

学位論文

分子生物学的手法及び分離培養法を用いた
鉄鋼排水処理活性汚泥中の
嫌氣的フェノール分解細菌の解明

Molecular and culture-dependent analyses of anaerobic phenol-degrading
bacteria in activated sludge treating synthetic steel industry wastewater

東京大学大学院新領域創成科学研究科社会文化環境学専攻

末岡 一男

目次

| | |
|--|-----------|
| 第1章 研究の背景と目的 | 1 |
| 1.1 研究の背景 | 1 |
| 1.2 研究の目的 | 2 |
| 1.3 論文の構成 | 3 |
| 第2章 既往の知見 | 5 |
| 2.1 安水の物理化学的処理法及び生物学的処理法 | 5 |
| 2.1.1 安水処理システム | 5 |
| 2.1.2 生物学的処理法の種類と特徴 | 6 |
| 2.1.3 安水の生物学的処理法 | 9 |
| 2.2 安水処理活性汚泥に生息する微生物 | 11 |
| 2.3 フェノール分解細菌 | 12 |
| 2.3.1 好氣的フェノール分解細菌 | 12 |
| 2.3.2 嫌氣的フェノール分解細菌 | 13 |
| 2.4 分子生物学的手法 | 18 |
| 2.5 Stable Isotope Probing (SIP) 法 | 24 |
| 2.5.1 SIP法の特徴と近年の動向 | 25 |
| 2.5.2 SIP法の発展 | 26 |
| 2.6 分離培養法 | 31 |
| 2.6.1 微生物の発見と微生物学の歴史 | 31 |
| 2.6.2 培養されている細菌と培養されていない細菌 | 33 |
| 2.6.3 分離培養法とその発展 | 35 |
| 第3章 研究手法 | 43 |
| 3.1 供試試料 | 43 |
| 3.2 RNA-stable isotope probing (SIP) 法 | 51 |
| 3.2.1 対象生物の安定同位体元素による標識 | 51 |
| 3.2.2 RNA抽出 | 51 |
| 3.2.3 DNase処理 | 52 |
| 3.2.4 RNA定量 | 53 |
| 3.2.5 超遠心溶媒の作成 | 54 |
| 3.2.6 超遠心を用いたRNAの浮遊密度による分画 | 57 |
| 3.2.7 超遠心溶媒の分画・回収 | 60 |
| 3.2.8 各分画の浮遊密度の決定 | 63 |
| 3.2.9 各分画からのイソプロ沈殿によるRNA回収 | 64 |
| 3.2.10 RT-PCR法による16S rRNAの増幅 | 64 |
| 3.2.11 T-RFLP解析 | 65 |
| 3.2.12 クローニング解析とシーケンシング解析 | 66 |
| 3.2.13 フェノール分解細菌の特定 | 67 |
| 3.3 分離培養法 | 69 |
| 3.3.1 サンプル採取 | 69 |
| 3.3.2 培地の選択 | 69 |
| 3.3.3 培養条件 | 69 |
| 3.3.4 分離株の獲得と顕微鏡観察 | 70 |

| | | |
|---|------------------------------|------------|
| 3.4 | 水質分析法 | 71 |
| 3.4.1 | フェノール定量法 | 71 |
| 3.4.2 | 硝酸塩定量法 | 71 |
| 3.4.3 | 亜硝酸塩定量法 | 72 |
| 3.4.4 | pH測定法 | 72 |
| 第4章 嫌氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定 | | 73 |
| 4.1 | はじめに | 73 |
| 4.2 | 実験方法 | 73 |
| 4.2.1 | 活性汚泥の嫌気培養 | 73 |
| 4.2.2 | 水質分析 | 75 |
| 4.2.3 | RNA-SIP法 | 75 |
| 4.3 | 結果 | 76 |
| 4.3.1 | 活性汚泥の嫌気培養 | 76 |
| 4.3.2 | T-RFLP解析 | 76 |
| 4.3.3 | クローニング解析とシーケンシング解析 | 87 |
| 4.4 | 考察 | 91 |
| 4.4.1 | 硝酸塩存在下での嫌氣的フェノール分解 | 91 |
| 4.4.2 | 嫌氣的フェノール分解細菌の特定 | 92 |
| 4.4.3 | 汚泥Bと汚泥Cに生息する嫌氣的フェノール分解細菌の比較 | 97 |
| 4.5 | 結論 | 99 |
| 第5章 好氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定 | | 100 |
| 5.1 | はじめに | 100 |
| 5.2 | 実験方法 | 100 |
| 5.2.1 | 活性汚泥の好気培養 | 100 |
| 5.2.2 | 水質分析 | 101 |
| 5.2.3 | RNA-SIP法 | 101 |
| 5.3 | 結果 | 102 |
| 5.3.1 | 活性汚泥の好気培養 | 102 |
| 5.3.2 | T-RFLP解析 | 103 |
| 5.3.3 | クローニング解析とシーケンシング解析 | 114 |
| 5.4 | 考察 | 118 |
| 5.4.1 | 好氣的フェノール分解 | 118 |
| 5.4.2 | 好氣的フェノール分解細菌の特定 | 119 |
| 5.4.3 | 汚泥Aと汚泥Cに生息する好氣的フェノール分解細菌の比較 | 125 |
| 5.4.4 | 嫌氣的フェノール分解細菌と好氣的フェノール分解細菌の比較 | 126 |
| 5.5 | 結論 | 126 |
| 第6章 嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養 - 汚泥Aと汚泥B - | | 128 |
| 6.1 | はじめに | 128 |
| 6.2 | 実験方法に関する事前調査 | 128 |
| 6.2.1 | 無機塩培地の選択 | 129 |
| 6.2.2 | 微量培地成分の選択 | 130 |
| 6.2.3 | 固化剤の選択 | 134 |
| 6.2.4 | 基質濃度の決定 | 135 |
| 6.2.5 | 硝酸塩濃度の決定 | 135 |
| 6.3 | 実験方法 | 135 |
| 6.3.1 | 供試試料 | 135 |
| 6.3.2 | 固化培地の作成手順 | 136 |

| | | |
|---------------------------------------|------------------------------|------------|
| 6.3.3 | 培養条件 | 137 |
| 6.3.4 | viable countの測定 | 137 |
| 6.3.5 | コロニーの形態的特徴の観察 | 137 |
| 6.3.6 | 分離株の獲得 | 137 |
| 6.3.7 | 分離株の16S rRNA遺伝子塩基配列の解読 | 137 |
| 6.3.8 | 培養条件の評価 | 138 |
| 6.3.9 | RNA-SIP法で捉えたフェノール分解細菌の分離・培養 | 138 |
| 6.4 | 結果 | 138 |
| 6.4.1 | viable countの経時的推移 | 138 |
| 6.4.2 | コロニーの形態的特徴の観察 | 141 |
| 6.4.3 | 分離株の系統学的位置 | 143 |
| 6.4.4 | RNA-SIP法で捉えたフェノール分解細菌の分離・培養 | 150 |
| 6.5 | 考察 | 151 |
| 6.5.1 | viable countとコロニーの形態的特徴からの評価 | 151 |
| 6.5.2 | 分離株の系統学的位置からの評価 | 153 |
| 6.5.3 | 嫌氣的フェノール分解細菌を捉えやすい平板培養条件 | 154 |
| 6.5.4 | RNA-SIP法で捉えたフェノール分解細菌の分離・培養 | 154 |
| 6.5.5 | カラギーナンとゲランガムの固化剤としての評価 | 155 |
| 6.6 | 結論 | 156 |
| 第7章 嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養 - 汚泥C - | | 157 |
| 7.1 | はじめに | 157 |
| 7.2 | 実験方法 | 157 |
| 7.2.1 | 海水を含む固体培地の作成手順の検討 | 157 |
| 7.2.2 | 供試試料 | 158 |
| 7.2.3 | 基本的な培地条件 | 158 |
| 7.2.4 | 固体培地の作成手順 | 159 |
| 7.2.5 | 培養条件 | 160 |
| 7.2.6 | 分離株の獲得 | 160 |
| 7.2.7 | 分離株の16S rRNA遺伝子塩基配列の解読 | 160 |
| 7.2.8 | RNA-SIP法で捉えたフェノール分解細菌の分離・培養 | 160 |
| 7.3 | 結果 | 161 |
| 7.3.1 | 海水を含む固体培地の作成手順の検討 | 161 |
| 7.3.2 | 分離株の系統学的位置 | 165 |
| 7.3.3 | RNA-SIP法で捉えたフェノール分解細菌の分離・培養 | 169 |
| 7.4 | 考察 | 170 |
| 7.4.1 | 嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養 | 170 |
| 7.4.2 | RNA-SIP法で捉えたフェノール分解細菌の分離・培養 | 171 |
| 7.4.3 | 汚泥Bと汚泥Cから得られた分離株の比較 | 171 |
| 7.5 | 結論 | 177 |
| 第8章 総括 | | 178 |
| 参考文献 | | 188 |

図の一覧

第1章 研究の背景と目的

| | | |
|------|--------|---|
| 図1-1 | 本論文の構成 | 4 |
|------|--------|---|

第2章 既往の知見

| | | |
|-------|-----------------------|----|
| 図2-1 | 安水総合処理システムの一例 | 6 |
| 図2-2 | 標準活性汚泥法 | 6 |
| 図2-3 | 硝化脱窒処理プロセス | 8 |
| 図2-4 | 硝化液循環型硝化脱窒プロセス | 8 |
| 図2-5 | 好氣的フェノール分解経路 | 13 |
| 図2-6 | 嫌氣的フェノール分解経路 | 15 |
| 図2-7 | PCR-DGGE法の原理 | 20 |
| 図2-8 | T-RFLPプロファイルの一例 | 21 |
| 図2-9 | 液体培地を用いた培養法の流れ | 36 |
| 図2-10 | 固体培地を用いた培養における画線操作の流れ | 37 |

第3章 研究手法

| | | |
|-------|--|----|
| 図3-1 | 人工安水処理硝化脱窒処理プロセス | 43 |
| 図3-2 | 人工安水処理硝化脱窒処理プロセスの運転条件の一例 | 44 |
| 図3-3 | 本研究で使用した活性汚泥の一例 | 46 |
| 図3-4 | 安水処理活性汚泥に生息する特徴的な形態をした微生物 | 47 |
| 図3-5 | 汚泥Aの顕微鏡観察 | 48 |
| 図3-6 | 汚泥Bの顕微鏡観察 | 49 |
| 図3-7 | 汚泥Cの顕微鏡観察 | 50 |
| 図3-8 | VersaFluor™ Fluorometer System (BIO-RAD) | 54 |
| 図3-9 | 超遠心溶媒調整用の検量線 | 56 |
| 図3-10 | 超遠心チューブ | 57 |
| 図3-11 | チューブシーラー | 57 |
| 図3-12 | 超遠心機 | 59 |
| 図3-13 | 超遠心ローター | 59 |
| 図3-14 | PlugとSpacer | 59 |
| 図3-15 | Torque Wrench | 59 |
| 図3-16 | 超遠心チューブラック | 61 |
| 図3-17 | Removal Tool | 61 |
| 図3-18 | 固定台 | 61 |
| 図3-19 | ペリスタポンプ | 62 |
| 図3-20 | 分画・回収セット | 62 |
| 図3-21 | チューブを挟む器具 | 62 |

第4章 嫌氣的フェノール分解細菌のRNA-SIP法による特定

| | | |
|------|--|----|
| 図4-1 | 汚泥Bの培養6.5時間後の ¹³ C系列(A)と対照系列(B)のT-RFLPプロファイル | 78 |
| 図4-2 | 汚泥Bの培養35時間後の ¹³ C系列(A)と対照系列(B)のT-RFLPプロファイル | 79 |
| 図4-3 | 汚泥Bの培養6.5時間後における83 bp, 148 bp, 510 bpのT-RFs長を持つT-RFsの各分画中における相対的T-RFs割合の推移 | 81 |

| | | |
|------|---|----|
| 図4-4 | 汚泥Bの培養35時間後における83 bp, 148 bp, 486 bp, 495 bp, 510 bpのT-RFs 長を持つT-RFs の各分画中における相対的T-RFs割合の推移 | 82 |
| 図4-5 | 汚泥Cの培養9.7時間後の ¹³ C系列(A)と対照系列(B)のT-RFLPプロファイル | 84 |
| 図4-6 | 汚泥Cの148 bp, 510 bpのT-RFs 長を持つT-RFs の各分画中における相対的T-RFs割合の推移 | 86 |

第5章 好氣的フェノール分解細菌のRNA-SIP法による特定

| | | |
|------|---|-----|
| 図5-1 | ¹³ C系列(A)と対照系列(B)の水質変化 | 103 |
| 図5-2 | 汚泥Aの ¹³ C系列(A)と対照系列(B)のT-RFLPプロファイル | 104 |
| 図5-3 | 汚泥Aの83 bp, 122 bp, 141 bp, 495 bp, 497 bpのT-RFs 長を持つT-RFs の各分画中における相対的T-RFs割合の推移 | 106 |
| 図5-4 | 汚泥Cの培養2.1時間後の ¹³ C系列(A)と対照系列(B)のT-RFLPプロファイル | 108 |
| 図5-5 | 培養5.7時間後の(A) ¹³ C系列と(B) 対照系列のT-RFLPプロファイル | 110 |
| 図5-6 | 培養2.1時間後における122 bp, 276 bp, 439 bp, 440 bpのT-RFs 長を持つT-RFs の各分画中における相対的T-RFs割合の推移 | 112 |
| 図5-7 | 培養5.7時間後における122 bp, 276 bp, 439 bp, 440 bp, 495 bpのT-RFs 長を持つT-RFs の各分画中における相対的T-RFs割合の推移 | 113 |

第6章 嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養 - 汚泥Aと汚泥B -

| | | |
|------|-------------------------------|-----|
| 図6-1 | viable countの経時的推移 | 140 |
| 図6-2 | 培養18週間後のviable countの比較 | 141 |
| 図6-3 | 各固化剤における網レベルでの系統学的位置による分離株の割合 | 144 |
| 図6-4 | 近縁種との相同性によって分類した分離株の割合 | 149 |

第7章 嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養 - 汚泥C -

| | | |
|------|---|-----|
| 図7-1 | 各固化剤における網レベルでの系統学的位置による分離株の割合 | 165 |
| 図7-2 | 各培養系列において汚泥Bと汚泥Cから得られた分離株の系統学的位置 (網レベルでの分類) | 174 |

表の一覧

第2章 既往の知見

| | | |
|------|----------------------------|----|
| 表2-1 | 市販されている固化剤や増粘剤の種類とその由来及び用途 | 40 |
|------|----------------------------|----|

第3章 研究手法

| | | |
|------|-----------------------------------|----|
| 表3-1 | 本研究で使用した活性汚泥の性状（活性汚泥採取時）と実施した実験 | 45 |
| 表3-2 | 活性汚泥を採取した時期前後の人工安水処理活性汚泥プロセスの運転状況 | 45 |
| 表3-3 | TURBO DNA-free™によるDNase処理時の試薬添加量 | 53 |
| 表3-4 | GBを作成するための各成分の混合比 | 55 |
| 表3-5 | 検量線作成のための超遠心溶媒の組成 | 56 |
| 表3-6 | RT-PCR法に用いたプライマーセット | 65 |
| 表3-7 | シーケンシング解析に用いたプライマー | 67 |

第4章 嫌氣的フェノール分解細菌のRNA-SIP法による特定

| | | |
|------|--|----|
| 表4-1 | 汚泥Bの ¹³ Cライブラリーにおいて嫌氣的フェノール分解に関与する細菌と特定されたクローンの16S rRNA全長塩基配列に基づいた近縁種（Blastnプログラムによる） | 88 |
| 表4-2 | 汚泥Cの ¹³ Cライブラリーにおいて嫌氣的フェノール分解に関与する細菌と特定されたクローンの16S rRNA塩基配列に基づいた近縁種（Blastnプログラムによる） | 90 |
| 表4-3 | 汚泥Bと汚泥Cの ¹³ Cを同化したと特定されたT-RFsの系統学的位置、検出までの培養時間、 ¹³ Cによる標識度合い、文献情報による嫌氣的フェノール分解能の有無、クローン数 | 96 |
| 表4-4 | 汚泥Bと汚泥Cの嫌氣的フェノール分解細菌または嫌氣的フェノール分解に関与する細菌のT-RFs長と系統学的位置 | 97 |

第5章 好氣的フェノール分解細菌のRNA-SIP法による特定

| | | |
|------|--|-----|
| 表5-1 | 汚泥Aの ¹³ Cライブラリーにおいて好氣的フェノール分解に関与する細菌と特定されたクローンの16S rRNA塩基配列に基づいた近縁種（Blastnプログラムによる） | 115 |
| 表5-2 | 汚泥Cの ¹³ Cライブラリーにおいて好氣的フェノール分解に関与する細菌と特定されたクローンの16S rRNA塩基配列に基づいた近縁種（Blastnプログラムによる） | 117 |
| 表5-3 | 汚泥Aと汚泥Cの ¹³ Cを同化したと特定されたT-RFsの系統学的位置、検出までの培養時間、 ¹³ Cによる標識度合い、文献情報による好氣的フェノール分解能の有無、クローン数 | 124 |
| 表5-4 | 汚泥Aと汚泥Cの好氣的フェノール分解細菌と好氣的フェノール分解に関与する細菌のT-RFs長と系統学的位置 | 125 |

第6章 嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養 - 汚泥Aと汚泥B -

| | | |
|------|---------------------------------------|-----|
| 表6-1 | 無機塩培地の組成 | 130 |
| 表6-2 | これまでに報告のあるvitamin solutionの成分比較 | 131 |
| 表6-3 | これまでに報告のあるtrace element solutionの成分比較 | 132 |
| 表6-4 | vitamin solutionの組成（DSMZの461番） | 133 |
| 表6-5 | trace element solutionの組成（DSMZの141番） | 133 |

| | | |
|------|--|-----|
| 表6-6 | 各培地溶液の混合割合 | 136 |
| 表6-7 | 固化剤ごとに観察されたコロニーの色 | 143 |
| 表6-8 | 固化剤ごとに観察されたコロニーの形と大きさ | 143 |
| 表6-9 | 分離株の16S rRNA遺伝子の部分塩基配列に基づいたBlastnプログラムによる近縁種 | 147 |

第7章 嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養 -汚泥C-

| | | |
|------|--|-----|
| 表7-1 | 各培地溶液の混合割合 | 159 |
| 表7-2 | 作成された培地の特徴 | 163 |
| 表7-3 | 分離株の16S rRNA遺伝子の部分塩基配列に基づいたBlastnプログラムによる近縁種 | 167 |
| 表7-4 | 汚泥Bと汚泥Cから得られた分離株の系統学的位置 | 172 |
| 表7-5 | 汚泥Bと汚泥Cから得られたクローンの系統学的位置 | 175 |

第8章 総括

| | | |
|------|--|-----|
| 表8-1 | 人工安水処理活性汚泥に生息する嫌氣的フェノール分解細菌と好氣的フェノール分解細菌 | 188 |
|------|--|-----|

第1章 研究の背景と目的

1.1 研究の背景

本研究では、鉄鋼排水である安水を処理する活性汚泥を研究対象とした。鉄の生産において、コークスは高炉で鉄鉱石を還元するときの還元剤として、また燃料として使用される。コークスは石炭を乾留して製造され、この時に生じるのが安水である。一般的に、フェノール類、アンモニア、チオシアン酸塩、シアン化合物、タール油状分など環境上好ましくない成分を多量に含んでいる。また、製鉄所全水質汚濁負荷量のうち COD (chemical oxygen demand) の 50%、窒素の 80% を占めており、COD の 70-80% はフェノール由来である。安水の主要有機物成分はフェノールである。

通常、安水処理は物理化学的処理法と生物学的処理法を組み合わせた総合処理システムで行なわれる。物理化学的処理法ではアンモニアストリッピング法によってアンモニアが除去される。生物学的処理法では、海水で 2-3 倍に希釈したのち標準活性汚泥法によってフェノール類やチオシアン酸塩などが除去される (なお、海水で希釈する理由は、一般的に製鉄所は沿岸部に位置しており、淡水ではなく海水を利用することによりコストを削減するためである)。その他にも、シアン化合物やタール状油分などを除去する様々な工程がある。但し、アンモニアストリッピング法は、エネルギーやコスト面での負担が大きいという欠点がある。そこで、アンモニアの除去をエネルギーやコスト面で負担の少ない生物学的処理法で行うことが検討されている。つまり、アンモニアと有機物の同時除去が行える硝化液循環型硝化脱窒プロセスの適用である。この硝化液循環型硝化脱窒プロセスは下水処理を中心に適用されているが、安水処理においてはまだ本格的には導入されておらず、検討段階である。

これまでに、著者の研究室では、安水処理硝化脱窒プロセスの処理性能の裏づけ及び主要な微生物叢の解明を目的として、分子生物学的手法による微生物群集構造解析と分離培養法による微生物の分離が行われてきた。新田見は脱窒機能遺伝子 *nirK* 及び *nirS* を対象とした微生物群集構造解析 (新田見, 2003)、山崎と Bijan は 16S rRNA 遺伝子を対象とした微生物群集構造解析 (山崎, 2002; Gurung, 2004)、末岡は液体培養法および平板培養法を用いた微生物分離・培養 (末岡, 2002; 末岡, 2004) を安水処理活性汚泥に対して行なった。これらの研究からは、安水処理に関わっている細菌の系統遺伝学的情報やそれらが持つ生理学的特徴の一面が明らかになってきた。一方、本プロセスでは運転期間を通じて安水中の主要有機物成分であるフェノールが脱窒槽で殆ど分解されており、フェノールを嫌氣的に分解する細菌 (フェノールを電子供与体、硝酸塩を電子受容体として生体エネルギー

一を得て、フェノールを摂取・同化している細菌（以下、嫌氣的フェノール分解細菌）が特に重要であると考えられた。しかし、そうした細菌に関する知見はこれらの研究からは得られなかった。

嫌氣的フェノール分解細菌を特定するためには、近年著しく発展を遂げてきた安定同位体元素を利用した手法である Stable Isotope Probing (SIP) 法を適用することが考えられる。SIP 法とは、安定同位体元素を含んだ化合物を対象生物に摂取・同化させ、安定同位体元素によって対象生物の核酸やリン脂質脂肪酸を標識し、標識された核酸やリン脂質脂肪酸を解析することによって対象生物を検出・特定する分子生物学的手法である。SIP 法を使うことで、これまでの分子生物学的手法では困難であった、対象生物の代謝機能の推定と生化学情報・遺伝子情報に基づいた対象生物の特定を同時に行うことが可能となった。なお、核酸を解析対象とする場合、RNAの方がDNAより感度が良いことが知られている。

一方、分子生物学的手法では、系統遺伝学的な情報を得ることはできるものの、それ以上の情報を得ることは困難である。安水処理硝化脱窒プロセスで重要な機能的役割を担っている嫌氣的フェノール分解細菌の生理学的特徴を知るには、分離培養法によって分離株を獲得し調査するしか方法がない。また、嫌氣的フェノール分解細菌に関する既往の知見に関しては、一部の系統学的位置 (*Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Cryptanaerobacter*, *Clostridium* (*Sedimentibacter*), *Thauera*, *Magnetospirillum* 属) に分類される細菌に関しては研究が進んでいるが、様々な環境に生息する嫌氣的フェノール分解細菌を網羅的に解析した報告はなく、安水処理活性汚泥に生息する嫌氣的フェノール分解細菌に関する報告もない。そのため、安水処理活性汚泥中には、未知の嫌氣的フェノール分解細菌が存在する可能性は充分大きいと考えられる。本研究を通じて、嫌氣的フェノール分解細菌に関する新たな知見を提供できる可能性があることも、学術的な意義において重要であると考えられる。

そこで、SIP 法でとらえた嫌氣的フェノール分解細菌を分離・培養することができるとよい。分離培養法では環境中に生息する微生物の僅かしか捉えられないことが一般的に知られているが、分離培養法の改善は近年少しずつ行なわれており、嫌氣的フェノール分解細菌に適した条件に培養条件を検討することで、ある程度その壁を乗り越えることができることが考えられた。

1.2 研究の目的

本研究では、前述の研究の背景を踏まえて、以下を目的とした。

- (目的 1) : 実験室規模の人工安水処理硝化脱窒プロセスを対象として、そこに生息する嫌氣的フェノール分解細菌を分子生物学的手法によって特定する
- (目的 2) : (目的 1) と比較をするために、好氣的フェノール分解細菌を分子生物学的手法によって特定する

- (目的 3) : 実験室規模の人工安水処理硝化脱窒プロセスを対象として、そこに生息する嫌氣的フェノール分解細菌を分離培養法によって分離・培養する
- (目的 4) : (目的 1) から (目的 3) で得られた結果を比較し、RNA-SIP 法で捉えた細菌が平板培養法で分離されているかを確認する

(目的 1) では、嫌氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定を行った。(目的 2) では、好氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定を行った。(目的 3) では、嫌氣的フェノール分解細菌の平板培養法による分離・培養を行った。(目的 4) では (目的 1) ・ (目的 2) ・ (目的 3) の結果を比較して、RNA-SIP 法によって特定された嫌氣的または好氣的フェノール分解細菌が分離・培養されているかを確認した。

1.3 論文の構成

本論文は、全 8 章から構成される。図 1-1 に論文の構成を示す。

第 1 章の「研究の背景と目的」では、本研究の背景と目的および論文の構成を説明した。

第 2 章の「既往の知見」では、安水処理・フェノール分解細菌・分子生物学的手法と分離培養法に関する既往の知見を紹介した。

第 3 章の「研究手法」では、活性汚泥に関する情報、RNA-SIP 法・平板培養法・水質分析法の実験手順を説明した。

第 4 章の「嫌氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定」では、嫌氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定を行った。対象遺伝子は 16S rRNA とした。

第 5 章の「好氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定」では、好氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定を行った。対象遺伝子は 16S rRNA とした。

第 6 章の「嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養 - 汚泥 A と汚泥 B -」では、平板培養法に使用する基質濃度 (フェノール濃度) と固化剤の種類に着目して、培養条件の違いが得られる分離株の違いに与える影響を評価し、嫌氣的フェノール分解細菌を捉えやすい平板培養条件を絞り込んだ。また、汚泥 B から嫌氣的フェノール分解細菌を分離し、16S rRNA 遺伝子を解読した。そして、第 4 章と第 5 章の結果と比較した。

第 7 章の「嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養 - 汚泥 C -」では、第 6 章で検討した培養条件を基本的に用いて、さらに海水を含む培地の使用を検討した。海水を用いたのは、人工安水処理硝化脱窒プロセスの流入水に

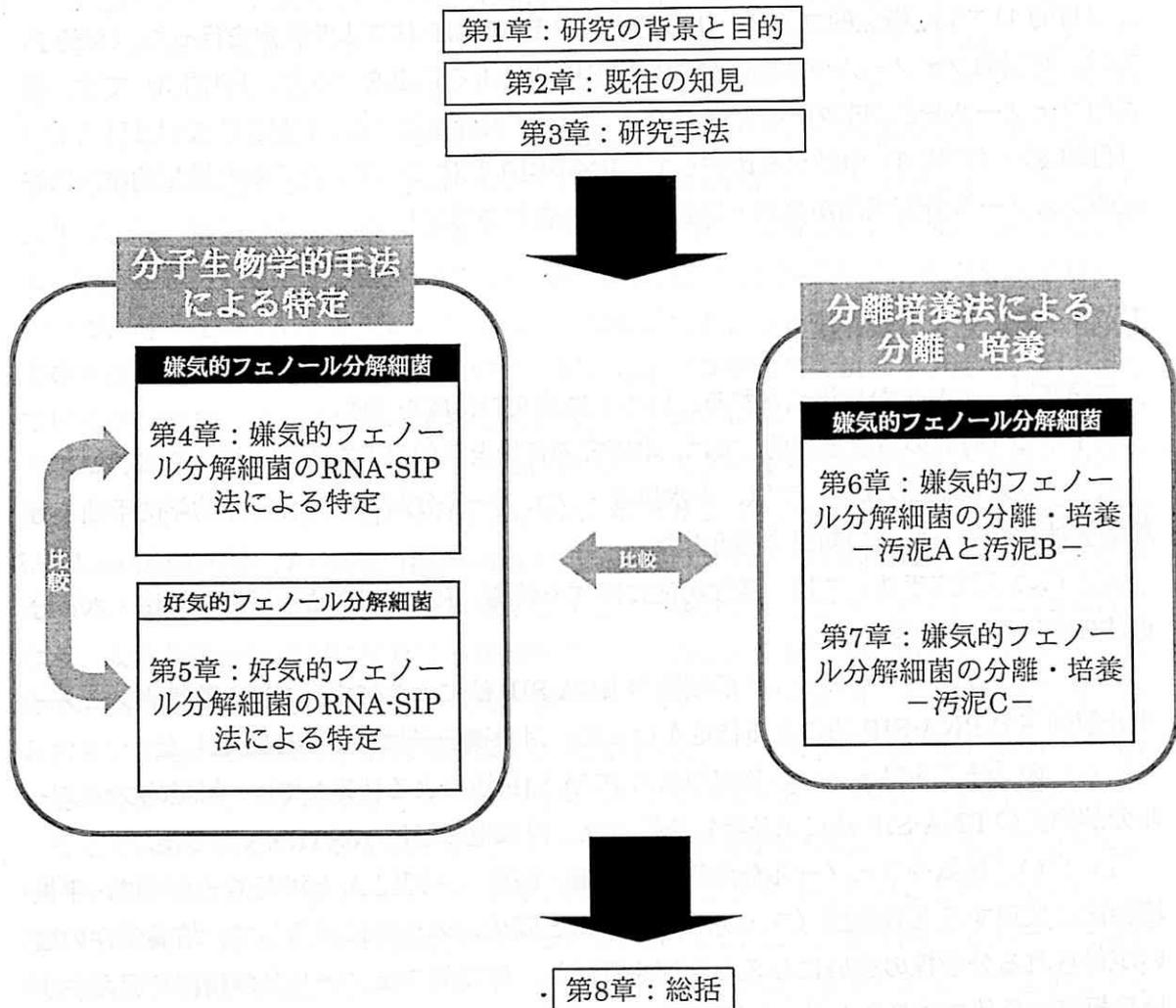


図 1-1 本論文の構成

第2章 既往の知見

本章では、本研究で対象とする安水処理に関わる既往の知見と本研究で用いた研究手法（分子生物学的手法と分離培養法）に関わる既往の知見を紹介する。

まず前者に関しては、一般的な安水処理法と生物学的処理法の種類について具体的に説明する。次に、安水処理法に関する知見と安水処理に関わる微生物に関する知見を紹介する。そして、本研究で対象とした嫌氣的フェノール分解細菌と好氣的フェノール分解細菌に関する知見を紹介する。

次に後者に関しては、複合微生物系の解析手法として広く用いられている分子生物学的手法と分離培養法についてそれぞれ説明する。そして、本研究で用いた RNA-stable isotope probing (SIP) 法と平板培養法に関する知見をそれぞれ紹介する。

2.1 安水の物理化学的処理法及び生物学的処理法

2.1.1 安水処理システム

安水は、フェノール類やチオシアン酸塩、アンモニア態窒素、タール油状分やシアン化合物、チオ硫酸塩を多量に含んでいる。安水処理は、一般的に物理化学的処理法と生物学的処理法を組み合わせで行われる。安水処理プロセスの一例を図 2-1 に示す。

物理化学的処理法では、アンモニア態窒素やシアン化合物が除去される。代表的な物理化学的処理法は、アンモニアストリッピング法である。アンモニアストリッピング法とは、安水の pH をアルカリ性にする事で、安水中のアンモニアが遊離アンモニアガスとして回収されるという原理に基づいた処理法である。回収後、ガスは硫安工程（硫酸アンモニウム製造工程）に送付される。一方、シアン化合物は、生物学的処理法（活性汚泥法）後に、凝集剤を用いた凝集沈殿工程で除去される。

一方、生物学的処理法では、安水中のタール状油分を除いて、さらにコークス炉ガスやアンモニア態窒素を蒸留によって除いた後の排水（脱安水と呼ぶ）が処理される。タール状油分、硫化水素イオン、シアンイオン、アンモニア態窒素などによって微生物の代謝機能阻害が起こるために、生物学的処理法の前にはこのような前処理や脱安水の希釈が必要となる。脱安水は希釈水（海水など）で希釈された後に活性汚泥法によって処理されて、フェノール類やチオシアン酸塩などが除去される。代表的な生物学的処理法は、標準活性汚泥法である（標準活性汚泥法の詳細は、「2.1.2 生物学的処理法の種類と特徴」を参照）。

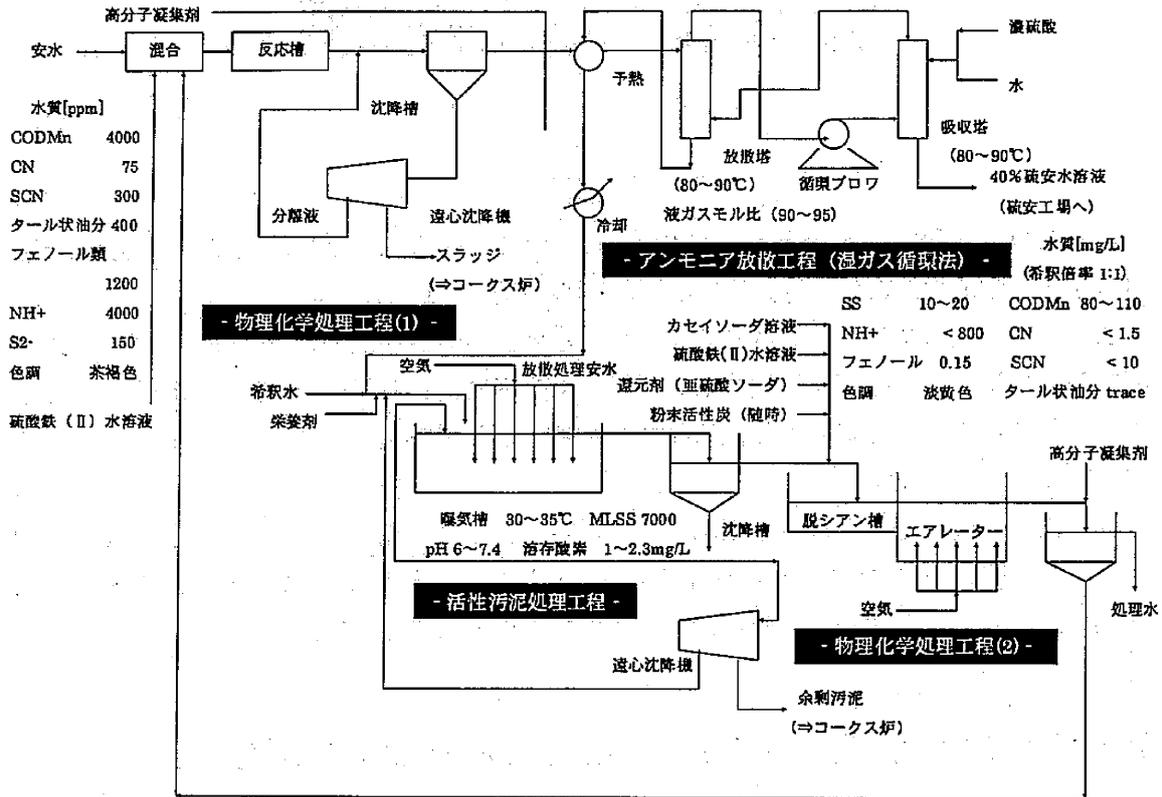


図 2-1 安水総合処理システムの一例

2.1.2 生物学的処理法の種類と特徴

本研究では、生物学的処理法を担っている活性汚泥を研究対象とした。そこで、現在、様々な排水処理分野において一般的に用いられている生物学的処理法について説明する。

最も基本的な生物学的処理法は標準活性汚泥法である（図 2-2）。標準活性汚泥法は、排水中の有機物を微生物による酸化分解により除去する方法である。微生物による有機物の酸化分解に必要な酸素を曝気して供給する曝気装置を備えた好気槽と、その後、活性汚泥（微生物の集合体）を沈殿させる沈殿槽と、好気槽内の微生物濃度を高く保つための活性汚泥返送系から構成されている。微生物は排水中の有機物を、一部は活動のためのエネルギーを得るために酸化分解して利用し、残りの一部を微生物自体が増殖するために体内に同化して利用する。よって、排水中の有機物は増殖した微生物として形を変えて処理槽系内に残ることになる。そのため、処理槽の微生物濃度が増加しすぎない程度に、定期的に沈殿槽から微生物を余剰汚泥として除去する必要がある。

このような活性汚泥法であるが、様々な問題点もある。そのひとつとして、沈殿槽において汚泥の沈降効率が悪くなる現象がある。これはバルキングと呼ばれる現象で、主に糸状性微生物が大量に増殖して、活性汚泥の沈降効率を悪化させるために起こる現象である。

沈降効率が悪化した活性汚泥は、沈降せずに沈殿槽から放流水として排出されてしまい、活性汚泥濃度の著しい減少を招き、排水処理が行えない状態に陥ってしまう。バルキングを起こす微生物群の系統学的位置や、バルキングが起こりやすい運転条件や起こりにくい運転条件などはある程度解明されているが、その詳しい原因などは未だに解明されていない。

