

| Title        | アジア都市河川に生息する細菌の群集構造と活性           |
|--------------|----------------------------------|
| Author(s)    | 見坂, 武彦                           |
| Citation     | 大阪大学, 2000, 博士論文                 |
| Version Type | VoR                              |
| URL          | https://doi.org/10.11501/3169334 |
| rights       |                                  |
| Note         |                                  |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

アジア都市河川に生息する細菌の群集構造と活性

7406

24-34

見坂武彦

アジア都市河川に生息する細菌の群集構造と活性

# 見 坂 武 彦

.

.

目次

| 緒論   |                              | 1  |
|------|------------------------------|----|
| 本論   |                              | ·  |
| 第一章  | HNPP-FISH 法を用いた細菌群集構造解析法の最適化 | 3  |
| 第二章  | アジア都市河川環境の微生物学的評価            | 14 |
| 総括   |                              | 28 |
| 結論   |                              | 31 |
| 謝辞   |                              | 32 |
| 引用文献 |                              | 33 |
|      |                              |    |

# Abbreviations

| A.T.      | ambient temperature                                       |
|-----------|---|
| CFU       | colony forming units                                      |
| Cy3-FISH  | fluorescent in situ hybridization with mono-Cy3 labelled  |
|           | oligonucleotide probe                                     |
| DAPI      | 4',6-diamidino-2-phenylindole                             |
| DVC       | direct viable counting                                    |
| DVC-FISH  | combination of fluorescent in situ hybridization          |
|           | with direct viable count approach                         |
| EC        | electric conductivity                                     |
| FISH      | fluorescent in situ hybridization                         |
| FITC      | fluorescein isothiocyanate                                |
| FITC-FISH | fluorescent in situ hybridization with mono-FITC labelled |
|           | oligonucleotide probe                                     |
| HNPP      | 2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate     |
| HNPP-FISH | HNPP and Fast Red TR in situ hybridization                |
| SYBR-II   | SYBR green II   |
| TDC       | total direct count  |
| TOC       | total organic carbon                                      |
| W.T.      | water temperature   |

微生物は生物圏に広く生息し、多種多様な物質の分解、循環を通して、生態系を支えて いる.例えば動植物に由来する有機物を無機化し、栄養塩の再利用を促進している.また 農薬や合成洗剤など環境中に放出された様々な化学物質を分解し、環境浄化に大きく貢献 している.つまり微生物のこれらの働きがなければ、物質は循環せず、生態系の恒常性は 維持できないといえる.このため微生物による化学物質の分解性を予測することは、環境 負荷の軽減に重要な意味を持ち、日本をはじめ多くの先進国では、化学物質の製造にあた り生分解試験が課せられている<sup>1-3)</sup>.また微生物は分解者として環境中で機能している一方、 上位の生物に栄養源として利用され、生産者としての役割も担っている.この概念は microbial loop として 1980 年代から認識されるようになり<sup>4)</sup>、生物圏における炭素の流れ を説明する上で必須のものとなっている.

このように環境中の微生物はその存在の重要性が認識されているにもかかわらず,群集 の基本的情報,すなわち群集構造やそれを構成する個体の生理活性に関する情報ですら, いまだ十分には理解されていない.この大きな理由として,現在一般的に用いられている 培養法では,環境中のごく一部の細菌しか検出できないことが挙げられる.つまり培養法 により得られる細菌数は,直接計数法による値に比べ通常 10 倍から 1000 倍低く<sup>5-11</sup>, 培養を基本とする手法のみでは,環境中の微生物群集に関する情報が制限される.このよ うに培養の難しい細菌であっても,その多くは生理活性を有していることが明らかとなっ ている<sup>12-14)</sup>.またこれらの細菌の一部は感染能力や毒素産生能力を持つことが報告されて おり<sup>15,16</sup>,培養困難な細菌の重要性が認識されてきている.したがって環境中に生息する 細菌の群集構造を解析しその生理活性を評価するためには,培養操作に依存しない検出法 が必要となる.

環境中に生息する細菌を培養することなく属種レベルで明らかにする方法として、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法が 1990 年以降環境微生物学に応用されつつあ る<sup>17-19)</sup>. FISH 法は蛍光プローブを用いて菌体内の rRNA に対してハイブリダイゼーショ ンを行い、特定の細胞を検出する方法である. rRNA は、界 (kingdom)、科 (family)、属 (genus)、種 (species) 等のレベルで共通な塩基配列をその中に含んでいる<sup>19)</sup>. したがって 目的に応じた配列をプローブとして利用することによって、属や種に関する遺伝情報をも とにした特定細菌の検出が可能となる. しかしながら、FISH 法の検出感度は菌体内の

rRNA 含量に依存することから<sup>17,19</sup>, 貧栄養な環境に生息する rRNA 含量が低い細菌に対しては,その応用が制限される場合が多い.そこで本研究では検出感度の向上を目的として,蛍光色素 HNPP (2-hydroxy-3-naphthoic acid-2' phenylanilide phosphate) および Fast Red TR を用いた FISH 法 (HNPP-FISH 法) に着目した<sup>20)</sup>.本法はプローブに標識した酵素の反応により,蛍光強度を増幅させる手法である.本研究では,まず標準株を用いて HNPP-FISH 法の検出条件の最適化を試み,本法を河川水中の細菌群集構造解析に応用しそ の有効性について検討した.河川は湖沼,地下水などと同様,淡水資源として人間の生活 に不可欠なものであり,同時に親水空間として我々の生活に深く関わっている.

FISH 法の検出感度は細菌の rRNA 含量に依存することから,細菌の生理活性を知る指標の一つとなる<sup>17,19</sup>.一方,飢餓状態に入った細菌では rRNA の半減期は数日であることが報告されており<sup>21)</sup>, FISH 法は厳密には細菌の生死を評価できる手法ではない.環境中では生きている細菌,高い生理活性を持つ細菌は物質循環における寄与が大きいと推察される.そこで DVC (direct viable counting) 法を行った試料に対して FISH を行い (DVC-FISH 法)<sup>9,22)</sup>,生きている細菌を対象とした群集構造解析を試みた.DVC 法は試料に培地成分と DNA gyrase を阻害する抗菌剤を加えて一定時間インキュベートする手法であり, 増殖能を有する細菌は抗菌剤により細胞分裂が阻害されるため伸長・肥大する<sup>6)</sup>.この時 タンパク合成が行われ,細胞内の rRNA 含量が増加する.このような試料に対し FISH を 行うことにより,細菌の属種とタンパク合成能を同時に検出することが可能となる.

本研究では、DVC-FISH 法を東南アジアの河川に生息する細菌の群集構造解析とその生 理活性評価に応用した.東南アジア諸国では,急速に都市化,工業化が進み,生活排水, 工業廃水,さらには多量の農薬の使用による水質汚濁が深刻化している<sup>23-26)</sup>.環境中に放 出された汚染物質は微生物による分解を受けるため,生態系に対する汚染物質の影響を評 価するにあたっては,微生物学的な検討が求められている.しかしながら環境微生物学は 主に冷温帯に位置する欧米諸国を中心に発展してきたため,東南アジアなどの熱帯に生息 する細菌に関する知見は,未だ限られている.そこで本研究ではマレーシアの首都クアラ ルンプールを流れる Kelang 川,タイの首都バンコクを流れる Chao Phraya 川,さらに大 阪市周辺の河川を対象として都市河川に生息する細菌の現存量,生理活性,群集構造を調 査し,河川環境の微生物学的評価を試みた.

第一章 HNPP-FISH 法を用いた細菌群集構造解析法の最適化

特定の種,属などの細菌を特異的にシングルセルレベルで検出する方法として,FISH 法 が 1990 年以降環境微生物学に応用されつつある<sup>17-19</sup>. FISH 法は細菌の rRNA の塩基配 列をターゲットとしたプローブを作成し,その末端を fluorescein isothiocyanate (FITC) など の蛍光色素でモノラベルして検出を行うという方法が一般的である.このようなシングル セルレベルでの検出法では,同時に細菌の生理活性の情報を得ることが可能であり,将来 的には多重染色法を用いて細菌の持つ複数の遺伝子情報,例えば属種と機能等を同時に知 ることができる.

FISH 法はその有用性が認識されているものの,検出感度は菌体内の rRNA 含量に依存 することから<sup>17,19</sup>,貧栄養な環境に生息する rRNA 含量が低い細菌に対しては,その応用 が制限される場合が多い.そこで本研究では,蛍光基質として HNPP および Fast Red TR を用いた HNPP-FISH 法を用い<sup>20)</sup>,蛍光シグナルの増強を試みた. HNPP-FISH 法ではま ずジゴキシゲニンで 5<sup>\*</sup>-末端を標識したプローブを用いて in situ ハイブリダイゼーション を行う (Fig. 1).次にアルカリフォスファターゼを結合させた抗ギゴキシゲニン抗体を加え てプローブと結合させる.ここに蛍光基質である HNPP を添加すると HNPP が HNP に 脱リン酸化され,さらに Fast Red TR を添加することによって蛍光物質 HNP/TR が生成さ れる.この反応ではアルカリフォスファターゼに活性がある限り HNP/TR が細胞内に沈着 する.したがってこのような酵素反応を利用した系を用いることにより,蛍光シグナルを

DIG-labelled probe



Fig. 1. Principle of HNPP-FISH.

