

# 酢酸，都市下水および懸濁性有機物を添加した都市下水を処理する嫌気好気活性汚泥の微生物群集構造解析

李 美京<sup>1</sup>・中島典之<sup>2</sup>・古米弘明<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 工修 東京大学 大学院工学系研究科都市工学専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1)

E-mail : mkleee@env.t.u-tokyo.ac.jp

<sup>2</sup> 正会員 工博 東京大学講師 大学院工学系研究科 (〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1)

<sup>3</sup> 正会員 工博 東京大学教授 大学院工学系研究科 (〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1)

炭素源としてそれぞれ酢酸 (Run-A)，都市下水 (Run-S)，都市下水に下水由来の懸濁性有機物(POM) (Run-SP) を投入してリン除去が安定した 3 つの系を構築し，PCR-DGGE 法を用いてその微生物群集を解析した。Run-SP に投与した POM は，1 $\mu$ m ナイロンシートを用いて，下水処理場の最初沈殿池越流水から回収した。DGGE バンドパターンに基づいて微生物群集構造の違いを調べた結果，3 系列すべてに共通して存在するバンドが 3 本あり，Run-A および Run-SP のみの共通バンドが 1 本であった。Run-S および Run-SP のみの共通バンド 11 本を含めて，Run-S および Run-SP の共通バンドは 14 本であり，POM 添加により微生物群集構造が大きく変化することは観察されなかった。バンド C1 および A/SP の塩基配列を解読した結果，*Thiothrix* 近縁種および *Rhodocyclus* 近縁種であった。

**Key Words :** enhanced biological phosphorus removal, particulate organic matter, microbial community analysis, polyphosphate accumulating organisms, PCR-DGGE

## 1. はじめに

分子生物学的手法の開発・発展により，近年ポリリン酸を菌体内に蓄積する微生物 (リン蓄積細菌：Polyphosphate Accumulating Organisms (PAOs)) に関する新たな知見が蓄積されてきている。Bond ら<sup>1)</sup> はリン除去能が高い汚泥とリン除去能が低い汚泥を比べてリン除去能が高い汚泥から *Rhodocyclus* 属の近縁種が検出された結果を得た。さらに，Hesselmann ら<sup>2)</sup>，Crocetti ら<sup>3)</sup> は酢酸を主基質として培養したリアクターから，非常に大量の *Rhodocyclus* 属に近縁なグループを検出している。Zilles ら<sup>4)</sup> は，実規模の生物学的リン除去プロセス(EBPR) からも，*Rhodocyclus* 近縁種が重要な役割を担うという結果を報告している。このように，分子生物学的手法を用いることによって，PAOs の細菌種に関する様々な知見が得られつつある。また，藤田ら<sup>5)</sup> は都市下

水に酢酸とリン酸を添加した系でのリン除去活性汚泥について，DGGE バンド蛍光強度とリン除去活性の変化傾向の相関解析を行い，相関性の高いバンドには *Rhodocyclus* 属の近縁種はなく，明瞭な相関性を示したものとして *Thiothrix* 属に近縁のバンドを見いだしている。また，Mino ら<sup>6)</sup> は，現在のところ PAOs は単一種ではなく，複数の多様な微生物群がリン蓄積能を有している可能性もあることを指摘している。

このように，従来の生物学的リン除去に関する研究は，酢酸あるいはプロピオン酸などの人工下水を基質とした系におけるものが主であり，実験室レベルの人工下水における生物学的リン除去機構はある程度明らかになってきているが，遅分解基質である懸濁性有機物 (Particulate Organic Matter, 以下 POM と呼ぶ) を多く含んでいる実下水におけるリン除去特性とそれを担う微生物については十分に検討されていない。特に，リン除去に寄与する微生物群集の

解析という点では、進められてきた研究のほぼすべてが人工下水を用いた実験系における微生物群集を対象としており、実下水を用いてその群集構造とリン除去能の動的な変化を調べた例は限られている。

上述のように過去の実験は酢酸を使っている例が多いが実際の下水には様々な溶存性有機物や懸濁性有機物が含まれており、必ずしも酢酸基質により得られた知見が、そのまま都市下水処理場でリン除去機能を有している微生物群集の評価に適用できるとは限られない。そこで本研究では、都市下水と酢酸との基質の違いによる微生物群集構造の差異を分子生物学的手法により調べることを最終的な目標とし、以下のような二つの目的を設定した。

