

〈特集〉

菌叢解析再訪

—— 変遷と展望 ——

伊藤 司¹⁾, 金田一 智 則²⁾, 押 木 守³⁾, 岡 部 聡⁴⁾¹⁾群馬大学大学院理工学府 環境創生部門
(〒 376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1 E-mail: t.ito@gunma-u.ac.jp)²⁾広島大学大学院工学研究科 社会基盤環境工学専攻
(〒 739-8527 広島県東広島市鏡山 1-4-1 E-mail: tomokin@hiroshima-u.ac.jp)³⁾長岡工業高等専門学校 環境都市工学科
(〒 940-0817 新潟県長岡市西片貝町 888 E-mail: oshiki@nagaoka-ct.ac.jp)⁴⁾北海道大学大学院工学研究院 環境創生工学部門
(〒 060-8628 札幌市北区北 13 条西 8 丁目 E-mail: sokabe@eng.hokudai.ac.jp)

概 要

自然環境や下水汚泥などに存在する多種多様な微生物は極めて重要な役割を担っている。しかし、その殆どの細菌は未だに人為的に培養することができず、菌叢の全体像や個々の細菌の機能は明らかになっていない。今後、我々が地球環境保全に積極的に取り組むためには、これら未知の菌叢の構造と機能を明らかにし、未知の微生物の持つ有用な機能を積極的かつ効率的に活用していく必要がある。ブラックボックスが存在すれば、その中身を見たくするのは必然であり、そのために新たな手法が開発される。環境分野には魅力ある未踏の研究フロンティアが横たわっている。

キーワード：環境微生物，菌叢解析技術，16 S rRNA 遺伝子，スループット，NGS

原稿受付 2018.1.10

EICA: 22(4) 21-26

1. 環境分野における菌叢解析の目的と意義

菌叢とは様々な“種類”の微生物によって構成された集団のことである。種類の表し方は、専門的には DNA 配列に基づく系統分類による属名や種名（例：*Nitrosomonas*, *Thiobacillus denitrificans*）が用いられるが、機能に基づく表記（例：硝化細菌，脱窒細菌，硫酸塩還元細菌，メタン生成菌）は一般にわかりやすく現在も広く用いられる。また、種類のみならず、数（個体数）の情報も菌叢を表現する上で重要である。

菌叢解析の直接的な目的は上に述べたような微生物の種類や個体数を明らかにすることであるが、菌叢解析は主に我々が目にしている現象の担い手を明らかにし、その現象を生態学的に説明するために行われてきた。確かに、菌叢解析により処理性や処理の安定性を診断したり予測したりすることに対する期待もある。実際、原生動物の微生物叢は実際に活性汚泥の処理性の診断に用いられてきた¹⁾。しかし、原核生物（細菌および古細菌）の菌叢解析情報からより高度な処理に対してそれを実現することはまだ難しい。むしろ菌叢解析によってそれがいかに困難であるかを我々が知ることになった。活性汚泥や生物膜の水処理微生物系に存在する種は 100~1,000 以上と極めて多種多様であ

り、しかもこれまで純粋培養されて生理機能が調査された原核生物は DNA 配列情報から推定される全体のごく一部に過ぎないという事実がある。構成細菌のほとんどが未培養と知りながら、研究者は菌叢解析やその他の技術を駆使して複雑な環境微生物生態系の現象を 1つ1つ説明してきたのである。例えば、硝化細菌の種類と多様性はアンモニア濃度などの水質を反映すること²⁾、硝化細菌と共存する未培養微生物が硝化細菌の代謝物や死骸を利用して生態系維持に貢献していること³⁾、形態的には同一とみなされてきたバルキング原因糸状性細菌の遺伝子系統学的な多様性⁴⁾、嫌気グラニユールにおいて微生物の 60~70% もが未知種であることやメタン生成古細菌が従来知見以上に多様であること⁵⁾、嫌気消化の有機酸分解菌の種多様性が基質濃度変動への対応を可能にしていると考えられること⁶⁾、微生物燃料電池の電力生成には特定の微生物が必ずしも必要でなく様々な微生物が関与すること⁷⁾など、このような微生物生態学的な知見の積み重ねは近い将来に廃水処理施設が菌叢解析に基づいた運転の維持管理や処理水質の安定および向上を実現し、さらにはエネルギー生産や資源回収施設へと発展していくために重要であると考えられる。現に、廃水処理微生物の公開データベース MiDAS⁸⁾には未分離の微生物も含