増強することができる. HNPP-FISH 法では, FITC でモノラベルしたプロ ーブを用いた FITC-FISH 法に比べ約 8 倍強い蛍光が得られることが示され ている <sup>20)</sup>.

本章ではまず水環境に多く生息す ると報告されている細菌群を標的と したプローブを用いて HNPP-FISH 法の最適化を行った.そして本法を河

川水中の細菌群集構造解析に応用し、その有効性を検討した.

# 材料および方法

#### 細菌株と培養

*Escherichia coli* は LB 培地 (1% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) を用いて 37℃で振盪培養した. 他の菌株は LB 培地 (ただし, *Flavobacterium* 属は 0% NaCl, *Vibrio* 属は 3% NaCl, 他の菌株は 0.5% NaCl) を用いて 30℃ で振盪培養した.

#### 採水地点

1996年,箕面川上流の高山,大阪市内を 流れる寝屋川の北橋にて表層水を採取した (Fig. 2).高山は箕面治水ダムの上流に位置 し,山林地帯にある.川幅は狭く,両岸は 草や木が生い茂っている.寝屋川の北橋は 大阪ビジネスパーク内に位置する.上流に は小規模な工場が多く集まった地域があり, 住宅密集地域の一部では家庭排水が流れ込 んでいる.

#### 細菌数ならびに全有機炭素値の測定

コロニー形成数 (CFU) の測定にあたっ
 ては, R2A 培地<sup>27)</sup> に試料水を塗布し, 25℃
 で 1 週間培養した後, 培地表面に生じたコ
 ロニー数を計測した.



Fig. 2. Sampling stations in northern Osaka.

全菌数 (TDC) の測定には DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を用いた. 試料水に DAPI を終濃度  $1 \mu$ g ml<sup>-1</sup> となるように添加し, 5 分間染色した後, 濾過によって試料中 の細菌を Nuclepore black filter (Costar Scientific; 孔系  $0.20 \mu$  m) 上に捕集した. フィルター をスライドガラス上に乗せ, エマルジョンオイルで封入し, 蛍光顕微鏡 (Olympus BH2) で 観察・計数した. なお DAPI 由来の蛍光の観察には励起フィルター UG1, ダイクロイッ クミラー DM400, 吸収フィルター L420 を用いた. 全有機炭素値は, TOC-500 (島津) により測定した.

#### オリゴヌクレオチドプローブ

本研究で用いたプローブの配列を Table 1 に示した. これらは水環境に多く生息すると 報告されている細菌群を標的として作成したものであり,それぞれ FC: Flavobacterium-Cytophaga のクラスター, BCA: Burkholderia-Comamonas-authentic Alcaligenes グループ, VA: Vibrio-Aeromonas グループ, Ac: Acinetobactor 属, P(I): Pseudomonas (rRNA group I) が 検出対象である<sup>28,29)</sup>. また真正細菌を標的としたプローブ EUB338<sup>18)</sup> およびネガティブコ ントロールとなるプローブ NON<sup>30)</sup> を用いた. 各プローブの 5'-末端はジゴキシゲニンで 標識した. 16S rRNA の塩基配列に基づく系統樹を Fig. 3 に示した. プローブ BCA のグ ループは Proteobacteria の beta グループ, プローブ Ac, VA, P(I) のグループは Proteobacteria の gamma グループに属する. 各プローブの特異性およびハイブリダイゼー ションの条件は, 30 種の標準株を用い, HNPP-FISH 法により検討した.

Table 1. Oligonucleotide probes.

| Probe  | Specificity                                     | Sequence (5'- 3')                        | Tartget position <sup>a</sup> | Reference |
|--------|---|--|-------------------------------|-----------|
| FC     | Flavobacterium-Cytophaga                        | AGGTACCCCCAGCTTCCATGGCT                  | 16S, 1408-1430                | 28,29     |
| BCA    | Burkholderia-Comamonas<br>Authentic Alcaligenes | GTGTGCCGGTTCTCTTTCGAGCAC                 | 16S, 1022-1044                | 28,29     |
| Ac     | Acinetobacter                                   | GCGCCACTAAAGCCTCAAAGGCC                  | 16S, 836-858                  | 28,29     |
| VA     | Vibrio-Aeromonas                                | ACGACGCACTTTTTGGGATTCGCT<br>CACTATCGCAAG | 16S, 1265-1297                | 28,29     |
| P(I)   | Pseudomonas (rRNA I)                            | ATTTCAGCCTACCACCTTAA                     | 23S, 1467-1486                | 28.29     |
| EUB338 | domain Bacteria                                 | GCTGCCTCCCGTAGGAGT                       | 16S, 338-355                  | 18        |
| NON    | Negative control                                | ACTCCTACGGGAGGCAGC                       | 16S, 338-355                  | 30        |

<sup>a</sup> E.coli rRNA numbering.



Fig. 3. Evolutionary distance tree based on 16S rRNA sequences. The bar corresponds to 10% estimated sequence divergence.  $a^{a}$  23S rRNA-targeted oligonucleotide probe.

#### HNPP-FISH

各試料に冷 paraformaldehyde 溶液(12% in PBS [pH7.5])を加え(終濃度 3%), 4℃で 8 -16 時間固定した.次に,ガラスファンネルにフィルターをセットした濾過装置に試料水 を入れ,細菌をフィルター上にトラップした.濾過滅菌水で洗浄した後,このフィルター を容量 50 ml の Centrifuge tube (Corning) に入れ,濾過滅菌水を加えてピペッティングに より細菌を再懸濁した.

ゼラチンコーティング (0.1% gelatin, 0.01% KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) したスライドガラス上に再懸濁 した試料を 20  $\mu$ 1 滴下し,乾燥させた後, 50%, 80%, 100% エタノールにそれぞれ 3 分 間浸すことにより脱水を行った.次に lysozyme 溶液 (0.5 mg ml<sup>-1</sup> in 100 mM Tris-HCl [pH8.2], 50 mM EDTA) を 30  $\mu$ 1 滴下し 4°C で 15 分間処理した後,濾過滅菌水で軽く 洗浄し,再び 50%, 80%, 100% エタノールで脱水を行った. proteinase K 溶液 (0.1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> in 10 mM Tris-HCl [pH8.2], 1 mM EDTA) を 30  $\mu$ 1 滴下し室温で 3 分間処理した後,濾 過滅菌水で軽く洗浄し,再び 50%, 80%, 100% エタノールで脱水を行った.

次に digoxigenin で標識したオリゴヌクレオチドプローブ 200 ng を含むハイブリダイ ゼーションバッファー (0.9 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS, 20 mM Tris HCl [pH7.5], 30 ~45% formamide) を 20 µ1 滴下し, 37℃ で 1 時間インキュベートした. 反応後, 37℃,

室温, 4℃ の濾過滅菌水で軽く洗浄し, ブロッキング液 (30 ng ml<sup>-1</sup> BSA in PBS) を 30  $\mu$ 1 滴下し,室温で 30 分間ブロッキング処理を行った.次にブロッキング液を 15  $\mu$ 1 除い た後,アルカリフォスファターゼ結合 Anti digoxigenin Fab fragments (Boehringer) をブロッ キング液で 60 倍希釈し Tween 20 を 1% となるように加えた液を 15  $\mu$ 1 滴下して混合 し,室温で 45 分間反応させた.反応後バッファー 1 (100 mM Tris-HCl [pH7.5], 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20), バッファー 2 (100 mM Tris-HCl [pH8.0], 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) でそれぞれ室温で 10 分間,2 回洗浄後,HNPP/Fast Red TR (Aisin Cosmos) 反応液 (100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> HNPP, 250  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> Fast Red TR in バッファー 2) を 30  $\mu$ 1 滴下し,室温で 30 分間反応させた.この HNPP/Fast Red TR 反応を 2 回繰り返した後,濾過滅菌水で 5 分間洗浄した.DAPI によるカウンター染色 (終濃度 2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) を行い,MacIlavaine バ ッファー (53.2 mM citric acid, 93.6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [pH4.5]) 10  $\mu$ 1 で封入し,蛍光顕微鏡 (Olympus BH2) で観察・計数した.HNP/TR 由来の蛍光の観察には励起フィルター BP490+EY455,ダイクロイックミラー DM500,吸収フィルター O515 を用いた.DAPI 由 来の蛍光の観察には励起フィルター UG1,ダイクロイックミラー DM400,吸収フィルタ ー L420 を用いた.

#### 結果および考察

#### 検出条件の最適化

FISH 法により特異的な検出を行うには、ハイブリダイゼーション温度、塩濃度, formamide 濃度の最適化が必要となる.本研究では塩濃度を 0.9 M, ハイブリダイゼーション温度を 37℃ に固定し、ホルムアミド濃度を変化させた.

