

未知微生物をお手軽に分離培養するテクニック

Techniques for isolating yet-to-be cultured microbes without vigorous efforts

山梨大学 生命環境学部 環境科学科 助教 **田中 靖浩**

Yasuhiro Tanaka (Assistant Professor)

Department of Environmental Sciences, Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Yamanashi,

産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 主任研究員 **玉木 秀幸**

Hideyuki Tamaki (Senior Scientist)

Bioproduction Research Institution, The National Institute of Advanced Industrial Science and Technology



キーワード

未知微生物、難培養性微生物、分離培養法

1 はじめに

地球上にはどれくらいの種類の微生物(本稿では微生物の中でも特に細菌に焦点をあてて話を進めることをあらかじめご了承ください)が生息しているかご存じだろうか?その答えとして誰も正確な数字を挙げることはできないだろう。しかし、現在の主流となっている小サブユニットリボソームRNA遺伝子(16S rRNA遺伝子)に基づく分子生物学的手法による解析では、土壌1gあたりに100万種オーダーで存在するとの報告もあることから¹⁾、地球全体だと少なく見積もっても1000万種はいるであろうと筆者らは考えている。では、我々人類はこれまでにどれくらいの種類の微生物を培養できたのだろうか。

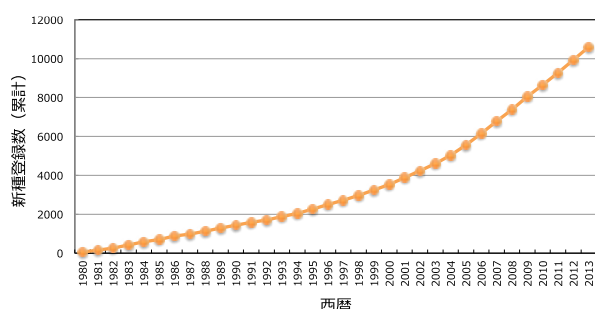


図1. 新種細菌の登録数

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN, <http://www.bacterio.cict.fr/>)のデータを用いて作成

図1には1980年から2013年までの新種細菌の登録数の変遷を示しているが、きれいな右肩上がりのチャートで順調に増え続けており、2013年の段階では合計で約10000種が正式に学名登録されている。仮に上記の“地球上に生息する微生物が1000万種”を基準に考えるとわずか0.1%程度にすぎないのである。これはすなわち、地球上にはまだ数多くの未知微生物が分離培養されずにとり残されていることを示している。

このような未知微生物の中には有益な機能を有するものも多く含まれると推察されることから、“未開の生物資源”として大いに期待されている。しかし、その多くは一般的な方法では分離培養が困難な難培養性微生物であることが知られている^{2, 3)}。そのため、これまでに数多くの研究者がこの難培養性微生物を分離培養すべくさまざまな手法の開発に挑んできた⁴⁻¹⁵⁾。本稿ではその中でも特殊な器具や高価な機器を使わず、どこの研究室でもすぐに試すことのできる“お手軽な手法”に絞って以下に紹介する。

2 古典的微生物培養法にちょっとした工夫を加える

ここでいう古典的微生物培養法とは、平板培地に環境試料(の希釈物)を接種し、これを適当な温度で培養する方法のことを指すが、この方法にちょっとした工夫を加えることで、さまざまな未知微生物の分離培養が可能となっている。

2.1 栄養濃度の薄い培地を用いる

この方法は微生物の分離培養に用いる平板培地中の有機物濃度を低く設定するというものである。教科書にも載っている方法なので、あえてここで書く必要はないかもしれないが、いまだに学会などで、環境試料からの微生物分離培地としてLB培地や標準寒天培地を用いたケースが多く見られることから、意外とまだ知らない研究者もいるかもしれないと思い紹介する次第である。このように書くとLB培地や標準寒天培地が微生物の培地としてダメな印象を与えてしまうが、そうではない。これらの培地は大腸菌や*Pseudomonas*属細菌といった一般的によく知られた易培養性の従属栄養細菌の培養には優れてはいるのだが、環境試料から未知の微生物を分離する、という目的には適さないという意味である。その理

由の一つとしては、これらの培地には、自然環境中ではおおよそありえない高濃度の有機物が含まれているため、多くの微生物が生育する上で強いストレスとなる(具体的には高濃度の有機物代謝によって生成する活性酸素による細胞損傷と考えられている)ことが挙げられる¹⁶⁾。

