生物学的リン除去機能の発現過程における 嫌気好気回分式活性汚泥のキノンプロファイル解析

藤田 昌史* 古米 弘明** 中島 典之**

Quinone Profile Analysis of Activated Sludge during Start-up Phase in Anaerobic/Oxic Sequencing Batch Reactor

Masafumi FUJITA*, Hiroaki FURUMAI** and Fumiyuki NAKAJIMA**

* Department of Civil and Environmental Engineering, University of Yamanashi, 4-3-11 Takeda, Kofu, Yamanashi 400-8511, Japan

** Department of Urban Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8656, Japan

Abstract

A bench-scale anaerobic/oxic sequencing batch reactor (SBR) was operated for 35 days with peptone and acetate fed as carbon sources during the start-up phase. In order to find quinone biomarkers representing bacteria that play important roles in priming the enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process, the time variations of 12 quinone species and EBPR activities were quantitatively compared in the SBR. Both phosphate release rate and specific phosphate release rate increased at the beginning of the operation and reached maximum on the 21st day. It was interpreted kinetically that the concentration of phosphate-accumulating organisms (PAOs) in the reactor and the fractional percentage of PAOs in the sludge increased in the first 21 days. Only MK-10 showed a good correlation with EBPR activity through out this period, and therefore, MK-10 could be a candidate biomarker. Since Q-9 and MK-7 showed good correlations only in the first seven days, these two quinone species may be present in bacteria that play certain roles during the early phase of EBPR development.

Key words: activated sludge, enhanced biological phosphate removal; EBPR, quinone profile, anaerobic/oxic sequencing batch reactor; A/O SBR

1. はじめに

化学分類学的あるいは分子生物学的な手法が利用されることにより、活性汚泥の微生物群集構造が、次第に明らかになりつつある。特に化学分類学的な手法のひとつであるキノンプロファイル法¹⁾は、他の手法に比べて定量性に優れていることから²⁾、土壌試料³⁾など廃水処理系以外の微生物群集の解析にも利用されている。

Hiraishiら¹⁾は、いち早くキノンプロファイル法を活性汚泥に適用した。廃水の種類や処理方式によらず、活性汚泥にはユビキノン (Q-n) とメナキノン (MK-n) が存在することや、前者の方が後者よりも高い存在比を占めることを明らかにした⁴⁾。また、生物学的リン除去機能が明らかに異なる嫌気好気活性汚泥と標準活性汚泥のキノンプロファイルと比較したところ、両者の微生物群集構造に実質的な違いは認められなかったことも報告している⁵⁾。さらに、活性汚泥微生物群集構造の形成には、流入下水組成が運転操作条件よりも大きく影響することも報告している⁶⁾。

Okadaら⁷⁾は、酢酸基質で長期間馴致した嫌気好気回分式

活性汚泥に、人為的な外乱を与えることにより生物学的リン除去活性が低下していく過程や外乱を止めた後に回復していく過程を、キノンプロファイル法により追跡した。その結果、生物学的リン除去活性の消長とQ-9の変化が対応していたことを報告している。

Linら⁸⁾は、酢酸基質、ミルクパウダー／グルコース基質、ペプトン基質および酵母エキス／グルコース基質の人工下水をそれぞれ用いて、嫌気好気回分式活性汚泥運転を行った。生物学的リン除去活性とキノンプロファイルとの関係を4ケースのデータをまとめて調べたところ、Okadaら⁷⁾により報告されているQ-9に加えてMK-10が、生物学的リン除去活性と相関が見られたことを報告している。

一方、Furumaiら⁹⁾は、人工下水ではなく酢酸を添加した都市下水を用いて嫌気好気回分式活性汚泥運転を行った。そして、生物学的リン除去活性が安定した後、酢酸添加量を段階的に削減して、生物学的リン除去活性が低下していく過程をキノンプロファイル法により追跡した。生物学的リン除去活性とキノンプロファイルとの関係を調べたところ、MK-7およびMK-8 (H4)が生物学的リン除去活性の変