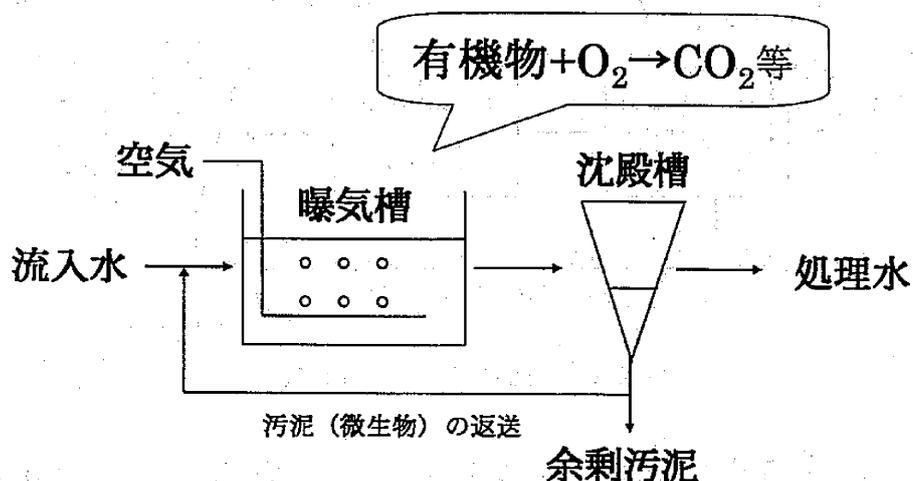


図 2-2 標準活性汚泥法

次に、標準活性汚泥法に窒素除去プロセスを組み合わせた硝化脱窒処理プロセスについて説明する。最も単純な硝化脱窒処理プロセスを図 2-3 に示す。

まず、好氣的な硝化槽において *Nitrosomonas* 属などのアンモニア酸化細菌によりアンモニア態窒素が亜硝酸態窒素に酸化され、次いで *Nitrobacter* 属などの亜硝酸酸化細菌により亜硝酸態窒素が硝酸態窒素に酸化される。この一連の反応を硝化反応と呼ぶ。硝化反応では、水素イオンが生成されるため、硝化槽の pH は低下する。また、好氣的従属栄養細菌などにより、有機物も酸化反応で除去される。

そして、硝化反応により生じた硝酸態窒素を含んだ排水が脱窒槽に移る。嫌氣的な脱窒槽では硝酸態窒素を利用した脱窒細菌による脱窒反応が起こる。脱窒反応では、一般的に有機物が電子供与体として、硝酸態窒素が電子受容体として反応が起こる。但し、硫黄化合物を電子供与体とした脱窒反応なども知られている。硝酸態窒素は、亜硝酸態窒素を経て、一酸化窒素、亜酸化窒素、窒素ガス（気体）と還元され、最終的に窒素ガスとして窒素の除去が行われる。また、前述の通り、脱窒反応における電子供与体として、有機物も酸化反応により除去される。脱窒反応では、水酸化物イオンが生成されるため、脱窒槽の pH は上昇する。また、脱窒反応における電子供与体としての有機物が前段の硝化槽において殆ど除去されてしまう場合には、脱窒槽へ有機物を添加するなどの対処が必要となる。

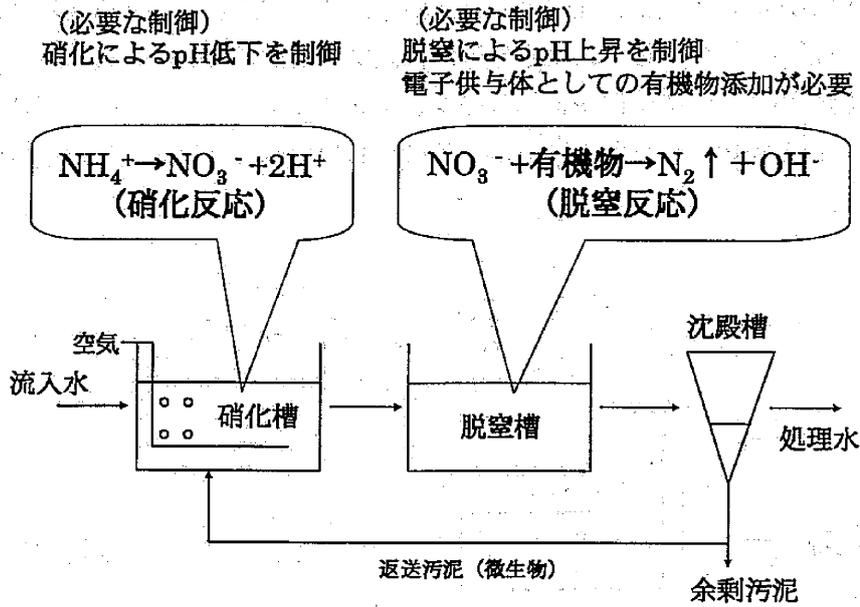


図 2-3 硝化脱窒処理プロセス

以上が、最も単純な硝化脱窒処理プロセスにおける反応である。しかし、硝化槽における pH 低下が硝化反応を担う硝化細菌の代謝を阻害することや、脱窒槽における pH 上昇の調整や有機物添加が必要なことなどが、本処理法の問題点である。

そこで、この pH 調整の問題を硝化液を脱窒槽へ循環させることにより緩和し、pH の変動を抑制できるように改善した処理法が、硝化液循環型硝化脱窒プロセスである (図 2-4)。

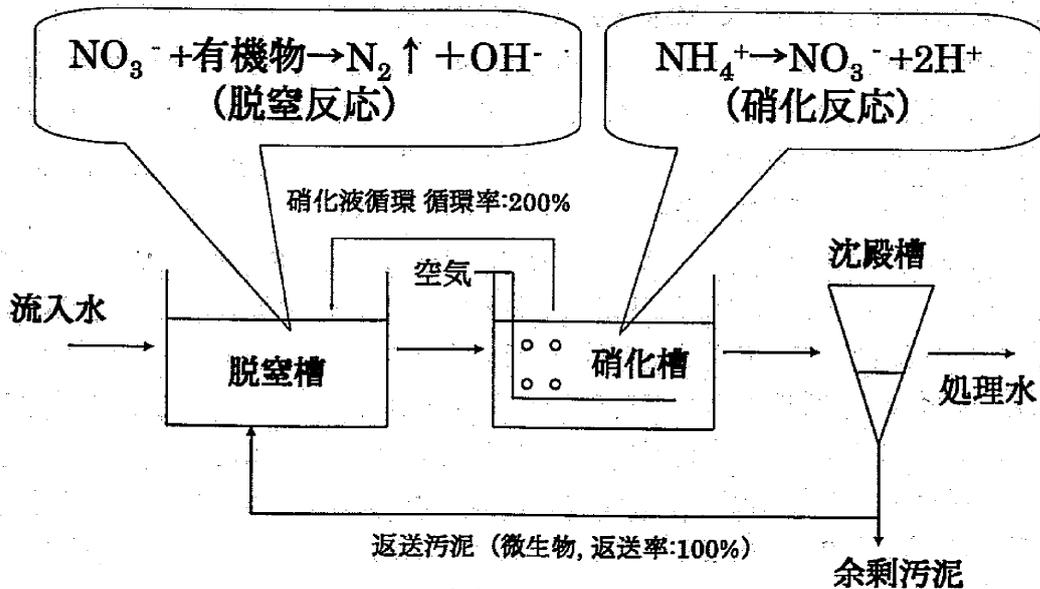


図 2-4 硝化液循環型硝化脱窒プロセス

硝化液循環型硝化脱窒プロセスでは、硝化槽と脱窒槽が逆の位置になり、まず脱窒槽に

排水が流入することになる。硝化槽と脱窒槽で起こる反応は前述の通りであるが、pHが低下した硝化液を脱窒槽に流入させて循環させることにより、硝化槽と脱窒槽で起こるpHの変動が緩和されるという利点がある。

本研究では、この硝化液循環型硝化脱窒プロセスで長年運転されてきた人工安水活性汚泥を対象とした。

2.1.3 安水の生物学的処理法

安水処理に関連する知見は、近年、少しずつであるが報告が増えている。報告例としては、大きく二つに分けられ、ひとつは生物学的処理法に関わる報告例で、もうひとつは物理化学的処理法に関わる報告例である。ここでは、生物学的処理法に関わる報告例についてのみ知見を紹介する。

生物学的処理法に関わる報告例には、様々な処理法を実施してその処理法の処理性能や問題点などを記述した報告例と、処理に関与する微生物を分子生物学的手法や培養法によって解析した報告例がある。この二つに関して、それぞれ順に報告例を紹介する。

まず、様々な処理法を実施してその処理法の処理性能や問題点などを記述した報告例を紹介する。1950-1970年頃の古い報告では、標準活性汚泥法によってアンモニア態窒素を硝化反応で、チオシアン酸塩やフェノールを酸化反応で除去する運転を行い、処理性能や基質濃度と生物代謝阻害の関係などを評価している (Ashmore *et al.*, 1967, 1968; Cooper & Catchpole, 1973)。1980年代になると、無酸素好気活性汚泥法による安水処理の検討を行った報告例があり、フェノールは脱窒反応の炭素源として利用可能であり、アンモニアを発生させるシアン化物とチオシアン酸塩の酸化反応は、無酸素好気活性汚泥法におけるシアン化物とチオシアン酸塩の除去を担う中心反応であると報告している (Richards & Shieh, 1989)。その後は、Limらが、安水処理実験室規模の生物膜処理リアクターのキノプロファイル法を用いた微生物群集構造解析を行ない、処理性能との関連を評価している (Lim *et al.*, 2002, 2003)。それぞれ、海水希釈した安水と淡水希釈した安水の2種類を処理させて微生物群集構造の比較を行なった報告 (Lim *et al.*, 2002) と、有機物濃度の高い安水と低い安水の2種類を処理させて微生物群集構造の比較を行った報告 (Lim *et al.*, 2003) である。Liらは、安水中の難分解芳香族化合物である pyridine, indole, quinoline, 2-methyl quinoline, isoquinoline の5種類の物質が脱窒反応を介した分解によって効率的に分解されることを示し、その分解速度を測定した (Li *et al.*, 2001)。また、これら以外にも、フェノールやチオシアン酸塩の除去 (有機物除去) や、アンモニア態窒素の除去 (窒素除去)、シアン化合物といった生物毒性を有した物質の除去 (毒生物質除去) に焦点を当て、生物膜や活性汚泥法といった生物処理法を用いて様々な運転条件を検討した報告例も多数ある (Kowalska *et al.*, 1998; Lee & Park 1998; Zhang *et al.*, 1998; Jianlong *et al.*, 2002a; Toh & Ashbolt, 2002; Chakraborty & Veeramani, 2005; Chao *et al.*, 2006; Jeong

& Chung, 2006a, 2006b; Vázquez *et al.*, 2006a, 2006b; Marañón *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008; Lay-Son & Drakides, 2008; Park *et al.*, 2008)。

このように、安水処理は鉄製造業には不可欠であり、その処理の一部には古くから生物学的処理法が用いられてきたため、比較的多くの研究報告例がある。

2.2 安水処理活性汚泥に生息する微生物

次に、処理に関与する微生物を分子生物学的手法や培養法によって解析した報告例を紹介する。こちらは、前述した処理法の処理性能や問題点などを記述した報告例に比べると報告例が少ない。まず、安水処理活性汚泥中の主要な微生物群集と考えられるフェノール分解細菌やチオシアン酸塩分解細菌を研究対象とした例を紹介する。

「フェノール分解細菌」に関する知見や「Stable Isotope Probing (SIP) 法」に関する知見で再び紹介するが、Manefield らを中心にして、安水処理活性汚泥中の好氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定 (Whiteley & Bailey, 2000; Manefield *et al.*, 2002, 2005) や、AHLs (*N*-acyl-homoserine lactones) の安水処理微生物群集への影響評価などが行われている (Valle *et al.*, 2005)。

他には、鉄鋼業廃棄物や安水処理活性汚泥からフェノール分解細菌を分離・培養した報告例がある。El-Sayed らは、コークス製造工程で排出されるフェノール汚染廃棄物からフェノール分解細菌である *Bulkholderia cepacia* PW3 と *Pseudomonas aeruginosa* AT2 の 2 株を分離した (El-Sayed *et al.*, 2003)。Jianlong らは、安水処理活性汚泥から quinoline を炭素源と窒素源の両方として利用し生育する quinoline 分解細菌である *Burkholderia pickettii* を分離した。(Jianlong *et al.*, 2002b)。この他にも、安水処理活性汚泥を分離源としてフェノール、シアン化合物、アンモニア態窒素を分解する細菌を分離・培養した報告例がある (White *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2002)。

また、著者の研究室でも安水処理活性汚泥を対象として、様々な研究が行なわれてきた。16S rRNA 遺伝子を対象とした安水処理活性汚泥中における微生物群集構造解析 (山崎, 2002; Gurung, 2004) や、脱窒機能遺伝子 *nirK* 及び *nirS* を対象とした安水処理活性汚泥中における微生物群集構造解析 (新田見, 2003)、液体培養法および平板培養法を用いた安水処理活性汚泥における微生物分離の試み (末岡, 2002; 末岡, 2004) などが行なわれた。また、本研究で対象とした人工安水処理硝化脱窒プロセスにおいて、亜硝酸塩が硝化槽内に蓄積する現象が見られた時期があった。この時期には、定量 PCR 法を用いた亜硝酸酸化細菌の挙動解析と安水処理リアクターの性能を比較した研究も行われた (Takasaki *et al.*, 2007)。

以上が、安水処理活性汚泥を対象とした研究例である。このように安水処理活性汚泥中の好氣的フェノール分解細菌に関する知見は数例あった。しかし、本研究で対象とした安水処理活性汚泥中の嫌氣的フェノール分解細菌に関する知見は報告がなかった。

2.3 フェノール分解細菌

フェノール分解細菌は、大別すると好氣的フェノール分解細菌と嫌氣的フェノール分解細菌に分けられる。両者共に分子生物学的手法と分離培養法によって研究されており、また、その代謝経路の報告もなされている。以下、好氣的フェノール分解細菌、嫌氣的フェノール分解細菌について、既往の知見を紹介する。

2.3.1 好氣的フェノール分解細菌

まず、好氣的フェノール分解細菌を分子生物学的手法や分離培養法によって解析した報告例を紹介し、次に好氣的フェノール分解経路に関する報告例を紹介する。

国内では Watanabe らによって、活性汚泥中の好氣的フェノール分解細菌が良く研究されてきた。高濃度フェノール流入水に対するリアクター処理性能の解析やフェノール分解細菌の活性汚泥への投与による影響評価や、フェノール分解細菌群集の PCR-temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) 法による解析と分離培養法による解析が報告されている (Watanabe *et al.*, 1996)。また、フェノール加水分解酵素 (the largest subunit of bacterial multicomponent phenol hydroxylases (LmPHs)) に特異的なプライマーを作成して、活性汚泥中の細菌群集に対して PCR-DGGE 法と分離培養法による 16S rRNA 遺伝子とフェノール加水分解酵素遺伝子を対象とした解析も報告されている (Watanabe *et al.*, 1998; Futamata *et al.*, 2001)。

Watanabe らは、フェノール分解細菌を分離する時に、基本的にかザミノ酸・グリセロール・酵母エキスを含む培地とリン酸塩の無機塩培地にフェノールを添加した培地の 2 種類の培地を用いて平板培養法を行っている (Watanabe *et al.*, 1998, 1999)。そして、*Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacteroides*, *Comamonas*, *Hydrogenophaga*, *Nevskia*, *Pseudomonas*, *Variovorax* 属に近縁な細菌がフェノール分解細菌として分離されている (Watanabe *et al.*, 1998, 1999)。

一方、海外では Jiang らによって、好氣的フェノール分解グラニュール活性汚泥中のフェノール分解細菌が良く研究されてきた。Jiang らは、まず好氣的フェノール分解グラニュール活性汚泥リアクターの運転を行った (Jiang *et al.*, 2002)。その後、高濃度フェノール流入水に対するリアクター処理性能の解析 (Jiang *et al.*, 2004a) やグラニュール活性汚泥からの好氣的フェノール分解細菌の分離培養を行っている (Jiang *et al.*, 2004b)。好氣的フェノール分解細菌の分離培養では、Watanabe らが報告したリン酸塩の無機塩培地にフェノールを添加した培地に修正を加えた培地を用いて平板培養を行っている。*Acidovorax*, *Comamonas*, *Hydrogenophaga*, *Pandoraea*, *Pigmentiphaga*, *Propionibacterium*, *Propioniferax*, *Rhodococcus*, *Xanthomonas*, *Xenophilus* 属に近縁な細菌がフェノール分解細菌として分離されている。また、グラニュール活性汚泥を対象としているので、分離株には自己凝集能力があり、分離株間では凝集能力の相性に違いが見られたと報告している

(Jiang *et al.*, 2006)。

以上の例は、PCR-TGGE 法や PCR-DGGE 法などの分子生物学的手法と分離培養法を組み合わせて、好氣的フェノール分解細菌の解析を行った研究である。また、「2.2 安水処理活性汚泥に生息する微生物」で触れたように、RNA-stable isotope probing (SIP) 法を安水処理活性汚泥中の好氣的フェノール分解細菌群集に適用した研究が Manefield らによって報告され、*Acidovorax*, *Thauera* 属に近縁な細菌が好氣的フェノール分解細菌と特定された (Manefield *et al.*, 2002, 2005)。特定された *Thauera* 属は *Thauera aromatica* に近縁であり、*Thauera aromatica* はこれまでに好氣的フェノール分解細菌として報告されておらず、一般的に脱窒条件下で芳香族化合物を分離する細菌として知られている (Lack *et al.*, 1991; Lack & Fuchs, 1992, 1994; Schmeling *et al.*, 2004; Schühle & Fuchs, 2004)。このように、RNA-SIP 法を適用することによって、これまでに報告のない未知の生物機能が推測可能となった。

好氣的なフェノールの代謝経路に関しては、図 2-5 に示すようにフェノールがカテコールを経て好氣的に分解されることが知られている (Vaillancourt *et al.*, 2006)。カテコールは、多環芳香族化合物を含む様々な芳香族化合物の好氣的分解中間代謝物である。カテコールの分解経路には、catechol 1, 2-dioxygenase (C12O) が関与するオルト開裂と catechol 2, 3-dioxygenase (C23O) が関与するメタ開裂がある (図 2-5)。これら C12O 遺伝子と C23O 遺伝子のプライマーは既に設計されており (Leander *et al.*, 1998; Sei *et al.*, 1998; Junca & Pieper, 2003)、様々な複合生物系の中の C12O 遺伝子と C23O 遺伝子の解析に使用されている (Leander *et al.*, 1998; Junca & Pieper, 2004; Kasuga *et al.*, 2007)。

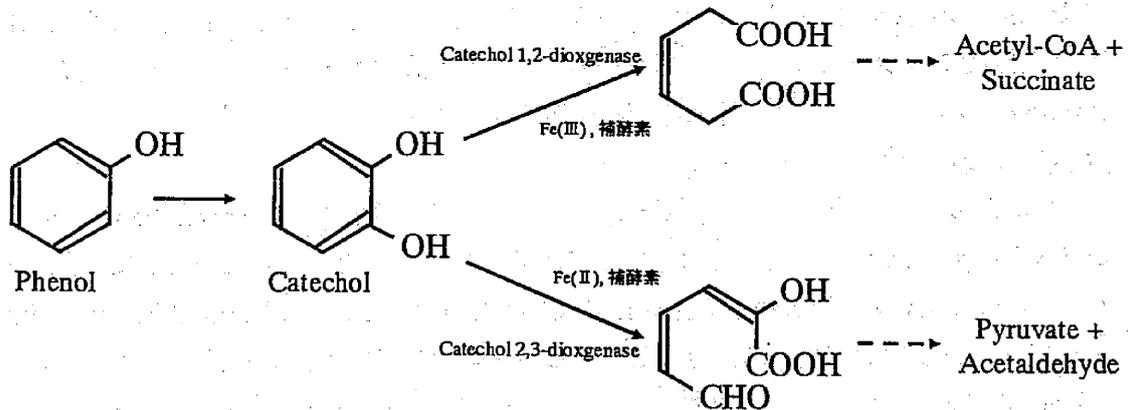


図 2-5 好氣的フェノール分解経路

2.3.2 嫌氣的フェノール分解細菌

まず、嫌氣的フェノール分解細菌を分子生物学的手法や分離培養法によって解析した報告例を紹介し、次に嫌氣的フェノール分解経路に関する報告例を紹介する。

好氣的フェノール分解細菌に関する知見に比べて、嫌氣的フェノール分解に関する研究は一部の系統学的位置の細菌に限られている。これまでに *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Cryptanaerobacter*, *Clostridium* (*Sedimentibacter*), *Thauera*, *Magnetospirillum* 属に分類される細菌が分離されており、さらに *Azoarcus*, *Clostridium* (*Sedimentibacter*), *Thauera* 属に分類される細菌については、その嫌氣的フェノール分解の代謝経路の推定や嫌氣的フェノール分解遺伝子の単離・アミノ酸配列や塩基配列の解読などが行われてきた (Tschech & Fuchs, 1987, 1989; Glöckler *et al.*, 1989; Zhang & Wiegel, 1990; Lack *et al.*, 1991; Lack & Fuchs, 1992, 1994; Zhang & Wiegel, 1994; He & Wiegel, 1995; Rabus & Widdel, 1995; van Schie & Young, 1998; Song *et al.*, 1999; Breinig *et al.*, 2000; Shinoda *et al.*, 2000; Schmeling *et al.*, 2004; Schühle & Fuchs, 2004; Rabus *et al.*, 2005; Rehfuss & Urban, 2005)。 *Magnetospirillum* 属は *Alphaproteobacteria* 綱、 *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Thauera* 属は *Betaproteobacteria* 綱、 *Cryptanaerobacter*, *Clostridium* (*Sedimentibacter*) 属は *Clostridia* 綱に分類される。以下、これらの中で良く研究が進んでいる *Azoarcus*, *Thauera*, *Clostridium* (*Sedimentibacter*) 属の知見について、概要を説明する。

Azoarcus 属

Azoarcus 属に分類される嫌氣的フェノール分解細菌は、エチルベンゼンを含む芳香族化合物を硝酸塩存在下の嫌氣的条件下で分解する細菌として分離され、 *Azoarcus* sp. strain EbN1 と名づけられた (Rabus R & Widdel F, 1995)。 strain EbN1 は硝酸塩存在下の嫌氣的条件下でフェノールを分解することが後にわかり、既にその全ゲノムが解読されている (Rabus *et al.*, 2005)。そして、ゲノム中には *Thauera aromatica* strain K172 と相同性の高い嫌氣的フェノール分解遺伝子群が存在することがわかった (Breinig *et al.*, 2000; Rabus *et al.*, 2005)。なお、硝酸塩還元能を有している。

Clostridium (*Sedimentibacter*) 属

Clostridium 属に分類される嫌氣的フェノール分解細菌は、4-hydroxybenzoate と 3,4-dihydroxybenzoate を最終産物としてフェノールに代謝をする分離株として分離され、 *Clostridium hydroxybenzoicum* strain JW/Z-1^T と名づけられた (Zhang & Wiegel, 1990)。そして、これらの反応経路を推定した後、これらの反応を担う酵素を分離した (Zhang & Wiegel, 1994; He & Wiegel, 1995)。この酵素は、4-hydroxybenzoate をフェノールに変換する反応とその逆反応を触媒することがわかった (He & Wiegel, 1995)。その後、 *Clostridium hydroxybenzoicum* strain JW/Z-1^T は再分類され、正式に *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* strain JW/Z-1^T と分類・同定された (Breitenstein *et al.*, 2002)。 *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* strain JW/Z-1^T の嫌氣的フェノール代謝経路は、図 2-6 の中で、phenylphosphate を経路しない方の反応経路である。なお、硝酸塩還元能は有していない。

また、酵素レベルでの報告はないが、*Clostridium* 属に分類される嫌氣的フェノール分解細菌として、proteose peptone 存在下の嫌氣条件下で、フェノールを安息香酸に、4-hydroxybenzoate をフェノールと安息香酸に代謝する株 (strain 6 と名づけられている) が分離されている (Li *et al.*, 1996)。その後、この株 (strain 6) には別の株 (strain 7) が若干混在しており、純化がされていないことがわかった。様々な過程を経て strain 6 の分離に成功し、正式に *Cryptanaerobacter phenolicus* strain LR7.2^T と分類・同定された (Juteau *et al.*, 2005)。なお、硝酸塩還元能は有していない。

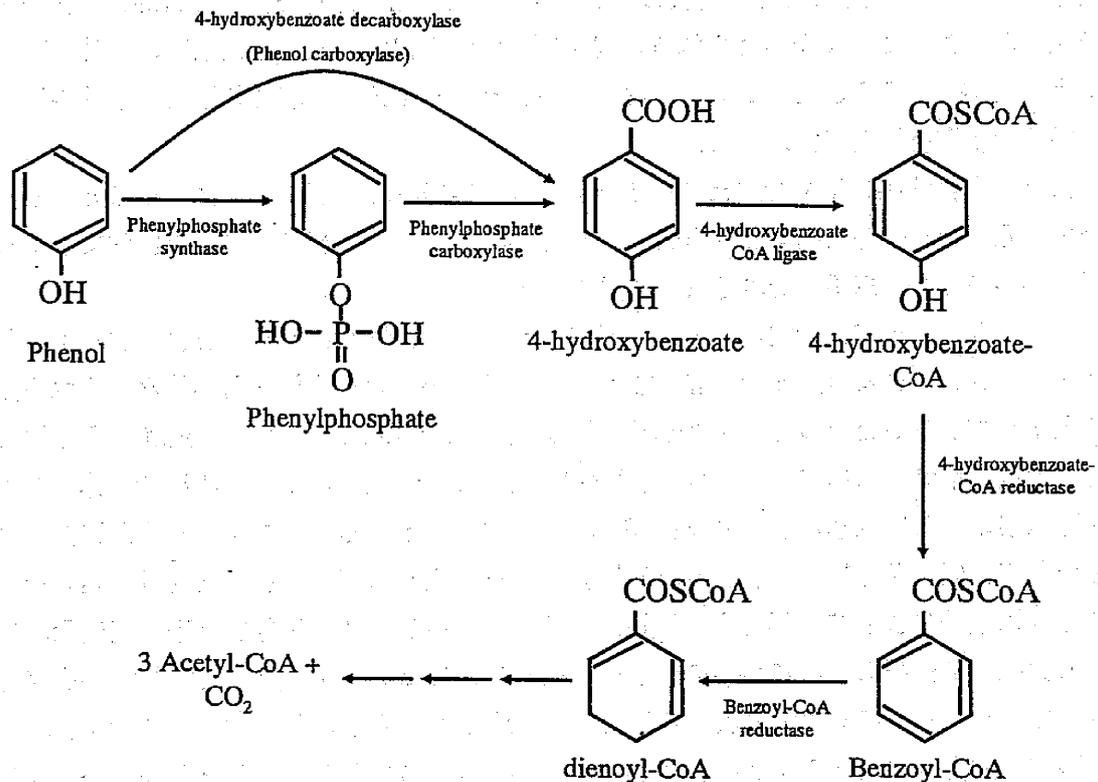


図 2-6 嫌氣的フェノール分解経路 (Boll & Fuchs, 2005 を改変)

Thauera 属

Thauera 属に分類される嫌氣的フェノール分解細菌は、分子状酸素の存在しない状況下で硝酸塩を電子受容体として、フェノールを二酸化炭素にまで酸化する分離株として分離された (Tschsch & Fuchs, 1987)。当初は、*Pseudomonas* 属に分類されるとしていたが、正式に *Thauera aromatica* strain K172 と分類・同定された (Anders *et al.*, 1995)。嫌氣的フェノール分解遺伝子は、この *Thauera aromatica* strain K172 が最も良く研究がされており、図 2-6 に示すように、嫌氣的フェノール代謝経路やそれに関わる酵素などが解明されている (Breinig *et al.*, 2000; Schmeling *et al.*, 2004; Schühle & Fuchs, 2004; Boll &

Fuchs, 2005)。 *Thauera aromatica* strain K172 の嫌氣的フェノール代謝経路は、図 2-6 の中で、phenylphosphate を経由する方の反応経路である。

このように、一部の系統学的位置に属する細菌の嫌氣的フェノール分解に関しては、それを担う分離株の獲得から反応を担う酵素の単離まで良く研究がなされている。代謝経路に関するさらなる詳細に関しては、フェノールを含めた芳香族化合物の嫌氣的分解に関するレビューにまとめられている (Heider J & Fuchs G, 1997; Harwood CS *et al*, 1999; Widdel F & Rabus R, 2001; Gibson J & Harwood CS, 2002; Boll M *et al*, 2002; Boll M, 2005)。しかし、環境中には、既報の反応経路以外の経路で分解を行う嫌氣的フェノール分解細菌が生息していると考えられる。例えば、鉄還元細菌、硫酸還元細菌、発酵細菌などによる反応が考えられる。このような嫌氣的フェノール分解細菌を分子生物学的手法などで網羅的に解析した研究例はない。

また、嫌氣的条件下でのフェノール分解とは言い切れないが、フェノールの分解と硝酸塩の還元を行う細菌に関する報告例と、土壌中のフェノール分解細菌を SIP 法で解析した報告例があった。以下、それぞれ順に紹介する。

Beak らによって、低酸素濃度条件下でフェノールを分解し硝酸塩を還元する細菌が分離・培養されている (Beak *et al*, 2003)。コンポスト・水田土壌・色素排水・下水汚泥・工業排水プラントといった様々な分離源から、1 mM のフェノールと 6 mM の硝酸塩を含んだ無機塩培地を用いて、気層が酸素とヘリウム (98 : 2 (vol : vol)) の混合気体でバイアル瓶 (培地 : 気層は 90 ml : 35 ml) を用いて集積培養を行った。フェノールが完全に分解された後、同じ条件で集積培養系の植え継ぎを 3-5 回行い、最終的に R2A 固体培地を用いた平板培養法によって分離株を獲得した。その中からフェノール分解と硝酸塩還元能を有する分離株を選択した。これらの分離株に関して、フェノールを含んだ液体無機塩培地を用いてフェノールの分解の試験が行われた。培地には電子受容体として、酸素のみ/酸素と硝酸塩/硝酸塩のみの 3 通りが添加された。結果、全ての分離株は、電子受容体が酸素のみ/酸素と硝酸塩の場合にだけフェノールを分解した。また、約 1300 bp 以上の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいて、これらの分離株は *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bosea*, *Ochrobactrum*, *Rhodospirillum*, *Staphylococcus*, *Thermomonas*, *Variovorax* 属に分類された。

土壌中のフェノール分解に関与する細菌を SIP 法によって追跡した報告例が 2 報ある。ひとつは Padmanabhan らの報告で、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールを与えた土壌に対して DNA-SIP 法を適用して、*Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* 属がフェノール由来の ^{13}C を同化したとして検出された (Padmanabhan *et al*, 2003)。もうひとつは DeRito らの報告で、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールを与えた土壌に対して DNA-SIP 法を適用して、*Herbaspirillum*, *Kocuria*, *Lysobacter*, *Propionibacterium*, *Sphingonomoas*, *Staphylococcus*, *Variovorax* 属がフェノール由来の

^{13}C を同化したとして検出された (DeRito *et al.*, 2003)。但し、これらの属が好氣的にフェノールを同化したのか、嫌氣的にフェノールを同化したのかは不明である。

2.4 分子生物学的手法

polymerase chain reaction (PCR) 法が登場して以来、分子生物学的に複合微生物系を解析する試みがなされてきた。PCR 法は目的の DNA 領域を簡便に増幅できる手法である。複合微生物系から抽出した DNA を対象として PCR 法を適用することによって、分離培養法に依存せずに複合微生物系を遺伝学的に解析することが可能になる。しかし、PCR 法によって増幅された DNA には DNA 塩基配列の異なる DNA が含まれている。そのため、これらの DNA を一つ一つに分離・回収して解析する必要がある。クローニング法を用いることで 1 種類塩基配列を持つ DNA を分離・回収することができる。但し、クローニング法は手間がかかるため、複数のサンプルを処理することには不向きである。そこで、クローニング法とは異なる原理を用いて、DNA 塩基配列に依存して複数種の DNA の混合物から数種類または 1 種類の DNA を分離・解析する手法が登場した。PCR-denaturing gel gradient electrophoresis (PCR-DGGE) 法 (Fischer SG & Lerman LS, 1979, 1983; Muyzer *et al.*, 1993)、PCR-temperature gradient gel electrophoresis (PCR-TGGE) 法 (Rosenbaum V & Riesner D, 1987; Muyzer G & Smalla K, 1998)、PCR-terminal restriction fragment length polymorphisms (PCR-T-RFLP) 法 (Liu *et al.*, 1997) である。これらの手法は複数のサンプルを一度に処理することに適している。なお、手法の詳しい原理はあとで述べる。

これらの手法は以下のような形で用いられることが多い。PCR-DGGE 法や PCR-TGGE 法では、増幅した DNA をポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行い、DNA の塩基配列の違いによって分離する。分離した DNA はゲルから回収しシーケンシングを行なうことができる。一方、PCR-T-RFLP 法では、増幅した DNA を制限酵素によって断片化した後、ゲルまたはキャピラリーを用いた電気泳動を行い、DNA の塩基配列の長さによって分離する。但し、PCR-DGGE 法や PCR-TGGE 法のように 1 種類の塩基配列を持つ DNA を分離・回収することができないため、大抵の場合クローニング解析とシーケンシング解析を併せて行う。

PCR-DGGE 法、PCR-TGGE 法、PCR-T-RFLP 法は、複合微生物系を解析する分子生物学的手法として紹介されて以来爆発的に広まり、現在では汎用される解析技術となっている。クローニング法と比較して、複数のサンプルを短い時間で一度に解析できる点や、複数のサンプル間の比較を行える点が利点と言える。

それでは以下に各手法の原理を説明する。

a) クローニング法

クローニング法はベクターと宿主を利用して目的の DNA 領域を増幅する手法である。また DNA 領域を単離する手法でもある。その原理は以下である。目的の DNA 領域を生物の DNA から切り出す。切り出した DNA 領域をベクターと呼ばれるプラスミド DNA に組み

込み、ベクターを宿主となる細菌に導入する。一般的に、宿主として大腸菌 (*Escherichia coli*) が用いられる。組み込まれたベクターは宿主の増殖と共に増える。十分に宿主が増えたところでベクターを回収する。そして、目的の DNA 領域を切り出し、回収することで、増幅された目的 DNA 領域が得られる。また、最終的に 1 種類の DNA 領域が回収されるので、数種類の DNA 領域が混在している中から 1 種類の DNA 領域を単離・回収する目的で用いられることもある。

b) PCR 法

PCR 法は、DNA ポリメラーゼとプライマー (DNA 合成開始部位となる 10-20 bp 程度のヌクレオチド断片) によって目的の DNA 領域を増幅する手法である。ベクターやホストを使わずに、DNA ポリメラーゼによる酵素反応で目的の DNA 領域を増幅を行える点がクローニング法と比べて便利な点である。その原理は次の通りである。増幅したい目的の DNA 領域をはさむプライマーを 2 種類用意する。1 種類は目的の DNA 領域の 2 本鎖 DNA のセンス鎖 5'末端側に相補的な配列を、もう 1 種類はアンチセンス鎖 5'末端側に相補的な配列を用意する。そして、鋳型となる目的の DNA 領域を含んだ DNA、プライマー 2 種類、DNA ポリメラーゼ、DNA 合成材料となるデオキシリボヌクレオチド、その他酵素反応条件に必要な緩衝液を混合して、温度サイクルを繰り返す。温度サイクルは、2 本鎖 DNA の 1 本鎖への変性、プライマーの 1 本鎖 DNA のアニーリング、プライマー部位から 3'方向への DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応を 1 サイクルの反応として複数回行うように設定する。複数回行うことによって、目的の DNA 領域は理論的には指数関数的に増幅される。現在では DNA ポリメラーゼを含む PCR 反応液のセットが使いやすい形で販売され、さらに温度サイクルを自動的に行えるサーマルサイクラーが利用され、PCR 法によって目的の DNA 領域を簡単に増幅することが可能となった。しかし、PCR 法に関連する様々な問題も認識されている。それらは、使用するプライマーが既知の塩基配列から作成されているため、未知の塩基配列を保有する対象は検出できないことや、PCR 法反応中にキメラやヘテロデュプレックスの生成 (Kanagawa, 2003) やプライマーのアニーリング効率に関すること (Suzuki & Giovannoni, 1996; Polz & Cavanaugh 1998) である。また、rRNA 遺伝子を対象とする場合、細胞あたりの rRNA 遺伝子コピー数が細菌の種類によって異なること (Klappenbach *et al.*, 2000; Acinas *et al.*, 2004) も、PCR 法を介した手法では実環境に存在する生物細胞の数を反映しにくいという問題として認識されている。

c) PCR-DGGE 法

PCR-DGGE 法は化学的変性勾配を利用して DNA を分離する。その原理は次の通りである。PCR-DGGE 法のための PCR 法では、2 種類のプライマーのうち 1 種類に GC クランプというほとんど GC のみで構成された約 40 bp の配列を含んだプライマーを用いる。GC クランプは、通常のプライマーに対して 5'側に付加する形にする。このようなプライマー