めて廃水処理で検出される微生物の生態情報（系統分類、形態、代謝、廃水処理における存在量等）が属レベルで集積されている。菌叢の理解から菌叢による診断、さらには制御へと期待が高まる。

2. 環境分野における菌叢解析技術の変遷

2.1 顕微鏡観察による菌叢解析

顕微鏡を用いた形態学的観察による微生物叢解析は現在においてもなお活性汚泥の状態を評価して維持管理に役立てる上で有効な方法である。観察対象は主に原生動物の繊毛虫類、微小後生動物の輪虫類、糸状性細菌など形態の特徴が捉えやすい数十から百マイクロメートル程度の大きさの微生物に限定されるが、微生物の種類および個体数と微生物が出現する環境（浄化の程度）には相関が認められていることから指標微生物として利用されている。バルキング関連の糸状性細菌叢はグラム染色とナイセル染色の顕鏡結果と形態観察結果を組み合わせることで評価できる。原生動物は廃水中の重金属や有機性化学物質に対する毒性応答の指標になり得ること⁹⁾やメタン発酵などの嫌気環境中での役割は未解明であることなどから現在も研究が進められている。顕微鏡観察によるこのような比較的大型の微生物叢解析は、処理目的がBODの低減のみの場合には有用であっても、窒素除去やリン除去に対しては適用できない。汚染土壌や地下水のバイオレメディエーションなどに対しても同様に難しい。硝化・脱窒など酸化還元反応により物質変換を直接担うのは細菌であるため、これらを観察対象としたいが、球状、桿状、らせん状など形態的多様性に極めて乏しい中で特定の細菌の存在や個体数を通常の光学顕微鏡による観察で評価することは不可能である。しかし、高度な処理水質に対する要求の高まりや微生物を用いた環境浄化への期待から細菌類の挙動説明が求められるようになったことも菌叢解析が進められた背景にある。

2.2 培養に基づく方法による菌叢解析

水質浄化に関わる各種細菌の個体数ならびにその変化を処理性能との関係から明らかにする目的で、平板培養法や最確値（MPN）法など、培養に基づいた微生物の同定および計数方法が用いられてきた。培養法の特徴は、アンモニア酸化細菌の場合には亜硝酸イオンの生成を検出し、硫酸塩還元細菌の場合には硫化水素生成の結果生じる硫化鉄の沈殿を確認するなど、検出方法が微生物機能の発現に基づいていることである。培養法では窒素除去に関わるアンモニア酸化細菌（培養時間：4～5週間）、亜硝酸酸化細菌（8～9週間）、脱窒細菌（1～2週間）のほか、硫化水素生成による臭気発生および腐食に関わる硫酸塩還元細菌（2～3

週間）および硫黄酸化細菌（1～3週間）、メタン生成菌（4週間）などが検出・定量できる¹⁰⁾。CGYやR2Aなどの低栄養培地を用いた培養で得られたコロニーに対して基質資化性や各種性状試験を組み合わせると十数種類の属を同定し、微生物叢を推定することもできる。生物膜内の窒素除去の研究¹¹⁾など20世紀末までの水処理に関する多くの研究が培養法を用いて行われ、メカニズム解明やモデル構築等に寄与してきた。一方、培養には長時間要するため、試験結果を生物反応槽の運転管理に迅速にフィードバックすることは困難であり大きな課題であった。

