

## 総 説

安定同位体利用技術

# 安定同位体でバイオテクノロジーのための 微生物機能を探る

足立恭子

Reprinted from  
RADIOISOTOPES, Vol.57, No.1  
January 2008



**Japan Radioisotope Association**

[http : //www.jrias.or.jp/](http://www.jrias.or.jp/)

## 総 説



### 安定同位体利用技術

## 安定同位体でバイオテクノロジーのための微生物機能を探る<sup>†</sup>

足立恭子

株式会社 海洋バイオテクノロジー研究所 有用物質利用領域  
026-0001 岩手県釜石市平田 3-75-1

Key Words : stable isotope, microorganism, biotechnology, biosynthesis, biodegradation, stable isotope probing, carbon-13, deuterium

### 1. はじめに

バイオテクノロジー分野での安定同位体の利用は、有用物質の生合成経路、あるいは環境汚染物質生分解代謝経路・機構の解明のために用いられてきた。更に、明らかにされた代謝経路と関係遺伝子の定量的解析を行うことにより微生物代謝の最適化を目指すメタボリックエンジニアリング（代謝工学）では、安定同位体標識化合物を用いたフラックス解析が重要な技術として確立されている。

1970～80年代には新規有用天然物の構造が決定されるとすぐに生合成経路の解明まで行われたが、その後は新規の骨格を有する天然物が少なくなったため、生合成経路を調べる必要がなくなってきた。しかし1990年代の後半になると、バイオテクノロジー技術の進歩と応用の伴い、天然物の生合成遺伝子取得あるいは取得した遺伝子の機能解析の目的で、合成経路を詳細により確かな方法で調べなければならない状況となった。特にポリケチド合成系はその産物

が生理活性物質として非常に有用な化合物が多いため、最も研究例が多い分野であり、代謝経路並びに遺伝子ともに詳細に調べられている<sup>1)</sup>。一方、医薬品以外の化成品についてもバイオプロセスによる生産を目指す、いわゆるグリーンバイオテクノロジーの試み<sup>2)</sup>がなされるようになり、この分野でも安定同位体を用いた標識実験による微生物代謝経路の解明が重要になっている。

ところが、微生物機能や代謝経路が非常に多様であるため、それらを解明するための安定同位体の利用方法も常法からは少し外れて、目的に合致した利用法を工夫する必要がある場合も多い。ここでは、筆者の所属する海洋バイオテクノロジー研究所（MBI）での安定同位体を利用した研究成果を中心に、バイオテクノロジー分野での微生物機能の利用を目指した新しい知見並びに関連する研究の現状を紹介する。

### 2. 有用物質の生合成経路の解明

微生物の有用機能の探索は、主として陸上微生物を中心に精力的に行われ、発酵工業や医薬などの分野で有用性が確立されたものも多い。一方、微生物を単離培養することなく分子遺伝学的手法による解析を行った結果、無脊椎動物や海藻などの生物体内/表面を含む海洋環境は、陸上微生物とは異なる未知微生物の宝庫である

<sup>†</sup> “Applications of Stable Isotopes in Life Sciences”. Investigation of Microbial Function for the Application of the Biotechnology Using Stable Isotopes. Kyoko ADACHI : Applied Bioorganic Chemistry Group, Marine Biotechnology Institute Co. Ltd., 3-75-1, Heita, Kamaishi-shi, Iwate Pref. 026-0001, Japan.

ことが明らかとなってきた。それら未知海洋微生物は、エネルギー機構や代謝経路が陸上微生物とは異なっていて、新たな有用機能（物質、酵素、遺伝子など）を有していることが期待できる。筆者らは、多様な海洋環境から各種方法で既に 50 000 株以上の微生物を分離しており、多くの外部研究機関と共同して網羅的機能解析を進めている。

その中のスクリーニング法のひとつとして、MBI では HPLC/PDA, NMR を中心としたメタボロミクス分析により、効率的に微生物中の有用代謝物を検出・解析することを試みている。つまり、代謝物の構造から有用酵素/遺伝子の存在を予想し、それらを取得しようというのである。多くの新規代謝物あるいは有用物質が検出、単離精製された中で、筆者らは次の 2 種類の化合物がバイオテクノロジー分野で有用と考えて、生合成経路の解析を行った。