Flavobacterium breve (Empedobacter brevis) と Aeromonas hydrophila を試料として, プロ ーブ FC を用いた HNPP-FISH を行い, DAPI で染色後, 蛍光顕微鏡像を比較した (Fig. 4). Fig. 4a, b の写真は同一視野を撮影したものであり, UV 励起光下では DAPI により核酸 染色された全ての細菌が蛍光を発した. 一方, 同一視野を青色励起光下で観察した場合プ ローブが標的とする細菌, すなわち プローブ FC とハイブリダイズし HNP/TR 由来の赤 色蛍光を発する Empedobacter brevis のみを検出することができた. なお赤色蛍光が強い場 合には UV 励起光下でも青色と赤色の混在したシグナルとして観察することができた. こ のように HNPP-FISH 法を用いることにより特定細菌のみを高感度に検出することが可能 となる. ホルムアミド濃度を 0% から 55% まで 5% ごとに濃度を変化させ, 蛍光顕微鏡 像を見ながら標的とする Flavobacterium breve のみを検出するハイブリダイゼーションの 条件を検討したところ,至適条件はホルムアミド濃度 30%,ハイブリダイゼーション温度 37℃,ハイブリダイゼーション時間 1 時間となった.



Fig. 4. Specific identification of target bacterial cells with HNPP/Fast Red TR whole-cell hybridization. *F. breve* (*E. brevis*) and *A. hydrophila* were hybridized with *Flavobacterium-Cytophaga* specific probe. The same microscopic fields are shown with UV excitation (a) and Blue excitation (b).

5 種のプローブ (FC, BCA, Ac, VA, P(I)) におけるハイブリダイゼーションの至適条 件を,30 種の標準株を用いて検討した (Table 2). HNPP-FISH を行ったのち蛍光が見られ たものは+,見られなかったものは-で表した.それぞれ標的とする細菌にのみ蛍光が見 られるように検出条件を最適化することができたことから,HNPP-FISH 法を用いることに より,多種多様な細菌が混在する試料から特定の細菌のみを高感度に検出可能であると考 えられた.

#### 河川に生息する細菌に対する有効性

河川水試料を用いて本法の有効性を検討するに先立ち,採水地点の河川水の特性を比較 した.両地点の気温,水温,pH,EC,TOC 値および細菌数を Table 3 に示した.これら の結果より,高山に比べ北橋は有機物による汚染が進んでいることを確認した.

| Sturin                                      |               | Presence of sigr | nal (no. of mismatch | es) for probe $a$ : | ······              |
|---|---------------|------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| Sıram                                       | FC [23]       | BPA [24]         | Ac [23]              | VA [36]             | P(I) [20]           |
| Chryseobacterium meningosepticum ATCC 13253 | + (1)         | — (12)           | — (10)               | — (19)              | — (ND)              |
| Empedobacter brevis GIFU3159                | + (ND)        | — (ND)           | — (ND)               | — (ND)              | — (ND)              |
| Flavobacterium johnsoniae ATCC 17061        | + (2)         | — (7)            | — (12)               | — (12)              | — (ND)              |
| Sphingobacterium thalpophilum ATCC 43320    | + (2)         | - (13)           | - (11)               | — (15)              | — (ND)              |
| Alcaligenes faecalis ATCC 19018             | — (ND)        | + (ND)           | — (ND)               | — (ND)              | <b>—</b> (9)        |
| Alcaligenes xylosoxidans ATCC 27061         | — (ND)        | + (ND)           | — (ND)               | — (ND)              | — (ND)              |
| Burkholderia cepacia ATCC 25416             | — (9)         | + (1)            | - (8)                | - (13)              | — (10)              |
| Comamonas acidovorans IAM 12409             | — (ND)        | + (ND)           | — (ND)               | — (ND)              | — (ND)              |
| Comamonas testosteroni IAM 12419            | — (ND)        | + (ND)           | — (ND)               | — (ND)              | — (ND)              |
| Acinetobacter baumannii ATCC 19606          | — (9)         | - (10)           | + (0)                | - (14)              | — (ND)              |
| Acinetobacter calcoaceticus ATCC 23055      | — <b>(9</b> ) | — (10)           | + (0)                | — (10)              | — (9)               |
| Acinetobacter haemolyticus ATCC 17906       | - (9)         | - (10)           | + (0)                | - (10)              | — (ND)              |
| Acinetobacter johnsonii ATCC 17909          | (9)           | - (10)           | + (0)                | <b>—</b> (10)       | (ND)                |
| Acinetobacter junii ATCC 17908              | — <b>(9</b> ) | - (10)           | + (0)                | - (14)              | — (ND)              |
| Acinetobacter lwoffi ATCC 15309             | - (9)         | - (10)           | + (0)                | - (11)              | — (ND)              |
| Aeromonas caviae JCM 1060                   | — (10)        | - (11)           | - (12)               | + (2)               | — (ND)              |
| Aeromonas hydrophila ATCC 7966              | <b>— (9)</b>  | <b>—</b> (13)    | - (11)               | + (2)               | — (10) <sup>°</sup> |
| Vibrio campbellii ATCC 25920                | — (10)        | — (9)            | - (10)               | + (1)               | — (ND)              |
| Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802          | — (10)        | - (8)            | - (9)                | + (3)               | — (ND)              |
| Vibrio vulnificus ATCC 27562                | — (10)        | - (8)            | <b>—</b> (10)        | + (3)               | — (ND)              |
| Pseudomonas mendocina ATCC 25411            | (9)           | - (13)           | — (7)                | - (14)              | + (ND)              |
| Pseudomonas fluorescens RIMD 1615005        | — (ND)        | — (ND)           | (ND)                 | — (ND)              | + (ND)              |
| Pseudomonas putida ATCC 12633               | - (9)         | <b>— (10)</b>    | <b>— (6)</b>         | - (15)              | + (ND)              |
| Ralstonia eutrophus IAM12305                | — (ND)        | — (ND)           | — (ND)               | — (ND)              | — (ND)              |
| Escherichia coli K-12 W3110                 | <b>—</b> (12) | - (11)           | - (11)               | - (8)               | — (6) <sup>(</sup>  |
| Moraxella bovis IAM12313                    | — (ND)        | — (ND)           | — (ND)               | — (ND)              | — (ND)              |
| Moraxella lacunata IAM12150                 | — (ND)        | — (ND)           | — (ND)               | — (ND)              | — (ND)              |
| Moraxella nonliquefaciensIAM 12314          | — (ND)        | — (ND)           | — (ND)               | — (ND)              | — (ND)              |
| Breviundimonas diminutaGIFU657              | — (ND)        | — (ND)           | — (ND)               | — (ND)              | — (ND)              |
| Stenotrophomonas maltophilia KM1168         | — (ND)        | — (ND)           | — (ND)               | — (ND)              | — (ND)              |
| formamide concentration                     | 30%           | 40%              | 40%                  | 45%                 | 45%                 |

Table 2. Specificity of the designed oligonucleotide probes determined by in situ hybridization.

<sup>a</sup> Probe lengths are shown in square brackets. ND, no data : sequence data are not available in GenBank.

Table 3. Physico-chemical characteristics of river water samples.

| Property  | Means $\pm$ SD for all 1995-96 measurements |                             |  |  |
|---|---|-----------------------------|--|--|
|   | Takayama                                    | Kitahashi                   |  |  |
| Ambient temperature ( $^{\circ}$ C)                     | 8.3±7.9                                     | 14±9.9                      |  |  |
| Water temperature ( $^{\circ}$ C)                       | 8.0±5.6                                     | 16±7.8                      |  |  |
| pH  | 7.9±0.4                                     | 7.2±0.4                     |  |  |
| Electrical conductivity ( $\mu$ S cm <sup>-1</sup> )    | 120±40                                      | 470±250                     |  |  |
| Total organic carbon (mg liter <sup>1</sup> )           | 2.0±1.3                                     | 10±7.9                      |  |  |
| TDC (cells ml <sup>-1</sup> ) <sup><math>a</math></sup> | $3.0 \pm 1.7 \times 10^{5}$                 | $9.9 \pm 7.7 \times 10^6$   |  |  |
| CFU (cells ml <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>              | 1.3±0.8x10 <sup>4</sup>                     | $2.5 \pm 2.6 \times 10^{6}$ |  |  |

<sup>a</sup> TDC, total direct counts determined by DAPI staining.

<sup>b</sup> CFU, colony forming units on R2A medium.

次に真正細菌に共通なプローブ EUB338 を用いて FISH 法の検出効率を検討した.Fig.5 は HNPP-FISH 法で検出した河川水中の細菌の蛍光顕微鏡写真である. 左右の写真は同一

а



Fig. 5. Typical micrographs of bacterial cells detected by HNPP-FISH: cells hybridized with EUB338 in river water sample collected at Kitahashi (a, b) and Takayama (c, d). The same microscopic fields are shown with UV excitation (a, c) and Blue excitation (b, d).

視野を撮影したものである. a, b は北橋の試料, c, d は高山の試料である. UV 励起光 下(a, c)では全ての細菌が DAPI 由来の青色の蛍光を発しているのに対し,青色励起下 (b, d) では HNPP-FISH 法により検出した細菌のみが赤色の蛍光を発している.本研究 では各励起光下で細菌を計数し,プローブとハイブリダイズした細菌の全細菌に対する割 合を求めた.

Fig. 6 は寒天平板培養法, FITC-FISH 法, HNPP-FISH 法により検出可能な細菌の全細菌 に対する割合を比較した結果である. 試料として汚染の進んだ地点である北橋の河川水を 用い, FITC-FISH 法, HNPP-FISH 法では真正細菌に共通なプローブ EUB338 を用いた. 寒天平板培養法により検出できた細菌は全細菌の約 5%, 従来法である FITC-FISH 法によ り検出できた細菌は約 15% であった. これに対し HNPP-FISH 法では約 70% の細菌を 検出することができ, HNPP-FISH 法は従来法に比べはるかに有効な手法であることがわか った.

