

(84) 低水温嫌気性処理槽内に生息する メタン生成古細菌群の動態解析

古川 卓¹・荒木 信夫^{2*}・青木 仁孝²・對馬 育夫³
珠坪 一晃³・Wilasinee Yoochatchaval³・房 月芹³・山口 隆司¹

¹長岡技術科学大学 環境システム工学系 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1)

²長岡工業高等専門学校 環境都市工学科 (〒940-8532 新潟県長岡市西片貝888)

³独立行政法人国立環境研究所 水圏環境研究領域 (〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2)

* E-mail: araki@nagaoka-ct.ac.jp

低水温条件にて低濃度有機性排水の連続処理を行う2基のEGSB槽内に生息する3属の優占メタン生成古細菌群の動態解析を行った。Real-time PCR法による16S rDNAの定量では*Methanosaeta*属と*Methanobacterium*属は同等の存在量を示した。この2属に比較して*Methanospirillum*属は1-2オーダー小さい値であったが、FISH解析では*Methanospirillum*属は*Methanobacterium*属と同程度の存在割合であった。そこでReal-time PCR法による16S rRNAの定量を試みたところ、FISH解析と同じ傾向を示した。これは、低水温運転のメタン発酵槽内には低活性の細胞や死滅細胞が蓄積することが原因であった。10℃馴致汚泥は20℃馴致汚泥と同等の水素資化性メタン生成活性を有していたが、これは好低温性の*Methanospirillum*属の集積化が一因と判断した。

Key Words : expanded granular sludge bed, real-time PCR, fluorescence in-situ hybridization, 16S rDNA, 16S rRNA, *Methanosaeta*, *Methanospirillum*

1. はじめに

近年、排水処理の低コスト化、省エネルギー化への気運が高まっており、嫌気性微生物群の凝集体であるグラニュール汚泥を利用した Up-flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) 法などのメタン発酵処理技術の開発と実用化が進行している^{1,2}。メタン発酵処理技術は、酸素供給のための曝気電力が不要で余剰汚泥の発生が少ないことに加え、エネルギーとして利用可能なメタンガスが得られることからエネルギー回収型排水処理技術として先進国と途上国の双方での実用化が活発化している。しかし、メタン発酵処理では、反応槽の運転温度をメタン生成古細菌の至適増殖温度である30-35℃付近³に維持する必要がある。また、安定的なグラニュールの形成・維持のため、中・高濃度(2-10 gCOD_{cr}/L)有機性排水への適用に限定される場合が多い^{4,5}。しかし、実際に多くの産業排水、あるいは生活排水は低濃度(0.3-1.0 gCOD_{cr}/L)で排出されており、水温も平均で20℃程度と低い⁶。

低濃度排水の無加温処理にUASB法を適用した場合、メタン生成古細菌の不活性化、生成ガスが少ないことによる汚泥床の物理的攪拌不足や水の粘性増加による汚泥と排水(基質)との接触効率の低下といった問題が指摘されている。そのため、低温条件での嫌気性排水処理の実施例は少なく、微生物叢に関する知見もわずかである。

我々は、これまでにExpanded Granular Sludge Bed (EGSB)法で低濃度人工排水の20℃以下での処理試験を行い、保持汚泥中には中温・中高濃度排水で優占的に存在する*Methanosaeta*属、*Methanobacterium*属に加え、水素資化性メタン生成古細菌である*Methanospirillum*属が存在することを確認した^{7,8}。

本研究では、低温メタン発酵処理槽(EGSB)内での、優占メタン生成古細菌の動態と装置の運転温度や保持汚泥の活性との関連を調査するため、メタン生成古細菌の16S rDNAと16S rRNAを標的としたReal-time PCR法とFISH解析による定量を行った。

2. 実験方法

(1) 汚泥サンプルの採取

メタン生成古細菌の動態解析, 活性評価には, 運転温度条件の異なる 2 系列の EGSB 反応槽⁹⁾から採取したグラニュール汚泥を用いた。EGSB 反応槽への供給排水には, スクロース, 酢酸, プロピオン酸, 酵母エキスを COD 比で 4.5: 2.25: 2.25: 1 の割合で含む有機物濃度 0.6~0.8 gCOD/L の人工排水 (食品加工工場や飲料製造工場から排出される低濃度排水を想定) を用いた。Run1 EGSB 反応槽は, 水温 20°C で 100 日程度運転を行った後, 水温を 15°C から 5°C まで段階的に低下させ処理を行った。Run2 EGSB 反応槽は, 水温 20°C 一定で長期間処理を行った。Run2 の植種汚泥には糖産業排水の連続処理を行った実規模の UASB 反応槽 (30-35°C) から採取したグラニュールを用い, Run1 については Run2 で 100 日程度処理を行ったグラニュールを植種汚泥として用いた。

