的なプライマーによって PCR を行い、その増幅産物を用いてクローニングを行った。グループ特異的に行っているため、系の中に種類が少なく同じ種が検出される可能性があるため、まずは DGGE 又は RFLP によってクローンのスクリーニングをかけた。DGGE のスクリーニングはクローンに 357fGC-518r(V3) 又は 968fGC-1392r(V6-V8) で PCR を行い、増幅産物を泳動してバンドの高さから種数を決定する。そして、異なる種のみを選び出して塩基配列を解読し、系統解析ソフト ARB を用いてプローブの作成を行った。設計したプローブを活性汚泥試料に適用して、最初にグループレベルプローブで行った際に捉えられたポリリン酸蓄積細菌と同じ細菌が捉えられているかを FISH 法によって確かめた。そして高濃度 DAPI 染色と FISH の二重染色法によってプローブで捉えられたポリリン酸蓄積細菌がポリリン酸を蓄積しているかを確認した。

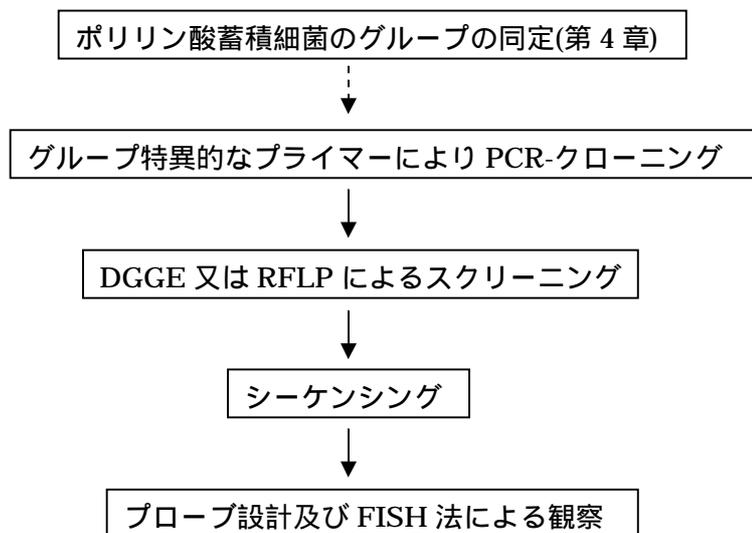


図 5.1 実験の手順

5.3 Proteobacteria に属するポリリン酸蓄積細菌

5.3.1 プライマーの選定

Proteobacteria に属する細菌がポリリン酸を蓄積していることは第 4 章の研究で明らかになった。第 4 章で用いた GAM42a プローブの配列をリバースプライマーとして用い、フォワードプライマーとして 27f を用いて PCR を行い、Proteobacteria に特異的な配列を得ることを目的とした。このプローブ配列をプライマーとして用いる方法は、Beer *et al.*(2004) が ALF1b プローブをフォワードプライマーとして、Kong *et al.*(2005) が Actino1011 プローブをリバースプライマーとして用いるなど一般的によく行われている。しかし、図 5.2 のように GAM42a は 23srRNA を標的としているため、ITS 領域を超えた PCR で約 3000bp という長い産物を増幅する必要がある。そこでまずは PCR 条件の検討を行った。検討事項は以下の 2 つである。約 3000bp の増幅産物が得られるのかということ、と Proteobacteria に特異的なプライマーとなっているかということである。特に については、Proteobacteria に特異的な配列である Bet42a は GAM42a とは 1 塩基のみの違いしかないため Proteobacteria を捉えてしまうのは容認せざるを得ないと考えられる。

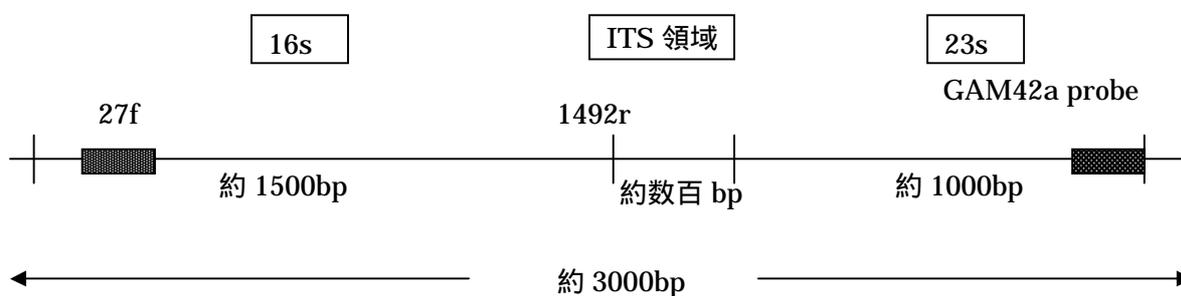


図 5.2 27f-GAM42a プライマーによる PCR (概念図)

検討 約 3000bp の増幅産物が得られるのか

GAM42a に陽性な純菌である *E. coli* に対して、27f-GAM42a プライマーを用いて PCR 増幅後、アガロースゲル電気泳動を行った(図 5.3)。左端のレーンは DNA ラダーで Hind である。アガロースゲル電気泳動の結果、約 3000bp の増幅産物が得られていることを確認できた。また、レーンの 1~7 は PCR を行う際のアニーリング温度を 1;52.4、2;55.3、3;56.7、4;58.1、5;59.1、6;60.9、7;62 としてサーマルサイクラー T-Gradient を用いて PCR を行った結果である。結果として、59.1 で増幅産物を示すバンドが薄くなり、60.9 以上では増幅が確認できない程度になっていた。これによりアニーリング温度は

60 以下が望ましいことが分かった。

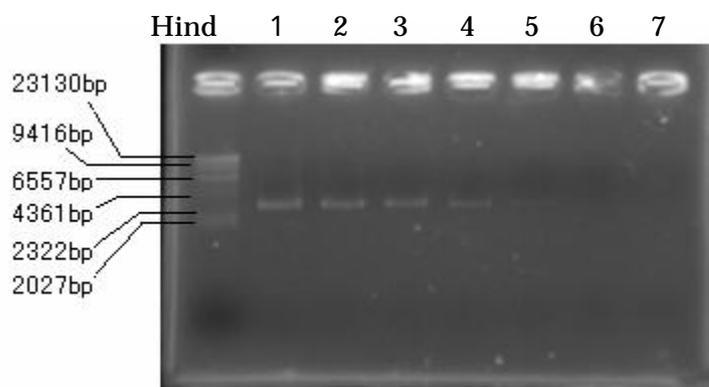


図 5.3 27f-GAM42a プライマーで PCR を行った結果

検討 Proteobacteria に特異的なプライマーとなっているか

Proteobacteria に属する純菌 3 種と 1 塩基違いの Proteobacteria に属する純菌 3 種を用いて検討を行った。用いた純菌は表 5.1 の通りである。それぞれ純菌を別々に 27f-GAM42a プライマーを用いてアニーリング温度を振って PCR を行ったところ、Proteobacteria に属する細菌と Proteobacteria に属する細菌で違いは見られなかった。これは、Proteobacteria の塩基配列を増幅させるとき、プライマーと完全に一致する細菌が存在しない条件では、1 塩基違いの塩基配列でもアニーリングが起こりやすかったと考えられる。

そこで、6 種を混合した状態で PCR を行い、Proteobacteria が特異的に増幅されるかを以下の手順で検討した。表 5.1 の純菌 6 種を混合して DNA 抽出を行い、27f-GAM42a プライマーを用いて GAM42a に特異的になるように PCR を行った。その PCR 産物を 50 倍希釈したものを鋳型として、357fGC-518r プライマーでアニーリング温度 56 ・ 58 ・ 60 の 3 条件で PCR をかけ、DGGE 法を行いバンドパターンから Proteobacteria が特異的に増幅されているかを確認した。マーカーは 6 種を混合したものを 357fGC-518r で PCR を行ったものである。電気泳動の結果、図 5.4 のようになった。

全てのアニーリング温度で、Proteobacteria に属する *E.coli*、*Pseudomona aeruginosa* のバンドが濃く現れ、Proteobacteria の *Comamonas testosteroni* 及び *Rhodocyclus tenuis* はバンドが見えなくなっていたので、27f-GAM42a が Proteobacteria を特異的に増幅していることが確認できた。*Sphaerotilus natans* は DNA 抽出されずマーカーに現れなかった。糸状性細菌のため塊となってしまうピペットで集菌できなかつたと考えられる。*Stenotrophomonas multophila* は Proteobacteria であるが GAM42a には陽性でない可能

性がある。この結果から、27f-GAM42a プライマーのアニーリング温度は 58 とし、PCR 条件を表 5.2 のようにした。

表 5.1 PCR 条件の検討に用いた純菌

Proteobacteria	
	<i>Escherichia coli</i> (IAM12119)
	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (IAM1514)
	<i>Stenotrophomonas multophila</i> (IAM12423)
Proteobacteria	
	<i>Comamonas testosteroni</i> (IAM12419)
	<i>Sphaerotilus natans</i> (ATCC13338)
	<i>Rhodocyclus tenuis</i> (DSM109)

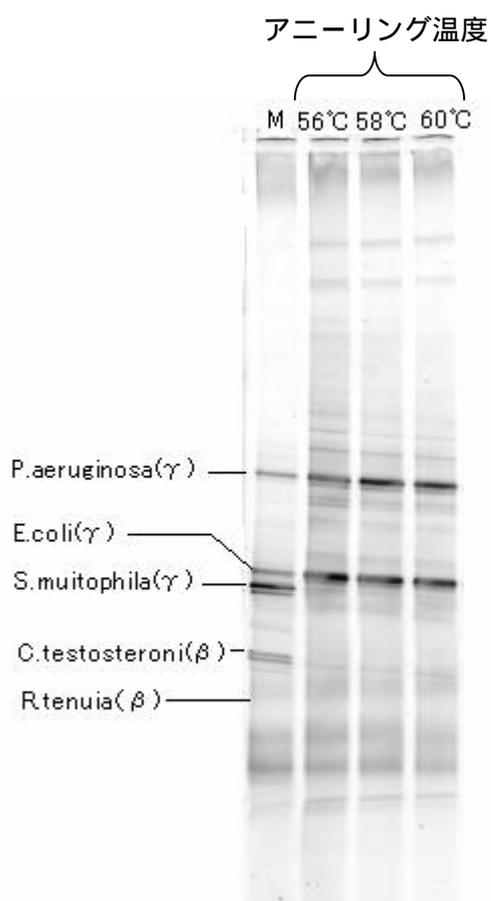


表 5.2 27f-GAM42a プライマーの PCR 条件

Step		
Heat Shock	94	10分
Denaturation	94	30秒
Annealing	58	30秒
Extention	72	3分30秒
Final extention	72	10分

Denaturation-Extension を 30 サイクル行う

図 5.4 27f -GAM42a プライマーの PCR 条件

5.3.2 クローニングの結果

27f-GAM42a プライマーによって増幅した PCR 産物を用いてクローニング法を行い、48 クローンをピックアップし、ダイレクトコロニー-PCR を行った。シーケンスを読む前に、357fGC-518r プライマーを用いた DGGE によってスクリーニングを行った(Liu *et al.* (2002))(図 5.5)。DGGE の 1 つのレーンには 1~3 クローン泳動した。コロニーダイレクト PCR のためコンピテントセルの大腸菌も V3 の PCR で増幅されているので、1 クローン泳動すればバンドは 2 本のはずであるが、多くのバンドが見られている。ただ、最も濃く現れたバンドは判断することができたので、そこからクローンのスクリーニングを行うことは可能であった。

DGGE によるスクリーニングの結果、13 クローンに絞りこまれた。この 13 クローンについて 27f プライマーによって 500bp 程度の片側だけの塩基配列を読んだ。しかし、13 クローンのうち解読できなかったものや Proteobacteria を捉えてしまったものが含まれていたため結果として、8 種の Proteobacteria に属するクローンの配列が得られた(表 5.3)。GAM3 と GAM4 は *Thiotrichaceae* に属する細菌で、GAM5、GAM7、GAM8 は *Xanthomonadaceae* に属する細菌 GAM1 と GAM13 は *Thioalkalivibrio* に属する細菌であった。GAM3 の近縁種である *Achromatium* sp.HK15 には Grey *et al.*(1999)により特異的なプローブが設計されており G バクテリアの形状をしていたので、第 4 章で捉えられた球菌の可能性が高い。しかし、相同性は 92%と低く、Grey *et al.*の設計したプローブは GAM3 に特異的でないため、新しくプローブを設計する必要があった。そこで、GAM3 の 16s 全長配列を読み、特異的なプローブを設計した。GAM3 と同じ属の *Thiotrichaceae* である GAM4 と、補章(第 8 章)のクローニング結果からも検出された *Xanthomonadales* の GAM5 についても全長配列を読み、プローブを設計した。

表 5.3 クローニングから得られた塩基配列の近縁種

Clone	Closest sequence	Affiliation	Similarity
GAM1	<i>Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans</i>	Gammaproteobacteria;hromatiales;Ectothiorhodospiraceae;Thioalkalivibrio.	93%
GAM3	<i>Achromatium</i> sp. HK15	Gammaproteobacteria;Thiotrichales;Thiotrichaceae;	92%
GAM4	<i>Beggiatoa</i> sp. 402	Gammaproteobacteria;Thiotrichales;Thiotrichaceae;	92%
GAM5	<i>Aquimonas voraii</i>	Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;	93%
GAM7	<i>Dokdonella koreensis</i>	Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae; Dokdonella.	89%
GAM8	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i>	Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae;	89%
GAM12	<i>Lysobacter brunescens</i>	Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae; Lysobacter.	91%
GAM13	<i>Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans</i>	Gammaproteobacteria;hromatiales;Ectothiorhodospiraceae;	92%

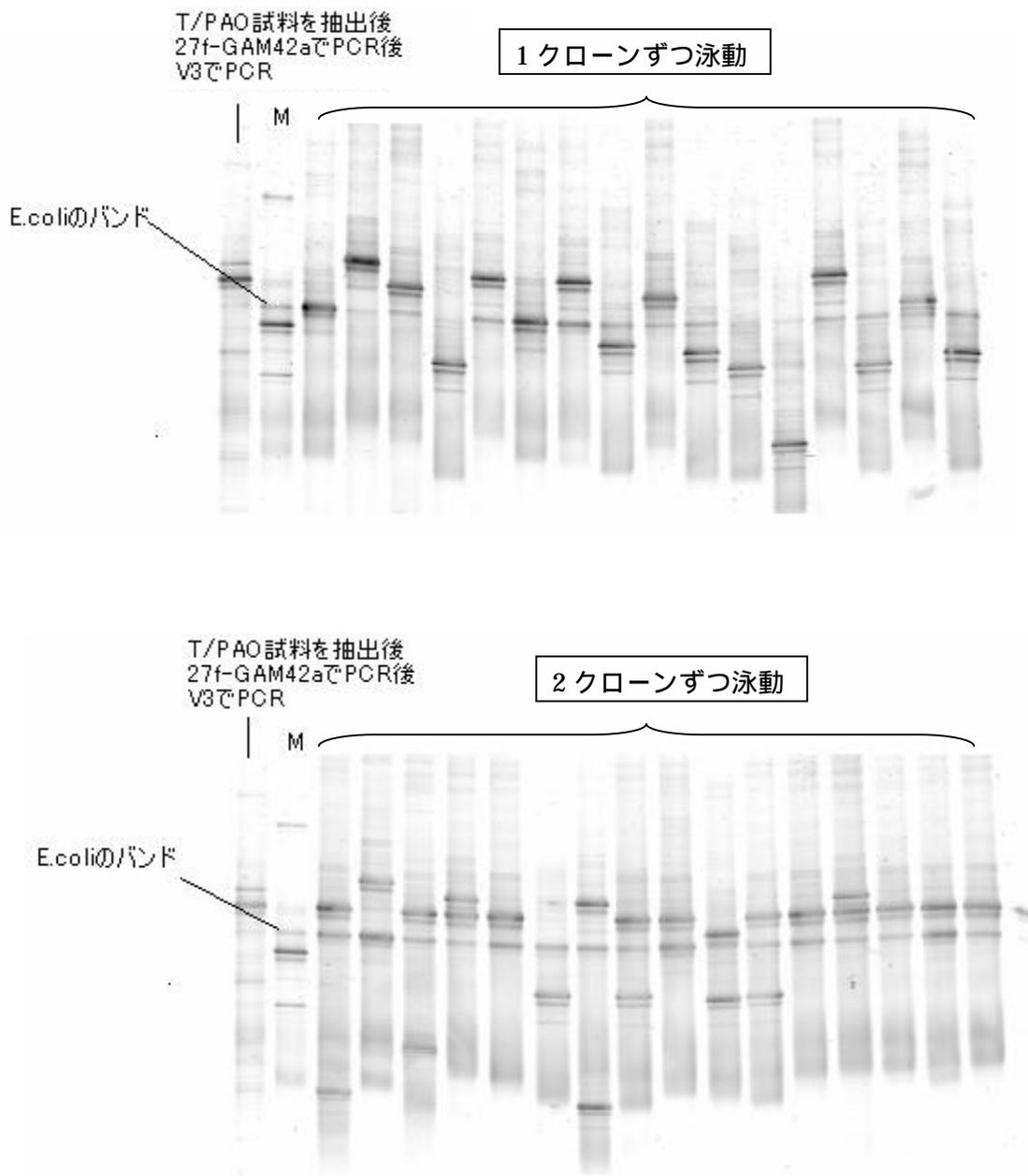


図 5.5 DGGE によるクローンのスクリーニング

5.3.3 オリゴヌクレオチドプローブの設計

GAM3、GAM4、GAM5 の 27f-1492r の 16srRNA の全長約 1500bp の両側の解読を行った。この塩基配列を ARB に入れて系統樹を作成し、それぞれのクローンに特異的なプローブを設計をした(図 5.6)。設計したプローブの配列は表 5.4 の通りである。クローン GAM3 には Gam209 プローブ、GAM4 には Ach.845 プローブ、GAM5 には Gam663 プローブをそれぞれ特異的になるように設計した。全長を解読後 ARB の系統樹を書いたところ、GAM3、GAM4 はともに *Achromatium* から同じくらいの距離にあった。結果として、クローン GAM4 と *Achromatium* sp.を捉えられるプローブを設計することができた。

表 5.4 設計したプローブ

Probe	Target site	Sequence(5'-3')
Gam209	209-226	CTGTTAGCGCGAGGCCTT
Ach.845	845-862	AGCTGCGCCACCAAGCCC
Gam663	663-684	CACCGGGAATTCCACCACCCTC

