

多摩川下流域底泥における硫酸還元菌の 核酸プローブによる解析とその硫酸還元速度との関係

1 9 9 6 年

滝 井 進

東京都立大学理学部生物学科教授

目 次

1. はじめに	1
2. ハイドロキシアパタイト・スピンカラムを用いた 底泥堆積物からの核酸抽出法の開発	2
3. 多摩川底泥懸濁液における有機物添加後の 硫酸還元菌の動態の核酸プローブ法による解析	5
4. 多摩川下流域における硫酸還元活性の分布と季節変化	15
5. 核酸プローブ法による多摩川下流域底泥における 硫酸還元菌の分布と動態の解析	20
6. ま と め	26
7. プロトコル	27
8. 文 献	38

1. ま え が き

硫酸還元菌は有機物負荷の高い河川、湖沼や海域の底泥などの嫌気的環境で硫酸塩を酸化剤（電子受容体）として有機物や水素を酸化する際、硫化水素を生成する。そのため、硫酸塩の多い海水の流入する内湾や感潮河川などの嫌気的底泥では、活発な硫酸還元により悪臭の発生や魚介類の弊死などを招き、問題となっている。とくに、多摩川下流域では有機物負荷が大きく、底泥は嫌気的になりやすいため、前報（瀧井、1992）で示したように活発な硫酸還元が夏季を中心に起こっている。

一方、硫酸還元は、沿岸海域底泥における有機物の無機化に主要な位置を占めることが近年明らかになってきた（例えば、Jorgensen,1982）。そのため、硫酸還元菌の主要な活動の場である底泥堆積物におけるその動態を属レベルで明らかにすることは、環境の改善や物質循環の理解に不可欠である。

硫酸還元菌の計数は今までMPN（最確数）法や二重皿法など培養による方法で行われてきた。これらの方法では試料中の細菌細胞を完全に分散させることや限られた種類の培地であらゆる種類の硫酸還元菌を増殖させることの困難さのため、計数値はかなり過小評価になると考えられる。さらに、近年、硫酸還元菌の新種が次々に発見され、多くの有機物を直接、または間接的に分解できることが明らかになってきたが、それらの種には通常の方法では培養が困難なものも多い。さらに、培養計数法では、活発に増殖している細胞も不活性な細胞も用いられた培地に増殖できれば等しく計数されるので、培養法による菌数と代謝活性は一般に相関が得られない。したがって、硫酸還元菌の培養による計数法では活性を担う菌群の動態や種類組成を明らかにすることは極めて難しい。

そこで、本研究では最近開発されつつある、培養を要しない分子生物学的手法の一つである16SリボソームRNAを標的としたオリゴヌクレオチドプローブ法を適用して、硫酸還元菌の動態を明らかにすることを目的とした。リボソームRNA（rRNA）は増殖速度の大きい細菌ほどその含量が高いため、この方法では、現場で活性のある（増殖速度の大きい）種の組成と分布を捉えられるものと期待される。本法は細菌密度の高いルーメン（反芻動物第一胃）内細菌の動態（Stahl et al.,1988）や廃水処理施設（Amann et al.,1992）や塩田（Risatti et al.,1994）などの人工的生物膜の硫酸還元菌の解析に適用され、成功している。しかし、より細菌密度の低い自然水域の底泥堆積物についての報告はまだ見当たらない。その理由は堆積物から効率よく核酸を抽出し、分子生物学的分析に耐えられるほどの純度に精製する方法が確立されていないためである。そこで、われわれはまず、核酸の抽出・精製法から検討を開始した。

2. ハイドロキシアパタイト・スピンカラムを用いた 底泥堆積物からの核酸抽出法の開発

Kevin J. Purdy 藤本 淳治、福井 学、龍井 進

2-1 はじめに

自然微生物集団の分子生物学的解析には環境から核酸を直接、高い純度で抽出することが必要である。堆積物や土壌から核酸を抽出するためには、最初に細菌細胞を堆積物や土壌から分離する方法と、分離せず堆積物・土壌中で直接細菌を破碎する方法がある。前者は後者に比べ、核酸の収量が低く、また、分離の容易な細菌の核酸の比率が増すため、その構成に偏りが生じる恐れが強い (Steffan et al., 1988 ; Leff et al., 1995)。そのため、環境試料から微生物集団の核酸を得るためには後者が一般に用いられるが、従来の方法は抽出効率が低く、また夾雑する多くの有機物が混入しやすい (Steffan et al., 1988 ; Tebbe & Vahjen, 1993)。細菌細胞の直接破碎法は酵素による溶解法からビーズビーターを用いる機械的破碎法まで多数報告されている (Bruce et al., 1992 ; More et al., 1994 ; Ogram et al., 1987 ; Porteous & Armstrong, 1991 ; Tsai & Olson, 1991) が、機械的破碎法が堆積物中の細胞破壊には最も効率が良く、しかも非選択的である (More et al., 1994)。

われわれは、細胞破碎にビーズビーターを用い、核酸の精製に新しいハイドロキシアパタイト・スピンカラムを用いる方法を検討し、酵素と凍結融解による細胞破碎とフェノール・クロロホルムにより精製する、最もよく使われる Tsai & Olson (1991) の方法と比較した。

2-2 方法

堆積物から細胞外の核酸を除去するため、堆積物試料を等量の 120mM リン酸ナトリウム、pH 8.0 とともに 15 分間 150rpm で振盪し、6000xg で遠心した。ペレット状の試料を 4g ずつアルミ箔に包み、抽出まで -20°C で保存した。Tsai & Olson 法では核酸の沈殿にイソプロパノールを用いるが、代わりにエタノールを用いた。また、腐植夾雑物は Moran et al. (1993) による 2 ml Sephadex G-75 によって除去した。その試料処理時間は 1.5 日である。

開発した方法は以下の通りである。堆積物試料 (湿重 1g) は乾熱滅菌したガラスビーズ (直径 0.1mm、0.5g) とともにネジ蓋つきエッペンドルフチューブに入れ、さらに、つぎの溶液を加えた。リン酸ナトリウム (pH 8.0) + 1% 酸洗浄ポリビニルピロリドン、0.5ml Tris 飽和フェノール (pH 8.0) および 50ml の 20% ドデシル硫酸ナトリウム。細胞を破碎するため、これをビーズビーター (マイクロディスメンプレータ U 型、ビー・ブラウン社製) で 2000rpm 30 秒間処理し、30 秒氷上で冷却する操作を 3 回繰り返した。処理したサンプルを 12000xg で 2 分間遠心し、上静を新しい 2 ml チューブに移し、氷冷した。抽出残査からさらに核酸を抽出するため、再び残査の入ったチューブに 120mM リン酸

ナトリウム0.75mlを加え、2000rpmで30秒間ビーズビーターで処理した。得られた二つの上静を合わせ、前もって調製しておいたハイドロキシアパタイト (HTP) ・スピнкаラムを通した。HTPカラムはガラスウールを詰めた1 mlのプラスチック・シリンジに0.6-0.7mlのHTPを入れ、100xgで2分間遠心して調製した。このカラムに抽出液を0.7ml加え、100xg、2~4分間遠心し、全ての抽出液を処理するまで遠心を繰り返した。次いで、カラムを0.7mlの120mMリン酸ナトリウムpH7.2で3回洗浄し、HTPに結合したタンパク質を除去した。つづいて、0.4mlの300mMリン酸カリウムで核酸を溶出し、滅菌エッペンドルフチューブに集めた。リン酸カリウムはリン酸ナトリウムよりもHTPカラムから核酸を溶離するのに有効である。溶出液は2.5mlセファデックス-G75スピнкаラムで脱塩を行い、核酸をエタノールで沈殿させ、50 μ lのTE (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH8.0) に懸濁し、-20°Cで保存した。処理時間はエタノール沈澱を含め3時間である。

2-3 結果と考察

この方法で得られた核酸は10キロ塩基対のオーダーで、アガロースゲルのエチジウムブロマイド染色により23Sおよび16SrRNAが明瞭に認められた (図2-1)。大部分のDNAとRNAは最初の抽出バッファーで抽出されるが、2回目の洗浄によってもかなりの量が抽出される。しかし、それ以上の処理によっては核酸はほとんど抽出されない。カラムへのロードおよび溶出の段階で核酸の損失はほとんど

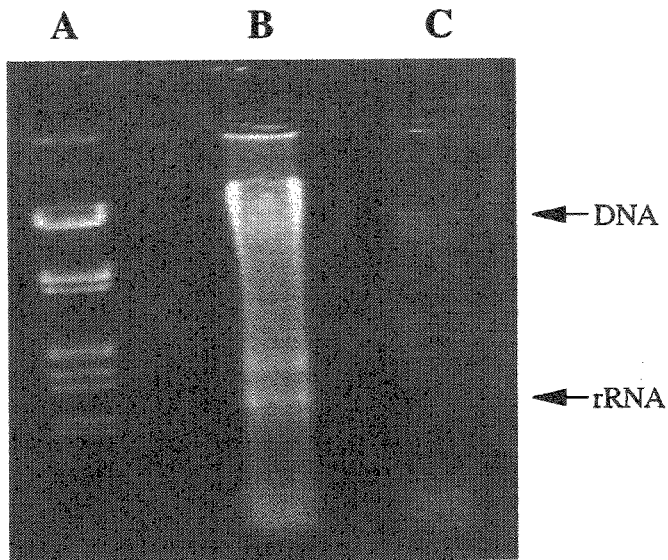


図2-1 ハイドロキシアパタイト・スピнкаラム (HTP) 法 (B) と Tsai & Olson法 (C) によって底泥から抽出された核酸のエチジウムブロマイド染色アガロースゲル。AはEcoRI+HinD III digested λ DNA サイズマーカー

表 2 - 1 Tsai&Olson 法と HTP スピンカラム法により底泥から抽出された核酸の紫外外部吸収比

試料	紫外外部吸収比	
	A260/A280	A260/A230
Tsai & Olson 法	1.08	0.82
HTP スピンカラム法	1.77	1.87

と認められなかった。また、溶出バッファーはカラムに結合した核酸の90%以上を除去できる。表 2 - 1 に示すように、得られた核酸の分光学的測定によるとタンパク質混入の指標である260nmと280nmの吸光度の比(A260/A280)と腐植物質混入の指標である260nmと230nmの吸光度の比(A260/A230)は1.75以上を示すので、その純度はかなり高い。アガロースゲル電気泳動のエチジウムブロマイド染色によれば、Tsai & Olson (1991) 法で得られた核酸量はHTPスピンカラム法に比べてかなり少なく(図 2 - 1)、また、A260/A280とA260/A230の値(表 2 - 1)からみて、腐植物質の混入が多い。腐植物質は多くの分子生物学的手法の妨害となるばかりか、核酸の分光学的定量に影響を与えるため、この方法での核酸の収率は求められなかったが、アガロースゲル電気泳動から肉眼的に推定すると、Tsai & Olson法による核酸の収率はHTPスピンカラム法よりもかなり低いと推定される。

後述するように、HTPスピンカラム法によって堆積物から得られた核酸試料は放射性リンで標識したオリゴヌクレオチドとのRNAハイブリダイゼーションにも支障なく利用できた。細胞破碎から核酸精製段階までの時間を大幅に短縮することができたことは、RNA分解酵素によるRNAの分解を防ぐ上で大きな利点である。ここに述べた新しい抽出法は、迅速で、簡単な方法であり、現在使われている抽出法に比べて、純度の高いDNAとRNAを得られることが明らかとなった。

3. 多摩川底泥懸濁液における有機物添加後の硫酸還元菌の動態の核酸プローブ法による解析

Kevin J. Purdy, 滝井 進

3-1 はじめに

現在、細菌種の90%以上が、伝統的な手法によっては培養が不可能と考えられている。したがって、どんな環境においても活性のある細菌群を完全には単離、同定できていない。とくに、嫌気環境の微生物は酸素に敏感であり、増殖速度が小さいため、従来の同定、計数法によっては捉えられないものが多い。また、単離された細菌を実験室で純粋培養すると、自然環境で重要となる特性を示さなかったり、また、重要でない特性を誇張して表す可能性がある。そのため、環境における微生物の活性と群集構造との関係に関する知見は極めて乏しいのが現状である。そこで、未知の細菌種の探索や特定の細菌種や属の自然環境における生態の研究に、近年開発されつつある培養を要しない分子生物学的手法が注目されている。近年、細菌の系統的分類法はリボソーム小サブユニットRNA (16SrRNA) の塩基配列の比較によって著しく進展した。16SrRNA配列の可変的または保存的部位に特異的にハイブリダイゼーションするオリゴヌクレオチドプローブを作成することによって、培養せずに細菌の種または群を同定することが可能になる。

自然界に多いグラム陰性の硫酸還元菌はプロテオバクテリアのデルタ群に属し、系統的に比較的まとまったグループを形成しているので、16SrRNAを標的とした種々のオリゴヌクレオチドプローブを製作することによって属や群のレベルで同定が可能になる。このようなプローブは既にDeverouxら(1992)によって開発されており、最近、室内廃水処理生物膜(Amann et al.,1991)や塩田の生物膜(Risatti et al.,1994)の硫酸還元菌の種類組成の解析に用いられている。しかし、既に述べたように、硫酸還元菌の自然界における主要な活動の場である水界堆積物ではこの方法の適用例はまだ報告されていない。われわれは、底泥から比較的純度の高い核酸を抽出する方法を開発することができたので、まず、種々の有機物を添加した多摩川底泥懸濁液における硫酸還元菌の動態を各種の硫酸還元菌に特異的なヌクレオチド・プローブを用いて解析し、これらプローブによる方法の有用性を評価した。

3-2 材料と方法

感潮域の塩分濃度の低いガス橋(地点2、河口から約10.5km)と塩分濃度の高い羽田(地点4、河口から約1.2km)の2地点でアクリル樹脂製円筒(内径4cm)により表層泥を採取し、実験室に持ち帰った。表層底泥に等容量の脱酸素した河川水を加えて懸濁液とし、嫌氣的に100mlの三角フラスコに分注した。フラスコ2本ずつに各種の有機酸(乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、乳酸+モリブデン酸)塩を最終濃度20mM、また、硫酸塩を10mMとなるように添加した。硫酸塩のみを加えたコント