メタン生成古細菌の定量条件検討のため *Methanosaeta thermophila*(NBRC 101360), *Methanospirillum hungatei*(NBRC 100197), *Methanobacterium formicicum*(NBRC 100475) の純粋菌株を用いた。培養には嫌気性培地⁹⁾(10 mM NH₄Cl, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂ · 6H₂O, 1 mM CaCl₂ · 2H₂O, 30 mM NaHCO₃, 4 mM acetate) を使用した。

(2) DNA 抽出

純粋菌株からの DNA 抽出には Goldenberger らの方法¹⁰⁾ に準拠した。また, リアクターから採取した解析サンプルからの DNA 抽出には中村らの方法¹¹⁾ を参考に Bead-Beader 法を用いた。抽出した DNA は, Gene Clean Turbo

kit (BIO101) を用いて精製を行った。

(3) RNA 抽出

解析サンプルからの RNA 抽出には Bead-Beader 法を用い, Kang らの方法¹²⁾ に準拠した。以降の作業はキット (RNase-Free DNase Set (50), QIAGEN) に従った。抽出した RNA はキット (TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0, TaKaRa Biomedicals) に従いランダムプライマー (5'-NNNNNNNNN-3') を用いた逆転写反応による cDNA の生成を行った。

(4) PCR プライマーと FISH 用プローブ

研究で用いた各メタン生成古細菌群に特異的な 16S rDNA 及び 16S rRNA の定量に用いた PCR プライマーを表-1 に示す。FISH プローブには各プローブの 5' 末端に Cy3 標識を付加したものをを用いた。本研究で用いたプローブを表-2 に示す。本研究で開発した PCR プライマーと FISH 用プローブは純粋菌株を用いて最適条件を検出した。

(5) FISH 法

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法は Amann 等の方法¹³⁾ に準じて実験を行った。オリゴプローブは 5' 末端に Cy3 標識を付加したものをを用いた。

(6) Real-time PCR 法

16S rDNA および RNA からランダムプライマーで逆転写した cDNA は Real-time PCR (Smart Cycler System II, Cepheid, TaKaRa Biomedicals) 法によって定量を行った。検出方法には SYBR Green I によるインターカレーター

表-1 実験に用いた PCR プライマー

| Target group | Primer Name | Target site (<i>E.coli</i> position) | Orientation | Primer sequence (5'-3') | References |
|----------------------------------|------------------------|------------------------------------------|-------------|-------------------------|------------|
| <i>Methanospirillum</i> spp | Msp-485F | 16S (0485-0511) | F | CTggTgAAgAAAggCCgg | This study |
| <i>Methanospirillum</i> spp | Msp-496R-m | 16S (0629-0645) | R | CAGTWTCCCCTgAACgCC | This study |
| <i>Methanobacterium</i> | S-F-Mbac-0398-S-a-20 | 16S (0399-0426) | F | CCCAAgTgCCACTCTTAACg | 15 |
| <i>Methanobacterium</i> | Mbac-0540R | 16S (0540-0559) | R | AAyggCCACCCTTgAgCTg | This study |
| <i>Methanosaeta</i> spp. | S-F-Msae-0573-A-a-17 G | 16S (0574-591) | F | CCggCCgATgTCTgggA | 15 |
| <i>Methanosaeta</i> (KuA1, KuA3) | MS827f-R | 16S (0827-0841) | R | ACCgTggCCgACACCTA | 16 |

表-2 実験に用いたプローブ

| Target group | Probe Name | Target site (<i>E.coli</i> position) | Probe sequence (5'-3') | References |
|-----------------------------|------------|------------------------------------------|-------------------------|------------|
| <i>Methanospirillum</i> spp | Msp1425 | 16S (1425-1445) | gATACATCCTCATCAAGACCTC | This study |
| <i>Methanospirillum</i> spp | Msp1614 | 16S (0485-0511) | CTgAACgCCYATCAGTTRAgCCg | This study |
| <i>Methanobacteriales</i> | MB1174 | 16S (1175-1196) | AAyggCCACCCTTgAgCTg | 17 |
| <i>Methanosaeta</i> spp. | MX825 | 16S (0825-0847) | TCgCACCGTggCCgACACCTAgC | 17 |