2.3 16S rRNA アプローチによる菌叢解析

(1) 16S rRNA アプローチ

微生物の“16S rRNA 遺伝子”の塩基配列の分子系統解析に基づく分類および標的微生物の検出・定量技術のことを16S rRNA アプローチという。rRNA（リボソームRNA）は細胞内のタンパク質合成器官であるリボソームを構成するRNAである。遠心分離による沈降速度の違いから5S、16S、23S rRNAがあり、16S rRNA（真核生物の場合は18S rRNA）が分子系統解析に用いられる。その理由は、①全ての生物に存在する、②塩基配列の長さが十分で、比較解析に適している、③遺伝子自体の進化が遅く、保存領域・可変領域を適度に有している、④公共データベースが充実しているなどの利点からである。16S rRNA アプローチの発展はPCR法の普及によるところが大きい。種々の菌叢解析手法は一部を除きPCR法により試料中の目的遺伝子を大量増幅することが基本となっている。16S rRNA 遺伝子のほか、硝化脱窒反応において重要なアンモニア酸化酵素遺伝子 *amo* および亜硝酸還元酵素遺伝子 *nir* などの機能遺伝子を対象に特定の機能微生物群に絞った菌叢解析や、発現したRNAを対象に、より活性を反映した菌叢解析が行われてきた。核酸抽出からPCR増幅までの工程は高速シーケンス法登場後も基本的には変わっていない。

PCR法で増幅したいDNA領域の両端を決定するのがプライマーである。菌叢解析の対象として細菌、古細菌、特定の微生物系統、機能遺伝子など、目的に応じたPCRプライマーを選定する。環境試料中の全細菌を対象としたPCRでは、PCR増幅産物は異なる塩基配列をもつDNAを多数含む。その異なる塩基配列をもつDNAの数がその環境試料中の微生物の系統分類学的多様性であり、たとえば種の数である。その異なる塩基配列をもつDNAをどのように解析するのかという点に、以降に述べる16S rRNAアプローチの各手法の特徴が表れている。

(2) DGGE法

DGGE法は、GC含量の高い配列を付加したPCR増

幅産物を変性剤（ホルムアミドなど）の濃度勾配があるゲル中で電気泳動すると、DNAの塩基配列の違いが異なるバンドとして現れ、すなわち種数がバンドの数として現れることから、細菌叢の多様性の可視化に用いられる手法である。細菌叢の経時変化の可視化に効果的である。任意のバンドを切り出して塩基配列を解読し、属や種を決定することもできる。ただし、多様性が大きい試料の個々のバンドの塩基配列の解読が困難、数百塩基を超える長さのDNAの解析には不向きなどの欠点がある。

(3) T-RFLP法

PCR増幅産物を制限酵素で切断すると、塩基配列が異なるDNAはそれぞれ長さの違う切断断片を生じることになる。T-RFLP法では蛍光標識された末端を有する断片長に着目し、末端断片の長さを計測することで、断片長の違いを種の違い、断片長のバリエーションを種の多様性、ある断片長のシグナル強さをその種の数的多さとして、菌叢を捉える。DGGE同様、細菌叢の時間変化の可視化および標的微生物のモニタリングに有効である。

(4) クローンライブラリー法

クローンライブラリー法は、環境試料のPCRによって得られた様々な微生物由来の16S rRNA遺伝子の混合液から、単一種由来の個々の16S rRNA遺伝子を遺伝子組換え技術により別々の大腸菌に導入し、大腸菌の増殖と同時に増幅される個々の遺伝子について塩基配列を決定し、系統解析により種を推定する方法である。この過程で、個別の導入遺伝子を保有する大腸菌を数十～百、二百程度作製し、これら的大腸菌コロニー（クローン）を寒天培地上に整列（ライブラリー化）しておき、順次解析していくことで菌叢を明らかにする。解析数を増やすほど、もとの環境試料中の微生物群集の分布を反映できると考えられるが、大腸菌コロニーのピックアップや塩基配列解読の費用を勘案すると多くとも数百コロニーまでの解析が現実的などころである。塩基配列を解読した後はBLASTによる相同性検索を行うが、たとえば16S rRNA遺伝子の相同性検索の結果Uncultured bacteriumと相同性が高いという結果が得られた場合、相同性結果のみからその16S rRNA遺伝子を持つ微生物の機能を推定することは困難である。したがって、より詳細な系統樹を作成し、系統学的に近縁な分離株から機能を推定するという方法がとられる。

クローンライブラリー法で解析する遺伝子は16S rRNA遺伝子に限らない。機能遺伝子の解析例としてポリリン酸蓄積細菌 *Candidatus Accumulibacter phosphatis* を取り上げる。この細菌は活性汚泥プロセスで生物学的リン除去を担う重要な細菌でありながら、これまで分離株が得られていない。16S rRNA遺伝子