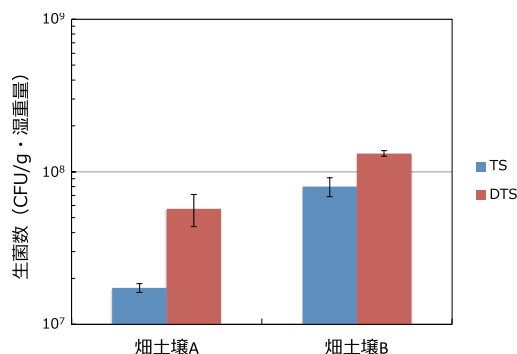


図2. 栄養濃度が異なる2種の平板培地における生菌数の比較

図2は筆者らが土壌中に生息する2種の微生物をターゲットとし、トリプチケースソイ(TS)培地とTS培地を100倍希釈した培地(DTS培地)をベースとした寒天平板培地によって培養した結果であるが、いずれの土壌においてもDTS培地の方でTS培地よりも高いCFU値が得られていることが分かる。このような事実をもとに、一般的によく用いられる完全培地を希釈することで、系統的に新規微生物(未知微生物)の分離培養に成功した例がいくつか報告されている。例えば、Janssenらは市販のNutrient Brothを100倍希釈した培地を用いることで難培養性細菌群として知られる*Verrucomicrobia*門、*Acidobacteria*門に属する新規微生物の分離培養に成功している⁵⁾。

なお、薄い培地を用いた場合は濃い培地よりも全体的に微生物のコロニー形成速度は遅めとなる。特に難培養性微生物の多くは生育が遅いものがほとんどであることから培養時間については長めに設定するのが望ましいことを付け加えておく。ちなみに、筆者らの研究室では最低でも2~4週間の培養期間を設けるようにしている。

2.2 平板培地のゲル化剤を変える

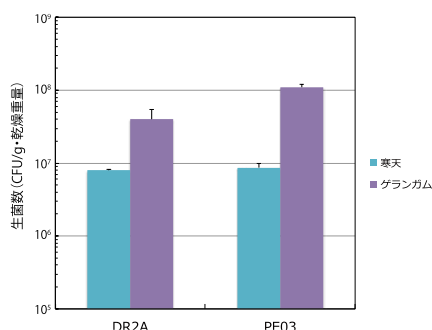


図3. 寒天およびグランガム平板培地における生菌数の比較 (Tamaki et al., 2005を一部改変)

ロベルト・コッホ以来、微生物の分離培養には平板培地の使用が不可欠となっているが、多くの微生物学者の頭の中

には「平板培地=寒天平板培地」という関係が構築されているといっても過言ではないと思う。しかし、ここ10年余で平板培地の作製にあたってゲル化剤として寒天以外のものを使うことで、これまで難培養とされた未知微生物を取得できる可能性を示す研究成果が得られている^{11, 12)}。

図3には、霞ヶ浦の底泥試料を分離源とし、ゲル化剤として寒天とグランガムを用いて作製した平板培地(DR2AおよびPE03という組成が異なる2種の培地¹²⁾)を用いて培養した時に得られたCFU値を示しているが、DR2A培地、PE03培地のいずれにおいてもグランガム平板培地で寒天平板培地の約10倍の値が得られていることが分かる。また、PE03培地をベースとした二つの平板培地において出現したコロニーをランダムに30個選択し、16S rRNA遺伝子に基づく系統解析に供したところ、寒天平板培地では系統的に新規微生物が占める割合が30%であったのに対し、グランガム平板培地ではその倍以上の63%を占めるとの結果が得られた(図4)。

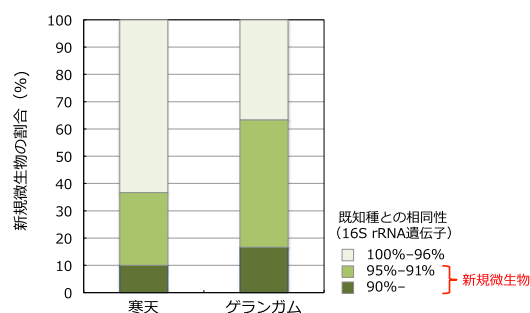


図4. 寒天およびグランガム平板培地における新規微生物の取得率 (Tamaki et al., 2005を一部改変)