ひとつは、海洋の石油汚染現場などでアルカン分解を行っている *Alcanivorax* 属細菌の生産する新規抗菌物質 3-(5-ヒドロキシ-2-メチル-6-オキソ-6*H*-ピラン-3-イル)-2-メチルアクリル酸 (HPMA) である (図 1)。この海洋細菌は世界中のどの海域にも生息していて、タンカー事故などによる石油汚染が生じると主にアルカン分解の役割を担っている<sup>3)</sup>。興味深いことに、MBI の立地している岩手県釜石市の海洋から同属の細菌を 3 株分離した後、実験室で一般的な海洋細菌の生育培地であるマリンアガー 2216 (Difco) 上でコロニーを形成させてもどれも生育が非常に悪くて、図 2(A) に示したように透明で肉眼ではわかりにくかった。一方、マリンアガーに 0.5% 程度のピルビン酸ナトリウムを加えた培地上では、図 2(B) によく生育してクリーム色のコロニーを形成した。この現象は、同種の細菌で基準株である *Alcanivorax jadensis* DSM12178<sup>T</sup> でも同様だったので、本株を用いてピルビン酸ナトリウム存在下での代謝物を調べたところ、図 1 に示した新規抗菌物質 HPMA を生産していることがわかった<sup>4)</sup>。

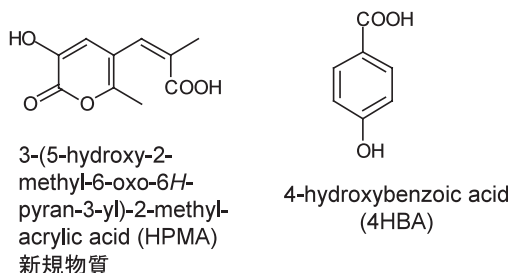


図 1 海洋細菌から得られた有用物質の構造

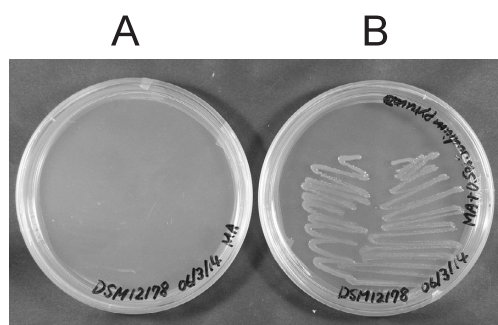
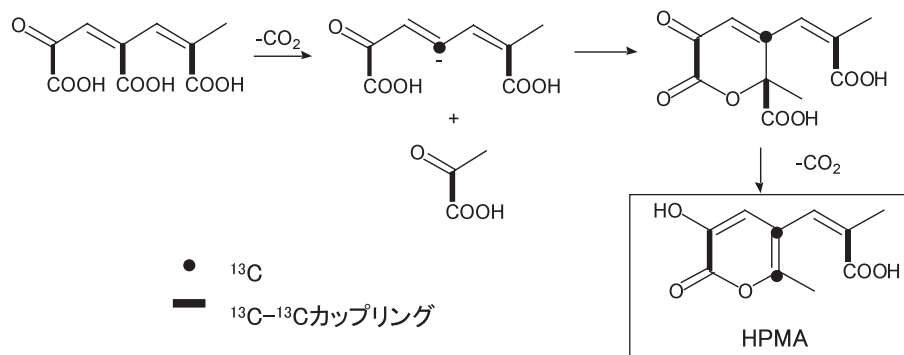
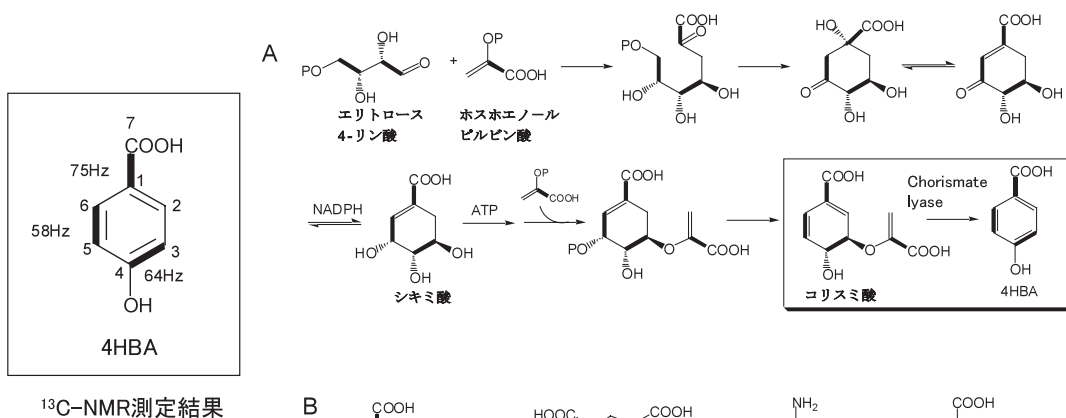


