

原著論文 (通常論文)

下水余剰汚泥を溶解する細菌株の分離・同定およびその汚泥溶解性

Characterization and Identification of Sewage Sludge-Lysing Bacteria

松本翔一郎, 李 雪松, 前田 憲成, 尾川 博昭*

SHOICHIRO MATSUMOTO, XUESONG LI, TOSHINARI MAEDA and HIROAKI I. OGAWA

九州工業大学 大学院生命体工学研究科 生体機能専攻 〒808-0196 北九州市若松区ひびきの2-4

*TEL: 093-695-6059 FAX: 093-695-6012

*E-mail: ogawahi@life.kyutech.ac.jp

Department of Biological Functions and Engineering, Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyusyu Institute of Technology, 2-4, Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyusyu 808-0196, Japan

(原稿受付 2008年4月18日/原稿受理 2008年5月14日)

Two microorganisms, strain KH3 and KH4 were isolated from sewage excess sludge in Hiagari Wastewater Treatment Center (Kitakyushu City, Fukuoka, Japan); these strains can decrease up to 30% of the excess sludge at 37°C and 50°C, respectively. The 16S ribosomal RNA gene sequence analysis for KH3 and KH4 suggests that the two strains are new species of genus *Brevibacillus* and *Bacillus*; therefore, they were designated *Brevibacillus* sp. KH3 and *Bacillus* sp. KH4, respectively. Strains KH3 and KH4 had high protease activities when they were incubated with sewage excess sludge. A casein zymography for evaluating protease activity revealed that KH3 released two proteases (32 and 40 kDa) and KH4 produced three protease activities (30, 44, and 250 kDa). Nutrient-rich conditions (excess sludge plus LB medium) strongly inhibited the degradation of excess sludge by KH3. Since 40-kDa protease was detected during incubation under nutrient-poor environment (excess sludge without LB) but not during nutrient-rich condition, the 40-kDa protease seems to be involved in degradation of sludge by KH3.

Key words: sewage excess sludge, sludge-lysing bacteria, sludge-lysing capacity, protease

キーワード: 下水余剰汚泥, 細菌の分離, 汚泥溶解性, プロテアーゼ

1. 緒 言

現在, 我が国における排水処理は, 活性汚泥法によるものが大部分を占める。この方法は, 反応槽に微生物の塊である活性汚泥を投入し, エアレーションによってこれを活性化させて, 微生物が汚濁成分を好気分解することで排水を浄化するものである¹⁸⁾。しかしながら, 活性汚泥法は排水中の有機物により微生物の培養を促しているため, 必然的に微生物量が増加する。発生する微生物の塊は適宜引き抜く必要があり, その引き抜かれたものが余剰汚泥である。余剰汚泥は産業廃棄物としてその処理が物議を醸しており, 焼却処理後に埋め立てを行う処分法が大部分を占めていることが実状である¹⁵⁾。埋め立て処分に関しては, 埋立地の確保が困難になっており, 全国でもその残余年数は少なく, 処理コストも高騰している。そのため, 近年では建築資材や農業用肥料などへリサイクルを行う処理技術が開発されている^{12,13,15)}。その一方で, 近年では発生汚泥の抑制技術も開発されており, 超音波による処理²⁾やオゾンによる処理法などが考案されてきた⁴⁾。これらの技術は, 汚泥の減容化としては十分な能力を示すが, それに伴って処理コストも膨大

なものになるという欠点がある。

そこで我々は, 汚染された土壌や水域などを浄化するバイオレメディエーション技術をヒントに, 生物学的な技術, すなわち微生物を用いた減容処理技術に着目した³⁾。この方法を採用することで, 上記に示したような物理・化学的処理に比べ, 特にそのコスト面で大幅な削減が見込めると考えられる。本研究では, 根本的解決法としての下水余剰汚泥の環境負荷低減技術の確立(汚泥減量化)を目指して, 下水余剰汚泥を溶解する能力を有する微生物のスクリーニングを行い, 分離・同定した細菌株の性状を明らかにすると共に, その余剰汚泥溶解性および可溶化因子を究明した。

