

総 説 (一般)

嫌気脱窒環境下における緑膿菌の Biofilm 形成メカニズムの解析

Analysis of the Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation under Anaerobic Conditions

清川 達則¹, 八幡 稔¹, 豊福 雅典², 内山 裕夫², 野村 暢彦^{2*}

TATSUNORI KIYOKAWA, YUTAKA YAWATA, MASANORI TOYOFUKU, HIROO UCHIYAMA and NOBUHIKO NOMURA

¹ 筑波大学大学院生命環境科学研究科 〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1

² 筑波大学生命環境系 〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1

* TEL: 029-853-6627 FAX: 029-853-6627

* E-mail: nomunobu@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

¹ Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tennodai 1-1-1,
Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

² Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tennodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

キーワード: バイオフィーム, 嫌気環境, 脱窒, 細胞外多糖

Key words: biofilm, anaerobic, denitrification, exopolysaccharide

(原稿受付 2012 年 10 月 14 日/原稿受理 2012 年 11 月 7 日)

1. はじめに

近年, 実環境中において微生物の多くは浮遊状態で存在しているのではなく, 物質表面に付着したバイオフィーム状態で存在していることが分かってきた^{3,4)}。バイオフィームとは物質表面に付着した微生物およびそこで増殖した微生物の集団であり, 微生物細胞と細胞外成分 (EPS: Extracellular Polymeric Substances) から構成される三次元構造体である。

バイオフィームの身近な例としては台所や風呂場の「ぬめり」や歯の表面にできる歯垢などが挙げられるが, その他にもバイオフィームは我々の社会と密接に関係しており, 有用な場合もあれば, 有害な場合もある。湖や川ではバイオフィームが汚染物質を分解し環境浄化に役立っており, 排水処理施設に用いられる活性汚泥法では微生物をフロックやグラニュールといった凝集状のバイオフィームとして, また生物膜処理法では担体に付着させたバイオフィームとして, 水質浄化機能を積極的に活用している他^{22,25)}, 環境浄化に利用されるバイオレメディエーションの一部も土壌などに形成されたバイオフィーム状態の微生物の浄化作用を利用したものである¹⁾。一方で, 水道管などの工業用配管中に形成されたバイオフィームは, 配管内部の詰まりや金属腐食の誘発によって各設備の性能低下を引き起こすことが知られている¹⁶⁾。また, 医療器具内やヒトの肺上皮に形成されたバイオフィームは, 高い抗生物質耐性や物理的剥離の困難性から感染症治療の難治化を引き起こす^{3,6)}。あるいは種々のセンサー表面上のバイオフィームにより測定が妨害される場合もある。このように, バイオフィームは正負両面において我々の社会と密接に関わっている。

前述したように, バイオフィームは物質表面に付着した微生物集団が形成する構造体である。この構造体は決して均一な構造ではなく, バイオフィーム内部でも酸素濃度や栄養が不均一な環境が形成されていることが知られている^{2,12)}。そのために, これまでの微生物学で扱ってきた様な, 純粋培養された浮遊状態の均一な微生物についての知見だけでは, 不均一なバイオフィームの理解には不十分なことが分かってきている^{4,23)}。以上のように, バイオフィームは我々の社会および産業とのつながりが深く, その理解と制御が求められていることから, 近年の微生物学において注目された分野となってきた。

2. 嫌気脱窒環境下のバイオフィーム

微生物の生育環境は酸素の存在する好気環境と酸素の存在しない嫌気環境の二つに大別できる。好気環境では最終電子受容体として酸素を用いるが, 嫌気環境では最終電子受容体として硝酸や硫酸などの酸素以外の物質が用いられる。このように好気環境と嫌気環境では代謝が異なることを利用して, 排水処理では処理したい物質に合わせて環境を変化させている²⁴⁾。特に, 硝酸を窒素にまで還元する脱窒と呼ばれる嫌気呼吸は硝化と共に, 土壌や排水における化合物態窒素をガス状窒素や亜酸化窒素に変換することから, 自然界における窒素の循環に非常に重要な役割を担っている。

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* は環境中に遍在しており, 好気環境下では酸素を用いた呼吸を行って生育するが, 嫌気環境下でも脱窒を行って生育することができる²¹⁾。興味深いことに, 緑膿菌は嫌気脱窒条件下におい