図 2 海洋から分離した *Alcanivorax* 属細菌の寒天培地上での生育の違い

A: マリンアガー培地    B: MA + 0.5% ピルビン酸ナトリウム (MA)

そこで、ピルビン酸から HPMA への生合成経路を明らかにするために、二重標識 [ $1,2-^{13}\text{C}_2$ ]ピルビン酸ナトリウムを用いて取込み実験を行った。 $^{13}\text{C}$ -NMR を用いて  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  カップリングを観測する手法は、生合成研究の上で極めて重要であり、他では代用できないために、広範に使用されている<sup>5)</sup>。本実験でも、生産された HPMA を単離後  $^{13}\text{C}$ -NMR 測定して、分裂パターンを調べた。その結果から、図 3 に示したような、通常のポリケチドの生合成機構とは異なる機構が予想された。生産菌が特殊な海洋細菌であることから、新規な生合成遺伝子/酵素が期待できる。

また、海洋細菌 *Microbulbifer* sp. A4B-17 が、抗菌物質 4-ヒドロキシ安息香酸 (4HBA) (図 1 (B)) とそのアルキルエステル体 (パラベン) をグルコースから産生することを見出した<sup>6)</sup>。微生物がパラベンを蓄積するという報告は、本

 $^{13}\text{C}$ -NMR測定結果図3 二重標識[1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]ピルビン酸を用いた取り込み実験の結果と HPMA の推定生合成経路図4 二重標識[1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]ピルビン酸を用いた 4HBA への取り込み実験の結果と推定生合成経路 A と B  
B の代謝経路ではなかった

株が初めてである。パラベンシャンプーや化粧品類に防腐剤として添加されている物質で、工業的にはベンゼンから合成され、バイオテクノロジー技術では既に組み換え微生物でトルエンからの合成ができています<sup>7)</sup>。しかし、いずれも原料に石油成分を用いているので、それらの代わりにグルコースを用いるグリーンバイオテクノロジー技術のための生合成酵素遺伝子を単離することを目的として、生合成経路を明らかにすることを試みた。

微生物や植物で既に知られている 4HBA の生合成経路から、シキミ酸経路を経てコリスミ

酸が合成されるのは推定できた。その後、図4のAとBで示したどちらの経路を経るかは、4HBAの1位と7位の炭素間の結合が途中過程で切れたかどうか重要な点となるので、それを解明するために二重標識[1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]ピルビン酸ナトリウムを用いて取り込み実験を行った。その結果、図4(a)の4HBAのように標識されていることがわかり、Chorismate lyaseによりコリスミ酸から変換されることが予想された。現在、Chorismate lyaseをコードする *ubiC* 遺伝子を、海洋細菌 *Microbulbifer* sp. A4B-17から取得することを試みている。

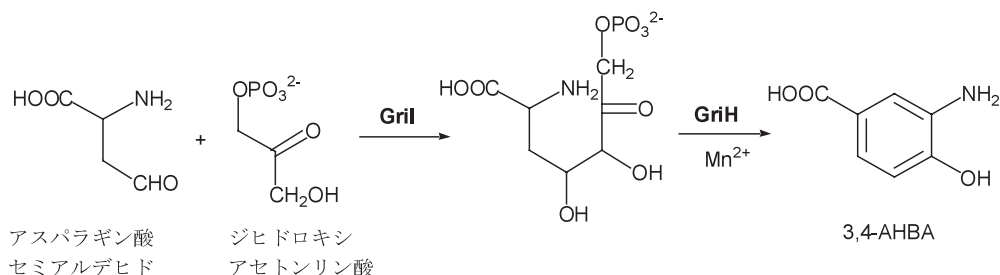


図5 GriI, GriH による 3,4-AHBA の生合成経路

その他の海洋細菌では、*Vibrio* 科細菌でロイシンからアセトンへの新規代謝経路が  $d_7$ -ロイシン ( $(\text{CD}_3)_2\text{CDCH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$ ) を用いた取り込み実験により、見つかったという報告がある<sup>8)</sup>。これは、GC-MS 分析により *Vibrio* 経路では  $d_6$ -アセトンができ、*Pseudomonas* 経路では  $d_5$ -アセトンができたことが示され、これまで *Pseudomonas* 属細菌で知られていたロイシンからアセトンへの代謝経路<sup>9)</sup>と異なる経路であることを証明している。