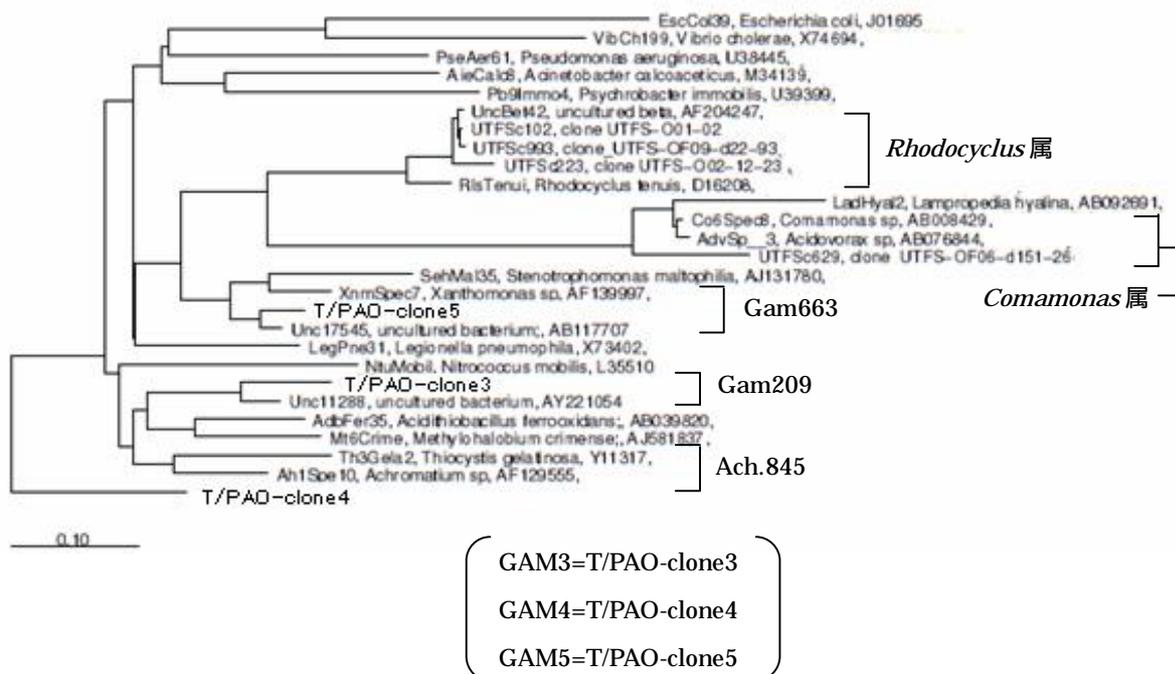


図 5.6 得られたクローンの系統樹

設計したプローブについてホルムアミド濃度の条件決定を行った。ホルムアミド濃度の検討にはポジティブコントロールとネガティブコントロールとなる純菌を用いて行うのが理想である。しかし、本研究では、実際の試料を用いてホルムアミド濃度条件の決定を行った。条件検討はホルムアミド濃度を 10%、20%、30%、40%と変えて FISH を行うことでホルムアミド濃度の最適化を行った。濃度が低いと非特異的に結合され、高すぎると特異的な結合も行われなくなるので、特異的な結合のみが行われていると思われる濃度を観察によって決定した。それぞれのプローブについて検討を行ったところ、Ach.845 については非特異的結合があまり起こらず、10%～30%のいずれでも細菌を特異的に捉えていた。その中で最も条件の厳しいホルムアミド濃度 30%を採用した。Ach.845 以外のプローブについては、Gam209 は細菌を捉えられておらず、逆に Gam663 は GAM42s よりも広く捉えてしまっていたので、非特異的結合をしてしまっていると考えられた。そのため、Gam209 及び Gam663 プローブは解析には用いることができなかった。

表 5.5 ホルムアミド濃度の検討

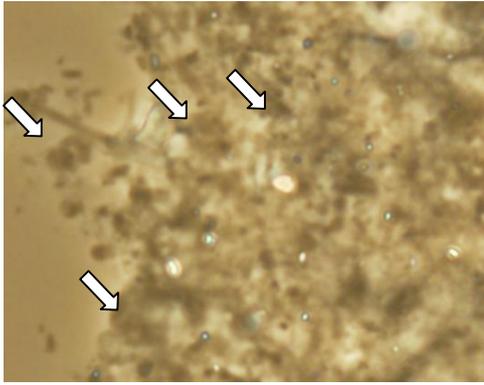
Probe	10%	20%	30%	40%	
Gam209	-	-	-	-	+ ; 特異的に細菌を捉えている
Ach.845	+	+	+	+-	++ ; 非特異的結合が見られる
Gam663	++	++	++	++	+- ; 特異的だが、蛍光が弱い ; 蛍光が得られていない

5.3.4 活性汚泥への適用

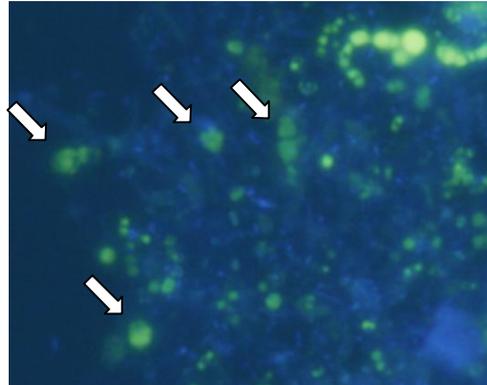
Ach.845 プローブを表 5.6 に整理する。T 処理場 PAO 活性汚泥中に存在した Proteobacteria に属するポリリン酸蓄積細菌が、このプローブを用いて捉えることができるのかを確認するため、高濃度 DAPI と Ach.845 プローブによる FISH の二重染色を行った。Ach.845 プローブに陽性な球菌はポリリン酸を蓄積していた(図 5.7)。また、T 処理場 PAO 試料には多く存在しているので、T 処理場活性汚泥中では主要なポリリン酸蓄積細菌の 1 つであると考えられた。

表 5.6 Ach.845 プローブ

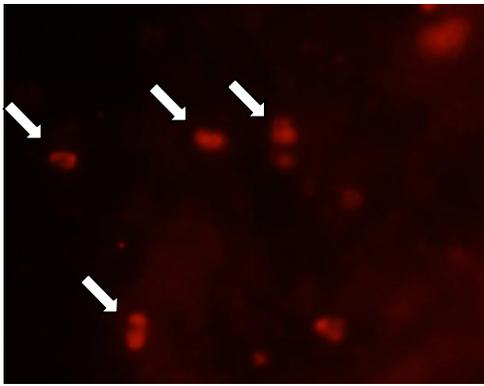
Probe	Target site	Sequence(5'-3')	FA(%)
Ach.845	845-862	AGCTGCGCCACCAAGCCC	30%



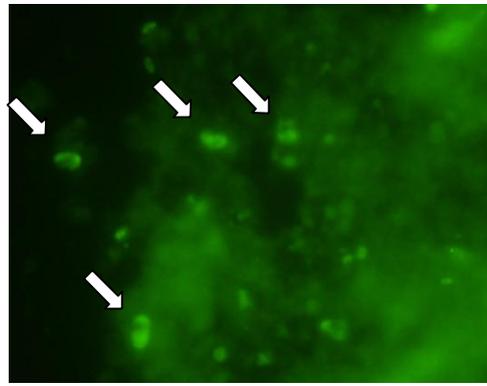
位相差図



高濃度 DAPI 染色



Ach.845(cy3)



GAM42a(FITC)

図 5.7 高濃度 DAPI と Ach.845 プローブを用いた FISH の二重染色

5.4 Run13(グルタミン酸/アスパラギン酸系)及び Run6(グルタミン酸系)に出現した球菌の同定

5.4.1 顕微鏡観察によるグループレベルの同定

Run13(グルタミン酸/アスパラギン酸系)Run6(グルタミン酸系)で出現した球菌は DAPI で染色はされるものの、真正細菌全体を捉える EUBmix プローブを用いた FISH で蛍光を発しなかった。この場合、考えられるのは EUBmix プローブが捕捉できる細菌ではない、細胞壁処理が充分でない、の 2 通りである。としては EUBmix プローブは真正細菌全体を捉えることを目的として設計されているが、捉えられない細菌も存在することが悪鬼らかとなっている(Daims *et al.*(1999))。としてはパラホルムアルデヒド固定やエタノール固定のみでは蛍光を発しない細菌は数多く報告されている(Beimhohr *et al.*(1993)、Erhart *et al.*(1997))。

プローブが浸透しづらい細菌はグラム陽性細菌であるので、まずはグラム染色を行ってプローブの蛍光を発しない原因を探った。グラム染色を行った結果、図 5.8 にあるように青紫色に染色されたので、この細菌はグラム陽性細菌であることが分かった。そのため、FISH で蛍光を発しない原因は細胞壁処理が弱いためであることが分かった。そこで、グラム陽性細菌に有効な細胞壁処理であるエタノール固定とリゾチウム処理を行って FISH を行った。リゾチウム溶液の濃度は 25mg/ml(in 100mM Tris,50mMEDTA,pH8.0)とし、処理の方法は Kawaharasaki *et al.*(1998)に従った。エタノール固定・リゾチウム処理後、HGC69a プローブ及び EUBmix プローブを用いて FISH 法を行ったところ、両プローブで蛍光が得られた(図 5.9)。この細菌は HGC69a に陽性な細菌、すなわち Actinobacteria であることが分かった。既存の知見として、Actinobacteria に属して、通常の細胞壁処理では蛍光を発しない細菌として、Nakamura *et al.*(1995)によって、*Microlunatus Phosphovor* が単離されている。そこで、Run13、Run6 に対して FISH で *Microlunatus Phosphovor* に特異的な MP2 プローブ(Kawaharasaki *et al.*(1998))を適用したところ、Run13 では、*Microlunatus Phosphovor* とそれ以外の球菌が存在し、Run6 では *Microlunatus Phosphovor* はほとんど存在していなかった。そのため、本節で対象としている Actinobacteria に属する細菌は新規のポリリン酸蓄積細菌である可能性が高い。Run13 に比べ、Run6 は群集構造が単純化されていたため、Run6 を中心に新規のポリリン酸蓄積細菌の探索を行った。

なお、本論文では、高濃度 DAPI と FISH の二重染色を行う場合は高濃度 DAPI を先に観察する方法で行っているが、Run6、Run13 の球菌は FISH を行ってもリンを溶出しないことが分かったので、本節に限り、高濃度 DAPI 染色は FISH の後に行っている。

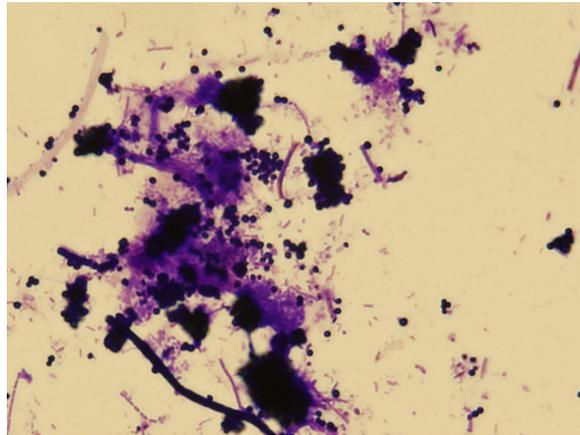
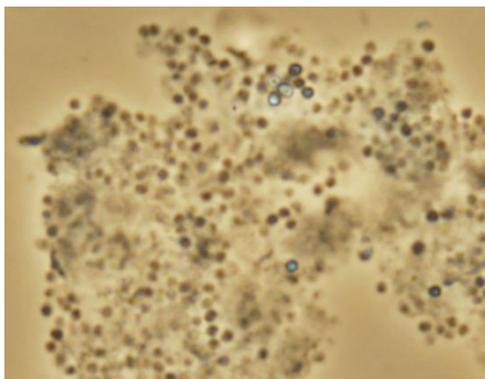
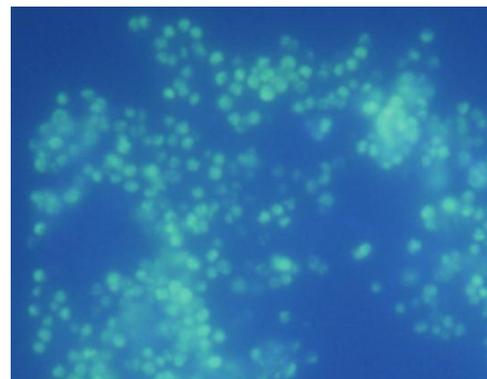


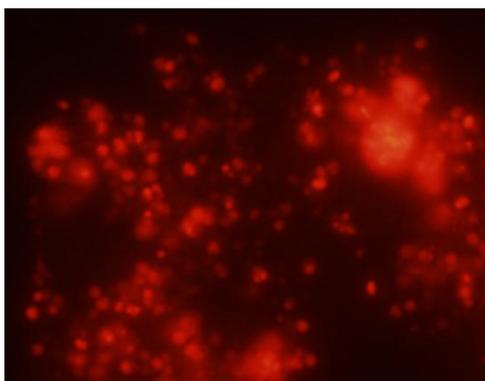
図 5.8 グラム染色の結果(Run13)



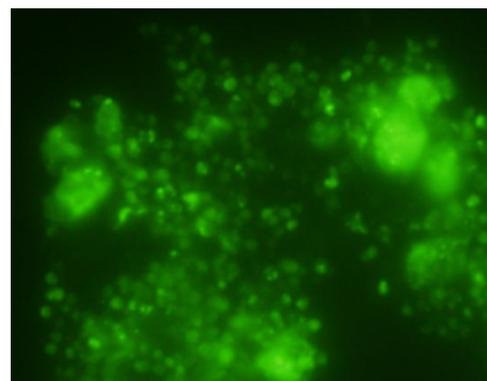
位相差図



高濃度 DAPI 染色



HGC69a(cy3)



EUBmix(FITC)

図 5.9 HGC69a プローブによる蛍光の観察

5.4.2 プライマーの選定

5.3.1 で GAM42a プローブの配列をリバースプライマーとして用いたのと同様に、HGC69a プローブをリバースプライマーとして用い、フォワードプライマーを 27f で PCR を行った。しかし、アニーリング温度を振って PCR を行ったところ、どの条件でもスメアが見られ、標的とする PCR 産物を増幅できていなかったため、HGC69a の配列を用いることは断念した。そこで、Actinobacteria に特異的なプライマーとして、Oyaizu et al.(2000) が設計した Hgc-1 プライマーを用いて PCR を行った。Oyaizu et al.は、より特異的にするために、Hgc-1 と Hgc-2 をそれぞれフォワードプライマー・リバースプライマーとして用いていたが、本研究では Actinobacteria に属する細菌を網羅的に捉える必要があったので、フォワードプライマーを Hgc-1、リバースプライマーとして 1492r を用いて PCR を行った。Hgc-1 の標的部位は 420 - 440 なので約 1100bp の増幅産物が得られる。PCR 条件はいくつかアニーリング温度を振って最適と思われた 56 で行った。PCR 条件は表 5.7 である。

表 5.7 Hgc-1-1492r プライマーの PCR 条件

Step		
Heat Shock	94	10分
Denaturation	94	30秒
Annealing	56	30秒
Extention	72	1分30秒
Final extention	72	10分

Denaturation-Extension を 30 サイクル行う

5.4.3 クローニングの結果

Run6 及び Run13 について、Hgc-1 - 1492r プライマーによって増幅した PCR 産物からクローニングを行った。Run6 から 55 クローンを、Run13 から 40 クローンをそれぞれピックアップして SP6-T7 プライマーを用いてダイレクトコロニー PCR を行った。シーケンスを読むにあたって、Run6 についてはクローンを DGGE によってスクリーニングを行った(図 5.10)。Hgc-1-1492r は標的部位が 420-1510 で V3 領域を含まないため、968fGC-1392r プライマーを用いた。また、Run13 は簡易的に RFLP によってスクリーニングをかけた。

これらのスクリーニングを行ったところ、Run6 では 8 クローン、Run13 では 11 クローンに絞られた。特に Run6 ではバンドが同じ高さに来る配列を持つクローンを多く含んでいた(図 5.10)。それらについて、Hgc-1 プライマーを用いて 500bp 程度の片側の塩基配列を読んだ。しかし、いくつかの種は Actinobacteria でなかった場合や同じ配列を読んでもまった場合があったのでそれらは除いた。得られた塩基配列の近縁種を表 5.8 に載せた。

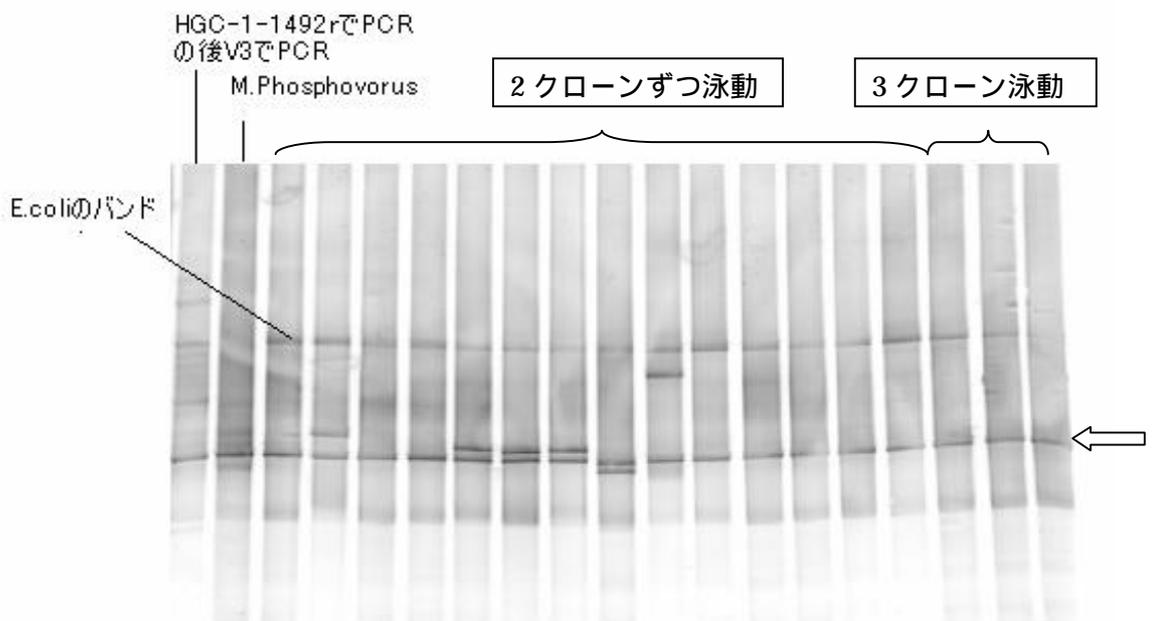
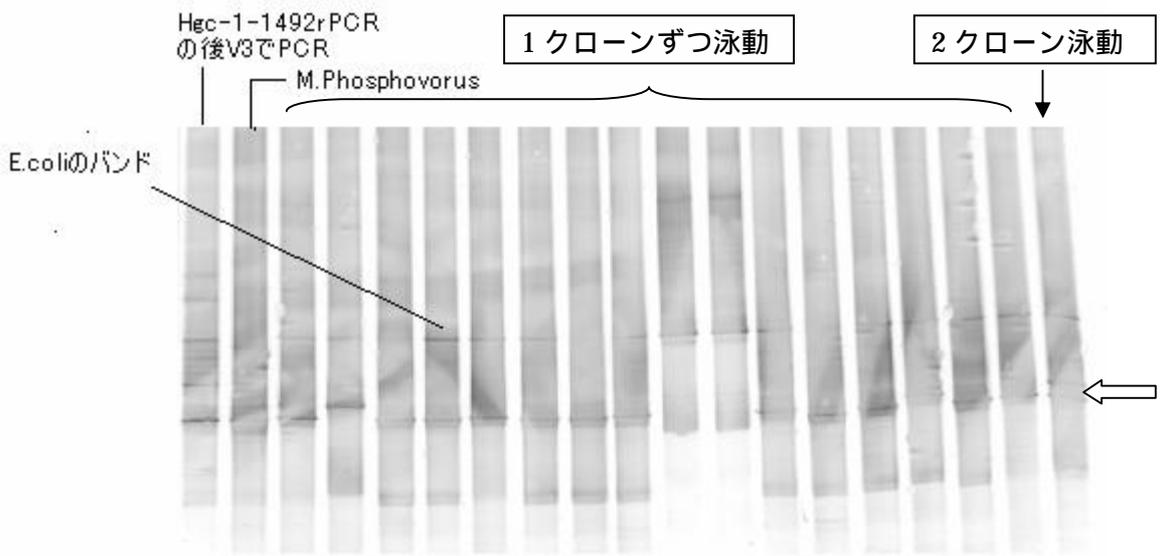