て細胞伸長や抗生物質耐性能の上昇など好気条件下とは異なった形質および遺伝子発現を示すことが知られている^{8,20)}。さらに、本菌は高いバイオフィーム形成能を持つことからバイオフィーム研究のモデル微生物の一つであり、現在までに詳細な解析が行われている。しかしながら、その報告の多くは好気条件下のものであり、嫌気脱窒条件下のバイオフィームについて報告されたものは少ないのが現状である。近年、我々の先行研究から好気条件下のバイオフィームと嫌気脱窒条件下のバイオフィームでは形状の異なるバイオフィームを形成することが示された¹⁸⁾ (図1)。これは本菌が好気環境下と嫌気脱窒環境下でバイオフィームを変化させて環境に適応していることを示唆するものであり、そこには必ずバイオフィームを変化させる利点があるはずである。本研究では将来の微生物制御を見据えて、好気条件下と嫌気脱窒条件下のバイオフィームの違いを調べることで、どうしてバイオフィームの構造を変化させるのかについて明らかにすることを目的とした。

3. 嫌気脱窒環境下におけるバイオフィームの観察手法の開発

従来のバイオフィーム観察技術には flow cell chamber system と共焦点レーザー顕微鏡が用いられており、flow cell 内でバイオフィームを形成させ、菌体に発現させた蛍光タンパク質である GFP や蛍光染色剤である FITC などの蛍光を検出することでバイオフィームの立体画像を取得してきた。しかし、嫌気条件脱窒条件下のバイオフィームを観察するにあたって、flow cell system では嫌気脱窒条件が保てないという問題点と嫌気脱窒環境では蛍光タンパクや蛍光染色剤は機能しないといった二つの問題点があった。これらを解決するために、当研究室では嫌気 flow cell chamber system として AFGAS (airtight flow reactor for nondestructive gaseous metabolite analysis and structure visualization)¹⁸⁾ と嫌気脱窒環境下でもバイオフィームの観察が可能な顕微鏡観察技術として COCRM (Continuous Optimizing Confocal Reflection Mi-

croscopy) 法¹⁹⁾ を開発した。AFGAS は脱気して酸素を抜いた培地を気密性の高い流路内で灌流させる flow cell system であり、chamber 内に顕微鏡観察が可能な状態で嫌気脱窒条件下のバイオフィームを形成させることができる。また、COCRM 法は菌体の反射光を検出することで従来の技術とは違い、試料の非破壊、非染色で経時的な三次元構造の観察が可能な顕微鏡観察手法である。

4. 嫌気脱窒環境下におけるバイオフィーム形成過程の経時観察

バイオフィームの構造形成メカニズムについての理解は微生物を制御するにあたって非常に重要である。例えば、水処理の分野で用いられている活性汚泥はフロックやグラニューールといった凝集体構造を形成しているが、これは水処理のプロセスにおいて汚泥の沈降性の高さが求められているために、凝集体構造が形成しやすい運転条件で処理を行っている。この凝集体構造が崩れてしまい沈降性が低下する、パルキングと呼ばれる現象は重大な処理障害を引き起こすことで問題視されている²⁴⁾。また、バイオフィームの内部は栄養や代謝産物、酸素濃度の勾配が形成され不均一な環境を形成しており、栄養を内部に浸透させるための水路を持った構造や代謝産物を効率的に利用するために不均一な細菌叢を持った構造を形成する。硝化細菌の形成するバイオフィームを例に挙げると、アンモニア酸化細菌が密に詰まった細胞塊とそのすぐ傍らに密度の小さな亜硝酸酸化細菌の集団が分布しており、アンモニアから亜硝酸さらに硝酸へと酸化が進む一連の代謝過程と対応しているかのような構造を形成することが知られている^{15,23)}。以上のようにバイオフィームの構造は物性や代謝の効率化と深く関係しており、このようなバイオフィームの制御には構造形成メカニズムの理解が必要と考えられる。

そこで、バイオフィームの構造に関与するとされる形成過程に着目した。バイオフィームのモデル微生物である緑膿菌を例にすると、バイオフィーム形成は、まず、鞭毛および纖毛を介した付着により物質表面に付着する