また季節変化 (1月,4月,10月) について検討を行ったところ,プローブ EUB338 に より検出できた細菌の割合は,汚染の進んだ地点である北橋では 55-70%,汚染の進んで いない地点である高山では 40-45% となり地点による差が見られた (Fig.7). これは貧栄 養な地点ほど生息する細菌の rRNA 含量が低いことに起因すると考えられた.例えば, Kirchman らは放射性同位元素で標識した栄養基質を用いて,汚染物質の量が多い地点ほど 細菌による基質の取り込み量が多いこと,つまりタンパク合成が活発であることを報告し ている<sup>31)</sup>.また Yamaguchi らは汚染の進んだ地点では生理活性を持つ細菌の全細菌に対 する割合が高いことを報告している<sup>14)</sup>.本研究の結果から有機物汚染が進んだ地点では, タンパク合成を行う細菌が多く,rRNA 含量が高いことが推察された.

グループ特異的な 5 種のプローブを用いて細菌群集構造を解析した結果では (Fig. 7), 北橋では約 50%,高山では 25-40% の細菌がいずれかのプローブとハイブリダイズし, プローブ EUB338 で検出できる細菌の大部分を同定することができた.また両地点ともに プローブ FC, BCA とハイブリダイズする細菌が多く検出され,季節による細菌群集構造 の大きな変化は見られなかった.培養法を用いた細菌群集構造の調査では,多くの河川や 湖沼において Flavobacterium 属の細菌が優占種として存在していることが報告されてい る <sup>32-36</sup>.本研究においても Flavobacterium-Cytophaga クラスターの細菌が多く検出され, これらの細菌群が淡水環境に広く分布していることが推察された.今後優占種の遺伝学 的・生理学的性質を検討することにより,環境中における役割や生態学的意義を理解でき るものと期待される.

なお、いずれの試料においても HNPP-FISH 法では検出できない細菌が存在した.この



Fig. 6. Bacterial fraction detectable by three methods in river water sample collected at Kitahashi. <sup>*a*</sup> Cells hybridized with EUB338 probe.





主な理由として,(I) 細胞壁の透過性が低いために HNPP-FISH 法の際にプローブや抗体が 菌体内に入らなかったこと,(II) 菌体内の rRNA 含量が HNPP-FISH 法の検出限界以下で あったことが挙げられる.(I) に関しては透過性処理に用いた lysozyme や proteinase K に 対する感受性の低いことが考えられ,今後菌体の処理方法を改良することにより高い割合 で河川水中の細菌群集構造を解析できるものと考えられる.(II) に関してはプローブの標 的となる塩基配列の増幅が必要となる.その手段として細胞内で PCR 反応を行う in situ PCR 法<sup>37,38)</sup> や,培地成分と抗菌剤を加えたインキュベーションにより細胞内の rRNA 含 量を増加させる DVC-FISH 法<sup>9,22)</sup> などが挙げられ,今後の発展が期待される.

#### 小括

本研究では,河川水中の生理活性の低い細菌の群集構造を解析することを目的として, より高感度な検出が可能な HNPP-FISH 法に着目し,その最適化を試みた.水環境に多く 生息すると報告されている細菌を標的とした 5 種の rRNA プローブを用い,そのハイブ リダイゼーションの条件を 30 種の標準株を用いて決定した.

次に本法を河川水中の細菌群集構造解析に応用し,従来法との比較を行った.HNPP-FISH 法では全細菌の約 70% の細菌を検出することができたのに対し,培養法では約 5%,従 来法である FITC-FISH 法では約 15% であった.このことから本法は従来法に比べはるか に有効な手法であることがわかった.

また 5 種のプローブを用いて群集構造解析を行った結果,有機物汚染の進んだ地点では 約 50%,汚染の進んでいない地点では 25-40% の細菌がいずれかのプローブとハイブリ ダイズし,プローブ EUB338 で検出できる細菌の大部分を同定することができた.またい ずれの地点でも Flavobacterium-Cytophaga クラスターの細菌が多く検出され,これらの細 菌群が淡水環境に広く分布していることが推察された.

# 第二章 アジア都市河川環境の微生物学的評価

FISH 法は属種レベルでの群集構造解析に有効な手法であり,またその検出感度は細菌の rRNA 含量に依存することから,細菌の生理活性を知る指標の一つとなる<sup>17,19</sup>.しかしな がら,飢餓状態に入った細菌では rRNA の半減期は数日であることが報告されており<sup>21)</sup>, FISH 法は厳密には細菌の生死を評価できる手法ではない.環境中では生きている細菌,高 い生理活性を持つ細菌は物質循環における寄与が大きいと推察される.そこで本章では DVC 法を行った試料に対して FISH を行い (DVC-FISH 法)<sup>9,22)</sup>,生きている細菌を対象と した群集構造解析を試みた.DVC 法は試料に培地成分と DNA gyrase を阻害する抗菌剤を 加えて一定時間インキュベートする手法であり,増殖能を有する細菌は抗菌剤により細胞 分裂が阻害されるため伸長・肥大する<sup>6)</sup>.この時タンパク合成が行われ,細胞内の rRNA 含 量が増加する.このような試料に対し FISH を行うことにより,細菌の属種とタンパク合 成能を同時に知ることができる.

本章では、DVC-FISH 法を東南アジアの河川に生息する細菌の群集構造解析とその生理 活性評価に応用した.東南アジア諸国では、急速に都市化、工業化が進み、生活排水、工 業廃水、さらには多量の農薬の使用による水質汚濁が深刻化している<sup>23-26</sup>.環境汚染に対 して的確な対策を講じるためには、まず河川環境の現状を明らかにすることが重要であり、 特に生態系に対する汚染物質の影響を評価することが必須となる.細菌は多様な機能と豊 富な現存量をもとに生態系の根幹部を支えているため、汚染物質の生態系影響評価にあた っては微生物学的な検討が必要である.また河川の持つ自浄作用において、細菌は極めて 重要な役割を果たしていることから、今後社会の発展を維持しながらも、淡水資源を安全 かつ効率的に利用していくためには、自浄作用における細菌の能力を評価し、河川に生息 する細菌を深く理解することが必要である.しかしながら環境微生物学は主に冷温帯に位 置する欧米諸国を中心に発展してきたため、東南アジアなどの熱帯に生息する細菌に関す る知見は、未だ限られている.そこで本章ではマレーシアの首都クアラルンプールを流れ る Kelang 川、タイの首都バンコクを流れる Chao Phraya 川、さらに大阪市周辺の河川を 対象として、都市河川に生息する細菌の現存量、生理活性、群集構造を調査し、河川環境 の微生物学的評価を試みた.

材料および方法

#### 採水地点

1998 年から 1999 年にかけて Kelang 川流域の 5 地点 (Fig. 8), Chao Phraya 川の 3 地 点 (Fig. 9), 大阪近郊河川の 4 地点 (Fig. 10) にて表層水を採取した. クアラルンプール市 内の採水地点である KL1, KL3, KL4 では, 川幅は約 10 m, 水深は 1-2 m であり, 周 囲は市街地である (Fig. 11a, b, c). 約 10 km 下流のシャーラム市に位置する SA6 では, 川幅は約 50 m であり, 周囲は工場地帯である (Fig. 11d). さらに 5 km 下流のケラン市に 位置する K7 では, 川幅は約 100 m であり, 周囲は市街地である (Fig. 11e). マレーシア では未処理の下水が河川に流入する場合が多く, また下水処理場では塩素消毒が行われず に処理水が河川に放流される. Kelang 川では, 河川の水量が少ないにもかかわらず, 十分 に処理されていない多量の下水が河川に流入するため, 水質汚濁が著しく進んでいる. バ ンコク市内の採水地点である CP1, CP2, CP3 の地点ではいずれも川幅は 100 m 以上, 水深は 10 m 以上あり, 周囲は市街地である (Fig. 11f, g, h). バンコク市内では下水処理場 が存在するもののその数は少なく, また下水管の不備が多いため, 未処理の下水が Chao Phraya 川に流入する場合が多い. Chao Phraya 川は, Kelang 川に比べると水量がはるかに



Fig. 8. Sampling stations in Kelang River basin.







Fig. 10. Sampling stations in Osaka.

















Fig. 11. Photographs of sampling stations. a, KL1; b, KL3; c, KL4; d, SA6; e, K7; f, CP1; g, CP2; h, CP3.

多いことから, Kelang 川の方が流入する下水の影響をより強く受ける.大阪市内の採水地 点である KN, NY, HR, YM はそれぞれ神崎川,寝屋川,平野川,大和川下流に位置し, 都市近郊の汚染の進んだ地点である.

#### 細菌数ならびに全有機炭素値の測定

コロニー形成数の測定にあたっては, R2A 培地に試料水を塗布し, 30℃ で 1 週間培養 した後, 培地表面に生じたコロニー数を計測した.

