

2006 年度 修 士 論 文

MAR-FISH 法を用いたポリリン酸蓄積細菌とグリコーゲン蓄積

細菌の競合関係の評価

MAR-FISH analysis of competition between poly-phosphate accumulating
organisms and glycogen accumulating organisms

藤 原 和 也

FUJIWARA, Kazuya

東京大学大学院新領域創成科学研究科

環境学研究系 社会文化環境専攻

目次

目次

i - iii

第 1 章 序論	1
1.1 研究背景	1
1.2 本研究の目的	2
1.3 本論文の構成	2
第 2 章 既往知見の整理	4
2.1 生物学的リン除去プロセスの原理	4
2.1.1 生物学的リン除去プロセスの原理	4
2.1.2 生物学的リン除去プロセスの悪化	6
2.2 ポリリン酸蓄積細菌とグリコーゲン蓄積細菌	7
2.2.1 ポリリン酸蓄積細菌 (PAOs)	7
2.2.2 グリコーゲン蓄積細菌 (GAOs)	8
2.2.3 PAOs と GAOs の競合関係	10
2.3 <i>in situ</i> での基質利用特性解析手法 (FISH 法および MAR 法)	12
2.3.1 FISH 法	12
2.3.2 MAR 法	13
2.3.3 MAR-FISH 法	15
2.3.4 MAR-FISH 法による定量評価の試み	15
第 3 章 実験材料および方法	16
3.1 概要	16
3.2 供試生物試料	16
3.2.1 純菌試料	16
3.2.2 活性汚泥試料	16
3.3 使用したラジオアイソトープ標識化合物	17
3.4 化学分析法	17
3.4.1 溶存イオン濃度の測定	17
3.4.2 MLSS	17

3.5	分子生物学的手法	17
3.5.1	MAR-FISH 法	17
3.5.2	顕微鏡観察	19
3.5.3	細菌数の定量	19
3.5.4	画像処理および画像解析	19
第 4 章	MAR-FISH 法による基質摂取量比較法の検討	24
4.1	概要	24
4.2	実験方法	24
4.2.1	供試菌株および使用培地	24
4.2.2	放射性基質を用いた培養 (hot 培養)	
	- 1 種類の純菌による試験 -	25
4.2.3	放射性基質を用いた培養 (hot 培養)	
	- 2 種類の純菌による試験 -	27
4.2.4	露光時間の検討	29
4.2.5	画像解析	29
4.2.6	基質摂取量と銀粒子面積の関係性の評価	30
4.3	実験結果および考察	31
4.3.1	露光時間の検討	31
4.3.2	純菌 1 種類を用いた検討	32
4.3.3	純菌 2 種類を用いた検討	37
4.4	結論	42
第 5 章	MAR-FISH 法による PAO-GAO の基質摂取量の比較	43
5.1	概要	43
5.2	実験方法	43
5.2.1	供試活性汚泥および試料調製	43
5.2.2	バッチ試験 (hot 培養および cold 培養)	43
5.2.3	露光時間の検討	44
5.2.4	画像解析	45
5.2.5	銀粒子面積の計算	46
5.3	実験結果および考察	47
5.3.1	露光時間の検討	47
5.3.2	cold 試験の結果	51

5.3.3 hot 試験の結果（銀粒子面積による基質摂取量の比較）	56
5.4 結論	63
第 6 章 総括および結論	64
6.1 総括	64
6.2 今後の展望	65
謝辞	66
参考文献	68

第 1 章 序論

1.1 研究背景

高度成長期に顕在化した公害問題の 1 つに、水質汚濁、富栄養化が挙げられる。これらは旺盛な生産活動、消費活動の下で、有害物質や生活排水等が水域に流入したことが原因で発生した公害であった。その後の公害規制や企業努力によって、水質にまつわる多くの公害問題が改善の方向に向かっているが、富栄養化については未だに決定的な解決が見られていない。

富栄養化は、生活排水や工場排水、農業排水等に含まれる窒素、リンが、湖沼や内湾等の閉鎖性水域に流入することで生じる問題である。多量の窒素、リンが水域に流れ込むことにより水域内の一次生産者の活性が飛躍的に高まり、結果として赤潮やアオコなどを誘発する。これらの現象は、漁業被害、取水被害を引き起こすだけでなく、水域の生態系に悪影響を及ぼす。このため、富栄養化の防止や、既に富栄養化した湖沼の環境改善が水域環境保全における重要な課題となっている。

リンは富栄養化の原因物質の 1 つである。生活排水や工場排水、農業排水には少なからず含まれており、水域に排出される前に、下水処理場で除去される場合が多い。排水からのリン除去は物理化学的手法と、生物学的手法に大別される。前者は確実性が高いが、コストがかさむ、大量の汚泥が発生する等の問題点を有する。一方で生物学的手法は安価であるが、処理水質が一定しないという課題がある。

生物学的にリンを除去する方法は、30 年ほど前に活性汚泥法を改良して開発され、現在では世界中に広く普及している方法である。しかしながら、生物学的リン除去プロセスについては未解明の部分が極めて多く、実処理場での運用は、多くの部分を経験に頼っているのが現状である。このため、良好な運転状況を維持すること、あるいは悪化時の回復運転が極めて難しいとされている。一方で、水域への排水に対する環境基準は、ますます厳しくなる傾向にあり、処理場での安定的で効率的なリン除去が強く求められるようになってきている。

下水中からのリン除去は、汚泥中に存在するポリリン酸蓄積細菌（通称 PAOs）と呼ばれる細菌によって実現されている。リン除去が悪化する理由として、この PAOs が活性を失うことが考えられるが、その理由はいろいろと提案されている。たとえば、生物学的リン除去プロセスは嫌気槽と好気槽で構成されているが、嫌気槽に硝酸や亜硝酸が混入することで完全嫌気が実現されず、PAOs が十分な働きをできなくなる可能性、プロセス中に PAOs にとって有毒な何らかの物質（たとえば、過酸化水素。臭気を消す目的で投入されることがある）により、PAOs の活性が失われる可能性、嫌気槽における基質量が何らかの原因で過少となり（たとえば、雨によって下水が希釈される等）、PAOs が積極的に増殖できなくなる可能性、プロセス中に PAOs と競合する、リン除去に寄与しない細菌群が優占化してしまう可能性などである。リン除去の悪化を説明する

試みが数多くなされてきたが、決定的な知見は未だに得られていない。近年では、分子生物学的な手法が注目されており、PAOs の種類や代謝の解析、PAOs の単離の試み、PAOs の競合細菌の探索等が積極的に行われている。しかしそれでも、悪化の原因はおろか、プロセス中に存在する微生物群集についても未解明な部分が多いまだ。

1.2 本研究の目的

前節でも述べたように、生物学的リン除去プロセスは不安定なシステムであり、より安定的で効率的な運転方法の確立が求められている。しかしながら、実処理場においても実験室規模のリアクターにおいても、生物学的リン除去プロセス中にどのような細菌が存在し、どのような機能を担っているのかについて、知見が不足しており、プロセス全体の微生物相を説明できる状態ではない。生物学的リン除去プロセスの安定的、効率的な運転のためには、プロセスを構成する微生物種、とりわけリン除去を担う細菌群やそれらと密接な関係を有する細菌群（たとえば競合細菌や共生細菌等）についての知見を集積することが必要となる。

そこで本研究では、生物学的リン除去プロセスにおいてリン除去を担っている細菌群（PAOs）と、PAOs と基質競合の関係にある細菌群について、その競合関係を調査することを目的とした。PAOs とその競合細菌の関係を調査・解明することで、PAOs が優占的に増殖する条件を探索し、プロセスの安定的な運転に寄与する情報を取得する。

基質摂取能に関する情報を得ることができる手法（MAR-FISH 法）を適用し、培養時の pH の変化が、系内に存在する PAOs およびその競合細菌の基質摂取量、および両者間の競合関係に及ぼす影響を調査した。

1.3 本論文の構成

本論文の概略を以下に示す。本章において研究の背景と目的を、第 2 章で本研究と関連の深い既往の知見を整理した。第 3 章では本研究で私用する実験手法について説明し、第 4 章および第 5 章で実験結果および考察を述べた。第 6 章では本研究の成果をまとめた上で、今後の展望を記述した。

第 1 章 序論

本研究の背景と目的、および構成を述べた。

第 2 章 既往知見の生理

本研究と関連の深い、既存の知見を整理した。

第3章 実験材料および方法

本研究で行った実験の試料および方法を記述した。

第4章 MAR-FISH 法による基質摂取量比較法の検討

MAR-FISH 法を用いることで、基質摂取量の多寡を表現できるかどうか、あらかじめ確認した。

第5章 MAR-FISH 法による PAOs と GAOs の基質摂取量の比較

実処理場の汚泥を対象に、培養初期の pH が異なる状態で PAOs と GAOs の基質摂取量を比較し、初期 pH が PAOs あるいは GAOs に及ぼす影響を解析した。また、両者の競合関係を評価した。

第6章 総括および結論

本研究の成果と今後の展望をまとめた。

第 2 章 既往知見の整理

2.1 生物学的リン除去プロセスの原理

2.1.1 生物学的リン除去プロセスの原理

下水中から有機物を取り除く方法として、活性汚泥法が古くから処理場で採用されてきた。この手法は、「活性汚泥」と呼ばれる微生物群を下水と接触させ、微生物の働きによって下水中から有機物を除去するものである。生物学的リン除去プロセス（Enhanced Biological Phosphorus Removal process: EBPR process）は、活性汚泥法を改良したものであり、下水中から有機物とリンを同時に除去するプロセスである。

生物学的リン除去プロセスは1970年代半ばに、その基本プロセスが提案された(Barnard, 1975)。この処理法は嫌気好気活性汚泥法とも呼ばれ、図 2.1 に示す複数の槽から構成される。下水は最初沈殿池で大型の浮遊物を除去された後、まず嫌気槽に導入される。嫌気槽では有機物の除去とリン酸の下水中への吐き出しが同時に生じる（図 2.2）。続いて下水は好気槽に導入される。好気槽において、嫌気槽で吐き出した以上のリン酸の取り込みが生じ、結果として下水中からリンの除去が達成される（図 2.2）。

生物学的リン除去プロセスにおいて、リン除去に重要な役割を果たしているのが、ポリリン酸蓄積細菌（Poly-phosphate Accumulating Organisms: PAOs）である。PAOs は図 2.3 に示すような代謝様式を有していると考えられている。PAOs は体内にポリリン酸を蓄積することができ、これを加水分解してエネルギーを得、嫌気条件下で有機物を優先的に摂取することができる。摂取した有機物は、PHA（Poly-HydroxyAlcanoate）と呼ばれる貯蔵物質に変換し、体内に蓄積する。続く好気条件下では、蓄積した PHA をエネルギー源・炭素源として用い、増殖を行う共に、細胞外に存在するリン酸を摂取してポリリン酸の再合成を行う。PAOs は嫌気条件下で積極的に有機物の除去が可能であるため、嫌気好気プロセス内では、他の従属栄養細菌に優占して増殖することが出来る。このため、生物学的リン除去プロセス内では、PAOs が優占した状態が維持されているとされている。

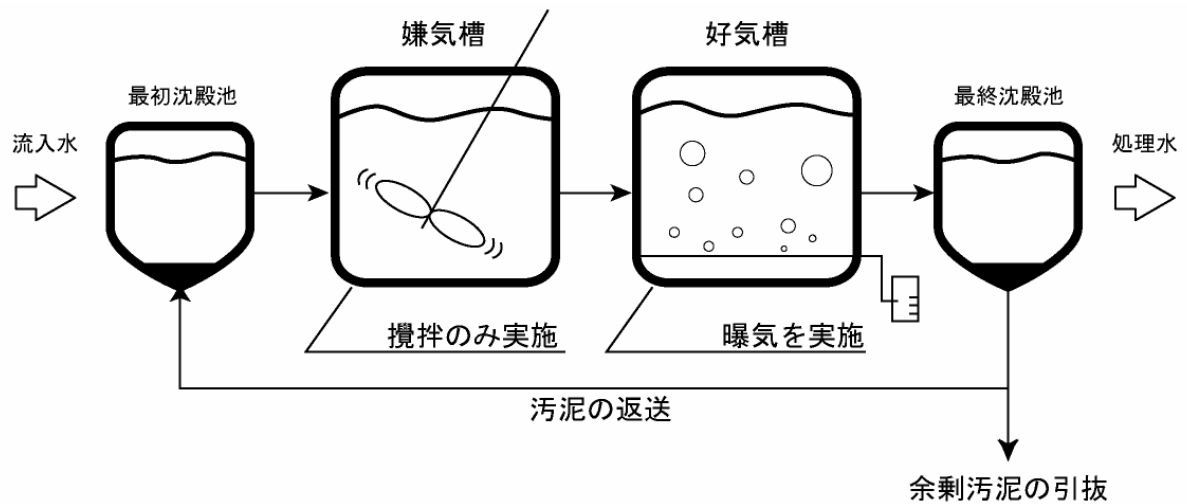


図 2.1 生物学的リン除去プロセスの構成

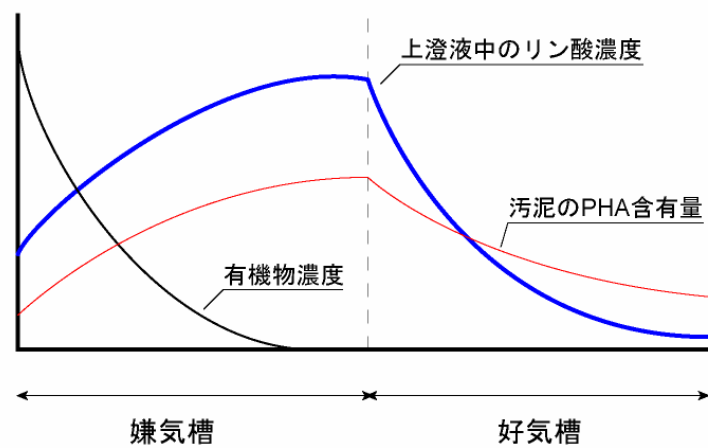


図 2.2 生物学的リン除去プロセス内での有機物およびリン酸濃度の変化

嫌気槽では有機物濃度が減少するとともに、上澄液中のリン酸濃度および汚泥のPHA含有量が増加する。好気槽ではPHA量の減少と上澄液中のリン酸濃度の減少が見られる。

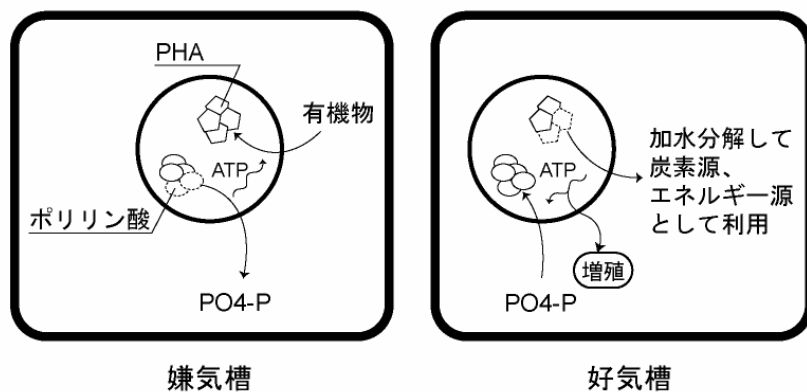


図 2.3 ポリリン酸蓄積細菌（PAOs）の代謝

嫌気槽では体内に蓄積したポリリン酸を加水分解してエネルギーを得、有機物を取り込みPHAとして体内に蓄積する。続く好気槽では、体内のPHAを加水分解して、炭素源、エネルギー源として使用し、増殖やポリリン酸の再合成を行う。

2.1.2 生物学的リン除去プロセスの悪化

生物学的リン除去プロセスは必ずしも安定な処理方式とは言えない。本プロセス内には、PAOsと競合関係にある細菌も存在しており、彼らの存在がプロセスの悪化を招く場合があることが指摘されている。競合細菌の一つとして、グリコーゲン蓄積細菌（Glycogen Accumulating Organisms: GAOs）と呼ばれる細菌が挙げられる（Mino *et al.*, 1995）。彼らは、ポリリン酸の代わりにグリコーゲンを体内に蓄積することができ、嫌気条件下でグリコーゲンを分解し、エネルギーおよび還元力を得、有機物摂取を行っていると考えられている。GAOs が PAOs を駆逐してしまった場合、図 2.4 に示すような水質挙動を示すこととなり、リン除去は達成されない。

また、嫌気条件下でリン除去のみならず有機物除去も行われなくなる悪化様式も報告されている。この悪化様式では PAOs および GAOs の両者ともに駆逐されている可能性が考えられるが、どのような微生物が関与しているかについては、ほとんど明らかになっていないのが現状である。

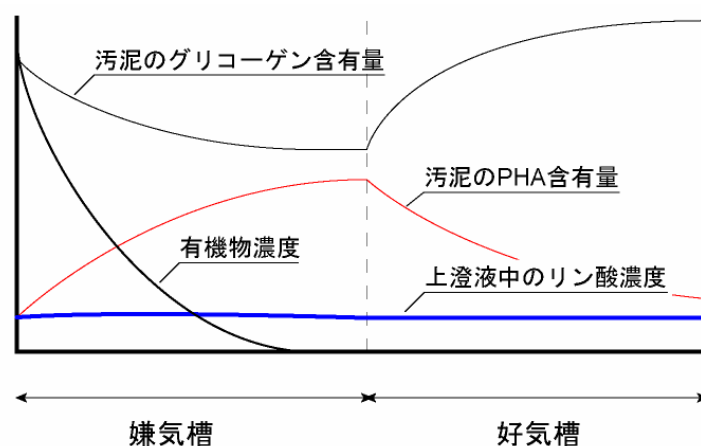


図 2.4 リン除去が悪化した EBPR での有機物およびリン酸の挙動

嫌気槽では体内に蓄積したグリコーゲンを用いてエネルギーを得、有機物を取り込み PHA として体内に蓄積する。続く好気槽では、体内の PHA を加水分解して、炭素源、エネルギー源として使用し、増殖やグリコーゲンの再合成を行う。

2.2 ポリリン酸蓄積細菌とグリコーゲン蓄積細菌

2.2.1 ポリリン酸蓄積細菌 (PAOs)

これまでに生物学的リン除去に関与する微生物群を明らかにしようとする試みが数多くなされている。その過程で、PAOs は単一の微生物種ではなく、複数の微生物群で構成されていることが明らかとなってきた (Mino *et al.*, 1998; Seviour *et al.*, 2003)。以下に、これまで提示されている PAOs について整理した。

(1) *Candidatus* ‘*Accumulibacter Phosphatis*’

Candidatus ‘*Accumulibacter Phosphatis*’は Hesselmann ら (1999) により命名された PAO で、*Rhodocyclus* 属に近縁な *Proteobacteria* -2 サブグループに属する。酢酸を主な炭素源とする実験室リアクターから検出され、FISH 法と化学染色法、形態的な観察から、この細菌が好気条件下でリンを蓄積し、嫌気条件下で PHA を蓄積していることが確認された (Hesselmann *et al.*, 1999; Crocetti *et al.*, 2000)。これらの研究で設計された *Accumulibacter* を標的とするいくつかのプロープはその後、実験室リアクターおよび実処理場における EBPR 汚泥の研究において、広く用いられている。*Accumulibacter* は多くの実験室リアクターおよび実処理場において、多数確認されており (Kawaharasaki *et al.*, 2002; Onuki *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2005)、リン除去において主要な役割を果たしている PAO と考えられる。

(2) *Microlunatus phosphovorius*

Microlunatus phosphovorius NM-1 株は、Nakamura ら (1995) によって実験室規模の EBPR リアクターから単離されたポリリン酸蓄積細菌である。この細菌は好気条件下でポリリン酸を蓄積し、嫌気条件下で放出することが確認された。Kawaharasaki ら (1998) は、*M. phosphovorius* に特異的な FISH プロープ (MP2) を設計し、EBPR 汚泥中での存在量を定量した。結果、全真正細菌に対する割合は約 3 %であったと報告している (Kawaharasaki *et al.*, 1998)。また、*M. phosphovorius* はグルコースを良く摂取するが、酢酸の摂取速度は遅いことがわかっている (Nakamura *et al.*, 1995)。これらの結果から、*M. phosphovorius* は主要な PAO ではないと考えられている (Kawaharasaki *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002)。

(3) High GC グループおよび *Actinobacteria*

Liu ら (2001) は実験室規模の EBPR リアクターから、ポリリン酸蓄積能を有するが PHA 蓄積能を持たない 2 種類の HGC グループの細菌を検出した。そのうちの 1 種類は細長い形状をしており、*Tetrasphaera* 属に近縁の新しいグループであることが明らかとなった。これらの *Actinobacteria* に属する PAOs は、酢酸を摂取せずいくつかのアミノ酸を好んで摂取すること、PHA 蓄積能が認められないこと、が明らかとなっている (Kong *et al.*, 2005)。もう 1 種類は *Nostcoida*

limicola II に近縁の糸状菌であった。*N. limicola* II はポリリン酸を蓄積する糸状菌であることが確認されている（Blackall *et al.*, 2000）、この糸状菌も EBPR プロセス中で、リン除去の一部を担っている可能性がある（Seviour *et al.*, 2003）。*Actinobacteria* に属する PAOs はデンマークのいくつかの EBPR プロセスで観察されているほか、日本の処理場においても広く分布していることが報告されている（宇田, 2006）。

(4) その他の PAOs

単離株としては、Stante ら（1997）が酪農排水を処理する EBPR プロセスから、*Lampropedia* に属する細菌を単離しており、ポリリン酸を蓄積することが確認されている。グラム陽性で球菌の *Tetrasphaera japonica* や *Tetrasphaera australiensis*（Maszenan *et al.*, 2000）、グラム陽性の細長い形態を有する *Tetrasphaera elongata*（Hanada *et al.*, 2002）などもポリリン酸蓄積能を有する単離株である。都市下水処理場から単離された *Comamonas* 属に属する *Malikia spinosa* は、PHA 蓄積能、ポリリン酸蓄積能の双方を有していることが確認されている（Spring *et al.*, 2005）。

2.2.2 グリコーゲン蓄積細菌（GAOs）

PAOs と基質摂取において競合する細菌群として、ポリリン酸の代わりにグリコーゲンを貯蔵物質として利用する細菌群が提案されている（Mino *et al.*, 1998; 2000; Blackall *et al.*, 2002; and Seviour *et al.*, 2003）。Mino ら（1998）はこの細菌群をグリコーゲン蓄積細菌（GAOs）と名づけた。GAOs はその代謝形態から、PAOs の有力な競合細菌と考えられているが、GAOs についての知見は乏しいのが現状である。

PAOs との競合細菌との意味合いでは、‘G-bacteria’と呼ばれる細菌群も存在する。‘G-bacteria’は「tetrad や sheets もしくはクラスターを形成している球菌」と定義され（Seviour *et al.*, 2003）、Cech and Hartman（1990, 1993）によってはじめて報告された。彼らは、リン除去活性が悪化した活性汚泥において、tetrad（4 つまたはそれ以上のセルからなるクラスター）が塊状になっている細菌が優占していることを報告し、この細菌群を‘G-bacteria’と名づけた。Liu ら（1996）は GAOs の代謝が支配的なときに‘G-bacteria’を検出したと報告している。その後も、tetrad の形態を有する‘G-bacteria’に類似の細菌が生物学的リン除去プロセスで幅広く報告されるようになっている。しかし、‘G-bacteria’の代謝形態が GAOs のそれと同一であるかどうかは、明らかになっていない。

以下に GAOs および‘G-bacteria’として提案されているものを整理する。

(1) GB バクテリアおよび *Candidatus 'Competibacter Phosphatis'*

GB バクテリアは直径が 2–4 μm 程度の比較的大きな球菌で、リン除去の良否に関わらず生物学的リン除去プロセス中で観察される。系統学的には *-Proteobacteria* の GB と呼ばれる lineage に属することから、GB バクテリアと呼ばれる。Kong ら (2002b) は GB バクテリアが少なくとも 7 種類のサブグループから構成される種であることを報告している。*Candidatus 'Competibacter Phosphatis'* は Crocetti ら (2002) により報告された *-Proteobacteria* に属する球菌で、GB バクテリアと極めて近縁である。GB バクテリアは、嫌気条件下で PHA を合成するがポリリン酸を蓄積しないことが確認されているが、グリコーゲンの蓄積については直接的には確かめられていない (Kong *et al.*, 2002a)。このため GAOs の代謝様式を有しているかどうか不明確である。しかしながら、これらの細菌群を標的とする FISH プローブ (プローブ名; GB) による解析によって、嫌気での短鎖脂肪酸の摂取能やアミノ酸の摂取能、PHA 合成能を有していること、実処理場および実験室規模リアクターに幅広く分布していることが明らかにされており、PAOs の有力な競合細菌であると考えられている (Crocetti *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2002b; Levantasi *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2006)。

(2) *Micropruina glycogenica*

Micropruina glycogenica はグラム陽性 HGC グループに属する細菌で、Shintani ら (2000) によって生物学的リン除去プロセスから単離された。*M. glycogenica* は嫌気条件下でグルコース等の有機物を摂取し、グリコーゲンを蓄積することが確認されている。*M. glycogenica* に特異的な FISH プローブも作成されており (プローブ名; MIC 184)、これを用いた解析から、酢酸とグルコースを基質とする実験室規模のリン除去悪化 EBPR リアクターにおいて、*M. glycogenica* が全細菌の 22 %まで増殖していたことが報告されている (Kong *et al.*, 2001)。近年では、日本の実処理場においても、広く分布していることが確認されている (Wong *et al.*, 2005)。

(3) その他の GAOs

リン除去が悪化した生物学的リン除去プロセスからは、TFOs (Tetrad Forming Organisms) と呼ばれる細菌群が観察されてきた (Seviour *et al.*, 2000; Kong *et al.*, 2001; Kong *et al.*, 2002a)。近年の培養によらない解析手法によって、嫌気好気プロセス中の汚泥から、いくつかの *-Proteobacteria* に属する TFOs が GAOs の表現型を有することが示された。そのうちの 1 種類は *Sphingomonadales* 科に属するもので、残りの 2 種類は *Defluvicoccus vanus* に近縁であった (Beer *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2006)。しかしながら、これらの TFOs はわずかの処理場でしか確認されていない。

2.2.3 PAOs と GAOs の競合関係

GAOs は嫌気条件において、PAOs と基質を奪い合う関係にあることから、生物学的リン除去プロセスの悪化を引き起こす原因と考えられている。両者の基質競合に関しては、多くの研究がなされている。これまでに、添加する基質、pH 等の条件が良好な生物学的リン除去を実現するために重要な役割を果たす可能性が指摘されている。以下に両者の競合に関する知見を整理した。