で増幅された DNA 増幅産物を、DNA 変性剤（尿素とホルムアミド）で濃度勾配を作成したポリアクリルアミドゲル中で電気泳動をする。電気泳動は、DNA 変性剤濃度が薄い方から濃い方へと行う。DNA 増幅産物は 2 本鎖であり、その塩基配列に依存してある DNA 変性剤濃度で 2 本鎖が 1 本鎖に開裂する。一方、GC クランプ部位は結合力が強いので開裂しない。すると、DNA 増幅産物は 3 方向に分かれた形状をとる。こうして泳動抵抗が大きくなることで DNA 増幅産物が開裂した場所にとどまる。このようにして、DNA 増幅産物の塩基配列に依存して、1 bp の塩基配列の違いでも分離が可能とされている。ある程度の時間泳動を行い、ほとんどの DNA 増幅産物の変性し泳動しなくなった後、ポリアクリルアミドゲルを DNA 染色剤で染色して、DNA パターンを視化してプロファイルをとる。泳動条件によるが、1 種類から数種類の DNA 増幅産物が 1 本のバンドとして視化される(図 2-7)。

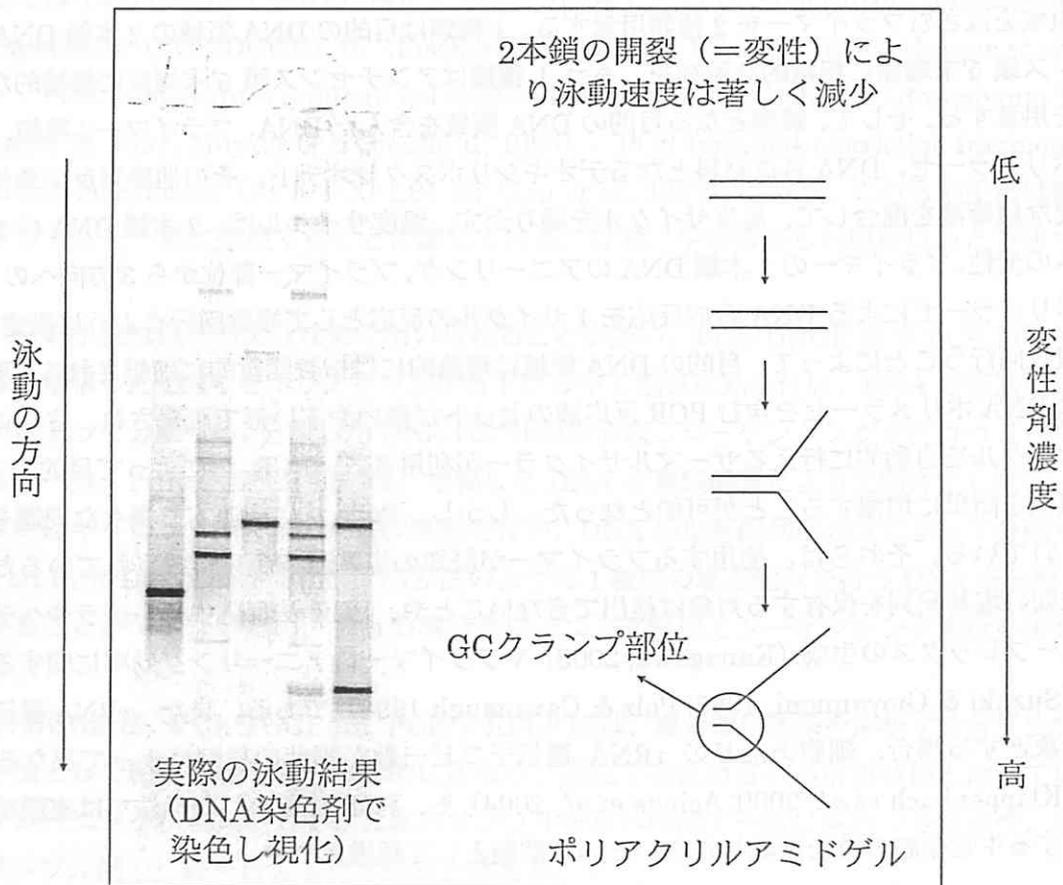


図 2-7 PCR-DGGE 法の原理

また、PCR-DGGE 法の後では、バンドを切り出してシーケンシング法によってバンドに含まれる DNA の塩基配列を決定することが可能である。但し、1 本のバンドが数種類の DNA を含む場合には、それらを分離する必要がある。

d) PCR-TGGE 法

PCR-TGGE 法では、PCR-DGGE 法が化学的変性を利用しているのに対して、熱変性を利用して DNA を分離する。その他の原理は PCR-DGGE 法に同じである。また、図 2-7 に示すようなバンドのプロファイルが同様に得られる。

e) PCR-T-RFLP 法

PCR-T-RFLP 法は、DNA 塩基長の違いを利用して DNA を分離する。その原理は次の通りである。PCR-T-RFLP 法のための PCR 法では、2 種類のプライマーのうち 1 種類の 5' 末端側に蛍光標識したプライマーを用いる。このようなプライマーで増幅された DNA 増幅産物を制限酵素で切断する。生じた DNA 断片 (terminal restriction fragment (TRF)) を 1 本鎖に変性した後、電気泳動によってその塩基長の違いにより分離・検出する。検出されるのは、蛍光標識されたプライマーを含む断片のみとなる。分離・検出は、一般的にオート DNA シーケンサーを用いて行われる。このようにして、DNA 増幅産物の塩基配列に依存して、1 bp の塩基配列の違いでも原理的には分離が可能である。得られたプロファイルの一例を図 2-8 に示す。原理的には、1 つのピークが 1 つの塩基長を有する DNA 断片に相当している。

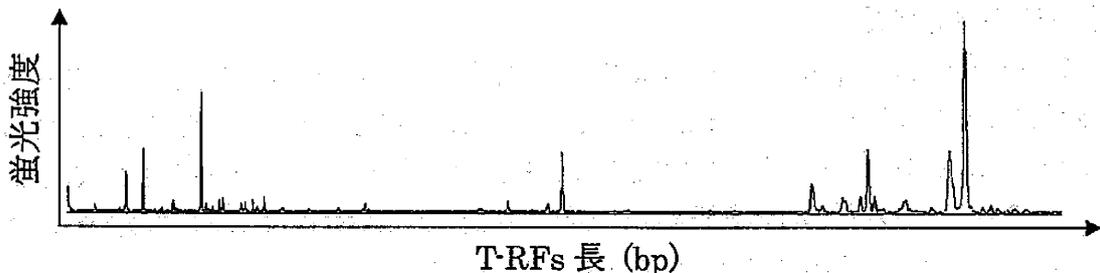


図 2-8 TRFLP プロファイルの一例

(ABI 310 genetic analyzer (Applied Biosystems)を用いた場合)

PCR-DGGE 法の後では、バンドを切り出してシーケンシング法によってバンドに含まれる DNA の塩基配列を決定することが可能であった。一方、PCR-T-RFLP 法ではそれができない。各ピークがどのような塩基配列に由来するのかを知るためには、鋳型として用いた DNA をクローニング法とシーケンシング法によって解析する必要がある。

ここまで紹介してきた手法は PCR を介して利用されることが多い手法である。PCR 法に依存すると、PCR 法に内在する様々なバイアスや rRNA のコピー数が微生物間で異なることなどが問題となる。一方、PCR 法を介さない手法には、fluorescent *in situ* hybridization (FISH) 法がある。以下にその原理を説明する。

f) FISH 法

FISH 法は PCR 法を介さずに、特異的なプローブ（蛍光標識された 20 bp 程度のヌクレオチド断片）を用いて特定の微生物を標識して顕微鏡下で観察する手法である（Amann *et al.*, 1995）。その原理は次の通りである。標的とする微生物の核酸の塩基配列に相補的な塩基配列を持つプローブを用いる。このプローブをサンプルに添加して標的核酸に結合させた後、蛍光顕微鏡下で観察する。標的核酸を持つ微生物が蛍光を発して検出される。複合微生物系に FISH 法を適用する場合、多くは rRNA を対象とする。PCR 法を介していないために、PCR 法に関するバイアスの問題が FISH 法では問題にならない。しかし、FISH 法には、rRNA が少ない微生物は蛍光検出が困難であるという問題がある。

そして、近年著しい発展を遂げている手法に Microautoradiography (MAR) -FISH 法と stable isotope probing (SIP) 法がある。これらの手法は、それぞれ放射性同位体化合物・安定同位体化合物を利用して、それらを摂取した微生物を特定する手法である。前述した PCR-DGGE 法、PCR-TGGE 法、PCR-T-RFLP 法とは大きく異なり、用いた化合物から推定される生物の「代謝機能」という側面と標識された物質を解析して特定される生物の「正体（生化学情報や遺伝子情報に基いた特定）」という側面を対応付けることができる画期的な手法である。以下、それぞれの手法について説明する。

g) MAR-FISH 法

Microautoradiography (MAR) -FISH 法とは、放射性同位元素の細胞内への取り込みを感光剤によって検出する Microautoradiography 法と FISH 法を組み合わせた手法である（Lee *et al.*, 1999）。その原理は次の通りである。放射性同位体元素（一般的に ^{14}C が良く用いられる）を含んだ化合物を微生物に与えて培養し、放射性同位体化合物を細胞内に取り込ませる。培養した微生物をスライドグラス上に固定する。このスライドグラスに臭化銀を含んだ感光乳剤を塗布し、放射性同位体化合物を摂取した微生物から放出される放射線を感光乳剤に曝露させる。すると、放射線に曝露された感光乳剤部分には銀粒子が形成され、これを明視野で顕微鏡観察することによって放射性同位体化合物を取り込んだ微生物を特定する。複合微生物系に適用すれば、用いた放射性同位体化合物を取り込んだ微生物のみを特異的に特定することができる。但し、後述する stable isotope probing (SIP) 法と同様に、用いた放射性同位体化合物（SIP 法の場合は安定同位体化合物）の代謝産物を取り込んだ微生物も同時に検出されてしまうという cross-feeding 効果に注意する必要がある。

h) SIP 法

stable isotope probing (SIP) 法とは、安定同位体元素（stable isotope）を用いて、対象微生物を標識（probing）して検出・特定する分子生物学的手法である。その原理は次の通りである。安定同位体元素（一般的に ^{13}C が良く用いられる）を含んだ化合物を微生物に

与えて、摂取・同化させる。その安定同位体化合物を摂取・同化した微生物は、安定同位体化合物中の安定同位体元素を用いて細胞成分（DNA・RNA・リン脂質脂肪酸）を合成する。この細胞成分を解析することによって安定同位体化合物を摂取・同化した微生物を特定する。MAR-FISH法と同様に、cross-feeding 効果に注意する必要がある。

このように、複合微生物系を解析する分子生物学的手法は様々である。本研究では分子生物学的手法を用いて嫌氣的フェノール分解細菌を特定する試みを行うにあたり、ここで紹介した手法の中から SIP 法を選択した。選択した理由については、次の節で述べる。

2.5 Stable Isotope Probing (SIP) 法

stable isotope probing (SIP) 法とは、安定同位体元素 (stable isotope) を用いて、対象生物を標識 (probing) して検出・特定する分子生物学的手法である。安定同位体元素を含んだ化合物を生物に与えることによって、その安定同位体化合物を摂取・同化した生物を標識した後、標識された物質を解析することによってその生物を特定するという原理に基づいている。複合微生物系を解析するための既存の分子生物学的手法 (PCR-DGGE 法、PCR-TGGE 法、PCR-T-RFLP 法、FISH 法) とは異なり、用いた化合物から推定される生物の「代謝機能」という側面と標識された物質を解析して推定される生物の「正体 (生化学情報や遺伝子情報に基いた特定)」という側面を対応付けることができる手法である。

土壌・活性汚泥などを中心に適用されており、Whitely らにより *Nature Protocol* 誌に DNA-SIP 法と RNA-SIP 法のプロトコルが報告されて以来 (Whitely *et al.*, 2007)、以前にも増して SIP 法が爆発的に広まっている。

本研究では分子生物学的手法として SIP 法を用いた。数ある分子生物学的手法の中から SIP 法を選択したのは次のような理由からであった。本研究の目的である嫌氣的フェノール分解細菌 (及び好氣的フェノール分解細菌) の特定を可能にする分子生物学的手法は、MAR-FISH 法か SIP 法に限られた。

MAR-FISH 法では放射性同位体化合物 (^{14}C 標識されたフェノール) を用いて培養を行い、FISH 法によって特異的なプローブを用いて ^{14}C 標識されたフェノールを同化した微生物を特定する。具体的には、MAR-FISH 法を適用したサンプルからクローニング法とシーケンシング法によって微生物種の塩基配列を獲得し、それらに特異的なプローブを作成して FISH 法を適用することになる。こうして、 ^{14}C 標識されたフェノールを同化した微生物の塩基配列を獲得することがきる。しかし、この作業には時間と費用がかかり、作成したプローブが目的の微生物を特定できない可能性もある。また、 ^{14}C 標識されたフェノールは非常に高価である点も複数回実験を行う上で欠点となる。

一方、SIP 法では安定同位体化合物 (^{13}C 標識されたフェノール) を用いて培養を行い、密度勾配平衡遠心法と T-RFLP 法・クローニング法によって ^{13}C 標識されたフェノールを同化した微生物を特定する。SIP 法では ^{13}C 標識されたフェノールを同化した微生物の塩基配列をほぼ確実に特定でき、さらに、MAR-FISH 法に比べて、費用も安価であり時間も短くてすむ。そのため、複数回実験を行うのには適している。

そこで、本研究では SIP 法を適用することにした。解析対象物質はデータベースが豊富な核酸とし、DNA よりも感度の良い RNA を選択した。

次の節では、SIP 法の特徴と近年の動向に関して述べ、SIP 法の注意点や問題点などを既往の知見を交えながら紹介する。

2.5.1 SIP 法の特徴と近年の動向

安定同位体化合物を利用した複合微生物系を対象とする微生物群集構造解析は、近年著しく発展を遂げている。炭素の安定同位体である ^{13}C 標識された化合物をバイオマーカーとして利用して、リン脂質脂肪酸 (Phospholipids fatty acids (PLFA)) を解析することにより、環境中における微生物の機能と微生物の特定 (生化学情報や遺伝子情報に基いた特定) を結びつけた研究が、1998年にBoschkerらにより *Nature* 誌に初めて発表された

(Boschker *et al.*, 1998)。その後、土壌のメタノール利用微生物を対象として、 ^{13}C 標識された化合物 (^{13}C 標識されたメタノール) を利用して16S rDNA遺伝子を対象として系統解析を行った研究が、2000年にRadajewskiらにより *Nature* 誌に発表された (Radajewski *et al.*, 2000)。これが、DNA-SIP法を用いた最初の研究である。

以後、DNA-SIP法に関する研究が数報報告され、対象遺伝子をDNAではなくRNAとしたRNA-SIP法に関する最初の研究が、2002年にManefieldらにより *Applied and Environmental Microbiology* 誌に報告された (Manefield *et al.*, 2002b)。Manefieldら、Luedersらのグループを中心にRNA-SIP法に関する研究が数報報告された後、その他の様々な研究者による報告例が増加の一途をたどっているのが現状である。RNA-SIP法は、その対象をDNAではなくRNAとすることにより、DNAを合成する時間を待たないこと、16S rRNAは16S rDNAよりも多いコピー数を持つこと、16S rRNAは代謝回転速度が速いこと、などを理由にDNA-SIP法よりも感度が良いと報告されている (Manefield *et al.*, 2002b; Dumont *et al.*, 2006)。

このRNA-SIP法は本質的にはDNA-SIP法の姉妹手法という流れの中で、Whiteley, Manefield, Luedersらにより紹介されてきた。前述の通り、細胞中におけるrRNAの代謝回転が早いという理由から、RNA-SIP法はDNA-SIP法に比べて非常に感度が良い。また、もうひとつの利点として、標識されたDNAの回収が少なくとも1回の細胞分裂を必要とする点とは異なり、標識されたRNAの回収は細胞分裂を待つ必要がない、という点もある。RNA-SIP法と称される技術であるが、これまでにrRNAに対してのみ用いられており、発現機能遺伝子のmRNA転写物に対しては用いられていない (rRNAに対してmRNAの存在量は少なく、現在の解析技術では困難なことがその理由と考えられる)。この分野に関しては、今後の発展に注目したい。この他には今後報告例が多くなると予想される分野として、Luedersらによる報告例のように安定同位体化合物を用いるのではなく安定同位体で標識された微生物を用いる研究例や (Lueders *et al.*, 2006)、 ^{13}C -labeled DNAをMetagenome解析の対象とする研究例が考えられる。Murase & Frenzelは水田土壌の微生物食物連鎖を調べるために、安定同位体炭素で標識したメタンを用いて、メタンを同化した微生物とそれを捕食する真核生物との系統学的位置を特定した (Murase & Frenzel 2007)。近年、SIP法を用いた研究にかかわらず、原生動物の群集構造解析例も報告されており (Díez B *et al.*, 2001; Countway *et al.*, 2005; Brown & Wolfe, 2006)、これらの研究例

のように、原核生物だけではなくあらゆる微生物を考慮した食物連鎖に目を向ける準備が整いつつあるといえる。また、Metagenome解析の対象が ^{13}C -labeled DNAであれば、ランダムヘキサマーとPhi29 DNA Polymeraseによって少ない核酸をある程度増幅させた後に、Metagenome解析が可能であろう。

このような発展を遂げてきたSIP法であるが、核酸の組成から考えて（例として、 $\text{dAMP}=\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}$ ）窒素や酸素の安定同位体を用いても可能である。しかし、その割合から推定されるように、標識された核酸と標識されていない核酸の分離が困難である。Buckleyらは、DNAのA-T間に特異的に挿入する物質であるbis-benzimideによりGC含量に依存してDNAの浮遊密度を変化させることを利用して、困難であった ^{15}N -DNAの分離を可能にした（Buckley *et al.*, 2007a）。そして、安定同位体窒素を用いて、土壌中の窒素固定細菌を調査し、新規窒素固定細菌を特定した（Buckley *et al.*, 2007b）。また、Schwartzは、 H_2^{18}O を用いて*Escherichia coli*と土壌を培養して、 ^{18}O で標識されたDNAの分離に成功した（Schwartz, 2007）。このように、核酸を構成する様々な元素を利用したSIP法が報告されており、実験目的によっては強力な手法になり得るといえる。

2.5.2 SIP法の発展

a) SIP法の問題点

DNA-SIP法やRNA-SIP法にもいくつかの欠点がある。まずは、cross-feeding効果の問題点とその利用について述べる。SIP法に関わる制限事項としては、基質を添加した後、標識されたDNAやRNAの合成を待つ必要がある点である。この問題は、RNAよりもDNAの方が標識されるのに時間がかかるため、DNA-SIP法を行う上でより問題になりやすい。また、RNA-SIP法でも問題になる点であるが、どのような培養を行ったとしても標識された産物の代謝産物の形成が起これ、その代謝産物を対象としてない生物が摂取・同化することによって対象外の生物を検出してしまうというcross-feeding効果が問題として挙げられる。Manefieldらは、フェノールを同化する細菌*Pseudomonas putida* BS564株とフェノール耐性があるがフェノールは同化しない細菌*Pseudomonas chlororaphis* BS523株を ^{13}C 標識されたフェノールを与えて共に培養して、cross-feeding効果が起こる様子を示した（Manefield *et al.*, 2002b）。

cross-feedingの問題に対するひとつの解決策として、DNA-SIP法においてはarchaeal ^{13}C -carrier DNAを用いることにより培養時間を短くすることができるという報告がなされた（Gallagher *et al.*, 2005）。この原理は、安定同位体化合物による培養時間を短縮することによって生成される ^{13}C -labeled DNA量が少量になるが、超遠心時に少量の ^{13}C -labeled DNAを含むサンプルDNAと共にarchaeal ^{13}C -carrier DNAを添加して遠心操作を行うことによって可視化できるバンドとして（エチジウムブロマイドにより可視化）検出するという方法である。

一方、cross-feeding効果は問題点でもあるが、それを利用することもできる。例えば、

Murase & Frenzel らの報告例がそうであるように、ある基質を細菌が摂取してその細菌を原生動物が捕食するとする場合、一連の食物連鎖の機構を解明するためには、安定同位体標識されたある基質を添加した後にその挙動を SIP 法で追跡すればよい (Murase & Frenzel 2007)。つまり、安定同位体基質が細菌に同化された後に、それらの標識された細菌が原生動物により捕食されるという過程を SIP 法で追跡すれば、捕食関係にある細菌と原生動物の系統的位置を推測することが可能となる。また、前もって細菌自体を安定同位体化合物で生育させて標識しておき、それをある系に投入してその様子を SIP 法で追跡することもできる。さらに、MAR-FISH 法を組み合わせれば、細菌が原生動物により捕食された瞬間や原生動物の体内に取り込まれた状況などを、顕微鏡写真という明確な形で示すことができるであろう。この他には、植物と植物が供給する有機物を摂取する微生物の関係なども解析が可能である (Ostle *et al.*, 2003; Griffiths *et al.* 2004)。

cross-feeding 効果以外の問題点としては、炭素の安定同位体元素を用いる場合に実際の系内において、 ^{12}C 、 ^{13}C の炭素を選り好みせずに対象とする生物が摂取しているのかどうかという問題が考えられた。Manefield らの報告では、*Pseudomonas putida* BS564 株を使用して ^{13}C 標識されたフェノールと標識されていないフェノールの混合物(様々な混合比率で使用)を唯一の炭素源として培養した系においては、選り好みする現象が確認されなかったと報告している (Manefield *et al.*, 2002b)。しかし、Uphaus らの報告では、藻類の *Chlorella vulgaris* に水素、炭素、酸素、窒素の重い安定同位体を摂取させた場合、通常の細胞よりも大きさが大きくなり、重い安定同位体は、細胞の大きさ、そして核酸、糖類、蛋白質といった細胞構成成分の性質や分配を変化させたと報告している (Uphaus *et al.*, 1967)。また、 ^{13}C 標識された hexadecane は ^{12}C と ^{13}C を混合した hexadecane を与えた集積培養系よりも生育が遅れたという報告もある (Zengler *et al.*, 1999)。

b) SIP 法で用いられる超遠心溶媒の種類

核酸を SIP 法の解析対象とする場合、安定同位体元素で標識された核酸を超遠心法によって分離・分画する。その時に使用する超遠心溶媒には、一般的に DNA-SIP 法では塩化セシウム溶液 (CsCl solution) を、RNA-SIP 法ではトリフルオロ酢酸セシウム溶液 (CsTFA solution) を使用する。この溶媒の違いは、DNA と RNA の浮遊密度の違いに起因している。Lueders らが 2004 年に *Environmental Microbiology* 誌に報告した論文に数種類の原核生物と真核生物の DNA 又は RNA の浮遊密度の例が示してあるのを参照されたい (Lueders *et al.*, 2004a)。また、Manefield らは、評価に用いた様々な媒体中において Native RNA は DNA よりも高い浮遊密度を持ち、トリフルオロ酢酸セシウム溶液が密度勾配媒体として最適な実証結果を得た、と報告した (Manefield *et al.*, 2002a)。しかし、このトリフルオロ酢酸セシウム溶液は紫外線領域の波長を吸収し、RNA の紫外線観察を困難にする。そのために、RNA-SIP 法では、超遠心後に超遠心溶媒を分画・回収して解析を行う。一方、塩化セシウム溶液を用いる DNA-SIP 法では、塩化セシウム溶液が紫外線領域の

波長を吸収しないために、安定同位体元素で標識された DNA をエチジウムブロマイドによって可視化して、安定同位体元素で標識された DNA だけを回収することが可能である。

実際に、RNA-SIP 法を行う場合は、RNA を分画および回収後、各フラクションの total RNA の定量やリアルタイム PCR 法による rRNA の定量や terminal restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) 解析や denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 解析などによる rRNA プロファイル解析を行うことで、安定同位体元素で標識された RNA が含まれる分画を推定する。

c) GC含量による核酸の浮遊密度の違い

複合微生物系のような様々な生物由来の DNA 又は RNA を含むサンプルは、密度勾配平衡遠心法において様々な位置を占めるという問題がある。つまり、生物によって DNA 又は RNA の GC 含量に違いがあるので、密度勾配平衡遠心法において平衡に達する位置（浮遊密度）が異なるということである。そのため、元々 GC 含量の高いゲノムを保有する生物の核酸は、高い浮遊密度に位置することになり、安定同位体化合物を同化して標識された生物由来の DNA 又は RNA との区別を困難にする。さらに、標識された割合が小さければ小さいほど、これらの区別はより困難となる。

この問題を解決するためには、安定同位体化合物を与えて培養する系列に対する対照系として、標識されていない化合物を与えて培養する対照系列を行うと良い。両者を比較することにより、標識された生物をより明確に特定することができる。

これまでに報告された安定同位体炭素を用いた RNA-SIP 法の報告例には、 ^{13}C 標識された基質を与えた系列 (^{13}C 系列) のみを行う場合と、 ^{13}C 標識された基質を与えた系列 (^{13}C 系列) と標識されていない基質を与えた系列 (対照系列) の両方を行う場合の 2 通りがある。以下に、それらの実験の流れを説明する。

^{13}C 系列のみを行う場合

対象生物の培養には、 ^{13}C 標識された基質を与えて培養した ^{13}C 系列のみを行う。次に、培養期間を通じて数点でサンプルを採取して、異なる培養時間のサンプルの超遠心後の各分画に存在する RNA 量を、リアルタイム PCR でモニタリングして比較する。又は、培養前のサンプルと培養後のサンプルの超遠心後の各分画に存在する RNA 量を、リアルタイム PCR でモニタリングして比較する。大抵の場合、rRNA 遺伝子を対象としたリアルタイム PCR を用いる。培養時間が長くなるにつれて、浮遊密度の高い分画に RNA が検出されるようになる。この RNA の分布の様子から、 ^{13}C -RNA を含有する分画を推定して選択する。選択した分画中の RNA を鋳型としてクローンライブラリーを作成する。 ^{13}C を摂取・同化した生物は、 ^{13}C 系列の各分画の T-RFLP 解析や DGGE 解析を行い、それらのプロファイルと比較することによって特定する。 ^{13}C を摂取・同化した生物の系統学的位置は、T-RFLP 解析を行った場合はクローニング解析とシーケンシング解析によって決定し、DGGE 解析

を行った場合は DGGE バンドを切り出して、シーケンシング解析によって決定する。クローニング解析を行う場合は、 ^{13}C 系列の浮遊密度の高い分画のみに対して行うか、又は ^{13}C 系列の浮遊密度の高い分画と低い分画に対して行うのが一般的である。

以上の実験の流れに従った報告例は、Lueders らや Hatamoto らなどの報告である (Lueders *et al.*, 2004b; Hatamoto *et al.*, 2007)。

^{13}C 系列と対照系列の両方を行う場合

対象生物の培養には、 ^{13}C 標識された基質を与えて培養した ^{13}C 系列を行い、その対照として標識されていない基質を与えて同条件で培養した対照系列を行う。次に、 ^{13}C 系列と対照系列の超遠心後の各分画に存在する RNA を鋳型とした遺伝子プロファイルを取り比較する。大抵の場合、rRNA 遺伝子を対象とした T-RFLP 解析又は DGGE 解析を用いる。 ^{13}C 系列と対照系列の遺伝子プロファイルを比較することによって、 ^{13}C -RNA を含む分画や ^{13}C -RNA に由来する terminal restriction fragments (TRFs) や DGGE バンドを特定することができる。 ^{13}C を摂取・同化した生物の系統学的位置は、T-RFLP 解析を行った場合はクローニング解析とシーケンシング解析によって決定し、DGGE 解析を行った場合は DGGE バンドを切り出して、シーケンシング解析によって決定する。クローニング解析を行う場合は、 ^{13}C 系列と対照系列の浮遊密度の高い分画に対して行うのが一般的である。

以上の実験の流れに従った報告例は、Lu & Conrad や Hori らや Murase & Frenzel などの報告である (Lu & Conrad, 2005; Hori *et al.*, 2007; Murase & Frenzel, 2007)。

これら 2 通りの実験の流れから得られる結果には、以下の違いが見られることになる。

[^{13}C 系列のみを行う場合]では、 ^{13}C 系列の浮遊密度の高い分画のみから情報を得るか、又は、 ^{13}C 系列の浮遊密度の高い分画と低い分画の両者から情報を得ることになる。このため、GC 含量の高い、つまり、浮遊密度の高い分画に検出されやすい生物の ^{13}C の摂取・同化に関する判断が難しく、また、十分に安定同位体元素で標識された後に、 ^{13}C 系列の浮遊密度の高い分画まで移行してきた生物の RNA のみを対象とすることになる。

一方、[^{13}C 系列と対照系列の両方を行う場合]では、 ^{13}C 系列と対照系列の浮遊密度の高い分画の両者から情報を得ることになる。このため、GC 含量の高い、つまり、浮遊密度の高い分画に検出されやすい生物の ^{13}C の摂取・同化に関しては、対照系列の浮遊密度の高い分画から得られる情報があるために、[^{13}C 系列のみを行う場合]に比べて判断しやすいと考えられる。また、対照系列を行っているという意味では、安定同位体化合物を与えたために起こるかも知れない人工的な変化 (安定同位体化合物に起因する変化) を排除することができるという利点もある。さらに、 ^{13}C 系列と対照系列の全ての分画から得られた遺伝子プロファイルを比較することによって、浮遊密度の高い分画まで移行していない生物 (元々低い浮遊密度を保有している生物) も解析対象とすることが可能である。

本研究では、[^{13}C 系列と対照系列の両方を行う場合]に従った。

d) ^{13}C 標識の意味する所

最後に、現在主流となっているSIP法に関する考え方を述べる。初期のDNA-SIP法やRNA-SIP法では、超遠心後の浮遊密度の高い分画において標識されたDNA 又はRNAが検出される強く検出される程度まで安定同位体化合物を与えて培養することが必要だとされてきた。つまり、DNAを例にすると、超遠心後の遠心チューブ中に標識されていないDNAのバンドと標識されたDNAのバンドが、エチジウムブロマイドによる染色によって検出されるといった状態をさす。しかし、現在の主流となる考え方では、この状態まで培養することは ^{13}C で標識されすぎていると考えられている。標識されすぎているという状態は、高濃度で安定同位体化合物を与えたり、長時間培養を行わなければ実現できない。このような条件で培養を行えば、実環境を模倣していない可能性やcross-feeding効果が強く影響してしまう状況になっている可能性があるといえる。

理想的な ^{13}C 標識の状態は、次のような状態である。対照系列において、RNAが含まれる浮遊密度の最も高い分画を基準にする。この時、 ^{13}C 系列において、基準とした分画よりも1分画か2分画だけ浮遊密度の高い分画にRNAが検出される程度に ^{13}C 標識した状態である。この程度の ^{13}C 標識であれば、高濃度で安定同位体化合物を与えたり、長時間培養を行う必要はない。なお、この程度の ^{13}C 標識でも ^{13}C を同化した生物は十分に検出可能である。Friedrichの“It will be particularly rewarding to get closer to ‘probing’ rather than enrichment in SIP”.という言葉がそれを良く表している (Dumont *et al.*, 2006; Friedrich, 2006)。

2.6 分離培養法

2.6.1 微生物の発見と微生物学の歴史

微生物とは、「肉眼では見えない」生物の総称である。微生物の存在を確認する方法には、2種類の方法がある。ひとつは、顕微鏡によって拡大して観察する方法である。汚泥や土壌などを、顕微鏡で観察すると、確かに小さな物体が存在する。それらは、様々な動きをするものや全く動かないものがある。一般的に、これらの小さな物体は微生物として人間には認識されている。但し、「肉眼では見えない」ということは意外と厄介である。観察された物体がこれまでに観察されなかったような場合には、それらが微生物であると特定することは難しい。このような時には、核酸を染色する4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を利用した蛍光染色法が有効である。しかし、核酸以外が染色されることや染色されにくい微生物も存在する。著者も、安水処理活性汚泥中の優占している微生物が染色されなかった経験があり、本研究で用いた人工安水処理活性汚泥中の微生物にもそのようなものが確認された。

このように微生物を顕微鏡によって観察したのは、レーウエンフックが最初だと言われている。顕微鏡自体は、16世紀末のヨーロッパにおいて、対物レンズと接眼レンズの2つを組み合わせた複式顕微鏡として既にあったという。一方、レーウエンフックは、レンズが1つの単式顕微鏡を用いて微生物を観察した。彼は、1600年代に、この自作の単式顕微鏡を用いて、自然界の微生物（現在でいう藻類や原生動物）を観察し、それらの大きさを推定していた。レーウエンフックによる微生物の顕微鏡観察は非常に先駆的であったが、微生物に対する人々の関心が深まることはなく、依然として微生物は無生物から自然に発生するという考え方が浸透していた。この考え方が改められるのは、約200年後のパスツールによる実験によってであった。

微生物の存在を確認するもうひとつの方法は、微生物によって物質に生化学的変化を起こさせて、それらの存在を確認する方法である。有名な白鳥型のフラスコを用いたパスツールによる実験がそれである。19世紀半ばには、発酵産業が発展し、微生物による病気の問題も注目を集めていた。依然として、微生物は無生物から自然に発生するという考え方が浸透しており、その考え方が微生物に対する理解を難しくさせている問題でもあった。パスツールは、そこに着目し「微生物は親から発生するものなのか？それとも、自然発生的に発生するものなのか？」ということをも、白鳥型のフラスコを用いた実験（自然発生説批判の実験）により決着させた。

パスツールによって確立された実験法によって、以後、微生物学は徐々に発展を遂げていくことになる。まずは、1880年にコッホが平板培養法を確立した。培地をゼラチンで固化した固体培地表面に微生物サンプルを塗布して培養することにより、培地表面に微生物の集落であるコロニーを形成させるという方法である。コロニーは肉眼で観察することが

できる。微生物を肉眼で観察できる集落までに生育させて、その存在を肉眼で確認できるという点が画期的であった。後にゼラチンの代用として寒天が用いられ、現在では汎用されている。このようなコロニーを、滅菌された道具で滅菌された固体培地に新しく画線して植え継ぐことによって、純菌を得ることができる。液体培地でも段階希釈を行い培養することによって純菌を得ることができるが、コロニーという形で純化されたことを確認できるという点で（顕微鏡による観察も同時に行えば、純化していることをさらに確認できる）平板培養法は便利であり、微生物学の純然たる王道を行く手法といえる。

平板培養法が確立されて以来、肉エキス・酵母エキスを用いた培地が用いられ、炭素源として有機物を利用できる従属栄養菌が多く分離されてきたことが推測される。一方、炭素源としてCO₂を利用できる独立栄養菌の分離は、平板培養法を用いると難しいことが多い。このような独立栄養菌の分離を行ったのがヴィノグラドスキーであった。ヴィノグラドスキーは寒天の代わりにシリカゲルを固化剤として使用することにより、これらを分離した。硝化細菌、硫黄酸化細菌、鉄酸化細菌などの独立栄養細菌が分離された。

このように非常に便利な平板培養法であるが、その問題点が徐々に認識されてきた。そして、その問題は未だに改善されずに、微生物学の大きな問題点として残っている。それは、平板培養法によって捉えられる培養可能な微生物の数と、実際に顕微鏡観察によって観察される微生物の数には、約10-1000倍もの差があるという問題であった (Amann *et al.*, 1995)。また、同じ条件で同じサンプルを平板培養したとしても、その結果自体もばらつきを持ってしまうという問題もあった。1900年代に入り、微生物学がひとつの研究分野として本格的に歩み始めた頃から、これらの問題は深刻に認識され、多くの研究者により問題として語られてきた。

こうして顕微鏡観察による直接係数法と平板培養法などの分離培養法による計数法には、大きな差が見られることが一般的に認識された。では、実際に生きている微生物はどの程度いるのであろうか？顕微鏡観察による直接係数法を行った場合、生存細胞と、死滅細胞や生物ではない粒子との区別がつかないために、実際に生きている微生物数に対して過大評価をしてしまう。一方、分離培養法による係数法を行った場合、細胞の凝集や全ての微生物に適切な培養条件でないために、実際に生きている微生物数に対して過小評価をしてしまう。この問題に対する解決手法として、Kogureらによってナリジクス酸を用いて顕微鏡観察をする手法が報告され (Kogure *et al.*, 1979)、直接活性計測法 (Direct Viable Counts) として知られている。ナリジクス酸は、DNA合成を特異的に阻害しグラム陰性細菌の細胞分裂を抑制するが、その他の合成経路は抑制せずに結果として伸長した繊維状の細胞を形成させる。このように、活性を有して分裂を行い伸長した細胞を計数する手法である。Kogureらは、平板培養法による係数法と顕微鏡による直接係数法とナリジクス酸を用いた生細胞の直接係数法の3種類を比較した。結果、ナリジクス酸を用いた生細胞の直接係数法は、平板培養法による係数法よりも1000倍高く、顕微鏡による直接係数法よりも10倍低い程度の計数値を示した。こうして「生きているが培養できない (Viable But

NonCulturable (VBNC))」という認識が明確になっていった。パスツールが微生物の自然発生を否定し、微生物が増殖することが微生物が活着していることの証として認識されてきたが、「活着しているが培養できない (VBNC)」という状況が当たり前であることが強く認識され、微生物の生死に対する意識改革がもたらされたと言える。