図 5.10 DGGE による Run6 のクローンのスクリーニング

(← 同じ高さにくるバンドが多い。)

表 5.8 クローニングから得られた塩基配列の近縁種

Clone	Name		相同性
R6-59	<i>Nocardioides aquiterrae</i>	Actinobacteria;Actinobacteridae;Actinomycetales;Propionibacterineae;Nocardioideaceae;Nocardioides.	97%
R6-2	<i>Mycobacterium</i> sp. WF2	Actinobacteria;Actinobacteridae;Actinomycetales;Corynebacterineae;Mycobacteriaceae;Mycobacterium.	99%
R6-36	<i>Propionivibrio dicarboxylicus</i>	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales;Rhodocyclaceae; Propionivibrio.	97%
R6-62	bacterium Ellin5133 (<i>Nocardioides aquiterrae</i>)	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales Propionibacterineae;Nocardioideaceae.	95%
R13-2	<i>Microlunatus phosphovorius</i>	Actinobacteria;Actinobacteridae;Actinomycetales;Propionibacterineae;Propionibacteriaceae;Microlunatus	99%
R13-5	<i>Rhodococcus</i> sp. TM14_1	Actinobacteria;Actinobacteridae;Actinomycetales;Corynebacterineae; Nardiaceae; Rhodococcus.	99%
R13-9	<i>Nocardioides aquiterrae</i>	Actinobacteria;Actinobacteridae;Actinomycetales;Propionibacterineae;Nocardioideaceae;Nocardioides.	98%

Run6 の図 5.10 の DGGE によるスクリーニングの際に同じ高さのバンドが多かったクローンが R6-59 で *Nocardioides* に近縁な種であった。さらに、Run13 でも共通して R13-9 に *Nocardioides* に近縁な種が検出された。また、Run13 では R13-2 に *Microlunatus Phosphovorius* が検出されているが、Run6 からは検出されなかった。これは、FISH による顕微鏡観察の結果で、Run13 には *Microlunatus Phosphovorius* が観察されたが、Run6 では観察されなかったという結果とも一致した。以上の結果から、*Nocardioides* に近縁な種が新規のポリリン酸蓄積候補として可能性が高いと考えられた。

5.4.4 オリゴヌクレオチドプローブの設計

Nocardioides に近縁な種であった R6-34 及び R13-9 の Hgc-1 - 1492r の全長、すなわち約 1100bp の両側の解読を行った。この塩基配列から、ARB を用いてプローブ設計を行った。これらのクローンを包括するプローブ、NOC.767 及び NOC.1032 の設計を行った。NOC.767 は NOC.1032 に比べて広く捉えるプローブである。系統学的な位置関係は図 5.11 に示した。

表 5.9 設計したプローブ

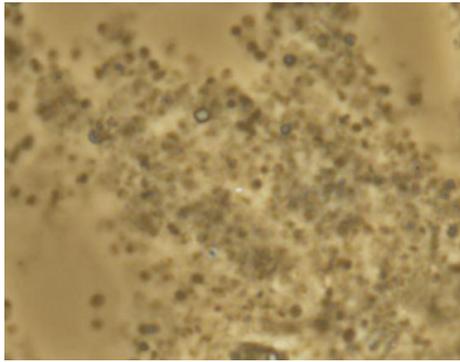
Probe	Target site	Sequence(5'-3')
NOC.1032	1032-1049	CCACCTGTACACCCCAA
NOC.767	767-784	CTGTTGCTCCCCACT

5.4.5 活性汚泥への適用

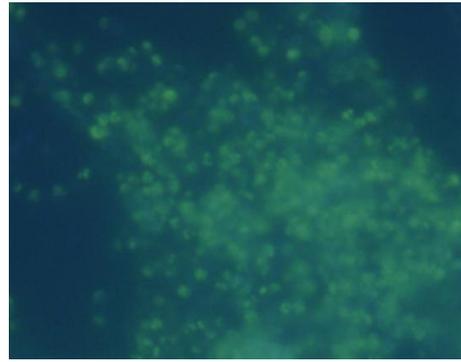
NOC.1032 及び NOC.767 プローブについて表 5.11 に整理する。NOC.1032 及び NOC.767 プローブをそれぞれのホルムアミド濃度で適用したところ、Run6 で存在していた球菌は NOC.1032 と NOC.767 の両方のプローブによって捉えられた。すなわち、Run6 に存在したポリリン酸蓄積球菌は *Nocardiodes* に近縁な種であることが分かった(図 5.12)。

表 5.11 NOC.1032 及び NOC.767 プローブ

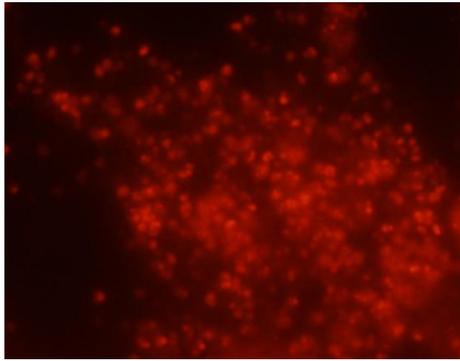
Probe	Target site	Sequence(5'-3')	FA(%)
NOC.1032	1032-1049	CCACCTGTACACCCCAA	20%
NOC.767	767-784	CTGTTGCTCCCCACACT	30%



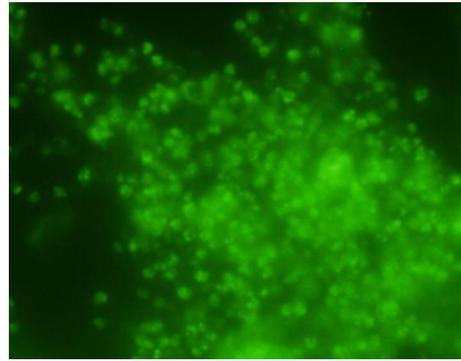
位相差図



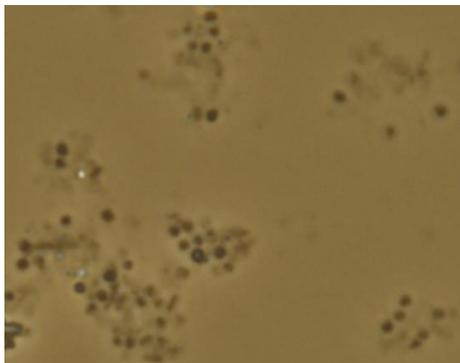
高濃度 DAPI 染色



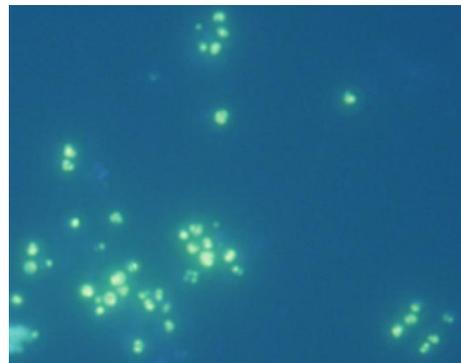
NOC.1032(cy3)



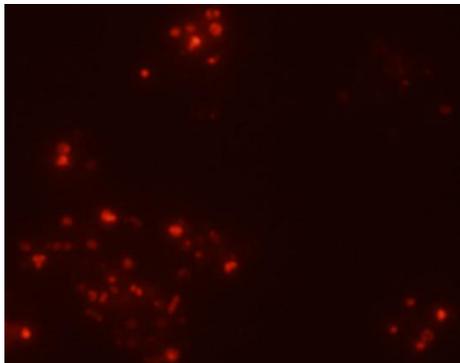
HGC69a(FITC)



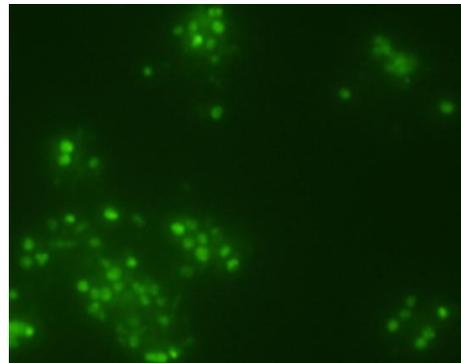
位相差図



高濃度 DAPI 染色



NOC.767(cy3)



HGC69a (FITC)

図 5.12 NOC.1032/NOC.767 プローブ

5.4.6 同定された細菌に関する考察

Run6 は福島(2002)で運転されたもので、福島が行った研究結果から本研究で同定された種の解釈を行う。本研究で対象としたのはグルタミン酸を唯一の炭素源で馴致して 122 日目の試料である。リアクターの運転状況と DGGE 及び FISH による結果から考察する。

DGGE 及び FISH

まず、福島が行った V3 領域を対象として行った DGGE の結果を図 5.13 に示す。

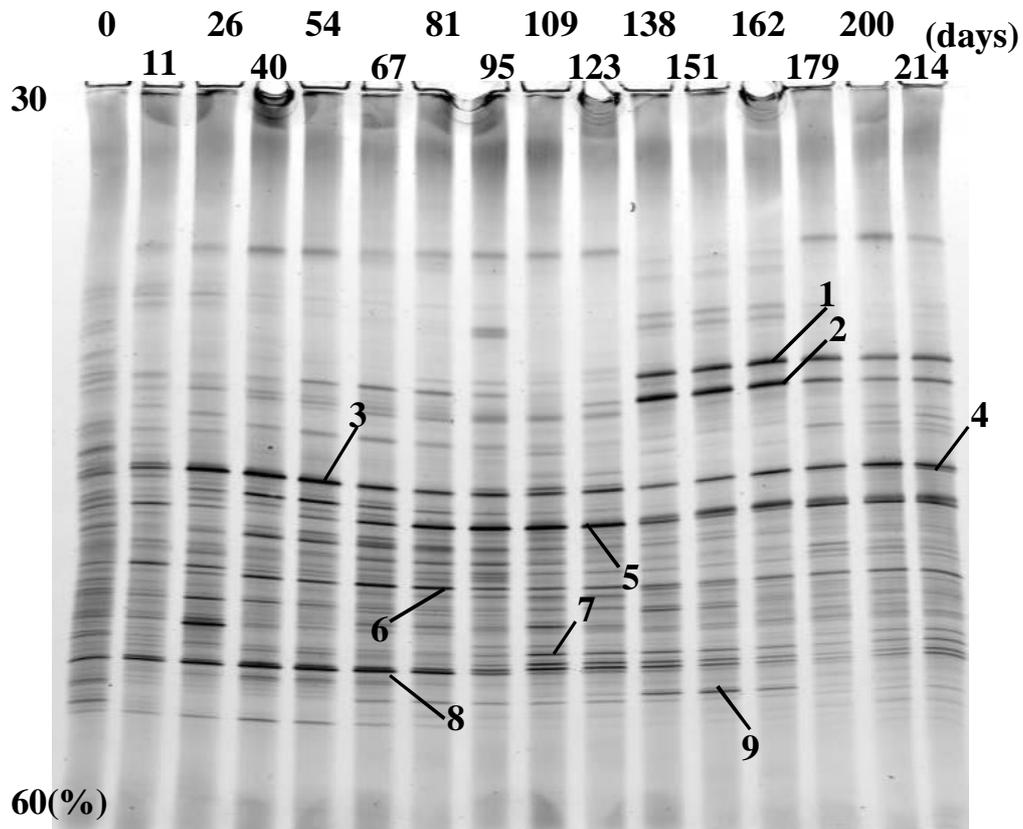


図 5.13 Run6 の DGGE の結果(福島(2002))

福島(2002)はバンド 1~9 の V3 領域の塩基配列の解釈を行っている。本研究で得られた *Nocardiodes* に近縁な種はバンド 7 と一致している可能性が高い。塩基配列の解釈を行った位置がずれているため確実ではないが、バンド 7 の相同性検索の結果は *Nocaridiodes plantarum* に最も近縁で、相同性が 93%であった。バンド 7 は 109 日目から 162 日目あたりで見られるバンドである。また、バンド 6 は *Accumulibacter* として報告のある種と 100% 相同性が一致したバンドである。バンド 6 は 81 日目あたりまでは徐々に濃くなってきてい

るが、その後は徐々に弱まってきている。すなわち、81 日目あたりで、何らかの原因で、増殖してきた *Accumulibacter* が減少し始め、それに代わって *Nocardiodes* に近縁な種が現れ始めている。

また、福島は 1、67、123、162 日目のサンプルを用いて、真正細菌に対する *Accumulibacter* の割合 (PAO 比) と全菌に対するポリリン酸を蓄積している菌の割合 (DAPI 比) の比較を行っている (図 5.14)。1 日目から 67 日目にかけて *Accumulibacter* の割合とポリリン酸蓄積細菌の割合が類似した変動をしているため、*Accumulibacter* がリン除去を担っている可能性が高い。しかし、67 日目以降ではその割合は乖離し、ポリリン酸蓄積細菌の割合は増加しているにもかかわらず、*Accumulibacter* の割合は減少又は横ばいとなっている。そのため、67 日目以降の DAPI 比の増加には *Nocardiodes* に近縁なポリリン酸蓄積細菌の寄与があったと考えられる。

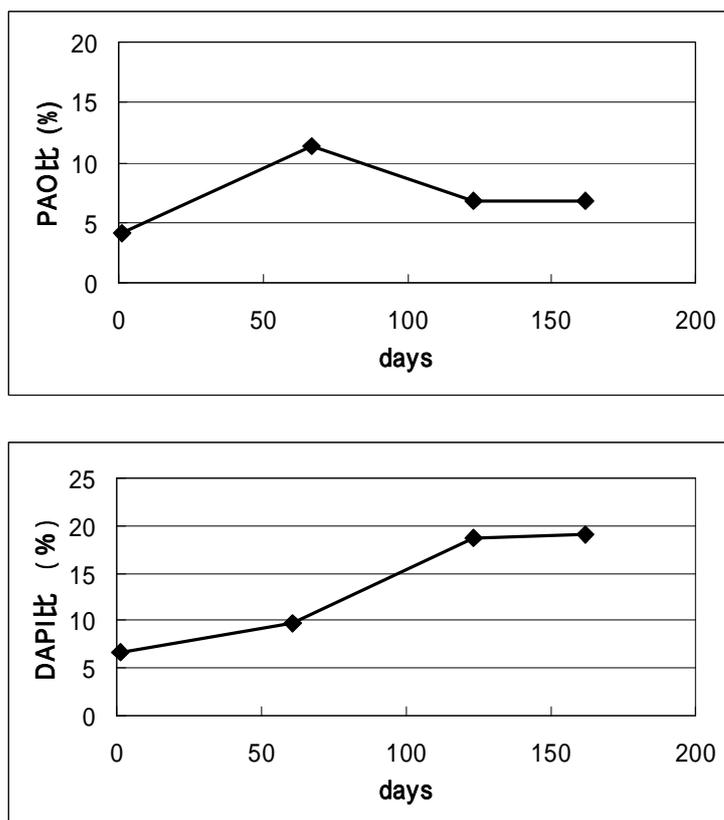


図 5.13 PAO 比及び DAPI 比(福島(2002))

DGGE 及び顕微鏡観察の結果から、馴致 90~100 日目あたりで、何らかの原因により、*Accumulibacter* に代わって、*Nocardiodes* に近縁な種がリン除去を担い始めたと考えられる。

リアクターの運転状況

同定された *Nocardioides* に近縁なポリリン酸蓄積細菌は Run6-122 日目の試料の中では優占種であるため、このときのリアクターの運転状況からこの細菌の生理学的特徴について推測することができる。122 日目は、嫌気でのリンの放出は少ないが、好気の終わりではリンを取りきっていた。また、溶存有機物は嫌気で取り込まれていた。嫌気でのリンの放出をあまり行わないため、小貫ら(2005)の言う狭義の PAOs の定義からは外れるポリリン酸蓄積細菌である可能性が高い。しかし、好気の終わりではポリリン酸を蓄積してリンを上澄み中から取り除いているのでリン除去を担う細菌であることに間違いはない。今後、この細菌の生理学的特徴を確かめていく必要がある。

5.5 第 5 章のまとめ

本章で最も大きい成果は、第 4 章で FISH 法によって観察されたポリリン酸蓄積細菌 2 種について系統学的な同定することができたことである。また、本章の研究により、ポリリン酸蓄積細菌の種の系統学的な同定手法を提案できたと考えている。この方法はまず、既存の捉える範囲の大きいプローブを用いた FISH によって大まかな系統学的な位置を探す。それが確認できれば、そのプローブの配列又は確認できた系統学的なグループを特異的に捉えるプライマーによって PCR-クローニング法を行うため、スクリーニングがかかった状態で探索を行える。この方法はスクリーニング手法として有効であるのに加えて、遺伝子解析を行う前に FISH によって固定法や形態、どの程度の割合を占めているかなどの情報を知った上で実験を進めることでその後の操作が行いやすい。この手法はポリリン酸蓄積細菌以外の、他の群集解析にも応用が可能であると考えられる。さらにこの手法が有効であるということが分かったので、第 4 章の研究を新規のポリリン酸蓄積細菌探索の手がかりとして使うことが可能であることも同時に証明することができた。

本章の最も大きい成果である同定できたポリリン酸蓄積細菌についてまとめる。

まず 1 種目は Proteobacteria に属する G バクテリアに似た形態を持つ細菌で、T 処理場活性汚泥中には多く存在しているポリリン酸蓄積細菌であった。この種は今まで知られていた種とは系統学的に離れた位置にある種であるため、今まで考えられていたポリリン酸蓄積細菌の群集像に新しい知見を加えることができた。生物学的リン除去プロセスに存在する細菌で Proteobacteria に属するものは、GB プローブに捉えられる種又はその近縁な種が注目されていたが、本研究で捉えられた種はそれらとは全く異なる種であった。これにより、実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の多様性がよりいっそう広がった。また、実処理場から同定できた種であるため、他の処理場においても存在している可能性が高い。

2 種目は、グルタミン酸で馴致した汚泥において優占化していた Actinobacteria に属す

る *Nocardioides* に近縁な球菌である。この細菌はグラム陽性でリゾチウム処理を必要とするため、通常の固定を行った FISH では検出されない種である。ポリリン酸蓄積細菌を同定するためには、単離をしない限り、リン染色と同時に染色する FISH によって確認せざるを得ないため、今まで見落とされてきた種である可能性がある。グルタミン酸による馴致によって、途中から *Accumulibacter* に代わって優占化していたので、何らかの特異的な代謝をする種であることも考えられる。ある運転状況におけば、優占化することができる種であるため、実処理場などでも寄与している可能性は高い。また、リアクターの運転状況から、嫌気条件下でポリリン酸を吐き出して PHA を蓄積し、好気条件下でポリリン酸合成を行う狭義の PAO には属さないポリリン酸蓄積細菌である可能性が高い。

今後はこれらのポリリン酸蓄積細菌が何を基質として取り込み、どのような代謝をしているのかを明らかにしていく必要がある。そして、これらの種がどの程度実処理場に存在しているのか、その分布についても調査していく必要がある。本研究で同定できた種はポリリン酸蓄積細菌の全体像を把握し、そのメカニズムを解明するための重要な知見になると考えられる。

第 6 章 実処理場活性汚泥のリン組成の解析

及びポリリン酸蓄積細菌の定量評価

6.1 概要

下水処理場におけるリン除去プロセスは汚泥中にリンを蓄積することによって下水中からリンを取り除いている。汚泥にリンを蓄積させる方法としては、化学的にリンを凝集させるか、生物によってリンを蓄積させるかのいずれかの方法がある。東京都の水再生センターでは化学的凝集によってリン除去プロセスを運転している処理場はなく、リン除去が行われている処理場は全て生物学的リン除去プロセスを採用している。しかし、味埜(1982)によると、実処理場汚泥については、金属性リンを多く蓄積し、汚泥によっては汚泥内リンの 4 割を超える。これらの金属性リンの由来は流入水中に存在する金属や緊急時に用いられた PAC(ポリ塩化アルミニウム)などの影響が考えられ、実処理場活性汚泥が含有するリンについて化学的凝集による影響は無視することはできない。そこで、本研究では東京都水再生センターを対象として、汚泥が含有するリンの金属による化学的凝集の寄与及び微生物によるリン蓄積の寄与について、定量的に評価した。

