

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年10月6日(06.10.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/159287 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 11/14 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
C02F 3/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/060772
- (22) 国際出願日: 2016年3月31日(31.03.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-076955 2015年4月3日(03.04.2015) JP
- (71) 出願人: 住友化学株式会社(SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1048260 東京都中央区新川二丁目27番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 中村 洋介(NAKAMURA Yosuke); 〒5548558 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友化学株式会社内 Osaka (JP). 新田英二(NITTA Eiji); 〒5548558 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友化学株式会社内 Osaka (JP). 朝子 弘之(ASAKO Hiroyuki); 〒5548558 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友化学株式会社内 Osaka (JP). 岡崎 文美(OKAZAKI Fumiyoshi); 〒5548558 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住友化学株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番

1号丸の内 MY PLAZA (明治安田生命ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING MICROBIOLOGIC AGENT, AND MICROBIOLOGIC AGENT

(54) 発明の名称: 微生物製剤の製造方法及び微生物製剤

(57) Abstract: The method for producing a microbiologic agent according to the present invention comprises: a step for adding, in a medium containing a target compound, an inorganic fine particle carrier and a biomass containing a target compound-degradable microorganism to cause microorganisms contained in the biomass to be supported by the inorganic fine particles, and culturing the target compound-degradable microorganism while monitoring the existence ratio thereof with respect to the microorganisms supported by the inorganic fine particle carrier; and a step for obtaining the microbiologic agent by, after the existence ratio of the target compound-degradable microorganism has reached a predetermined value, recovering the inorganic fine particle carrier that supports the target compound-degradable microorganism. The existence ratio of the target compound-degradable microorganism is obtained by a method comprising: a step for obtaining amplification products by amplifying a predetermined region of 16S rRNA genes of the microorganisms supported by the inorganic fine particle carrier; and a step for analyzing base sequence data sets of the amplification products, classifying the obtained base sequence data sets into multiple groups on the basis of the homology between respective base sequence data sets, determining each microorganism having a base sequence data set in one of the groups to be a single type, determining the type of the target compound-degradable microorganism on the basis of a representative base sequence data set of each of the groups, and calculating the existence ratio of the target compound-degradable microorganism with respect to all the microorganisms on the basis of the number of the obtained base sequence data sets.

(57) 要約: 本発明に係る微生物製剤の製造方法は、対象化合物を含む培地中で、対象化合物分解性微生物を含むバイオマスと、無機微粒子担体とを添加し、バイオマスに含まれる微生物を無機微粒子に担持させ、無機微粒子担体に担持された微生物における対象化合物分解性微生物の存在割合を監視しながら、培養する工程と、対象化合物分解性微生物の存在割合が所定の値に到達した後、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体を回収し、微生物製剤を得る工程と、を備え、対象化合物分解性微生物の存在割合が、無機微粒子担体に担持された微生物の16S rRNA遺伝子の所定の領域を増幅して増幅産物を得る工程と、増幅産物の塩基配列データを解析し、得られた塩基配列データを各塩基配列データ間の相同性に基づいて複数のグループに分け、それぞれのグループの塩基配列データを有する微生物を単一の種類とし、それぞれのグループの代表塩基配列データに基づき、対象化合物分解性微生物の種類を決定し、得られた塩基配列データの数に基づき、すべての微生物における対象化合物分解性微生物の存在割合を算出する工程と、を含む方法によって得られる。

WO 2016/159287 A1

明 細 書

発明の名称：微生物製剤の製造方法及び微生物製剤

技術分野

[0001] 本発明は、微生物製剤の製造方法及び微生物製剤に関する。

背景技術

[0002] 排水処理において、対象化合物を排水から除く方法としては、燃焼処理方法又は対象化合物分解性微生物を利用した生物学的処理方法等が用いられる。対象化合物分解性微生物を得る方法としては、対象化合物を分解する微生物を集積培養して、その分解微生物を特定、単離して純粋培養する方法（単離培養方法）が知られている。また、活性汚泥の様な混合微生物系の場合、対象化合物を低濃度で栄養源として与え、徐々に濃度を高めていくことにより活性汚泥を対象化合物に馴れさせ、分解能を高める馴養と呼ばれる方法（馴養方法）が知られている。

[0003] しかしながら、単離培養方法では、分解微生物の単離に長時間を要し、適した微生物も人工的に培養できるものに限られ、更に純粋培養するための製造コストが高いといった課題がある。一方、馴養方法は、安価で大量に分解微生物を培養できるものの、馴養に長時間を要するといった課題がある。

[0004] その他に対象化合物分解微生物を高密度化する方法としては、例えば、特許文献1に記載されているように、硝化細菌を高密度化し、優れた物性を有する、微粒子個体と微生物を凝集造粒化することによる微生物製剤の製造方法が開示されている。この微生物製剤は、連続培養することで効率的に製造することができ、保存もできるため、排水の効率的な処理に有用である。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2003-274937号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、特許文献 1 に記載の方法は、窒素処理能力を指標にして硝化細菌を高密度化することが可能であるが、造粒化中及び造粒化後の硝化細菌群の種類、存在量が把握できない。窒素以外の対象化合物の処理においても同様のことが考えられる。このような方法では、対象化合物の分解性のみを指標とした場合、対象化合物分解性微生物の存在量及び存在割合は把握できていないため、造粒化工程で添加する対象化合物の濃度が高過ぎることによる対象化合物分解微生物群の増殖阻害、また対象化合物の分解中間物の蓄積による対象化合物分解微生物の増殖阻害等を予測することが困難である。一方、近年の遺伝子解析技術の進歩により、活性汚泥等の複合微生物系から、微生物を単離することなく存在する微生物の種類及び存在量を把握することが可能となってきた。しかし、その技術の活用は、現状では単なる測定の域を脱しておらず限定的であることから、遺伝子解析技術を微生物製剤の製造方法に適応させるための技術確立が望まれていた。

[0007] 本発明は、上記事情に鑑み、対象化合物分解性微生物の存在割合を監視することで、対象化合物分解性微生物を所望の密度に担持する微生物製剤を安定的且つ効率的に製造する方法を提供することを目的とする。また、本発明は、上記製造方法により製造された微生物製剤、該微生物製剤を用いた化合物分解方法、及び該微生物製剤の評価方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、製造中の微生物製剤に担持される微生物を網羅的に解析した遺伝子解析情報に基づき、微生物製剤に担持される対象化合物分解性微生物を監視することで、微生物製剤を効果的に製造する方法を新たに確立し、本発明を完成させるに至った。

[0009] すなわち、本発明は、例えば以下の〔1〕～〔6〕に関する。

〔1〕対象化合物分解性微生物を担持する微生物製剤の製造方法であって、対象化合物を含む培地中で、対象化合物分解性微生物を含むバイオマスと、無機微粒子担体とを添加し、バイオマスに含まれる微生物を無機微粒子に担持させ、無機微粒子担体に担持された微生物における対象化合物分解性微生物

物の存在割合を監視しながら、培養する工程と、対象化合物分解性微生物の存在割合が所定の値に到達した後、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体を回収し、微生物製剤を得る工程と、を備え、対象化合物分解性微生物の存在割合が、無機微粒子担体に担持された微生物の 16S rRNA 遺伝子の所定の領域を増幅して増幅産物を得る工程と、増幅産物の塩基配列データを解析し、得られた塩基配列データを各塩基配列データ間の相同性に基づいて複数のグループに分け、それぞれのグループの塩基配列データを有する微生物を単一の種類とし、それぞれのグループの代表塩基配列データに基づき、対象化合物分解性微生物の種類を決定し、得られた塩基配列データの数に基づき、すべての微生物における対象化合物分解性微生物の存在割合を算出する工程と、を含む方法によって得られる、製造方法。