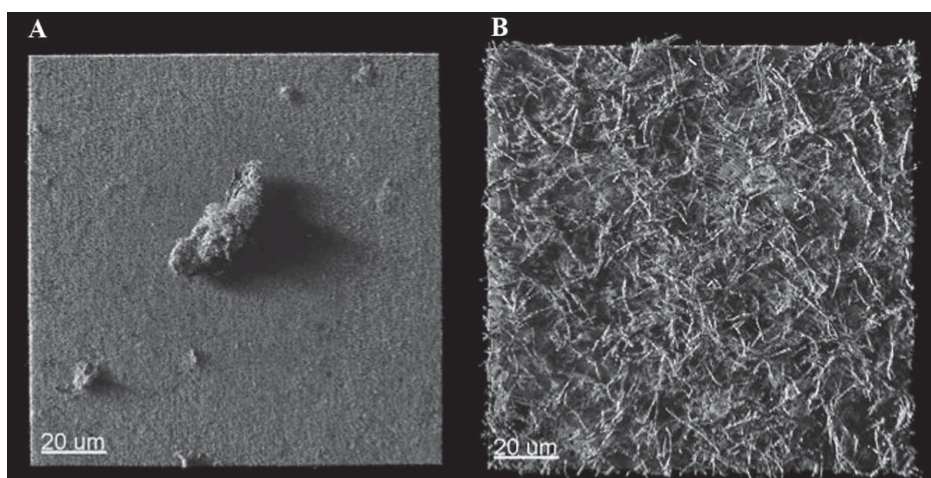


図1. 好気条件下 (A) と嫌気脱窒条件下 (B) における緑膿菌バイオフィームの構造の違い。

緑膿菌は好気条件下では凝集状のバイオフィームを形成するのに対して、嫌気脱窒条件下ではメッシュ状のバイオフィームを形成する。

ことから始まる。続いて、増殖に伴って凝集体を形成し、さらに細胞外多糖や細胞外 DNA などの EPS を分泌しながらマイクロコロニーから成熟したバイオフィルムを形成する。成熟したバイオフィルムではやがて、ラムノリピッドの生産および運動性が上昇することで、菌体がバイオフィルム状態から脱離して浮遊状態に移行する。この浮遊菌は新たな環境を見つけて付着し、またバイオフィルムを形成し始める (図 2)。このようなライフサイクルをもって緑膿菌はバイオフィルム状態と浮遊状態を行き来しながら生育していることが知られている^{4,17)}。

以上のように緑膿菌はバイオフィルムのモデル微生物として研究が進んでいる上、我々の先行研究から、AFGAS と COCRM 法を用いて好気条件下と嫌気脱室条件下においてバイオフィルム構造が異なることが観察されている。そのため、本菌はバイオフィルム構造の変化はどのように生じているのか、構造の変化にはどのような利点があるのかを調べるのには非常に適した細菌である。

まずは、嫌気脱室条件下におけるバイオフィルムの形成過程を調べるために、AFGAS を用いた嫌気脱室条件下のバイオフィルムの経時観察を行った。以下の実験には緑膿菌の基準株として汎用される緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株を供試菌株として用いた。前培養は LB 培地 (Nacalai, Kyoto, Japan) に硝酸カリウムを終濃度 100 mM になるように添加した LBN 培地を用い、ハンゲートチューブで培地を Ar ガス置換した後、密閉した状態で 37°C、12 時間、200 rpm で振とう培養を行い、これを前培養液として以降の実験に用いた。AFGAS の条件は Yawata らの方法を参考にした¹⁸⁾。培地には M63 培地に硝酸カリウムを終濃度 25 mM になるように添加した培地を用い、Ar ガスによるガス置換と脱気を三回繰り返したものを用いた。植菌は前培養液から培地を除き、菌体を PBS バッファで二回洗浄後、OD600=0.1 に調整した菌液 700 μ L を flow cell chamber 内に注入した。培養は植菌後 37°C で 1 時間静置培養後、流速 15 μ L/min で灌流させた。観察は COCRM 法を用いて培養後 1 時間、16 時間、24 時間、32 時間目で顕微鏡観察をした。嫌気脱室環境は脱室呼吸の遺伝子を欠損した株を上記した条件で培養し、生育が見られないことで確認した (data not shown)。顕微鏡観察の結果、1 時間目から 16 時間目で基質表面への付着が見られ、24 時間目で成熟したバイオフィルムを形成し、36 時間目で脱離する様子が観察された (図 3)。この結果から嫌気