活性汚泥中のリンを金属よるものと微生物によるものに分画することによって、汚泥中の微生物によるリン蓄積の正確な評価が可能となった。ここで求められたリン含有率と活性汚泥中に存在するポリリン酸蓄積細菌の存在割合にはなんらかの相関関係があることが予想される。酢酸を主要な炭素源にして馴致した汚泥の解析では、Crocetti et al.(2000)はリン含有率と PAOm_{ix}/EUB338 の相関で、Kong et al.(2002)はリン含有率及び嫌気下におけるリンの放出と PAOm_{ix}/EUBm_{ix} の相関で $R^2=0.90$ を超える高い相関があったことを報告している。Lee et al.(2003)は、都市下水を流入水とする AO 法及び UCT 法によるパイロットプラントの汚泥を解析している。リン含有率と PAO651/EUBm_{ix} の相関を取ったところ、AO 法では $R^2=0.03$ 、UCT 法では $R^2=0.41$ と Crocetti et al.(2000)に比べると低く、その原因を他の細菌によってもリン除去がなされていたと考察している。特に、相関の低かった AO 法では Actinobacteria の存在割合(HGC69a/EUBm_{ix})とリン含有率の相関が $R^2=0.53$ と高く、かつ FISH-MAR によって Actinobacteria が ^{33}Pi を摂取していたと報告している。また、様々な処理場の試料の解析は Wang et al.(2005)又は宇田ら(2005)によって行われている。Wong et al.はリン含有率と高濃度 DAPI/DAPI では $R^2=0.73$ の相関があったが、PAOm_{ix}/EUBm_{ix} ではほとんど相関は見られなかったと報告している。宇田ら(2005)もリン含有率と PAOm_{ix}/EUBm_{ix} で相関を取っており、 $R^2=0.24$ と弱い相関はあったものの相関係数は低かった。

既存の研究のほとんどはリン含有率と Accumulibacter の存在割合の相関を取ることを目指している。しかし、この解析には リン含有率は生物によるものだけではない、生物学的リン除去は Accumulibacter 以外の細菌によっても行われている、という 2 つの問題点がある。は味埜(1982)が報告しているとおり、化学的凝集を行っていない活性汚泥プロセスにおいても金属性リンは存在していることが分かっており、これを取り除いて生物によるリン含有率を評価する必要がある。また、については、Liu et al.(2001)が Actinobacteria に属するポリリン酸蓄積細菌である Actino1011 陽性細菌を同定しており、Kong et al.(2005)は Actino1011 陽性細菌をさらに細かく分けたプローブ Actino658 及び Actino221 を設計し、それらが Accumulibacter よりも多く存在した処理場もあったと報告している。また、その他にもポリリン酸蓄積細菌が存在することが本研究第 4 章から明らかとなっている。

本研究では微生物によるリン含有率を測定し、そのリン含有率によって、Accumulibacter(PAOmix)と Actino1011 プローブ陽性細菌の割合とリン含有率の相関関係を示すことによって、細菌群集により活性汚泥のリン除去活性を説明することを目指した。

6.2 実験方法

6.2.1 実験方法の概要

東京都の水再生センターの処理方式、処理系、日時の異なる 27 試料の採取を行った。(日時が異なる試料は K 処理場西系 CAS のみで、この試料は雨水の影響がある試料である。) 試料採取時に試料の一部を自然沈降及び 0.45 μm フィルタによる固液分離を行い、上澄みは分離して持ち帰った。試料は MLSS、MLVSS、T-P、上澄み中のリン酸濃度の測定、及び低温の弱酸によるリンの分画実験を行った。群集解析は FISH 法により行い、Accumulibacter 及び Actino1011 陽性細菌の真正細菌に対する割合の定量を行った。

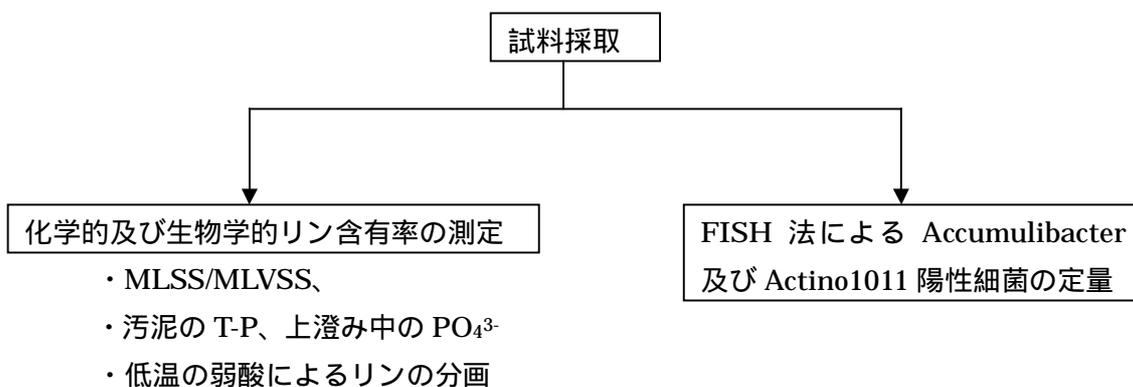


図 6.1 実験方法のフロー

6.2.2 試料採取時のリンの溶出の影響の検討

活性汚泥試料を実処理場から採取する際、採取してから実験室に持ち帰るために要する時間差は生物によるリン蓄積を測定する際に問題となる可能性がある。本研究で対象とした東京都内の水再生センターで試料採取してから実験室のある東京大学本郷キャンパス工学部 14 号館まで持ち帰るため、試料採取から測定に至るまでに、1 時間～2 時間の時間差が生じる。この 1 時間から 2 時間の間、サンプリングボックスの中で汚泥試料は嫌気下に置かれてしまうためリンの吐き出しが考えられ、もしその値が大きい場合は汚泥のリン含有率を考える際、影響を無視することができない。そのため、汚泥のリン蓄積能力を正確に評価するためには上澄み中のリン濃度を正確に測定する必要がある。そこで、K 処理場 CAS(雨)及び A 処理場 A2O の試料用いて検討を行った。試料採取後、サンプリングボックスを冷却しながら持ち帰った後(1.5 時間後)、さらに冷蔵庫にて放置して試料採取から 5 時間経過後にそれぞれ固液分離を行った上澄みのリン酸濃度を測定した(図 6.2)。5 時間経過後でも、A 処理場 A2O では吐き出しはなかった。また、K 処理場西系 CAS(雨)でも 0.3mgP/L 程度の吐き出ししかなく、汚泥の T-P(25mgP/L)に比べれば 1 %程度と非常に小さい値であった。本研究で分析した全ての試料で試料採取時と持ち帰り後の上澄みのリン酸濃度の測定を行って吐き出したリン酸の量を毎回計算したが、最大でも 0.3mgP/L とほとんど問題はなかった。その理由としては、試料採取後、冷却して持ち帰っていること、好気の末端から取っているため有機物がほとんど存在しないこと、という 2 つの理由が考えられる。

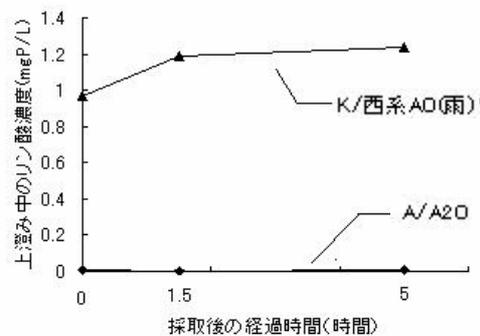


図 6.2 試料採取後のリン酸の吐き出しの影響

6.2.3 汚泥中のリンの分画法の検討

(1) 再現性と回収率

味埜ら(1983)によると、同一の汚泥に対して複数回 STS 法の分析を行って各画分の変動係数はほぼ 0.1 以下で再現性は良好であった。画分の中で再現性が悪かったのは脂質画分と

タンパク画分で本研究では分画していない項目で、本研究で行った C-PCA 画分 PO₄³⁻-P(金属性リン)及び T-P(金属性リン + 低分子ポリリン酸)については再現性の問題はなかった。味埜らは 3 試料以上分析し、特異的な値を除いて解析を行っていたので、本研究でも同一試料に対して 3 度同じ分析を行ったところ 95% 値変動係数はすべての項目で 1 割以下と再現性に問題はなかった(表 6.1)。

表 6.1 分画法の再現性

K 処理場 CAS(雨)				A 処理場 A2O			
画分	平均値 (mg/gVSS)	変動係数	平均値に対する 変動の割合(%)	画分	平均値 (mg/gVSS)	変動係数	平均値に対する 変動の割合(%)
C-PCA PO ₄ -P	10.3	0.5	4.5%	C-PCA PO ₄ -P	5.2	0.2	3.7%
C-PCA T-P	16.3	1.1	6.6%	C-PCA T-P	20.8	0.8	3.7%
残渣 T-P	19.6	1.5	7.6%	残渣 T-P	18.7	0.6	3.1%
上澄み PO ₄ -P	1.8	0.1	3.8%	上澄み PO ₄ -P	0.0	-	-

次に STS 法におけるリン回収率は以下の式で計算される。

$$\text{回収率(\%)} = \frac{\text{各画分T-Pの合計値}}{\text{汚泥内T-P}} \times 100$$

味埜ら(1983)の実験では、回収率の平均は実処理場汚泥で 90%、室内培養汚泥で 93%であった。回収率が著しく低い場合には、解析の対象から除いていた。本研究では、画分は C-PCA 画分及び残渣のみであったが、画分の回収率は毎回測定した。本研究で行った画分 27 試料の回収率は以下のようなになった。平均 93.4%、95% 値変動係数 10.3 で、最小と最大で 20% 程度の誤差はあったものの概ね回収率は良かったと言える。

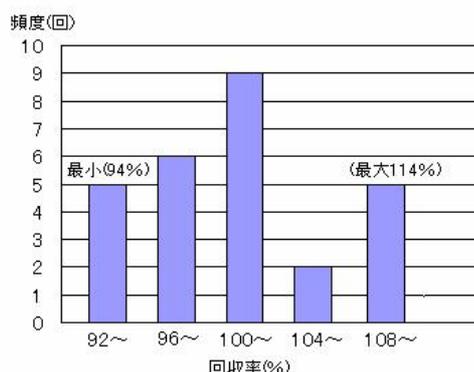


図 6.3 リンの分画の回収率の頻度分布

本研究では、再現性及び回収率について問題がなかったため、同一試料については 1 回の分析で行い、回収率の確認は毎回行った。

(2) 嫌気好気汚泥及び人工汚泥への適用

活性汚泥中のリン組成の変化を嫌気好気過程における変化を実験室汚泥（酢酸による馴致）及び実処理場汚泥（SU 処理場 AO 試料）を対象として解析した(図 6.4)。実験室汚泥及びSU 処理場 AO 汚泥ともに嫌気工程で上澄み中にリンを放出し、好気工程においてほぼその全量を低分子ポリリン酸として汚泥中に蓄積していた。すなわち、低分子ポリリン酸が主にリンの放出、取り込みに機能している画分であることが確認された。

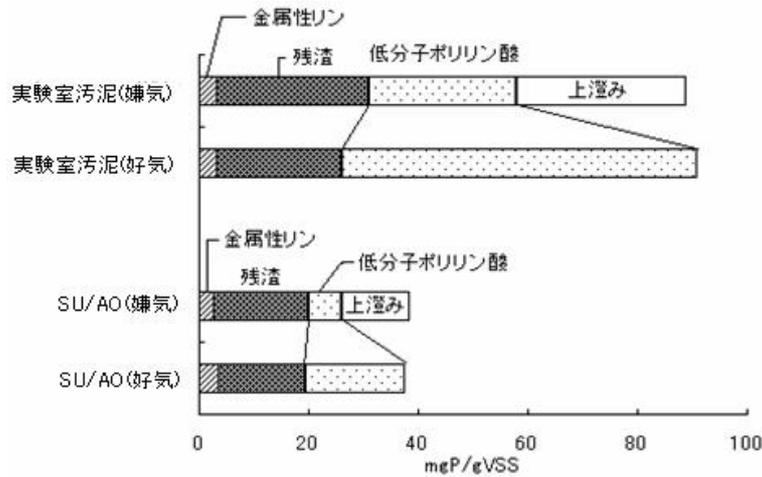


図 6.4 嫌気好気条件での汚泥内リン組成の変化

酢酸で馴致した嫌気好気汚泥と、生物学的リン除去を行っていない標準活性汚泥法で馴致した汚泥及び亜硝酸酸化型無酸素好気汚泥という人工汚泥の3種の分画を行った(図 6.5)。嫌気好気汚泥とそれ以外の汚泥で最も大きな違いは低分子ポリリン酸の量であった。すなわち、生物学的リン除去に大きく貢献しているのは低分子ポリリン酸であった。また、金属性リンの量の違いは馴致期間にあると考えられる。嫌気好気汚泥は馴致 4 週間のものであったが、他の 2 試料は 1 年近く運転されたものであった。馴致によって金属性リンが引き抜き汚泥とともに流出したと考えられる。

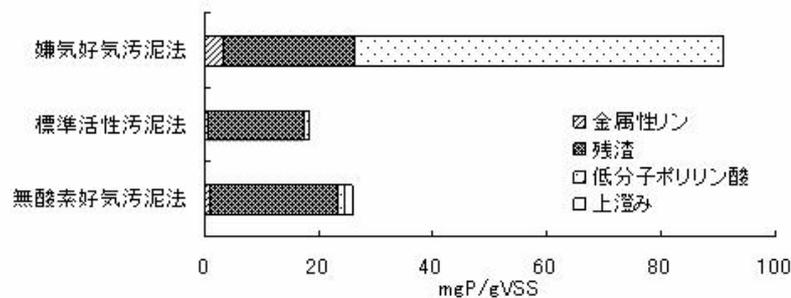


図 6.5 処理方式による汚泥内リン組成の違い

6.3 活性汚泥試料について

活性汚泥試料は東京都 23 区に存在する処理場の処理系、処理方式、処理日時の異なる 27 試料の採取を行った。同じ処理場内でも、処理系によって流入水が異なる場合又は処理方式が異なる場合があるのでそれぞれ採取を行った。また、試料採取は 2005 年 10 月～12 月にかけて行った。

試料採取を行った活性汚泥の MLSS、MLVSS、処理水中のリン濃度（試料採取時の上澄みのリン濃度）、リン含有率を表 6.2 にまとめた。リン含有率は全リンからサンプリング時のリン濃度を引いたものを MLSS 又は MLVSS で叙して百分率換算して求めた。

MLSS 及び MLVSS は、流入負荷量、処理方式の違いや要請されている放流基準の違いによって処理場ごとに大きく異なっている。また、生物学的リン除去が行われている処理場ではリン含有率が高く、上澄み中のリン濃度は低い。

表 6.2 活性汚泥試料のリンに関する基本的な測定値

処理場名	MLSS (mgP/L)	MLVSS (mgP/L)	上澄み (mgP/L)	リン含有率	
				(%)(SSベース)	(%)(VSSベース)
SU/AO	1968	1540	0.00	2.6	3.4
SU/CAS	2392	1788	0.01	2.8	3.7
MK/AO	877	695	0.00	2.7	3.4
MK/A2O	1242	995	0.00	2.7	3.4
MK/CAS	1175	975	0.01	2.8	3.3
S3/CAS	1000	810	1.07	2.7	3.3
S6/CAS	1288	1012	0.53	3.4	4.4
MS/東系AO	982	768	0.01	4.0	5.1
MS/東系CAS	886	708	2.70	3.5	4.3
MS/西系CAS	834	694	1.37	1.5	1.7
NG/AO	1536	1232	0.00	2.4	3.0
NG/A2O	1462	1172	0.00	2.4	3.0
NG/CAS	1766	1428	0.00	2.0	2.5
MY/AO	1056	892	1.28	1.9	2.3
MY/CAS	862	736	1.50	1.7	2.0
A/A2O	1562	1192	0.01	2.8	3.7
K/東系AO	1497	1129	0.00	4.0	5.3
K/西系AO	1346	1010	0.00	3.4	4.5
K/西系CAS	1304	1004	0.00	3.4	4.4
K/西系CAS(雨)	900	650	0.97	2.6	3.7
KS/AO	1140	898	7.54	3.2	4.0
KS/CAS	1416	1096	1.62	3.6	4.7
O/CAS	1238	1040	1.48	1.5	1.8
N/AO	1081	882	0.06	2.2	2.7
SG/北系CAS	1281	1034	0.12	2.7	3.3
SG/南系CAS	1010	843	1.31	1.8	2.2
U/A2O	1366	1078	0.00	2.8	3.5

処理方式ごとにリン含有率の大きさの順に並べた。AO 法又は A2O 法による処理を行っている試料と標準活性汚泥法による処理を行っているものをそれぞれ図 6.6 に示した。

AO 法又は A2O 法を行っている試料では KS/AO と MY/AO の試料を除いて、上澄み中のリンはほぼ取り除かれている。KS/AO では上澄みのリン濃度が 7.54mgP/L と、試料採取当日に何らかのトラブルが生じていたことが考えられ、MY/AO では常時処理がうまくいっていないということであった。一方、標準活性汚泥法では汚泥のリン含有率の低い SG 処理場南系 CAS、MY 処理場 CAS、O 処理場 CAS、MS 処理場西系では生物学的リン除去を行っておらず、処理水のリン濃度は 1.3~1.5mgP/L であった。標準活性汚泥法を導入している処理場では好気槽の前段の曝気量を絞って擬似嫌気好気法で運転されている処理場が多い。また、流入負荷が大きいため好気槽の前段の DO の消費が早く前段に酸素のない状況が生まれ、意図せず擬似嫌気好気の形で運転されている処理場もある。標準活性汚泥法でリン含有率が高くなっている試料でも、リンを完全に除去できている試料であるが、リン含有率が高くても処理水中のリンを完全に取りきれない試料も多かった。