〔2〕対象化合物が（S）-2-（4-クロロフェニル）-3-メチルブタン酸である、〔1〕に記載の製造方法。

〔3〕対象化合物がアンモニアである、〔1〕に記載の製造方法。

〔4〕〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の製造方法により製造された、微生物製剤。

〔5〕〔4〕に記載の微生物製剤を用いた、化合物分解方法。

〔6〕〔4〕に記載の微生物製剤の評価方法であって、微生物製剤に含まれる微生物における対象化合物分解性微生物の存在割合を指標として微生物製剤を評価する工程を備え、対象化合物分解性微生物の存在割合が、微生物製剤に含まれる微生物の 16S rRNA 遺伝子の所定の領域を増幅して増幅産物を得る工程と、増幅産物の塩基配列データを解析し、得られた塩基配列データを各塩基配列データ間の相同性に基づいて複数のグループに分け、それぞれのグループの塩基配列データを有する微生物を単一の種類とし、それぞれのグループの代表塩基配列データに基づき、対象化合物分解性微生物の種類を決定し、得られた塩基配列データの数に基づき、すべての微生物における対象化合物分解性微生物の存在割合を算出する工程と、を含む方法によって得られる、評価方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、微生物製剤に担持される微生物の種類を検出し、その存在割合を算出した結果に基づき、対象化合物分解性微生物を監視することで、対象化合物分解性微生物を所望の密度に担持する微生物製剤を安定的且つ効率的に製造する方法を提供することができる。また、本発明は、上記製造方法により製造された微生物製剤、この微生物製剤を用いた化合物分解方法、及びこの微生物製剤の評価方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本実施形態の微生物製剤を製造する反応槽の概略縦断面図である。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明を実施するための形態（以下、「本実施形態」という。）について詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施形態に限定されるものではない。

[0013] <微生物製剤の製造方法>

本実施形態の対象化合物分解性微生物を担持する微生物製剤の製造方法は、対象化合物を含む培地中で、対象化合物分解性微生物を含むバイオマスと、無機微粒子担体とを添加し、バイオマスに含まれる微生物を無機微粒子に担持させ、無機微粒子担体に担持された微生物における対象化合物分解性微生物の存在割合を監視しながら、培養する工程と、対象化合物分解性微生物の存在割合が所定の値に到達した後、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体を回収し、微生物製剤を得る工程と、を備える。

[0014] 本実施形態に係る対象化合物としては、微生物により分解される化合物であれば特に制限されるものではないが、排水中に含まれるものが好ましい。このような化合物としては、例えば、アンモニア、亜硝酸、ベンゼン、トルエン、スチレン、キシレン、カテコール、プロトカテキュ酸、プロトカテキュアルデヒド、2-フェニル酪酸、2-イソプロピルフェニル酪酸、(S)-2-(4-クロロフェニル)-3-メチルブタン酸、安息香酸、ベンズアルデヒド等が挙げられる。これらの中でも、排水からの除去が望まれている

アンモニア又は（S）－2－（4－クロロフェニル）－3－メチルブタン酸が好ましい。

[0015] 対象化合物を含む培地としては、対象化合物を含み、且つ対象化合物分解性微生物を培養できるものであれば、特に制限されるものではない。このような培地としては、各塩類、pH等を人工的に調製した培地であってもよく、下水又は廃水であってもよい。培地に含まれる対象化合物の濃度は、対象化合物分解性微生物を馴養する観点から、初期濃度は低く設定し、培養過程で次第に高くしていくことが好ましい。初期濃度は、対象化合物ごとに、適宜設定することができる。

[0016] 対象化合物分解性微生物とは、対象化合物を栄養源として分解し、利用することができる微生物である。本実施形態に係る対象化合物分解性微生物は、対象化合物の選択により、適宜選択される。対象化合物にアンモニアを選択した場合は、例えば、硝化細菌（*Nitrosomonas*属等のアンモニア酸化細菌、*Nitrobacter*属、*Nitrospira*属等の亜硝酸酸化細菌等）が挙げられる。対象化合物に（S）－2－（4－クロロフェニル）－3－メチルブタン酸を選択した場合は、例えば、*Sphingomonadaceae*科細菌等が挙げられる。

[0017] 対象化合物分解性微生物を含むバイオマスとしては、例えば、活性汚泥、土壌、バイオフィーム等のマイクロフロー等が挙げられ、汚水の浄化のため産業上広く利用されているという観点から、活性汚泥が好ましい。活性汚泥としては、下水汚泥、産業排水処理場活性汚泥、し尿処理場汚泥等が挙げられる。

[0018] 無機微粒子担体としては、材質が金属及びその無機塩類又は酸化物であってもよく、炭素を含有するものであっても化学的に無機物に分類されるものであってもよく、又は有機態炭素の含有量が1%程度未満の純物質又は混合物であってもよい。無機微粒子担体としては、例えば、アルミナ（酸化アルミニウム）、ヒドロキシアパタイト（カルシウムリン酸ヒドロキシド）等の工業製品（規格外品、副産物、廃品等を含む）、活性汚泥等の有機性廃棄物

の焼却灰並びに火力発電又はコークス炉の燃えかすである石炭焼却灰等が挙げられる。

[0019] 無機微粒子担体としては、中でも、安価であり、簡便な操作で得ることができ、また微生物の活性発現が短期間で生じるといった観点から、石炭焼却灰が好ましい。石炭焼却灰の中でも、クリンカアッシュ又はフライアッシュが好ましく、ふるい分け等を行わなくても中心粒子径が $100\mu\text{m}$ 以下であることから、フライアッシュがより好ましい。無機微粒子担体としては、クリンカアッシュも粉砕して中心粒子径を調整することで、フライアッシュと同様に用いることができる。クリンカアッシュ又はフライアッシュの組成は、特に制限されるものではない。

[0020] 無機微粒子担体の中心粒子径は、 $1\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ が好ましく、 $4\mu\text{m}\sim 75\mu\text{m}$ がより好ましく、 $13\mu\text{m}\sim 25\mu\text{m}$ が更に好ましい。中心粒子径がこのような範囲の場合、対象化合物分解性微生物を含むバイオマス及び無機微粒子担体を混合した際に、両者が凝集しやすくなり、好適な量の対象化合物分解性微生物を含むバイオマスが無機微粒子担体に担持されやすくなる傾向にある。

[0021] 無機微粒子担体の比重は、特に制限されないが、 $1.2\sim 3.5$ が好ましい。

[0022] 無機微粒子担体は、培養初期の歩留まりを向上させることを目的として、必要に応じて、各種凝集剤を用いて凝集させてもよい。凝集剤としては、例えば、ノニオン性、カチオン性、アニオン性の高分子凝集剤等が挙げられる。

[0023] 本実施形態に係る培養方法としては、回分、半回分、流加、連続のいずれの方式を用いてもよい。培養方法としては、例えば、増殖が遅く菌体収率の低い微生物を効率的に調製するという観点から、特開平9-187272号公報に記載されるように、微生物を培養する容器（以下、反応槽という）へ供給する対象化合物の濃度を培養時間の経過に伴い、対数増加させる連続培養方式を用いてもよい。

[0024] 本実施形態において、反応槽の仕様については特に制限されるものではなく、従来用いられてきた培養タンク及び活性汚泥処理槽等を利用することができる。対象化合物分解性微生物が好気性微生物である場合、運転経費を抑え、簡便な運転管理で、対象化合物分解性微生物を高濃度に集積して効率よく培養することができるといった観点から、例えば、図1に示されるような反応槽を用いてもよい。

[0025] 図1に示す反応槽100はスプリット形の気泡塔反応器で構成される。この反応器は、培養槽1内に隔壁3及び整流板4を組み込んだ構造になっており、隔壁3によって曝気部分2と、沈降部分5に仕切られている。沈降部分5の底部はテーパ状のスロープ6となっており、ここを伝って下降してきた固形物が底部の散気装置7から流入した空気又は高酸素分圧ガス8による上昇流によって曝気部分2内の整流板4で区切られた片側部分を上昇し、曝気部分2の上方で流入水9と接触、混合され、整流板4で区切られたもう一方の外側を下降して底部のスロープ6に到達するという循環流を形成する。