2. 材料および方法

2.1. 実験材料

下水余剰汚泥試料は, 北九州市の日明浄化センター²⁰⁾から採取したものを使用し, 微生物のスクリーニングおよび汚泥溶解性試験を行った。試薬は, 特級規格のものを使用した。採取した余剰汚泥は, 菌株を接種する前に高圧蒸気滅菌(121°C, 20分間)を行い, 滅菌精製水で

3回洗浄し、濃度が25% (v/v) になるように、滅菌精製水で調整したものを用いた。

2.2. 細菌のスクリーニングおよび同定

浄化センターから採取してきた湿重量200gの下水余剰汚泥を三角フラスコに採取し、50°Cで1週間振とう培養した。1週間後、この培養液に新たに採取してきた余剰汚泥を、重量比1:2となるように三角フラスコに加え、さらに1週間振とう培養した¹⁶⁾。8週間後まで培養液を同様に連続馴養し、採取したての余剰汚泥を用いた滅菌汚泥寒天培地に塗布して培養した。この条件下で生育した汚泥溶解斑（ハロー）を形成しているコロニーを分離し、グラム染色などの形態観察、最適培養条件やアピ50CH（日本ビオメリュー（株））などに基づく生化学/生理学的テストを行った。また、微生物進化系統の研究で最も有効な分子マーカーである16S rRNA 遺伝子のDNA相同性解析を行い、分離した細菌の同定を行った^{9,14,19)}。

2.3. 余剰汚泥可溶化率の測定

汚泥寒天培地で分離した菌株を、Luria-Bertani (LB) 液体培地に1コロニー植菌して最終濃度 1×10^8 cfu/mLとなるよう37°Cで18時間前培養し、菌株を遠心分離(8,000 × g, 1分間)して集菌した。その後、生理食塩水(0.85% NaCl水溶液)で3回洗浄した。その菌体を所定の滅菌余剰汚泥試料200 mL (v/v) に添加し、各温度(30°C, 37°C, 50°C), 60 rpmで振とう培養した。24時間毎に25 mLずつサンプリングを行い、遠心分離(18,000 × g, 10分間)により、試料中の固形分を沈殿させ、その沈殿物は蒸発皿上に回収した。その沈殿物を105°Cで48時間乾燥させ、乾燥重量から余剰汚泥の減量値を測定した。一方、遠心分離後の上清は、可溶化因子同定のための粗酵素液として使用した。

2.4. 余剰汚泥可溶化因子の同定

余剰汚泥可溶化因子を同定するため、カゼインザイモグラフィーによるプロテアーゼの検出およびその酵素活性を測定した。プロテアーゼの活性は、反応時間1分あたりに吸光度を0.001上昇させる値を1 unitと定義し、カゼインを基質とした加水分解活性から測定した⁷⁾。汚泥可溶化因子の同定のために採取した上清は、不純物を除くために、凍結融解後、さらに遠心分離(15,000 × g, 3分間)した。遠心分離後の上澄み液をSDS-PAGEおよびカゼインザイモグラフィーの試料とした¹⁸⁾。また、同じ粗酵素液から、Lowry法によってタンパク質の定量を行い⁹⁾、さらにフェノール硫酸法によって糖質の定量を行った¹¹⁾。

3. 結果

3.1. 余剰汚泥可溶化微生物の性状

50°Cの余剰汚泥試料から下水汚泥を溶解する細菌のスクリーニングを行った結果、8週間の集積培養によって、滅菌汚泥寒天培地にハローを形成するコロニーを分離することができた(図1)。馴養せず、採取したばかりの余剰汚泥を直接寒天培地に塗布しても、ハローを形