に基づく系統樹では、どのリン除去プロセスでもほぼ単一種として検出されるが、ポリリン酸合成に関わる機能遺伝子 (*ppkI*) を対象に系統樹を作成すると、type I (I-A から I-E) と type II (II-A から II-I) の14グループに分類でき¹²⁾、これらは優占するリン酸濃度が異なる特徴があることが報告されている¹³⁾。16S rRNA 遺伝子の系統解析から機能推定することの限界を示す一方、分子生物学的手法を新しい培養方法と組み合わせることの有用性を示しているといえる。

(4) 定量PCR法

PCR中に増幅されるDNA量をリアルタイムでモニタリングすることで16S rRNA遺伝子などの目的遺伝子を定量する手法である。微生物ゲノム上の目的遺伝子のコピー数がわかれば細胞数を定量できる。病原微生物など特定の指標微生物の定量に有用である。

(5) FISH法

細胞内のrRNAの標的配列に蛍光オリゴヌクレオチドプローブを結合させ、目的の微生物細胞を蛍光顕微鏡下で可視化する方法にFISH法（蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法）がある。検出された細胞を計数することで定量も可能である。細胞内rRNA量は細胞活性に比例するため、活性の高い微生物の検出に有用である。rRNA含有量の少ない微生物を検出するには蛍光検出感度を高めたCARD-FISH法¹⁴⁾がある。FISH法では経験上、全細胞のおよそ0.1%の存在割合があれば目的微生物の存在を確認することができる。生物膜やグラニュールなどの細胞集塊の薄切片に適用すると微生物空間分布の情報が得られることはFISH法の大きな特徴である。FISH法で得られる微生物空間分布と基質等の化学成分濃度分布は空間解像度の相性が良く、両者の組み合わせは複雑な微生物生態系の解析に非常に効果的である¹⁵⁾。

(6) キノンプロファイル法¹⁶⁾

微生物の呼吸鎖や電子伝達鎖の構成成分であるキノンを試料から抽出し、HPLCで測定することにより得られる各種キノンの定量結果により菌叢を表す方法である。キノンの種類および同種のキノンであってもその分子構造は微生物分類群によって異なることから、キノンの分子種組成であるキノンプロファイルから菌叢解析できる。本手法は16S rRNAアプローチではなく、16S rRNA遺伝子の系統分類のような解像度はないが、化学分析であるため定量性および再現性に優れている特徴をもつ。

(7) 同位体ラベル化法と16S rRNAアプローチの組み合わせ

安定同位体 (¹³C, ¹⁵N, ¹⁸O など) および放射性同位体 (³H, ¹⁴C など) を用いた生体物質のラベル化をクローンライブラリー法やFISH法と組み合わせること

により、微生物の系統分類と基質利用等の機能を同時に解析できる手法がある。

安定同位体を用いる SIP 法¹⁷⁾は、安定同位体標識の基質で培養後に DNA 抽出して密度勾配超遠心分離を行うと、安定同位体を取り込んだ微生物由来の DNA が取り込んでいない微生物の DNA より重いため分離され、重いほうの DNA クローンライブラリーの個々の塩基配列を解析することで、供与基質を利用した微生物種を特定できる手法である。RNA を対象とする RNA-SIP 法¹⁸⁾の結果は、(DNA-)SIP 法より活性を反映する。

放射性同位体を用いるマイクロオートラジオグラフィと組み合わせた方法に MAR-FISH 法¹⁹⁾がある。放射性同位体で標識された基質を微生物に取り込ませた後、FISH 法と組み合わせる。試料をスライドガラス上に固定し、FISH 法、続いて放射線に感光する乳剤をコーティングして露出・現像を行い、顕鏡する。放射性物質を同化した微生物細胞から放出される放射線により生成される銀粒子の位置画像と、FISH 法による微生物検出画像とを重ねることで、供与基質を取り込んだ微生物を特定できる手法である。

(8) 16 S rRNA アプローチからの実用化事例

16 S rRNA アプローチが新しい微生物の発見、その後の処理プロセスの実用化へと発展した嫌気性アンモニア酸化 (anammox) 細菌の事例を紹介したい。anammox 反応自体は 1977 年に予測されていたが、anammox 反応を担う微生物が特定されたのは 1999 年²⁰⁾のことである。*Planctomycetes* 門に属することがクローンライブラリー法により示され、さらに FISH 法用プローブの塩基配列が報告されたことで、環境中から anammox 細菌の検出が可能となり研究が急速に進展した。例えば、定量 PCR 法を用いて anammox 細菌が確実に存在する植種源を選定したことで集積培養期間が短縮され²¹⁾、結果的に窒素除去速度が最も高い anammox 細菌の発見に繋がっている。現在、世界では 100 基を超える anammox 実規模プラントが稼働²²⁾しているが、菌叢解析技術がもたらした成果である。

