

汚染物質分解コンソーシアムにおけるキープレイヤーとオーディエンス

Interaction of Key Player and Audience in Pollutants-Degrading Consortia

加藤 広海*, 小川なつみ, 津田 雅孝, 永田 裕二
HIROMI KATO, NATSUMI OGAWA, MASATAKA TSUDA and YUJI NAGATA

東北大学大学院生命科学研究科微生物進化機能開発講座 〒980-8577 仙台市青葉区片平 2-1-1 東北大学大学院生命科学研究科本館 307

* TEL: 022-217-6227

* E-mail: katee@ige.tohoku.ac.jp

Laboratory of Microbial Evolution and Function Research, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-1-1, Katahira Sendai, Miyagi 980-8577, Japan

キーワード: バイオレメディエーション, コンソーシアム, 非分解菌, 土壌, 細胞密度

Key words: bioremediation, consortium, non-degrading bacteria, soil, cell density

(原稿受付 2018年4月6日/原稿受理 2018年4月25日)

1. はじめに

たった1gの土壌でもそこに棲息する微生物の種類は数千種以上と言われており、このような莫大な多様性を持った微生物コミュニティには、硝化菌や脱窒菌などの物質循環を担う微生物や、難分解性の環境汚染物質の分解微生物など、様々な役割を持つ微生物が含まれている。また各役割を担う微生物は単体として独立に機能するのではなく、共存する微生物間で互いに関わり合いながら機能を発揮していると考えられる。そこで我々は、環境変動を受けた土壌細菌叢の総体としての反応を理解する目的で、人工的に芳香族化合物で汚染した土壌のメタゲノム解析を実施してきた。その結果、汚染物質の分解菌は優占せず、分解に直接関与しない非分解菌が菌叢内で優占していたことを見出してきた⁶⁾。例えば汚染物質として土壌に添加したPhenanthrene (Phn)が分解された時期のメタゲノム解析では、ショットガンメタゲノムリード11,331,760本のうち、Phnの初発酸化反応を担うPhn dioxygenase large subunitの遺伝子断片リードはわずか89本であった。またそれら遺伝子断片の由来菌である*Mycobacterium*属は、細菌叢全体の1%程度しか存在しなかった。またメタゲノム解析では*Mycobacterium*属以外にも250を超える細菌属が検出されたが、その多くが汚染による増減がほとんど見られない、いわば環境変動に対して「サイレント」なレスポンスであった。このような結果から、「数的にマイナーな分解菌(キープレイヤー)に対して、直接的には分解に関与しない大多数の優占菌(オーディエンス)が本当にサイレントな存在なのか、あるいは何らかのポジティブな応答があるのか」という新たな疑問が生まれた。このような問いに、培養を介さないメタゲノム的アプローチ

だけで答えるのは難しい。そこで我々は集積培養を介して取得した汚染物質の分解細菌コンソーシアムを対象とすることで、メタゲノム解析で提起された問題(キープレイヤーとオーディエンスという細菌叢構造にどのような利点があるのか、どのようなメカニズムによってそれが成立し得るのか)を実験的に検証することにした。

本稿では、*Burkholderiaceae*を非分解菌とする2つの分解コンソーシアム(2種以上のメンバーから成る複合微生物系)について明らかになったことを紹介する。分解菌*Mycobacterium*と非分解菌*Burkholderia*を含むPhn分解コンソーシアムでは、Phnによって起きる分解菌の生育阻害が非分解菌の存在によって緩和され、また分解菌*Sphingobium*と非分解菌*Cupriavidus*を含む γ -hexachlorocyclohexane (HCH)分解コンソーシアムでは、寒天培地上の分解菌のコロニーに対して非分解菌が方向性を持ってコロニー成長することで、積極的にコンソーシアムを形成し得ることがわかった。これらの現象を通して、コンソーシアムのキープレイヤーと周囲のオーディエンスがどのように相互作用するのかを紹介する。

