

第5章 好氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定

5.1 はじめに

本章では、好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活性汚泥を好氣培養した。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、T-RFLP 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好氣的フェノール分解細菌を特定した。なお、汚泥 A と汚泥 C を実験サンプルとして用いた。

また、最後に第 4 章と第 5 章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と、好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解に関与する細菌を比較した。

5.2 実験方法

5.2.1 活性汚泥の好氣培養

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 A と汚泥 C を使用した（汚泥 A 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 A の好氣培養

汚泥 A (MLSS 1626mg/L) にフェノールを有機物源として与え好氣培養した。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の濃度は約 0 mg liter^{-1} （検出限界以下）であった。

50 ml の滅菌済み三角フラスコに 20 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)を 3.0 mg 添加した（最終濃度は約 $270 \text{ mg liter}^{-1}$ ）。滅菌済みシリコ栓で蓋をして、 24°C で暗所で振盪培養を

行った。 ^{13}C 系列と対照系列に対してバイアル瓶を複数用意した (^{13}C 系列 9 本、対照系列 9 本)。

培養 0、6、13 時間後に、 ^{13}C 系列と対照系列のそれぞれ 3 本ずつの三角フラスコを開封した。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- μm 孔径の cellulose acetate filter (ADVANTEC) でろ過して水質分析した。

汚泥 C の好気培養

汚泥 C (MLSS 9706mg/L) にフェノールを有機物源として与え好気培養した。 ^{13}C 系列と対照系列を用意した。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 の滅菌済み三角フラスコに 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) を 1.0 mg 添加した (4 回のパルス添加の最終濃度は約 70-90 mg liter⁻¹)。滅菌済みシリコ栓で蓋をして、33°C で暗所で振盪培養を行った。 ^{13}C 系列と対照系列に対してバイアル瓶を複数用意した (^{13}C 系列 12 本、対照系列 20 本)。培養開始後、残存しているフェノールの濃度を適宜分析し、必要に応じてフェノールを追加した。培養 2.1, 3.7, 5.7 時間後に $^{13}\text{C}_6$ フェノールまたは $^{12}\text{C}_6$ フェノールを 1.0 mg 添加した。基質添加はフェノールが枯渇する前に行った。

培養 2.1, 3.7, 5.7, 7.8 時間後に、 ^{13}C 系列と対照系列のそれぞれ 3 本ずつの三角フラスコを開封した。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- μm 孔径の cellulose acetate filter (ADVANTEC) でろ過して水質分析した。

$^{12}\text{C}_6$ フェノールを与えた残りの 8 本の三角フラスコについては、2.1 時間後に三角フラスコ 1 本を開封し、遠心分離およびろ過により上澄液を回収した後、フェノール濃度を分析した。

5.2.2 水質分析

活性汚泥の上澄液中のフェノール濃度を測定した。測定方法は第 3 章の「3.4 水質分析法」に従った。

5.2.3 RNA-SIP 法

汚泥 A の RNA-SIP 法

^{13}C 系列と対照系列の培養 6 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。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)。

汚泥 C の RNA-SIP 法

^{13}C 系列と対照系列の培養 2.1 時間後と培養 5.7 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。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、T-RFLP 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。T-RFLP 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。

5.3 結果

5.3.1 活性汚泥の好気培養

汚泥 A の好気培養

^{13}C 系列と対照系列のフェノール濃度と pH の挙動を図 5-1A と図 5-1B に示す。両系列共に、培養 6 時間後にはフェノールがすべて分解され、pH は培養開始時とそれほど変化がなかった。なお、培養 6 時間後の汚泥 A の上澄液は明るい黄色を呈していた。

汚泥 C の好気培養

^{13}C 系列と対照系列のフェノール濃度の挙動をモニタリングした。両系列共に、初期添加及び培養期間中にパルス添加したフェノール 1.0 mg が、次の活性汚泥サンプリング時間までの約 1.6-2 時間の間に消費された。また、汚泥 A とは異なり、培養 2.1, 3.7, 5.7, 7.8 時間後の汚泥 C の上澄液は明るい黄色を呈していなかった。

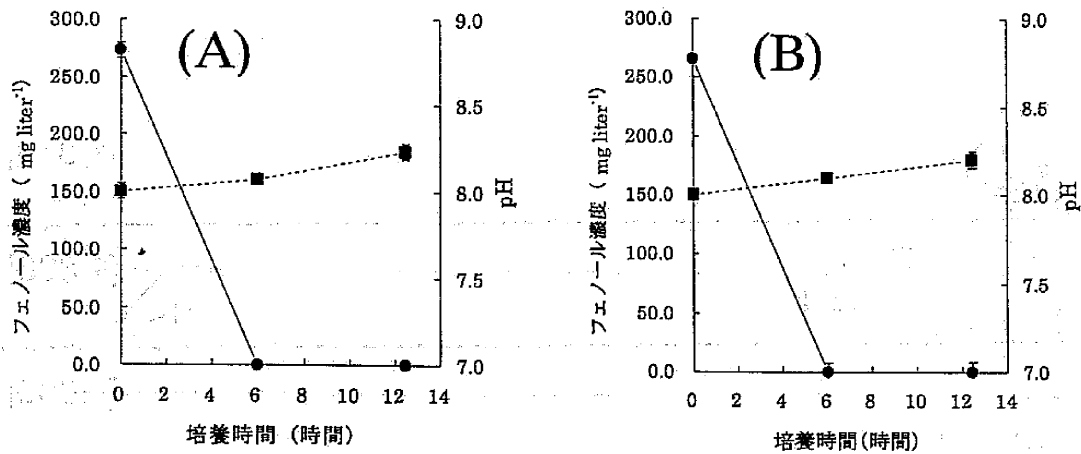


図 5-1A と図 5-1B 汚泥 A の ^{13}C 系列(A)と対照系列(B)の水質変化

フェノール濃度 (●), pH (■)

図中のプロットは triplicate で行なった平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

5.3.2 T-RFLP 解析

第 4 章で述べたように、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノール由来の ^{13}C を同化した細菌の ^{13}C 系列の 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。

汚泥 A の T-RFLP 解析

^{13}C 系列と対照系列の培養 6 時間後の活性汚泥を用いて作成した T-RFLP プロファイルを図 5-2A と図 5-2B 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。その内の浮遊密度の高い 6 分画と低い 2 分画の合計 8 分画を示した。

こうして、83 bp, 122 bp, 141 bp, 495 bp, 497 bp の T-RFs を好氣的フェノール分解に関与する細菌由来の T-RFs と特定した。また、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 5-3 に示す。浮遊密度が高い分画に移行するにつれて、どの T-RFs においても対照系列よりも ^{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。

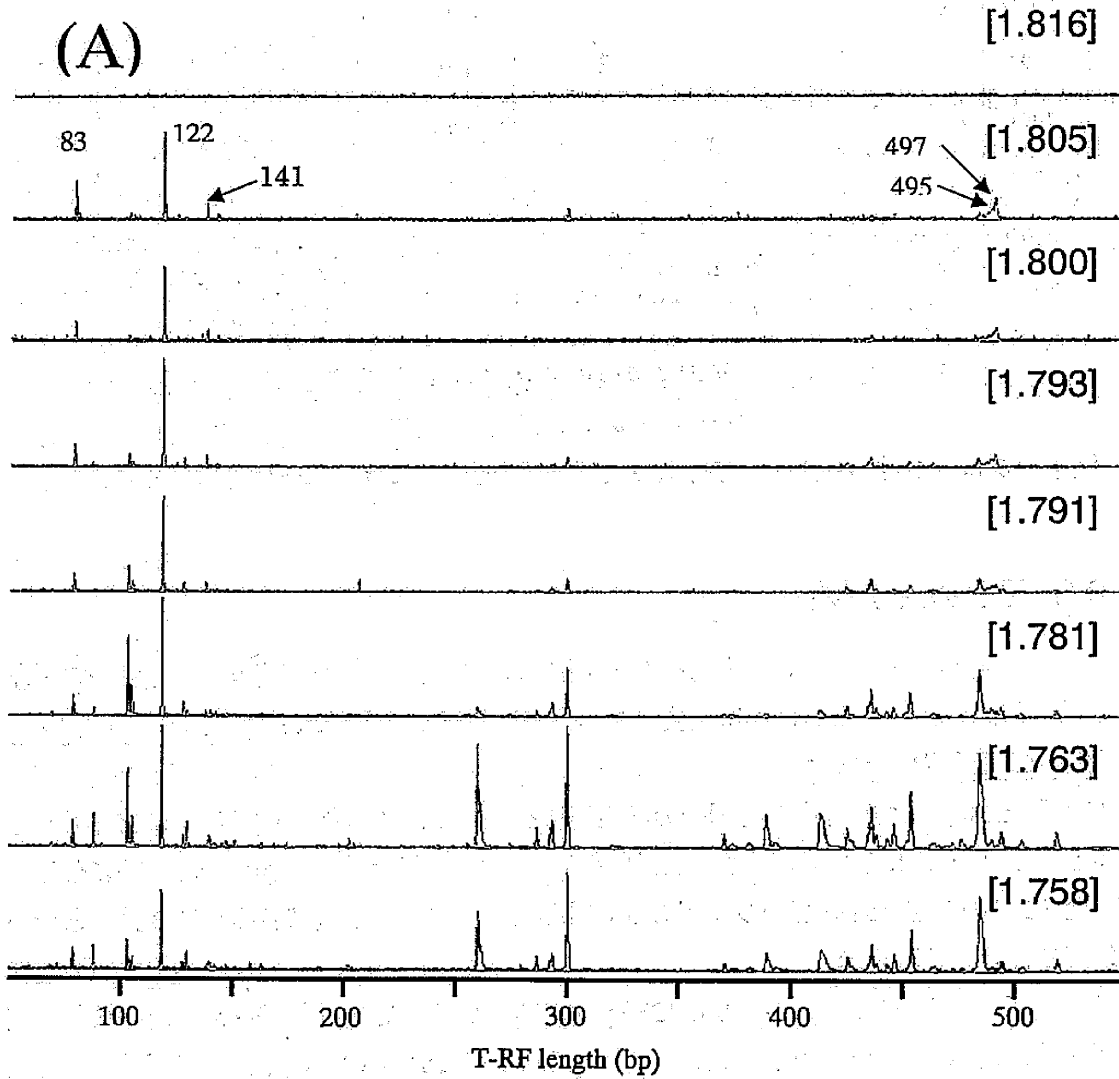


図 5-2A と図 5-2B 汚泥 A の ^{13}C 系列(A)と対照系列(B)の T-RFLP プロファイル

[]内の数字は、各分画の浮遊密度を示す。単位は、 g ml^{-1} 。

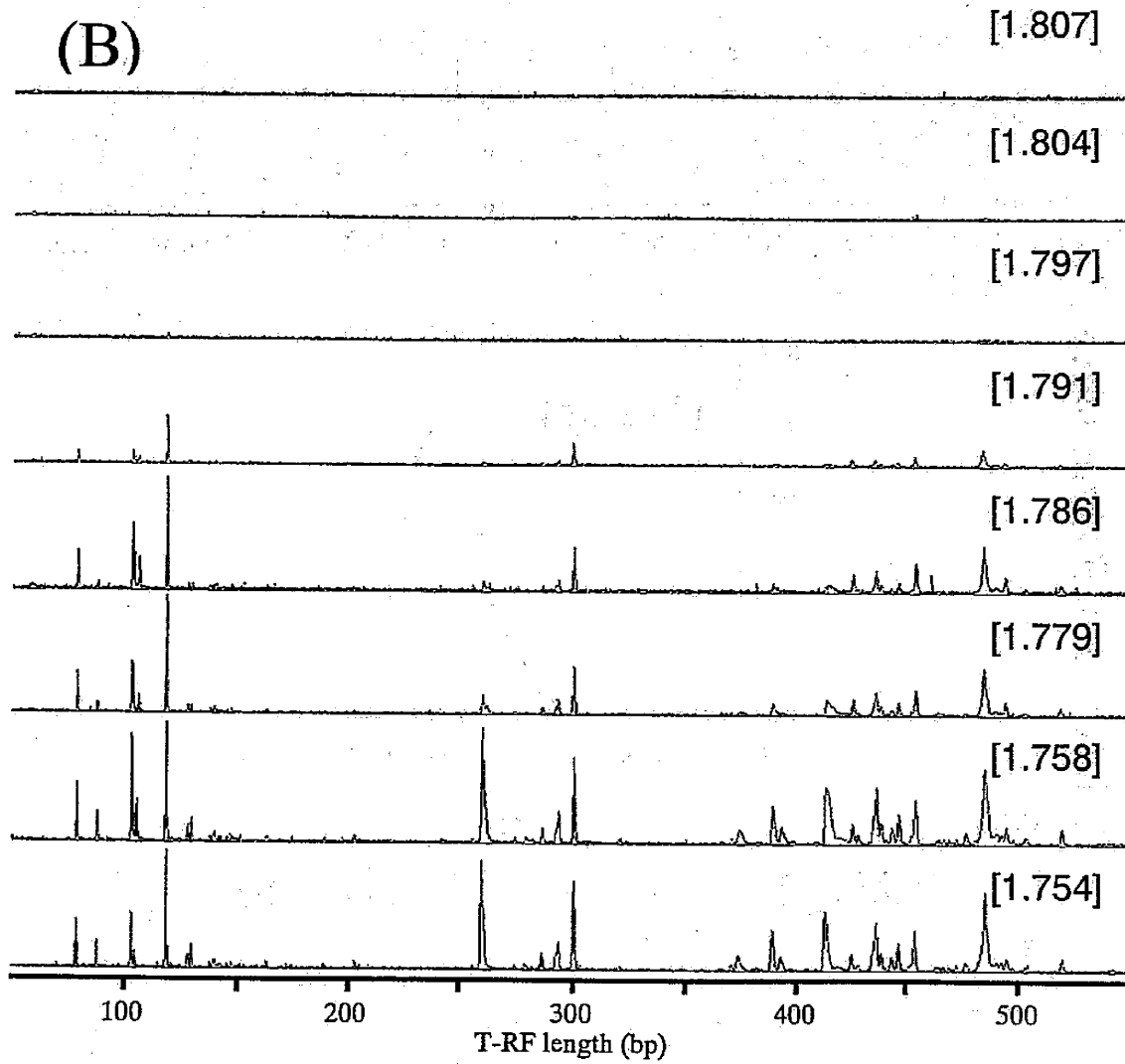


図 5-2A と図 5-2B- (続き)

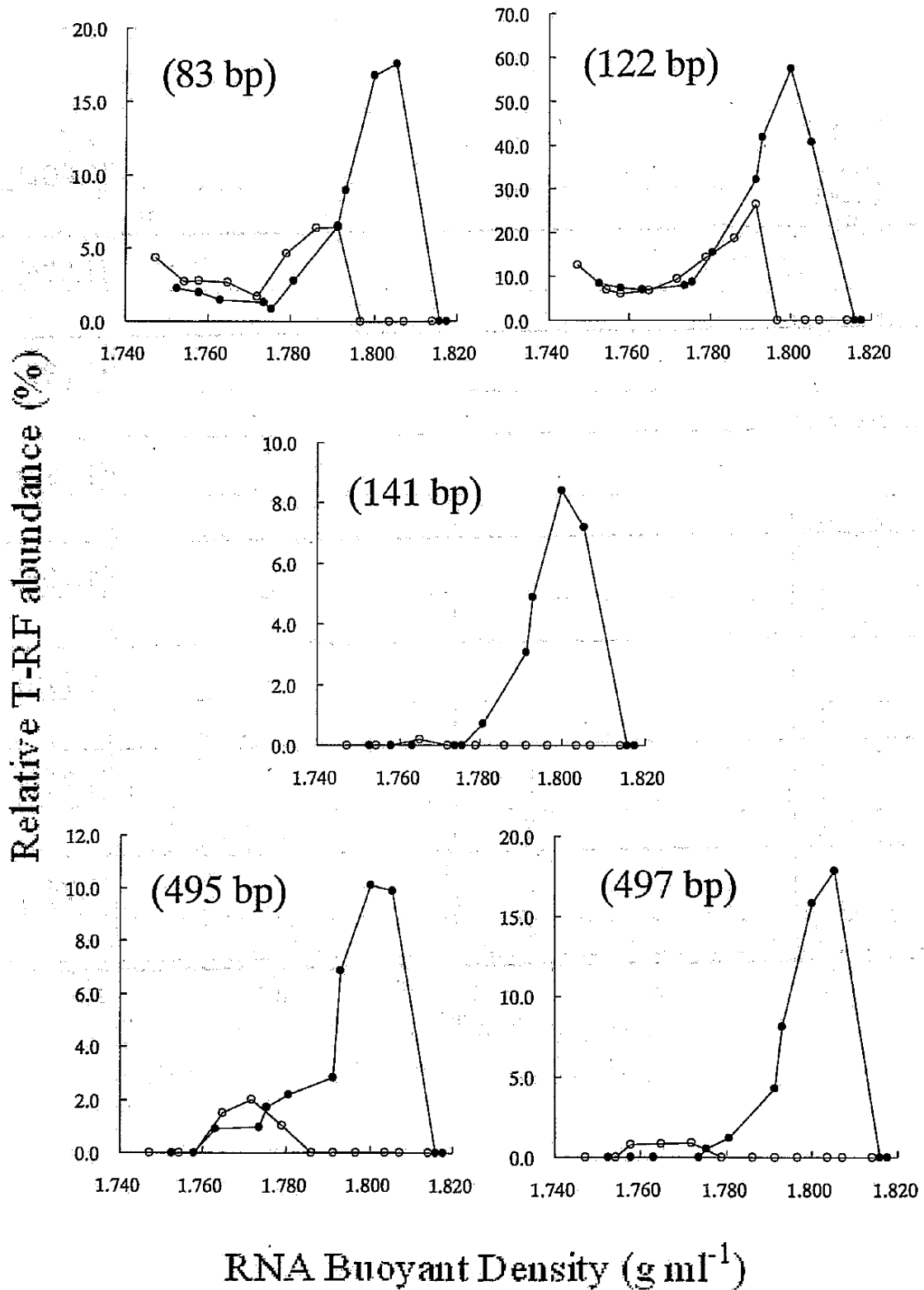


図 5-3 汚泥 A の 83 bp, 122 bp, 141 bp, 495 bp, 497 bp の T-RFs 長を持つ T-RFs の各分画中における相対的 T-RFs 割合の推移 (●, ¹³C 系列; ○, 対照系列)

汚泥 C の T-RFLP 解析

^{13}C 系列と対照系列の培養 2.1 時間後と培養 5.7 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 5-4A と図 5-4B、図 5-5A と図 5-5B 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。

こうして、培養 2.1 時間後には、122 bp, 276 bp, 439 bp, 440 bp の T-RFs を好氣的フェノール分解に関与する細菌群由来の T-RFs と特定した。一方、培養 5.7 時間後には 122 bp, 276 bp, 439 bp, 440 bp の T-RFs に加えて、495 bp の T-RF を好氣的フェノール分解に関与する細菌由来の T-RFs と特定した。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 5-6 (培養 2.1 時間後) と図 5-7 (培養 5.7 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 ^{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。

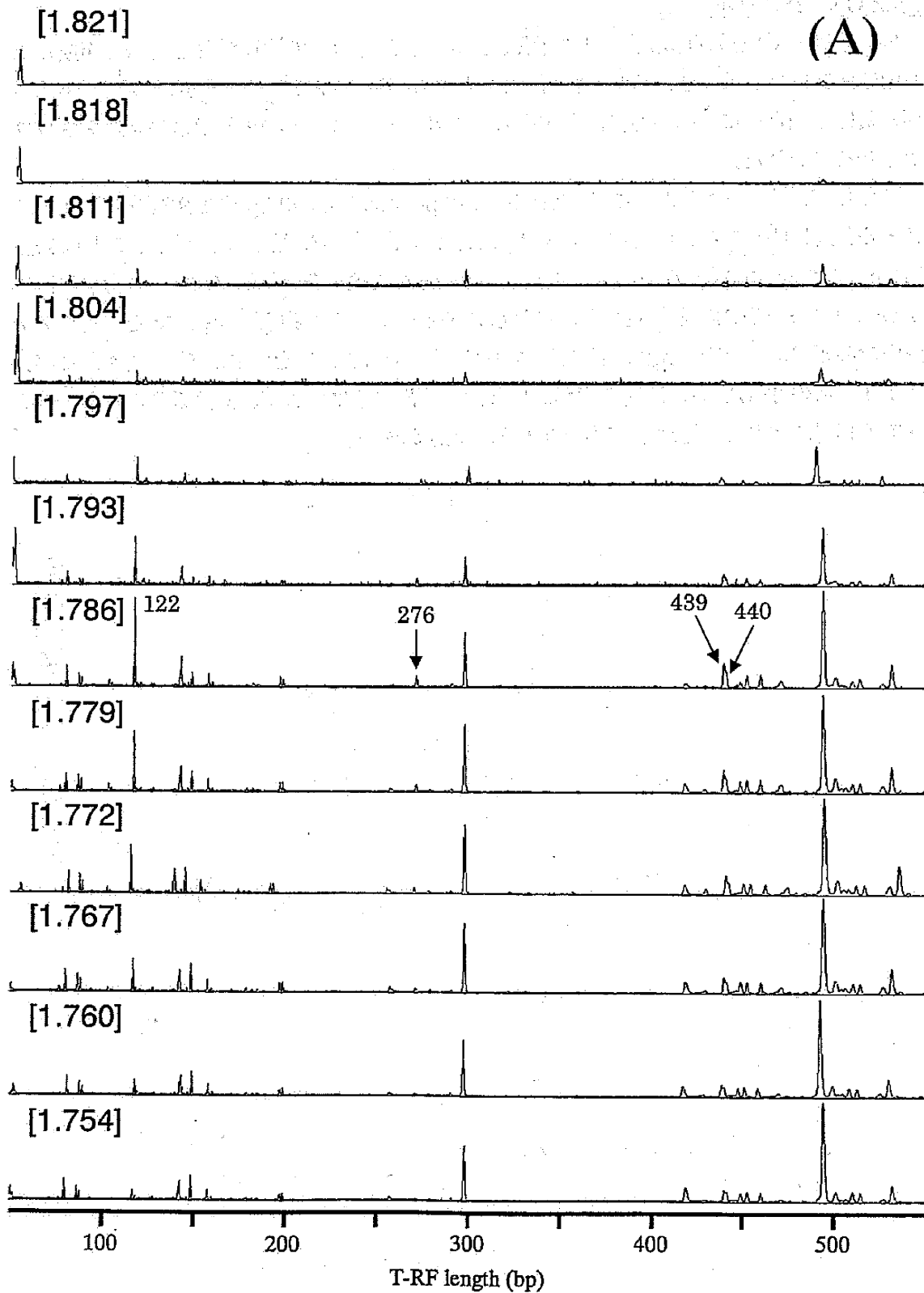


図 5-4A と図 5-4B 汚泥 C の培養 2.1 時間後の ^{13}C 系列(A)と対照系列(B)の T-RFLP プロファイル

[]内の数字は、各分画の浮遊密度を示す。単位は、 g ml^{-1} 。

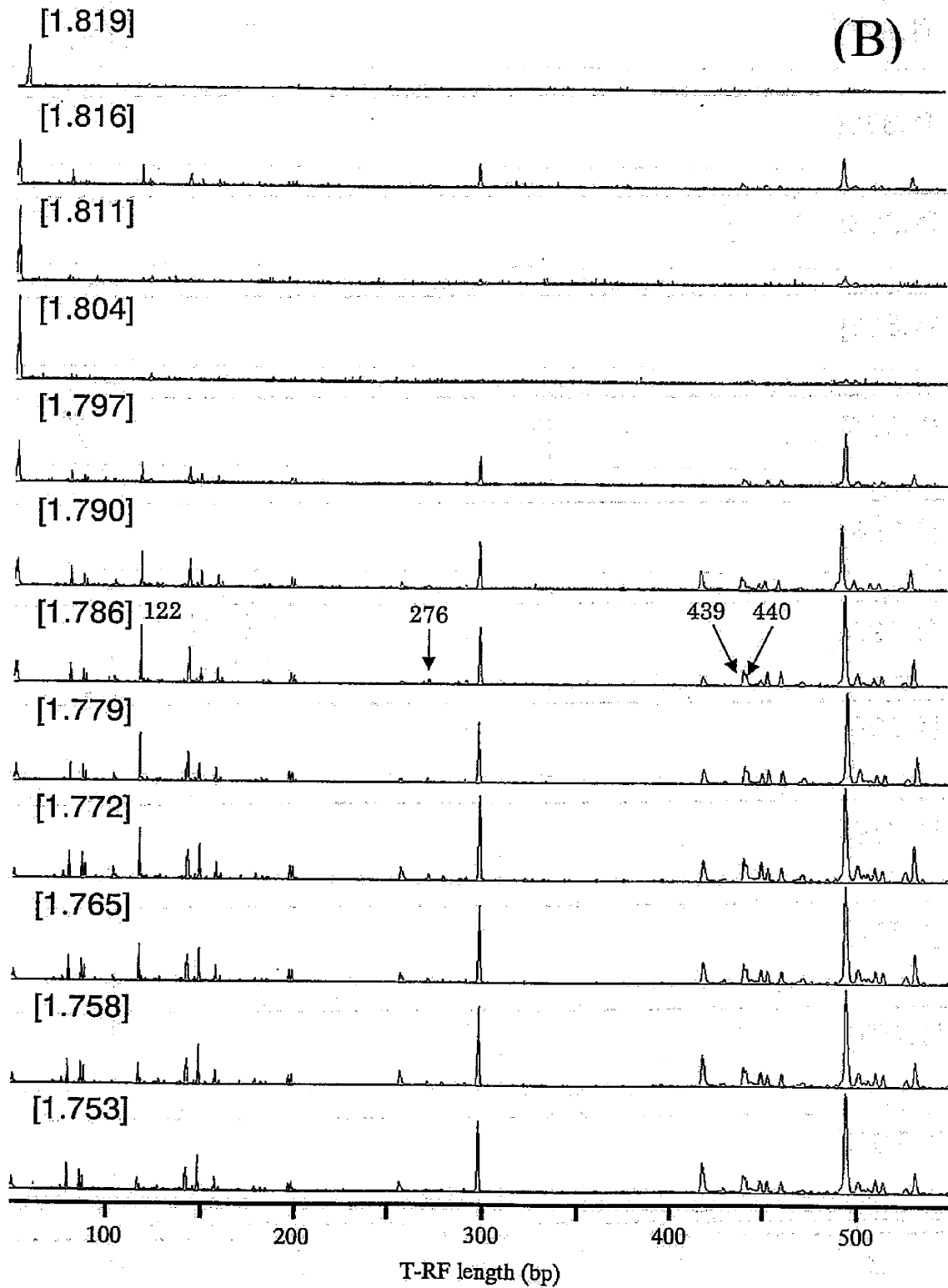


図 5-4A と図 5-4B - (続き)

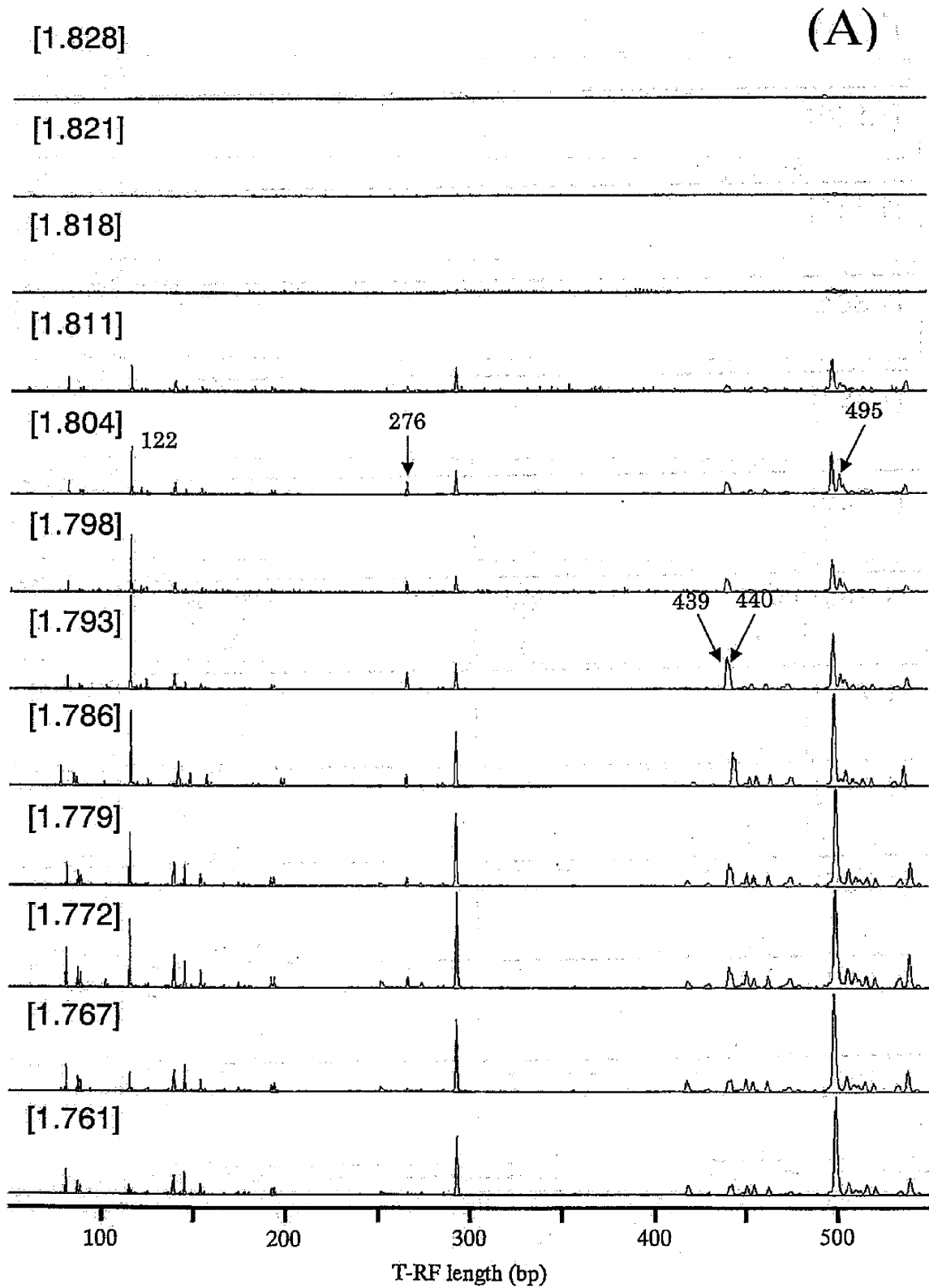


図 5-5A と図 5-5B 汚泥 C の培養 5.7 時間後の ^{13}C 系列(A)と対照系列(B)の T-RFLP プロファイル

[]内の数字は、各分画の浮遊密度を示す。単位は、 g ml^{-1} 。

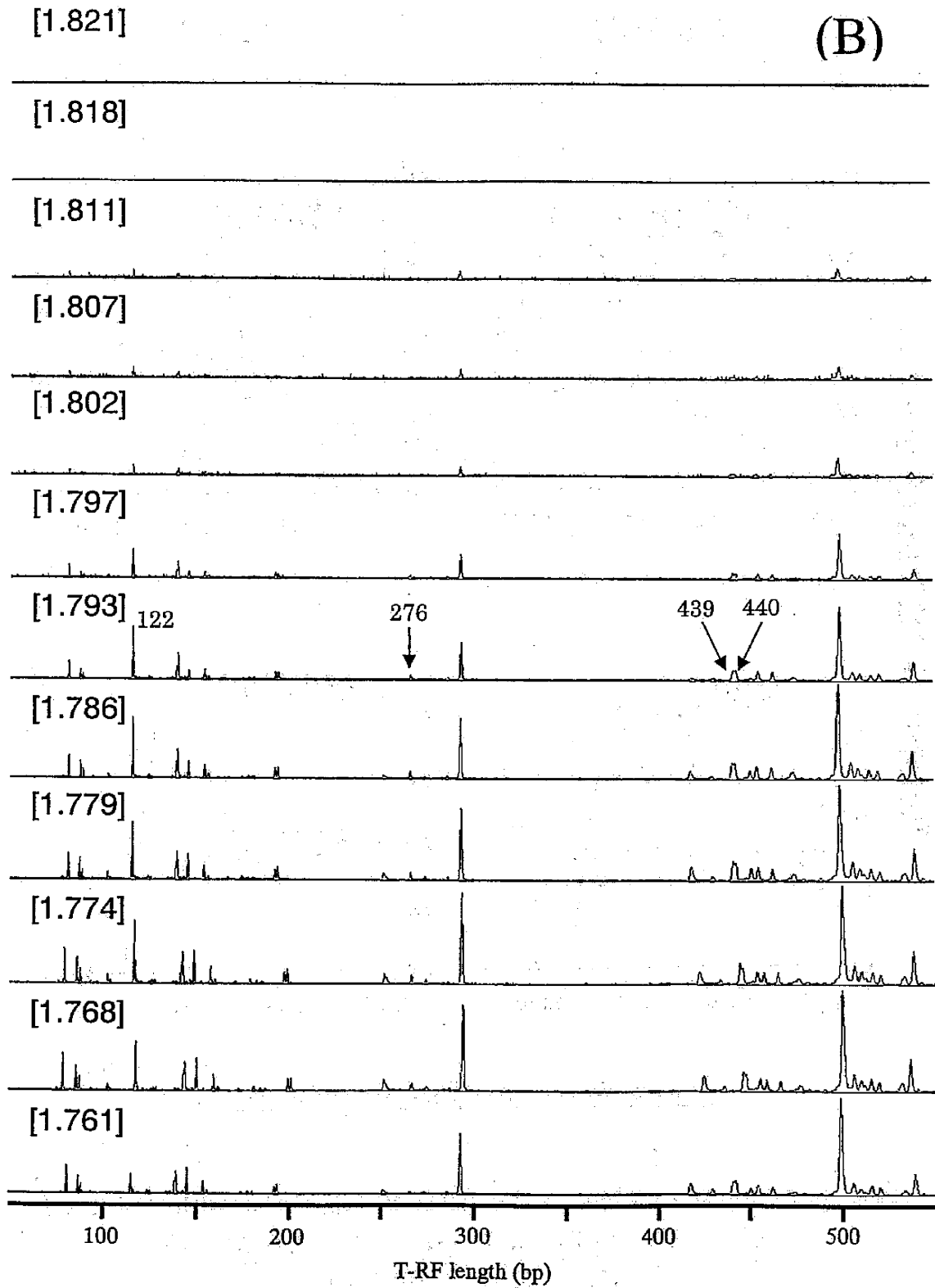


図 5-5A と図 5-5B - (続き)