脱室条件下の形成過程には付着から成熟、脱離という好気条件下のバイオフィルムと同様の形成過程があることが示された。

5. バイオフィルム中における多糖の分布の比較

続いて、バイオフィルム中の EPS に着目した。バイオフィルムは細胞と EPS で構成されているが、その大部分が EPS によって占められていることが報告されている⁷⁾。EPS には細胞外多糖や細胞外 DNA、細胞外タンパク質があり、細胞同士の接着や細胞の物質表面との付着、バイオフィルムの構造維持、保水による乾燥ストレス耐性、UV ストレス耐性など様々な機能を担っている⁷⁾。このような機能的な EPS に覆われたバイオフィルムは外部から隔離された環境となり、浮遊菌と比べて環境中のストレスに対する抵抗性が飛躍的に上昇することが知られている。緑膿菌のバイオフィルムにおいて、この EPS の中でも多糖は基質表面との付着やバイオフィルムの構造維持、免疫系や抗生物質への抵抗性^{5,9,10)}などの機能が知られていることから特に重要視されている。実際に、CV アッセイ法¹³⁾を用いてバイオフィルムの形成量を評価したところ、好気条件下では多糖合成遺伝子欠損株では野生株に比べてバイオフィルム形成量が大幅に減少した。また、嫌気脱室条件下でも、好気条件下と同様にバイオフィルム形成量の大幅な減少が確認された (data not shown)。この結果から、嫌気脱室条件下でも多糖がバイオフィルムに重要な働きをしていることが予想された。そこで、バイオフィルム中の多糖の分布を好気条件下と嫌気脱室条件下のバイオフィルムで比較することとした。

バイオフィルムは LBN 培地を用いて 37°C、24 時間静置培養して Glass Base Dish (IWAKI) に形成させた。多糖の染色は Luyan らの手法に従った⁹⁾。バイオフィルムの培養上清を除去後、FITC conjugated lectin で 1 時間染色した。PBS バッファで洗浄後、COCRM 法でバイオフィルムを、lectin を FITC の蛍光観察でそれぞれ顕微鏡観察した。その結果、好気条件下では、多糖がバイオフィルム全体を覆うように存在しているのに対して (図 4A-B)、嫌気脱室条件下ではバイオフィルムは多糖に覆われておらず、多糖はガラス表面に局在している様子が観察された (図 4C-D)。この結果から、好気条件下のバイオフィルムと嫌気脱室条件下のバイオフィルムでは多糖の分布に明らかに差があることが示された。