表-3 Real time-PCR の反応条件

| primer pair | S-F-Msae-0573-A-a-17 G/MS827F-R | | | S-F-Mbac-0398-S-a-20/Mbac-0540R | | | Msp-485F/Msp-496R-m | | |
|--------------------------|---------------------------------|-------|-----|---------------------------------|-------|-----|---------------------|-------|-----|
| primer conc (nM) | 200 | | | 300 | | | 200 | | |
| PCR reaction | (°C) | (sec) | | (°C) | (sec) | | (°C) | (sec) | |
| Denature | 95 | 20 | | 95 | 20 | | 95 | 20 | |
| Denature | 95 | 10 | | 95 | 10 | | 95 | 10 | |
| Anneal | 62 | 15 | *45 | 66 | 15 | *45 | 59 | 15 | *45 |
| Extention | 72 | 10 | | 72 | 10 | | 72 | 10 | |
| Fluorescence measurement | 86 | 6 | | 86.5 | 6 | | 87 | 6 | |

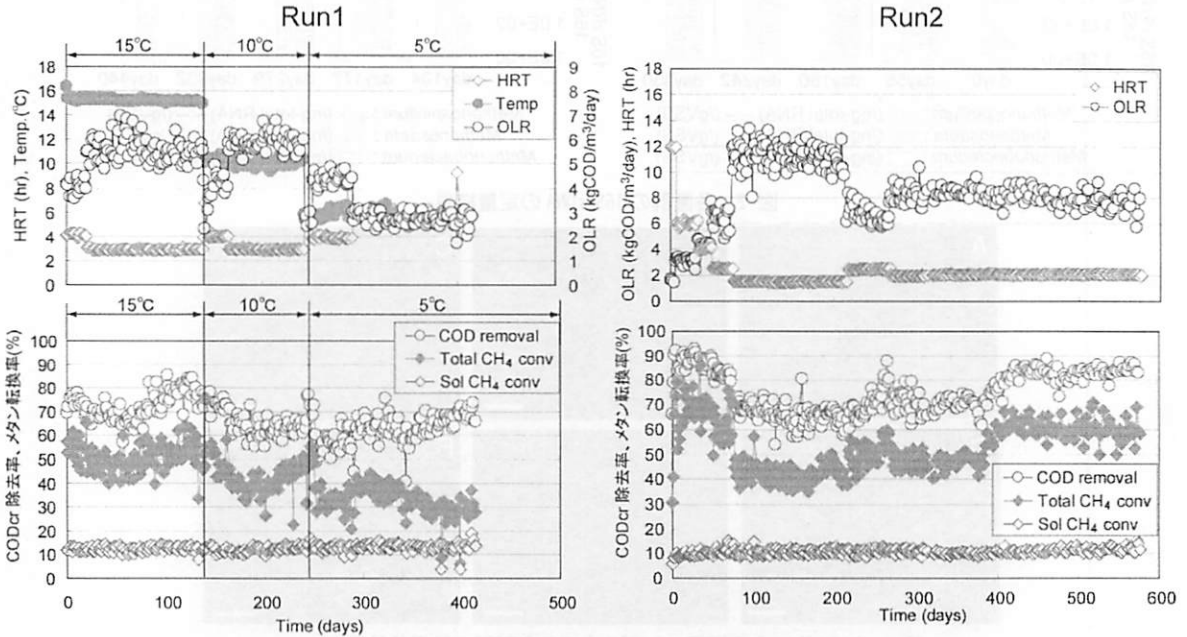


図-1 2系列のESGBによる排水処理の状況

法を用いた。PCR 反応液組成はキット (SYBR *Premix Ex Taq* (Perfect Real Time), TaKaRa Biomedicals) に従った。PCR 条件はアニーリング温度、プライマー添加量、反応時間、蛍光取得温度について検討を行った。反応条件を表-3に示す。

(7) メタン生成活性試験

試験方法については球坪らの方法⁹⁾を参考にした。リアクターから採取した汚泥は窒素気流下で 120 mL バイアル瓶に封入し、20°C、振盪条件でメタン生成活性を測定した。基質には酢酸、 H_2/CO_2 (80:20 (v/v)) を用い、単位汚泥重量当たりのメタン生成速度として評価した。

3. 実験結果及び考察

(1) EGSB 槽の低温下での排水性

Run1, Run2 における排水処理の状況、CODcr 除去率とメタン転換率の経日変化を図-1 に示す。Run1 では、水温 15°C、有機物負荷(OLR: Organic Loading Rate) 6 kgCOD/m³/day での運転において CODcr 除去率 80%、メタンガス転換率 53%を達成した。水温を 10°C に低下後