* 山梨大学大学院医学工学総合研究部 〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11

** 東京大学大学院工学系研究科 〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1

化と対応していたことを報告している。

既存の研究報告⁷⁻⁹⁾では、生物学的リン除去活性の変化と同様の挙動を示したキノン種が異なっている。また、近年、ポリリン酸蓄積細菌群の一種として注目されている *Rhodocyclus* 属の近縁種¹¹⁻¹⁴⁾は、*β-Proteobacteria* に属することから Q-8 を含有すると考えられるが、その存在比が大きいこともあり、生物学的リン除去活性との対応が明確には観察されていない。したがって、統一的な見解が得られていない現状にある。

そこで本研究では、生物学的リン除去機能の発現過程に着目し、ペプトン／酢酸基質の人工下水を用いて、嫌気好気回分式活性汚泥法によるスタートアップ実験を行い、微生物群集構造の時系列的な変化をキノンプロファイル法により追跡した。そして、生物学的リン除去活性とキノンプロファイルとの関係を定量的に調べることににより、生物学的リン除去機能の発現過程において重要な役割を果たす微生物群のキノンバイオマーカーを検討した。

2. 実験および解析方法

2.1 種汚泥

食堂廃水および尿尿を処理していた二槽式間欠曝気装置¹⁵⁾から採取した活性汚泥を、生物学的リン除去機能を消失させるために約3ヶ月間空曝気したものを種汚泥として用いた。後述するリン放出活性試験を行ったところ、この種汚泥には生物学的リン除去活性がほとんど認められなかったことが確認されている¹⁶⁾。

2.2 回分式活性汚泥装置の運転方法

回分式活性汚泥装置として、有効容量100lの角型反応槽を用いて、6時間サイクルで嫌気好気運転を行った。各工程の時間配分は、流入・攪拌工程を1時間、攪拌工程を1時間、曝気工程を3時間、沈殿工程を0.6時間、排水工程を0.4時間に設定した¹⁶⁾。曝気工程では、反応槽内の溶存酸素濃度を $2.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ に制御した。また、サイクルを通じて水温を 20°C に制御した。SRTを15日に設定して、曝気工程終了直前に余剰汚泥の引抜きを行った。原水には、Table 1に示したペプトン／酢酸基質の人工下水を用いた。

2.3 リン放出活性の評価方法

N_2 ガスで十分に曝気した水道水に酢酸ナトリウムおよび重曹を、それぞれ $1300 \text{ mg} \cdot \text{COD} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{HCO}_3 \cdot \text{l}^{-1}$ となるように加えたものを、リン放出活性試験液とした。それに、曝気工程終了直前に採取した洗浄済みの汚泥を合わせて三角フラスコに入れ、密栓した。そして、水温を 20°C に設定した恒温水槽中に浸し、マグネティックスターラーで攪拌を始め、リン放出活性試験を開始した。所定の時間毎に混合液を採取し、リン酸¹⁷⁾の分析を行った。試験開始後、リン酸濃度は直線的に上昇し、その後飽和値

に達する⁹⁾。本研究では、リン酸濃度が直線的に増加している部分に着目して、その直線の傾きをリン放出速度 ($\text{mg} \cdot \text{P} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$) と定義した。また、その傾きをあらかじめ分析しておいた MLVSS¹⁷⁾ で除したものを、比リン放出速度 ($\text{mg} \cdot \text{P} \cdot \text{g} \cdot \text{VSS}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$) と定義した。動力学的には、リン放出速度の変化は生物学的リン除去を担うポリリン酸蓄積細菌群の存在量の変化を、比リン放出速度の変化は活性汚泥全体に占めるポリリン酸蓄積細菌群の存在比の変化をそれぞれ間接的に表現しているものと見なされる。

2.4 キノンプロファイル法

2.4.1 分析方法

クロロホルム・メタノール溶液 (2:1, v/v) とヘキサンを順次用いて活性汚泥からキノンを含む脂溶性成分を抽出した。この抽出物を固相抽出カートリッジ (Waters社, Sep-Pak Silica) に吸着させ、2% (v/v) および 10% (v/v) のジエチルエーテル・ヘキサン溶液を用いて、メナキノンおよびユビキノンをそれぞれ分離・精製した³⁾。アセトンに溶媒置換した後、高速液体クロマトグラフィー (Waters社, HP-1100) により、ユビキノンおよびメナキノンの各分子種を分離・定量した。各キノン種の同定には ENIU 値⁴⁾ およびフォトダイオードアレイ検出器から得られるスペクトログラムを参考にした。定量には、ユビキノンについては、Q-10の標準品 (WAKO社) を用いた。メナキノンについては、その分子吸光係数を考慮することで、標準品の Q-10 濃度から換算した。