[0026] 沈降部分5では固形物と清澄水が重力により分離され、固形物はスロープ6を伝って曝気部分2に戻り、清澄水は排出口10から処理水11として排出される。曝気部分2の水面上方から流入する流入水9として、対象化合物を含む合成培地又は排水等を供給し、培養を行う。流入水9の供給は連続的又は断続的のいずれでも良い。

[0027] 図1に示す反応槽では、反応槽内に無機微粒子担体を流動させ、これにバイオマスに含まれる微生物を集積、担持させて培養する。培養にあたっては、反応槽に培地を供給し、散気装置7から空気又は高酸素分圧ガス8を供給し、曝気部分2内で無機微粒子担体を含む培地を循環させながら、無機微粒子担体を流動させ、無機微粒子担体上に微生物を集積させる。このような方法によれば、運転経費を抑え、簡便な運転管理で、対象化合物分解性微生物を高濃度に集積した微生物製剤を効率よく培養することができる傾向にあり、また槽内へ供給された酸素の利用効率が高いため、高負荷運転をすることもできる。

[0028] 本実施形態において、後述する方法により、無機微粒子担体に担持された対象化合物分解性微生物の種類及び無機微粒子担体に担持された微生物に対する存在割合を確認することができる。そのため、対象化合物分解性微生物を担持する無機微粒子担体を培養する過程で、定期的に対象化合物分解性微生物の存在割合を調べることにより、その変化を調べることができる。

[0029] 対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体における対象化合物分解性微生物の存在割合が所定の値に達したときには、対象化合物を分解する微生物製剤として所定の機能を有すると判定することができるため、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体を回収して、本実施形態の微生物製剤を得ることができる。微生物製剤として所定の機能を有すると判定するための対象化合物分解性微生物の存在割合は、対象化合物によって適宜設定することができる。対象化合物にアンモニアを選択した場合は、例えば、硝化細菌の存在割合は、5%以上であることが好ましく、10%以上であることがより好ましく、15%以上であることが更に好ましい。対象化合物に(S)-2-(4-クロロフェニル)-3-メチルブタン酸を選択した場合は、例えば、(S)-2-(4-クロロフェニル)-3-メチルブタン酸分解性微生物の存在割合は、5%以上であることが好ましく、6%以上であることがより好ましく、7%以上であることが更に好ましい。

[0030] 対象化合物分解性微生物の存在割合が所定の値に到達するまで培養した対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体を回収し、これを本実施形態の微生物製剤とする。本実施形態において、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体のみを回収してこれを微生物製剤としてもよいし、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体を含む培地を微生物製剤としてもよいし、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体を含む培地から濃縮又は乾燥により水分を除いたものを微生物製剤としてもよい。本実施形態の微生物製剤の保存及び貯蔵の際には、担持される微生物が好気性微生物である場合、事前に高酸素分圧ガスで処理してもよい。

[0031] 本実施形態の製造方法は、培養過程で、対象化合物分解性微生物の監視に

よって、製造中の微生物製剤（対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体）に含まれる対象化合物分解性微生物の存在割合の変化を調べることで、増殖阻害等の問題を迅速に検出し、対応することができるため、微生物製剤を安定且つ効率的に製造することができる。例えば、対象化合物分解性微生物の増殖阻害が予測された場合には、添加する対象化合物の量を調整する等の対応をとることにより、対象化合物分解性微生物の増殖を適切に制御することができる。

[0032] <対象化合物分解性微生物の存在割合の算出>

対象化合物分解性微生物の存在割合は、無機微粒子担体に担持された微生物の 16S rRNA 遺伝子の所定の領域を増幅して増幅産物を得る工程と、増幅産物の塩基配列データを解析し、得られた塩基配列データを各塩基配列データ間の相同性に基づいて複数のグループに分け、それぞれのグループの塩基配列データを有する微生物を単一の種類とし、それぞれのグループの代表塩基配列データに基づき、対象化合物分解性微生物の種類を決定し、得られた塩基配列データの数に基づき、すべての微生物における対象化合物分解性微生物の存在割合を算出する工程と、を含む方法によって得られる。

[0033] 対象化合物分解性微生物の 16S rRNA 遺伝子は、例えば、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体から直接調製した DNA を用いることができる。DNA の調製方法は、当業者に周知の方法を用いることができ、例えば、市販されている DNA 抽出キット等を用いることができる。

[0034] 調製した DNA に含まれる 16S rRNA 遺伝子の所定の領域を増幅し、得られる増幅産物を続く解析に用いる。16S rRNA 遺伝子には、遺伝子上に種間に共通な配列を含む保存領域、及び種・属等によって異なる配列を含む可変領域（V1-V9）が存在する。増幅させる領域は、複数の種類の微生物由来の 16S rRNA 遺伝子を一度の増幅工程で得られること、及び、複数の種類の微生物が判別できることから、保存領域に挟まれた可変領域であることが好ましい。増幅させる領域としては、例えば、V3-V4 領域を含む範囲が挙げられる。増幅させる領域の塩基配列数としては、1

00～1500塩基が好ましく、300～800塩基がより好ましく、400～600塩基が更に好ましい。増幅させる領域がこのような長さであれば、解析の際に、複数の種類の微生物を分類するのに、十分な信頼性を得られる傾向にある。

[0035] 16S rRNA遺伝子の所定の領域を増幅させる方法としては、特に制限されるものではなく、当業者に周知の方法を用いることができる。このような方法としては、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR法）が挙げられる。

[0036] PCR法を用いて増幅する場合、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体に含まれる複数の微生物を検出するという観点から、用いるプライマーは、フォワードプライマー及びリバースプライマー共に、16S rRNA遺伝子の可変領域を挟む保存領域に対してストリンジントな条件でハイブリダイズするように設計されたユニバーサルプライマーであることが好ましい。

[0037] フォワードプライマー及びリバースプライマーは、16S rRNA遺伝子の保存領域に対してストリンジントな条件でハイブリダイズする塩基配列であるユニバーサルプライマー配列を有する。ユニバーサルプライマー配列の長さとしては、15～40塩基が好ましく、15～30塩基がより好ましく、15～25塩基が更に好ましい。

[0038] 本明細書において、「ストリンジントな条件」とは、標的配列に対して相同性を有するヌクレオチド鎖の相補鎖が標的配列に優先的にハイブリダイズし、そして相同性を有さないヌクレオチド鎖の相補鎖が実質的にハイブリダイズしない条件を意味する。ストリンジントな条件は配列依存的であり、種々の状況で異なる。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジントな条件は、規定されたイオン強度及びpHでの特定の配列についての熱融解温度（ T_m ）より約5℃低く選択される。 T_m は、規定されたイオン強度、pH、及びDNA濃度下で、標的配列に相補的なヌクレオチドの50%が平衡状態で標的配列にハイブリダイズ

する温度である。

[0039] 増幅産物の塩基配列を解析する方法としては、例えば、シーケンサーによるシーケンス解析が挙げられる。シーケンサーとしては、16S rRNA遺伝子の所定の領域を増幅させた増幅産物（アンプリコン）を分離することなく、複数種の微生物を同時に、且つ、網羅的に解析できるという観点から、次世代型シーケンサーが好ましく、例えば、GS FLX+ System（ロシュ社製）、MiSeq（イルミナ社製）等が挙げられる。