3. 現在の菌叢解析技術と展望

DGGE 法やクローンライブラリー法が導入された当時、DNA 配列を解読するシーケンス法はもっぱらサンガーシーケンス法 (キャピラリーシーケンス法) であったが、2000 年代から登場した高速シーケンス法 (次世代シーケンス技術、以下 NGS) は瞬く間に我々の分野を席卷した。現在の NGS は大別して、1) 数百 bp 程度の比較的短い長さの塩基配列を大量に取得する方法と 2) 数 kb 以上の長い塩基配列を取得する技術に大別される。前者は Illumina 社の MiSeq/

HiSeq/NovaSeq シリーズに代表され、NovaSeq は一度の解析で 2 Tb (テラバイト) 以上の塩基配列を解読できる能力がある。後者は PacBio シーケンサや MinION に代表され、数 kb~数百 kb の長い塩基配列を得る点が特長である。NGS を用いて菌叢解析を行う場合、アンプリコンシーケンス法とメタゲノムシーケンス法に大別される。アンプリコンシーケンス法は、16 S rRNA 遺伝子などの特定遺伝子を PCR 増幅し、増幅産物を NGS 解析する方法であり、現在最も一般的な手法である。一方のメタゲノムシーケンス法では抽出 DNA を断片化した後、ランダムにシーケンス (ショットガンシーケンスと呼ばれる) を行う手法である。メタゲノムシーケンスでは試料 DNA に含まれる遺伝子を網羅的に解析するため、菌叢 (who is there?) の情報に加えて、遺伝子の有無に基づいて機能推定を行うことができる点が魅力である。しかし、廃水処理 (活性汚泥) のような比較的単純な組成の試料ですら、100 種類以上の細菌が存在することが明らかとなっており、全種類の細菌のゲノム情報を網羅的にシーケンス解析するには膨大なシーケンス量が必要となる。例えば、微生物ゲノムの大きさを 4 Mb、ショットガンシーケンスによってゲノム全体をカバーするためには 100 倍のシーケンス量が必要だと仮定すると、 $[4 \text{ Mb} \times 100 \text{ 倍} \times 100 \text{ 種類}] = 40 \text{ Tb}$ 相当のシーケンス解析が必要である。このような膨大な量の塩基配列を獲得するための労力に加えて、Tb クラスの塩基配列情報を解析するための計算機リソースと技術者 (バイオインフォマティシャン) の確保がハードルとなり、メタゲノム解析は研究レベルでの実施に留まっているという印象である。

NGS を用いることによって、廃水処理装置内にどのような細菌がいるのかを DGGE 法やクローンライブラリー法と比べて、遙かに詳細に我々は理解できるようになった。その一方で、NGS は我々の知識の限界も示唆している。例えば、著者は前述の anammox 細菌の機能を網羅的に解明するために、anammox 細菌の全ゲノム配列を NGS によって解読したが、ゲノム上から見出された遺伝子約 4,000 個の内、機能を推定できた遺伝子はわずか 1/4 程度であった²³⁾。これは遺伝子およびタンパク質 (酵素) について我々の知見が不十分であることを如実に示している。こうした機能未知遺伝子の解析が微生物の機能、ひいては廃水処理装置の性能を理解する上で次の課題であることは疑いない。従来、遺伝子が司る機能は遺伝子組換えやタンパク質精製・機能解析といった手法によって解明されてきたが、こうした従来の解析手法のハイスループット化が今後十年では大きな研究課題になるだろう。

また、NGS データの活用も今後の課題である。NGS によって得られる菌叢や遺伝子情報はいわゆる

ビッグデータに相当する情報であり、統計数理処理との相性が良い。一方、NGSと対になって解析されなければならない、水質や運転データの収集・公開はNGSのデータの蓄積と比べて大きく遅れている。NGSデータはDDBJやGenBankといった公共データベースに登録・公開されているが、解析した試料の由来や水質・運転条件などの詳細は省略される場合が多い。これではNGSデータを統計解析し、工学的に有意義な情報を抽出することは困難である。NGSデータを工学的に活かすためには、論文や公共データベースのプラットフォームにおいて、NGSデータと水質や運転条件の情報を併せて公開する必要があり、そのための協力体系や仕組みの整備も今後の課題である。