- 1) 都市下水の特徴の一つである POM を追加で添加した系との比較により、基質の違いがもたらす群集構造の違いを明らかにする。
- 2) DGGE バンドパターンから判断された各系列に特徴的なバンドおよび共通バンドの塩基配列を解読し、リン蓄積細菌として報告されている *Rhodocyclus* 近縁種の出現の有無を確認する。

## 2. 実験方法

### (1) SBR 運転条件

Fig.1 に示したように、1 サイクルが 360 分 (6 時間) になるように、嫌気 150 分 (流入 10 分)、好気 150 分 (汚泥引き抜き 15 分)、沈殿 45 分、排水 15

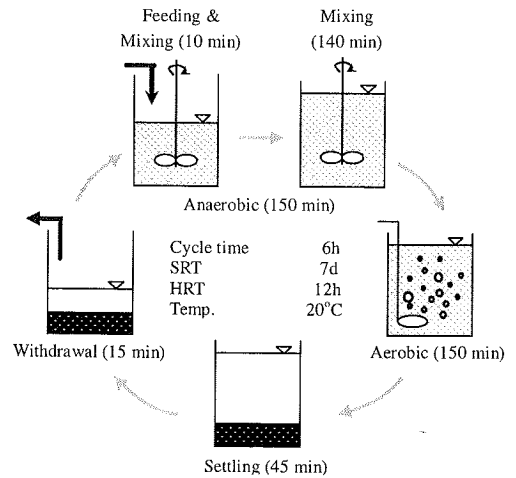


Fig.1 Schematic diagram of SBR operation

分の条件下で、6L (2 基) と 20L (1 基) の回分式リアクターを用いて 63 日間運転を行った。SRT=7 日、HRT=12 時間、水温は 20°C に制御した。炭素源の投与条件は Table 1 に示したとおりである。Run-A と Run-S は実験期間前から長期間、酢酸あるいは下水を投与して運転を継続していたものであり、Run-SP に対するリン除去能を安定させた対照系列として運転した。一方、Run-SP は Phase I、Phase II 及び Phase III において、下水由来の POM の投与量および流入下水量を変化させて、その応答を見る系列とした。Run-S および Run-SP は、同じ種汚泥、同じ下水を用いて 14 日間運転した時点を目と設

Table 1 Substrate conditions for reactor operation

Run-A (6L)		Run-S (20L)	Run-SP (6L)			
			Phase I (0-20 day)	Phase II (21-42 day)	Phase III (43-63 day)	
CH <sub>3</sub> COONa	113 mgC/L	Domestic sewage <sup>*1</sup>	Domestic sewage <sup>*1</sup>	No dilution		Two times dilution
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8 mgP/L		POM	30 mgC/L added	60 mgC/L added	
NH <sub>4</sub> Cl	35 mgN/L			4 mg/L		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	30 mg/L					
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	180 mg/L					
Nutrient solution <sup>*)</sup>	0.3 mg/L					
ATU <sup>**2</sup>	4 mg/L					

\*1 The average TOC and DOC of domestic sewage were 83 mgC/L and 38 mgC/L, respectively.

\*\*2 N-allylthiourea.

定し、Run-SP は Phase I に切り替えた。後で示す Fig.6a)の結果からも分かるように、Run-S と Run-SP の 0 日の DGGE バンドパターンには差異が認められないことから、リアクターサイズの微生物群集構造への影響は無視できると考えた。また、安定した微生物群集構造と得るために、各 Phase の長さは SRT の 3 倍を基準とした。なお、Run-A および Run-SP は硝化作用により生成される硝酸塩変動に伴うリン除去阻害を防止するためにアリルチオ尿素 (ATU) を添加した。

Run-SP に投与した POM は、ナイロンシート(1 $\mu$ m メッシュ)を用いて、下水処理場の最初沈殿池越流水から回収した。回収した POM は実験に用いるまでの間、-20 $^{\circ}$ C の冷凍庫で保管した。実験に際しては POM の醗酵や加水分解を防止するために、POM の貯蔵タンクを 5~6 $^{\circ}$ C に維持しながら流入下水と共に投与した。

## (2) 分析項目

全リン (リン含有率)、MLSS、MLVSS 分析は下水試験方法<sup>7)</sup>に従った。酢酸、リン酸、硝酸および亜硝酸はアニオンカラム (Dionex AS12A) を装備したイオンクロマトグラフ (DX-AQ, Dionex) で測定した。全有機炭素 (TOC) は TOC アナライザー (TOC-500, 島津製作所) によって測定した。