[0040] シーケンサーにGS FLX+ System（ロシュ社製）を用いる場合、ユニバーサルプライマーは、ユニバーサルプライマー配列の他に、特定の配列を有していてもよい。例えば、フォワードプライマーは、5'末端から、シーケンス解析での配列決定に必要なアダプター配列、各検体に固有のバーコード配列、ユニバーサルプライマー配列となるように設計され、リバースプライマーは、5'末端から、シーケンス解析での配列決定に必要なアダプター配列、ユニバーサルプライマー配列となるように設計される。バーコード配列とは、検体間の識別に利用するもので、同時にシーケンサーに供する検体数に対応した任意に設計した塩基配列である。このようなバーコード配列を有するプライマーを用いることで、1回のシーケンス解析で多数の検体を解析することができる。アダプター配列及びバーコード配列は、メーカー指定のものを用いることができる。バーコード配列の長さは、塩基配列解析に用いる検体数に応じて設計することができ、例えば、8～15塩基とすることができる。

[0041] 以下、GS FLX+ Systemにより得られた塩基配列データの解析方法を説明するが、本発明は、これに限定されるものではない。

[0042] シーケンス解析により得られた塩基配列データは、塩基配列データに含まれる検体固有のバーコード配列に基づき、各配列をそれぞれの固有の検体に分けられる。分けられた塩基配列データを、更に、塩基配列データの配列長、ユニバーサルプライマー配列とミスマッチする塩基数、シーケンサーに付属するクオリティプログラムにより算出される配列決定した塩基配列デ

ータの平均クオリティ値等により選別し、高精度な塩基配列データとする。

[0043] 得られた高精度な塩基配列データを、OTU (Operational Taxonomic Unit) 解析により、塩基配列データ間の相同性に基づいて複数のグループに分ける。同じグループに分けるための塩基配列データ間の相同性は、要求される信頼性に応じて設定することができ、95%以上であってもよく、97%以上であってもよく、99%以上であってもよい。OTU解析を行うためのソフトウェアとしては、例えば、Uclust (http://drive5.com/usearch/manual/ucrust_algo.html)、UPARSE (http://drive5.com/usearch/manual/uparse_pipeline.html)、USEARCH (<http://www.drive5.com/usearch>) 等が挙げられる。

[0044] OTU解析の結果において、同じグループの塩基配列データを有する微生物は単一の種類の微生物である。ここでいう「種類」とは、分類学上の科、属、種を含むものである。それぞれのグループの代表塩基配列データをDDBJ、GenBank、RDP、Greengenes等のデータベースで相同性検索し、最も相同性の高い塩基配列データを有する微生物を、代表塩基配列データを有する微生物だと特定する。これにより、決定された代表塩基配列データが含まれるグループの微生物の種類を特定することができる。それぞれのグループの微生物の種類を特定したら、データベース等の情報に基づき、どのグループの微生物が対象化合物分解性微生物であるかを決定することができる。本明細書において、代表塩基配列データとは、各グループに属するいずれの塩基配列データとも閾値以上の相同性を示す塩基配列データのことを示す。

[0045] OTU解析の結果において、グループの数は、検出可能な範囲において、その微生物叢を構成する微生物の種類の数と同じと考えることができる。各グループに分けられた塩基配列データの数からは、得られた塩基配列データ数全体における割合、つまり微生物叢全体に占めるそのグループの微生物種の存在割合を求めることができる。上記の方法により、代表塩基配列データから対象化合物分解性微生物のグループを決定することで、その存在割合を

算出することができる。

[0046] <化合物分解方法>

本実施形態の微生物製剤は、対象化合物の分解に利用することができる。対象化合物の分解方法としては、例えば、対象化合物を含む廃液等に対し、本実施形態の微生物製剤を添加し、攪拌する方法が挙げられる。このとき、添加する微生物製剤の量は、対象化合物の種類、反応槽の容量、微生物製剤に担持されている対象化合物分解性微生物の存在割合等により、適宜設定することができる。

[0047] <微生物製剤の評価方法>

本実施形態の微生物製剤の評価方法は、対象化合物分解性微生物の存在割合を指標として微生物製剤を評価する工程を備える。対象化合物分解性微生物の存在割合は、上述した方法を用いることができる。

[0048] 本実施形態の評価方法に用いられる微生物製剤としては、例えば、製造後保存されている微生物製剤が挙げられる。

[0049] 微生物製剤の評価は、微生物製剤に含まれる微生物における対象化合物分解性微生物の存在割合を算出することで行われる。評価方法としては、例えば、製造直後の微生物製剤及び保存中の微生物製剤に含まれる対象化合物分解性微生物の存在割合を比較し、保存中の微生物製剤に含まれる対象化合物分解性微生物の存在割合が減少している場合、保存中の微生物製剤の分解活性が低下していると判定することができる。

実施例

[0050] [実施例 1]

(材料)

培地の製造に用いる成分の濃縮液を以下に示す方法で調製した。(NH₄)₂SO₄ 35.4 gとNa₂HPO₄ 7.7 gを純水 500 mLに溶解して、アンモニア態窒素15000 mg/Lの窒素リン溶液とした。KCl 110 gとCaCl₂・2H₂O 50 gとCoCl₂ 1 mgを純水 1000 mLに溶解して、無機塩溶液1とした。NaMoO₄・2H₂O 5 mgを

純水 1000 mL に溶解して無機塩溶液 2 とした。 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 85 g と $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.5 g と $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2 g と ZnSO_4 100 mg と $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100 mg を純水 1000 mL に溶解して無機塩溶液 3 とした。培養中に供給する培地は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2 g と Na_2HPO_4 1.54 g を純水 1000 mL に溶解し、無機塩溶液 1 1 mL、無機塩溶液 2 1 mL、無機塩溶液 3 1 mL を加えることにより製造した。培地は、培養期間中に継続して供給するため、適宜、必要量を製造した。活性汚泥懸濁液は、化学工場の曝気槽から活性汚泥を採取して、活性汚泥濃度が 5000 mg-MLSS/L となるように純水を用いて調整した。MLSS とは、浮遊固形物 (Mixed liquor Volatile Suspended Solid) のことである。MLSS は、下水試験方法 上巻 — 2012 年度版 — 公益社団法人日本下水道協会著に記載の方法に従って測定した。無機微粒子担体分散液は、純水 800 mL にフライアッシュ 500 g を加えて混合した懸濁液と、スミフロック FA-40H (MT アクアポリマー社製) 60 g を純水 600 mL に溶解した液を混合して製造した。

[0051] (微生物製剤の製造)

曝気部と固液分離を行うための沈降部とを備えるエアリフト型連続反応槽を用いて、微生物製剤の製造を行った。反応槽に活性汚泥懸濁液 10 L、窒素リン溶液 10 mL、無機塩溶液 1 10 mL、無機塩溶液 2 10 mL、無機塩溶液 3 10 mL、無機微粒子担体分散液 1.4 L を加え、エアリフトにより攪拌し、培養を行った。これらを混合した培地は、10 質量% H_3PO_4 溶液及び 10 質量% Na_2CO_3 溶液を用いて、pH 7.5 付近に制御した。水温は 25°C に制御した。以下、反応槽中の培地を培養液という。

[0052] 培養開始後、培養液中のアンモニア態窒素の濃度を測定し、アンモニア態窒素がなくなったら、供給用培地の供給を開始した。培養液中のアンモニア態窒素濃度及び培地の流速は、培養液中のアンモニア濃度、亜硝酸濃度、硝酸濃度、及び硝化細菌の存在割合の測定結果に応じて、硝化細菌の増殖阻害

が起こらないように調整し、培養液中のアンモニア態窒素濃度が徐々に高くなるようにした。

[0053] 培養後36日目の培養液を、反応槽の曝気部から回収し、これを硝化細菌が高密度化された微生物製剤とした。

[0054] (アンモニア態窒素の測定)

反応槽の沈降部から活性汚泥が沈降分離された培養液を回収し、これを孔径0.45 μm、直径25 mmのシリンジフィルター（アドバンテック社製）でろ過し、アンモニア態窒素検出キット及び分光光度計スペクトロクワントNOVA60（メルクミリポア社製）を用いて測定した。