NGS解析とは別に、細菌数を定量する目的で定量PCR法も有力なツールである。定量PCR法においても、NGS同様、近年大きな技術革新があり、PCR反応をナノ流路集積デバイス上で行うことによってスループットが飛躍的に向上した。定量PCR法は、例えば、健康関連微生物（原虫、細菌、ウイルス）の検出・定量を目的に行われるが、検出対象毎に異なるPCRプライマーが必要であるため、1個のサンプルについて複数のPCR反応が必要である。例えば、腸管系ウイルスの定量では10種類以上のPCR反応が必要であり、これを各検体について繰り返し分析を行う必要があった。従って、定量PCR法を繰り返し行う必要があり、試薬、労力、時間ともにスループットに課題が残されていた。現在市販されているナノ流路デバイス、例えば、Fluidigm社の市販チップ（96.96 Dynamic Array chip）では一度に9,216個の定量PCR反応を同時に行うことができ、これらの課題を一度に解決できる手法として注目を集めている。著者がこれを応用した例では、10種類程度の健康関連微生物を同時に遺伝子定量できることを確認している²⁴⁾。本技術によって、96 wellフォーマットの定量PCR装置では1ヶ月以上の測定日数を要していたところを一日内で測定を終えることができた。健康関連微生物のモニタリング技術として定量PCR法は今後もゴールドスタンダードでありつづけると考えられ、さらなる普及が期待される。

最後にNGSやマイクロ流路デバイスといった技術革新とは別に、培養法の重要性を強調したい。NGSが注目されて久しいが、anammoxやアンモニア酸化古細菌（AOA）といった廃水処理におけるキープレイヤーの発見は常に培養ベースの手法が先行してきた。上述の通り、塩基配列の解読技術は革新的に成長したが、塩基配列から得られる情報は限られており、我々にとって最も興味のある「機能」については別の切り口が必要である。微生物の分離培養や遺伝子組換えといった従来の手法も今後存在意義を失うことはなく、

むしろ、NGS解析の解釈を補完するために重要性を増すと考えられる。特にハイスループットな培養技術の開発は急務の課題であり、我々の取り組むべき課題はまだ多く残されているようである。

参考文献

- 1) 須藤隆一, 稲森悠平: 図説 生物相からみた処理機能の診断, 産業用水調査会, (1997)
- 2) 金田一智規, 伊藤司, 岡部聡, 渡辺義公: 16 Sr DNA 解析によるアンモニア酸化細菌の多様性評価, 環境工学研究論文集, Vol. 40, pp. 71-79 (2003)
- 3) S. Okabe, T. Kindaichi, and T. Ito: Fate of ¹⁴C-labeled Microbial Products Derived from Nitrifying Bacteria in Autotrophic Nitrifying Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 7, pp. 3987-3994 (2005)
- 4) T. Kanagawa, Y. Kamagata, S. Aruga, T. Kohno, M. Horn, and M. Wagner: Phylogenetic Analysis of and Oligonucleotide Probe Development for Eikelboom Type 021N Filamentous Bacteria Isolated from Bulking Activated Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 11, pp. 5043-5052 (2000)
- 5) 原田秀樹, 大橋晶良, 井町寛之: 超高速メタン発酵バイオリアクターの開発と汚泥菌叢の分子微生物生態解析, 環境バイオテクノロジー学会誌, Vol. 4, No. 1, pp. 19-27 (2004)
- 6) H. D. Ariesyady, T. Ito, K. Yoshiguchi, and S. Okabe: Phylogenetic and Functional Diversity of Propionate-Oxidizing Bacteria in an Anaerobic Digester Sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 75, No. 3, pp. 673-683 (2007)
- 7) 木村善一郎: 微生物燃料電池陰極槽内の微生物生態系, 水環境学会誌, Vol. 33, No. 11, pp. 357-360 (2010)
- 8) S. J. McIlroy, A. M. Saunders, M. Albertsen, M. Nierychlo, B. McIlroy, A. A. Hansen, S. M. Karst, J. L. Nielsen, and P. H. Nielsen: MiDAS: the Field Guide to the Microbes of Activated Sludge. *Database*, Vol. 2015, Article ID bav062 (2015)
- 9) P. Madoni: Protozoa in Wastewater Treatment Processes: A Minireview, *Italian Journal of Zoology*, Vol. 78, No. 1, pp. 3-11 (2011)
- 10) 日本下水道協会: 下水試験方法 下巻 2012年版 (2012)
- 11) S. Okabe, K. Hiratia, Y. Ozawa, and Y. Watanabe: Spatial Microbial Distributions of Nitrifiers and Heterotrophs in Mixed-Population Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 50, No. 1, pp. 24-35 (1996)
- 12) Y. Mao, D. W. Graham, H. Tamaki, and T. Zhang: Dominant and Novel Clades of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* in 18 Globally Distributed Full-Scale Wastewater Treatment Plants, *Scientific Reports*, Vol. 5, Article number: 11857 (2015)
- 13) A. Nurmiyanto, H. Kodera, T. Kindaichi, N. Ozaki, Y. Aoi, and A. Ohashi: Dominant *Candidatus Accumulibacter phosphatis* Enriched in Response to Phosphate Concentrations in EBPR Process, *Microbes and Environments*, Vol. 32, No. 3, pp. 260-267 (2017)
- 14) A. Pernthaler, J. Pernthaler, and R. I. Amann: Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, pp. 3094-3101 (2002)
- 15) S. Okabe, H. Satoh, and Y. Watanabe: In Situ Analysis of Nitrifying Biofilms as Determined by In Situ Hybridization and