2.4.2 微生物群集構造の遷移過程の評価方法

キノンプロファイルの遷移過程を定量的に評価するために、非類似度⁴⁾を算出した。そして、サンプル間の類似性をデンドログラムで視覚的に表現するために、算出した非類似度をもとにグループ間平均連結法 (UPGMA法) によりクラスター解析を行った。

3. 結果および考察

3.1 実験経過

スタートアップ実験の期間は、下水投与開始から35日目までとした。処理水のリン酸濃度および汚泥のリン含有率の変化を Fig. 1 に示した。運転開始直後における処理水のリン酸濃度は $3.9 \text{ mg} \cdot \text{P} \cdot \text{l}^{-1}$ を示したが、7日目では $1.2 \text{ mg} \cdot \text{P} \cdot \text{l}^{-1}$ にまで減少していた。運転開始から7日目までの間に、生物学的リン除去機能が発現したものと考えられる。実験の経過とともに処理水のリン酸濃度は減少し、21日目では完全にリンが除去されていた¹⁶⁾。

運転期間中の MLVSS は、 $1100 \sim 1450 \text{ mg} \cdot \text{VSS} \cdot \text{l}^{-1}$ の範囲にあった。そして、汚泥のリン含有率は、運転開始直後に 3.6% を示したが、実験の経過とともに増加し続け、実験終

Fig. 1 Effluent $\text{PO}_4\text{-P}$ and P-content in sludge

Table 1 Composition of synthetic wastewater

Components	Conc. ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	Water quality	Conc. ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)
Peptone	140	COD_{Cr}	300
CH_3COONa	140	TOC	115
CH_3COOH	10	T-P	8
KH_2PO_4	25	$\text{PO}_4\text{-P}$	6
NaCl	100	T-N	34
NaHCO_3	150	$\text{NH}_4\text{-N}$	15
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	70	$\text{NO}_3\text{-N}$	0

了時の35日目には5.2%にまで達していた。

また、運転開始直後の処理水にはアンモニア性窒素が約13 mg-N・l⁻¹残存していたものの、14日目以降はまったく検出されず、硝酸性窒素が約7 mg-N・l⁻¹残存していた。このことから、14日目以降は硝化が十分に行われていたと言える。一方、処理水のDOCについては、運転開始直後には34 mg-C・l⁻¹であったが、14日目以降は3 mg-C・l⁻¹程度にまで低下していた。

3.2 リン放出活性の変化

リン放出活性試験の結果から算出したリン放出速度および比リン放出速度の変化をFig. 2に示した。

実験開始後からリン放出速度および比リン放出速度が、それぞれ増加し続けていた。そして、処理水のリン酸濃度がゼロに達した21日目では、実験期間のなかでそれぞれ最も高い速度を示した。35日目には、いずれの速度も減少していたが、Fig. 1に示したように、汚泥のリン含有率が21日目以降も増加していたことから、ポリリン酸蓄積細菌群の存在量や活性汚泥に占めるその存在比が減少したとは考えにくい。一方でFig. 1に示したように、処理水リン酸濃度も若干増加していたことから、理由は不明であるが35日目の活性汚泥には本来の生物学的リン除去活性を十分に発揮できない要因が存在していたものと考えられる。しかしながら、少なくとも実験開始日から21日目までの間に、ポリリン酸蓄積細菌群の存在量が増加したとともに、活性汚泥に占める存在比も同時に増加したと動力学的に解釈できるものと考えられる。

3.3 活性汚泥微生物群集構造の変化

3.3.1 キノン存在量の変化

実験期間において検出された各キノン種の存在量の変化をFig. 3に示した。

実験の経過とともに、ほとんどのキノン種の存在量が増加していたが、特にQ-8およびMK-10ではその傾向が顕著に見られた。本実験で用いた種汚泥は約3ヶ月間空曝気していたことから、飢餓状態にあったものと予想されるが、実験開始とともに十分な基質が与えられた状態になったことから、菌体増殖が活発に行われたものと考えられる。そのため、ほとんどのキノン種の存在量が増加していたものと考えられる。

