

- (33) 単一基質で運転した生物学的リン除去プロセスにおける PCR-DGGE 法を用いた微生物群集解析と FISH 法を用いた生物学的リン除去を担う微生物の同定

Microbial Community Analysis by PDR-DGGE Method and *In situ* Identification of Bacteria in Enhanced Biological Phosphorus Removal Process Fed with Sole Carbon Sources

○岡本真由子*、福島寿和**、小貫元治***、味埜俊***

OKAMOTO Mayuko*, FUKUSHIMA Toshikazu**, ONUKI Motoharu***, MINO Takashi***

ABSTRACT; Due to a great progress in molecular techniques in microbial community analysis, microbes in enhanced biological phosphorus removal (EBPR) activated sludge are now intensively investigated. Several new candidates for polyphosphate accumulating organisms (PAOs) are now discovered or proposed. In this research, laboratory scale reactors were operated using glucose or aspartate as a sole carbon source and the microbial community was investigated using PCR-DGGE, cloning and FISH. In the aspartate fed reactor, *Dechloromonas* related bacteria which accumulated polyhydroxyalkanoate (PHA) but not polyphosphate (behaving like glycogen accumulating organisms (GAOs)) was found to exist significantly even when phosphate was well removed. On the other hand, in the glucose fed reactor, three *Actinobacteria* related genotypes were found. Although these genotypes were closely related to each other, one existed significantly when phosphate was removed well, and the others were found when the phosphorus removal activity was deteriorated. In both reactors, *Rhodocyclus* related PAO candidate was found at a certain level (about 20% of eubacteria) when the phosphorus was removed well, but the DGGE band corresponding to the bacteria didn't correspond to the profile of phosphorus removal activity. In this way, the complexity of microbial communities in EBPR activated sludge was shown.

KEYWORDS; Activated sludge; Enhanced biological phosphorus removal; Polyphosphate accumulating organisms; PCR-DGGE; FISH

1. はじめに

下水処理において富栄養化対策としての生物学的リン除去プロセスの果たす役割が大きくなっている。本プロセスを適用した実際の現場ではリン除去能の不安定性が指摘され、またリン除去を担うとされる微生物は単離も同定もされておらず、微生物学的に基礎的な知見がないのが現状である。これらのことからリン除去を担うとされるポリリン酸蓄積細菌 (PAOs : Polyphosphate Accumulating Organisms) を同定することは、今なお重要な課題である。近年は分子生物学的手法の発展に伴い、16S rRNA 遺伝子をターゲットとした様々な微生物群集解析手法を用いた PAOs の同定が行われており、酢酸馴養の系で *Rhodocyclus* sp. に近縁な種が報告されている^{1), 2)}。また様々な物質が含まれている実下水を対象とした系では多様な微生物がリン除去を担っている可能性がある³⁾。一方で実下水を対象とした生物学的リン除去プロセスにおいて、リン除去を担う微生物の 16S rRNA 遺伝子の配列をスクリーニングする簡便な方法が見当たらない。

そこで本研究では、酢酸以外で実下水に含まれる可能性のある物質として、アスパラギン酸とグルコースに着目し、これらを炭素源として生物学的リン除去を行う微生物を探索した。アスパラギン酸とグルコース

* 株式会社西原環境テクノロジー (Nishihara Environmental Technology, Inc.)

** 住友化学工業株式会社 (Sumitomo Chemical Co. Ltd.)

*** 東京大学大学院新領域創成科学研究科 (Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

をそれぞれ唯一の炭素源とした生物学的リン除去リアクターを運転し、PCR-DGGE 法を用いて微生物群集の変動をモニタリングした。さらにリアクターにおけるリン除去活性の変動と微生物群集構造を比較することにより、生物学的リン除去を担う微生物の絞り込みを行った。これと並行して Cloning 法により、16S rRNA 遺伝子の全長をクローン化し、絞り込んだ DGGE バンドに対応するクローンを得て、16S rRNA 遺伝子の全長配列を解読した。さらにその配列を特異的に検出するオリゴヌクレオチドプローブを作成し、FISH (Fluorescent *in situ* Hybridization) 法による顕微鏡観察を行い、リアクター内における挙動を調べた。以上の操作により各炭素源における微生物群集を解析し、生物学的リン除去を担う微生物を同定することを本研究の目的とした。生物学的リン除去を担う微生物を標的としたプローブの数を増やし、それを実下水と対象とした系に適用することで、生物学的リン除去を担う微生物群集構造を明らかにしていくという戦略を前提とした研究である。