<基質による影響>

グルコースを基質として用いた実験室規模リアクターにおいて、生物学的リン除去が悪化するとの報告が数多くなされている。Kong ら (2001) は、酢酸とグルコースを用いて実験室規模の嫌気好気リアクターを運転したところ、リン除去能が見られず、*M. glycogenica* や *-Proteobacteria*、*-Proteobacteria* に属する TFOs 等の GAOs が優占したと報告している。その一方で、グルコースを用いた場合でも、良好なリン除去を実現した実験室規模リアクターの報告も少なくない (Sudiana *et al.*, 1999; Jeon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002)。Jeon ら (2000; 2001) は、グルコースを用いたリアクターでは発酵性細菌が重要な働きをしており、高次脂肪酸が短鎖脂肪酸に分解された後に PAOs が有効に機能するようになる、との可能性を指摘している。

Levantasi ら (2002) 酢酸、プロピオン酸および酪酸の混合基質を用いた EBPR リアクターにおいて、PAOs と GAOs が互いに共存していることを報告している。このリアクターの汚泥は、全細菌のうち 53 %が *Candidatus Accumulibacter phosphatis*、13 %が *Candidatus Competibacter phosphatis* であった。どうしてこのような共存が成立したのか、理由は定かではない。

近年では、プロピオン酸を基質として用いることで良好なリン除去を実現できるとの報告がなされている (Pijuan *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004)。Oehmen ら (2004; 2006) は、プロピオン酸を基質として用いることで *Candidatus Accumulibacter phosphatis* を選択的に優占させることができ、GB バクテリアの増殖を抑制できると報告している。

<pH による影響>

EBPR のリン除去性能に対する pH の影響は、古くから多くの研究がなされてきており、リアクターの pH が高い条件でリン除去が良好になるとの報告例が多い。Smolders ら (1994a) は、EBPR の嫌気条件における PAOs の酢酸摂取量を熱力学的に考察した。PAOs の酢酸の取り込みが槽内の pH が 8 において、pH 6 よりも容易になるとの結果が得られたことから、PAOs は高 pH 条件下で有利に増殖が可能であるとしている。一方で、Filipe ら (2001a) は嫌気条件下での GAOs の代謝モデルを作成し、嫌気条件下での pH の上昇に伴って GAOs の酢酸摂取速度が低下することを示した。実汚泥を用いた試験でもモデルの結果は支持され、嫌気条件の pH が 6.5 から 8.5 に上昇するにしたがって、酢酸摂取速度が低下したと報告している (Filipe *et al.*, 2001a)。これらの知見から、pH 8 付近においては PAOs が優占的に増殖し、良好なリン除去が達成され则认为られている。

一方でリン除去性能が高 pH 条件下で悪化するとの報告もなされている。Liu ら (2006) は、実験室規模 EBPR リアクターを用いて、系全体の pH ではなく嫌気槽初期の pH のみを調整してリン除去効率への影響を調査した。結果、pH が 6.8 から 8 に上昇するに従って、汚泥による酢酸摂取量、リン放出量はともに増加するが、酢酸摂取量当りのリン除去量（リン除去効率）は低下したと報告している (Liu *et al.*, 2006)。

このように pH の影響については、様々な知見が存在しているため、pH の影響について決定的な結論は得られていないのが現状である。

<温度による影響>

Whang ら (2002) は、生物学的リン除去プロセスを運転する際の温度が、PAOs と GAOs の存在比に作用して、プロセスの安定性を決定する可能性を指摘した。20℃では PAOs が優占し、逆に 30℃では GAOs が優勢になると報告している (Whang *et al.*, 2002)。また 30℃で培養した汚泥を顕微鏡観察したところ、大量の TFOs が観察されたと述べている (Whang *et al.*, 2002)。

<その他の影響因子>

Matsuo ら (1994) は、汚泥滞留時間 (SRT) のリン除去性能に対する影響を、実験室規模の EBPR リアクター（連続式）で調査した。結果、嫌気槽の SRT が長い場合 (an-SRT = 4.6 – 6.4 days) にはリン除去が良好で、嫌気槽の SRT が短い場合 (an-SRT = 0.9 days) にはリン除去性能が悪い状態だったと報告している。

Barat ら (2006) は、Ca 濃度がリン酸放出量、酢酸摂取量に及ぼす影響を調査した。実験室規模の EBPR リアクター (SBR) で、流入水中の Ca 濃度が上昇するにつれて酢酸摂取量当りのリン放出量が低下し、ポリリン酸蓄積活性が低下する可能性を指摘している。

このほか、リン除去性能に対する Mg 濃度や K 濃度の影響についての報告例がある (Pattarkine *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2006)。

いずれの報告でも PAOs と GAOs の競合関係について決定的な情報を与えることは出来ていない。PAOs あるいは GAOs の活性はマスとして取り扱う例が多く、PAOs 単体あるいは GAOs 単体の基質摂取活性について情報を得ることは出来ていない。このことが両者の基質競合について決定的な情報が得られない原因となっている。

2.3 *in situ* での基質利用特性解析手法（FISH 法および MAR 法）

2.3.1 FISH 法

Fluorescence *in situ* hybridization（FISH）法は rRNA を標的とするオリゴヌクレオチドプローブを用いて、*in situ* で微生物を同定、識別する手法である（Amann *et al.*, 1995）。FISH 法では、標的微生物に特異的な遺伝子プローブ（蛍光色素で標識しておく）を用いて、これを対象微生物の rRNA と結合させることで、蛍光顕微鏡下で標的微生物を染色・検出することができる。

FISH 法において、rRNA を標的とするのにはいくつか理由がある（Amann *et al.*, 1995）：すなわち、rRNA はすべての生菌に存在する、比較的安定であるとともに、細胞内に多コピー存在する（通常、数千コピー）、可変領域と保存性の高い領域の双方を有している、等である。多くの場合、遺伝子プローブは 16S rRNA を標的として作成される。単離された微生物種の 16S rRNA 配列のデータベースが公開されているほか、環境中からも多種多様な配列が続々と見出されている。遺伝子プローブはこれらのデータベースから得られる配列情報をもとに、ARB のようなソフトウェアを用いて作成する。

FISH 法は以下のような手順で実施する。

- (1) 試料の固定（fixation）
- (2) 標的 rRNA への遺伝子プローブのハイブリダイゼーション（hybridization）
- (3) 余分な遺伝子プローブを洗い流す（washing）
- (4) 顕微鏡による観察、撮像

観察結果を写真に記録しておくことで、直接計数法あるいはプローブポジティブな面積を測定することにより、細菌数の定量が可能である。遺伝子プローブは通常、15 から 30 塩基程度の長さで作成され、蛍光色素等の標識は 5'末端に施される。一般的な蛍光色素としては、fluorescein（FITC）や carbocyanine 染色剤（Cy3 や Cy5）がある。

活性汚泥の微生物群集解析の分野では、微生物群集の定量や同定のための有力なツールとして、FISH 法が用いられてきた。形態による観察・分類法は確実性に乏しかったが、FISH 法の登場によって処理場間の比較や確実な判断が可能になった。FISH 法を用いて、*in situ* で各グループの微生物が担う役割が明らかにされてきている。

2.3.2 MAR 法

Microautoradiography (MAR) 法は、放射性同位元素で標識した基質を微生物に摂取させた後、試料を特殊な感光乳剤と接触させることで、放射性同位元素の空間分布に従って、乳剤上にその情報が記録されるという手法である。MAR は複合微生物系において、シングルセルレベルで代謝活性を評価できる点できわめて有用なツールである。生物の代謝様式の解明等の分野では、古くから用いられてきた手法である (Brock and Brock, 1968)。

MAR の手順は大まかに次の 5 ステップからなる。

- (1) 標本の作成 (サンプルの固定・カバーガラスへの塗布): 放射性同位元素で標識した試料を固定し、細胞形態を保持させる。その後、カバーガラスに塗布する。
- (2) 感光乳剤の塗布: 臭化銀の結晶を成分とする感光乳剤を、カバーガラス上に薄く塗布する。
- (3) 放射線への暴露: 遮光条件下で、感光乳剤に放射線を暴露させる。Gurney-Mott 理論によると、 β 線が結晶格子を通過すると臭素原子を酸化する。このとき電子が放出され、放出された電子は結晶中の欠陥部位に捕えられる。捕らえられた電子は負の電荷を持つため、結晶中の遊離の銀イオンを引き寄せる。こうして集められた銀イオンは電子と作用して、銀原子へと還元される。このようにして銀の粒子が生成され、潜像核を形成する。潜像核に一定量以上の銀原子が集積されると現像可能となる。
- (4) 現像: 現像は、潜像核をより大きな銀粒子へと成長させ、これを目に見える状態にする作業である。現像液にサンプルを浸すと、臭化銀が還元されて潜像核に集積されて、銀粒子が大きくなり、観察可能な大きさになる。この後、サンプルを定着液に浸して未反応の臭化銀を取り除くことで、現像が終了する。
- (5) 顕微鏡観察: 明視野において検鏡する。Silver grain (銀粒子) が確認された細胞は、放射性同位元素で標識した基質を摂取した細菌である。

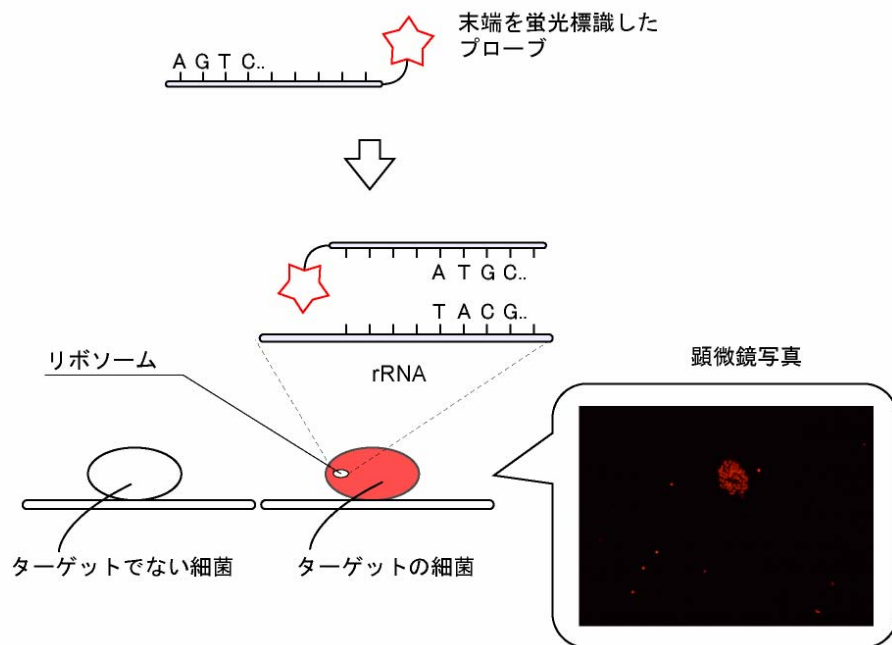


図 2.5 FISH 法の原理

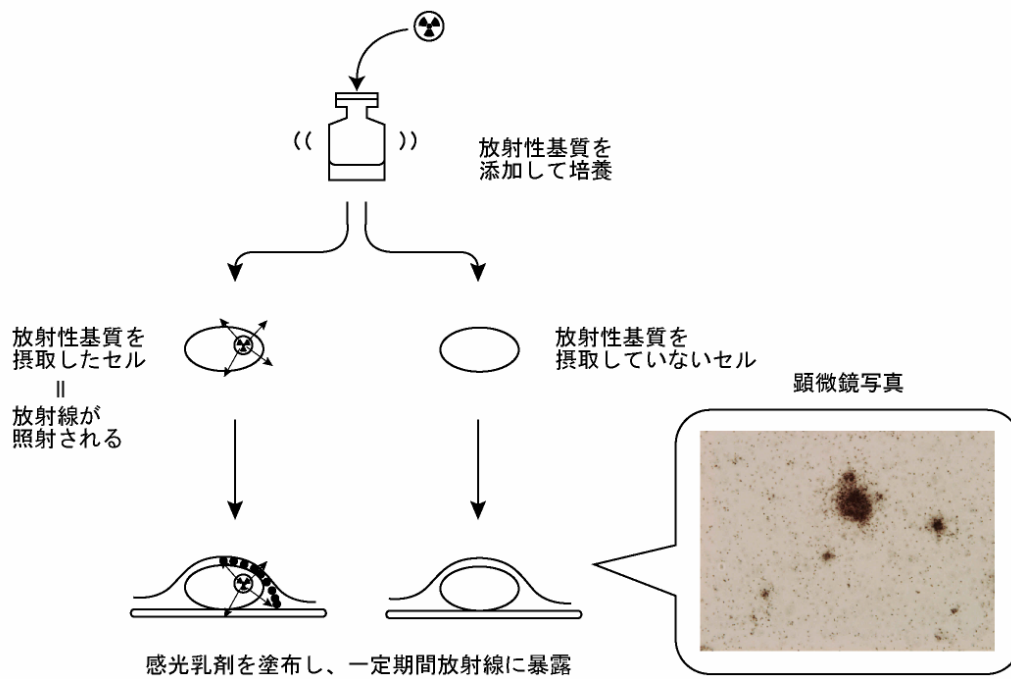


図 2.5 MAR 法の原理

2.3.3 MAR-FISH 法

1999 年になって、FISH 法と MAR 法とを組み合わせた手法が開発された (Lee *et al.*, 1999; Ouverney *et al.*, 1999)。この新しい手法は ‘FISH-MAR’ と呼ばれ (本論文では MAR-FISH 法と呼ぶ)、複雑な微生物群集において、特定の微生物群の基質摂取能や代謝様式を、シングルセルレベルで明らかにすることができる、有力なツールである。本手法により、培養できない微生物群の生理活性や、特定の実環境中における微生物の活性を評価することが可能になった。

MAR-FISH 法ではまず、ラジオアイソトープで標識した基質を添加してサンプルを培養する。その後、固定、洗浄を経て、サンプルの一部をカバーガラスに固定する。この状態で FISH 法に供し、特定の微生物種にプローブをハイブリダイズさせる。その後 MAR の操作を行うことで、ラジオアイソトープで標識した基質を摂取した微生物のみに銀粒子が生成する。顕微鏡下で FISH のシグナルと銀粒子とを観察することで、「どの細菌が何を摂取したか」を確認することができる。

MAR-FISH 法はその有用性から、近年注目を集めており、実環境中の微生物群集の生理生態学的解析に幅広く用いられるようになっている (Nielsen and Nielsen, 2005; Wagner *et al.*, 2006)。

2.3.4 MAR-FISH 法による定量評価の試み

MAR-FISH 法は「どの微生物がどの基質を摂取しているか」という知見を得るのに極めて有力なツールである。しかし、「どの程度の基質を摂取しているか」という定量的なデータを得る方向には、あまり用いられてこなかった。しかし近年、基質摂取量の多寡を相対的に評価したり、あるいは基質摂取量の絶対値を推定したりするのに、MAR-FISH 法を積極的に活用する例が少しずつ出てきた。Cottrell and Kirchman (2003) は MAR-FISH 法を用いて、海洋微生物中の各種細菌のアミノ酸摂取に対する寄与度を調査した。採取した海水に ^3H で標識したアミノ酸 (Leucine および Thymidine) を添加し、標識アミノ酸を摂取した微生物周辺に生じた銀粒子の面積を測定することで、微生物間の活性の比較を試みた。結果、塩濃度の違いによって、アミノ酸摂取を活発に摂取する細菌種がグループレベルで変化することを明らかにした。Kirchman のグループは他にも、特定の化合物の摂取に対する複数の微生物群の寄与度や、特定の細菌種のアミノ酸摂取や化合物摂取に対する寄与度の推定なども行っている (Malmstorm *et al.*, 2004a; Malmstrom *et al.*, 2004b; Malmstorm *et al.*, 2005a; Malmstrom *et al.*, 2005b)。Nielsen ら (2003) は銀粒子の個数から、糸状菌の基質摂取量をシングルセルレベルで推定することを試みた。純菌を用いて基質摂取量とセル周辺に生成する銀粒子の個数との関係を調査し、その間にリニアな関係が存在することを示した。その後、実汚泥中の微生物の銀粒子の個数を計数することで、実環境条件下で個々の微生物の基質摂取速度を推定している。Sintes and Herndl (2006) は Nielsen ら (2003) と同様の評価を、銀粒子の面積を用いて行い、やはり実環境中での微生物の基質摂取量の絶対値を推定している。

このように、MAR-FISH 法を定量評価に用いる試みが少しずつなされるようになってきている。

第3章 実験材料および方法

3.1 概要

本研究では、化学分析手法と分子生物学的手法とを用いることで、*in situ*における微生物の基質摂取量の比較を行う。本章では、研究に使用する試料、分析手法および機器の概要を記述した。より具体的な標本作成手順、実験操作等はそれぞれの章において詳述した。

3.2 供試生物試料

3.2.1 純菌試料

第4章の手法検討において、純菌株 *Escherichia coli* K-12 株および *Ralstonia eutropha* H-16 株を用いた。いずれの菌株も本試験に供する前に、冷凍ストックを前培養に供した。*E.coli* については、LB 培地を用いて 14 – 16 時間振盪培養（180 rpm, 37 °C）した後、*R.eutropha* については、LB 培地を用いて 22 – 24 時間振盪培養（180 rpm, 37 °C）した後、1.5mL 容チューブに分注して、遠心分離（13500×g, 10min, Micro centrifuge MX-160, トミー精工社）により集菌し、10mM 滅菌リン酸カリウム溶液を用いて 2 回洗浄した。洗浄後の菌株は所定の菌体濃度になるように希釈して本試験を実施した。

3.2.2 活性汚泥試料

第5章では、一般下水処理場（M 水再生センター，東京都）から採取した活性汚泥を試験に供した。M 水再生センターの諸元を表 3.1 に示す。活性汚泥試料はいずれも、好気槽末端の完全混合状態のものを採取した。採取した汚泥試料はただちに実験室に持ち帰り、その後の試験に供した。

表 3.1 M 水再生センターの諸元

所在地	処理容量	処理排水	処理方式
東京都荒川区	750,000 m ³ /day	一般家庭排水	AO（嫌気好気）法

3.3 使用したラジオアイソトープ標識化合物

ラジオアイソトープで標識した酢酸ナトリウム ($[^3\text{H}]\text{Acetic acid, sodium salt}$, 150 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$, Amersham Bioscience 社) を基質として使用した。培養時には、標識化合物だけでなく非標識の酢酸ナトリウムを補完的に添加した。

3.4 化学分析法

3.4.1 溶存イオン濃度の測定

リン酸イオン ($\text{PO}_4\text{-P}$) および酢酸イオンはイオンクロマトグラフィー法により測定した。測定にはコンパクト IC 761 (Metrohm 社) あるいは DX-AQ1110 (DIONEX 社) を使用した。

3.4.2 MLSS

下水道試験法 (1997) に従い、遠心分離法を用いて測定した。

3.5 分子生物学的手法

3.5.1 MAR-FISH 法

ラジオアイソトープ標識化合物と共に培養した純菌試料あるいは活性汚泥試料は、新鮮な 8 % パラホルムアルデヒド溶液と、容積比 1 対 1 で混合し、4 \square で 3 時間固定を行った (Lee *et al.*, 1999)。3 時間経過した後、遠心分離 (HIMAC centrifuge CR 15 B, HITACHI 社, 10,000 $\times g$, 5 min) により菌体ペレットを回収し、水道水で 3 回洗浄を行った。洗浄後、98%エタノールおよび 1 \times PBS 溶液 (137 mM NaCl, 8.1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , pH 7.2) を等量ずつ加えて菌体ペレットを懸濁し、使用まで $-20\square$ で保存した。固定サンプルは、あらかじめゼラチンコートをしたカバーガラス (24 \times 60 mm, NEO micro cover glass, マツナミガラス社) に塗布した。塗布する際には、超音波破碎器 (ULTRASONOC PROCESSOR GE 50 T, Sonics 社) を用いて菌体を分散させた。純菌試料に対しては 3V、2A で 30 秒間、活性汚泥試料に対しては 3V、2A で 120 秒間、超音波分散を行った。塗布後、50%, 80%および 98%のエタノールに 3 分間ずつ浸し、脱水した。その後、カバーガラスを風乾し、MAR-FISH に供した。

FISH 法は基本的に Amann *et al.* (1995) に従って行った。10 pmol/ \square l になるように調製したプローブ 1 容に対し、使用するプローブに応じたホルムアミド濃度を持つ hybridization buffer (5M NaCl, 1M Tris/HCl(pH 7.2), 10% SDS, x % ホルムアミド) を 8 容混合し、20 \square l をカバーガラス上

にスポットした。このカバーガラスを、気液平衡を保った 50 mL 容の遠沈管内に入れ、46 □で 2 時間ハイブリダイゼーションに供した。2 時間経過後、48 □の washing buffer にカバーガラスを 20 分間浸し、余分なプローブを洗い流した。Washing buffer は hybridization buffer と同じ stringency を持つように調製した。洗浄後、washing buffer を超純水で洗い流し、素早くカバーガラスを乾燥させた。

本研究で使用したオリゴヌクレオチドプローブを表 3.2 に整理した。EUB338, EUB338-II, EUB338-III プローブは fluorescein isothiocyanate (FITC) で、その他のプローブは Cynince-3 (Cy3) で、5'末端を標識してある。

MAR 法は基本的に Andreasen and Nielsen (1997) および Lee *et al.* (1999) に従って行った。手順の詳細を以下に示す。

1. 感光乳剤によるコーティング

43 □に加温した感光乳剤 Hypercoat Emulsion LM1 (Amersham Bioscience 社) に、カバーガラスを約 5 秒間浸した。乳剤から取り出した後、サンプルを塗布していない面の乳剤をティッシュでふき取り、暗所で 2 時間静置して乾燥させた。このとき、カバーガラスを 30 度程度傾けて静置した。

2. 感光乳剤への 線の暴露

カバーガラスを回収後、遮光した箱にシリカゲルとともにカバーガラスを保存した。4□で所定の時間だけ暴露させ、「3.現像操作」に供した。暴露時間は数時間から 10 日の間に設定した。

3. 現像操作

現像操作では次の 3 種類の薬品を使用した。

- ・ 現像液: Kodak D19 (40 g/L)
- ・ 停止液: 蒸留水
- ・ 定着液: チオ硫酸ナトリウム水溶液 (300 g/L)

カバーガラスは現像液、停止液、定着液の順に、それぞれ 3 分間、1 分間、4 分間浸した。その後、定着液を洗い流すために水道水で約 10 分間、蒸留水で約 10 分間洗浄を行った。洗浄後のカバーガラスはすばやく乾燥させた。

乾燥させたカバーガラスは、退色防止剤 SlowFadeLightGold (Molecular Probes 社) をスポットしてスライドグラスにかぶせ、標本を完成させた。乾燥後ただちに検鏡が行えない場合には、検鏡するまで 4 □で暗所にカバーガラスを保存した。

3.5.2 顕微鏡観察

顕微鏡観察は CCD カメラ DP50（オリンパス社）を搭載した蛍光顕微鏡 model BX51（オリンパス社）を用いて行った。顕微鏡下では、FITC ポジティブなセルは緑色、Cy3 ポジティブなセルは赤色として観察される（図 3.1）。生成した銀粒子は明視野により観察した（図 3.2）。全てのサンプルにおいて、FITC-FISH 画像、Cy3-FISH 画像および MAR 画像を撮像・保存した。MAR 画像については、カメラ位置を 0.5 μm ずつ上下方向にずらし、焦点面の異なる 6 枚の画像を撮像した。これらの画像は画像加工ソフトウェア AdobeTM PhotoshopTM（Adobe 社）、画像解析ソフトウェア Leica QWin（Leica 社）を用いて処理・解析した（3.5.4 節参照）。

3.5.3 細菌数の定量

顕微鏡を利用した細菌種の定量には、直接計数法を採用した。各サンプルでプローブポジティブなセルの個数を計数した。

3.5.4 画像処理および画像解析

本研究では、純菌の基質摂取量の多寡、あるいは活性汚泥中の PAOs および GAOs の基質摂取量の多寡を、菌体周辺の銀粒子の面積で評価することを試みている。3.5.2 で得られた FISH 画像および MAR 画像は AdobeTM PhotoshopTM を用いて次の手順で処理し、銀粒子面積の測定に供した。

1. 画像の 2 値化（図 3.3(a)）

撮像された 6 枚の MAR 画像全てに対し、2 値化処理を行う。適当な閾値を設定して、全ての画像を、白黒 2 階調の画像に変換する。ここで白い領域は銀粒子が存在しない部分、黒い領域は銀粒子が存在する部分を現す。閾値は、焦点が合った銀粒子のみの「黒い領域」となるように、目視にて設定する。

2. 2 値化した画像の統合（図 3.3(b)）

2 値化した 6 枚の画像を統合して、1 枚の画像に変換する。「乗算モード」を用いて、2 枚ずつ処理していく。乗算とは、2 つの画像を対象として、それぞれの色情報に基づいて、一つ目の画像の色（基本色）にもう一つの画像の色（合成色）を掛け合わせる操作で、合成色が黒（255）の場合は、結果色は黒（255）になり、合成色が白（0）の場合は基本色がそのまま残る。

3. FISH 画像による対象菌体の選択（図 3.3(c)）

MAR 画像と同一視野の FISH 画像を開き、閾値を設定して FISH で染色された部分のみを選択する。閾値は、菌体の大きさと同程度の領域だけが選択されるように、目視にて設定する。その後、選択範囲を一定距離だけ拡張する。これは、銀粒子が菌体上だけでなく、その周囲にも形成されるためである。

4. FISH 画像と MAR 画像の統合（図 3.4(d)）

1.および 2.で加工された MAR 画像と、3.で加工された FISH 画像を重ね合わせ、「FISH で染色された菌体周辺の銀粒子のみ」が写った画像を取得する。