ロールも用意した。培養前に各フラスコから懸濁液を採取し、6000xgで10分間遠心し、上澄液はGF/Fフィルターでろ過後、硫酸イオンと有機酸の分析まで-20℃で保存した。底泥サンプルはTsai & Olson (1991)の方法で洗浄し、-20℃で保存した。底泥懸濁液は窒素ガスを通気後、密栓し、100回転/分、28℃で2週間振湯培養した。その間、2ないし3日毎にサンプリングを行った。

上澄液の硫酸塩はイオンクロマトグラフィー (Dionex QIC, IonPack AS 4 A) により、有機酸は Lawongsa et al.(1987)の方法により高速液体クロマトグラフィー(Hitachi L-6200 interigent pump, L-4000 UV detector, coloum : SCR-101H, Shimadzu) で分析した。核酸はわれわれの開発したヒドロキシアパタイト・スピнкаラム法(前述)で抽出した。ナイロンメンブランへの核酸の固定とオリゴヌクレオチド・プローブとのハイブリダイゼーションはStahl et al. (1988)の方法によった。実験手法はこの報告の最後にまとめた。用いたプローブは主にDevereux et al. (1992)の記載のものであり、それらの標的生物や塩基配列、ハイブリダイゼーションの温度および洗浄温度は表3-1に示す通りである。メンブランのオートラジオグラフはデンストメータ(島津CS-930)により、既知菌種のrRNAから求めた検量線から定量した。

表3-1 用いたオリゴヌクレオチド・プローブの標的生物と塩基配列、
洗浄温度および文献

プローブ	標的生物	塩基配列(5'→3')	洗浄温度(°C)	文 献
p1400	全生物	ACGGGCGGTGTGTRC	46	Stahl et al., 1988
p338	全真正細菌	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	45	Amann et al., 1990
p385	グラム陰性硫酸還元菌	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	52	Amann et al., 1990
p129	<i>Desulfobacter</i>	CAGGCTTGAAGGCAGATT	46	Devereux et al., 1992
p221	<i>Desulfobacterium</i>	TGCGCGGACTCATCTTCAA	57	Devereux et al., 1992
p660	<i>Desulfobulbus</i>	GAATTCACATTTCCCCTCTG	59	Devereux et al., 1992
p687	<i>Desulfovibrio</i>	TACGGATTTCACTCCT	45	Devereux et al., 1992
p804	<i>Desulfobacter</i>	CAACGTTTACTGCGTGGA	46	Devereux et al., 1992
	<i>Desulfococcus</i>			
	<i>Desulfosarcina</i>			
	<i>Desulfobotulus</i>			

3-3 結果

地点2で採取した底泥堆積物に各種有機酸を添加した懸濁液における有機酸と硫酸イオンの経時変化を図3-1に示す。乳酸添加懸濁液(a)では硫酸イオンは5日、乳酸は2日以内に消費され、同時に、酢酸とプロピオン酸が生成された。2日以後プロピオン酸は減少するが、酢酸は5日まで増加した。乳酸にさらにモリブデン酸を添加したもの(b)では、硫酸イオンは全く消費されなかったが、乳酸の消費はモリブデン酸無添加に比べてやや遅くなるものの、その影響は小さかった。しかし、乳酸の消費とともに生成された酢酸とプロピオン酸は8日にピークに達したが、その後の減少はわずかで、とくにプ

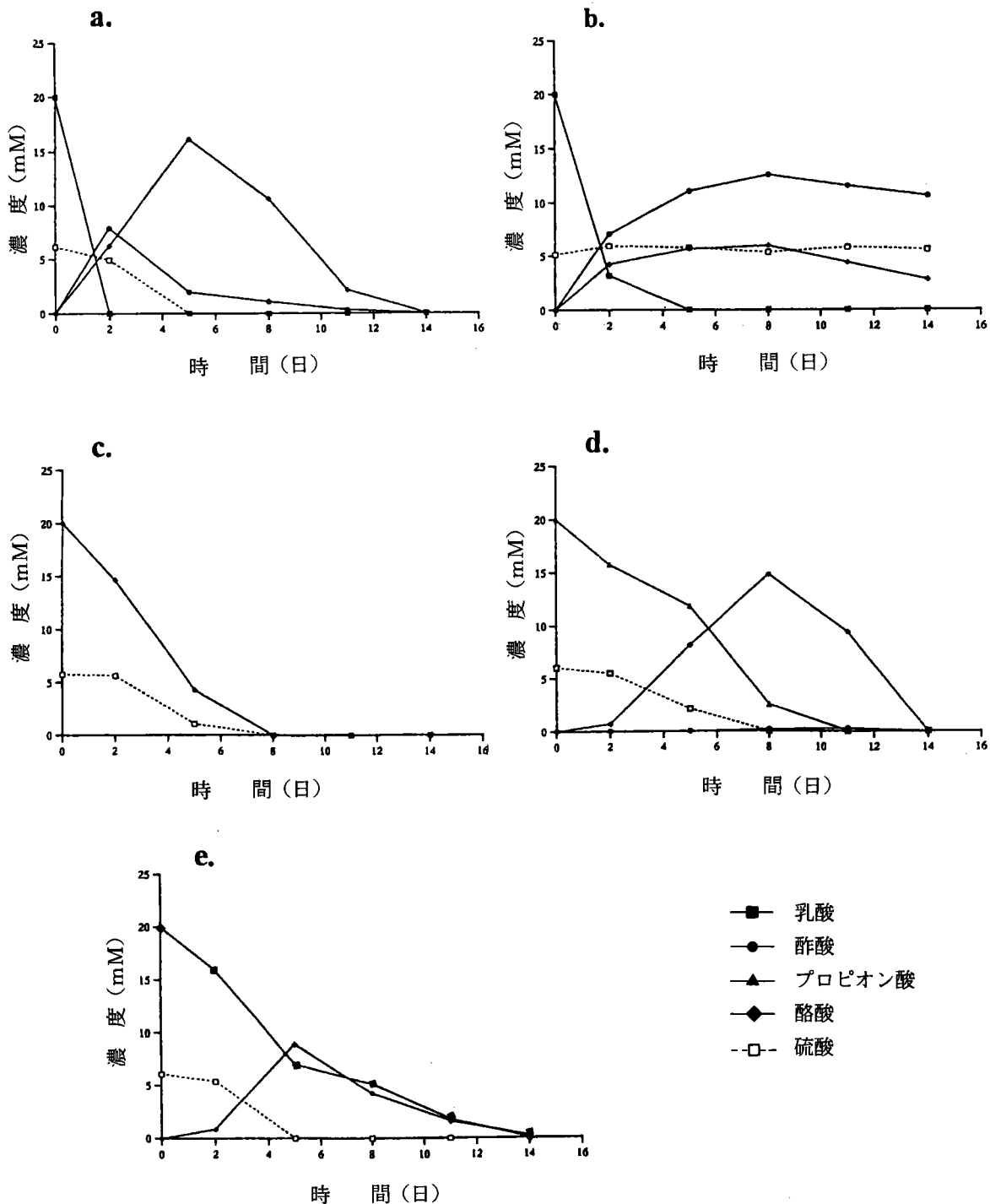


図3-1 地点2底泥懸濁液に各種有機酸を添加後の有機酸と硫酸イオンの経時変化

a : 乳酸添加 b : 乳酸+モリブデン酸塩添加 c : 酢酸添加
d : プロピオン酸添加 e : 酪酸添加

ロンピオン酸の減少はほとんど認められなかった。プロピオン酸添加のもの(c)では硫酸イオンは5日で消失し、プロピオン酸はそれまでは急速に、その後、ゆっくりと減少した。プロピオン酸の減少と共に酢酸が生成され、5日以後に徐々に減少した。酪酸添加(d)では硫酸イオンの減少はより遅く、8日で消失したが、酪酸の減少と共に酢酸が蓄積し、8日にピークとなった後、14日に消失した。酢酸添加では硫酸イオンも、酢酸も減少し、ともに8日で消失したが、他の有機酸は生成されなかった。底泥懸濁液における硫酸イオンの経時変化を図3-2にまとめた。硫酸イオンは乳酸とプロピオン酸添加で最も速やかに減少し、次いで酢酸、酪酸の順であった。

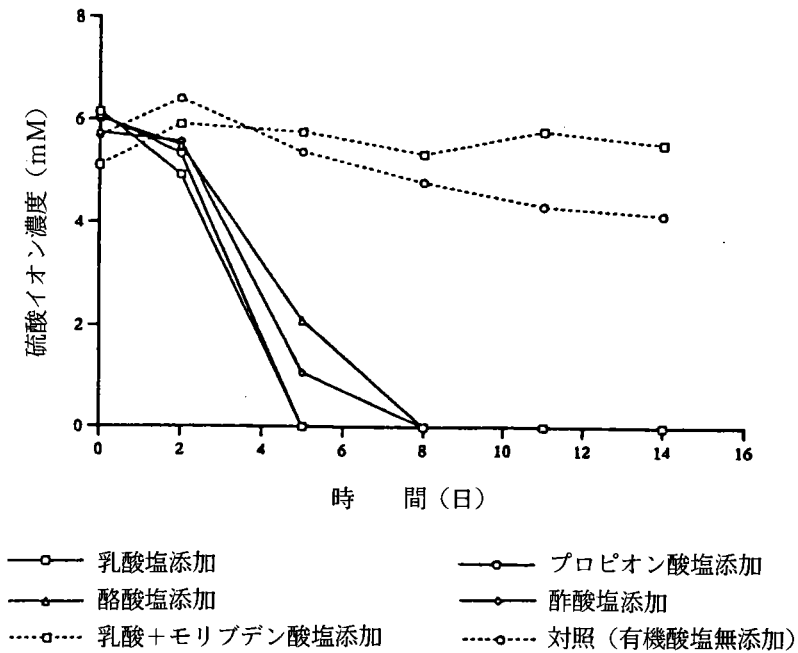


図3-2 地点2底泥懸濁液に各種有機酸を添加後の硫酸イオンの経時変化

上述の各種有機酸を添加した地点2の底泥懸濁液におけるオリゴヌクレオチド・プローブにより検出された硫酸還元菌のrRNAの全細菌rRNAに対する比率の培養後の変化を図3-3に示す。顕著な変化を示したのは、乳酸とプロピオン酸を添加した懸濁液に限られ(図3-3aとb)、rRNA比率の増加は*Desulfobulbus* (p660)のみであった。この属の比率は全細菌の50%に達した。プロピオン酸の存在しない場合と硫酸還元の特異的阻害剤であるモリブテン酸を添加した場合には、*Desulfobulbus*の比率は常に低かった。酢酸および酪酸添加の場合は、他のプローブによる反応のわずかな増加がみられたが、その程度はコントロールおよびモリブテン酸添加の懸濁液とほとんど差がなかった。

海水域の地点4で採取した底泥の懸濁液における有機酸と硫酸イオンの経時変化を図3-4に示す。添加した乳酸は、地点2の場合と同様、2日で消費されたが、酢酸とプロピオン酸の生成は、それぞれ

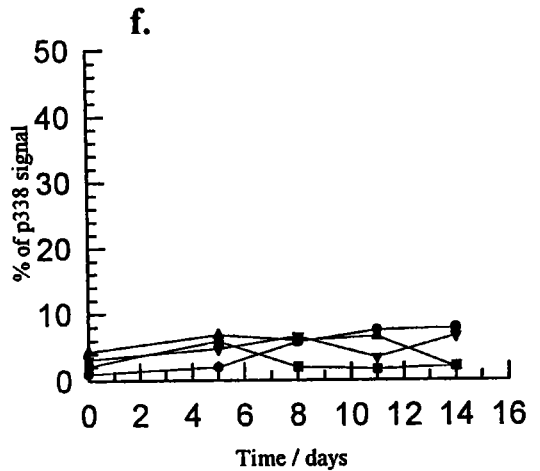
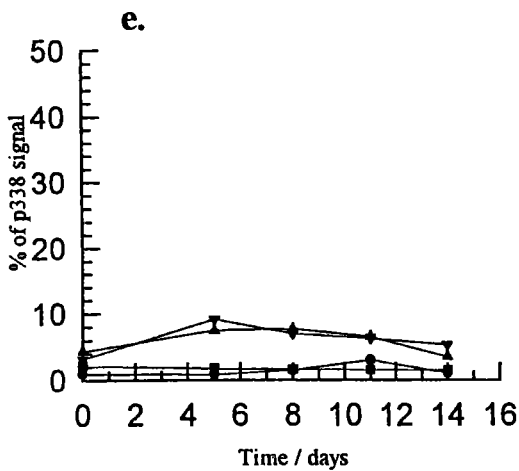
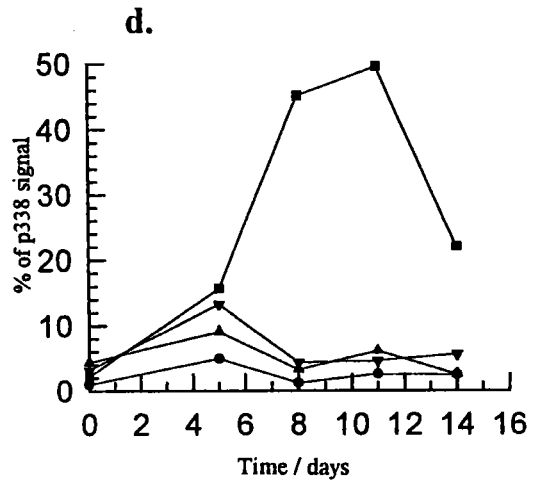
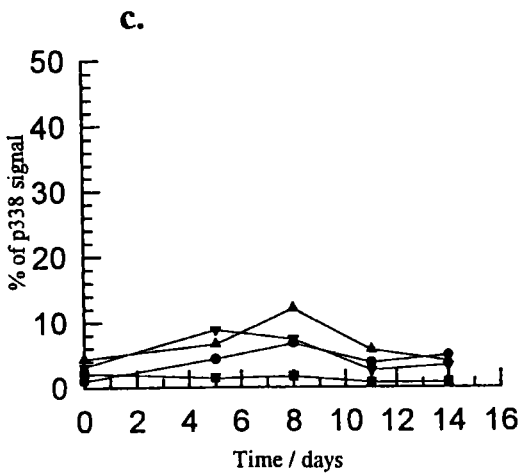
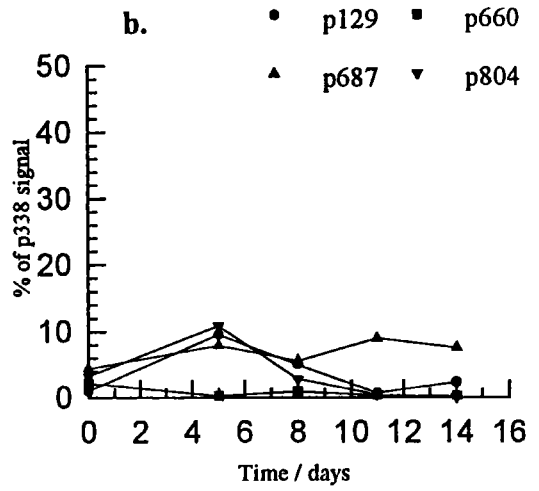
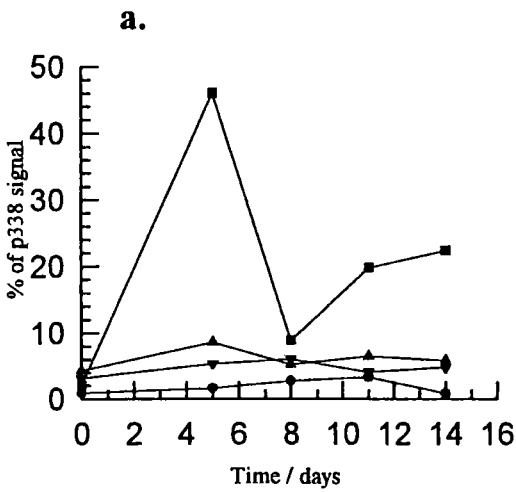