やがて、複合微生物系の解析手法として、分離培養法ではなく遺伝子を対象とした解析手法が用いられるようになる。生物はその形態的特徴や生理学的特徴によって分類されてきたが、生物の蛋白質合成に参与するリボソームのsmall subunit RNAの塩基配列が解析対象となり、また分類指標のひとつとなっていった。1980年代には、原核生物のリボソーム粒子中の5 rRNAが解析対象となった。しかし、約120塩基しかない5 rRNAでの分類は難しく、16S rRNAや23S rRNAに代わっていった。16S rRNA遺伝子を対象として、環境中のDNAをクローニング法とシーケンシング法によって解析した最初の研究は、1991年に Schmidtらにより海洋を対象として行われた (Schmidt *et al.*, 1991)。また、1987年には、16S rRNA遺伝子を対象とした解析によって原核生物が細菌と古細菌に分類されることを Woeseが報告した (Woese, 1987)。以降、16S rRNAや23S rRNAなどの様々な遺伝子を対象とした複合微生物系の分子生物学的手法による解析が加速していった。

現在では、様々な技術を組み合わせた分子生物学的手法が開発されている。また、遺伝子解読技術も、Venterらによって *Helicobacter pylori* やキイロショウジョウバエやヒトのゲノムを対象としたショットガンシーケンシング法が報告されて以来 (Tomb *et al.*, 1997; Venter *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2000)、環境サンプルにも適用され始め (Venter *et al.*, 2004, Martín *et al.*, 2007)、爆発的に広まっている。しかし、一般的に用いられる分子生物学的手法では、様々な生物種間の遺伝子に共通して存在する塩基配列 (約 10-20 base pair (bp) でプライマーと呼ばれる) を用いて、対象となる遺伝子領域を増幅する polymerase chain reaction (PCR) 法が用いられており、このプライマーは既知の塩基配列から作成されているので、環境中に存在する生物の一部しか捉えることができないという問題もある。しかし、最近になって、プライマーの塩基配列を改善する試みがなされてきている (Isenbarger *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2008; Brons & van Elsas *et al.*, 2008)。

以上のように、観察に始まり、分離培養法、分子生物学的手法によって発展を遂げてきた微生物学分野であるが、近年、大量に解読されている塩基配列情報の解析を行うバイオインフォマティクス分野も重要な分野となっている。塩基配列情報から様々な情報が予測されるであろうが、やはり純粋培養を経なければ得られない情報が多く存在するであろう。そのためにも、分離培養法の改善を試みていく必要があると考えられる。

2.6.2 培養されている細菌と培養されていない細菌

生物にはその細胞構造の特徴による違いから、原核生物と真核生物に分けられる。原核生物は細菌 (真正細菌) と古細菌にさらに分類される。微生物と呼ばれる対象は、一般的に細菌、古細菌、真菌、原生動物、後生動物など様々な系統にわたる微小な生物を指すこ

とが多い。本研究では、細菌を対象として研究を行った。本節では、現在までに知られている細菌の系統学的位置について、分子生物学的手法と分離培養法を用いた既往の知見を交えながら説明する。

現在、細菌の分類において、50以上の門が確認されているが、その内の僅か半分しか分離株が得られていない (Hugenholtz *et al.*, 1998b; Rappé & Giovannoni, 2003; Keller & Zengler, 2004)。また、高塩濃度環境の微生物マットから PCR 法を介したクローニング解析とシーケンシング解析によって、数多くの新しい門が検出されたという報告や (Ley *et al.*, 2006)、従来から良く使用されてきた 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーの長さを 10 bp に短くした miniprimer を使用することにより、新しい門が検出されたという報告などもある (Isenbarger *et al.*, 2008)。このように、認識されていない系統学的位置の細菌は多数存在すると考えられる。

分離株が得られていない門には、口腔細菌や活性汚泥中など様々な環境で検出される candidate division TM7 や、イエローストーン国立公園内の Obsidian Pool から検出された candidates division OP3, OP5, OP8, OP9, OP11 などが知られているが (Hugenholtz *et al.*, 1998a; Hugenholtz *et al.*, 2001; Leadbetter, 2003; Ferrari *et al.*, 2005)、その他にも様々な門がある (Weller *et al.*, 1992; Fuhrman *et al.*, 1993)。また、分離株が僅かながら得られている門には、土壌中で確認される *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* 門や、好熱性細菌の *Thermomicrobia* 門、塩素化炭化水素の脱塩素化を行う *Dehalococcoides* 属などが属する *Chloroflexi* 門などである。これらの門に関しては、Janssen ら、Sekiguchi ら、Yamada らによって、少しずつではあるが分離株が得られている (Sekiguchi *et al.*, 2001; Joseph *et al.*, 2003; Sait *et al.*, 2002, 2006; Yamada *et al.*, 2007; Stott *et al.*, 2008)。また、candidate division OP11 に属する分離株は最近分離された (Stott *et al.*, 2008)。Stott らは Janssen らが報告したようなゲランガムを固化剤として用いた低 pH の培地を用いて分離に成功している。この candidate division OP11 に属する分離株は、ゲランガムを含まない培地では生育せず、ゲランガムをエネルギー源として利用していると考えられた。さらに、本研究を通じて、著者も *Chloroflexi* 門、*Thermomicrobia* 門、*Actinobacteria* 門、そして Candidate SBR 1093 門の分離株が分離された。これらに関しては、純化の確認及び継代培養を行っている最中である。場合によっては、新しい培地に継代しても生育しないという状況も起こりうるであろう。

このように、現在知られている細菌の系統学的位置はほんの一部であり、さらに分離株が得られて、その機能が解明されている系統学的位置は、さらに少ないことがわかる。これらの細菌は、「2.6.1 微生物の発見と微生物学の歴史」でふれたように、液体培地又は固体培地を用いた分離培養法によって分離が試みられてきた。その分離培養法の流れを次に述べる。サンプル採取に始まり、培地の選択、培養条件の種類、培養方法の種類について基本的なことを述べて、液体培地を用いた培養法と固体培地を用いた培養法の流れについて述べる。

2.6.3 分離培養法とその発展

本節では、従来から用いられている分離培養法として、液体培地と固体培地をそれぞれ用いた分離培養法について、その手法の流れを簡単に説明する。次に、これらの手法に対する改善の試みを行った報告例や新しい分離培養法の報告例を紹介する。

a) 液体培地を用いた分離培養法

液体培地を用いた分離培養法を行う場合には、基本的に試験管・三角フラスコ・バイアル瓶に液体培地を入れてサンプルを接種して培養を行う。

培養を行う前の準備として培養に使用する実験機器を滅菌するために、高温高圧蒸気滅菌処理（以下、オートクレーブ処理）を施す。この他の滅菌法には乾熱滅菌法・電子線滅菌法・ガンマ線滅菌法がある。液体培地はオートクレーブ処理又はろ過滅菌を行う。

試験管を用いた場合を例として、液体培地の培養容器への分注から培養までの過程を図2-9に示す。純菌などを大量培養する場合やある特定の代謝機能を持つ微生物を優占化させて集積培養する場合には、図2-9に示すような接種する試料の段階的な希釈は不要である。一方、活性汚泥や土壌といった複合微生物系から純菌を分離培養する場合には行うことが多い。

まず、活性汚泥や土壌中に生息する微生物は集合体（フロック）を形成していたり、土壌粒子の中に生息していたりする。そのため微生物を分散させる目的で超音波処理やボルテックス操作を行う。次に、前もって作成しておいた液体培地を試験管に分注する。液体培地が9 ml ずつ分注された試験管に、1 ml の試料を添加して良くボルテックス操作を行い、試料中の微生物を分散させる。それをさらに9 ml の液体培地が分注された新しい試験管に1 ml 添加して同様の操作を繰り返すことによって、希望の段階まで菌体の希釈を行う。段階希釈操作が終了すれば、それらを目的に合った培養条件で培養を行う。必要に応じてこの一連の分離培養操作を繰り返すことによって最終的に純菌を得ることができる。但し、強い共生関係を持つ微生物同士は、操作を繰り返しても純化が難しいと考えられる。

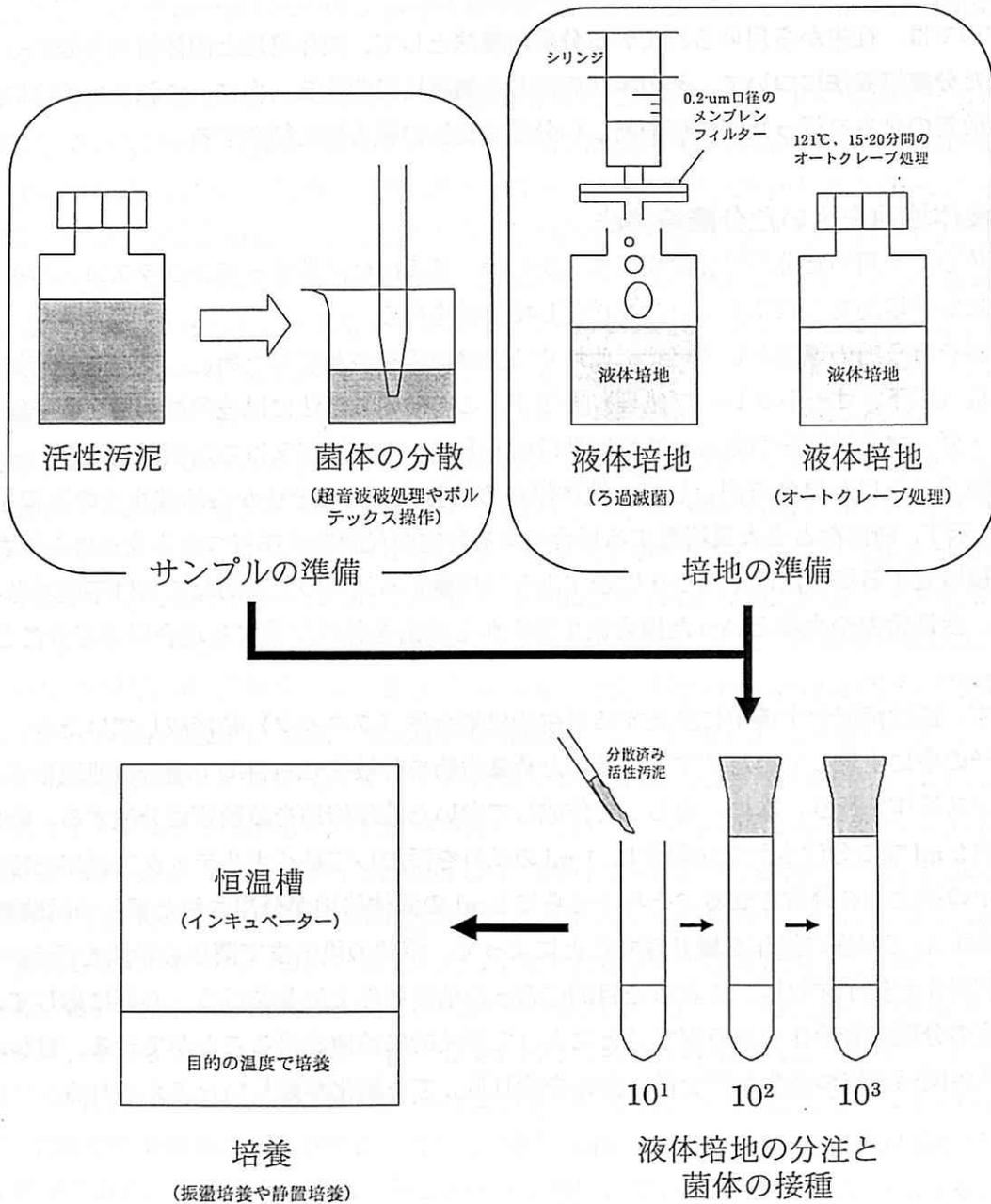


図 2-9 液体培地を用いた培養法の流れ

b) 固体培地を用いた分離培養法

固体培地は、液体培地に固化剤を添加してオートクレーブ処理を行った後、適当な温度に冷ましてからペトリ皿や試験管に分注して作成する。次に、固体培地に試料を接種して培養を行う。固形培地表面上にコロニーと呼ばれる微生物の集落を形成させ、そのコロニーを新しい培地へ画線することによって、最終的に純菌を分離・培養する。

なお、試料を固体培地に接種する方法には、塗抹法と混釈法がある。

塗抹法は以下の手順で行う。まず、滅菌済みコンラージ棒（又は使い捨てスプレダー）を用いて、適当に希釈した 0.1-0.2 ml の試料を固体培地表面に塗付する。試料が十分乾いたら、培地の乾燥を防ぐためにペトリ皿にパラフィルムをまいて、シャーレを逆さにして培養機の中に入れ適当な温度で培養を行う。増殖の早いものは 1 日以内に、遅いものは数ヶ月後に培地表面にコロニーが出現してくる。混釈法との大きな違いは、培地中にコロニーが形成されることがないという点である。

一方、混釈法は以下の手順で行う。まず、試料を適量（0.5-1.0ml 程度）ペトリ皿に入れる。オートクレーブ処理後の適温（固化温度は固化剤の種類に依存するが、大抵 40-45℃程度）に保持した固体培地を流し込み、よく混釈した後に培地を固化させる。以降の操作は、塗抹法と同じである。

試料を接種した固体培地を培養すると、複合微生物系のサンプルを用いた場合には、1 枚のペトリ皿の固体培地表面または固体培地中に複数のコロニーが形成される。これらのコロニーを単体として分離・培養するために画線作業を行う（図 2-10）。

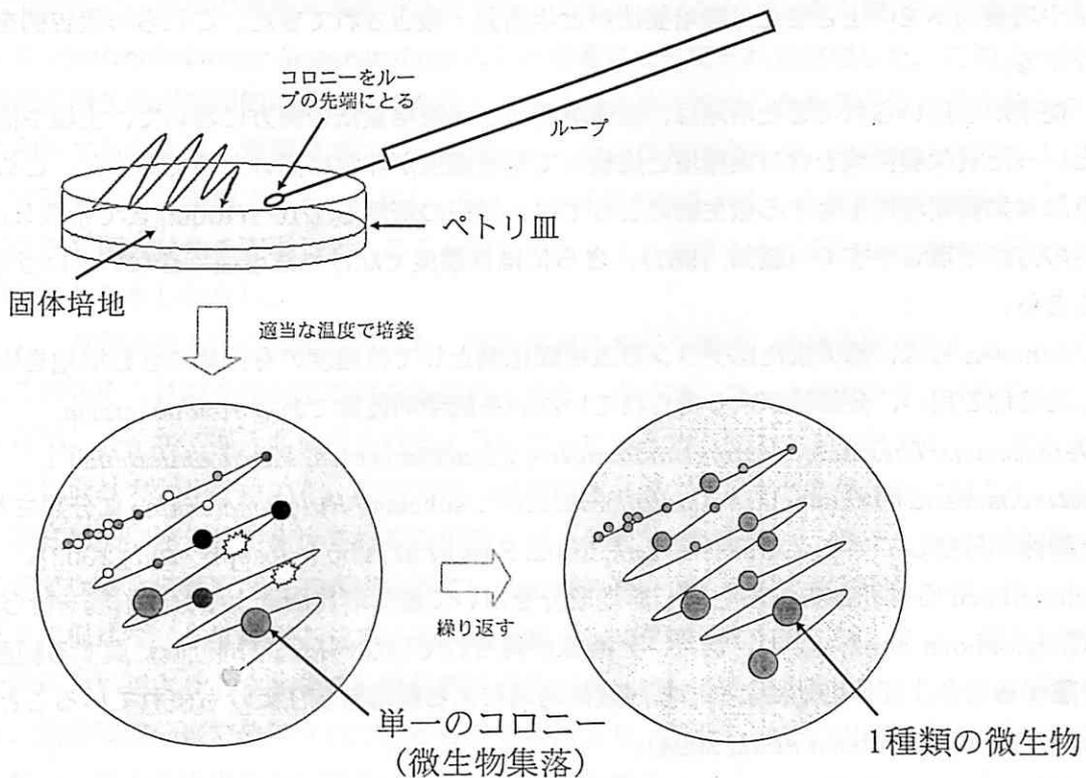


図 2-10 固体培地を用いた培養における画線操作の流れ

画線とは、ループと呼ばれる細菌を培地上に広げる道具を用いて、線を描くように培地上にコロニーを広げる作業である。ループは使い捨てのプラスチック製のものと、使用ごとにバーナーの火炎で焼いて繰り返し使用できるニクロムや白金でできたものがある。前者はループの先端が非常に滑らかで、プラスチック製であるために柔軟性がある。非常にやわらかい培地に画線する場合に便利である。一方、後者のニクロムや白金のものは何度もバーナーで焼くとループの先端が滑らかさを失う場合が多い。しかし、何度も使用できるため、コストパフォーマンスは良い。画線を繰り返すことによって、最終的に1種類の微生物を分離培養することができる。

c) 分離培養法の改善

前述した液体培地または固体培地を用いた分離培養法は、培養技術が開発された当初のまま、長い間改善が余りなされなかった。用いられる培地は肉エキス・酵母エキスを成分として含み、高濃度の栄養塩を含んだものが多く、実環境とは程遠いものであった。また、固体培地を作成するための固化剤は寒天ばかりが用いられてきた。このような培地成分や培地成分濃度、固化剤といった培養条件に着目し改善を施し、実環境を模倣した分離培養法や培養効率を向上させた分離培養法が近年開発・報告されてきた。これらの報告例を紹介する。

従来から用いられてきた培地は、液体培養法と平板培養法の両方において、土壌や海洋といった貧栄養環境を含む実環境と比較して基質濃度が非常に高いものであった。このような貧栄養環境に生育する微生物にとっては、従来の培地を1/10-1/10000まで希釈した培地の方が増殖しやすく（服部, 1987）、さらには低濃度でなければ増殖できないという場合もある。

Janssenらは、寒天またはゲランガムを固化剤として低濃度の有機物を含む培地を固化した培地を用い、分離株が余り得られていない系統学的位置である *Acidobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* 門, *Actinobacteria* 門の subclass *Acidimicrobidae* と subclass *Rubrobacteridae* に分類される分離株が分離している (Janssen *et al.*, 2002; Sait *et al.*, 2002; Joseph *et al.*, 2003)。Schoenbornらは Janssenらと同じ培地成分を用いて液体培養法による分離培養を行った (Schoenborn *et al.*, 2004)。結果、分離株が得られていない系統学的位置に属する細菌を分離する場合、固体培地による培養が液体培地による段階希釈法よりも優れていることがわかった (Schoenborn *et al.*, 2004)。

また、Connon & Giovannoniらは、海水を処理して作成した低濃度基質の液体培地を用いて海洋微生物を培養した。増殖は DAPI 染色で確認して、増殖が確認されたものは新しい培地に植え継いで分離株を得た。結果、SAR11 (*Alphaproteobacteria* subclass)、OM43 (*Betaproteobacteria* subclass)、SAR92、(*Gammaproteobacteria* subclass)、OM60/OM241 (*Gammaproteobacteria* subclass) といったこれまで分離株が得られていなかった系統が分

離された (Connon & Giovannoni 2002)。この他にも、低濃度の基質を常に連続的に供給する手法として、Zengler らの報告した手法がある。夾雑物を取り除いた微生物細胞を小さなゲル (gel microdroplets (GMDs)) の中にいれ、そこに低濃度の基質を連続的に供給して生育させた。生育した細胞を含む GMDs は、フローサイトメトリーでマイクロコロニーが形成されていることを確認して分離して、次の培養ステップとして、ひとつの GMDs ごとにマイクロプレートのウェルに入れてさらに培養を行うことで分離株を得た。結果、これまで分離株が得られていなかった系統が分離された (Zengler *et al.*, 2002)。Connon & Giovannoni らと Zengler らでは、手法の違いはあるが、基本的な概念は、実環境を模倣した低栄養状態をつくること、増殖確認を高感度で行えることに集約される。また、液体培養で数個の細胞をひとつのウェルや GMDs にいれて培養を行うので、その中で異なる微生物同士の cross-feeding 効果が可能となり、共培養の効果もある。

また、低濃度で基質を供給するために、ある微生物の基質を別の微生物に供給させた例がある。Sakai らは Rice Cluster I と呼ばれるのメタン生成古細菌群に属する *Methanocella paludicola* の純粋培養を、プロピオン酸酸化細菌である *Syntrophobacter fumaroxidans* との共培養によって分離した (Sakai *et al.*, 2007, 2008)。*Methanocella paludicola* の生育には低濃度での水素の連続的供給が必要であったため、プロピオン酸を酸化して水素を生成する *Syntrophobacter fumaroxidans* との共培養によってそれを実現した。このように、数種類の微生物が空間的に近接して存在し、ある微生物が産生した物質を別の微生物がすぐに利用する現象は、実環境ではごく普通にみられる状況であろう。そして、これを人工的に実現するのは困難である。しかし、Sakai らは微生物を利用して実環境を模倣し、メタン生成古細菌の分離を実現した。ここを切り口にして、今後さらに新しい培養法が開発・報告されるかもしれない。

一方、基質濃度という要素以外にも、平板培養法を行う場合、培地を固化させるために用いる固化剤の種類を検討する試みもされてきた。古くは、コッホがゼラチンを固化剤として使用し、やがて寒天が代用されるようになっていった。ヴィノグラドスキーは寒天の代わりにシリカゲルを用いた。現在では、培養関連分野で使用される固化剤に限らず、食品・家庭用品関連分野で使用される固化剤・ゲル化剤・増粘剤には、様々なものが開発されてきている。自動販売機で販売されている缶コーヒーから食卓に並ぶゼリーやドレッシングまで様々な食品に応用されている。固化剤・ゲル化剤・増粘剤に関しては、微生物学の分野においてよりも食品学の分野非常に研究が進んでいると言える。表 2-1 にその例を挙げる。培養関連分野で使用されているものも数例あり、それらはその出典を記した。以下に、ゲランガムを固化剤として用いた報告例を紹介する。

Janssen らと Tamaki らによって、平板培養を行う時の条件として、固化剤、培地の種類、pH、培養時間、サンプル塗付量の検討が行われ、固化剤としては従来の寒天を用いるよりもゲランガム (gellan gum) を用いる方が、高い培養効率 (viable count = CFU per g (or ml) of sample) や新規分離株を得やすく、また、分子生物学的手法によって捉えられる

微生物群集構造を反映しやすいことが示された (Janssen *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2005; Tamaki *et al.*, 2005)。また、培地の種類や pH をサンプルに適したものを使用すること、培養時間を数ヶ月以上にする、サンプル塗付量を少なくすることが培養効率を高くするという結果であった (Davis *et al.*, 2005)。さらに、天然高分子や生体高分子と知られるペクチン、アルギン酸、キシラン、キサンタン、N-アセチルグルコサミンを基質として利用した所、キシランやアルギン酸を利用した場合に増殖効率が良いという結果であった (Davis *et al.*, 2005)。

表 2-1 市販されている固化剤や増粘剤の種類とその由来及び用途

| 物質名 (英語名) | 物質の由来や構造 | 一般的な用途 | 培養関連の報告例 (用途) |
|-------------------------|--|--|--|
| カラギーナン (carrageenan) | イバラノリ科、キリンサイ科、ギンナンソウ科、スギノリ科又はツノマタ科の全藻から得られた ι -カラギーナン、 κ -カラギーナン及び λ -カラギーナンを主成分とする直鎖状の多糖類 (但し、ゲル化剤として使用されるのは、 κ -カラギーナン) | ゲル化剤・増粘剤としての食品添加物 | Watson & Apirion, 1976; Lines, 1977 (細菌培養)、Reeslev & Kjeller, 1995 (菌類培養) |
| ゲランガム (gellan gum) | <i>Pseudomonas elodea</i> の細胞外直鎖状高分子多糖類 | 食品の増粘剤 細胞培養培地の固化剤 | Janssen <i>et al.</i> , 2002; Joseph <i>et al.</i> , 2003; Davis KER <i>et al.</i> , 2005; Tamaki <i>et al.</i> , 2005 (細菌培養) |
| 寒天 (agar) | テングサ目、スギノリ目等の紅海藻から熱抽出される粘質多糖類 | ゲル化剤・増粘剤としての食品添加物 細胞培養培地の固化剤 DNA 電気泳動用ゲル | 汎用されており報告多数 (細菌・菌類培養) |

表 2-1- (続き)

| 物質名 (英語名) | 物質の由来や構造 | 一般的な用途 | 培養関連の報告例 (用途) |
|--|---|-----------------------|---|
| キサントガム (xanthan gum) | Xanthomonas campestris が 算出する粘質多糖類 | 食品の増粘剤 洗淨剤 | Babbar & Jain, 2006 (細菌・菌類培養)、Jain & Babbar, 2006 (植物培 養) |
| ローカストビーン ガム (locust bean gum) | カロブ樹 (<i>Ceratonia siliqua</i> L.) の種子の胚乳から製造さ れる多糖類 | 食品の増粘剤 | Gonçalves & Romano, 2005 (植物培養) |
| グアーガム (guar gum) | マメ科植物グアー豆の胚乳 から製造される水溶性高分 子 | 食品添加物 凝集剤や蓄冷剤 | Jain & Babbar, 2004; Babbar <i>et al.</i> , 2005 (植 物培養)、Jain <i>et al.</i> , 2005 (細菌・菌類培養) |
| カードラン (curdlan) | <i>Agrobacterium biovar 1</i> が 産生する発酵多糖類 | 食品添加物 | 該当なし |
| アルギン酸 (alginate) | 褐藻類の細胞壁多糖 D-マンヌロン酸がβ-グリコ シド結合した、又はL-グルロ ン酸がα-グリコシド結合し た直鎖状のポリウロニド多 糖 | 食品の増粘剤 | Davis KER <i>et al.</i> , 2005 (細菌培養) |
| ペクチン (pectin) | 様々な植物に含まれる多糖 類 | ゲル化剤・増粘剤とし ての食品添加物 | Janssen <i>et al.</i> , 1997; Davis KER <i>et al.</i> , 2005 (細菌培養) |
| ゼラチン (gelatin) | 牛骨・牛皮・豚皮などに含ま れるコラーゲンの加水分解 蛋白質 | 食品添加物 | コッホによって培地の 固化剤として使用され たとされる (細菌培養) |

宮本武明ら、2003年、『天然・生体高分子材料の新展開 (シーエムシー出版)』を参考に
して作成した

また、前述の基質濃度や固化剤以外で検討がなされた微生物の新しい分離法としては、Kaeberlein らが報告した実環境を模倣した培養法がある (Kaeberlein *et al.*, 2002)。彼らは、寒天で固化したサンプルをポリカーボネート膜で上下を挟み込み、上部の膜と寒天の間には若干の空間を作成してここを海水で満たし (彼らはこれを diffusion chamber と名づけている)、それを実環境である潮間帯の海洋土壌の上において培養を行った。膜は、細胞を通過させないが海洋土壌との物質の交換を可能にするという構造になっている。寒天表面に生育してきたコロニーの多くはマイクロコロニーであった。この手法は通常のペトリ皿を用いた平板培養法よりも培養効率が高かった。対象がマイクロコロニーであり、得られたマイクロコロニーを普通の固体培地に植え継いでも増殖しないコロニーがあったということから、簡便さにはかけると思われるが、実環境を模倣したという点では期待される。また、同じようにポリカーボネート膜を使用して、Kaeberlein らの diffusion chamber のような構造のものを作成して、土壌細菌を培養した例も Ferrari らにより報告されている (Ferrari *et al.*, 2005)。彼らは、分離株が得られていない門として知られている TM7 門の分離株を、ポリカーボネート膜上にマイクロコロニーとして形成させた。

また、培養効率を高めるという方法では、Cyclic AMP や Acyl homoserine lactones を添加して培養する方法も報告されている (Bussmann *et al.*, 2001; Bruns *et al.*, 2002, 2003)。但し、これらの報告は基本的に低濃度の基質を用いて培養を行っている。

以上のように、分離株が得られておらずその機能がほとんど解明されていない系統学的位置の細菌も数多く存在している。しかし、例えば昆虫の体内でお互いに依存し合い共生する細菌のように、あらゆる生物が共生無しには生きられないことを考えると、純粋培養によって全ての生物を培養することが可能であるのかは疑問が残る。ただ、今後ゲノミクス・プロテオミクス・バイオインフォマティクスの分野が発展していくにつれて、分離培養法の改善も加速していくかもしれない。

第3章 研究手法

3.1 供試試料

本研究で対象とした人工安水処理硝化脱窒処理プロセスの全体写真と運転状況の概要をそれぞれ図3-1と図3-2に示す。本プロセスは、2002年に立ち上げられて以来、約6年間運転が続けられている。現在も運転中であり、その間流入水の組成の変更も含めて様々な運転条件で運転を行われてきた。本プロセスの運転及び管理は、新日本製鉄株式会社の先端技術研究所（君津）の研究者が行なった。本研究で対象とした期間中の流入水には、フェノールとチオシアン酸塩を有機物源とした海水を含んだ人工排水（人工安水）が使用された。

本プロセスの仕組みであるが、まず、海水含有の人工安水が無酸素槽である脱窒槽を通過し、次に好気槽である硝化槽を通過する。最後に沈殿槽に至り、活性汚泥は沈殿され返送汚泥として再び脱窒槽に戻され、沈殿槽での上澄液が処理水となる。

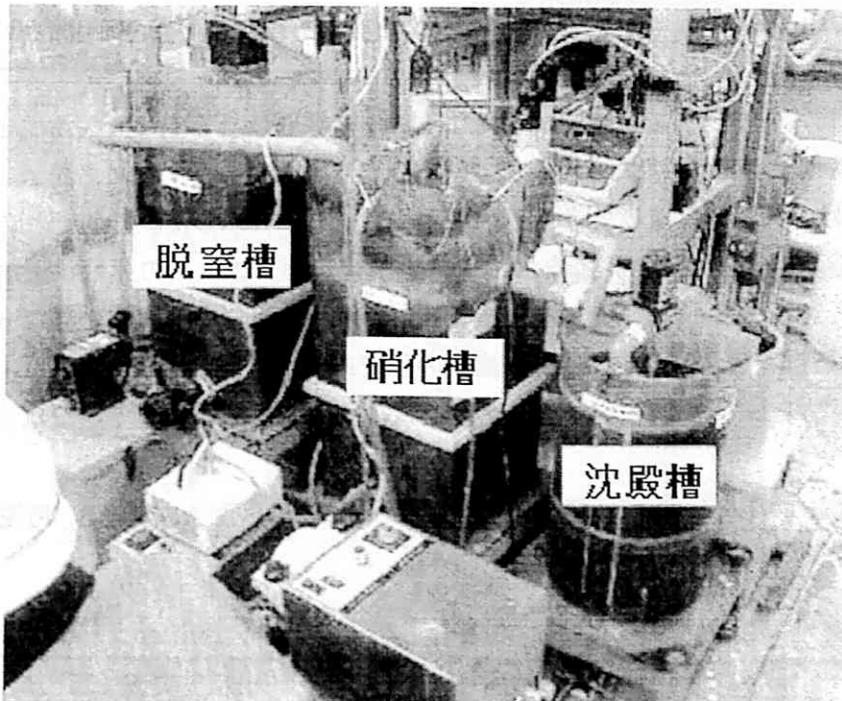


図3-1 人工安水処理硝化脱窒処理プロセス

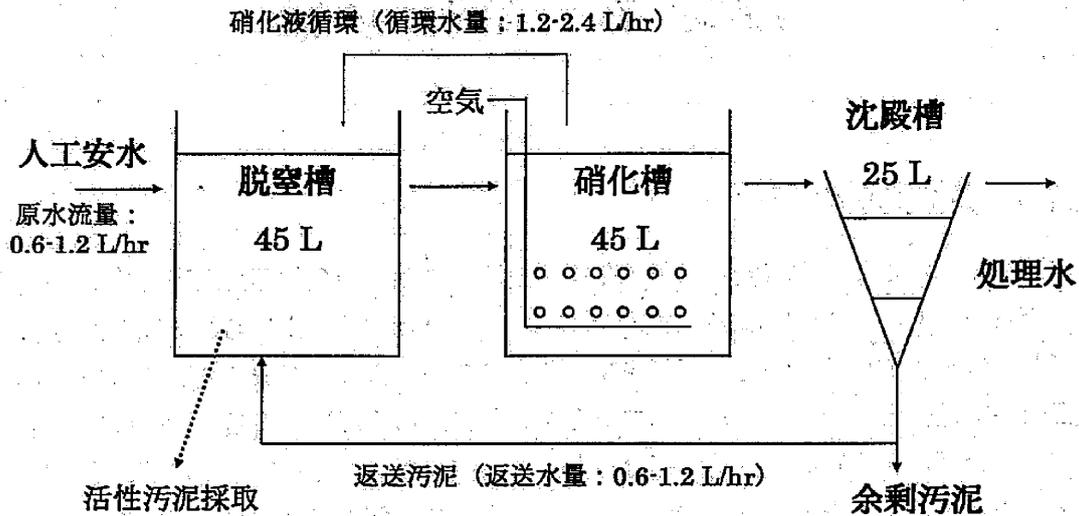


図 3-2 人工安水処理硝化脱窒処理プロセスの運転条件の一例

立ち上げ以来、脱窒槽・硝化槽・沈殿槽の容積は変更していない。変更をしたのは、流入水組成、原水流量、循環水量、返送水量、脱窒槽・硝化槽の運転温度である。

運転期間中のほとんどの時期において、人工安水中のフェノールとチオシアン酸塩は脱窒槽で除去されていた。つまり、脱窒反応を介したフェノールとチオシアン酸塩の分解が起こっていたと推測され、このような代謝経路を有する微生物が約 6 年間という期間を通じて馴致されているものと考えられた。

本研究では、本プロセスの脱窒槽から異なる時期に採取した 3 つの活性汚泥を使用した。汚泥の採取時期は 2006/09/27、2006/12/26、2007/07/19 であり、順に汚泥 A、汚泥 B、汚泥 C と名づけ、汚泥を採取した時の汚泥の性状を表 3-1 に示した。それぞれの活性汚泥において、採取時期の他には、人工安水処理硝化脱窒処理プロセスの運転状況が異なっていた (表 3-2)。運転温度、pH、流入水である人工安水の海水含有率が特に異なっていた。表 3-1 に示した値は、活性汚泥を採取した直後の値である。但し、これらの値は 1 日の中でも常に多少の変動をしている。一方、活性汚泥を採取した時期前後の運転状況は表 3-2 に示した。

このような 3 つの人工安水処理硝化脱窒処理プロセスの汚泥 A、汚泥 B、汚泥 C に対して、RNA-SIP 法と平板培養法を適用した (表 3-1)。

表 3-1 本研究で使用した活性汚泥の性状（活性汚泥採取時）と実施した実験

| 活性汚泥 (採取時期) | 人工安水処理硝化脱窒処理プロセスの 運転状況 (活性汚泥採取時) | | | 各汚泥に対して実施した実験 とその対象細菌 | |
|----------------------|-------------------------------------|-----|---------------|--------------------------|-------|
| | 温度 (°C) | pH | 流入水の 海水含有率 | RNA-SIP 法 | 平板培養法 |
| 汚泥 A (2006/09/27) | 24 | 7.9 | 54.5% | AE | AN |
| 汚泥 B (2006/12/26) | 23 | 7.8 | 68.2% | AN | AN |
| 汚泥 C (2007/07/19) | 33 | 7.9 | 60.0 % | AE AN | AN |

AE, 好氣的フェノール分解細菌を対象とした実験

AN, 嫌氣的フェノール分解細菌を対象とした実験

表 3-2 活性汚泥を採取した時期前後の人工安水処理活性汚泥プロセスの運転状況

| 項目 | 汚泥採取時期の約1ヵ月前後の 人工安水処理硝化脱窒プロセスの特性 | | | |
|---------------------|--|-----------|-----------|------------|
| | 汚泥 A | 汚泥 B | 汚泥 C | |
| 人工 安水 の 組成 | C ₆ H ₅ OH (g liter ⁻¹) | 0.55 | 0.55 | 0.75 |
| | NaSCN (g liter ⁻¹) | 0.13 | 0.13 | 0.14 |
| | NH ₄ Cl (g liter ⁻¹) | 1.75 | 1.75 | 3.1 |
| | Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O (g liter ⁻¹) | 0.58 | 0.58 | 0.22 |
| | Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O (g liter ⁻¹) | 0.05 | 0.05 | 0.06 |
| | NaHCO ₃ (g liter ⁻¹) | 4.55 | 4.55 | 7.0 |
| | 脱安水 ^a (% v/v) | 9.1 | 9.1 | — |
| | 工業用水 (% v/v) | 36.4 | 22.7 | 40.0 |
| | 海水 (% v/v) | 54.5 | 68.2 | 60.0 |
| 脱 窒 槽 | 水温 (°C) | 22-24 | 21-23 | 30-33 |
| | pH | 7.5-8.0 | 7.5-7.9 | 7.6-8.0 |
| | MLSS ^b (mg liter ⁻¹) | 1200-2400 | 3000-4000 | 8000-11000 |

a) 脱安水とは、アンモニアストリッピング法を行った後の安水のこと。

b) MLSS, mixed liquor suspended solids

実験に用いた活性汚泥の一例を図 3-3 に示す。本研究で用いた人工安水処理活性汚泥や実際の安水処理を担っている安水処理活性汚泥は、一般的な生活排水を処理する下水処理の活性汚泥と比較して、色が濃く活性汚泥の沈降性が非常に良い。図 3-3 のように、色は黒色に近い濃い茶色をしている。



図 3-3 本研究で使用した活性汚泥の一例 (2006 年 9 月 27 日採取：汚泥 A)