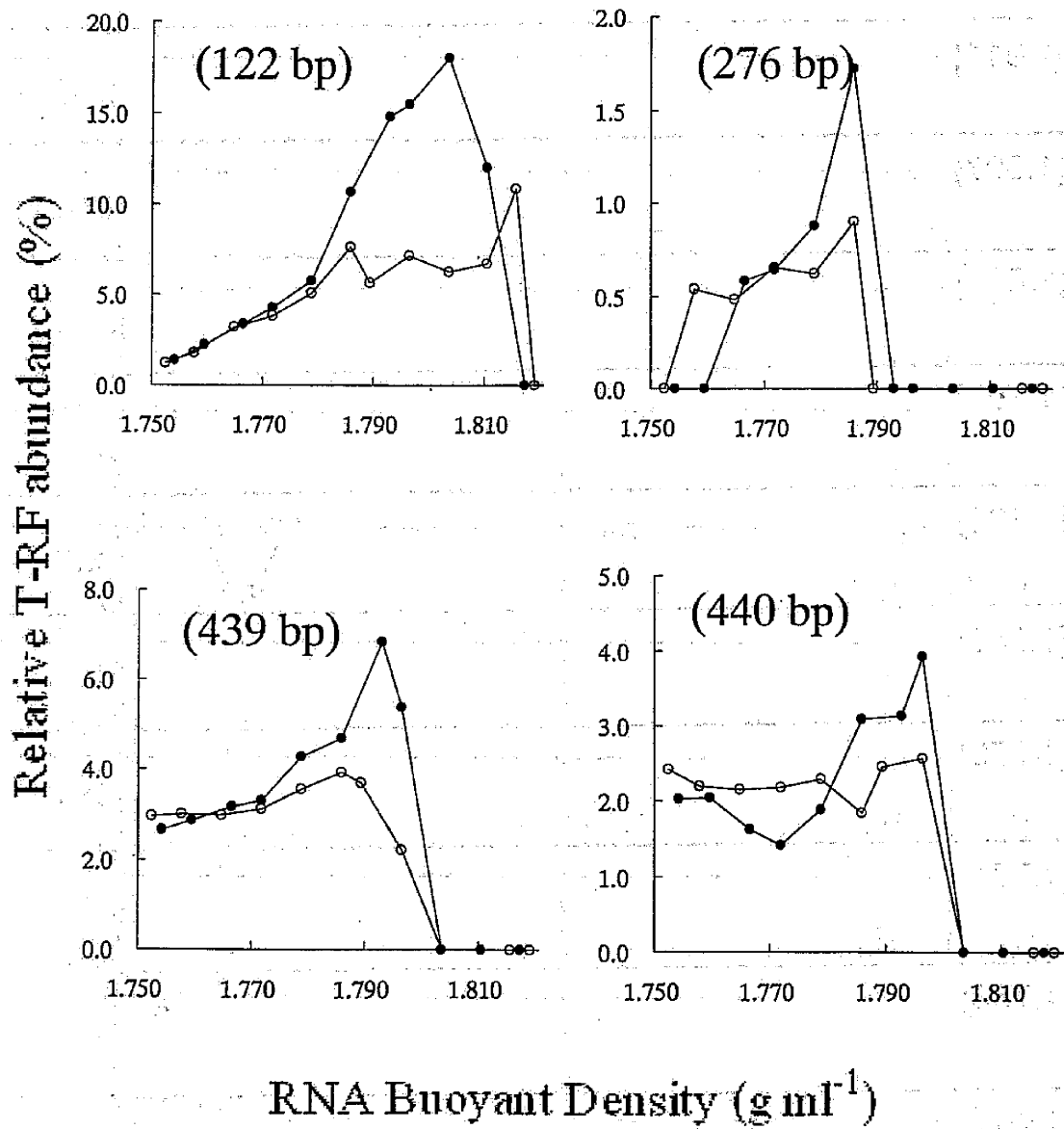


図5-6 汚泥Cの培養2.1時間後における122 bp, 276 bp, 439 bp, 440 bpのT-RFs長を持つT-RFsの各分画中における相対的T-RFs割合の推移
(●, ¹³C系列; ○, 対照系列)

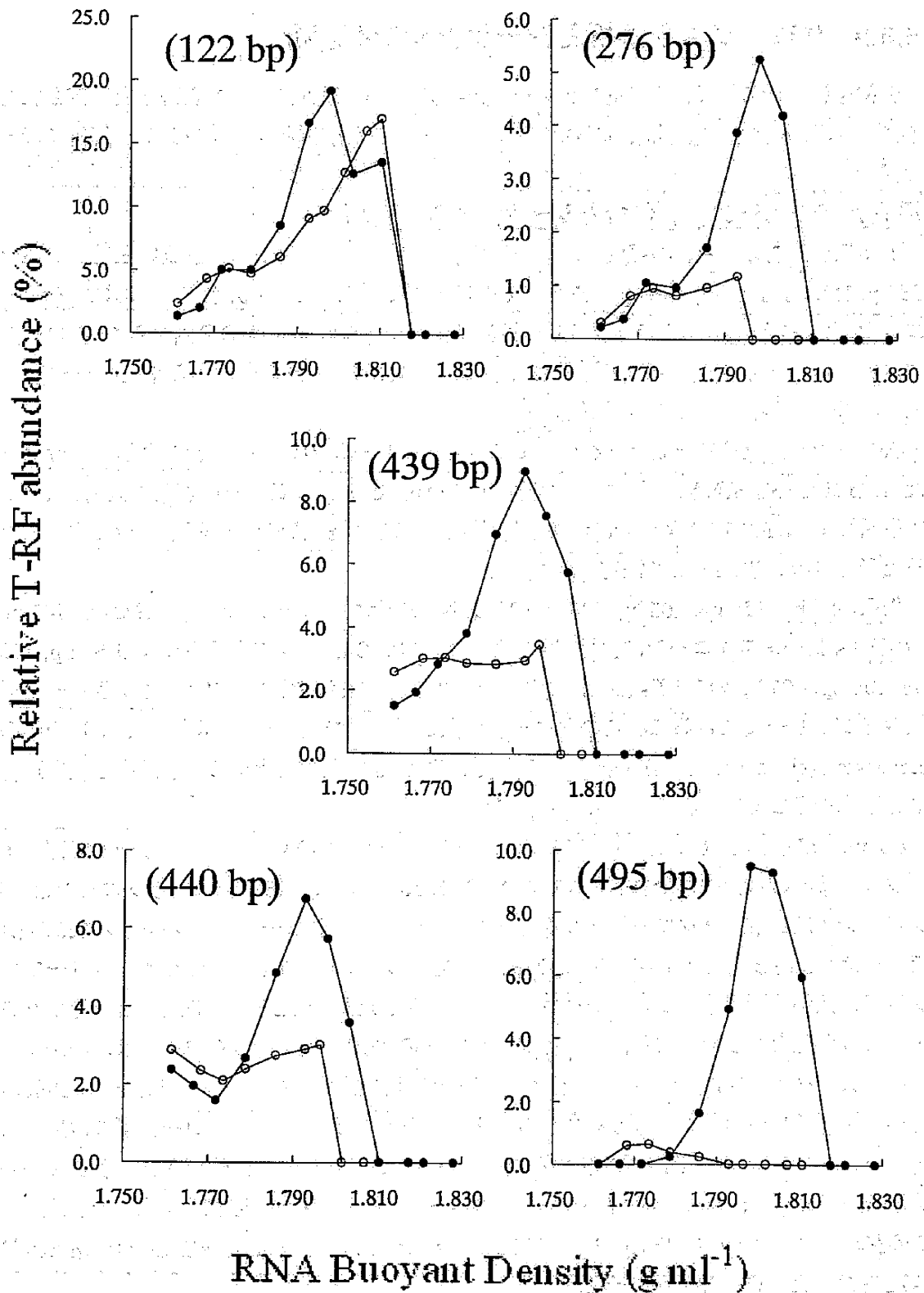


図 5-7 汚泥 C の培養 5.7 時間後における 122 bp, 276 bp, 439 bp, 440 bp, 495 bp の T-RFs 長を持つ T-RFs の各分画中における相対的 T-RFs 割合の推移 (●, ¹³C 系列; ○, 対照系列)

5.3.3 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 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 A 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、好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 83 bp, 122 bp, 141 bp, 495 bp, 497 bp の T-RFs の系統学的位置を決定するために、クローニング解析を行った。 ^{13}C ライブラリーは浮遊密度が 1.805 g ml^{-1} の分画から 61 クローン (図 5-2A)、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 74 クローン (図 5-2B) 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 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, 122 bp, 495 bp, 497 bp の T-RFs 長を持つクローンは獲得できたが、141 bp の T-RFs 長を持つクローンは獲得できなかった。次に、Blastn プログラムにより 83 bp, 122 bp, 495 bp, 497 bp の T-RFs 長を持つクローンの近縁種を決定した。 ^{13}C ライブラリーと対照ライブラリーにおけるこれらのクローンの数と近縁種を表 5-1 に示す。表 5-1 の中の 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。

83 bp, 122 bp, 495 bp, 497 bp の T-RFs 長を持つクローンの ^{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 16 クローンと 10 クローン (83 bp)、18 クローンと 35 クローン (122 bp)、3 クローンと 0 クローン (495 bp)、8 クローンと 1 クローン (497 bp) であった。83 bp, 497 bp, 495 bp の T-RFs 長を持つクローンでは、 ^{13}C ライブラリーでのクローン数が対照ライブラリーのクローン数を上回ったが、122 bp の T-RFs 長を持つクローンのみが逆となった。また、122 bp と 497 bp の T-RFs 長を持つクローンは、僅かに異なる複数のグループに分かれた。122 bp の T-RFs 長を持つクローンは、closest match の僅かに異なるクローンが ^{13}C ライブラリーと対照ライブラリーに 1 クローンずつ検出された。一方、497 bp の T-RFs 長を持つクローンは、3 つのグループに分類され、うち 2 つのグループの closest relative は *Marinobacterium* sp. strain IC961 と同じであった。残り 1 つのグループの closest relative は、*Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans* strain ARhD (AY360060) に 91% の相同性を示した。

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)

| T-RF 長 (bp) | クローン数 (^{13}C ライブラリー) | クローン数 (対照ライブラリー) | Closest match (相同性(%)) | Closest relative (相同性(%)) |
|-------------|---------------------------------|------------------|--|---|
| 83 | 16 | 10 | uncultured bacterium clone DR-7 (AY945908) (99-100) | <i>Thauera aromatica</i> strain LG356 (AJ315680) or strain SP (AJ315679) (99-100) |
| 122 | 17 | 34 | Bacterium GFCr-3 (DQ154279) (93) | 左に同じ |
| | 1 | 1 | uncultured actinobacterium clone A-C1R-F07 (AY307866) (97) | Bacterium GFCr-3 (DQ154279) (93) |
| 495 | 3 | 0 | <i>Halomonas alimentaria</i> (AF211860) (99) | 左に同じ |
| 497 | 4 | 0 | uncultured bacterium clone Niigata-14 (AB243825) (98-99) | <i>Marinobacterium</i> sp. strain IC961 (AB196257) (98) |
| | 3 | 0 | <i>Marinobacterium</i> sp. strain IC961 (AB196257) (99) | 左に同じ |
| | 1 | 1 | uncultured bacterium clone P0X3b1B11 (EU491366) (97) | <i>Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans</i> strain ARhD (AY360060) (91) |

以下に、83 bp、122 bp、495 bp、497 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、どのクローンも *Thauera* 属に近縁であった。

122 bp の T-RFs 長を持つクローンは、表 5-1 に示すとおり、全 53 クローン中 2 クローンのみが系統学的にやや離れていた。但し、どのクローンも *Propionibacterium* 属に近縁な *Bacterium* GFCr-3 (DQ154279) に近縁であった。また、どのクローンも *Propioniferax* 属に近縁な好氣的フェノール分解能の報告のある *Eubacterium* sp. strain PG-04 (AY566577) にも近縁であった。

495 bp の T-RFs 長を持つクローンは、どのクローンも *Halomonas* 属に近縁であった。

497 bp の T-RFs 長を持つクローンは、表 5-1 に示すとおり、全 9 クローン中 2 クローンのみが系統学的に離れていた。それら 2 クローンは *Thioalkalivibrio* 属に近縁であった。一方、残りの 7 クローンは *Marinobacterium* 属に近縁であった。

以上から、*Betaproteobacteria* 綱に分類される *Thauera* 属、*Gammaproteobacteria* 綱に分類される *Halomonas* 属と *Marinobacterium* 属と *Thioalkalivibrio* 属、*Actinobacteria* 綱に分類される *Propionibacterium* 属の 5 属に近縁な細菌が、好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、好氣的フェノール分解に関与する細菌群由来の T-RFs と特定された 122 bp、276 bp、439 bp、440 bp、495 bp の T-RFs の系統学的分類を決定するために、培養 5.7 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 1.811 g ml^{-1} の分画から 80 クローン (図 5-5A)、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 142 クローン (図 5-5B) 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 (但し、 ^{13}C ライブラリーの 276 bp の T-RF 長を持つクローンは、357f プライマーでの解読に失敗し、519r プライマーで解読した 470 bp の塩基配列長しか得られなかった)。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、122 bp、276 bp、439 bp、440 bp、495 bp の T-RFs 長を持つクローンを全て獲得できた。122 bp、276 bp、439 bp、440 bp、495 bp の T-RFs 長を持つクローンの ^{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 14 クローンと 26 クローン (122 bp)、1 クローンと 2 クローン (276 bp)、3 クローンと 2 クローン (439 bp)、2 クローンと 0 クローン (440 bp)、3 クローンと 0 クローン (495 bp)。また、 ^{13}C ライブラリーと対照ライブラリーにおける割合では、それぞれ 18%と 18% (122 bp)、1%と 1% (276 bp)、4%と 1% (439 bp)、3%と 0% (440 bp)、4%と 0% (495 bp) であった。また、クローンのアライ

メント解析を行なったところ、¹³C ライブラリーの 122 bp, 439 bp, 440 bp, 495 bp の T-RFs 長を持つクローンは (276 bp は 1 クローンのみ)、それぞれ 98-100% の相同性に収まり、グループには分類されなかった。

次に、Blastn プログラムにより 122 bp, 276 bp, 439 bp, 440 bp, 495 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 5-2 に示す。表 5-2 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 5-2 汚泥 C の ¹³C 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群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 (bp) | クローン数 (¹³ C ライブラリー) | Closest match (相同性%) | Closest relative (相同性%) |
|-------------|---------------------------------|---|--|
| 122 | 14/14 | uncultured actinobacterium clone A-C1R-F07 (AY307866) (97) | Bacterium GFCr-3 (DQ154279) (93-94) |
| 276 | 1/1 | uncultured actinobacterium clone A-C2F-D09 (AY307871) (96)* | <i>Microbispora</i> sp. HS32-2 (DQ356893) (93) * |
| 439 | 3/3 | uncultured organism clone MAT-CR-PS-G02 (EU246244) (96) | <i>Citireimonas salinaria</i> CL-SP20 ^T (AY962295) (95) |
| 440 | 2/2 | uncultured bacterium clone D8-89 (DQ836762) (97) | <i>Rhodobacter</i> sp. 1-5 (AF513400) (95) |
| 495 | 3/3 | <i>Halomonas alimentaria</i> (AF211860) (99) | 左に同じ |

*276 bp のみ 470 bp の塩基配列に基づいた Blastn 結果

以下に、122 bp, 276 bp, 439 bp, 440 bp, 495 bp の T-RFs 長を持つクローンの系統学的分類について、順に簡潔に説明する。

122 bp の T-RFs 長を持つクローンは、どのクローンも *Actinobacteria* 綱に分類される *Propionibacterium* 属に近縁な Bacterium GFCr-3 (DQ154279) に近縁であった。この他には、好氣的フェノール分解能の報告のある *Propioniferax* 属に近縁な Eubacterium sp. strain PG-04 (AY566577) にも近縁であった。

276 bp の T-RFs 長を持つクローンは、*Actinobacteria* 綱に分類される *Microbispora* sp. HS32-2 (DQ356893) に近縁であった。この他には、*Pseudonocardia benzenivorans* strain B5^T (AJ556156) にも近縁であった。

439 bp の T-RFs 長を持つクローンは、*Alphaproteobacteria* 綱に分類される *Citreimonas salinaria* CL-SP20^T (AY962295) に近縁であった。また、原油汚染土壌から検出されたクローンである uncultured bacterium clone Y51 (EU328076) にも近縁であった。

440 bp の T-RFs 長を持つクローンは、*Alphaproteobacteria* 綱に分類される *Rhodobacter* sp. 1-5 (AF513400) に近縁であった。また、海水から分離された PAHs (polyaromatic hydrocarbons) 分解細菌である *Citreicella* sp. 2-2A (AB266065) にも近縁であった。

495 bp の T-RFs 長を持つクローンは、*Gammaproteobacteria* 綱に分類される *Halomonas alimentaria* (AF211860) に近縁であった。

以上から、*Alphaproteobacteria* 綱に分類される *Citreimonas* 属と *Rhodobacter* 属、*Gammaproteobacteria* 綱に分類される *Halomonas* 属、*Actinobacteria* 綱に分類される *Microbispora* 属と *Propionibacterium* 属の 5 属に近縁な細菌が、好氣的フェノール分解に関与する細菌と考えられた。

5.4 考察

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、好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好氣的フェノール分解細菌に関する知見は、Manefield らによって RNA-SIP 法での解析例が報告されている (Manefield *et al.*, 2002, 2005)。Manefield らの供試試料は標準活性汚泥法で運転しているイギリス国内の実安水処理プラントの汚泥であり、本研究の供試試料が日本国内で採取されたものである点、海水を多く含む人工安水を処理している点、処理プロセスが異なる点 (彼らは標準活性汚泥法、本研究は硝化脱窒法) に違いがあった。

ここでは、RNA-SIP 法によって特定された好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。

5.4.1 好氣的フェノール分解

汚泥 A における好氣的フェノール分解

汚泥 A の好気培養では、初期添加したフェノール 3.0 mg は培養 6 時間以内に全て分解された。そして、培養 6 時間後の活性汚泥上澄液は明るい黄色を呈しており、中間代謝物の形成によるものと考えられた。好氣的フェノール分解は、まずフェノールがカテコールに代謝される。そして、カテコールが、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のいずれかを經由して分解される。このうち、後者のメタ開裂を經由した場合、中間代謝物質として 2-hydroxymuconic semialdehyde が生成され、これが明るい黄色を呈することが知られて

いる (Franklin *et al.*, 1981)。これらのことから、好氣的フェノール分解に関わった微生物がメタ開裂を経由して好氣的にフェノールを分解したことが推測されたが (Molin & Nilsson, 1985; McClure *et al.*, 1991)、これらを証明するためにはさらに詳しい検討が必要である。

汚泥 C における好氣的フェノール分解

汚泥 A では最終濃度が約 270 mg liter⁻¹ となるようにフェノールを 1 回だけ初期添加したのに対して、汚泥 C では最終濃度が約 70-90 mg liter⁻¹ となるようにフェノールを 4 回パルス添加した。4 回パルス添加したフェノール 1.0 mg は 1.6-2 時間以内に全て分解された。しかし、汚泥 A とは異なり、培養後の活性汚泥上澄み液は明るい黄色を呈していなかった。これは、パルスで添加したために中間代謝物が蓄積しにくかった可能性も考えられた。また、メタ開裂ではなくオルト開裂を経由してフェノールが分解された可能性も考えられた。但し、これらを証明するためにはさらに詳しい検討が必要である。

5.4.2 好氣的フェノール分解細菌の特定

ここでは、¹³C 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、「4.4.2 嫌氣的フェノール分解細菌の特定」と同じく次の 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 ¹³C 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、¹³C 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 A と汚泥 C で ¹³C 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、文献情報による好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 5-3 に示した。

汚泥 A における好氣的フェノール分解細菌の特定

T-RFLP 解析結果とクローニング解析結果から、83 bp、122 bp、495 bp、497 bp の T-RFs 長を持つクローンは、それぞれ *Thauera* 属、*Propionibacterium* 属、*Halomonas* 属、*Marinobacterium* 属または *Thioalkalivibrio* 属に近縁な細菌であることがわかった。以下、

既往の知見を交えながら、これらの細菌が直接的に $[^{13}\text{C}_6]$ フェノール由来の ^{13}C を同化していたのか、間接的に同化していたのかを考察する。但し、汚泥 A では解析した汚泥は培養 6 時間の汚泥だけであったため、cross-feeding 効果について議論するのは難しく、どの T-RF's も cross-feeding 効果が関与していないとして考察を進めた。

83 bp の T-RF は、培養 6 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、2 番目に優先した T-RF として検出された。83 bp の T-RF 長を持つクローンの closest match は、uncultured bacterium clone DR-7 (AY945908、相同性 99-100%)であった。uncultured bacterium clone DR-7 (AY945908、相同性 99-100%)は、Shanghai Coking & Chemical Factory (Wujing, Shanghai)の排水処理プラントの活性汚泥を種汚泥として、キノリンとグルコースを基質とした人工排水で馴致したバイオフィームから検出されたクローンであった (Liu *et al.*, 2006)。また、closest relative は *Thauera aromatica* strain LG356 (AJ315680、相同性 99-100%)または *Thauera aromatica* strain SP (AJ315679、相同性 99-100%)であった。*Thauera aromatica* strain LG356 については、フェニル酢酸と硝酸塩を基質として活性汚泥から分離された細菌であるが、好気条件下でフェノールを分解するか否かは不明である (Mechichi *et al.*, 2002)。*Thauera aromatica* strain SP については、L-フェニルアラニンと硝酸塩を基質として集積をした後、フェニル酢酸と硝酸塩を基質として活性汚泥から分離された細菌で、脱窒条件下でのフェノール分解能を有していることは知られているが、同じく好気条件下でフェノールを分解するか否かは不明である (Mechichi *et al.*, 2002)。また、*Thauera aromatica* は、RNA-SIP 法によって好氣的安水処理活性汚泥中の好氣的フェノール分解細菌として特定されている (Manefield *et al.*, 2002)。このように *Thauera aromatica* は株によって好氣的フェノール分解能が異なるが、好氣的フェノール分解能を有する株は、実安水処理活性汚泥を対象として RNA-SIP 法により特定した知見 (Manefield *et al.*, 2002) であった。このことから、83 bp の T-RF に対応する細菌を好氣的フェノール分解細菌と特定した。

122 bp の T-RF は、培養 6 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、最も優先した T-RF として検出された。122 bp の T-RF 長を持つクローンの closest match は、*Propionibacterium* 属に近縁な Bacterium GFCr-3 (DQ154279、相同性 93%) または uncultured actinobacterium clone A-C1R-F07 (AY307866、相同性 97%)であった。Bacterium GFCr-3 は、Cr 耐性細菌として分離された株であり、フェノール分解能に関しては不明である (Kourtev *et al.*, 2006)。一方、uncultured actinobacterium clone A-C1R-F07 (AY307866、相同性 97%)はブラジルの熱帯の河口底質において優占していたクローンであり、やはりフェノール分解能に関しては不明である (Piza *et al.*, 2004)。また、closest relative は、Bacterium GFCr-3 (DQ154279、相同性 93%)の次に相同性が高いものは、Eubacterium sp. strain PG-04 (AY566577、相同性 92-93%)であった。*Propioniferax* 属に近縁な Eubacterium sp. strain PG-04 は、好氣的フェノール分解グラニュール活性汚泥から分離された株であり、好気条件下でフェノール分解能を有している (Jiang *et al.*,

2004b)。これらの知見と最も優占した T-RF として検出されたことから、122 bp の T-RF に対応する細菌を好氣的フェノール分解細菌と特定した。また、closest relatives との相同性が低いことから、*Propionibacterium* 属に近縁であるが、系統学的に新規な好氣的フェノール分解細菌であるとも考えられた。

495 bp の T-RF 長を持つクローンの closest match と closest relative は、*Halomonas alimentaria* (AF211860、相同性 99%)であった。*Halomonas alimentaria* は、jeotgal という韓国の伝統的発酵シーフードから分離された細菌として報告されており、硝酸塩還元能を有することが確認されているが、好気条件下でのフェノール分解能は検討されていない (Yoon *et al.*, 2002)。但し、495 bp の T-RF は、6 時間という短い培養時間を経た活性汚泥から検出されたことから、cross-feeding 効果によって検出された可能性は低いと考えられた。よって、495 bp の T-RF に対応する細菌を好氣的フェノール分解細菌と特定した。

497 bp の T-RF 長を持つクローンは、前述のとおり 3 つのグループに分類された。うち 2 つのグループに分類されたクローンの closest match と closest relative は、それぞれ uncultured bacterium clone Niigata-14 (AB24382、相同性 98-99%) または *Marinobacterium* sp. strain IC961 (AB196257、相同性 99%) と *Marinobacterium* sp. strain IC961 (AB196257、相同性 98-99%) であった。また、どのクローンも *Marinobacterium georgiense* strain KW-40^T (U58339、相同性 98-99%) に近縁であった。*Marinobacterium georgiense* strain KW-40^T は、パルプ工場からの高濃度リグニン含有排水を元に集積した系から分離された株であり、好気条件下でフェノール分解能を有している (González *et al.*, 1997)。この知見から、497 bp の T-RF に対応する細菌のうち、*Marinobacterium* 属に近縁な細菌を好氣的フェノール分解細菌と特定した。

一方、残りの 1 つのグループに分類されたクローンの closest match と closest relative は、それぞれ uncultured bacterium clone P0X3b1B11 (EU491366、相同性 97%) と *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans* strain ARhD (AY360060、相同性 91%) であった。*Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans* strain ARhD (AY360060) は、好塩好アルカリ性の脱窒性硫黄酸化のチオシアン酸塩利用細菌であり、*Thioalkalivibrio* 属はチオシアン酸塩利用細菌として有名である (Sorokin *et al.*, 2004)。また、検出されたクローンの数も、¹³C ライブラリーと対照ライブラリーからそれぞれ 1 クローンずつと少なかったため、好氣的フェノール分解細菌であるとは考えにくいとした。

以上、*Thioalkalivibrio* 属に近縁な 497 bp の T-RF 長を持つクローン以外の 83 bp、122 bp、495 bp、497 bp の T-RFs 長を持つクローンは、既往の知見と著者の実験結果から、フェノールを直接同化できると考えられた。よって、これらの T-RFs に対応する細菌は、好氣的フェノール分解細菌と特定した。さらに、*Propionibacterium* 属に近縁な細菌は、系統学的に新規な好氣的フェノール分解細菌と考えられた。

汚泥 C における好氣的フェノール分解細菌の特定

T-RFLP 解析結果とクローニング解析結果から、122 bp, 276 bp, 439 bp, 440 bp, 495 bp の T-RFs 長を持つクローンは、それぞれ *Actinobacteria* 綱に分類される *Propionibacterium* 属と *Microbispora* 属 (それぞれ 122 bp と 276 bp)、*Alphaproteobacteria* 綱に分類される *Citreimonas* 属と *Rhodobacter* 属 (それぞれ 439 bp と 440 bp) と *Gammaproteobacteria* 綱に分類される *Halomonas* 属 (495 bp) に近縁な細菌であることがわかった。

122 bp の T-RF 長を持つクローンは、汚泥 A から検出された好氣的フェノール分解細菌と 99-100% の非常に高い相同性を示した。そのため、近縁種に関する文献情報は「汚泥 A における好氣的フェノール分解細菌の特定」に前述した通り、好氣条件下でフェノール分解能を有している *Bacterium* GFCr-3 (DQ154279、相同性 93%) が closest relative として近縁であった (Jiang *et al.*, 2004b)。この知見や、最も優占した T-RF として検出されたこと、2.1 時間という短い培養時間で検出されたことから考えて、122 bp の T-RF に対応する細菌を好氣的フェノール分解細菌と特定した。また、*Propionibacterium* 属に近縁であるがその相同性が低いことから (相同性 93-94%)、系統学的に新規な好氣的フェノール分解細菌であるとも考えられた。

276 bp の T-RF 長を持つクローンは、*Actinobacteria* 綱に分類される *Microbispora* sp. HS32-2 (DQ356893、相同性 93%) に近縁であった。この他には、*Pseudonocardia benzenivorans* strain B5^T (AJ556156、相同性 92%) にも近縁であった。また、122 bp の T-RF 長を持つクローンとは 94% の相同性と比較的近縁であった。*Pseudonocardia benzenivorans* strain B5^T は、1,2,3,5-tetrachlorobenzene を唯一の炭素源とした集積培養系から分離された株であり、4-hydroxybenzoate を分解できる。このように、芳香族化合物を分解できる近縁種の存在は確認できたが、フェノール分解能に関しては不明であった。しかし、276 bp の T-RF が 2.1 時間という短い培養時間で検出されたことから考えて、276 bp の T-RF に対応する細菌を好氣的フェノール分解細菌と特定した。また、*Microbispora* 属に近縁であるがその相同性が低いことから (相同性 93%)、系統学的に新規な好氣的フェノール分解細菌であるとも考えられた。但し、¹⁸C ライブラリーで 1 クローンしか検出されなかったため、汚泥 C 内では存在量の非常に少ない細菌であろう。