- the Use of Microelectrodes, *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 7, pp. 3182–3191 (1999)
- 16) A. Hiraishi, Y. Morishima, and J. Takeuchi: Numerical Analysis of Lipoquinone Patterns in Monitoring Bacterial Community Dynamics in Wastewater Treatment Systems, *The Journal of General and Applied Microbiology*, Vol. 37, No. 1, pp. 57–70 (1991)
- 17) S. Radajewski, P. Ineson, N.R. Parekh, and J.C. Murrell: Stable-Isotope Probing as a Tool in Microbial Ecology, *Nature*, Vol. 403, pp. 646–649 (2000)
- 18) M. Manefield, A.S. Whiteley, R.I. Griffiths, and M.J. Bailey: RNA Stable Isotope Probing, a Novel Means of Linking Microbial Community Function to Phylogeny, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 11, pp. 5367–5373 (2002)
- 19) N. Lee, P. Nielsen, K. Andreasen, S. Juretschko, J. Nielsen, K. Schleifer, and M. Wagner: Combination of Fluorescent In Situ Hybridization and Microautoradiography—a New Tool for Structure-Function Analyses in Microbial Ecology, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 3, pp. 1289–1297 (1999)
- 20) M. Strous, J. Fuerst, E. Kramer, S. Logemann, G. Muyzer, K. van de Pas-Schoonen, R. Webb, J. Kuenen, and M. Jetten: Missing Lithotroph Identified as New Planctomycete. *Nature*, Vol. 400, pp. 446–449, No. 6743 (1999)
- 21) I. Tsushima, Y. Ogasawara, T. Kindaichi, H. Satoh, and S. Okabe: Development of High-Rate Anaerobic Ammonium-Oxidizing (anammox) Biofilm Reactors, *Water Research*, Vol. 41, No. 8, pp. 1623–1634 (2007)
- 22) 岡部聡: Anammox 研究開発の動向, *水環境学会誌*, Vol. 37, No. 9, pp. 316–320 (2014)
- 23) M. Oshiki, K. Shinyako-Hata, H. Satoh, and S. Okabe: Draft Genome Sequencing of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacterium, “*Candidatus Brocadia sinica*”, *Genome Announcements*, Vol. 3, No. 2, pp. e00267–15 (2015)
- 24) S. Ishii, G. Kitamura, T. Segawa, A. Kobayashi, T. Miura, D. Sano, and S. Okabe: Microfluidic Quantitative PCR for Simultaneous Quantification of Multiple Viruses in Environmental Water Sample, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 80, No. 24, pp. 7505–7511 (2014)