図3-3 地点2底泥懸濁液に各種有機酸を添加後の硫酸還元菌rRNAの全細菌rRNAに対する割合(%)の経時変化

a~eは図3-1に同じ。fはコントロール。

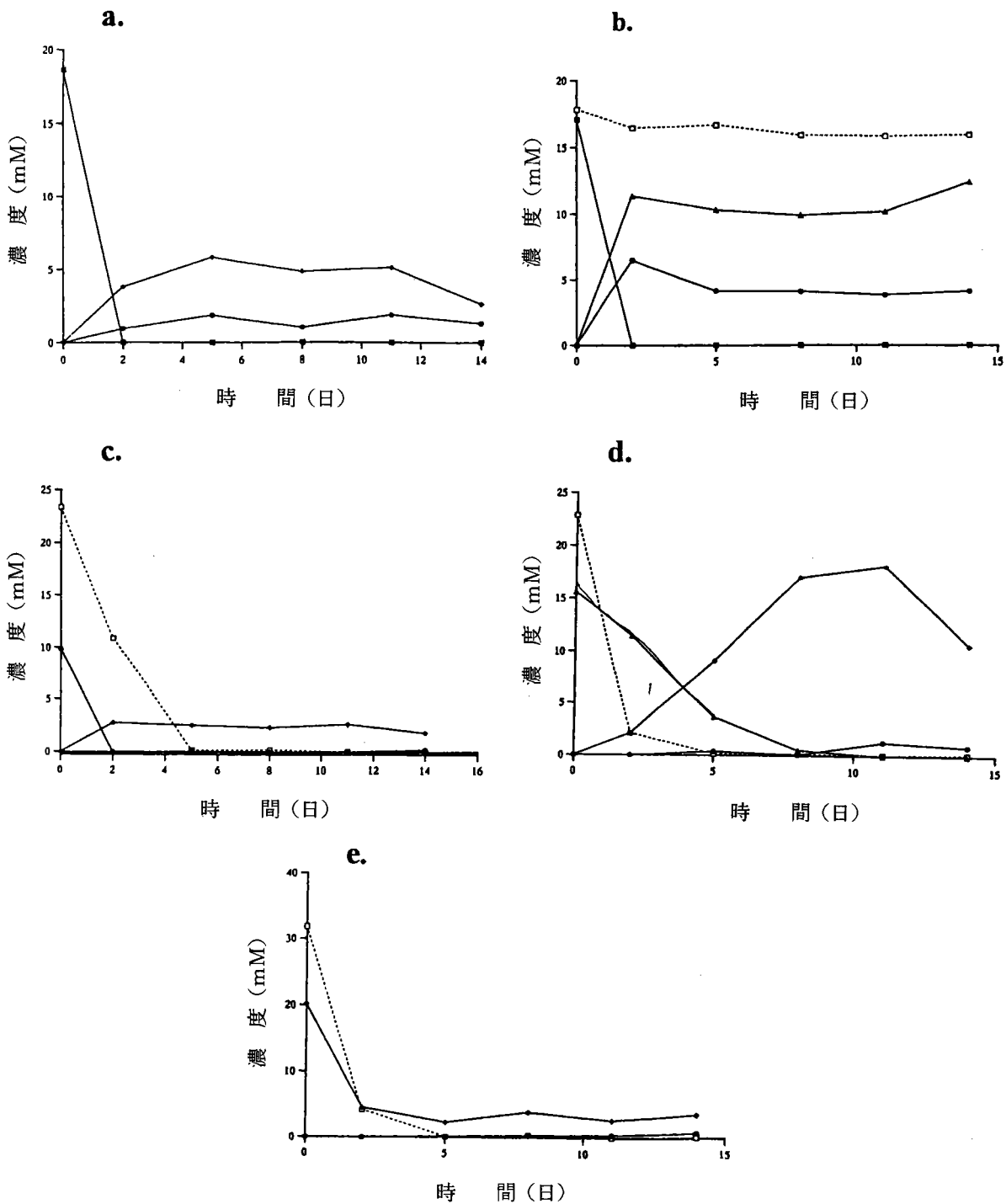


図3-4 地点4底泥懸濁液に各種有機酸を添加後の有機酸と硫酸イオンの経時変化
シンボルは図3-1と同じ。

a : 乳酸添加 b : 乳酸+モリブデン酸塩添加 c : 酢酸添加
d : プロピオン酸添加 e : 酪酸添加

5 mMと2 mM程度であり、その後、11日までほとんど変化しなかった。この時の硫酸イオンは5日までに消失した。乳酸とともにモリブデン酸を添加したものは、乳酸の減少は、乳酸のみ添加の場合と同じであったが、酢酸、プロピオン酸の生成量は2倍以上に増加し、その後の減少は認められなかった。プロピオン酸添加ではプロピオン酸は2日以内に消失し、3 mM程度の酢酸が生成した。硫酸イオンは5日までに検出限界以下に減少し、その後、有機酸濃度はほとんど減少を示さなかった。酪酸添加では酪酸は15日で検出限界以下に減少し、同時に酢酸が生成し、8日でピークに達した後、14日に消失した。硫酸塩は8日で消失した。酢酸添加では酢酸、硫酸イオンとも8日で消失したが、他の有機酸は生成されなかった。地点4の底泥懸濁液における硫酸イオンの消費速度を比較すると(図3-5)、乳酸、プロピオン酸添加が最も早く、次いで酪酸、酢酸の順であった。地点2の底泥の場合と同様に、硫酸塩はモリブデン酸で阻害された懸濁液では利用されなかった。コントロールでは、硫酸塩の減少は有機酸添加のものより遅いが、14日には消失した。

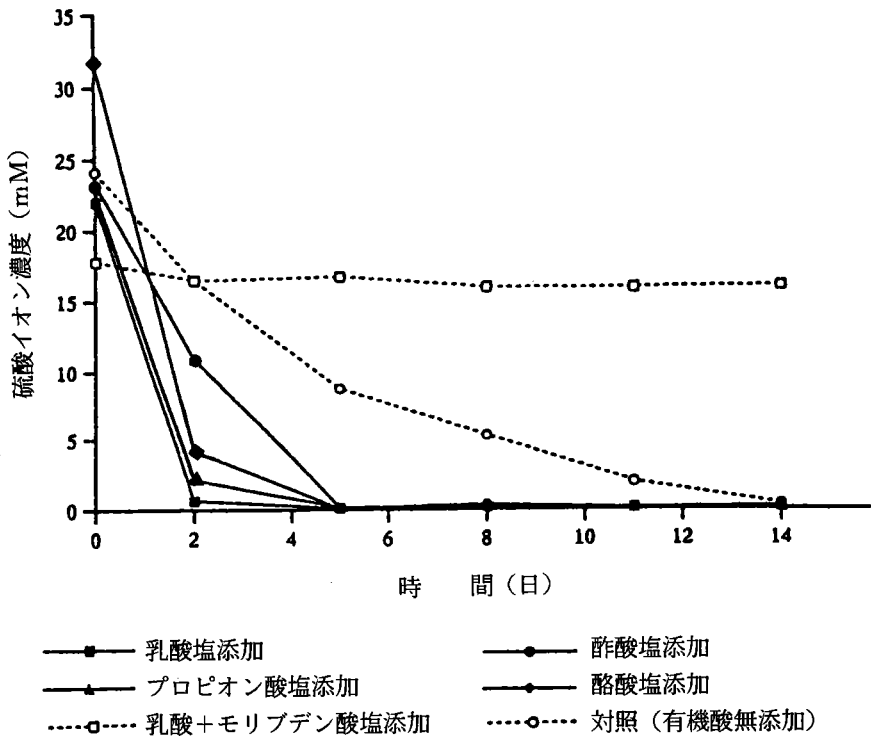


図3-5 地点4底泥懸濁液に各種有機酸を添加後の硫酸イオンの経時変化

図3-6には各種有機酸を添加した地点4の底泥懸濁液における硫酸還元菌rRNAの全細菌rRNAに対する比率の変化を示す。地点2と異なり、乳酸+モリブデン酸添加およびコントロールを除く全ての底泥懸濁液で数種の硫酸還元菌rRNAの比率の増加が認められた。乳酸添加では、グラム陰性硫酸還元菌のシグナルと同様に、*Desulfobacter*のシグナル強度の急速な増加があり、また、*Desulfobulbus*の遅いが、着実な増加もみられた。酢酸添加では、グラム陰性硫酸還元菌と*Desulfobacter*のシグナルだけが増加し、両者のシグナル強度はほぼ等しかった。プロピオン酸は*Desulfobulbus*により酢酸に分解されるため、プロピオン酸添加では、グラム陰性硫酸還元菌、*Desulfobulbus*および*Desulfobacter*のシグナルの増加が認められた。酪酸添加では、グラム陰性硫酸還元菌のシグナルのみが増加し、酢酸の生成があったにもかかわらず、*Desulfobacter*の増加は認められなかった。一方、少量のプロピオン酸の生成に伴い、わずかな*Desulfobulbus*の増加があった。

3-4 考察

ここに示したデータから2つの結論が得られる。第一に、底泥懸濁液という人工的環境における種々の細菌属の相対的活性の変化が、オリゴヌクレオチド・プローブの利用によって検出が可能であることがわかった。いままで、細菌の活性が16SrRNAを標的とするプローブのシグナル強度と相関するという証拠はほとんど示されていなかったもので、この結論は重要である。本研究で用いられたような有機物添加に対する硫酸還元菌の応答は比較的良好に研究されている(Laanbroek & Pfennig, 1981; Tayler & Parkes, 1985)ので、用いたプローブの自然微生物集団に対する適応性を確認する上でこの系は理想的である。これらの結果は、オリゴヌクレオチド・プローブが細菌集団の活性の変化を追跡するのに有効であることを明確に示すものである。

第二に、塩分濃度の異なる2地点で活性のある硫酸還元菌の種類が異なることが示された。塩分濃度の低い地点2では、基質添加で*Desulfobulbus*のみが増加したが、塩分濃度の高い地点4では、数種の硫酸還元菌が活性を示した。*Desulfobacter*は地点4でのみ増加を示したことは、この種の増殖が高い塩分濃度の環境に限られるとのこれまでの報告と一致する。*Desulfovibrio*は、乳酸培地で通常最もよく単離される種であるが、本実験のどの処理によっても増加を示さなかった。水素・CO₂の添加で*Desulfovibrio*は集積される可能性があるが、今後の課題である。Tayler & Parkes (1985)は乳酸を添加した沿岸海域底泥懸濁液を嫌気培養し、硫酸還元菌の増加を脂肪酸の分析によって追跡した結果、われわれの結果と同様に、*Desulfovibrio*に特有の脂肪酸(i17:1w7)の増加は認められなかった。

地点4底泥の酪酸添加懸濁液では*Desulfobacter*を含むグラム陰性硫酸還元菌のシグナル強度は、明らかに*Desulfobacter*のそれよりも大きい。他の添加物では、両者のシグナルはほぼ等しかった。これは、酪酸添加により、*Desulfobacter*以外の種が集積されたものと考えられるが、現在利用可能なプローブではこの種を同定することはできなかった。