439 bp の T-RF 長を持つクローンは、*Alphaproteobacteria* 綱に分類される *Citreimonas salinaria* CL-SP20^T (AY962295、相同性 95%) に近縁であり、フェノール分解能に関しては不明である (Choi & Cho, 2006)。また、原油汚染土壌から検出されたクローンである uncultured bacterium clone Y51 (EU328076、相同性 95%) にも近縁であった。文献情報からは好氣的フェノール分解能を推測することは難しかったが、439 bp の T-RF が 2.1 時間という短い培養時間で検出されたことを考えて、439 bp の T-RF に対応する細菌を好氣的フェノール分解細菌と特定した。また、*Citreimonas* 属に近縁であるがその相同性が低いことから (相同性 95%)、系統学的に新規な好氣的フェノール分解細菌であるとも考えられた。

440 bp の T-RF 長を持つクローンは、脱窒条件で運転しているリアクターから検出された uncultured bacterium clone D8-89 (DQ836762, 相同性 97%) に最も近縁であった。closest relative は *Alphaproteobacteria* 綱に分類される *Rhodobacter* sp. 1-5 (AF513400, 相同性 95%) であり、また、多環芳香族化合物分解細菌として海水から分離された *Citreicella* sp. 2-2A (AB266065, 相同性 94-95%) にも近縁であった。このように、芳香族化合物を分解できる近縁種の存在は確認できたが、フェノール分解能に関しては不明であった。しかし、440 bp の T-RF が 2.1 時間という短い培養時間で検出されたことを考えて、440 bp の T-RF に対応する細菌を好氣的フェノール分解細菌と特定した。また、*Rhodobacter* 属に近縁であるがその相同性が低いことから (相同性 95%)、系統的に新規な好氣的フェノール分解細菌であるとも考えられた。

495 bp の T-RF 長を持つクローンは、汚泥 A から検出された好氣的フェノール分解細菌と 99% の非常に高い相同性を示した。closest match と closest relative は、*Halomonas alimentaria* (AF211860, 相同性 99%) であり、硝酸塩還元能を有することが確認されているが、好気条件下でのフェノール分解能は検討されていない (Yoon *et al.*, 2002)。495 bp の T-RFs に対応する細菌は、培養 5.7 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初めて検出され、培養 2.1 時間後に検出されなかったことを考えると $^{13}\text{C}_6$ フェノールの代謝産物を同化し検出された可能性が考えられた。しかし、フェノールの同化速度や取り込み速度が遅い可能性や、495 bp の T-RFs に対応する細菌の存在量が少ないために検出されるまでに時間がかかった可能性も考えられた。以上、495 bp の T-RF に対応する細菌は、好氣的フェノール分解細菌である可能性と、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を考え、好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解に関与する細菌と特定した。

以上から、*Actinobacteria* 綱に分類される *Propionibacterium* 属 (122 bp) と *Microbispora* 属 (276 bp) と *Alphaproteobacteria* 綱に分類される *Citreimonas* 属 (439 bp) と *Rhodobacter* 属 (440 bp) に近縁な細菌が好氣的フェノール分解細菌と特定した。また、いずれの細菌も近縁種との相同性が低いことから (相同性 93-95%)、系統的に新規な好氣的フェノール分解細菌であるとも考えられた。一方、*Gammaproteobacteria* 綱に分類される *Halomonas* 属に近縁な細菌 (495 bp) は、好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解に関与する細菌と特定した。

表5-3 汚泥Aと汚泥Cの¹³C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、¹³C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

| 汚泥の種類 | T-RF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* | 好氣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A | 83 bp | <i>Thauera</i> | 6.0 | 強 | あり | 16/61 |
| | 122 bp | <i>Propionibacterium</i> | 6.0 | 強 | なし | 18/61 |
| | 141 bp | クローン獲得できず | 6.0 | — | — | — |
| | 495 bp | <i>Halomonas</i> | 6.0 | 強 | なし | 3/61 |
| | 497 bp | <i>Marinobacterium</i> | 6.0 | 強 | あり | 7/61 |
| | 497 bp | <i>Thioalkalivibrio</i> | 6.0 | 強 | なし | 1/61 |
| 汚泥C | 122 bp | <i>Propionibacterium</i> | 2.1 | 強 | なし | 14/80 |
| | 276 bp | <i>Microbispora</i> | 2.1 | 弱 | なし | 1/80 |
| | 439 bp | <i>Citreimonas</i> | 2.1 | 弱 | なし | 3/80 |
| | 440 bp | <i>Rhodobacter</i> | 2.1 | 弱 | なし | 2/80 |
| | 495 bp | <i>Halomonas</i> | 5.7 | 強 | なし | 3/80 |

*、¹³C系列と対照系列のT-RFLP解析結果を比較し、対照系列と比べて¹³C系列でのT-RFs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、T-RFsの相対的強度が低い場合は、標識度合いを弱とした。

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

汚泥 A と汚泥 C から好氣的フェノール分解細菌または好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-RFLP 解析での T-RF 長と系統学的分類を表 5-4 にまとめた。これを見ると、汚泥 A 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 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

| T-RF 長 (bp) | 好氣的フェノール分解細菌の系統学的分類 | | 活性汚泥の種類 | |
|-------------|----------------------------|--------------------------|---------|------|
| | 綱 | 属 ^a | 汚泥 A | 汚泥 C |
| 122 bp | <i>Actinobacteria</i> | <i>Propionibacterium</i> | ○ | ○ |
| 276 bp | | <i>Microbispora</i> | — | ○ |
| 439 bp | <i>Alphaproteobacteria</i> | <i>Citreimonas</i> | — | ○ |
| 440 bp | | <i>Rhodobacter</i> | — | ○ |
| 83 bp | <i>Betaproteobacteria</i> | <i>Thauera</i> | ○ | — |
| 495 bp | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Halomonas</i> | ○ | △ |
| 497 bp | | <i>Marinobacterium</i> | ○ | — |

○, 好氣的フェノール分解細菌と特定された

△, 好氣的フェノール分解細菌または好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 A または汚泥 C から得られた約 900-1000 bp の 16S rRNA 塩基配列に基づいて記述した。但し、276 bp の *Microbispora* 属に近縁な塩基配列のみ 470 bp に基づいて記述した。

a) 汚泥 A と汚泥 C の類似点

汚泥 A と汚泥 C の好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解に関与する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) と、汚泥 A と汚泥 C で検出された 122 bp の T-RF に対応する細菌 (*Propionibacterium* 属に近縁な細菌) が高い相同性を示した (相同性 99-100%) (表 5-4)。同じく 495 bp の T-RF に対応する細菌 (*Halomonas* 属に近縁な細菌) が高い相同性を示した (相同性 99%) (表 5-4)。なお、122 bp の T-RF に対応する細菌 (*Propionibacterium* 属) は、汚泥 A と汚泥 C の両方で好氣的フェノール分解細菌と特定された。一方、495 bp の T-RF に対応する細菌は、汚泥 A では好氣的フェノール分解細菌と特定されたが、汚泥 C では好氣的フェノール分解細菌である可能性と他の微生物によって [¹³C₆] フェノールが代謝された後の代謝産物を摂取している可能性 (cross-feeding 効果) の両方が考えられた。

b) 汚泥 A と汚泥 C の相違点

汚泥 A と汚泥 C の好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解に関与する細菌は大きく異なっていた (表 5-4)。汚泥 A では、83 bp の T-RF に対応する *Thauera* 属、497 bp の T-RF に対応する *Marinobacterium* 属が検出され、汚泥 C では検出されなかった。一方、汚泥 C では、276 bp の T-RF に対応する *Microbispora* 属、439 bp の T-RF に対応する *Citireimonas* 属、440 bp の T-RF に対応する *Rhodobacter* 属が検出され、汚泥 A では検出されなかった。このことは、汚泥 A で優占していた 83 bp の T-RF に対応する *Thauera* 属、497 bp の T-RF に対応する *Marinobacterium* 属が、プロセスの運転条件を何度か変更する中で、約 10 ヶ月後の汚泥 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。

以上をまとめると、汚泥 A と汚泥 C では、*Propionibacterium* 属 (122 bp の T-RF) と *Halomonas* 属 (495 bp の T-RF) が共通して検出された。しかし、*Thauera* 属 (83 bp の T-RF)、*Marinobacterium* 属 (497 bp の T-RF)、*Microbispora* 属 (276 bp の T-RF)、*Citireimonas* 属 (439 bp の T-RF)、*Rhodobacter* 属 (440 bp の T-RF) は、汚泥 A または汚泥 C の一方でしか検出されなかった。第 4 章の「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」で考察したように、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 A (約 24℃) と汚泥 C (約 33℃) の大きな違いであった人工安水処理硝化脱窒プロセスの運転温度が、好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。

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

第 4 章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 (表 4-3) と、第 5 章で特定された好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解に関与する細菌 (表 5-4) を比較した。結果、高い相同性を示したのは、汚泥 B 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 *Thauera* 属 (83 bp の T-RF) と、汚泥 A で好氣的フェノール分解細菌と特定された *Thauera* 属 (83 bp の T-RF) だけであった (相同性 99%)。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の特定を同時に行った汚泥 C においては、高い相同性を示すものが全くいなかった。

これらのことから、人工安水処理活性汚泥内において、好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解に関与する細菌と、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は、系統的に異なっていることがわかった。

5.5 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、好氣的フェノ

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 A では、*Thauera* 属、*Propionibacterium* 属、*Halomonas* 属、*Marinobacterium* 属に近縁な細菌が好氣的フェノール分解細菌であると特定された。また、*Propionibacterium* 属に近縁な細菌は、系統学的に新規な好氣的フェノール分解細菌と考えられた。

汚泥 C では、*Actinobacteria* 綱に分類される *Propionibacterium* 属と *Microbispora* 属と、*Alphaproteobacteria* 綱に分類される *Citreimonas* 属と *Rhodobacter* 属に近縁な細菌が好氣的フェノール分解細菌であると特定された。また、いずれの細菌も近縁種との相同性が低いことから、系統学的に新規な好氣的フェノール分解細菌であるとも考えられた。また、*Gammaproteobacteria* 綱に分類される *Halomonas* 属に近縁な細菌は、好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解に関与する細菌と特定した。

また、汚泥 A と汚泥 C で特定された好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解に関与する細菌 (cross-feeder) を比較した。結果、汚泥 A では *Propionibacterium* 属、*Halomonas* 属、*Marinobacterium* 属、*Thauera* 属に近縁な細菌が好氣的フェノール分解細菌として特定され、汚泥 C では *Citreimonas* 属、*Microbispora* 属、*Propionibacterium* 属、*Rhodobacter* 属に近縁な細菌が好氣的フェノール分解細菌として特定された。一方、汚泥 C では *Halomonas* 属に近縁な細菌が好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解に関与する細菌 (cross-feeder) として特定された。このように、*Propionibacterium* 属と *Halomonas* 属に近縁な細菌を除いて、好氣的フェノール分解細菌として特定された細菌は、汚泥 A と汚泥 C では異なっていた。

さらに、第 4 章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と、第 5 章で好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解に関与する細菌 (表 5-4) を比較した。結果、*Thauera* 属に近縁な細菌を除いて、人工安水処理活性汚泥内において、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、好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解に関与する細菌は、系統学的に異なっていることがわかった。

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-

6.1 はじめに

本章および次の第7章では、分離培養法によって嫌氣的フェノール分解細菌を分離・培養することを目的とした。さらに、第4章と第5章で述べた、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と、嫌氣的または好氣的フェノール分解に関与する細菌を分離することを目指した。

第2章の「2.6.1 微生物の発見と微生物学の歴史」や「2.6.3 分離培養法とその発展」で述べたように、一般に環境中の細菌には分離培養することが困難なものが多い。その一方、基質濃度や固化剤を工夫することで、分離培養な困難な細菌を分離できる場合があることが報告されている。そこで、本章では、平板培養法に使用する基質濃度と固化剤の種類に着目して、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検討・評価した。まず、汚泥Aと汚泥Bを供試試料とし、培地中の硝酸塩の濃度は一定とし、フェノール濃度および固化剤の種類を変えて平板培養を行なった。培養期間中の viable count (活性汚泥 1 ml あたりの CFU (colony forming unit) 値) の推移・コロニーの形態的特徴の多様性・得られた分離株の系統学的位置の 3 項目を評価軸として、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た。さらに、第4章で RNA-SIP 法によって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が分離されているかを調べた。

なお、次の第7章でも本章と同じく平板培養法を用いて同様の目的で検討を行ったが、次の点が本章と異なっている。第7章では汚泥Cを供試試料とし、分離培養の条件としては基本的に本章の検討・評価の結果から決めた培養条件を用いた。また、本章で用いた培地には海水を加えなかったが、第7章では培地に海水(海水濃度は汚泥Cを採取した時期の硝化脱窒プロセスの流入水中の濃度に合わせた)を加えた。海水を加えたのは、硝化脱窒プロセスの流入水には海水が含まれており、その環境を模倣した培地にするためである。

6.2 実験方法に関する事前調査

実験方法を説明する前に、用いた培地成分と固化剤をどのようにして決定したのかを説明する。培地成分のうち、無機塩培地と微量培地成分 (trace element solution と vitamin solution の 2 つ)、基質濃度 (フェノール濃度)、硝酸塩濃度を、文献情報を基に決定した。

また、固化剤については、文献情報の他に簡単な予備実験を行って決定した。最後に、決定した培地成分と固化剤を用いて、固体培地の作成手順を決定した。これらを順に説明する。

6.2.1 無機塩培地の選択

まず無機塩培地であるが、ここで言う無機塩が意味するところは、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のことである。

無機塩培地として、表 6-1 に示す培地を使用した。この培地成分を選ぶにあたり、嫌氣的フェノール分解細菌や嫌氣的芳香族化合物分解細菌の分離に関する既往の知見で報告のある培地の無機成分や、カルチャーコレクション DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) に登録されている無機塩培地を比較した。

まず、嫌氣的フェノール分解細菌や嫌氣的芳香族化合物分解細菌の分離・培養に関してこれまで報告されている無機塩培地には、Taylor ら、Tschech A & Fuchs G、van Schie PM & Young LY、Shinoda ら、Song らのものがあつた (Taylor *et al.*, 1970; Tschech A & Fuchs G, 1987; van Schie PM & Young LY, 1998; Shinoda *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2000)。これらは、Taylor らと Tschech A & Fuchs G の 2 例に集約される (Taylor *et al.*, 1970; Tschech A & Fuchs G, 1987)。このどちらも表 6-1 に示したリン酸水素塩、リン酸二水素塩、アンモニウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩と trace element solution と vitamin solution を全てまたは一部を含んだ培地であつた。但し、Taylor らの無機塩培地は炭酸水素ナトリウムを含まず、最終的に pH を 8.5 に調整する必要があり、Tschech A & Fuchs G の無機塩培地は炭酸水素ナトリウムを含み、最終的に pH を 7.2-7.4 に調整する必要があつた。

一方、カルチャーコレクションの DSMZ に登録されている 1000 種類程度の培地のうち、30 種類程度が無機塩培地であつた。これらの無機塩培地の殆どは、Taylor らと Tschech A & Fuchs G の 2 例に同じく、リン酸水素塩 (Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 など)、リン酸二水素塩 (KH_2PO_4)、アンモニウム塩 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ など)、マグネシウム塩 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MgCl_2 など)、カルシウム塩 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ など) と trace element solution と vitamin solution を全てまたはその一部を含んでいた。これらに共通するのは、リン酸水素塩及び/またはリン酸二水素塩によって pH 緩衝作用を持たせ、生育に必要な窒素と微量金属を含んでいる点である。

trace element solution と vitamin solution は比較対象とせずに、既往の報告例と DSMZ に登録されていた 30 種類程度の無機塩培地を比較した。そして、炭酸塩を含まない培地で、かつ前述したリン酸水素塩、リン酸二水素塩、アンモニウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩を含み、pH が 7.0 付近である DSMZ の 457 番の培地を無機塩培地として選択した。表 6-1 に示した含有成分及び含有量は、DSMZ の 457 番の培地に従っている。DSMZ の 457 番の培地には、表 6-1 に示す成分以外に trace element solution が含まれているが、これは別のものを使用した (後述する)。

表 6-1 無機塩培地の組成

| 成分 | 添加量 |
|--|------------|
| Na_2HPO_4 | 2.44 g |
| KH_2PO_4 | 1.52 g |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0.50 g |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0.20 g |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0.05 g |
| Distilled water | 1000.00 ml |

DSMZ の 457 番の培地成分の一部及び含有量に従った

6.2.2 微量培地成分の選択

無機塩培地に添加する微量培地成分として、vitamin solution と trace element solution がある。vitamin solution は表 6-4 に示す DSMZ の 461 番のものを、trace element solution は表 6-5 に示す DSMZ の 141 番のものを使用した。vitamin solution と trace element solution を選ぶにあたり、無機塩培地の選択の手順と同じく、微生物の分離に関する既往の知見で報告のあるものや、カルチャーコレクション DSMZ に登録されているものを比較した。

まず、vitamin solution は以下のようにして選択した。微生物の分離・培養に関してこれまで報告されている vitamin solution には、Hanada ら、Janssen ら、Rosencrants ら、Sait ら、Tamaki らのものがあつた (Hanada *et al.*, 1995; Janssen *et al.*, 1997; Rosencrants *et al.*, 1999; Sait *et al.*, 2004; Tamaki *et al.*, 2005)。これらの報告例で使用された vitamin solution は、Hanada らと Janssen らの 2 例に集約される。Hanada らの vitamin solution には 8 種類の成分が、Janssen らのものには 10 種類の成分が含まれていた (表 6-2)。

一方、カルチャーコレクションの DSMZ に登録されているは、DSMZ の 141 番と 461 番の 2 種類があつた。DSMZ の 141 番の vitamin solution には 10 種類の成分が、461 番には 11 種類の成分が含まれていた (表 6-2)。

既往の報告例と DSMZ に登録されていた vitamin solution を比較して、最も含有成分が多い DSMZ の 461 番 (11 種類の成分を含む) を選択した (表 6-4)。

表 6-2 これまでに報告のある vitamin solution の成分比較

| 物質名 | Hanadaら | Janssenら | DSMZ の 141 番 | DSMZ の 461 番 |
|------------------------|---------|----------|--------------|--------------|
| ニコチン酸 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| チアミン (ビタミン B1) | ○ | ○ | ○ | ○ |
| ビオチン | ○ | ○ | ○ | ○ |
| p-アミノ安息香酸 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| シアノコバラミン (ビタミン B12) | ○ | ○ | ○ | ○ |
| パントテン酸 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| ピリドキシン (ビタミン B6) | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 葉酸 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| リボ酸 | - | ○ | ○ | ○ |
| リボフラビン (ビタミン B2) | - | ○ | ○ | ○ |
| ニコチン酸アミド | - | - | - | ○ |

○, 該当する物質を含む; -, 該当する物質を含まない

次に、trace element solution は以下のようにして決定した。微生物の分離・培養に関してこれまで報告されている trace element solution は、vitamin solution と同じ報告例から探した (Hanada *et al.*, 1995; Janssen *et al.*, 1997; Rosencrants *et al.*, 1999; Sait *et al.*, 2004; Tamaki *et al.*, 2005)。これらの報告例で使用された trace element solution は、Hanada らと DSMZ の 320 番の SL-10 の 2 例に集約される。Hanada らと DSMZ の 320 番の SL-10 の trace element solution には、表 6-1 の無機塩培地に含まれている金属であるマグネシウム (Mg) とカルシウム (Ca) を除いて、それぞれ 6 種類と 7 種類の金属化合物が含まれていた (表 6-3)。

一方、カルチャーコレクションの DSMZ に登録されているは、前述の DSMZ の 320 番の SL-10 以外では、DSMZ の 27 番の SL-6、141 番、457 番の SL-4、660 番の SL-7、878 番、925 番の 6 種類であった。マグネシウム (Mg) とカルシウム (Ca) を除いて、これらの trace element solution には、順に 6、9、7、6、5、7 種類の金属化合物が含まれていた (表 6-3)。

既往の報告例と DSMZ に登録されていた trace element solution を比較して、最も含有成分が多い DSMZ の 141 番 (9 種類の金属化合物を含む) を選択した (表 6-5)。

表 6-3 これまでに報告のある trace element solution の成分比較

| 金属 元素 | Hanada ら | DSMZ の 878 番 | DSMZ の 27 番 | DSMZ の 660 番 | DSMZ の 457 番 | DSMZ の 925 番 | DSMZ の 320 番 | DSMZ の 141 番 |
|----------|-------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Mn | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Zn | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Cu | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Mo | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Co | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Fe | ○ | - | - | - | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Ni | - | - | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Al | - | - | - | - | - | - | - | ○ |
| Se | - | - | - | - | - | - | - | ○ |

各 trace element solution に含まれていた金属化合物の「金属元素記号・金属元素名・金属化合物の化学式」を以下に表記した。但し、化合物中の水和物の表記を省略している。

Mn, マンガン, $MnCl_2$ または $MnSO_4$

Zn, 亜鉛, $ZnCl_2$ または $ZnSO_4$

Cu, 銅, $CuCl_2$ または $CuSO_4$

Mo, モリブデン, Na_2MoO_4

Co, コバルト, $CoCl_2$, $Co(NH_3)_2$, $CoSO_4$

Fe, 鉄, $FeCl_2$ または $FeSO_4$

Ni, ニッケル, $NiCl_2$

Al, アルミニウム, $KAl(SO_4)_2$

Se, セレン, Na_2SeO_3

こうして、vitamin solution は DSMZ の 461 番、trace element solution は DSMZ の 141 番に決定した。

表 6-4 vitamin solution の組成 (DSMZ の 461 番)

| 成分 | 添加量 |
|-----------------------------------|---------|
| Vitamin B ₁₂ | 50 mg |
| Pantothenic acid | 50 mg |
| Riboflavin | 50 mg |
| Pyridoxamine-HCl | 10 mg |
| Biotin | 20 mg |
| Folic acid | 20 mg |
| Nicotinic acid | 25 mg |
| Nicotine amide | 25 mg |
| alpha-lipoic acid | 50 mg |
| p-aminobenzoic acid | 50 mg |
| Thiamine-HCl x 2 H ₂ O | 50 mg |
| Distilled water | 1000 ml |

表 6-5 trace element solution の組成 (DSMZ の 141 番)

| 成分 | 添加量 |
|--|---------|
| Nitrilotriacetic acid | 1.5 g |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 3 g |
| MnSO ₄ · 2 H ₂ O | 0.5 g |
| NaCl | 1.0 g |
| FeSO ₄ · 7 H ₂ O | 0.1 g |
| CoSO ₄ · 7 H ₂ O | 0.18 g |
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O | 0.1 g |
| ZnSO ₄ · 7 H ₂ O | 0.18 g |
| CuSO ₄ · 5 H ₂ O | 0.01 g |
| KAl(SO ₄) ₂ · 12 H ₂ O | 0.02 g |
| H ₃ BO ₃ | 0.01 g |
| Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O | 0.01 g |
| NiCl ₂ · 6 H ₂ O | 25 mg |
| Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O | 0.3 mg |
| Distilled water | 1000 ml |

6.2.3 固化剤の選択

第2章の「2.6.3 分離培養法とその発展」で述べたように、食品添加物としてのゲル化剤・増粘剤や平板培養法で使用される固化剤には様々なものがある。平板培養法で使用される固化剤は古くはゼラチンやシリカゲルであったが、現在では、一般的に寒天が使用されている。寒天には、その精製度合いにより様々なグレードがあり、用途として微生物の培養から核酸の電気泳動による分離などと幅広い。これら以外のものでは、カラギーナン (carrageenan)、ゲランガム (gellan gum)、キサントタンガム (xanthan gum)、ローカストビーンガム (locust bean gum)、グアーガム (guar gum)、アルギン酸 (alginate)、ペクチン (pectin)、ゼラチン (gelatin)、カードラン (curdlan) などが知られている。特に、ゲランガムに関しては、Janssen らや Tamaki らによって固化剤としてゲランガムを用いた場合には、寒天を用いた場合とは異なる系統学的位置の細菌が分離されることが報告されている (Janssen *et al.*, 2002; Sait *et al.*, 2002; Joseph *et al.*, 2003; Tamaki *et al.*, 2005)。

本研究では、従来から用いられている寒天に加えて、カラギーナン、ゲランガムを固化剤として使用した。カラギーナンはResearch Organics社製のもの(商品名:Carrageenan、微生物培養用)を、ゲランガムは和光社製のもの(商品名:Gellan gum、植物組織培養用)を、寒天はDifco社製のAgar noble(商品名:Agar noble、電気泳動用または微生物培養用)およびBacto agar(商品名:Bacto agar、微生物培養用)を用いた。以下、Agar nobleについては寒天A、Bacto agarについては寒天Bと略記する。それぞれ1.5%(wt/wt)の濃度で使用した。

また、これら以外の固化剤として、キサントタンガム、ローカストビーンガム、グアーガム、アルギン酸、ペクチン、ゼラチン、カードランなどの利用に関しても、微生物の分離用固化培地として使用できるかどうかの検討を行った。しかし、固化を促進するために塩濃度などの調整の検討も行ったが、0.5-15.0%(wt/wt)の固化剤濃度範囲で、画線(使い捨てのプラスチック製のループを使用)が可能な程度に十分な培地表面の強度を実現できるものはなかった。但し、キサントタンガムとローカストビーンガムを混合して固化剤として使用した場合(キサントタンガム:ローカストビーンガムを4:6の重量比で、培地に対して合計で1.5%(wt/wt)濃度で用いた場合)と、ゼラチンを固化剤として15.0%の濃度で使用した場合に、ある程度の培地表面の強度が得られた。強度としては、スプレダーによるサンプル塗布は可能であるが、画線をするのが困難な程度の培地表面の強度であった。キサントタンガムとローカストビーンガムの混合物を固化剤としたものは実際に培養を行ったが、コロニーの生育が確認され培養自体に問題はなかった。但し、キサントタンガムとローカストビーンガムの構成成分が原因であろうか、作成した固化培地は不透明であり、シャーレの裏側からのコロニーの確認に不便であった。

6.2.4 基質濃度の決定

第2章の「2.6.3 分離培養法とその発展」で述べたように、従来から用いられている培地の基質濃度は、実環境とは程遠い高濃度のものがほとんどである。Connon & Giovannoni や Zengler らは、低濃度の基質を与えることで、これまでに分離されてこなかった系統学的位置に属する分離株を得ている (Connon & Giovannoni 2002; Zengler *et al.*, 2002)。そこで、本研究では、平板培養法における基質濃度の影響を確認するために、フェノール濃度を低濃度・中濃度・高濃度の3段階に設定した。それぞれ約 10, 100, 500 mg liter⁻¹ のフェノール濃度となるように設定した。

6.2.5 硝酸塩濃度の決定

硝酸塩濃度は、汚泥Aと汚泥Bを採取した脱窒槽内の硝酸塩濃度と既往の知見で報告のあった平板培地の硝酸塩濃度を比較して決定した。

汚泥Aと汚泥Bを採取した日前後における脱窒槽内の硝酸塩濃度は、それぞれ約 150, 100 mgN liter⁻¹であった。一方、フェノールを唯一の有機物源、硝酸塩を電子受容体として嫌気培養を行った平板培養法の既往の報告では、約 70 mgN liter⁻¹であった (Tschsch A & Fuchs G, 1987)。4-hydroxybenzoate を唯一の有機物源、硝酸塩を電子受容体として嫌気培養を行った平板培養法の既往の報告では、約 280 mgN liter⁻¹であった (Taylor *et al.*, 1970)。また、ハロゲン化安息香酸を有機物源、硝酸塩を電子受容体として嫌気培養を行った平板培養法の既往の報告では、約 140 mgN liter⁻¹であった (Song *et al.*, 2000)。嫌氣的トルエン分解細菌 (嫌氣的フェノール分解細菌も含む) を分離・培養するための培地の例では、約 70 mgN liter⁻¹であった (Fries *et al.*, 1994; Song *et al.*, 1999)。

こうして、汚泥AとBを採取した脱窒槽内の硝酸塩濃度と既往の知見で報告のあった硝酸塩濃度を比較すると、約 70-150 mgN liter⁻¹が良く用いられている。そこで、ほぼ中間の約 100 mgN liter⁻¹となるように培地中の硝酸塩濃度を設定した。

6.3 実験方法

6.3.1 供試試料

実験室規模の人工安水処理硝化脱窒処理プロセスの脱窒槽から採取した汚泥Aと汚泥Bの2種類を供試試料とした。汚泥Aはフェノールと硝酸塩を添加して嫌気培養をした後の汚泥を (約 50 時間の培養)、汚泥Bは第4章でRNA-SIP法の嫌気培養を終えた汚泥を用いた (約 50 時間の培養)。

6.3.2 固化培地の作成手順

培地成分の混合割合を表 6-6 に示す。

表 6-6 各培地溶液の混合割合

| 成分 | フェノール濃度の段階 | | |
|--|---------------------------------------|--|--|
| | 低濃度 (約 10 mg liter ⁻¹) | 中濃度 (約 100 mg liter ⁻¹) | 高濃度 (約 500 mg liter ⁻¹) |
| 無機塩培地 | 1000.0 ml | 1000.0 ml | 1000.0 ml |
| vitamin solution | 5.0 ml | 5.0 ml | 5.0 ml |
| trace element solution | 10.0 ml | 10.0 ml | 10.0 ml |
| フェノール溶液 (40000 mg liter ⁻¹) | 0.25 ml | 2.5 ml | 12.5 ml |
| NaNO ₃ 溶液 (10000 mgN liter ⁻¹) | 10.0 ml | 10.0 ml | 10.0 ml |
| 固化剤 | 15.0 g | 15.0 g | 15.0 g |

フェノール溶液は作成後、0.2 μm フィルターでろ過滅菌する

NaNO₃ 溶液は作成後、0.2 μm フィルターでろ過滅菌する

vitamin solution, trace element solution は作成後、0.2 μm フィルターでろ過滅菌する

表 6-6 の割合で混合すると、フェノール濃度が低濃度・中濃度・高濃度の培養系列では、フェノール濃度はそれぞれ 9.8, 97.3, 481.9 mg liter⁻¹ となり、硝酸塩濃度はそれぞれ 97.5, 97.3, 96.4 mgN liter⁻¹ となる。次に、固体培地の作成手順を述べる。

[固体培地の作成手順]

1. 無機塩培地 (表 6-1) を作成した後、pH を 6.9 (汚泥 A 用) または 7.25 (汚泥 B 用) に調整した。
2. 固化剤を 1.5% (wt/wt) となるように添加して、121℃で 15 分間のオートクレーブ処理を行った。
3. オートクレーブ処理終了後、培地をウォーターバスで 65℃に保持した。
4. 0.20 μm 孔径の cellulose acetate filter (ADVANTEC) で濾過滅菌済みの 65℃に保持されたフェノール溶液、NaNO₃ 溶液、vitamin solution、trace element solution を表 6-6 に示す割合で速やかに添加した。
5. 添加後、速やかに混合して、シャーレ (BIOBIK 社、プラスチック製、直径 90 mm 高さ 15 mm) に分注した。
6. 作成した培地は、常温に冷却後、使用まで AnaeroPack 試薬 (三菱ガス化学 (株)) と

