

(7) 16S rRNA標的モレキュラー・プローブのIn-situ Hybridizationによる  
嫌気性汚泥微生物叢の生態学的構造解析

Analysis of Microbial Ecological Structure of Anaerobic Granular Sludge Consortia  
by In-situ Hybridization of 16S rRNA targeted oligonucleotides

珠坪一晃\*、関口勇地\*、原田秀樹\*、大橋晶良\*、多川正\*、大関弘和\*、荒木信夫\*\*

Kazuaki SYUTSUBO, Yuji SEKIGUCHI, Hideki HARADA, Akiyoshi OHASHI,

Tadashi TAGAWA, Hirokazu OSEKI, Nobuo ARAKI

**ABSTRACT:** Whole cell in-situ hybridization with fluorescent oligonucleotides was used to study the microbial community structure of anaerobic granular sludges developed in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors receiving various types of wastewaters.

The molecular probes used were complementary to conserved region of the 16S rRNA of the domain *Archaea*, genus *Methanosaeta* (*Methanothrix*), and *Methanobacter* group which includes all species of *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanosaeta*.

The result indicated that *Archaea* accounted for approximately 40 to 60% of DAPI (6-diamidino-2-phenylindole) stained cells (corresponding to the total cell number) in the respective granular sludges and *Methanosaeta* species constituted 15 to 35% of DAPI stained cells. A strong positive correlation was observed between the presence ratio of genus *Methanosaeta* determined by FISH and acetoclastic methanogenic activity of the respective sludges.

Topology of microbial structure of two types of granules, mesophilically-grown and thermophilically-grown granules, was investigated by dividing the individual whole-granules into the outer-layer and the inner-layer portions. The inner-layer portion contained methanogens more significantly than the outer-layer portion. Thermophilic granules had a tendency to contain higher percentage of *Methanobacter* group, which utilize hydrogen or formate for methanogenesis, compared with mesophilic granule. This supports our previous finding that syntrophic acetate oxidizing methanogenesis through hydrogen (or formate) formation became more prominent under thermophilic conditions.

**KEY WORDS:** Fluorescence in-situ hybridization (FISH), anaerobic granular sludge, acetoclastic methanogen, *Archaea*, microbial community structure, 16S rRNA

## 1. はじめに

近年UASB法や嫌気性固定床法などの嫌気性微生物群の凝集・集塊機能（自己固定化作用）を利用した廃水処理プロセスが急速に普及してきている<sup>1)</sup>。これらの反応器内で形成される、嫌気性生物膜やグラニュール状汚泥内では、種々の微生物群が、さまざまなnicheに係わる競合や共生関係を保ちながら、浮遊増殖状態では見られない、特異的な生態学的構造と機能を獲得しているものと考えられる。<sup>2)3)</sup>

一方、近年の分子生物学の発展により生物の遺伝情報を分子レベルで解析することが可能となり、それらは生物学、医学はもとより、環境微生物学を研究する上でも非常に多くの情報と新しい解析手法を提供している。なかでも微生物の持つ16S rRNA遺伝子の塩基配列の解析により得られる情報は、微生物の系統進化のみならず、環境微生物学上きわめて有用なツールを提供している。その16SrRNA遺伝子の塩基配列を利用して、特定の微

\* 長岡技術科学大学工学部 環境システム工学系

(Department of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology)

\*\* 長岡工業高等専門学校 環境都市工学科

(Department of Civil and Environmental Engineering, Nagaoka college of Technology)

生物を最も直接的に検出する手法としてFISH (fluorescent in-situ hybridization) 法が注目されている<sup>4)</sup>。FISH法は、微生物の株(strain)レベルから種、属、広くはドメインレベルまでの系統分類群を、それぞれに特異的な16S rRNAの塩基配列に相補的な蛍光DNAプローブにより、顕微鏡下でダイレクトかつ簡便に同定、定量を行うことができ、従来の培養に依る間接的な方法とは一線を画する手法として期待されている。

そこで本研究では、さまざまな廃水に適応したグラニュール汚泥に対してFISH法を適用し、グラニュール汚泥内のメタン生成細菌存在率の定量的把握を行った。また、グラニュール汚泥のメタン生成活性、UASB反応器の運転条件と、FISH法により測定したメタン生成菌存在率との相関性を検討した。さらに、高温培養グラニュールの微生物生態学的構造の特徴を明らかにするため、グラニュール外層部、及び内層部でのメタン生成細菌の存在率に関して中温培養グラニュールとの比較検討をおこなった。