さらに、地点4では、地点2ではみられなかった、硫酸塩による制限が認められた。硫酸塩は急速に

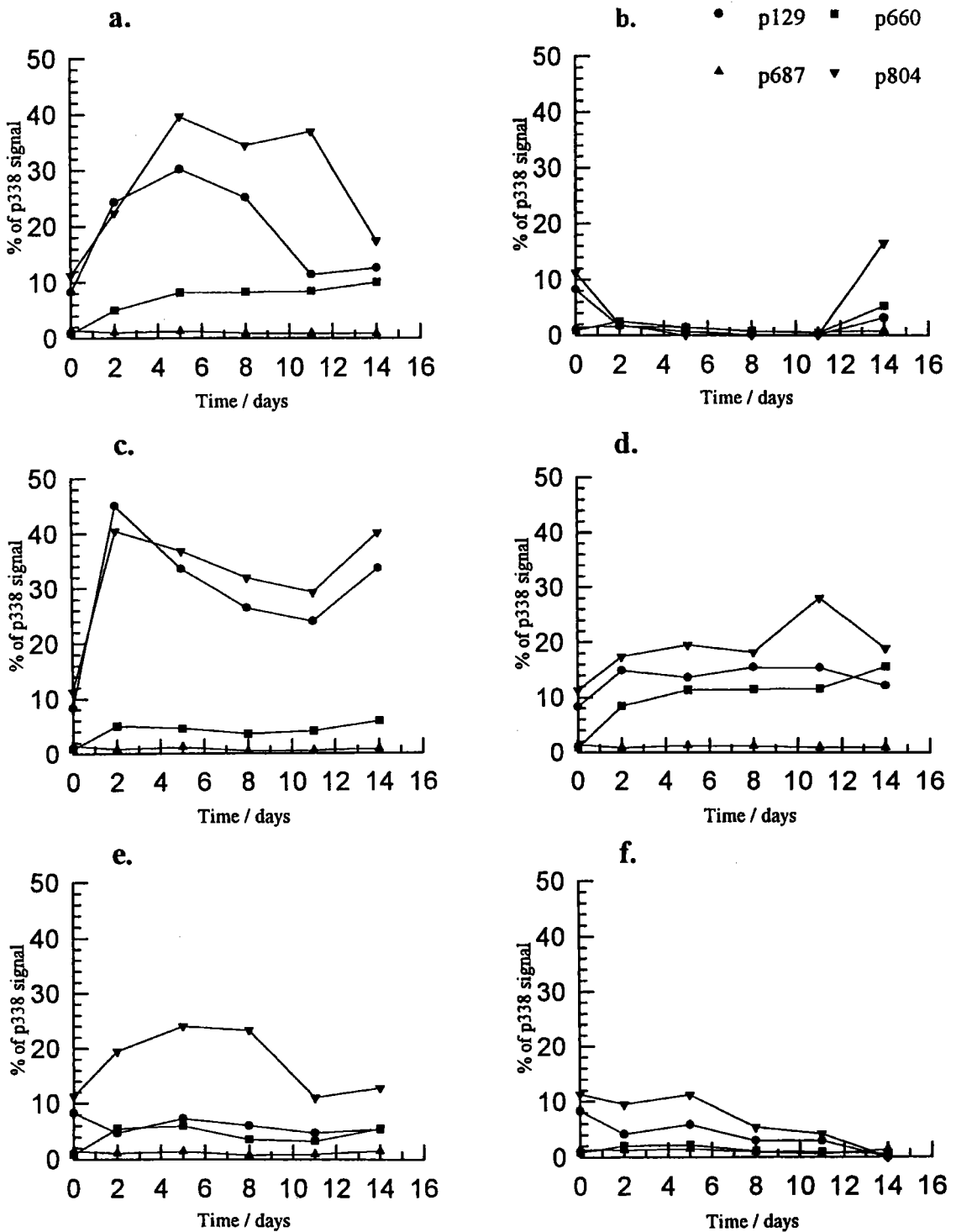


図3-6 地点4底泥懸濁液に各種有機酸を添加後の硫酸還元菌rRNAの全細菌rRNA
 に対する割合(%)の経時変化
 a~eは図3-1に同じ。fはコントロール。

検出限界以下に減少したが、その後間もなく添加した基質やその分解産物の利用が停止した。同様の結果は図3-6に示した各硫酸還元菌のrRNA相対量でも示され、減少または一定となった。このパターンは地点2ではみられず、硫酸塩が検出されなくなっても、基質は完全に消費されるまで利用された。このことは汽水性または淡水性の硫酸還元菌は、硫酸塩の制限されることの少ない海域の硫酸還元菌に比べて、硫酸塩を低濃度まで利用できる能力を持つことを示すものであろう。

上述したように、これらのデータは16SrRNAに対するオリゴヌクレオチド・プローブが細菌集団の相対的活性の変化を追跡するための有用な手段であることを明確に示した。この手法が有機物無添加の自然試料に適応可能かどうかは試料の微生物活性と核酸の抽出効率にかかっている。

4. 多摩川下流域における硫酸還元活性の分布と季節変化

滝井 進、Kevin Purdy、藤本 淳治

4-1 はじめに

多摩川下流域の塩分濃度の異なる数地点における硫酸還元速度の季節変化を調査し、同時に測定した環境要因との関係を考察して、地点や季節による硫酸還元活性の変化の要因を明らかにしようと試みた。また、次章で述べる硫酸還元菌組成の核酸プローブによる解析のための試料を同時に採集した。

4-2 調査地点

調査は図4-1に示す多摩川下流域とその近くの4地点で行った。地点2はガス橋の右岸約150m上流の吐水口前、地点3は六郷橋下の最深部、地点4は多摩川合流点近くの海老取川天空橋そばの船着場および地点5は呑川河口である。地点2と4では、直径4cmのアクリル樹脂製チューブを底泥にさし込み採泥した。地点3および5では、無攪乱柱状採泥器（離合社）を用いた。底泥コアはクールボックスに入れて実験室に持ち帰り、当日または翌日に硫酸還元速度の測定を開始した。

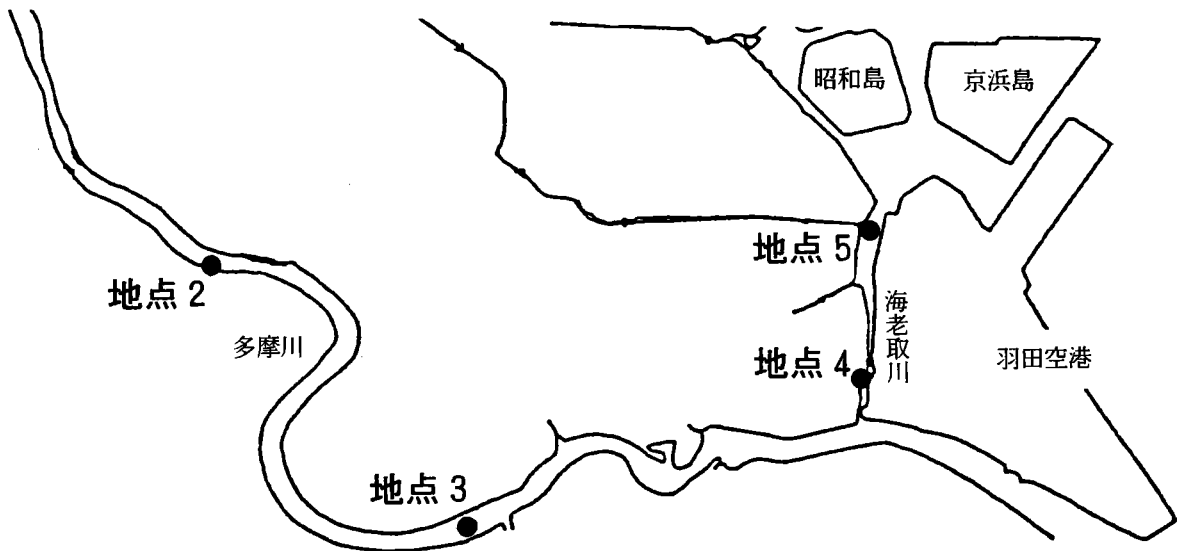


図4-1 多摩川下流域の調査地点

4-3 実験方法

硫酸還元速度の測定は放射性硫黄で標識した硫酸塩を用いるラジオトレーサー法によった。底泥堆積物コアに先端を切除したプラスチック・シリンジを3 cmの深さまで差し込んで底泥を採取し、ダブルゴム栓で密栓した。現場温度と平衡に達した後、 ^{35}S -硫酸塩(約3700KBq/ml) 20 μl をマイクロシリンジで底泥に均一に注入し、現場温度で培養した(Nedwell & Takii, 1988)。約24時間後、凍結により反応を止め、生成した酸揮発性硫化物を酢酸亜鉛溶液をしみこませたろ紙に吸収し、その放射能を液体シンチレーションカウンターで測定して硫酸還元速度を求めた(Fukui & Takii, 1990)。ただし、地点2では、この方法では対照(培養時間0時間)の放射線量が著しく高くなるため、窒素ガス気流下で三角フラスコに底泥試料を入れ、同容量の無酸素蒸留水を加えてスラリーとし、ダブルシリコン栓で密閉した。放射性硫酸塩をシリンジで注入し、混合後培養した。反応の停止は、1 M酢酸亜鉛溶液1 mlを添加後、凍結した。硫酸還元速度の測定はいずれも3連で行なった。

底泥の灼熱減量は乾燥試料を電気炉で550°C、2時間灼熱し、重量減少から求めた。硫酸塩の定量は、前述の通りである。

4-4 結果と考察

調査地点の底泥の水分含量、有機物含量(灼熱減量)および間隙水と底層水の硫酸イオン濃度を表4-1にまとめた。最上流の地点2では河川水は硫酸塩濃度が0.4~2 mMと低く、底泥間隙水の硫酸塩も冬期を除き1 mM以下であった。底泥は灰褐色の砂泥質で、有機物含量(灼熱減量)も調査地点のうちで最も低かった。地点3は、水深が約6 mあり、下流部よりも深い。そのため、遡上する海水が底層に停滞し、表層は淡水河川水が重層する塩分成層の起こりやすい場所であり、河川流量の変動によって底層の海水の水位変動が大きい。底泥は黒色のヘドロ状で、硫化水素臭が強く、有機物含量も12~20%と高かった。地点4と5はともに海水域であり、硫酸塩濃度は常に高く、底泥は、地点3と同様に、黒色ヘドロ状で、有機物含量も比較的高く、常に硫化水素臭があった。ただし、地点5は下水処理場の放流水の影響を受けやすい場所である。

硫酸還元速度は表4-2にまとめた。いずれの地点も表層で高く、下層ほど低い場合が多いが、例外もしばしばみられた。層別の最大値は8月の地点4表層(0-3 cm)の1.9 mmol/ml/日で、次いで5月の地点3表層の1.8 mmol/ml/日であった。深度別の硫酸還元速度を0-9 cmまで積算し、底泥表面積当たりで表した硫酸還元速度を図4-2に示す。地点4の2月が最高で、119 mmol/m²/日と高い値を示した。低温にもかかわらず、なぜ高かったのかは不明であるが、これを除くと、各地点とも春と夏に活性が高い傾向がみられ、温度の影響が大きいことを示唆している。しかし、地点3では7月の値は5月の2桁以下であった。これは7月の間隙水の硫酸塩が0.1 mM以下と低く、硫酸還元が低い硫酸塩供給によって制限されたためである。おそらく、底層の海水の停滞が続き、硫酸還元による消費によって硫酸塩が枯渇したものであろう。このとき測定したメタン生成速度は404 mmol/m²/日

表4-1 多摩川下流域の底泥の性状

調査地点	調査日	泥深 (cm)	水分含量 (%)	灼熱減量 (%)	間隙水硫酸イオン濃度 (mM)
2	12/14/93	0-2	54.27	7.25	
		5-7	52.12	8.42	
		10-12	39.91	6.39	
2	4/27/94	0-3	45.56	5.28	0.13
		3-6	47.71	6.53	0.01
		6-9	43.36	5.9	0
2	8/10/94	0-3	48.40	5.29	*BW 0.41
		3-6	47.25	6.37	0.36
		6-9	35.49	4.58	0.24
2	11/21/94	0-3	55.1	8.29	BW 0.55
		3-6	36.05	4.02	0.31
		6-9	38.73	6.63	0.19
2	2/20/95	0-3	63.22	9.73	BW 1.78
		3-6	64.58	11.67	2.77
		6-9	56.67	9.01	0.38
3	5/31/94	0-3	79.53	15.14	BW 7.01
		3-6	74.75	12.95	6.54
		6-9	72.96	12.63	1.88
3	7/11/94	0-3	80.69	19.06	0.11
		3-6	78.45	19.9	0.02
		6-9	73.69	18.41	0.02
3	2/22/95	0-3	67.23	12.48	BW 24.32
		3-6	66.59	12.19	25.73
		6-9	65.43	11.98	26.07
4	12/14/93	0-2	55.33	8.67	BW 12.74
		2-4	48.88	8.45	17.2
		6-8	52.04	9.27	ND
4	4/27/94	0-3	62.5	13.02	31.76
		3-6	66.28	15.03	6.22
		6-9	63.34	12.12	0.71
4	8/10/94	0-3	71.73	13.32	BW 12.17
		3-6	63.44	11.14	3.52
		6-9	66.02	11.81	3.19
4	11/25/94	0-3	75.72	15.34	BW 15.85
		3-6	58.03	8.98	18.67
		6-9	67.73	13.04	17.43
4	2/20/95	0-3	74.03	13.5	BW 14.68
		3-6	60.41	8.56	18.13
		6-9	59.33	8.71	25.27
5	5/31/94	0-3	74.7	13.6	BW 18.44
		3-6	68.31	12.41	18.75
		6-9	64.01	11.6	20.79
5	7/11/94	0-3	85.81	23.14	BW 22.87
		3-6	62.74	12.73	15.52
		6-9	54.2	12.13	9.2