嫌気ジャー（三菱ガス化学（株））を用いて1晩以上保存した。

6.3.3 培養条件

活性汚泥サンプルを滅菌済み 0.85%NaCl 溶液を用いて 10^2 - 10^7 の範囲で段階的に希釈を行った。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後、次の希釈段階を作成した。シャーレ1枚に対して希釈したサンプルを汚泥Aでは200 μ l、汚泥Bでは100 μ l 添加した。プラスチック製のスプレダーでサンプルを塗布した。塗布後、AnaeroPack 試薬と嫌気ジャーを用いて、暗所にて18-23°Cで約18週間以上培養した。1つの希釈段階に対して、各3枚のシャーレを作成した。

6.3.4 viable count の測定

コロニーの生育状況をもつ、18週間のうち5点でコロニー数を計数した。それに基づき、活性汚泥1mlに対する生成コロニー数をDavisらの手法に従って計算した値を、viable countとして算出した (Davis *et al.*, 2005)。1つの希釈段階に対して3枚のシャーレを作成したので、3枚のシャーレのCFU値をviable countに変換した後、3つの値の平均値と標準偏差を計算した。

6.3.5 コロニーの形態的特徴の観察

コロニーカウントをする際、同時にコロニーの形態的特徴（コロニーの色、大きさ、形）を観察した。

6.3.6 分離株の獲得

汚泥Bを供試試料としフェノール濃度を中濃度とした培養系列から、分離株の取得を試みた。新しいコロニーの生育がそれ程見られなくなった培養18週間以降、培養に用いた培地と同じ成分の培地を用いて画線を繰り返して純化を行った。コロニーの様子が1種類のコロニー（1種類の微生物）と肉眼または顕微鏡観察で判断できた状態をもって純化作業を終了した。

6.3.7 分離株の16S rRNA 遺伝子塩基配列の解読

純化を終了した分離株について、次のようにして16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析した。AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) と付属のdNTPとPCR bufferを用いて、27f/1492rプライマーセット (Lane *et al.*, 1991) でコロニーダイレクトPCR反応を行った。PCR Mixtureを作成した後、滅菌した爪楊枝で軽くつついたコロニーをPCR Mixtureに軽く浸して菌体を添加した。PCR条件は、94°C, 10分に続いて[50°C, 30秒; 72°C, 2分; 94°C, 30秒]のPCR反応を35サイクル行い、最後に伸長反応を72°C, 10分で行った。得られた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。

シーケンシングは、タカラバイオ㈱の受託シーケンス解析を利用した。BigDye terminator 反応を用いて ABI 3730xl 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 357f/519r プライマーセット (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SEMBL操作をした。得られた約 1000 bp 程度の部分塩基配列を Blastn プログラムによって解析して、分離株の近縁種を決定し系統学的位置を推定した。

6.3.8 培養条件の評価

基質濃度と固化剤を組み合わせた全 12 通りの培養条件に関して、培養期間中の viable count (活性汚泥 1 ml あたりの CFU (colony forming unit) 値) の推移・コロニーの形態的特徴の多様性・得られた分離株の系統学的位置の 3 項目を評価軸として、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た。

6.3.9 RNA-SIP 法で捉えたフェノール分解細菌の分離・培養

第 4 章と第 5 章では、RNA-SIP 法による嫌氣的または好氣的フェノール分解細菌の特定の結果を述べた。得られた分離株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を、第 4 章と第 5 章で得られた 16S rRNA 塩基配列と比較し、同じ塩基配列を保有する分離株の有無を確認した。

6.4 結果

6.4.1 viable count の経時的推移

培地の viable count の経時的变化を汚泥とフェノール濃度ごとに図 6-1A から図 6-1F に示す。一部の培地において、培養 8-12 週間後には viable count がプラトー付近まで達したことが確認された (図 6-1A, 図 6-1B, 図 6-1E)。しかし、その他の培地においては、培養 12-18 週間後に再び増加を示すものや、18 週間後でも緩やかな増加を示しているものが確認された (図 6-1C, 図 6-1D, 図 6-1F)。

次に、培養 18 週間後の viable count をまとめたものを図 6-2 に示す。汚泥 B の固化剤がカラギーナンと寒天 A 以外の培養条件では、フェノール濃度が低濃度 > 中濃度 > 高濃度と低濃度になるにつれて、培養 18 週間後の viable count が高くなるという傾向が確認された (図 6-2)。一方、汚泥 B の固化剤がカラギーナンと寒天 A の培養条件では、フェノール濃度が中濃度 > 低濃度 > 高濃度という順に、培養 18 週間後の viable count が高くなるという傾向が確認された (図 6-2)。但し、どの固化剤でも、フェノール濃度が低濃度または中濃度の場合と高濃度の場合の間には、培養 18 週間後の viable count の値に約 2-29 倍という顕著な違いが確認された (図 6-2)。

一方、固化剤ごとには、培養18週間後の viable count (各3枚のシャーレの平均値) を比較した場合、汚泥Bのフェノール濃度が高濃度の培養条件以外では、カラギーナンとゲランガムの viable count は寒天Aと寒天Bの viable count 以上の値を示した。一方、汚泥Bのフェノール濃度が高濃度の培養条件では、カラギーナンの viable count が最も良く、寒天Bの viable count がゲランガムの viable count を若干上回った。但し、ほとんどの培養条件では、カラギーナンとゲランガムの viable count と寒天Aと寒天Bの viable count の間には大きな差があった(図6-2)。

また、培養18週間後のカラギーナンとゲランガムの viable count を比較した場合、フェノール濃度が中濃度と高濃度ではカラギーナンがゲランガムを上回り、一方、フェノール濃度が低濃度ではその逆となった(図6-2)。

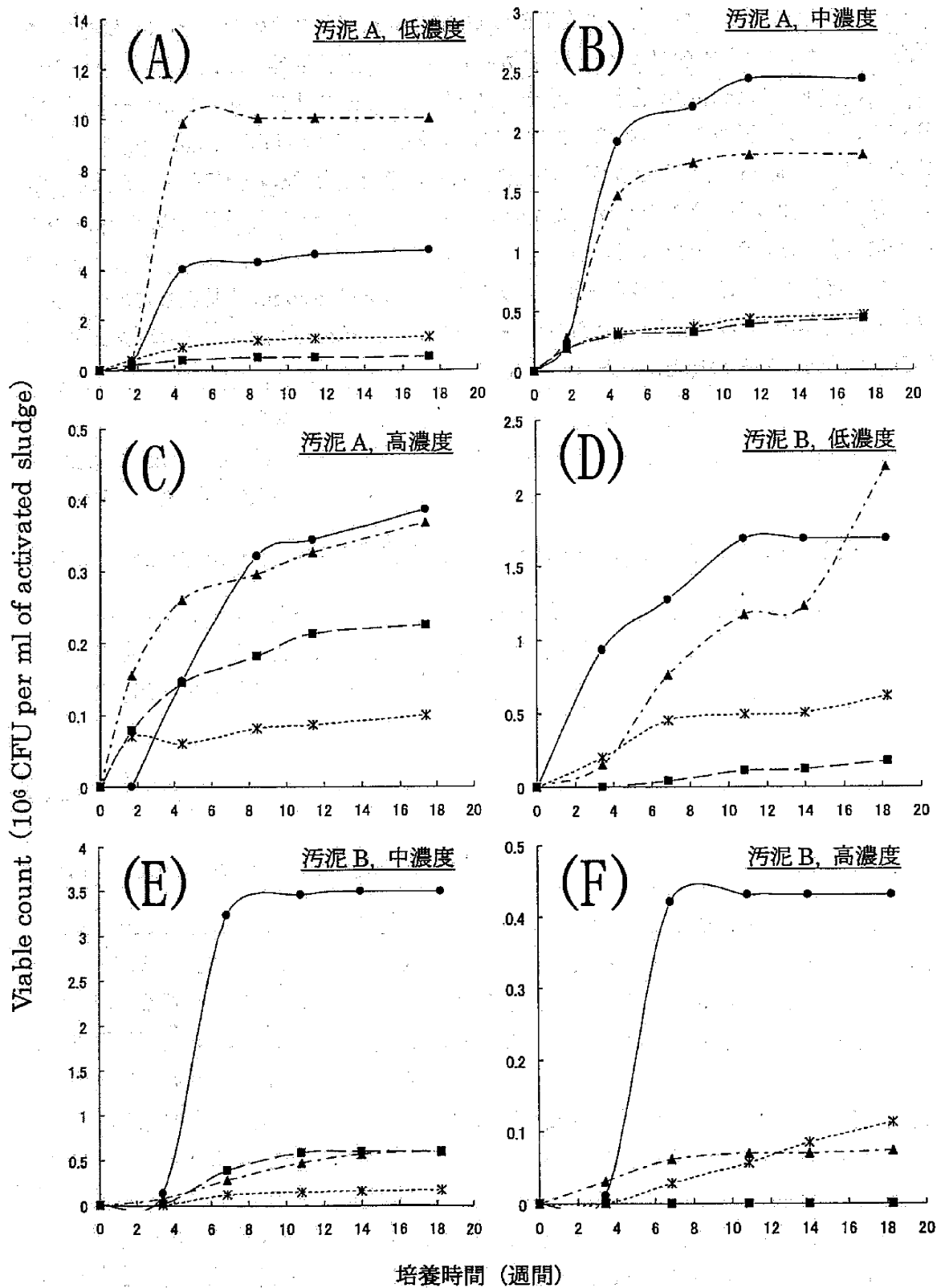


図6-1 viable countの経時的推移

カラギーナン(●); ゲランガム(▲); 寒天A(■); 寒天B(*)

下線部分は使用汚泥とフェノール濃度を示す。また、図を見やすくするために、標準偏差を示すエラーバーは示さなかった。各プロットにおける標準偏差の割合の平均値は、24.3%であった。

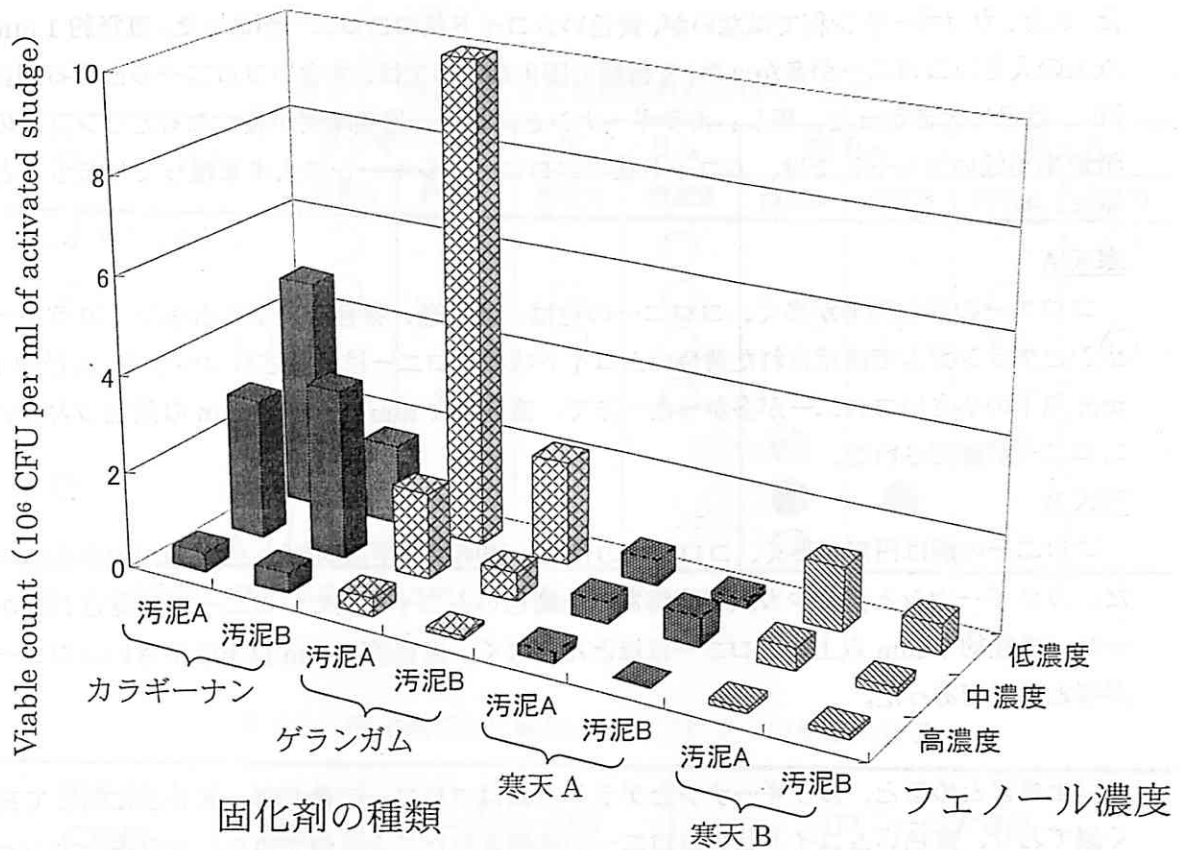


図 6-2 培養 18 週間後の viable count の比較

6.4.2 コロニーの形態的特徴の観察

コロニーの形態的特徴について、色、形、大きさの 3 点から観察した。まず、フェノール濃度の違いによらず同じ固化剤を用いた場合には、活性汚泥が異なっても（汚泥 A と汚泥 B の違い）生育したコロニーの形態的特徴（色、形、大きさ）には大きな違いが確認されなかった。そこで、低濃度・中濃度・高濃度のフェノール濃度をひとまとめにして、4 種類の固化剤ごとに、コロニーの色を表 6-7 に、コロニーの形とコロニーの大きさを表 6-8 に示した。以下、4 種類の固化剤ごとにコロニーの形態的特徴を説明する。

カラギーナン

コロニーの形は円形が多く、コロニーの色は透明色（半透明色）、白色、黄色が多かった。他の固化剤と比べて、黄色いムコイド状のコロニーが特に多く、直径約 1 mm 以上の大きいコロニーが多かった。4 種類の固化剤の中では、大きいコロニーの占める割合は最も大きかった。但し、培養時間が長くなるとサンプルの希釈率が低いシャーレでは、ムコイド状のコロニーがシャーレの大半を覆ってしまうことがあった。

ゼランガム

コロニーの形は円形が多く、コロニーの色は透明色（半透明色）、白色、淡黄色が多かっ

た。また、カラギーナン程ではないが、黄色いムコイド状のコロニーがあった。直径約1 mm以上の大きいコロニーが多かった。4種類の固化剤の中では、大きいコロニーの占める割合は2番目に大きかった。但し、カラギーナンと同様に、培養時間が長くなるとサンプルの希釈率が低いシャーレでは、ムコイド状のコロニーがシャーレの大半を覆ってしまうことがあった。

寒天A

コロニーの形は円形が多く、コロニーの色は、淡茶色、茶色が大半を占めた。カラギーナンとゲランガムで確認された黄色いムコイド状のコロニーは確認されなかった。直径約1 mm以下の小さいコロニーが多かった一方で、直径約1 mmから約3 mmの茶色の大きいコロニーが確認された。

寒天B

コロニーの形は円形が多く、コロニーの色は、透明色（半透明色）、淡茶色が大半を占めた。カラギーナンとゲランガムで確認された黄色いムコイド状のコロニーは確認されなかった。直径約1 mm以上のコロニーはほとんどなく、直径約1 mm以下の小さいコロニーがほとんどであった。

以上をまとめると、カラギーナンとゲランガムはコロニーの色、形、大きさに関して良く似ており、黄色いムコイド状のコロニーが確認されたことも似ていた。カラギーナンとゲランガムを固化剤として用いた場合、コロニーの形は円形で、コロニーの色は透明色（半透明色）、白色、黄色（淡黄色）で、大きいコロニーが生育しやすいという傾向が確認された。

一方、寒天Aと寒天Bは、カラギーナンとゲランガムとは非常に異なっていた。特に、大きいコロニーが少なく小さいコロニーが多いのが特徴的であった。寒天Aを固化剤として用いた場合、コロニーの形は円形で、コロニーの色は淡茶色、茶色で、小さいコロニーが生育しやすいという傾向が確認された。また、寒天Bを固化剤として用いた場合、コロニーの形は円形で、コロニーの色は透明色（半透明色）、淡茶色で、小さいコロニーが生育しやすいという傾向が確認された。

表 6-7 固化剤ごとに観察されたコロニーの色

| コロニーの色 | カラギーナン | | ゲランガム | | 寒天A | | 寒天B | |
|------------|--------|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 汚泥A | 汚泥B | 汚泥A | 汚泥B | 汚泥A | 汚泥B | 汚泥A | 汚泥B |
| 透明 (半透明) ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | | | ○ | ○ |
| 白色 ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | | | ○ | |
| 淡黄色 ○ | | | ○ | ○ | | ○ | ○ | ○ |
| 黄色 ○ | ○ | ○ | | ○ | | | | |
| 淡茶色 ○ | | | | | ○ | | ○ | |
| 茶色 ● | | | | | ● | ● | | |
| 黄土色 ○ | | | | | ○ | | ○ | |

丸印の部分は、該当する色のコロニーが観察されたことを示す

表 6-8 固化剤ごとに観察されたコロニーの形と大きさ

| 固化剤の種類 | 汚泥の種類 | コロニーの形 | コロニーの大きさ |
|--------|-------|----------|---------------------------|
| カラギーナン | 汚泥A | 円形が非常に多い | 大きいコロニーが多い 小さいコロニーは少ない |
| | 汚泥B | | |
| ゲランガム | 汚泥A | | 大きいコロニーが多い 小さいコロニーは少ない |
| | 汚泥B | | |
| 寒天A | 汚泥A | | 小さいコロニーが多い 大きいコロニーは少ない |
| | 汚泥B | | |
| 寒天B | 汚泥A | | 小さいコロニーが多い 大きいコロニーは少ない |
| | 汚泥B | | |

大きいコロニーは直径が約 1 mm 以上のコロニーを示す

小さいコロニーは直径が約 1 mm 以下のコロニーを示す

6.4.3 分離株の系統学的位置

汚泥 B のフェノール濃度が中濃度のカラギーナン、ゲランガム、寒天 A、寒天 B を固化剤とする各培養系列 (図 6-1E) から分離株を取得し、それぞれ 37, 27, 42, 31 株の分離株を得た。これらの分離株の 16S rRNA 遺伝子の約 1000 bp の部分塩基配列を解読して、Blastn プログラムによって相同性解析を行い近縁種を決定した。決定した近縁種の系統学

的位置から分離株の綱 (class) レベルでの分類を行った。そして、さらに細かく分類するために、決定した近縁種によって分離株を分類した。また、決定した近縁種との 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性によって分離株を分類した。以下、各分類において確認された特徴的な傾向を整理し、最後にそれらを総合的にまとめた。

なお、複数行った培養系列の中からこの培養系列を選択した理由は、汚泥 B に対しては RNA-SIP 法による嫌氣的フェノール分解細菌の特定を行っており (第4章)、かつフェノール濃度が中濃度であるため、獲得された分離株の多くがフェノール分解能を有していると推測されたためであった。

a) 分離株の綱レベルでの系統学的位置

分離株の系統学的位置を綱 (class) レベルで分類した結果を図 6-3 に示す。

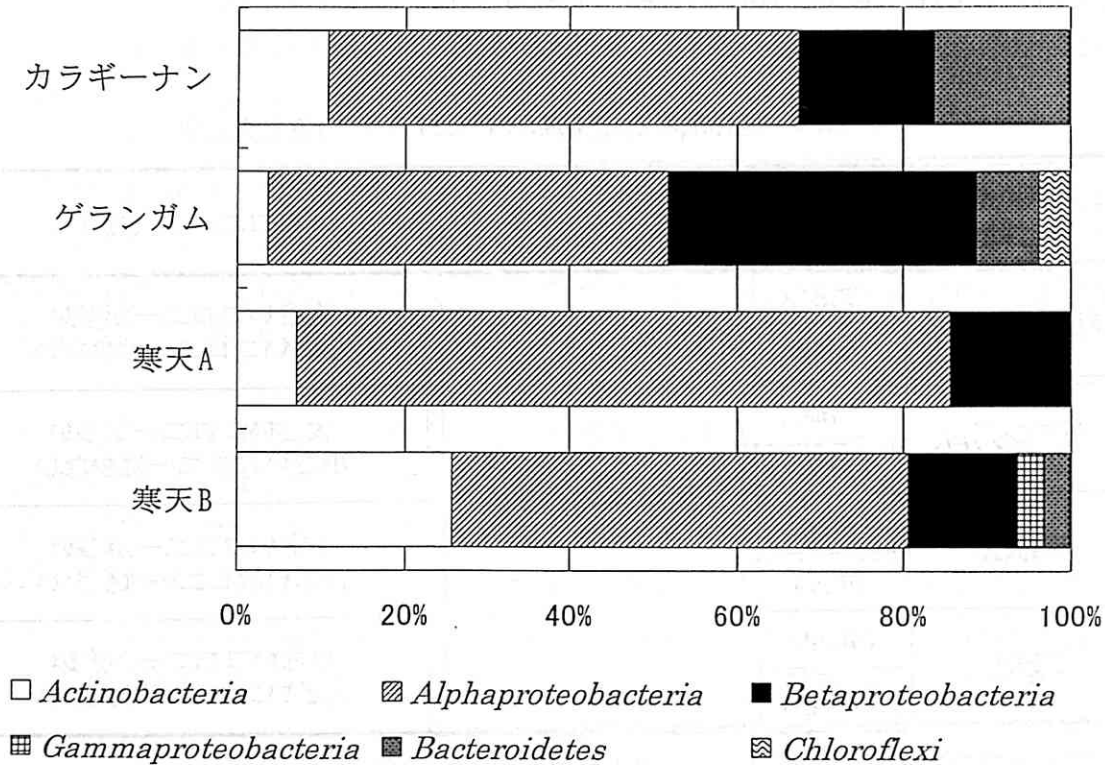


図 6-3 各固化剤における綱レベルでの系統学的位置による分離株の割合

4 種類の固化剤から得られた全分離株 137 株は、全部で 6 綱に分類された。Actinobacteria 綱、Alphaproteobacteria 綱、Betaproteobacteria 綱、Gammaproteobacteria 綱、Bacteroidetes 綱、Chloroflexi 綱の 6 綱であった。また、どの固化剤でも分離株が得られた系統学的位置は Alphaproteobacteria 綱、Betaproteobacteria 綱、Actionbacteria 綱の 3 綱であった。次に、固化剤ごとに見ると、得られた分離株はゲランガム、寒天 B、カラギー

ナン、寒天 A の順に、5, 5, 4, 3 網に分類された。以下、*Alphaproteobacteria* 網、*Betaproteobacteria* 網、*Actinobacteria* 網に属する分離株が各固化剤において占める割合について説明する。

Alphaproteobacteria 網

Alphaproteobacteria 網に属する分離株が各固化剤において占める割合が、どの固化剤でも最も多かった。その割合は、寒天 A > カラギーナン > 寒天 B > ゲランガムの順で、それぞれ 79% > 57% > 55% > 48% であった。どの固化剤共でも分離株のほぼ半数以上が *Alphaproteobacteria* 網に属する分離株であり、特に寒天 A では約 80% を占めていた。また、寒天 A と他の 3 種類の固化剤を比較すると、約 1.5 倍の違いがあった。

Betaproteobacteria 網

2 番目に多かったのが、*Betaproteobacteria* 網に属する分離株であった。同じく、その割合は、ゲランガム > カラギーナン > 寒天 A > 寒天 B の順で、それぞれ 37% > 16% > 14% > 13% であった。ゲランガムと他の 3 種類の固化剤を比較すると、約 2-3 倍の違いがあった。

Actinobacteria 網

3 番目に多かったのが、*Actinobacteria* 網に属する分離株であった。同じく、その割合は、寒天 B > カラギーナン > 寒天 A > ゲランガムの順で、それぞれ 26% > 11% > 7% > 3% であった。寒天 B と他の 3 種類の固化剤を比較すると、約 2-8 倍の違いがあった。

Bacteroidetes 網・*Gammaproteobacteria* 網・*Chloroflexi* 網

一方、*Bacteroidetes* 網、*Gammaproteobacteria* 網、*Chloroflexi* 網の 3 網に属する分離株は、一部の固化剤からしか分離株が得られなかった。まず、*Bacteroidetes* 網に属する分離株は、カラギーナン、ゲランガム、寒天 B からのみ分離された。その割合は、カラギーナン > ゲランガム > 寒天 B の順で、16.2% > 7.4% > 3.2% であった。また、*Gammaproteobacteria* 網と *Chloroflexi* 網に属する分離株は、それぞれ寒天 B とゲランガムから 1 株ずつだけ分離された。

これらの結果から、以下の傾向が確認された。

- カラギーナンを固化剤として用いた場合、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Bacteroidetes* 網が優占的に分離される
- ゲランガムを固化剤として用いた場合、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Betaproteobacteria* 網が優占的に分離される
- 寒天 B を固化剤として用いた場合、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Actinobacteria* 網が優占的に分離される
- 寒天 A を固化剤として用いた場合、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Alphaproteobacteria* 網が優占的に分離される

b) 近縁種に着目した分離株の分類

次に、分離株の 16S rRNA 塩基配列に基づいて決定した近縁種によって、分離株を分類した結果を表 6-9 に示す。表 6-9 には、分離株の固化剤ごとに占める割合を表記し、分離株の相同性を 100-95%・95-90%・90%以下の 3 種類に分類して表記した。また、近縁種が同じ分離株については、固化剤ごとに占める割合に対して分散値を計算し表記した。この分散値が大きければ、該当する分離株の固化剤ごとに占める割合がばらついていることを表している。

4 種類の固化剤から得られた全分離株 137 株は、全部で 27 種類の近縁種に分類された。固化剤ごとに見ると、得られた分離株は寒天 B、寒天 A、ゲランガム、カラギーナンの順に、17, 12, 9, 8 種類の近縁種に分類された。このことから、寒天 B>寒天 A>ゲランガム>カラギーナンの順に、系統学的位置という観点で多様な分離株が得られやすいことがわかった。さらに、近縁種から推定した分離株の系統学的位置と固化剤の種類の間に見られた傾向について以下に述べる。

Alphaproteobacteria 網に分類される分離株の近縁種は、表 6-9 に示すさらに細かい分類を見ると固化剤ごとに違いが確認された。*Hoeflea* sp. KF7 (AB257592), *Ochrobacterium anthropi* (EU275247), *Phyllobacteriaceae* bacterium 905/1 (AM884149), *Silicibacter pomeroyi* DSS-3 (CP000031) に近縁な分離株が、寒天 A を固化剤として用いた場合にだけ分離された。なお、カラギーナン・ゲランガム・寒天 B を固化剤として用いた場合にだけ分離された分離株はなかった。

Betaproteobacteria 網に分類される分離株の近縁種は 3 種類と少なかった。さらに *Betaproteobacteria* 網では *Azoarcus* sp. 22Lin (Y13222) に近縁な分離株が大半を占め、この分離株はゲランガムを固化剤として用いた場合に優占的に分離された。そのため「a) 分離株の網レベルでの系統学的位置」に前述した傾向と同じく、ゲランガムを固化剤として用いた場合に *Betaproteobacteria* 網が優占的に分離されるという傾向を示した。

Bacteroidetes 網に分類される分離株の近縁種は 1 種類 (*Bacteroidetes* bacterium KMM 3903 (AY271623)) だけであったため、「a) 分離株の網レベルでの系統学的位置」に前述した傾向と同じく、カラギーナンを固化剤として用いた場合に *Bacteroidetes* 網が優占的に分離されるという傾向を示した。

これらの結果から、以下の傾向が確認された。

- 寒天 B>寒天 A>ゲランガム>カラギーナンの順に、系統学的位置という観点で多様な分離株が得られやすい
- 寒天 A を固化剤として用いた場合、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Alphaproteobacteria* 網が多様に分離される

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

| class | closest relative (accession no.) | 固化剤ごとに占める分離株の割合(%) | | | | 分散 ^a | 相同性 ^b | 文献 情報 ^c |
|-------------------------|--|--------------------|-----------|------|------|-----------------|------------------|-----------------------|
| | | カラギー ナン | ゲランガ ム | 寒天A | 寒天B | | | |
| Actinobacteria | <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (EF442428) | 2.7 | | | | 1.4 | M | |
| | <i>Corynebacterium singulare</i> (T10999) | 8.1 | | | | 12.3 | H | |
| | Corynebacterium-like bacterium QSSC9-20 (AF170755) | | | 2.4 | | 1.1 | H | |
| | <i>Leifsonia rubeus</i> (AJ488585) | | 3.7 | | 9.7 | 15.7 | H | |
| | <i>Leifsonia</i> sp. (EF527429) | | | | | 3.2 | H | |
| | <i>Microbacterium</i> sp. CQ0110Y (DQ852355) | | | | 3.2 | 2.0 | H | |
| | <i>Ornithinimicrobium</i> sp. TUTT1205 (AB188211) | | | | 3.2 | 2.0 | H | |
| | Propionibacteriaceae bacterium DA02 (EU541469) | | | 2.4 | | 3.2 | H | |
| | <i>Rhodococcus</i> sp. CHNTR32 (DQ337561) | | | 7.1 | | 9.6 | H | |
| | Rubrobacterineae bacterium BR7-21 (EU870951) | | | | 3.2 | 2.0 | M | |
| Alpha proteobacteria | <i>Devosia</i> sp. BD-c194 (EF575560) | | | 11.9 | | 9.7 | H | |
| | <i>Hoeflea siderophila</i> (EU670237) | 24.3 | 18.5 | | | 9.7 | H | |
| | <i>Hoeflea</i> sp. KF7 (AB257592) | | | 19.0 | | 68.0 | H | |
| | <i>Hyphomicrobium</i> sp. P-47 (AM411913) | | 3.7 | | 16.1 | 43.9 | H | |
| | <i>Mesorhizobium ciceri</i> (AY206686) | 10.8 | 3.7 | 4.8 | | 9.3 | H | |
| | <i>Ochrobacterium anthropi</i> (EU275247) | | | 4.8 | | 4.3 | H | |
| | Phyllobacteriaceae bacterium 905/1 (AM884149) | | | 2.4 | | 1.1 | H | |
| | Rhodobacteraceae bacterium D11-58 (AM403283) | 18.9 | 7.4 | | 3.2 | 51.2 | H | |
| | Rhodobacteraceae bacterium D5-41 (AM403195) | 2.7 | | 7.1 | 9.7 | 14.2 | H | |

表 6-9 - (続き)

| class | closest relative (accession no.) | 固化剤ごとに占める分離株の割合(%) | | | 分散 ^a | 相同性 ^b | 文献情報 ^c |
|-----------------------------|--|--------------------|-------|------|-----------------|------------------|-------------------|
| | | カラギーナン | ゲランガム | 寒天 A | | | |
| <i>Alpha proteobacteria</i> | <i>Rhodobium orientis</i> (D80792) | | 14.8 | 16.7 | 35.4 | M | |
| | <i>Silicibacter pomeroyi</i> DSS-3 (CP0000031) | | | 7.1 | 9.6 | M | |
| <i>Beta proteobacteria</i> | <i>Azoarcus</i> sp. 22Lin (Y13222) or <i>Azoarcus</i> sp. FL05 (AF011330) | 16.2 | 37.0 | 14.3 | 174.6 | H | ○ |
| | <i>Bacterium</i> ROME435A (AY998138) or <i>Azoarcus</i> sp. FL05 (AF011330) | | | | 7.8 | H | ○ |
| | <i>Denitrobacter permanens</i> (Y12639) | | | | 7.8 | H | |
| <i>Gamma proteobacteria</i> | <i>Bacterium</i> CYCU-0215 (DQ232379) | | | | 2.0 | H | |
| <i>Bacteroidetes</i> | <i>Bacteroidetes bacterium</i> KMM 3903 (AY271623) | 16.2 | 7.4 | | 37.0 | M | |
| <i>Chloroflexi</i> | <i>Sphaerobacter thermophilus</i> (AJ871226) | | 3.7 | | 2.6 | L | |

a) 分散は、固化剤ごとに占める分離株の割合 (%) に対する値を示す。ある分離株の分散値が大きければ、該当する分離株の固化剤ごとに占める割合がばらばらについていることを表している。

b) 相同性は、H が 100-95%, M が 95-90%, L が 90%以下を示す。

c) 文献情報から該当する分離株に嫌氣的フェノール分解能があると考えられたものを○で示した。

c) 近縁種との相同性による分離株の分類

次に、4種類の固化剤から得られた全分離株 137 株の近縁種との相同性を固化剤ごとにまとめたものを図 6-4 に示す。図 6-4 は表 6-9 に示した相同性を固化剤ごとに表記しなおしたものである。