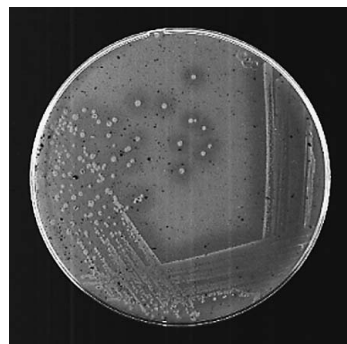


図1. The formation of colonies lysing excess sludge

成する菌株が得られなかったことから、この集積培養の意味は重要であると考えられる。すなわち、通常、他菌との共生で優先でなかった汚泥溶解菌は、集積培養による馴養によりはじめて分離できるようになったことが示唆される。このハローを形成したコロニーについて、グラム染色およびヒューレイフソン培地を用いてOF試験を行った。その結果、試験したクローンは全てグラム陽性の桿菌で、ブドウ糖非発酵であることがわかった。次に、簡易的にこれらのクローンをを用いて余剰汚泥の溶解性試験を行ったところ、2つの菌株が効率良く汚泥を減容化していることがわかった。そこでこの2つの菌株について、アピ50CHおよびアピ20Eを利用して生化学/生理学的試験を行った。それぞれの性質を表1に示す。さらに、各々の性状について調べたところ、KH3株は30~50°C, pH 6~10で生育し、至的温度は50°C, 至的pHは8で、KH4株は30~45°C(50°Cでわずかに生育), pH 5~11で生育し、至的温度は37°C, 至的pHは6であった。両菌株ともオキシダーゼおよびカタラーゼ活性は示さず、運動性を持ち、胞子を形成する好気性細菌であることがわかった。また、16S rRNA 遺伝子のDNA相同性解析を行ったところ、それぞれ *Brevibacillus agri* と *Bacillus* sp. Eur1 に近縁する菌株であることがわかった(表2)。どちらの菌株も相同性が98%以下であったことから新菌種であると判断し、それぞれ *Brevibacillus* sp. KH3 株および *Bacillus* sp. KH4 株と名付けた。

3.2. 微生物による余剰汚泥の溶解性

余剰汚泥より50°Cで単離した2株を用いて、それぞれの汚泥溶解性を検討した。図2に示すように、*Brevibacillus* sp. KH3株は50°Cで、*Bacillus* sp. KH4株は37°Cで、それぞれ5日間のうちに約30%の余剰汚泥を減容化していることが判明した。また、KH4株は50°Cでも若干の余剰汚泥溶解性を示したが、この結果は50°Cでわずかに生育するという性質と相関していた。次に、汚泥にLB培地と同様の栄養素を添加したLB-汚泥培地を作成し、富栄養条件下での両菌株の汚泥溶解性を検討した。栄養素を添加した場合、その溶解性はほとんど確認することができず、富栄養条件下では、これらの菌株が汚泥を減容化できないことが示唆された(データ不記載)。次にLowry法およびフェノール硫酸法を用い、余剰汚泥遠心上清中の糖類とタンパク質について検討した(図3および4)。両菌株接種区において、汚泥中の

表 1. Biochemical/physiological characterization of isolated microbes

	Test	<i>Brevibacillus</i> sp. KH3	<i>Bacillus</i> sp. KH4
Assimilation	Glycerol	+ ^a	- ^b
	Inositol	+	-
	Mannitol	+	-
	Esculin	+	+
	5-ketogluconic acid	-	+
	Gelatin	+	+
	L-arabinose	+	+
Biochemical/ physiological characterization	Spore forming	+	+
	Motility	+	+
	O-F test	Non-fermentation	Non-fermentation
	Oxidase	-	-
	Catalase	-	-
	Behavior for oxygen	Aerobic	Aerobic
	Viable pH	6~10	5~11
	Growth: 30°C	+	+
	Growth: 37°C	+	+
	Growth: 50°C	+	± ^c
	Growth: 55°C	-	-