[0055] (アンモニア態窒素除去率の算出)

反応槽の沈降部から活性汚泥が沈降分離された培養液を回収した時点における、培養液中に含まれるアンモニア態窒素濃度及び供給用培地に含まれるアンモニア態窒素濃度から、アンモニア態窒素除去率を算出した。

[数1]

$$\text{アンモニア態窒素除去率(\%)} = \left[1 - \frac{\text{培養液中のアンモニア態窒素濃度 (mg-N/L)}}{\text{供給用培地中のアンモニア態窒素濃度 (mg-N/L)}} \right] \times 100$$

[0056] (窒素処理能力の算出)

反応槽の沈降部から活性汚泥が沈降分離された培養液を回収した時点における、培地中に含まれるアンモニア態窒素濃度、供給用培地に含まれるアンモニア態窒素濃度、供給用培地の流量及び反応槽曝気部の培養液容量から、窒素処理能力を算出した。

[数2]

$$\text{窒素処理能力 (mg-N/L·hr)} = \frac{\text{供給用培地中のアンモニア態窒素濃度 (mg-N/L)} - \text{培養液中のアンモニア態窒素濃度 (mg-N/L)}}{\text{反応槽曝気部の培養液容量 (mL)} / \text{供給用培地の流量 (mL/分)} / 60 \text{分}}$$

[0057] (微生物の種類の決定及びそれぞれの微生物の存在割合の算出)

・DNAの調製

硝化細菌の検出及びその存在割合の算出は、培養中の無機微粒子担体に活性汚泥が固着した対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体を回収し、そこに含まれる微生物の16S rRNA遺伝子を用いた塩基配列デー

タに基づいて求めた。対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体中の微生物のDNAは以下の方法で調製した。

[0058] 対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体を含む培地 1.5 mL を回収し、室温で遠心分離 (13000 rpm、5 分間) した。上清を除いた後、滅菌生理食塩水を 1 mL 加えて、5 秒間ほど転倒混合し、室温で遠心分離 (13000 rpm、5 分間) した。上清を除いた後、Lysis buffer (エイムアル社製) を 300 μ L 加え、よく混合した。この懸濁液をビーズの入ったチューブ (イージーエクストラクト for DNA (エイムアル社製)) に添加後、ボルテックスミキサーで 2 分間攪拌破碎した。破碎液に 300 μ L の TE 溶液 (10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.0) (以下、TE 溶液という。) を添加し、4 $^{\circ}$ C で遠心分離 (13000 rpm、5 分間) した。その後、上清液 450 μ L を新しいチューブに入れ、これに 600 μ L のフェノール混溶液 (イージーエクストラクト for DNA に付属のもの (エイムアル社製)) を加え、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した後、4 $^{\circ}$ C で遠心分離 (13000 rpm、5 分間) した。上清 300 μ L を回収して新しいチューブ (1.5 mL) に移し、これに 1200 μ L のエタノール (99.5%) を加えて、4 $^{\circ}$ C で遠心分離 (13000 rpm、5 分間) した。上清を除いた後、チューブに 1000 μ L の冷エタノール (70%) を加えて、4 $^{\circ}$ C で遠心分離 (13000 rpm、5 分間) し、得られた DNA ペレットを真空乾燥した。乾燥した DNA ペレットに 150 μ L の TE 溶液を加えたものを、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体中の微生物の DNA 溶液とした。

[0059] ・16S rRNA 遺伝子の増幅

調製した DNA 溶液中の二本鎖 DNA 濃度を測定し、その測定値に基づいて計算した 50 ng の DNA を鋳型として、ユニバーサルプライマーセット (フォワードプライマー及びリバースプライマー) を用いて、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を PCR 増幅した。PCR はタカラバイオ社製の「Premix Ex Taq Hot Start Version」

(登録商標)を用いて、各プライマーを50 pmol含む反応液50 μ Lを調製し、94℃で2分間のプレヒーティングを行った後、変性、アニーリング、伸長をそれぞれ98℃×10秒間、50℃×30秒間、72℃×80秒間で行い、これを25サイクル繰り返した。ユニバーサルプライマーセットを用いたPCRにより、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体に含まれる各種微生物のDNA断片(約570 bp)を増幅した。

[0060] フォワードプライマーには、5'末端側から、配列番号1に記載の塩基配列からなるアダプターA配列、10塩基からなるバーコード配列、配列番号2に記載の塩基配列からなるユニバーサルプライマー配列を有するものを用いた。リバープライマーには、5'末端側から、配列番号3に記載の塩基配列からなるアダプターB配列、配列番号4に記載の塩基配列からなるユニバーサルプライマー配列を有するものを用いた。

[0061] ・シーケンス解析

増幅したPCR産物を、DNAクリーナー(和光純薬社製)で処理し、DNAを精製した。精製DNAは200 μ LのTE溶液で溶出・回収した。回収した精製DNA溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、約570 bpの位置に検出されるバンドをゲルごと切り出した。切り出したゲルからMinElute Gel Extraction Kit(キアゲン社製)を用いてDNAを抽出し、これをシーケンサーに供するシーケンス用サンプルとした。

[0062] 上記シーケンス用サンプルを、GS FLX+ Systemシーケンサー(ロシュ社製)に供し、シーケンス解析を行った。シーケンスの条件・工程等はメーカー所定のプロトコールに従った。得られた各塩基配列のデータについては、各塩基配列データに含まれるサンプル固有のバーコード配列に基づき、各塩基配列データをそれぞれの固有のサンプルに分類した。その後、塩基配列データの配列長200塩基未満、1000塩基以上、ユニバーサルプライマー配列(フォワードプライマー)とのミスマッチ1塩基以上、及びシーケンサーに付属のクオリティプログラムを用いて決定される

配列決定した塩基配列データの平均クオリティ値が25以下の配列データを除去することにより、高精度塩基配列データを抽出した。

[0063] ・O T U解析

上記高精度塩基配列データを、O T U解析に供した。O T U解析では、95%以上の相同性を有する各配列データ同士を同じグループに分類し、複数のグループを形成した。O T U解析は、U c l u s tを用いて行った。O T U解析により得られた情報から、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体に含まれる微生物の種類の決定及びそれぞれの微生物の存在割合の算出を行った。

[0064] (結果)

対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体を各日数培養した後のアンモニア態窒素除去率、窒素処理能力及び対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体に含まれる硝化細菌（アンモニア酸化細菌（N i t r o s o m o n a s 属）、亜硝酸酸化細菌（N i t r o b a c t e r 属、N i t r o s p i r a 属））の存在割合をまとめたものを表1に示す。培養中の対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体に含まれる微生物の遺伝子解析情報によって、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体中に含まれる硝化細菌の存在割合の変化を経時的に測定することができた。また、各種硝化細菌の増加に伴い、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体の窒素処理能力が増加していることも示された。

[0065] [表1]

培養日数(日)	アンモニア態窒素 除去率(%)	窒素処理能力 (mg-N/L・hr)	微生物存在割合(%)		
			Nitrosomonas属	Nitrobacter属	Nitrospira属
0	-	-	<0.1	0.3	<0.1
8	81.8	3.9	<0.1	0.4	0.2
15	99.6	11.3	<0.1	0.1	0.6
29	100	30.4	18.9	5.9	6.9
36	100	42.8	26.8	8.2	5.6

[0066] [実施例2]

(材料)