2. 実験方法

2.1 実験室内リアクターの運転

図 1 に示した容量 10L の連続回分式リアクターを実験室内に設置した。以下に示すような嫌気好気工程を持つ運転により、生物学的リン除去を実現した。1 サイクルを 6 時間とし、排水 30 分、水道水流入 20 分、基質流入 10 分、嫌気工程 90 分、好気工程 150 分、沈殿 60 分で運転した。水道水流入と基質流入の 30 分間に窒素パージを行って溶存酸素を除去した。pH は pH コントローラーによって 7.0-7.2 に調整した。各サイクルの排水工程において 6L の上澄みを排水することによって HRT を 10 時間に調整した。同様に各サイクルの好気工程の最後の 30 分で約 300ml の汚泥混合液を引き抜くことによって SRT を約 8 日に調整した。

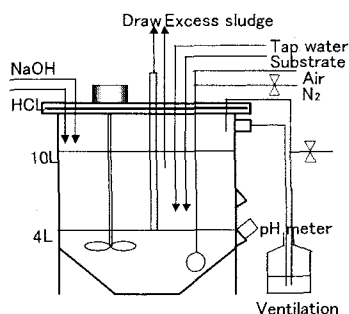


図 1 リアクター模式図⁴⁾

基質はアスパラギン酸馴養リアクターはアスパラギン酸を唯一の炭素源とし、グルコース馴養リアクターはグルコースを唯一の炭素源とし、それぞれ 8000mgC/L になるように調整した。無機塩として、 $\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$; 0.88g/L, $\text{MgCl}_2(6\text{H}_2\text{O})$; 9.07g/L, KCl ; 4.2g/L, NH_4Cl ; 1.76g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2.16g/L, K_2HPO_4 ; 1.8g/L, KH_2PO_4 ; 1.4g/L を加え、リンは共に 640mgP/L になるように調整し、硝化を抑制するアリルチオ尿素を添加した。基質の流入量を 50~75ml/cycle に調整したので、流入直後のリアクター内の有機物濃度の理論値は 40~60mgC/L となった。

2.2 水質分析

DOC は TC、IC 法 (TOC-500、Shimadzu) または NPOC 法 (TOC-V、Shimadzu)、溶存リン酸イオン、酢酸、プロピオン酸及びアスパラギン酸はキャピラリー電気泳動 (CIA、Waters)、乳酸はイオンクロマトグラフィー (イオンクロマトグラフィー IC7000、YOKOGAWA) により測定した。MLSS、MLVSS、リン含有率 (TP 及び D-P) は下水道試験法⁵⁾に従い測定した。

2.3 微生物群集解析

汚泥から核酸を FAST DNA kit (for Soil) により抽出し、得られた核酸から 16S rRNA 遺伝子の *E.coli* numbering 341-534 領域を PCR 法によって増幅した⁶⁾。この PCR 産物を DGGE によって解析した⁶⁾。得られたバンドのうち、リン除去活性の消長に呼応して強度の変化しているバンドを切り出して DNA 断片を回収し、シーケンサー (ABI310、PE Applied Biosystems) によって塩基配列を解読した。この配列と最も高い相同性をもつ塩基配列を、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) から BLAST (Basic local alignment search tool) を用いて検索し、最近縁配列を求めた。

切り出したバンドが由来する微生物の 16S rRNA 遺伝子の全長配列を得るために、抽出ゲノム DNA から新たに 27f プライマー⁷⁾と 1492r プライマー⁷⁾を用いて、PCR 法によって増幅し、得られた PCR 産物についてクローニングを行った (QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit, QIAGEN)。

得られたクローンの全長の配列をシーケンサー (ABI310 または ABI3100, PE Applied Biosystems) によって解読した。シーケンシング反応に用いたプライマーは、27f, 357f, 517f, 1099f, 534r, 907r, 1114r, 1492r (以上全て⁷⁾) である。DGGE バンドと同様に、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) の中から最も相同性の高い塩基配列を BLAST (Basic local alignment search tool) を用いて検索した。