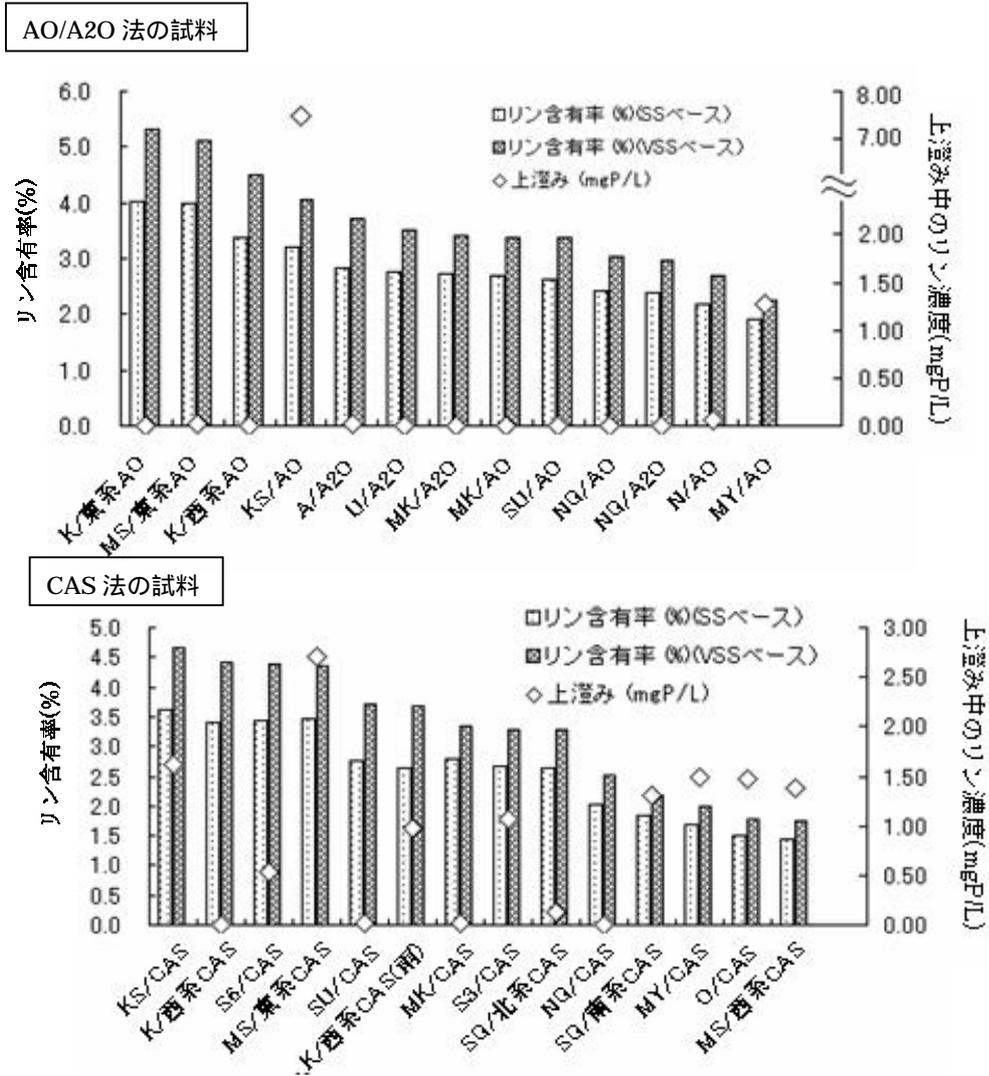


図 6.6 リン含有率と処理水のリン濃度

6.4 実処理場活性汚泥のリン組成

活性汚泥試料中のリンを金属性リン、生体内低分子ポリリン酸、その他の画分に分画した(図 6.7)。

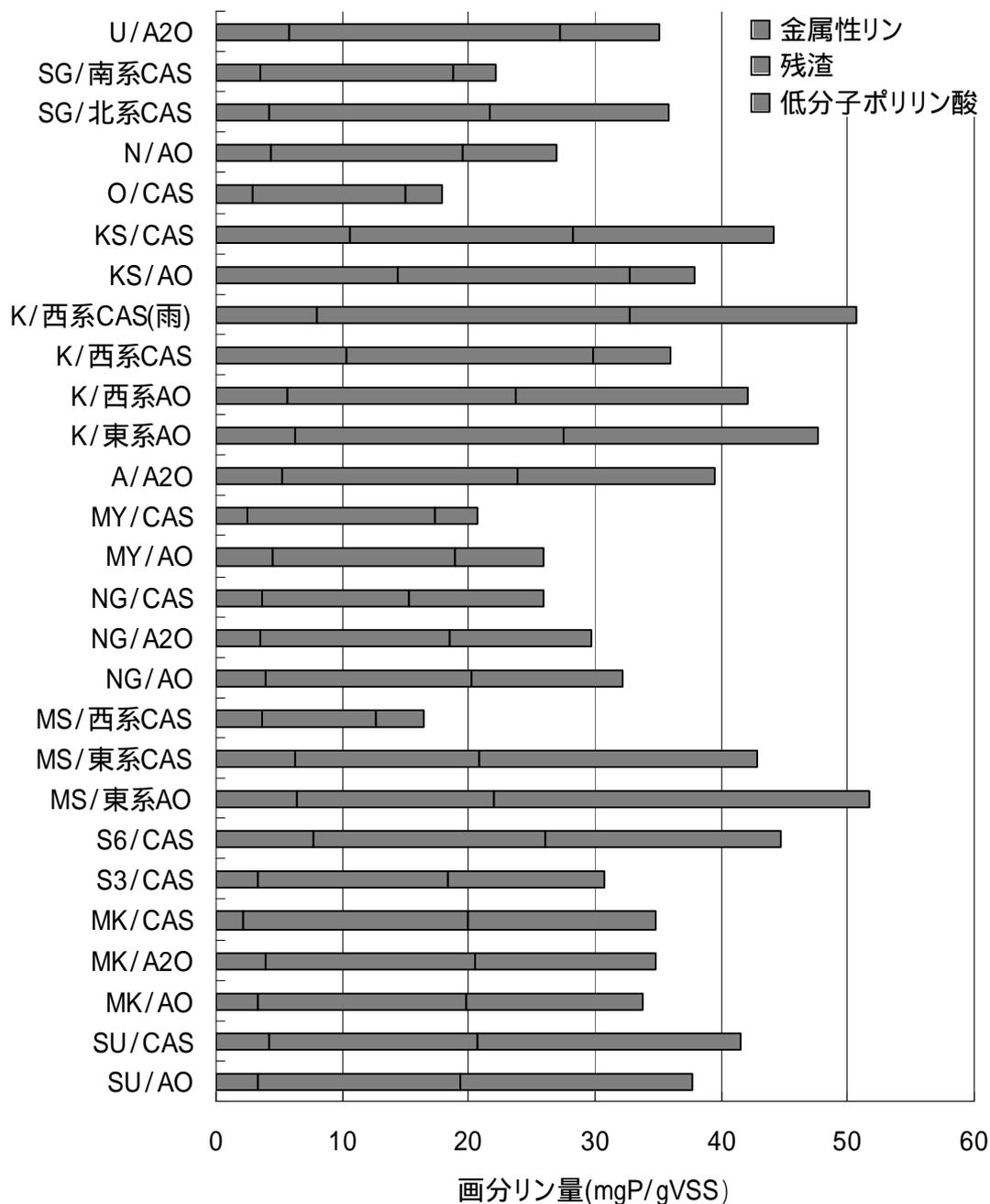


図 6.7 実処理場活性汚泥のリン組成

金属性リンについて

金属性リンは 2.2mgP/gVSS ~ 14.4mgP/gVSS、汚泥全体のリンの 6 ~ 38% を占めていた。試料ごとに大きなばらつきがあった。SG 処理場、K 処理場、NG 処理場など処理場が同一で、処理方式のみが異なる試料では金属性リンの濃度がほぼ近い値をとった。一方、同一処理場でも MS 処理場や S 処理場のように、処理系の異なる試料では大きく異なる値を取っていた。MS 処理場では東系で、S 処理場では 6 号で汚泥処理工場からの返流水を受け入れており、それぞれ MS 処理場西系、S 処理場 3 号の金属性リンの濃度に比べて大きい値をとっていた。そのため、金属性リンの量はそれぞれの処理場の流入水に依存すると考えられた。

金属性リンの量はリン酸が結合する Ca や Fe、Al などの無機物の量に依存している。流入水中のこれらの量が増加すると金属性リンも増加するはずである。そこで、無機物の量を推定する代表値として、MLVSS/MLSS (以下 VSS 値とする) を用いた。MLSS は浮遊物質量を、MLVSS は有機性の浮遊物質量を表す指標であるため、VSS 値は無機物の量が増加すると小さい値を取る。金属性リンと VSS 値の相関を取ったところ、図 6.5 のようになった。VSS 値の増加とともに金属性リンの減少があるという傾向があった。

近似曲線は(金属性リン) = (VSS 値) × -0.49 + 44.13、決定係数 0.31 となった。同様の研究を行っている味埜(1982)の推定値 ($Y=88.63-1.06x(x > 80)$ $y=4.21(x < 80)$) を同じ図上で比べると、近い値を得られていた。ただ、本研究では VSS 値にかかわらず、全体で近似曲線を引いた方が相関は良かった。金属性リンは特異的な値を取る試料もあるため、完全に推定が可能ではないが、常時がモニタリング行われている MLSS 及び MLVSS によって汚泥のリンの中の金属性リンをある程度は推定できることが分かった。

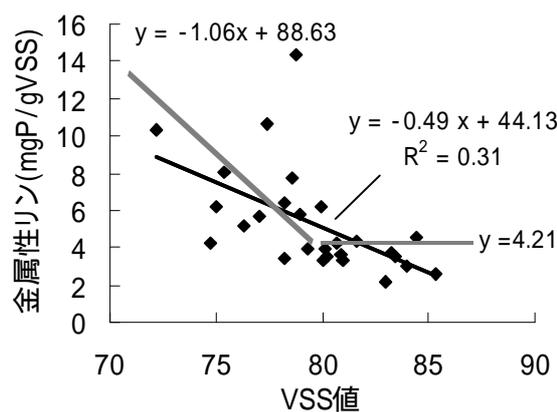


図 6.8 金属性リンの VSS 値による推定

生体内リン

生体内低分子ポリリン酸は 3.0mgP/gVSS から 29.8mgP/gVSS、汚泥全体のリンの 13～58%を占めていた。他の画分と比べると最も大きなバラツキがあった。低分子ポリリン酸は生物学的リン除去に最も寄与している画分であるので、このばらつきは生物学的リン除去の効率性に依存している。処理のうまくいっていない KS 処理場 AO・MY 処理場 AO を除く AO・A2O 法の 11 試料で比較しても、7.4mgP/gVSS～29.8mgP/gVSS と非常に大きくばらついていた。すなわち、生物学的リン除去を担うポリリン酸蓄積細菌は処理場ごとの特徴に相当した量で存在していることが示唆される。

また、低分子ポリリン酸を生体内リン（低分子ポリリン酸と残渣画分の和）と比較してみると、図 6.6 のようになった。味埜によると生体内リンが 20mgP/gVSS 以下の領域では低分子ポリリン酸量はほとんど変化しないとしている。また、生体内リンが 20mgP/gVSS～30mgP/gVSS は高分子ポリリン酸を含めたポリリン酸の増加によるものとしており、30mgP/gVSS を超える領域では低分子ポリリン酸の増加のみであるとしている。本研究においても同様の結果が得られている。生体内リンが 20mgP/gVSS 以上の領域では、20～30 でばらつきがあるものの、決定係数 0.81 と相関が高かった。すなわち、生体内リン量の増加分はそのほとんどが低分子ポリリン酸によるものであった。

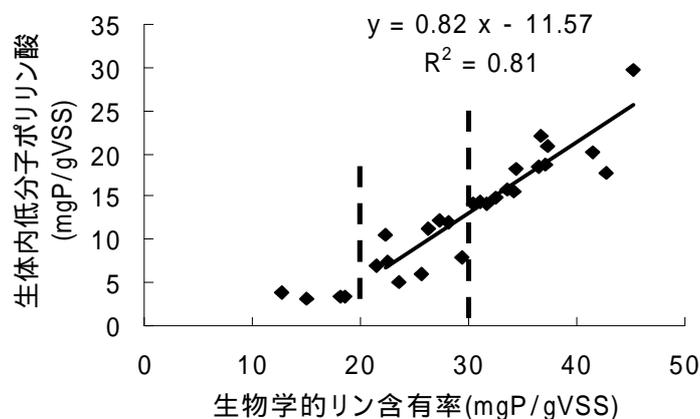


図 6.9 生体内リンと低分子ポリリン酸の関係

6.5 *Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphates*’及び Actino1011 陽性細菌の処理場ごとの分布

6.5.1 *Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphates*’及び Actino1011 陽性細菌の定量結果

FISH 法により *Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphates*’ (PAOmix 陽性細菌) と Actino1011 陽性細菌の真正細菌 (EUB mix 陽性細菌) に対する割合を面積定量によって求めた。図 6.7 に示す。実処理場において、*Accumulibacter* は 0.5% ~ 11.6%、平均 5.3% 存在した。MY 処理場 CAS、MS 処理場西系 CAS、SG 処理場南系 CAS、O 処理場 CAS といった汚泥のリン含有率や処理水のリン濃度から見て生物学的リン除去を行っていないと考えられる試料においても 0.5 ~ 1.6% と小さい割合ではあるが、*Accumulibacter* は存在していた。また、K 処理場東系 AO や K 処理場西系 CAS、SU 処理場 AO では 10% を超えていた。Actino1011 陽性細菌は 0.2 ~ 8.2%、平均 2.7% 存在していた。*Accumulibacter* と同様、Actino1011 陽性細菌はみやぎ CAS で 2.6%、落合 CAS で 2.9% 存在するなど生物学的リン除去が行われていないと考えられる試料においても存在していた。また、MK 処理場 CAS・A2O、MS 処理場東系 AO・CAS、SU 処理場 AO で 5% を超えていた。

試料採取時の上澄みのリン濃度が 0.1mgP/L の生物学的リン除去がうまくいっている 15 試料に限ると、*Accumulibacter* は 3.1 ~ 11.6%、平均 6.8% 存在しており、生物学的リン除去がうまくいっている試料では全ての平均値 5.3% よりも多く存在していた。一方、同様に生物学的リン除去がうまくいっている 15 試料に限っても、Actino1011 陽性細菌は 0.5 ~ 8.2%、平均 3.1% と試料全体での平均 2.7% とそれほど変わらなかった。すなわち、Actino1011 陽性細菌は生物学的リン除去を行っていない標準活性汚泥法においても多く存在していることが分かった。

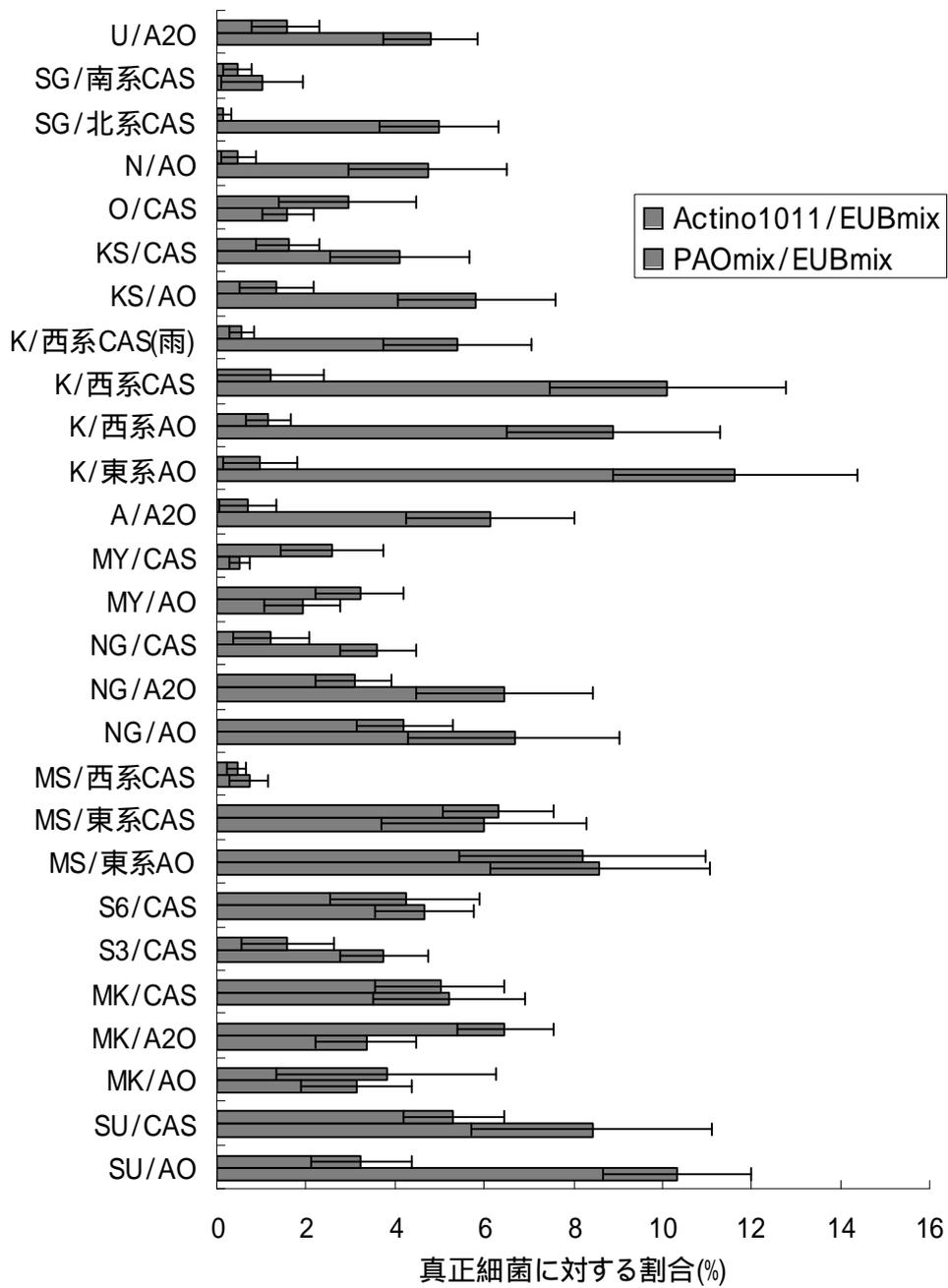


図 6.10 Accumulibacter・Actino1011 陽性細菌の分布

6.5.2 *Candidatus* 'Accumulibacter phosphates' と Actino1011 陽性細菌の競合関係

横軸に Accumulibacter の割合、縦軸に Actino1011 陽性細菌の割合をとったところ競合関係や共生関係は見出されなかった。競合が発生するとすれば、リン摂取の段階での競合であるが、Accumulibacter、Actino1011 陽性細菌には競合関係は見られず、それぞれの存在にほとんど関係していないと考えられる。Kong *et al.*(2005)も提案している通り、これらの微生物群の存在量は基質の利用特性が重要な要素となっている可能性が高い。Accumulibacter は短鎖脂肪酸(Kong *et al.*(2004))を、Actino1011 陽性細菌はアミノ酸など(Kong *et al.*(2005))を有機物源とすることが知られている。例えば、次のようなケースが考えられる。流入下水が、家庭下水が主な場合は Accumulibacter に有利に働き、工場排水を多く含む下水は高い濃度のたんぱく質を含んでいることがあるのでその場合は Actino1011 陽性細菌に有利に働くという可能性がある。

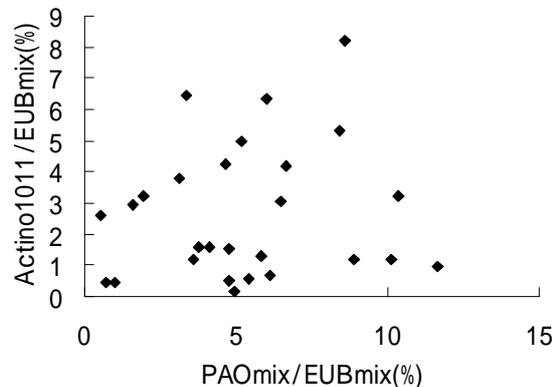


図 6.11 Accumulibacter ・ Actino1011 陽性細菌の関係

6.5.3 クラスタ分析

Accumulibacter と Actino1011 陽性細菌の分布が処理場ごとにどのようなになっているかを階層クラスタ解析によって示した(図 6.12)。クラスタ分析とは特定の計算手順によって、多くのサンプルについて“似ているもの”を集めて分類する手法のことである。分析には SPSS Base 13.0J というソフトを用いて、クラスタ間の距離は平方ユークリッド距離、クラスタの凝集法にはウォード法により階層クラスタ解析を行った。