得られた画像を Leica QWin で解析し、黒い領域の面積を測定して「銀粒子の面積」とした。

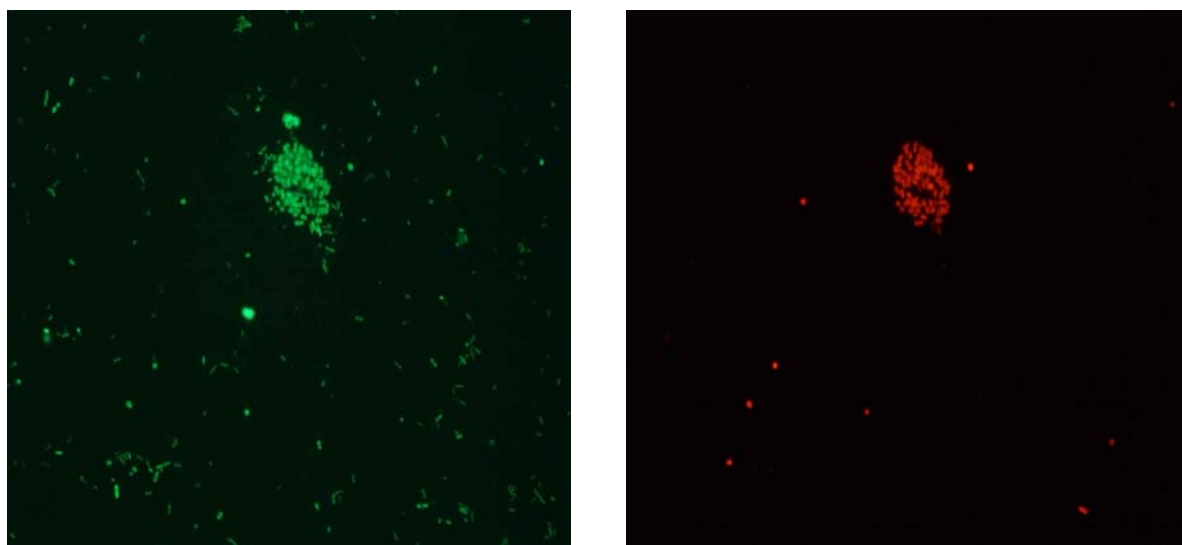


図 3.1 FITC-FISH 画像（左）および Cy3-FISH 画像（右）

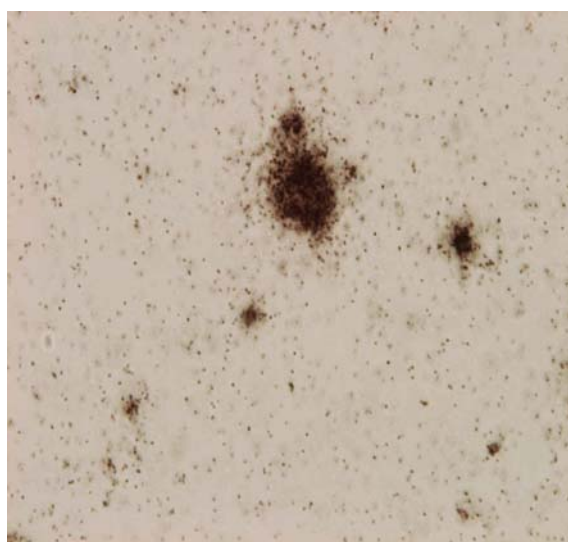


図 3.2 MAR 画像

表 3.2 本研究で使したオリゴヌクレオチドプローブ

Probe name	Probe sequence (5'-3')	rRNA target site ^d	Specificity	FISH stringency (FA %) ^e	Reference
EUB338 ^a	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S (338-355)	Most Bacteria	0 – 50	Amann <i>et al.</i> (1990)
EUB338 II ^a	GCAGCCACCCGTAGGTGT	16S (338-355)	Planctomycet <i>al.es</i>	0 – 50	Daims <i>et al.</i> (1999)
EUB338 III ^a	GCTGCCACCCGTAGGTGT	16S (338-355)	Verrucomicrobiales	0 – 50	Daims <i>et al.</i> (1999)
PAO462 ^b	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	16S (462-485)	<i>Candidatus</i> ‘Accumulibacter phosphatis’	35	Crocetti <i>et al.</i> (2000)
PAO651 ^b	CCCTCTGCCAAACTCCAG	16S (651-668)	<i>Candidatus</i> ‘Accumulibacter phosphatis’	35	Crocetti <i>et al.</i> (2000)
PAO846 ^b	GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	16S (846-866)	<i>Candidatus</i> ‘Accumulibacter phosphatis’	35	Crocetti <i>et al.</i> (2000)
GB	CGATCCTCTAGCCCACT	16S (612-628)	□- <i>Proteobacterial</i> GAOs	35	Kong <i>et al.</i> (2002)
BET42a ^c	GCCTTCCCACTTCGTTT	23S (1027-1043)	□- <i>Proteobacteria</i>	35	Manz <i>et al.</i> (1992)
GAM42a ^c	GCCTTCCCACATCGTTT	23S (1901-1918)	□- <i>Proteobacteria</i>	35	Manz <i>et al.</i> (1992)

a: EUB338, EUB338 II および EUB338 III は、これら全てを混合して使した (EUBmix)。

b: PAO462, PAO651 および PAO846 は、これら全てを混合して使した (PAOmixture)。

c: BET42a および GAM42a は蛍光標識を施さない competitor を混合して使した。

d: Escherichia coli rRNA numbering.

e: hybridization buffer 中のホルムアミド濃度を示す。

(a) 2 値化



(b) 画像の統合

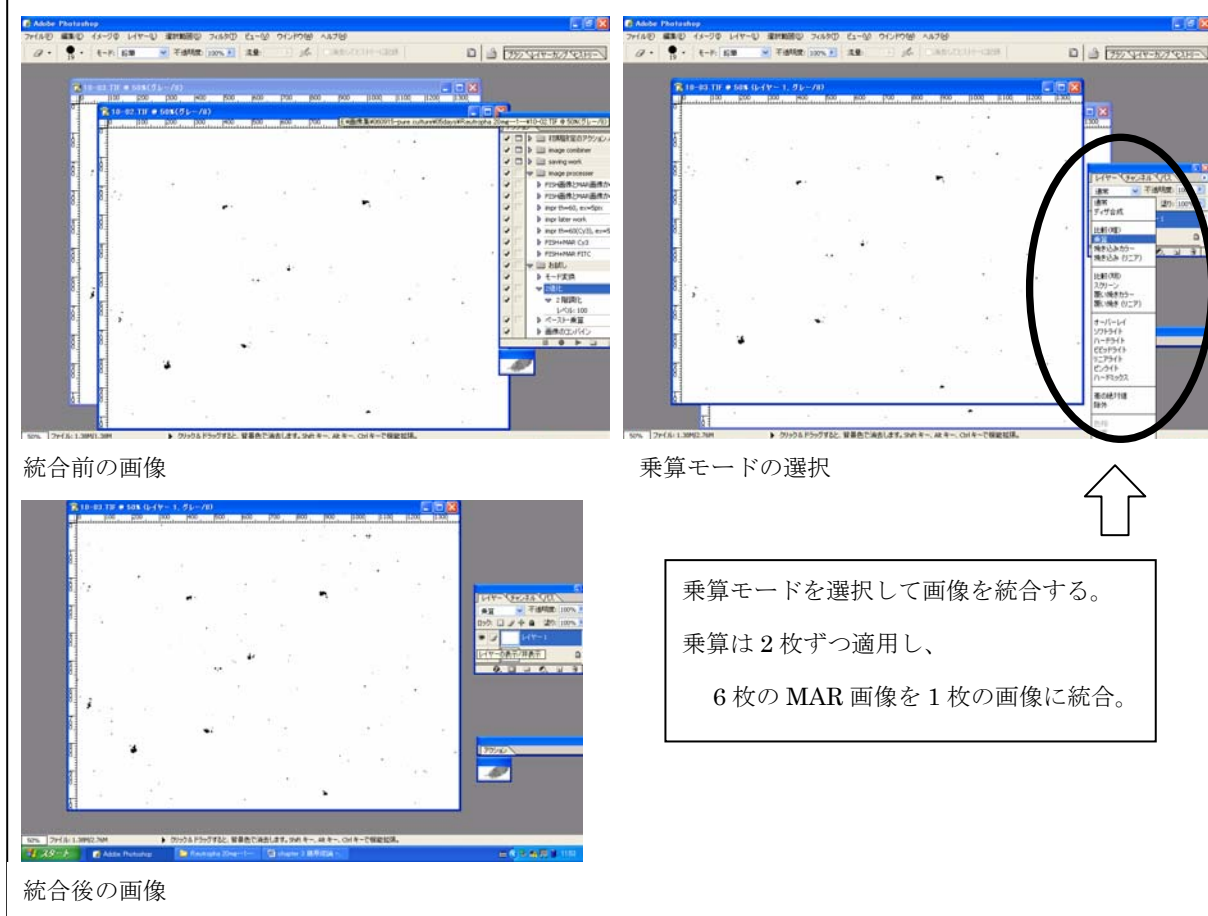
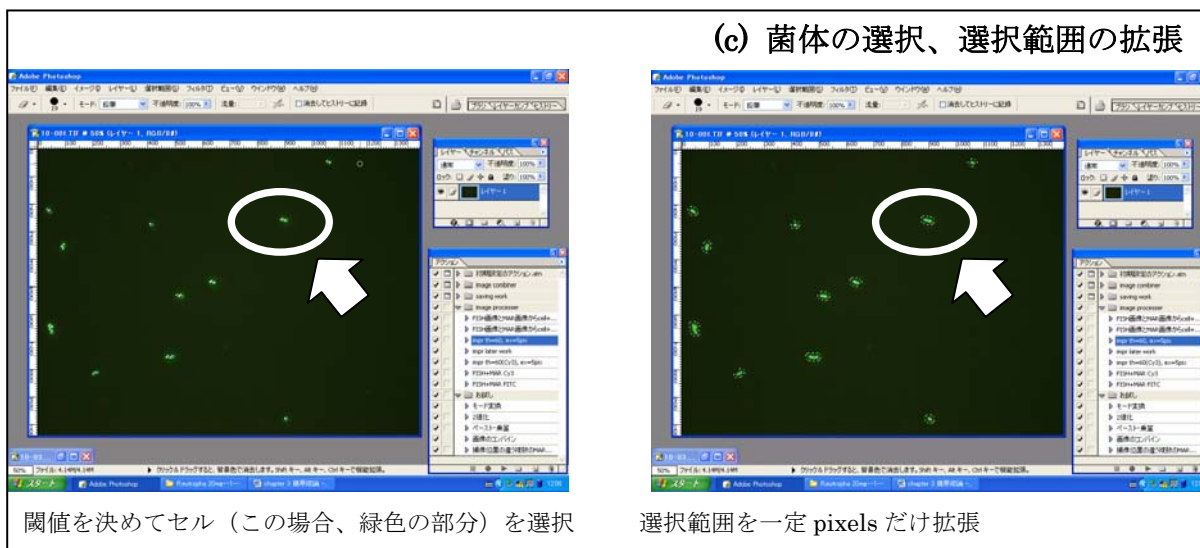


図 3.3 画像処理の方法

(c) 菌体の選択、選択範囲の拡張



(d) MAR 画像と FISH 画像の統合

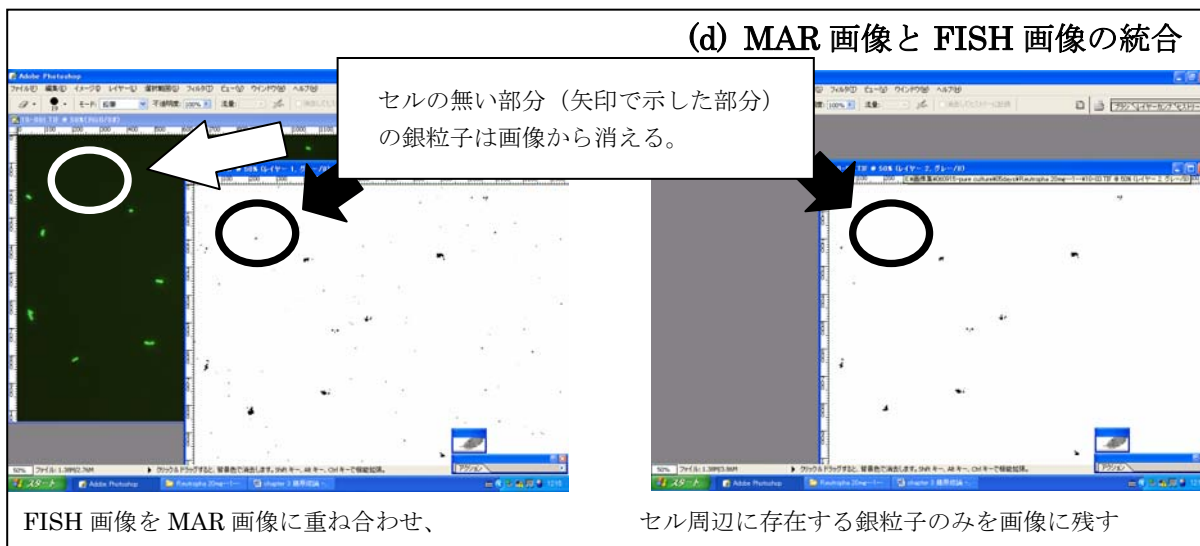


図 3.3 画像処理の方法

第 4 章 MAR-FISH 法による基質摂取量比較法の検討

4.1 概要

MAR-FISH 法は、「どの細菌が何の基質を摂取したか」を評価するには極めて有力な手法である。これまでも培養困難な微生物群の代謝形態の解析、*in situ* での基質摂取特性の把握に広く用いられている。しかし MAR-FISH 法は、「どれだけ摂取したか」という定量的な情報を得るには不向きとされ、定量評価にはあまり用いられてこなかった。近年では、MAR ポジティブな細菌に生じる銀粒子 ‘silver grain’ の面積や数を定量することで、その情報を基に基質摂取量の比較・概算を試みた報告もなされるようになってきた。ただ、依然として銀粒子の量を用いた定量評価については報告例が少なく、銀粒子の量を用いた定量評価の確実性は保証されていない。

そこで本研究では、「MAR-FISH 法を用いて基質摂取量の多寡を評価できるか否か」を確認することを試みた。純菌に対して既知濃度の放射性基質を添加、摂取させ、MAR-FISH 法を適用した。その後、菌体周辺に生じた単位セル当りの銀粒子面積を測定し、摂取した基質量と銀粒子面積の関係を解析した。

結果、(1) 単位セル当りの銀粒子面積は基質摂取量の多寡を表現しており、単一細菌種の基質摂取量の多寡を比較するために使用可能であること、(2) 銀粒子面積による比較は、複数の細菌種の基質摂取量を比較するのには適当でないこと、が確認された。

4.2 実験方法

4.2.1 供試菌株および使用培地

試験には *Escherichia coli* K-12 株および *Ralstonia eutropha* H-16 株を用いた。供試菌の保存株は本試験の前に、LB 培地を用いてそれぞれ 14 – 18 時間あるいは 24 – 26 時間往復振盪培養 (180 rpm, 37℃) した。その後、1.5mL 容チューブに分注し、遠心分離 (13,500×g, 10min) により集菌し、10mM 滅菌リン酸カリウム溶液を用いて 2 回洗浄した。洗浄後の菌体を無機塩培地および基質と混合し、所定の濃度に希釈して 10 mL 容の培養容器に入れてバッチ試験に供した (好気条件で 2 時間)。無機塩培地は表 4.1 の組成で調製し、基質として酢酸ナトリウムを用いた。

表4-1 無機塩培地の組成

CaCl ₂ (2H ₂ O)	0.09 g/L
MgCl ₂ (6H ₂ O)	0.9 g/L
KCl	0.4 g/L
NH ₄ Cl	0.17 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.22 g/L
K ₂ HPO ₄	0.18 g/L
KH ₂ PO ₄	0.14 g/L

4.2.2 放射性基質を用いた培養（hot 培養） - 1 種類の純菌による試験 -

菌体周辺に生成する銀粒子の面積が、菌体の基質摂取量の多寡を表現し得るかどうかを確認するために、*E.coli* あるいは *R.eutropha* を用いた実験を実施した。*E.coli* あるいは *R.eutropha* に ^3H で標識した既知濃度の基質（酢酸ナトリウム）を添加し、菌体周辺に生成する銀粒子の面積を測定する。摂取した基質量と生成した銀粒子面積との関係を解析した。実験の概要を図 4.1 に示す。

E.coli を用いた試験では、5 mgC/L（放射能濃度、5 $\square\text{Ci/mL}$ ）、20 mgC/L（同、20 $\square\text{Ci/mL}$ ）の酢酸ナトリウムを添加する系を用意して、バッチ試験を実施した（それぞれ 2 繰り返しで実施。以後、各培養系を E5-1, E5-2, E20-1 および E20-2 と呼ぶ）。

R.eutropha を用いた試験も同様に、5 mgC/L（放射能濃度、5 $\square\text{Ci/mL}$ ）、20 mgC/L（放射能濃度、20 $\square\text{Ci/mL}$ ）の酢酸ナトリウムを添加する系を用意して、バッチ試験を実施した（それぞれ 2 繰り返しで実施。以後、各培養系を R5-1, R5-2, R20-1 および R20-2 と呼ぶ）。添加する ^3H -酢酸ナトリウムの割合は、いずれの培養系においても、酢酸ナトリウム全体に対して約 5 %となるように調製した。

また、*E.coli* を用いる試験、*R.eutropha* を用いる試験のいずれにおいても、コントロールとして低温滅菌した *E.coli* あるいは *R.eutropha* を用意して同様の条件で培養した（繰り返し無し、以後、両培養系を EP および RP と呼ぶ）。

さらに、hot 培養と並行して非標識の酢酸ナトリウムのみを添加する培養系（cold 培養）を別途用意した（繰り返し無し）。これは hot 培養における基質摂取量を把握するためである。

培養後、MAR に供するサンプルについては、培養液を採取して同量の 8% paraformaldehyde と混合し 3 時間固定した。その後水道水で 3 回洗浄し、希釈（2 - 4 倍程度）、超音波分散（3V, 2A で 30 秒間）を経てカバーガラスに塗布・固定した。固定後のカバーガラスを FISH 法、MAR 法に供した。非標識の酢酸ナトリウムを添加した系からは培養前と後に培養液を 2 mL ずつ採取してイオンクロマトグラフィーに供し、両菌株の基質摂取量を確認した。

FISH 法では、5'末端を FITC で蛍光標識した EUBmix プローブを使用した。MAR 法では、カバーガラス上に感光乳剤（Hypercoat Emulsion, Amersham Bioscience）を塗布し、4 \square で一定時間放射線に暴露させた。一定時間経過後、現像操作を経て顕微鏡による観察を行い、FISH 画像および MAR 画像を得た。

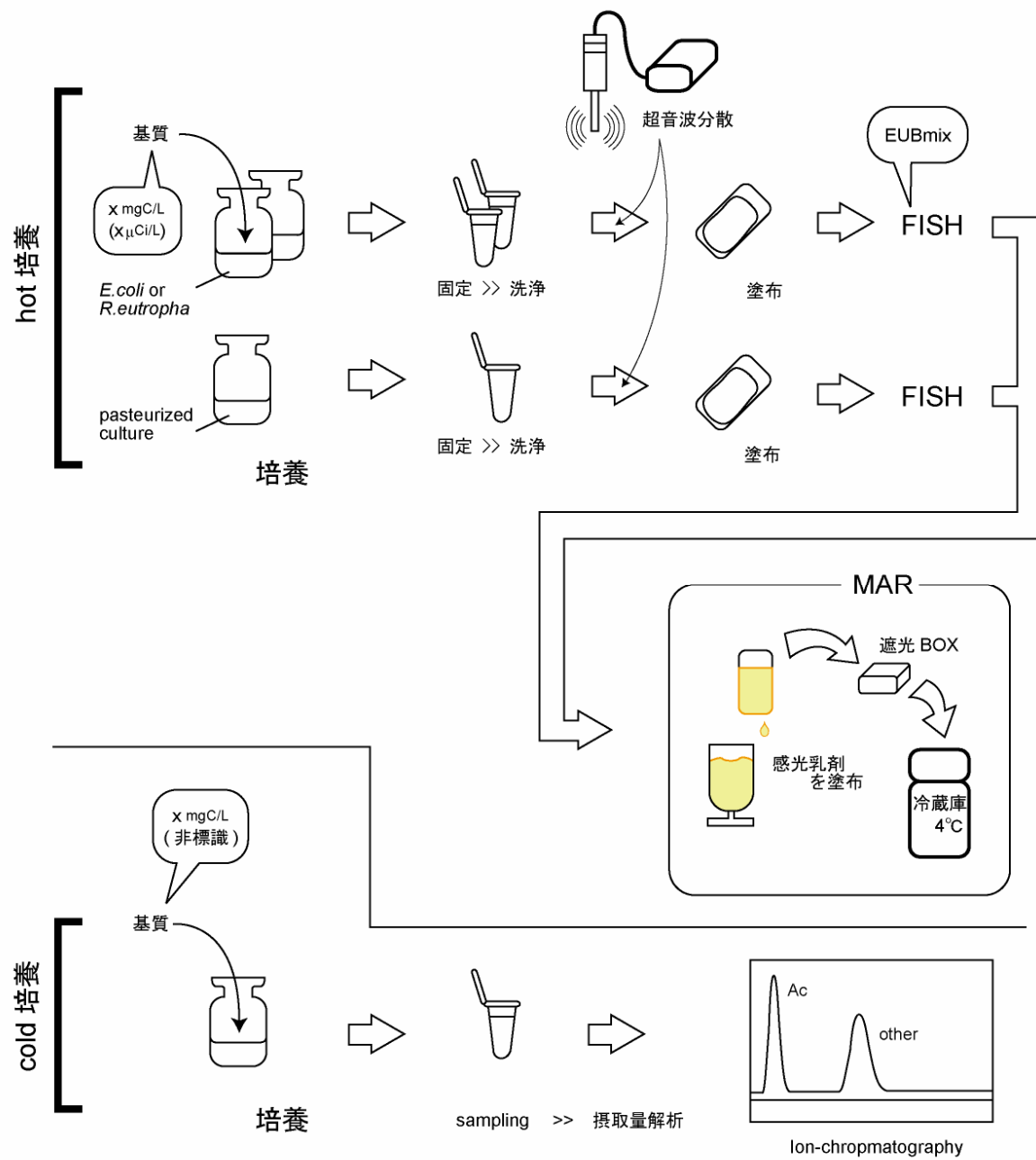


図 4.1 純菌 1 種類を用いた放射性基質による培養

4.2.3 放射性基質を用いた培養 (hot 培養) - 2 種類の純菌による試験 -

菌体周辺に生成した銀粒子の面積を用いることで、複数の細菌種の基質摂取量の比較が可能かどうかを確認する試験を実施した。4.2.2 と同様に、*E.coli* および *R.eutropha* の保存菌株をそれぞれ前培養し、集菌・洗浄して 10 mL 容の培養容器に植種した。このとき、菌体濃度が同一（ともに 1.1×10^9 cells/mL）になるように植種した。実験の概要を図 4.2 に示す。

以下の 2 種類の培養試験を実施した：すなわち、

試験(A) *E.coli* に 5 mgC/L（放射能濃度, 5 \square Ci/mL）、*R.eutropha* に 20 mgC/L（同、20 \square Ci/mL）を添加して培養を行う系（2 繰り返し）

試験(B) *E.coli* に 20 mgC/L（放射能濃度, 20 \square Ci/mL）、*R.eutropha* に 5 mgC/L（同、5 \square Ci/mL）を添加して培養を行う系（2 繰り返し）

の 2 種類である。

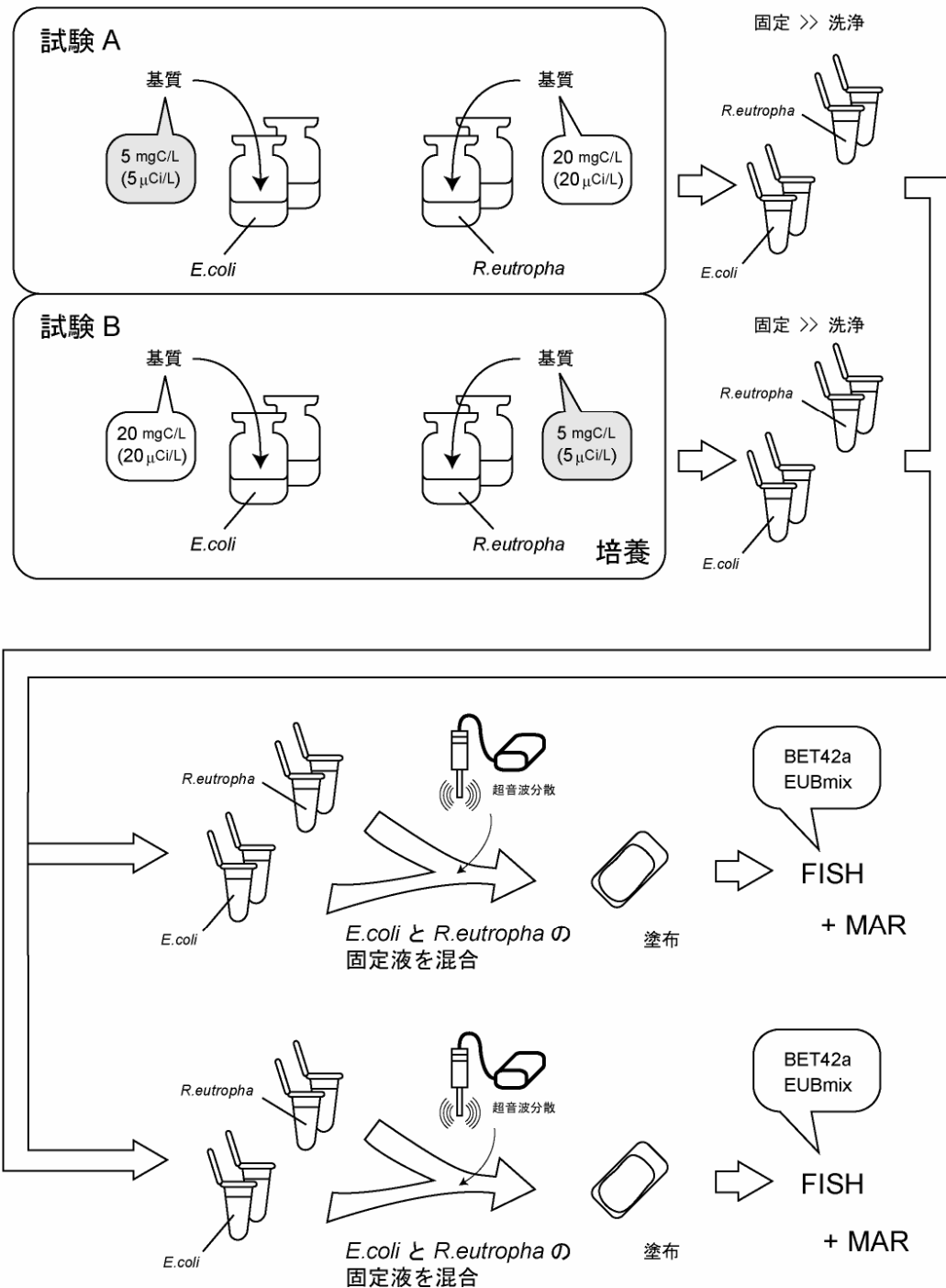
これらに加えて、*E.coli*、*R.eutropha* それぞれの低温滅菌系を用意し、コントロールとした（繰り返し無し）。

また、hot 培養での基質摂取量を把握するため、cold 培養を同時に行った（繰り返し無し）。

培養後、MAR に供するサンプルについては、培養液を採取して同量の 8% paraformaldehyde と混合し 3 時間固定し、水道水で 3 回洗浄した。洗浄後、*E.coli* と *R.eutropha* の培養液を等量ずつ混合し、超音波分散（3V, 2A, 30 秒間）を行って、カバーガラスに塗布・固定した。その後、FISH 法、MAR 法に供した。非標識系は、4.2.2 と同様に摂取量の解析に供した。

FISH 法では 5'末端を FITC で蛍光標識した EUBmix プローブおよび 5'末端を Cy3 で蛍光標識した BET42a プローブを使用（蛍光標識を施さない GAM42b プローブをコンペティターとして使用）した。MAR 法では感光乳剤をカバーガラスに塗布したのち、一定時間放射線に暴露させ、顕微鏡観察により FISH 画像および MAR 画像を得た。

hot 培養



cold 培養

図 4.1 と同じ手順で実施する

図 4.2 試験 A および試験 B の概要.