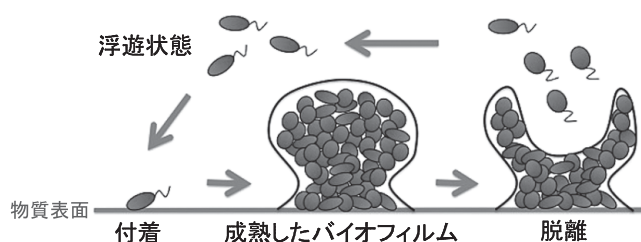


図 2. 好気環境下における緑膿菌バイオフィルム形成過程。

固体表面への付着からバイオフィルムの成熟、浮遊状態への脱離から構成される。

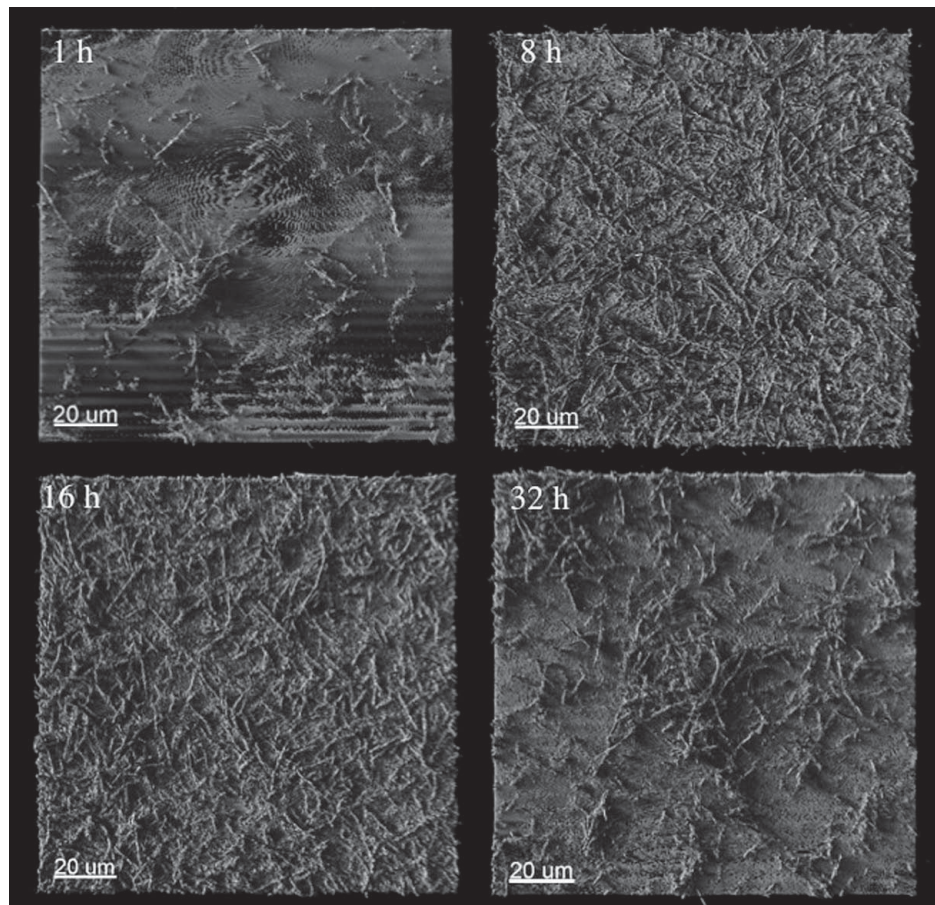


図3. 嫌気脱室条件下における緑膿菌バイオフィーム形成過程.

培養1時間目から8時間目で基質表面への付着が見られ、16時間目で成熟したバイオフィームを形成し、36時間目で脱離した.

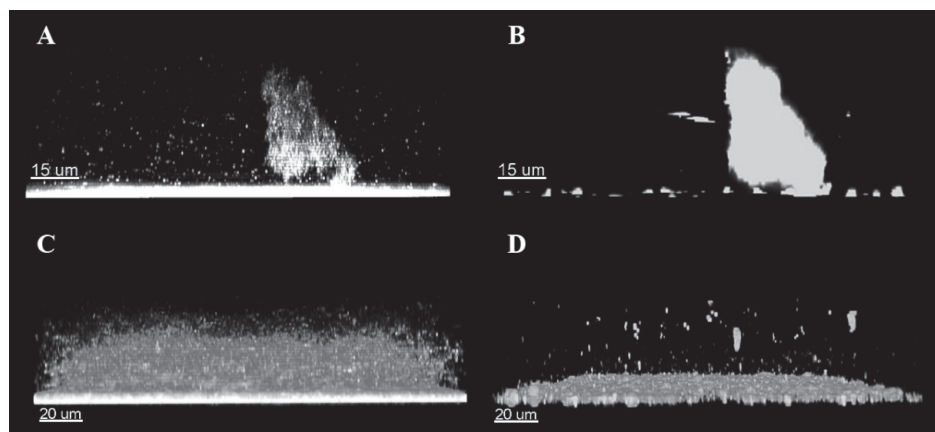


図4. 気条件下と嫌気脱室条件下における緑膿菌バイオフィーム中の多糖の分布.

好気条件下のバイオフィームとガラス面の COCRM 画像 (A) と多糖の FITC 検出画像 (B). 嫌気脱室条件下のバイオフィームとガラス面の COCRM 画像 (C) と多糖の FITC 検出画像 (D).