微生物の生合成経路にはまだまだ知られていないものも多く、その中には工業的にも有用なものがあると予想される。最近では、放線菌で新規ベンゼン環合成経路が堀之内らによって発見された<sup>10)</sup>。動物はベンゼン環合成能がないが、4HBA のところでも述べたように、植物や微生物はシキミ酸経路によってベンゼン環が合成される。しかし、この放線菌ではベンゼン環を有する化合物 3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸 (3,4-AHBA) が GriI, GriH という二つの酵素によって、シキミ酸経路とは全く異なる経路で生合成されることが明らかにされた。この実験の際には、 $[2-^{13}\text{C}]$  及び  $[4-^{13}\text{C}]$  アスパラギン酸、 $[3-^{13}\text{C}]$  ピルビン酸、 $[1-^{13}\text{C}]$ 、 $[2-^{13}\text{C}]$  並びに  $[6-^{13}\text{C}]$  グルコースの取込み実験を個別に行い、3,4-AHBA のどの位置に取込まれたか詳細に調べることで、図5の経路が確立された。3,4-AHBA は機能性ポリマーの合成原料として有用な化合物であり、前述した 4HBA と同様、工業原料の脱石油化という観点からも注目されている。

### 3. 環境汚染物質の分解・変換経路の解析

石油流出事故や工場などから環境中に放出された汚染物質を微生物によって除去しようという試みはアメリカで 1980 年代頃から非常に盛んになり、汚染物質を分解する微生物のスクリーニングと共に分解過程の解明が放射性同位体や安定同位体を用いて精力的に行われてきた。石油分解の場合、ベンゼンやナフタレンなどの芳香族化合物の分解を中心に解析が進み、第一段階はどれも酸素の挿入による芳香族環の開裂であった。MBI でもこれまでに多くの石油分解菌を分離同定してきている<sup>3), 11)</sup>。

石油は多種類の芳香族/脂肪族炭化水素の混合物なので、そのなかのどれか単一の化合物に焦点をあてて分解菌を分離後、経路を解明することがよく行われた。その中のひとつフェナンスレン (Phe) の分解経路には、サリチル酸 (Sal) 経路と *o*-フタル酸 (OPA) 経路の 2 種が知られており、途中の 1-ヒドロキシ-2-ナフタレン酸 (1H2NA) から分岐されて、どちらかの経路をたどって最終的には二酸化炭素と水に分解される<sup>12), 13)</sup>。しかし、途中経路で詳細が明らかになっていない部分があり、筆者らは海浜砂から分離した Phe 分解菌 *Nocardioide* sp. KP7<sup>14)</sup> を用いてそれらの解明を試みた。KP7 株は Phe を OPA 経路で分解することがわかったので、その 1H2NA からの分解過程の第一段階である 1H2NA 酸素添加酵素 (HNAO) を精製、生化学的性状を明らかにするとともに、HNAO 遺伝子も単離した<sup>15)-17)</sup>。1H2NA が

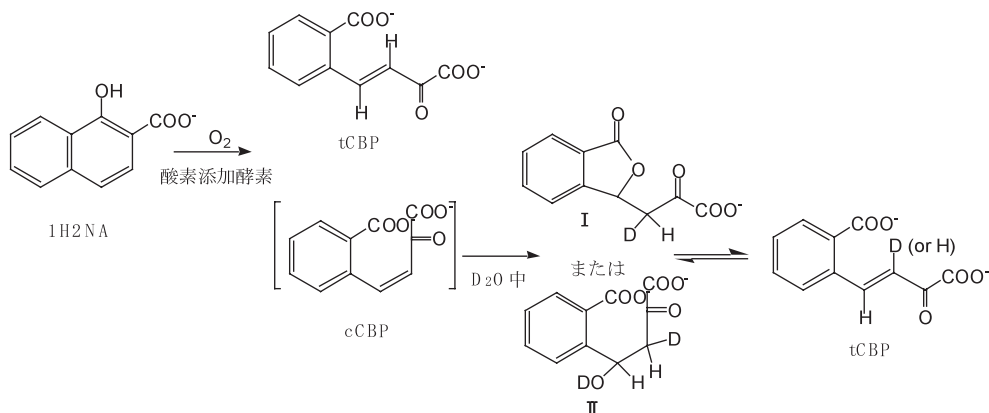


図6 1H2NAの開環反応で推定される二つの産物と化学反応

HNAOにより環開裂を受けるだけならば、反応生成物はシス-2'-カルボキシベンザルピルビン酸 (cCBP) と考えられていたが (図6), まだ実際には確認されていなかった<sup>18)</sup>。そこで, 筆者らは大腸菌で発現させたHNAOを用いて, 1H2NAとの反応過程をNMRで解析した。