は処理性能が低下するが、興味深いことにその後処理性能は回復し、10°C 運転期間の後半では、15°C 運転時とほぼ同程度の処理性能を発揮出来た。しかしながら、水温 5°C 運転では、CODcr 除去率を維持するために、有機物負荷を 3 kgCOD/m³/day (15°C、10°C 運転時の半分) に低下させなければならなかった。一方、20°C で長期運転を行った Run2 では、400 日以上での連続運転の結果、有機物負荷 8 kgCOD/m³/day で CODcr 除去率 91%、メタン転換率 60%を達成した。

(2) 優占メタン生成古細菌群の 16S rDNA 定量

水温低下による保持汚泥中の優占メタン生成古細菌の菌数変化を調査するため、EGSB 槽保持汚泥⁷⁾⁸⁾での優占種と判明している *Methanosaeta* 属、*Methanobacterium* 属、*Methanospirillum* 属の 16S rDNA を Real-time PCR 法により定量した。図-2 に Run1 及び Run2 における 3 属の古細菌の単位回収 DNA あたり及び単位 VSS 量あたりの 16S rDNA コピー数の定量結果を示す。Run2 については 0 日目から同条件で連続運転を行っている。単位回収 DNA あたりの 16S rDNA コピー数はバクテリア+古細菌に対する存在割合、単位 VSS 量あたりの 16S rDNA コピー数

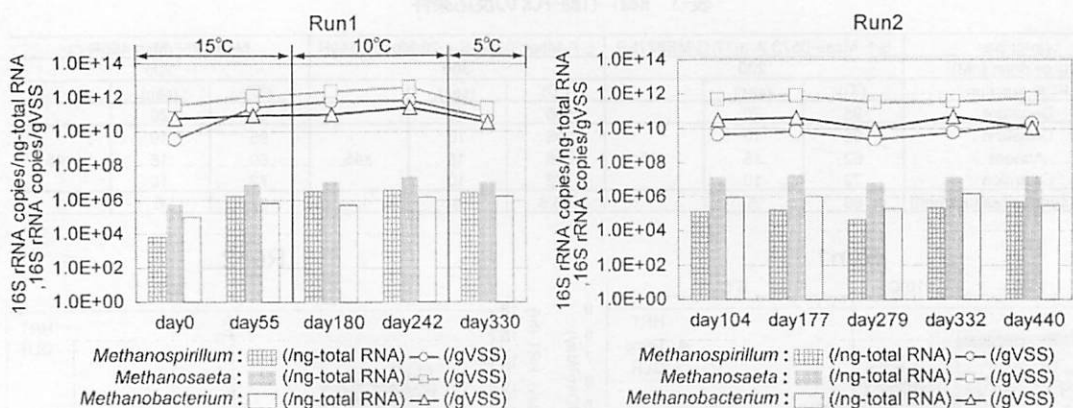


図-2 各菌群の 16S rDNA の定量結果

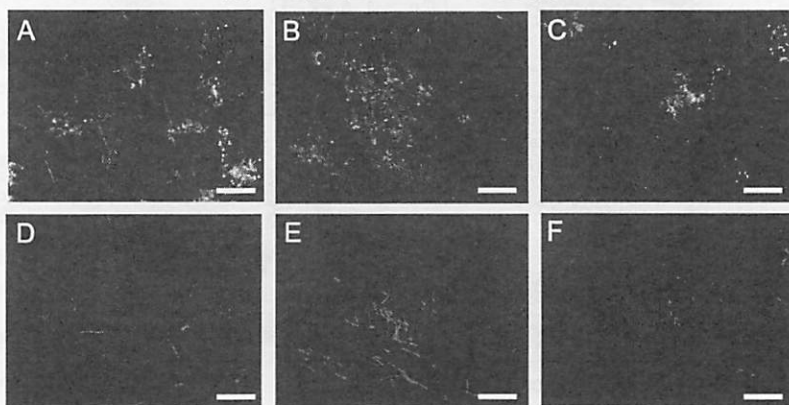


図-3 FISH 法による汚泥サンプル中での各菌群の特異的検出

A, B, C は DAPI による全細菌染色. D: *Methanospirillum* 属, E: *Methanosaeta* 属,
F: *Methanobacterium* 属. A と D, B と E, C と F はそれぞれ同一視野. スケールバーは 5 μ m

は汚泥内の菌数を反映した値である. Run1 では, 15°C で全ての古細菌の 16S rDNA コピー数に増加がみられ, その後は 10°C, 5°C と水温が低下してもわずかに増加傾向にあった. また, *Methanospirillum* 属の 16S rDNA 量は *Methanosaeta* 属及び *Methanobacterium* 属に比較して 2 オーダー程度小さい値であった. 水温 20°C で長期運転を行った Run2 では, Run1 に比較すると 3 属のコピー数はやや少ないものの, ほぼ同じ微増加傾向で, 運転期間を通じて大きな変化は見られなかった. この結果から, 運転水温に関わらず微生物増殖に十分な負荷条件下で有機物がメタンまで良好に分解されていれば汚泥内に優占しているメタン生成古細菌の 16S rDNA コピー数は大きく変動しないことが明らかになった.