^a positive reaction^b negative reaction^c slight growth

表 2. Homology search of 16S ribosomal RNA gene

Nomenclature	Base pair	16S rRNA Homology search	Homology [%]
<i>Brevibacillus</i> sp. KH3	1370	<i>Brevibacillus agri</i>	97.0
		<i>Brevibacillus brevis</i>	96.8
		<i>Brevibacillus parabrevis</i>	96.4
<i>Bacillus</i> sp. KH4	1320	<i>Bacillus</i> sp. Eur1	97.8
		<i>Bacillales bacterium Gsoil</i>	94.5
		<i>Thermophilic bacterium</i> sp. MP3	89.1

糖類およびタンパク質が増加していることがわかった。これは、両菌株の汚泥溶解によるものであると考えられる。

3.3. 余剰汚泥可溶化因子の同定

下水汚泥が減少していく過程で、余剰汚泥の減容化能力を有する2株が高いプロテアーゼ活性を示すことがわかった(図5)。*Brevibacillus* sp. KH3株は50°C、48時間後に最も高い活性を示し、*Bacillus* sp. KH4株は37°C、96時間後に最も高い活性を示した。このことから、これらの菌株によって放出されるプロテアーゼは、余剰汚泥の可溶化因子ではないかと考えた。SDS-PAGEを行い、粗酵素液のタンパク質の確認を行ったところ、数本のバンドが確認された。次に、このプロテアーゼ活性を観察するため、カゼインゲイモグラフィーを行った。その結果、KH3株は32 kDaおよび40 kDaの分子量を持つ2種類のプロテアーゼを放出していた。(図6a)。汚泥溶解が見られなかった富栄養条件下にある汚泥中のプロテアーゼも観察したところ、図7に示すように、上述した2つのバンドとは異なるものが得られた。これら

の結果から、KH3株が放出する32 kDaおよび40 kDaのプロテアーゼは、下水余剰汚泥の減容化の因子であることが示唆された。一方、KH4株では、約30 kDa、45 kDaおよび250 kDaでのプロテアーゼの活性が確認された(図6b)。これら3つのプロテアーゼは、図5の酵素活性と相関して、カゼイン分解活性が時間経過とともに強くなっていることが確認できた。酵素活性の向上は、汚泥溶解率とも相関していることから、ここで確認した3つのプロテアーゼのいずれかが、汚泥溶解因子の可能性があると考えられる。

4. 考察

4.1. 汚泥可溶化率向上について

下水余剰汚泥中から、それを可溶化する*Brevibacillus* sp. KH3株および*Bacillus* sp. KH4株を分離・同定した。これらの微生物により、余剰汚泥は約30%が減容化されることが判明した(図2)。一方、栄養素を添加して富栄養状態にしたLB-汚泥培地では、それらの菌株に