最初に, これまで行われてきた反応産物の解析と同様, 基質である1H2NAとHNAO酵素の反応溶液から弱酸性条件で有機溶媒抽出<sup>18)</sup>, HPLC精製後NMR解析を行ったところ, 図6に示した化合物Iが確認された。これは精製過程で弱酸性条件にしたためと考え, 1H2NAとHNAO酵素を重水 (99.9%  $D_2O$ ) で作製した緩衝溶液に溶解しNMR管内で反応させ, 反応産物の経時変化を $^1H$ -NMRで直接観察することを試みた。その結果, 反応産物はトランス-2'-カルボキシベンザルピルビン酸 (tCBP) 単一であることが明らかとなった。しかも, 3位の水素が重水素に置換した際に見られる, 図7に示したH-3とH-4のピークシグナル変化は, 全く観測されなかった。もし, 開裂反応の最初の産物がcCBPで化学的反應を経てtCBPになったとしたら3位の水素が重水素に置換されているはずであるが (図6), それが見られなかったことから, HNAO酵素反応産物はtCBPであることを本実験で初めて証明した<sup>19)</sup>。このように, 反応産物中の重水素の置換を見ることで反応経路の推定が可能である。

#### 4. Stable Isotope Probing (SIP)

1980年代以降の分子微生物生態学や分子生物学の発展により, 環境中の微生物の全体像や個々の微生物/酵素による環境汚染物質の分解過程が徐々に明らかになってきたのは, 上述したとおりである。しかし, 例えば石油汚染現場に生息する微生物群集のなかで検出されたDNA断片を持つ微生物が石油中に含まれるどの有機化合物を実際に分解できるかが, 分子微生物生態学的手法では直接的に証明できなかった。この問題を解決するために開発されたのが, Stable Isotope Probing (SIP) である<sup>20)</sup>。なかでもRNA-based SIP (RNA-SIP) 法<sup>21)</sup>は最も新しい方法で, 原理は以下のとおりである (図8参照)。 $^{13}C$ で標識された有機化合物をある微生物が分解・資化すれば, その微生物のrRNAも $^{13}C$ で標識されるが, 資化できない微生物のrRNAには $^{13}C$ が取り込まれない。微生物群集全体より抽出した全rRNAから資化菌由来の $^{13}C$ -rRNAを, 非資化菌の $^{12}C$ -rRNAと比重の違いに基づいて遠心分離により分画する。この $^{13}C$ -rRNAの配列を解析することで資化機能を担う微生物の属種を同定することができる。rRNAに代わってrDNAでも全く同じ原理で, 同様のことが可能である。