4.2.4 露光時間の検討

MAR 法では感光乳剤に放射線を一定時間暴露させる。暴露時間が長くなれば放射線の暴露量が増え、生成する銀粒子の量も増加する。Nielsen ら (2003) は、露光時間を長く取りすぎると、生成する銀粒子の量が飽和してしまい、銀粒子数の定量的な評価が出来なくなると指摘している。この問題は面積測定においても同様に発生すると考えられる。そこで培養系 R5, R20 および RP を用いて、生成する銀粒子の面積と露光時間の関係を把握し、最適な露光時間の検討を試みた。露光時間として 1、3、5 および 8 日間を採用し、菌体周辺の銀粒子面積の変化を調べた。

4.2.5 画像解析

得られた FISH 画像および MAR 画像を、画像処理ソフト AdobeTM PhotoshopTM を用いて処理した。MAR 画像は閾値を設定して 2 値化処理を行う。MAR 画像を構成する 1 つ 1 つ画素には、256 段階の階調情報が存在するが、閾値以下の階調値を持つ画素は階調 0 (黒) に変換し、閾値より大きな階調値を持つ画素は階調 255 (白) に変換する (図 3.3(a))。つまり閾値を x とすると、「 x 以下の階調値を持つ画素を銀粒子と見なす」ということである。閾値の設定は目視による判断以外に方法がない。そこで培養条件によって閾値の設定がぶれないよう、階調 120 あるいは 160 を閾値として採用し、解析を行うこととした。これは得られた画像の観察から、銀粒子の面積を最も正確に表す値だと判断したためである。なお本章のサンプルの MAR 画像を撮像する際には、顕微鏡の光量、絞り、フィルターの有無、撮像時の CCD カメラの露光時間等の条件を全てのサンプルについて一定にしておき、閾値以外の条件が異ならないように注意した。

2 値化した画像と FISH 画像から、菌体周辺の銀粒子のみが写った画像を得た。FISH 画像を用いて菌体を検出し、一定範囲だけ拡張して選択する (図 3.3(c))。一定範囲拡張して選択するのは、銀粒子が菌体直上だけでなく、その周辺 0.5 μm 程度まで生成する (^3H を用いた場合) ためである (Nielsen *et al.*, 2003)。その後、MAR 画像上の同じ領域に存在する銀粒子 (階調 0 の画素) のみを残し、残りの画素全てを白 (階調 255) に変換する (図 3.3(d))。

FISH 画像には、

(1) EUBmix プローブ (FITC で蛍光標識) 陽性細菌が写っている画像で、陽性細菌が緑色に染色されているもの

(2) Bet42b プローブ (Cy3 で蛍光標識) 陽性細菌が写っている画像で、陽性細菌が赤色に染色されているもの

の 2 種類がある。EUBmix プローブ陽性細菌 (緑色) については、階調 75 あるいは 80 以下の画素を「菌体」として選択した。Bet42b プローブ (赤色) については、階調 50 あるいは 60 以下の画素を「菌体」として選択した。このとき、菌体と同程度の大きさが選択されるような閾値を、目視により選定した。

画像は 1 つのサンプル当たり 25 枚ずつ取得し、解析に耐える写真を選定して解析に供した。

4.2.6 基質摂取量と銀粒子面積の関係性の評価

各サンプルから得られた画像について、画像解析ソフト Leica QWin を用いて、菌体周辺に生成した銀粒子の面積を測定した。基質摂取量と単位セル当りの銀粒子面積について、両者の関係性の把握を試みた。それぞれの培養系における単位セル当りの銀粒子面積(1)式によって算出した。

$$\begin{aligned} & \text{系列}x\text{における単位セル当りの銀粒子面積の平均値 (SGarea}(x)) \quad \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{個}} \right] \\ &= \frac{\sum_{i=1}^{\text{視野数}} (\text{系列}x\text{の第}i\text{番目の視野における銀粒子面積}) \quad [\mu\text{m}^2]}{\sum_{i=1}^{\text{視野数}} (\text{系列}x\text{の第}i\text{番目の視野における全細菌数}) \quad [\text{個}]} \quad \dots(1) \end{aligned}$$

4.3 実験結果および考察

4.3.1 露光時間の検討

露光時間 1, 3, 5 および 8 days における単位セル当りの銀粒子面積の推移を図 4.3 に示す。

R20-1, R20-2 はともに、露光時間が長くなるにつれて銀粒子面積の増加率が下がり、一定の値に収束していく様子が見られた。一方 R5-1, R5-2 は、露光時間 1 – 8 days の範囲において、銀粒子面積が直線的な増加を続ける傾向が見られた。

R20 の系では摂取された ^3H -基質が多かったため照射される放射線量が比較的多く、銀粒子の生成が迅速であったため、3 – 8 days で銀粒子が飽和に達しはじめたと考えられた。一方で R5 の系では、 ^3H -基質が少なかったため放射線量が少なく、銀粒子の生成速度が遅いため、露光時間 8 days では飽和期に達しなかったと考えられた。ただ、露光時間 3 – 8 days の範囲内では、銀粒子面積の大小が基質摂取量の多寡と一致しており、純菌を対象とした実験では、この範囲内で露光時間を設定するのが望ましいと考えられた。

銀粒子の生成が飽和に達する露光時間は、用意する実験系によって異なると思われる。このため、それぞれの菌株について別々に露光時間の検討を行う方が、より適切であったと考えられる。しかしながら今回の試験においては、*R.eutropha* も *E.coli* もほぼ同一の実験条件で実験を行ったため、*R.eutropha* における露光時間の検討結果を *E.coli* にも適用して露光時間を決定することとした。

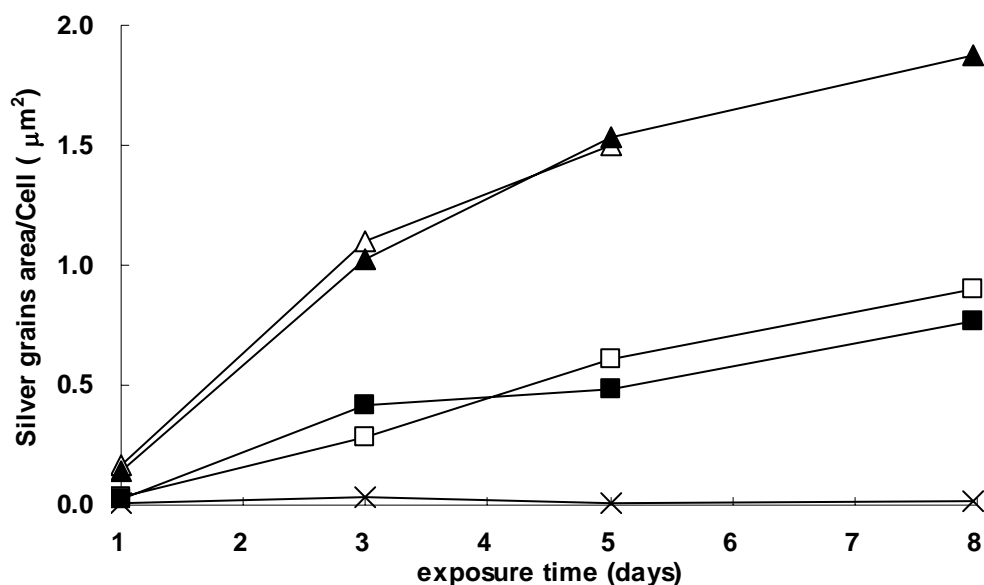


図 4.3 単位セル当りの銀粒子面積 (*R.eutropha*) の推移. それぞれのシンボルは□, R5-1; ■, R5-2; △, R20-1; ▲, R20-2 (8 days はデータ無し); ×, RP を表す.

4.3.2 純菌 1 種類を用いた検討

「単位セル当りの銀粒子面積が、基質摂取量を表現しうるかどうか」を、*R.eutropha*、*E.coli* の純菌を用いて確認した。E5（2 繰り返し）、E20（同）、R5（同）、R20（同）、EP（繰り返しなし）および RP（同）の系について、単位セル当りの銀粒子面積を算出し、それらの比較を行った。単位セル当りの銀粒子面積は(1)式により算出した。*R.eutropha* 周辺の銀粒子面積の算出には「露光時間 5 days、閾値 120」を採用し、*E.coli* 周辺の銀粒子面積の算出には「露光時間 7 days、閾値 160」を採用した。*E.coli* 周辺の銀粒子面積の解析において、より大きな閾値を採用したのは、これらの MAR 画像を撮像する際に誤って顕微鏡の光量を増やして撮像してしまったため、MAR 画像が通常よりも明るく撮像されてしまい、閾値 120 では適切な解析ができない状態だったためである。

解析に供した画像数、セル数をまとめたものを表 4.2 に、それぞれの系で得られた画像を図 4.6、図 4.7 に示す。

***R.eutropha* を用いた試験**

(1) 基質摂取量の確認

hot 培養と並行して、通常の基質のみを添加した培養（cold 培養）を実施し、*R.eutropha* による基質摂取量を測定した。結果、2 時間の培養を通じて添加した基質（酢酸ナトリウム, 23.3 mgC/L）の全量が摂取されていた。この結果から、hot 培養の際に添加した基質は、いずれの系でも全量摂取されていたと判断した。

(2) 銀粒子面積による基質摂取量比較の可否の検討

各系列の単位セル当りの銀粒子面積[$SGarea(x)$]を図 4.4 に示す。基質摂取量と $SGarea(x)$ の相関を調べたところ、有意な相関が認められ（t-test, $P<0.05$ ）、高度に有意な直線回帰（ $y = 0.0709x + 0.1187$ ）が認められた（t-test, $P<0.01$ ）。このことから、 $SGarea(x)$ は基質摂取量に対して直線的に変化すると見て良いと考えられた。 $SGarea(x)$ に対して母平均の 95%信頼区間を求めたところ、図 4.4 中の点線の範囲となった。

***E.coli* を用いた試験**

(1) 基質摂取量の確認

hot 培養と並行して cold 培養を実施し、*E.coli* による基質摂取量を測定した。結果、2 時間の培養を通じて添加した基質（酢酸ナトリウム, 23.9 mgC/L）の全量が摂取されていた。この結果から、hot 培養の際に添加した基質は、いずれの系でも全量摂取されていたと判断した。

(2) 銀粒子面積による基質摂取量比較の可否の検討

各系列の単位セル当りの銀粒子面積の平均値 [$SGarea(x)$] を図 4.5 に示す。基質摂取量と $SGarea(x)$ の相関を調べたところ、有意な相関が認められ（t-test, $P<0.05$ ）、高度に有意な直線回帰（ $y = 0.0182x - 0.0059$ ）が認められた（t-test, $P<0.01$ ）。このことから、 $SGarea(x)$ は基質摂取量に対

して直線的に変化すると見て良いと考えられた。*R.eutropha* と同様に、*SGarea(x)*に対して母平均の95%信頼区間を求めたところ、図 4.5 中の点線の範囲となり比較的広い範囲を取った。

以上の結果から、*R.eutropha*、*E.coli* の双方とも、基質摂取量と *SGarea(x)*に正の相関が認められ、銀粒子面積によって基質摂取量の多寡を比較できることが示された。ただし、両者の回帰直線の95%信頼区間はある程度広い範囲を取っていることから、比較する銀粒子面積がわずかである場合には、慎重な判断が必要であると考えられた。

表4.2 *R.eutropha* あるいは*E.coli* による実験のMAR画像の解析結果

<i>R.eutropha</i>				
系*	画像数 (枚)	銀粒子面積の合計 (μm^2)	セル数の合計 (個)	<i>SGarea(x)</i> ($\mu\text{m}^2/\text{cell}$)
R5	14	541.3	894	0.6
	12	486.3	1006	0.5
R20	8	629.1	419	1.5
	6	1469.7	958	1.5
RP	20	6.5	572	0.0
<i>E.coli</i>				
系*	画像数 (枚)	銀粒子面積の合計 (μm^2)	セル数の合計 (個)	<i>SGarea(x)</i> ($\mu\text{m}^2/\text{cell}$)
E5	18	40.8	480	0.1
	18	35.0	633	0.1
E20	17	206.9	523	0.4
	20	260.0	764	0.3
EP	20	3.8	1076	0.0

*各系列の試験は繰り返し数2で行った。ただし、RPおよびEPは繰り返し無しである。

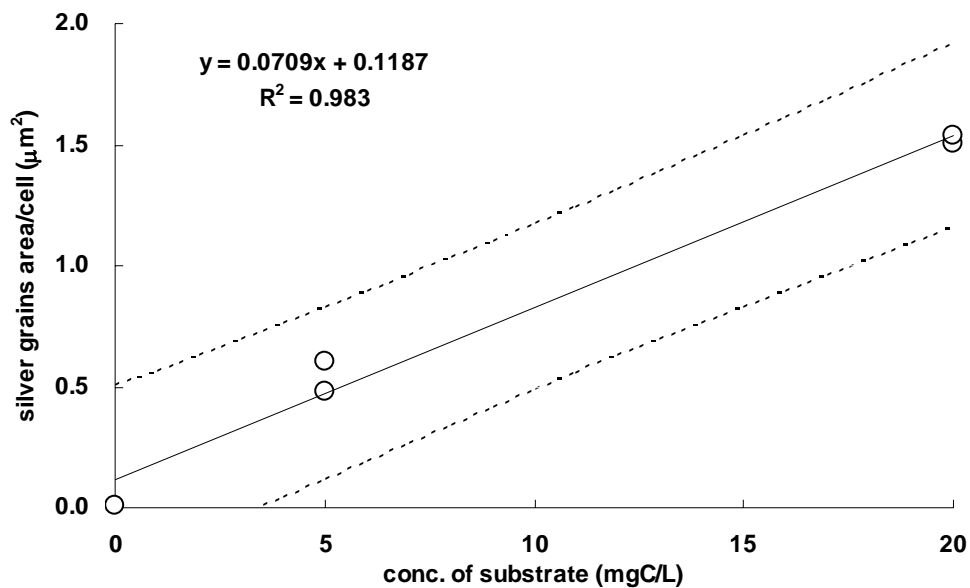


図 4.4 基質摂取量と各培養系 (R5-1, R5-2, R20-1, R20-2 および RP) の $SGarea(x)$ 値の関係. 実線は回帰直線を, 点線は母平均の 95%信頼上限および 95%信頼下限を表す.

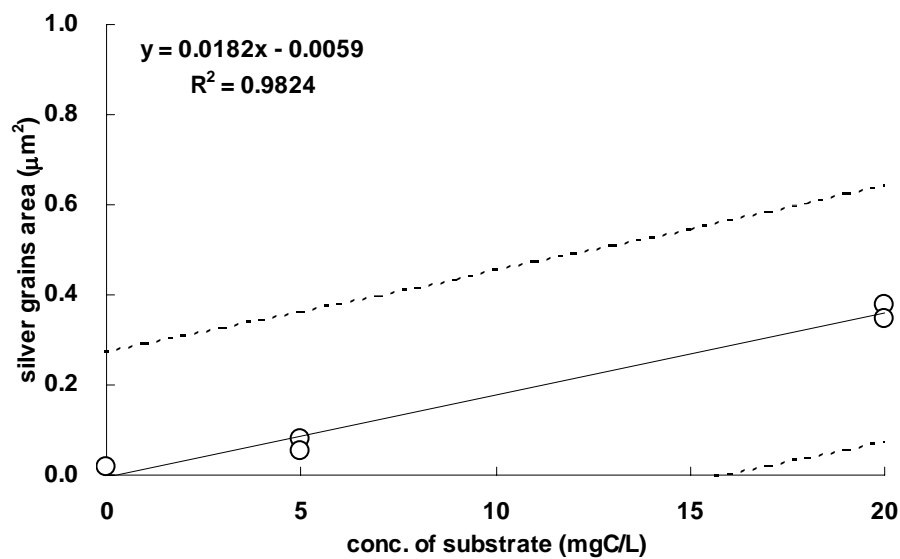
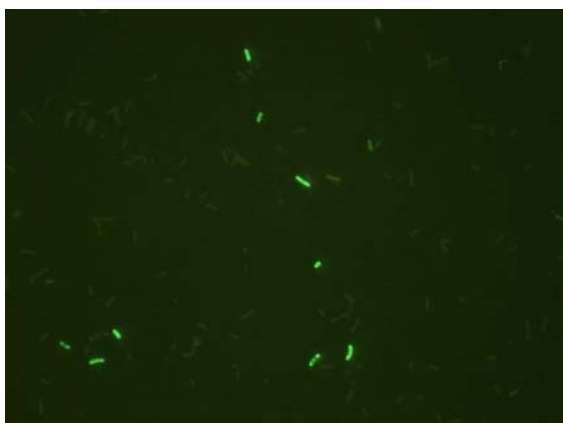
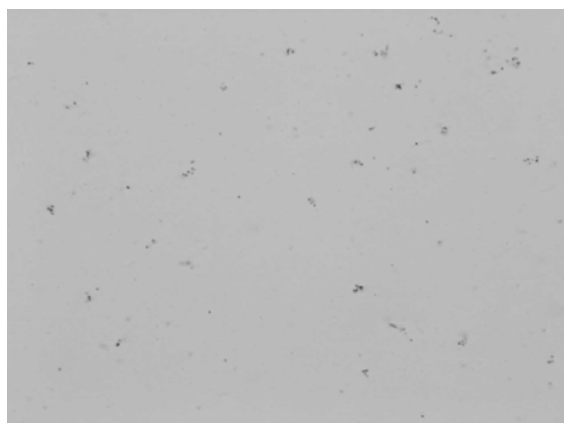
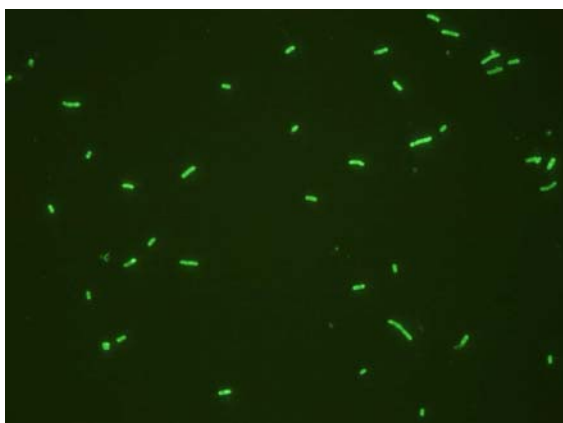


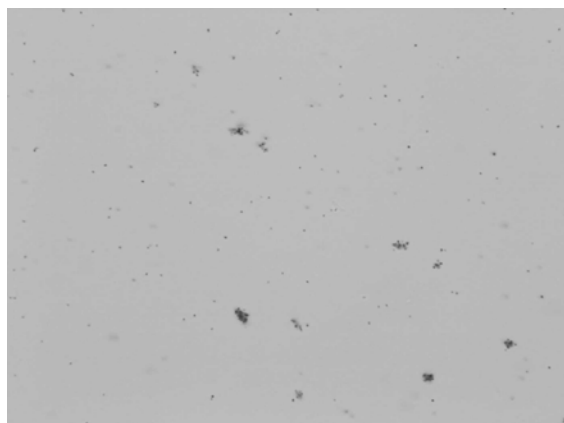
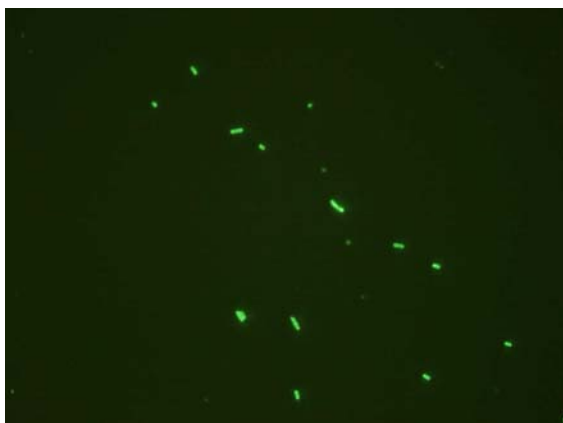
図 4.5 基質摂取量と各培養系 (E5-1, E5-2, E20-1, E20-2 および EP) の $SGarea(x)$ 値の関係. 実線は回帰直線を, 点線は母平均の 95%信頼上限および 95%信頼下限を表す.



系列 RP で得られた FISH 画像（左）および MAR 画像（右）

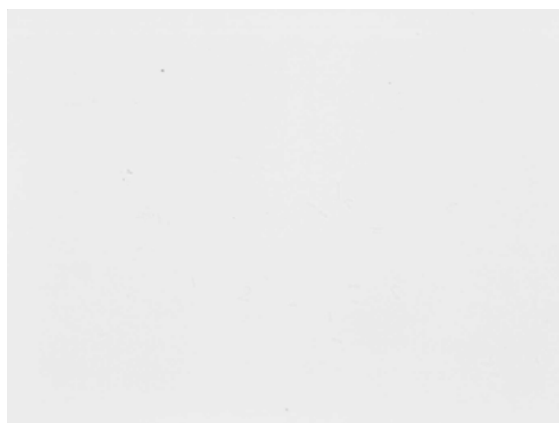
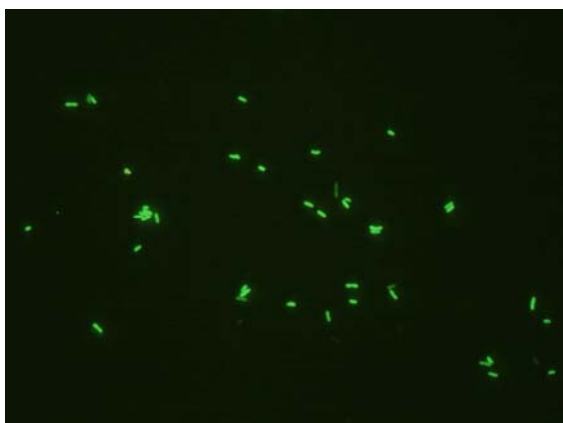


系列 R5-1 で得られた FISH 画像（左）および MAR 画像（右）

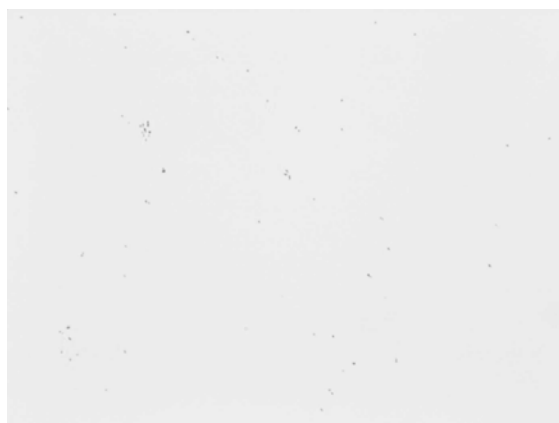
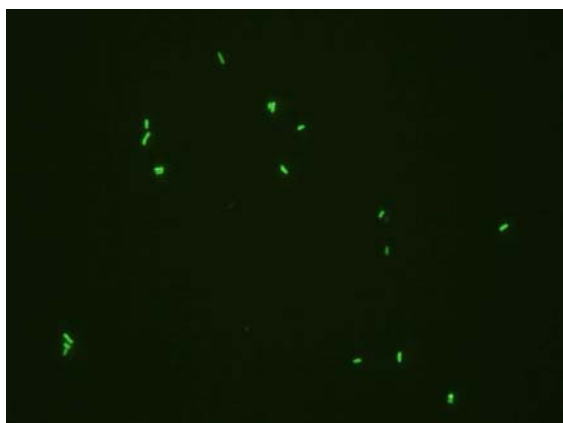


系列 R20-1 で得られた FISH 画像（左）および MAR 画像（右）

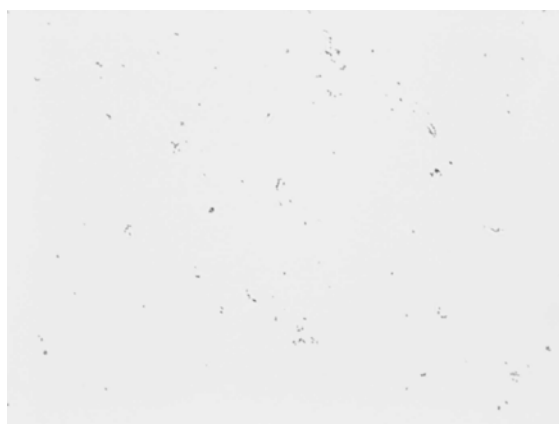
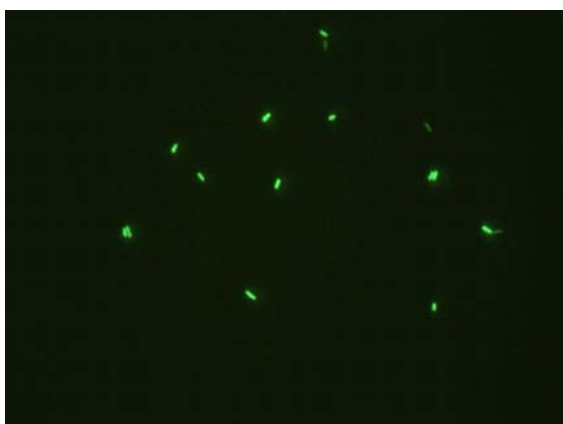
図 4.6 *R.eutropha* を用いた試験で得られた FISH 画像と MAR 画像



系列 EP で得られた FISH 画像（左）および MAR 画像（右）



系列 E5-1 で得られた FISH 画像（左）および MAR 画像（右）



系列 E20-1 で得られた FISH 画像（左）および MAR 画像（右）

図 4.6 *E.coli* を用いた試験で得られた FISH 画像と MAR 画像

4.3.3 純菌 2 種類を用いた検討

前節までで、単一の細菌種を用いた場合には、単位セル当りの銀粒子面積によって基質摂取量の比較が可能であることが示された。次に、複数の細菌種を用いた場合にも、同様の評価が可能かどうかを明らかにするため、以下の 2 種類の試験を行った。

- ・ 試験(A) E.coli に 5 mgC/L、R.eutropha に 20 mgC/L を摂取させ、それぞれの菌体周辺に生成した、単位セル当りの銀粒子の面積を求める
- ・ 試験(B) E.coli に 20 mgC/L、R.eutropha に 5 mgC/L を摂取させ、それぞれの菌体周辺に生成した、単位セル当りの銀粒子の面積を求める

その後、基質の摂取量と単位セル当りの銀粒子面積の関係性を解析した。

解析に供した画像数、セル数をまとめたものを表 4.5 に、それぞれの系で得られた画像を図 4.10、図 4.11 に示す。

E.coli および R.eutropha を用いた試験

(1) 基質摂取量の確認

E.coli および *R.eutropha*

よる基質摂取量を測定した。結果を表 4.3 および表 4.4 に示す。試験 A では 2 時間の培養を通じて、*R.eutropha* は約 23 mgC/L を、*E.coli* は約 16 mgC/L の基質を摂取していた。このことから、ラジオアイソトープを用いて培養した系でも、添加した基質が全量摂取されたと判断した。また試験 B では *R.eutropha*、*E.coli* ともに、添加した基質のほぼ全量を摂取しており、ラジオアイソトープを用いて培養した系でも、添加した基質が全量摂取されたと判断した。

表4-3 試験Aでの*R.eutropha* および*E.coli* の培養液中の基質濃度の推移と基質摂取量.