さらに、その後の研究で別の底泥サンプルにおいても上記と同様にグランガム平板培地を用いることで、高頻度で系統的に新規微生物が取得できることが示されるとともに(この場合は取得微生物の46%が系統的に新規であった)、当該新規微生物の44%がグランガム平板培地では生育するものの、寒天平板培地では生育しない菌株であることが明らかとなった¹¹⁾。すなわち、これらの結果から平板培地のゲル化剤として寒天を用いることが難培養性微生物の分離培養の妨げとなっていた可能性が示されたわけである。

では、なぜ、寒天を用いると本来は分離培養できるはずの微生物を得ることができないのであろう?その答えとしては今のところ2つの理由が考えられている。1つめの理由は寒天中に微生物のコロニー形成阻害物質(生育阻害物質)が含まれていることである。これは原らによって明らかにされたことであるが¹⁷⁾、寒天中にほんのわずかに含まれる5-ヒドロキシメチルフラン-2-カルボン酸とフラン-2-カルボン酸が細菌のコロニー形成に関与するスウォーミング(運動性)を阻害するとのことで、特に生育の遅い細菌に関

してはこの影響を大きく受け、肉眼で確認できるコロニー形成に至らないケースがあるようである。未知微生物の多くは生育が遅いと考えられることから、おそらくこれらの物質の影響を受けているのであろう。次に、2つめの理由であるが、寒天平板培地の調製方法に問題があるというものである。具体的には、通常、寒天平板培地を作製する時は液体培地に寒天を加え、オートクレーブ滅菌にかけるが、実はこれが諸悪の根源となる場合があるのである。一般的に微生物の分離培養に用いる多くの培地には緩衝能を持たせるためにリン酸塩を加えるが、このリン酸の存在下で寒天をオートクレーブ処理すると培地中に過酸化水素が生成し(10mMのリン酸添加で約15μMの過酸化水素が生成)、これによって微生物の生育が阻害されるというわけである¹³⁾。実際、リン酸塩と寒天を別々にオートクレーブして作製した平板培地を用いて土壌、底泥、河川水の3種の環境試料中の微生物を培養すると、いずれの試料においても通常の方法で作製した寒天平板培地よりも培養率が向上し、多くの新規微生物が分離培養できたとの結果が得られている¹³⁾。

2.3 共生微生物のチカラを借りる

環境中に分布する微生物の多くは他の生物と共生して生活している。微生物が共生関係を持つ相手としては動物、植物がすぐにイメージできるものの、微生物同士の間にも成り立っていることは意外と思いつかないだろう。しかし、ここ十数年間で微生物間の相互作用に関する研究が盛んに行われ、彼らが自身あるいは多種の微生物と様々な化学物質を介して情報のやりとりをしていることが明らかとなってきた。例えば、*Vibrio fischeri*(発光細菌)の発光や*Pseudomonas aeruginosa*(緑膿菌)のバイオフィルム形成に関わる遺伝子はシグナル物質であるN-アシル化ホモセリンラクトン類(N-Acyl homoserine lactones; AHLs)によって^{18, 19)}、また*Streptococcus mutans*(ミュータンス菌)のバイオフィルム形成に関わる遺伝子は特殊なオリゴペプチドによって制御される²⁰⁾等である。このようなシグナル物質の中には微生物の生育に関与するものも存在すると考えられており、これがすなわち微生物同士の共生と言えるのである。このような背景から、微生物分離用の平板培地に代表的なシグナル物質のAHLsを添加することで、環境水からの微生物の培養率が向上したケース²¹⁾や難培養性細菌群の一つである*Acidobacteria*門細菌の取得率がアップする等の報告がなされている¹⁰⁾。ただ、AHLsにしてもオリゴペプチドにしてもさまざまな種類があり、個々の細菌種によって感知される物質が異なる場合が多い。従って、特定のシグナル物質を培地に添加するだけでは取得される難培養性微生物の種類が限定される可能性がある。さらに、これらのシグナル物質の多くは市販されていないことから、“ちょっと試してみよう”といった