MBIでは, 石油備蓄基地の周辺のような, ベンゼン等石油系炭化水素で汚染された環境を

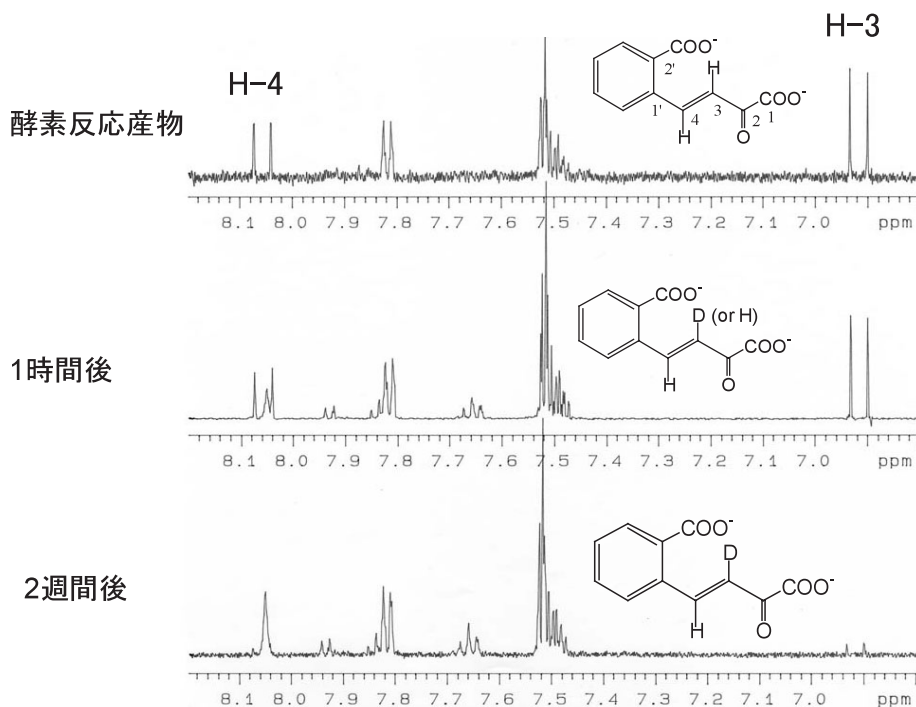


図7 酵素反応後弱酸性で抽出して得た化合物IのpH 7.5-D<sub>2</sub>O溶液中での経時変化

浄化する分解菌に関する研究も行ってきた<sup>22), 23)</sup>。近年は、海洋などのオープンな環境に比べて研究が遅れていた土壌や地下水中での嫌氣的石油分解に関する研究が注目を集めている。ベンゼンについては、環境サンプルや集積培養物を使用した実験で嫌氣的に分解されているのが確認されているにもかかわらず、今までに嫌気性ベンゼン分解菌は1株しか単離されていない。MBIでも、様々な環境サンプルを用いて集積培養法により嫌気性ベンゼン分解菌の単離を試みてきたが、単離にいたらなかった。そこで、はじめに環境中で嫌気ベンゼン分解に関与している細菌をSIP法により16S rDNA塩基配列情報として特定した後、同情報を持つ細菌を非選択的に単離する（集積培養しない）方法を試みることにした<sup>24)</sup>。

ガソリン汚染地域より採取した地下水に栄養塩（リン、窒素）、電子受容体（硝酸、硫酸イオン等）及び[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]ベンゼンを添加して培養し、ベンゼンの分解が観察された地下水の細菌から

rRNAを抽出した。密度勾配遠心分離した“重いrRNA”(<sup>13</sup>C-rRNA)を逆転写PCRにかけ、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)で細菌叢を解析した結果、*Betaproteobacteria*に属する*Azoarcus*属細菌がベンゼン分解に関与していることが示唆された。次に、*Betaproteobacteria*の増殖に適した非選択的有機培地プレートに地下水を塗布し、その上に形成するコロニーをDGGEスクリーニングすることで上記*Azoarcus*属細菌群を単離した。それらの嫌氣的ベンゼン分解活性の解析は、放射性同位体<sup>14</sup>C標識ベンゼンを基質として与え、微生物の分解によって生成される<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>を測定して確かめることができ、SIP法の有用性を実証できた。

SIP法は、他にも酢酸資化菌<sup>25)</sup>、ピレン<sup>26)</sup>、フェノール<sup>21)</sup>、セルロース<sup>27)</sup>、in vitroのモデル系ではあるがヒト腸内のグルコース摂取細菌<sup>28)</sup>の同定にも使用され、便利な手法として広く利用されつつある。