	<i>R.eutropha</i> *	<i>E.coli</i> *
添加直後	23.3	23.3
120分培養後	0.0	7.2
基質摂取量	23.3	16.1

*, mgC/L

表4-4 試験Bでの*R.eutropha* および*E.coli* の培養液中の基質濃度の推移と基質摂取量.

	<i>R.eutropha</i> *	<i>E.coli</i> *
添加直後	23.3	23.9
120分培養後	0.0	0.9
基質摂取量	23.3	23.0

*, mgC/L

(2) 銀粒子面積による基質摂取量比較の可否の検討

試験 A、B で培養したサンプルに対して、*R.eutropha* 周辺の単位セル当りの銀粒子面積および *E.coli* 周辺の単位セル当りの銀粒子面積を測定した。銀粒子面積は(1)式により算出した。試験 A、B はともに、露光時間 5 days、閾値は 120 で解析を行った。結果を図 4.8 および図 4.9 に示す。

試験 A では基質摂取量と $SGarea(x)$ の関係には正の相関が認められたが、試験 B では両者に相

関が見られず、基質摂取量と銀粒子面積の関係が逆転していた。試験 B で *E.coli* の基質摂取量が *R.eutropha* のそれよりも大きいにも関わらず、銀粒子面積の値が逆転した理由として、*E.coli* 体内からの標識化合物の漏出が考えられた。*R.eutropha* は摂取した酢酸を PHA として菌体内に蓄積するが、*E.coli* は摂取した酢酸を分解し H_2O と CO_2 に変換している可能性が高い。本試験で使用した放射性基質は 3H -酢酸ナトリウムであるため、 3H が *E.coli* 体内に残らず菌体内に漏出することは十分に考えられる。そこで、試験 B における菌体内の正味のアイソトープ量を、液体シンチレーションカウンタ (LSC) を用いて調べた。LSC は対象物の放射能濃度の測定に用いられる方法である。シンチレータと呼ばれる液体に α 線が照射されると、シンチレータが発光する。この原理を利用して放射性物質をシンチレータ中に添加し、発光量から添加した物質の放射能濃度を測定することができる。試験 B の *E.coli* および *R.eutropha* の固定後の培養液を遠心分離により固液分離し、菌体ペレットと上澄液に含まれるアイソトープ量を計測した。結果を表 4.6 に示す。

E.coli の系では上澄み液の LSC 値が菌体ペレットのそれよりも高いことから、標識化合物が菌体内から漏出した可能性が強く示唆された。また菌体ペレットの LSC 値は、*E.coli* の値が *R.eutropha* の値よりも低くなっており、*E.coli* に含まれているアイソトープ量は *R.eutropha* よりも少量になっていることが示された。このことから、単位セル当りの銀粒子面積 [$SGarera(x)$] が基質摂取量と逆転したのは、単位セル当りの銀粒子面積 [$SGarera(x)$] が基質摂取量を反映していないのではなく、両者の菌体内に含まれているアイソトープ量を適切に反映した結果だったと考えられた。

銀粒子面積は菌体内に存在するアイソトープの量を示すため、標識化合物が摂取後に何らかの原因で菌体外に移動した場合は、正味の摂取量を銀粒子面積で評価することはできない。*E.coli* は基質 (今回は 3H -酢酸ナトリウム) を摂取した後に、標識化合物が菌体外に移動するタイプに該当すると考えられる。一方、*R.eutropha* では標識化合物が体内に蓄積される。このように、取り込んだアイソトープのその後の挙動が異なる (基質代謝様式が異なる) 2 つの細菌種については、基質摂取量の比較に銀粒子を用いるのは不適當であると考えられた。

PAOs と GAOs は基質 (たとえば短鎖脂肪酸) を取り込んだ後、どのような代謝をしているかが明確でない。このため、標識化合物が PAOs あるいは GAOs に取り込まれた後、同じような挙動を示すかどうかは不明である。このような状況では、銀粒子面積によって PAOs と GAOs の基質摂取量を直接比較することは不適當と考えられた。しかしながら、対象を単一の微生物種に限定すれば、銀粒子面積を用いる基質摂取の多寡を評価できる。たとえば、培養条件の変化に伴って PAOs あるいは GAOs の基質摂取がどのように変化するか、という事を把握することは可能である。そこで第 5 章では、培養時の pH が異なる系を用意し、pH が PAOs あるいは GAOs の基質摂取に及ぼす影響を調査することにした。また、それぞれの pH 条件下での、PAOs と GAOs の基質競合を評価することを試みた。

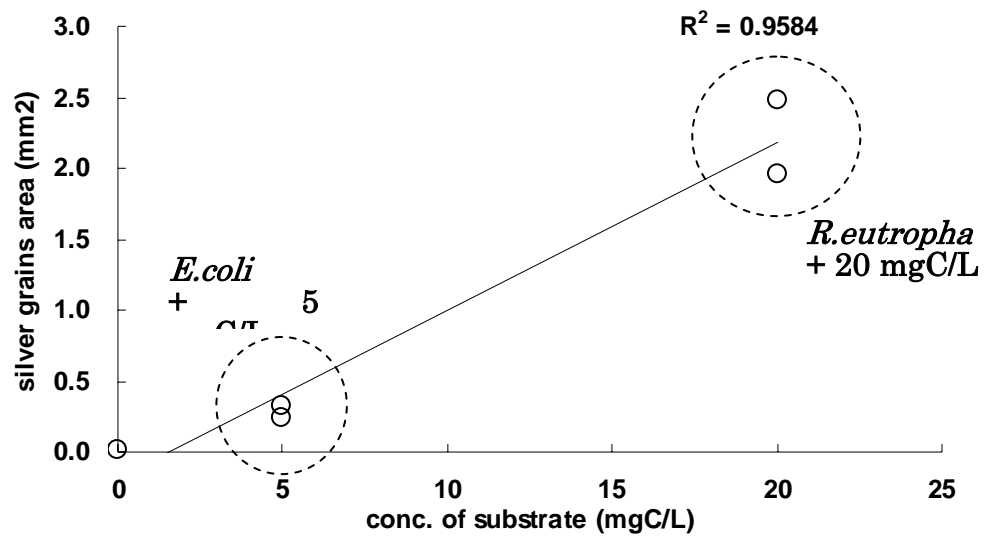


図 4.8 試験 A の結果. 基質摂取量と $SGarea(x)$ (*E. coli*あるいは *R. eutropha* を用いた培養系) の関係を表す.

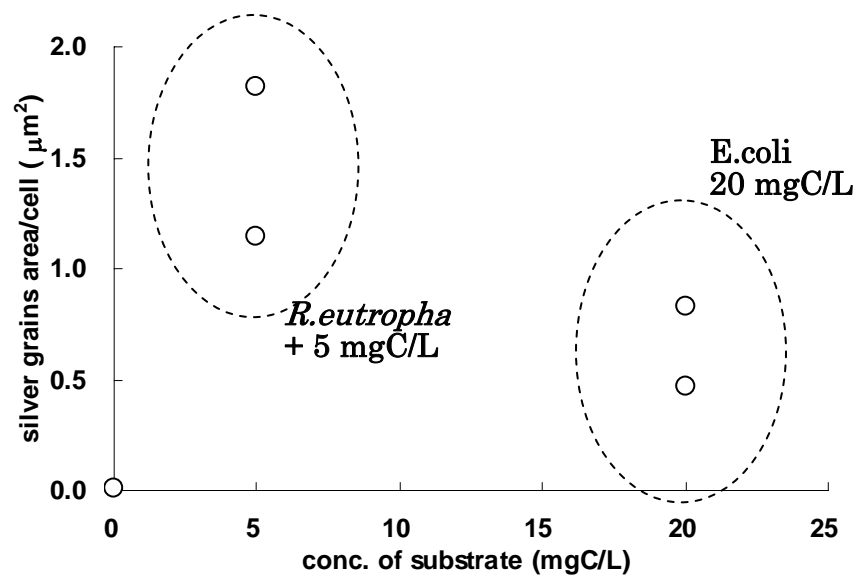


図 4.9 試験 B の結果. 基質摂取量と $SGarea(x)$ (*E. coli*あるいは *R. eutropha* を用いた培養系) の関係を表す.

表4.5 試験Aおよび試験Bで得られた実験のMAR画像の解析結果

試験A (*R.eutropha* に5 mgC/Lの基質を、*E.coli* に20 mgC/Lの基質を添加)

系*	画像数 (枚)	銀粒子面積の合計 (μm^2)	セル数の合計 (個)	SGarea(x) ($\mu\text{m}^2/\text{cell}$)
<i>E.coli</i>	16	50.6	153	0.3
	17	57.4	246	0.2
<i>R.eutropha</i>	16	415.5	168	2.5
	17	273.3	140	2.0
滅菌対照	20	3.7	349**	0.0

試験B (*E.coli* に5 mgC/Lの基質を、*R.eutropha* に20 mgC/Lの基質を添加)

系*	画像数 (枚)	銀粒子面積の合計 (μm^2)	セル数の合計 (個)	SGarea(x) ($\mu\text{m}^2/\text{cell}$)
<i>E.coli</i>	19	134.3	287	0.5
	20	208.8	252	0.8
<i>R.eutropha</i>	19	294.5	257	1.1
	20	390.0	214	1.8
滅菌対照	20	4.3	331**	0.0

*, 各系列の試験は繰り返し数2で行った. ただし, 滅菌対照系は繰り返し無しである.

**, 全セルの合計値.

表 4.6 試験 B における培養後の *E.coli* (E20-1 および E20-2) および *R.eutropha* (R5-1 および R5-2) の液体シンチレーションカウンターの値. 遠心分離により固液分離した後の菌体ペレットと上澄み液の値.

	菌体ペレット	上澄み液
E20-1	5.9×10^4	7.8×10^4
E20-2	4.0×10^4	7.8×10^4
R5-1	6.8×10^4	1.8×10^4
R5-2	6.4×10^4	1.9×10^4

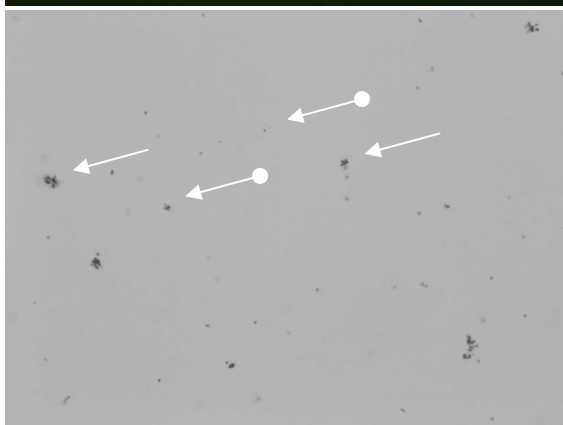
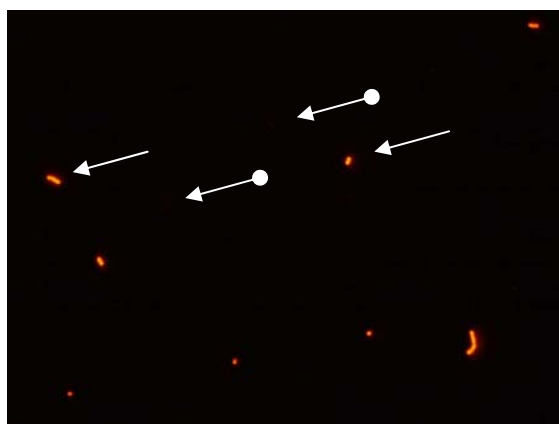
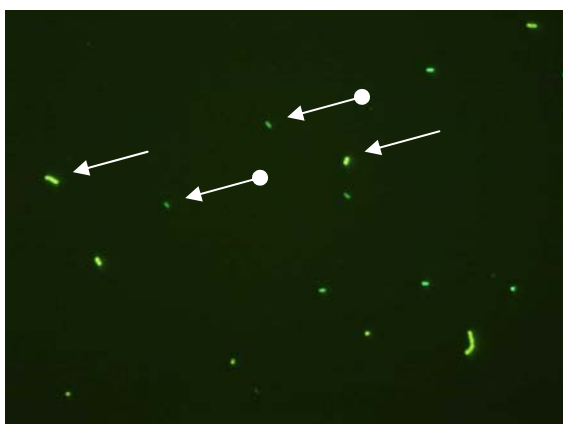


図 4.10 試験 A で画像 (左上)FITC-FISH 画像, (右上)Cy3-FISH 画像, (左下)MAR 画像.
始点が○の矢印は *E.coli* を表す. 通常の矢印は *R.eutropha* を表す.

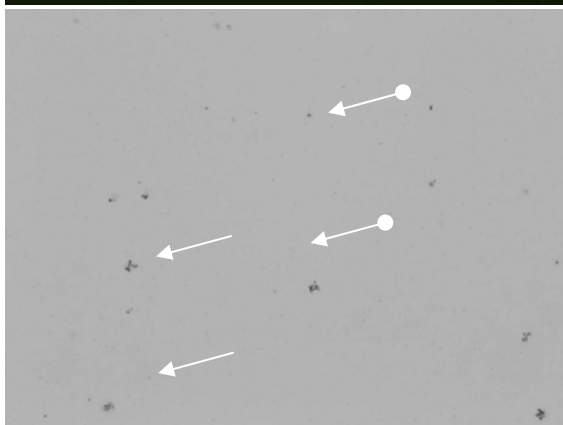
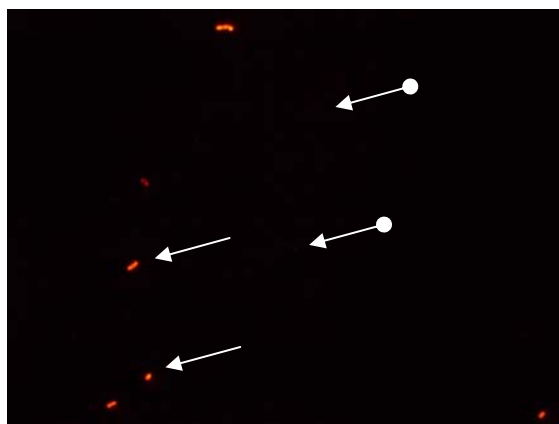
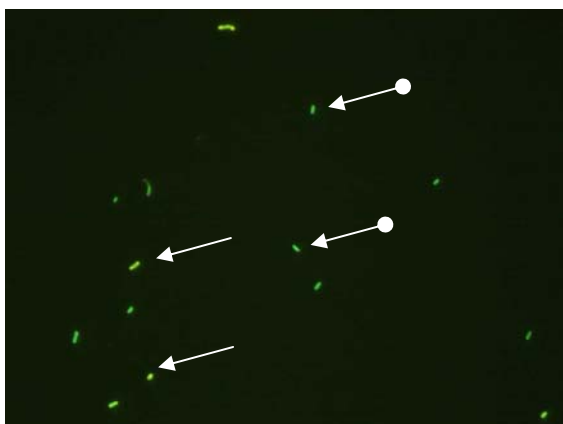


図 4.11 試験 B で画像 (左上)FITC-FISH 画像, (右上)Cy3-FISH 画像, (左下)MAR 画像.
始点が○の矢印は *E.coli* を表す. 通常の矢印は *R.eutropha* を表す.

4.4 結論

本章では、純菌を用いた試験から、以下のことが明らかとなった。

- 単位セル当りの銀粒子面積は、細菌の基質摂取量の多寡を表現している。単一の細菌種が対象であれば、銀粒子面積により基質摂取量の多寡を比較することが可能である。
- 銀粒子面積による評価は菌体内にトラップされているアイソトープの量を把握しているに過ぎず、代謝様式が異なる複数の細菌種の基質摂取量を直接比較するのには、適当でないと考えられる。

第 5 章 MAR-FISH 法による PAO-GAO の基質摂取量の比較

5.1 概要

第 4 章では MAR-FISH 法を用いて、単位セル当りの銀粒子面積を比較することで、細菌種の基質摂取量の多寡を比較できることが明らかとなった（ただし、対象が 1 種類の細菌である場合のみ）。そこで本章では、銀粒子面積の比較によって、汚泥培養時の初期 pH が生物学的リン除去プロセス内の PAOs あるいは GAOs の基質摂取に及ぼす影響を調査した。

培養開始時の pH が異なる系を用意し、嫌気条件下でバッチ試験を行い、採取した汚泥を MAR-FISH 法に供した。得られた顕微鏡画像について、代表的な PAOs と考えられている *Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphatis*’、GAOs の一種である *Candidatus* ‘*Conpetibacter phosphatis*’の単位セル当りの銀粒子面積を定量した。

2 回おこなった実験から、全く異なる結果が得られた。すなわち、培養初期の pH が *Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphatis*’の基質摂取、あるいは *Candidatus* ‘*Conpetibacter phosphatis*’の基質摂取に影響を及ぼすという結果と、及ぼさないという結果が、両方とも得られた。このことから、培養初期の pH が、*Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphatis*’と *Candidatus* ‘*Conpetibacter phosphatis*’の基質摂取におよぼす影響について、本研究で得られたデータからは、決定的な結論を得られなかった。

5.2 実験方法

5.2.1 供試活性汚泥および試料調製

試験には M 水再生センター・嫌気好気活性汚泥法の好気槽末端から採取した活性汚泥を用いた。実験室に持ち帰った供試汚泥は、直ちに人口下水で 3 回洗浄した。人口下水は表 4-1 に示した無機塩培地をさらに 10 倍に希釈して調製した。洗浄後、MLSS が約 1000 mg/L になるように希釈し、培養ビンに移した。窒素パージを約 15 分間おこない、ヘッドスペースを窒素ガスで完全に置換し、嫌気条件を作成した。その後、窒素パージを行いながら培養液の pH を所定の値に調整した。

5.2.2 バッチ試験（hot 培養および cold 培養）

バッチ試験は異なる時期に 2 度実施した。1 度目は 10 月中旬、2 度目は 12 月中旬である。以後、1 度目のバッチ試験を試験 1、2 度目のバッチ試験を試験 2 と呼ぶこととする。試験 1 では初期 pH を 6、7、8 あるいは 9 に、試験 2 では初期 pH を 6、7 あるいは 8 に調整した。

< cold 培養 >

cold 培養は 500 mL 容の容器に汚泥試料約 250 mL を投入して実施した。試料の pH を調整した後、窒素パージを行いながら、速やかに基質（酢酸ナトリウム）を添加してバッチ試験を開始した。バッチ試験の概略図を図 5-1 (a) に示す。最初に添加する基質の濃度は、試験 1 で約 20 mgC/L、試験 2 で約 6 mgC/L とし、一定時間ごとにサンプリングを実施した。このとき、同時に pH を測定した。サンプリングした汚泥を遠心分離による固液分離、ろ過（0.45 μ m Cellulose Acetate, Toyo Roshi 社）に供し、上澄み液を得た。その後上澄み液中の酢酸イオン濃度、リン酸濃度を測定した。

< hot 培養 >

hot 培養は 9 mL 容の容器に汚泥試料 2 mL を投入して実施した。試料の pH を調整した後、窒素パージを行いながら、速やかに基質を添加してバッチ試験を開始した。バッチ試験の概略図を図 5-1 (b) に示す。基質として、 ^3H で標識した酢酸ナトリウムと非標識の酢酸ナトリウムを混合して添加した。添加する基質の濃度は試験 1、2 とともに 20 mgC/L とし、放射能濃度は 20 $\mu\text{Ci/mL}$ になるように調製した（全酢酸ナトリウムに占める ^3H -酢酸ナトリウムの量は 8 %）。その後、嫌気条件で 2 時間培養を行った。培養は 3 繰り返しにて実施した。培養時には 70 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間低温滅菌した汚泥を別途用意して同様に培養し、対照系とした。

培養後、培養液を採取して同量の 8% paraformaldehyde と混合し 3 時間固定し、水道水で 3 回洗浄した。洗浄後、超音波分散（3V, 2A, 120 秒間）を行って、カバーガラスに固定し、FISH 法に供した。FISH 法では、代表的な PAOs である *Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphatis*’（以後、*Accumulibacter* と呼ぶ）を標的とする PAOmix プローブ（Cy3）、GAOs の一種である *Candidatus* ‘*Competibacter phosphatis*’（以後、*Competibacter* と呼ぶ）を含む細菌種を標的とする GB プローブ（Cy3）、全真正細菌を標的とする EUBmix プローブ（FITC）を用いた。

その後、サンプルを MAR 法に供して顕微鏡観察を行い、PAOmix プローブ陽性細菌（*Accumulibacter*）および GB プローブ陽性細菌（*Competibacter*）のセル数と、菌体周辺に生じた銀粒子の面積を測定した。菌数は直接計数法により測定した。

5.2.3 露光時間の検討

第 4 章と同様に、最適な露光時間の検討を行った。露光時間として 6 時間、12 時間、1 および 3 日間を採用し、菌体周辺に生成する銀粒子面積の変化を調べた。それぞれの露光時間で撮像した画像について、目視により最適な露光時間を決定した。

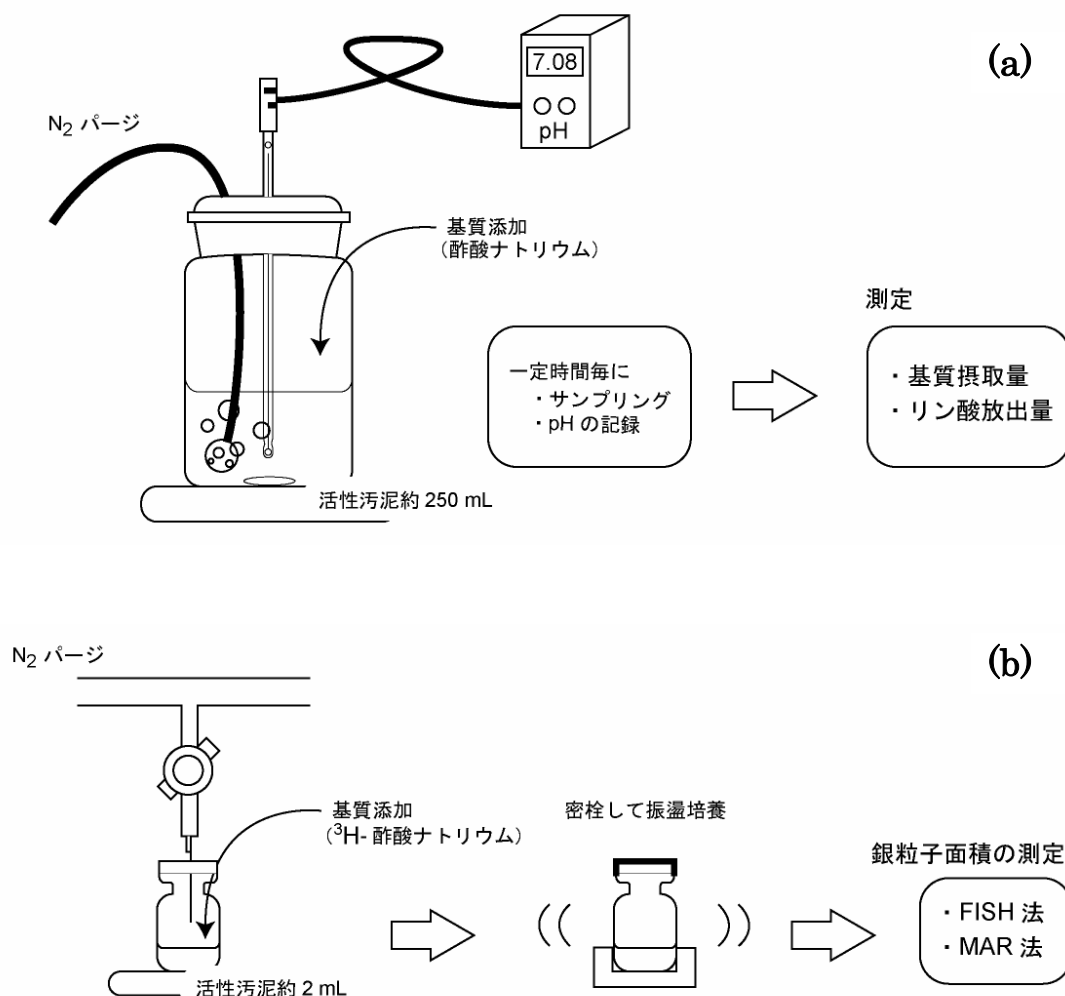


図 5.1 cold バッチ試験および hot バッチ試験の概要.