全菌数の測定にあたっては、大阪の河川水試料に対しては DAPI を、他の試料に対して は SYBR-II (SYBR green II) を用いた. 試料水に冷 paraformaldehyde 溶液 (12% in PBS [pH7.5]) を加え (終濃度 3%)、4°C で 18 時間以上固定した. 次に DAPI (終濃度 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) または SYBR-II (終濃度 stock solution の 1 万倍希釈) を添加して 5 分間染色し、濾 過によって試料中の細菌をポリカーボネートフィルター (東洋濾紙;孔系 0.20 $\mu$ m) 上に 捕集した. フィルターをスライドガラス上に乗せ、エマルジョンオイルで封入し、蛍光顕 微鏡 (Olympus AX70) で観察・計数した. なお DAPI 由来の蛍光の観察には U-MWU キ ューブ、SYBR-II 由来の蛍光の観察には U-MNIBA キューブを用いた.

全有機炭素値は, TOC-5000 (島津) により測定した.

#### 大腸菌群試験

大腸菌群数は、乳糖ブイヨン培地を用いた MPN 法により求めた<sup>39)</sup>.

#### オリゴヌクレオチドプローブ

使用したプローブを Table 4 に示した. すなわち, Proteobacteria の alpha, beta, gamma サブクラスをそれぞれ標的としたプローブ ALF1b, BET42a, GAM42a<sup>40)</sup>, Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides 門の Cytophaga-Flavobacterium クラスターを標的としたプローブ CF319<sup>41)</sup>, 偏性嫌気性グラム陰性細菌 Bacteroides グループを標的としたプローブ BAC303<sup>41)</sup>, 通性嫌気性グラム陰性腸内細菌科 Escherichia-Shigella のグループを標的とし たプローブ ES445 を用いた. プローブ ES445 は本研究でデザインした. また真正細菌を 標的としたプローブ EUB338 およびネガティブコントロールとなるプローブ NON を用 いた. 各プローブの 5'-末端は蛍光色素 Cy3<sup>42,43)</sup> で標識した. 16S rRNA の塩基配列に基 づく系統樹を Fig. 12 に示した. プローブ ALF1b, BET42a, GAM42a, CF319 の標的とす る細菌は交差反応しない. プローブ BAC303 とハイブリダイズする細菌の一部はプローブ CF319 と, プローブ ES445 とハイブリダイズする細菌は, プローブ GAM42a と交差反応 する.

| Probe  | Specificity   | Sequence (5'-3')       | Tartget position <sup>a</sup> | Reference  |
|--------|---|------------------------|-------------------------------|------------|
| ALF1b  | Alpha subclass of Proteobacteria                      | CGTTCG(C/T)TCTGAGCCAG  | 16S. 19-35                    | 40         |
| BET42a | Beta subclass of Proteobacteria                       | GCCTTCCCACTTCGTTT      | 238, 1027-1043                | 40         |
| GAM42a | Gamma subclass of Proteobacteria                      | GCCTTCCCACATCGTTT      | 238, 1027-1043                | 40         |
| CF319  | <i>Cytophaga-Flavobacterium</i> cluster of CFB-phylum | TGGTCCGT(G/A)TCTCAGTAC | 16s, 319-336                  | 41         |
| BAC303 | Bacteroides cluster of CFB-phylum                     | CCAATGTGGGGGGACCTT     | 16s. 303-319                  | 41         |
| ES445  | Escherichia-Shigella and relatives                    | CTTTACTCCCTTCCTCCC     | 16s, 445-462                  | This study |
| EUB338 | domain Bacteria                                       | GCTGCCTCCCGTAGGAGT     | 16S, 338-355                  | 16         |
| NON    | Negative control                                      | ACTCCTACGGGAGGCAGC     | 16S, 338-355                  | 28         |

Table 4. Oligonucleotide probes.

<sup>a</sup> E. coli rRNA numbering.



Fig. 12. Evolutionary distance tree based on 16S rRNA sequences. The bar corresponds to 10% estimated sequence divergence.

#### Cy3-FISH

各試料に冷 paraformaldehyde 溶液 (12% in PBS [pH7.5]) を加え (終濃度 3%), 4℃ で 18 時間固定した.次にポリカーボネート製フィルター上に細菌を捕集し,濾過滅菌水で洗 浄した. 続いて細菌を捕集したポリカーボネート製フィルターを 6 分の 1 に切断した. スライドガラス上に置いた濾紙に 40 μ1 のハイブリダイゼーションバッファー (0.9 M NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS, 20 mM Tris-HCl [pH7.5], 各濃度の formamide [ALF1b, 20%; BET42a, 35%; GAM42a, 35%; CF319, 15%; BAC303, 0%; ES445, 45%; EUB, 0%; NON. 0%1)を吸収させ、その上に細菌を捕集したポリカーボネート製フィルターを置き、 51℃ で 15 分間インキュベートした.次に Cy3 で標識したオリゴヌクレオチドプローブ 2 ng μl<sup>-1</sup> を含むハイブリダイゼーションバッファーを 40 μl 滴下し,46℃ で 3 時間イン キュベートした.ハイブリダイゼーション後,フィルターを 300 μ1 の洗浄バッファー (各 濃度の NaCl [ALF1b, 0.225 M; BET42a, 80 mM; GAM42a, 80 mM; CF319, 80 mM; BAC303, 0.9 M; ES445, 80 mM; EUB, 0.9 M; NON, 0.9 M], 5 mM EDTA, 0.01% SDS, 20 mM Tris-HCl [pH7.5]) に浸し, 48℃ で 30 分間インキュベートした.洗浄後, フィルターを 300 μ1の核酸染色溶液 (DAPI の終濃度は 1 μg ml<sup>-1</sup>, SYBR-II の終濃度は stock solution の 1 万倍希釈) に浸し, 室温で 5 分間インキュベートした. フィルターを濾過滅菌水で洗浄 し、風乾させた後、エマルジョンオイルで封入して蛍光顕微鏡 (Olympus AX70) で観察・ 計数した. なお DAPI 由来の蛍光の観察には U-MWU キューブ, SYBR-II 由来の蛍光の 観察には U-MNIBA キューブ, Cv3 由来の蛍光の観察には U-MWIG キューブを用いた.

#### <u>DVC</u>

FISH 法の検出感度の向上と個々の細菌の生理活性を評価するため、 DVC 法を併用した<sup>6,44)</sup>. すなわち試料を容量 15 ml の Centrifuge tube (Corning) に入れ, yeast extract (50  $\mu$  g ml<sup>-1</sup>), nalidixic acid (20  $\mu$  g ml<sup>-1</sup>), pipemidic acid (10  $\mu$  g ml<sup>-1</sup>), piromidic acid (10  $\mu$  g ml<sup>-1</sup>), cephalexin (10  $\mu$  g ml<sup>-1</sup>), ciprofloxacin (0.5  $\mu$  g ml<sup>-1</sup>) を加え, 30° で 18 時間静置した後, Cy3-FISH を行った.

#### 結果および考察

Kelang 川, Chao Phraya 川, 大阪の河川の採水地点における気温, 水温, pH, EC, TOC 値および全菌数を Table 5 に示した. 有機炭素値はいずれも高い値を示し, 有機物汚染が

| Sampling<br>stations | Date         | A.T. <sup>a</sup><br>(°C) | W.T. <sup>b</sup><br>(°C) | pН  | $EC^{c}$<br>(µS cm <sup>-1</sup> ) | $TOC^{d}$ (mg liter <sup>-1</sup> ) | $TDC^{e}$ $(10^{6} ml^{-1})$ |
|----------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|-----|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| KL1                  | 22 Jul. 1999 | 25.1                      | 26.7                      | 7.6 | 534                                | 9.7                                 | 15                           |
|                      | 14 Oct. 1999 | 25.0                      | 27.1                      | 7.5 | 200                                | 5.4                                 | 3.0                          |
| KL3                  | 22 Jul. 1999 | 25.8                      | 25.6                      | 7.4 | 352                                | 7.4                                 | 11                           |
|                      | 14 Oct. 1999 | 25.1                      | 25.6                      | 7.4 | 189                                | 4.1                                 | 3.0                          |
| KL4                  | 22 Jul. 1999 | 27.8                      | 26.3                      | 7.7 | 351                                | 7.3                                 | 10                           |
|                      | 14 Oct. 1999 | 24.6                      | 25.7                      | 7.6 | 195                                | 4.2                                 | 3.8                          |
| SA6                  | 22 Jul. 1999 | 31.3                      | 28.9                      | 7.5 | 369                                | 8.3                                 | 6.2                          |
|                      | 14 Oct. 1999 | 31.8                      | 27.5                      | 7.3 | 219                                | 6.5                                 | 4.0                          |
| K7                   | 22 Jul. 1999 | 29.3                      | 29.5                      | 7.4 | 369                                | 8.2                                 | 6.0                          |
|                      | 14 Oct. 1999 | 29.0                      | 26.7                      | 7.3 | 159                                | 5.5                                 | 3.2                          |
| CP3                  | 20 Jul. 1999 | 31.3                      | 31.2                      | 7.6 | 652                                | 7.1                                 | 3.1                          |
|                      | 12 Oct. 1999 | 30.1                      | 30.8                      | 7.8 | 220                                | 4.6                                 | 3.4                          |
| CP2                  | 20 Jul. 1999 | 31.4                      | 30.8                      | 7.6 | 287                                | 6.2                                 | 2.4                          |
|                      | 12 Oct. 1999 | 29.5                      | 30.7                      | 7.9 | 200                                | 4.7                                 | 3.3                          |
| CP1                  | 20 Jul. 1999 | 28.8                      | 31.2                      | 7.6 | 308                                | 6.0                                 | 2.2                          |
|                      | 12 Oct. 1999 | 29.4                      | 30.6                      | 7.7 | 230                                | 5.5                                 | 3.8                          |
| HR                   | 27 Sep. 1999 | 29.3                      | 26.4                      | 7.6 | 700                                | 9.8                                 | 13                           |
| YM                   | 27 Sep. 1999 | 27.1                      | 27.4                      | 7.8 | 420                                | 5.6                                 | 12                           |
| KN                   | 27 Sep. 1999 | 23.8                      | 26.3                      | 7.8 | 387                                | 6.3                                 | 4.7                          |
| NY                   | 27 Sep. 1999 | 27.4                      | 27.5                      | 7.6 | 394                                | 5.1                                 | 4.0                          |

Table 5. Physico-chemical characteristics of river water samples.