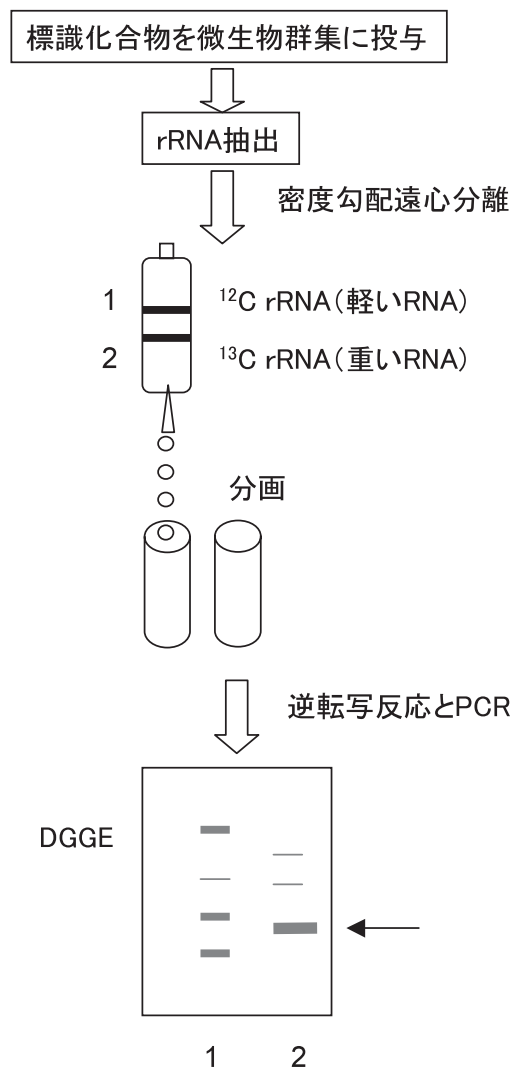


図8 RNA-SIP  
2のレーンが $^{13}\text{C}$  標識化合物を分解した微生物のrDNA断片  
特に矢印のバンドに由来する微生物は主要な分解菌と考えられる

## 5. おわりに

安定同位体は、微生物の物質代謝機能を探る上での重要なツールであることは現在でも疑う余地がない。1990年代以降、分子微生物学やバイオテクノロジー技術が目覚ましく発展してきたなかでも、安定同位体による解析技術の基礎が研究の進展の鍵となり、これらの分野の中

から新たなSIPという技術も生まれてきた。

一方、安定同位体による物質の生成や分解経路の探索は、目的毎にどのような標識化合物を使用するのが適切か選ぶことが重要な問題であろう。また、生合成で残されている最も興味深い課題は、カイメン等海洋無脊椎生物が有する医薬ソースとして重要な天然物の真の生産者を確かめることである。それらは、海洋無脊椎生物に共生している微生物であろうとずっと考えられてきたが、海洋無脊椎生物の飼育や共生微生物の分離培養が難しいことが研究の進展を阻んでいた。これらの技術が確立した際には、安定同位体の出番となることであろう。

微生物機能を遺伝子と関連づけ代謝のより詳細なメカニズムを解析するために、従来の安定同位体標識化合物を用いた代謝フラックス解析と近年著しく発達してきたメタボローム解析を統合して結果を考察しようという試みもなされている。

紹介したMBIにおける研究成果は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)から委託されたプロジェクト「高機能化学製品等製造法(海洋生物活用)の研究開発」、「複合生物系等生物資源利用技術開発」、「生物機能を活用した生産プロセスの基盤技術開発」、「ゲノム情報に基づいた未知微生物遺伝資源ライブラリーの構築」、「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術開発」のもとに行われた。

## 文 献

- 1) Hill, A. M., The biosynthesis, molecular genetics and enzymology of the polyketide-derived metabolites, *Nat. Prod. Rep.*, **23**, 256-320 (2006)
- 2) 海野 肇, 岡畑恵雄, 編, グリーンバイオテクノロジー—持続的社會のための生物工学, 講談社(2002)
- 3) Hara, A., Syutsubo, K. and Harayama, S., *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation, *Environ. Microbiol.*, **5**, 746-753 (2003)