## (3) 微生物群集構造解析

実験期間における微生物群集構造の変化を調べる目的で、1 週間毎に汚泥を採取し、以下の手法により解析した。

### a) DNA 抽出

嫌気終了時の汚泥懸濁液をリアクターから 100mL を採取し、スターラを用いて均一に混合しながら約 3.5mgMLSS を採取した。採取した汚泥は 10000rpm で 5 分間遠心分離をして上澄みを除いたあと、TE buffer (10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH8.0) で洗浄し、冷凍保存した。DNA 抽出時に解凍し、FAST DNA spin kit for soil (Bio 101 Systems, Q-BIOgene, USA) を用いて付属のマニュアルにしたがって DNA 抽出を行った。抽出した DNA は -20 $^{\circ}$ C で保存した。

### b) PCR-DGGE 法

抽出した DNA は分光光度計により濃度を測定し、希釈により濃度を 50ng/ $\mu$ L に調整して PCR 法によ

る増幅に供した。PCR 法により、16SrDNA の 341-534(*E.coli* position) 領域 (V3 領域を含む領域) を増幅した。用いたプライマーは全細菌に特異的なプライマーである 357fGC: 5'GC クランプ-CCTAGG GAGGCAGCAG-3' と 518r: ATTACCGCGGCTGCTG G である。用いた GC クランプの配列は 5'-CGCCCC CCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGACGGGG GG-3' である。反応液は 50 $\mu$ L とし、反応液に加えた template 量は 1  $\mu$ L である。PCR サイクルは変性 94 $^{\circ}$ C 30 秒、伸長 72 $^{\circ}$ C 30 秒とした。サイクル数は 30 サイクルとした。Taq polymerase は Ampli-Taq Gold<sup>TM</sup> with Gene Amp (PE Applied Biosystems, USA)、サーマルサイクラーは PE Applied Biosystems 社 9600 (USA) および Biometra 社 T3 Thermocycler (Germany) を用いた。得られた PCR 産物は、20 $\mu$ L ずつ DGGE に供した。方法は主に Muzer ら<sup>9)</sup>の方法に従った。DGGE 法のグラジエントゲルの作成と泳動には、DCode<sup>TM</sup> Universal Mutation Detection system (BioRad, USA) を使用し、泳動条件は、130V、60 $^{\circ}$ C で 6 時間とした。変性剤濃度勾配は 35-60% とした。泳動後のゲルは<sup>TM</sup>Vistra Green (Amersham, USA) で 15 分間染色し、蛍光イメージアナライザー Fluor-Imager 596 (Molecular Dynamics, USA) で撮影した。

ゲル上のバンドの塩基配列を解読するため、カッターによりバンドを切り出し、滅菌 Milli-Q 水 50 $\mu$ L 中で凍結融解を 3 回繰り返すことで、バンド中の DNA を回収した。回収した DNA は、再び 357fGC プライマーと 518r プライマーを用いた PCR により増幅した。PCR 条件はサイクル数のみ 20 または 25 サイクルに減らし、その他の条件は上述の PCR と同じである。精製を繰り返し、目的のバンドが一本になった DNA を 357f と 518r プライマーを用いて 25 サイクルの PCR 法で再増幅し、以下の塩基配列解読に供した。

### c) 塩基配列解読

塩基配列解読は ABI310 (PE Applied Biosystems, USA) および Bioneer Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, USA) を用いてマニュアルに準拠して行った。解読した塩基配列に対して DDBJ (DNA Data Bank of Japan <http://ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology.html>) から BLAST (Basic local alignment search tool) を用いて、既知種の中から相同性が高い塩基配列を検索し、近縁種の推

定を行った。

### 3. 実験結果および考察

#### (1) リン除去特性

1 サイクル中の嫌気でのリンの吐き出し量, 好気でのリンの取り込み量をリン除去活性を表す指標とした。Run-A, Run-S および Run-SP の嫌気工程の終了直前および好気工程の終了直前のリン濃度を Fig.2 に示した。Fig.2 のデータと流入流出のリン濃度の結果に基づいて1サイクルのリン収支を計算した結果を Fig.3 に示した。リン収支の計算はリアクターに流入したリン量と前サイクルで残存したリン量, 嫌気で吐き出されたリン量をプラス側に表示し, 好気で取り込まれたリン量と処理水のリン量をマイナス側に表示した。また, 流入下水のリン, TOC および処理水のリン濃度変化は Fig.4 に示した。