<sup>4</sup> A.T., ambient temperature.

<sup>b</sup> W.T., water temperature.

<sup>6</sup> EC, electrical conductivity.

<sup>d</sup> TOC, total organic carbon.

<sup>e</sup> TDC, total direct counts determined by DAPI or SYBR-II staining.

コロニー形成細菌の全細菌に対する割合を Fig. 13 に示した. 汚染の進んだ大阪の河川 水試料では 10-30%, Chao Phraya 川の試料では 5-10% であったのに対し, Kelang 川の 試料では 20-60% であり,極めて高い値を示した. 従来より環境中の細菌は大部分が培 養困難であることが報告されていることから<sup>6-8,14)</sup>, Kelang 川の細菌の生理状態はこれらの 細菌と大きく異なることが推察された.

FISH 法および DVC-FISH 法の検出効率を表した結果を Fig. 14 に示した. これは真正 細菌に共通なプローブ EUB338 とハイブリダイズした細菌の全細菌に対する割合として 表した. FISH 法のみを行った場合, Kelang 川の試料では 55-80%, Chao Phraya 川の試 料では 15-35%, 大阪の試料では 45-60% であった (Fig. 14a). FISH 法の検出効率は菌



Fig. 13. Culturable bacteria in river water samples measured as CFU on R2A medium.



Fig. 14. Hybridization efficiency.

体内の rRNA 含量に依存することから<sup>17,19</sup>, Kelang 川の試料では rRNA 含量が高い, す なわち細菌の生理活性が高く, Chao Phraya 川の試料では生理活性が低いことが推察された. また DVC-FISH を行った場合, 検出効率は, Kelang 川の試料では大きく変化しなかった のに対し Chao Phraya 川の試料では 75-80%, 大阪の試料では 70-80% に向上した (Fig. 14b). 検出効率の増加は, DVC 法でのインキュベーションによりタンパク合成が行わ れ, rRNA 含量が増加した細菌が存在することを意味する. したがって FISH 法では検出 されず, DVC-FISH 法でのみ検出可能となった細菌, すなわち Chao Phraya 川の試料では 40-60%, 大阪の試料では 10-40% を占める細菌は, 河川水中での生理活性が低いもの の, タンパク合成能を保持していると考えられた. また Kelang 川の試料では, 河川水中 での生理活性が高い細菌が多いため, 検出効率が大きく変化しなかったと考えられた.

このように Kelang 川, Chao Phraya 川, 大阪の河川水試料を比較したところ, EC, TOC 値, 全菌数では, これら 3 地域による違いは, 顕著に見られなかった. しかしながら, コ ロニー形成細菌の全細菌に対する割合, FISH 法および DVC-FISH 法の検出効率をもとに 細菌の生理活性を検討したところ, 3 地域による違いが見られ, Kelang 川では生理活性の 高い細菌が多いことが明らかとなった. Kelang 川では水量が少ないにもかかわらず, 十分 に処理されていない多量の下水が流入している. また処理された場合でも, 塩素消毒が行 われずに河川に放流される. このような理由により河川水中に生理活性の高い細菌が多い と考えられた.

Fig. 15 はグループ特異的なプローブを用いて細菌群集構造を解析した結果である.上の カラムが FISH 法を用いた結果 (Fig. 15a),下のカラムが DVC-FISH 法を用いた結果 (Fig. 15b)である.FISH を行ったところ,大阪の河川では beta サブクラスの細菌が優占 するのに対し,Kelang 川, Chao Phraya 川では beta および gamma サブクラスの細菌が多 く生息していることがわかった.冷温帯の水環境では beta サブクラスの細菌が優占し, 次いで *Cytophaga-Flavobacterium* クラスターの細菌または alpha サブクラスの細菌が多 く,gamma サブクラスの細菌の現存量は極めて少ないことが報告されている<sup>42,43,45-48)</sup>.こ れに対し Kelang 川,Chao Phraya 川の試料では gamma サブクラスの細菌が優占種の一部 であることが特徴として挙げられる.また大阪の試料では DVC-FISH を行うことにより, gamma サブクラスの細菌が多く検出されるようになった (Fig. 15b).FISH 法を用いた結果 との比較から,大阪の河川に生息する gamma サブクラスの細菌は河川水中での生理活性 が低いものの,タンパク合成能を保持していることがわかった.このことは通常の FISH 法



Fig. 15. Bacterial community structure in river water samples determined by FISH (a) and DVC-FISH (b).

では、生理活性の低い gamma サブクラスの細菌の現存量が過小評価されていたことを意味する. 一般的に gamma サブクラスの細菌は自然環境中での現存量は少ないと報告され

ているものの<sup>42,43,45-48)</sup>,実際には冷温帯の水環境に生理活性が低い状態で生存していることが推察された.

東南アジアでは下水が十分処理されずに河川に流入する場合が多い.そこで動物消化管 由来の細菌の現存量を検討するため,屎尿汚染の指標として一般的に用いられる大腸菌群 試験を行った.しかしながらこの方法は,(I) 培養法であるため時間を要する,(II) 大腸菌 の他,自然環境中に生息する Erwinia carotovora や Citrobacter freundii など屎尿とは無関 係の細菌を検出してしまう<sup>39)</sup>,という問題点がある.そこで本研究では,同時に FISH 法 による検出を行い,結果を比較した.プローブとして Escherichia-Shigella グループを標的 としたプローブ ES445, Bacteroides グループを標的としたプローブ BAC303 を用いた. 大腸菌 (Escherichia coli) は屎尿汚染の指標として用いられる細菌である.大腸菌と Shigella 属の細菌の 16S rRNA の塩基配列は相同性が高く区別できないため,本研究では Escherichia-Shigella グループを標的としたプローブを作成した.また Bacteroides グループ は動物消化管において最優勢を占める細菌群である<sup>49-52)</sup>. Table 6 はそれぞれ大腸菌群数, プローブ BAC303 または ES445 とハイブリダイズした細菌数を測定した結果である.ま たこれらの細菌の全細菌に対する割合を併記した.

大腸菌群数は, Chao Phraya 川, 大阪の河川水試料では 10<sup>3</sup> MPN ml<sup>-1</sup> 未満であるのに対 し, Kelang 川の試料では 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> オーダーという高い値を示した. また Kelang 川の試 料では, プローブ BAC303 とハイブリダイズした細菌は, 全細菌の 1-8% であった. *Bacteroides グループ*の細菌は, 動物消化管内では *Escherichia-Shigella グループ*に比べは るかに現存量が多く, また偏性嫌気性菌であるため, 溶存酸素の存在する河川水中では生 存できないという特徴を持つ<sup>49,50</sup>. Kelang 川の試料では, プローブ BAC303 とハイブリ ダイズする細菌がプローブ ES445 とハイブリダイズした細菌よりも多く, 全細菌に占め る割合が高い (1-8%) こと, 大腸菌群数が非常に多いことから, Kelang 川は屎尿を含ん だ下水による有機物負荷を強く受けていることが示された.

Chao Phraya 川の試料では、プローブ ES445 とハイブリダイズした細菌は、全細菌の 1-9% であった.下水処理場で塩素処理を受けた場合、Escherichia-Shigella グループの細 菌は殺菌されるはずである.しかしながら河川水中でのその現存量はプローブ BAC303 と ハイブリダイズした細菌よりも多く、全細菌に占める割合が高い (1-9%) ことから、屎尿 を含んだ下水が Chao Phraya 川に流入し、その後 Escherichia-Shigella グループの細菌が河 川水中で生存・増殖していると考えられた.またプローブ BAC303 とハイブリダイズした

細菌および大腸菌群の現存量は, Kelang 川の試料に比べ少なかったことから, Chao Phraya 川は屎尿を含んだ下水による有機物負荷を受けているものの,河川の水量が多いため Kelang 川ほどその影響は強くないと考えられた.

大阪の試料では、プローブ BAC303 または ES445 とハイブリダイズした細菌の全細菌 に対する割合は、本実験の検出限界である 0.1% 未満であったことから、十分に下水処理 が行われていると考えられた.