また、顕微鏡によって活性汚泥内の微生物を観察すると、他の活性汚泥では余り確認されないような形態をした微生物が生息していた。その一例を図 3-4 に示す。直径が約 20-50 μm の丸い塊状に集合した微生物集団が数種類確認された。また、汚泥 A、汚泥 B、汚泥 C の顕微鏡観察の結果を図 3-5 から図 3-7 に示す。汚泥 A、汚泥 B、汚泥 C ともに、数珠状の糸状微生物と丸い塊状に集合した微生物やテトラド状に集合した球菌が観察された。汚泥 C はバルキングが発生して約 2-3 週間後の活性汚泥であったため、糸状微生物が汚泥 A と汚泥 B に比べて多く、数珠状の糸状微生物の他にも線状の糸状微生物が観察された。

前述の通り、安水には高濃度のフェノールや高濃度のアンモニア態窒素、そしてチオシアン酸塩、チオ硫酸塩、タール状油分、シアン化合物が含まれている。このような安水を処理する安水処理活性汚泥はある意味極限的な環境であるとも言え、そこに生息する微生物は極限微生物という学術的な意義も持ち合わせた研究対象といえる。

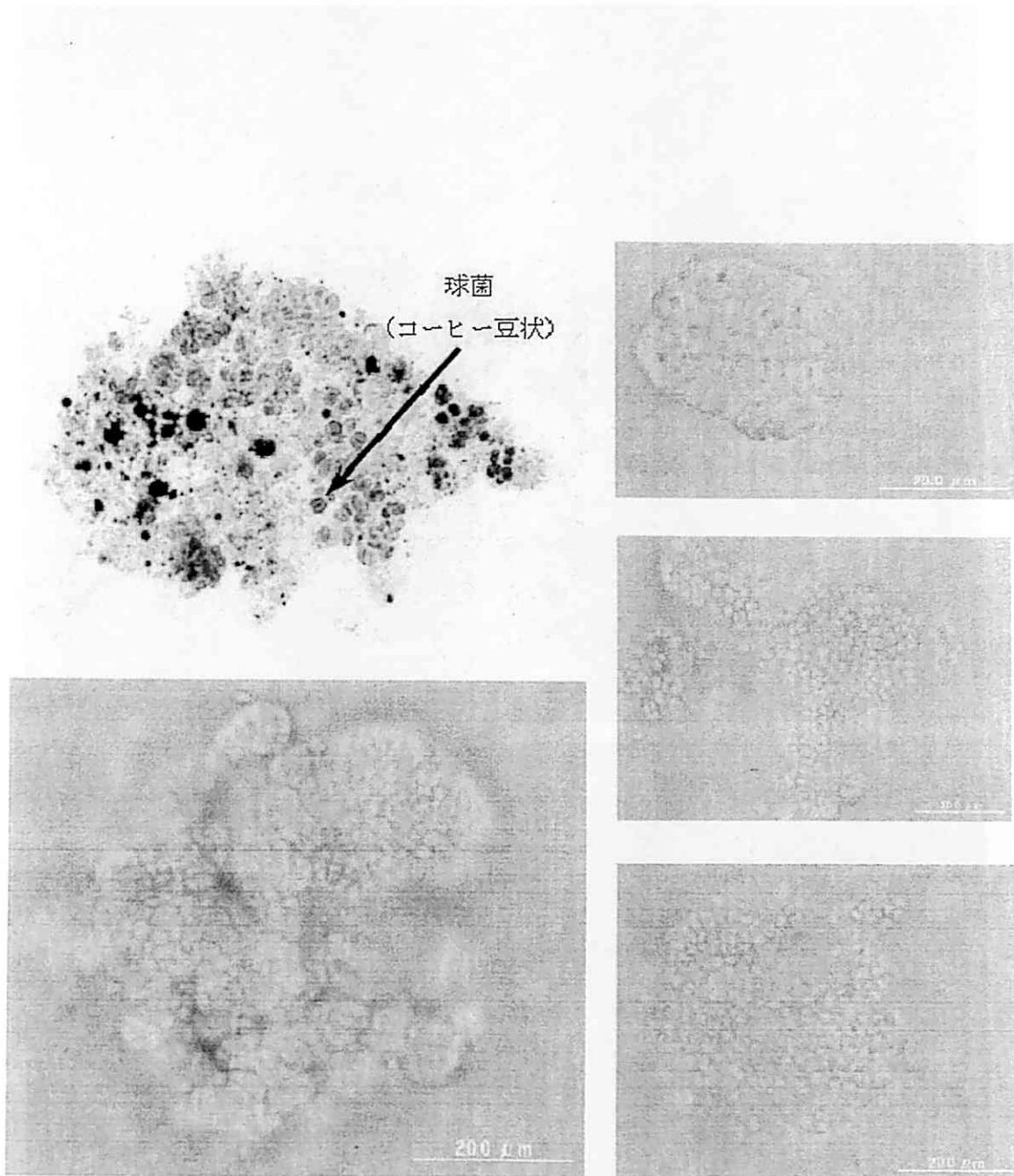


図 3-4 安水処理活性汚泥に生息する特徴的な形態をした微生物

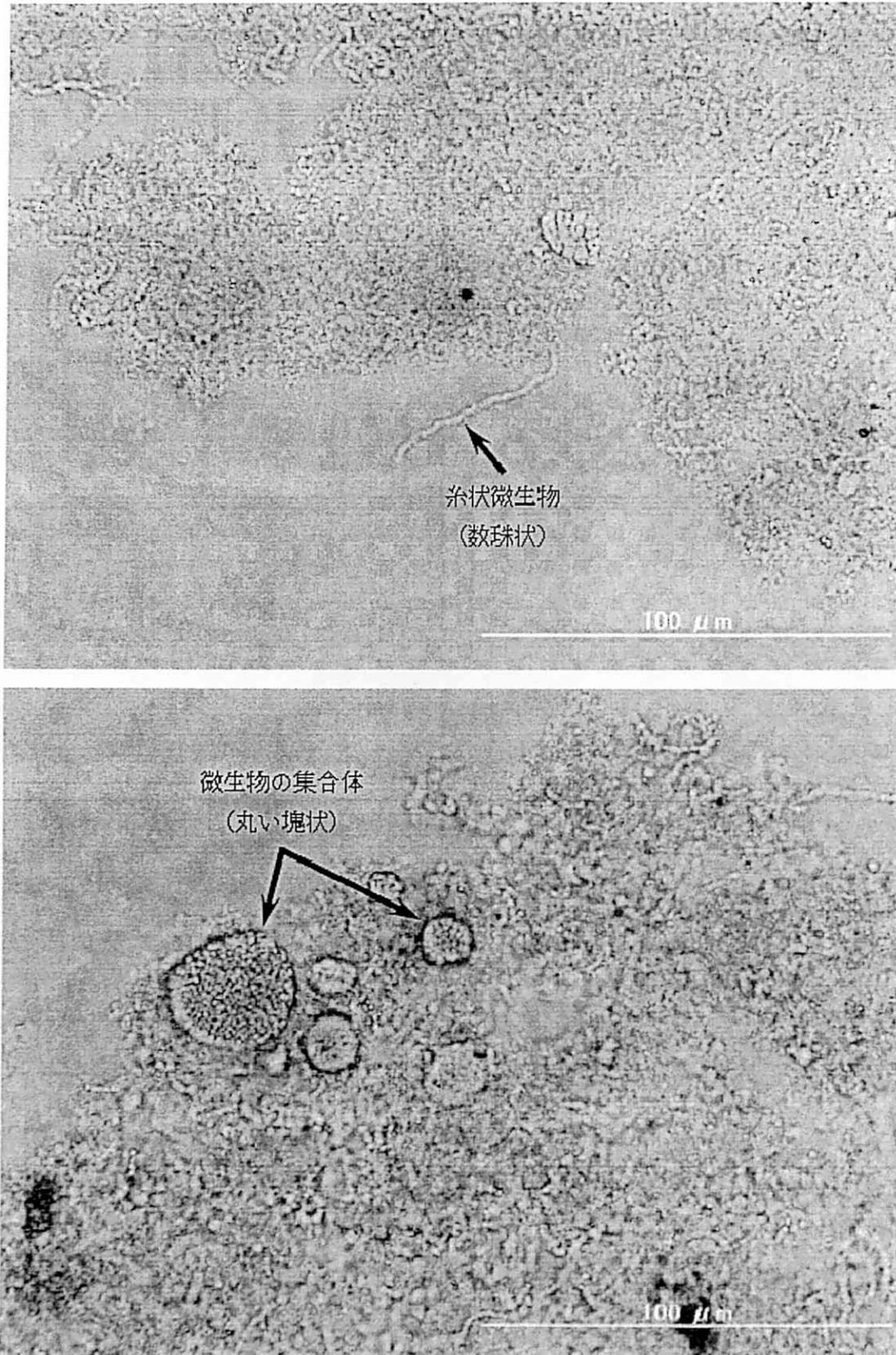


図 3-5 汚泥 A の顕微鏡観察 (2006 年 9 月 27 日採取 : 汚泥 A)

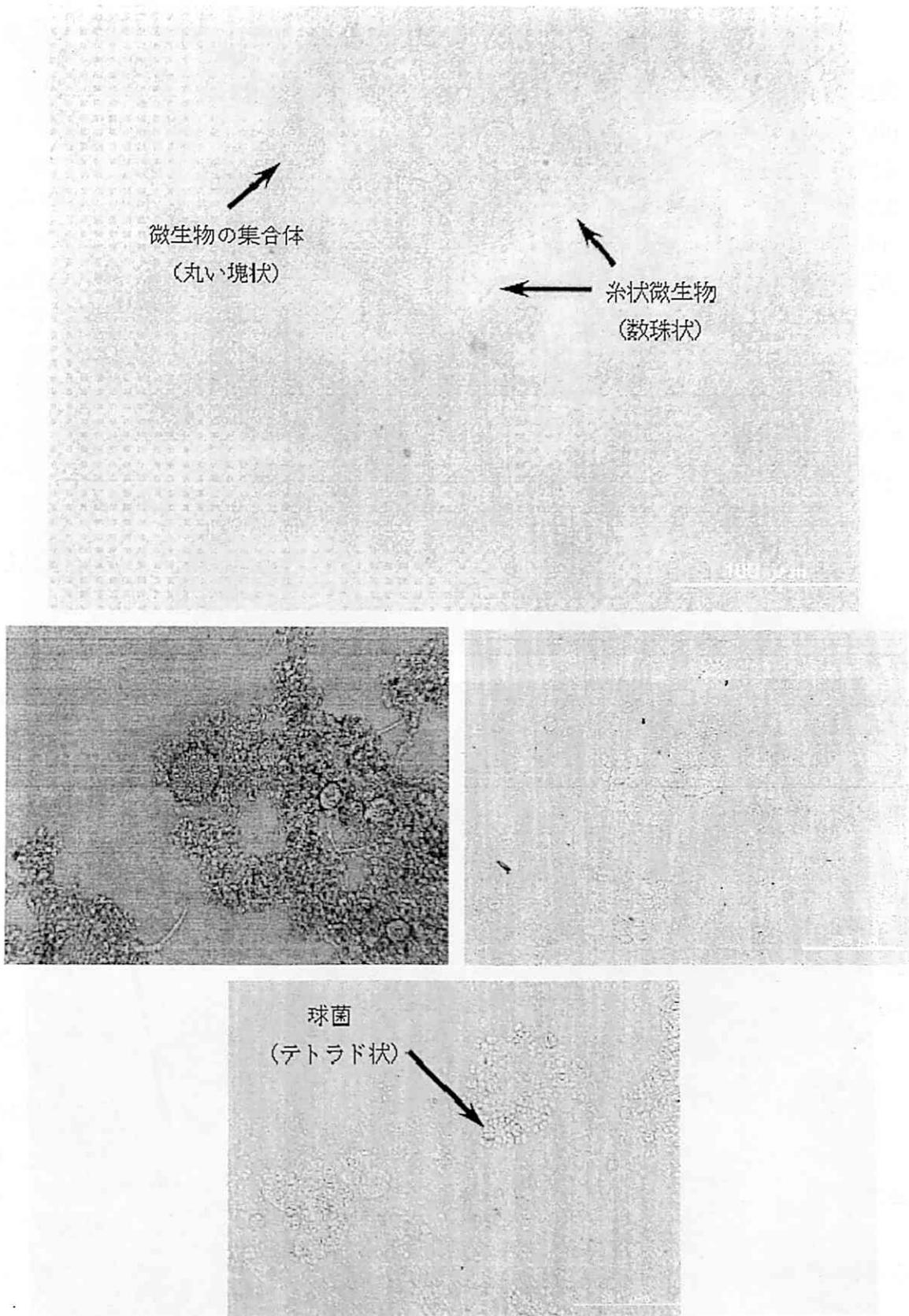


図 3-6 汚泥 B の顕微鏡観察 (2006 年 12 月 26 日採取 : 汚泥 B)

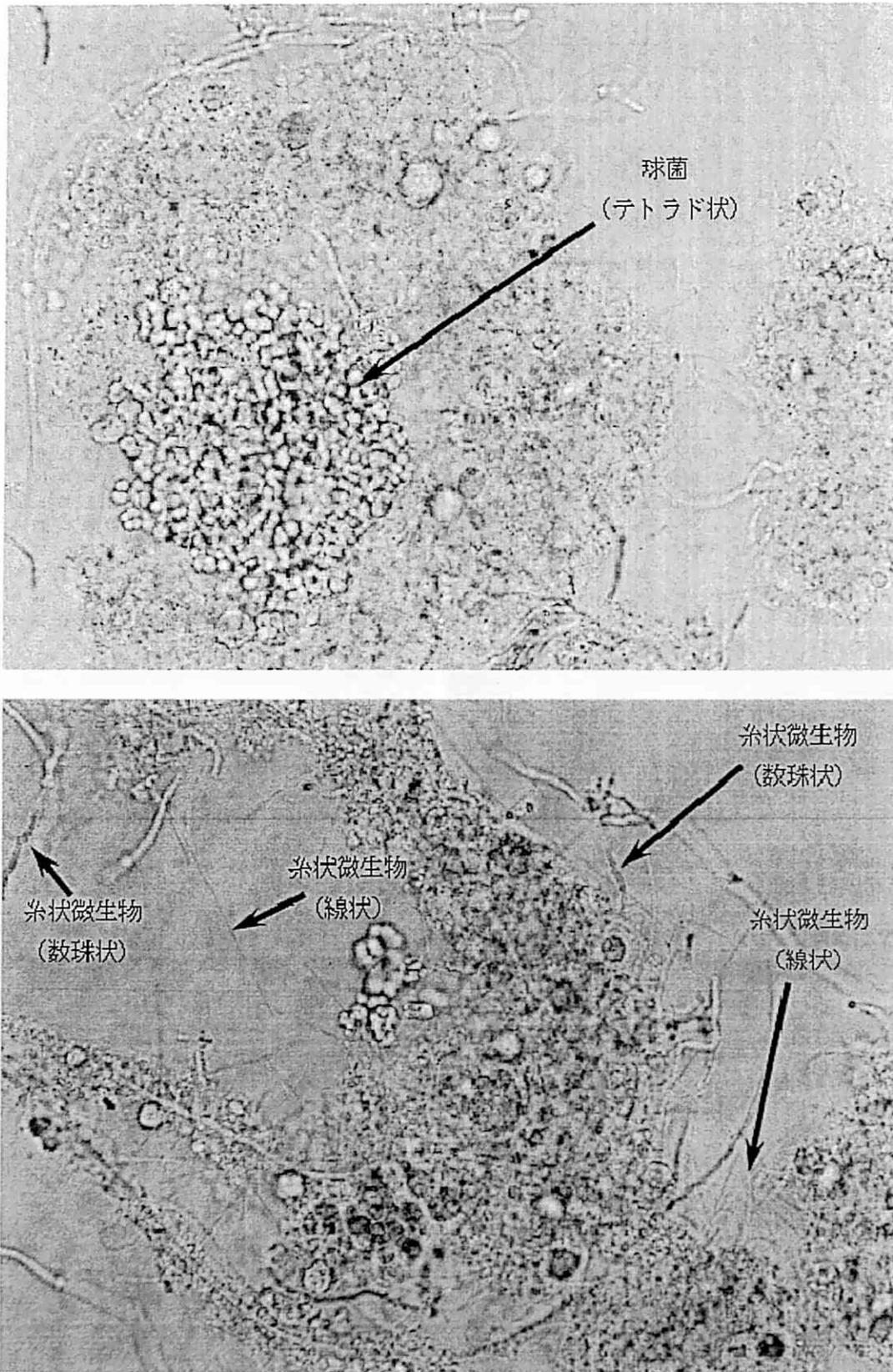


図 3-7 汚泥 C の顕微鏡観察 (2007 年 7 月 19 日採取 : 汚泥 C)

3.2 RNA-stable isotope probing (SIP) 法

RNA-stable isotope probing (SIP) 法は、以下の手順で行った。対象の安定同位体元素 (^{13}C) による標識、RNA 抽出、DNase 処理、RNA 定量、超遠心溶媒の作成、超遠心を用いた RNA の分画、各分画の回収、各分画の浮遊密度の決定、イソプロ沈殿による各分画からの RNA 回収、reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR) 法による 16S rRNA の増幅、terminal restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) 解析、クローニング解析、シーケンシング解析、 ^{13}C 同化細菌の決定、という手順が全工程である。各工程を順に説明する。

但し、Whiteley らによって *Nature Protocols* 誌に報告された RNA-SIP 法のプロトコル (Whitely *et al.*, 2007) とは若干異なる部分がある。基本的に、Whiteley らと同じ手法を用いて同じ工程で行っているが、著者は、彼らのプロトコルが報告される以前に、Manefield らや Lueders らの報告を参考にしながら (Manefield *et al.*, 2002b; Lueders *et al.*, 2004a)、試行錯誤して改善を施しつつ行ってきたため、若干異なる部分がある。

3.2.1 対象生物の安定同位体元素による標識

まず、RNA-SIP 法の最初の実験工程として、対象となる RNA 分子を安定同位体元素によって標識する。安定同位体元素を含んだ化合物として、全ての炭素が安定同位体炭素で置換されたフェノール (以下、 $^{13}\text{C}_6$ フェノール) を用いた。嫌氣的フェノール分解細菌を対象とした場合には、活性汚泥に $^{13}\text{C}_6$ フェノールと硝酸塩を与えて嫌気培養を行なった。一方、好氣的フェノール分解細菌を対象とした場合には、活性汚泥に $^{13}\text{C}_6$ フェノールを与えて好気培養を行なった。培養条件の詳細に関しては、第4章と第5章の該当する節を参照されたい。

3.2.2 RNA 抽出

培養終了後の活性汚泥から RNA を抽出した。Manefield らの手法に従い (Manefield *et al.*, 2002b)、酸性 PCI solution を用いた活性汚泥処理および Beads Beating と RNeasy Mini Kit を組み合わせた手法を用いた。以下に実際の実験手順を示す。

[実験手順]

1. -80°C 保存しておいた活性汚泥を用意する。
2. 適量の活性汚泥を 0.5 ml の 240 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0) に再懸濁させる。
3. 0.75 ml の phenol:chloroform:isoamyl alcohol (125:24:1, pH 4.0) (Ambion) を添加して、ピペティングを行い良く混合してホモジナイズをする。
4. 作成した溶液の全量を Lysing Matrix E Tube (Qbiogene) 1 本に移して、FastPrep

FP120 bead beating system (BIO101 Thermo ELECTRON CORPORATION) にて 5.5m/s で 40-45 秒間物理的破碎を行う。

(補足) 15 秒間程度破碎を行い、氷上にて冷却するという操作を繰り返してサンプルの温度上昇を防ぐ。

(補足) 全量入りきらない場合は、チューブ 2 本に分けて入れる。又は、入りきる分量だけで次のステップに進んでも十分な RNA が得られる。

5. Lysing Matrix E Tube (Qbiogene) を最高スピードで (約 20,000×g) 10 分間遠心する。
6. 上澄み 400 μ l を新しいチューブに移す。
7. Buffer RLT with β -ME を 400 μ l 添加した後、反転振とうを数回行う。
8. 800 μ l の 70 % エタノールを添加して、ピペットで良く混合する。
9. 形成した沈殿を含んだサンプル (約 700 μ l) を、2 ml のコレクションチューブにセットした RNeasy ミニカラムにアプライする。ふたを静かに閉め、 $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) で 15 秒間遠心操作する。フロースルーを捨てる。
(補足) 液量が 700 μ l を超える場合は、ステップ 6. の操作を繰り返す。
10. 700 μ l の Buffer RW1 を RNeasy カラムにアプライする。チューブのふたを静かに閉めて、洗浄のために $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) で 15 秒間遠心する。フロースルーとコレクションチューブを捨てる。
11. RNeasy カラムを 2 ml の新しいコレクションチューブに移す。500 μ l の Buffer RPE を RNeasy カラムにピペットでアプライする。ふたを静かに閉めて洗浄のために $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) で 15 秒間遠心操作を行う。フロースルーを捨てる。
(補足) Buffer RPE は濃縮状態であるので、使用前にエタノールを Buffer RPE に添加したことを確認すること。
(補足) 2 ml のコレクションチューブの代わりに、通常の 2 ml エッペンチューブを用いても良い。
12. 500 μ l の Buffer RPE を RNeasy カラムに添加する。チューブのふたを静かに閉め、RNeasy シリカゲルメンブレンを乾燥するため、 $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) で 2 分間遠心操作する。
13. RNeasy カラムを新しい 2 ml コレクションチューブに移し、フロースルーの入った古いコレクションチューブを捨てる。マイクロ遠心機で最高スピードで 1 分間遠心操作を行う。
(補足) 2 ml のコレクションチューブの代わりに、通常の 2 ml エッペンチューブを用いても良い。
14. 溶出のために、RNeasy カラムを新しい 1.5 ml コレクションチューブに移す。RNeasy シリカゲルメンブレンに 30-50 μ l の RNase フリー水を直接ピペットで添加する。ふたを静かに閉め、 $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) で 1 分間遠心操作を行い溶出する。

3.2.3 DNase 処理

次に、抽出された RNA は DNA を含んでいるので、RNA 抽出物を TURBO DNA -free (Ambion) によって DNase 処理をした。またこの時、RNA の分解を抑制するために、RNasin® Plus Ribonuclease Inhibitor (Promega) を併用した。以下に実際の実験手順を示

す。

以下、サンプル量が 20 μl の場合の実験手順である。サンプル量が異なれば、添加する 10X TURBO DNase Buffer を調整すること(表 3-3)。

[実験手順]

1. サンプルに RNasin® Plus Ribonuclease Inhibitor (Promega)を 2 μl を添加して良く混合する。
(補足) サンプル量にかかわらず、2 μl の RNasin® Plus Ribonuclease Inhibitor (Promega)を添加している。
2. ステップ 1 の溶液に、TURBO DNase Buffer 2.56 μl を混合した後、TURBO DNase 1.5 μl を添加して優しく混合する。
3. 30 分間、37°C でインキュベートする。
4. 残りの TURBO DNase 1.5 μl を添加して、さらに 30 分間、37°C でインキュベートする。
(補足) サンプルと DNase と Buffer をよく混合すること。
5. ステップ 3 に移る前のサンプル全容量は 25.56 μl である。2/10 容量の DNase Inactivation Reagent を添加するので、5.2 μl の DNase Inactivation Reagent を添加して、時々混合しながら室温で 2 分間インキュベートする。
6. 10,000 \times g で 5 分間遠心を行い、RNA が含まれている上澄みを注意深く新しい tube に移す。
(補足) この時に、DNase Inactivation Reagent ギリギリまでサンプルを採取しないほうが良い。

表 3-3 TURBO DNA-free™による DNase 処理時の試薬添加量

| サンプル量 (μl) | TURBO DNase (μl) | 10X TURBO DNase Buffer (μl) | DNase Inactivation Reagent (μl) |
|-------------------------|-------------------------------|--|--|
| 20.0 | 3.0 | 2.56 | 5.2 |
| 30.0 | 3.0 | 3.67 | 7.4 |
| 40.0 | 3.0 | 4.78 | 9.6 |
| 50.0 | 3.0 | 5.89 | 11.8 |

3.2.4 RNA 定量

DNA を含まない精製された RNA が得られた。この精製された RNA を RiboGreen RNA quantification kit (Molecular Probes)を用いて定量した。定量には、蛍光分光光度計が必要であり、著者は、VersaFluor™ Fluorometer System (BIO-RAD)を使用した(図 3-8)。実験手順については、製造業者のマニュアルに従えば十分であるので、説明は省略する。

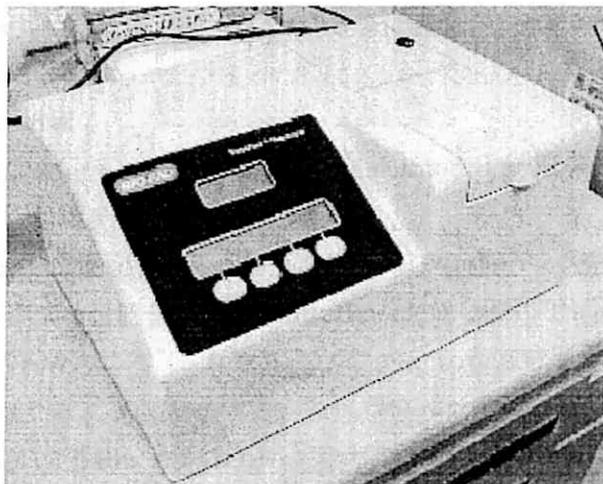


図 3-8 VersaFluor™ Fluorometer System (BIO-RAD)

3.2.5 超遠心溶媒の作成

超遠心に使用する超遠心溶媒を作成した。RNA-SIP 法で使用する超遠心溶媒は、トリフルオロ酢酸セシウム、Gradient Buffer (GB)、ホルムアミドを混合して作成する。最終的に超遠心溶媒の比重が $1.795 \text{ (g ml}^{-1}\text{)}$ となるように調整する。比重は電子秤で実測しても良いが、電子秤を使用して比重を測定しながら作成するのは面倒である。そこで、様々な組成比で作成した超遠心溶媒の屈折率とその比重の関係式から、屈折率を測定して比重を予測するという方法を用いた。屈折率の測定には、屈折率は AR200 digital refractometer (Reichert) を用いて測定した。測定には溶液が $75\text{--}100 \text{ (}\mu\text{l)}$ あれば充分である。

以下、分子生物学的手法グレードの Gradient Buffer (GB) の作成手順を述べて、次にトリフルオロ酢酸セシウム (cesium trifluoroacetate (CsTFA) (GE Healthcare)) を用いて作成した検量線の作成方法について述べる。まず、次の 3 種類の化合物を表記した最終濃度になるように混合して GB を作成した。0.1 M Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 M KCl; 1 mM EDTA。

a) Gradient Buffer (GB) の作成手順

[用意するもの]

1 M Tris-HCl (pH 8.0)

1 M KCl

0.5 M EDTA

トリフルオロ酢酸セシウム (cesium trifluoroacetate (CsTFA) (GE Healthcare, 2 g ml^{-1}))

ホルムアミド (Deionized formamide、和光)

[Gradient Buffer (GB)の作成]

販売されている GB 各成分は以下の濃度のものがあり、これらを用いた。

1 M Tris-HCl (pH 8.0)

1 M KCl

0.5 M EDTA

(注意点) 全て RNase-free, DNase-free (分子生物学用)の試薬を用いること。

GB の組成 (0.1 M Tris-HCl, pH 8; 0.1 M KCl; 1 mM EDTA)は、Lueders らに従った (Lueders, *et al.*, 2004)。表 3-4 の組成比でそれぞれを混合すればよい。

表 3-4 GB を作成するための各成分の混合比

| GB の各成分 | 添加量 |
|------------------------------------|---------|
| 1 M Tris-HCl (pH 8.0) | 5 ml |
| 1 M KCl | 5 ml |
| 0.5 M EDTA | 0.1 ml |
| Distilled water (RNase-free water) | 39.9 ml |

b) 超遠心溶媒の比重測定用の検量線の作成

次に、超遠心溶媒の比重測定用の検量線を作成するために、表 3-5 に示した組成の超遠心溶媒を作成した。まず、#1 の組成を作成してその屈折率と比重を測定した後、#2 から#16 まで順番に GB を添加していきながら、同様にしてその屈折率と比重を測定した。こうして、横軸に屈折率、縦軸に比重としてプロットした検量線を図 3-7 に示す。

図 3-9 の検量線に従えば、屈折率 1.3726-1.3727 (nD-TC (20.0°C))の超遠心溶媒を作成すれば、比重が 1.795 (g ml⁻¹) となる。但し、RNA をその浮遊密度の違いにより分画する操作では、超遠心溶媒の比重は重要であるので、屈折率から予測した比重が妥当であるかを、最後に電子秤でチェックすることを推奨する。また、超遠心溶媒は、市販の RNase-free, DNase-free のコニカルチューブなどに作成するのが便利である。溶液の混合もしやすい。

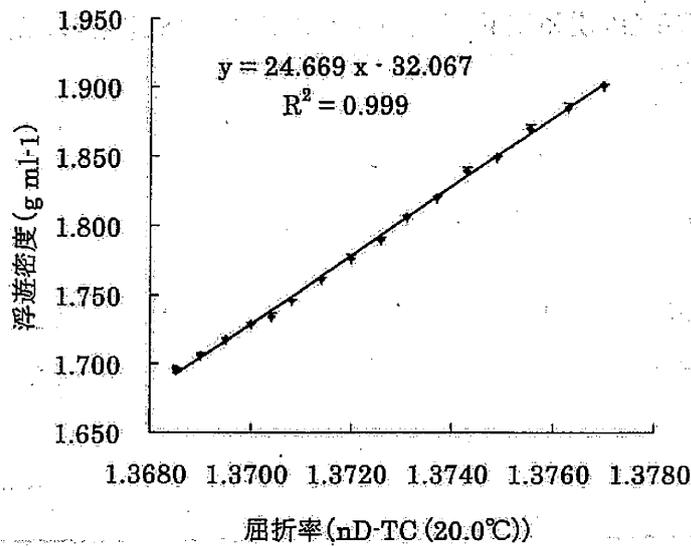


図 3-9 超遠心溶媒調整用の検量線

表 3-5 検量線作成のための超遠心溶媒の組成

| サンプル番号 | トリフルオロ酢酸セシウム (ml) | GB (ml) | ホルムアミド (ml) | 全量 (ml) |
|--------|-------------------|---------|-------------|---------|
| #1 | 4.5 | 0.0 | 0.175 | 4.675 |
| #2 | 4.5 | 0.1 | 0.175 | 4.775 |
| #3 | 4.5 | 0.2 | 0.175 | 4.875 |
| #4 | 4.5 | 0.3 | 0.175 | 4.975 |
| #5 | 4.5 | 0.4 | 0.175 | 5.075 |
| #6 | 4.5 | 0.5 | 0.175 | 5.175 |
| #7 | 4.5 | 0.6 | 0.175 | 5.275 |
| #8 | 4.5 | 0.7 | 0.175 | 5.375 |
| #9 | 4.5 | 0.8 | 0.175 | 5.475 |
| #10 | 4.5 | 0.9 | 0.175 | 5.575 |
| #11 | 4.5 | 1.0 | 0.175 | 5.675 |
| #12 | 4.5 | 1.1 | 0.175 | 5.775 |
| #13 | 4.5 | 1.2 | 0.175 | 5.875 |
| #14 | 4.5 | 1.3 | 0.175 | 5.975 |
| #15 | 4.5 | 1.4 | 0.175 | 6.075 |
| #16 | 4.5 | 1.5 | 0.175 | 6.175 |

3.2.6 超遠心を用いた RNA の浮遊密度による分画

超遠心溶媒への RNA の添加と超遠心チューブへのローディングから超遠心の実施までを説明する。

RNA はその組成と構造から様々な浮遊密度を持っている。超遠心を行うことにより、超遠心溶媒には浮遊密度の違いによる連続した勾配が作成される。ある浮遊密度を持つ RNA は、同じ浮遊密度を持つ超遠心溶媒の部分に移動して平衡に達する。超遠心はこの平衡が訪れるまで実施する必要がある。このような原理に基づいて、RNA をその浮遊密度の違いにより分画する。著者は、Lueders らの手法を参考として (Lueders *et al.*, 2004a)、超遠心条件を決定した。

まず、作成した超遠心溶媒と RNA を超遠心チューブにローディングして混合し、シーラーで超遠心チューブの頭をシーリングするまで手順を述べる。

a) RNA の超遠心チューブへのローディング

[用意するもの]

超遠心チューブ、5 ml tubes (5PA SEAL TUBE ASSY (日立工機))

チューブシーラー (tube sealer STF-2 (日立工機))

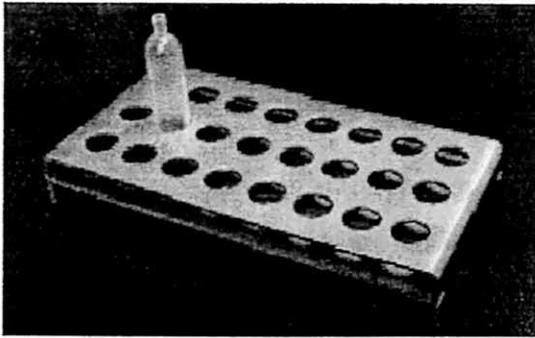


図 3-10 超遠心チューブ

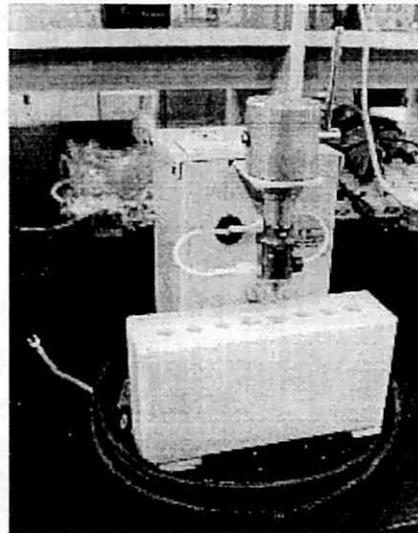


図 3-11 チューブシーラー

[実験手順]

1. 比重が 1.795 g ml^{-1} の超遠心溶媒を用意する。
2. 使用する超遠心機器、超遠心ローターに合った超遠心チューブを選択する。
(補足) 使用前に超遠心チューブに亀裂がないことを確認する。
3. 超遠心チューブの 8 割程度まで超遠心溶媒を添加して、超遠心チューブ内部に入っている

る気泡を抜く。

(補足) 日立工機の超遠心チューブの場合は、液体が入った状態で超遠心チューブを逆さにしても液体がこぼれ出ないので、超遠心チューブを上手く回転させる・指で軽くはじくなどして気泡を追い出す。

4. RNA を 500 (ng) 添加する。

(補足) 大抵の場合、500 ng に相当する RNA 溶液の容量は 10 μ l 以下であるので、RNA の添加によって超遠心溶媒の比重が大きく変化することはない。

5. 超遠心チューブの肩まで超遠心溶媒を入れる。

(補足) 超遠心チューブの首まで超遠心溶媒を入れない方がよい。シーリングする時に、溶けた首の部分が超遠心溶媒に触れてしまい、上手くシーリングできないことがある。

6. シーラーで超遠心チューブの首を溶解して蓋をする。

7. 超遠心チューブを強く押して、亀裂や液漏れなどがいないかを確認する。

8. 超遠心チューブの重さを測定する。

(補足) 超遠心ローターの対角線上に位置するサンプルは、その重さの差が 0.1 g 以下であればよい。

以上で、超遠心チューブへの RNA のローディングが終了した。

b) 超遠心条件の決定

次に、日立工機が販売している超遠心機 (Himac CP80WX (日立工機)) と超遠心ローター (SRP83VT vertical rotor (日立工機)) を使用した場合に、著者が行った超遠心条件を説明する。

超遠心に限らず様々な遠心機器において、以下の式を用いて遠心を行う時の遠心力($\times g$) と回転数(rpm)の変換が行える。必要な数値は、回転半径(cm)である。

$$RCF = 1118 \times R \times N^2 \times 10^{-8}$$

RCF : (遠心力相対遠心加速度) ($\times g$)

R : 回転半径 (cm)

N : 1 分間当たりの回転数 (rpm)

著者は、Lueders らの条件を参考にして (Lueders *et al.*, 2004a)、超遠心条件を決定した。Lueders らは、超遠心チューブ内の平均半径において 130,000 $\times g$ で 60 時間以上という条件であった。彼らが使用した Sorvall の TV865 ローターの詳細条件と、著者が使用した日立工機の SRP83VT ローターの詳細条件を比較して、超遠心チューブ内の平均半径において約 130,000 $\times g$ となるように回転数を決定した。44,500 (rpm) で回転させれば、平均半径にて約 130,000 $\times g$ が実現できると計算された。Lueders らの条件を参考にして (Lueders *et al.*, 2004a)、回転時間と運転温度は 66 時間以上、20.0 $^{\circ}$ C とした。回転時間は、平衡に達するのに十分な時間として Lueders らの時間の 1 割増しとした。つまり、44,500

(rpm), 20.0°C, > 66 時間で運転を行った。比重が 1.795 (g ml⁻¹) の超遠心溶媒を使用して、この条件で遠心操作を行うと、1.830-1.740 (g ml⁻¹) の間に収まる程度の密度勾配が作成される。