5.2.4 画像解析

第 4 章と同様に、得られた FISH 画像および MAR 画像を、画像処理ソフト AdobeTM PhotoshopTM を用いて処理した。培養条件ごとに閾値の設定がぶれないよう、階調 60 を閾値として採用し、解析を行うこととした。得られた MAR 画像の観察から、階調 60 が銀粒子の面積を最も正確に表す値だと判断した。なお MAR 画像を得る際には、顕微鏡の光量、絞り、フィルターの有無、撮像時の CCD カメラの露光時間等の条件を、全てのサンプルについて一定にしておき、閾値以外の条件が異ならないように注意した。

2 値化した画像と FISH 画像から、菌体周辺の銀粒子のみが写った画像を得た。FISH 画像を用いて菌体を検出し、細菌周辺の銀粒子面積を測定する。本章で解析に供する FISH 画像は、PAOmix プローブ陽性細菌および GB プローブ陽性細菌が写っている画像で、いずれも陽性細菌は赤色に染色されている。これらの画像については階調 60 を閾値に設定し、それ以下の階調値を持つ画素を「菌体」として選択した。

5.2.5 銀粒子面積の計算

各サンプルから得られた画像について、画像解析ソフト Leica QWin を用いて、PAOmix プローブ陽性細菌（*Candidatus* ‘*Accumulibacter phosphatis*’）あるいは GB プローブ陽性細菌（*Candidatus* ‘*Competibacter phosphatis*’）の菌体周辺に生成した銀粒子の面積を測定した。単位セル当りの銀粒子面積は第 4 章と同様に次式によって算出した。

$$\begin{aligned} & \text{系列}x\text{における単位セル当りの銀粒子面積の平均値 (SGarea}(x)) \quad \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{個}} \right] \\ &= \frac{\sum_{i=1}^{\text{視野数}} (\text{系列}x\text{の第}i\text{番目の視野における銀粒子面積}) \quad [\mu\text{m}^2]}{\sum_{i=1}^{\text{視野数}} (\text{系列}x\text{の第}i\text{番目の視野における全細菌数}) \quad [\text{個}]} \quad \dots(1) \end{aligned}$$

5.3 実験結果および考察

5.3.1 露光時間の検討

露光時間 6 時間、12 時間、1 および 3 日目の MAR 画像および同一視野の FISH 画像を図 5.2(a)-(d) に示す。

露光時間が 1 日以上になると、菌体周辺に銀粒子が密に生じていた。このため、露光時間 1 日の段階で既に、銀粒子の生成が飽和している可能性が考えられた。このため、露光時間として 6 時間あるいは 12 時間を設定することが望ましいと考えられた。

銀粒子生成の様子から、試験 1 では *Accumulibacter* については露光時間 12 時間、*Competibacter* については露光時間 6 時間を、試験 2 では *Accumulibacter*、*Competibacter* ともに露光時間 6 時間を採用した。

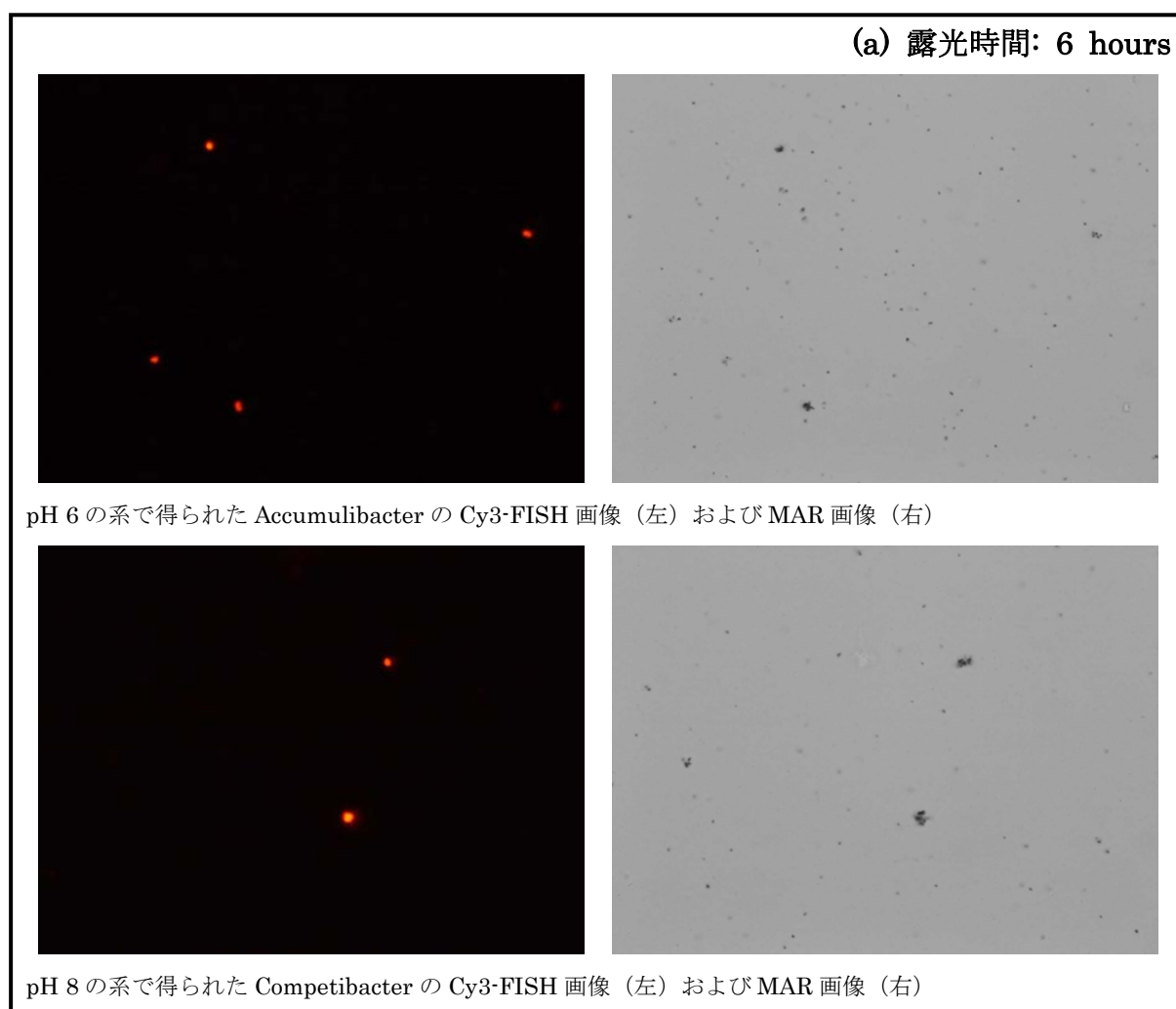
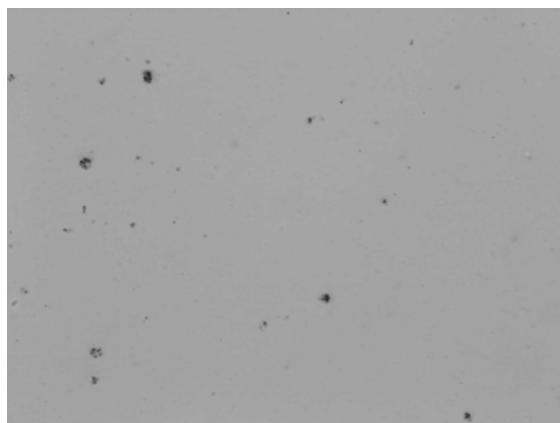
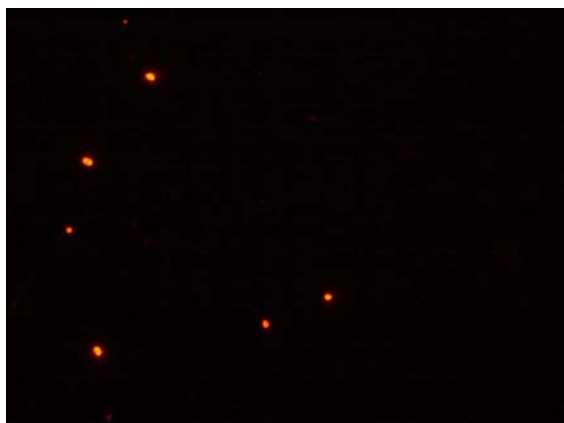
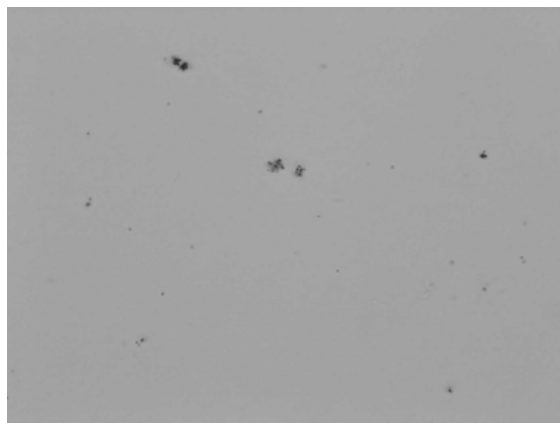
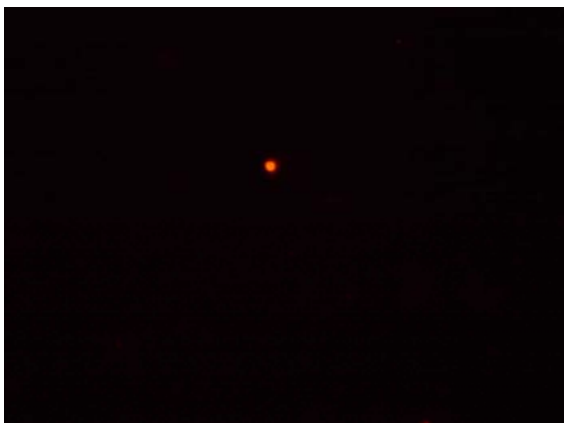


図 5.2 (a) 露光時間 6 hours での *Accumulibacter* あるいは *Competibacter* 周辺に生成した銀粒子

(b) 露光時間: 12 hours



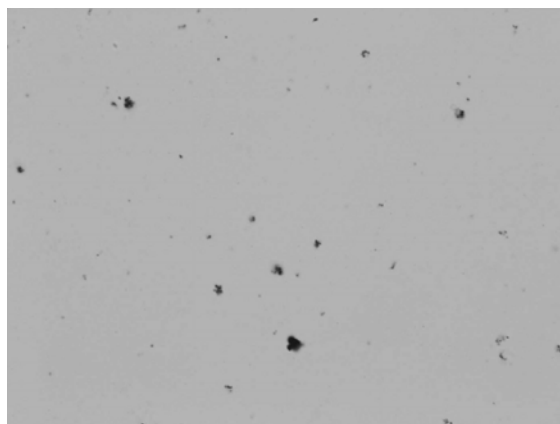
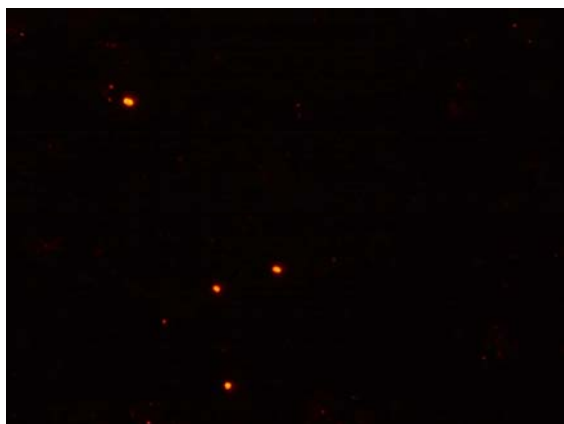
pH 8 の系で得られた *Accumulibacter* の Cy3-FISH 画像 (左) および MAR 画像 (右)



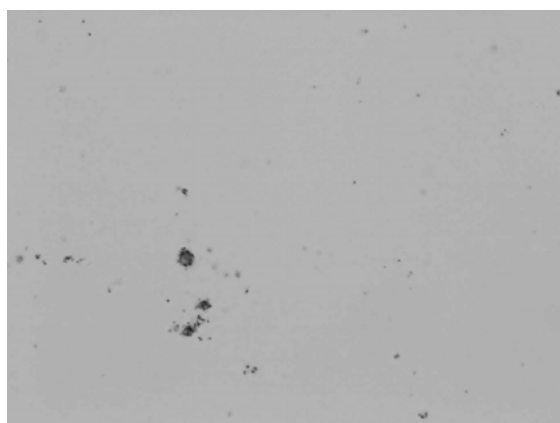
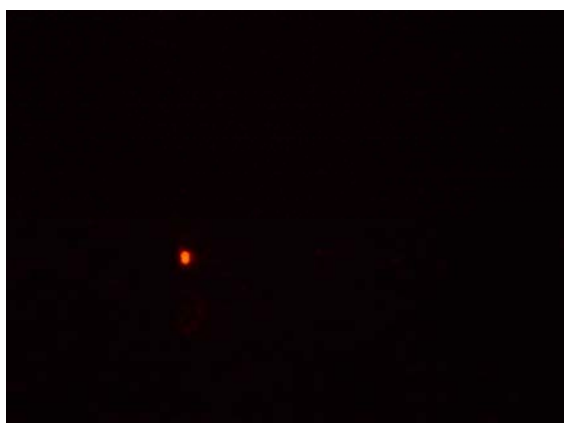
pH 6 の系で得られた *Competibacter* の Cy3-FISH 画像 (左) および MAR 画像 (右)

図 5.2 (b) 露光時間 12 hours での *Accumulibacter* あるいは *Competibacter* 周辺に生成した銀粒子

(c) 露光時間: 1 days



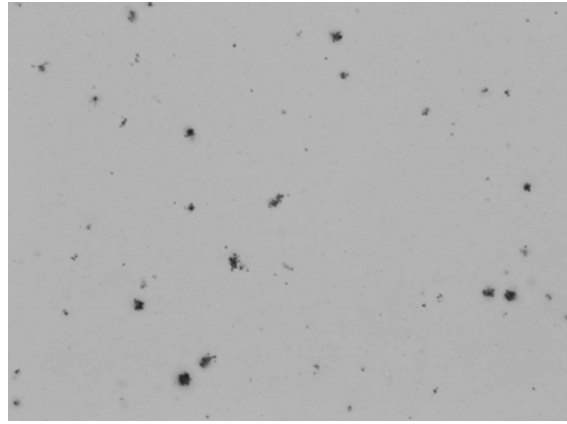
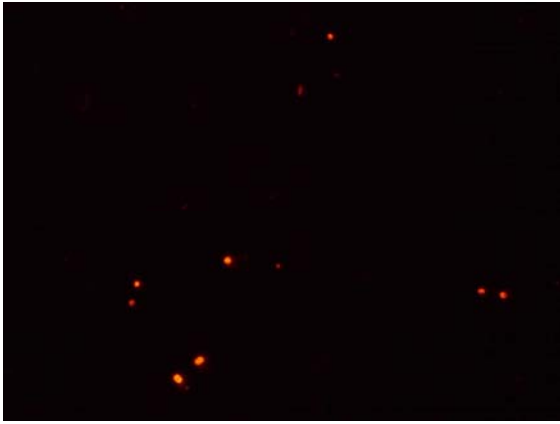
pH 8 の系で得られた *Accumulibacter* の Cy3-FISH 画像 (左) および MAR 画像 (右)



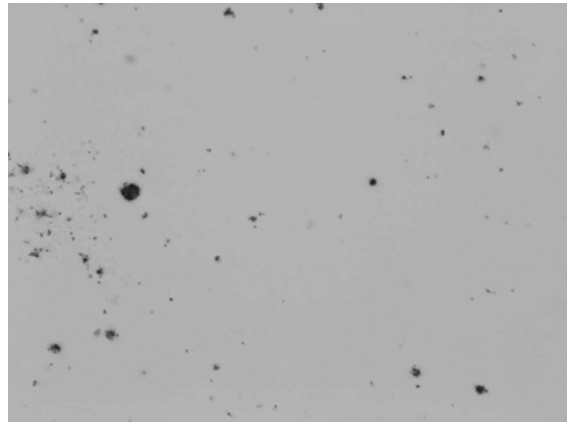
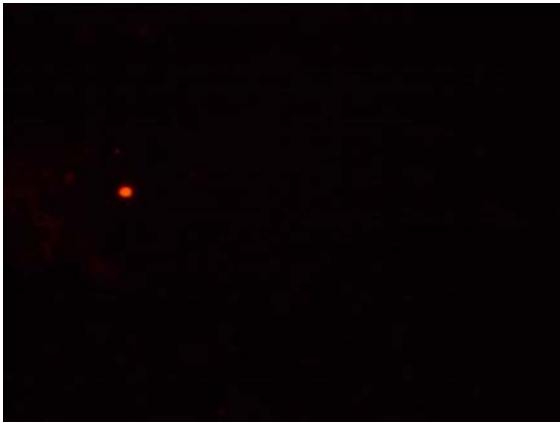
pH 8 の系で得られた *Competibacter* の Cy3-FISH 画像 (左) および MAR 画像 (右)

図 5.2 (c) 露光時間 1 days での *Accumulibacter* あるいは *Competibacter* 周辺に生成した銀粒子

(d) 露光時間: 3 days



pH 8 の系で得られた *Accumulibacter* の Cy3-FISH 画像 (左) および MAR 画像 (右)



pH 8 の系で得られた *Competibacter* の Cy3-FISH 画像 (左) および MAR 画像 (右)

図 5.2 (d) 露光時間 3 days での *Accumulibacter* あるいは *Competibacter* 周辺に生成した銀粒子

5.3.2 cold 試験の結果

試験 1 および試験 2 における pH の挙動、酢酸イオン濃度の推移およびリン酸イオン濃度の推移を以下に示す（図 5.3 – 図 5.8）。図 5.3 – 図 5.5 は試験 1 の結果を、図 5.6 – 図 5.8 は試験 2 の結果を表す。

試験 1 における pH は、初期 pH が 6、7 および 8 の系では徐々に上昇し、試験開始 60 分後には 7.5、7.9 および 8.2 に推移した。その後は若干の変動が見られるものの、pH おおむね一定の値を取っていた。初期 pH が 9 の系では pH に大きな変動は見られず、試験終了時（120 分後）にはわずかに減少して 8.6 であった。

試験 1 における基質摂取量は、初期 pH が 7 あるいは 8 の系で最大であった。いずれも添加した基質の全量が摂取されており、それぞれの摂取量は 17.4 mgC/L、22.1 mgC/L であった。初期 pH が 6 の系の摂取量は 15.5 mgC/L で、添加した基質の一部が残った。初期 pH が 9 の系の摂取量では 4.0 mgC/L であった。また、リン酸放出量は、初期 pH が 6 のときに最大で、9.3 mgP/L であった。初期 pH が上昇するに従ってリン酸放出量は低下し、初期 pH が 7、8、9 の系ではそれぞれ、7.7 mgP/L、6.8 mgP/L、5.4 mgP/L であった。

試験 2 における pH はいずれの系でも徐々に上昇し、試験開始 20 分後には初期 pH が 6 の系で 7.4 に、初期 pH が 7 の系で 7.7 に、初期 pH が 8 の系で 8.3 に推移した。その後は徐々に低下し、試験終了時（120 分後）にはそれぞれの系で、7.2、7.5、7.9 を示した。

試験 2 では、いずれの系においても添加した基質の全量（約 6 mgC/L）が摂取されていた。また、リン酸放出量は、初期 pH が 7 において最大値（9.4 mgP/L）を示した。初期 pH が 6、8 の系におけるリン酸放出量はそれぞれ、7.9 mgP/L、8.1 mgP/L であり、pH が 6 から 7 にかけてはリン酸放出量が増加し、pH が 7 から 8 にかけては低下していた。

リン酸の放出量は PAOs の活性を表す材料になることから、pH とリン酸放出量（あるいは単位酢酸摂取量あたりのリン酸放出量）の関係は、多くの報告例がある。既往の知見では、pH の上昇に伴って、リン酸の放出も上昇するという報告例が圧倒的である。PAOs が酢酸摂取の際に必要なとするエネルギーについては、次のような説明がなされている。すなわち、低 pH 条件下では、多くの酢酸が菌体内に受動輸送されるため、PAOs が必要とするエネルギー量は少なくすみ、反対に高 pH 条件下では受動輸送がなくなるため、酢酸摂取のために PAOs 自身が多量のエネルギーを生産することになる（Smolders *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996）。これによれば、高 pH で多量のエネルギーを必要とすることから、菌体内に蓄積されたポリリン酸がより多量に分解される。このため、酢酸摂取量あたりのリン放出量が増加すると説明される。

一方で、本研究で得られた結果では、試験 1 において pH の上昇に伴ってリン酸放出が低下するという結果が得られた。また、酢酸摂取量あたりのリン放出量を求めたところ、この値も pH が上昇するに従って低下した（ただし、pH 9 を除く）。これは既往の知見と決定的に異なっている。Liu ら（2006）は本研究と同様に、嫌気培養の初期の pH のみを調整した実験系を用意して、初期 pH が汚泥に及ぼす影響を調べている。彼らはその中で、pH が 6.4 から 6.8 に上昇する際、リンの放出量が減少することを観察している。リン放出量が減少した理由として、活性汚泥の細胞外ポリマーの効果や、酸性条件下でセルからリン酸が溶出していた可能性等を指摘しているが、明確な理由付けは得られていない。試験 1 におけるリン酸の挙動が上記のようになった理由も、これと同様に定かではないが、試験 1 で使用した EBPR 汚泥中の PAOs がこれまでの報告例とは異なる活性を示していた可能性がある。

試験 2 では、リンの放出量が pH 6 から 7 にかけて増加し（7.9 mgP/L→9.4 mgP/L）、pH 7 から 8 にかけて減少が見られた（9.4 mgP/L→8.1 mgP/L）。試験 2 でも pH が上昇する（7 → 8）際にリン放出量の減少（および酢酸摂取量あたりのリン放出量の減少）が見られた（図 5.10）。ただし試験 2 では、添加した基質量が（摂取量可能量に対して）過少であった可能性が強く、pH の変化によるリン放出能の変化を十分に評価できていない可能性が考えられた。

次に基質摂取量について考える。EBPR 汚泥においては、pH が酢酸摂取量に与える影響を調査した例も数多く見られる。既往の知見では、pH が上昇するにしたがって基質摂取量が上昇すると報告しているもの、pH の変動は基質摂取量（あるいは速度）とは無関係であると報告しているもの等、異なる知見が散見される。本章の試験 1 においては、pH 9 の培養系で基質摂取量は極めて少量だった（4.4 mgC/L）。また、pH 7、pH 8 の系列で添加した基質が全量摂取された（それぞれ 17.4 mgC/L, 22.1 mgC/L）のに対し、pH 6 の培養系では基質摂取量がわずかに低い値を示した（15.5 mgC/L）。これらの結果は、Liu ら（1995）および Liu ら（2006）の報告例と良く一致している。Liu ら（1995）は pH 5.0 から pH 8.6 の範囲で、pH を変えて EBPR 汚泥をバッチ試験に供し、pH 5.7 の系、pH 8.6 の系での酢酸摂取量が、pH 6.5, pH 7.1, pH 7.8 の系のそれよりも若干低下することを報告している。また Liu ら（2006）も、培養初期の pH を 6.4 から 8.0 の範囲で変えた系を用意し、EBPR 汚泥をバッチ試験に供した。結果、pH 6.4 の系で酢酸摂取速度、プロピオン酸摂取速度が他の初期 pH の系よりも低い値を取ることを観察した。これらの知見と合わせると、試験 1 で pH 6 における酢酸摂取量が低下したのは、酢酸摂取速度が低下し培養期間（120 分）内では摂取しきれなかった可能性が考えられた。試験 1 の基質摂取の挙動は、従来の EBPR 汚泥における報告例と同様の傾向を示していたと考えられる。