感じで気軽に研究を始めることはできない(一部のAHLsは市販されているが非常に高価である)。そこで、我々の研究グループでは様々なシグナル物質を含むものとして、培養可能な微生物の“培養スープ”を代替品として使っている。“培養スープ”とは、具体的には土壌や環境水、活性汚泥など、微生物分離源となる環境試料あるいはすでに培養された微生物を液体培地に接種して培養後、遠心分離することで得られる培養上清のことで、これを適量添加した培地(筆者らの研究室では10%に設定している)を微生物分離用培地とするのである。この手法を用いることで我々はこれまでに通常の平板培地では生育が極めて遅く、分離培養が困難な新属新種細菌のAST4株(*Catellibacterium nectarophilum*として新学名登録)の取得に成功している¹⁵⁾。

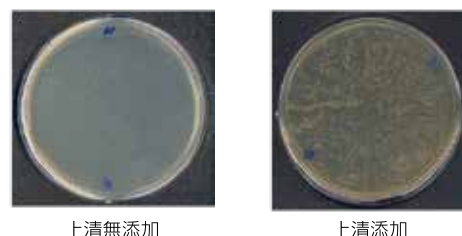


図5. 複合微生物培養上清添加および無添加培地におけるAST4株の生育

図5にはこの細菌の分離源である活性汚泥を接種し培養することで得られた“複合微生物”の培養液上清を添加した培地と、無添加の培地における当該菌株の生育を示しているが、上清の添加によってAST4株の生育が著しく促進されていることがお分かりいただけるであろう。後に、このAST4株の生育を促進する微生物の特定を行ったところ、同じ分離源(活性汚泥)中に生息していた*Sphingomonas*属細菌(GF9株)であることが分かったのであるが²²⁾、このGF9株の培養上清を添加した培地を用いることで、さらに別の活性汚泥サンプルからも新たな難培養性の細菌で*Leucobacter*属の新種と考えられるASN212株の取得に成功している²³⁾。このように、“培養スープ”を用いる方法はどの研究室でもすぐに試すことのできる方法であるが、我々のように運良くGF9株と同様に難培養性細菌の生育を促進する因子を生産する微生物を取得できたならば、これを利用することにより、様々なサンプルをターゲットとして芽づる式に難培養性の未知微生物を取得できるかもしれない。

3

微生物分離源として用いる試料の選択

未知微生物を取得する手段として、微生物の培養法を工夫するだけではなく、微生物の分離源をうまく選択する方

法もある。具体例をいくつか挙げると、深海、地熱地帯、南極といった普通ではない環境のサンプルをターゲットにするということである。なぜなら、このようなサンプルには特殊な微生物が存在していると考えられるからである。また、これらのサンプルは入手が容易ではないことから、研究材料(微生物分離源)として使っている研究者に限られるため、多くの新規微生物が手付かずで“未発掘”のまま残されている可能性が高いともいえるだろう。しかし、本稿の主旨が「どこの研究室でもすぐに試すことのできる方法を紹介する」であることを鑑みると、これらのサンプルを使えば良いと紹介するのは少々ピントはずれとなってしまう。そこで、筆者らが読者の皆さんにおすすしたいのは、上記のような特殊環境サンプルが新規微生物の分離に有効であると考えられる2つめの理由、すなわち、「研究材料(微生物分離源)として使っている研究者に限られる」に該当し、入手が容易なサンプルを探すという戦略である。とはいえ、なかなかそういったサンプルを見つけ出すのは難しいかもしれないが、サンプル選定のコツとして、一見、あまりにも平凡すぎて面白みがなく、誰も研究対象にしていけないような環境試料に目をつけると良いかもしれない。実際に、我々もこのような観点から、池や湖、河川などに生息している水生植物に着目し、運良く(?)系統的に新規な微生物の取得に成功している^{24, 25)}。水生植物は古くから富栄養化した水環境の浄化等に関する研究に用いられており^{26, 27)}、最近では根圏微生物との相互作用によって難分解性の有機化学物質を分解する能力も有することが明らかとなってきた^{28, 29)}。従って、研究材料としてあまり使われておらず面白くないというわけではなかったのだが、意外にも水生植物の根や葉、茎にどのような微生物が生息しているかに関する知見はほとんど無い状態であった。そこで、我々はまず水生植物の根をターゲットとして、どのような微生物が分離されるかについて検討した。対象とした水生植物サンプルは浮遊性水生植物のウキクサ、抽水植物のヨシ、ミソハギであるが、以下にそれぞれの植物ごとにどのような新規微生物が分離されたかについて述べることにする。