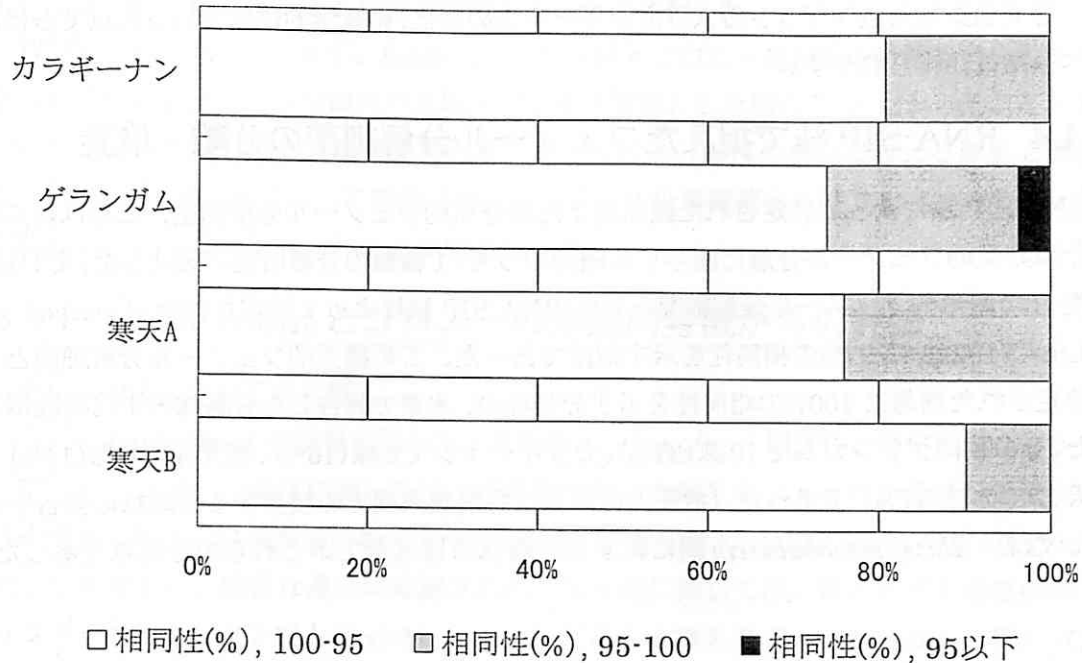


図 6-4 近縁種との相同性によって分類した分離株の割合

どの固化剤でも、約 70%以上の分離株が既存の分離株 (closest relative) と 100-95%の相同性を示した。一方、既存の分離株と 95-100%の相同性を示した分離株は、寒天 A>ゲランガム>カラギーナン>寒天 B の順で、それぞれ 24%>22%>19%>10%であった。カラギーナン・ゲランガム・寒天 A に比べて、寒天 B の値が低かった。

これらの結果から、カラギーナン・ゲランガム・寒天 A に比べて、寒天 B を固化剤として用いた場合は、新規性の高い分離株を得にくいと考えられた。しかし、顕著な違いではなかった。

以上、「a) 分離株の網レベルでの系統学的位置」と「b) 近縁種による分離株の分類」と「c) 近縁種との相同性による分離株の分類」で整理された傾向をまとめると、以下のような傾向が確認された。

- カラギーナンを固化剤として用いた場合、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Bacteroidetes* 網が優占的に分離される
- ゲランガムを固化剤として用いた場合、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Betaproteobacteria* 網が優占的に分離される

- 寒天 B を固化剤として用いた場合、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Actinobacteria* 綱が優占的に分離される
- 寒天 A を固化剤として用いた場合、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Alphaproteobacteria* 綱が優占的にかつ多様に分離される
- 寒天 B > 寒天 A > ゲランガム > カラギーナンの順に、系統学的位置という観点で多様な分離株が得られやすい

6.4.4 RNA-SIP 法で捉えたフェノール分解細菌の分離・培養

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、または嫌氣的または好氣的フェノール分解に関与する細菌のうち、1 種類の分離培養に成功した。それは、汚泥 B で嫌氣的フェノール分解細菌として RNA-SIP 法によって特定された *Azoarcus* sp. 22Lin (Y13222) に 97% の相同性を示す細菌であった。この嫌氣的フェノール分解細菌として特定された細菌に 100% の相同性を示す分離株が、本章で報告した分離株の中に複数得られた。その数はゲランガムで 10 株 (37%)、カラギーナンで 6 株 (16%)、寒天 A で 6 株 (14%)、寒天 B で 2 株 (7%) であった (括弧内の割合は各培養系列での該当する分離株の割合を示す)。なお、*Betaproteobacteria* 綱に属する分離株のほぼ全てがこれらの分離株であった。

6.5 考察

本章では、分離培養法によって嫌氣的フェノール分解細菌を分離・培養することを目的とした。さらに、RNA-SIP 法によって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を分離することを目指した。

以下の考察において、まず、viable count の推移とコロニーの形態的特徴の多様性を指標とした場合と、得られた分離株の系統学的位置を指標とした場合の 2 点からそれぞれ考察を行い、最後に総合的に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た。次に RNA-SIP 法によって特定されたフェノール分解細菌またはフェノール分解に関与する細菌（第 4 章と第 5 章）との比較を行った。

6.5.1 viable count とコロニーの形態的特徴からの評価

viable count についての考察

まず、viable count の推移に関して、基質濃度（フェノール濃度）と固化剤の 2 点から考察する。フェノール濃度に関しては、どの固化剤においてもフェノール濃度が低濃度または中濃度の場合には高濃度の場合よりも、培養 18 週間後の viable count の値が約 2-29 倍大きな値を示し、顕著な違いが確認された。固化剤に関しては、ほとんどの培養条件で、カラギーナンとゲランガムの viable count と寒天 A と寒天 B の viable count の間には大きな差があった。

つまり、より高い viable count を得るためには、フェノール濃度は、高濃度よりも低濃度または中濃度にした方が良いとわかった。一方、固化剤は、寒天 A や寒天 B よりも、カラギーナンやゲランガムを用いる方が良いとわかった。

コロニーの形態的特徴についての考察

次にコロニーの形態的特徴に関して、色、形、大きさの 3 点から考察する。まず、同じ固化剤を用いた場合には、フェノール濃度や活性汚泥が異なっても、生育したコロニーの形態的特徴（色、形、大きさ）には大きな違いが確認されなかった。

カラギーナンとゲランガムを固化剤として用いた場合、コロニーの形は円形で、コロニーの色は透明色（半透明色）、白色、黄色（淡黄色）で、大きいコロニーが生育しやすいという傾向が確認された。寒天 A を固化剤として用いた場合、コロニーの形は円形で、コロニーの色は淡茶色、茶色で、小さいコロニーが生育しやすいという傾向が確認された。寒天 B を固化剤として用いた場合、コロニーの形は円形で、コロニーの色は透明色（半透明色）、淡茶色で、小さいコロニーが生育しやすいという傾向が確認された。

これらをまとめると、コロニーの形には大きな違いは見られなかったが、コロニーの色と大きさにおいて、カラギーナンとゲランガム、寒天 A と寒天 B の 2 つのグループに大別された。コロニーが大きいことは、画線の時に非常に便利であり、コロニーの形態的特徴を見分けやすく異なる形態的特徴を持つコロニーを認識しやすい。カラギーナンとゲラン

ガムはこの点で優れていると言える。

以上の考察をまとめると、より高い viable count とより大きなコロニーを得るには、以下の2つの培養条件を満たすと良いことが分かった。

- ① フェノール濃度は低濃度 (約 10 mg liter⁻¹) または中濃度 (約 100 mg liter⁻¹) にする
- ② 固化剤にはカラギーナンまたはゲランガムを用いる

①は、低濃度の方が培養効率が向上すること (Connon & Giovannoni; Janssen *et al.*, 2002; Sait *et al.*, 2002; Zengler *et al.*, 2002; Joseph *et al.*, 2003) を報告した既往の知見と一致するものであった。本研究で対象とした硝化脱窒プロセスでは、流入原水が 0.6-1.2 L/hour で 45 L の脱窒槽に流入しており、フェノール濃度に換算すると 7.3-20.0 mg/hour/L の流量で流入している。また、脱窒槽のフェノール濃度は本プロセスのほとんどの運転期間を通じて約 0 mg/L であったことから、活性汚泥が晒されているフェノール濃度は数 mg/L であったと考えられた。よって、フェノール濃度が低濃度の培養条件で viable count がより高くなる傾向が見られたのは、実環境を模倣したためであると考えられた。

また、②の中の、固化剤にはゲランガムを用いる、という点は、平板培養法に用いたサンプルや基質が異なるが、Tamakiらの知見と一致するものであった (Tamaki *et al.*, 2005)。Tamakiらは、霞ヶ浦の底泥をサンプルとして使用して、16S rRNA 遺伝子を対象として分子生物学的手法によって捉えられる微生物群集構造と、固化剤としてゲランガムと寒天 A の2種類を用いた平板培養法によって捉えられる微生物群集構造を比較した。分子生物学的手法では、DNA を対象として、PCR 法・クローニング法・シーケンシング法を行なっている。一方、平板培養法では、2種類の培地成分と3種類の培地 pH の合計6通りの条件で好気培養と嫌気培養を行なっている。6通りの培養条件のうち、最も viable count の高かった1つの培養条件に対して、ゲランガムと寒天 A 共にランダムに30コロニーを選択して、16S rRNA 遺伝子のシーケンシング解析を行なっている。

平板培養法によって得られた分離株をゲランガムと寒天 A の間で比較した Tamakiらの結果では、*Alphaproteobacteria* 綱、*Betaproteobacteria* 綱、*Actinobacteria* 綱、*Bacteroidetes* 綱に属する分離株の割合は、ゲランガムではそれぞれ 30%、40%、0%、23%、寒天 A ではそれぞれ 60%、3%、23%、0%であった。ゲランガムでは *Betaproteobacteria* 綱に属する分離株が最も多く分離され、次いで *Actinobacteria* 綱に属する分離株が多く分離されていることがわかる。一方、寒天 A では *Alphaproteobacteria* 綱に属する分離株が最も多く、次いで *Actinobacteria* 綱に属する分離株が多く分離されていることがわかる。これは、本章の結果と非常に良く一致する。

また、Tamakiらは、分子生物学的手法と平板培養法の比較も行なっている。こちらに関

しては、次の節の「6.5.2 分離株の系統学的位置からの評価」で考察する。

6.5.2 分離株の系統学的位置からの評価

汚泥 B のフェノール濃度が中濃度のカラギーナン、ゲランガム、寒天 A、寒天 B を固化剤とする各培養系列 (図 6-1E) から、それぞれ 37, 27, 42, 31 株の分離株を得た。これらの分離株の 16S rRNA 遺伝子 (約 1000 bp) に基づいた綱 (class) レベルでの系統学的位置の結果、以下の傾向が確認された。

- カラギーナンを固化剤として用いた場合、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Bacteroidetes* 綱が優占的に分離される
- ゲランガムを固化剤として用いた場合、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Betaproteobacteria* 綱が優占的に分離される
- 寒天 B を固化剤として用いた場合、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Actinobacteria* 綱が優占的に分離される
- 寒天 A を固化剤として用いた場合、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Alphaproteobacteria* 綱が優占的にかつ多様に分離される
- 寒天 > 寒天 A > ゲランガム > カラギーナンの順に、系統学的位置という観点で多様な分離株が得られやすい

なお、分離株の嫌氣的フェノール分解能については、固化剤をエネルギー源として生育する細菌がいることが知られていることから (Stott *et al.*, 2008)、今回得られた分離株全てが嫌氣的フェノール分解能を有しているとは限らない。さらに、本研究では、時間的な制約から分離株の嫌氣的フェノール分解能を調査する実験を行えなかった。

そこで、分離株の近縁種情報から文献調査を行い、分離株の嫌氣的フェノール分解能を調査・推定した。嫌氣的フェノール分解能を有すると推測された分離株は、*Betaproteobacteria* 綱に分類される *Azoarcus* sp. 22Lin (Y13222) (または *Azoarcus* sp. FL05 (AF011330))、*Bacterium* ROME435Asa (AY998138) (または *Azoarcus* sp. FL05 (AF011330)) に近縁な分離株であった。*Azoarcus* sp. FL05 (AF011330) は、硝酸塩を還元しフェノールを分解する嫌氣的フェノール分解細菌である (van Schie & Young, 1998)。これらの分離株は、ゲランガムを固化剤として用いた培養系列から最も高い割合 (37%) で分離され、次いでカラギーナン (16%)、寒天 A (14%)、寒天 B (7%) の順であった。このことから判断すると、ゲランガムが他の 3 種類の固化剤に比べて、嫌氣的フェノール分解細菌を最も捉えやすいと考えられた。文献情報のみによって判断しているために不確定な要素を含んでいるが、分離株の系統学的位置からの評価の結果として、次の②' が嫌氣的フェノール分解細菌を分離・培養しやすい培養条件として考えられた。

②' 固化剤にはゲランガムを用いる

なお、この②' は、平板培養法に用いたサンプルや基質が異なるが、Tamaki らの知見と一致するものであった (Tamaki *et al.*, 2005)。Tamaki らは分子生物学的手法と平板培養法の比較を行い以下のような報告をした (Tamaki らの報告の概要は前述に詳しい)。ゲランガムを固化剤として用いて分離された分離株では、30 コロニー中 11 コロニーが分子生物学的手法によって得られたクローンと 95% 以上の相同性を示した。一方、寒天 A を固化剤として用いて分離された分離株では、30 コロニー中 1 コロニーだけがそうであった。つまり、固化剤としてゲランガムを用いた場合は、寒天 A を用いた場合よりも分子生物学的手法で捉えられる微生物群集構造に近い分離株を得やすいと考えられる。これは、本章の結果と一致する。しかし、本研究で得られた結果では、*Azoarcus* sp. 22Lin (Y13222) または *Bacterium* ROME435Asa (AY998138) に近縁な 2 種類の分離株のみがこのような傾向を示したに過ぎず、一般化するには結果が不十分と考えられた。

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

「6.5.1 viable count とコロニーの形態的特徴からの評価」では、より高い viable count とより大きなコロニーを得る培養条件として、① フェノール濃度は低濃度または中濃度にする、② 固化剤にはカラギーナンまたはゲランガムを用いる、の 2 点が挙げられた。また、「6.5.2 分離株の系統学的位相からの評価」では、嫌氣的フェノール分解細菌を分離・培養しやすい培養条件として、②' 固化剤にはゲランガムを用いる、の 1 点が挙げられた。これらをまとめると、

- ① フェノール濃度は低濃度 (約 10 mg liter⁻¹) または中濃度 (約 100 mg liter⁻¹) にする
- ② 固化剤にはカラギーナンまたはゲランガムを用いる

の 2 点にまとめることができる。

分離株全てが嫌氣的フェノール分解細菌とは限らないということを考慮すると、より高い viable count を実現して獲得できるコロニー数を増やすことは、嫌氣的フェノール分解細菌が分離される可能性を高めるであろう。また、より大きなコロニーを得ることでコロニーの形態的特徴の違いを見極め、異なるコロニーをより多く拾い上げることができるであろう。こういった理由から、嫌氣的フェノール分解細菌を捉えやすい平板培養条件として上記の 2 点にまとめられた。

6.5.4 RNA-SIP 法で捉えたフェノール分解細菌の分離・培養

「6.4.4 RNA-SIP 法で捉えたフェノール分解細菌の分離・培養」で述べたように、汚泥

B中の嫌氣的フェノール分解細菌として RNA-SIP 法によって特定された *Azoarcus* sp. 22Lin (Y13222)に97%の相同性を示す細菌の分離に成功した。全部で24株分離された。

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

本章の結果および考察から、固化剤としてカラギーナンとゲランガムの有用性が示された。ゲランガムは、JanssenらやTamakiらの報告例があり (Janssen *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 2005; Tamaki *et al.*, 2005)、比較的利用されている固化剤である。一方、カラギーナンは古くから報告はあるが、一般的な微生物の分離に利用されているとは言いがたい。しかし、実際に使用をしてみて、カラギーナンを用いると透明性が高い培地を作成することができ、そのためにコロニーの確認が容易であり、また、前述のように優れた結果を与えるものであった。カラギーナンを平板培養に用いた研究は1976年以降において、既に数例発表されている (Watson & Apirion, 1976; Lines, 1977; Reeslev & Kjeller, 1995)。にもかかわらず、なぜもっと普及しないのか疑問であるが、その理由はよくわからない。培地のpHに影響を与えること、また、血液培地を作成する場合にカラギーナンの固化温度が60℃程度と高いために、添加する血液に影響することなどが問題点として知られている (Lines, 1997)。しかし、もっと利用されてもよいのではないかと感じられた。

6.6 結論

本章では、分離培養法によって嫌氣的フェノール分解細菌を分離・培養することを目的とし、様々なフェノール濃度と固化剤を用いて平板培養法を行なった。さらに、第4章と第5章で述べた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と、嫌氣的または好氣的フェノール分解に関与する細菌を分離することを試みた。本章では、主に次のような結論が得られた。

嫌氣的フェノール分解細菌を捉えやすい平板培養条件として、培養に用いるフェノール濃度と固化剤を、

- ① フェノール濃度は低濃度 (約 10 mg liter⁻¹) または中濃度 (約 100 mg liter⁻¹) にする
- ② 固化剤にはカラギーナンまたはゲランガムを用いる

という条件に設定することが重要である。

さらに、第4章で述べたRNA-SIP法によって汚泥B中の嫌氣的フェノール分解細菌として特定された *Azoarcus* sp. 22Lin (Y13222) に 97% の相同性を示す細菌が 24 株分離された。これらの分離株は、ゲランガムを固化剤として用いた培養系列から最も高い割合で分離され、以下、カラギーナン、寒天A、寒天Bの順であった。

また、本章の目的とは性質が異なるが、用いた4種類の固化剤と得られた分離株の系統学的位置の間に次の傾向が確認された。

- カラギーナンを固化剤として用いた場合は、他の3種類の固化剤を用いた場合よりも *Bacterioidetes* 綱が優占的に分離される
- ゲランガムを固化剤として用いた場合は、他の3種類の固化剤を用いた場合よりも *Betaproteobacteria* 綱が優占的に分離される
- 寒天Bを固化剤として用いた場合は、他の3種類の固化剤を用いた場合よりも *Actinobacteria* 綱が優占的に分離される
- 寒天Aを固化剤として用いた場合は、他の3種類の固化剤を用いた場合よりも *Alphaproteobacteria* 綱が優占的にかつ多様に分離される
- 寒天B > 寒天A > ゲランガム > カラギーナンの順に、系統学的位置という観点で多様な分離株が得られやすい

なお、今回得られた分離株の中には、文献情報に基づく限り嫌氣的フェノール分解能を持っているとは考えにくいものが多数存在した。本章で用いた固化剤を基質として利用する細菌も知られており、それらが分離されている可能性がある。嫌氣的フェノール分解能を有するか否かを確認するためには、フェノールと硝酸塩を用いて液体培養を行い各成分の利用性を確認する必要がある。この点は今後の課題とした。

第7章 嫌氣的フェノール分解細菌の 分離・培養 -汚泥 C-

7.1 はじめに

本章では、前章の第6章と同じく、分離培養法によって嫌氣的フェノール分解細菌を分離・培養することを目的とした。さらに、第4章と第5章で述べた、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と、嫌氣的または好氣的フェノール分解に関与する細菌を分離することを目指した。

まず、第6章で結論した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基本的に用い、さらに海水を培地の一部として使用することを検討した。海水を培地成分として使用した理由は、人工安水処理硝化脱窒プロセスの流入水である人工安水に海水が含まれており、培養環境を実環境に近づけるためである。しかし、海水には様々な塩が含まれており、この塩とその他の培地成分や固化剤がオートクレーブ処理によって様々な化学物質の変化を起こす可能性が考えられた。そこでまず、海水を含む固体培地の作成手順を検討し、沈殿の生成や培地の変色といった培地の顕著な変化が見られない条件を決定した。検討の結果、海水を含む培地を用いるとگرانガムの使用が難しいことがわかった。گرانガムは塩分濃度が高い培地に対しては固化温度が非常に高くなってしまい、オートクレーブ処理後に固化してしまうためであった。そこで、第6章で結論した嫌氣的フェノール分解細菌を捉えやすい平板培養条件のうち固化剤に関しては、گرانガムの使用は中止しカラギーナンを用いることにした。また、比較対象として寒天Aも用いた。フェノール濃度は、① フェノールは低濃度(約 10 mg liter^{-1}) または中濃度(約 $100 \text{ mg liter}^{-1}$) にする、に従った。こうして決定した培養条件を用いて、汚泥Cを供試試料とし、嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養を試みた。

7.2 実験方法

7.2.1 海水を含む固体培地の作成手順の検討

本章では、第6章で決定した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基本的に用いた上で、海水を含む固体培地の使用を検討した。海水を含む培地の使用を検討した理由は、人工安水処理硝化脱窒プロセスの流入水である人工安水に海水が含まれており(海水含有率約60-70%)、培養環境を実環境に近づけるためである。しかし、培地に海

水を含むためか、第6章で報告した固体培地の作成手順に従うと、様々な問題が生じた。具体的には、固化剤を無機塩培地に添加した場合、海水に添加した場合、海水と無機塩培地の混合液に添加した場合には、異なる性状の固体培地が作成された。さらに、固化剤によってはオートクレーブ処理後に固化することや、65℃のウォーターバスに保持した後に固化することが確認された。そこで、海水を含む固体培地を作成するための手順を改めて検討した。

固体培地の作成過程で、培地が固化せず、かつ沈殿の生成や培地の変色が極端に生じないような培地作成手順の検討を行なった。検討内容は以下の2つの場合に対して行った。

- (1) 無機塩培地：海水を1:2で混合した場合（海水含有率67%）
- (2) 無機塩培地：海水を2:3で混合した場合（海水含有率60%）

なお、(1)の海水含有率が67%である理由は、検討を行った時期の人工安水の海水含有率が67%であったためであった。そして、(1)の検討が終了した後、人工安水の海水含有率が60%に変更された。そこで、再び(2)の海水含有率が60%の検討実験を行った。本章では、(2)の検討結果から得られた条件を使用した。

検討では固化剤にはカラギーナン、ゲランガム、寒天Aの3種類を用い、固化剤の量は最終的な培地重量に対して1.5% (wt/wt)とした。フェノール濃度は中濃度の約100 mg mg liter⁻¹とし、硝酸塩濃度は100 mgN liter⁻¹とした。

7.2.2 供試試料

実験室規模の人工安水処理硝化脱窒処理プロセスの脱窒槽から採取した汚泥Cを供試試料とし、第4章でRNA-SIP法の嫌気培養を終えた汚泥を用いた(約30時間の培養)。なお、汚泥Cを採取した時の脱窒槽の水質特性は、pHは7.8前後、温度は33℃前後であった。プロセスの流入水である人工安水は海水を60%含んでいた。海水は君津に位置する新日本製鐵(株)に近い東京湾の海水を用いた。

7.2.3 基本的な培地条件

無機塩培地は、第6章の表6-1に示す培地を使用した。但し、汚泥Cを採取した前後の脱窒槽のpHに合わせて、無機塩培地のpHを7.85に調整して使用した。

無機塩培地に添加する微量培地成分には、第6章で決定したのものを使用した。vitamin solutionは第6章の表6-2に示すDSMZの461番のものを、trace element solutionは第6章の表6-3に示すDSMZの141番のものを使用した。

フェノール濃度は、低濃度・中濃度に設定した。それぞれ約10, 100 mg liter⁻¹のフェノール濃度となるように設定した。固化剤は、カラギーナンと寒天Aを用いた。但し、フェノール濃度が低濃度の培養条件に対しては固化剤としてカラギーナンのみを、フェノール

濃度が中濃度の培養条件に対しては固化剤としてカラギーナンと寒天Aを使用した。なお、ゲランガムの使用を断念した理由は、「7.3.1 海水を含む固体培地の作成手順の検討」で示す。

汚泥 C に対する RNA-SIP 法では、汚泥の培養期間中の硝酸塩濃度は約 $0\text{--}70 \text{ mgN liter}^{-1}$ であった。そこで、固体培地中の硝酸塩濃度も同程度に設定し、最終濃度が約 $22.6 \text{ mgN liter}^{-1}$ ($100 \text{ mgNO}_3 \text{ liter}^{-1}$) となるようにした。

7.2.4 固体培地の作成手順

培地成分の混合割合を表 7-1 に示す。

表 7-1 各培地溶液の混合割合

| 成分 | フェノール濃度の段階 | |
|---|------------|-----------|
| | 低濃度 | 中濃度 |
| 無機塩培地+海水 (2:3の重量比で混合) | 1000.0 ml | 1000.0 ml |
| vitamin solution | 5.0 ml | 5.0 ml |
| trace element solution | 10.0 ml | 10.0 ml |
| フェノール溶液 ($40000 \text{ mg liter}^{-1}$) | 0.25 ml | 2.5 ml |
| NaNO_3 溶液 ($10000 \text{ mgNO}_3 \text{ liter}^{-1}$) | 10.0 ml | 10.0 ml |
| 固化剤 | 15.0 g | 15.0 g |

フェノール溶液・ NaNO_3 溶液・vitamin solution・trace element solution は作成後、 $0.2 \mu\text{m}$ フィルターでろ過滅菌する

表 7-1 の割合で混合すると、フェノール濃度が低濃度・中濃度の培養系列では、フェノール濃度がそれぞれ $9.8, 97.3 \text{ mg liter}^{-1}$ となり、硝酸塩濃度は両方共に $22.0 \text{ mgN liter}^{-1}$ となる。次に、固体培地の作成手順を述べる。

[固体培地の作成手順]

1. 無機塩培地 (表 6-1) を作成した後、pH を 7.85 に調整した。
2. 無機塩培地と海水を 2:3 の重量比で用意した。固化剤を無機塩培地には 0.375% (wt/wt) となるように、海水には 2.25% (wt/wt) となるように添加して、別々に 121°C で 15 分間オートクレーブ処理を行った。
3. オートクレーブ処理終了後、培地をウォーターバスで 65°C に保持した。
4. 65°C に保持されたオートクレーブ処理後の無機塩培地と海水を速やかに混合した。

5. 0.20- μm -pore-size cellulose acetate filter (ADVANTEC)で濾過滅菌した、65°Cに保持されたフェノール溶液、 NaNO_3 溶液、Vitamin solution、Trace element solutionを表7-1に示す割合で速やかに添加した。
6. 添加後、速やかに混合して、シャーレ (BIOBIK社、プラスチック製、直径90 mm高さ15 mm) に分注した。
7. 作成した培地は、常温に冷却後、使用まで AnaeroPack 試薬 (三菱ガス化学 (株)) と嫌気ジャー (三菱ガス化学 (株)) を用いて1晩以上保存した。

7.2.5 培養条件

活性汚泥サンプルを滅菌済み 0.85%NaCl 溶液を用いて 10^2 - 10^7 の範囲で段階的に希釈を行った。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後、次の希釈段階を作成した。希釈したサンプルを、シャーレ1枚に対して100 μl 添加した。プラスチック製のスプレダーでサンプルを塗布した。塗布後、AnaeroPack 試薬と嫌気ジャーを用いて、暗所にて33°Cで約18週間以上培養した。1つの希釈段階に対して、各3枚のシャーレを作成した。

7.2.6 分離株の獲得

新しいコロニーの生育がそれ程見られなくなった培養18週間以降、培養に用いた培地と類似した成分の培地を用いて (海水を市販の人工海水である Livesea salt (DELPHIS) に置き換えた固体培地)、画線を繰り返して純化を行った。コロニーの様子が1種類のコロニー (1種類の微生物) と肉眼または顕微鏡観察で判断できた状態をもって純化作業を終了した。

7.2.7 分離株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列の解読

純化を終了した分離株について、次のようにして16S rRNA 遺伝子塩基配列を解析した。実験手順は第6章の「6.3.7 分離株の16S rRNA 遺伝子塩基配列の解読」に基本的に従った。但し、シーケンシングプライマーは357fプライマー (Lane *et al.*, 1991) のみを使用した。得られた約700 bp程度の部分塩基配列を Blastn プログラムによって解析して、分離株の近縁種を決定し系統学的位置を推定した。

7.2.8 RNA-SIP 法で捉えたフェノール分解細菌の分離・培養

第6章の「6.3.9 RNA-SIP 法で捉えたフェノール分解細菌の分離・培養」で述べたように、解読した16S rRNA 遺伝子塩基配列を用いて、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と嫌氣的または好氣的フェノール分解に関与する細菌の分離株の有無を確認した。

7.3 結果

7.3.1 海水を含む固体培地の作成手順の検討

(1) 無機塩培地：海水を 1 : 2 で混合した場合（海水含有率 67%）の検討結果
まず、以下の①-③の条件に対して、固体培地の作成過程で培地が固化せず、かつ沈殿の生成や培地の変色が極端に生じないような培地作成手順の検討を行なった。

- ① 固化剤を LS sol.*に添加する
- ② 固化剤を無機塩培地に添加する
- ③ 固化剤を無機塩培地と LS sol.*を 1 : 2 で混合した海水含有無機塩培地に添加する

*) なお、海水は限られた量しかなかったため、海水の代用品として人工海水成分として市販されている Livesea salt を使用した。Distilled water 1 liter に対して、37.5 g の Livesea salt を溶解して使用した (LS sol.と表記した)。

固化剤はカラギーナン、ゲランガム、寒天 A の 3 種類を用いた。固化剤の量は最終的な培地重量に対して 1.5% (wt/wt) とした。培地の出来具合についての評価項目は、オートクレープ後の①-③の各培地と最終的に作成された固体培地における色・粘性の有無と沈殿の有無とした。実験手順は次に従った。

[実験手順]

1. 無機塩培地（第 6 章の表 6-1）を作成した後、pH を 7.85 に調整した。
2. 無機塩培地と LS sol. を 1 : 2 の重量比で用意した。
3. 固化剤を①-③の条件で添加した後、121°C で 15 分間のオートクレープ処理をして、培地をウォーターバスで 65°C に保持した。
4. ①と②の場合は、65°C に保持されたオートクレープ処理後の無機塩培地と LS sol. を速やかに混合して、さらに 0.20- μm 孔径の cellulose acetate filter (ADVANTEC) で濾過滅菌済みの 65°C に保持されたフェノール溶液、 NaNO_3 溶液、vitamin solution、trace element solution を表 7-1 に示す割合で速やかに添加した。一方、③の場合は、0.20- μm 孔径の cellulose acetate filter (ADVANTEC) で濾過滅菌済みの 65°C に保持されたフェノール溶液、 NaNO_3 溶液、vitamin solution、trace element solution を表 7-1 に示す割合で速やかに添加した。
5. ①-③共に、添加後は、速やかに混合して、シャーレに分注した。

(注意点) なお、すべての条件においてフェノール濃度は $100 \text{ mg liter}^{-1}$ 、硝酸塩濃度は $100 \text{ mgN liter}^{-1}$ とした。