## 2. 実験方法

### 2. 1 供試グラニュールとその培養条件

FISH法の適用は、供給廃水、COD容積負荷など、培養条件の異なる5種類のUASBグラニュール汚泥（当研究室で培養）、及び1種の消化汚泥を用いた（Table 1）。グラニュール汚泥は、ラボスケールUASBリアクター（全容積13L、中温35℃、高温55℃）及びセミパイロットスケールUASBリアクター（150 L、25℃、都市下水処理場に設置）から採取した。全ての反応器は、各廃水において1年以上の連続運転を行っており、常時85～95%の良好なCOD<sub>Cr</sub>除去率を示しており、反応器内には1～5mm程度のグラニュールが安定的に保持されていた。消化汚泥は、一般的な都市下水処理場（長岡市）の中温下水消化汚泥を用いた。なお、各供試汚泥の酢酸からのメタン生成活性の測定は、珠坪ら<sup>5)</sup>の方法に準拠した。

Table 1 Cultivation conditions of anaerobic sludge consortia provided for FISH examination.

| No. | Temp. | Sludge Type     | Type of Wastewater                  | COD Loading Rate<br>kg COD/m <sup>3</sup> /d | Methanogenic Activity*<br>gCOD/gVSS/d |
|-----|-------|-----------------|-------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------|
| 1   | 55℃   | Granule         | Alcohol Distillery Wastewater       | 100                                          | 3.0                                   |
| 2   | 55℃   | Granule         | Synthetic wastewater (sucrose,VFAs) | 23                                           | 2.0                                   |
| 3   | 35℃   | Granule         | Synthetic wastewater (sucrose,VFAs) | 7.8                                          | 2.4                                   |
| 4   | 35℃   | Granule         | Diluted Milk                        | 4.8                                          | 1.4                                   |
| 5   | 35℃   | Digested Sludge | Sewage sludge                       | 1.0                                          | 0.1                                   |
| 6   | 25℃   | Granule         | Domestic Sewage                     | 1.5                                          | 0.1                                   |

\*: Test substrate : acetate (2000 mgCOD/L)

### 2. 2 DNAプローブ

実験にはArchaea（古細菌）を特異的に検出するARC915<sup>6)</sup>に加え、*Methanosaeta*（*Methanothermobacter*）属の16S rRNAに特異的な配列に相補的な配列を持つMT757（757-775, *E.coli* position）、同じく*Methanobacter* group（*Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanosaeta*属を含む）の16S rRNAに特異的なMB318（318-336, *E.coli* position）を新たに設計し、上記3種類のプローブを使用して実験を行った（Table 2）。プローブの5'末端には蛍光標識であるテトラメチルローダミン（G励起：545nm）を付加しており、DAPI（U励起：380nm）との二重染色により同一視野での全菌数、及びin-situ hybridizationによる対象微生物との同時検出を可能とした。

Table 2 Sequence of the Oligonucleotide probes used in this study.

| Probe Name | Target                     | Probe Sequence         | Td (°C) |
|------------|----------------------------|------------------------|---------|
| ARC915     | All Archaea                | 5' GTGCTCCCCGCCAATTCCT | 66.4    |
| MT757      | Genus <i>Methanosaeta</i>  | 5'CCTAGCTTTCTGTCCTTG   | 58.1    |
| MB318      | <i>Methanobacter</i> group | 5'GAACCTTGCTCAGGTTTC   | 53.2    |

## 2. 3 サンプルの作成方法

採取したグラニューール及び消化汚泥は、直ちにphosphate buffered saline (PBS) で洗浄した後、ホモジナイザー（日音医理器械製作所：ヒスコトロン）及び、超音波処理（BRANSON SONIFIER 250）により十分に分散させた後、4%パラフォルムアルデヒド溶液によって、4℃環境下で5時間固定を行った。

また、グラニューール内部と外部のメタン菌存在率の調査では、50-60個の対象グラニューールをステンレスナイフで厚さ0.1~0.2mm程度にスライスし、ピノキュラー観察下で外側と内側とに分離、回収し、上記と同様の分散処理を行って固定した。