2.4 FISH 法による標的細菌の定量及びそのポリリン酸及び PHB 蓄積能力の判定

サンプルを 3%パラホルムアミド溶液で固定しエタノール脱水を行い、46℃で 2 時間 Hybridization を行った⁸⁾。観察には蛍光顕微鏡 (BX51, Olympus 社) を用いた。得られた画像をもとに、Leica の画像解析アプリケーションソフト Qwin を用い、面積定量を行った。また 50ppm の高濃度 DAPI を用いてポリリン酸染色を行い、FISH 法とポリリン酸染色法との二重染色を行った⁴⁾。さらに Nile blue 染色を用いた PHB (polyhydroxybutyrate) 染色を行い、これについても FISH 法との二重染色を行った⁹⁾。使用したプローブを表 1 に示す。

2.5 分子系統学的解析と DNA プローブ設計

2.3 で得られた 16S rRNA 遺伝子の全長配列について CLUSTAL-W を用いて全長配列の alignment をかけ系統樹を作成した。このとき得られた 16S rRNA 遺伝子の全長配列の中からプローブを設計する標的種を決定し、既存のプローブとのマッチングを行った。また FISH 法に用いるオリゴヌクレオチドプローブを作成した。プローブの設計には ANGIS の BioManager¹⁶⁾のプログラム Primer3 または塩基配列データベースツール ARB¹⁷⁾を用いた。またこの作業と並行して RDP¹⁸⁾の CHECK PROBE 機能にかけた。プローブのスクリーニングにはポジティブコントロールとして、入手可能な純菌がなかったので PCR-DGGE 法によって標的種のバンドが相対的に濃く現れていたときの汚泥サンプルを用い、ネガティブコントロールとして、ミスマッチを 1~2 塩基含む純菌を用いた。必要に応じてリゾチーム処理も行った。Hybridization は温度を 46℃に統一し、ホルムアミド濃度を 10, 20, 30, 35, 45%と振って、最適な Hybridization 条件を検討した¹⁹⁾。

3. 結果

3.1 リアクターの運転状況

アスパラギン酸馴養リアクターに関して、リン除去活性に関わる各モニタリング項目の経日変化を図 2 に示す。22 日目まではリン含有率も増加傾向にあり、嫌気でのリン濃度の増加量はあまり多くないものの嫌気におけるリンの吐き出し及び好気におけるリンの取り込みが見られていたので、リン除去活性が上昇していたと判断される。その後徐々にリンの吐き出し取り込みが減少し、43 日目に運転を停止した。

グルコース馴養リアクターのリン除去活性に関わる各モニタリング項目の経日変化を図 3 に示す。15 日目まではリン含有率も増加し、嫌気でのリン濃度の増加量はあまり多くはないものの嫌気におけるリンの吐き出し及び好気におけるリンの取り込みが見られていたので、リン除去活性も増加していたと判断される。有機炭素の摂取速度が速かったため 22 日目以降徐々に基質の量を増加し、最終的には約 2 倍量となるように調整した。しかしながらその後徐々にリンの吐き出し取り込みが見られなくなったため、43 日目に運転を停止した。MLSS は運転開始時には約 4000mg/L あったが、その後低下し 2000mg/L 程度になったが、基質の量を増やしたのに伴い若干増加した。