こうして、作成された培地の特徴を表 7-2 に示す。ゲランガムは、G-①、G-②、G-③共にオートクレーブ終了後に既に固化している場合と、LS sol.と無機塩培地を混合した直後に固化する場合の 2 通りであった。このため、固化剤として使用することが困難であると判断して使用を断念した。カラギーナンは、C-②のみが 65°Cウォーターバスで固化した。C-①と C-③のうち、沈殿のない C-①の作成条件を採用することにした。寒天 A は、固体培地作成中に固化した条件はなく、作成された固体培地中には A-①、A-②は沈殿がなく、A-③は沈殿があった。カラギーナンと同条件で固体培地を作成するのが良いと考え、A-①の作成条件を採用することにした。

以上とまとめると、以下の結論が得られた。

- 無機塩培地と LS sol.を 1 : 2 で混合して LS sol.を含む固体培地を作成する場合、カラギーナンと寒天 A を固化剤として用いるならば、LS sol.に固化剤を添加する作成方法が良い。

表 7-2 作成された培地の特徴

| 培地条件 ^a | 培地成分 | オートクレーブ後の様子 | | | 作成された 固体培地の様子 |
|-------------------|-------------------|---------------------------------|--------------------|-------|-------------------------------|
| | | 色 | 粘性の有無 ^b | 沈殿の有無 | |
| C-① | LS sol. | 淡黄色 | 少し有 | 無 | 淡白色、沈殿無 |
| | 無機塩培地 | 淡白色 (ほぼ透明色) | 無 | 無 | |
| C-② | LS sol. | 透明色 | 無 | 無 | 無機塩培地のみが 65℃ウォーターバス で固化 |
| | 無機塩培地 | 淡茶色 | 少し有 | 無 | |
| C-③ | 無機塩培地+ LS sol. | 白色 | 無 | 無 | 淡白色、若干沈殿有 |
| G-① | LS sol. | 固化剤を入れた LS sol.がオートクレーブ終了後に既に固化 | | | |
| | 無機塩培地 | | | | |
| G-② | LS sol. | 透明色 | 無 | 無 | LS sol.と無機塩培地 を混合直後に固化 |
| | 無機塩培地 | 淡茶色 | 無 | 無 | |
| G-③ | 無機塩培地+ LS sol. | オートクレーブ終了後に既に固化 | | | |
| A-① | LS sol. | 淡黄色 | 無 | 無 | 淡白色、沈殿無 |
| | 無機塩培地 | 淡白色 (ほぼ透明色) | 無 | 無 | |
| A-② | LS sol. | 透明色 | 無 | 無 | 淡茶色、沈殿無 |
| | 無機塩培地 | 濃茶色 | 無 | 無 | |
| A-③ | 無機塩培地+ LS sol. | 白色 | 無 | 有 | 淡白色、若干沈殿有 |

- a) 培地条件の表記法は、左の英文字が固化剤の種類を示しており、右が前述した条件①-③を示している。左の英文字の固化剤は、Cがカラギーナン、Gがゲランガム、Aが寒天Aを示す。
- b) 粘性の有無に関して、各表記は次の状態を示す。少し有と表記がある場合は、ゲル化が少し始まりかけているような状態であるが、完全に固化はしない状態。無と表記がある場合は、固化剤を添加する前の液体の状態とほとんど変わらない状態。

(2) 無機塩培地：海水を2:3で混合した場合（海水含有率60%）の検討結果
実際に実験を行った時期の人工安水の海水含有率は60%であった。そのため、「(1) 無機

塩培地：海水を2:3で混合した場合（海水含有率67%）の検討結果」で得られた結果を踏まえた上で、再び検討実験を行った。今度はLS sol.を海水に置き換えた。固化剤は、カラギーナンと寒天Aを用いた。固化剤の量は最終的な培地重量に対して1.5% (wt/wt)とした。

[実験手順]

1. 無機塩培地（表6-1）を作成した後、pHを7.85に調整した。
2. 無機塩培地と海水を2:3の重量比で用意した。
3. 固化剤を海水に添加した後、オートクレーブ処理をして、培地をウォーターバスで65°Cに保持した。
4. 65°Cに保持されたオートクレーブ処理後の無機塩培地と海水を速やかに混合して、さらに0.20- μm 孔径のcellulose acetate filter (ADVANTEC)で濾過滅菌済みの65°Cに保持されたフェノール溶液、 NaNO_3 溶液、vitamin solution、trace element solutionを表7-1に示す割合で速やかに添加した。
5. 添加後は、速やかに混合して、シャーレに分注した。

（注意点）なお、すべての条件においてフェノール濃度は $100 \text{ mg liter}^{-1}$ 、硝酸塩濃度は $100 \text{ mgN liter}^{-1}$ とした。

結果、寒天Aを固化剤として用いた場合は、表7-2の結果と同じく、問題なく固体培地を作成することができた。一方、カラギーナンを固化剤として用いた場合は、65°Cウォーターバスに保持した所、海水が徐々に固化しはじめて、最終的には固化した。

この固化の様子から推測すると、原因は海水に対するカラギーナンの割合が若干多いためであると推測された。「(1) 無機塩培地：海水を2:3で混合した場合（海水含有率67%）の検討結果」では、LS sol.に対するカラギーナンの割合は2.25% (wt/wt)である。一方、今回の検討実験では、海水に対するカラギーナンの割合は2.5% (wt/wt)である。僅かであるが、この差が固化の原因と考えられた。

そこで、海水に対するカラギーナンの割合を2.25% (wt/wt)として、残りカラギーナンを無機塩培地に添加することにした。すると、無機塩培地に対するカラギーナンの割合は0.375% (wt/wt)となる。結果、カラギーナンを無機塩培地と海水に0.375% (wt/wt)と2.25% (wt/wt)の割合で添加した場合は、問題なく固体培地を作成できた。

以上の結果を踏まえて、無機塩培地と海水にそれぞれ0.375% (wt/wt)と2.25% (wt/wt)の割合で固化剤を添加することに決定した。この条件は、カラギーナンと寒天Aの両方に適用した。このような検討実験を通して、「7.2.3 固体培地の作成手順」で記述した培地作成手順に決定した。

7.3.2 分離株の系統学的位置

フェノール濃度が低濃度で固化剤がカラギーナンの培養系列からは 18 株、フェノール濃度が中濃度で固化剤がカラギーナンまたは寒天 A の培養系列からは、それぞれ 54 株と 80 株の分離株を得た。これらの 16S rRNA 遺伝子の約 700 bp の部分塩基配列を解読して、Blastn プログラムによって相同性解析を行い、近縁種を決定した。決定した近縁種の系統学的位置から分離株の綱 (class) レベルでの系統学的位置を行った。そして、さらに細かく分類するために、決定した近縁種によって分離株を分類した。

a) 分離株の綱レベルでの系統学的位置

分離株の系統学的位置を綱 (class) レベルで分類した結果を図 7-1 に示す。

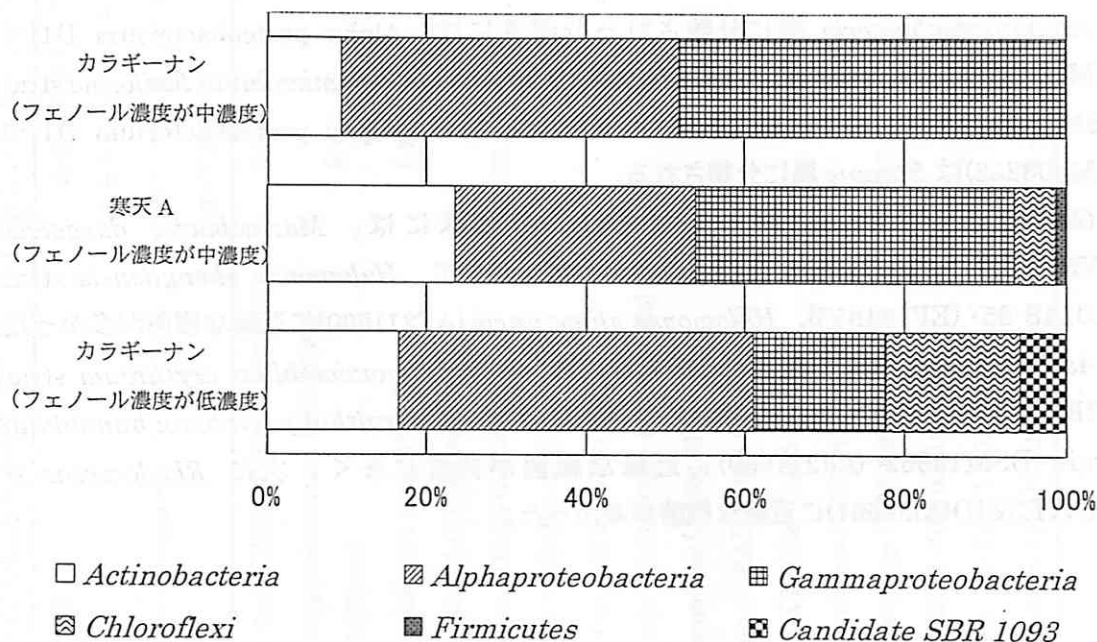


図 7-1 各固化剤における綱レベルでの系統学的位置による分離株の割合

得られた全分離株 152 株は、全部で 6 綱に分類された。Actinobacteria 綱、Alphaproteobacteria 綱、Gammaproteobacteria 綱、Chloroflexi 綱、Firmicutes 綱、Candidate SBR 1093 門 (綱) の 6 綱であった。また、どの培養条件からも Alphaproteobacteria 綱、Gammaproteobacteria 綱、Actinobacteria 綱の 3 綱に分類される分離株が得られ、これら 3 綱に属する分離株の割合の合計は約 78-100%と非常に高かった。次に、培養条件ごとでは、得られた分離株は、カラギーナン (フェノール濃度が中濃度)、寒天 A (フェノール濃度が中濃度)、カラギーナン (フェノール濃度が低濃度) の順に、3, 5, 5 綱に分類された。

どの培養条件においても *Alphaproteobacteria* 綱または *Gammaproteobacteria* 綱に属する分離株の割合が最も多かった。次に多かったのが、*Actinobacteria* 綱に属する分離株であった。一方、*Chloroflexi* 綱、*Firmicutes* 綱、Candidate SBR 1093 門 (綱) に属する分離株は、カラギーナン (フェノール濃度が低濃度) と寒天 A (フェノール濃度が中濃度) の2つの培養条件からのみ分離された。

b) 近縁種に着目した分離株の分類

次に、分離株の 16S rRNA 塩基配列に基づいて決定した近縁種によって、分離株を分類した結果を表 7-3 に示す。表 7-3 には、分離株の培養条件ごとに占める割合を表記し、分離株の相同性を 100-95%・95-90%・90%以下の3種類に分類して表記した。以下、3つの培養条件から得られた全分離株 152 株に関して、分離株が数多く得られた系統学的位置を述べる。

Alphaproteobacteria 綱に分類される分離株には、Alpha proteobacterium D11-55 (AM403232)、*Mesorhizobium* sp. LZXC28 (DQ659074)、*Pedomicrobium fusiforme* strain DSM 5304 (Y14313) に近縁な細菌が多かった。なお、Alpha proteobacterium D11-55 (AM403232) は *Stappia* 属に分類される。

Gammaproteobacteria 綱に分類される分離株には、*Marinobacter daepoensis* (AY517633) に近縁な細菌が圧倒的に多かった。続いて、*Halomonas shengliensis* strain SL014B-85^T (EF121853)、*Halomonas alimentaria* (AF211860) に近縁な細菌が多かった。

Actinobacteria 綱に分類される分離株には、1 株 (*Aeromicrobium erythreum* strain NRRL B-3381 (AF005021)) を除いて 2 種類に分類され、*Ornithinimicrobium humiphilum* strain DSM12362 (AJ277650) に近縁な細菌が非常に多く、次に *Rhodococcus* sp. CHNTR32 (DQ337561) に近縁な細菌が多かった。

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

| class | 近縁種の系統学的位置 closest relative (accession no.) | 培養条件ごとに占める分離株の割合(%) | | | 相同性 ^a | 文献 情報 ^b |
|-----------------------|--|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------|
| | | カラギーナン (フェノール濃 度が低濃度) | 寒天 A (フェノ ール濃度が中濃 度) | カラギーナン (フェノール濃 度が中濃度) | | |
| <i>Actinobacteria</i> | <i>Aeromicrobium erythreum</i> strain NRRL B-3381 (AF005021) | 5.6 | | | H | |
| | <i>Ornithinimicrobium humiphilum</i> strain DSM12362 (AJ277650) | 5.6 | 18.8 | 5.6 | H | |
| | <i>Rhodococcus</i> sp. CHNTR32 (DQ387561) | 5.6 | 5.0 | 3.7 | H | |
| <i>Alpha</i> | Alpha proteobacterium A41 (AB302374) | | 1.3 | 7.4 | H | |
| <i>proteobacteria</i> | Alpha proteobacterium D11-55 (AM403232) | 22.2 | 7.5 | 11.1 | H | |
| | Bacterium SL3.14 (DQ517077) | | | 1.9 | H | |
| | <i>Hyphomicrobium</i> sp. LAT3 (AY934489) | | 1.3 | | H | |
| | <i>Labrys wisconsinensis</i> strain W1215-PCA-4 (EF382666) | | 1.3 | 3.7 | M | |
| | <i>Maricaulis virginensis</i> (AJ301667) | | 1.3 | | H | |
| | <i>Mesorhizobium loti</i> strain CCBAU 85075 (EU256446) | | | 5.6 | H | △ |
| | <i>Mesorhizobium</i> sp. LZXC28 (DQ659074) | | 5.0 | 11.1 | H | |
| | <i>Nitratireductor aquibiodomus</i> NL21 (AF534573) | | 1.3 | | H | |
| | <i>Pedomicrobium fusiforme</i> strain DSM 5304 (Y14313) | 22.2 | 5.0 | 1.9 | H | |
| | <i>Phyllobacterium</i> sp. STM 4022 (EF100518) | | 1.3 | | M | |
| | <i>Rhodobacteraceae</i> bacterium D5-41 (AM403195) | | 3.8 | | H | |
| | <i>Thalassobius aestuarii</i> strain TF-212 (DQ535898) | 5.6 | 1.3 | | H | |

表 7-3 - (続き)

| class | closest relative (accession no.) | 培養条件ごとに占める分離株の割合(%) | | 文献 情報 ^b |
|-------------------------|--|----------------------------|----------------------------|-----------------------|
| | | カラギナン (フェノール濃 度が低濃度) | カラギナン (フェノール濃 度が中濃度) | |
| Gamma proteobacteria | <i>Halomonas alimentaria</i> (AF211860) | 6.3 | 1.9 | H |
| | <i>Halomonas shengliensis</i> strain SL014B-85T (EF121853) | 5.6 | 1.9 | H Δ |
| | <i>Halomonas</i> sp. EEZMo-14 (EF101990) | | 1.9 | H |
| | <i>Halomonas</i> sp. MARC2PPNM (EU019952) | | 5.6 | H |
| | <i>Marinobacter daepoensis</i> (AY517633) | 11.1 | 37.0 | H Δ |
| | <i>Marinobacterium</i> sp. IC961 (AB196257) | | 2.5 | H |
| Firmicutes | <i>Pseudomonas stutzeri</i> (X98607) | | 1.3 | H |
| | <i>Bacillus firmus</i> strain S26-2 (DQ514315) | | 1.3 | L |
| | Anaerobic filamentous bacterium YMTK-2 (AB109438) | 11.1 | | L |
| Chloroflexi | <i>Longilines arvorzyae</i> (AB243673) | 5.6 | | L |
| | <i>Sphaerobacter thermophilus</i> (AJ420142) | | 3.8 | L |
| Candidate SBR 1093 | ND ^c | | 1.3 | L |
| | ND ^c | 5.6 | | L |

a) 相同性は、Hが100-95%, Mが95-90%, Lが90%以下を示す。

b) 文献情報から該当する分離株に嫌氣的芳香族化合物分解能があると考えられたものをΔで示した。

c) ND, not determined. 既存の分離株との相同性が低いため、*Chloroflexi*綱や Candidate SBR 1093 門 (綱) 以外の系統学的的位置に属する分離株が closest relative として検索されてしまうため。

7.3.3 RNA-SIP 法で捉えたフェノール分解細菌の分離・培養

汚泥 C 中の RNA-SIP 法によって特定された嫌氣的フェノール分解細菌の結果との比較を行なった。

a) RNA-SIP 法で捉えた好氣的フェノール分解細菌の分離・培養

汚泥 A と汚泥 C 中で好氣的フェノール分解細菌に関与する細菌と RNA-SIP 法によって特定された細菌に、100%の相同性を示す分離株が 2 種類得られた。好氣的フェノール分解細菌に関与する細菌とは、RNA-SIP 法によって $[^{13}\text{C}_6]$ フェノール由来の ^{13}C を同化していたが、直接的に同化していたのか、間接的に同化していたのか ($[^{13}\text{C}_6]$ フェノールの代謝産物を同化 (cross-feeding 効果)) の判断が難しかった細菌である。

1 種類は、汚泥 A と汚泥 C の両方で特定された *Halomonas alimentaria* (AF211860) に 99%の相同性を示す細菌であった。この分離株は、フェノール濃度が中濃度で固化剤として寒天 A を用いた培養条件から 4 株得られた。一方、フェノール濃度が低濃度または中濃度で固化剤としてカラギーナンを用いた培養条件からは得られなかった。

もう 1 種類は、汚泥 A で特定された *Marinobacterium* sp. strain IC961 (AB196257) に 99%の相同性を示す細菌であった。この分離株は、フェノール濃度が中濃度で固化剤として寒天 A を用いた培養条件から 1 株得られた。一方、フェノール濃度が低濃度または中濃度で固化剤としてカラギーナンを用いた培養条件からは得られなかった。

b) RNA-SIP 法で捉えた嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養

RNA-SIP 法によって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は、分離されなかった。

以上をまとめると、フェノール濃度が中濃度で寒天 A を固化剤として使用した培養条件からのみ、汚泥 A または汚泥 C で RNA-SIP 法によって好氣的フェノール分解細菌に関与する細菌と特定された細菌が 2 種類分離された。一方、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分離には至らなかった。

7.4 考察

本章では、分離培養法によって嫌氣的フェノール分解細菌を分離・培養することを目的とした。さらに、RNA-SIP法によって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を分離することを目指した。

まず、第6章の結果から得られた「嫌氣的フェノール分解細菌を捉えやすい平板培養条件」を踏まえた上で、さらに海水を培地の一部として使用することを検討した。検討した培地を用いて嫌氣的フェノール分解細菌を分離・培養する試みを行った。結果、カラギーナン（フェノール濃度が中濃度）、寒天A（フェノール濃度が中濃度）、カラギーナン（フェノール濃度が低濃度）の3通りの培養条件から、それぞれ54株、80株、53株の分離株を得て、これらの16S rRNA遺伝子の約700 bpの部分塩基配列を解読した。

以下の考察において、得られた分離株の中に嫌氣的フェノール分解能を有する細菌がいるかどうかを文献情報から判断した（本来であれば、フェノール分解能の試験を行うべきであるが、本研究ではそれを行わなかった）。次に、RNA-SIP法によって特定されたフェノール分解細菌またはフェノール分解に関与する細菌（第4章と第5章）との比較を行った。最後に、汚泥Bから得られた分離株（第6章）と汚泥Cから得られた分離株（本章）を比較した。

7.4.1 嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養

文献情報から分離株の嫌氣的フェノール分解能を推定した。しかし、嫌氣的フェノール分解能を持つと推測される分離株はいなかった。そこで、同じく文献情報から分離株の嫌氣的芳香族化合物分解能を推定した。こちらに関しては、いくつか該当するものがあつた。

硝酸塩還元に伴う嫌氣的芳香族化合物分解能を持つと推定された分離株は、*Mesorhizobium loti* strain CCBAU 85075 (EU256446) と *Halomonas shengliensis* strain SL014B-85T (EF121853) と *Marinobacter daepoensis* (AY517633)（または *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain aa-14 (EU652043)）に近縁な分離株であつた。

Mesorhizobium loti strain CCBAU 85075 (EU256446)と同属同種の *Mesorhizobium loti* strain 4FB11 (AF229877) は、脱窒条件下で benzoate や 4OHB (4-hydroxybenzoate) を分解することが報告されている (Song *et al.*, 2000)。

Halomonas shengliensis strain SL014B-85T (EF121853)は、好塩性の原油利用脱窒細菌として分離・特定されている (Wang *et al.*, 2007)。

Marinobacter daepoensis (AY517633) に近縁な分離株は *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain aa-14 (EU652043)にも近縁であつた。*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*には様々な芳香族化合物を利用し硝酸塩還元能（硝酸塩を亜硝酸塩に還元）を持っている株が報告されており、*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain DSM 8798^Tが代表的な株である (Gauthier *et al.*, 1992)。また、*Marinobacter daepoensis*

(AY517633) は、硝酸塩還元能(硝酸塩を亜硝酸塩に還元)を持っている (Yoon *et al.*, 2004)。

このように、嫌氣的フェノール分解能を持つと推定される分離株はいなかったが、嫌氣的芳香族化合物分解能を持つと推定される分離株はいた。但し、第6章でも述べたように、Davis らや Stott らの報告によって、固化剤をエネルギー源として生育する分離株がいることが報告されている (Davis *et al.*, 2005; Stott *et al.*, 2008)。そのため、得られた分離株の嫌氣的フェノール分解能や嫌氣的芳香族化合物分解能を調査するためには、フェノールと硝酸塩を含んだ培地を用いて液体培養を行い、フェノールと硝酸塩の利用性を確認する必要がある。

7.4.2 RNA-SIP 法で捉えたフェノール分解細菌の分離・培養

汚泥 A と汚泥 C 中で好氣的フェノール分解細菌に関与する細菌と RNA-SIP 法によって特定された細菌に、100%の相同性を示す分離株が2種類得られた。1種類は、汚泥 A と汚泥 C の両方で特定された *Halomonas alimentaria* (AF211860) に 99%の相同性を示す細菌であり、もう1種類は汚泥 A で特定された *Marinobacterium* sp. strain IC961 (AB196257) に 99%の相同性を示す細菌であった。それぞれ4株と1株ずつ分離され、フェノール濃度が中濃度で寒天 A を固化剤として用いた培養系列のみから分離された。

第6章では、多様な嫌氣的フェノール分解細菌を捉えうる培養条件として、

- ① フェノールは低濃度 (約 10 mg liter⁻¹) または中濃度 (約 100 mg liter⁻¹) にする
- ② 固化剤にはカラギーナンまたはゲランガムを用いる

という条件を結論した。しかし、本章でカラギーナンを固化剤として用いた培養系列からは、RNA-SIP 法によって特定されたフェノール分解細菌またはフェノール分解に関与する細菌は分離されなかった。

7.4.3 汚泥 B と汚泥 C から得られた分離株の比較

第6章では、汚泥 B から得られた分離株について述べた。以下に第6章での実験手順を簡潔に述べる。無機塩培地にフェノール (有機物源) と硝酸塩 (電子受容体) を添加した固体培地を用いて嫌気培養を行った。フェノール濃度が中濃度のカラギーナン・ゲランガム・寒天 A・寒天 B を固化剤とする各培養系列から分離株を取得し、それぞれ 37, 27, 42, 31 株の分離株を得た。これらの 16S rRNA 遺伝子の約 1000 bp の部分塩基配列を解読して、綱 (class) レベルでの分離株の系統的位置を行った。

本章では、汚泥 C から得られた分離株について述べた。以下に本章での実験手順を簡潔に述べる。海水と無機塩培地の混合液にフェノール (有機物源) と硝酸塩 (電子受容体) を添加した固体培地を用いて嫌気培養を行った。フェノール濃度が中濃度でカラギーナン・寒天 A を固化剤とする各培養系列、フェノール濃度が低濃度でカラギーナンを固化剤とする各培養系列から分離株を取得し、それぞれ 54, 80, 18 株の分離株を得た。これらの 16S rRNA 遺伝子の約 700 bp の部分塩基配列を解読して、綱 (class) レベルでの分離株の

系統学的位置を行った。

まず、汚泥 B と汚泥 C から得られたそれぞれ 137 株と 152 株の全分離株を、網レベルでの系統学的位置によって分類した結果を表 7-4 に示す。

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

| 網レベルでの 分離株の系統学的位置 | 異なる系統学的位置に分類される分離株の割合 (%) | |
|----------------------------|---------------------------|------|
| | 汚泥 B | 汚泥 C |
| <i>Actinobacteria</i> | 12 | 18 |
| <i>Alphaproteobacteria</i> | 61 | 36 |
| <i>Betaproteobacteria</i> | 19 | 0 |
| <i>Gammaproteobacteria</i> | 1 | 40 |
| <i>Bacteroidetes</i> | 7 | 0 |
| <i>Chloroflexi</i> | 1 | 5 |
| <i>Firmicutes</i> | 0 | 1 |
| Candidate SBR 1093 | 0 | 1 |

汚泥 B と汚泥 C の間で割合に大きな違いが見られたのは、*Alphaproteobacteria* 網と *Betaproteobacteria* 網と *Gammaproteobacteria* 網であった。小さな違いが見られたのは、*Actinobacteria* 網と *Bacteroidetes* 網と *Chloroflexi* 網であった。

特に、*Betaproteobacteria* 網と *Gammaproteobacteria* 網に関しては、汚泥 B ではそれぞれ 19% (26 株/137 株) と 1% (1 株/137 株)、汚泥 C ではそれぞれ 0% (0 株/152 株) と 40% (61 株/152 株) と、一方の網に分類される分離株がほとんど得られなかった。さらに細かく見ると、汚泥 B の *Betaproteobacteria* 網に分類される分離株に関しては、2 株 (*Denitrobacter permanens* (Y12639) に近縁な分離株) を除いて、残り全ての株が *Azoarcus* 属に近縁な分離株 (RNA-SIP 法によって嫌氣的フェノール分解細菌と特定された細菌に相当する分離株) であった (表 6-9)。汚泥 C の *Gammaproteobacteria* 網に分類される分離株に関しては、1 株 (*Pseudomonas stutzeri* (X98607) に近縁な分離株) を除いて、残り全ての株が海洋細菌として知られている *Marinobacter* 属と *Halomonas* 属の 2 属に近縁な分離株であった (表 7-3)。

Alphaproteobacteria 網に関しては、汚泥 B では 1 番目に割合が多く (61%)、汚泥 C では 2 番目に割合が多く (36%)、汚泥 B の割合では汚泥 C の割合の約 1.7 倍であった。さらに細かく見ると、*Alphaproteobacteria* 網に分類される分離株に関しては、汚泥 B では *Hoeflea*, *Rhodobacter*, *Rhodobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium* 属が大半を占めており (表 6-9)、汚泥 C では *Alpha proteobacterium* D11-55 (AM403232), *Mesorhizobium*, *Pedomicrobium*, *Alpha proteobacterium* A41 (AB302374), *Rhodobacter* 属が大半を占めていた (表 7-3)。汚泥 B と汚泥 C に共通していたのは、*Mesorhizobium* 属と *Alpha*

proteobacterium D11-55 (AM403232) 属であった。なお、Alpha proteobacterium D11-55 (AM403232)は *Stappia* 属に近縁であり、Alpha proteobacterium A41 (AB302374)は *Roseovarius* 属に近縁である。

Actinobacteria 綱に関しては、汚泥 B では 12%を、汚泥 C では 16%を占めていた (表 7-4)。さらに細かく見ると、汚泥 B では *Leifsonia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium* 属が大半を占めており (表 6-9)、汚泥 C では *Ornithinimicrobium*, *Rhodococcus* 属が大半を占めていた (表 7-3)。汚泥 B と汚泥 C に共通していたのは、*Ornithinimicrobium* 属と *Rhodococcus* 属であった。

Bacteroidetes 綱と *Chloroflexi* 綱に関しては、汚泥 B ではそれぞれ 7% (9 株/137 株) と 1% (1 株/137 株)、汚泥 C ではそれぞれ 0% (0 株/152 株) と 5% (7 株/152 株) と、一方の綱に分類される分離株がほとんど得られなかった。汚泥 B と汚泥 C に共通していたのは、*Chloroflexi* 綱に分類される *Sphaerobacter* 属だけであったが、分離株と近縁種との相同性は 90%以下と非常に低く、同属に分類されるかは不明であった。

以上のように、汚泥 B と汚泥 C から得られた分離株には、その系統学的位置において類似点と相違点が確認された。

また、汚泥 B と汚泥 C の平板培養法に用いた合計 7 つの培養条件ごとに、分離株の綱レベルでの系統学的位置によって分類した結果を図 7-2 に示した。前述の考察では、汚泥 B と汚泥 C の 2 つの区分に分けて分離株の系統学的位置を見たが、図 7-2 のようにさらに細かく 7 つの培養条件に分けて見た場合でも、*Alphaproteobacteria* 綱と *Betaproteobacteria* 綱と *Gammaproteobacteria* 綱に関する汚泥 B と汚泥 C の間の大きな違いは、同様に確認できた。このことから、この大きな違いが生じた原因は、第 6 章と第 7 章の培養条件の違い、つまり、分離源として用いた汚泥 B と汚泥 C の微生物群集構造の違いや、汚泥 B と汚泥 C に対して用いた培養条件の違いに起因すると考えられた。以下、この 2 点に関して考察する。

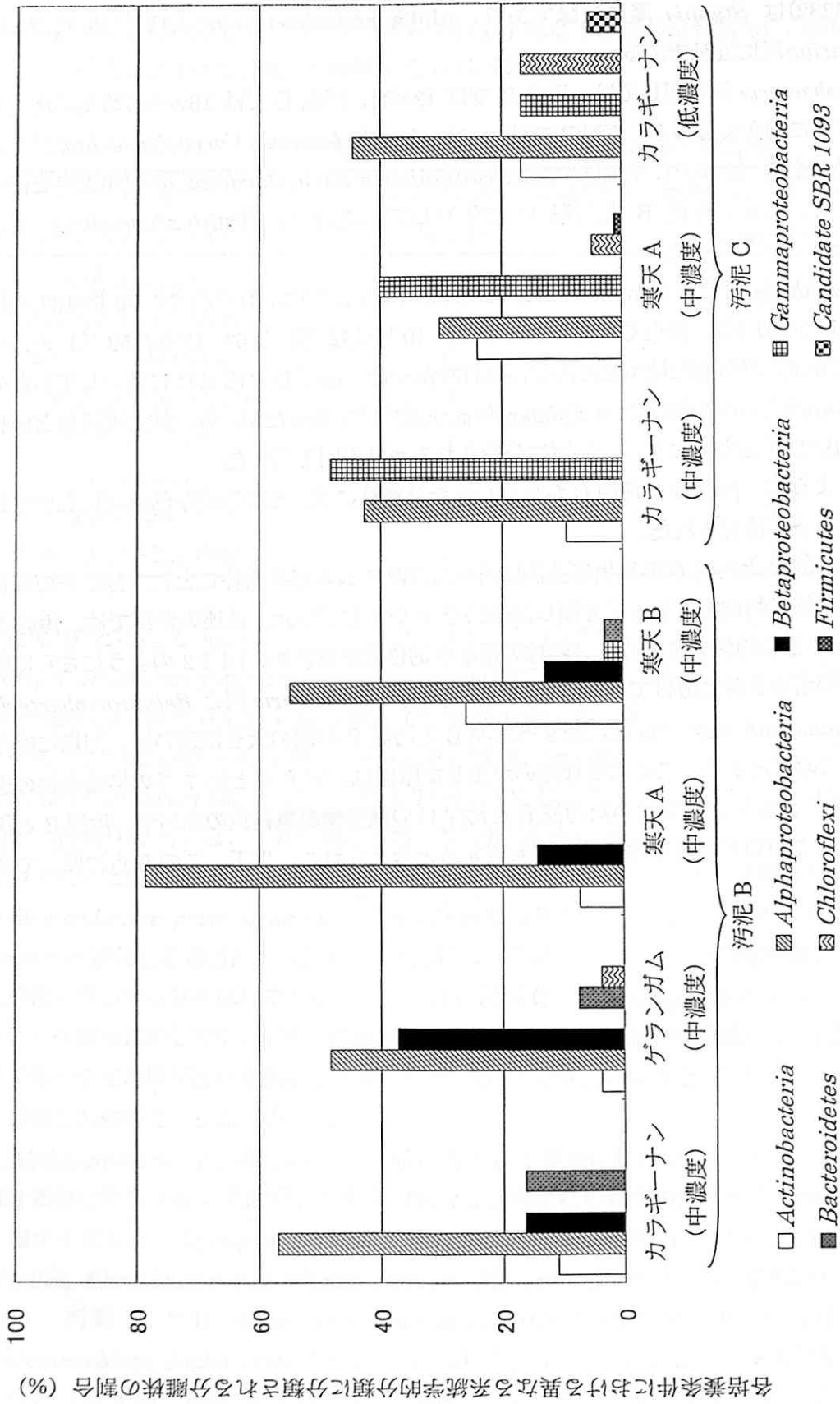


図 7.2 各培養系列において汚泥 B と汚泥 C から得られた分離株の系統学的的位置 (網レベルでの分類)

a) 分離源として用いた汚泥 B と汚泥 C の微生物群集構造の違い

汚泥 B と汚泥 C から得られた分離株の違いが生じたひとつの理由としては、分離源として用いた汚泥 B と汚泥 C の微生物群集構造の違いが考えられた。この違いを考察する前に、分離源として用いた汚泥 B と汚泥 C の微生物群集構造を網レベルで示す (図 7-3)。図 7-3 は、RNA-SIP 法の実験の中で作成した対照ライブラリーにおける網レベルでのクローンの系統学的位置の結果から作成した。