(3) 優占メタン生成古細菌群の FISH 解析

16S rDNA コピー数の定量結果を検証するため, Gomezらの方法¹⁹⁾を参考にこれら 3 属の菌群が実際に汚泥内にとどの程度の割合で存在するか FISH 法を用いて確認した. これまでの研究⁸⁾では *Methanospirillum* 属のみについて

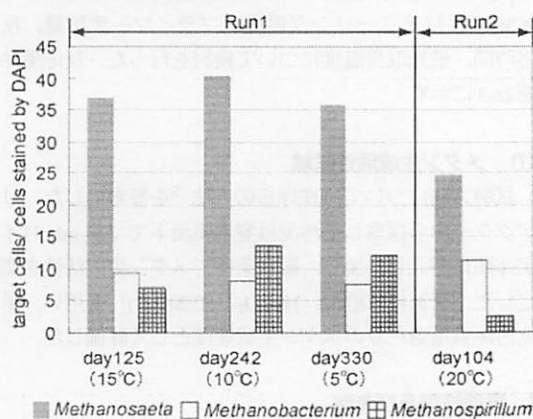


図-4 DAPI 染色細胞に対する
各メタン生成古細菌群の比率

FISH を行ったが, 本研究では *Methanospirillum* 属に加え *Methanosaeta* 属, *Methanobacterium* 属についても FISH 法を実施した. Run1 の運転開始 242 日目のサンプルに FISH 解析を行った際の顕微鏡写真を図-3 に示す. 水温

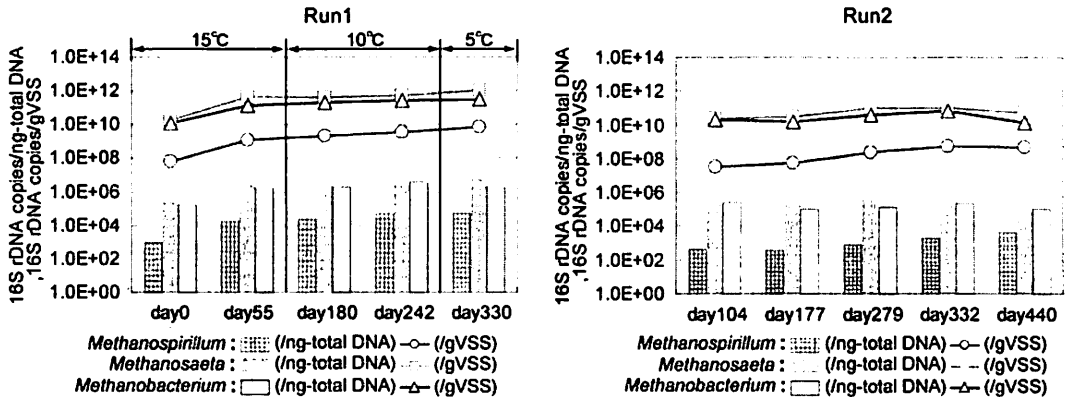


図-5 各菌群の 16S rRNA の定量結果

20°C, 15°C, 10°C, 5°Cの各サンプルを解析したところ、全ての汚泥からそれぞれの菌種に特徴的なシグナルが得られた。図-4に各サンプルの DAPI 染色細胞に対するそれぞれのプローブで検出されたメタン生成古細菌の細胞数の割合を示す。いずれのサンプルも存在割合が圧倒的に大きいものは *Methanosaeta* 属であり、DAPI 染色細胞の約 1/3 を占めていた。一方、水素資化性メタン生成古細菌では、20°C および 15°C で *Methanobacterium* 属が *Methanospirillum* 属よりも大きな値を示したが、10°C および 5°C ではその割合が逆転している。これは、16S rDNA コピー数の計測結果と明らかに異なっている。低温条件下での *Methanobacterium* 属の FISH 解析では蛍光シグナルが微弱だった細胞（カウント出来ず）も多く存在しており、FISH 法では観察できない低活性細胞の存在が示唆された。即ち、Real-time PCR 法による 16S rDNA の定量では FISH 解析では検出できないような低活性もしくは死滅細胞由来の遺伝子も計測し、細菌数が過大評価されたと判断した。また、*Methanospirillum* 属は 16S rDNA コピー数では極めて小さな存在割合であったが、FISH 解析では比較的多くの細胞が確認できた。