<バッチ試験 1>

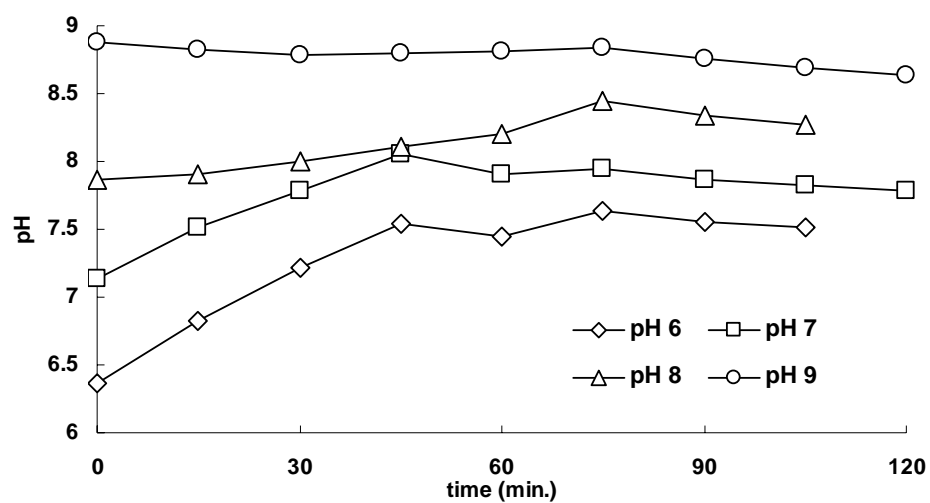


図 5.3 試験 1 における pH の挙動

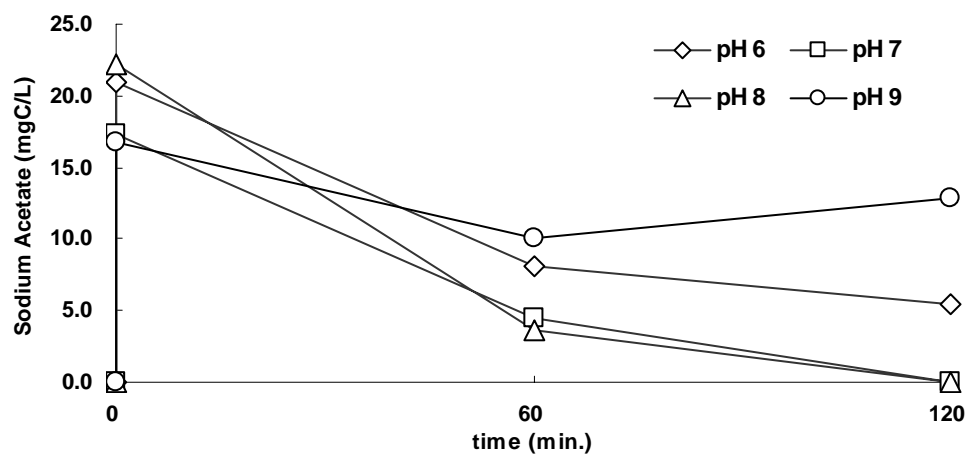


図 5.4 試験 1 に基質（酢酸ナトリウム）濃度の推移

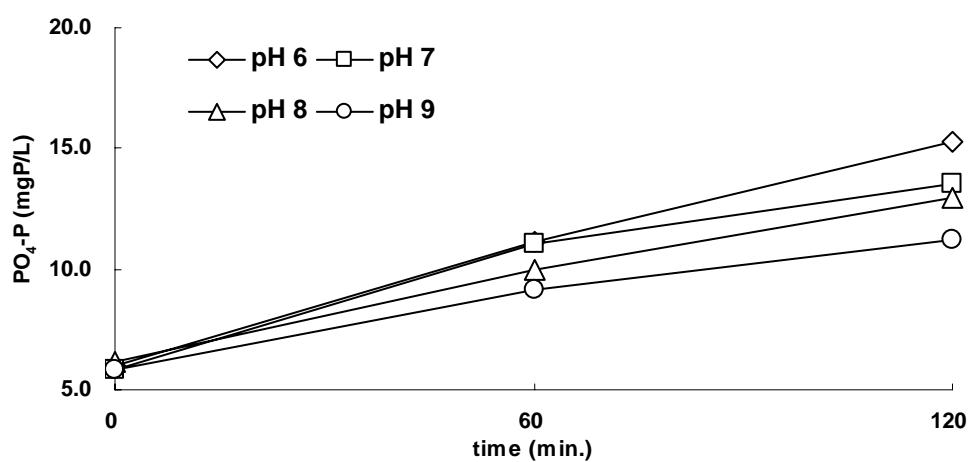


図 5.5 試験 1 にリン酸イオン濃度の推移

<バッチ試験 2>

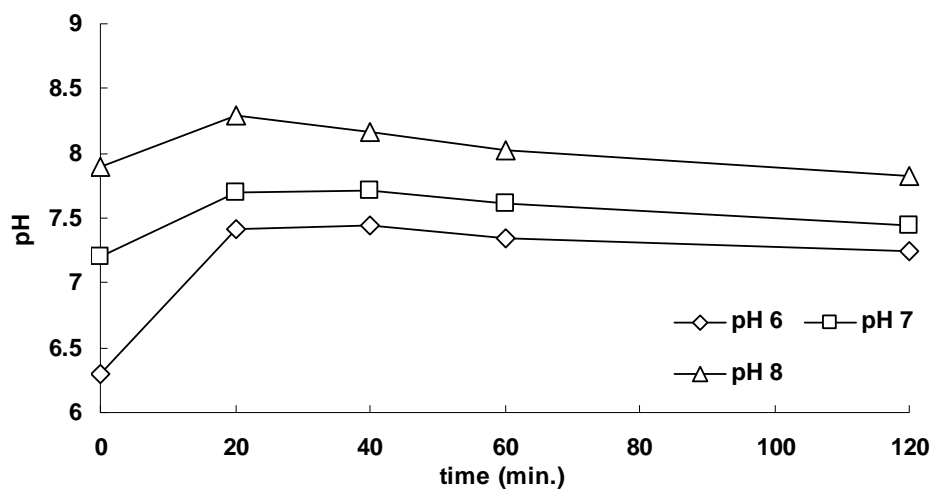


図 5.6 試験 2 における pH の挙動

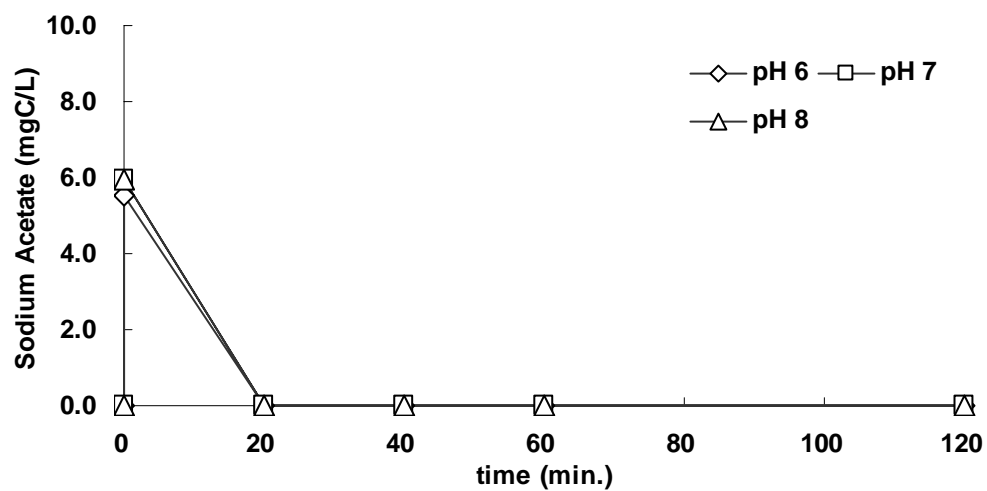


図 5.7 試験 2 に基質（酢酸ナトリウム）濃度の推移

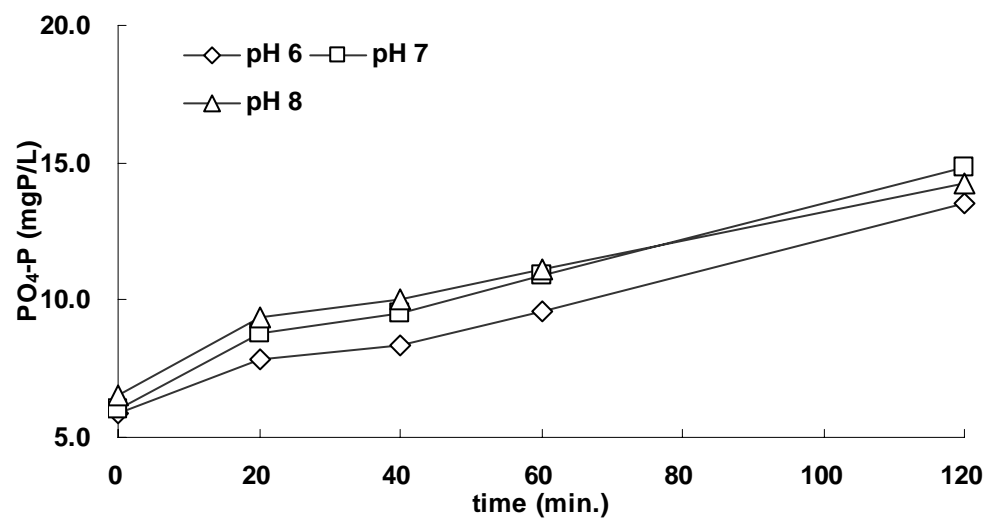


図 5.8 試験 2 にリン酸イオン濃度の推移

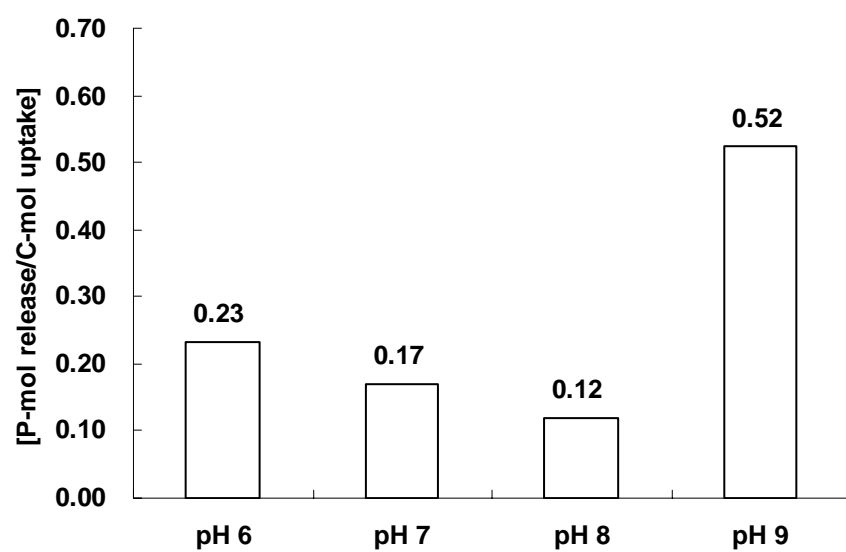


図 5.9 試験 1 における各 pH での、酢酸摂取量あたりのリン放出量 [P-release/Ac-uptake].

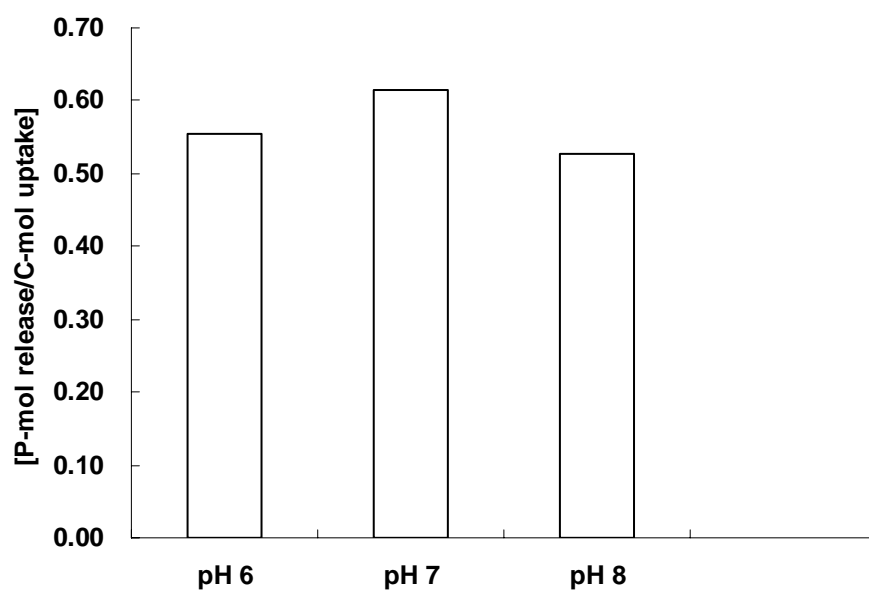


図 5.10 試験 2 における各 pH での、酢酸摂取量あたりのリン放出量 [P-release/Ac-uptake].

5.3.3 hot 試験の結果（銀粒子面積による基質摂取量の比較）

試験 1 および試験 2 における、PAOmix プローブ陽性細菌（*Accumulibacter*）あるいは GB プローブ陽性細菌（*Competibacter*）周辺に生じた、単位セルあたりの銀粒子面積 [$SGarea(x)$] の測定結果を、表 5.1 および図 5.9, 表 5.2 および図 5.10 に示す。それぞれの培養系列で解析に供した画像数、セル数を表 5.1、表 5.2 に、得られた画像を図 5.11、図 5.12 に示す。

試験 1 において、異なる初期 pH における *Accumulibacter* 周辺の $SGarea(x)$ は図 5.9(a) のように分布した。pH 6–8 の範囲では、*Accumulibacter* 周辺の $SGarea(x)$ に有意な差は認められなかった（t-test, $P>0.05$ ）。しかし、pH 9 における *Accumulibacter* 周辺の銀粒子面積は pH 6–8 と比べて有意に減少しており（t-test, $P<0.05$ ）、pH 8 から 9 の範囲では、初期 pH と $SGarea(x)$ の間には、有意な直線回帰（ $y = -0.430x + 4.730$ ）が認められた（t-test, $P<0.02$ ）。このことから、初期 pH が 6 から 8 である場合には、初期 pH が *Accumulibacter* の基質摂取に影響を及ぼすとは言えず、初期 pH が 9 まで上昇すると *Accumulibacter* の基質摂取が低下する可能性が示された。

一方 *Competibacter* については、pH 6 から 9 の範囲において、初期 pH の増加に伴って $SGarea(x)$ が減少する傾向が見られた。初期 pH と $SGarea(x)$ の間に有意な相関関係が認められ（t-test, $P<0.05$ ）、両者間には高度に有意な直線回帰（ $y = -1.053x + 10.98$ ）が認められた（t-test, $P<0.01$ ）。このことから、*Competibacter* 周辺に生じる単位セルあたりの基質摂取量は、初期 pH の上昇に従って直線的に低下していくことが示された。

試験 2 では、異なる初期 pH における *Accumulibacter* 周辺の $SGarea(x)$ は図 5.10(a) のように分布した。pH 6 から 8 の範囲では、*Accumulibacter* 周辺の $SGarea(x)$ と初期 pH の間には有意な相関が認められた（t-test, $P<0.05$ ）。このことから、試験 2 では初期 pH が *Accumulibacter* の基質摂取に影響を与える可能性が示された。一方で *Competibacter* 周辺の $SGarea(x)$ は、初期 pH との間に相関関係が認められず（t-test, $P>0.05$ ）、*Competibacter* の基質摂取に対して初期 pH の影響があるとは言えなかった。

試験 1 および試験 2 の結果から、それぞれの細菌に対して初期 pH の影響が認められる場合と、そうでない場合とが、両方とも観察された。試験 1 では、*Accumulibacter* の基質摂取は初期 pH の影響を受けず、*Competibacter* の基質摂取は初期 pH の影響を受けており、初期 pH の上昇に伴って *Accumulibacter* の基質摂取が相対的に有利になっていく可能性が示された。一方で、試験 2 では試験 1 と逆の結果が示された。

このことから、*Accumulibacter* および *Competibacter* の基質摂取量は、初期 pH の変化に対して常に一定の反応を示すのではなく、低下すること、一定に維持される場合もあることが示された。既往の知見では、PAOs 優占汚泥における酢酸摂取は、pH の影響を受けないとするものが多

い。また、受けるとしても低 pH において、わずかに低下を示すという報告が多い。試験 1 において *Accumulibacter* 周辺の銀粒子面積が示した傾向は、従来の知見を支持するものであったが、試験 2 では従来の知見と異なる結果であった。また、*Competibacter* については、pH が高くなるに従って基質摂取が低下するとされている (Filipe *et al.*, 2001)。これは、基質摂取のためのエネルギーを得るために消費しなければならないグリコーゲンの量が、高 pH 条件下で増加するためだと説明されている (Filipe *et al.*, 2001)。*Competibacter* の基質摂取についても、試験 1 では既往の知見と一致する傾向を示したが、試験 2 では既往知見とは異なる結果であった。

これまでなされている報告では、PAOs あるいは GAOs が優占化した汚泥を用いて、汚泥全体の基質摂取能、リン放出能を評価しており、*Accumulibacter* あるいは *Competibacter* そのものの基質摂取量を評価しているわけではない。*Accumulibacter* あるいは *Competibacter* の単体としての活性は、pH だけでなく様々な要因によって変化する可能性がある。本研究では、*Accumulibacter* あるいは *Competibacter* のシングルセルレベルでの活性（基質摂取量）を評価しており、このことが既往の研究と異なる結果が得られた理由の 1 つであると考えられた。また本研究では、培養初期の pH のみを調整しており、従来の報告とは条件が異なる（既往の報告例では多くの場合、培養期間全体の pH を一定の値に調整している）。このことも、これまでの報告例と異なる結果がえられた理由であると考えられた。

いずれにせよ、本研究で得られた結果からだけでは、初期 pH が *Accumulibacter* あるいは *Competibacter* の基質摂取に及ぼす影響について、決定的なことは言えなかった。同様に異なる初期 pH における両者の競合関係についても、決定的なことは言えない。*Accumulibacter* と *Competibacter* の競合関係を明らかにするためには、同様の実験を繰り返すことで、より多くの知見を得る必要があると考えられた。

表5.1 試験1におけるMAR画像の解析結果（AccumulibacterおよびCompetibacter）。

Accumulibacter				
系*	画像数（枚）	銀粒子面積の合計（ μm^2 ）	セル数の合計（個）	$SGarea(x)$ （ $\mu\text{m}^2/\text{cell}$ ）
pH 6	15	138.2	70	2.0
	19	75.7	58	1.3
	18	67.3	61	1.1
pH 7	18	91.5	64	1.4
	16	61.0	53	1.2
	20	74.0	74	1.0
pH 8	14	73.5	50	1.5
	14	58.6	51	1.1
	15	66.2	53	1.2
pH 9	19	30.6	35	0.9
	16	38.9	46	0.8
	18	55.7	65	0.9
Competibacter				
系*	画像数（枚）	銀粒子面積の合計（ μm^2 ）	セル数の合計（個）	$SGarea(x)$ （ $\mu\text{m}^2/\text{cell}$ ）
pH 6	20	107.7	20	5.4
	19	67.5	19	3.6
	18	100.8	18	5.6
pH 7	19	79.6	19	4.2
	16	62.2	16	3.9
	18	33.7	18	1.9
pH 8	18	51.4	18	2.9
	15	25.5	15	1.7
	17	55.0	17	3.2
pH 9	18	28.2	18	1.6
	17	37.6	17	2.2
	16	20.8	16	1.3

*各系列の試験は繰り返し数3で行った。

表5.2 試験2におけるMAR画像の解析結果（AccumulibacterおよびCompetibacter）。

Accumulibacter				
系*	画像数（枚）	銀粒子面積の合計（ μm^2 ）	セル数の合計（個）	$SGarea(x)$ （ $\mu\text{m}^2/\text{cell}$ ）
pH 6	15	62.2	80	0.8
	19	65.8	72	0.9
	18	78.3	80	1.0
pH 7	18	38.4	63	0.6
	16	58.2	83	0.7
	20	46.8	61	0.8
pH 8	14	27.1	56	0.5
	14	51.5	83	0.6
	15	51.6	70	0.7
Competibacter				
系*	画像数（枚）	銀粒子面積の合計（ μm^2 ）	セル数の合計（個）	$SGarea(x)$ （ $\mu\text{m}^2/\text{cell}$ ）
pH 6	15	162.9	15	10.9
	19	142.2	19	7.5
	18	142.4	18	7.9
pH 7	17	138.5	17	8.1
	17	99.4	17	5.8
	19	119.9	19	6.3
pH 8	18	112.9	18	6.3
	15	108.5	15	7.2
	11	70.5	11	6.4

*各系列の試験は繰り返し数3で行った。

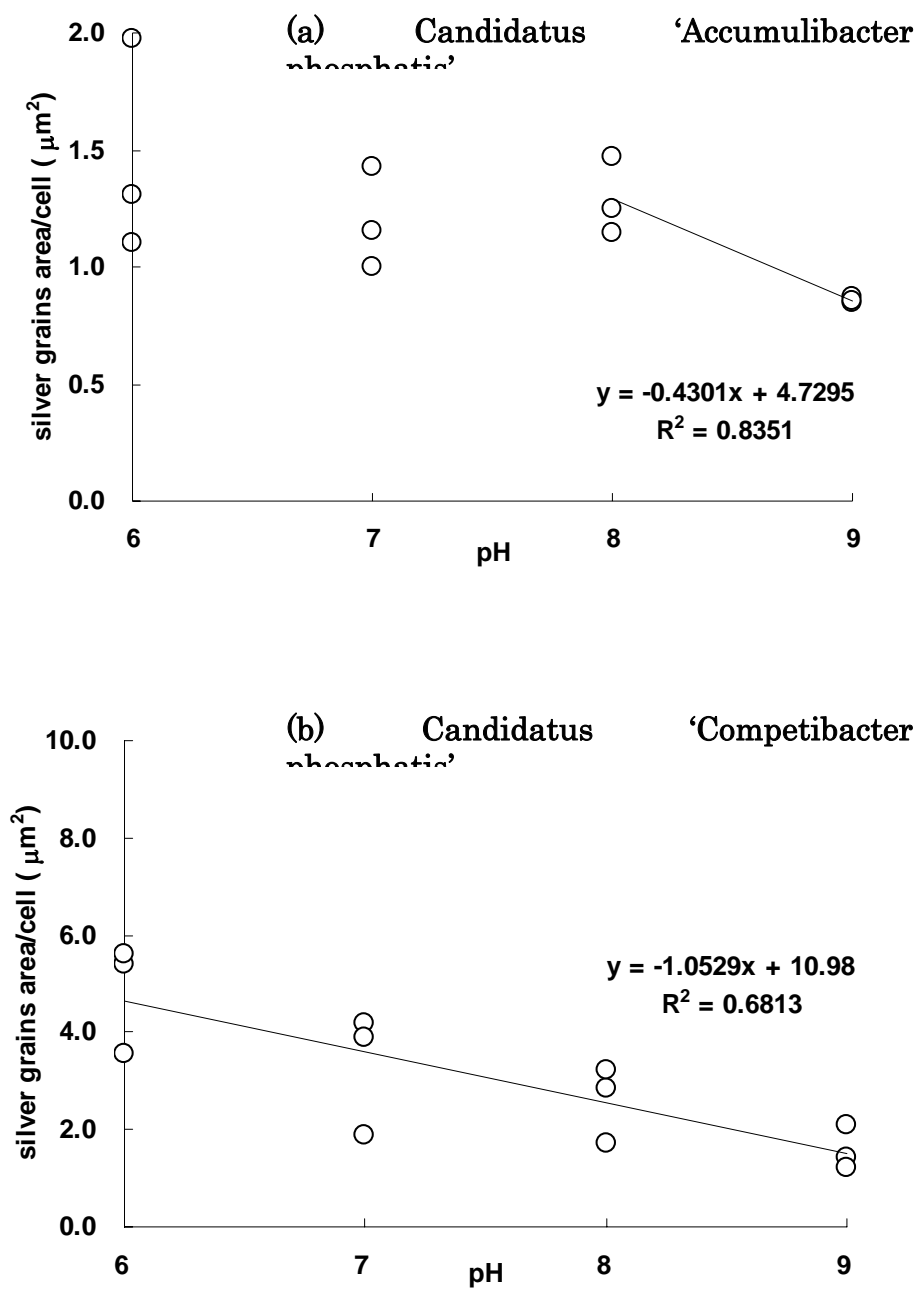


図 5.9 試験 1 における、初期 pH と単位セル当りの銀粒子面積 [$SGarea(x)$] の関係. (a) PAOmix プローブ陽性細菌 (*Candidatus* 'Accumulibacter phosphatis') についての解析結果, (b) GB プローブ陽性細菌 (*Candidatus* 'Competibacter phosphatis') についての解析結果.

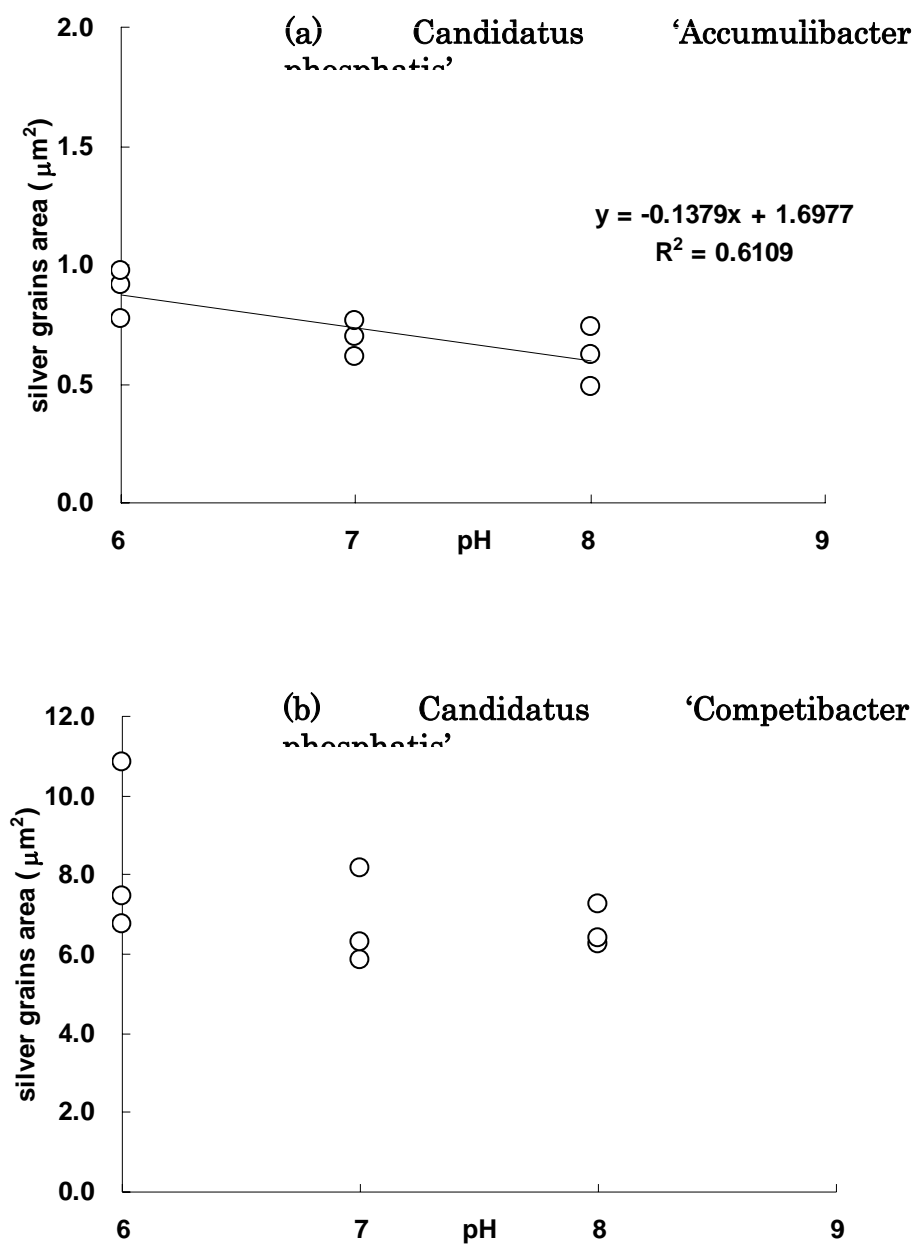


図 5.10 試験 2 における、初期 pH と単位セル当りの銀粒子面積 [$SGarea(x)$] の関係. (a) PAOmix プローブ陽性細菌 (*Candidatus* 'Accumulibacter phosphaticus') についての解析結果, (b) GB プローブ陽性細菌 (*Candidatus* 'Competibacter phosphaticus') についての解析結果.