## 2. 4 In-situ hybridization法

In-situ hybridization法は、Amannら<sup>7)</sup>の方法に準拠した。whole cell hybridizationにはゼラチンコーティングしたスライドガラスを用いた。固定した微生物試料をスライド表面に塗布し、空気乾燥、エタノール脱水を施した後、プローブを溶解させたhybridization buffer (0.9M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, 20~35% formamide, pH 7.2) によりハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション温度は、ARC915, MT757の両プローブは46℃とし、MB318プローブは40℃とした。洗浄は、同様に hybridization buffer を用いてARC915, MT757が48℃、MB318は42℃で、20分間行った。その後、全菌の検出のため、サンプルにDAPI染色を施した。なお、ホルムアミド濃度は、ARC915プローブが35%、MT757プローブが20%、MB318プローブが22%と、各プローブに対して理論的な濃度となる様に設定した。

ハイブリダイゼーション、DAPI染色を施したサンプルは、落射型蛍光顕微鏡（オリンパスBH-2）によって観察、各スライドごとに10視野程度の写真撮影を行い、画像解析により、全菌数（DAPIカウント、青色発光）に対する標的菌数（In-situ hybridizationによるローダミンカウント、赤色発光）で存在率を算出した。なお、各標的細菌の存在率は3~5つのスライドの平均値より求めた。

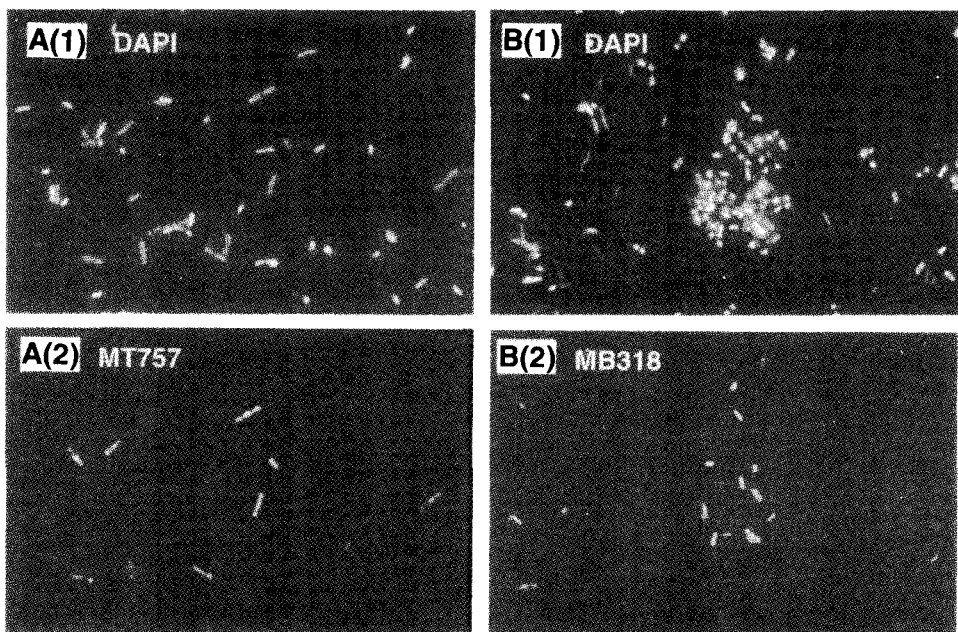
また、グラニューール内微生物の全菌数に対する生菌の割合（Live/Dead）の測定は、Molecular Probes 社のL-7007 Live/Dead kitによって行った。保持汚泥中の細菌の生死は、2種類の蛍光染色剤（SYTO9とPI）による染色により判定される。生細胞では、SYTO 9 によりDNAが染色されることにより緑色の蛍光を発し、死細胞では、細胞膜の破損部分から、ヨウ化プロピジウム（PI）が侵入し、DNAが染色されることにより、赤色の蛍光を発する。キットによる染色後、落射蛍光顕微鏡観察を行い、画像解析により生菌の割合を算出した。

## 3. 実験結果及び考察

### 3. 1 プローブの設計、及びFISHによる特定微生物の検出

健全なグラニューール内には、酢酸資化性メタン生成細菌として*Methanosaeta* (*Methanotrix*) 属、また、水素資化性メタン生成細菌としては*Methanobrevibacter*, *Methanobacterium* 属等が優占菌種となりやすいことが知られている<sup>8)</sup>。本研究では、上記メタン菌の in-situ hybridization による検出のため、*Methanosaeta* 属に特異的な16S rRNA配列に相補的な配列を持つMT757プローブ (757-775, *E.coli* position), *Methanobacter* group (*Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanosaeta* 属を含む) に特異的な16S rRNA配列に相補的な配列を持つMB318プローブ (318-336, *E.coli* position) を新規に設計した。両プローブは、データベース上での検索の結果、標的とする細菌群（属）以外の細菌に対してはすべて2塩基以上のミスマッチを持つものとなっており、ハイブリダイゼーション条件の設定により、特異的な標的細菌群の検出が可能であると推察された。