(4) 優占メタン生成古細菌種の 16S rRNA 定量

Real-time PCR 法の普及により細菌由来の 16S rDNA の計測は容易に行えるようになったが、前述したように低温条件下で運転するリアクターでは低活性の細胞や溶菌せずに蓄積している死滅細胞の遺伝子数まで計測する危険性がある。16S rDNA コピー数の定量で、Run2 に比較して Run1 の方が大きな値を示した（図-2）が、これは死滅菌体が溶菌せずにリアクター内に蓄積したことも一因と考えられる。そこで、細胞の活性度を反映する¹⁹⁾とされている 16S rRNA の定量^{20)~22)}を行った。Run1 及び Run2 における 3 属の古細菌の単位回収 RNA あたり及び単位 VSS 量あたりの 16S rRNA コピー数の定量結果を図-

5 に示す。水素資化性メタン生成古細菌に着目すると Run1 の運転当初（15°C）及び Run2（20°C）では *Methanobacterium* 属の 16S rRNA コピー数が、*Methanospirillum* 属よりも多いが、Run1 での低水温運転に伴ってコピー数が逆転し *Methanospirillum* 属の優占化が生じた。これは、16S rDNA の解析結果（図-2、*Methanobacterium* 属の 16S rDNA が常に 2 オーダー多い）と大きく異なる。即ち、*Methanobacterium* 属の方が低温下で相対的に一細胞当たりの活性度（16S rDNA 量に対する 16S rRNA 量の割合）が小さいことを示している。これは、低温下では相対的に FISH 解析で検出される *Methanobacterium* 属の細胞が少ないこと（図-4）に対する妥当性を裏付けるものである。一方、*Methanospirillum* 属は 10°C といった低温条件下で活性（16S rRNA 量/16S rDNA 量の比）が増大したことから、好低温性の種が存在するものと考えられる。また図-5 より、Run1 では単位 VSS 量あたりの 16S rRNA コピー数が 10°C 条件でも緩やかに増大しているが、これもこの好低温性 *Methanospirillum* 属の増殖に起因したものと判断できる。Run1 汚泥（10°C 運転時）のクローン解析により、中温性の *Methanospirillum hungatei* とは系統的に異なる *Methanospirillum* 種が汚泥中に集積化したことを確認している²³⁾。

(5) メタン生成活性試験

図-5 より、Run1 汚泥の単位汚泥重量あたりのメタン生成古細菌由来の 16S rRNA コピー数（≒活性度）は、水温 10°C 程度まで大きく減少することがなかった。そこで、酢酸および H₂CO₂ を基質として、至適増殖温度 35°C 条件下で保持汚泥のメタン生成活性を測定した。図-6 に各サンプルのメタン生成活性及び植種グラニュール汚泥の 35°C における活性を 1 とした場合の各サンプルの活性の増大倍率を示す。植種グラニュール汚泥には

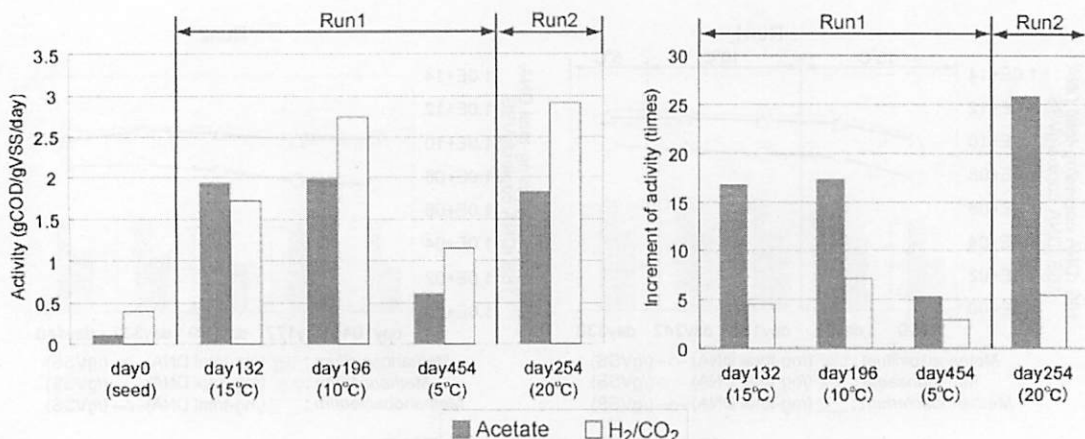


図-6 各サンプルのメタン生成活性（左），
植種グラニュール汚泥に対する各サンプルの活性の増大倍率（右）

Run2に植種したものを使用している。

酢酸資化性メタン生成活性の活性は、いずれの運転温度汚泥試料においても大きく増大した。Run1の10°C馴致汚泥での酢酸資化性メタン生成活性の増加率は15°C馴致汚泥とほぼ同等であり、16S rRNA コピー数の定量と同じ結果であった。温度が低下したにも関わらず活性が減少しなかった原因は不明であるが、*Methanosaeta* 属が低温への耐性を獲得した可能性もある（クローン解析による優占種の変化は確認されなかった）。しかしながら、5°C馴致汚泥では酢酸資化性メタン生成活性は大きく低下した。