*底層水

表 4 - 2 多摩川下流域底泥の硫酸還元速度

調査地点	調査日	培養温度 (°C)	泥深 (cm)	硫酸還元速度		
				(nmol/wet gr./d)	(nmol/ml/d)	(mmol/m ² /d)
2	8/10/94	30	0-3	45.41(0.47)	57.75(1.11)	4.02*
			3-6	10.16(5.16)	14.02(6.44)	
			6-9	20.31(1.89)	30.71(1.56)	
2	11/21/94	17.4	0-3	45.96(8.13)	58.47(9.99)	7.2*
			3-6	30.43(4.17)	42.31(8.14)	
			6-9	94.59(5.94)	139.32(17.56)	
2	2/20/95	11.0	0-3	1.99(0.18)	2.29(0.18)	0.08*
			3-6	0.22(0.12)	0.25(0.14)	
			6-9	0.08(0.01)	0.09(0.01)	
3	5/31/94	21.2	0-3	1750(243)	1844(276)	83.68*
			3-6	589(1)	606(8)	
			6-9	299(51)	340(58)	
3	7/11/94	24.5	0-3	4.24(0.29)	4.38(0.36)	0.21*
			3-6	2.12(0.13)	2.06(0.22)	
			6-9	0.47(0.17)	0.48(0.18)	
3	2/22/95	11	0-3	76.17(92.65)	90.93(111)	9.63*
			3-6	190(34)	223(41)	
			6-9	5.60(2.45)	6.74(2.81)	
4	12/14/93	14.1	0-2	30.6(24.4)	45.8(30.4)	4.33**
			2-4	48.9(48.6)	70.2(67.9)	
			6-8	33.6(19.7)	54.9(27.5)	
4	4/27/94	20	0-3	219(25)	244(26)	20.31*
			3-6	256(24)	277(25)	
			6-9	170(39)	156(32)	
4	8/10/94	30	0-3	1666(109)	1911(116)	78.29*
			3-6	272(31)	343(331)	
			6-9	291(69)	355(85)	
4	11/25/94	17	0-3	172(40)	193(44)	13.31*
			3-6	112(12)	138(14)	
			6-9	98.4(11.4)	112(12)	
4	2/20/95	11	0-3	1106(161)	1283(173)	119.17*
			3-6	749(168)	959(197)	
			6-9	1415(267)	1731(339)	
5	5/31/94	21.2	0-3	447(13)	517(12)	29.06*
			3-6	251(49)	286(53)	
			6-9	141(10)	166(14)	
5	7/11/94	24.5	0-3	134(8)	141(9)	5.08*
			3-6	9.2(6.2)	11.6(7.4)	
			6-9	4.3(0.7)	5.8(1.1)	

括弧内は標準偏差。

*0-9 cm,**0-8 cm

(0 - 9 cm) に達し、有機物の最終的無機化の主役はメタン生成が硫酸還元にとってかわっていた。

多摩川下流域とその付近の調査地点では、一般に、有機物と硫酸塩の供給の多い地点で夏季を中心に硫酸還元の活性が高いが、その変動は地点によって異なることがわかった。

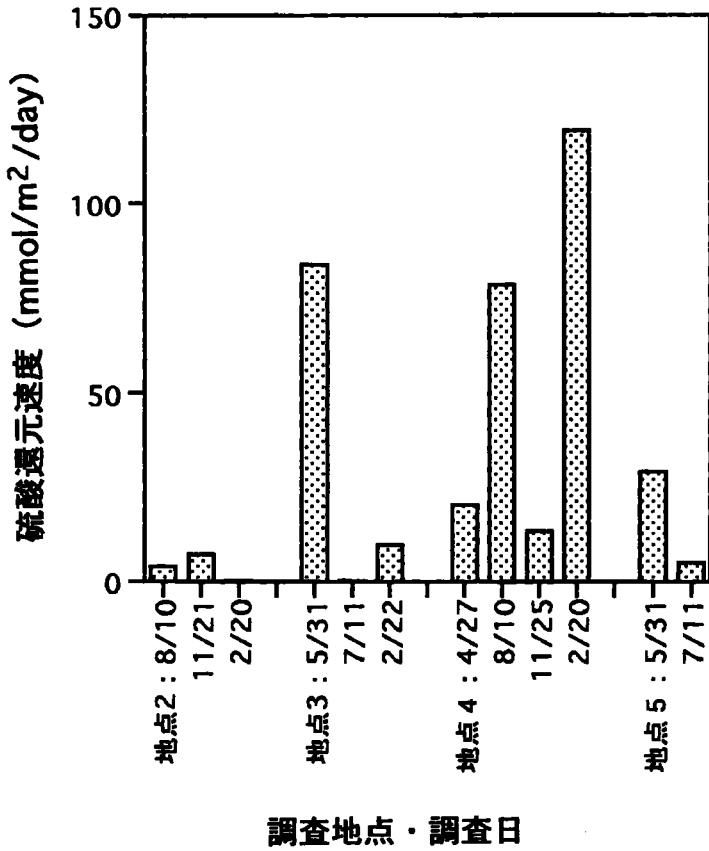


図4-2 多摩川下流域底泥の面積当たりの硫酸還元速度

5. 核酸プローブ法による多摩川下流域底泥における硫酸還元菌の分布と動態の解析

Kevin Purdy, 藤本 淳治、滝井 進

5-1 はじめに

硫酸還元菌の底泥における分布はいままで最確数 (MPN) 法や二重皿法など培養による方法で調べられてきた。しかし、これらの方法では、試料中の全ての硫酸還元菌に対して用いられる培地の種類や培養条件が限られるため、また、細胞の分散の困難さのため、かなりの過小評価になると考えられている。また、培養法では、現場で活性のある菌も、不活性の菌も、用いた培地に増殖できれば等しく計数されるので、菌数と活性は対応しないことが多い。

現場の硫酸還元菌の機構をより詳細に解明するためには現場で活性のある硫酸還元菌の属レベルの種類組成を明らかにする必要があるが、培養法では、上記の理由に加え、同定に多大の労力を要するため、困難である。そこで、本研究では、培養を要しない核酸プローブ法によって底泥の硫酸還元菌の分布を属レベルで明らかにすることを試みた。本法では、各菌群のリボソーム (r) RNA 含量の相対量を求めるので、リボソーム含量の高い、したがって現場で増殖速度の大きい菌群の割合が捉えられるものと考えられる。

5-2 材料と方法

底泥試料は硫酸還元速度の測定に用いたものの一部であり、採取日に洗浄し、凍結保存した。核酸の抽出、ハイブリダイゼーションおよび定量法はプロトコルの K. Purdy の方法を用いた。

5-3 結果

底泥から抽出された核酸の一部の純度を表 5-1 に示す。吸光度で求めた核酸量は表層で最も高い場合が多いが、垂直分布は必ずしも一様では無かった。核酸の純度については、タンパク質の混入の指標である 260nm/280nm の値が平均で 1.75 であり、腐植物質などの混入の指標である 260nm/230nm の値が平均 1.72 であるので、ほぼ満足できる純度であった。

ハイブリダイゼーションの結果を表 5-2 にまとめた。底泥からの核酸の抽出効率が一定ではないため、得られた rRNA 量は全て全細菌 rRNA に対する比率 (%) で示した。p385 で得られたグラム陰性硫酸還元菌の rRNA の比率が非常に高く、とくに地点 4 でしばしば 100% を越えている。このプローブは正確には大部分のプロテオバクテリアのデルタ群と若干のグラム陽性菌に特異的である (Amann et al., 1995)。また、p804 は *Desulfobacter*, *Desulfobacterium* に加え数種の完全酸化型硫酸還元菌を標的とする (表 3-1) が、p804 で求められた rRNA 量は、表 5-2 でみられるように、とくに海水域

表 5 - 1 多摩川下流域底泥から抽出した核酸の紫外部吸収比

試料 (地点、採取日、泥深)	A260/A280	A260/A230
地点2.94/11:0-3	1.79	1.80
3-6	1.64	1.50
6-9	1.67	1.55
地点2.95/2 : 0-3	1.73	1.59
3-6	1.69	1.47
6-9	1.60	1.33
9-12	1.58	1.23
地点3.95/2 : 0-3	1.78	2.07
3-6	1.84	1.89
6-9	1.78	1.67
9-12	1.89	2.01
地点4.94/11 : 0-3	1.66	
3-6	1.76	2.02
6-9	1.78	1.67
地点4.95/2 : 0-3	1.88	1.98
3-6	1.68	1.47
6-9	1.88	1.92
9-12	1.84	1.93
平均	1.75	1.72

でp129 (*Desulfobacter*) とp221 (*Desulfobacterium*) によるrRNAの合計よりも少ない場合が多かった。そのため、以下の議論は属特異的のプロンプ (p129, p221, p660とp687) によるrRNA量の全細菌rRNAに対する比率について議論する。全細菌rRNAに対する硫酸還元菌4属のrRNAの割合を図5-1にまとめた。

地点2では、4月、8月には*Desulfobulbus*のrRNAがほとんどであるが、11月、2月では*Desulfobacterium*も多く、とくに下層では*Desulfobulbus*よりも多かった。塩分要求性の*Desulfobacter*と乳酸培地でよく生育する*Desulfovibrio*のrRNAはまったく検出されなかった。

地点3は5月、7月、2月の3回の調査であるが、5月と7月では、硫酸還元菌3属のRNAは全細菌の10%以上を占めた。両月とも、*Desulfobacter* RNAが優占したが、地点2と同様に*Desulfovibrio*のrRNAは検出されなかった。硫酸塩の枯渇による硫酸還元速度の低下した7月では*Desulfobulbus*の比率がかなり高くなった。2月は硫酸還元速度が最も低く、4属合計のRNAも6-9cmを除き、3-7%であった。優占したのは、3-6cmと9-12cmで*Desulfobacter* rRNA、6-9cmで*Desulfobacterium* rRNA、0-3cmでは*Desulfovibrio* rRNAであった。

表5-2 硫酸還元菌の全細菌に対するrRNAの割合 (p338シグナルに対する%)

地点	採取日	泥 深 (cm)	プローブ						4プローブ*の合計
			p 3 8 5	p 1 2 9	p 2 2 1	p 6 6 0	p 6 8 7	p 8 0 4	
2	94/2/24	0-3	111.5	0	0.34	2.25	0	1.86	2.59
		3-7	90.87	0	0	4.15	0	0	4.15
2	94/4/27	0-3	132.2	0	0	2.54	0	0	2.54
		3-6	0	0	0	0	0	0	0
		6-9	135.3	0	0	1.88	0	0	1.88
2	94/8/10	0-3	91.66	0	0.16	3.16	0	0	3.32
		3-6	75.8	0	0	2.68	0	0	2.68
		6-9	79.09	0	0	2.53	0	0	2.53
2	94/11/2	0-3	ND	0	0.28	0.48	0	0.8	0.76
		3-6	ND	0	1.13	0.18	0	2.38	1.31
		6-9	ND	0	1.08	1.33	0	3.95	2.41
2	95/2/20	0-3	ND	0	0.27	0.42	0	1.15	0.69
		3-6	ND	0	0.59	0.46	0	1.46	1.05
		6-9	ND	0	1.01	0.93	0	5.04	1.94
		9-12	ND	0	4.69	2.05	0	6.5	6.74
3	94/5/31	0-3	87.91	11.93	2.94	2.68	0	15.21	17.55
		3-6	127.2	7.16	2.75	2.53	0	14.04	12.44
		6-9	104.8	12.03	5.59	1.84	0	20.33	19.46
3	94/7/11	0-3	57.9	8.03	1	3.72	0	7.51	12.75
		3-6	93.81	5.99	0.9	6.84	0	0	13.73
		6-9	85.83	8.8	1.15	4.65	0	8.13	14.6
3	95/2/20	0-3	ND	0.44	1.04	0.69	1.17	1.44	3.34
		3-6	ND	0	1.83	1.13	0	4.79	2.96
		6-9	ND	15.39	9.29	0.89	1.95	14.44	27.52
		9-12	ND	0	6.5	0.86	0	11.67	7.36
4	94/4/27	0-3	170.5	9.91	3.04	3.41	0	19.03	16.36
		3-6	128.6	8.12	1.23	5.12	0	25.48	14.47
		6-9	193.2	15.95	0.88	0.6	0	0	17.43
4	94/8/10	0-3	113.2	21.88	2.2	3.96	0	0	28.04
		3-6	132.9	9.24	1.44	0.26	0	12.26	10.94
		6-9	137.1	12.26	1.84	0.85	0	12.55	14.95
4	94/11/2!	0-3	ND	4.25	6.57	0.76	1.44	7.9	13.02
		3-6	ND	1.72	3.81	0.45	0	6.04	5.98
		6-9	ND	0	7.8	0	0	3.02	7.8
4	95/2/20	0-3	ND	3.56	0.13	0.62	2	2.73	6.31
		3-6	ND	4.48	2.26	0.73	2.92	4.76	10.39
		6-9	ND	8.71	3	0.72	1.69	6.2	14.12
		9-12	ND	6.37	1.77	0.79	2.28	5.86	11.21
5	94/5/31	0-3	132.7	2.83	1.07	2.81	0	12.41	6.71
		3-6	95.68	2.44	1.07	3.59	0	16.91	7.1
		6-9	89.59	2.58	0.57	4.48	0	14.25	7.63
5	94/7/12	0-3	94.88	8.86	1.23	4.93	0	9.69	15.02
		3-6	34.99	0	2.01	0.24	0	0	2.25
		6-9	139.1	0	0	2.55	0	0	2.55