培地の製造に用いる成分の濃縮液を以下に示す方法で調製した。M g S O₄

・ 7 H₂O 100 g を純水 1000 mL に溶解して、無機塩溶液 A とした。
 。 Na₂HPO₄ 4.152 g と NaH₂PO₄ 2.244 g と (NH₄)₂SO₄ 1.2 g を純水 300 mL に溶解して、無機塩溶液 B とした。(S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 3 - メチルブタン酸 (純度約 85 質量%) 1.18 g を純水 100 mL に溶解した (S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 3 - メチルブタン酸溶液 (10 g / L) を用いた。無機微粒子担体分散液は、純水 250 mL に活性汚泥焼却灰 50 g を加えて混合、懸濁させて製造した。活性汚泥懸濁液は、化学工場の曝気槽から活性汚泥を採取したものをそのまま用いた。培養中に供給する培地は、(NH₄)₂SO₄ 1.0 g と Na₂HPO₄ 1.3 g と NaH₂PO₄ 0.9 g を純水 1000 mL に溶解し、(S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 3 - メチルブタン酸溶液 4.0 mL、及び無機塩溶液 1 1 mL、無機塩溶液 2 1 mL、無機塩溶液 3 1 mL を加えることにより製造した。培地は、培養期間中に継続して供給するため、適宜、必要量を製造した。その他、培養開始時に用いる炭素源として、メタノールと水を 7 : 3 (v / v) 程度の割合で含む工場由来副生油を用いた。

[0067] (微生物製剤の製造)

曝気部（容量 1 L）及び沈降部（容量 0.4 L）を備えるエアリフト型連続反応槽を用いて、微生物製剤の製造を行った。反応槽に、活性汚泥懸濁液 570 mL と無機塩溶液 A 4.9 mL と無機塩溶液 B 300 mL と工場由来副生油 13.2 μ L と (S)-2-(4-クロロフェニル)-3-メチルブタン酸溶液 9.876 mL と無機微粒子担体分散液と 250 mL、純水 70 mL を加え、培地を調製した。この培地をエアリフトにより攪拌し、培養を行った。培地は、10 質量% Na_2CO_3 溶液を用いて、pH 6.9 付近に制御した。水温は 25 $^{\circ}\text{C}$ に制御した。以下、反応槽中の培地を培養液という。

[0068] 培養開始後、培養液中の (S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 3 - メチ
ルブタン酸濃度を測定し、(S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 3 - メチ

ルブタン酸の濃度の顕著な減少が認められたら、(S)-2-(4-クロロフェニル)-3-メチルブタン酸を所定の濃度含有する培地を連続的に供給して連続培養を行った。追加する培地に含まれる塩類は(S)-2-(4-クロロフェニル)-3-メチルブタン酸添加量に応じて増加させた。培養中の対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体に含まれる微生物の変遷を把握するため、随時、培養中の対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体に含まれる微生物のDNA抽出を行った。

[0069] ((S)-2-(4-クロロフェニル)-3-メチルブタン酸濃度の測定)

培地中の(S)-2-(4-クロロフェニル)-3-メチルブタン酸濃度は、培地を下記の条件でHPLCに供することで算出した。

・装置：LC-10A（島津製作所社製）

・カラム：SUMIPAX ODS A-211 4.6mm×250mm、5 μ （住化分析センター社製）

溶媒：A液 0.01% TFA水溶液、B液 アセトニトリル、A液：B液＝4：6

流速：1.0mL／分

オーブン温度：40℃

検出器：UV 220nm

サンプル注入量：10 μ L

[0070] ((S)-2-(4-クロロフェニル)-3-メチルブタン酸除去率の算出)

反応槽の沈降部から活性污泥が沈降分離された培養液を回収した時点での、培養液に含まれる(S)-2-(4-クロロフェニル)-3-メチルブタン酸濃度、供給用培地に含まれる(S)-2-(4-クロロフェニル)-3-メチルブタン酸濃度から、(S)-2-(4-クロロフェニル)-3-メチルブタン酸除去率を算出した。

[数3]

$$(S)\text{-}2\text{-(}4\text{-クロロフェニル)}\text{-}3\text{-メチルブタン酸除去率}(\%) = \left[1 - \frac{\text{培養液中の}(S)\text{-}2\text{-(}4\text{-クロロフェニル)}\text{-}3\text{-メチルブタン酸濃度}(\text{mg/L})}{\text{供給用培地中の}(S)\text{-}2\text{-(}4\text{-クロロフェニル)}\text{-}3\text{-メチルブタン酸濃度}(\text{mg/L})} \right] \times 100$$

[0071] ((S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 3 - メチルブタン酸処理能力の算出)

反応槽の沈降部から活性汚泥が沈降分離された培養液を回収した時点での、培地中に含まれる (S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 3 - メチルブタン酸濃度、供給用培地に含まれる (S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 3 - メチルブタン酸濃度、供給用培地の流量、反応槽曝気部の培養液容量から、(S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 3 - メチルブタン酸処理能力を算出した。

[数4]

$$\frac{(\text{S}) - 2 - (4 - \text{クロロフェニル}) - 3 - \text{メチルブタン酸処理能力} (\text{mg/L} \cdot \text{hr}) = \frac{\text{供給用培地中の} (\text{S}) - 2 - (4 - \text{クロロフェニル}) - 3 - \text{メチルブタン酸濃度} (\text{mg/L}) - \text{培養液中の} (\text{S}) - 2 - (4 - \text{クロロフェニル}) - 3 - \text{メチルブタン酸濃度} (\text{mg/L})}{\text{反応槽曝気部の培養液容量} (\text{mL}) / \text{供給用培地の流量} (\text{mL/分}) / 60 \text{分}}$$

[0072] (微生物の種類決定及びそれぞれの微生物の存在割合の算出)

(S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 3 - メチルブタン酸分解菌の検出及びその存在割合の算出は、培養中の無機微粒子担体に活性汚泥が固着した対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体を回収し、そのDNAを用いた遺伝子解析情報に基づいて求めた。対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体中の微生物の遺伝子解析情報は実施例1と同様の方法で得た。

[0073] (結果)

対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体を各日数培養した後の (S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 3 - メチルブタン酸除去率、(S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 3 - メチルブタン酸処理能力及び対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体に含まれる (S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 3 - メチルブタン酸分解性菌 (*Sphingomonadaceae* 科) の存在割合をまとめたものを表2に示す。培養中の対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体に含まれる微生物の遺伝子解析情報によって、(S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 3 - メチルブタン酸分解性菌の存在割合の変化を経時的に測定することができた。また、Sph

ngomonadaceae科細菌の増加に伴い、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体の（S）－2－（4－クロロフェニル）－3－メチルブタン酸処理能力が増加していることも示された。

[0074] [表2]

培養日数(日)	(S)－2－(4－クロロフェニル)－3－メチルブタン酸除去率(%)	(S)－2－(4－クロロフェニル)－3－メチルブタン酸処理能力(mg/L・hr)	微生物存在割合(%)
			Sphingomonadaceae科
0	－	－	0.1
9	100	3.7	11.3
27	100	1.3	9.8
41	100	7.8	12.4

[0075] [実施例3]

培地の製造に用いる無機塩溶液は、実施例1と同じ、無機塩溶液1、無機塩溶液2、無機塩溶液3とした。（S）－2－（4－クロロフェニル）－3－メチルブタン酸溶液は、実施例2と同じものを用いた。流入水は、（S）－2－（4－クロロフェニル）－3－メチルブタン酸溶液1 mL、（NH₄）₂SO₄ 1 g、Na₂HPO₄ 1.298 g、NaH₂PO₄ 0.912 gを純水 1000 mLに溶解し、無機塩溶液1 1 mL、無機塩溶液2 1 mL、無機塩溶液3 1 mLを加えることにより製造した。流入水は、（S）－2－（4－クロロフェニル）－3－メチルブタン酸除去反応期間中に継続して供給するため、適宜、必要量を製造した。活性汚泥懸濁液は、化学工場の曝気槽から活性汚泥を採取したものをそのまま用いた。