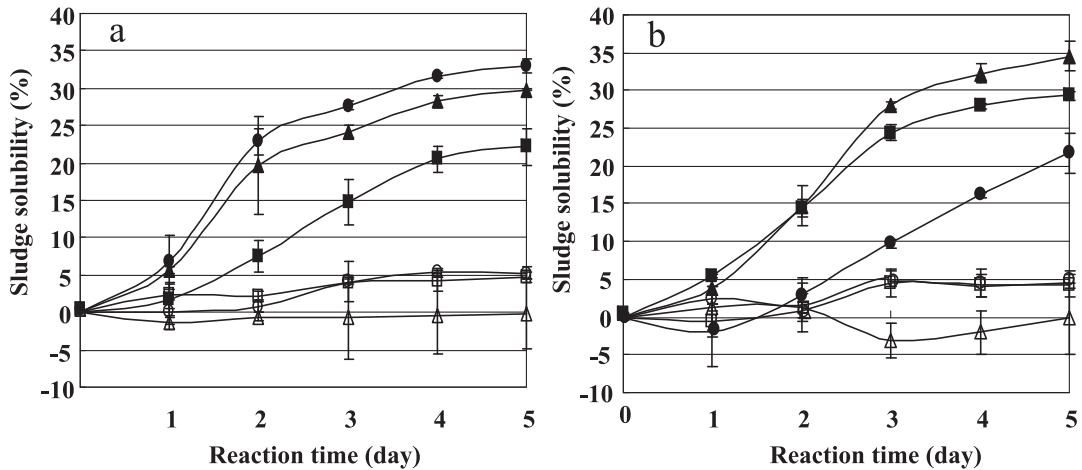


図2. Dissolubility of sludge at different temperature by *Brevibacillus* sp. KH3 (a) and *Bacillus* sp. KH4 (b). Reaction temperature are 30°C (■), 37°C (▲) and 50°C (●). Open symbols are without KH3 and KH4.

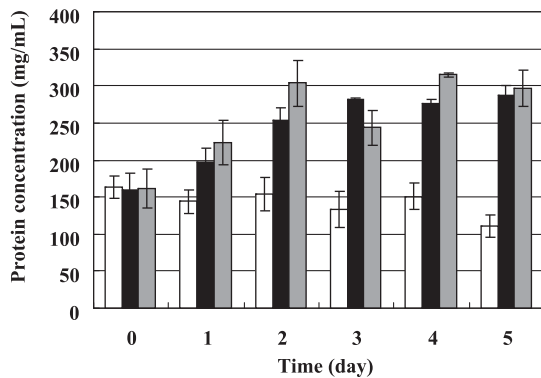


図3. Protein contents in the excess sludge reacted with KH3 and KH4. Reaction temperature: 50°C for KH3 (black bar) and 37°C for KH4 (hatched bar). White bars are controls without inoculation of bacteria.

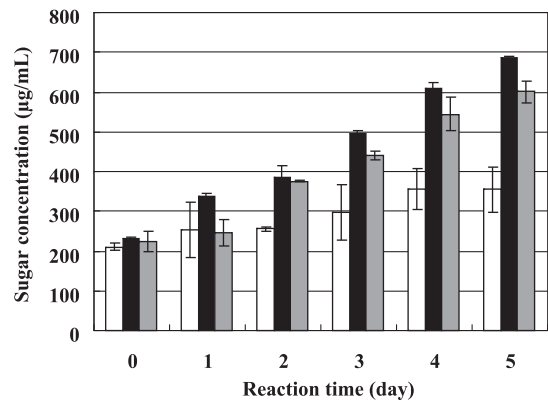


図4. Sugar contents in the excess sludge reacted with KH3 and KH4. Reaction temperature: 50°C for KH3 (black bar) and 37°C for KH4 (hatched bar). White bar is without adding bacteria.

よる汚泥の減量化は認められなかった。すなわち、これらの菌株は栄養条件が乏しい環境において、汚泥溶解能力を発揮することが示唆された。汚泥溶解率は両菌株とも30%以上の数値を示しているが、その時点で定常状態になっていることが観察された。これは、本細菌によって産生された汚泥の溶解産物による富栄養化、または汚泥中に溶解対象の物質がなくなりそれらの菌株が働きにくい環境になったためと考えられる。余剰汚泥を構成する全有機物のうち、約6割がタンパク質である³⁾。図5に示したように、KH3株およびKH4株はプロテアーゼを放出し、タンパク質を分解して汚泥を減容化していると考えられる。従って、細菌による減量化対象物質を考慮しながら、今後の汚泥溶解性の向上を検討する必要があると考えられる。

4.2. 汚泥可溶化因子の特定

下水汚泥の減量化に関しては、細菌のどのような力によって、汚泥の何を可溶化しているのかという点にも着目したい。余剰汚泥の全有機物のうち約6割を占めているものが微生物などのタンパク質であることと、そのタ