水素資化性メタン生成活性の増加率は、20°C馴致汚泥（Run2）と15°C馴致汚泥（Run1）で、同等であるが、低温条件の10°C馴致汚泥で最も大きな増加倍率を示した。5°C馴致汚泥では水素資化性メタン生成活性は低下するものの酢酸資化性メタン生成活性と比較して低下率は低かった。

以上の結果より、水温10°Cまでのメタン生成古細菌の16S rRNA コピー数維持とメタン生成活性の維持が一致することが検証された。特に、水素資化性メタン生成活性については、10°Cで最大増加率を示しており、16S rRNA 量/16S rDNA 量の比が増大した好低温性 *Methanospirillum* 属が活性維持に貢献しているものと考えられる。

4. まとめ

低水温で運転するEGSB反応槽から採取したグラニュール汚泥を試料として、Real-time PCR法による16S rDNAと16S rRNAの定量を行った。さらに、その結果を検証するために、FISH解析とメタン生成活性試験を合

わせて実施した。その結果、低水温条件で運転するメタン発酵槽汚泥には16S rDNAは保存されているものの、FISH解析では検出できなかった。これは低活性の細胞や溶菌しない死滅菌体が汚泥内で蓄積していることが原因と考えられる。したがって、装置内で有機物分解に関わる微生物叢の動態解析を行うには16S rRNAを対象とする必要がある。また、これまで微生物量の指標として用いられてきたVSS量についても、低水温運転時には不活性の細胞が多く存在することを考慮する必要がある。

謝辞

本研究の一部は、産業技術研究助成事業費助成金（NEDO）および国立環境研究所特別研究の補助を受けて実施したものである。

参考文献

- 1) Luostarinen S., Sanders, W., Kujawa-Roeleveld K., Zeeman, G., Effect of temperature on anaerobic treatment of black water in UASB-septic tank systems, *Bioresource Technology* Volume 98, Issue 5, March 2007, Pages 980-986
- 2) Álvarez J.A., Ruiz I., Gómez M., Presas J., Soto M., Start-up alternatives and performance of an UASB pilot plant treating diluted municipal wastewater at low temperature, *Bioresource Technology* Volume 97, Issue 14, September 2006, Pages 1640-1649
- 3) Chin K.-J., Lukow T., Conrad R., Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil, *Applied and Environmental Microbiology* Volume 65, Issue 6, June 1999, Pages 2341-2349
- 4) Rebac S., Van Lier, J.B., Lens P., Stams A.J.M., Dekkers F., Swinkels K.Th.M., Lettinga G., Psychrophilic anaerobic treatment