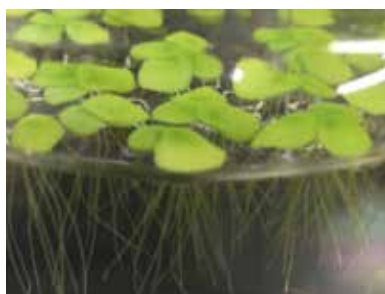


図6. 浮遊性水生植物のウキクサ

3-1. ウキクサからのVerrucomicrobia門細菌の分離²⁴⁾

ウキクサ(図6)は池、沼、湖、河川等に広く分布する浮

遊性の水生植物であるが、初夏から夏にかけて水田一面に“緑の絨毯”のごとく繁茂している風景をご覧になった方もおられるであろう。では、このウキクサの根からはどのような微生物が分離されるのだろうか?DTS平板培地を用いて分離した80株は16S rRNA遺伝子のパターン解析(RFLP解析;Restriction Fragment Length Polymorphism解析)により20グループに分けられた。

表1. ウキクサ根由来微生物と既知菌種の16S rRNA遺伝子の比較 (Matsuzawa et al. 2010を改変)

RFLP グループ	菌 株 数	既知菌種	相同性 (%)	分類群 (門または綱)*
1	11	<i>Haloferula rosea</i>	84	Verrucomicrobia
2	3	<i>Sphingomonas wittichii</i>	99	Alphaproteobacteria
3	20	<i>Zoogloea oryzae</i>	99	Betaproteobacteria
4	3	<i>Zoogloea caeni</i>	99	Betaproteobacteria
5	1	<i>Methyloversatilis universalis</i>	99	Betaproteobacteria
6	1	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>	98	Betaproteobacteria
7	12	<i>Methylobium aquaticum</i>	97	Betaproteobacteria
8	5	<i>Methylobium aquaticum</i>	97	Betaproteobacteria
9	1	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	87	Verrucomicrobia
10	1	<i>Devosia insulae</i>	97	Alphaproteobacteria
11	1	<i>Algoriphagus manitolivorans</i>	86	Bacteroidetes
12	1	<i>Runella zeae</i>	97	Bacteroidetes
13	3	<i>Niastella koreensis</i>	95	Bacteroidetes
14	1	<i>Rhodoplanes elegans</i>	88	Alphaproteobacteria
15	5	<i>Mesorhizobium chacoense</i>	98	Alphaproteobacteria
16	5	<i>Opitutus terrae</i>	95	Verrucomicrobia
17	2	<i>Opitutus terrae</i>	93	Verrucomicrobia
18	2	<i>Asticcacaulis excentricus</i>	99	Alphaproteobacteria
19	1	<i>Blastomonas ursincola</i>	100	Alphaproteobacteria
20	1	<i>Lacibacter cauensis</i>	99	Bacteroidetes

太字は既知菌種の16S rRNA遺伝子との相同性が95%以下のもの(新規微生物)