表1 本研究で用いたプローブのシーケンス、rRNA における位置及びホルムアミド濃度

Probe name	Probe sequence (5' -3')	rRNA target site	Reported specificity (acc. no.)	Stringency (%)	Reference
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAG T	16S, 338-355	Bacteria	20-35	Amann <i>et al.</i> (1990) ¹⁰⁾
EUB338-II	GCAGCCACCCGTAGGTG T	16S, 338-355	Bacteria Planctomycetales	35	Daims <i>et al.</i> (1999) ¹¹⁾
EUB338-III	GCTGCCACCCGTAGGTG T	16S, 338-355	Bacteria Verrucomicrobiales	35	Daims <i>et al.</i> (1999) ¹¹⁾
ALF1b	CGTTCGCTCTGAGCCAC	16S, 19-35	Alphaproteobacteria Some Deltaproteobacteria Spirochaetes	20	Manz <i>et al.</i> (1992) ¹²⁾
BET42a	GCCTTCCCACTTCGTTT	23S, 1027-1043	Betaproteobacteria	35	Manz <i>et al.</i> (1992) ¹²⁾
GAM42a	GCCTTCCCACTTCGTTT	23S, 1027-1043	Gammaproteobacteria	35	Manz <i>et al.</i> (1992) ¹²⁾
HGC69a	TATAGTTACCAACGCCGT	23S, 1901-1918	Actinobacteria [high gram-positive bacteria]	25	Roller <i>et al.</i> (1994) ¹³⁾
CF319a	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	16S, 319-336	Cytophaga-Flavobacterium-group of the Bacteroidetes	35	Manz <i>et al.</i> (1996) ¹⁴⁾
PAO462	CCGTCATCTACWCAGGG TATTAAC	16S, 462-485	PAO cluster	35	Crocetti <i>et al.</i> (2000) ²⁾
PAO651	CCCTCTGCCAAACTCCAG	16S, 651-668	PAO cluster	35	Crocetti <i>et al.</i> (2000) ²⁾
PAO846	GTTAGCTACGGCACTAAA AGG	16S, 846-866	PAO cluster	35	Crocetti <i>et al.</i> (2000) ²⁾
AMAR839	CTGCGACACCGAACGGC AAGCC	16S, 839-860	Amaricoccus spp. 'G-bacteria'	20	Manszenan <i>et al.</i> (2000) ¹⁵⁾
OFAGS634	AGCCTTCCAGTCACAAGC G	16S, 634-652	clone-OF08-04 (AB166783) and clone-OF09-22-46 (AB166785)	20	This study
OFAGS996	CTCTTCAGGATTCCAGAC A	16S, 996-1014	clone-OF08-04 (AB166783) and clone-OF09-22-46 (AB166785)	20	This study
OFASPS102 4	GTTTCAGATTCCCTTTCGG GC	16S, 1024-1043	clone-OF08-18 (AB166784)	35	This study
OFGS584	TTCCGACGCAACAAACCA C	16S, 584-602	clone-OF09-36-04 (AB166786) and clone-OF09-36-43 (AB166787)	20	This study