距離を 2 で切ったところクラスタは 7 つに分かれた。その 7 つのクラスタについて記述する。クラスタ 1 は Accumulibacter も Actino1011 陽性細菌も全細菌に対して 1% 以下と、ほとんど存在していないクラスタでリン除去もほとんど行われていない。クラスタ 2 もクラスタ 1 と同様にリン除去が行われていない試料であるが、Actino1011 陽性細菌が 2~3% と Accumulibacter に比べて多く存在していた。クラスタ 1 とクラスタ 2 は AO 法だが生物学的リン除去がうまくいっていない MY 処理場 AO と生物学的リン除去

を意図していない標準活性汚泥法の試料のクラスターとなった。クラスター3は Accumulibacter が 3~6%程度で、Actino1011 陽性細菌が 2%以下という Accumulibacter によってリン除去が達成されている試料であった。しかし、クラスター3に属する試料の生物学的リン含有率はクラスター4~7に比べると低い値であった。クラスター4は Accumulibacter が多く存在し、Actino1011 陽性細菌が少ない K 処理場の 3つの試料と SU 処理場 AO であった。K 処理場の 3つの試料では Accumulibacter は 9%~11%存在するが、Actino1011 陽性細菌は 1%程度しか存在しないという試料であった。また、SU 処理場 AO では Accumulibacter は 10%、Actino1011 陽性細菌は 3%程度であった。クラスター5では、Accumulibacter 及び Actino1011 陽性細菌がともに 5%以上存在している試料である。クラスター6は NG 処理場 AO 及び A2O のみのクラスターで Accumulibacter が 6%程度、Actino1011 陽性細菌が 3%程度存在していた。クラスター7は MK 処理場の 3試料 S 処理場 6号 CAS の試料で、Actino1011 陽性細菌が Accumulibacter と同じかそれ以上存在している試料であった。

標準活性汚泥法と擬似嫌気好気法、AO 法、A2O 法の間では生物学的リン除去が行われているかどうかで存在量に違いはあったものの、生物学的リン除去が行われている汚泥間では処理方式の違いはほとんどなかった。クラスター間の違いで最も大きい要素は流入水による群集構造の違いが考えられた。クラスター3~7に属した生物学的リン除去を行っている試料で、同一の処理場で処理方式の異なる試料は MK・K・NG・S・KS・MS の 7 処理場の試料があるが、処理場が同じにもかかわらずクラスターが異なったのは NG 処理場と S 処理場と SU 処理場のみで、それ以外の 4 処理場の試料では同じクラスターに存在していた。NG 処理場は AO と A2O は同じクラスターに属し、NG 処理場 CAS が異なるクラスターに属していた。NG 処理場 CAS では擬似嫌気好気法を行っていないが、NG 処理場 AO の返送汚泥を数%送り込むということを行っている。すなわち、この群集構造の違いは生物学的リン除去を行っているかの違いであった。S 処理場、SU 処理場では、2 試料ずつ測定した結果が、異なるクラスターに属していたが、両処理場試料ともに試料間で、流入水が異なっていた。砂町では 3号には家庭下水のみであるが、6号の試料では家庭下水に加えて汚泥処理工場からの返流水を受け入れているため流入水の負荷が高い。また SU 処理場においては、採取したときの試料は SU 処理場 CAS では他の処理場の工事に伴って、流入水を受け入れていたため、負荷が非常に高い汚泥となっていた。そのため、生物学的リン除去を行っている汚泥において、Accumulibacter と Actino1011 陽性細菌の存在は流入水による影響が大きいと考えられる。また、クラスター4 とクラスター5・6・7 の違いは、Actino1011 陽性細菌の存在量である。クラスター4 はほとんどが Accumulibacter のみの汚泥であるのに対して、クラスター5・6・7 は Accumulibacter と Actino1011 陽性細菌がともにある程度存在していた。

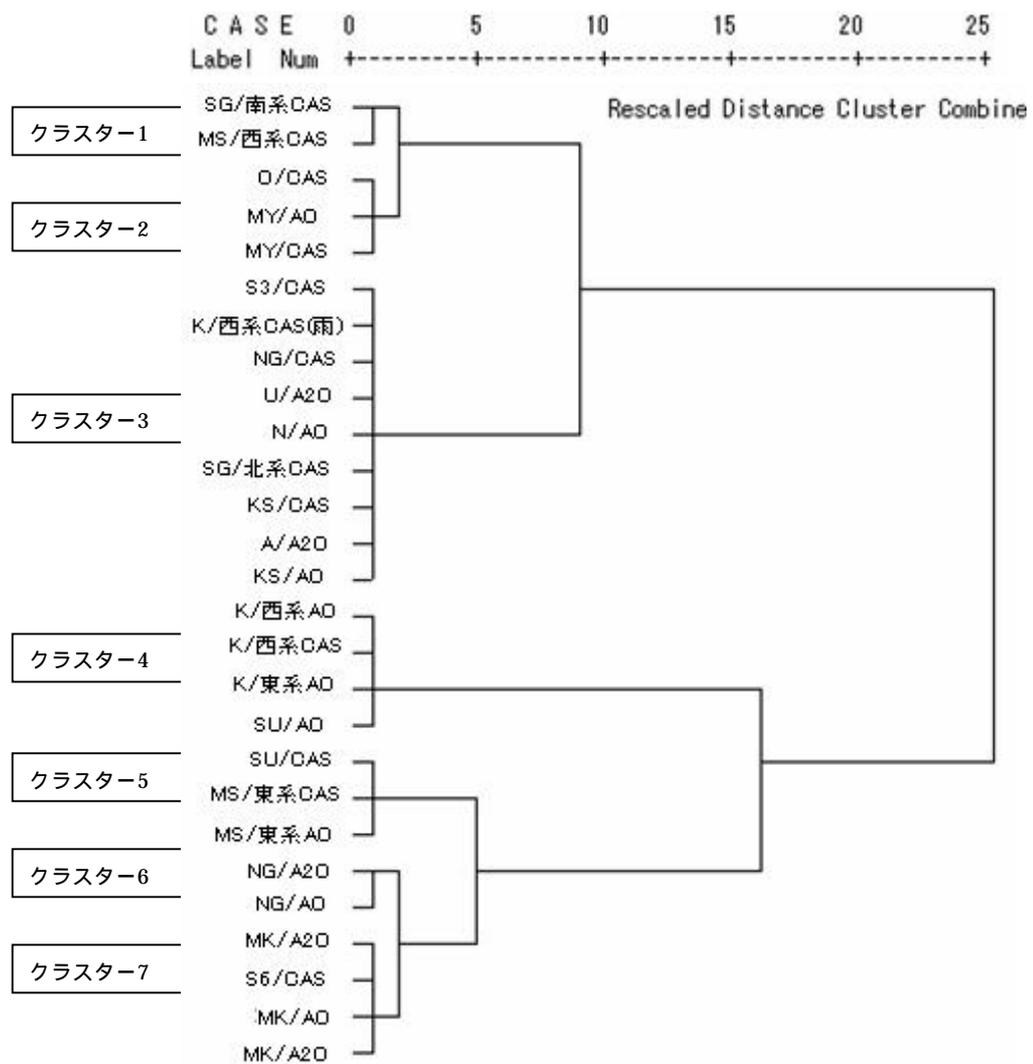


図 6.12 クラスタ解析の結果

6.6 ポリリン酸蓄積細菌の存在とリン含有率の相関関係

下水中のリンを取り除くためには汚泥中にリンを蓄積する必要がある。一般的な微生物は乾燥菌体重量あたり2%であるが、それに比べて高濃度にリンを蓄積することのできるポリリン酸蓄積細菌が多く存在していれば、リン含有率は高くなるはずで、そこには相関関係があることが予想される。そこで、本研究で行った様々なリン含有率の指標と *Accumulibacter* 及び *Actino1011* 陽性細菌の割合の比較を行った。

リン含有率の指標には、T-P/MLVSS、生体内低分子ポリリン酸、及び生物学的リン含有率 (= T-P - 金属性リン - 上澄みのリン酸) の3つの指標を用いた。

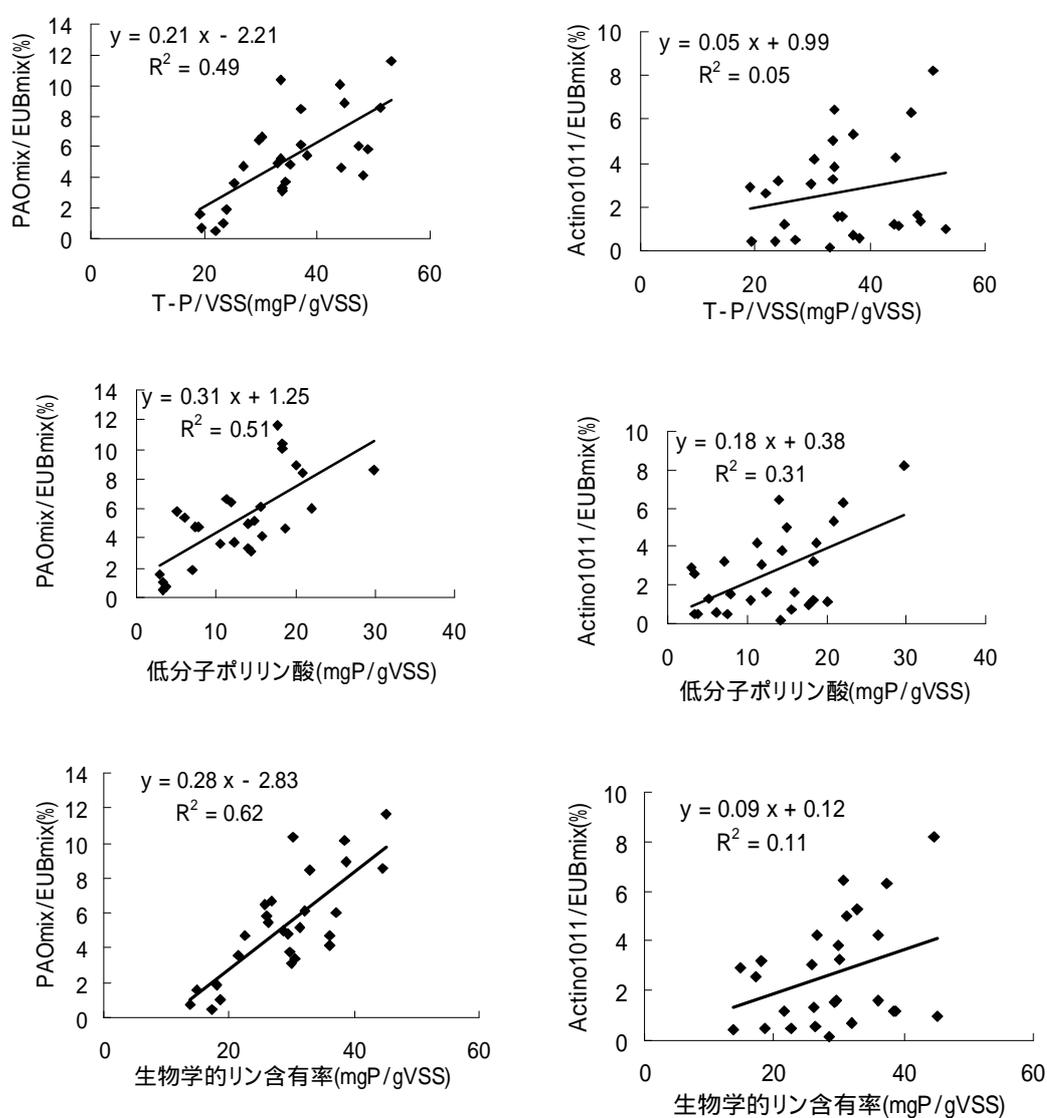


図 6.13 リン含有率とポリリン酸蓄積細菌の相関

T-P/MLVSS と PAOmix/EUBmix の相関は $R^2=0.49$ と、宇田ら(2005)や Wong et al.(2005) に比べると良い相関が得られた。また、PAOmix/EUBmix と低分子ポリリン酸及び生物学的リン含有率でも相関を取ったところ、低分子ポリリン酸では $R^2=0.52$ とあまり変化は無かったが、生物学的リン含有率では $R^2=0.62$ と T-P/MLVSS に比べて決定係数が 0.1 以上も上昇した。リン含有率は低分子ポリリン酸のみではなく、残渣に含まれる高分子ポリリン酸の影響もあるため、両方を指標に入れた生物学的リン含有率の方が相関は良くなったと考えられる。Actino1011 陽性細菌は生物学的リン含有率との相関は $R^2=0.11$ と非常に相関は低かった。

Accumulibacter と Actino1011 陽性細菌の真正細菌の割合を単純に足し合わせて生物学的リン含有率との相関を取り直したところ、図 6.14 のようになった。2 種の存在割合による相関関係は PAOmix の割合との相関と変わらず $R^2 = 0.62$ であったので、2 種の存在によっても相関は高かった。しかし、汚泥が含有するリンの量をポリリン酸蓄積細菌の存在量によって説明するということはこの 2 種のみでは完全にはできなかった。

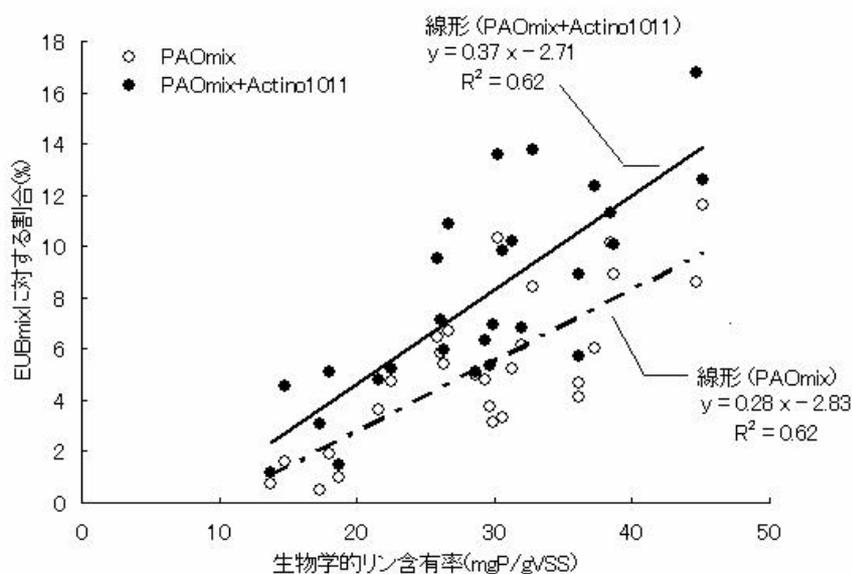


図 6.14 リン含有率とポリリン酸蓄積細菌の相関

6.7 第6章のまとめ

解析を行った 27 試料中の汚泥のリン含有率は VSS ベースで、1.7% ~ 5.1% で、生物学的リン除去がうまくいっている汚泥では上澄み中のリン酸濃度は 0.1mgP/L 以下となっていた。金属性リンは 2.2mgP/gVSS ~ 14.4mgPgVSS、汚泥全体のリンの 6 ~ 38% を占めていた。また、生体内低分子ポリリン酸は 3.0mgP/gVSS から 29.8mgP/gVSS、汚泥全体のリンの 13 ~ 58% を占めていた。

Candidatus 'Accumulibacter phosphates' (PAOmix 陽性細菌) と Actino1011 陽性細菌の真正細菌(EUB mix 陽性細菌) に対する割合をそれぞれ定量したところ、Accumulibacter は 0.5% ~ 11.6%、平均 5.3% 存在し、Actino1011 陽性細菌は 0.15 ~ 8.2%、平均 2.7% 存在していた。Accumulibacter と Actino1011 陽性細菌の存在量には、生物学的リン除去を行っている汚泥に限れば処理方式による違いは見られず、処理場や処理系の違いによるものが大きかった。また、2 種の微生物間で競合関係や共生関係は見られなかった。この微生物群の存在量は流入水中に存在する基質の利用性が重要な要素となっている可能性が高い。

Accumulibacter の存在量と生物学的リン含有率の相関を取ったところ、 $R^2=0.62$ と汚泥全体のリン含有率と相関をとった場合に比べ 0.1 以上決定係数が上昇した。汚泥全体のリン含有率から金属性リンを除いて求める生物学的リン含有率という微生物による汚泥のリン含有能力を示す指標を提案できた。Accumulibacter と Actino1011 陽性細菌の真正細菌の割合を単純に足し合わせて生物学的リン含有率との相関を取ったところ、Accumulibacter の存在割合との相関と変わらず $R^2 = 0.62$ であったが、2 種の存在によっても相関は高かった。しかし、汚泥のリン含有率はこの 2 種のみでは説明がつかず、その他のポリリン酸蓄積細菌の寄与が考えられた。

第 7 章 総括

7.1 まとめ

本研究では、実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の群集構造を明らかにするために、FISH 法を中心とする分子生物学的手法を用いて微生物解析を行った。ポリリン酸蓄積細菌のリン蓄積という代謝が活性汚泥全体のリン除去能力の指標であるリン含有率に寄与していることを示すことを目的とした。

第 4 章では、高濃度 DAPI と FISH の二重染色法によって、実処理場試料のポリリン酸蓄積細菌の群集解析を行った。実処理場試料 6 試料を解析したところ、Proteobacteria、Proteobacteria、Actinobacteria に属する細菌のみがリンを蓄積していたので、種構成はグループレベルで見ると似通っていた。しかし、その存在割合は処理場ごとにばらつきがあることが分かった。また、ポリリン酸蓄積細菌のうち、Accumulibacter は 21% ~ 57%、Actino1011 陽性細菌は 16% ~ 56% を占め、2 種の合計は 45% ~ 78% に達した。そのため、実処理場において非常に重要な役割を果たしているポリリン酸蓄積細菌であった。しかし、この 2 種以外にもポリリン酸蓄積細菌が存在することは明らかとなった。Proteobacteria

及び Actinobacteria に属する細菌では、Accumulibacter と Actino1011 陽性細菌以外で球菌、long-rod な形態を持つ細菌などが捉えられた。また、Proteobacteria に属する球菌では G バクテリアに類似した形状を持つポリリン酸蓄積細菌が存在していた。このようにポリリン酸蓄積細菌は多様であり、まだ系統学的に同定されていないポリリン酸蓄積細菌も存在していることが分かった。新規のポリリン酸蓄積細菌を含めて高濃度 DAPI によって染色されるポリリン酸蓄積細菌の群集構造の全体像を大まかに捉えることができた。

次に、第 4 章でグループレベルの FISH 法によって観察されたポリリン酸蓄積細菌のうち、第 5 章では、2 種について系統学的な同定することができた。まず 1 種目は Proteobacteria に属する G バクテリアに類似した形態を持つ細菌で、今まで知られていた種とは系統学的に離れた位置にある種であった。ポリリン酸蓄積細菌の群集像に新しい知見を加えることができた。2 種目は、Actinobacteria に属する *Nocardiodes* に近縁な球菌である。この細菌はグラム陽性でリゾチウム処理を必要とするため、通常の固定を行った FISH では検出されない種である。グルタミン酸による馴致によって、優占化していた種であるため、実処理場などでも寄与が大きい可能性は高い。また、リアクターの運転状況から、嫌気条件下でポリリン酸を吐き出して PHA を蓄積し、好気条件下でポリリン酸合成を行う狭義の PAO には属さないポリリン酸蓄積細菌である可能性が高い。

また、これらの研究を通じて、新しいポリリン酸蓄積細菌の系統学的な同定手法を提案できた。まず、既存の捉える範囲の大きいプローブによって大まかに FISH によって系統