ンパク質を標的にプロテアーゼを放出して汚泥の溶解を行う細菌の報告が既になされている³⁾。今回、我々が分離した2つの細菌株についても、プロテアーゼの活性を有していることが示された。そこで、このプロテアーゼ活性と余剰汚泥の溶解性を検討したところ、余剰汚泥の溶解がプロテアーゼによるものであることが示唆された。しかし、図6に示したように、2~3種類のプロテアーゼの存在が観察されたため、どのプロテアーゼが余剰汚泥の溶解に関与しているのか特定する必要がある。まだ予備的な結果であるが、KH3株の放出する余剰汚泥溶解プロテアーゼは(図6および7)、分子量約40 kDaのメタロプロテアーゼの一種であると考えられ、ナトリウムイオンによりその活性が阻害されることがわかっている(データ不記載)。そこで、この溶解因子と考えられるプロテアーゼについて分離・精製を行い、プロテアーゼの特性や機能について検討していくことが必要である。

4.3. 環境負荷低減技術の確立に向けて

我々が生活していく上で、下水処理施設からの余剰汚泥の発生は必然であり、また下水道の普及に伴ってその

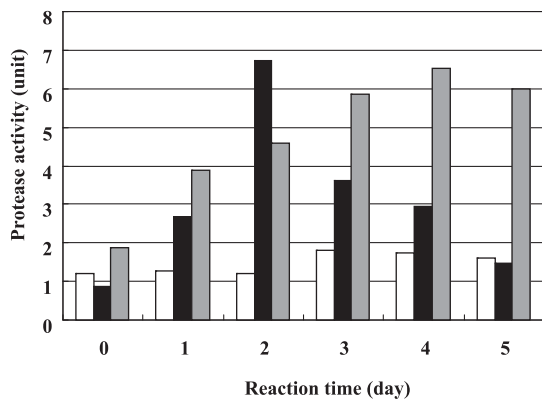


図5. Protease activity by *Brevibacillus* sp. KH3 (black bar) and *Bacillus* sp. KH4 (hatched bar). Reaction temperature: 50°C for KH3 and 37°C for KH4. White bar is without adding bacteria.

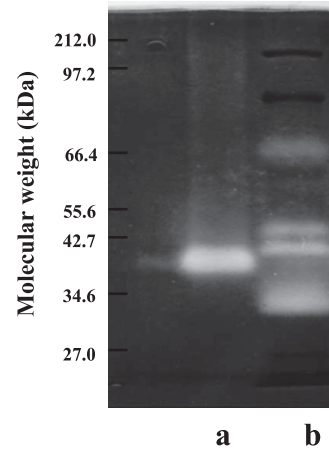


図7. Casein zymography of proteases derived from *Brevibacillus* sp. KH3 produced in the nutrient-poor (without LB medium; lane a) and nutrient-rich excess sludge (with LB; lane b).

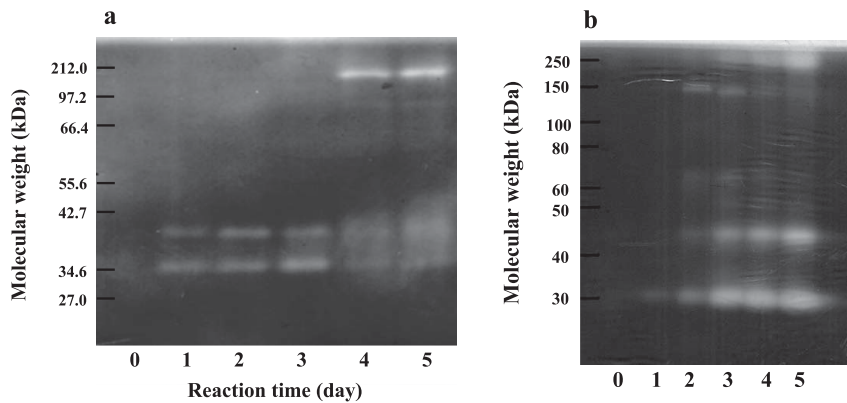


図6. Casein zymography of proteases produced by *Brevibacillus* sp. KH3 (a) and *Bacillus* sp. KH4 (b).