* p129+p221+p660+p687

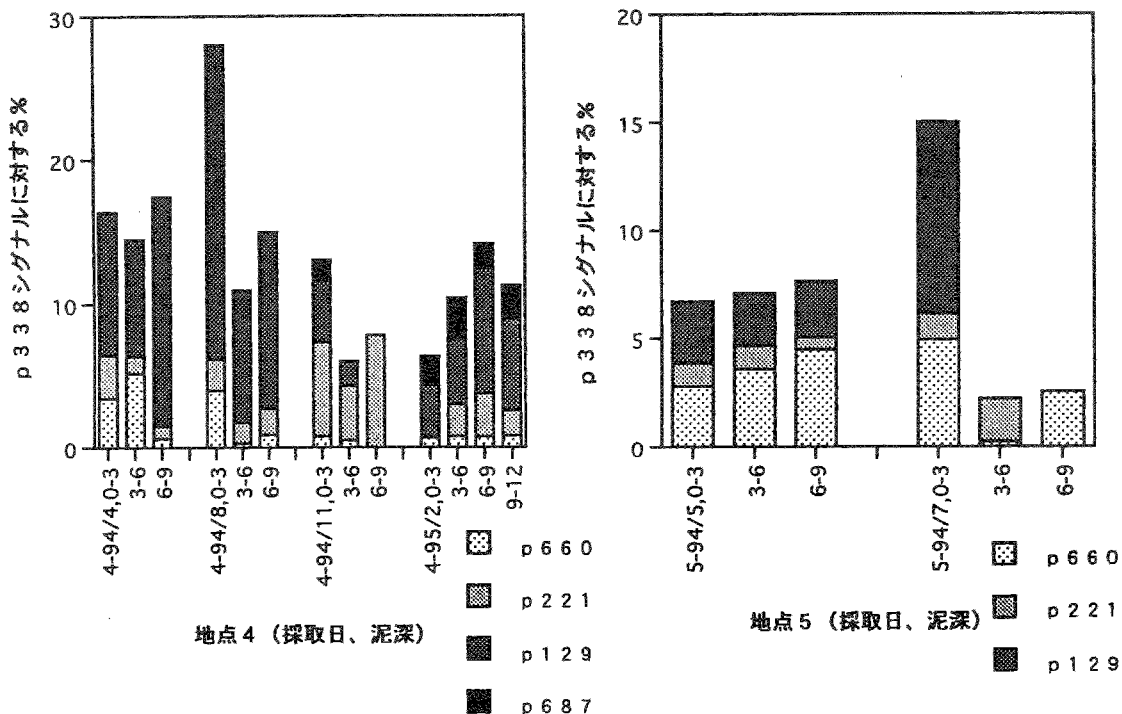
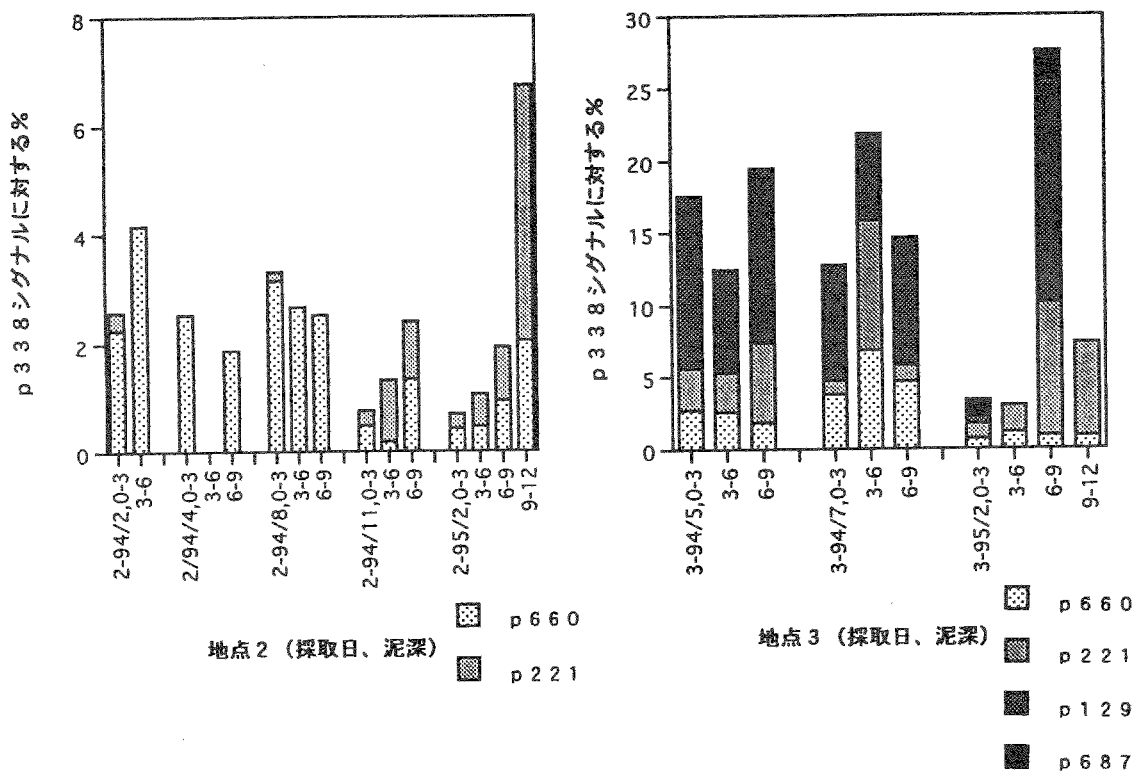


図5-1 多摩川下流域底泥における硫酸還元菌4属のrRNAの全細菌rRNAに対する割合(%)

地点4も硫酸還元菌3属のRNAが10%以上の場合が多く、11月を除き、*Desulfobacter* rRNAが優占した。硫酸還元速度が最も低かった11月では*Desulfobacterium* rRNAの比率が高かった。11月の表層と2月の全層で1-3%の*Desulfovibrio* rRNAが検出されたのは興味深い。地点5では2回のみ調査であるが、*Desulfovibrio*は全く検出されず、硫酸還元菌3属RNAの比率は地点4よりも低かった。また、全般的には*Desulfobacter*よりも*Desulfobulbus*の比率が高い点、地点4と異なる。

5-4 考察

16SrRNAを標的とするオリゴヌクレオチド・プローブによって多摩川下流域における硫酸還元菌の属レベルの水平および垂直分布を明らかにすることができた。増殖速度の大きい細胞ほどrRNA含量は大きいので、rRNA量は代謝活性に比例すると考えられる。残念ながら、核酸の抽出効率が一定でないため、底泥当たりの硫酸還元菌RNAの絶対量は求めることができなかったが、全細菌に対する硫酸還元菌4属のRNAの比率と現場硫酸還元速度とは全データ(サンプル数=36, $r=0.468$)で0.5%の危険率で有意の相関が得られた(図5-2)。しかし、地点ごとでは両者の相関は認められなかった。これは、全細菌リボソームRNA量が季節や温度で変化するため、硫酸還元菌RNAの比率の変化が、絶対量の変化と異なるためであろう。Li(1996)によれば、年間を通じてほぼ6°Cに保たれる長野県木崎湖湖心部の底泥では全生物RNAに対する硫酸還元菌RNAの比率は現場硫酸還元速度と高い相関を示した。

塩分濃度の低い地点2では硫酸還元菌RNAの比率は5%以下と低く、優占属は*Desulfobulbus*の場合が多く、*Desulfovibrio*、*Desulfobacter*はまったく検出されなかった。*Desulfobulbus*はプロピオン酸、乳酸、水素を利用する不完全酸化型の硫酸還元菌で、2章で述べたように、乳酸の分解は、硫酸還元の特異的阻害剤であるモリブデン酸によって影響されないため、この地点の硫酸還元の主な基質はプロピオン酸と水素と推測される。*Desulfovibrio*は乳酸培地でよく単離され、普遍的な種と考えられている。たとえば、Laanboek & Pfennig(1981)はアガーシェイク法による計数で、乳酸利用硫酸還元菌は酢酸やプロピオン酸利用菌より1桁多いと報告しており、また、Jorgensen & Bak(1991)は海底泥で、MPN法により酢酸利用硫酸還元菌と*Desulfovibrio*を含む水素利用硫酸還元菌が同数であったと報告している。しかし、多摩川のこれらの地点では活性に対する*Desulfovibrio*の寄与はほとんど無視できるようである。

塩分濃度の高い地点3、4、5では硫酸還元菌4属のRNAの比率は10%を越える場合が多く、*Desulfobacter*が優占する場合がほとんどであった。*Desulfobacter*は7g/l(Widdel & Bak, 1992)以上の食塩を要求する海水性であり、ほとんど酢酸しか利用できない完全酸化型の硫酸還元菌である。従って、塩分濃度の高い3地点では硫酸還元の直接の基質はおもに酢酸と考えられる。実際、Sorensenら(1981)やParkesら(1989)の研究によれば、沿岸海域の底泥における硫酸還元の基質は主に酢酸であることが示されている。これら3地点では、*Desulfobacterium*、*Desulfobulbus*も検出さ

れた。*Desulfobacterium*も完全酸化型であるが、多くの基質を利用できる代わりに、酢酸の利用は微弱である。地点3の7月は硫酸還元速度が、硫酸塩の枯渇のために極めて低いにもかかわらず、硫酸還元菌RNAの比率は12-15%と高かった。硫酸塩が欠乏してからサンプリングまでの時間が不明であるが、一部の硫酸還元菌はおそらくプロトン還元・酢酸生成菌としてメタン生成菌と栄養共生関係にあり、高いリボソーム含量（増殖速度）を維持していた可能性がある。今後、メタン生成菌の核酸プローブ法による種類組成の解析を含めて、さらに検討すべき興味深い現象である。

これら硫酸還元菌の種類組成の結果は、2章で示した基質添加後の硫酸還元菌の種類の変化ともよく対応している。

硫酸還元菌の属レベルのプローブによるRNAの合計はp385による全グラム陰性硫酸還元菌RNAよりもはるかに小さかった。用いた属レベルのプローブで捕らえられないグラム陰性硫酸還元菌は、例えば、*Desulfoarculus baarsii*, *Desulfonema*, *Desulfomonieles tiedjei*などいくつか挙げられるが、全細菌RNAに対するp385によるRNAの比率が100%を越える結果がいくつかみられたので、主にp385によるRNAの過大評価によるものであろう。また、p804は*Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus multivorans*, *Desulfosarcina variabilis*および*Desulfobotulus sapovorans*を含む完全酸化型硫酸還元菌を標的とするため、p804で得られたRNA量はp129とp221によるRNA量の和よりも大きいか、少なくとも等しくなければならないが、逆の結果が得られた場合がいくつかみられた。これらはハイブリダイゼーション条件、メンブレンの核酸量、夾雑物の影響などのためと考えらるが、今後の検討課題である。

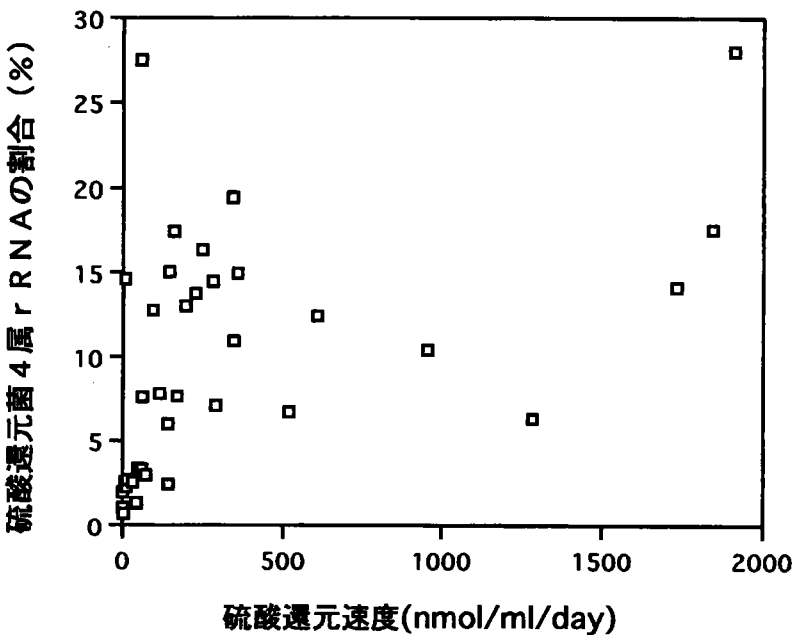


図 5 - 2 多摩川下流域底泥における硫酸還元菌 4 属のrRNAの全細菌rRNAに対する割合 (%) と硫酸還元速度との関係。

6. ま と め

われわれが新たに開発したハイドロキシアパタイト・スピнкаラム法によって多摩川下流域の底泥から比較的きれいな核酸を抽出することができた。それによって、ほとんどはじめて、底泥の活性のある硫酸還元菌の属レベルの分布を明らかにできたと考える。その結果、塩分濃度の低い地点では不完全酸化型の*Desulfobulbus*が主に優占するのに対し、塩分濃度の高い地点では完全酸化型の*Desulfobacter*が優占する場合の多いことがわかった。培養法によって、優占種として報告されることの多い*Desulfovibrio*はほとんど検出されなかった。これらの結果は、多摩川底泥懸濁液に各種有機酸を添加した場合の硫酸還元菌の動態とも一致を示した。したがって、核酸プローブ法は底泥の硫酸還元菌の属レベルでの動態の解析に極めて有用であると結論される。しかし、p385による全グラム陰性硫酸還元菌RNAが全細菌RNAよりも多く検出される場合があったことなど、本法には改善すべき問題もあることが明らかになった。また、現場活性との関係を検討するためには、硫酸還元菌RNAの絶対量を求める必要があるが、核酸の抽出効率が一定ではないため、現状ではRNAの相対量しか求められない。これらの問題を解決するために今後も努力を続けるつもりである。

おわりに、本研究は客員研究員として本学微生物生態学研究室に滞在したイギリス・エッセクス大学のKevin J. Purdy氏に負うところが大きい。また、方法の検討、現場調査やサンプリングに当研究室の大学院生、藤本淳治、李建華、中里亮治の諸君の助力を得た。また、地点3および5のサンプリングは大田区都市環境部公害課の定期調査に便乗して行ったもので、公害課水質係の方々には快く便宜を計っていただいた。厚く感謝する次第である。

7. プロトコル

底泥堆積物からの核酸の抽出・精製法

1. 堆積物試料の洗浄 (K. Purdy, 藤本)

- 1) 試料30gまでを50mlオークリッジチューブ (ナルゲン) に入れる。
- 2) 4℃で6000xg (8000rpm)、10分間遠心し、上静を間隙水分析に用いる。
- 3) 等量 (w/v) の120mMリン酸ナトリウム (pH8.0) を加え、清浄なスパチュラでペレットを懸濁する。
- 3) 4℃で150rpm、15分間振盪する。
- 4) 4℃で20000xg (14600rpm)、15分間遠心し、上清を捨てる。
- 5) 120mMリン酸ナトリウム (pH8.0) で洗浄し、上と同様に遠心し、上清を捨てる。
- 6) 洗浄した試料をすぐ使用しないときはRNAの損失を防ぐため、-20℃で保存する。試料はサンプリング後、なるべく早く洗浄し、凍結すべきである。