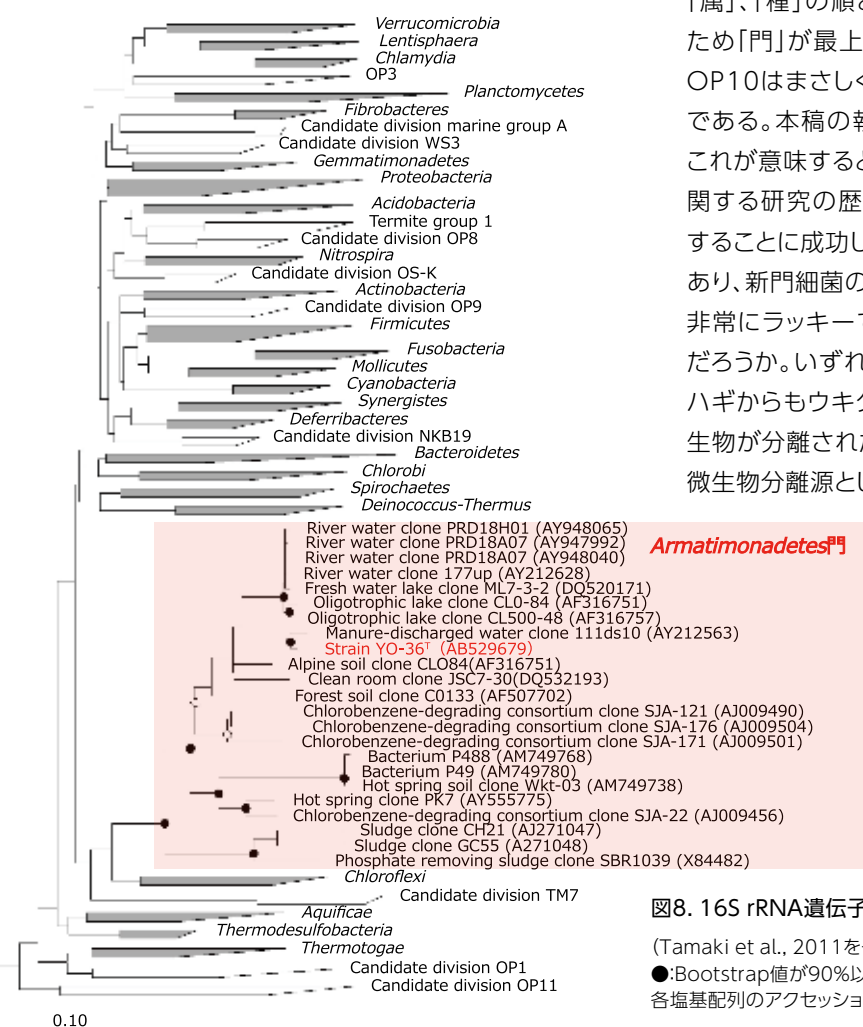
*Proteobacteria門は網レベルで表記

表1には各グループの既知菌種との16S rRNA遺伝子の比較を示しているが、このうちの7グループ、すなわち分離株全体の31%を占める25菌株が系統的に新規な微生物であった(16S rRNA遺伝子の相同性が既知菌株由来のもの95%以下の菌株を新規微生物としている)。一方、我々が他の研究で4種の畑土壌をターゲットとして同様に微生物の分離を行ったケースでは、新規微生物の取得率が0~10%であったことを考慮すると、ウキクサ根からは非常に高頻度で新規微生物を得ることができたといえるであろう。さらに特筆すべきは、それらのうち4グループは難培養性の細菌群の一つであるVerrucomicrobia門に属していたことである。本稿においてVerrucomicrobia門細菌が難培養であることは何回か記述してきたが、その根拠の

一つとして、この細菌群は土壌等の様々な環境中で比較的高いポピュレーションで存在しているにもかかわらず、その分離頻度は1%程度との報告もあり⁸⁾、極めて分離頻度が低いことが挙げられる。ところが、上述のウキクサ根のケースにおいては、分離した80株のうちの実に24%(19株)が *Verrucomicrobia* 門に属していた。これは、一つの環境試料からの *Verrucomicrobia* 門細菌の取得率という点でチャンピオンデータであることは言うまでもなく、新規微生物分離源としてのウキクサ根のポテンシャルの高さを示すものであるといえよう。



図7. 抽水植物のミソハギとヨシ



3-2. ミソハギ、ヨシからの新規微生物の分離²⁵⁾

上述のウキクサの結果を受けて、筆者たちは「水生植物の根はひょっとしたら新規微生物の宝庫なのかもしれない」と考え、今度は抽水性の水生植物で、川縁などの湿地を好んで生息しているミソハギとヨシ(図7)の根をターゲットとして微生物の分離を試みた。

それぞれの植物根から40株ずつを分離し、それらの系統解析を16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づいて行ったところ、ミソハギ由来の菌株の35%、ヨシ由来の菌株の28%が系統的に新規な微生物であり、これらの水生植物の根からもウキクサ根と同様に高頻度で新規微生物を取得可能であることが示された。また、さらに、ヨシ根から分離された菌株の中には極めて新規性の高い微生物が含まれていた。すなわち、それまでは遺伝子レベルでしか存在が明らかにされていなかった細菌群の一つである門レベルの未培養系統群Candidate division OP10に属する菌株(YO-36株)が取得されるという驚くべき結果を得たのである(図8)。