発生量は、現在のところ年間約4億トン以上にものぼり、今後も増加傾向にあると言える^{15,18)}。さらにその処分には、膨大なコストがかかっており、費用面でも大きな負担となっている。つまり、従来の焼却処理後の埋め立て処分では、環境負荷が大きくなるばかりで、我々の生活を脅かすものとなる。余剰汚泥による環境負荷に対し、この数年で様々な対策が検討されており、埋め立て処分にかわって資源としての有効利用、また、物理的処理や化学的処理などによって、発生量そのものの抑制策も講じられるようになった^{2,4,12,15)}。それらの技術の進展により、環境負荷は軽減されてきてはいるが、そのための設備費、ランニングコストや消費エネルギーといった点で、大きく負担があるというデメリットもある。そこで我々が着目したのが生物学的な手法、すなわち、微生物による環境負荷低減技術である³⁾。この方法は微生物のみの力で汚泥を減量化できることから、環境面だけではなく、特にコスト面を考えればその負担は大きく軽減されるため、非常に有益な技術だと言える。

今回、我々がスクリーニングによって得た細菌の中で、*Brevibacillus* sp. KH3 株および *Bacillus* sp. KH4 株はそれぞれ単体で高い汚泥溶解性を持っていることが分かった(図2)。しかしながら、両細菌とも汚泥溶解率が30%程度であり、その割合は他に報告されている菌株に

よる分解率とほぼ同程度であった³⁾。その要因は様々なことが考えられるが、KH3 株においては、図3に示したように、ある時間(48時間)をピークにプロテアーゼの活性が弱まっていることが見受けられた。すなわち、溶解産物によって細菌自身の働きが抑制されてしまっている可能性、あるいは下水汚泥の溶解によって富栄養条件となり、KH3 株自身の酵素産生機構によってプロテアーゼの発現を減少させたことも考えられる。今後、KH3 株の汚泥溶解プロテアーゼをコードする遺伝子をクローニングして、栄養条件の貧富に関わらずこの遺伝子の発現量を高めることができれば、下水余剰汚泥のさらなる減容化も期待できる。そのためには、今後、両菌株による汚泥溶解の機構をより詳細に追究していくとともに、その構造遺伝子を同定していくことが課題となる。

従来までメタン発酵(嫌気消化)という余剰汚泥の減容化技術が実用化されているが、本研究で分離した汚泥溶解細菌株を活用した方法は、汚泥減容能力を向上することが考えられるため、余剰汚泥の高速減量化技術として期待できる。現状では約3割の減量化が限界であり、クリアしなければならない課題も多数あるが、*Brevibacillus* sp. KH3 株および *Bacillus* sp. KH4 株という2種の下水汚泥溶解菌に加え、溶解した下水汚泥溶液を使用して、例えば乳酸菌による乳酸発酵や大腸菌を用いた水素

の生産といった資源化技術を組み合わせることで、更なる余剰汚泥の資源化が可能だと考えられる^{6,10,17)}。すなわち、下水余剰汚泥の可溶化技術と資源化技術をうまく活用することができれば、効率的で簡潔な環境負荷低減技術の確立が期待できると考えられる。

5. 要約

近年、わが国において発生する余剰汚泥は、その多くが埋め立て処分されており、環境面や処理コストの大きな負担から、バイオレメディエーションをヒントに生物学的的手法による環境負荷低減技術の確立を試みた。下水余剰汚泥中より微生物のスクリーニングを行ったところ、数種の細菌株の分離に成功した。そこで、これらのクローンによる汚泥溶解性を調べたところ、2株において特に高い溶解性を持つものが得られた。これら2株の分類・同定を行い、*Brevibacillus* sp. KH3株および*Bacillus* sp. KH4株と名付けた。これらは16S rRNA遺伝子のDNA相同性解析の結果から、新菌種であると考えられる。この2株について溶解性を検討したところ、120時間目までに高い溶解率を示し、最大で約30%になることが分かった。両菌株とも、プロテアーゼを放出していることが判明したため、その活性をカゼインゼイモグラフィによって確認した。その結果、汚泥溶解率および酵素活性との相関性から、KH3株に関しては2本、KH4株に関しては3本の、汚泥溶解に関わると考えられるバンドが確認できた。この2株による汚泥溶解の最適条件や、産生するプロテアーゼの精製・同定を検討していくことで、微生物による環境負荷低減技術の発展が期待されるものである。