以下、超遠心チューブをローターにセットして、決定した超遠心条件で超遠心を開始するまでの手順を述べる。

c) 超遠心の実施

[用意するもの]

超遠心機、Himac CP80WX (日立工機)

超遠心ローター、SRP83VT vertical rotor (日立工機)

Spacer (赤色のキャップ)

Plug (銀色のネジキャップ)

Torque Wrench (Plug を閉める器具)



図 3-12 超遠心機

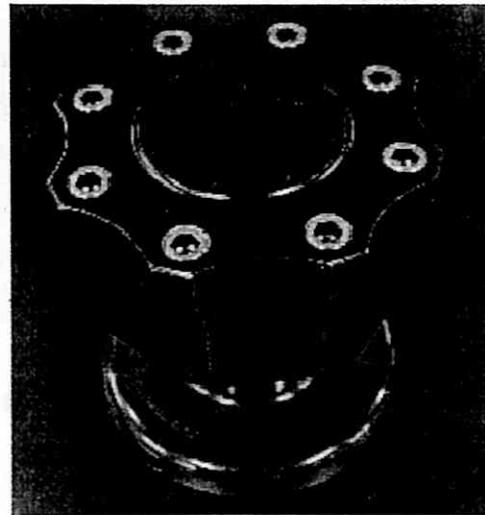


図 3-13 超遠心ローター

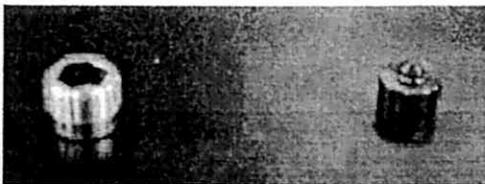


図 3-14 Plug (左) と Spacer (右)

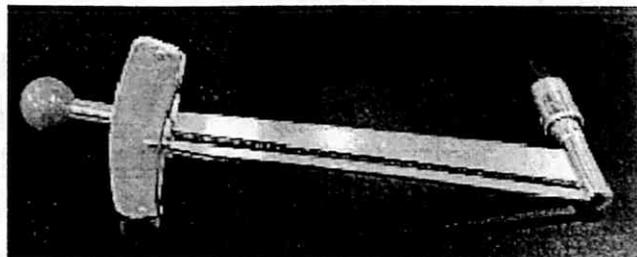


図 3-15 Torque Wrench

[実験手順]

1. 超遠心機器の右側面にある主電源を ON にする。
(補足) 電源を切るときは、超遠心機器のローターを入れるドアを閉めて、同様に右側面にある主電源を OFF にする。
2. ローター固定台を机などに固定する。
3. SRP83VT ローターをローター固定台の上にセットする。
4. 超遠心ローターの穴の中を RNase 除去剤で拭く。
(補足) 著者は、2%希釈済み ABSOLVE (PerkinElmer) を使用した。
5. 超遠心チューブをローターにセットする
(補足) 釣り合いがとれるように位置していることを必ず確認する。また、ローターの穴とサンプルの対応を確実に記録しておくこと。
6. 超遠心チューブに Spacer (赤色のキャップ) をかぶせる。
7. Plug (銀色のネジキャップ) で蓋をする。
8. Torque Wrench (Plug を閉める器具) で Plug (銀色のネジキャップ) を 120 の目盛りまで閉める。
9. 「ACCEL」を 9、「DECEL」を F にセットする。
(補足) 日立工機の方は、「DECEL」は 9 でも密度勾配はくずれないだろうと話していた。「DECEL」を F (ブレーキなし) にすると、完全停止するまでに 2-5 時間程度かかる。
10. 「SPEED」、「TIME」、「TEMP」を目的の数値にセットする。
11. 「vacuum」を押して、内部が真空になるまで待つ。
(補足) 5-10 分程度待つ。
12. 「START」を押す。
(補足) 回転数が目的の回転数になるまで、超遠心機器のそばを離れずに、安全な運転が行われていることを確認する。ログノートに記録する。

3.2.7 超遠心溶媒の分画・回収

超遠心が終了したら、超遠心機から超遠心ローターを注意深く取り出し、形成された勾配を分画する。トリフルオロ酢酸セシウムは紫外線を吸収するので、分画した RNA をバンドとして視化することができない。こういった理由から、 ^{13}C -RNA のみを引き抜くことができないために、浮遊密度の違いにより分画された超遠心溶媒を分画・回収していく操作を行う。分画操作は、Manefield らの手法に従い (Manefield *et al.*, 2002b)、超遠心チューブの上部から RNase-free water を送り込み、超遠心チューブの下部から超遠心溶媒を押し出して、分画していく。1 分画あたり 400 μl で分画した。

以下に、超遠心の終了から、分画・回収操作までの手順を述べる。

a) 超遠心ローターからの超遠心チューブの取り出し

[用意するもの]

超遠心チューブラック (Beckman Coulter, #348122)

固定台 (ローターを固定する台)

Torque Wrench (Plug を閉める器具)

Removal Tool (Spacer を外す器具)

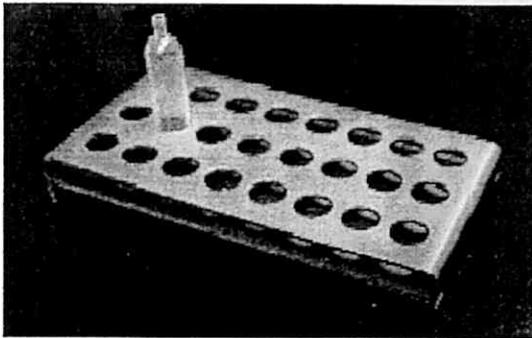


図 3-16 超遠心チューブラック

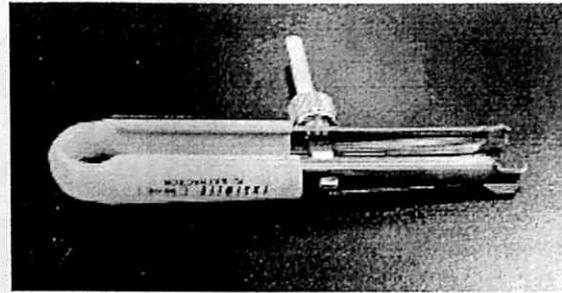


図 3-17 Removal Tool

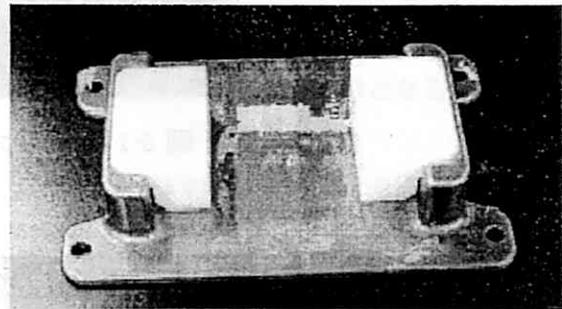


図 3-18 固定台

[実験手順]

1. 超遠心機器の中のローターが完全に停止したことを確認する。
2. 「vacuum」を押す。
(補足) 真空を解除する。
3. 形成された密度勾配を壊さないように、注意深くローターを取り出して、注意深く固定台の上に置く。
4. ローターの上部をしっかりと押さえて、Plug (銀色のネジキャップ)を Torque Wrench (Plug を閉める器具)にて外す。
(補足) この操作をする時に、ローターが最も揺れやすいので注意する。
5. Spacer (赤色のキャップ)を Removal Tool (Spacer を外す器具)にて外す。
6. Removal Tool (Spacer を外す器具)で超遠心チューブの首をつまんで、注意深くローターから引き抜き、超遠心チューブラックに注意深く立てる。

この後、すぐに分画操作に移る。

b) 超遠心溶媒の分画・回収

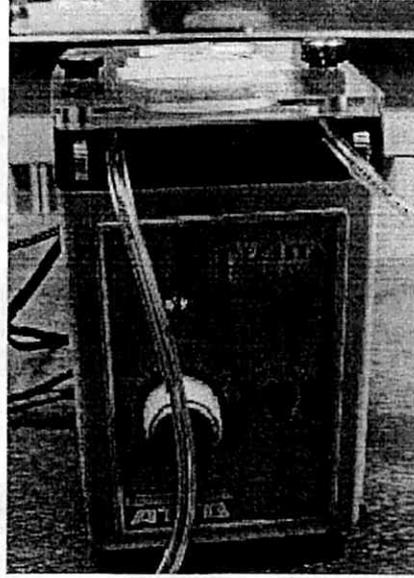


図 3-19 ペリスタポンプ

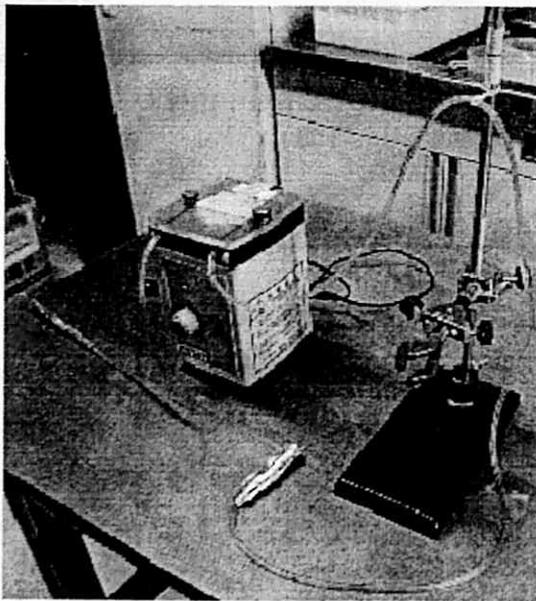


図 3-20 分画・回収セット



図 3-21 チューブを挟む器具

[用意するもの]

ペリスタポンプ (ATTA 社)

マスターフレックスチューブ (ヤマト科学株式会社, 6409-14, #243714, 17TR)

シリンジ針 (テルモ, 25G x 1")

ultraPURE, RNase-free water (Invitrogen)

エッペンチューブ, RNase-free, DNase-free (1.5 ml or 2.0 ml)

予め、図 3-20 のように分画・回収セットを用意しておく。ペリスタポンプには、図 3-19 のようにマスターフレックスチューブを挟み込んでおく。マスターフレックスチューブの一方の端にはシリンジ針を連結しておき (チューブコネクタで連結する)、他方の端は ultraPURE, RNase-free water に浸しておく。分画操作を行う前に、マスターフレックスチューブ全体を ultraPURE, RNase-free water で満たしておく。また、超遠心溶媒を回収するためのエッペンチューブを必要分だけ用意しておく。以上の前準備を行っておく。

[実験手順]

1. 超遠心チューブを図 3-21 に示すような器具で挟み込む。
(補足) 超遠心チューブは鉛直方向に保持し、なるべく内溶液が揺らがないようにする。
2. 超遠心チューブの上部に ultraPURE, RNase-free water の注ぎ込み口となるシリンジ針 (25G x 1") を注意深く刺す。
(補足) 超遠心チューブを手でしっかりと固定して、シリンジ針を回転させながらゆっくりと差し込むと、シリンジ針が一気に刺さらずに超遠心チューブが揺らぐことを防げる
3. 超遠心チューブの底にサンプル回収口となる穴を開けるために、シリンジ針 (25G x 1") を注意深く刺して、シリンジ針を抜く。
4. ペリスタポンプを稼働させる。
5. 同時にストップウォッチで時間を計り始める。
6. 目的の量の超遠心溶媒を 2.0 ml エッペンチューブに回収をしていく。
(補足) ペリスタポンプの流量を $400 \mu\text{l min}^{-1}$ と設定しておけば、1 分間ずつ回収していけば良い。
7. 回収が終了したら、ペリスタポンプを停止して終了。

3.2.8 各分画の浮遊密度の決定

超遠心溶媒の分画・回収後には、各分画の回収した $400 \mu\text{l}$ の超遠心溶媒のうち、 $75 \mu\text{l}$ を refractometer による浮遊密度測定用として、残り $325 \mu\text{l}$ を RNA 回収用サンプルとして使用した。但し、Whiteley らは、RNA の代わりに同量の RNase-free water を添加した超遠心溶媒を、毎回の超遠心で各分画の浮遊密度測定用として利用することを推奨している (Whiteley *et al.*, 2007)。

一方、著者は、超遠心後の各分画の超遠心溶媒の浮遊密度決定用として、「3.2.5 超遠心溶媒の作成」で述べたような、屈折率と比重の検量線を作成して、測定した屈折率から比

重を求めた。検量線の作成は、RNAの代わりに同量の RNase-free water を添加した超遠心溶媒を超遠心し分画・回収して、各分画の超遠心溶媒の屈折率と比重を実測して行った。この検量線を用いれば、屈折率を測定することで、各分画の比重を決定できる。本研究では、全てこの方法で超遠心後の各分画の超遠心溶媒の浮遊密度を決定した。

但し、同じ条件で超遠心を実施しても、毎回正確に同じ勾配が作成されるとは限らないことから、Whiteley らの方法に従うことを推奨する。

3.2.9 各分画からのイソプロパノール沈殿による RNA 回収

各分画中に含まれている RNA をイソプロパノール沈殿により回収した。一般的に、用いられている方法で十分である。以下に、その手順を述べる。

[実験手順]

1. 各分画の超遠心溶媒の量を見積もる。
(補足) 屈折率の測定に 75 μl 使用したので、残りは 325 μl 。
2. 1/10 倍量 (32.5 μl) の 3M 酢酸ナトリウムを入れて、混合する。
3. 100% イソプロピルアルコールを等量 (325 μl) 入れる。
4. 均一になるまで良く混ぜた後、遠心操作を行い壁面に液体がついていない状態にする。
5. -20°C で一晩静置する。
6. 4°C で 15,000 \times g、120 分間遠心する。
(補足) RNA 量が少ない分画からもなるべく RNA を回収するために、遠心時間を長くした。
(補足) 遠心後、核酸の沈殿は確認できないが、沈殿ができていると考えられる位置を確認しておく。
7. 上澄みを注意深くピペティングにて捨てる。
8. RNA 沈殿があると考えられる部分に直接あたらない様に、80% エタノール (RNase-free) を静かに 900 μl 入れる。
9. チューブの中身を混ぜずに、15,000 \times g で 10 分間遠心する。
10. ピペティングで上澄みを注意深く捨てる。
11. 乾燥させる。
(補足) 風乾が良い。
12. 25-35 μl の TE Buffer (pH 8.0, RNase-free) を添加して良くボルテックス操作を行い、次の分子生物学的実験まで -80°C 保存する。
(補足) 著者は、10 μl 程度ずつ分注した後、 -80°C 保存した。

3.2.10 RTPCR 法による 16S rRNA の増幅

reverse transcription (RT)-PCR 法は、TRFLP 解析用とクローニング解析用の RTPCR 産物を作成するために、AccessQuick™ RTPCR System (Promega) を用いて RTPCR を行った。

T-RFLP 解析では、¹³C 系列と対照系列の全分画から回収した RNA を鋳型として RT-PCR を行った。プライマーとして、細菌の 16S rRNA を対象とした FAM 標識された 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') と 非標識の 907r (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') (Lane *et al.*, 1991) を使用した。RT-PCR 条件は、逆転写反応を 48°C, 45 分で行った。94°C, 3 分に続いて、[52°C, 45 秒; 72°C, 1.5 分; 94°C, 30 秒]の PCR 反応を 20 サイクル行い、最後に伸長反応を 72°C, 5 分で行った。

一方、クローニング解析用では、¹³C 系列と対照系列の T-RFLP 解析によって選択した ¹³C 系列と対照系列の浮遊密度の高い分画 1 つずつに対して、分画から回収した RNA を鋳型として RT-PCR を行った。プライマーとして、細菌の 16S rRNA を対象とした 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') と 907r (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') または 1492r (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') (Lane *et al.*, 1991) を使用した。27f/907r のプライマーセットを用いた場合、T-RFLP 解析と同じ RT-PCR 反応条件を使用した。一方、27f/1492r のプライマーセットを用いた場合、RT-PCR 反応条件は、逆転写反応を 48°C, 45 分で行った。94°C, 2 分に続いて、[50°C, 45 秒; 72°C, 1.5 分; 94°C, 45 秒]の PCR 反応を 20 又は 25 サイクル行い、最後に伸長反応を 72°C, 8 分で行った。

得られた RT-PCR 産物は、2%アガロースゲルで電気泳動を行い、目的の増幅産物を確認した。QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) で精製した後、以後の T-RFLP 解析又はクローニング解析に供した。

RT-PCR 法に用いたプライマーセットを RNA-SIP 法の結果を報告した各章 (第 4 章から第 7 章) ごとに表 3-6 にまとめた。

表 3-6 RT-PCR 法に用いたプライマーセット

| 章名 | T-RFLP 解析 | クローニング解析 |
|-------|-----------|-----------|
| 第 4 章 | 27f/907r | 27f/1492r |
| 第 5 章 | 27f/907r | 27f/907r |
| 第 6 章 | 27f/907r | 27f/1492r |
| 第 7 章 | 27f/907r | 27f/907r |

3.2.11 T-RFLP 解析

terminal restriction fragments length polymorphism (T-RFLP) 法とは、Liu らによって報告された手法であり (Liu *et al.*, 1997)、その原理や実験の流れについては第 2 章の「2.4 分子生物学的手法」で述べた。

T-RFLP 解析は、安定同位体元素 (¹³C) による RNA の標識が成功しているか否かを判断するために行った。¹³C 系列と対照系列の T-RFLP プロファイルを比較することにより、

その成否を判断することができる。その方法は次の原理に基づいている。

^{13}C を同化した生物の RNA の浮遊密度は、同化前のそれよりも高くなる。そのため、 ^{13}C を同化した細菌の terminal restriction fragments (TRFs) は、培養時間の経過とともに浮遊密度の高い分画に移行すると予想される。 ^{13}C 系列と対照系列の TRFLP プロファイルと比較することによって、 ^{13}C 系列においてこのような変化を示した TRFs を ^{13}C を同化した細菌 (フェノール分解に関与する細菌) 由来の TRFs と特定することができる。つまり、 ^{13}C による RNA の標識が成功していれば、 ^{13}C 系列ではいくつかの TRFs が浮遊密度の高い分画に移行し、一方、対照系列ではどの分画においても TRFLP プロファイルにそれ程変化がない、という状況になる。

この RT-PCR 法の操作において重要となる点が、RNA テンプレート量、PCR のサイクル数といった項目である。回収された RNA 濃度や対象とする遺伝子群の性質に基づいて、最適な条件を決定しなければならない。RNA テンプレート量が多すぎたり、PCR サイクル数が多すぎたりすると、対照系列の浮遊密度の高い分画でも RT-PCR 産物が増幅されてしまい、 ^{13}C 系列と対照系列の TRFLP プロファイルの比較による判断が若干困難となる。理想的な RT-PCR 条件は、 ^{13}C 系列の浮遊密度の高い分画には RT-PCR 産物が増幅されて、一方、それに相当する浮遊密度の対照系列の分画には RT-PCR 産物が増幅されない、という条件である。このような条件となるように、本章の「3.2.10 RT-PCR 法による 16S rRNA の増幅」で述べた RT-PCR 条件を決定した。

TRFLP 解析は次の手順で行った。精製した RT-PCR 産物を *Msp*I (TOYOBO) を用いて制限酵素処理した。制限酵素処理したサンプルは、95°C で 3 分間変性処理後、氷上で急冷した。TRFs の長さによる分離は ABI 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。TRFs の長さはスタンダードマーカースと比較して、GeneScan software で決定した。

3.2.12 クローニング解析とシーケンシング解析

クローニング解析とシーケンシング解析は、本章の「3.2.11 TRFLP 解析」で特定された ^{13}C を同化した細菌由来の TRFs の系統学的位置を決定するために行った。

TRFLP 解析の結果に基づいて選択した ^{13}C 系列と対照系列の浮遊密度の高い分画それぞれ 1 分画ずつに対して、クローニング解析を行った。精製した RT-PCR 産物を QIAGEN® PCR Cloning-plus Kit (Qiagen) を用いて製造会社の指示に従うか、又は、タカラバイオ㈱の受託シーケンス解析を利用してクローニングした。 ^{13}C 系列と対照系列から無作為に複数個のクローンを選択した。それぞれ、 ^{13}C ライブラリー、対照ライブラリーと名づけた。

選択したクローンは、タカラバイオ㈱の受託シーケンス解析を利用してシーケンシングした。BigDye terminator 反応を用いて ABI 3730x/DNA sequencer (Applied Biosystems) でシーケンシングした。シーケンシングプライマーは、細菌の 16S rRNA を対象とした 357f (5'- CTCCTACGGGAGGCAGCAG -3') プライマーと 519r (5'-

GWATTACCGCGGCKGCTG-3') (Lane *et al.*, 1991) を使用した。

また、27f と 1492r プライマーでクローニング解析を行い 16S rRNA 全長塩基配列解析を行う場合、シーケンシングプライマーは、細菌の 16S rRNA を対象とした 926f (5'-AAACTYAAAKGAATTGACGG-3') と 1110r (5'-GGGTTGCGCTCGTTG-3') と 1114f (5'-GCAACGAGCGCAACCC-3') (Lane *et al.*, 1991) を使用した。得られた配列は、DNasis Pro (日立ソフトウェアエンジニアリング) でアセンブル操作をした。

シーケンシングにより得られたクローンの塩基配列を用いて、実際に行った T-RFLP 解析の条件で RT-PCR 法と制限酵素処理を行った場合に得られると予想されるクローンの T-RF 長を *in silico* 解析によって決定した。T-RFLP 解析で検出された T-RFs が、*in silico* 解析によって決定したクローンの T-RF 長と同じ場合、T-RFLP 解析で検出された T-RFs の塩基配列がそのクローンの塩基配列と同じであると判断した。こうして T-RFLP 解析で検出された T-RFs の系統学的位置を決定した。

シーケンシング解析に用いたプライマーを RNA-SIP 法の結果を報告した各章 (第 4 章から第 7 章) ごとに表 3-7 にまとめた。

表 3-7 シーケンシング解析に用いたプライマー

| 章名 | シーケンシング解析 | |
|-------|------------|--------------------------------|
| | 全クローン | 一部のクローン |
| 第 4 章 | 357f, 519r | 357f, 926f, 1114f, 519r, 1110r |
| 第 5 章 | 357f, 519r | — |
| 第 6 章 | 357f, 519r | — |
| 第 7 章 | 357f, 519r | — |

3.2.13 フェノール分解細菌の特定

T-RFLP 解析では、 ^{13}C 系列と対照系列の T-RFLP プロファイルを比較することにより、 ^{13}C 系列の T-RFLP プロファイル内で浮遊密度の高い分画に移行している T-RFs を選択して、それらをフェノール分解に関与する細菌の T-RFs と決定した。

次に、クローニング解析とシーケンシング解析では、 ^{13}C 系列と対照系列の浮遊密度の高い分画それぞれ 1 分画ずつからクローンライブラリーを作成し、これらのクローンの 16S rRNA の部分塩基配列又は全長塩基配列を決定した。これらのクローンの塩基配列を用いて、実際に行った T-RFLP 解析の条件で RT-PCR 法と制限酵素処理を行った場合に得られると予想されるクローンの T-RF 長を *in silico* 解析によって決定した。

以上の T-RFLP 解析、クローニング解析とシーケンシング解析から得られる結果をまとめると、T-RFLP 解析によって特定したフェノール分解に関与する細菌由来の T-RFs と同じ T-RFs 長を保有するクローンの塩基配列が、フェノール分解に関与する細菌の塩基配列

に相当する。こうして、フェノール分解に関与した細菌の系統学的位置が特定された。

但し、特定されたフェノール分解に関与する細菌は、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノール由来の ^{13}C を摂取・同化したことは確かであるが、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールを直接摂取したのかそれとも $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールの代謝産物を直接摂取したのかの判断が問題である。 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールを直接摂取した細菌はフェノール分解細菌であるが、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールの代謝産物を直接摂取した細菌は cross-feeder (対象化合物の代謝産物を同化する生物を指す) である。この両者を合わせて、フェノール分解に関与する細菌とここまで呼んできた。この違いを判断するためには、特定されたフェノール分解に関与する細菌の T-RFs が検出されるまでの培養時間・検出強度・その他の T-RFs との関係を経験的に評価して判断する。さらに、特定されたフェノール分解に関与する細菌の系統学的位置に、これまでにフェノール分解細菌が報告されているかを文献情報から調査する。こういった情報から総合的に判断して、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールを直接摂取したのか、それとも $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールの代謝産物を直接摂取したのかを最終的に推定する。

3.3 分離培養法

本研究では、平板培養法を用いて嫌氣的フェノール分解細菌を分離培養した。固化剤として、カラギーナン・ゲランガム・2種類の寒天を用いた。フェノール濃度は、低濃度・中濃度・高濃度の3種類に設定した。分離培養の結果の詳細な内容は、第6章と第7章を参照されたい。ここでは、平板培養法を行うにあたり特に留意した点や実験の大まかな手順を簡潔に述べる。

3.3.1 サンプル採取

本研究では、活性汚泥をサンプルとして用いた。嫌氣的な処理を行っている脱窒槽から活性汚泥を採取した。活性汚泥が大気になるべく触れないように、滅菌した容器に活性汚泥を採取した後、なるべく気層が残らないように容器を満たす形で採取した。実験室までの運搬は、常温で約3時間で行った。培養を開始するまでの約12時間は、常温で保存を行った。実験室に持ち帰った活性汚泥は、まずRNA-SIP法の培養のために使用した。分離培養法の活性汚泥は、このRNA-SIP法の培養が終了した汚泥を用いた。詳細に関しては、第6章と第7章を参照されたい。

3.3.2 培地の選択

本研究では、平板培養法を用いて嫌氣的フェノール分解細菌の分離培養を行った。本研究で対象とした嫌氣的フェノール分解という代謝は、硝酸塩が還元されるという反応を意味している。硝酸塩が還元されると、水酸化物イオンが生成されることによって、pHが上昇する。そのために、培地に緩衝作用を持たせる必要があった。また、既往の知見でも、嫌氣的フェノール分解細菌に限らず、硝酸塩還元反応の代謝を有する微生物を分離するための培地には、緩衝作用がある培地が用いられていた。

そこで、本研究で用いる培地として、無機塩培地（従属栄養微生物を分離・培養するために使用される有機物以外の無機成分）と微量培地成分（trace element solution と vitamin solution の2つ）を文献調査やカルチャーコレクションに登録されている培地の調査を通じて決定した。詳細に関しては、第6章と第7章を参照されたい。

3.3.3 培養条件

固体培地への活性汚泥の接種方法は塗抹法を用いた。但し、固体培地に活性汚泥を塗付する前に、滅菌済み0.85%NaCl溶液を希釈溶液として段階希釈を行った。希釈の各段階では、ボルテックスミキサーで1.5分程度攪拌作業を行った。これは活性汚泥のフロックを小さくし、微生物を分散させる目的で行った。超音波破碎を行わなかったのは、超音波によって死滅する細菌も少なからず存在すると考えたためであった。希釈したサンプルを、シャーレ1枚に対して100または200 μ l 添加した。プラスチック製のスプレダーでサン

ルを塗布した。塗布後、三菱ガス化学株式会社から市販されているアネロパック角型ジャー（密閉容器）とAnaeroPack・ケンキ（酸素吸収剤）の嫌気培養セットを使用して、嫌気状態を作成し培養した。固体培地は、培地中に含まれる酸素を除去する目的で、培養に使用する前に最低1日以上嫌気培養セットに保存した。本嫌気培養セットでは、AnaeroPack・ケンキによって、角型ジャー内の酸素が2時間以内に完全に吸収され、21%前後の炭酸ガスが発生し嫌気状態になる。詳細に関しては、第6章と第7章を参照されたい。

3.3.4 分離株の獲得と顕微鏡観察

生育したコロニーを複数回画線して純化を終了し、分離株を獲得した。分離株の純化の確認や形態観察や活性汚泥中の微生物の観察は、Olympus BX60 蛍光顕微鏡（Olympus）を用いて行った。

3.4 水質分析法

活性汚泥の上澄液中のフェノール濃度、硝酸塩濃度、亜硝酸塩濃度、pH の測定方法は、以下の方法を用いた。

3.4.1 フェノール定量法

フェノールは4-アミノアンチピリン吸光光度法を用いて定量した (King *et al.*, 1991)。実験手順は以下に従った。

[測定原理]

pH 約 10 に調節した試料に 4-アミノアンチピリン溶液とヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム溶液を順に添加して、生成する赤色のフェノールと 4-アミノアンチピリンの化合物の吸光度を測定してフェノールを定量する。測定範囲は 0.05-0.5 mg である。

[用意する試薬]

pH 10.0 の緩衝溶液 (ホウ酸 3.09 g、塩化カリウム 3.73 g、1 N 水酸化ナトリウム 44 ml を 1 liter の distilled water に溶解したもの)

2%の4-アミノアンチピリン溶液

8%のヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム溶液

[実験手順]

1. 0.20 μm 孔径の cellulose acetate filter (ADVANTEC) でろ過して得られた活性汚泥の上澄液を 900 μl 用意する。
2. 100 μl の pH 10.0 の緩衝溶液を添加する。
3. 10 μl の 2%の 4-アミノアンチピリン溶液を添加する。
4. 10 μl の 8%のヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム溶液を添加する。
5. サンプルが反応するまで 5 分間待つ。
6. 分光光度計 (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop 社)) で吸光度 (500 nm) を測定する。
7. 2-6. の操作をフェノール標準液に対して行い、吸光度 (500 nm) とフェノール濃度の検量線を作成してサンプル濃度を決定する。

3.4.2 硝酸塩定量法

硝酸塩濃度は、イオンクロマトグラフ (DX-AQ 1110 (DIONEX)) によって決定した。カラムは IonPac® AS12A (DIONEX) を用いた。検出器は電気伝導率検出器を用いた。実験手順は、製造会社の指示に従った。

3.4.3 亜硝酸塩定量法

亜硝酸塩濃度は、N-(1-ナフチル)エチレンジアミン吸光光度法で決定した。

[測定原理]

酸性溶液中でスルファニルアミドと亜硝酸塩が反応してジアゾニウム塩が生じる。このジアゾニウム塩がナフチルエチレンジアミンと反応することによって、ピンク色から赤色のアゾ色素が生じる。このアゾ色素の 540 nm における吸光度を測定し定量する。測定範囲は、亜硝酸態窒素として 0.0005-0.0009 mgN である。

[用意する試薬]

スルファニルアミド溶液 (スルファニルアミド 0.6 g を温水 50 ml に溶解し冷却後、塩酸 40 ml を加えて水で 100 ml とする)

N-(1-ナフチル)エチレンジアミン溶液 (0.1%の N-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩水溶液、褐色瓶に保存して 1 週間以内に使用)

[実験手順]

1. 0.20 μm 孔径の cellulose acetate filter (ADVANTEC) でろ過して得られた活性汚泥の上澄液を 10 ml 用意する。
2. スルファニルアミド溶液を 0.2 ml 添加して混合し、常温で 5 分間放置する。
3. N-(1-ナフチル)エチレンジアミン溶液を 0.2 ml 添加して混合し、常温で 10 分間以上放置する。
4. 分光光度計 (U-1800 レシオビーム分光光度計(日立ハイテクノロジーズ株式会社)) で吸光度 (540 nm) を測定する。
5. 2-4. の操作を亜硝酸態窒素標準液に対して行い、吸光度 (540 nm) と亜硝酸塩濃度の検量線を作成してサンプル濃度を決定する。

3.4.4 pH 測定法

pH は TWINpH B-212 (Horiba) を用いてガラス電極法で測定した。1 ml 程度の液量で pH を測定することができる。

第4章 嫌氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定

4.1 はじめに

本章では、嫌氣的フェノール分解細菌を分子生物学的手法 (RNA-SIP 法) によって特定することを目的とした。そのために次のような手順で実験した。汚泥にフェノールを有機物源として与えて、硝酸塩存在下で活性汚泥を嫌気培養した。培養した汚泥を以下の RNA-SIP 法の分子生物学の実験に供した。汚泥から精製された RNA を抽出し、密度勾配遠心法によってその RNA を浮遊密度によって分画した。各分画の 16S rRNA を対象として、TRFLP 解析とクローニング解析・シーケンシング解析を行い、16S rRNA 塩基配列に基づいて嫌氣的フェノール分解細菌を特定した。なお、汚泥 B と汚泥 C を実験サンプルとして用いた。

4.2 実験方法

4.2.1 活性汚泥の嫌気培養

培養には、人工安水処理硝化脱窒プロセスの脱窒槽から採取した汚泥 B と汚泥 C を使用した (汚泥 B と汚泥 C の性状は、第3章の「3.1 供試試料」を参照)。滅菌済みメディウム瓶に採取して実験室に持ち帰り、使用までの約 12 時間は室温で運搬・保存した。

汚泥 B の嫌気培養

汚泥 B (MLSS 4316mg/L) にフェノールを有機物源として与え、硝酸塩存在下で嫌気培養した。培養には、6 つの炭素が安定同位体炭素で置換されたフェノール (以下、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノール) を与える ^{13}C 系列と標識されていないフェノール (以下、 $[^{12}\text{C}_6]$ フェノール) を与える対照系列の 2 系列を用意した。培養前の活性汚泥の上澄液中のフェノール、硝酸塩、亜硝酸塩の濃度は、それぞれ約 0 mg liter^{-1} (検出限界以下), $94 \text{ mgN liter}^{-1}$, $11 \text{ mgN liter}^{-1}$ であった。

50 ml の滅菌済みバイアル瓶に 10 ml の活性汚泥を分注した。 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノール (Cambridge Isotope Laboratories, USA) または $[^{12}\text{C}_6]$ フェノール (和光) と硝酸ナトリウム (和光) を、各バイアル瓶に対してそれぞれ 0.91 mg と 0.55 mgN ずつ添加した。バイアル瓶にブチルゴム栓をしてアルミシールで蓋をした。気相を 99.99%窒素ガスで 5 分間置換

した後、23°Cで暗所で静置培養を行った。¹³C 系列と対照系列に対して、バイアル瓶を複数用意した (¹³C 系列 12 本、対照系列 20 本)。

培養開始後、適宜残存しているフェノールおよび硝酸の濃度を分析し、必要に応じてフェノール及び/または硝酸塩を追加した。培養 17.5 時間後には、^[13C6]フェノールまたは^[12C6]フェノールを各バイアル瓶に対して 1 mg ずつ、培養 26.3 時間後には、^[13C6]フェノールまたは^[12C6]フェノールと硝酸ナトリウムを、各バイアル瓶に対してそれぞれ 1.3 mg と 1.5 mgN ずつ添加した。各基質添加はフェノール及び硝酸塩が枯渇する前に行った。

培養 6.5, 16.5, 351 時間後に ¹³C 系列と対照系列のバイアルそれぞれ 3 本ずつを開封した。活性汚泥を遠心分離し、活性汚泥ペレットは後の分子生物学的実験のために -80 度保存した。また、上澄液は、0.20- μ m 孔径の cellulose acetate filter (ADVANTEC) でろ過して水質分析した。

^[12C6]フェノールを与えた残りの 8 本のバイアルについては、培養 24.5 時間後と培養 34 時間後にバイアル 1 本をずつ開封し、遠心分離およびろ過により上澄液を回収した後、フェノールと硝酸塩濃度を分析した。

汚泥 C の嫌気培養

汚泥 C の嫌気培養では、汚泥 B の嫌気培養で行なった結果を踏まえ、実験方法の細部にいくつかの変更を加えた。

汚泥 B の場合と同様に、汚泥 C (「3.1 供試試料」を参照、MLSS 9706mg/L) にフェノールを有機物源として与え、硝酸塩存在下で嫌気培養した。¹³C 系列と対照系列の 2 系列を用意した。培養前の活性汚泥の上澄液中のフェノール、硝酸塩は、それぞれ約 0 mg liter⁻¹ (検出限界以下) , 53 mgN liter⁻¹であった。

50 ml の滅菌済みバイアル瓶に 10 ml の活性汚泥を分注した。^[13C6]フェノール (Cambridge Isotope Laboratories, USA) または^[12C6]フェノール (和光) と硝酸ナトリウム (和光) を、各バイアル瓶に対してそれぞれ 1.0 mg と 0.226 mgN ずつ添加した。バイアル瓶にブチルゴム栓をしてアルミシールで蓋をした。気相を 99.99% 窒素ガスで 5 分間置換した後、33°Cで暗所で静置培養を行った。¹³C 系列と対照系列に対して、バイアル瓶を複数用意した (¹³C 系列 12 本、対照系列 18 本)。

培養開始後、残存しているフェノールおよび硝酸の濃度を適宜分析し、必要に応じてフェノール及び/または硝酸塩を追加した。培養 4.7, 9.7, 14.8 時間後に、^[13C6]フェノールまたは^[12C6]フェノールと硝酸ナトリウムを、各バイアル瓶に対してそれぞれ 1.0 mg と 0.226 mgN ずつ添加した。基質添加はフェノール及び硝酸塩が枯渇する前に行った。

培養 4.7, 9.7, 14.8, 24.7 時間後に ¹³C 系列と対照系列のバイアルそれぞれ 3 本ずつを開封した。以下、汚泥 B と同様の操作を施し、活性汚泥ペレットは後の分子生物学的実験のために -80 度保存し、上澄液は水質分析に供した。