対照ライブラリーとは、RNA-SIP 法を適用した際に、安定同位体で標識されていない [$^{12}\text{C}_6$] フェノールを与えて培養した対照系列において、超遠心後の浮遊密度の高い 1 分画から 16S rRNA を対象として作成したクローンライブラリーである (第 4 章と第 5 章を参照)。大抵の場合、対照系列はどの分画においても微生物群集構造プロファイルがそれ程大きくは変わらない。汚泥 B と汚泥 C に対して行った RNA-SIP 法においても同様であった (図 4-2B と図 4-5B)。よって、表 7-5 に示す網レベルでのクローンの系統学的位置の結果は、汚泥 B と汚泥 C から抽出した RNA をそのままクローニングした結果と大きくは変わらないと考えられる。この前提を踏まえて、この 2 つの対照ライブラリーを汚泥 B と汚泥 C の微生物群集構造を反映しているものとして比較する。

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

| 網レベルでの 分離株の系統学的位置 | 異なる系統学的位置に分類されるクローンの割合 (%) | |
|----------------------------|----------------------------|------|
| | 汚泥 B | 汚泥 C |
| <i>Actinobacteria</i> | 5 | 16 |
| <i>Alphaproteobacteria</i> | 1 | 9 |
| <i>Betaproteobacteria</i> | 28 | 3 |
| <i>Gammaproteobacteria</i> | 57 | 36 |
| <i>Deltaproteobacteria</i> | 1 | 5 |
| <i>Bacteroidetes</i> | 5 | 6 |
| <i>Chloroflexi</i> | 0 | 4 |
| <i>Firmicutes</i> | 0 | 1 |
| <i>Planctomycetes</i> | 1 | 18 |
| <i>Verrucomicrobia</i> | 1 | 0 |
| <i>Gemmatimonadetes</i> | 0 | 2 |
| Others | 1 | 2 |

汚泥 B と汚泥 C の対照ライブラリーの網レベルでのクローンの系統学的位置について、簡単に説明する。汚泥 B における各網の占める割合は *Gammaproteobacteria* 網 > *Betaproteobacteria* 網 > *Bacteroidetes* 網 > *Actinobacteria* 網の順に多く、それぞれ 57% > 28% > 5% > 5% であった。一方、汚泥 C における各網の占める割合は *Gammaproteobacteria*

網>*Planctomycetes* 網>*Actinobacteria* 網>*Alphaproteobacteria* 網>*Bacteroidetes* 網>*Deltaproteobacteria* 網の順に多く、それぞれ 36%>18%>16%>9%>6%>5%であった。

このように、汚泥 B では *Gammaproteobacteria* 網と *Betaproteobacteria* 網の 2 網で全体の 85% を占めているのに対して、汚泥 C では *Gammaproteobacteria* 網と *Planctomycetes* 網と *Actinobacteria* 網と *Alphaproteobacteria* 網と *Bacteroidetes* 網の 5 網で全体の 85% を占めている。

このように、汚泥 B と汚泥 C の微生物群集構造の構成比率は異なっていた。*Betaproteobacteria* 網の占める割合は、クローニング解析の結果では汚泥 B で 28%、汚泥 C で 3% (表 7-5)、平板培養法の結果では汚泥 B で 19%、汚泥 C で 0% (表 7-4) と類似していた。一方、*Alphaproteobacteria* 網と *Gammaproteobacteria* 網やその他の網に関しては、クローニング解析の結果と平板培養法の結果は類似していなかった。特に、汚泥 B では、*Gammaproteobacteria* 網のクローンの割合が 57% に対して、分離株の割合は 1% と非常に大きな差があった。

なお、微生物群集構造の違いを考慮するにあたり、クローニング解析は RT-PCR 法を介して得られた結果であり、PCR 法に付随するバイアスや細菌ごとの rRNA のコピー数の違い (Suzuki & Giovannoni, 1996; Polz & Cavanaugh 1998; Klappenbach *et al.*, 2000; Kanagawa, 2003; Acinas *et al.*, 2004; Isenbarger *et al.*, 2008; Frank *et al.*, 2008; Brons & van Elsas *et al.*, 2008) を考慮する必要はある。

b) 汚泥 B と汚泥 C に対して用いた培養条件の違い

もうひとつの理由として、汚泥 B と汚泥 C に対して用いた培養条件の違いが考えられた。特に、汚泥 B では海水を含まない固体培地を用い、汚泥 C では海水を含む固体培地を用いた点が大きく影響したと考えられた。そして、この点を反映するように、*Gammaproteobacteria* 網に分類される分離株は、汚泥 C では海洋細菌として知られる *Marinobacter* 属と *Halomonas* 属の 2 属に近縁な分離株でほぼ全て占められており、この 2 属に近縁な分離株は全分離株に対して最も多い 40% を占めていた。一方、汚泥 B では、*Gammaproteobacteria* 網に分類される分離株 1 株のみであり、海洋細菌と考えられる系統学的位置の分離株は得られなかった。

以上をまとめると、分離源として用いた汚泥 B と汚泥 C の微生物群集構造の違いに関しては、原因として考えられる要素を抽出できなかった。一方、汚泥 B と汚泥 C に対して用いた培養条件の違いに関しては、海水を培地成分として用いたことがひとつの要素として抽出された。この要素が、汚泥 B と汚泥 C の *Gammaproteobacteria* 網に分類される分離株 (または、海洋細菌として分類される分離株) に大きな影響を与えている一因と考えられた。

7.5 結論

本章では、第6章の結果から得られた「嫌氣的フェノール分解細菌を捉えやすい平板培養条件」を踏まえた上で、さらに海水を培地の一部として使用することを検討した。そして、検討した培地を用いて嫌氣的フェノール分解細菌を分離・培養する試みを行った。

本章では、主に次のような結論が得られた。

海水を含む固体培地を作成する場合、ゲランガムを使用することは困難であった。しかし、カラギーナンと寒天 A を使用することは可能であった。但し、カラギーナンと寒天 A を用いる場合においても、海水や無機塩培地への固化剤の添加量を工夫する必要がある。様々な検討を通して、沈殿の生成や培地の変色といった培地の顕著な変化が見られない海水を含む固体培地の作成手順を決定した。

こうして決定した条件を用いて分離株 152 株を獲得した。そして、RNA-SIP 法によって好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解細菌に関与する細菌と特定された *Halomonas alimentaria* (AF211860) に 99% の相同性を示す細菌 (汚泥 A と汚泥 C) が 4 株分離された。同じく、好氣的フェノール分解細菌と特定された *Marinobacterium* sp. strain IC961 (AB196257) に 99% の相同性を示す細菌 (汚泥 A) が 1 株分離された。いずれもフェノール濃度が中濃度で寒天 A を固化剤として用いた培養系列のみから分離された。

また、汚泥 B と汚泥 C から得られた分離株を比較した。結果、*Alphaproteobacteria* 綱と *Betaproteobacteria* 綱と *Gammaproteobacteria* 綱に分類される分離株の割合に大きな違いが見られた。この違いを生んだ要素として、汚泥 C に対してのみ海水を含む固体培地を使用したことが一因として考えられ、さらにこの影響は *Gammaproteobacteria* 綱に分類される分離株に最も影響を与えたと考えられた。汚泥 C から得られた *Gammaproteobacteria* 綱に分類される分離株は海洋細菌として知られる *Marinobacter* 属と *Halomonas* 属の 2 属に近縁な分離株でほぼ全て占められており、全分離株に対する割合は最も多い 40% を占めていた。一方、汚泥 B から得られた *Gammaproteobacteria* 綱に分類される分離株は、全分離株に対して 1% を占めるに過ぎなかった。

なお、第6章と同じく、今回得られた分離株の中には、文献情報に基づく限り嫌氣的フェノール分解能を持っているとは考えにくいものも存在した。嫌氣的フェノール分解能を有するか否かを確認するためには、フェノールと硝酸塩を用いて液体培養を行い各成分の利用性を確認する必要がある。この点は今後の課題とした。

第8章 総括

本研究では、実験室規模の人工安水処理硝化脱窒プロセス内で機能的に重要な役割を担っていると考えられた嫌氣的フェノール分解細菌（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を得て、フェノールを摂取・同化している細菌）を特定および分離・培養することを目的として掲げ、具体的に以下の点を目的とした。

- (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。

まず、各章（第4章から第7章）で得られた結論を簡潔にまとめる。

第4章

第4章は「嫌氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定」と題し、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。得られた結果を表 8-1 にまとめた。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、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して特定された。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。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) として特定され、この他にも *Pseudomonas* 属に近縁な細菌が特定された。このように、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。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、ひとつの要因として汚泥 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の違いが挙げられた (汚泥 B では約 23℃、汚泥 C では約 33℃)。なお、汚泥 C で嫌氣的フェノール分解細菌と特定された *Marinobacter* 属と *Pelagibacter* 属 (約 900 bp の 16S rRNA 塩基配列から推定された近縁種) に近縁な細菌は、近縁種との相同性が 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。

第5章

第5章は「好氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定」と題し、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。得られた結果を表 8-1 にまとめた。汚泥 A では *Propionibacterium* 属、*Halomonas* 属、*Marinobacterium* 属、*Thauera* 属に近縁な細菌が好氣的フェノール分解細菌として特定され、汚泥 C では *Citriimonas* 属、*Microbispora* 属、*Propionibacterium* 属、*Rhodobacter* 属に近縁な細菌が好氣的フェノール分解細菌として特定された。一方、汚泥 C では *Halomonas* 属に近縁な細菌が好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解に関与する細菌 (cross-feeder) として特定された。このように、*Propionibacterium* 属と *Halomonas* 属に近縁な細菌を除いて、好氣的フェノール分解細菌として特定された細菌は、汚泥 A と汚泥 C では異なっていた。このような違いをもたらしたひとつの要因として、第4章に同じく、汚泥 A と汚泥 C の人工安水処理硝化脱窒プロセスの運転温度の違いが挙げられた (汚泥 A では約 24℃、汚泥 C では約 33℃)。

以上、第4章と第5章において、(目的1) と (目的2) が達成された。

第6章

第6章は「嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養 - 汚泥 A と汚泥 B -」と題し、まず、フェノール濃度および固化剤の種類を変えて平板培養を行い、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た。また、その過程で分離された分離株の一部の系統学的位置を決定し、第4章と第5章で特定された細菌が分離されているかを調べた。これらの結果から、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評価した。結果、以下のような結論が得られた。

嫌氣的フェノール分解細菌を捉えやすい平板培養条件としては、培養に用いるフェノール

ル濃度と固化剤を

- ① フェノール濃度は低濃度 (約 10 mg liter⁻¹) または中濃度 (約 100 mg liter⁻¹) にする
- ② 固化剤にはカラギーナンまたはゲランガムを用いる

ことが重要である。

さらに、第 4 章で汚泥 B 中の嫌氣的フェノール分解細菌として特定された細菌 (*Azoarcus* sp. 22Lin (Y13222) に 97% の相同性を示す細菌) の分離に成功し、全部で 24 株分離された。

なお、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する過程で、用いた 4 種類の固化剤 (カラギーナン・ゲランガム・寒天 A・寒天 B) と得られた分離株の系統学的位置の間に次の傾向が確認された。

- カラギーナンを固化剤として用いた場合は、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Bacteroidetes* 綱が優占的に分離される
- ゲランガムを固化剤として用いた場合は、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Betaproteobacteria* 綱が優占的に分離される
- 寒天 B を固化剤として用いた場合は、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Actinobacteria* 綱が優占的に分離される
- 寒天 A を固化剤として用いた場合は、他の 3 種類の固化剤を用いた場合よりも *Alphaproteobacteria* 綱が優占的にかつ多様に分離される
- 寒天 B > 寒天 A > ゲランガム > カラギーナンの順に、系統学的位置という観点で多様な分離株が得られやすい

第 7 章

第 7 章は「嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養 —汚泥 C—」と題し、第 6 章で結論された平板培養条件①と②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。海水を加えたのは、硝化脱窒プロセスの流入水には海水が含まれており、その環境を模倣した培地にするためであった。こうして、フェノール濃度は①に従った。一方、固化剤については、海水を含む固体培地を作成する場合にはゲランガムを使用することが困難であることがわかった。そのため、固化剤にはカラギーナンを用い比較対象として寒天 A も用いた。但し、カラギーナンと寒天 A を用いる場合においても、海水や無機塩培地への固化剤の添加量を工夫する必要があった。様々な検討を通して、沈殿の生成や培地の変色といった培地の顕著な変化が見られない海水を含む固体培地の作成手順を決定することができた。

こうして決定した培養条件を用いて、嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養を試み、汚泥 C から 152 株を分離した。得られた分離株が嫌氣的フェノール分解能を有するか否かを判断するためには、フェノールと硝酸塩を用いて液体培養を行い各成分の利用性を確認する必要がある。しかし、本研究ではこれを行わなかった。そのため、文献情報からの嫌

氣的フェノール分解能を推測するだけに留まった。

一方、第5章で汚泥A中と汚泥C中の好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解細菌に関与する細菌と特定された細菌 (*Halomonas alimentaria* (AF211860)に99%の相同性を示す細菌) の分離に成功し、全部で4株分離された。同じく、第5章で汚泥A中の好氣的フェノール分解細菌と特定された細菌 (*Marinobacterium* sp. strain IC961 (AB196257)に99%の相同性を示す細菌) の分離にも成功し、1株分離された。

最後に、汚泥Bと汚泥Cから得られた分離株を比較した(第6章と第7章の比較)。結果、*Alphaproteobacteria*綱と*Betaproteobacteria*綱と*Gammaproteobacteria*綱に分類される分離株の割合に大きな違いが見られた。この違いを生んだ要素として、汚泥Cに対してのみ海水を含む固体培地を使用したことが一因として考えられた。汚泥Cから得られた*Gammaproteobacteria*綱に分類される分離株は、海洋細菌として知られる*Marinobacter*属と*Halomonas*属の2属に近縁な分離株でほぼ全て占められており、全分離株に対する割合は最も多い40%を占めていた。このため、海水の影響は*Gammaproteobacteria*綱に分類される分離株に最も影響を与えたと推測された。

以上、第6章と第7章では、フェノール濃度と固化剤に着目して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検討し、さらに海水を含む固体培地の作成手順を、カラギーナンと寒天Aを固化剤として使用した場合において検討し決定した。そして、これらの培養条件を用いて嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養を試みた。汚泥Bから137株、汚泥Cから152株が得られた。但し、これらの分離株の嫌氣的フェノール分解能を確認する実験は行わなかったため今後実施する必要がある。こうして、(目的3)はその一部が達成された。一方、RNA-SIP法によって特定された嫌氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解細菌(第4章と第5章)の一部の分離・培養に成功した。こうして、(目的4)が達成された。

以上が、本研究で得られた結果の各章におけるまとめである。

本研究の初めに掲げた(目的1)から(目的4)については、(目的1)・(目的2)・(目的4)は達成されたが、(目的3)はその一部が達成されたに留まった。(目的3)の達成されなかった部分は今後の課題とした。

本研究の大きな成果のひとつは、人工安水処理活性汚泥内で機能的に重要な役割を担っていると考えられた*Azoarcus* sp. 22Lin (Y13222)に97%の相同性を示す細菌の分離に成功したことであった。この株の生理学的特徴を調査し、安水処理プロセス内での挙動とプロセスの処理状況との関連付けを行うことが、今後の課題であろう。

また、本研究を通して、これまでに嫌氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解細菌としての報告がない細菌がRNA-SIP法によって特定され、かつ、それらの中には

系統学的にも新規な細菌が含まれていることが解明された。これが本研究のもうひとつの大きな成果である。一部の系統学的位置に限られている嫌氣的フェノール分解細菌の知見に対して、新たな知見を提供できたと言える。

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

| フェノール分解細菌の種類 | T-RF 長 | 嫌氣的または好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 | 汚泥 A | 汚泥 B | 汚泥 C | |
| 嫌氣的フェノール分解細菌 | 83 bp | Betaproteobacteria | Azoarcus (※) | | ○ | - | |
| | | | Thauera | | △ | - | |
| | 148 bp | | Pelagibacter ^b | | △ | ○ | |
| | 495 bp | | Pseudomonas | | △ | - | |
| | | | Gamma ⁺ proteobacteria | Microbulbifer ^b | | △ | ○ |
| | | 510 bp | | Pelagibacter | | △ | - |
| | | | Pseudomonas | | △ | - | |
| 好氣的フェノール分解細菌 | 122 bp | Actinobacteria | Propionibacterium | ○ | | ○ | |
| | 276 bp | | Microbispora | - | | ○ | |
| | 439 bp | Alphaproteobacteria | Citriimonas | - | | ○ | |
| | 440 bp | | Rhodobacter | - | | ○ | |
| | 83 bp | Betaproteobacteria | Thauera | ○ | | - | |
| | 495 bp | | Halomonas (※) | ○ | | △ | |
| | 497 bp | Gamma ⁺ proteobacteria | Marinobacterium (※) | ○ | | - | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

○, 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, 属名は、汚泥 A または汚泥 C から得られた約 900-1000 bp の 16S rRNA 塩基配列に基づいて記述した。

但し、276 bp の *Microbispora* 属に近縁な塩基配列のみ 470 bp に基づいて記述した。

※, RNA-SIP 法で特定された細菌と 16S rRNA (遺伝子) 塩基配列において 100% の相同性を示す分離株が得られたもの

今後の課題

本研究の成果を総括していく中で、今後の課題がいくつか提示された。また、その他にも、本研究の成果を踏まえた上で、今後展開していける課題について考えた。これらを以下にまとめた。

a) 本研究の中でやり残した課題

- ◆ (課題 a-1) 人工安水処理活性汚泥内で機能的に重要な役割を担っていると考えられた嫌氣的フェノール分解細菌 (*Azoarcus* sp. 22Lin (Y13222) に 97% の相同性を示す細菌) の生理学的特徴の調査と汚泥中での存在量の確認

まず、*Azoarcus* sp. 22Lin (Y13222) に 97% の相同性を示す細菌に関しては、生育最適条件 (温度・pH・フェノール濃度・硝酸塩濃度)、フェノール分解速度、硝酸塩還元速度、亜硝酸塩蓄積の有無を調査する必要がある。解明された生理学的特徴をプロセスの運転状況に反映し、プロセス運転条件の管理・最適化に貢献することができる。

また、この細菌の人工安水処理活性汚泥内での存在量や空間的分布状況を FISH 法で把握することも重要である。生理学的特徴だけでは把握できない、活性汚泥という実環境中での挙動を解明し、プロセス運転条件の管理・最適化にさらに応用していくためである。

- ◆ (課題 a-2) RNA-SIP 法で特定された新規な嫌氣的フェノール分解細菌 (*Microbulbifer* 属と *Pelagiobacter* 属に近縁な細菌) の汚泥中での存在量の確認

この 2 属に近縁細菌に関しては、現段階では分離株が得られていない。そのため、分離・培養の試みを続けていくことも重要である。また、現段階でこれらの 16S rRNA 全長塩基配列が得られているので、(課題 a-1) で述べたように、人工安水処理活性汚泥内での存在量や空間的分布状況を FISH 法で把握することは可能である。(課題 a-1) と同じく、こういった情報をプロセス運転条件の管理・最適化に応用していく。

- ◆ (課題 a-3) RNA-SIP 法で特定された嫌氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解細菌のフェノール同化の MAR-FISH 法による再確認

本研究では RNA-SIP 法を用いたが、SIP 法に内在する cross-feeding 効果の問題を完全に否定することは原理的に無理である。そのため、同じく cross-feeding 効果の問題を抱えてはいるが、MAR-FISH 法によってフェノールの同化を再確認することも重要である。また、本研究を通じて、 $[^{13}\text{C}_6]$ フェノールを用いて微生物を標識するために必要な時間は、約 2 時間から 10 時間程度の短い時間でも充分であることがわかった。

この培養時間は、MAR-FISH法を適用する場合にも同じく適用でき、さらに培養時間を短くすることも可能であろう。培養時間を短くすれば cross-feeding 効果の可能性は減り、さらに一番初めにフェノールを同化する微生物の特定にもつながる。

よって、MAR-FISH法を適用することで、本研究の成果の再現性を確認することができ、また、RNA-SIP法で特定された嫌氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解細菌の新たな特徴を発見することにもつながるであろう。

◆ (課題 a-4) 得られた分離株の嫌氣的フェノール分解能の確認

本研究では、多様な嫌氣的フェノール分解細菌を捉えうる平板培養条件を検討し、汚泥 B から 137 株、汚泥 C から 152 株を分離した。しかし、これらの分離株の嫌氣的フェノール分解能を確認する実験は行なわなかった。まず、この確認を行い、嫌氣的フェノール分解細菌が分離されているのかどうかを調べる必要がある。そして、この結果を含めて、本研究で結論付けられた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再検討することが重要である。

◆ (課題 a-5) 固化剤としてのカラギーナンの有用性の確認

嫌氣的フェノール分解細菌を捉えやすい平板培養条件の検討を通して、ゲランガムとカラギーナンの有用性が示唆された。しかし、(課題 a-4) で述べたように、検討に用いた評価項目には、得られた分離株が嫌氣的フェノール分解可能を有するか否かという項目は入れなかった。そのため、(課題 a-4) の結果を受けて、カラギーナンの有用性が再評価されるべきである。

また、カラギーナンに関しては、嫌氣的フェノール分解細菌という狭い枠組みに限らず、その他の有用性を模索することも重要であると考えられた。本研究では、海水を含む固体培地を作成する場合、固化剤として利用ができることを示せたのが一例といえる。

b) 本研究の成果を踏まえた上での今後の展開

◆ (課題 b-1) 安水処理の運転管理における研究展開

(課題 a-1)・(課題 a-2) に述べたように、特定または分離・培養された嫌氣的フェノール分解細菌について、分離株の生理学的特徴の調査や人工安水処理活性汚泥内での存在量や空間的分布状況の FISH 法による把握を通じて、プロセス運転条件の管理・最適化に応用できる。

今後、実際の安水処理に硝化脱窒処理プロセスを適用する場合、安水中に含まれるフェノール類を中心とした様々な芳香族化合物を分解することが必要となる。そして、この安水中の様々な芳香族化合物は、コークス製造に使用する石炭の質・コークス製造時にコークス炉内でリサイクルされる廃棄物プラスチック（一般廃棄物プラスチック・産業廃棄物プラスチック）の成分によって変動する。最近では、安価で低質な石炭や廃棄物プラスチック由来の難分解性成分が増えており、そのための対策をとる必要がある。また、実際の安水処理は管理者の経験によって行なわれている場合が多く、安水処理のためのマニュアルがない。このような状況を改善していくためにも、(課題 a-1)・(課題 a-2) で述べたような基礎的知見の集積とプロセス運転状況の関連付けをはかり、安水処理マニュアルを整備していくことが重要と考えられる。

◆ (課題 b-2) 得られた嫌氣的フェノール分解細菌における研究展開

(課題 a-1) で述べた嫌氣的フェノール分解細菌 (*Azoarcus* sp. 22Lin (Y13222) に 97% の相同性を示す細菌) に関しては、代謝経路の決定や代謝に関与する遺伝子の解読 (または全ゲノム解読) が学術的な意味で価値をもつと考えられる。第 2 章で述べたように、嫌氣的フェノール分解細菌の代謝経路にはいくつか経路があり、この分離株が既知の代謝経路を有しているとは限らない。また、本研究では、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を得て、フェノールを摂取・同化していると推測されたに過ぎない。この点に関して、生化学的アプローチと遺伝学的アプローチを行い、代謝経路とその関連遺伝子の解明することが、さらなる新しい知見の提供につながる可能性はある。

◆ (課題 b-3) 実環境を模倣した汚泥培養系の構築

本研究では、フェノール濃度が $70\text{--}270\text{ mg liter}^{-1}$ となるような培養系列で、汚泥の好気培養と嫌気培養を行なった。しかし、実環境では、フェノールが $7.3\text{--}20.0\text{ mg/hour/L}$ の流量で流入し、脱窒槽のフェノール濃度は本プロセスのほとんどの運転期間を通じて約 0 mg/L であったことから、活性汚泥が晒されているフェノール濃度は数 mg/L であったと考えられた。このような実環境を模倣するために、数 mg/L 程度のフェノール濃度を維持できるような、パルス型でフェノール添加が可能な培養システムを作成することも検討するべきであった。今後、RNA-SIP 法を行なう場合は、実環境を模倣した培養システムを作成して行いたい。与えるフェノール濃度が変われば、特定される細菌が異なってくる可能性は十分考えられる。

◆ (課題 b-4) 分離培養法における研究展開

本研究では、基質濃度（フェノール濃度）と固化剤（ゲランガム・カラギーナン・寒天 A・寒天 B）の種類を検討して、人工安水処理活性汚泥内で機能的に重要な役割を担っている嫌氣的フェノール分解細菌の分離に成功した。そして、固化剤の種類ごとに、この分離株が得られた割合が異なっていた。特に、寒天 B からの割合が他の 3 種類の固化剤に比べて低かった。寒天 B は Difco 社から販売されている Bacto Agar という商品である。培養を行なったことがある人にとっては、この寒天 B は広く認識されており固体培地を作成する場合に一般的に使用されているとあって良い。

本研究では、固化剤の種類が得られる分離株の種類に影響を与えるという結果を提示することができた。この結果は、平板培養法における固化剤の選択は重要な点である、という認識を広めるための助けになるであろう。

また、固化剤の種類が得られる分離株の種類に影響を与えた原因を調査することが、平板培養法の改善のための糸口を探る手助けとなるかもしれない。本研究で用いた 4 種類の固化剤を用いて作成した固体培地は、画線をした時の感触から培地表面の状態が異なることが容易に認識された。特に、カラギーナン・ゲランガムは培地表面の水分が多く、一方、寒天 A・寒天 B は少ないと感じた。このような違いは、培地表面という界面（固体と液体が共存する状態）と微生物の間に異なる性質を生じさせると考えられる。この培地表面という界面の性質を様々な観点から評価していくことも、重要であると考えられた。

参考文献

参考文献 (英文)

Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V & Polz MF (2004) Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J Bacteriol* 186: 2629-2635.

Adams MD, Celniker SE, Holt RA *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.

Amann RI, Ludwig W & Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-169.

Anders HJ, Kaetzke A, Kämpfer P, Ludwig W & Fuchs G (1995) Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the *Proteobacteria*. *Int J Syst Bacteriol* 45: 327-333.

Ashmore AG, Catchpole JR & Cooper RL (1967) The biological treatment of carbonization effluents—I. Investigation into treatment by the activated sludge process. *Water Res* 1: 605-624

Ashmore, AG, Catchpole JR & Cooper RL (1968) The biological treatment of carbonization effluents—II. Studied of the influence of liquor composition. *Water Res* 2: 555-562.

Babbar SB, Jain R & Walia N (2005) Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 41: 258-261.

Babbar SB & Jain R (2006) Xanthan gum: an economical partial substitute for agar in microbial culture media. *Curr Microbiol* 52: 287-292.

Baek SH, Kim KH, Yin CR, Jeon CO, Im WT, Kim KK & Lee ST (2003) Isolation and characterization of bacteria capable of degrading phenol and reducing nitrate under low-oxygen conditions. *Curr Microbiol* 47: 462-466.

- Boll M, Fuchs G & Heider J (2002) Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr Opin Chem Biol* 6: 604-611.
- Boll M (2005) Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birch-like reductions. *Biochim Biophys Acta* 1707: 34-50.
- Boll M & Fuchs G (2005) Unusual reactions involved in anaerobic metabolism of phenolic compounds. *Biol Chem* 386: 989-997.
- Boschker, HTS, Nold SC, Wellsbury P, Bos D, Graaf W, Pel R, Parkes RJ & Cappenberg TE (1998) Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ^{13}C -labelling of biomarkers. *Nature* 392:801-805.
- Breinig S, Schiltz E & Fuchs G (2000) Genes Involved in Anaerobic Metabolism of Phenol in the Bacterium *Thauera aromatica*. *J Bacteriol* 182: 5849-5863.
- Breitenstein A, Wiegel J, Haertig C, Weiss N, Andreesen JR & Lechner U (2002) Reclassification of *Clostridium hydroxybenzoicum* as *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* gen. nov., comb. nov., and description of *Sedimentibacter saalensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 801-807.
- Brons JK and van Elsas JD (2008) Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Appl Environ Microbiol* 74: 2717-2727.
- Bruns A, Cypionka H & Overmann J (2002) Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic sea. *Appl Environ Microbiol* 68: 3978-3987.
- Bruns A, Nübel U, Cypionka, H & Overmann J (2003) Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol* 69: 1980-1989.
- Brown PB & Wolfe GV (2006) Protist genetic diversity in the acidic hydrothermal environments of Lassen volcanic National Park, USA. *J Eukaryot Microbiol* 53: 420-431.
- Buckley DH, Huangyutitham V, Hsu S-F & Nelson TA (2007a) Stable isotope probing with ^{15}N

achieved by disentangling the effects of genome G + C content and isotope enrichment on DNA density. *Appl Environ Microbiol* 73: 3189–3195.

Buckley DH, Huangyutitham V, Hsu S-F & Nelson TA (2007b) Stable isotope probing with ^{15}N reveals novel non-cultivated diazotrophs in soil. *Appl Environ Microbiol* 73: 3196-3204.

Bussmann I, Philipp B & Schink B (2001) Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. *J Microbiol Methods* 47 :41–50.

Chakraborty S & Veeramani H (2005) Response of pulse phenol injection on an anaerobic–anoxic–aerobic system. *Bioresource Technology* 96: 761-767.

Chao YM, Tseng IC & Chang JS (2006) Mechanism for sludge acidification in aerobic treatment of coking wastewater. *Journal of Hazardous Materials B*137: 1781-1787.

Chen JA, Li X, Li J, Cao J, Qiu Z, Zhao Q, Xu C & Shu W (2007) Degradation of environmental endocrine disruptor di-2-ethylhexyl phthalate by a newly discovered bacterium, *Microbacterium* sp. strain CQ0110Y. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:676-682.

Choi DH & Cho BC (2006) *Citreimonas salinaria* gen. nov., sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade isolated from a solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2799-2803.

Clement BG, Kehl LE, DeBord KL & Kitts CL (1998) Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J Microbiol Methods* 31: 135-142.