酢酸を炭素源とする Run-A は実験期間を通じて安定してリン除去活性が見られた。下水のみの Run

-S および下水に POM を 30, 60mgC/L を添加した Run-SP も, 安定なリン除去が見られた。例外的に 42 日目のみリン吐き出しと取り込みが観察されなかったが, その原因としては, 年末年始で平常より流入有機物濃度が低くさらに前日に大雨が降ったために, 非常に希釈された下水が流入した (Fig.4, 矢印) 結果, 一時的に1サイクルのリン放出や取り込みが観察されなかったという可能性が考えられる。その時, 汚泥のリン含有率および処理水中のリン濃度は Run-SP が 4.0%, 0.02mgP/L, Run-S が 4.8%, 0.11mgP/L であった。PAOs が摂取可能な有機物が一時的に足りなかったためにリンを吐き出さなかったと考えられる。

各 Run のリン含有率と MLSS の変化を Fig.5 に示す。リン含有率は Run-A が平均 8.3%, Run-SP は Phase I-5.6%, Phase II-4.8%, Phase III-3.2% であり, Run-S は 5.4% である。

このようにどの Run においても実験終了時にはほぼ安定したリン除去能を示していたと考えられる。

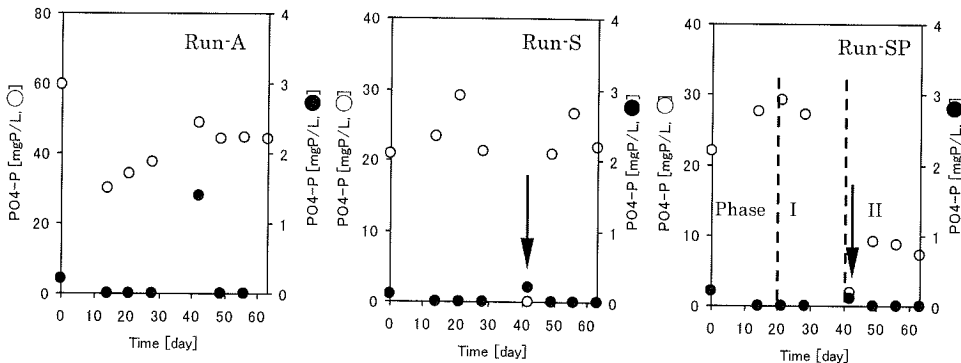


Fig.2 Changes of phosphorus concentration at the end of anaerobic (○) and aerobic phase (●)

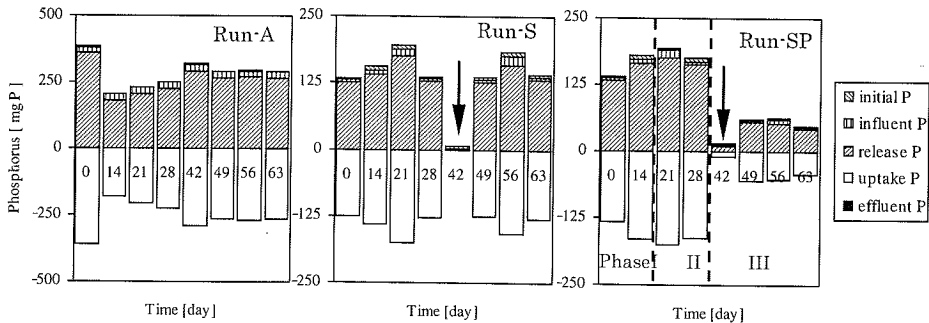


Fig.3 Phosphorus balance in one cycle of operation.