3.3.2 キノン存在比の変化

実験期間におけるキノン存在比の変化をFig. 4に示した。種汚泥のユビキノンおよびメナキノンの優占分子種は、それぞれQ-8およびMK-10であった。MK-10は、MK-9 (H4)と誤同定されやすいことが報告されているが⁴⁾、本研究ではENIU値が10.1と見積もられたことから、このキノン種をMK-10と判断した。約3ヶ月間、飢餓状態にあった種汚泥には、MK-10を持つ微生物群が、他のキノン種を持つ微生物群よりも相対的に多く存在することとなり、そのため、

Fig. 2 P-release rates and specific P-release rates

本実験では、優占分子種としての報告^{1, 4~6)}のないMK-10が優占していたものと推測される。

Fig. 3に示したように、実験開始後7日目では、種汚泥には存在しなかったQ-9が検出された。同時に、MK-7およびMK-10の存在比は、他のキノン種よりも相対的に大きく増加していた。実験期間のなかで最も高い生物学的リン除去活性を示した21日目における優占キノン種の順序は、ユビキノンではQ-8>Q-10>Q-9、メナキノンではMK-10>MK-7>MK-8 (H4)であった。そして、21日目以降もこれらの順序は変わることはなかった。

本実験におけるユビキノンの優占種の順序は、ペプトン/酢酸基質で馴致した嫌気好気回分式活性汚泥のキノンプロファイルを調べたHiraishiら¹⁸⁾の結果と一致した。一方、メナキノンについては、飢餓状態にあった種汚泥の影響もあり、過去のMK-8 (H4)>MK-7>MK-8の順序になるという報告とは異なった。

3.3.3 非類似度解析

キノンプロファイルの遷移過程を定量的に評価するためにクラスター解析を行った (Fig. 5)。

得られたデンドログラムは、実験開始日と7日目で形成されたクラスターと14日目から35日目までのサンプルで形成されたクラスターの2つに大別された。この2つのクラスターは、非類似度が0.31で連結されていたことから、Hiraishiら⁴⁾によって提案されている非類似度の解釈の基準により、両者の微生物群集構造は大きく異なっていたと解釈される。一方、14日目から35日目までのサンプルは、非

Fig. 3 Quinone concentrations in A/O SBR activated sludge

Fig. 4 Quinone profile in A/O SBR activated sludge

Fig. 5 Dendrogram showing fractional quinone changes

類似度が0.1以下でクラスターが形成されていた。また、28日目と35日目とは非類似度が0.05と計算され、実験期間のなかで最も小さい値を示していた。したがって、上記の基準⁴⁾により、14日目以降は実質的な微生物群集構造の変化は起こらなかったと判断される。

14日目から21日目にかけて、リン放出速度や比リン放出速度が増加していたことから、動力学的にはこの間もポリリン酸蓄積細菌群の存在量は増加したものと見える。しかしながら、活性汚泥全体の微生物群集構造が実質的に変化しと解釈されるほどではなかったと判断される。

本実験では飢餓状態の種汚泥を用いたことから、実験開始後の微生物群集の遷移過程には、飢餓状態から十分な栄養が与えられた状態への遷移と嫌気工程導入による遷移の両者が含まれていたと考えられるが、キノンの存在比に基づいた微生物群集構造の観点では、いずれの遷移も14日目までには終了していたものと判断される。言い換えると、生物学的リン除去機能を発現し得る微生物群集構造は、14日目までに形成されていたものと推測される。

3.3.4 生物学的リン除去活性の挙動と対応するキノンバイオマーカーの検討

(1) キノン存在量に着目した検討

実験期間にわたって測定したリン放出活性とキノンプロファイルとの関係を調べることで、本研究の目的である生物学的リン除去活性の増加過程で重要な役割を果たす微生物群のキノンバイオマーカーを探索することを試みた。

まず、生物学的リン除去活性と各キノン種の存在量との関係を定量的に調べた (Fig. 6)。本検討では、キノン存在量に着目することから、動力学的にはポリリン酸蓄積細菌群の存在量を間接的に表現していると考えられるリン放出速度を、生物学的リン除去活性の指標として用いた。