FISH 法, DVC-FISH 法を用いた結果から, Kelang 川, Chao Phraya 川では, 動物消化 管由来の細菌は培養法である大腸菌群試験により得られる値に比べはるかに高い割合で存 在していることが明らかとなった. 屎尿汚染の見られる環境では, 消化器感染症の病原体 の存在が危惧される. したがって Kelang 川, Chao Phraya 川では, 培養操作に依存しない 手法を用いて汚染指標細菌をモニタリングする必要があると考えられた.

| Sampling stations        | Coliform<br>10 <sup>3</sup> MPN ml <sup>-1</sup>                   | $BAC303^{a}$ $10^{3} cells ml^{-1}$  | $\frac{\text{ES445}^{b}}{10^{3} \text{ cells ml}^{-1}}$  |
|--------------------------|--|--|--|
| KL1<br>KL3<br>KL4<br>SA6 | >24 (>0.5) <sup>c</sup><br>5.4 (0.10)<br>>24 (>0.30)<br>2.4 (0.06) | $\begin{array}{c} 69^{d} & (1.4) \\ 140^{d} & (3.9) \\ 550^{d} & (7.7) \\ 140^{d} & (3.7) \end{array}$ | $\begin{array}{c} <4.9^{d}  (<0.1) \\ <3.7^{d}  (<0.1) \\ 2.9^{d}  (0.4) \\ 99^{d}  (2.6) \end{array}$ |
| K7                       | 9.2 (0.30)   | 79 <sup>d</sup> (2.2)  | 29 <sup>d</sup> (0.8)  |
| CP3<br>CP2<br>CP1        | 0.54 (0.017)<br>0.35 (0.015)<br>0.35 (0.016)                       | 9.3 (0.3)<br>17 (0.7)<br>15 (0.7)  | 260(8.5)22(0.9)150(6.6)  |
| HR<br>YM<br>KN<br>NY     | 0.35 (0.0027)<br>0.92 (0.0080)<br>0.35 (0.0075)<br>0.35 (0.0088)   | <13 (<0.1)<br><12 (<0.1)<br><4.7 (<0.1)<br><4.0 (<0.1)   | <13 (<0.1)<br><12 (<0.1)<br><4.7 (<0.1)<br><4.0 (<0.1)   |

Table 6. Abundance of fecal bacteria in river water samples.

Bacteroides groups detemined by DVC-FISH.

<sup>®</sup> Escherichia-Shigella and relatives detemined by DVC-FISH.

 $\degree$ % of total count.

<sup>"</sup> Determined by FISH.

# 小括

東南アジア諸国では,急速に都市化,工業化が進み,生活排水,工業廃水,さらには多 量の農薬の使用による水質汚濁が深刻化している.環境汚染に対して的確な対策を講じる ためには、まず河川環境の現状を明らかにすることが重要であり、生態系の根幹部を支え ている細菌を深く理解することが必要である。そこでマレーシアの Kelang 川およびタイ の Chao Phraya 川に生息する細菌の群集構造およびその生理活性をシングルセルで検討し た.大阪の都市河川水との比較を行ったところ、Kelang 川に生息する細菌の 20-60% が 培養可能であることが分かり、細菌の生理状態が全く異なることが推察された。

細菌の rRNA 含量を指標とした FISH 法および DVC-FISH 法の検出効率の結果から, Kelang 川に生息する細菌は河川水中での生理活性が高いこと, Chao Phraya 川に生息する 細菌は河川水中での生理活性が低いものの, その多くはタンパク合成能を有していること がわかった. Kelang 川では水量が少ないにもかかわらず, 十分に処理されていない多量の 下水が流入している. また処理された場合でも, 塩素消毒が行われずに河川に放流される ことから, Kelang 川に生息する細菌の多くは生理活性が高いものと考えられた.

細菌群集構造解析の結果から,両河川ともに Proteobacteria の beta, gamma サブクラス の細菌が優占し, beta サブクラスが優占する冷温帯の水環境との違いがみられた.また大 阪の試料では DVC-FISH を行うことにより, gamma サブクラスの細菌が多く検出される ようになったことから,これらの細菌は河川水中での生理活性が低いものの,タンパク合 成能を保持していることが明らかとなった.一般的に gamma サブクラスの細菌は自然環 境中での現存量は少ないと報告されていることから,実際には冷温帯の水環境に生理活性 が低い状態で生存していることが推察された.

FISH 法を用いて Bacteroides グループ, Escherhichia-Shigella グループの細菌の現存量 を検討した結果, Kelang 川および Chao Phraya 川では,動物消化管由来の細菌が培養法に より得られる値に比べはるかに高い割合で存在していることが明らかとなった.屎尿汚染 の見られる環境では,消化器感染症の病原体の存在が危惧される.したがって Kelang 川, Chao Phraya 川では,培養操作に依存しない手法を用いて汚染指標細菌をモニタリングする 必要があると考えられた.

DVC-FISH 法を用いることにより,通常の FISH 法では困難であったタンパク合成能を 持つ細菌を対象とする群集構造解析が可能となり,水環境の微生物モニタリングに有効な 手法であると考えられた.また本法は迅速かつ高感度にタンパク合成能を持つ特定細菌を 検出可能であることから,医療や食品分野,住環境における微生物管理に応用できるもの と期待される.

 $\mathbf{27}$ 

#### 総括

微生物は生物圏に広く生息し、多種多様な物質の分解、循環を通して、生態系を支えて いる.例えば動植物に由来する有機物を無機化し、栄養塩の再利用を促進している.また 農薬や合成洗剤など環境中に放出された様々な化学物質を分解し、環境浄化に大きく貢献 している.つまり微生物のこれらの働きがなければ、物質は循環せず、生態系の恒常性は 維持できないといえる.また微生物は分解者として環境中で機能している一方、上位の生 物に栄養源として利用され、生産者としての役割も担っている.このように環境中の微生 物はその存在の重要性が認識されているにもかかわらず、群集の基本的情報、すなわち群 集構造やそれを構成する個体の生理活性に関する情報ですら、いまだ十分には理解されて いない.この大きな理由として、現在一般的に用いられている培養法では、環境中のごく 一部の細菌しか検出できないことが挙げられる.また培養の難しい細菌であっても、その 多くは生理活性を有していることが明らかとなっており、環境中における重要性が認識さ れてきている.したがって環境中に生息する細菌の群集構造を解析しその生理活性を評価 するためには、培養操作に依存しない検出法が必要となる.

環境中に生息する細菌を培養することなく属種レベルで明らかにする方法として, 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH 法) が 1990 年以降環境微生物学に応用されつつ ある.しかしながら, FISH 法の検出感度は菌体内の rRNA 含量に依存することから, 貧 栄養な環境に生息する rRNA 含量が低い細菌に対しては, その応用が制限される場合が多 い.そこで本研究では蛍光基質 HNPP および Fast Red TR を用いた高感度な FISH 法 (HNPP-FISH 法) に着目し, 河川水中の生理活性の低い細菌の群集構造を解析することを 目的として, その最適化を試みた.水環境に多く生息すると報告されている細菌を標的と した 5 種の rRNA プローブを用い, そのハイブリダイゼーションの条件を 30 種の標準 株を用いて決定した.

次に本法を河川水中の細菌群集構造解析に応用し,従来法との比較を行った. HNPP-FISH 法では全細菌の約 70% の細菌を検出することができたのに対し, 寒天平板培養法では約 5%,従来法である FITC-FISH 法では約 15% であった. このことから本法は従来法に比 べはるかに有効な手法であることがわかった. また 5 種のプローブを用いて群集構造解析 を行った結果,有機物汚染の進んだ地点では約 50%,汚染の進んでいない地点では 25-40% の細菌がいずれかのプローブとハイブリダイズし,プローブ EUB338 で検出できる

 $\mathbf{28}$ 

細菌の大部分を同定することができた.本法は淡水環境に生息する細菌の役割や生態学的 意義を理解するための基礎となるものと考えられた.

FISH 法の検出感度は細菌の rRNA 含量に依存することから,細菌の生理活性を知る指標の一つとなる.しかしながら,飢餓状態に入った細菌では rRNA の半減期は数日であり, FISH 法は厳密には細菌の生死を評価できる手法ではない.環境中では生きている細菌,高い生理活性を持つ細菌は物質循環における寄与が大きいと推察される.そこで DVC 法を行った試料に対し FISH を行い (DVC-FISH 法),東南アジアの河川に生息する細菌の群集構造解析とその生理活性評価に応用した.本研究では水質汚濁が深刻化しているマレーシアの Kelang 川およびタイの Chao Phraya 川,さらに大阪市周辺の都市河川を対象とした.

細菌の rRNA 含量を指標とした FISH 法および DVC-FISH 法の検出効率の結果から, Kelang 川に生息する細菌は河川水中での生理活性が高いこと, Chao Phraya 川に生息する 細菌は河川水中での生理活性が低いものの, その多くはタンパク合成能を有していること がわかった. Kelang 川では水量が少ないにもかかわらず, 十分に処理されていない多量の 下水が流入している. また処理された下水であっても, 塩素消毒が行われずに河川に放流 されることから, Kelang 川に生息する細菌は生理活性が高いものと考えられた.

細菌群集構造解析の結果から,両河川ともに Proteobacteria の beta, gamma サブクラス の細菌が優占し, beta サブクラスが優占する冷温帯の水環境との違いがみられた. また大 阪の試料では DVC-FISH を行うことにより, gamma サブクラスの細菌が多く検出される ようになったことから,これらの細菌は河川水中での生理活性が低いものの,タンパク合 成能を保持していることが明らかとなった. 一般的に gamma サブクラスの細菌は自然環 境中での現存量は少ないと報告されていることから,実際には冷温帯の水環境に生理活性 が低い状態で生存していることが推察された.