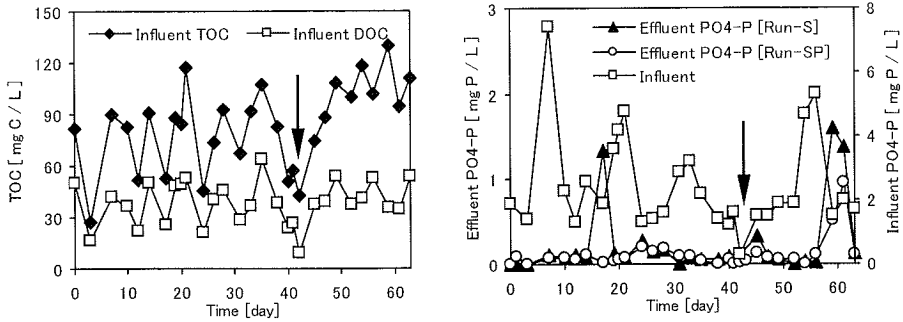


Fig.4 Changes of organic carbon and phosphate concentration in domestic sewage and phosphate concentration in the effluent in Run-S and Run-SP.

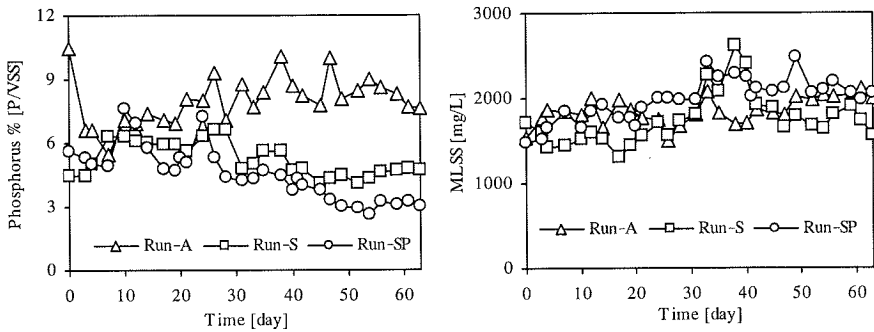


Fig. 5 Changes of phosphorus content of the sludge and MLSS

## (2) 微生物群集解析

### a) DGGE バンドパターン解析

DGGE ゲル画像 (Fig.6) から、電気泳動解析ソフト ImageQuANT (Molecular Dynamics 社, Version 4.1-J) によって各レーンのバンドを自動検出した (Sensitivity=16, Noise=1). その結果, Run-A, Run-S, Run-SP の 3 系列で処理が安定していた 63 日目の運転終了時点における DGGE バンド数は, それぞれ 11, 19, 16 本となった.

検出されたバンドの泳動位置からバンドの共通性を判断して, 3 系列の DGGE バンドの分類を Fig.7 に集合関係として表示した. 3 系列に共通して存在するバンドが 3 本 (C1-C3) であり, Run-A と Run-S のみの共通バンドが 1 本 (A/S), Run-A と Run-SP のみの共通バンド (A/SP) が 1 本, Run-S および Run-SP のみの共通バンドは 11 本 (S/SP1-S/SP11) である. Run-A, Run-S, Run-SP に特有なバンドはそれぞれ, 6 本 (A1-A6), 4 本 (S1-S4), 1 本 (SP) であった. この結果から Run-A は下水お

よび下水に POM を添加した系列と大きく異なる微生物群集構造をもつ系列だと考えられる.

Run-S と Run-SP はともに実際の都市下水を主基質として運転を行った系列であり, その差異は POM および ATU の添加の有無である. Run-S と Run-SP の共通バンドは 14 本であり, POM および ATU の添加の有無による大きな微生物群集構造の変化は見られなかった. それぞれの系に特有のバンドについては, S1-S4 のバンドは硝化を抑制しなかったことにより増加した細菌, バンド SP は POM 添加による影響で増加した細菌に対応するものである可能性が考えられる. しかしながら, バンド S1-S4 の塩基配列は解読できておらず, バンド SP は次項で述べるように塩基配列は解読できたものの, POM との関連は明らかにはできなかった. Run-S および Run-SP で実験期間中に消滅したバンドのうち, 21 日目頃に, 二つの系列で同時に消えたバンド 2 本があるが, それは流入下水の変動による影響ではないかと考えられる.