学的な位置を探し、そのプローブの配列又は確認できた系統学的なグループを特異的に捉えるプライマーによる PCR-クローニングによりグループ特異的な配列のみを得る方法である。この方法はスクリーニング手法として有効であるのに加えて、遺伝子解析を行う前に FISH によって固定法や形態、どの程度の割合を占めているかなどの情報を知った上で実験を進めることでその後の操作が行いやすい。この手法は他の群集解析にも応用が可能であると考えられる。

微生物群集が明らかとなっても、実処理場でそれらが実際にリン除去を担っているのかということが重要である。第 6 章では実処理場 27 試料を用いて、Accumulibacter、Actino1011 陽性細菌の存在が実際に汚泥のリン除去能の指標となるリン含有率の解析を行った。真正細菌のうちで、Accumulibacter は 0.5%~11.6%、平均 5.3%存在し、Actino1011 陽性細菌は 0.15~8.2%、平均 2.7%存在していた。また、汚泥のリン除去活性を示す指標として、生物学的リン含有率という指標を提案した。汚泥中に含まれるリンには、金属性リンの影響の大きい試料も含まれるため、この金属性リンの影響を取り除いた生物が行っているリン含有率のみを正確に測定する新しい指標である。Accumulibacter の存在量と生物学的リン含有率の相関を取ったところ、 $R^2=0.62$ と汚泥全体のリン含有率と相関をとった場合に比べ 0.1 以上決定係数が上昇した。Accumulibacter と Actino1011 陽性細菌の真正細菌の割合を単純に足し合わせて生物学的リン含有率との相関を取ったところ、 $R^2 = 0.62$ であり相関が高かった。そのため、Accumulibacter や Actino1011 陽性細菌の存在が、実際に汚泥のリン含有率の増加に寄与しているということを証明できたしかし、汚泥の生物学的リン含有率はこの 2 種のみでは説明がつかないということも同時に明らかとなった。

本研究の成果によって、実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の微生物群集像に近づくことができたと考えている。

7.2 今後の展望

本研究により実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌の全体像が大まかに明らかになった。実処理場において、Accumulibacter や Actino1011 陽性細菌が主要なポリリン酸蓄積細菌であることは分かった。しかし、まだ同定ができていないポリリン酸蓄積細菌の寄与も大きいことも明らかになった。本研究によって 2 種系統学的に同定することができたが、それらは顕微鏡に観察されたポリリン酸蓄積細菌の一部に過ぎない。今後、これらの実処理場に存在するポリリン酸蓄積細菌が全て明らかとなって、処理場ごとにどのような微生物群集を構築しているのかを解析する必要がある。これらをふまえて、実処理場の生物学的リン除去プロセスの微生物群集像の解明、さらにメカニズムの完全な理解のための今後の展望を以下に述べる。

生物学的リン除去プロセスのメカニズムの解明のためには、誰がどのような代謝を行っ

てそこに生存しているのか、微生物同士の共生・競合などの相互関係はどのようになっているのかを明らかにする必要がある。本研究は「誰がリン除去を行っているか」というところに焦点をあてて研究を行ってきたが、まだ実処理場でリン除去を担っている微生物の全てが明らかとなった訳ではない。この「誰が」という部分を明らかにする研究は今後も重要な課題の1つとなる。次に、この「誰が」ということが明らかになれば、この微生物がどのような代謝を行っているのかということも明らかにする必要がある。近年、MAR-FISHによって、*Accumulibacter* や *Actino1011* 陽性細菌の基質特性などは明らかとされた(Kong et al.(2004)、(Kong et al.(2005))。しかし、どのような生理学的特徴や機能を持っていて、どのような環境に強いのかということを実際に明らかにするためには、主要なポリリン酸蓄積細菌である *Accumulibacter* の単離が重要な課題であることは間違いない。

本研究で用いた FISH 法が改良され、高感度 FISH と呼ばれる方法が開発されている。通常の FISH は蛍光を得るためには細胞の中に多く存在する rRNA を標的として行う必要があったが、高感度 FISH はプラスミド、tmRNA、mRNA の検出などにも用いられている(Zwirgmaier et al.(2005)、Pernthaler et al.(2004)は rRNA と mRNA の同時染色に成功している。この方法により単離されていない *Accumulibacter* などのポリリン酸蓄積細菌がどのような機能遺伝子を持っていてどのような代謝を行っているのかを明らかにすることが可能かもしれない。また、個々の種と代謝を結びつけるという点では、SIP(Stable Isotope Probing)法も有効である。SIP 法では基質を摂取した細菌の系統的位置も同定することが可能であるので誰が基質を食べたのかを明らかにすることができる(Radajewski et al.(2000) Manefield et al.(2002))。このような分子生物学的手法のさらなる技術革新が生物学的リン除去プロセスのメカニズムの解明に役立つはずである。

また、本研究ではポリリン酸蓄積細菌のみを対象としてきたが、これらの群集構造・代謝を明らかにすると同時に、競合細菌であるグリコーゲン蓄積細菌などその他の細菌の群集構造を把握することにより、生物学的リン除去プロセスの微生物群集像の全体像が明らかとなる。

これらの知見を集約して、包括的な微生物群集構造の理解が進むことによって、生物学的リン除去プロセスのメカニズムの解明、さらには安定的・効率的な生物学的リン除去プロセスの構築を可能とする。

第 8 章（補章） 実処理場活性汚泥中に存在する

Bacillus 属細菌の同定

8.1 概要

活性汚泥処理プロセスの安定化は最も重要な課題の 1 つである。*Bacillus* 属細菌は多くの酵素活性を有しているため、活性汚泥法に適用した場合、より多くの分解及び臭気の抑制効果が期待される。青木は活性汚泥処理プロセスの安定化や臭気対策に *Bacillus* 属細菌を利用した処理プロセスを提案している。また、村上ら(1995)はシリカを主成分とし、マグネシウムなどのミネラル溶液を添加することで、*Bacillus* 属細菌を人為的に増殖、優占化させる活性汚泥プロセスを開発した。そして Choi et al.(2002)は実際に家畜廃水処理に *Bacillus* 属細菌を利用して、有機物除去に加えて窒素・リン除去といった高度処理も行われたと報告している。

本研究で対象とした千葉県津田沼処理場では、実規模プラント、実下水を用いて *Bacillus* 属細菌を利用した廃水処理の試みを行っている。津田沼処理場によると活性汚泥中に活性剤として黒曜石及びマグネシウムを添加したところ活性汚泥中のバチルスが増殖し、実際にリン除去・窒素除去の安定化及び臭気の抑制化がなされている。

そこで、津田沼処理場活性汚泥の微生物叢に着目し、培養法及び分子生物学的手法によって *Bacillus* 属細菌を含めた微生物群集解析を行った。

8.2 実験方法

8.2.1 培養法による *Bacillus* 属細菌の同定

1%でんぷん入りの標準寒天培地によって、一般細菌の培養及び *Bacillus* 属細菌の培養を行った。*Bacillus* 属細菌は培地中のでんぷんを分解するため、コロニーの周りが白く溶解される(実験農芸化学)。この方法はバチルスの存在を示す最も簡易的な手法で、津田沼処理場におけるバチルスの存在の根拠ともなっている方法である。単離は活性を高めた状態で行う必要があるため、第 4 章でバッチ試験を行った試料を用いた。1%のでんぷんを入れた標準寒天培地をオートクレーブにかけて滅菌後、希釈倍率をふって混しゃく法で培地にまいて、37℃で 18 時間培養後、一般細菌及び *Bacillus* 属細菌の計数を行った。

8.2.2 分子生物学的手法を用いた *Bacillus* 属細菌の同定

系 1 (活性剤あり) と系 2 (活性剤なし) の返送汚泥をそれぞれ採取し、活性剤の有無による群集構造を比較の及び *Bacillus* 属細菌の同定を行うため、DGGE 法及びクローニング法を用いて比較を行った。また、単離された *Bacillus* 属細菌の活性汚泥中における同定及び定量を行うために特異的なプローブによって FISH 法を行った。

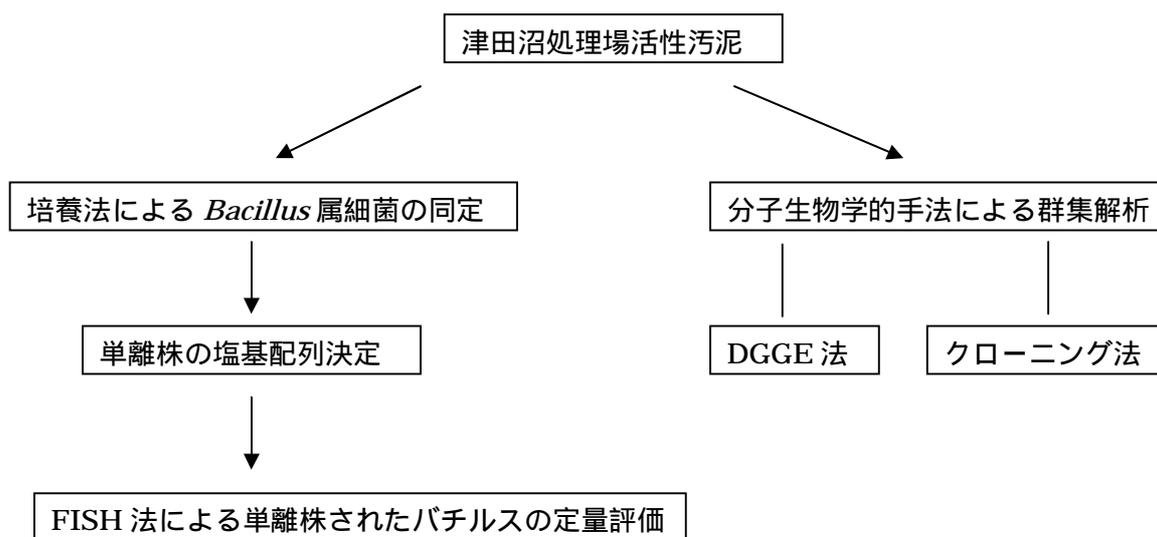


図 8.1 津田沼処理場汚泥の群集解析の流れ

8.3 実験結果

8.3.1 単離の結果

1% でんぷん入りの標準寒天培地を用いて培養を行ったところ、澱粉培地に出現したコロニー数は 6.3×10^5 cfu/ml あり、内 *Bacillus* 属細菌数 (澱粉分解能を示した菌数) は 2.5×10^4 cfu/ml であった (図 8.2)。培養法に基づく、一般細菌のうち *Bacillus* 属細菌は 4.0% であった。単離された *Bacillus* 属細菌を倍率 1000 倍で顕微鏡観察を行ったところ、図 8.3 のような桿菌が単離されていた。

8.3.2 DGGE 法による群集解析結果

DGGE 法によって、系 1 (活性剤あり) と系 2 (活性剤なし) の群集構造の全体像を比較したところ、図 8.4 のように微生物群集構造にはほとんど違いがなかった。活性剤は全体の

群集構造自体に影響を与えているというよりは、特定の菌種、すなわち *Bacillus* 属細菌の増殖にのみ影響を与えている可能性が示唆された。



図 8.2 単離の結果
(← : *Bacillus* 属細菌)

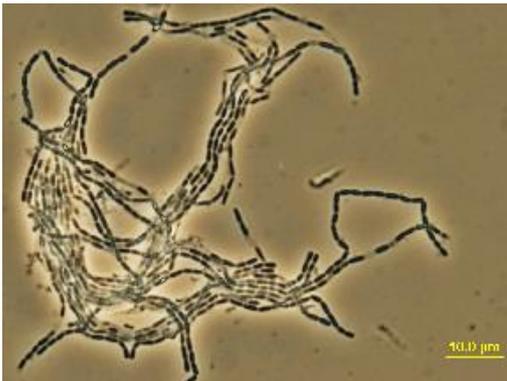


図 8.3 単離された *Bacillus* 属細菌

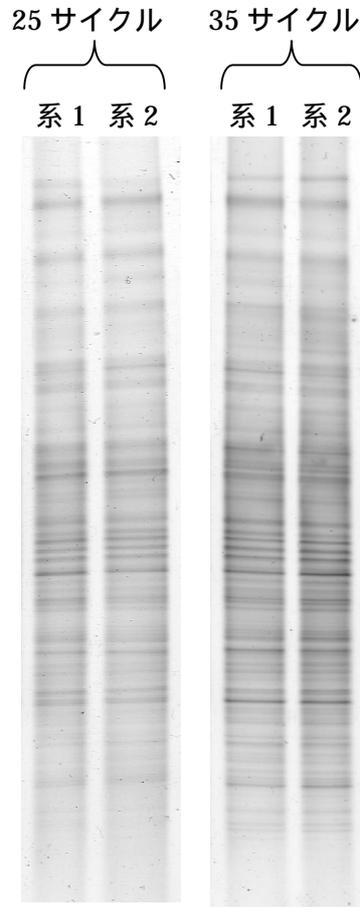


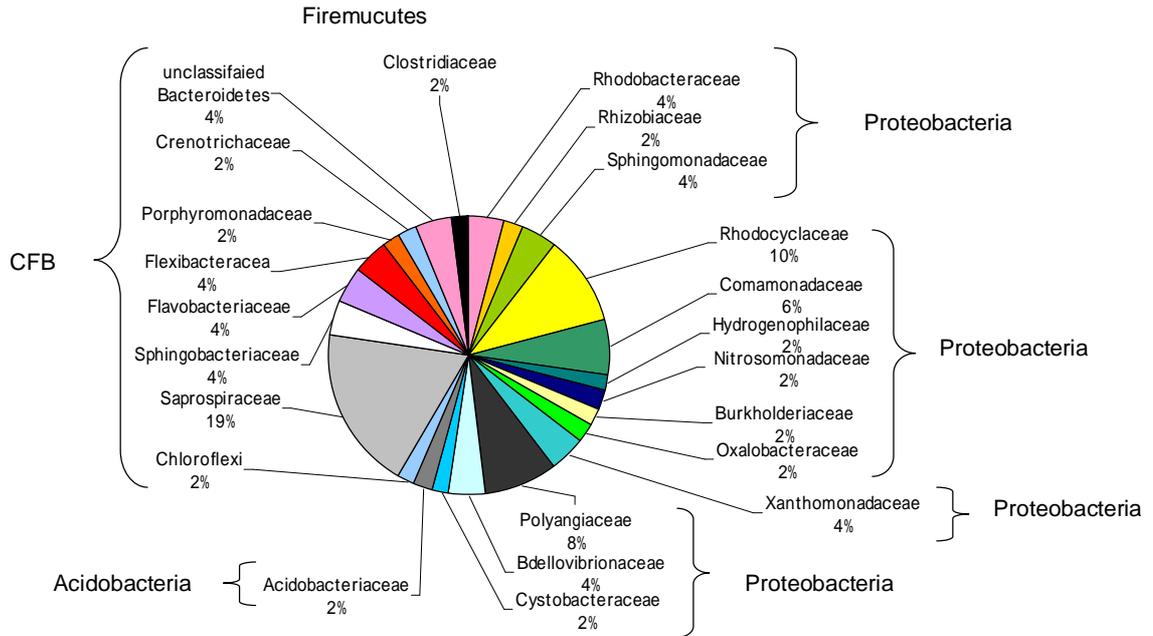
図 8.4 系 1 と系 2 の DGGE バンドの比較

8.3.3 クローニング法による結果

系 1 (活性剤あり) と系 2 (活性剤なし) についてクローニングを行い、48 クローンずつ拾い、T7 - SP6 プライマーによって PCR 増幅し、357f プライマーを用いて片側のみ塩基配列を読んだ。クローンライブラリーを作成したところ図 8.5 のようになった。他のグループに比べて CFB グループが多く出た。これは Crocetti et al.(2000) や Liu et al.(2001) でも同様のことが報告されており、クローニング法で CFB に近縁なクローンが高い頻度で起こるのは DNA 抽出と PCR のバイアスのためであると推測されている (Wintzingerode et al.(1997))。

クローニングの結果、*Bacillus* 属細菌は検出されなかった。*Bacillus* 属細菌はグラム陽性細菌であるため、細胞壁が固く核酸が抽出されなかったという可能性はあるが、48 クローンの中では検出されなかった。48 クローンでは全体のコミュニティを反映できていないと考えられるが、少なくとも 48 クローンで出なかったので、*Bacillus* 属細菌はクローニング法で見る限り、全体の 2% にも満たないということが分かった。

系 1



系 2

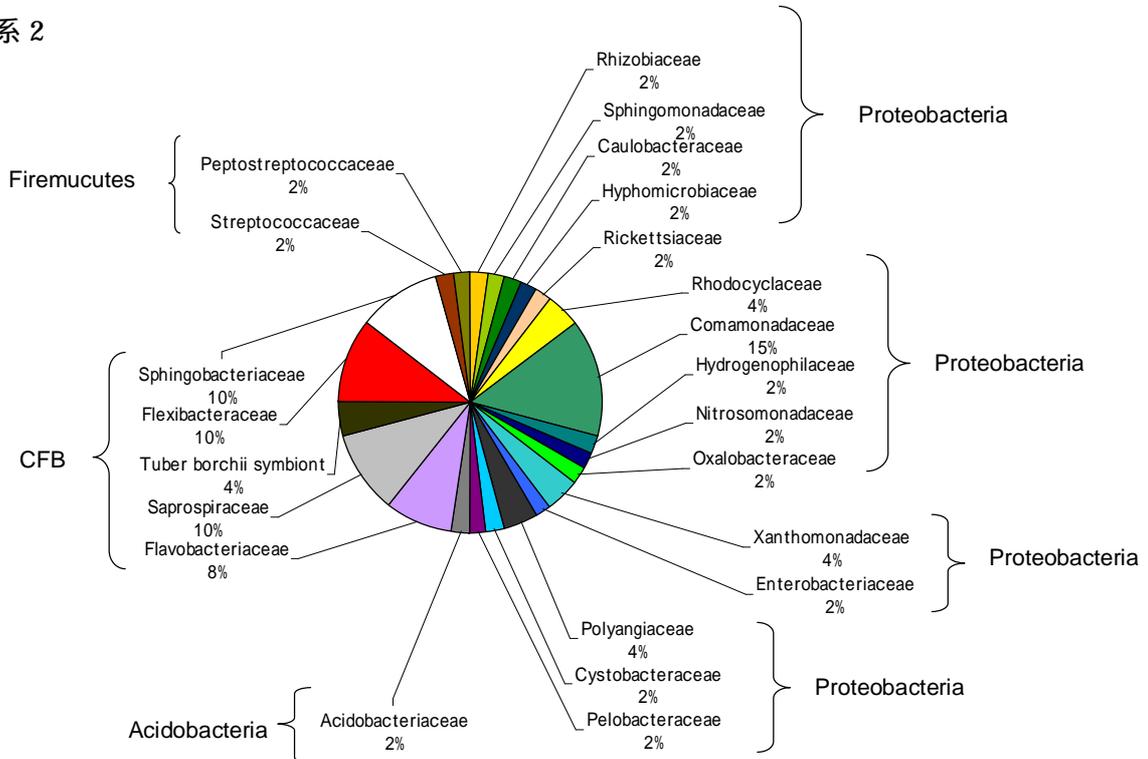


図 8.5 系 1 と系 2 のクローンライブラリー

8.3.4 単離株の塩基配列の解読

8.3.1 で寒天培地上に現れた白いコロニーを 22 株採取した。2 回画線を行って、コロニーが 1 つになったのを確認した。同じ種類の株が分離されている可能性があるので、DGGE 法によりスクリーニングを行った。DGGE 法は 357 f GC - 518r プライマーを用いて PCR を行った増幅産物を用いて行った。

泳動の結果、図 8.6 のように 22 株ともバンドが 1 本にはならなかったが、同じバンドパターンとなった。そのため、分離された 22 株は同じ種である可能性が高い。