といっても、これがどれだけすごいことなのか、今一つ“ピン”とこない方もおられるかと思うので少し説明すると、生物の階層分類は上から「界」、「門」、「綱」、「目」、「科」、「属」、「種」の順となる。細菌の場合は「界」が存在しないため「門」が最上位となるのだが、Candidate division OP10はまさしくその「門」の階層に該当する分類群なのである。本稿の執筆段階で細菌には30門が存在するが、これが意味するところは、150年近くの長い微生物分離に関する研究の歴史の中で、門レベルで新しい細菌を分離することに成功した例は全世界で30しかないということであり、新門細菌の分離に遭遇することはとても珍しく、また非常にラッキーである、ということがお分かりいただけるだろうか。いずれにせよ、この新門細菌も含めてヨシ、ミソハギからもウキクサと同様に高頻度で系統的に新規な微生物が分離されたということは、水生植物が全般的に新規微生物分離源として大いに期待できることを示すものである。

図8. 16S rRNA遺伝子に基づくYO-36株の分子進化系統樹

(Tamaki et al., 2011を一部改変)

●: Bootstrap値が90%以上, ○: Bootstrap値が80%以上
各塩基配列のアクセッションナンバーは括弧内に記載

り、今後さらに多くの水生植物をターゲットとして網羅的な微生物分離を進めることで31番目、32番目といった次なる新門細菌の分離につながるのではないかと筆者たちは日々妄想しているところである(一生のうちに何度も新門細菌の分離をしようというのは少々烏滸がましいか...)。なお、我々が分離に成功したヨシ根由来の上記菌株は2011年に28番目の新門細菌*Armatimonadetes*(属種名は*Armatimonas rosea*)として国際委員会により正式に認定されている³⁰⁾。

4 おわりに

以上、本稿では“どこの研究室でもすぐに試すことのできる未知微生物の分離培養法”として微生物の分離培地と分離源にそれぞれ工夫加える方法を紹介してきた。もちろん、それぞれの方法を個別に用いるだけでもそれなりの効果が期待できるが、できれば複数の方法を組合せて試していただくと、より効率良く新規な微生物を取得できるかもしれない。実際、すでにお気づきの読者もおられるかと思うが、上述の水生植物からの微生物分離では当然のごとく“薄い培地”を使用している。これは分離培地とサンプルの選定の工夫の両方を組合せた結果であるが、例えば、“濃い培地”を用いた場合にヨシの根から新門細菌が分離できたか?と聞かれれば答えは“ノー”である。

最後に、本稿で紹介した方法を使うかどうかは別として、もし、何らかの研究の過程で新規微生物が取得されたならば、一つだけお願いしたいことがある。それは、取得した微生物の命名についてである。ごく稀にはあるが、いろいろと論文を見ていると、分離した微生物に勝手に属種名を付けて論文中に記載し、かつその名前で16S rRNA遺伝子などの遺伝子情報をDDBJやEMBLといったデータベースに登録していることがある(場合によっては遺伝子情報だけのときもあるが)。もちろん、微生物の命名権は分離した研究者が持つものなので、名前をつけるのは構わない。しかし、その名前を正式名称として論文やデータベースに記載するには、必ず国際原核生物分類命名委員会による国際細菌命名規約に沿った上、International Journal of Evolutionary Microbiology誌等の学術誌にその細菌の性状を記載して提案・受理された後でないといけないのである。これを守っていただかないと、正式な名前ではない、いわゆる“芸名”みたいなものが本名として誤解され、他の論文にも記載されるという過ちの連鎖が生じるかもしれないのである。この点を念頭に置いて頂き、少し学名の記載や使用方法にも配慮頂きながら、研究をお進めいただければ幸いである。なお、細菌の命名方法については森らによる分かりやすい総説があるので³¹⁾、こちらを参照されたい。