Fig. 2に示したように、実験開始日から14日目にかけてリン放出速度が直線的に増加していたことから、この間に生物学的リン除去機能の発現に係わる微生物群も増殖したという相互関係が想定される。したがって、これらの微生物群が持つキノン種も同様に増加したものと考えられる。しかしながら、MK-8およびMK-11には、このような傾向はまったく見られなかった。MK-10 (H2), MK-10 (H4) およびMK-11 (H2)は、増加傾向は見られたものの、既に生物学的リン除去活性が認められていた7日目に検出されていなかったことから、目的とするバイオマーカーにはなり得ないと判断した。検出された12種類のキノン種のうち、残ったQ-8, Q-9, Q-10, MK-7, MK-8 (H4), MK-9 (H2) およびMK-10の合計7種類のキノン種には、上述したような関係が見られた。

(2) キノン存在比に着目した検討

前述したように、実験開始とともにほとんどのキノン種の存在量が増加していたことから、前項で絞り込まれた7種類のキノン種のなかには、生物学的リン除去には何ら関係しないにもかかわらず、単にリン放出速度と同様の増加傾向を示しただけのものが含まれている可能性が考えられる。

Fig. 6 Relationship between quinone concentrations and P-release rates

Fig. 7 Relationship between quinone fractions and specific P-release rates

そこで次に、この7種類のキノン種について、キノン存在比と生物学的リン除去活性との関係を定量的に調べた (Fig. 7)。本検討では、キノン存在比に着目することから、ポリリン酸蓄積細菌群の存在比を動力学的に表現していると考えられる比リン放出速度を、生物学的リン除去活性の指標として用いた。

比リン放出速度は実験開始から14日目にかけて直線的に増加していたことから、目的とするバイオマーカーであれば、この間に正の相関が見られるものと考えられる。この条件を完全に満たしたのはMK-10だけであった。Q-9およびMK-7は、7日目から14日目にかけては増加傾向が見られなかったが、実験開始日から7日目にかけては上述したような相関が認められた。したがって、Q-9およびMK-7は、生物学的リン除去機能の発現に係わりを持つ微生物群のキノン種である可能性がある。これら以外のキノン種については、明らかに何の関係も見られなかった。

本実験では嫌気工程を有しない対照系を設けていないため、実験開始後の微生物群集構造の変化が、嫌気工程導入だけに依存しているかどうかについては明確な判断が困難であるが、導き出された3種類のキノン種のうち、Q-9およびMK-10については、Linら⁸⁾の報告と同様の結果となった。一方、MK-7については、過去に著者ら^{9, 10)}によって見出されたキノン種と一部共通していた。これらのキノン種が、ポリリン酸蓄積細菌群を直接指示し得るかどうかについては明らかではないが、有機物の嫌気発酵反応を含む生物学的リン除去機能の発現過程に係わりを持つ微生物群のバイオマーカーとなり得る可能性がある。

本研究に加え既存の報告^{8, 9)}では、検出されたすべてのキノン種と生物学的リン除去との関係を調べているが、キノン分析の精度を考慮すると、存在比の非常に低いキノン種のデータについては再現性に懸念が生じる。しかしながら、今回のように時系列データを解析対象にしていることや見出されたバイオマーカーが別の実験系^{8~10)}でも報告されていることから、これらのキノン種の増加と生物学的リン除去機能の発現には係わりがあるものと推察される。

4. まとめ

ペプトン／酢酸系人工下水を用いて、嫌気好気回分式活性汚泥法によるスタートアップ実験を行った。ポリリン酸

蓄積細菌群に限らず、生物学的リン除去機能の発現過程において重要な役割を果たす微生物群のバイオマーカーを見出すことを目的として、リン放出活性とキノンプロファイルとの関係を定量的に調べた。その結果、以下のことが明らかとなった。

1) リン放出速度および比リン放出速度が、実験開始後から増加し続け、21日目にはそれぞれ最も高い速度を示した。この間に、ポリリン酸蓄積細菌群の存在量が増加したとともに、活性汚泥に占める存在比も同時に増加していたものと動力学的には解釈された。

2) 検出された12種類のキノン種のうちMK-10だけが、実験開始から21日目にかけて、リン放出速度および比リン放出速度との相関が見られたことから、生物学的リン除去機能に重要な役割を持つ微生物群のバイオマーカーとなる可能性がある。

3) Q-9、MK-7は、実験開始から7日目までに上記の相関が見られたことから、生物学的リン除去機能の発現に係わりを持つ微生物群のキノン種である可能性が示された。