MT757プローブの最適ハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーション温度と、供試汚泥中での標的細菌群の存在率との関係について、設計プローブ及び、意図的に標的微生物と1ミスマッチの塩基配列を持つキャリブレーションプローブとの比較を行うことにより検討した。その結果、設計プローブによる標的菌群の存在率がほぼ一定値となり、かつ1ミスマッチプローブでは、標的菌群の存在率がゼロとなる温度をハイブリダイゼーション温度とした。



**Fig. 1 Fluorescence micrographs of disintegrated thermophilically-grown granular sludge.**

A(1) : dyed with DAPI, A(2) : hybridized by *Methanosaeta* genus specific molecular probe (MT757), B(1) : dyed with DAPI, B(2) : hybridized by *Methanobacter*-group specific probe (MB318).

Fig.1には、分散処理を施したグラニュール汚泥に遺伝子プローブを適用した例 (Fig. 1A: MT757プローブ、Fig. 1B: MB318プローブ) を示した。それぞれ、Fig. 1 A(1)とA(2)、Fig. 1 B(1)とB(2)は、同一視野での観察結果である。上記のハイブリダイゼーション条件検討の結果、本研究において設計されたプローブは、ハイブリダイゼーション時のstringencyの厳しい条件下において、標的菌種を特異的に検出、蛍光顕微鏡下での観察が可能であり (Fig.1) 、有効にターゲット菌種を検出することが出来ることが分かった。また、観察画像は、写真撮影後、画像処理を施すことにより、容易に標的細菌群のダイレクトカウント (定量) が可能であることが示された。

### 3. 2 各種グラニュール内のArchaea, *Methanosaeta* 属の存在率

メタン生成汚泥 (Table 1) 中のArchaea (古細菌) , *Methanosaeta* 属の酢酸資化性メタン生成細菌の存在率を求めるため、ARC915、MT757プローブによる、in-situ hybridizationを行った。その結果 (Fig. 2) , 各試料中のArchaea属の菌数は、同一視野におけるDAPI染色により求めた全菌数の約38~65%、また*Methanosaeta*属の菌群として検出されたのは全菌数の15~38%であり、下水消化汚泥、活発なメタン生成が見られたUASBグラニュールのいずれのサンプルにおいても、ほぼ同様な値を示した。

In-situ hybridizationに対し、菌体からRNAを抽出し、全16S rRNA中の、標的菌体由来の16S rRNA量を測定することにより、菌体量を定量する手法として、dot blot hybridizationがある。Raskin<sup>9)</sup>、Harmsen<sup>10)</sup>らは、dot blot法を、糖系廃水処理嫌気性ケモスタット、及びUASBリアクター由来の汚泥に対し適用を行っている。その結果、全16S rRNA内の50-76%がArchaea由来の16S rRNAであったことを報告しており、本研究のFISH法での菌数測定の結果と、ほぼ同程度の結果を示している。

次に、単位汚泥重量 (gVSS) あたりに占める*Methanosaeta*属の菌数と、供試汚泥の酢酸基質でのメタン生成活性 (酢酸からのメタン生成ポテンシャル) を比較した。その結果、それぞれのメタン生成活性とin-situ hybridizationにより求めた*Methanosaeta*属の存在量に相関関係が認められた (Fig. 3) 。 Fig. 1のようにin-situ

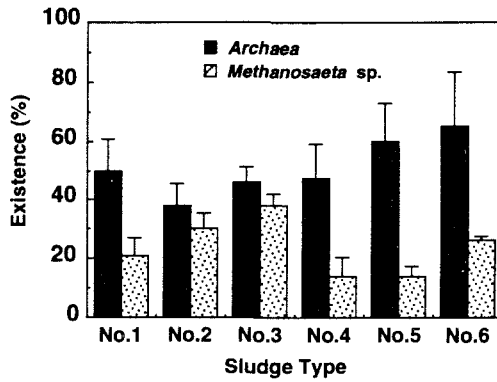


Fig. 2 Presence ratio of *Archaea* and *Methanosaeta* species quantified by FISH. Numbering of sludge consortia corresponds to Table 1.