- 4) 加納周雄, 志津里芳一, 足立恭子, 笠井宏朗, 勝田麻津子, 抗菌性化合物およびその製造法, 公開特許公報, 特開 2004-203783
- 5) 瀬戸治男, 天然物化学, pp.8-17, コロナ社 (2006)
- 6) Peng, X., Adachi, K., Chen, C., Kasai, H., Kanoh, K., Shizuri, Y. and Misawa, N., Discovery of a marine bacterium producing 4-hydroxybenzoate and its alkyl esters, parabens, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 5556-5561 (2006)
- 7) Ramos-Gonzalez, M. I., Ben-Bassat, A., Campos, M. J. and Ramos, J. L., Genetic engineering of a highly solvent-tolerant *Pseudomonas putida* strain for biotransformation of toluene to *p*-hydroxybenzoate, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 5120-5127 (2003)
- 8) Nemecek-Marshall, M., Wojciechowski, C., Wagner, W. P. and Fall, R., Acetone formation in the *Vibrio* family: a new pathway for bacterial leucine catabolism, *J. Bacteriol.*, **181**, 7493-7499 (1999)
- 9) Massey, L. K., Conrad, R. S. and Sokatch, J. R., Regulation of leucine catabolism in *Pseudomonas putida*, *J. Bacteriol.*, **118**, 112-120 (1974)
- 10) Suzuki, H., Ohnishi, Y., Furusho, Y., Sakuda, S. and Horinouchi, S., Novel benzene ring biosynthesis from C(3) and C(4) primary metabolites by two enzymes, *J. Biol. Chem.*, **281**, 36944-36951 (2006)
- 11) Kasai, Y., Kishira, H., Syutsubo, K. and Harayama, S., Molecular detection of marine bacterial populations on beaches contaminated by Nakhodka tanker oil-spill accident, *Environ. Microbiol.*, **3**, 1-10 (2001)
- 12) Evans, W. C., Fernley, H. N. and Griffiths, E., Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads, *Biochem. J.*, **95**, 819-831 (1965)
- 13) Kiyohara, H., Nagao, K. and Nomi, R., Degradation of phenanthrene through *o*-phthalate by an *Aeromonas* sp., *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1075-1082 (1976)
- 14) Iwabuchi, T., Yamauchi-Inomata, Y., Katsuta, A. and Harayama, S., Isolation and characterization of marine *Nocardioides* capable of growing and degrading phenanthrene at 42°C, *J. Mar. Biotechnol.*, **6**, 86-90 (1998)
- 15) Iwabuchi, T. and Harayama, S., Biochemical and genetic characterization of 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase, an enzyme involved in phenanthrene degradation by *Nocardioides* sp. strain KP7, *J. Bacteriol.*, **179**, 6488-6494 (1997)
- 16) Iwabuchi, T. and Harayama, S., Biochemical and genetic characterization of trans-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase from a phenanthrene-degrading *Nocardioides* strain, *J. Bacteriol.*, **180**, 945-949 (1998)
- 17) Iwabuchi, T. and Harayama, S., Biochemical and molecular characterization of 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7, *J. Biol. Chem.*, **273**, 8332-8336 (1998)
- 18) Barnsley, E. A., Phthalate pathway of phenanthrene metabolism: formation of 2'-carboxybenzalpyruvate, *J. Bacteriol.*, **154**, 113-117 (1983)
- 19) Adachi, K., Iwabuchi, T., Sano, H. and Harayama, S., Structure of the ring cleavage product of 1-hydroxy-2-naphthoate, an intermediate of the phenanthrene-degradative pathway of *Nocardioides* sp. strain KP7, *J. Bacteriol.*, **181**, 757-638 (1999)
- 20) Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R. and Murrell, J. C., Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology, *Nature*, **403**, 646-649 (2000)
- 21) Manefield, M., Whiteley, A. S., Griffiths, R. I. and Bailey, M., RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5367-5373 (2002)
- 22) Kasai, Y., Takahata, Y., Hoaki, T. and Watanabe, K., Physiological and molecular characterization of a microbial community established in unsaturated, petroleum-contaminated soil, *Environ. Microbiol.*, **7**, 806-818 (2005)
- 23) Watanabe, K., Watanabe, K., Kodama, Y., Syutsubo, K. and Harayama, S., Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4803-4809 (2000)
- 24) Kasai, Y., Takahata, Y., Manefield, M. and Watanabe, K., RNA-based stable isotope probing

- and isolation of anaerobic benzene-degrading bacteria from gasoline-contaminated groundwater, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 3586-3592 (2006)
- 25) Schwarz, J. I., Lueders, T., Eckert, W. and Conrad, R., Identification of acetate-utilizing Bacteria and Archaea in methanogenic profundal sediments of Lake Kinneret (Israel) by stable isotope probing of rRNA, *Environ. Microbiol.*, **9**, 223-237 (2007)
- 26) Singleton, D. R., Sangaiah, R., Gold, A., Ball, L.M. and Aitken, M. D., Identification and quantification of uncultivated *Proteobacteria* associated with pyrene degradation in a bioreactor treating PAH-contaminated soil, *Environ. Microbiol.*, **8**, 1736-1745 (2006)
- 27) Haichar, F., Achouak, W., Christen, R., Heulin, T., Marol, C., Marais, M. F., Mougél, C., Ranjard, L., Balesdent, J. and Berge, O., Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing, *Environ. Microbiol.*, **9**, 625-634 (2007)
- 28) Egert, M., de Graaf, A. A., Maathuis, A., de Waard, P., Plugge, C. M., Smidt, H., Deutz, N. E., Dijkema, C., de Vos, W. M. and Venema, K., Identification of glucose-fermenting bacteria present in an in vitro model of the human intestine by RNA-stable isotope probing, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **60**, 126-135 (2007)
-