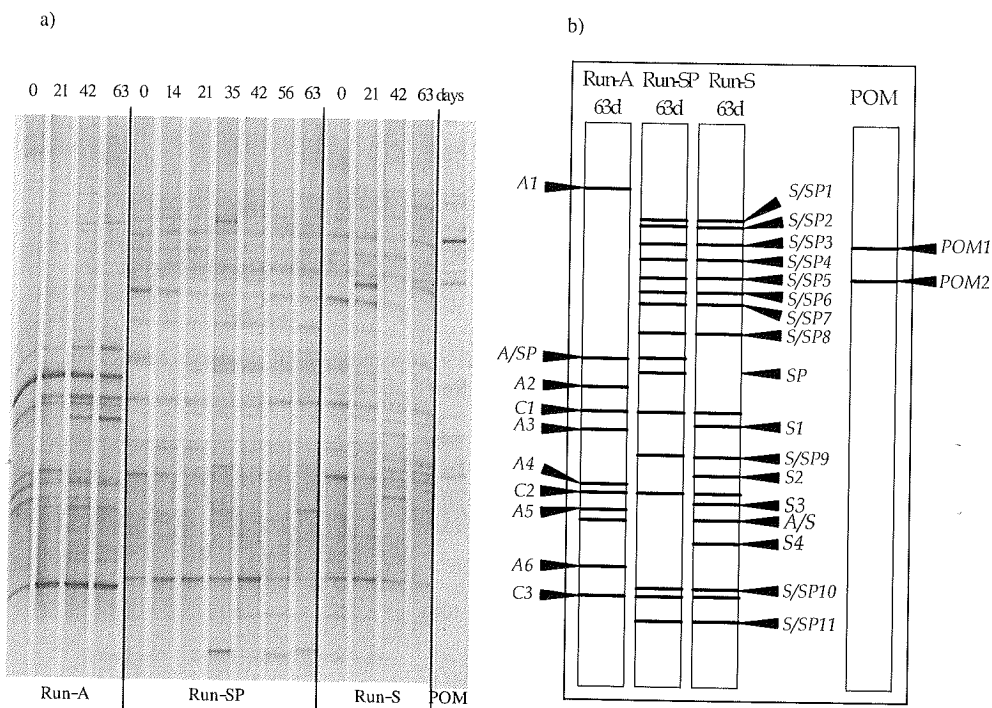


Fig.6 DGGE profiles of 16S rDNA fragment obtained from three reactors:  
 a) Fluorescent image b) A simplified image of detected bands

### b) 塩基配列解読の結果

Fig.6 に示した DGGE の DNA バンドについて塩基配列を解読した結果を Table 2 および Table 3 に示す。ここでは、塩基配列の解読に成功したバンドのうち、各系列に特徴的なバンドや共通のバンドに着目した。特に近年リン除去との関連が示唆されている *Rhodocyclus* 近縁種が実下水処理でも検出されるかどうかを検討するために、Run-A で顕著だったバンドの解読とそれらと Run-S 又は Run-SP との共通のバンドの解読に重点を置いた。このような観点から、Table 3 では C1, A/SP バンドと、その最近縁種および文献で提示されている類似種の計 3 種の塩基配列 (16S rDNA の V3 region) について比較した。

3 系列の共通バンドの一つである C1 は *Proteobacteria*  $\gamma$  群の *Thiothrix* 近縁種の配列に最も類似していた (相同性 98%)。この *Thiothrix* 属は代表的な糸状性細菌の一つであるが、実験期間においてバルキング現象は観察されなかった。藤田ら<sup>5)</sup>も実下水に酢酸とリン酸を添加した系においてこの *Thiothrix* 近縁種に類似したバンドを得ている (ミスマッチは 3 塩基)。この *Thiothrix* 近縁種が嫌気好気

活性汚泥で PAOs として機能しているのか、あるいは PAO と何らかの関連を有しているのかは未解明である。今後、*Thiothrix* 近縁種の細胞内の蓄積物質 (ポリリン酸塩と PHA) を同時染色方法である高濃度 DAPI と FISH を用いて調べる必要があると考えられる。

バンド A/SP から得られた配列と最も相同性が高い塩基配列は *Proteobacteria*  $\beta$  群の *Rhodocyclus* 近縁種の配列であった (相同性 98%)。この近縁種は Hesselmann ら<sup>2)</sup>、Onuki ら<sup>10)</sup> もリン蓄積細菌の一つとして提案している *Proteobacteria*  $\beta$  群の *Rhodocyclus* 近縁種に非常に近い種である。Table 3 に示したように、本研究で得られたバンド A/SP の塩基配列を過去の報告例と比較すると、AJ224937 の配列 (Hesselmann ら<sup>2)</sup> が報告した *Rhodocyclus* 近縁種) とのミスマッチ数は 3 であり、Onuki ら<sup>10)</sup> が報告した塩基配列とのミスマッチ数は 5 であった。