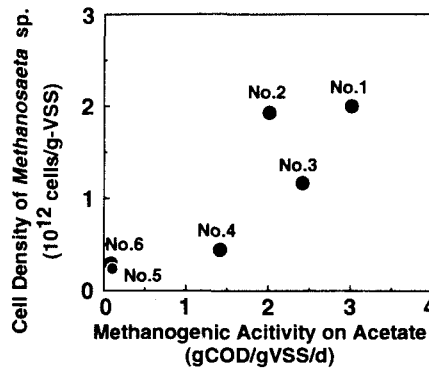


Fig. 3 Relationship between cell density of *Methanosaeta* species and acetate-fed methanogenic activity of the anaerobic sludge consortia.

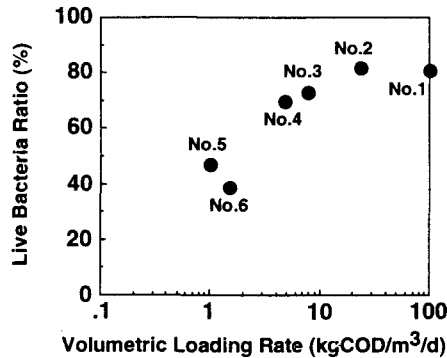


Fig. 4 Relationship between volumetric COD loading and live bacteria cell percentage of anaerobic sludge consortia.

hybridizationによって全菌体内の標的菌群の割合を測定することにより、その汚泥を構成する菌叢を調査することが可能であると同時に、汚泥の単位重量基準による標的菌数の算定により、供試汚泥の基質消費活性ポテンシャルを評価することも可能であることが示された。

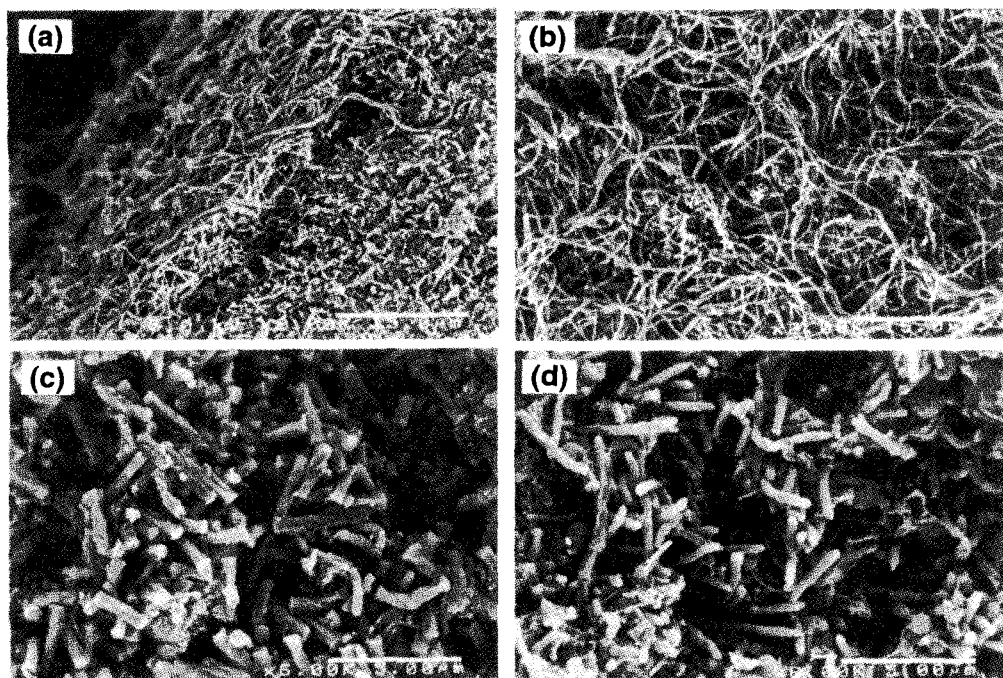
また、各供試汚泥中の全菌体に占める生菌の割合を把握するために、Live/Deadkitの適用を行った (Fig.4

）。その結果、供試汚泥培養時の反応器COD容積負荷が増加するにつれ、生存している菌体の割合が増加していることが示された。これは、反応器内の保持汚泥（反応槽内での供試汚泥の濃度は、20～25gVSS/Lとほぼ一定）への有機物負荷（COD容積負荷）が上昇するに従い、活発に活動している生菌数が増加していることを示し、上述の供試汚泥単位重量(gVSS)あたりに占める*Methanosaeta*属の菌数測定の結果と、ほぼ同様な傾向を示した。