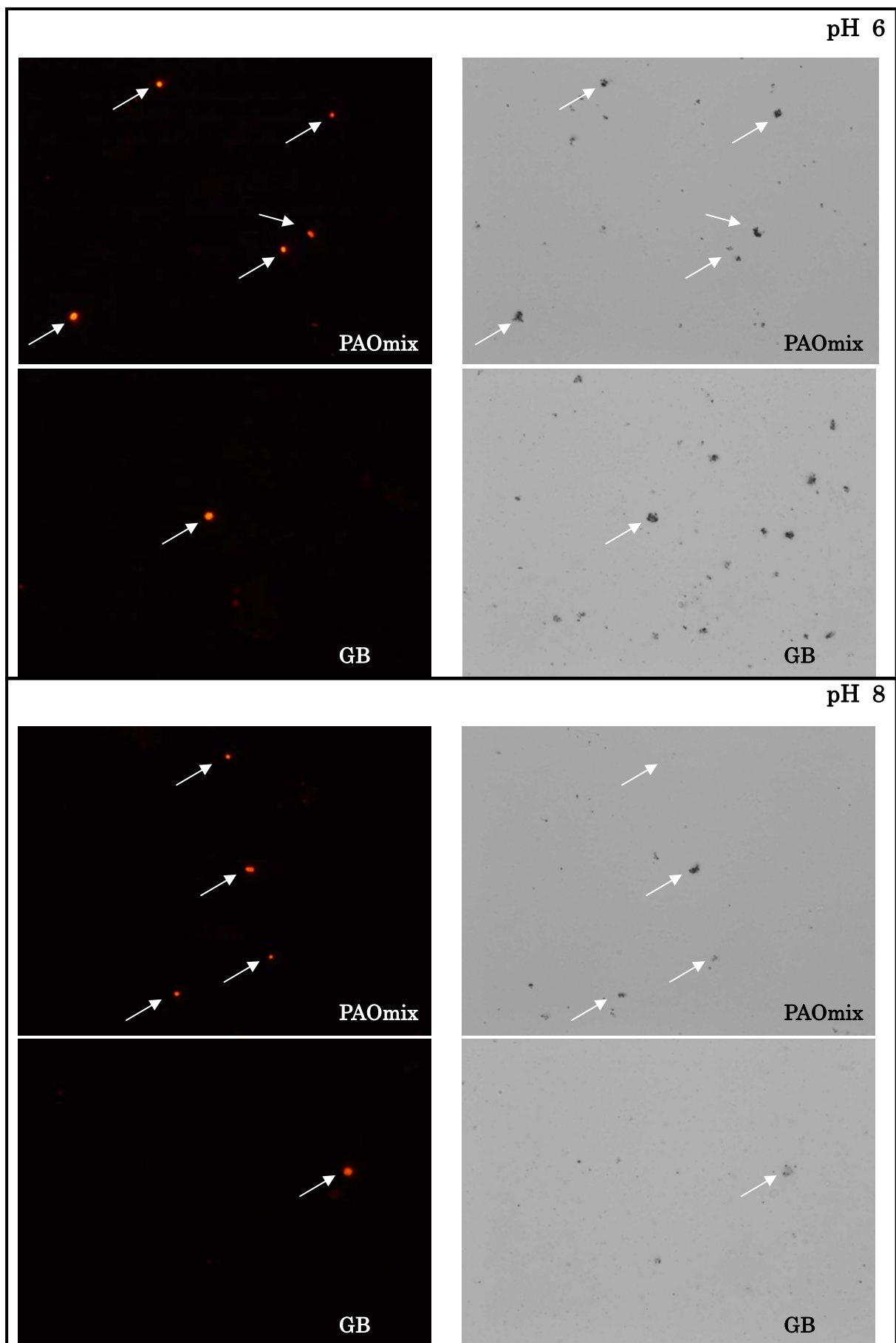


図 5.11 試験 1 における pH 6 の培養系（上段 4 枚）と pH 8 の培養系（下段 4 枚）から得られた Cy3-FISH 画像（左）および MAR 画像（右）。矢印はそれぞれのプローブにポジティブなセルを示す。

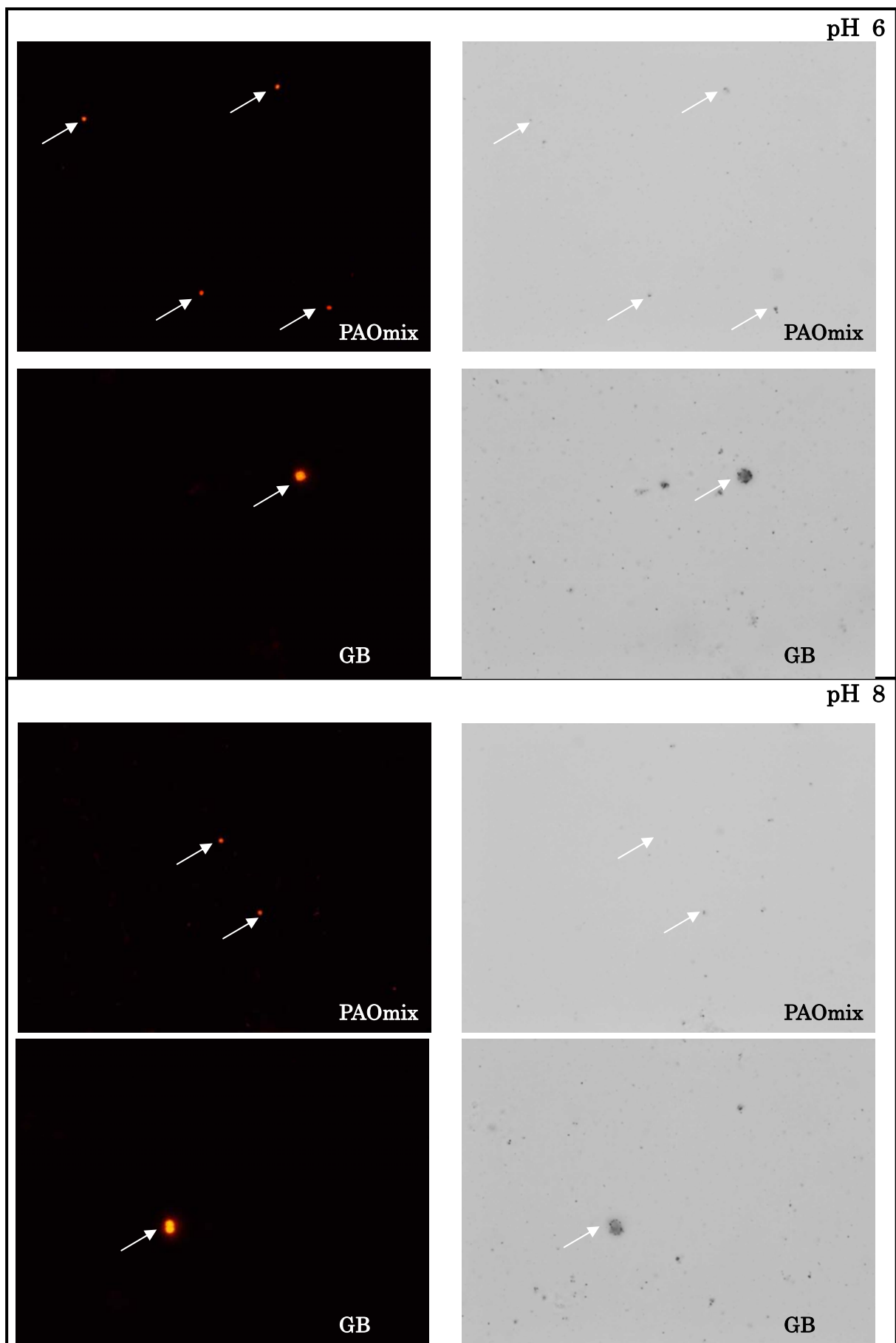


図 5.12 試験 2 における pH 6 の培養系（上段 4 枚）と pH 8 の培養系（下段 4 枚）から得られた Cy3-FISH 画像（左）および MAR 画像（右）．矢印はそれぞれのプローブにポジティブなセルを示す．

5.4 結論

本章では、実処理場の活性汚泥を用いた試験から、以下の結論が得られた。

- ・ 嫌気培養時の初期 pH は、*Accumulibacter* および *Competibacter* の基質摂取に影響を及ぼす場合と及ぼさない場合があった。本研究で得られた結果からだけでは、初期 pH が、*Accumulibacter* あるいは *Competibacter* に及ぼす影響や、双方の競合関係について明確な知見を得ることができなかった。

第 6 章 総括および結論

本章では、本研究で得られた成果を総括した。また、本研究で残された課題と今後の展望について記述した。

6.1 総括および結論

本研究ではポリリン酸蓄積細菌（PAOs）とグリコーゲン蓄積細菌（GAOs）の競合関係に関する知見を集積するため、MAR-FISH 法を用いた解析を実施した。培養時の pH が、PAOs あるいは GAOs の基質摂取に及ぼす影響を調査し、異なる pH 条件下での両者の基質競合（どちらの細菌が有利に基質を摂取しているか）を評価することを目的とした。

第 4 章では、MAR-FISH 法が基質摂取量の多寡を評価するために利用可能かどうか、検討を行った。純菌を用いて試験を実施したところ、基質摂取量と菌体周辺に生じる銀粒子面積（単位セルあたりの銀粒子面積）には有意な相関が認められた。また、基質摂取量と銀粒子面積との間には直線回帰があり、菌体の基質摂取量が増加するに従って、菌体周辺に生じる銀粒子面積は直線的に増加することが示された。このことから、単位セル当りの銀粒子面積を比較することで、菌体の基質摂取量を比較することができると考えられた。ただ、比較する銀粒子面積の値にわずかな差しかない場合には、基質摂取量の大小の判定を慎重に行う必要があると考えられた。また複数の細菌種を対象に、同様の評価が可能であるかどうかを確かめる試験を実施した。2 種類の純菌を用いて、一方の細菌種に高濃度の基質を摂取させ、他方の細菌種に低濃度の基質を摂取させる試験を行った。結果、高濃度の基質を摂取させた菌体において、その菌体周辺に生じた銀粒子の面積が、低濃度の基質を摂取させた菌体のそれよりも小さくなる場合があった。これは、菌体に取り込まれた放射性同位体が代謝の過程で H_2O 等の可動性の物質に変換され、菌体外に漏出したためと考えられた。このように菌体内部にトラップされている放射性同位体量が基質摂取量を正しく反映していない場合には、銀粒子面積を用いて複数の細菌種の基質摂取量を比較することはできないことが示された。このことから、代謝様式の異なる（あるいは、その可能性がある）複数の細菌種を対象として、銀粒子面積を用いて基質摂取量を評価することは、適当でないと考えられた。

第 4 章において対象とする細菌種が 1 種類の場合には、(MAR-FISH 法に供することで菌体周辺に生じる) 銀粒子面積を用いて基質摂取量の多寡が評価可能であることが示された。そこで第 5 章では銀粒子面積を用いて、PAOs と GAOs の競合関係を解析した。実処理場から採取した汚泥を対象に、培養初期の pH が異なる系を用意してバッチ試験を実施し、PAOs、GAOs の基質摂取に対する pH の影響を調査した。pH に着目したのは、PAOs と GAOs の競合を左右する因子の 1 つとして、pH の影響が古くから指摘されているためである。実験の結果、pH が PAOs あるいは GAOs

の基質摂取に及ぼす影響は、一定でないとの結果が得られた。このため、培養時 pH と PAOs-GAOs の競合の関係性（どの pH 条件下でどちらが有利に基質摂取を行っているか）について、明確な知見を得ることはできなかった。

6.2 今後の展望

本研究では、PAOs-GAOs の競合に対する pH の影響について、決定的な情報を得ることができなかった。pH と PAOs-GAOs 競合の関係性を把握するためには、第 5 章と同様の実験を繰り返し、多くのデータを集積する必要がある。そうすれば pH が PAOs、GAOs の基質摂取量に及ぼす影響、pH が PAOs-GAOs の基質競合に及ぼす影響について、何らかの結論が下せる可能性は高い。また、PAOs-GAOs の基質競合を左右する因子には、添加する基質の種類、硝酸・亜硝酸の有無など、pH 以外にも様々なものが提案されている。シングルセルレベルでの解析によれば、これらの因子の影響について、これまで得られている以上に詳細な情報が得られるはずである。さらに、本研究においては、PAOs として *Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'* のみを対象として、GAOs として *Candidatus 'Competibacter phosphatis'* のみを対象として解析を行った。しかし、PAOs も GAOs も複数の細菌群から構成される集団であり、*Accumulibacter* や *Competibacter* 以外にも重要な役割を担う PAOs あるいは GAOs が存在すると考えられている (Seviour *et al.*, 2003; Kong *et al.*, 2005; 宇田, 2006)。FISH 法におけるターゲットを広げて解析を実施すれば、PAOs 全体、GAOs 全体での基質競合に関する知見を得ることができる。そうした情報を積み重ねれば、生物学的リン除去プロセスの理解が進むだけでなく、より安定的、効率的な運転を実現することが可能になるはずである。今後は、MAR-FISH 法だけでなく様々な手法も駆使して、より広範な細菌種、培養条件を対象とした網羅的な解析がなされることが望まれる。

謝辞

本論文は、私が修士課程に在学した2年間の研究成果をまとめたものです。その間、数多くの方にお世話になりました。

味埜俊先生（新領域創成科学研究科社会文化環境学専攻教授）には、指導教官として多数のご指導、ご助言を頂きました。とりわけ修士課程へ進学して間もないころ、先生に頼ることばかりを考えていた私に、自立して課題に取り組む姿勢の重要性を示してくださいました。そのおかげで私は、物事に接する際の態度を改めることができ、研究だけでなく様々な方面で新たな挑戦ができるようになったと考えています。

また、佐藤弘泰先生（新領域創成科学研究科社会文化環境学専攻助教授）には、研究計画の立案から実験要領にわたるまで、終始懇切なご指導、ご助言を数多く頂きました。グループミーティングや研究会において、研究の方向性や枠組みを意識できるように、また、課題や問題の解決に向けた、指摘や示唆を投げかけてくださいました。突然、お邪魔してミーティングをお願いしたことも数多ありましたが、その都度お時間を割いてくださいました。

また、小貫元治先生（サステナビリティ学連携研究機構特任講師）には、研究の着想から整理に至るまで、繊細なご指導、ご助言を頂きました。グループミーティングや研究会では、ご自身の経験や知識に照らして、多くの貴重なアドバイスを頂きました。

また、浦川秀敏先生（附属海洋研究所助教授）には、副指導教官として多くのご指導、ご助言を頂きました。ミーティングの際には多くのご指摘をいただき、自らの研究について見つめなおすきっかけを与えてくださいました。そのおかげで、自らの研究のクオリティを高めることができたと考えています。

また、埜和之先生（アイソトープ総合センター助手）には、アイソトープセンターの利用にあたって、多大なご指導、ご助力を頂きました。センターの利用にあたって、機器の使用や時間外利用など、様々な面でお力を貸してくださいました。

また、Adeline Chua Seak May 博士（マライヤ大学研究員）には、研究室の先輩として、多大なご助言、ご助力を頂きました。研究をはじめるに当たっての相談、手法の指導、研究上の課題や問題の克服についてのご助言等、身に余るご支援を頂きました。また、公私にわたって親しく接していただいたおかげで、研究を進める上での不安を取り除いていただいただけでなく、楽しい研

研究室生活を過ごすことができました。

また、福島寿和氏（新領域創成科学研究科博士課程）には、研究室の先輩として、多大なご助言、ご声援を頂きました。私が研究上の課題に直面している際には、いつも貴重な意見を頂きました。私が突然相談をお願いしたような場合でも、快く応じてくださいました。グループミーティング後にかけていただいたご声援に、何度「これでいける！」と思ったことかわかりません。

また、押木守氏（同上）、宇田直樹氏（みずほフィナンシャルグループ）、田中秀治氏（三機工業株式会社）、金井祐樹氏（新領域創成科学研究科修士課程）には、研究室の先輩として、多大なご助言、ご声援を頂きました。研究の進捗や実験の手法について、時に厳しく時に優しく声をかけていただきました。その度に自分の気持ちを引き締めることができました。また数多くの実験手法を教えて頂いたほか、実験の設計や進捗について相談をお願いした際にも、気軽に応じていただき、多くの示唆を頂きました。

また、研究室の同期である、新井俊介氏、西條拓磨氏、都築淳氏、中野拓磨氏、村上達也氏には、研究室生活のみならず、講義をはじめ様々な場面で励ましあい、語り合い、酒を酌み交わし、笑いあって、生活を共にしてきました。そのおかげで、修士課程を乗り切ることができただけでなく、多くの思い出を作ることができました。

このほかにも研究室内外の多くの先輩、友人のご助言、ご声援をいただいたおかげで、この修士論文を書き上げることができました。本当にありがとうございました。

また、私事になりますが、私の生活や健康について常に心配し、暖かく見守ってくれた両親なくては、本論文を書き上げることはできませんでした。この場を借りて、両親に謝意を表したいと思います。ありがとうございました。

参考文献

英文

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

Barnard, J. L. (1975) Biological nutrient removal without the addition of chemicals. *Wat. 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 *γ-Proteobacteria*? *Microbiol.* **150**: 2267-2275.

Blackall, L. L., Seviour, E. M., Bradford, D., Rossetti, S., Tandoi, V. and Seviour, R. J. (2000) 'Candidatus Nostocoida limicola', a filamentous bacterium from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* **50**: 703-709.

Blackall, L. L., Crocetti, G. R., Saunders, A. M. and Bond, P. L. (2002) A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek.* **81**: 681-691.

Brock, T. D. and Brock, M. L. (1968) Autoradiography as a tool in microbial ecology. *Nature.* **209**: 734-736.

Cech, J. S. and Hartman, P. (1990) Glucose induced breakdown of enhanced biological phosphate removal. *Environ. Technol.* **11**: 651-656.

Cech, J. S. and Hartman, P. (1993) Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological phosphate removal system. *Wat. Res.* **27**: 1219-1225.

Chen, Y., Randall, A. A., McCue, T. (2004) The efficiency of enhanced biological phosphorus removal from real wastewater affected by different ratios of acetic to propionic acid. *Wat. Res.* **38**: 27-36.

Chua, A. S. M. (2006) Ecophysiological study of bacterial groups involved in enhanced biological phosphorus removal processes by using FISH-MAR technique. *Doctoral thesis.* Department of Frontier Sciences, The University of Tokyo.

- Crocetti, G. R., Hugenholtz, P., Bond, P. L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D. and Blackall, L. L.** (2000) Identification of poly phosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantification. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(3): 1175-1182.
- Crocetti, G. R., Banfield, J. F., Keller, J., Bond, P. L. and Blackall, L. L.** (2002) Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiol-SGM.* **148**: 3353-3364.
- Cottrell, M. T. and Kirchman, D. L.** (2003) Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 168-178.
- Falvo, A., Levantesi, C., Rossetti, S., Seviour, R. J. and Tandoi, V.** (2001) Synthesis of intracellular storage polymers by *Amaricoccus kaplicensis*, a tetrad forming bacterium present in activated sludge. *J. Appl. Microbiol.* **91**: 299-305.
- Filipe, C. D. M., Daigger, G. T. Leslie Grady Jr. C. P.** (2001) A metabolic model for acetate uptake under anaerobic conditions by glycogen accumulating organisms: stoichiometry, kinetics, and the effect of pH. *Biotechnol. Bioeng.* **76**(1): 17-31.
- 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. Bacteriol.* **52**: 883-887.
- Hesselmann, R. P., Werlen, C., Hahn, D., van der Meer, J. R. and Zehnder, A. J.** (1999) Enrichment phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**(3): 454-465.
- Jeon, C. O. and Park, J. M.** (2000) Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor fed with glucose as a sole carbon source. *Wat. Res.* **34**: 2160-2170.
- Jeon, C. O., Lee, D. S. and Park, J. M.** (2001) Enhanced biological phosphorus removal in an anaerobic-aerobic sequencing batch reactor: characteristics of carbon metabolism. *Water. Environ. Res.* **73**: 295-300.
- Kawaharasaki, M., Kanagawa, T., Tanaka, H. and Nakamura, K.** (1998) Development and application of 16S rRNA-targeted probe for detection of the phosphate accumulating bacterium *Microlunatus phosphovorius* in an enhanced biological phosphorus removal process. *Wat. Sci. Technol.* **37**: 481-484.

Kawaharasaki , M., Manbome, A., Kanagawa, T. and Nakamura, K. (2002) Flow cytometric sorting and RFLP analysis of phosphate accumulating bacteria in an enhanced biological phosphorus removal system. *Wat. Sci. Technol.* **46**:139-144.

Kong, Y., Beer, M., Seviour, R. J., Lindrea, K. C. and Rees, G. N. (2001) Structure and functional analysis of the microbial community in an aerobic: anaerobic sequencing batch reactor (SBR) with no phosphorus removal. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**: 597-609.

Kong, Y. H. Beer, M., Rees, G. N. and Seviour, R. J. (2002a) Functional analysis of microbial communities in aerobic-anaerobic sequencing batch reactors fed with different phosphorus/carbon (P/C) ratios. *Microbiol.* **148**: 2299-2307.

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

Kong, Y., Nielsen, J. L. and Nielsen, P. H. (2004) Microautoradiographic study of Rhodocyclus-related polyphosphate accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(9): 5383-5390.

Kong, Y., Nielsen, J. L. and Nielsen, P. H. (2005) Identity and ecophysiology of uncultured actionobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(7): 4076-4085.

Kong, Y., Xia, Y., Nielsen, J. L. and Nielsen, P. H. (2006) Ecophysiology of a group of uncultured gammaproteobacterial glycogen-accumulating organisms in full-scale EBPR wastewater treatment plants. *Environ. Microbiol.* **8**(3), 479-489.

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

Lee, N., Jansen, J. C., Aspegre, H., Henze, M., Nielsen, P. H. and Wagner, M. (2002) Population dynamics in wastewater treatment plants with enhanced biological phosphorus removal operated with and without nitrogen

removal. *Wat. Sci. Technol.* **46**(1-2): 163-170.

Levantesi, C., Serafim, L. S., Crocetti, G. R., Lemos, P. C., Possetti, S., Blackall, L. L., Reis, M. A. M. and Tandoi, V. (2002) Analysis of the microbial community structure and function of a laboratory scale enhanced biological phosphorus removal reactor. *Environ. Microbiol.* **4**(10): 559-569.

Liu, W. T., Mino, T., Nakamura, K. and Matsuo, T. (1996) Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphorus removal. *Wat. Res.* **30**: 75-82.

Liu, W. T., Nielsen, A. T., Wu, J. H., Tsai, C. S., Matsuo, Y. and Molin, S. (2001) *In situ* identification of polyphosphate- and polyhydroxyalkanoate-accumulating traits for microbial populations in a biological phosphorus removal process. *Environ. Microbiol.* **3**: 110-122.

Liu, Y., Chen, Y. and Zhou, Q. (2006) Effect of initial pH control on enhanced biological phosphorus removal from wastewater containing acetic acid and propionic acids. *Chemosphere.* **66**(1): 123-129.

Malmstrom, R. R., Keine, R. P., Cottrell, M. T. and Kirchman, D. L. (2004a) Identification and enumeration of bacteria assimilating dimethylsulfoniopropionate (DMSP) in the North Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr.* **49**: 597-606.

Malmstrom, R. R., Kiene, R. P., Cottrell, M. T. and Kirchman, D. L. (2004b) Contribution of SAR11 bacteria to dissolved dimethylsulfoniopropionate and amino acid uptake in the North Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4129-4135.

Malmstrom, R. R., Kiene, R. P., Vila, M. and Kirchman, D. L. (2005a) Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) assimilation by *Synechococcus* in the Gulf of Mexico and northwest Atlantic Ocean. *Limnol. Oceanogr.* **50**: 1924-1931.

Malmstrom, R. R., Cottrell, M. T., Elifantz, H. and Kirchman, D. L. (2005b) Biomass production and assimilation of dissolved organic matter by SAR11 bacteria in the northwest Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2979-2986.

Maszenan, A. M., Seviour, R. J., Patel, B. K. C., Rees, G. N. and McDougall, B. M. (1997) *Amaricoccus* gen. nov., a gram-negative coccus occurring in regular packages and tetrads, isolated from activated sludge biomass,

and descriptions of *Amaricoccus veronensis* sp. nov., *Amaricoccus tamworthensis* so. nov., *Amaricoccus macauensis* sp. nov. and *Amaricoccus kaplicensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* **47**: 727-734.

Maszenan, A. M. Seviour, R. J., Patel, B. K. C., Schumann, P., Burghard, 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. Bacteriol.* **50**: 593-603.

Matsuo, Y. (1994) Effect of the anaerobic solids retention time on enhanced biological phosphorus removal. *Wat. Sci. Technol.* **30**(6): 193-202.

Meyer, R. L., Saunders, A. M. and Blackall, L. L. (2006) Putative glycogen-accumulating organisms belonging to the *Alphaproteobacteria* identified through rRNA-based stable isotope probing. *Microbiol.* **152**: 419-429.

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

Mino, T. van Loosdrecht, M. C. M. and Heijnen, J. J. (1998) Microbiology and biochemistry of enhanced biological phosphate removal process. *Wat. Res.* **32**(11): 3193-3207.

Nakamura, K., Hiraishi, A., Yoshimi, Y., Kawaharasaki, M., Masuda, K. and Kamagata, Y. (1995) *Microlunatus phosphovorus* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* **45**: 17-22.

Nielsen, J. L., Christensen, D., Kloppenborg, M. and Nielsen, P. H. (2003) Quantification of cell-specific substrate uptake by probe-defined bacteria under *in situ* conditions by microautoradiography and fluorescence *in situ* hybridization. *Environ. Microbiol.* **5**(3): 202-211.

Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2005) Advances in microscopy: microautoradiography of single cells. In *Methods in Enzymology*. Editor JR Leadbetter, Academic Press, San Diego. **397**: 237-256.

Oehmen, A., Yuan, Z., Blackall, L. L. and Keller, J. (2004) Short-term effects of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Wat. Sci. Technol.*

50: 139-144.

Oehmen, A., Saunders, A. M., Vives, M. T., Yuan, A. and Keller, J. (2006) Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources. *J. Biotechnol.* **123**: 22-32.

Onuki, M. Satoh, H. and Mino, T. (2002) Analysis of microbial community that performs enhanced biological phosphorus removal in activated sludge fed with acetate. *Wat. Sci. Technol.* **46**(1-2), 145-154.

Ouverney, C. C. and Fuhrman, J. A. (1999) Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types *in situ*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1746-1752.

Pattarkine, V. M. and Randall, C. W. (1999) The requirement of metal cations for enhanced biological phosphorus removal by activated sludge. *Wat. Sci. Technol.* **40**(2): 159-165.

Pijuan, M., Saunders, A. M., Guisasola, A., Baeza, J. A., Casas, C. and Blackall, L. L. (2004) Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor using propionate as the sole carbon source. *Biotechnol Bioeng.* **85**: 56-67.

Seviour, R. J., Maszenan, A. M., Soddell, J. A., Tandoi, V., Patel, B. K. C., Kong, Y. H. and Schumann, P. (2000) Microbiology of the 'G-bacteria' in activated sludge. *Environ. Microbiol.* **2**, 581-593.

Seviour, R. J., Mino, T. and Onuki, M. (2003) The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge system. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**; 99-127

Sintes, E. and Herndl, G. J. (2006) Quantifying substrate uptake by individual cells of marine bacterioplankton by catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization combined with microautoradiography. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(11): 7022-7028.

Smolders, G. J. F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M. C. M and Heijnen, J. J. (1994) Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence. *Biotechnol. Bioeng.* **43**: 461-470.

Stante, L., Cellamare, C. M., Malaspina, F., Bortone, G. and Tiche, A. (1997) Biological phosphorus removal

by pure culture of *Lampropedia* spp. *Wat. Res.* **31**: 1317-1324.

Spring, S., Wagner, M., Schumann, P. and Kämpfer, P. (2005) *Malikia granosa* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate- and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, and reclassification of *Pseudomonas spinosa* as *Malikia spinosa* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* **55**: 621-629.

Sudiana, I. M., Mino, T., Satoh, H., Nakamura, K. and Matsuo, T. (1999) Metabolism of enhanced biological phosphorus removal and non-enhanced biological phosphorus removal sludge with acetate and glucose as carbon source. *Wat. Sci. Technol.* **39**: 29-35.

Wagner, M., Nielsen, P. H., Loy, A., Nielsen, J. L. and Daims, H. (2006) Linking microbial community structure with function: fluorescence in situ hybridization-microautoradiography and isotope array. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**: 1-9.

Wang, N., Peng, J. and Hill, G. (2002) Biochemical model of glucose induced enhanced biological phosphorus removal under anaerobic condition. *Wat. Res.* **36**: 49-58.

Whang, L. -M. and Park, J. K. (2002) Competition between polyphosphate-and glycogen-accumulating organisms in biological phosphorus removal system – effect of temperature. *Wat. Sci. Technol.* **46**: 191-194.

Wong, M. T., Tan, F. M. and Liu, W. T. (2004) Identification and occurrence of tetrad forming *Alphaproteobacteria* in anaerobic: aerobic activated sludge processes. *Microbiol.* **150**: 3741-3748.

Wong, M. T., Mino, T., Seviour, R. J., Onuki, M. and Liu, W. T. (2005) *In situ* identification and characterization of the microbial community structure for full-scale enhanced biological phosphorus removal plants in Japan. *Wat. Res.* **39**: 2901-2914.

Wu, Q., Bishop, P. L. and Keener, T. C. (2006) Biological phosphate uptake and release: effect of pH and magnesium ions. *Water Environ. Res.* **78**(2): 196-201.

和文

宇田直樹. (2006) 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. 東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学系社会文化環境学専攻修士論文.

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: 479-483.

社団法人 日本下水道協会. (1997) 下水道試験法.

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際に関する検討 -, 東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学系社会文化環境学専攻修士論文.