FISH 法を用いて Bacteroides グループ, Escherhichia-Shigella グループの細菌の現存量 を検討した結果, Kelang 川および Chao Phraya 川では,動物消化管由来の細菌が培養法に より得られる値に比べはるかに高い割合で存在していることが明らかとなった.屎尿汚染 の見られる環境では,消化器感染症の病原体の存在が危惧される.したがって Kelang 川, Chao Phraya 川では,培養操作に依存しない手法を用いて汚染指標細菌をモニタリングする 必要があると考えられた.

DVC-FISH 法を用いることにより,通常の FISH 法では困難であったタンパク合成能を 持つ細菌を対象とする群集構造解析が可能となり,本法は水環境の微生物モニタリングに

有効な手法であると考えられた.また DVC-FISH 法は迅速かつ高感度にタンパク合成能を 持つ特定細菌を検出可能であることから,医療や食品分野,住環境における微生物管理に 応用できるものと期待される.

### 結論

- 1. 河川水中の生理活性の低い細菌に対する群集構造解析を目的として HNPP-FISH 法を 最適化した.
- HNPP-FISH 法を用いることにより,河川水中の約 70% の細菌を対象とする群集構造 解析が可能となった.従来法である寒天平板培養法では約 5%, FITC-FISH 法では約 15% であったことから, HNPP-FISH 法ははるかに有効な手法であることが示された.
- 3. DVC-FISH 法を用いることにより,通常の FISH 法では困難であったタンパク合成能 を持つ細菌を対象とする群集構造解析が可能となった.
- 4. DVC-FISH 法は迅速かつ高感度にタンパク合成能を持つ特定細菌を検出可能であることから、水環境の微生物モニタリングのみならず、医療や食品分野、住環境における微生物管理に応用可能であると考えられた.

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり,終始暖かい御指導と御鞭撻を賜りました,大阪大学大学院薬学 研究科教授・恩師 那須正夫先生に篤く御礼申し上げます.

研究途上,数々の御助言をいただきました大阪大学大学院薬学研究科講師,谷佳津治先 生,大阪大学大学院薬学研究科助手,山口進康先生に深謝いたします.

また、本研究に御協力をいただきました大阪大学大学院薬学研究科遺伝情報解析学分野 の諸氏に御礼申し上げます.

マレーシア,タイでの調査・研究にあたり,数々の御助言,御協力を頂きました財団法 人 化学品検査協会 化学品安全センター 久留米研究所,田所博先生,藤本一馬先生, SIRIM-JICA Project,三上栄一先生,マヒドン大学環境資源学部講師,Benjaphorn Prapagdee 先生に深謝いたします.また,実験室ならびに実験器具等を提供して頂いた SIRIM Berhad, マヒドン大学環境資源学部に心より御礼申し上げます.

# 引用文献

- OECD Environment Directorate. p301C. *In* OECD Environment Directorate (ed.), OECD guidelines for testing of chemicals. OECD publications, France (1981).
- OECD Environment Directorate. p301E. *In* OECD Environment Directorate (ed.), OECD guidelines for testing of chemicals. OECD publications, France (1981).
- OECD Environment Directorate. p302C. *In* OECD Environment Directorate (ed.), OECD guidelines for testing of chemicals. OECD publications, France (1981).
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A. and Thingstad, F. : *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **10**, 257 (1983).
- 5) Hobbie, J.E., Daley, R.J. and Jasper, S. : Appl. Environ. Microbiol., 33, 1225-1228 (1977).
- 6) Kogure, K., Shimidu, U. and Taga, N. : Can. J. Microbiol., 25, 415-420 (1979).
- 7) Jones, J.G. : Freshwater Biol., 7, 67-91 (1977).
- 8) Torsvik, V., Goksyr, J. and Daee, F.L. : Appl. Environ. Microbiol., 56, 782-787 (1990).
- 9) Karlmbach, S., Manz, W. and Szewzyk, U. : Appl. Environ. Microbiol., 63, 4164-4170 (1997).
- 10) 谷佳津治,山本かおり,山口進康,那須正夫:防菌防黴,26,415-421 (1998).
- 11) Kawai, M., Yamaguchi, N. and Nasu, M. : J. Appl. Microbiol., 86, 496-504 (1999).
- 12) Rodriguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K. and Ridgway, H.F. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1801-1808 (1992).
- Porter, J., Diaper, J., Edwards, C. and Pickup, R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2783-2786 (1995).
- 14) Yamaguchi, K. Kenzaka, T. and Nasu, M. : Microb. Environ., 12, 1-8 (1997).
- 15) Rahman, I., Shahamat, M., Chowdhury, M.A. and Colwell, R.R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 115-120 (1996).
- 16) Colwell, R.R. : Science, 274, 2025-2031 (1996).
- 17) Delong, E.F., Wickham, G.S. and Pace, N.R. : Science, 243, 1360-1363 (1989).

- 18) Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R. and Stahl, D.A. : J. Bacteriol., 172, 762-770 (1990).
- 19) Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. : Microbial. Rev., 59, 143-169 (1995).
- Yamaguchi, N., Inaoka, S., Tani, K., Kenzaka, T. and Nasu, M. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 275-278 (1996).
- 21) Flardh, K., Cohen, P.S. and Kjelleberg, S. : J. Bacteriol., 174, 6780-6788 (1992).
- 22) Nishimura, M. Kogure, K. Kita-Tshukamoto, K. and Ohwada, K. : *Bul. Jap. Soc. Micro. Ecol.*, 10, 109-113 (1995).
- 23) Lee, Y.H. and Stuebing, R.B. : Bull. Environ. Contam. Toxicol., 45, 272-279 (1990).
- 24) Kusamran, W.R., Wakabayashi, K., Oguri, A., Tepsuwan, A., Nagao, M. and Sugimura, T. : Mutat. Res., 325, 99-104 (1994).
- 25) Tan, G.H.: Bull. Environ. Contam. Toxicol., 54, 171-176 (1995).
- 26) Department of Environment, Ministry of Science, Technology and the Environment, Malaysia, Environmental Quality Report (1997).
- 27) Reasoner, D.J. and Gerldreich, E.E. : Appl. Environ. Microbiol., 49, 1-7 (1985).
- Welikala, N., Yamaguchi, N., Kenzaka, T., Tani, K. and Nasu, M. : *Biocontrol Science*, 2, 79-86 (1997).
- Yamaguchi, N. Itoh, Y., Masuhara, M., Tani, K. and Nasu, M. : *Microb. Environ.*, 14, 1-9 (1999).
- 30) Wallner, G., Amann, R.I. and Beisker, W. : Cytometry, 14, 136-143 (1993).
- 31) Kirchman, D., K'nees, E. and Hodson, R. : Appl. Environ. Microbiol., 49, 599-607 (1985).
- 32) Lighthart, B. : Can. J. Microbiol., 21, 392-394 (1975).
- 33) Konda, T. and Tezuka, Y.: Jap. J. Ecol., 29, 209-220 (1979).
- 34) Maeda, S. : Jap. J. Limnol., 41, 163-171 (1980).
- 35) Stopinski, M. : Acta. Microbiol. Pol., 30, 283-294 (1981).
- 36) Nuttall, D. : J. Appl. Bacteriol., 53, 49-59 (1982).

- 37) Hodson, R.E., Dustwan, W.A., Garg, R.P. and Moran, M.A. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 4074-4082 (1995).
- 38) Tani, K., Kurokawa, K. and Nasu, M. : Appl. Environ. Microbiol., 64, 1536-1540 (1998).
- 39) 日本薬学会編 衛生試験法 · 注解, p.174-178 (1990).
- Manz, W., Amann, R. Ludwing, M., Wagner, M. and Schleifer, K.-H. : Syst. Appl. Microbiol., 15, 593-600 (1992).
- 41) Manz, W., Amann, R., Ludwing, W., Vancanney, M. and Schleifer, K.-H. : *Microbiology*, **142**, 1097-1106 (1996).
- 42) Alfreider, A., Pernthaler, J., Amann, R., Sattler, B., Glockner, F.O., Wille, A. and Psenner, R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2138-2144 (1996).
- 43) Glockner, F.O., Amann, R., Alfleider, A., Pernthaler, L., Psenner, R., Trebesius, K. and Field,
  K.G. : System. Appl. Microbiol., 19, 403-406 (1996).
- 44) Joux, F. and Lebaron, P. : Appl. Environ. Microbiol., 63, 3643-3647 (1997).
- 45) Weiss, P., Schweitzer, B., Amann, R. and Simon, M. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1998-2025 (1996).
- 46) Pernthaler, J., Alfreider, A., Posch, T., Andreatta, S. and Psenner, R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4778-4783 (1997).
- 47) Pernthaler, J., Glockner, F.O., Unterholzner, S., Alfreider, A., Psenner, R. and Amann, R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4299-4306 (1998).
- 48) Glockner, F.O., Fuchs, B.M. and Amann, R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3721-3726 (1999).
- 49) Moore, W.E.C. and Holdeman, L.V.: Appl. Microbiol., 27, 961-979 (1974).
- Holdeman, L.V., Good, I.J. and Moore, W.E.C. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 359-375 (1976).
- 51) Kreader, C.A.: Appl. Environ. Microbiol., 61, 1171-1179 (1995).
- Blaut, M. : German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrucke Annual Report 1996, 69-70 (1997).