以上の結果より、嫌気性汚泥へのFISH法の適用により、供試汚泥中での、標的細菌群のポピュレーションを評価できると共に、供試汚泥の有機物除去（メタン生成）活性の簡便な推定が可能であることが分かった。

### 3. 3 グラニュール内部のメタン生成細菌の分布

グラニュール内部には、集塊状に増殖する、生物膜特有の現象として、汚泥内部での微生物分布変化（マイクロコロニーの形成）が観察される。Fig. 5 は、本実験に用いた高温グラニュール(No.2)の全体、表面近傍、及び内部の菌叢を示しているが、表面近傍と内部では、形態から見て明らかに優占菌種の変化が観察される。しかしながら、現在までその変化を微生物種、もしくは属レベルで同定、定量することは非常に困難であった。そこで本研究では、FISH法を用いて、この変化を属レベルで定量化することを試みた。



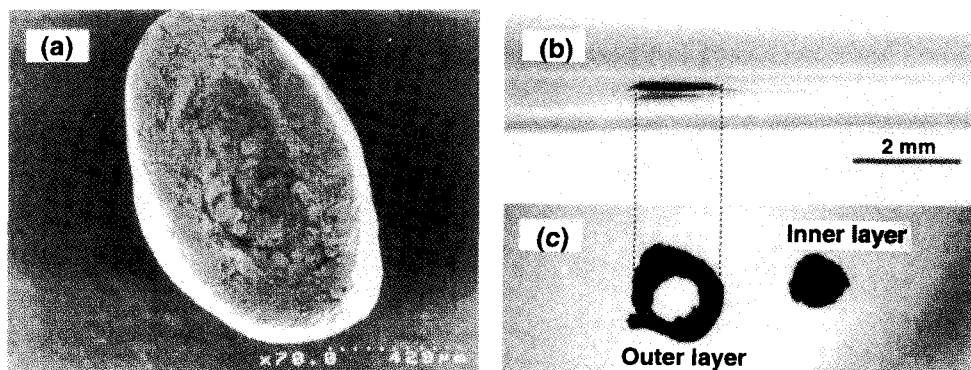
**Fig.5 Scanning electron micrographs of thermophilically-grown granular sludge treating an alcohol distillery wastewater.**

- (a) Cross-sectional view of granular sludge ( bar length=15μm)
- (b) Outer surface covered with thin filamentous bacteria ( bar length=15μm)
- (c) Interior structure of granular sludge : *Methanosaeta* microcolonies ( bar length=5μm)
- (d) Core portion of granular sludge : *Methanobacterium*-like bacteria ( bar length=5μm)

供試グラニュール汚泥としては、アルコール蒸留廃水処理高温グラニュール（No.1），糖系人工廃水処理高温（No.2），及び中温グラニュール（No.3）を用いた。これらのグラニュールを、ステンレスナイフにより0.2～0.3mmの厚さにスライスし、その切片について、ピノキュラー観察下で明らかに層別化している箇所を外層と内

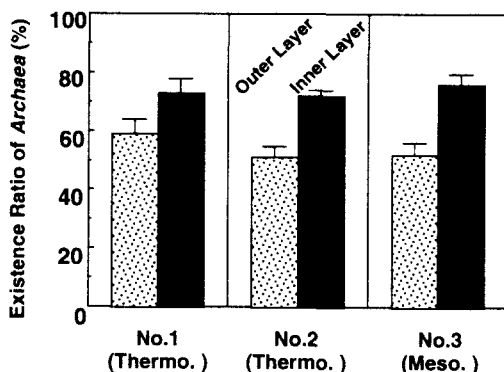
層を分離、別々に回収した (Fig. 6) . これらの2層に分離された汚泥について、ARC915, MT757, MB318プローブを用いた in-situ hybridization を適用し、各層に占めるそれぞれの菌群の割合を評価した。

それぞれの層内に占める *Archaea* に属する菌群は、中温、高温グラニュール共に、内層では72-76%、外層では51-59%の存在率を示し、いずれも外層に比べ内層部分に *Archaea* に属する菌群が多く存在する傾向を示した (Fig. 7) . 次に、*Methanosaeta* 属、*Methanobacter* group を特異的に検出するMT757, MB318プローブを各層に適用した結果、全ての層で *Methanosaeta* 属と *Methanobacter* group の菌数の総和がほぼ *Archaea* に属する菌群の菌数と一致した。従って、それぞれのグラニュール内に優占的に存在しているメタン菌は *Methanosaeta* 属と *Methanobacter* group であり、*Archaea* として検出された菌群のほとんどがメタン菌であることが示された。



**Fig. 6 Photographs of thermophilically-grown granular sludge.**

- (a) Cross sectional view of granular sludge.
- (b) Sliced granular sludge with a thickness of 0.3mm.
- (c) Outer-layer and Inner-layer core portions of granule sludge.