Run-SP に特有なバンド SP は下水に POM を添加後 21 日目頃から出現し最後まで存在したバンドであり、このバンドは *Actinobacteria* 近縁種であった。この細菌がもつ役割と添加した POM との関係は不

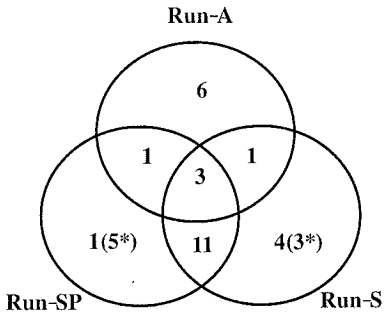


Fig.7 The number of detected bands in each Run. (\* The number of diminishing bands during the operation period.)

Table 2 Closest relatives of some of the distinct bands in Fig.6

Band	Closest relative	Accession No.	Identify
A1	<i>Lactococcus</i>	AF352166	195/195
A2	Unidentified	AY062125	194/194
A3	<i>Dechloromonas sp.</i>	AY032610	194/194
A4	Unidentified	AF234738	194/198
A5	<i>Methylosinus sp.</i>	AB007840	167/171
SP	<i>Actinobacteria</i>	AY186832	163/180
POM1	<i>Streptococcus</i>	AF290487	195/195
POM2	<i>Acidovorax</i>	AF332187	192/192

Table 3 Comparison of 16S rDNA sequence (V3 region)

① <i>Thiothix sp.</i> CT3 <sup>a)</sup>	CCTACGGGAGGCAGCAGTCGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGAT-CCAGCAATACCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTGCGGGTTGTAAGCACTT
② This study (C1 band)	CCTACGGGAGGCAGCAGTCGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATTCAGCAATACCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTGCGGGTTGTAAGCACTT
③ Fujita <i>et al.</i> (2003) <sup>5)</sup>	CCTACGGGAGGCAGCAGTCGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGAT-CCAGCAATACCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTGCGGGTTGTAAGCACTT
④ agreement*	*****
①	TCAGTTGGGAAGATAATG-ACGTTACCAACAGAAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGGTAAT
②	TCAGTTGGGAAGATAATGGAGTTACCAACAGAAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGGTAAT
③	TCAGTTGGGAAGATAATG-ACGTTACCAACAGAA-AAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGGTAAT
④	*****
① <i>Rhodocyclus sp.</i> <sup>b)</sup>	CCTACGGGAGGCAGCAGTCGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGAAGAAGGCCTTCCGGTTGTAAGCTCTTT
② This study (A/SP band)	CCTACGGGAGGCAGCAGTCGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGAAGAAGGCCTTCCGGTTGTAAGCTCTTT
③ Onuki <i>et al.</i> (2002) <sup>10)</sup>	CCTACGGGAGGCAGCAGTCGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAAGTGAAGAAGGCCTTCCGGTTGTAAGCTCTTT
④ agreement *	*****
①	CGGCGGGGAAGAAATTCCTGGGTTAATACCTGTAGTAGATGACGGTACC CGAATAAGAAGCACC GGCTACTACTGTCAGCAGCCGGGTAAT
②	CGGCGGGGAAGAAATTCCTGGGTTAATACCTGTAGTAGATGACGGTACC CGAATAAGAAGCACC GGCTACTACTGTCAGCAGCCGGGTAAT
③	CGGCGGGGAAGAAATTCACGGGTTAATACCTGTGTAGATGACGGTACC CGAATAAGAAGCACC GGCTACTACTGTCAGCAGCCGGGTAAT
④	*****

Accession No. a)AF148516 b)AJ224937. \* indicates agreement between three sequences (①-③).

明であるが、POMの加水分解や醗酵に寄与している可能性もある。POM自体から検出されたバンドPOM1は嫌気性醗酵細菌である*Streptococcus*近縁種、POM2は*Acidovorax*近縁種であった。

本研究では、PCR-DGGE法を用いDGGEゲル上のバンド位置に基づいて微生物群集構造の変化および多様性を解析し、さらにバンドの塩基配列の解読を行い近縁種の検索を行った。この手法は、比較的容易に微生物群集の変遷を視覚化でき、従来の培養に依存した手法では得られない情報を得られるもの、実際にどの細菌が系内に優占していたか、どのような反応に寄与していたかということの解明には至らない。このような限界を補うためには、塩基配列情