水質モニタリング用として用意した^[12C6]フェノールを与えた残りの 6 本のバイアルにつ

いては、培養4.6, 13.7時間後にバイアル1本をずつ開封し、遠心分離およびろ過により上澄液を回収した後、フェノールを分析した。

4.2.2 水質分析

嫌気的フェノール分解細菌の代謝によって、電子供与体としてのフェノールが減少し、電子受容体としての硝酸塩が脱窒反応によって減少する。そして、硝酸塩の一部は亜硝酸塩として一時的に蓄積し、残りは窒素ガスへと還元される。これらのフェノール・硝酸塩・亜硝酸塩の挙動を解析するために、活性汚泥の上澄液中のフェノール濃度、硝酸塩濃度、亜硝酸塩濃度を測定した。汚泥Bに対してはこれら3つの濃度を、汚泥Cに対しては亜硝酸塩濃度以外の2つの濃度を測定した。測定方法は第3章の「3.4 水質分析法」に従った。

4.2.3 RNA-SIP法

汚泥BのRNA-SIP法

^{13}C 系列と対照系列の培養6.5時間後と培養35時間後の活性汚泥サンプルをRNA抽出以下のRNA-SIP法に供した。二つの時点についてRNS-SIP法を行なったのは、標識した炭素がRNAに取り込まれるまでの時間が、この時点では明確ではなかったことによる。35時間培養した方がRNAへの取込み量が多くなり、RNA-SIP法による分析をより確実に行なうことができる。一方、長時間培養すると、いわゆるcross-feeding効果（ $^{13}\text{C}_6$ フェノールの代謝産物を同化した細菌が ^{13}C で標識される現象）が起こるために、嫌気的フェノール分解に直接関与しない微生物のRNAが標識されてしまう場合がある。そこで、短い培養時間の試料についてもRNA-SIP法の分子生物学的解析を行なうこととした。

実験手順は第3章の「3.2 RNA-stable isotope probing (SIP)法」に従った。ここでは、TRFLP解析、クローニング解析、シーケンシング解析に用いたプライマーについてのみ述べる。TRFLP解析では、FAM標識された27fプライマーと非標識の907rプライマーを使用した(Lane *et al.*, 1991)。クローニング解析では、27fプライマーと1492rプライマーを使用した(Lane *et al.*, 1991)。シーケンシング解析では、357fプライマーと519rプライマーを使用した(Lane *et al.*, 1991)。但し、嫌気的フェノール分解に関与する細菌と特定された ^{13}C 系列のクローンの一部の16S rRNAの全長塩基配列を決定するために、926fプライマーと1114fプライマーと1110rプライマー(Lane *et al.*, 1991)を使用した。

汚泥CのRNA-SIP法

汚泥Cでは、9.7時間培養した試料のみをRNA-SIP法による分析に供した。実験手順は第3章の「3.2 RNA-stable isotope probing (SIP)法」に従った。TRFLP解析では、FAM標識された27fプライマーと非標識の907rプライマーを使用した(Lane *et al.*, 1991)。クローニング解析では、27fプライマーと907rプライマーを使用した(Lane *et al.*, 1991)。シーケンシング解析では、357fプライマーと519rプライマーを使用し(Lane *et al.*, 1991)、

クローニング解析で対象とした 27f/907r 間の塩基配列を決定した。なお、クローニング解析に 27f/907r プライマーセットを用いたため、汚泥 B に対して行った 16S rRNA 全長塩基配列解析は行えなかった。

4.3 結果

4.3.1 活性汚泥の嫌気培養

汚泥 B の嫌気培養

^{13}C 系列と対照系列のフェノール濃度と硝酸塩濃度と亜硝酸塩濃度の挙動をモニタリングした。培養 6.5 時間後と培養 35 時間後には、それぞれフェノールが 0.183 ± 0.002 、 0.710 ± 0.022 mol/gMLSS、硝酸塩が 1.222 ± 0.062 、 3.760 ± 0.095 mol/gMLSS 消費され、亜硝酸塩が 0.590 ± 0.021 、 1.395 ± 0.016 mol/gMLSS 蓄積されていた (^{13}C 系列と対照系列の全 6 データの平均値 \pm 標準偏差を示した)。

汚泥 C の嫌気培養

^{13}C 系列と対照系列のフェノール濃度と硝酸塩濃度の挙動をモニタリングした。培養 4.7 時間後と培養 9.7 時間後には、それぞれフェノールが 0.109 ± 0.0007 、 0.219 ± 0.0003 mol/gMLSS、硝酸塩が 0.289 ± 0.0064 、 0.692 ± 0.011 mol/gMLSS 消費されていた (^{13}C 系列と対照系列の全 6 データの平均値 \pm 標準偏差を示した)。また、培養 9.7 時間以降は、添加したフェノールを完全に酸化するのに十分な硝酸塩が添加されていない状態で培養を行った。そのため、培養 14.8 時間後と培養 24.7 時間後には、フェノールが残存し硝酸塩は検出されなかった。

4.3.2 TRFLP 解析

まず、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノール由来の ^{13}C を同化した細菌を特定するために、TRFLP プロファイルをどのように解析するかを説明する。 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノール由来の ^{13}C を同化した細菌の RNA の浮遊密度は、同化前のそれよりも高くなる。そのため、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノール由来の ^{13}C を同化した細菌の T-RF は、培養時間の経過とともに浮遊密度の高い分画に移行すると予想される。一方、対照系列では $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールではなく $[^{12}\text{C}_6]$ フェノールを与えているので、このような移行は見られない。 ^{13}C 系列と対照系列の TRFLP プロファイルを比較することによって、このような変化を示した ^{13}C 系列の T-RFs を、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールを同化した嫌氣的フェノール分解に関与する細菌由来の T-RFs と特定することができる。

汚泥 B の TRFLP 解析

^{13}C 系列と対照系列の培養 6.5 時間後と培養 35 時間後の活性汚泥を用いて作成した

T-RFLP プロファイルを、それぞれ図 4-1A と 4-1B、図 4-2A と 4-2B に示す。¹³C 系列と対照系列ともに、超遠心後、全 12 分画ずつに分画して、全 12 分画の T-RFLP プロファイルを作成した。その中の浮遊密度の高い分画と低い分画を示した。35 時間培養した試料については、83 bp, 148 bp, 486 bp, 495 bp, 510 bp の T-RFs が浮遊密度の高い分画に移行したことがわかる (図 4-2A)。一方、短時間 (6.5 時間) 培養した試料でも、83 bp, 148 bp, 510 bp の T-RFs が浮遊密度の高い分画に移行した (図 4-1A)。特に、83 bp の T-RF は他の T-RFs に比べて大きく移行した。これらの T-RFs の ¹³C 系列と対照系列のそれぞれの分画中での相対的 T-RFs 割合の推移を、培養時間ごとにそれぞれ図 4-3 (培養 6.5 時間後) と図 4-4 (培養 35 時間後) に示す。どの T-RFs も、浮遊密度が高い分画に移行するにつれて、対照系列よりも ¹³C 系列での相対的 T-RFs 割合が高くなっている。

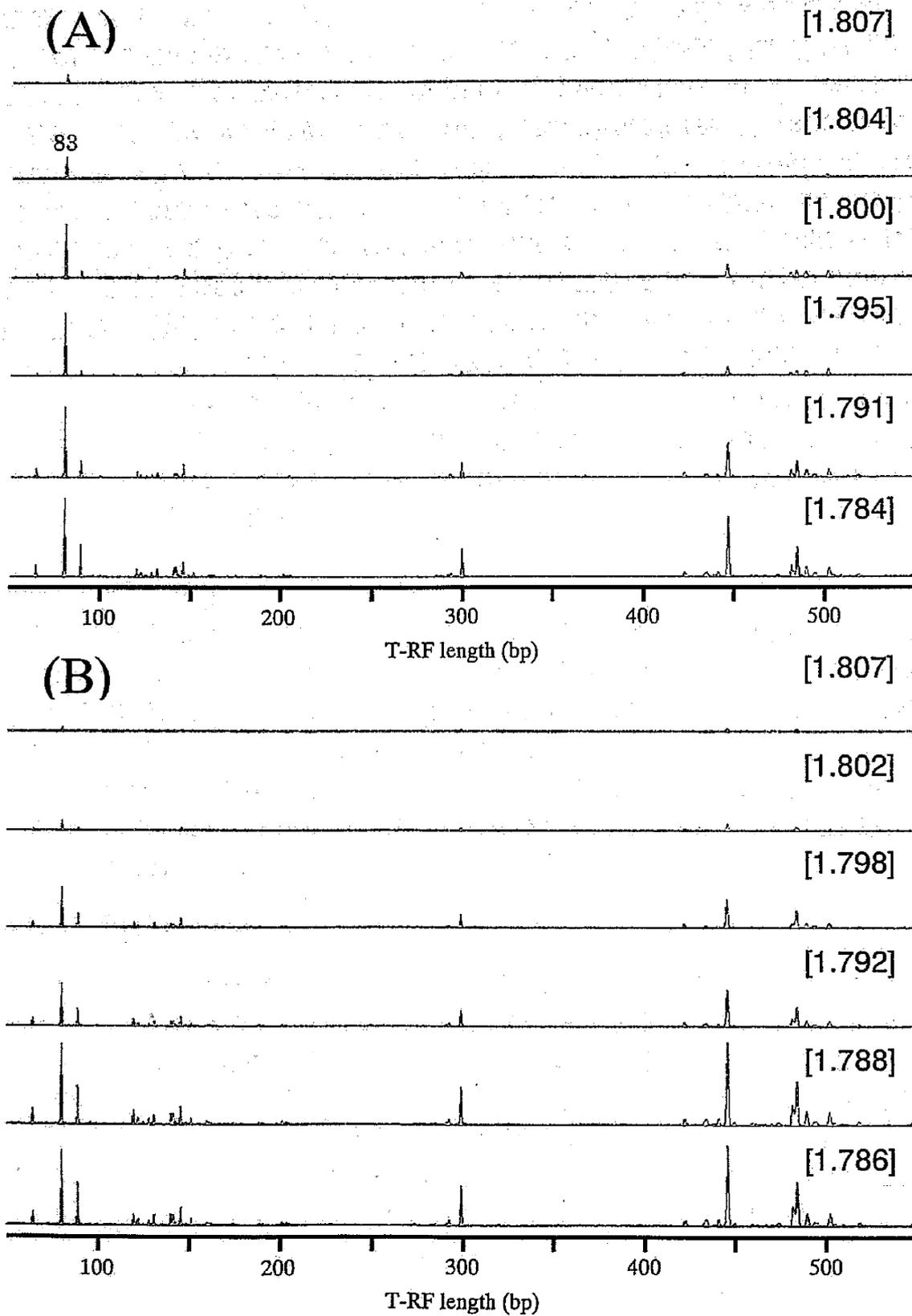


図 4-1A と図 4-1B 汚泥 B の培養 6.5 時間後の ^{13}C 系列(A)と対照系列(B)の T-RFLP プロファイル

[]内の数字は、各分画の浮遊密度を示す。単位は、 g ml^{-1} 。

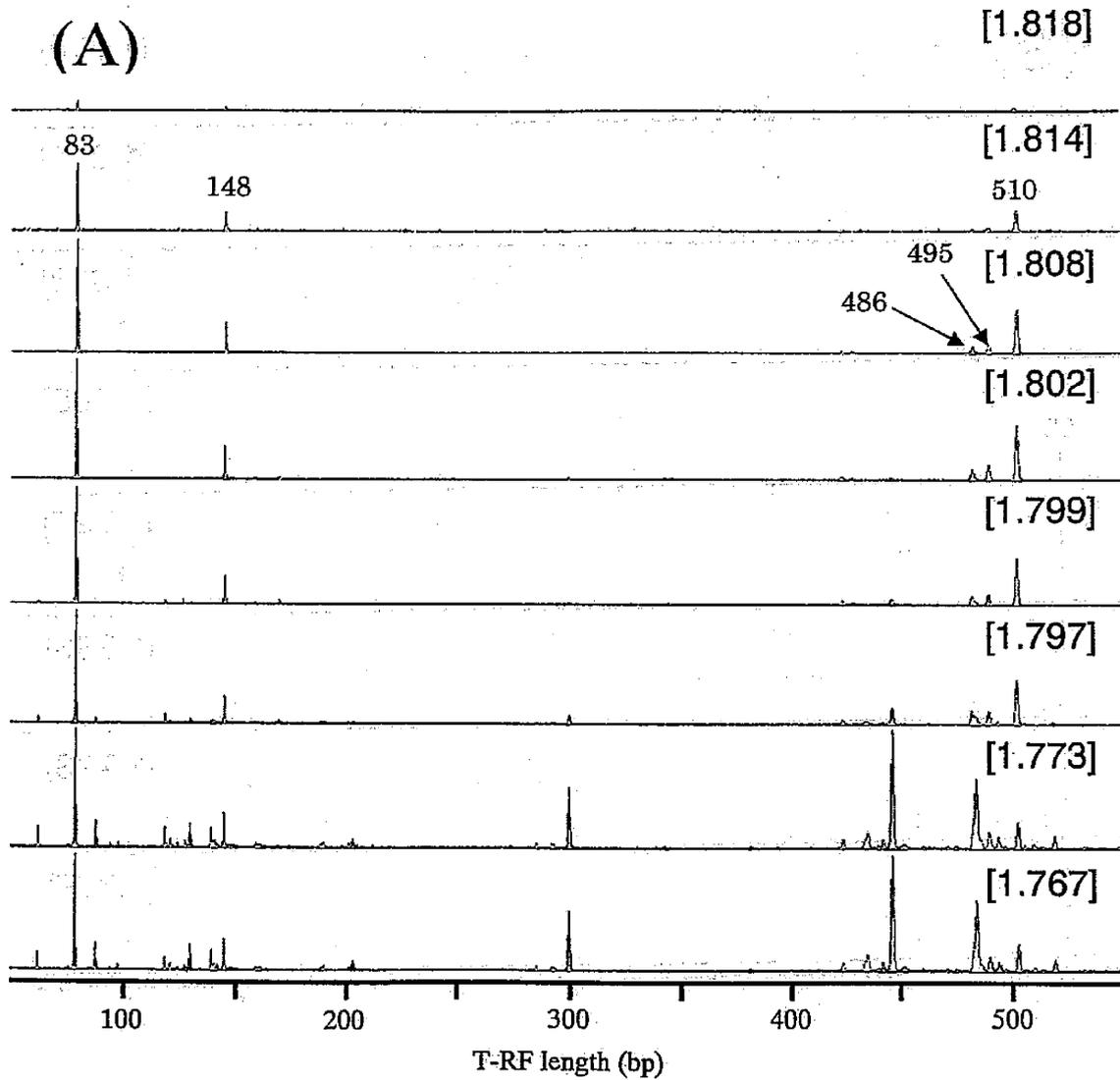


図 4-2A と図 4-2B 汚泥 B の培養 35 時間後の ¹³C 系列(A)と対照系列(B)の T-RFLP プロファイル

[]内の数字は、各分画の浮遊密度を示す。単位は、g ml⁻¹。

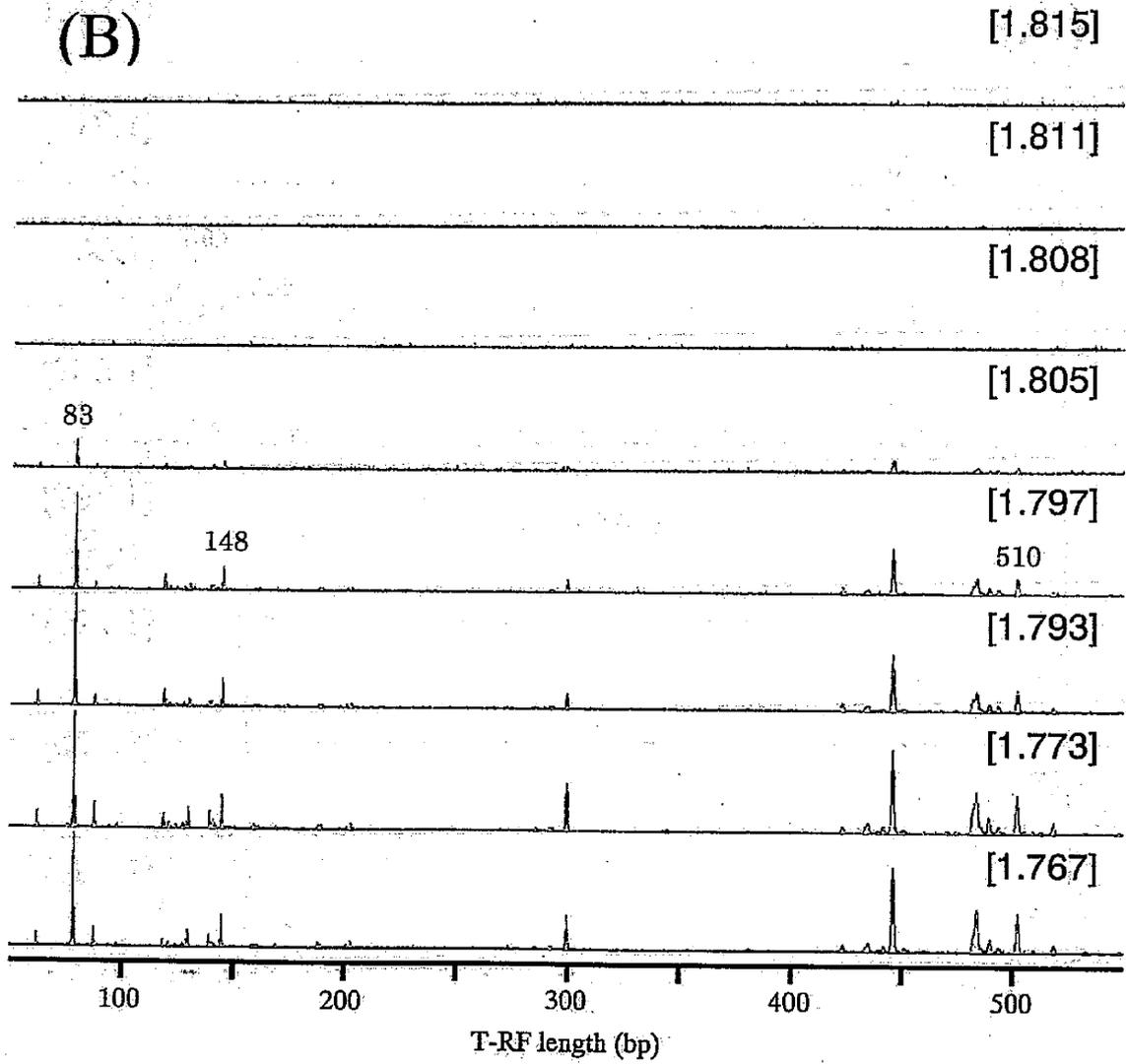


図 4-2A と図 4-2B - (続き)

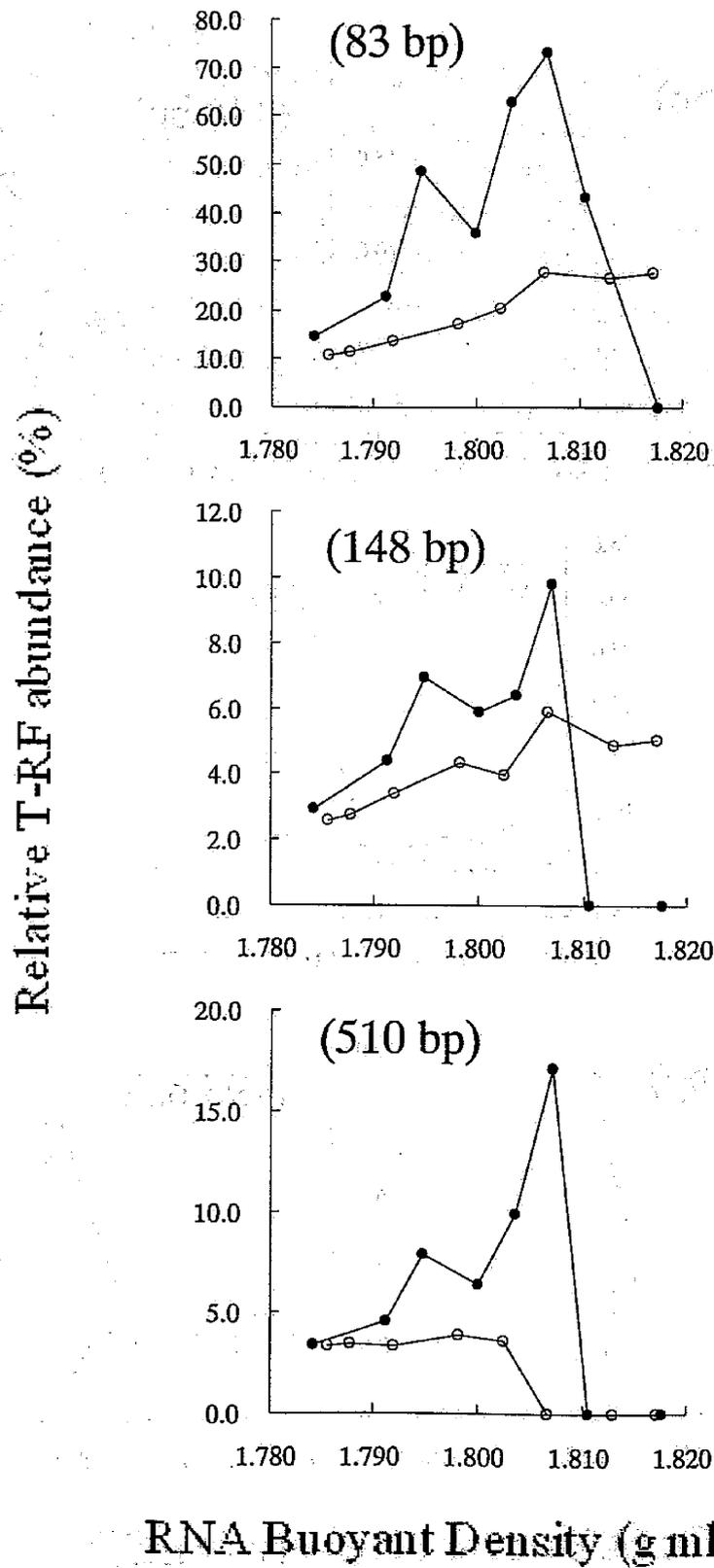


図 4-3 汚泥 B の培養 6.5 時間後における 83 bp, 148 bp, 510 bp の T-RFs 長を持つ T-RFs の各分画中における相対的 T-RFs 割合の推移 (●; ¹³C 系列, ○; 対照系列)

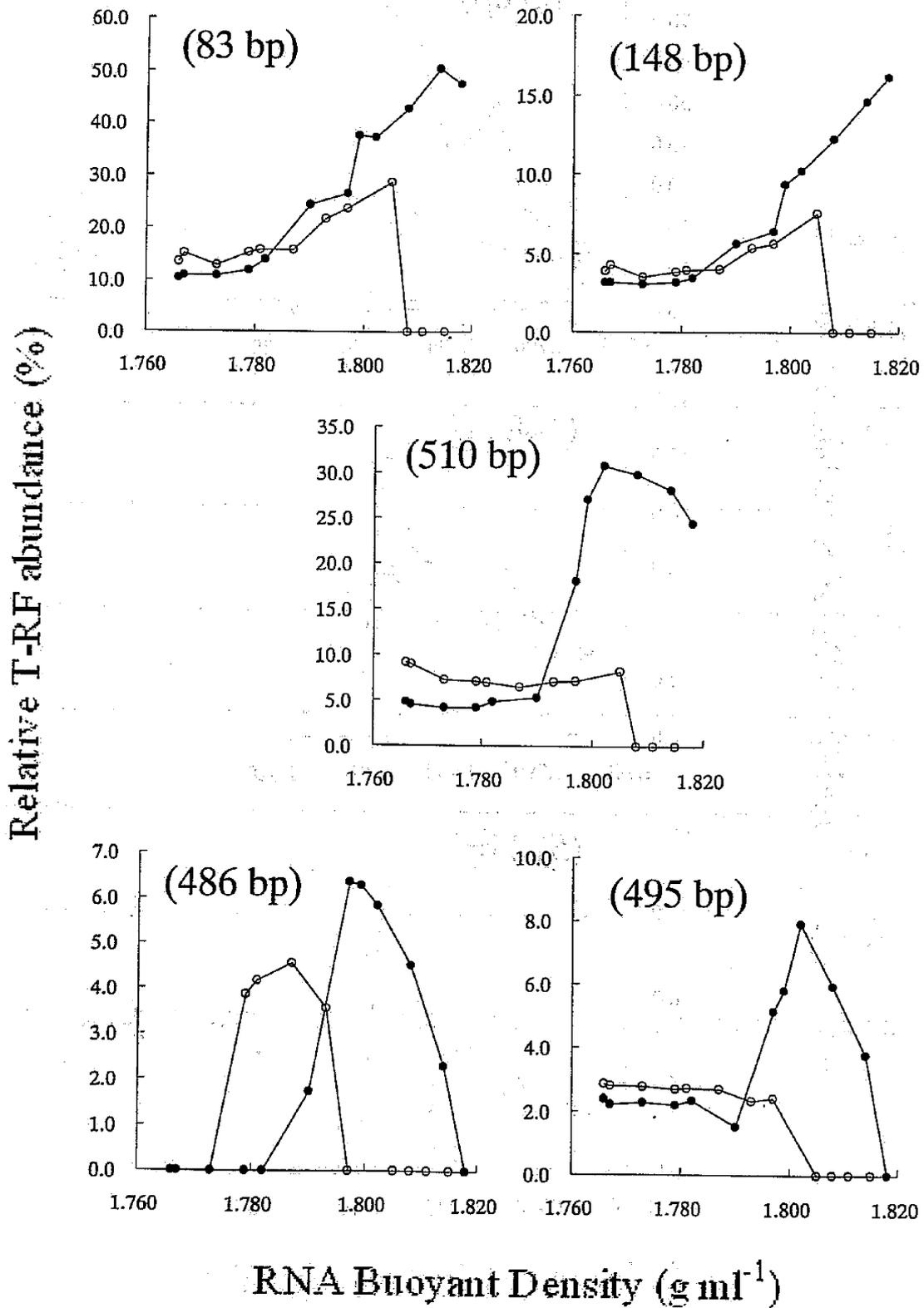


図4-4 汚泥Bの培養35時間後における83 bp, 148 bp, 486 bp, 495 bp, 510 bpのT-RFs長を持つT-RFsの各分画中における相対的T-RFs割合の推移 (●, ^{13}C 系列; ○, 対照系列)

汚泥 C の T-RFLP 解析

^{13}C 系列と対照系列の培養 9.7 時間後の活性汚泥を用いて作成した T-RFLP プロファイルを、それぞれ図 4-5A と図 4-5B に示す。 ^{13}C 系列と対照系列ともに、超遠心後、全 12 分画ずつに分画して、全 12 分画の T-RFLP プロファイルを作成した。その中の浮遊密度の高い分画と低い分画を示した。結果、9.7 時間培養した活性汚泥では、嫌氣的フェノール分解細菌の RNA が十分に標識されていることがわかった (図 4-5A)。

こうして、148 bp と 510 bp の T-RFs が嫌氣的フェノール分解に関与する細菌由来の T-RFs と特定された。これらの T-RFs の ^{13}C 系列と対照系列のそれぞれの分画中での相対的 T-RFs 割合の推移を図 4-6 に示す。どの T-RFs も、浮遊密度が高い分画に移行するにつれて、対照系列よりも ^{13}C 系列での相対的 T-RFs 割合が高くなっていることがわかる。

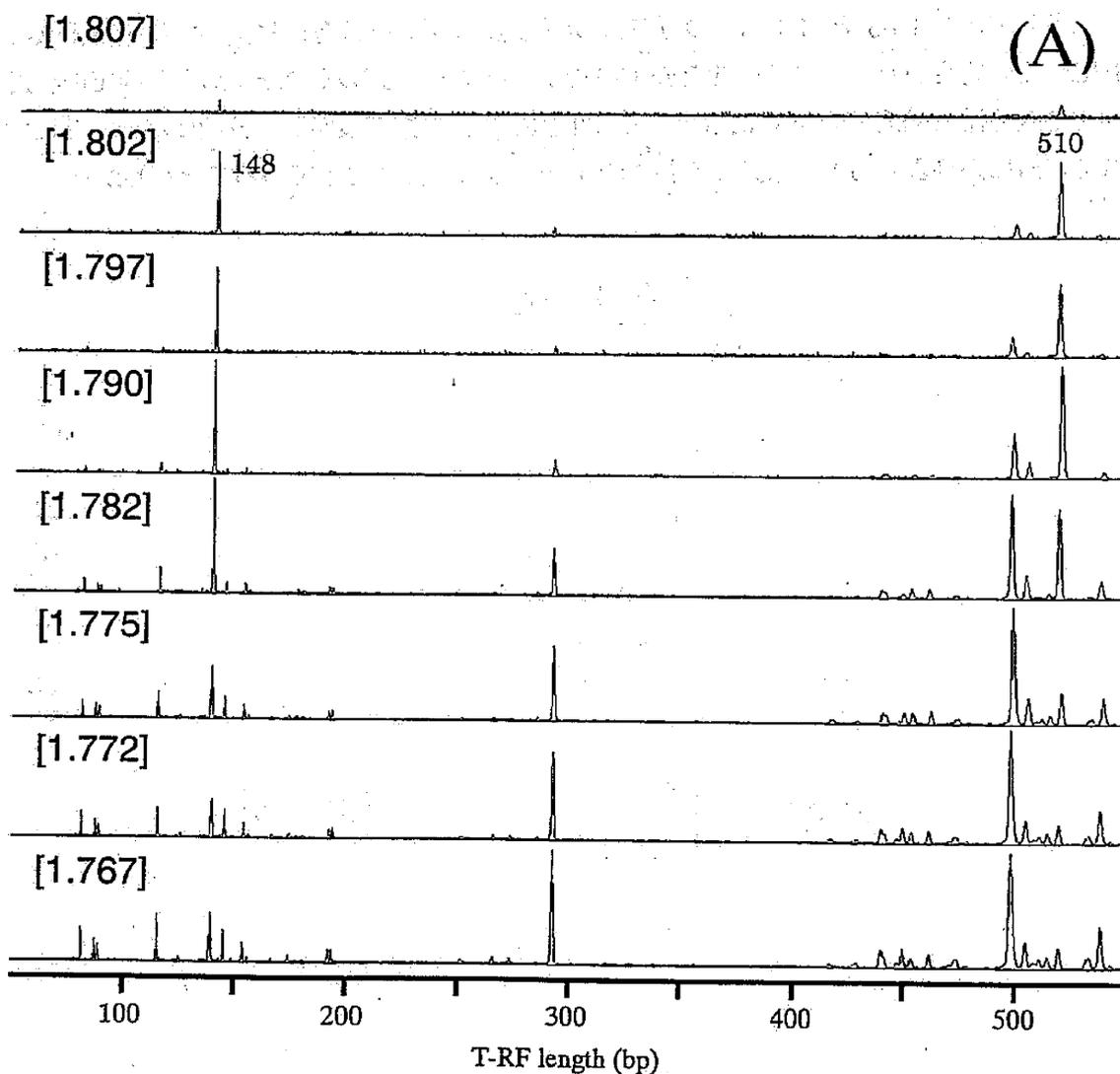


図 4-5A と図 4-5B 汚泥 C の培養 9.7 時間後の ^{13}C 系列(A)と対照系列(B)の T-RFLP プロファイル

[]内の数字は、各分画の浮遊密度を示す。単位は、g ml⁻¹。

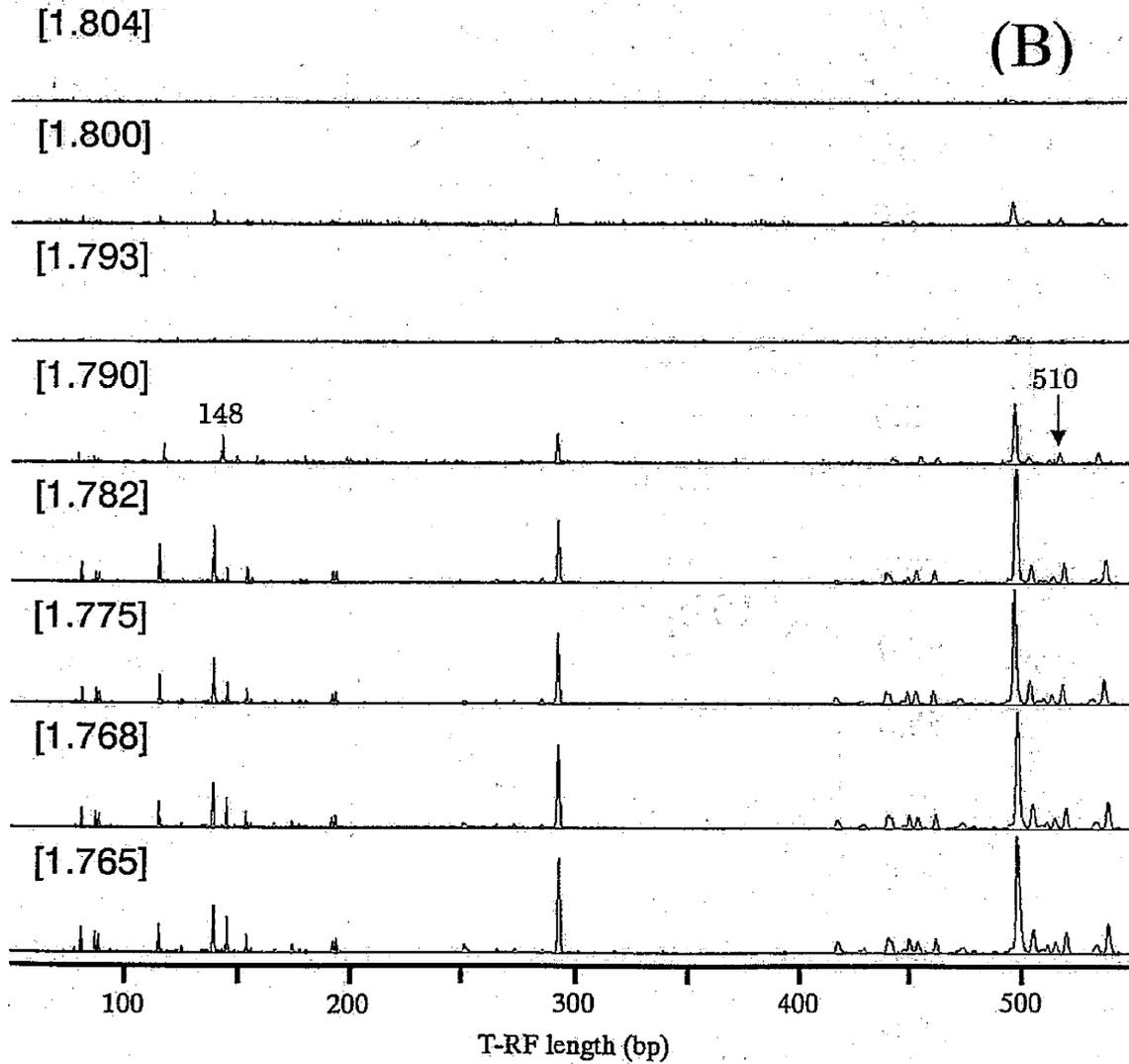


図 4-5A と図 4-5B- (続き)

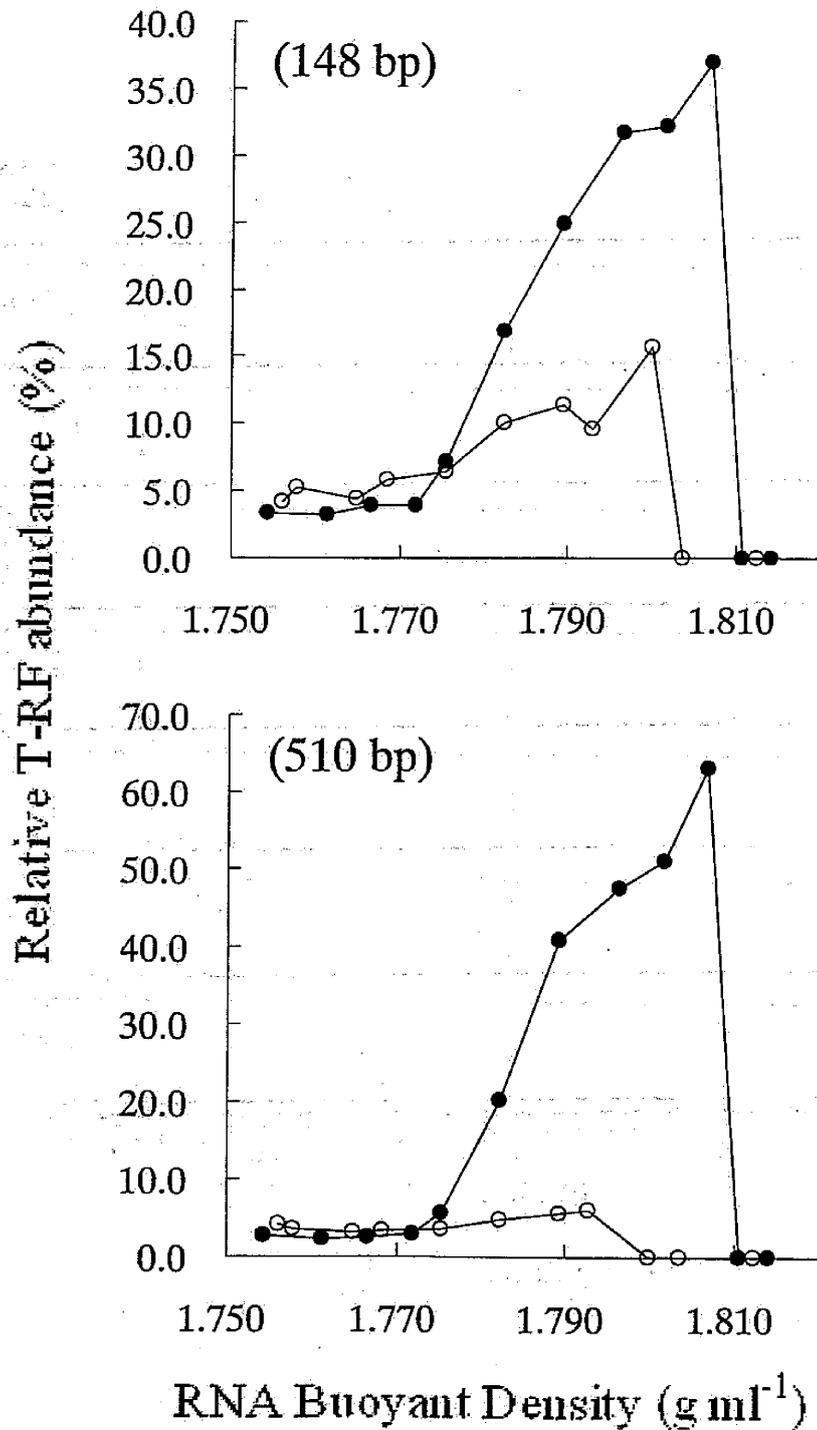


図 4-6 汚泥 C の 148 bp, 510 bp の T-RFs 長を持つ T-RFs の各分画中における相対的 T-RFs 割合の推移 (●, ^{13}C 系列; ○, 対照系列)