**Fig. 7 Presence ratio of *Archaea* in the outer-layer and the inner-layer portions of thermophilic and mesophilic granules.**

メタン発酵プロセスにおける、糖系廃水からのメタン生成では、まず糖類が発酵、消費され、低級脂肪酸や水素などが生成し、生成された中間生成物は、水素、酢酸へと転換される。大橋・原田ら<sup>11)</sup>はグルコース微小電極及びpH微小電極を製作して、グラニュール汚泥内のin-situでの基質、pHプロファイルを実測している。その実測プロファイルに関して数学モデルによるシミュレーションを行った結果、酸生成細菌がグラニュール表面近傍に多く存在し、また中央付近にはメタン生成細菌が優占的に生育していることを明らかにした。本研究では、シュクロースを主成分とした廃水、及びアルコール蒸留廃水を供して培養したグラニュールにおいて、グラニュール

表面に形成されている層（外層）に比べ、グラニュール内部の層（内層）に、より多くのメタン生成細菌が存在していることを菌数レベルで実証した（メタン生成細菌：外層＝約54%，内層＝約74%）。

一方、中温、高温グラニュールでのメタン生成細菌のポピュレーションを比較すると（人工廃水処理グラニュール、No.2とNo.3の比較）、同一の廃水を供給しているにも係わらず、中温グラニュールでは酢酸資化性メタン生成細菌である *Methanosaeta* 属が多く存在しているのに対し、高温グラニュールでは水素資化性メタン生成細菌である *Methanobacter* groupが比較的多く存在していることがわかる（Fig.8）。

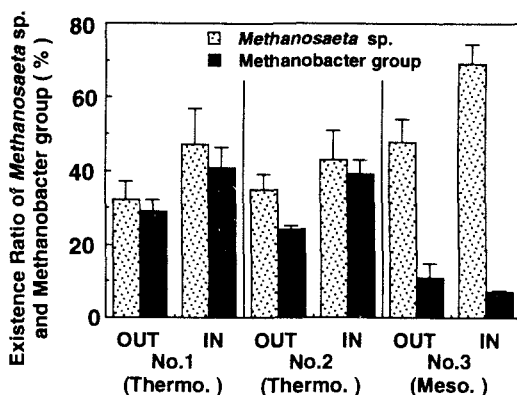


Fig. 8 Presence ratio of the genus *Methanosaeta* and *Methanobacter* group in the outer-layer and inner-layer portions of thermophilic and mesophilic granules.

酢酸からのメタン生成経路には、酢酸資化性メタン生成細菌による代謝とともに、酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成菌の共生系による、酢酸酸化・水素生成経由のメタン生成経路があることが知られている<sup>12)</sup>。珠坪・原田ら<sup>13)</sup>は、高温（55℃）グラニュール汚泥を用いた酢酸分解パイアル実験、熱力学的考察により、試験温度の上昇に伴い酢酸酸化・水素生成経由のメタン生成経路への寄与率が増加することを実証している。

本研究における、FISH法の適用の結果、高温グラニュールでは、*Methanosaeta*属の存在率が、32-47%と中温汚泥よりもかなり低いのにに対して、*Methanobacter* groupの存在率は、24 - 41%と中温汚泥よりも3~4倍卓越しており、高温グラニュールでの、活発な水素生成、すなわち、酢酸酸化・水素生成経由の共生系の卓越が、菌数レベルでも示される形となった。

#### 4. 結論

本研究の結果、以下のことが明らかになった。

1. 各種UASBリアクターより採取したグラニュール（5種）と、消化汚泥について、Archaea及び*Methanosaeta*属の特異的な検出のため、ARC915、MT757の各プローブを用いて、in-situ hybridizationを行った結果、各試料中のArchaeaに属する菌数は全菌数の38~65%に及び、また全菌数の15~38%が*Methanosaeta*に属する菌群として計測された。

2. グラニュール汚泥内に占める*Methanosaeta*属の存在率と、それら汚泥の酢酸基質からのメタン生成活性を比較した結果、メタン生成活性とin-situ hybridizationにより求めた*Methanosaeta*属の存在率に、ある程度の相関関係が認められ、in-situ hybridizationによるグループ特異的な菌数の測定により、汚泥中の各種活性を簡便に測定する