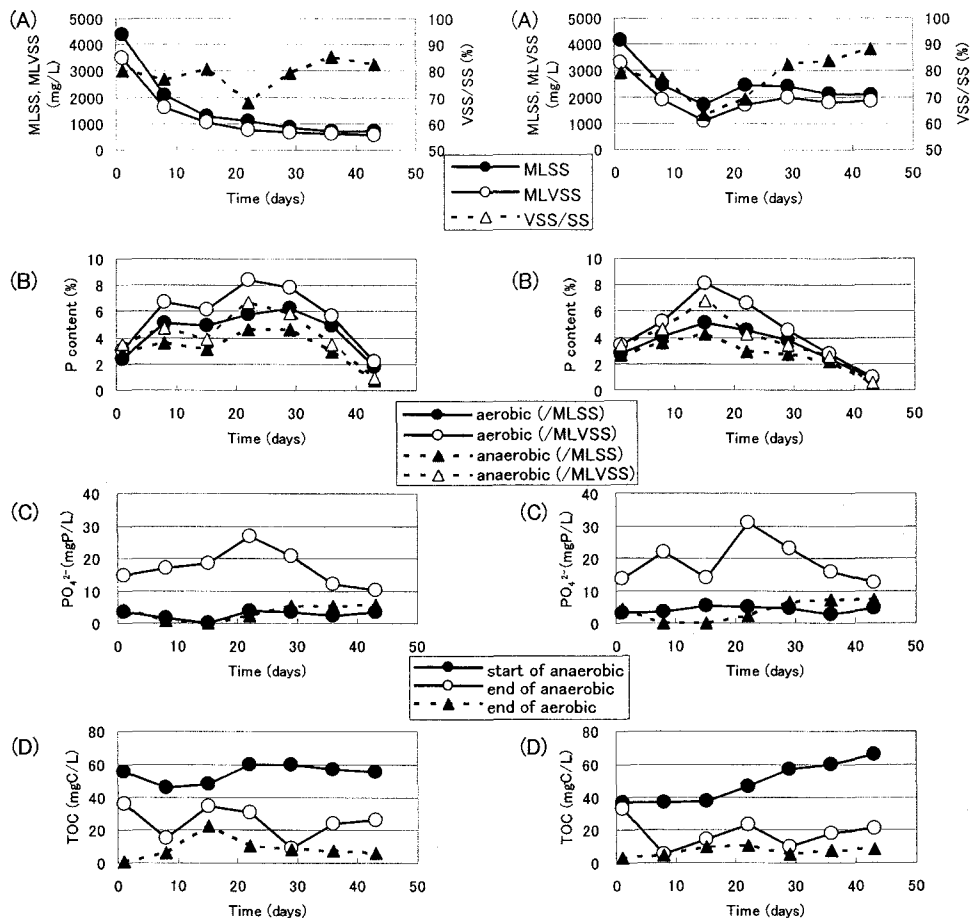


図2 アスパラギン酸馴養リアクターにおけるリン除去活性に関わる各モニタリング項目の経日変化 (A)MLSS, MLVSS, VSS/SS (B)P content (C) PO_4^{3-} (D)TOC

図3 グルコース馴養リアクターにおけるリン除去活性に関わる各モニタリング項目の経日変化 (A)MLSS, MLVSS, VSS/SS (B)P content (C) PO_4^{3-} (D)TOC

3.2 PCR-DGGE 法による微生物群集解析と DNA プローブ設計

アスパラギン酸馴養リアクターの PCR-DGGE 法による解析結果を図 4 に示す。バンド 4、9、10 は運転開始時に比べてリン除去が良好なときに相対的に濃く現れた。一方バンド 1、2 はリン除去活性が低下してから相対的に濃く現れた。*E.coli* numbering 341-534 領域の塩基配列を解読したところ、バンド 4 は *Betaproteobacteria* 綱に属する *Rhodocyclus* sp. に近縁であることが分かった。またリン除去が良好な時に相対的に濃いバンドであるバンド 9 及び 10 も *Betaproteobacteria* 綱に属する *Dechloromonas* sp. に近縁であることが分かった。そこでバンド 9 及び 10 に関して *E.coli* numbering 341-534 領域に同じ配列を持つ 16S rRNA 遺伝子全長をほぼ含むクローンを得て、16S rRNA 遺伝子全長配列の解読を行った。

グルコース馴養リアクターの PCR-DGGE 法による解析結果を図 5 に示す。リン除去が良好なときに相対的に濃く現れているバンドはバンド 1、3、4、11、16、17 であった。それに対してリン除去活性が低下してから相対的に濃く現れたバンドはバンド 6、8、18 であった。*E.coli* numbering 341-534 領域の塩基配列を解読したところ、バンド 11 は *Betaproteobacteria* 綱に属する *Rhodocyclus* sp. に近縁であることが分かった。バンド 15 はアスパラギン酸馴養リアクターにおいてもリン除去が良好なときに相対的に濃く現れた。

Betaproteobacteria 綱に属する *Dechloromonas* sp. に近縁であることが分かった。バンド 16 及び 17 は *Actinobacteria* に属していた。バンド 17 はリン除去が良好な時に相対的に濃く現れているバンドにも関わらず、リンを蓄積する代わりにグリコーゲンを蓄積することでエネルギーを得ているグリコーゲン蓄積細菌 (GAOs : Glycogen Accumulating Organisms) として報告されている *Micropruina glycogenica* に近縁であった。バンド 18 はリン除去が悪化してから相対的に濃く現れ、同じく *Actinobacteria* に属していた。そこで *Dechloromonas* sp. に近縁であったバンド 15 と *Actinobacteria* に属していたバンド 17 及び 18 に関して *E. coli* numbering 341-534 領域に同じ配列を持つ 16S rRNA 遺伝子全長をほぼ含むクローンを得て、16S rRNA 遺伝子全長配列の解読を行った。

図 4 及び図 5 で表記された番号で示されたバンド以外でも有意なバンドは確認されたが、*E. coli* numbering 341-534 領域の塩基配列を解読することができなかったため、解析の対象から外した。

またアスパラギン酸馴養リアクターのバンド 9 とグルコース馴養リアクターのバンド 15 をターゲットとしたプローブ、アスパラギン酸馴養リアクターのバンド 10 をターゲットとしたプローブ、グルコース馴養リアクターのバンド 17 及び 18 をそれぞれターゲットとしたプローブを設計し、最適な Hybridization 条件を検討した。設計したプローブのうち後の顕微鏡観察 (二重染色及び定量) で使用したプローブのシーケンス、rRNA における位置及びホルムアミド濃度を表 1 に示す。