6. 総括と今後の展望

我々の先行研究より緑膿菌のバイオフィームは好気条件下と嫌気脱室条件下ではバイオフィームの構造を変化させることを明らかにした。そこで本研究ではこのバイオフィームはなぜ変化するのかを明らかにすることを目的とし、まずは両条件のバイオフィームでは具体的に何

が違うのかを調べた。

本研究の結果から、好気条件下のバイオフィームと嫌気脱室条件下のバイオフィームでは付着から成熟し、やがて脱離するといった同様の形成過程を有していることが示された。また、好気条件下のバイオフィームと嫌気脱室条件下のバイオフィームという構造の異なるバイオフィームにおいて、好気条件下では多糖がバイオフィーム

ム全体を覆っているのに対して、嫌気脱室条件下では多糖がバイオフィルムの基質底面部にのみ局在しているといった、バイオフィルム中の多糖の分布に差があることが示された。以上のような結果から、バイオフィルムの構造の違いは多糖の分布の違いによって引き起こされているのか、それとも多糖の分布の違いはバイオフィルムの構造の違いによって引き起こされているのかという疑問が生じる。そのため、現在では嫌気脱室条件下における多糖の局在化がバイオフィルムのライフサイクルを通してどのように形成され、変化していくのかに着目することで、好気条件下と嫌気脱室条件下におけるバイオフィルム構造の違いと多糖の分布の違いの関係性について解析を行っている。先行研究において、嫌気脱室条件下では好気条件下と比べて Psl と呼ばれる、マンノースを主な構成糖とする細胞外多糖の一つの転写量が減少するという報告がある²⁰⁾。緑膿菌においては嫌気脱室条件下で誘導される転写調節因子があることから¹⁵⁾、Psl の転写抑制もこのような転写調節因子により行われていることが予想される。しかしながら、嫌気脱室条件下における Psl の制御機構については未だ報告はなされていない。好気条件においては、緑膿菌の付着と Psl 生産の関係性は詳細な解析がなされており、繊毛および鞭毛を介して細胞が基質表面に付着すると、その情報は二成分制御系を介して細胞内部に伝わり、Psl などのバイオフィルム形成に必要な遺伝子の発現を誘導する¹¹⁾。そこで、嫌気脱室条件下のバイオフィルムにおける、多糖の基質表面への局在化は、基質への付着を認識する二成分制御系による制御と嫌気脱室条件を認識する転写調節因子との相互作用によって生じていることが推測される。今後はこの転写調節因子と Psl 生産の関係について着目することで、嫌気脱室条件下のバイオフィルムの形成メカニズムについてより詳細に解析していきたい。また、緑膿菌の生産する多糖には Psl 以外にも Pel と呼ばれるグルコースを主な構成糖とする多糖やアルギン酸が報告されており、これらの発現量も解析する必要があると考えられる。さらに、本研究の目的である、どうしてバイオフィルムの構造が変化するのかについては、好気条件下と嫌気脱室条件下におけるバイオフィルム中の多糖の役割を、人工的に多糖の発現量を調節する系などを用いて比較することで解析していく予定である。

バイオフィルム構造の制御という観点における本研究の意義は、微生物の代謝の活性化や凝集性などの物理的特性をコントロールすることにある。更なる解析が進み、多糖やその他の嫌気脱室条件下におけるバイオフィルムの構造を変化させる因子が明らかになれば、水処理における脱室活性の向上やフロックのバルキング防止などの応用が期待できるかもしれない。

本研究では緑膿菌に着目してバイオフィルムの構造変化について詳細な解析を行ったが、微生物の多くはバイオフィルムを形成することを踏まえると、本研究の成果は微生物を制御する新たなアプローチにつながる事が期待される。

謝 辞

本研究は、文部科学省からの科学研究費補助、科学技

術振興機構 (JST) の戦略的創造研究推進事業 (CREST) および先端的低炭素化技術開発 (ALCA) の補助を受けて行われました。この場を借りて感謝いたします。