4.3.3 クローニング解析とシーケンシング解析

T-RFLP 解析の結果、嫌気的フェノール分解に関与する細菌由来の T-RFs と特定された T-RFs の系統学的位置を決定するために、クローニング解析とシーケンシング解析を行った。

汚泥 B のクローニング解析とシーケンシング解析

T-RFLP 解析の結果、嫌気的フェノール分解に関与する細菌由来の T-RFs と特定された 83 bp, 148 bp, 486 bp, 495 bp, 510 bp の T-RFs の系統学的位置を決定するために、培養 35 時間後のサンプルからクローニング解析を行った。 ^{13}C ライブラリーは浮遊密度が 1.814 g ml^{-1} の分画から 85 クローン (図 4-2A)、一方、対照ライブラリーは浮遊密度が 1.797 g ml^{-1} の分画から 83 クローン (図 4-2B) を獲得し、シーケンシング解析に供した。

まず、357f/519r プライマーセットを用いてこれらのクロンのシーケンシング解析を行った。得られた 16S rRNA の部分塩基配列は約 1000 bp であった。これらの塩基配列を *in silico* で解析して、27f/907f プライマーセットと制限酵素 *MspI* を用いた T-RFLP 解析で生成されると予想される T-RFs 長を決定した。

結果、83 bp, 148 bp, 495 bp, 510 bp の T-RFs 長を持つクローンは獲得できたが、486 bp の T-RFs 長を持つクローンは獲得できなかった。83 bp, 148 bp, 495 bp, 510 bp の T-RFs 長を持つクロンの ^{13}C ライブラリーと対照ライブラリーにおける数は、それぞれ 31 クローンと 17 クローン (83 bp)、26 クローンと 7 クローン (148 bp)、2 クローンと 0 クローン (495 bp)、26 クローンと 4 クローン (510 bp) であった。また、系統樹解析を行なったところ、83 bp, 148 bp, 495 bp, 510 bp の T-RFs 長を持つクローンは、それぞれ 2 つ, 1 つ, 1 つ, 3 つのグループに分類された。

次に、さらに詳しい系統学的位置を決定するために、これらの 83, 148, 495, 510 bp の T-RFs に相当するクロンのうち、 ^{13}C ライブラリーの分類された各グループ内の一部のクローンを選択し、それらの 16S rRNA の全長塩基配列を決定した。それぞれ、9 クローン、10 クローン、2 クローン、8 クローンの全長塩基配列を決定した。こうして得られた 16S rRNA の全長塩基配列に基づいた Blastn プログラムによるクロンの近縁種を表 4-1 に示す。表 4-1 中の closest match と closest relative は、それぞれ Blastn 結果の最上位の塩基配列と最も近縁な分離株を示している。

表 4-1 汚泥 B の ¹³C ライブラリーにおいて嫌氣的フェノール分解に関与する細菌と特定されたクローンの 16S rRNA 全長塩基配列に基づいた近縁種 (Blastn プログラムによる)

| T-RF 長 | クローン数 | Closest match (相同性%) | Closest relative (相同性%) |
|--------|-------|---|---|
| 83 bp | 4 | uncultured bacterium clone OTU_1 (EU083479) (99) | <i>Azoarcus</i> sp. 22Lin (Y13222) (97) |
| | 2 | uncultured bacterium clone PL-33B3 (AY570565) (97) | |
| | 2 | uncultured bacterium clone PL-33B3 (AY570565) (97) | |
| | 1 | uncultured bacterium clone DR-7 (AY945908) (99) | <i>Thauera aromatica</i> strain LG356 (AJ315680) (99) |
| 148 bp | 7 | <i>Pelagibacter variabilis</i> (AB167354) (91-92) | <i>Pelagibacter variabilis</i> (AB167354) (91-92) |
| | 1 | mucus bacterium 83 (AY654820) (92) | |
| | 1 | uncultured bacterium clone HB2-9-21 (DQ334644) (93) | |
| | 1 | uncultured gamma proteobacterium clone Belgica2005/10-140-19 (DQ351786) (91) | |
| 495 bp | 2 | uncultured bacterium clone HB2-9-21 (DQ334644) (98-99) | <i>Pseudomonas putida</i> strain Z24zhy (AM411067) (90-91) |
| 510 bp | 6 | Uncultured bacterium clone nsmpVI18 (AB212892) (98-99) | <i>Microbulbifer</i> <i>thermotolerans</i> strain JAMB-A94 (AB124836) or <i>Microbulbifer</i> <i>thermotolerans</i> strain JAMM 1340 (AB304802) (91) |
| | 1 | | <i>Pelagibacter epialgae</i> (AB266054) (90) |
| | 1 | | <i>Pseudomonas</i> sp. AB42 (EF554871) (94) |

以下に、83 bp、148 bp、495 bp、510 bp の T-RFs 長を持つクローンの系統学的位置に

ついて、順に簡潔に説明する。

83 bp の T-RFs 長を持つクローンは、1 クローンを除いて *Azoarcus* sp. 22Lin (Y13222) に 97% の相同性を示した。一方、その 1 クローンは、*Thauera aromatica* strain LG356 (AJ315680) に 99% の相同性を示した。

148 bp の T-RFs 長を持つクローンは、クローンによって closest match に若干の違いがあったが、どのクローンも *Pelagiobacter variabilis* (AB167354) に 91-92% の相同性を示した。

495 bp の T-RFs 長を持つクローンは、*Pseudomonas putida* strain Z24zhy (AM411067) に 90-91% の相同性を示した。

510 bp の T-RFs 長を持つクローンは、どのクローンも closest match である uncultured bacterium clone nsmpVI18 (AB212892) に 98-99% の相同性を示した。しかし、クローンは 3 つのグループに分類されたために、closest relatives は 3 つに分類された。それぞれ、*Microbulbifer thermotolerans* (AB124836 or AB304802) に 91%、*Pelagiobacter epialgae* (AB266054) に 90%、*Pseudomonas* sp. AB42 (EF554871) に 94% の相同性を示し、16S rRNA の全長塩基配列解析をした全 8 クローンは、それぞれ 6 つ、1 つ、1 つずつに分類された。

以上から、*Betaproteobacteria* 網に分類される *Azoarcus* 属と *Thauera* 属、*Gammaproteobacteria* 網に分類される *Microbulbifer* 属と *Pelagiobacter* 属と *Pseudomonas* 属の 5 属に近縁な細菌が、嫌氣的フェノール分解に関与する細菌と考えられた。

汚泥 C のクローニング解析とシーケンシング解析

T-RFLP 解析の結果、嫌氣的フェノール分解に関与する細菌由来の T-RFs と特定された 148 bp と 510 bp の T-RFs の系統的位置を決定するために、クローニング解析を行った。¹³C ライブラリーは浮遊密度が 1.802 g ml⁻¹ の分画から 102 クローン (図 4-5A)、一方、対照ライブラリーは浮遊密度が 1.790 g ml⁻¹ の分画から 126 クローン (図 4-5B) を獲得し、シーケンシング解析に供した。

357f/519r プライマーセットを用いてこれらのクローンのシーケンシング解析を行なった。得られた 16S rRNA の部分塩基配列は約 900 bp であった。これらの塩基配列を *in silico* で解析して、27f/907f プライマーセットと制限酵素 *MspI* を用いた T-RFLP 解析で生成されると予想される T-RFs 長を決定した。

結果、148 bp と 510 bp の T-RFs 長を持つクローンが複数獲得できた。148 bp と 510 bp の T-RFs 長を持つクローンの ¹³C ライブラリーと対照ライブラリーにおける数は、それぞれ 30 クローンと 4 クローン (148 bp)、39 クローンと 5 クローン (510 bp) であった。また、アラインメントを行なったところ、¹³C ライブラリーの 148 bp と 510 bp の T-RFs 長を持つクローンはそれぞれ同じく 99-100% の相同性に収まり、グループには分類されな

った。

次に、Blastn プログラムにより 148 bp と 510 bp の T-RFs 長を持つクローンの近縁種を決定した。これを表 4-2 に示す。表 4-2 中の closest match と closest relative は、それぞれ Blastn 結果の最上位の塩基配列と最も近縁な分離株を示している。

表 4-2 汚泥 C の ¹³C ライブラリーにおいて嫌氣的フェノール分解に関与する細菌と特定されたクローンの 16S rRNA 塩基配列に基づいた近縁種 (Blastn プログラムによる)

| T-RF 長 | クローン数 | Closest match (相同性(%)) | Closest relative (相同性(%)) |
|--------|-------|--|--|
| 148 bp | 13/30 | <i>Marinobacter taiwanensis</i> strain G1-1701 (EF368020) (91) | <i>Marinobacter taiwanensis</i> strain G1-1701 (EF368020) (91) |
| | 17/30 | uncultured gamma proteobacterium clone Belgica2005/10-120-17 (DQ351748) (94) | |
| 510 bp | 39/39 | Uncultured bacterium clone nsmpVI18 (AB212892) (99) | marine gamma proteobacterium HTCC2149 (AY386331) (90-91) |

以下に、148 bp と 510 bp の T-RFs 長を持つクローンの系統学的位置について、順に簡潔に説明する。

148 bp の T-RFs 長を持つクローンは、クローンによって closest match に若干の違いがあったが、どのクローンも *Marinobacter taiwanensis* strain G1-1701 (EF368020) に 91% の相同性を示した。

510 bp の T-RFs 長を持つクローンは、どのクローンも closest match である uncultured bacterium clone nsmpVI18 (AB212892) に 99% の相同性を示した。一方、closest relative である marine gamma proteobacterium HTCC2149 (AY386331) に 90-91% の相同性を示した。また、*Pelagibacter variabilis* (AB266055) にも 85% の相同性を示した。

以上から、*Gammaproteobacteria* 綱に分類される *Marinobacter* 属と *Pelagibacter* 属の 2 属に近縁な細菌が、嫌氣的フェノール分解に関与する細菌と考えられた。

4.4 考察

本章では、人工安水処理硝化脱窒プラントの活性汚泥を対象として、嫌氣的フェノール分解細菌を RNA-SIP 法によって特定することを試みた。安水のような高濃度のフェノールを含む排水を処理するシステム中において、重要な役割を担っている嫌氣的フェノール分解細菌に関する知見はこれまでに殆どない。また、嫌氣的フェノール分解細菌を、培養法に付随するバイアスを介さない分子生物学的手法により網羅的に解析した報告もこれまでにない。なお、土壌中のフェノール分解細菌を DNA-SIP 法によって調査した報告例は 2 例ある (Padmanabhan *et al.*, 2003; DeRito *et al.*, 2003)。しかし、嫌氣的フェノール分解であるかは不明である。よって、著者の知る限りでは、本研究は、嫌氣的フェノール分解細菌を RNA-SIP 法によって特定した最初の研究である。

ここでは、まず、培養中に観察されたフェノールの減少が脱窒によるものであったかを考察する。次に、RNA-SIP 法によって特定された嫌氣的フェノール分解に関与する細菌について、それらがフェノールを直接同化したのか、それともフェノールの代謝産物を同化したのか (cross-feeder という位置づけ) を、既往の知見の情報を交えながら考察していく。

4.4.1 硝酸塩存在下での嫌氣的フェノール分解

培養中に観察されたフェノールの減少が脱窒反応によるものであったかどうかを推測した。汚泥 B については、培養期間中にフェノール濃度・硝酸塩濃度・亜硝酸塩濃度を測定した。一方、汚泥 C については、フェノール濃度・硝酸塩濃度を測定した。添加したフェノール量と硝酸塩量からこれらの物質収支をとり、考察していく。

汚泥 B における硝酸塩存在下での嫌氣的フェノール分解

培養中、硝酸塩が減少し、また、亜硝酸塩が蓄積していた。硝酸塩が亜硝酸塩を経て窒素ガスに変換されたと仮定し、硝酸塩が受容した電子量を計算した。硝酸塩が亜硝酸塩または窒素ガスに還元される時、硝酸塩 1 mol あたりそれぞれ 2 mol または 5 mol の電子を受容する。また、フェノールが完全酸化される時、フェノール 1 mol あたり電子を 28 mol 供与する。35 時間後までに、フェノールは 0.710 (mol/gMLSS)消費され、硝酸塩は 3.76 (mol/gMLSS)消費され、亜硝酸塩は 1.395 (mol/gMLSS)蓄積された。これらの関係を利用して、硝酸塩が受容した電子量から、完全酸化されたフェノールの量 x mol を計算した。一方、フェノールの実際の減少量 y mol を、添加量と残存量から計算した。 y/x の値は、1.36 倍であった。この値は、フェノールの一部が同化されたためだと考えると説明がつく (Tschuch & Fuchs, 1987)。すなわち、フェノールの減少は脱窒と、その際に生成されたエネルギーを利用した同化であったと考えられる。

汚泥 C における硝酸塩存在下での嫌氣的フェノール分解

汚泥 B と同様に、培養中フェノールが減少し硝酸塩が減少していた。汚泥 C については

亜硝酸塩の濃度を測定しなかったため、利用された硝酸塩は窒素ガスに変換されたと仮定し、硝酸塩が受容した電子量を計算した。硝酸塩が窒素ガスに還元される時、硝酸塩 1 mol あたり 5 mol の電子を受容する。また、フェノールが完全酸化される時、フェノール 1 mol あたり電子を 28 mol 供与する。9.7 時間後までに、フェノールは 0.219 (mol/gMLSS)消費され、硝酸塩は 0.692 (mol/gMLSS)消費された。これらの関係を利用して、硝酸塩が受容した電子量から、完全酸化されたフェノールの量 x mol を計算した。一方、フェノールの実際の減少量 y mol を、添加量と残存量から計算した。 y/x の値は、1.77 倍であった。

この結果は、第4章に述べた汚泥 B の場合 (1.36 倍) と比べるとやや大きな数字である。第4章で述べたように、 y/x の値は通常 1 よりもやや大きくなる。その最も大きな理由と考えられるのは、フェノールの一部が完全酸化されるのではなく微生物によって同化されるためである。しかし、今回得られた 1.77 倍という数字は、同化のためであると説明するにはやや大きすぎるように思われる。

今回 y/x の値がやや大きくなった原因として、次のようなものが考えられるであろう。(1) フェノールが完全酸化されず部分酸化物までしか酸化されていなかったという可能性、および、(2) 外部から酸素が混入していた可能性、また、(3) 嫌気性発酵によりフェノールが分解された可能性。

(1) については、試料中のフェノール以外の有機成分を分析していなかったため、可能性を否定することはできない。

(2) が原因であるとする、蓋 (アルミシール) のしめ具合の違いや、あるいは基質の追加の際に外部から酸素が混入したとすると、バイアル間でフェノールや硝酸塩の減少量にばらつきが生じるであろう。しかし、そうしたばらつきは非常に小さかったため、この可能性は非常に小さいと考えられる。

(3) については、培養 9.7 時間以降は、添加したフェノールを完全に酸化するのに十分な硝酸塩が添加されていない状態で培養を行い、硝酸塩が枯渇するとフェノールが減少しなくなったことから (培養 14.8, 24.7 時間後までの y/x の値は 1.83 と 1.81 であり、培養 9.7 時間後 (1.77) と大差がない)、その可能性が低いと考えられた。

なお、今回の検討では亜硝酸を分析しなかった。亜硝酸が蓄積されていたとすると、 y/x の値はより大きくなるはずである。いずれにしても、フェノールの分解が脱窒だけによるものであったとは言い切れない。しかし、フェノールの分解が主として脱窒により起きたことは間違いないであろう。

4.4.2 嫌氣的フェノール分解細菌の特定

フェノールの減少が脱窒反応によるものであった可能性が高かったことがわかった。このことから、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールは脱窒反応に伴い同化されたといえる。そこで、ここでは、 ^{13}C を同化したと特定された細菌がフェノールを直接同化したのか、それともフェノールの代謝産物を同化したのかを考察していく。そのための基準として次の 4 つを基準とした。

- ① T-RFs が検出された順番
早い順番で検出されれば、直接同化した可能性が高いと考えられる
- ② T-RFs が初めて検出された汚泥サンプルの培養時間の長さ
短い培養時間で検出された場合、直接同化した可能性が高いと考えられる
- ③ ^{13}C ライブラリーで検出されたクローンの数
クローン数が多い場合、 ^{13}C を多く同化した（直接同化した）可能性が高いと考えられる
- ④ 嫌氣的フェノール分解細菌に関する既往の知見
T-RFs の系統学的位置に嫌氣的フェノール分解能が報告されている場合、直接同化した可能性が高いと考えられる

なお、これら4つの基準に基づいて、汚泥Bと汚泥Cで ^{13}C を同化したと特定されたT-RFsの検出までの培養時間、系統学的位置、文献情報による嫌氣的フェノール分解能の有無の確認、クローン数をまとめたものを表4-3に示した。

汚泥Bにおける嫌氣的フェノール分解細菌の特定

まず結果を整理すると、T-RFLP解析とクローニング解析の結果から、83 bpと148 bpと495 bpと510 bpのT-RFsに相当する塩基配列は、それぞれ *Azoarcus* 属または *Thauera* 属、*Pelagibacter* 属、*Pseudomonas* 属、*Microbulbifer* 属または *Pelagibacter* 属または *Pseudomonas* 属に近縁な塩基配列であることがわかった。培養6.5時間後では、83 bpのT-RFが ^{13}C 系列の浮遊密度の高い分画において優占したT-RFとして初めて検出された(図4-1A)。しかし、148 bpと510 bpのT-RFは、僅かながら検出されただけであった(図4-1A)。一方、培養35時間後では、83 bpのT-RFは依然として優占したT-RFとして検出されており(図4-2A)、それに加えて、148 bpと510 bpのT-RFも ^{13}C 系列の浮遊密度の高い分画において優占したT-RFsとして検出されるようになった(図4-2A)。また、495 bpのT-RFsが僅かであるが初めて検出された(図4-2A)。

a) 83 bp の T-RF について

83 bpのT-RFに相当する *Azoarcus* 属または *Thauera* 属は、培養6.5時間後の活性汚泥から ^{13}C 系列の浮遊密度の高い分画において優占したT-RFとして初めて検出され、さらに83 bp, 148 bp, 495 bp, 486 bp, 510 bpのT-RFsの中で一番初めに検出されたため、直接的に ^{13}C フェノール由来の ^{13}C を同化していると考えられた。よって、*Azoarcus* 属に近縁な細菌を嫌氣的フェノール分解細菌であると特定した。なお、83 bpのT-RF長を持つクローンは1クローンを除いて、残りのクローンは *Azoarcus* sp. strain 22Lin に近縁であった。*Azoarcus* sp. strain 22Lin は、cyclohexane-1,2-diol を炭素源及び電子供与体として、硝酸塩を電子受容体として生育することが知られている (Harder, 1997)。また、*Azoarcus* sp. FL05にも近縁であった(約97%の相同性)。*Azoarcus* sp. strain FL05は、フェノールを唯一の有機物源として、硝酸塩を電子受容体として生育することが知られている (van Schie

& Young, 1998)。

一方、残りの1クローンは *Thauera aromatica* strain LG356 に近縁であった。*Thauera aromatica* LG356 は脱窒条件下ではフェノールを分解しないとの報告があり (Mechichi *et al.*, 2002)、また、Manefield らは、RNA-SIP 法を用いて *Thauera aromatica* を安水処理活性汚泥の好氣的フェノール分解細菌と特定した (Manefield *et al.*, 2002)。しかし、同じ *Thauera aromatica* である *Thauera aromatica* strain K172 は、嫌氣的フェノール分解細菌 (脱窒条件下でフェノールを分解する細菌) として、古くから非常に良く研究がされてきている (Lack *et al.*, 1991; Lack & Fuchs, 1992, 1994; Schmeling *et al.*, 2004; Schühle & Fuchs, 2004)。このように、*Thauera aromatica* は株によって性質が異なる。これらの文献情報と検出されたクローン数が1クローンと少ないことから、このクローンに対応する *Thauera* 属に近縁な細菌がフェノールを直接同化したと判断するのは状況証拠が不十分であると考えた。そこで、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールを直接同化した可能性と、他の微生物によって $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールが代謝された後の代謝産物を摂取・同化した可能性の両者を考え、嫌氣的フェノール分解細菌または嫌氣的フェノール分解に関与する細菌と特定した。

b) 148 bp, 495 bp, 510 bp の T-RFs について

148 bp, 495 bp, 510 bp の T-RFs のうち、148 bp, 510 bp の T-RFs は培養 6.5 時間後では僅かながら検出され、培養 35 時間後になって初めて強く検出された。一方、495 bp の T-RFs は培養 35 時間後になって僅かながらだが初めて検出された。

148 bp, 495 bp, 510 bp の T-RF 長を持つクローンは、それぞれ *Pelagibacter variabilis* (148 bp : 相同性は 91-92%)、*Pseudomonas putida* strain Z24zhy (495 bp : 相同性は 90-91%)、*Microbulbifer thermotolerans* (510 bp : 相同性は 91%) または *Pelagibacter epialgae* (510 bp : 相同性は 90%) または *Pseudomonas* sp. AB42 (510 bp : 相同性は 94%) に近縁であり、510 bp のみ 3 つのグループに分類された。しかし、どのクローンも closest relatives との相同性が低く、これらの closest relatives や相同性の高い環境クローンの塩基配列の中に、嫌氣的フェノール分解や嫌氣的芳香族化合物分解に関連する報告があるものはなかった。これらのことから、148 bp, 495 bp, 510 bp の T-RFs に対応する細菌が、フェノールを直接同化したと判断するのは状況証拠が不十分であると考えた。そこで、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールを直接同化した可能性と、他の微生物によって $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールが代謝された後の代謝産物を摂取・同化した可能性の両者を考え、嫌氣的フェノール分解細菌または嫌氣的フェノール分解に関与する細菌と特定した。なお、いずれの細菌も系統的に新規性が高かった。

以上から、*Azoarcus* 属に近縁な細菌は、人工安水処理硝化脱窒プロセスにおいてフェノールを嫌氣的に直接同化していると強く示唆され、*Azoarcus* 属に近縁な細菌を嫌氣的フェノール分解細菌と特定した。一方、*Microbulbifer* 属、*Pelagibacter* 属、*Pseudomonas* 属、*Thauera* 属に近縁な細菌は、人工安水処理硝化脱窒プロセスにおいてフェノールを直接同

化している可能性と、他の微生物によって生成されたフェノールの代謝産物を同化している可能性が示唆された。よって、*Microbulbifer* 属、*Pelagibacter* 属、*Pseudomonas* 属、*Thauera* 属に近縁な細菌を、嫌氣的フェノール分解細菌または嫌氣的フェノール分解に関与する細菌と特定した。なお、*Microbulbifer* 属、*Pelagibacter* 属、*Pseudomonas* 属に近縁な細菌は、嫌氣的フェノール分解細菌としての報告がこれまでになく、系統学的に新規性が高かった。

汚泥 C における嫌氣的フェノール分解細菌の特定

まず結果を整理すると、TRFLP 解析の結果とクローニング解析の結果から、148 bp と 510 bp の T-RFs に相当する塩基配列は、それぞれ *Marinobacter* 属と *Pelagibacter* 属に近縁な塩基配列であることがわかった。これらの細菌が嫌氣的フェノール分解に関与していることは間違なく、両者共に 9.7 時間という短い培養時間で非常に強く標識されていたことから考えて、両者共にフェノールを直接同化している可能性が高いと考えた。但し、148 bp と 510 bp の T-RFs に対応する細菌のどちらか一方がフェノールを直接同化し、その代謝産物を残り一方が同化したという可能性も考えられた。しかし、この可能性は低いと考えた。以上から、*Gammaproteobacteria* 綱に分類される *Marinobacter* 属と *Pelagibacter* 属の 2 属 (約 900 bp の 16S rRNA 塩基配列から推定された近縁種) に近縁な細菌を嫌氣的フェノール分解細菌と特定した。

なお、既往の知見で述べたように、*Gammaproteobacteria* 綱に分類される嫌氣的フェノール分解細菌は報告されていない。また、既に報告のある *Betaproteobacteria* 綱に分類される *Thauera aromatica* strain K172 (Breinig *et al.*, 2000; Schmeling *et al.*, 2004; Schühle & Fuchs, 2004; Boll & Fuchs, 2005) と *Clostridia* 綱に分類される *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* strain JW/Z-1^T (Zhang & Wiegel, 1990; Zhang & Wiegel, 1994; He & Wiegel, 1995; Breitenstein *et al.*, 2005) とでは、その代謝経路が若干異なる。このように系統学的位置が異なるとその代謝様式も異なることや、嫌氣的フェノール分解細菌と特定された *Marinobacter* 属と *Pelagibacter* 属に近縁な細菌は系統学的に新規性が高いことから、これらの細菌が新しい代謝経路を持っている可能性も考えられた。

第4章 嫌気的フェノール分解細菌のRNA-SIP法による特定

表 4-3 汚泥 B と汚泥 C の ^{13}C を同化したと特定された TRFs の系統学的位置、検出までの培養時間、 ^{13}C による標識度合い、文献情報による嫌気的フェノール分解能の有無、クローン数

| 汚泥の種類 | TRF 長 | 系統学的位置 | 初めて検出された培養時間 (hr) | 標識度合い* | 嫌気的フェノール分解能の知見 | クローン数 (^{13}C ライブラリー) |
|----------------------|--------|----------------------|-------------------|--------|----------------|---------------------------------|
| 汚泥 B | 83 bp | <i>Azoarcus</i> | 6.5 | 強 | あり | 30/85 |
| | | <i>Thauera</i> | 6.5 | 弱 | あり | 1/85 |
| | 148 bp | <i>Pelaglobacter</i> | 6.5 | 弱 | なし | 26/85 |
| | 486 bp | クローン獲得できず | 35 | — | — | — |
| | 495 bp | <i>Pseudomonas</i> | 35 | 弱 | なし | 2/85 |
| | 510 bp | <i>Microbulifer</i> | | | | なし |
| <i>Pelaglobacter</i> | | | 6.5 | 弱 | なし | 1/85 |
| <i>Pseudomonas</i> | | | | | なし | 1/85 |
| 汚泥 C | 148 bp | <i>Marinobacter</i> | 9.7 | 強 | なし | 30/102 |
| | 510 bp | <i>Pelaglobacter</i> | 9.7 | 強 | なし | 39/102 |

* , ^{13}C 系列と対照系列の TRFLP 解析結果を比較し、対照系列と比べて ^{13}C 系列での TRFs の相対的強度が顕著に高い場合、標識度合いを強とした。また同じく比較し、TRFs の相対的強度が低い場合は、標識度合いを弱とした。

4.4.3 汚泥 B と汚泥 C に生息する嫌氣的フェノール分解細菌の比較

「4.4.2 嫌氣的フェノール分解細菌の特定」での考察を基に、汚泥 B と汚泥 C から嫌氣的フェノール分解細菌または嫌氣的フェノール分解に関与する細菌として特定された細菌の T-RF 長と系統学的位置を表 4-4 にまとめた。これを見ると、汚泥 B と汚泥 C には類似点と相違点があることがわかる。以下、それぞれについてまとめた。

表 4-4 汚泥 B と汚泥 C の嫌氣的フェノール分解細菌または嫌氣的フェノール分解に関与する細菌の T-RFs 長と系統学的位置

| T-RF 長 | 嫌氣的フェノール分解細菌の系統学的位置 | | 活性汚泥の種類 | |
|--------|-----------------------------|-----------------------------------|---------|------|
| | 綱 | 属 ^a | 汚泥 B | 汚泥 C |
| 83 bp | <i>Betaproteobacteria</i> | <i>Azoarcus</i> | ○ | — |
| | | <i>Thauera</i> | △ | — |
| 148 bp | <i>Gamma</i> proteobacteria | <i>Pelagibacter</i> ^b | △ | ○ |
| 495 bp | | <i>Pseudomonas</i> | △ | — |
| 510 bp | | <i>Microbulbifer</i> ^b | △ | ○ |
| | | <i>Pelagibacter</i> | △ | — |
| | | <i>Pseudomonas</i> | △ | — |

○, 嫌氣的フェノール分解細菌と特定された

△, 嫌氣的フェノール分解細菌または嫌氣的フェノール分解に関与する細菌 (cross-feeder) と特定された

—, 検出されなかった

a, 属名は、汚泥 B から得られた 16S rRNA 全長塩基配列に基づいて記述した。

b, 汚泥 B では 16S rRNA 全長塩基配列を解読し、汚泥 C では約 900 bp の 16S rRNA 塩基配列を解読したため、汚泥 B で同定された *Pelagibacter* 属と *Microbulbifer* 属に分類される細菌は、汚泥 C ではそれぞれ *Marinobacter* 属と *Pelagibacter* 属に対応する。

a) 汚泥 B と汚泥 C の類似点

汚泥 B と汚泥 C で嫌氣的フェノール分解細菌または嫌氣的フェノール分解に関与する細菌と特定された細菌の塩基配列を比較した (同じ領域である 27f/907r 間の塩基配列を比較した)。すると、汚泥 B で検出された *Pelagibacter* 属に近縁な細菌 (148 bp の T-RF) と汚泥 C で検出された *Marinobacter* 属に近縁な細菌 (148 bp の T-RF) が高い相同性を示した (相同性 98-99%) (表 4-4)。同じく汚泥 B で検出された *Microbulbifer* 属に近縁な細菌 (510 bp の T-RF の一部) と汚泥 C で検出された *Pelagibacter* 属に近縁な細菌 (510 bp の T-RF) も高い相同性を示した (相同性 99%) (表 4-4)。但し、汚泥 B の 510 bp の T-RF に対応する塩基配列は 3 つのグループに分類されており、その中で最もクローンの多かった 1 つのグループの塩基配列 (16S rRNA の全長塩基配列で *Microbulbifer thermotolerans*

と91%の相同性を示したグループの塩基配列)との相同性が高かった(表4-4)。

なお、*Pelagiobacter*属(または*Marinobacter*属)に近縁な細菌(148 bpのT-RF)と*Microbulbifer*属(または*Pelagiobacter*属)に近縁な細菌(510 bpのT-RF)は、汚泥Bでは嫌氣的フェノール分解細菌または嫌氣的フェノール分解に関与する細菌(cross-feeder)と特定されたが、汚泥Cでは嫌氣的フェノール分解細菌と特定された。

b) 汚泥Bと汚泥Cの相違点

汚泥Bでは、汚泥Cでは検出されなかった塩基配列が検出された。

汚泥Bでは、83 bpのT-RFに対応する*Azoarcus*属が培養6.5時間後の活性汚泥から¹³C系列の浮遊密度の高い分画において優占したT-RFとして初めて検出され、直接的に[¹³C₆]フェノール由来の¹³Cを同化している嫌氣的フェノール分解細菌であると結論付けられた。*Azoarcus*属は嫌氣的フェノール分解細菌として良く研究がなされている(Rabus & Widdel, 1995; Schie & Young, 1998; Rabus *et al.*, 2005)。一方、この*Azoarcus*属に近縁な細菌は、汚泥Cのクローニング解析とシーケンシング解析では、¹³Cライブラリーと対照ライブラリーの両方から1クローンも検出されなかった。汚泥Bで最も優占していたこれらの細菌が、プロセスの運転条件を何度か変更する中で、約7ヵ月後の汚泥Cでは全く検出されなくなった(rRNAを対象としたクローニング解析によっては全く検出されない程度の存在量になった)ということになる。

また、嫌氣的フェノール分解細菌または嫌氣的フェノール分解に関与する細菌と特定された細菌に関しては、83 bpのT-RFに対応する*Thauera*属、495 bpのT-RFに対応する*Pseudomonas*属、510 bpのT-RFに対応する*Pelagiobacter*属と*Pseudomonas*属は、汚泥Bでは検出されたが汚泥Cでは検出されなかった。但し、汚泥Bでは汚泥Cよりも長い時間培養した汚泥をクローニング解析とシーケンシング解析に供しているため、cross-feeding効果によって汚泥Bでは汚泥Cよりも多くの細菌が検出される可能性が高くなることに留意する必要がある。

以上をまとめると、汚泥Cでは、汚泥Bで嫌氣的フェノール分解を担っていた*Azoarcus*属に近縁な細菌(83 bpのT-RF)に変わって、*Marinobacter*属と*Pelagiobacter*属の2属に近縁な細菌(それぞれ148 bpのT-RFと510 bpのT-RFsの一部)が嫌氣的フェノール分解を担う形になっていた。その一方で、*Marinobacter*属(汚泥Bでの16S rRNA全長解析では*Microbulbifer*属)と*Pelagiobacter*属(汚泥Bでの16S rRNA全長解析では同じく*Pelagiobacter*属)の2属に近縁な細菌と*Pseudomonas*属に近縁な細菌は汚泥Bにも検出された。

このような違いをもたらした要因を特定するのは容易ではないが、汚泥Bと汚泥Cの人工安水処理硝化脱窒プロセスの運転温度が考えられた。汚泥Bでは約23℃、汚泥Cでは約33℃でプロセスの運転を行っていた。この運転温度の違いが嫌氣的フェノール分解細菌の生息に影響したひとつの要因であったのかもしれない。

4.5 結論

本章では、人工安水処理硝化脱窒処理プロセスの活性汚泥を対象として、嫌氣的フェノール分解細菌を RNA-SIP 法によって特定することを試みた。

汚泥 B では、*Azoarcus* 属に近縁な細菌が嫌氣的フェノール分解細菌として特定された。一方、*Microbulbifer* 属、*Pelagiobacter* 属、*Pseudomonas* 属、*Thauera* 属に近縁な細菌が嫌氣的フェノール分解細菌または嫌氣的フェノール分解に関与する細菌として特定された。また、*Microbulbifer* 属、*Pelagiobacter* 属、*Pseudomonas* 属に近縁な細菌は、嫌氣的フェノール分解細菌としての報告がこれまでになく、系統学的な新規性も高かった。なお、本プロセス内の嫌氣的フェノール分解細菌を [$^{13}\text{C}_6$] フェノールで標識するためには、6.5 時間という短時間でも可能であることがわかった。

汚泥 C では、*Marinobacter* 属と *Pelagiobacter* 属 (約 900 bp の 16S rRNA 塩基配列から推定された近縁種) に近縁な細菌が嫌氣的フェノール分解細菌として特定された。また、これらの細菌と近縁種との相同性は 90-91% と非常に低く、新しい系統学的位置に属すると考えられた。さらに、近縁種には嫌氣的フェノール分解能を持つ細菌の報告はなく、これらの細菌は新規な嫌氣的フェノール分解細菌と考えられた。

また、汚泥 B と汚泥 C で特定された嫌氣的フェノール分解細菌または嫌氣的フェノール分解に関与する細菌 (cross-feeder) を比較した (表 4-4)。結果、汚泥 B では *Azoarcus* 属に近縁な細菌が嫌氣的フェノール分解細菌と特定され、汚泥 C では *Marinobacter* 属と *Pelagiobacter* 属の 2 属に近縁な細菌が嫌氣的フェノール分解細菌と特定された。つまり、汚泥 B と汚泥 C では、異なる系統学的位置の細菌が嫌氣的フェノール分解を担っていたことがわかった。一方、汚泥 C の *Marinobacter* 属 (汚泥 B の *Microbulbifer* 属に相当) と *Pelagiobacter* 属 (汚泥 C の *Pelagiobacter* 属に相当) の 2 属に近縁な細菌は、汚泥 B では嫌氣的フェノール分解細菌または嫌氣的フェノール分解に関与する細菌 (cross-feeder) と特定され、この他にも *Pseudomonas* 属に近縁な細菌が特定された。このように、両汚泥に共通して一部で同じ系統学的位置の細菌が特定されたが、嫌氣的フェノール分解細菌として特定された細菌は、汚泥 B と汚泥 C では異なっていた。