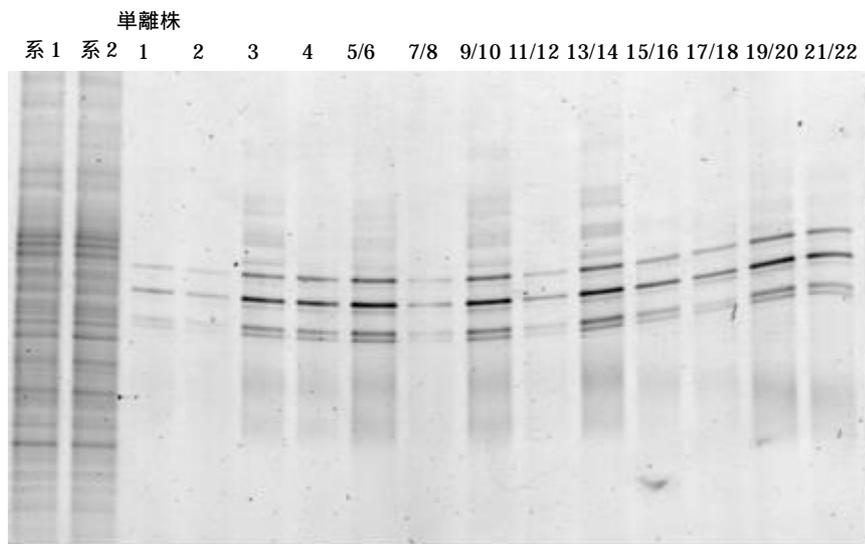


図 8.6 単離株の DGGE 法によるスクリーニング

そこで、単離株 3 と単離株 13 の塩基配列を 534r プライマーによって片側の解読を試みたところ、*Bacillus subtilis* complete genome(Z99104 AL009126)に 99%又は 100%一致していた。そのため、培地上に生えた *Bacillus* 属細菌は *Bacillus subtilis* であることが分かった。

8.3.5 FISH 法による検出

クローニング法から *Bacillus* 属細菌は検出されなかったが、培養法により *Bacillus subtilis* が検出された。そこで、FISH 法により活性汚泥中での同定を試みた。*Bacillus subtilis* を標的とするプローブはマイクロアレイによるものが Liu et al.(2005)によっていくつか設計されている。そのうち、本研究で読んだ 500bp 程度の配列にも相補的な関係を持つプローブを 1 つ選んだ(表 1)。このプローブを活性汚泥に FISH プローブとして用いる

際の、固定の条件、ハイブリダイゼーション条件を検討した。*Bacillus subtilis* はグラム陽性細菌であるため、固定はエタノール固定を行ったところ EUBmix プローブによって蛍光を得られたのでプローブの浸透には問題はなく、リゾチウム処理などの必要はなかった。ハイブリダイゼーション条件の検討にはポジティブコントロールとして単離した *Bacillus subtilis*、ネガティブコントロールとして一塩基違いの *Bacillus valtimortilis* を用いた。ホルムアルデヒド濃度を 5%、10%、20%、30%、40%で行ったところ、表 2 のように 5%、10%のみでしか蛍光を得られなかった(図 8.7)。ただ、ホルムアルデヒド濃度を 5%としても、蛍光は弱かった。しかし、ネガティブコントロールは 5%でも蛍光を発しなかったため、検出は可能であると判断して、活性汚泥に適用した。

表 1 *Bacillus subtilis* を標的とするプローブの塩基配列

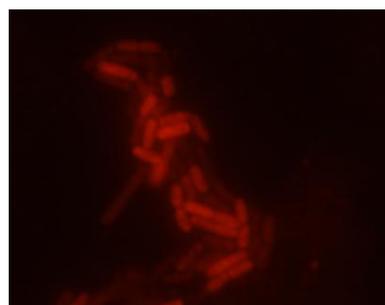
	Probe sequence(5'-3')	position	reference
B.subtilis175	GGTTCAAACAACCATCCG	175	Liu et al.(2005)

表 2 B.subtilis175 プローブの条件検討

		ホルムアミド濃度				
		5%	10%	20%	30%	40%
positive control	(B.subtilis)	+	+	-	-	-
negative control	(B.valtimortilis)	-	-	-	-	-



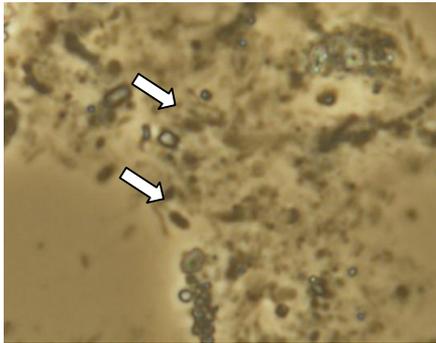
B.subtilis (位相差図)



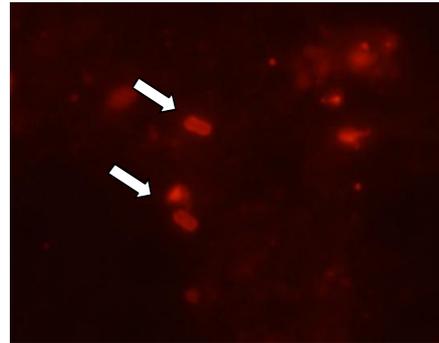
Cy3 (ホルムアミド濃度 5%)

図 8.7 B.subtilis174 プローブの純菌への適用

B.subtilis175 プローブをホルムアミド濃度 5%で、習志野処理場活性汚泥系 1 に適用した(図 8.8)。*Bacillus subtilis* の存在は確認することができたが、FISH 法によって定量できるほどは存在していなかった。



位相差図



B.subtilis174(cy3)

図 8.8 B.subtilis174 プローブの汚泥への適用

8.4 第 8 章のまとめ

培養法及びクローニング法により、津田沼処理場の *Bacillus* 属細菌を利用した活性汚泥プロセスにおける *Bacillus* 属細菌の同定及び群集解析を行った。クローニング法で 48 クローン中には *Bacillus* 属細菌は含まれなかったが、培養法により *Bacillus subtilis* が同定された。同定された *Bacillus subtilis* に特異的な FISH プローブを設計したところ、FISH 法によってその存在は確認された。しかし、その存在割合はそれほど高くなく、FISH 法では困難であった。*Bacillus* 属細菌は存在量が少なくても、その酵素活性で非常に有用な細菌の可能性はある。今後、定量 PCR などのより感度の高い定量法によって評価していく必要がある。

謝辞

本研究を行うにあたり、指導教官である味埜俊教授、佐藤弘泰助教授には大変お世話になりました。味埜先生は私が学部4年生のときから2年半にわたってご指導をいただきました。研究内容に関して無知であった私が、卒業論文を書き、修士論文を書き上げるまでに成長することができたのは先生のご指導あってのことであると思っています。佐藤先生は私が修士に入ってからのご指導教官になっていただきました。私が修士に入るタイミングで佐藤先生がAITから戻ってこられたのは私にとっては非常に幸運でした。研究に関することはもちろん、文章の書き方、論理の組み立て方など非常に貴重なご指導をいただきました。

小貫元治講師は、本論文の大きな柱である第4章の研究の発案者でもあります。この研究を柱に本論文が出来上がったといっても過言ではありません。また、研究に関する鋭いご指摘、ご指導をいただきました。

鯉淵幸雄講師には、本論文の副指導教官を引き受けていただき、貴重なご指摘をいただきました。

本研究を主に行っていた9号館メンバーには非常にお世話になりました。9号館責任者である岩井祥子さん、末岡一男さんには非常に感謝しています。9号館の非常に整った実験環境があったからこそ、自分の研究を進めることができたと思っています。

また味埜研究室の先輩方には非常にお世話になりました。小田和賢一さんは分子生物学的手法の高度なことから、PCRのバンドが出る、出ないといった初歩的なところまでいつも助言をいただいていたばかりでした。福島寿和さんは私の研究テーマである分子生物学的手法を用いた生物学的リン除去の解析の道をいわば切り開いてきた方で、いつも先進的な考え方をもちました。研究の進め方から実験方法、文章の書き方などいつも相談にのっていただきましたことを非常に感謝しております。

14号館では実験をする機会が少なく、不慣れなことが多かったですが、技官の唐沢祥嗣さんや中川博之さん、田中秀治君に手伝っていただいたことでなんとかやり遂げることができました。

最後に同学年のみんなと切磋琢磨することができたことで、この論文が完成したと思っています。

様々な方にお世話になれたおかげで、本論文が完成したのだと思っています。どうもありがとうございました。

参考文献

英文

Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., (1995-a). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.

Amann, R. (1995-b) In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Molecular Ecology Manual* 3.3.6, 1-15

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

Beer, M., Kong Y. H., and Seviour R. J. (2004) Are some putative glycogen accumulating organisms (GAO) in anaerobic:aerobic activated sludge systems members of the –Proteobacteria *Microbiology* 150:2267–2275.

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

Bond, P.L., Hugenholtz, P., Keller, J., and Blackall, L.L. (1995) Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Appl Environ Microbiol* 61: 1910-1916.

Bond, P.L., Erhart, R., Wagner, M., Keller, J., and 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.

Blackall, L.L., Seviour, E.M., Bradford, D., Rossetti, S., Tandoi, V., Seviour, R.J., (2000). ‘*Candidatus Nostocoidalmicola*’, a filamentous bacterium from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 703–709.

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 phosphorous removal activated sludge systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4077–4084.

Crocetti, G.R., Hugenholtz, P., Bond, P.L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D., Blackall, L.L., (2000) Identification of polyphosphate accumulating organisms and design of 16SrRNA directed probes for their detection and quantification. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1175–1182.

Crocetti, G.R., Banfield, J.F., Keller, L., Bond, P.L., Blackall, L.L., (2002) Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology* 148, 3353–3364.

Dabert, P., Sialve, B., Delgenes, J.-P., Moletta, R., Godon, J.-J., (2001) Characterization of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorous removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 500–509.

Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H., 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.

Erhart, R., D. Bradford, R. J. Seviour, R. Amann, and L. L. Blackall. (1997) Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for the detection and identification of "*Microthrix parvicella*" in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* 20:310–318.

Ferris, M. J., Muyzer, G., and Ward, D. M. (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16s rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62,34&346

Ferris, M. J., Muyzer, G., Ward, D. M. (1997) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting a Hot Spring Microbial Mat Community. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 340–346.

.Gray,N.D. Howarth, R. Rowan, A. Pickup, R. W. Jones, J. G. Head, I. M. (1999) Natural community of *Achromatium oxaliferum* comprise genetically, morphologically, and ecologically distinct subpopulations. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5089–5099.

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.

Hesselmann, R.P.X., Werlen, C., Hahn, D., van der Meer, J.R., 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.

Hugenholtz, P., Tyson, G. W., Webb, R. I., Wagner, A. M., Blackall, L. L. (2001) Investigation of candidate of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 411–419.

Hugenholtz, P., Gene, W., Tyson, W., A. M., Blackall, L. L. (2001) Design and evaluation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization. *Methods in Molecular Biology*, 176, 29-41

Jeon, C.O. and Park, J.M. (2000) Enhanced biological phosphorous removal in a sequencing batch reactor fed with glucose as a sole carbon source. *Water Res.* 34, 2160-2170.

Kawaharasaki, M., Kanagawa, T., Tanaka, H. Nakamura, K.(1998) Development and application of 16S rRNA-targeted probe for detection of the phosphate accumulating bacterium *Micrococcus phosphovorus* in an enhanced biological phosphorus removal process. *Water Sci. Technol.* 37, 481-484.

Kawaharasaki, M., Tanaka, H., Kanagawa, T., Nakamura, K., (1999) In situ identification of polyphosphate accumulating bacteria in activated sludge by dual staining with rRNA targeted oligonucleotide probes and 40,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) at a polyphosphate-probing concentration. *Water Res.* 33, 257–265.

Kong, Y., Beer, M., Seviour, R.J., Lindrea, K.C., Rees, G.N., (2002-a) Functional analysis of microbial communities in sequencing batch reactor fed with different phosphorous/carbon (P/C) ratios. *Microbiology* 148, 2299–2307.

Kong, Y., Ong, S.L., Ng, W.J., Liu, W.-T., (2002-b) Diversity and distribution of a deeplybranched novel proteobacterial group found in anaerobic–aerobic activated sludge process. *Environ. Microbiol.* 4, 753–757.

Kong, Y., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., (2004) Microautoradiographic study of Rhodocyclus-related polyphosphate accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorous removal plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5383–5390.

Lee, N., Nielsen, P.H., Andreasen, K.H., Juretschko, S., Nielsen, J.L., Schleifer, K.-H., Wagner, M., (1999) Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography—a new tool for structure-function analyzes in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1289–1297.

Lee, N., Nielsen, P.H., Aspegren, H., Henze, M., Schleifer, K.-H., la Cour Janssen, J., (2003). Long-term population dynamics and in situ physiology in activated sludge systems with enhanced biological phosphorous removal operated with and without nitrogen removal. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 211–227.

Liu, W., Linning, K.D., Nakamura, K., Mino, T., Matsuo, T., and Forney, L.J. (2000) Microbial community changes in biological phosphate-removal systems on altering sludge phosphorus content. *Microbiology* 146: 1099-1107.

Liu, W.-T., Nielsen, A.T., Wu, J.-H., Tsai, C.-S., Matsuo, Y., Molin, S., (2001) In situ identification of polyphosphate and polyhydroxyalkanoate accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process. *Environ. Microbiol.* 3, 100–122.

Liu, W.-T., Huang C-L., Hu J Y, Song L., Ong S. L., Ng W. J., (2002) Denaturing gradient gel electrophoresis polymorphism for rapid 16SrDNA clone screening and microbial diversity study. *J. Biosci. Bionng.* 93, 101–103.

Liu, Y., Zhang, T., Fang, H. H. P., (2005) Microbial community analysis and performance of a phosphate-removing activated sludge. *Bioresource Tech.* 96, 1205-1214

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. & Schleiffer, K.-H. (1992). Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* 15, 593–600.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., Schleifer, K.-H., (1996). Application of a suite of 16SrRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophage-Flavobacter-Bacteroides in the natural environment.

Microbiology 142, 1097–1106.

Maszenan, A.M., Seviour, R.J., Patel, B.K.C., Schumann, P., Burghardt, J., 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., Schleifer, K.-H., (1999) .Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of Gram-positive bacteria with low G+C content. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 186–196.

Mino, T., Matsuo, T., (1984) Estimation of chemically phosphorus in the activated sludge, Newsletter of IAWPRC's Study Group

Mino, T., Kawakami, T., Matsuo, T. (1984) Location of phosphorus in activated sludge and function of intracellular polyphosphate in biological phosphorus removal process. *Wat. Sci. Tech.*, 17, 93-106

Mino, T., Kawakami, T., Matsuo, T. (1985) Behaviour of intracellular polyphosphate in the biological phosphate removal. *Wat. Sci. Tech.*, 17, 11-21

Mino, T., Liu, W.-T., Kurisu, F., and Matsuo, T. (1995) Modelling glycogen storage and denitrification capability of microorganisms in enhanced biological phosphate removal processes. *Water Sci Tech* 31 (2): 25-34.

Mino, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., (1998) Microbiology and biochemistry of enhanced biological phosphate removal process. *Water Res.* 32, 3193–3207.

Nakamura, K., Ishikawa, S., Kawaharasaki, M., (1995). Phosphate uptake and release activity in immobilized polyphosphate accumulating bacterium *Micrococcus phosphovorans* strain NM-1. *J. Ferment. Bioeng.* 80, 377–382.

Moyer, C. L., Tiedje, J. M., Dobbs, F. C., and Karl, D. M. (1996) A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature.

Appl. Environ. Microbiol., 62, 2501-2507

Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695–700.

Muyzer, G. (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2, 317-322

Nielsen, A.T., Liu, W.-T., Filipe, C., Grady, L.J., Molin, S., Stahl, D.A., (1999) Identification of novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1251–1258.

Oyaizu, H., Kim, H., Takahachi, I., Syzuki, S., Sato, H., Mino, T., (2000) Analysis of complex microbial community in soil and wastewater treatment processes by cloning method. COE 形成プログラム「複合微生物系の機能を利用した高度水処理技術の体系化とその評価」東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 COE 研究プロジェクト

Nubel, U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R. I. Amann, W. Ludwig, and H. Backhaus. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 178:5636–5643.

Pernthaler, A., Amann, R., (2004) Simultaneous fluorescence in situ hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5426–5433..

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.

Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. (1994.) In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G1C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* 140,2849–2858.

Schuler, A. J., Onuki, M. Satoh, H. Mino, T.(2002) Density separation and molecular methods characterize enhanced biological phosphorus removal system populations. *Wat. Sci. tech.* 46, 195-198

Schuppler, M. Wagner, M. Schon, G. Gobbel, U. B., (1998) In situ identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbiol.* 144, 249-259

Seviour, R.J., Mino, T., Onuki, M., (2003) The microbiology of biological phosphorous removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 99–127.

Spring, S., Wagner, M., Schumann, P., 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. Microbiol.* 55, 621–629.

Stante, L., Cellamare, C.M., Malaspina, F., Bortone, G. and Tiche, A. (1997) Biological phosphorus removal by pure culture of *Lampropedia* spp. *Water Res.* 31, 1317-1324.

Streichen M., Golecki J. R. and Schön G. (1990) Polyphosphate-accumulating bacteria from different processes for biological phosphorus removal. *FEMS Microb. Ecol.* 73, 113-129.

Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedl, D., 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 792–800.

Weller R., Glöckner F. O. and Amann R. (2000). 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the in situ detection of members of the phylum *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*. *System. Appl. Microbiol.* 23: 107-114.

Wintzingerode, F.V., Gobel, U.B., and Stackebrandt, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21:213-229.

Wong, M.-T., T.Mino, Seviour R.J., Onuki M. 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.

Yu, Z., Morrison, M. (2004) Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial community by PCR-Denaturing Gradient Gel

Electrophoresis, Appl. Environ. Microbiol. 4800-4806

Zilles, J.L., Peccia, J., Kim, M.-W., Hung, C.-H., Noguera, D.R., (2002). Involvement of Rhodocyclus-related organisms in phosphorous removal in full-scale wastewater treatment plants. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2763–2769.

Zwirgmaier, K., (2005) Fluorescence in situ hybridisation (FISH) – the next generation, FEMS Microbiology Letters 246 , 151–158

和文

大江華(2004), アミノ酸を主要な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生科学研究科環境学専攻社会文化環境コース修士論文

岡本真由子(2003), 生物学的リン除去を担う微生物の探索及び同定, 東京大学大学院新領域創生科学研究科環境学専攻社会文化環境コース修士論文

小貫元治(2001), PCR-DGGE法を中心とする微生物群集解析手法を用いた生物学的リン除去を担う微生物の検索, 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻博士論文

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構造: 現状と展望, 水環境学会誌 8月号 479 - 483

栗栖太(1997), 高温接触酸化排水処理における微生物群集解析, 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻博士論文

社団法人 日本下水道協会(1997), 下水道試験方法

福島寿和(2002), 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専攻社会文化環境コース修士論文

味埜俊(1982), 活性汚泥内のリン化合物組成に注目した生物学的リン除去過程に関する基礎的研究

味埜俊，松尾友矩，川上智規(1983-a)，活性汚泥のリン組成とリン代謝に関する研究(第1報) - STS法を用いた汚泥内リン組成の分析 - ，下水道協会誌，vol20，No.228，1 - 9

味埜俊，松尾友矩，川上智規(1983-b)，活性汚泥のリン組成とリン代謝に関する研究(第2報) - 各種リン組成を持つ汚泥の形成とそのリン組成変化 - ，下水道協会誌，vol20，No.229，1 - 8