Cannon SA & Giovannoni SJ (2002) High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl Environ Microbiol* 68: 3878_3885

Cooper RL & Catchpole JR (1973) The biological treatment of carbonization effluents—IV. The nitrification of coke oven liquors and other trade wastes and the enhancement of biological oxidation of resistant organic compounds by the addition of growth factors to activated sludge. *Water Res* 7: 1137-1153.

Countway PD, Gast RJ, Savi GP & Caron DA (2005) Protistan diversity estimates based on 18S rDNA from seawater incubations in the western north Atlantic. *J Eukaryot Microbiol* 52: 95-106.

- Davis KER, Joseph SJ & Janssen PH (2005) Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 71: 826-834.
- DeRito CM, Pumphrey GM & Madsen EL (2005) Use of field-based stable isotope probing to identify adapted populations and track carbon flow through a phenol-degrading soil microbial community. *Appl Environ Microbiol* 71: 7858-7865.
- Diez B, Pedrós-Alió C, Marsh TL & Massana R (2001) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl Environ Microbiol* 67: 2942-2951.
- Dumont MG & Murrell JC (2005) Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nat Rev Microbiol* 3:499-504.
- Dumont MG, Neufeld JD & Murrell JC (2006) Isotopes as tools for microbial ecologists. *Curr Opin Biotechnol* 17:57-58.
- Ferrari BC, Binnerup SJ & Gillings M (2005) Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system select for previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 71: 8714-8720.
- Fischer SG & Lerman LS (1979) Length independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16: 191-200.
- Fischer SG & Lerman LS (1983) DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1579-1583.
- Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA & Olsen GJ (2008) Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 74: 2461-2470.
- Franklin FCH, Bagdasarian M, Bagdasarian MM & Timmis KN (1981) Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7458-7462.

- Friedrich, MW (2006) Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. *Curr Opin Biotechnol* 17:59-66.
- Fries MR, Zhou J, Chee-Sanford J & Tiedje JM (1994) Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl Environ Microbiol* 60: 2802-2810.
- Fuhrman JA, McCallum K & Davis, AA (1993) Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific oceans. *Appl Environ Microbiol* 59:1294-1302.
- Futamata H, Harayama S & Watanabe K (2001) Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 67: 4671-4677.
- Gallagher E, McGuinness L, Phelps C, Young LY & Kerkhof LJ (2005) ^{13}C -Carrier DNA shortens the incubation time needed to detect benzoate-utilizing denitrifying bacteria by stable-isotope probing. *Appl Environ Microbiol* 71:5192-5196.
- Gauthier MJ, Lafay B, Christen R, Fernandez L, Acquaviva M, Bonin P & Bertrand JC (1992) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbondegrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 42: 568-576.
- Gibson J & Harwood CS (2002) Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu Rev Microbiol* 56: 345-369.
- Griffiths RI, Manefield M, Ostle N, McNamara N, O'Donnell AG, Bailey MJ & Whiteley AS (2004) $^{13}\text{CO}_2$ pulse labelling of plants in tandem with stable isotope probing: methodological considerations for examining microbial function in the rhizosphere. *J Microbiol Methods* 58: 199-129.
- Glöckler R, Tschsch A & Fuchs G (1989) Reductive dehydroxylation of 4-hydroxybenzoyl-CoA to benzoyl-CoA in a denitrifying, phenol-degrading *Pseudomonas* species. *FEBS Letters* 251: 237-240.
- Gonçalves S & Romano A (2005) Locust bean gum (LBG) as a gelling agent for plant tissue culture media. *Sci Horti* 106: 129-134.
- González JM, Mayer F, Moran MA, Hodson RE & Whitman WB (1997) *Microbulbifer hydrolyticus* gen. nov., sp. nov., and *Marinobacterium georgiense* gen. nov., sp. nov., two marine bacteria from a

- lignin-rich pulp mill waste enrichment community. *Int J Syst Bacteriol* 47: 369–376.
- Gurung, B. (2004) Eubacterial community analysis in nitrification-denitrification process for coke oven wastewater treatment. master's thesis, Graduate school of Frontier Sciences, University of Tokyo.
- Hanada S, Hiraishi A, Shimada K & Matsuura K (1995) *Chloroflexus aggregans* sp. nov., a filamentous phototrophic bacterium which forms dense cell aggregates by active gliding movement. *Int J Syst Bacteriol* 45:676-681.
- Harder J (1997) Anaerobic degradation of cyclohexane-1,2-diol by a new *Azoarcus* species. *Arch Microbiol* 168: 199–204.
- Harder J, Heyen U, Probian C & Foß S (1998) Anaerobic utilization of essential oils by denitrifying bacteria. *Biodegradation* 11: 55-63.
- Harwood CS, Burchhardt G, Herrmann H & Fuchs G (1999) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol Rev* 22: 439-458.
- Hatamoto M, Imachi H, Ohashi A & Harada H (2007) Identification and cultivation of anaerobic, syntrophic long-chain fatty acid-degrading microbes from mesophilic and thermophilic methanogenic sludges. *Appl Environ Microbiol* 73: 1332-1340.
- He Z & Wiegel J (1995) Purification and characterization of an oxygen-sensitive reversible 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum*. *Eur J Biochem* 229: 77-82.
- Heider J & Fuchs G (1997) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur J Biochem* 243:577-596.
- Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL & Pace NR (1998a) Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* 180: 366-376.
- Hugenholtz P, Goebel BM & Pace NR (1998b) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 180: 4765–4774.
- Hugenholtz P, Tyson GW, Webb R, Wagner AM & Blackall LL (2001) Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain bacteria with no known pure-culture representatives. *Appl Environ Microbiol* 67: 411-419.

- Inoue K, Habe H, Yamane H, Omori T and Nojiri H (2005) Diversity of carbazole-degrading bacteria having the car gene cluster: Isolation of a novel gram-positive carbazole-degrading bacterium. *FEMS Microbiol Lett* 245: 145-153.
- Isenbarger TA, Finney M, Ríos-Velázquez C, Handelsman J & Ruvkun G (2008) Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world. *Appl Environ Microbiol* 74: 840-849.
- Jain R, Anjaiah V & Babbar SB (2005) Guar gum: a cheap substitute for agar in microbial culture media. *Lett Appl Microbiol* 41: 345-349.
- Jain R & Babbar SB (2004) Guar gum and isubgol as cost-effective alternative gelling agents for *in vitro* multiplication of an orchid, *Dendrobium chrysotoxum*. *Curr Sci* 88: 292-295.
- Jain R & Babbar SB (2006) Xanthan gum: an economical substitute for agar in plant tissue culture media. *Plant Cell Rep* 25: 81-84.
- Janssen PH, Schuhmann A, Mörchel E & Rainey FA (1997) Novel anaerobic ultramicrobacteria belonging to the *Verrucomicrobiales* lineage of bacterial descent isolated by dilution culture from anoxic rice paddy soil. *Appl Environ Microbiol* 63:1382-1388.
- Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, Taylor PM & Sait M (2002) Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl Environ Microbiol* 68: 2391-2396.
- Jeong YS & Chung JS (2006a) Biodegradation of thiocyanate in biofilm reactor using fluidized-carriers. *Process Biochem* 41: 701-707.
- Jeong YS & Chung JS (2006b) Simultaneous removal of COD, thiocyanate, cyanide and nitrogen from coal process wastewater using fluidized biofilm process. *Process Biochem* 41: 1141-1147.
- Jiang HL, Tay JH & Tay STL (2002) Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol. *Lett Appl Microbiol* 35: 439-445.
- Jiang HL, Tay JH & Tay STL (2004a) Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:602-608.

- Jiang HL, Tay JH, Maszenan AM & Tay STL (2004b) Bacterial diversity and function of aerobic granules engineered in a sequencing batch reactor for phenol degradation. *Appl Environ Microbiol* 70: 6767-6775.
- Jiang HL, Tay STL, Maszenan AM & Tay JH (2006) Physiological traits of bacterial strains isolated from phenol-degrading aerobic granules. *FEMS Microbiol Ecol* 57:182-191.
- Jianlong W, Xiangchun Q, Libo W, Yi Q & Hegemann W (2002a) Bioaugmentation as a tool to enhance the removal of refractory compound in coke plant wastewater. *Process Biochem* 53: 777-781.
- Jianlong W, Xiangchun Q, Liping H, Yi Q, Hegemann W (2002b) Microbial degradation of quinoline by immobilized cells of *Burkholderia pickettii*. *Wat Res* 36: 2288-2296.
- Joseph SJ, Hugenholtz P, Sangwan P, Osborne CA & Janssen PH (2003) Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 69: 7210-7215.
- Junca H & Pieper DH (2003) Amplified functional DNA restriction analysis to determine catechol 2, 3-dioxygenase gene diversity in soil bacteria. *J Microbiol Methods* 55: 697-708.
- Junca H & Pieper DH (2004) Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR DNA clone libraries. *Environ Microbiol* 6: 95-110.
- Juteau P, Côté V, Duckett MF, Beaudet R, Lépine F, Willemur R & Bisaillon JG (2005) *Cryptanaerobacter phenolicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobe that transforms phenol into benzoate via 4-hydrobenzoate. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 245-250.
- Kaeberlein T, Lewis K & Epstein SS (2002) Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296: 1127-1129.
- Kanagawa T. (2003) Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J Biosci Bioeng* 96: 317-323.
- Kaplan CW, Astaire JC, Sanders ME, Reddy BS & Kitts CL (2001) 16S Ribosomal DNA terminal restriction fragment pattern analysis of bacterial communities in feces of rats fed *Lactobacillus*

acidophilus NCFM. *Appl Environ Microbiol* 67: 1935-1939.

Kaplan CW & Kitts CL (2003) Variation between observed and true terminal restriction fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *J Microbiol Methods* 54: 121-125.

Kasuga I, Nakajima F & Furumai H (2007) Diversity of catechol 2,3-dioxygenase genes of bacteria responding to dissolved organic matter derived from different sources in a eutrophic lake. *FEMS Microbiol Ecol* 61: 449-458.

Keller M & Zengler K (2004) Tapping into microbial diversity. *Nature Microbiol* 2: 141-150.

King RJ, Short KA & Seidler RJ (1991) Assay for detection and enumeration of genetically engineered microorganisms which is based on the activity of a deregulated 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase. *Appl Environ Microbiol* 57: 1790-1792.

Kitts CL (2001) Terminal restriction fragment patterns, a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2: 17-25.

Kim YM, Park D, Jeon CO, Lee DS, Park JM (2008) Effect of HRT on the biological pre-denitrification process for the simultaneous removal of toxic pollutants from cokes wastewater. *Bioresour Technol* in press.

Klappenbach JA, Dunbar JM & Schmidt TM (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66: 1328-1333.

Kogure K, Shimidu U & Tada N (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can J Microbiol* 25: 415-420.

Kourtev PS, Nakatsu CH & Konopka AI (2006) Responses of the Anaerobic Bacterial Community to Addition of Organic C in Chromium(VI)- and Iron(III)-Amended Microcosms. *Appl Environ Microbiol* 72: 628-637.

Kowalska M, Bodzek M & Bohdziewicz J (1998) Biodegradation of phenols and cyanides using membranes with immobilized microorganisms. *Process Biochem* 33: 189-197.

Lack A, Tommast I, Aresta M & Fuchs G (1991) Catalytic properties of phenol carboxylase. *In vitro*

- study of CO₂: 4-hydroxybenzoate isotope exchange reaction. *Eur J Biochem* 197: 473-479
- Lack A & Fuchs G (1992) Carboxylation of Phenylphosphate by Phenol Carboxylase, an Enzyme System of Anaerobic Phenol Metabolism. *J Bacteriol* 174: 3629-3636.
- Lack A & Fuchs G (1994) Evidence that phenol phosphorylation to phenylphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* sp. *Arch Microbiol* 161: 132-139.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing, In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, New York, N.Y. p. 115-175.
- Lay-Son M & Drakides C (2008) New approach to optimize operational conditions for the biological treatment of a high-strength thiocyanate and ammonium waste: pH as key factor. *Wat Res* 42: 774-780.
- Leadbetter JR (2003) Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr Opin Microbiol* 6:274-281.
- Leander M, Vallaeyts T & Fulthorpe R (1998) Amplification of putative chlorocatechol dioxygenase gene fragments from α - and β -*Proteobacteria*. *Can J Microbiol* 44: 482-486.
- Lee MW & Park JM (1998) Biological nitrogen removal from coke plant wastewater with external carbon addition. *Water Environment Research* 70: 1090-1095.
- Lee N, Nielsen PH, Andreasen KH, Juretschko S, Nielsen JL, Schleifer KH & Wagner M (1999) Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography—a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 65: 1289-1297.
- Ley RE, Harris JK, Wilcox J, Spear JR, Miller SR, Bebout BM, Maresca JA, Bryant DA, Sogin ML & Pace NR (2006) Unexpected diversity and complexity of the guerrero negro hypersaline microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 72: 3685-3695.
- Li T, Bisailon JG, Villemur R, Létourneau L, Bernard K, Lépine, F & Beaudet R (1996) Isolation and characterization of a new bacterium carboxylating phenol to benzoic acid under anaerobic conditions. *J Bacteriol* 178: 2551-2558.

- Li YM, Gu G, Zhao J & Yu H (2001) Anoxic degradation of nitrogenous heterocyclic compounds by acclimated activated sludge. *Process Biochem* 37:81-86.
- Lim BR, Hu HY, Huang Y & Fujie K (2002) Effect of seawater on treatment performance and microbial population in a biofilter treating coke-oven wastewater. *Process Biochem* 37:943-948.
- Lim BR, Hu HY & Fujie K (2003) Biological degradation and chemical oxidation characteristics of coke-oven wastewater. *Water, Air, and Soil Pollution* 146: 23-33.
- Lines, AD (1977) Value of the K⁺ salt of carageenan as an agar substitute in routine bacteriological media. *Appl Environ Microbiol* 34: 637-639.
- Liu B, Zhang F, Feng X, Liu Y, Yan X, Zhang X, Wang L & Zhao L (2006) *Thauera* and *Azoarcus* as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactors revealed by microbial community structure comparison. *FEMS Microbiol Ecol* 55: 274-286.
- Liu W-T, Marsh TL, Cheng H & Forney L (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragments of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63: 4516-4522.
- Lu Y & Conrad R (2005) *In situ* stable isotope probing of methanogenic archaea in the rice rhizosphere. *Science* 309: 1088-1090.
- Lueders T, Manefield M & Friedrich MW (2004a) Enhanced sensitivity of DNA- and RNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environ Microbiol* 6:73-78.
- Lueders T, Pommerenke B & Friedrich MW (2004b) Stable-isotope probing of microorganisms thriving at thermodynamic limits: syntrophic propionate oxidation in flooded soil. *Appl Environ Microbiol* 70:5778-5786.
- Lueders T, Kindler R, Miltner A, Friedrich MW & Kaestner M (2006) Identification of bacterial micropredators distinctively active in a soil microbial food web. *Appl Environ Microbiol* 72:5342-5348.
- McClure NC, Fry JC & Weightman AJ (1991) Survival and catabolic activity of natural and genetically engineered bacteria in a laboratory-scale activated-sludge unit. *Appl Environ Microbiol* 57:366-373.

- Manefield M, Whiteley AS, Ostle N, Ineson P & Bailey MJ (2002a) Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16:2179-2183.
- Manefield M, Whiteley AS, Griffiths RI & Bailey MJ (2002b) RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to Phylogeny. *Appl Environ Microbiol* 68:5367-5373.
- Manefield M, Griffiths RI, Leigh MB, Fisher R & Whiteley AS (2005) Functional and compositional comparison of two activated sludge communities remediating coking effluent. *Environ Microbiol* 7:715-722.
- Manefield M, Griffiths R, McNamara NP, Sleep D, Ostle N & Whiteley A (2007) Insights into the fate of a ^{13}C labeled phenol pulse for stable isotope probing (SIP) experiments. *J Microbiol Methods* 69: 340-344.
- Maranón E, Vázquez I, Rodríguez J, Castrillón L, Fernández Y & López H (2008) Treatment of coke wastewater in a sequential batch reactor (SBR) at pilot plant scale. *Bioresource Technol* 99: 4192-4198.
- Marsh TL (1999) Terminal restriction fragment (T-RFLP), an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr Opin Microbiol* 2: 323-327.
- Martín HG, Ivanova N, Kunin V *et al.* (2007) Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. *Nature Biotechnol* 24: 1263-1269.
- Mechichi T, Stackebrandt E, Gad'on E and Fuchs G (2002) Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov.. *Arch Microbiol* 178: 26-35.
- Molin G & Nilsson I (1985) Degradation of phenol by *Pseudomonas putida* ATCC 11172 in continuous culture and different ratios of biofilm surface to culture volume. *Appl Environ Microbiol* 50: 946-950.
- Moeseneder MM, Winter C, Arrieta JM & Herndl GJ (2001) Terminal-restriction fragment (T-RFLP) screening of a marine archaeal clone library to determine the different phylotypes. *J Microbiol Methods* 44: 159-172.

- Murase J & Frenzel P (2007) A methane-driven microbial food web in a wetland rice soil. *Environ Microbiol* 9: 3025-3034.
- Muyzer G, Dewaal EC & Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gelelectrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- Muyzer G & Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Osborn AM, Moore ERB & Timmis, KN (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* 2: 39-50.
- Ostle N, Whiteley AS, Bailey MJ, Sleep D, Ineson P & Manefield M (2003) Active microbial RNA turnover in a grassland soil estimated using a ^{13}C spike. *Soil BiolBiochem* 35: 877-885.
- Padmanabhan P, Padmanabhan S, DeRito C, Gray A, Gannon D, Snape JR, Tsai CS, Park W, Jeon C & Madsen EL (2003) Respiration of ^{13}C -labeled substrates added to soil in the field and subsequent 16S rRNA gene analysis of ^{13}C -labeled soil DNA. *Appl Environ Microbiol* 69: 1614-1622.
- Park D, Lee DS, Kim YM, Park JM (2008) Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility. *Bioresour Technol* 99: 2092-2096.
- Piza FF, Prado PI & Manfio GP (2004) Investigation of bacterial diversity in Brazilian tropical estuarine sediments reveals high actinobacterial diversity. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 317-328.
- Polz MF & Cavanaugh CM (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* 64: 3724-3730.
- Rabus R & Widdel F (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 163: 96-103.
- Rabus R & Widdel F (1996) Utilization of alkylbenzenes during anaerobic growth of pure cultures of

- denitrifying bacteria on crude oil. *Appl Environ Microbiol* 62: 1238-1241.
- Rabus R, Kube M, Heider J, Beck A, Heitmann K, Widdel F & Reinhardt R (2005) The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 183: 27-36.
- Radajewski S, Ineson P, Parekh NR & Murrell C (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403:646-649.
- Radajewski S, McDonald IR & Murrell JC (2003) Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* 14:296-302.
- Rappé MS & Giovannoni SJ (2003) The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* 57: 369-394.
- Reh fuss M & Urban J (2005) *Alcaligenes faecalis* subsp. *Phenolicus* subsp. nov. a phenol-degrading, denitrifying bacterium isolated from a graywater bioprocessor. *Syst Appl Microbiol* 28: 421-429.
- Reeslev M & Kjeller A (1995) Comparison of biomass dry weights and radial growth rates of fungal colonies on media solidified with different gelling compounds. *Appl Environ Microbiol* 61: 4236-4239.
- Richards DJ & Shieh WK (1989) Anoxic-oxic activated-sludge treatment of cyanides and phenols. 33: 32-38.
- Rosenbaum V & Riesner D (1987) Temperature gradient gel electrophoresis: thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys Chem* 26: 235-246.
- Rosencrantz D, Rainey FA & Janssen PH (1999) Culturable populations of *Sporomusa* spp. and *Desulfovibrio* spp. in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl Environ Microbiol* 65:3526-3533.
- Ryu SH, Chung BS, Le NT, Jang HH, Yun PY, Park W & Jeon CO (2008) *Devosia geojensis* sp. nov., isolated from diesel-contaminated soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 633-636.
- Sait M, Hugenholtz P & Janssen PH (2002) Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ Microbiol*

4: 654-666.

Sakai S, Imachi H, Sekiguchi Y, Ohashi A, Harada H & Kamagata Y (2007) Isolation of key methanogens for global methane emission from rice paddy fields: A novel isolate affiliated with the clone cluster Rice Cluster I. *Appl Environ Microbiol* 73: 4326-4331

Sakai S, Imachi H, Hanada S, Ohashi A, Harada H & Kamagata Y (2008) *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order *Methanocellales* ord. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 929-936.

El-Sayed WS, Ibrahim MK, Abu-Shady M, El-Beih F, Ohmura N, Saiki H & Ando A (2003) Isolation and characterization of phenol-catabolizing bacteria from a coking plant. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:2026-2029.

van Schie PM & Young LY (1998) Isolation and Characterization of Phenol-Degrading Denitrifying Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64: 2432-2438.

Schmeling S, Narmandakh A, Schmitt O, Gad'on N, Schühle K & Fuchs G (2004) Phenylphosphate Synthase: a New Phosphotransferase Catalyzing the First Step in Anaerobic Phenol Metabolism in *Thauera aromatica*. *J Bacteriol* 186: 8044-8057.

Schmidt TM, DeLong EF & Pace NR (1991) Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol* 173: 4371-4378.

Schoenborn L, Yates PS, Grinton BE, Hugenholtz P & Janssen PH (2004) Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70: 4363-4366.

Schühle K & Fuchs G (2004) Phenylphosphate carboxylase: a new C-C lyase involved in anaerobic phenol metabolism in *Thauera aromatica*. *J Bacteriol* 186: 4556-4567.

Schwartz E (2007) Characterization of growing microorganisms in soil through stable isotope probing with H₂¹⁸O. *Appl Environ Microbiol* 73: 2541-2546.

Segura A, Hurtado A, Rivera B & Lazaroaie MM (2008) Isolation of new toluene-tolerant marine strains of bacteria and characterization of their solvent-tolerance properties. *J Appl Microbiol* 104:

1408-1416.

Sei K, Asano K, Tateishi N, Mori K, Ike M & Fujita M (1998) Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways. *J Biosci Bioeng* 88: 542-550.

Sekiguchi Y, Takahashi H, Kamagata Y, Ohashi A & Harada H (2001) In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green non-sulfur bacteria, subdivision I. *Appl Environ Microbiol* 67: 5740-5749.

Shinoda Y, Sakai Y, Ue M, Hiraishi A & Kato N (2000) Isolation and Characterization of a New Denitrifying Spirillum Capable of Anaerobic Degradation of Phenol. *Appl Environ Microbiol* 66: 1286-1291.

Song B, Häggblom MM, Zhou J, Tiedje JM & Palleroni NJ (1999) Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 49: 1129-1140.

Song B, Palleroni NJ & Häggblom MM (2000) Isolation and characterization of diverse halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. *Appl Environ Microbiol* 66: 3446-3453.

Sorokin DY, Tourova TP, Antipov AN, Muyzer G & Kuenen JG (2004) Anaerobic growth of the haloalkaliphilic denitrifying sulfur-oxidizing bacterium *Thi alkalivibrio thiocyanodenitrificans* sp. nov. with thiocyanate. *Microbiology* 150: 2435-2442.

Suzuki MT & Giovannoni SJ (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* 62: 625-630.

Stott WB, Crowe MA, Mountain BW, Smirnova AV, Hou S, Alam M & Dunfield PF (2008) Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand. *Environ Microbiol* in press.

Takasaki Y, Satoh H, Onuki M, Mino T, Ito K & Miki O (2007) Behavior of nitrite oxidizers in the nitrification/denitrification process for the treatment of simulated coke-oven wastewater. *J Wat*

Environ Technol 5: 29-36.

Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, Nakamura K, Nomura N, Matsumura M & Kamagata Y (2005) Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl Environ Microbiol* 71: 2162-2169.

Taylor BF, Campbell WL & Chinoy I (1970) Anaerobic degradation of the benzene nucleus by a facultatively anaerobic microorganism. *J Bacteriol* 102: 430-437.

Thomas S, Sarfaraz S, Mishra LC & Iyengar L (2002) Degradation of phenol and phenolic compounds by a defined denitrifying bacterial culture. *World J Microbiol Biotechnol* 18: 57-63.

Tomb JF, White O, Kerlavage AR *et al.* (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388: 539-547.

Toh SK & Ashbolt NJ (2002) Adaptation of anaerobic ammonium-oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:344-352.

Tschech A & Fuchs G (1987) Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads *Arch Microbiol* 148: 213-217.

Tschech A & Fuchs G (1989) Anaerobic degradation of phenol via carboxylation to 4-hydroxybenzoate: in vitro study of isotope exchange between $^{14}\text{CO}_2$ and 4-hydroxybenzoate. *Arch Microbiol* 152: 594-599.

Uphaus RA, Flaumenhaft E & Katz JJ (1967) A living organism of unusual isotopic composition. Sequential and cumulative replacement of stable isotopes in *Chlorella vulgaris*. *Biochim Biophys Acta* 141:625-632.

Vaillancourt FH, Bolin JT & Eltis LD (2006) The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Critical Rev Biochem Mol Biol* 41: 241-267.

Valle A, Bailey MJ, Whiteley AS & Manefield M (2005) *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) affect microbial community composition and function in activated sludge. *Environmental Microbiology* 6:424-433.

Vázquez I, Rodríguez J, Marañón E, Castrillón L & Fernández Y (2006a) Simultaneous removal of

- phenol, ammonium and thiocyanate from coke wastewater by aerobic biodegradation. *J Hazard Materials* 137: 1773-1780.
- Vázquez I, Rodríguez J, Marañón E, Castrillón L & Fernández Y (2006b) Study of the aerobic biodegradation of coke wastewater in a two and three-step activated sludge process. *J Hazardous Materials* B137: 1681-1688.
- Venter CJ, Adams MD, Myers EW *et al.* (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
- Venter CJ, Remington K, Heidelberg JF *et al.* (2004) Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74.
- Wang YN, Cai H, Chi CQ, Lu AH, Lin XG, Jiang ZF & Wu XL (2007) *Halomonas shengliensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, crude-oil-utilizing bacterium *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1222-1226.
- Watanabe K, Hino S & Takahashi N (1996a) Effects of exogenous phenol-degrading bacteria on performance and ecosystem of activated sludge. *J Ferment Bioeng* 82: 291-298.
- Watanabe K, Hino S & Takahashi N (1996b) Responses of activated sludge to an increase in phenol loading. *J Ferment Bioeng* 82: 522-524.
- Watanabe K, Teramoto M, Futamata H & Harayama S (1998) Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 64: 4396-4402.
- Watanabe K, Teramoto M & Harayama S (1999) An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. *Appl Environ Microbiol* 65: 2813-2819.
- Watanabe K, Futamata H & Harayama S (2002) Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategies. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 655-663.
- Watson N & Apirion D (1976) Substitute for agar in solid media for common usages in microbiology.

Appl Environ Microbiol 31: 509-513.

Weller R, Bateson MM, Heimbuch BK, Kopczynski ED & Ward DM (1992) Uncultivated cyanobacteria, Chloroflexus-like inhabitants, and spirochete-like inhabitants of a hot spring microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 58:3964-3969.

White JM, Jones DD, Huang D & Gauthier JJ (1988) Conversion of cyanide to formate and ammonia by a pseudomonad obtained from industrial wastewater. *J Industrial Microbiol* 3: 263-272.

Whiteley AS & Bailey MJ (2000) Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Appl Environ Microbiol* 66: 2400-2407.

Whiteley AS, Manefield M & Lueders T (2006) Unlocking the 'microbial black box' using RNA-based stable isotope probing technologies. *Curr Opin Biotechnol* 17:67-71.

Whiteley AS, Thomson B, Lueders T & Manefield M (2007) RNA stable-isotope probing. *Nature Protocols* 17:67-71.

Widdel F & Rabus R (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol* 12: 259-276.

Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-271.

Yamada T, Imachi H, Ohashi A, Harada H, Hanada S, Kamagata Y & Sekiguchi Y (2007) *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum *Chloroflexi* isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2299-2306.

Yoon JH, Lee KC, Kho YH, Kang KH, Kim CJ & Park, YH (2002) *Halomonas alimentaria* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 123-130.

Zengler K, Richnow HH, Rosselló-Mora R, Michaelis W, Widdel F (1999) Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* 401:266-269.

Zengler K, Toledo G, Rappé M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM & Keller M (2002) Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15681-15686.

Zhang M, Tay J, Qian Y & Gu X (1998) Coke plant wastewater treatment by fixed biofilm system for COD and NH₃-N removal. *Wat Res* 32: 519-527.

Zhang X & Wiegel J (1990) Isolation and partial characterization of a *Clostridium* species transforming p-hydroxybenzoate and 3,4-dihydroxybenzoate and producing phenols as the final transformation products, *Microb. Ecol.* 20, 103-121.

Zhang X & Wiegel J (1994) Reversible conversion of 4-hydroxybenzoate and phenol by *Clostridium hydroxybenzoicum*. *Appl Environ Microbiol* 60: 4182-4185.

参考文献 (和文)

末岡一男(2002) 液体培養法を用いた安水処理活性汚泥中の微生物単離の試み、東京大学工学部都市工学科卒業論文

末岡一男(2004) プレート培養法を用いた安水処理活性汚泥中における微生物単離の試み、東京大学大学院新領域創成科学研究科修士論文

新田見匡(2003) 亜硝酸還元酵素遺伝子に着目した脱窒細菌解析手法の確立及びその活性汚泥微生物群集構造解析への適用 東京大学大学院新領域創成科学研究科博士論文

服部勉、1987年、『大地の微生物世界』岩波新書(黄版)

宮本武明、赤池敏宏、西成勝好、2003年、『天然・生体高分子材料の新展開』シーエムシー出版

山崎恵美(2002) 製鉄所排水(安水)の硝化脱窒処理プロセスにおける真正細菌群集構造解析、東京大学大学院新領域創成科学研究科修士論文

謝辞

卒業論文から 7 年間、安水処理活性汚泥中に生息する微生物を対象に研究を行ってきました。私が所属する味埜佐藤研究室では、新日本製鐵（株）との共同研究という位置づけで、安水処理活性汚泥中に生息する微生物に関する研究が始まりました。そして、当時学部 4 年生であった私は、味埜佐藤研究室側の共同研究者の一員として研究に関わることになりました。以来、多くの学生によって、安水という特徴的な環境に生息する微生物が分子生物学的手法と分離培養法を用いて解明されてきました。その中で、私は微生物の分離・培養に特に強く惹かれ、卒業論文・修士論文・博士論文を通じて、安水処理活性汚泥に生息する微生物を分離培養法によって解明してきました。その間、約 1500 株の分離株を分離し、新規性の高い微生物の多さに驚き、興奮し、安水処理に関わる微生物に魅了されていたのを鮮明に記憶しております。その気持ちは今でも静かに熱く燃えております。こうした流れを受け、本研究では近年著しく発展を遂げてきた SIP 法と微生物学の純然たる王道である分離培養法を用いて、嫌氣的フェノール分解細菌を解明することになりました。

本研究を行うにあたり、指導教官である佐藤弘泰准教授（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）には大変お世話になりました。卒業論文からの 7 年間、楽しく研究を進めることができました。本論文の審査では、木暮一啓教授（東京大学海洋研究所海洋生態系動態部門）、黄光偉准教授（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）、栗栖太准教授（東京大学大学院工学系研究科工学部附属水環境制御研究センター）、味埜俊教授（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）に副査を快く引き受けていただきました。貴重なご意見を頂きましたこと、感謝いたします。また、新日本製鐵（株）側の共同研究者として、三木理博士、伊藤公夫博士、加藤敏朗博士、加藤文隆博士（共に先端技術研究所エネルギー・環境基盤研究部）には、本研究で対象とした活性汚泥や人工安水処理硝化脱窒プロセスの実験データを提供していただきました。改めてお礼を申し上げます。

なお、本研究は（財）鉄鋼業環境保全技術開発基金からの研究助成を受けて行われましたことをここに記し、感謝いたします。