3.3 FISH 法による標的細菌の定量及びポリリン酸及び PHB 蓄積能力の判定

アスパラギン酸馴養リアクターにおいて、リン除去が良好であった 22 日目の汚泥サンプルを用いて、全細菌に特異的な EUB mix プローブ (EUB338、EUB338-II、EUB338-III を混合したもの) とグループに特異的なプローブによる二重染色を行った結果を図 6 に示す。

Betaproteobacteria 綱が約半分を占め、次いで *Alphaproteobacteria* 綱が占めることが分かった。*Actinobacteria* 門、*Gammaproteobacteria* 綱及び *Cytophaga Flavobacterium* group は 10% 以下であった。同様に *Rhodocyclus* sp. に近縁な PAOs に特異的な PAO mix プローブ (PAO462、PAO651、PAO846 を混合したもの) による二重染色を行った結果、*Rhodocyclus* sp. に近縁な PAOs が約 25±3% を占めることが分かった。一方リン除去が悪化した 43 日目の汚泥サンプルを用いて、同様に AMAR839 プローブによる二重染色を行った結果、*Amaricoccus* spp. 'G-bacteria' が約 25% を占めた。

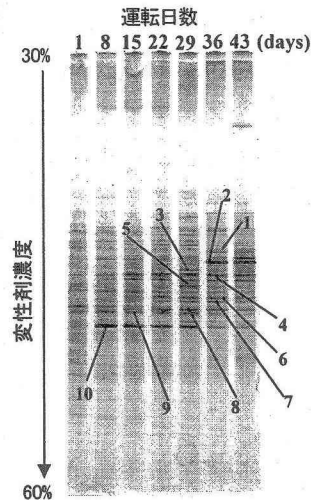


図 4 アスパラギン酸馴養リアクターにおける DGGE 結果²⁰⁾(数字: バンドの番号)

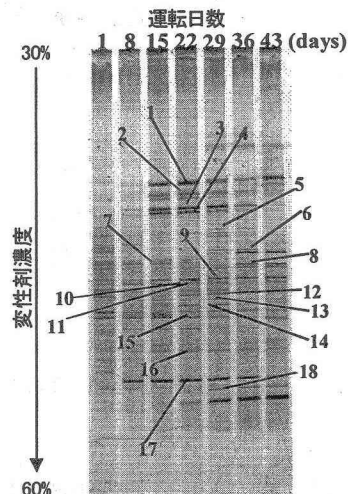


図 5 グルコース馴養リアクターにおける DGGE 結果²⁰⁾(数字: バンドの番号)

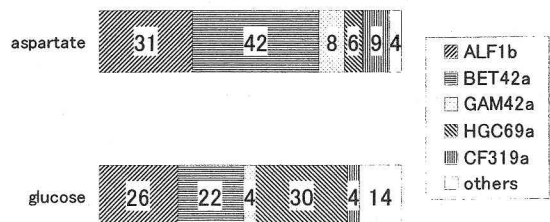


図 6 グループに特異的なプローブを用いた二重染色による定量的結果 (EUB mix プローブに対する割合: %)

作成したプローブのうち、*Dechloromonas* sp.に近縁なバンド（バンド9及び10）をターゲットとしたプローブ（OFAGS634、OFAGS996、OFASPS1024）を用いて観察したところ、リン除去が良好な汚泥中に存在することは確認されたものの、ポリリン酸染色との二重染色によりポリリン酸の蓄積は確認されなかった。一方、嫌気工程での PHB の蓄積は確認された。

グルコース馴養リアクターにおいて、リン除去が良好であった 22 日目の汚泥サンプルを用いて、全細菌に特異的な EUB mix プローブとグループに特異的なプローブによる二重染色を行った結果を図 6 に示す。*Actinobacteria* 門が約 30% を占め、次いで *Alphaproteobacteria* 綱と *Betaproteobacteria* 綱が約 25% 占めることが分かった。*Gammaproteobacteria* 綱及び *Cytophaga Flavobacterium* group は 10% 以下であった。同様に *Rhodocyclus* sp.に近縁な PAOs に特異的な PAO mix プローブによる二重染色を行った結果、*Rhodocyclus* sp.に近縁な PAOs が約 19±4% を占めることが分かった。