[0076] （（S）－2－（4－クロロフェニル）－3－メチルブタン酸除去反応）

曝気部（容量3 L）及び沈降部（容量1 L）を備えるエアリフト型連続反応槽を用いて、（S）－2－（4－クロロフェニル）－3－メチルブタン酸除去反応を行った。（S）－2－（4－クロロフェニル）－3－メチルブタン酸除去反応は、（S）－2－（4－クロロフェニル）－3－メチルブタン酸分解性微生物製剤が無い条件（A系列）と有る条件（B系列）の2種類の条件で行った。反応槽に流入水を加え、活性汚泥懸濁液を加え、活性汚泥濃度が2408 mg－MLSS/Lとなるように調整し、培養液とした。MLSSとは、浮遊固形物（Mixed Liquor Volatile Su

s p e n d e d S o l i d) のことである。B系列にのみ、更に上清を遠心分離により取り除いた実施例2で製造した、培養後54日目の(S)－2－(4－クロロフェニル)－3－メチルブタン酸分解性微生物製剤を459 mL分加え、培養液とした。A系列及びB系列の培養液を攪拌し、反応を開始した。流入水は1 mL／分の速度で加えた。流入水は、10質量% Na_2CO_3 溶液を用いて、pH 7付近に制御した。水温は25℃に制御した。微生物製剤中の微生物の遺伝子解析情報は実施例1と同様の方法で得た。

(S)－2－(4－クロロフェニル)－3－メチルブタン酸除去率及び(S)－2－(4－クロロフェニル)－3－メチルブタン酸分解性微生物の測定は、実施例2に記載の方法と同様にして行った。

[0077] (結果)

A系列及びB系列における、流入水の(S)－2－(4－クロロフェニル)－3－メチルブタン酸除去率及び(S)－2－(4－クロロフェニル)－3－メチルブタン酸分解性微生物の割合をまとめたものを、表3に示す。B系列では、反応開始時から(S)－2－(4－クロロフェニル)－3－メチルブタン酸分解性微生物製剤を加えているため、4.6日目の時点から(S)－2－(4－クロロフェニル)－3－メチルブタン酸分解性微生物の割合が高く、(S)－2－(4－クロロフェニル)－3－メチルブタン酸除去率も高かった。一方、A系列ではB系列に比べ、(S)－2－(4－クロロフェニル)－3－メチルブタン酸分解性微生物の割合の上昇が遅く、(S)－2－(4－クロロフェニル)－3－メチルブタン酸除去率も低かった。

[0078] [表3]

培養日数(日)	A系列(微生物製剤無し)		B系列(微生物製剤有り)	
	(S)－2－(4－クロロフェニル)－3－メチルブタン酸除去率(%)	微生物存在割合(%)	(S)－2－(4－クロロフェニル)－3－メチルブタン酸除去率(%)	微生物存在割合(%)
		Sphingomonadaceae科		Sphingomonadaceae科
4.6	15.3	0.3	100	8.4
5.6	24.2	3.2	100	9.1
6	60.9	8.6	100	7.8
6.6	90.2	9.7	100	7.7

符号の説明

[0079] 1…培養槽、2…曝気部分、3…隔壁、4…整流板、5…沈降部分、6…ス

ロープ、 7 …散気装置、 8 …空気又は高酸素分圧ガス、 9 …流入水、 10 …
排出口、 11 …処理水、 100 …反応槽

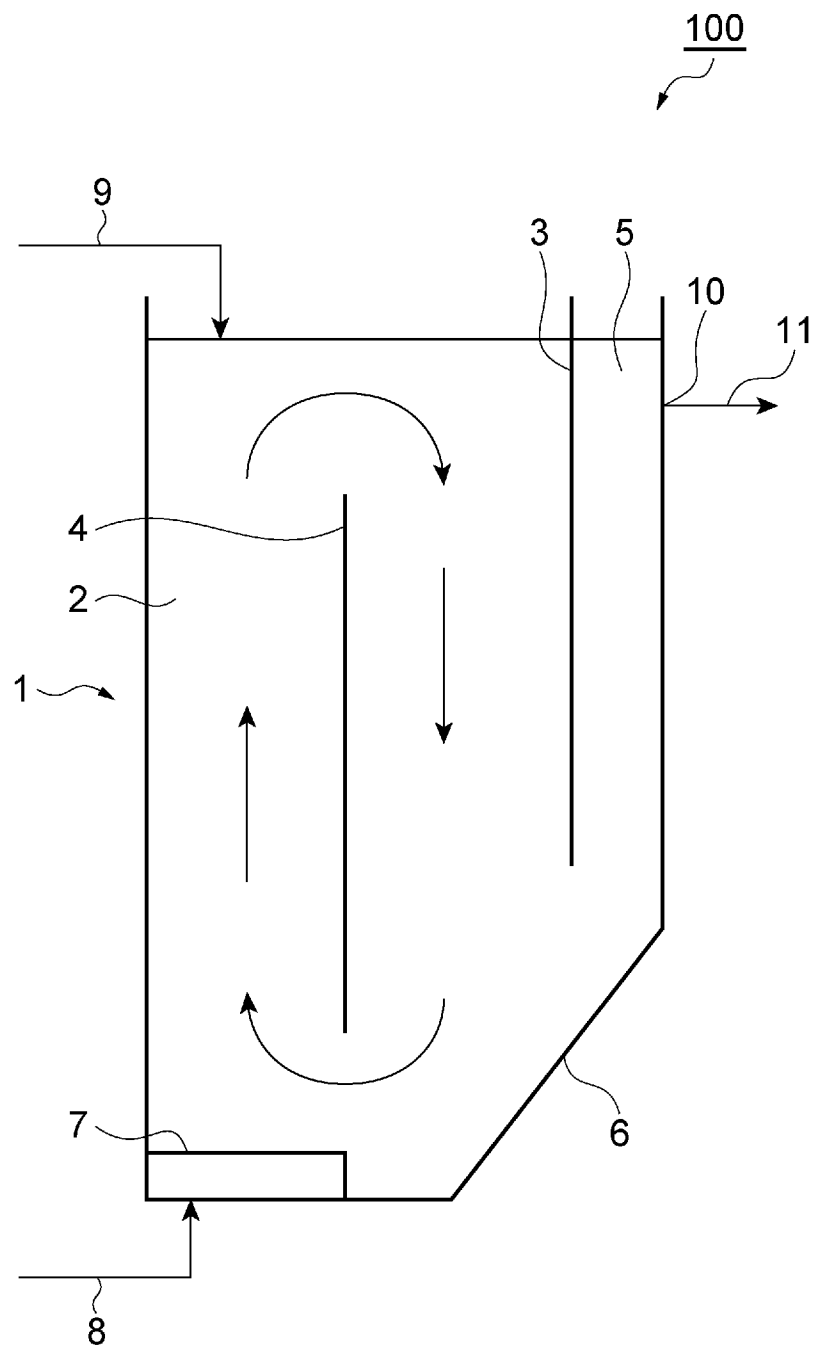
請求の範囲

- [請求項1] 対象化合物分解性微生物を担持する微生物製剤の製造方法であって、
- 、
- 対象化合物を含む培地中で、前記対象化合物分解性微生物を含むバイオマスと、無機微粒子担体とを添加し、前記バイオマスに含まれる微生物を前記無機微粒子に担持させ、前記無機微粒子担体に担持された微生物における対象化合物分解性微生物の存在割合を監視しながら、培養する工程と、
- 対象化合物分解性微生物の存在割合が所定の値に到達した後、対象化合物分解性微生物を担持した無機微粒子担体を回収し、微生物製剤を得る工程と、
- を備え、
- 前記対象化合物分解性微生物の存在割合が、
- 前記無機微粒子担体に担持された微生物の 16S rRNA 遺伝子の所定の領域を増幅して増幅産物を得る工程と、
- 前記増幅産物の塩基配列データを解析し、得られた塩基配列データを各塩基配列データ間の相同性に基づいて複数のグループに分け、それぞれのグループの塩基配列データを有する微生物を単一の種類とし、それぞれのグループの代表塩基配列データに基づき、対象化合物分解性微生物の種類を決定し、得られた塩基配列データの数に基づき、すべての微生物における対象化合物分解性微生物の存在割合を算出する工程と、
- を含む方法によって得られる、製造方法。
- [請求項2] 前記対象化合物が（S）－2－（4－クロロフェニル）－3－メチルブタン酸である、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項3] 前記対象化合物がアンモニアである、請求項1に記載の製造方法。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか一項に記載の製造方法により製造された、微生物製剤。