報からDNAプローブを設計しFISH法を用いて該当細菌を定量的・空間的に把握し、さらに機能と結び付けられるような染色手法等を併用して微生物解析を行う必要がある。

#### 4. 結論

炭素源として酢酸 (Run-A)、下水 (Run-S)、下水に下水由来 POM (Run-SP) を投入してリン除去が安定した系を構築し、その微生物群集を解析した。その結果、以下のことがわかった。

1) 3系列のDGGEバンドの共通性 (泳動位置から

- 判断した) を分類した結果, 3 系列で共通して存在するバンドが 3 本であり, そのうちの 1 本は *Thiothrix* 近縁種であった. *Thiothrix* 近縁種がリン除去プロセスにおいてどのような機能をもつ細菌か, 今後調べる必要があると考えられる.
- 2) Run-A と Run-SP の共通バンドが 1 本であり, このバンドの塩基配列が近年 PAO として提案されている *Rhodocyclus* 近縁種のもものと判断された.
- 3) Run-SP の特徴的なバンドが 1 本であった. さらに, Run-S と Run-SP の共通バンドが 14 本であり, POM 添加による大きな微生物群集構造の変化は観察されなかった.

## 参考文献

- 1) Bond, P. L., Hugenholtz P., Keller, J. and Blackall, L. L. : Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactor, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 61, pp. 1910-1916, 1995.
- 2) Hesselmann, R. P. X., Werlen, C., Hahn, D., Meer, J. R. D. and Zehnder, A. J. B. : Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge, *System. Appl. Microbiol.*, 22, pp. 454-465, 1999.
- 3) Crocetti, G. R., Hugenholtz, P., Bond, P. L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D. and Blackall, L. L. : Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16s rRNA-directed probes for their detection and quantitation, *Appl. Envir. Microbiol.*, Vol. 66, pp. 1175-1182, 2000.
- 4) Zilles, J. L., Peccia, J., Kim, M., Hung, C. and Noguera, D. R.: Involvement of *Rhodocyclus*-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 68, pp. 2763-2769, 2002.
- 5) 藤田昌史, 春日郁朗, 古米弘明, 中島典之, 小貫元治, 藤江幸一: 実下水に酢酸とリン酸を添加した系におけるリン除去活性汚泥の PCR-DGGE 解析, 第 37 回日本水環境学会年会講演集, pp. 56, 2003.
- 6) Mino, T., Loosdrecht, M. C. M. and Heijnen, J. J. : Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Wat. Res.*, 32, pp. 3193-3207, 1998.
- 7) 社団法人 日本下水道協会: 下水試験方法, 1997
- 8) Smolders, G. J. F., Meij, J. V. D., Loosdrecht, M. C. M. and Heijnen, J. J. : Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process : Stoichiometry and pH influence. *Biotechnol. Bioeng.*, 43, pp. 461-470, 1994.
- 9) Muyzer, G., Waal, E. C. D. and Uitterlinden, A. G. : Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 59, pp. 695-700, 1993.
- 10) Onuki, M., Satoh, H. and Mino, T. : Analysis of microbial community that performs enhanced biological phosphorus removal in activated sludge fed with acetate. *Water Sci. Technol.*, 46, pp. 145-154, 2002.

(2003. 6. 19 受付)

## MICROBIAL COMMUNITY ANALYSIS IN THREE ANAEROBIC/AEROBIC ACTIVATED SLUDGE PROCESSES FED WITH ACETATE, DOMESTIC SEWAGE WITH AND WITHOUT PARTICULATE ORGANIC MATTER

Mikyung LEE, Fumiyuki NAKAJIMA and Hiroaki FURUMAI

Two SBR reactors were operated with feed of domestic sewage (Run-S) and enriched sewage with particulate organic matters (Run-SP) until stable EBPR process was developed, while the third reactor was fed with acetate (Run-A) for a reference. Microbial community of activated sludges was analyzed by polymerase chain reaction -denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) method. Based on the analysis of DGGE band patterns, three bands were found commonly in all the lanes. Four bands were common between Run-A and Run-SP. There was no remarkable difference in band patterns between Run S and Run SP, which indicated that the addition of POM did not affect significantly the microbial community change in the activated sludge. The DNA sequences of the bands C1 and A/SP corresponded to the related sequences of *Thiothrix sp.* and *Rhodocyclus sp.*, respectively.