ことができる可能性が示された。

3. 同一の糖系人工廃水により培養した高温、及び中温グラニュールの表面付近の層（外層）、及び内部（内層）についてARC915, MT757, MB318プローブを用いたin-situ hybridizationを適用した結果、それぞれの層内に占めるArchaeaに属する菌群は、中温、高温グラニュールどちらも外層に比べ内層にArchaeaに属する菌群が多く存在することが明らかとなった。

4. 中温、高温グラニュールでメタン菌のポピュレーションの比較の結果、同じ廃水に適応しているにも関わらず、中温グラニュールでは酢酸資化性メタン菌である *Methanosaeta* 属が多く存在しているのに対し、高温グラニュールでは水素資化性メタン菌である *Methanobacter* group が比較的多く存在していることが判明し、高温グラニュールにおける酢酸酸化共生系による酢酸の消費が、菌数レベルでも示唆された。

以上のように、in-situ hybridizationによる菌体の特異的検出は、標的菌群の活性を迅速に測定するための方法として有効であると同時に、特にグラニュール等微生物集塊の生態学的構造の把握の一助となる、有用なツールであることが示された。

今後は、さらに詳細なグラニュール内部の微生物生態学的構造の解明のため、酸生成細菌、硫酸塩還元細菌、酢酸酸化等を含む嫌気共生系に関与する微生物群の特異的検出、また、グラニュール切片に対する各嫌気性菌群の検出にも本手法を適用して行く予定である。

なお本研究で、独自設計した遺伝子プローブ（MT757）は、1 mismatches プローブを用いた、実サンプルでのハイブリダイゼーションの温度の検討実験により、その特異的結合条件について評価を行ったが、純菌に対する特異性に関しては検討を行っていない。MB318プローブに関しても、これらの検討を行っておらず、本プローブの特異性の評価は、今後の課題である。

#### - 参考文献 -

- 1) 原田秀樹, 『微生物固定化法による排水処理』（須藤隆一編）, 「第7章スラッジブランケット（UASB）法」, 産業用水調査会, 220-280, 1988.
- 2) MacLeod, F., Guiot, S.R. and Costerton, J.W., Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1598-1607, 1990.
- 3) Grotenhuis, J.T.C., Smit, M., Plugge, C.M., Yuansheng, X., Van Lammeren, A.A.M., Stams, A.J.M., and Zehnder, A.J.B., Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrate, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1942-1949, 1991.
- 4) Amann, R.L., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H., Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169, 1995.
- 5) 珠坪一晃, 原田秀樹, 鈴木宏誌, 桃井清至, 大橋晶良, 高温UASBリアクターによるアルコール蒸留廃水処理特性と保持微生物群の生態学的挙動, 環境工学研究論文集, 32, 201-212, 1995.
- 6) Stahl, D.A. and Amann, R., Development and application of nucleic acid probes, in *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, E. Stackebrandt and M. Goodfellow, Editors., John Wiley & Sons, Inc.: New York, 205-248, 1991.

- 7) Amann, R.L., In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes., in *Molecular microbial ecology manual*, A.D.L. Akkermans and J.D. van Elsas, Editors. Kluwer Academic Publishers: London, 1-15, 1995
- 8) Schmidt, J.E., and Ahring, B.K., Granulation in thermophilic anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68, 339-344, 1995.
- 9) Raskin, L., Poulsen, L.K., Noguera, D.R., Rittmann, B.E., and Stahl, D.A., Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization, *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1241-1248, 1994.
- 10) Harmsen, H.J.M., Akkermans, A.D.L., Stams, A.J.M., and Vos, W.M., Population dynamics of propionate-oxidizing bacteria under methanogenic and sulfidogenic conditions in anaerobic granular sludge, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2163-2168, 1996.
- 11) 大橋晶良, 渡辺亮, 原田秀樹, 微小電極と数学的モデルによる嫌気性微生物グラニュール内の基質濃度とpHプロファイルの評価, *環境工学研究論文集*, 33, 235-245, 1996.
- 12) Zinder, S.H. And Koch, M., Non-aceticlastic methanogenesis from acetate : acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture, *Arch. Microbiol.*, 138, 263-272, 1984.
- 13) 珠坪一晃, 原田秀樹, 大橋晶良, 高温メタン発酵系における酢酸酸化・水素生成経由のメタン生成経路の生態学的意義, *環境工学研究論文集*, 33, 205-214, 1996.