作成したプローブのうち *Actinobacteria* に属するバンド（バンド17及び18）をターゲットとしたプローブ（OFGS584）を用いて観察したところ、リン除去が悪化した 36 日目の汚泥において 30% 前後存在することが分かった。形態としては小さな球菌が平面状もしくは集塊状になっていた。嫌気工程での PHB の蓄積は確認されなかった。

4. 考察

FISH 法による顕微鏡観察の結果、どちらのリアクターにおいてもリン除去良好時に *Rhodocyclus* sp.に近縁な PAOs が 20% 前後占めることが分かった。酢酸以外の基質を用いた場合でも *Rhodocyclus* 近縁種がリン除去を担っていることが明らかになった。しかしこの微生物が直接基質を摂取したのか、基質の発酵により酢酸が生成されて、それを摂取したのかは明らかにはなっていない。一方 PCR-DGGE 法ではバンドとして現れたものの、リン除去活性の消長に呼応した強度の変化を示さなかった。

Dechloromonas sp. に近縁なバンドをターゲットとしたプローブ（OFAGS634、OFAGS996、OFASPS1024）を作成して、アスパラギン酸馴養リアクターのリン除去が良好な時の汚泥について、FISH 法とポリリン酸染色及び PHB 染色との二重染色を行い観察したところ、ポリリン酸は蓄積せず、PHA は蓄積していることが分かった。リン除去が良好な時に相対的に濃く現れたバンドであり、新規 PAOs を発見する意図でプローブを作成したにも関わらず、GAOs のような代謝を行っていることが示唆された。またリン除去が悪化するに従って減少しながらも、リン除去が良好な時に PAOs が摂取するはずの有機物を奪うことで、PAOs の増殖を阻害していたとも考えられる。

グルコース馴養リアクターにおいて *Actinobacteria* に属するバンドは 3 つあり、バンド 16 及び 17 はリン除去が良好時、バンド 18 はリン除去悪化時に相対的に濃く現れた。16S rRNA 遺伝子全長のシーケンスが得られたバンド 17 と 18 についてその全長シーケンスをもとに系統樹を作成したところ、挙動のまったく異なるバンド 17 及び 18 が系統学的に大変近い位置にあり、96% の相同性が見られた。*Actinobacteria* に属する微生物は生物学的リン除去に何らかの形でかかわる微生物として数多く報告されており^{21), 22), 23)}、この細菌が嫌気工程を導入した活性汚泥プロセスの代謝に深く関わっていることを示唆する結果が本研究でも得られた。今後、バンド 17 及び 18 を形成した微生物の代謝をさらに検討していく必要がある。

5. 結言

アスパラギン酸馴養リアクター、グルコース馴養リアクターいずれにおいてもリン除去良好時に *Rhodocyclus* sp.に近縁な PAOs が 20% 前後占めており、酢酸以外の基質でも *Rhodocyclus* 近縁種がリン除去を担っていることが分かった。一方でリン除去良好時に相対的に濃く現れたバンドを形成した *Dechloromonas* sp.に近縁な微生物はポリリン酸を蓄積しておらず、PAOs であることを確認できなかった。本研究では *Rhodocyclus* sp.に近縁な PAOs 以外の新規 PAOs が存在するか否かが明らかにできなかった。し

かし *Dechloromonas* sp. に近縁な微生物は PHB の蓄積は確認しており、PAOs と競合する可能性が示唆された。今後得られたプローブを用いて標的とする細菌がどのような代謝をしているか解析していく必要がある。また生物学的リン除去を担う微生物を標的としたプローブを数多く開発し、実下水を対象とした系に適用していく必要がある。