- of low strength wastewaters, *Water Science and Technology* Volume 39, Issue 5, 1999, Pages 203-210
- 5) Syutsubo K., Harada H., Ohashi A., Suzuki H., An effective start-up of thermophilic UASB reactor by seeding mesophilically-grown granular sludge, *Water Science and Technology* Volume 36, Issue 6-7, 1997, Pages 391-398
 - 6) Yoochatchaval W., Nishiyama K., Okawara M., Ohashi, A., Harada, H., Syutsubo, K., Influence of effluent-recirculation condition on the process performance of expanded granular sludge bed reactor for treating low strength wastewater, *Water Science and Technology* Volume 57, Issue 6, 2008, Pages 869-873
 - 7) Syutsubo K., Yoochatchaval W., Yoshida H., Nishiyama K., Okawara M., Sumino H., Araki N., Harada H., Ohashi A., Changes of microbial characteristics of retained sludge during low-temperature operation of an EGSB reactor for low-strength wastewater treatment, *Water Science and Technology* Volume 57, Issue 2, 2008, Pages 277-281
 - 8) Yoochatchaval W., Tsushima I., Ohashi A., Harada H., Yamaguchi T., Araki N., Syutsubo K., Changes in process performance and microbial characteristics of retained sludge during low-temperature operation of an EGSB reactor, *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* Volume 43, Issue 14, December 2008, Pages 1650-1656
 - 9) Sekiguchi Y., Kamagata Y., Nakamura K., Ohashi A., Harada H., *Syntrophothermus lipocalidus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing anaerobe which utilizes isobutyrate, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* Volume 50, Issue 2, March 2000, Pages 771-779
 - 10) Goldenberger D., Perschil I., Ritzler M., Altwegg M., A simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification, *Genome Research* Volume 4, Issue 6, 1995, Pages 368-370
 - 11) 中村明靖, 荒木信夫, 山口隆司, 山崎慎一, 大橋晶良, 原田秀樹: Real-Time PCR法とCompetitive PCR法を用いた *Nitrosomonas* 属の 16S rDNA 遺伝子及び *amoA* 遺伝子の定量, *環境工学研究論文集* 39, 365-373, 2002
 - 12) Kang S., Denman S.E., Morrison M., Yu Z., McSweeney C.S., An efficient RNA extraction method for estimating gut microbial diversity by polymerase chain reaction, *Current Microbiology* Volume 58, Issue 5, May 2009, Pages 464-471
 - 13) Amann R.L., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A., Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, *Applied and Environmental Microbiology* Volume 56, Issue 6, 1990, Pages 1919-1925
 - 14) Manz W., Amann R., Szewzyk R., Szewzyk U., Stenstrom T.-A., Hutzler P., Schleifer K.-H., In situ identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy, *Microbiology* Volume 141, Issue 1, 1995, Pages 29-39
 - 15) Sawayama S., Tsukahara K., Yagishita T., Phylogenetic description methanogenic community using real-time PCR in a fixed-bed anaerobic digester, *Bioresource Technology* 97 (2006) 69-76
 - 16) Watanabe K., Kodama Y., Hamamura N., Kaku N., Diversity, abundance, and activity of archaeal populations in oil-contaminated groundwater accumulated at the bottom of an underground crude oil storage cavity, *Applied and Environmental Microbiology* Volume 68, Issue 8, 2002, Pages 3899-3907
 - 17) Raskin L., Stromley J.M., Rittmann B.E., Stahl D.A., Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens, *Applied and Environmental Microbiology* Volume 60, Issue 4, 1994, Pages 1232-1240
 - 18) Gomec C., Letsiou I., Ozturk I., Eroglu V., Wilderer P., Identification of Archaeal population in the granular sludge of an UASB reactor treating sewage at low temperatures, Volume 43, Issue 13 SPEC. ISS., November 2008, Pages 1504-1510
 - 19) Gonzalez I.L., Sylvester J.E., Incognito rRNA and rDNA in databases and libraries, *Genome Research* Volume 7, Issue 1, 1997, Pages 65-70
 - 20) Glynn B., Application of two-step quantitative reverse-transcription PCR to bacterial diagnostics, *Methods in molecular biology* (Clifton N.J.) Volume 345, 2006, Pages 97-109
 - 21) Fronhoffs S., Totzke G., Stier S., Wernert N., Rothe M., Brüning T., Koch B., Sachinidis A., Vetter H., Ko Y., A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction, *Molecular and Cellular Probes* Volume 16, Issue 2, 2002, Pages 99-110
 - 22) Gibson U.E.M., Heid C.A., Williams P.M., A novel method for real time quantitative RT-PCR, *Genome Research* Volume 6, Issue 10, 1996, Pages 995-1001
 - 23) Pfaffl M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic acids research* Volume 29, Issue 9, 1 May 2001, Pages e45

(2009.5.22受付)

Changes in Methanogenic Populations During Low Temperature Operation of an Expanded Granular Sludge Bed Reactor

Masaru FURUKAWA¹, Nobuo ARAKI², Masataka AOKI²,
Ikuo TSUSHIMA³, Kazuaki SYUTSUBO³, Wilasinee Yoochatchaval³,
Yueqin Fang³ and Takashi YAMAGUCHI¹

¹Dept. of Environmental System Engineering, Nagaoka University of Technology

²Dept. of Civil Engineering, Nagaoka National College of Technology

³Water and Soil Environmental Division, National Institute for Environmental Studies

Predominant three genera of methanogenic archaea such as *Methanosaeta*, *Methanobacterium* and *Methanospirillum* were monitored by quantification of 16S rDNA and 16S rRNA during low temperature operation of an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. The rDNA quantification of the methanogenic genera was overestimated due to existing of a large number of dead cells or low active cells in order to low cell lysis at the temperature under 20°C. Therefore, monitoring technology was necessary to target for 16S rRNA to analyze microbial community structure and gene quantification in the sludge from processes operated under a low temperature condition. *Methanospirillum* became predominant species in place of *Methanobacterium* as a hydrogenotrophic methanogen in the condition less than 20°C.