謝辞

本研究は、独立行政法人日本学術振興会の科研費(No. 18510076)の助成を得て行ったものであり、ここに深謝いたします。

文献

- Alexander, Y.S., I.G. Dmitrii, A.K. Irina, V.Y. Vera, T.A. Zakhar, P.B. Lidia, A.B. Ludmila, and M.S. Valentin. 1979. Intracellular serine proteinase of *Bacillus subtilis* strain Marburg 168. *J. Biochem.* 179: 333–339.
- Dewil, R., J. Baeyens, and R. Goutvrind. 2006. Ultrasonic treatment of waste activated sludge. *Environ. Progress* 25: 121–128.
- Hasegawa, S., N. Shiota, K. Katsura, and A. Akashi. 2000. Solubilization of organic sludge by thermophilic aerobic bacteria as a pretreatment for anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 41: 163–169.
- He, S., G. Xue, and B. Wang. 2006. Activated sludge ozonation to reduce sludge production in membrane bioreactor (MBR). *J. Hazard. Materials* 135: 406–411.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Maeda, T., V. Sanchez-Torres, and T.K. Wood. 2008. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. *Microbiol. Biotechnol.* 1: 30–39.
- Okamura, Y., N. Inoue, and T. Nikai. 2007. Isolation and characterization of a novel acid proteinase, tropinase from *Candida tropicalis* IFO 0589. *J. Med. Mycol.* 48: 19–25.
- Raser, K.J., A. Posner, and K.K.W. Wang. 1995. Casein Zymography: A method to study μ -calpain, M-calpain, and their inhibitory agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 319: 211–216.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier, and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697–703.
- 一番々瀬宏之, 柿本幸司, 白井義人, 尾川博昭. 1999. 余剰汚泥への糖の添加による乳酸の生産と減量化についての検討, pp.385. 第33回日本水環境学会年会講演集.
- 植木 厚. 1976. 糖質の化学(下), pp.367–387. 日本生化学会編, 生化学実験講座4. 東京化学同人.
- 鶴飼信義, 依田 亮. 1998. 自然浄化処理技術の実際—地域環境の保全—, pp.77–92. 日本技術士会監修. 地人書館.
- 下水汚泥資源利用協議会事務局. 2004. 下水汚泥有効利用状況調査報告.
- 篠田吉史, 加藤暢夫, 森田直樹. 2000. 16S rRNA 遺伝子解析による細菌の系統分類法. 島津評論. 57: 121–132.
- 柴山和夫. 1997. 下水道最先端—下水道の多目的活用—, pp.51–112. 下水道多目的活用研究会編. 理工図書.
- 鈴木達彦. 1979. 土壌微生物実験法, pp.174–178. 土壌微生物研究会編. 養賢堂版.
- 中崎清彦, 安達友彦. 2000. ゼロエミッションのための汚泥の工業原料化技術. 環境科学会誌. 13: 570–578.
- 野田典宏. 1999. 生物学的下水処理の理論と技術, pp.84–157. 山海堂.
- 前田憲成, 梁 明, 大住幸秀, 草野好司, 門上希和夫, 尾川博昭. 2003. 旧弾薬庫跡地土壌における2,4,6-トリニトロトルエン生分解微生物のスクリーニング. 環境化学. 13: 695–704.
- 松本幸一. 2004. 平成16年度版下水道統計 行政編, pp.1504–1505. 日本下水道協会.