文 献

- 1) Cao, B., P.D. Majors, B. Ahmed, R.S. Renslow, C.P. Silvia, L. Shi, S. Kjelleberg, J.K. Fredrickson, and H. Beyenal. 2012. Biofilm shows spatially stratified metabolic responses to contaminant exposure. *Environ. Microbiol.* 10.1111/j.1462-2920.
- 2) Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber, and G. James. 1994. Biofilms, the customized micro-niche. *J. Bacteriol.* Apr. 176: 2137-2142.
- 3) Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- 4) Davey, M.E. and G.A. O'toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867.
- 5) Digiandomenico, A., P. Warrenner, M. Hamilton, S. Guillard, P. Ravn, R. Minter, M.M. Camara, V. Venkatraman, R.S. Macgill, J. Lin, Q. Wang, A.E. Keller, J.C. Bonnell, M. Tomich, L. Jermutus, M.P. McCarthy, D.A. Melnick, J.A. Suzich, and C.K. Stover. 2012. Identification of broadly protective human antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl by phenotypic screening. *J. Exp. Med.* 209: 1273-1287.
- 6) Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 881-890.
- 7) Flemming, H.C. and J. Wingender. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 623-633.
- 8) Hill, D., B. Rose, A. Pajkos, M. Robinson, P. Bye, S. Bell, M. Elkins, B. Thompson, C. Macleod, S.D. Aaron, and C. Harbour. 2005. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5085-5090.
- 9) Ma, L., M. Conover, H. Lu, M.R. Parsek, K. Bayles, and D.J. Wozniak. 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.* 5: e1000354.
- 10) Meenu Mishra, Matthew S. Byrd, Susan Sergeant, Abul K. Azad, Matthew R. Parsek, Linda McPhail, Larry S. Schlesinger and Daniel J. Wozniak. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. *Cellular Microbiology* 14: 95-106.
- 11) Mikkelsen, H., M. Sivaneson, and A. Filloux. 2011. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 13: 1666-1681.
- 12) Monds, R.D. and G.A. O'Toole. 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* 17: 73-87.
- 13) O'Toole, G.A. and R. Kolter. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28: 449-461.
- 14) Schramm, A., L.H. Larsen, N.P. Revsbech, N.B. Ramsing, R. Amann, and K.H. Schleifer. 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4641-4647.
- 15) Trunk, K., B. Benkert, N. Quäck, R. Münch, M. Scheer, J. Garbe, L. Jänsch, M. Trost, J. Wehland, J. Buer, M. Jahn, M. Schobert, and D. Jahn. 2010. Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ. Microbiol.* 12: 1719-1733.
- 16) Xavier, J.B., W. Kim, and K.R. Foster. 2011. A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomo-*

- nas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 79: 166–179.
- 17) Yang, L., Y. Hu, Y. Liu, J. Zhang, J. Ulstrup, and S. Molin. 2011. Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Environ. Microbiol. 13: 1705–1717.
 - 18) Yawata, Y., N. Nomura, and H. Uchiyama. 2008. Development of a novel biofilm continuous culture method for simultaneous assessment of architecture and gaseous metabolite production. Appl. Environ. Microbiol. 74: 5429–5435.
 - 19) Yawata, Y., K. Toda, E. Setoyama, J. Fukuda, H. Suzuki, H. Uchiyama, and N. Nomura. 2010. Monitoring biofilm development in a microfluidic device using modified confocal reflection microscopy. J. Biosci. Bioeng. 110: 377–380.
 - 20) Yoon, M.Y., K.M. Lee, Y. Park, and S.S. Yoon. 2011. Contribution of cell elongation to the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* during anaerobic respiration. PLoS One. 6:e16105.
 - 21) Yoon, S.S., R.F. Hennigan, G.M. Hilliard, U.A. Ochsner, K. Parvatiyar, M.C. Kamani, H.L. Allen, T.R. DeKievit, P.R. Gardner, U. Schwab, J.J. Rowe, B.H. Iglewski, T.R. McDermott, R.P. Mason, D.J. Wozniak, R.E. Hancock, M.R. Parsek, T.L. Noah, R.C. Boucher, and D.J. Hassett. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. Dev. Cell. 3: 593–603.
 - 22) Zhu, G., Y. Peng, B. Li, J. Guo, Q. Yang, and S. Wang. 2008. Biological removal of nitrogen from wastewater. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol. 192 192: 159–195.
 - 23) 森崎久雄. 1999. バイオフィーム生成のサイエンス, pp. 49–63. 森崎久雄, 大島広行, 磯辺賢治 (編), バイオフィーム. サイエンスフォーラム.
 - 24) 岩堀恵祐. 2008. 水処理, pp. 164–171. 活性汚泥法における微生物とその制御, pp. 171–177. 稲森悠平 (編), 最新環境浄化のための微生物学. 講談社.
 - 25) 山崎宏史. 2008. 生物膜法における微生物とその制御, pp. 177–183. 稲森悠平 (編), 最新環境浄化のための微生物学. 講談社.