2. リゾチーム処理 (藤本)

- 1) 乾熱滅菌したガラスビーズ直径0.1mmと0.05mmを0.25gずつ2mlチューブに入れる。
- 2) 洗浄した堆積物を0.5gはかり取り、2mlチューブに入れる。
- 3) 0.9mlの50mMリン酸ナトリウム (pH6.8) と0.1mlのリゾチーム溶液 (50mg/ml) を加える。
- 4) チューブを室温で10分間、150rpm水平振盪する。
- 5) 12000xgで5分間遠心し、上静をすてる。

[必要な溶液]

50mMリン酸ナトリウムpH6.8

120mMリン酸ナトリウムpH8.0

300mlの400mMリン酸ナトリウムストック溶液 / 1

pH8.0に調製。オートクレーブ。

リゾチーム溶液 (50mg/ml)

3. ビーズ・ビーティング (K. Purdy : リゾチーム処理をしない場合)

- 1) 洗浄した堆積物を1-4gはかり取り、滅菌ミリQ水でよくゆすいだ振盪バイアルに入れる。
- 2) 乾熱滅菌したガラスビーズを堆積物と同重量はかり取り、振盪バイアルに入れる。
- 3) 堆積物1g当たり2容量の120mMリン酸ナトリウムpH8.0 + 1%酸洗浄PVPPと0.25容量のTris飽和フェノールpH8.0、さらに0.125容量の10%SDSを加える (例えば、1gサンプル + 1gビーズに2mlリン酸バッファーと0.25mlフェノールと0.125ml 10%SDS)。

- 4) 振盪バイアルをパラフィルムで注意してシールし、ビーズビーターにより2000rpmで30秒間振盪後、30秒間氷上で冷やす。この操作を2、3回くり返す。
- 5) 破砕物を振盪バイアルから30mlコーレックスチューブ(200℃で1夜加熱)に移す。振盪バイアルを洗浄するため0.75mlの120mMリン酸ナトリウムpH8.0+1%酸洗浄PVPPを用いる(先太の1mlチップが便利)。
- 6) 等容のTris飽和フェノールpH8.0(例えば、1gサンプル+1gビーズに2mlのフェノール)を添加し、パラフィルムでシール後、1分間激しく試験管ミキサーで振盪し、パラフィルムを取り除く。(チューブの外側のフェノールをふき取る。)
- 7) 6000xgで10分間遠心する。
- 8) フェノール層を乱さないように注意して、上の水層を集める。
- 9) コーレックスチューブの堆積物ペレットとフェノールに1.25容の120mMリン酸ナトリウムpH8.0を加える(例えば、1gサンプル+1gビーズにリン酸バッファー1.25ml)。
- 10) 6)、7)、8)と同様に操作を行い、得られた水層を前のものと一緒にする。

3' リゾチーム処理をした後のビーズ・ビーティングと核酸の精製(藤本)

- 1) 0.45mlの50mMリン酸ナトリウムpH6.8+1%酸洗浄PVPPと0.6mlのTris飽和フェノールpH8.0、さらに30 μ lの20%SDSと50 μ lの200mMピロリン酸ナトリウムpH8.0を加え、清浄なスパチュラでペレットを懸濁する。
- 2) 2000rpmで60秒間ビーズビーターで振盪する。
- 3) 12000xgで2分間遠心する。
- 4) 上の水層を新しいチューブに集める。
- 5) 0.6mlのリン酸ナトリウムpH6.8と30 μ lの20%SDSをペレットに加え、清浄なスパチュラで懸濁する。
- 6) 2000rpmで60秒間振盪する。
- 7) 12000xgで2分間遠心する。
- 8) 上層を4)のチューブに集める。
- 9) 抽出したサンプルを2分間氷上に保つ。
- 10) 12000xgで2分間遠心する。
- 11) サンプルをHTPスピнкаラム(4参照)に乗せ、100xg、4分間遠心する。
- 12) 全量をロードするまでくり返す。
- 13) 0.4mlの50mMリン酸ナトリウムpH6.8をロードし、100xg、4分間遠心してカラムを洗う。
- 14) 4回洗浄し、最後に0.2mlの140mMリン酸カリウムpH6.8で洗う。
- 15) 150mMリン酸カリウムpH6.8を0.2ml、0.3ml、0.3mlの順に加え、RNAを溶出し、2mlの清

浄なチューブに集める。

- 16) 溶出液を0.4mlずつ2つの3mlセファデックスG-75スピнкаラムにロードする。
- 17) 3M酢酸ナトリウムを40 μ l, 無水エタノールを0.8~1.0ml加え、軽く振って混合し、-20°Cで一夜沈澱させる。

4. ハイドロキシアパタイト (HTP) スピнкаラムを用いたDNA/RNAの精製法 (K. Purdy)

- 1) 滅菌デスポーザブル1mlシリンジにシリンジプランジャーを使って滅菌グラスウールを詰る。
- 2) 滅菌HTP懸濁液を加え、DNAグレードHTPを使うならば100xgで4分間、非DNAグレードHTPならば100xgで2分間遠心する。(先太1mlチップが便利。DNAグレードHTPは結合能力がより大きい、目詰まりしやすい。)
- 3) 遠心後、必要ならば、HTPを追加し、再度遠心する。ロード後、HTPは0.5-0.6ml必要である。
- 4) 抽出試料をカラムに0.75mlのせ、100xgで4分間遠心し、試料全量をロードするまでくり返す。(1回分が4分間で通過しないときは、遠心時間を5、6分に延ばす。カラムが詰まるので、決して遠心速度を上げてはならない。遠心速度を上げて状態を悪化させるだけである。100xgは迅速な初期ロードと低い目詰まりの妥協の産物である。)
- 5) 試料全量をロードしたら、カラムを0.75mlの120mMリン酸ナトリウムpH7.2で3回洗う。遠心は100xgで4-6分。
- 6) 0.4mlの300mMリン酸カリウムpH7.2を加え、DNA/RNAをカラムから滅菌したエペンドルフチューブに溶出する。遠心は100xgで6分間。
- 7) 溶出液をあらかじめ調製した2.5mlセファデックスG-75スピнкаラムにロードし、1600xgで8分間遠心して核酸を滅菌エペンドルフチューブに集める。
- 8) -20°Cで1夜エタノール沈澱を行う。(G-75カラム処理がうまくいけばエタノール沈澱に塩が必要となる。)
- 9) 25-50 μ lのTEに再懸濁し、-20°Cで貯蔵する。

5. ハイドロキシアパタイト (HTP) バッチ遠心法によるDNA/RNAの精製 (K. Purdy)

- 1) 滅菌15mlコーニングチューブに1mlのHTP懸濁液を入れる。(最終抽出液量が12mlを越えるならば、0.5mlのHTP懸濁液をいれた2本のチューブを用意する。HTPと試料をよく攪拌するためには少なくとも3mlの空間が必要である。)
- 2) 水層を加え、HTPペレットをゆるやかな攪拌かピペットをつかって再懸濁する。
- 3) 回転式振盪器でチューブを水平にして20分間100rpmで振盪する。
- 4) 2000xgで3分間遠心し、上清を捨てる。時々HTPがチューブのふちに集まるが、上静を除くときに乱してはいけない。次のバッファーを加えるときチューブに洗い入れる。

- 5) 2 mlの120mMリン酸ナトリウムpH7.2を加え、ゆるやかな攪拌かピペットをつかって再懸濁する。次いで、振盪し、3)、4)と同様に遠心後、上静を捨てる。(2本のチューブを用いたならば、2 mlの洗浄バッファーで一方のHTPを再懸濁し、これを用いて他方を再懸濁する。これにより、2つのペレットは一緒になる。)
- 6) 5)を2回くり返す。
- 7) 0.4mlの300mMリン酸カリウムpH7.2を加えDNAを溶出し、ゆるやかな攪拌かピペットをつかって再懸濁して30分間振盪する。
- 8) 3分間2000xgで遠心し、上静を集める。次いで、7)と8)をもう一度くり返す。
- 9) 2本の2.5mlセファデックスG-75スピナラムでDNAを脱塩する。(0.4mlずつ)
- 10) -20°Cで1夜エタノール沈澱を行うか、Microcon-100で一緒にした試料を濃縮する。
- 11) 試料を25 μ lのTEに再懸濁し、-20°Cで保存する。

どちらの方法を用いるかは抽出液の容量による。少量ならばスピナラム法が迅速であり効率も高いが、大量ならばバッチ遠心法がよい。しかし、どちらを選ぶかは合理的理由のほか個人の好みによる。

[必要な溶液]

- 120mMリン酸ナトリウムpH8.0
300mlの400mMリン酸ナトリウムストック溶液 / 1
pH8.0に調製。オートクレーブ。
- 120mMリン酸ナトリウムpH8.0 + 1%酸洗浄ポリビニルピロリドン (PVPP, Holben et al., 1988)
300mlの400mMリン酸ナトリウムストック溶液 / 1
10g酸洗浄ポリビニルピロリドン
pH8.0に調製。オートクレーブ。
- トリス飽和フェノールpH8.0
Sambrook et al. (1989) の記載による。
- 10% SDS
- ハイドロキシアパタイト (HTP) 懸濁液
Biorad booklet LIT-217の記載による。
HTP粉末1 に対しミリQ水6 をくわえ、静かに回転して混合する。10分間静置し、濁った上層をデカンとし、ミリQ水に再懸濁して4°Cで保存する。
- 120mMリン酸ナトリウムpH7.2
300mlの400mMリン酸ナトリウムストック溶液 / 1
pH7.2に調製。オートクレーブ。

●300mMリン酸カリウムpH7.2

40.8gKH₂PO₄/l

pH7.2に調製。オートクレーブ

●セファデックスG-75スピнкаラム

G-75をグラスウールで栓をした2.5mlシリンジに入れ、1600xg、8分間遠心する。G-75が遠心後2.5-3.0mlになるまで加える (Sambrook et al.,1989およびMoran et al., 1993参照)。プレコンデショニングのためミリQを0.4mlずつ3-4回カラムを通す。遠心は各回とも1600xg, 8分間。

●TE

10mMTris-HCl, 1mMEDTA, pH8.0.

ビーズ・ビーターとHTPスピнкаラムを用いる純粋培養からのDNAとRNAの抽出 (K. Purdy)

1. DNAとRNAの抽出

1) 2mlスクリーキャップ付き・チューブに以下の試薬を加える。

0.5mlの0.11mmガラスビーズ (滅菌済み)

125 μ lのL2バッファー

125 μ lの120mM Na phosphate pH8.0 (または250 μ lの5MguanidineSCN)

500 μ l細胞懸濁液

2) ビーズビーターで2000rpm30秒処理。

3) 12000xgで2分遠心。

4) 上静を集め、氷上に保存する。

5) エピペンドルフ・チューブに750 μ lの120mM Na phosphate pH8.0を加え、2) - 4) の操作を2-4回くり返す。

6) 抽出前に、1ml滅菌プラスチック・シリンジに滅菌グラスウールをシリンジ・プランジャーで詰め、HTPスピнкаラムをつくる。

7) 滅菌HTP (non-DNA-grade) を加え、100xgで2分間遠心する。

8) 遠心後、必要なら、さらにHTPを加え、再度遠心する。HTPは0.5-0.6ml必要。

9) HTPスピнкаラムに抽出液を加える直前に遠心し、ペレットを再懸濁しないこと。

10) 抽出液を0.75mlずつHTPスピнкаラムに加え、100xgで2-4分間遠心する。サンプル全てをカラムを通すまでくり返す。

11) エピペンドルフ・チューブのペレットを750 μ lの120mM Na phosphate pH8.0で洗浄し、10)

のように遠心する。上静をスピнкаラムにのせ、処理する。

- 12) 750 μ lの120mM Na phosphate pH8.0でカラムを3回洗う。遠心は100xgで3-4分。
- 13) 0.5mlの300mM KH_2PO_4 を加え、DNA/RNAをカラムから滅菌エッペンドルフ・チューブに溶出する。
- 14) 前もって調製した3 ml Sephadex G-75スピнкаラムに溶出液を加え、8分間、1600xgで遠心する。
- 15) -20°C で一晩エタノール沈澱を行う（もし、G-75カラムがうまくいけば、エタノール沈澱には塩が必要）。
- 16) 25-50 μ lのTEに再懸濁し、 -20°C で保存する。

2. DNAのみの抽出

- 1) 2 mlエッペンドルフ・チューブに以下の試薬を加える。
 - 0.5mlの0.11mmガラスビーズ（滅菌済み）
 - 125 μ lのL2バッファー
 - 125 μ lの120mM Na phosphate pH8.0（または250 μ lの5 M guanidineSCN）
 - 500 μ l細胞懸濁液
- 2) ビーズビーターで2000rpm30秒処理。
- 3) 12000xg、2分遠心。
- 4) 上静を集め、氷上に保存する。
- 5) エッペンドルフ・チューブに750 μ lの120mM Na phosphate pH8.0を加え、2) - 4) の操作を2回繰り返す。
- 6) 抽出前に、1 ml滅菌プラスチック・シリンジに滅菌ガラスウールをシリンジ・プランジャーで詰め、HTPスピнкаラムをつくる。
- 7) 滅菌HTP (non-DNA-grade)を加え、100xg 2分間遠心。
- 8) 遠心後、必要なら、さらにHTPを加え、再度遠心する。HTPは0.5-0.6ml必要。
- 9) HTPスピнкаラムに抽出液を加える直前に、ペレットを再懸濁しないこと。
- 10) 抽出液を0.75mlずつHTPスピнкаラムに加え、100xgで2-4分間遠心する。サンプル全てをカラムを通すまでくり返す。
- 11) エッペンドルフ・チューブのペレットを750 μ lの120mM Na phosphate pH8.0で洗浄し、10)のように遠心する。上静をスピнкаラムにのせ、処理する。
- 12) 750 μ lの180mM Na phosphate pH8.0でカラムを3回洗う。遠心は100xgで3-4分。
- 13) 0.4mlの300mM K_2HPO_4 pH7.2を加え、DNAをカラムから滅菌エッペンドルフ・チューブに溶出する。遠心は100xgで4分間。