参考文献

- 1) Hesselmann, R.P.X., Werlen, C., Hahn, D., van der Meer, J.R. and Zehnder, A.J.B. (1999) Enrichment, Phylogenetic Analysis and Detection of a Bacterium that Performs Enhanced Biological Phosphate Removal in Activated Sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 454-465.
- 2) Crocetti, G.R., Hugenholtz, P., Bond, P.L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D. and Blackall, L.L. (2000) Identification of Polyphosphate-Accumulating Organisms and Design of 16S rRNA-Directed Probes for Their Detection and Quantitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1175-1182.
- 3) Seviour, R.J., Mino, T., and Onuki, M. (2003) The Microbiology of Biological Phosphorus Removal in Activated Sludge Systems. *FEMS Microbiol. Reviews.* 27, 99-127.
- 4) 小貫元治 (2001), PCR-DGGE 法を中心とする微生物群集解析手法を用いた生物学的リン除去を担う微生物の探索, 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻博士論文.
- 5) 社団法人 日本下水道協会 (1997), 下水道試験法.
- 6) Muyzer, G., Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- 7) Lane, D.J. (1991) 16S/23S/ rRNA sequencing, p.115-147. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Academic Press, Chichester, England.
- 8) Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microb. Reviews.* 59, 143-169.
- 9) 花田茂久 (2000), 活性汚泥中における PHA 蓄積微生物量の直接測定にもとづく Activated Sludge Model NO.3 の妥当性の評価, 東京大学工学系研究科都市工学専攻修士論文.
- 10) Amann, R.L., David, L.K., and Stahl, A. (1990) Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology. *J. bacteriol.* 171(2), 762-770.
- 11) Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H. and Wagner, M. (1999) The Domain-Specific Probe EUB338 is Insufficient for The Detection of All Bacteria: Development and Evaluation of a More Comprehensive Probe Set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 434-444.
- 12) Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., and Schleifer, K.-H. (1992) Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for The Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 593-600.
- 13) Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H. (1994) In situ Probing of Gram-Positive Bacteria with High DNA G+C Content Using 23S rRNA- Targeted Oligonucleotides. *Microbiol.* 140, 2849-2858.
- 14) Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., and Schleifer, K.-H. (1996) Application of a Suite of 16S rRNA-Specific Oligonucleotide Probes Designed to Investigate Bacteria of the Phylum Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides in The Natural Environment. *Microbiol.* 142, 1097-1106.

- 15) Maszenan, A.M., Seviour, R.J., Patel, B.H.C., and Wanner J. (2000) A Fluorescently Labeled r-RNA Targeted Probe for The In situ Detection G-bacteria of The Genus *Amaricoccus* in Activated Sludge. J. Appl. Microbiol. 88, 826-835.
- 16) <http://biomanager.angis.org.au/>
- 17) Strunk, O., and Ludwig, W. (1996) ARB-Microbiologist's sequence database tools. Department of microbiology. the Technical University of Munich (Internet)
- 18) Cole, JR., Chai, B., Marsh, TL., Farris, RJ., Wang, Q., Kulam, SA., Chandra, S., McGarrel, DM., Schmidt, TM., Garrity, GM., Tiedje, JM.; Ribosomal Database Project. (2003) The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. Nucleic Acids Res. 31(1), 442-443.
- 19) Liu, W.-T., Nielsen, A.T. Wu, J.-H., Tsai, C.-S., Matsuo, Y., and Molin, S. (2001) *In situ* Identification of Polyphosphate⁻ and Polyhydroxyalkanoate⁻ Accumulating Traits for Microbial Populations in a Biological Phosphorus Removal Process. Environ. Microbiol. 3(2), 110-122.
- 20) 福島寿和 (2003), 生物学的リン除去プロセスにおける微生物群集解析—炭素源の種類による群集構造の差異に関する検討—, 東京大学大学院新領域創成科学研究科環境学専攻修士論文.
- 21) Shintani, T., Liu, W. T., Hanada, S., Kamagata, Y., Miyaoka, S., Suzuki, T., Nakamura, K. (2000) *Micropruina glycogenica* gen. nov., sp. nov., a new Gram⁺ positive glycogen-accumulating bacterium isolated from activated sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:201-207
- 22) Kong, Y.H., Beer, M., Seviour, R.J., Lindrea, K.C., and Rees, G.N. (2001) Structure and Functional Analysis of the Microbial Community in an Aerobic: Anaerobic Sequencing Batch Reactor (SBR) with no Phosphorus Removal. Syst. Appl. Microbiol. 24, 597-609.
- 23) Jeon, C.O., Woo, S.H., and Park, J.M. (2003) Microbial Communities of Activated Sludge Performing Enhanced Biological Phosphorus Removal in a Sequencing Batch Reactor Supplied with Glucose. J. Microbiol. Biotechnol. 13(3), 385-393.