謝 辞

本研究で用いた100/規模回分式活性汚泥装置は、(株)富士電機総合研究所からお借りした。また、同社の古屋勇治氏、佐々木康成氏からは本論文をまとめるにあたり、貴重なご意見をいただいた。ここに、深甚なる謝意を表する。

(原稿受付 2003年 4月28日)

(原稿受理 2003年12月27日)

参 考 文 献

- 1) Hiraishi, A., Hoshino, Y. and Kitamura, H. (1984) Isoprenoid quinone composition in the classification of *Rhodospirillaceae*, *Journal of General and Applied Microbiology*, **30**, 197-210.
- 2) 栗栖太, 佐藤弘泰, 味埜俊, 松尾友矩 (1999) 食用油を添加した高温接触酸化処理におけるFISH法・キノンプロファイル法・PCR-DGGE法を用いた微生物群集の解析, *土木学会論文集*, VII-13(636), 23-33.
- 3) Fujie, K., Hu, H.-Y., Tanaka, H., Urano, K., Saitou, K. and Katayama, A. (1998) Analysis of respiratory quinones in soil for characterization of micro biota, *Soil Science and Plant Nutrition*, **44**(3), 393-404.
- 4) Hiraishi A., Morishima, Y. and Takeuchi, I. (1991) Numerical analysis

- of lipoquinone patterns in monitoring bacterial community dynamics in wastewater treatment system, *Journal of General and Applied Microbiology*, **37**, 57-70.
- 5) Hiraishi, A., Masamune, K. and Kitamura, H. (1989) Characterization of the bacterial population structure in an anaerobic-aerobic activated sludge system on the basis of respiratory quinone profiles, *Applied and Environmental Microbiology*, **55**(4), 897-901.
 - 6) Hiraishi, A., Ueda, Y. and Ishihara, J. (1998) Quinone profile of bacterial communities in natural and synthetic sewage activated sludge for enhanced phosphate removal, *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(3), 992-998.
 - 7) Okada, M., Lin, C.-K., Katayama, Y. and Murakami, A. (1992) Stability of phosphorus removal and population of Bio-P-Bacteria under short term disturbances in sequencing batch reactor activated sludge, *Water Science and Technology*, **26**(3-4), 483-491.
 - 8) Lin, C.-K., Katayama, Y., Hosomi, M., Murakami, A. and Okada, M. (2000) The relationship between isoprenoid quinone and phosphorus removal activity, *Water Research*, **34**(14), 3607-3613.
 - 9) Furumai, H., Fujita, M. and Nakajima, F. (2001) Quinone profile analysis of activated sludge in enhanced biological P removal SBR treating actual sewage, *Advances in Water and Wastewater Treatment Technology*, Edited by Matsuo, T., Hanaki, K., Satoh, H., Elsevier, 165-174.
 - 10) 藤田昌史, 古米弘明, 中島典之 (2002) ショ糖溶液を用いて比重分画した実下水処理リン除去汚泥のキノンプロファイル解析, 水環境学会誌, **25**(12), 757-761.
 - 11) 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, *Systematic and Applied Microbiology*, **22**, 454-465.
 - 12) 小貫元治, 佐藤弘泰, 味埜俊 (2000) PCR-DGGE法による嫌気好気汚泥の微生物群集解析, 環境工学研究論文集, **37**, 9-16.
 - 13) Crocetti, G. R., Hugenholtz, P., Bond, P., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D. and Blackall, L. L. (2000) Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design 16S rRNA-directed probes for their detection and quantification, *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(3), 1175-1182.
 - 14) Mino, T. (2000) Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal, *Biochemistry (Moscow)*, **65**(3), 341-348.
 - 15) 佐々木康成, 津村和志, 山本康次, 大地佐智子 (1995) 窒素・リン同時除去を目的とした2槽式間欠曝気活性汚泥法の原理と処理性能について, 下水道協会誌, **32**(385), 49-58.
 - 16) 古屋勇治, 佐々木康成, 古米弘明 (1999) 回分式活性汚泥法のスタートアップ実験における硝化及び脱リン活性の変化, 下水道協会誌, **6**(443), 99-111.
 - 17) 日本下水道協会 (1997) 下水試験方法 (上巻) .
 - 18) Hiraishi, A. and Morishita, Y. (1990) Capacity for polyphosphate accumulation of predominant bacteria in activated sludge showing enhanced phosphate removal, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **69**(6), 368-371.