[請求項5] 請求項4に記載の微生物製剤を用いた、化合物分解方法。

[請求項6] 請求項4に記載の微生物製剤の評価方法であって、
前記微生物製剤に含まれる微生物における対象化合物分解性微生物の存在割合を指標として前記微生物製剤を評価する工程を備え、
前記対象化合物分解性微生物の存在割合が、
前記微生物製剤に含まれる微生物の16S rRNA遺伝子の所定の領域を増幅して増幅産物を得る工程と、
前記増幅産物の塩基配列データを解析し、得られた塩基配列データを各塩基配列データ間の相同性に基づいて複数のグループに分け、それぞれのグループの塩基配列データを有する微生物を単一の種類とし、それぞれのグループの代表塩基配列データに基づき、対象化合物分解性微生物の種類を決定し、得られた塩基配列データの数に基づき、すべての微生物における対象化合物分解性微生物の存在割合を算出する工程と、
を含む方法によって得られる、評価方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/060772

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N11/14(2006.01)i, C02F3/00(2006.01)i, C02F3/34(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N11/14, C02F3/00, C02F3/34, C12N1/20, C12N15/09, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2003-274937 A (Sumitomo Chemical Co., Ltd.), 30 September 2003 (30.09.2003), claims; paragraphs [0017], [0029]; examples (Family: none)	4, 5/1-6
X/Y	Yosuke NAKAMURA et al., "Development of Microorganism Formulation for Bioaugmentation", Sumitomo Kagaku Gijutsushi 2003-II, 28 November 2003 (28.11.2003), pages 19 to 25, ISSN: 0387- 1312, page 19, paragraph of 'Introduction', pages 21 to 22, paragraph of 'Shoka Saikin Seizai no Seibutsugaku-teki Kaiseki', page 21, left column, lines 8 to 29, page 21, right column, lines 2 to 8	4, 5/1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 June 2016 (20.06.16)

Date of mailing of the international search report
28 June 2016 (28.06.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/060772

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KRAIGHER, B. et al., Nitrification activity and community structure of nitrite-oxidizing bacteria in the bioreactors operated with addition of pharmaceuticals, Journal of Hazardous Materials (2011) Vol.188, pp.78-84, ISSN: 0304-3894 page 78, paragraph of 'abstract', page 79, right column, paragraph of '2.2', page 80, fig. 2, page 81, fig. 3, table 1, page 82, fig. 4	1-6
Y	JP 59-088098 A (Suntory Ltd.), 21 May 1984 (21.05.1984), page 1, lower right column, lines 3 to 10 (Family: none)	1-6
Y	BELLUCCI, M. et al., Chapter Eleven Ammonia-oxidizing bacteria in wastewater, Methods in Enzymology (2011) Vol.496, pp.269-286, ISSN: 0076-6879 pages 269 to 270, paragraph of 'abstract', pages 272 to 273, paragraph of '4.'	1-6
Y	JP 2008-142704 A (Kobelco Eco-Solutions Co., Ltd.), 26 June 2008 (26.06.2008), claims; paragraphs [0083], [0084]; example 1 (Family: none)	1-6
Y	JP 2002-282826 A (Mitsubishi Heavy Industries, Ltd.), 02 October 2002 (02.10.2002), claims; paragraphs [0023] to [0028], [0035] (Family: none)	1-6
Y	JP 2008-212083 A (Kyoto University), 18 September 2008 (18.09.2008), claims; example 2 (Family: none)	1-6
Y	JP 2007-268471 A (Ebara Corp.), 18 October 2007 (18.10.2007), claims; examples 2 to 5-5 (Family: none)	1-6
Y	JP 2010-531640 A (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization), 30 September 2010 (30.09.2010), claims; paragraph [0080]; examples 1 to 7 & US 2010/0279380 A1 claims; paragraph [0104]; examples 1 to 7 & EP 2170082 A1 & WO 2009/003222 A1	2, 4-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/060772

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 06-153989 A (Meidensha Corp.), 03 June 1994 (03.06.1994), claims; example 3; paragraphs [0003], [0004] (Family: none)	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N11/14(2006.01)i, C02F3/00(2006.01)i, C02F3/34(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i,
C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N11/14, C02F3/00, C02F3/34, C12N1/20, C12N15/09, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	JP 2003-274937 A (住友化学工業株式会社), 2003.09.30, 特許請求の範囲, 【0017】, 【0029】, 実施例 (ファミリーなし)	4, 5/ 1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- | | |
|--|---|
| 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの | 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの |
| 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの | 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの |
| 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) | 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | 「&」 同一パテントファミリー文献 |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | |

国際調査を完了した日

20.06.2016

国際調査報告の発送日

28.06.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

5802

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	中村洋介, 外 1 名 バイオオーグメンテーション用微生物製剤の開発, 住友化学 技術誌 2003-II, 2003 年 11 月 28 日, pp. 19-25, ISSN: 0387-1312 第 19 頁「はじめに」の項, 第 21 頁-22 頁「硝化細菌製剤の 生態学的解析」の項, 第 21 頁左欄第 8 行-29 行, 第 21 頁右欄第 2 行-8 行	4, 5/ 1-6
Y	KRAIGHER, B. et al., Nitrification activity and community structure of nitrite-oxidizing bacteria in the bioreactors operated with addition of pharmaceuticals, Journal of Hazardous Materials (2011) Vol.188, pp.78-84, ISSN: 0304-3894 第 78 頁「要約」の項, 第 79 頁右欄「2.2」項, 第 80 頁 図 2, 第 81 頁 図 3, 表 1, 第 82 頁 図 4	1-6
Y	JP 59-088098 A (サントリー株式会社), 1984.05.21, 第 1 頁右下欄第 3 行-10 行 (ファミリーなし)	1-6
Y	BELLUCCI, M. et al., Chapter Eleven Ammonia-oxidizing bacteria in wastewater, Methods in Enzymology (2011) Vol.496, pp.269-286, ISSN: 0076-6879 第 269 頁-270 頁「要約」の項, 第 272 頁-273 頁「4.」項	1-6
Y	JP 2008-142704 A (株式会社神鋼環境ソリューション), 2008.06.26, 特許請求の範囲, 【0083】, 【0084】, 実施例 1 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 2002-282826 A (三菱重工業株式会社), 2002.10.02, 特許請求の範囲, 【0023】-【0028】、【0035】 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 2008-212083 A (国立大学法人京都大学), 2008.09.18, 特許請求の範囲, 実施例 2 (ファミリーなし)	1-6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2007-268471 A (株式会社荏原製作所), 2007. 10. 18, 特許請求の範囲, 実施例 2 ～ 5 - 5 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 2010-531640 A (コモンウェルス サイエンティフィック アンド インダストリアル リサーチ オーガニゼーション), 2010. 09. 30, 特許請求の範囲, 【0080】, 実施例 1 - 7 & US 2010/0279380 A1, Claims, [0104], Example 1-7 & EP 2170082 A1 & WO 2009/003222 A1	2, 4-6
Y	JP 06-153989 A (株式会社明電舎), 1994. 06. 03, 特許請求の範囲, 実施例 3, 【0003】, 【0004】 (ファミリーなし)	1-6