参考文献

- 1) J. Gans, M. Wolinsky, J. Dunbar, *Science*, **309**(5739), 1387–1390 (2005).
- 2) R. I. Amann, W. Ludwig, K. H. Scheleifer, *Microbiol. Rev.* **59**(1), 143–169 (1995).
- 3) M. S. Rappé, S. J. Giovannoni, *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 369–394 (2003).
- 4) I. F. George, M. Hartmann, M. R. Liles, S. N. Agathos, *Appl. Environ. Microbiol.* **77**(22), 8184–8188 (2011).
- 5) P. H. Janssen, P. S. Yates, B. E. Grinton, P. M. Taylor, M. Sait, *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(5), 2391–2396 (2002).
- 6) T. Kaerberlein, K. Lewis, S. S. Epstein, *Science*, **296**(5570), 1127–1129 (2002).
- 7) A. Manome, H. Zhang, Y. Tani, T. Katsuragi, R. Kurane, T. Tsuchida, *FEMS Microbiol. Lett.* **197**(1), 29–33 (2001).
- 8) P. Sangwan, S. Kovac, K. E. Davis, M. Sait, P. H. Janssen, *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(12), 8402–8410 (2005).
- 9) G. Steinert, S. Whitfield, M. W. Taylor, C. Thoms, P. J. Schupp, *Mar. Biotechnol.* **16**(5), 594–603 (2014).
- 10) B. S. Stevenson, S. A. Eichorst, J. T. Wertz, T. M. Schmidt, J. A. Breznak, *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(8), 4748–4755 (2004).
- 11) H. Tamaki, S. Hanada, Y. Sekiguchi, Y. Tanaka, Y. Kamagata, *Environ. Microbiol.* **11**(7), 1827–1834 (2009).
- 12) H. Tamaki, Y. Sekiguchi, S. Hanada, K. Nakamura, N. Nomura, M. Matsumura, Y. Kamagata, *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(4), 2162–2169 (2005).
- 13) T. Tanaka, K. Kawasaki, S. Daimon, W. Kitagawa, K. Yamamoto, H. Tamaki, M. Tanaka, C. H. Nakatsu, Y. Kamagata, *Appl. Environ. Microbiol.* **80**(24), 7659–7666 (2014).
- 14) Y. Tanaka, Y. Benno, *Microbiol. Immunol.* **59**(2), 63–70 (2015).
- 15) Y. Tanaka, S. Hanada, A. Manome, T. Tsuchida, R. Kurane, K. Nakamura, Y. Kamagata, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**(3), 955–959 (2004).
- 16) S. F. Bloomfield, G. S. A. B. Stewart, C. E. R. Dodd, I. R. Booth, E. G. M. Power, *Microbiology*, **144**(1), 1–3 (1998).
- 17) S. Hara, R. Isoda, T. Tahvanainen, Y. Hashidoko, *PLoS One*, **7**(7), e41142 (2012).
- 18) A. L. Schaefer, B. L. Hanzelka, A. Eberhard, E. P. Greenberg, *J. Bacteriol.* **178**(10), 2897–2901 (1996).
- 19) R. S. Smith, B. H. Iglewski, *Curr. Opin. Microbiol.* **6**(1), 56–60 (2003).
- 20) K. Zhang, M. Ou, W. Wang, J. Ling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**(4), 933–938 (2009).
- 21) I. Bussmann, B. Philipp, B. Schink, *J. Microbiol. Methods*, **47**(1), 41–50 (2001).
- 22) Y. Tanaka, S. Hanada, H. Tamaki, K. Nakamura, Y. Kamagata, *Microbes Environ.* **20**(2), 110–116 (2005).
- 23) M. N. I. Bhuiyan, R. Takai, S. Mitsuhashi, K. Shigetomi, Y. Tanaka, Y. Kamagata, M. Ubukata, *J. Antibiot.*, in press (available at <http://www.nature.com/ja/journal/vaop/ncurrent/abs/ja201587a>).
- 24) H. Matsuzawa, Y. Tanaka, H. Tamaki, Y. Kamagata, K. Mori, *Microbes Environ.* **25**(4), 302–308 (2010).
- 25) Y. Tanaka, H. Tamaki, H. Matsuzawa, M. Nigaya, K. Mori, Y. Kamagata, *Microbes Environ.* **27**(2), 149–157 (2012).
- 26) R. M. Gersberg, B. V. Elkins, S. R. Lyon, C. R. Goldman, *Water Res.* **20**(3), 363–368 (1986).
- 27) K. R. Reddy, W. F. De Busk, *J. Environ. Qual.* **14**(4), 459–462 (1985).
- 28) R. A. Kristanti, T. Toyama, T. Hadibarata, Y. Tanaka, K. Mori, *RSC Adv.* **4**, 1616–1621 (2014).
- 29) T. Toyama, T. Ojima, Y. Tanaka, K. Mori, M. Morikawa, *Water Sci. Technol.* **68**(3), 522–529 (2013).
- 30) H. Tamaki, Y. Tanaka, H. Matsuzawa, M. Muramatsu, X. Y. Meng, S. Hanada, K. Mori, Y. Kamagata, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**(6), 1442–1447 (2011).
- 31) 森浩二, 中川恭好. 日本生物工学会誌, **89**(6), 336–339 (2011).