- 14) 前もって調製した2.5ml Sephadex G-75スピнкаラムに溶出液を加え、8分間1600xgで遠心する。核酸を新しいエペンドルフ・チューブに集める。
- 15) -20°Cで一夜エタノール沈澱を行う（もし、G-75カラム処理がうまくいけば、エタノール沈澱には塩が必要）。
- 16) 25-50 μ lのTEに再懸濁し、-20°Cで保存する。

3. RNAのみの抽出または抽出物からDNAとRNAの分離

- 1) 2 mlエペンドルフ・チューブに以下の試薬を加える。
 - 0.5mlの0.11mmガラスビーズ（滅菌済み）
 - 125 μ lのL2バッファー
 - 125 μ lの120mM Na phosphate pH8.0（または250 μ lの5 M guanidineSCN）
 - 500 μ l細胞懸濁液
- 2) ビーズ・ビーターで2000rpm30秒処理。
- 3) 12000xg、2分遠心。
- 4) 上静を集め、氷上に保存する。
- 5) エペンドルフ・チューブに750 μ lの120mM Na phosphate pH8.0を加え、2) - 4) の操作を2回繰り返す。
- 6) 抽出前に、1 ml滅菌プラスチック・シリンジに滅菌グラスウールをシリンジ・プランジャーを用いて詰め、HTPスピнкаラムをつくる。
- 7) 滅菌HTP (non-DNA-grade) を加え、100xg 2分間遠心。
- 8) 遠心後、必要なら、さらにHTPを加え、再度遠心する。HTPは0.5-0.6ml必要。
- 9) 抽出液をHTPスピнкаラムに加えるときに、ペレットを再懸濁しないこと。
- 10) 抽出液を0.75mlずつHTPスピнкаラムに加え、100xgで2-4分間遠心する。サンプル全てをカラムを通すまで繰り返す。
- 11) エペンドルフ・チューブの大きなペレットを750 μ lの120mM Na phosphate pH8.0で洗浄し、9) のように遠心する。上静をスピнкаラムに加え、処理する。
- 12) 750 μ lの120mM Na phosphate pH8.0でカラムを3回洗う。遠心は100xgで3-4分。
- 13) 0.7mlの180mM K₂ HPO₄ pH7.2でRNAを溶出し、溶出液を清浄なエペンドルフ・チューブに集め、氷上に保存する。
- 14) この操作を2回繰り返し、溶出液を別々に集める。
- 15) RNA洗浄溶出液をそれぞれ0.70mlの滅菌再蒸留水で稀釈し、よく混合する。
- 16) これを0.75mlずつ2番目のHTPカラムに、10) と同様に加える。
- 17) カラムを一度、120mM Na phosphate pH7.2で洗浄する。

- 18) 0.4mlの300mM $K_2 HPO_4$ pH7.2を加え、100xgで4分遠心して、RNAをカラムから滅菌したエッペンドルフ・チューブに溶出する。
- 19) DNAは最初のカラムから18)のように溶出できる。
- 20) 前もって調製した3ml Sephadex G-75スピнкаラムに溶出液を加え、8分間1600xgで遠心し、核酸を清浄なエッペンドルフ・チューブに集める。
- 21) $-20^{\circ}C$ で一晩エタノール沈澱を行う（もし、G-75カラム処理がうまくいけば、エタノール沈澱には塩が必要）。
- 22) 25-50 μ lのTEに再懸濁し、 $-20^{\circ}C$ で保存する。

オリゴヌクレオチドの放射能標識 (K. Purdy)

- 1) 1.5mlエッペンドルフ・チューブに以下の試薬を加える。
 - 1 μ lのオリゴヌクレオチド (10pmol)
 - 4 μ lの5 Xキナーゼ・バッファー
 - 9.4 μ lの再蒸留水
 - 5 μ l Gamma- ^{32}P -ATP (50 μ Ci, 1850 KBq)
 - 1 μ lポリヌクレオチド・キナーゼ
- 2) $37^{\circ}C$ に50分間保ち、次いで $68^{\circ}C$ に10分間保つ。
- 3) エタノール沈澱 (2.2 μ lの3 M酢酸ナトリウムと50 μ lのエタノール)
- 4) 13000xgで10分間遠心し、上静を ^{32}P 廃液に捨てる。
- 5) 氷冷した80%エタノールで洗浄する。
- 6) 100 μ lのTE (DNA)、または再蒸留水 (RNA) に再懸濁する。

放射能の99%はラベル化操作で廃液として捨てられる。ラベルしたプローブはドットプロットハイブリダイゼーションに用い、その際の放射性廃液は廃液溜にすてる。僅かに放射能を帯びたメンブランは固体廃棄物としてすてる。

放射性ATPは9.25MBq (250 μ Ci) の25 μ l入りバイアルで購入する。

[必要な試薬]

- オリゴヌクレオチド溶液
 - 1 μ lオリゴヌクレオチドストック溶液 (0.1 μ mol/ml), アンモニア除去。
 - 9 μ l TE
- 5 xキナーゼ・バッファー
 - 0.5ml 1 M Tris pH7.6 stock
 - 0.1ml 1 M MgCl₂ stock

20 μ l 1 M dithiotreitol stock

10 μ l 0.1M Spermidine HCl working stock

2 μ l 0.5 M EDTA stock

368 μ l 再蒸留水

-20°Cで保存。

●80%エタノール

800ml / 1 無水エタノール。

オリゴヌクレオチドのRNAへのハイブリダイゼーション (K. Purdy)

- 1) メンブランをバッグに入れ、プレハイブリダイゼーションバッファーをメンブラン 1 cm² 当たり約0.1ml加え、気泡を全て除きながら加熱ダブルシールする。
- 2) 2 - 4時間40°Cで振盪する。
- 3) プレハイブリダイゼーションバッファーを除き、等量の新しいバッファーに置き換える。(1) - 3) のプレハイブリダイゼーションは省略してもよい。
- 4) プローブを加え、気泡を除きながらバッグを注意してダブルシールする。さらに、他のバッグに入れ、ダブルシールする。
- 5) 特定の温度 (通常40-42°C) で16時間振盪する。
- 6) メンブランをバッグから出し、サンドイッチボックス中で特定の洗浄バッファーと温度 (通常 1 x SSC, 1 %SDS, 42°Cで30分) で洗浄する。
溶液は高放射能であるので、メンブランを取り出すときによく注意する。
溶液とバッグは定められた方法で廃棄する。
- 7) もう一度、最適温度で30分洗浄する。
- 8) 洗浄液を捨て、余分な液をふき取り、サランラップで包み、オートラジオグラフを行う。

プレハイブリダイゼーションバッファー、フレッシュ (K. Purdy)

プローブ129、221、660、804および814用。

11. 25mlの 4 M NaCl stock

6. 25mlの400mM NaPhosphate pH7.2 stock

0. 5mlの0.5M EDTA stock

5 mlの100X Denhards

5 mlの 5 mg / 1 Poly A

再蒸留水で50mlにする。溶解させるため37°Cに暖める。数日しかもたない。

プローブ338、385および1400用。

11. 25mlの4 M NaCl stock

6. 25mlの400mM NaPhosphate pH7.2 stock

0.5mlの0.5M EDTA stock

5 mlの100x Denhards

0.5mlの10%SDS stock

5 mlの5 mg / l Poly A

再蒸留水で50mlにする。溶解させるため37°Cに暖める。数日しかもたない。

標準バッファー

10ml 5 x HBS

5 ml 100x Denhardt

5 ml 5 mg / l Poly A

洗浄バッファー

プローブ129 (46°C), 221 (57°C), 660 (59°C), 804 (45°C), 814 (45°C) 用

50mlの20x SSC

100mlの10%SDS stock

プローブ338 (45°C), 385 (48°C), 1400 (x°C) 用

225mlの4 M NaCl stock

10mlの10%SDS stock

20ml / l の 1 M Tris pH7.2 stock

プレハイブリダイゼーションバッファー (藤本)

15mlの20x SSPE (1 x SSPE : 0.18M NaCl, 10mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH7.7)

10mの150x Denhardt

1.25mlの20%SDS

5 mlの5 mg / ml Poly A

プローブ687と814用

18.75mlのddH₂O

プローブ1400、129、660と804用

5 mlのホルムアミドと13.75mlのddH₂O

プローブ338、385、221、915と310用

10mlのホルムアミドと8.75mlのddH₂O

溶解させるため37°Cに暖める。数日しかもたない。

洗浄バッファー（藤本）

プローブ1400（42℃）、338（50℃）、385（57℃）、129（38℃）、660（57℃）、221（43℃）、
804（40℃）、915（52℃）、310（50℃）用

50mlの20x SSPE

50mlの20%SDS

プローブ687（37℃）814（40℃）用

100mlの20x SSPE

50mlの20%SDS

8. 文 献

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

Amann, R. I., Stromley, J., Devereux, R., Key, R., & Stahl, D. A. (1992). Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. Appl. Environ. Microbiol. , 58, 614-623.

Bruce, K. D., Hiorns, W. D., Hobman, A. M., Osbourne, P., Strike, P., & Ritchie, D. A. (1992). Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the PCR. Appl. Environ. Microbiol. , 58, 3413-3416.

Fukui, M., & Takii, S. (1990). Seasonal variations of population density and activity of sulfate-reducing bacteria in offshore and reed sediments of a hypertrophic freshwater lake. Jpn. J. Limnol. , 51(2), 63 - 71.

Jorgensen, B. B. (1982). Mineralization of organic matter in the sea bed-the role of sulphate reduction. Nature , 296, 643-645.

Jorgensen, B. B., & Bak, F. (1991). Pathways and microbiology of thiosulfate transformations and sulfate reduction in a marine sediment (Kattegat, Denmark). Appl. Environ. Microbiol. , 57, 847-856.

Laanbroek, H. J., & Pfennig, N. (1981). Oxidation of short-chain fatty acids by sulfate-reducing bacteria in a sandy marine sediment. Arch. Microbiol. , 128, 330-335.

Lawongsa, P. L., Inubushi, K., & Wada, H. (1987). Determination of organic acids in soil by high performance liquid chromatography. Soil sci. plant Nutr. , 33, 299-302.

Leff, L. G., Dana, J. R., McArthur, J. V., & Shimkets, L. J. (1995). Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. Appl. Environ. Microbiol. , 61, 1141-1143.

Li, J.-H. (1996) Ecological study on bacterial sulfate reduction in freshwater lake sediments. Doctoral thesis, Tokyo Metropolitan University.

- Moran, M. A., Torsvik, V. L., Torsvik, T., & Hodson, R. E. (1993). Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. Appl. Environ. Microbiol. , 59, 915-918.
- More, M. I., Herric, J. B., Silva, W. C., Ghiorse, W. C., & Madson, E. L. (1994). Quatitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of DNA from sediment. Appl. Environ. Microbiol. , 60, 1572-1580.
- Nedwell, D. B., & Takii, S. (1988). Bacterial sulphate reduction in sediments of a European salt marsh: Acid-volatile and tin-reducible products. Estuarine, Coastal and Shelf Sci. , 26, 599 - 606.
- Ogram, A., Sayer, G. S., & Barkey, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. J. Microbiol. Methods , 7, 57-66.
- Parkes, R. J., Gibson, G. R., Mueller-Harvey, I., Buckingham, W. J., & Herbert, R. J. (1989). Determination of the substrates for sulphate-reducing bacteria within marine and estuarine sediments with different rates of sulphate reduction. J. Gen. Microbiol. , 135, 175-187.
- Proteous, L. A., & Armstrong, J. L. (1991). Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method. Curr. Microbiol. , 22, 345-348.
- Risatti, J. B., Capman, W. C., & Stahl, D. A. (1994). Community structure of a microbial mat: The phylogenetic dimension. Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 91, 10 173-10177.
- Sorensen, J., Christensen, D., & Jorgensen, B. B. (1981). Volatile fatty acids and hydrogen as substrates for sulfate-reducing bacteria in anaerobic marine sediment. Appl. Environ. Microbiol. , 42, 5-11.
- Stahl, D. A., Flesher, B., Mansfield, H. R., & Montgomery, L. (1988). Use of physiogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. , 54, 1079-1084.
- Steffan, R. J., Goksoyr, J., Asim, K. B., & Atlas, R. M. (1988). Recovery of DNA from soils and sediments. Appl. Environ. Microbiol. , 54, 2908- 2915.

滝井 進 (1992) 多摩川下流域底泥における硫酸還元に関する研究。(財)とうきゅう環境浄化財団研究助成集報No.142.

Taylor, J., & Parkes, R. J. (1985). Identifying different populations of sulphate-reducing bacteria within marine sediment systems, using fatty acid biomarkers. J. Gen. Microbiol., 131, 631-642.

Tebbe, C. C., & Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. Appl. Environ. Microbiol., 59, 2657-2665.

Tsai, Y.-L., & Olson, B. H. (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. Appl. Environ. Microbiol., 57, 1070-1074.

Widdel, F., & Bak, F. (1992). Gram-negative mesotrophic sulfate-reducing bacteria. In A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, & K.-D. Shleifer (Eds.), The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, application. 2nd ed. (pp. 3353-3378). New York: Springer-Verlag.

「^{た ま がわりゅういきていでい}多摩川流域底泥における^{りゅうさんかんげんきん}硫酸還元菌の^{かくさん}核酸プローブによる
^{かいせき}解析とその^{りゅうさんかんげんそくど}硫酸還元速度との^{かんけい}関係」(研究助成・A類 NO. 176)

著 者 ^{た ま い すむ} 滝 井 進
発行日 1997年3月31日
発 行 財団法人 とうきゅう環境浄化財団
〒150 渋谷区渋谷1-16-14
(渋谷地下鉄ビル内)
TEL (03) 3400-9142
FAX (03) 3400-9141