2. Phn分解菌の生育阻害と非分解菌による阻害緩和効果

上記の芳香族化合物による汚染土壌を接種源としてPhnで集積培養を行った結果、Phnを重層した無機塩寒天培地でクリアゾーンを形成するコロニーMixEPa4を取得した。MixEPa4は黄色のシングルコロニーを形成するが、16S rRNA遺伝子解析では*Mycobacterium*属、*Burkholderia*属を含む複数の*Proteobacteria*を構成員とするコンソーシアムであることが明らかとなった^{7,17)}。実際にMixEPa4を栄養寒天培地に接種すると様々な形態のコロニーが観察され、それらシングルコロニーの

純粋分離の結果, *Mycobacterium* sp. EPa45 株および *Burkholderia* sp. Bcrs1W 株を始め複数の *Proteobacteria* 株が取得された。得られた株のうち EPa45 株のみが単独培養で Phn 分解活性を示し, また Phn 培地上において MixEPa4 と同様のクリアゾーンとコロニー形態を示した。また EPa45 株の完全ゲノム配列を決定したところ, 既知の Phn 分解菌 *M. vanbaalenii* PYR-1 と同性的のあるフェナントレン完全代謝経路を有していることがわかった⁷⁾。ところがコンソーシアム MixEPa4 では, EPa45 株は分解菌であるにも関わらず単独優占種にならず, 安定的に非分解菌の *Proteobacteria* が同等あるいはそれ以上の割合で存在した。よって, このような菌叢構造は, 上記汚染土壌における「キープレイヤーとオーディエンス」の問題を考える上でモデルケースとして捉えることができよう。

先に述べた通り, 分解菌 EPa45 株は単独培養でも Phn を分解できるが, 初期接種密度が低い場合は分解活性が極めて不安定になることがわかっている。汚染物質の微生物分解の研究分野では, 初期接種密度と分解活性の安定性の間に何らかの関係があることは経験的によく知られている。我々はこの「分解が不安定になる菌密度」に焦点を当てて, より詳細な実験を行うことにした。EPa45 株の細胞懸濁液の段階希釈液を Phn を含まない無機塩寒天培地にスポットすると, 希釈率に応じたコロニー形成が確認された (図 1)。EPa45 株は菌体内に残存した炭素源もしくは無機塩寒天培地に含まれる微量炭素源を利用してわずかに増殖することでコロニーを形成できると思われる。一方, Phn 含有無機塩寒天培地 (Phn 培地) に細胞懸濁液をスポットすると, 10 倍希釈までは Phn 分解・資化による明瞭なコロニー形成が見

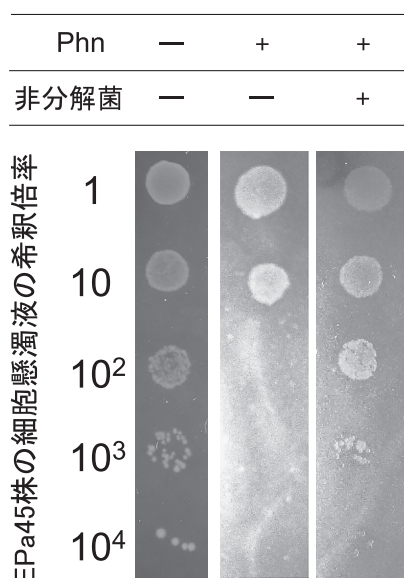


図 1. Phn 分解菌 *Mycobacterium* sp. EPa45 株の Phn による生育阻害と非分解菌 *Burkholderia* sp. Bcrs1W 株による緩和効果。

EPa45 株の細胞懸濁液の段階希釈液を無機塩寒天培地 (左), Phn 含有無機塩寒天培地 (中) にスポットした。(右) EPa45 株の段階希釈液を Bcrs1W 株の細胞懸濁液 (一定濃度) と合わせて Phn 含有無機塩寒天培地にスポットした。見えているコロニーは EPa45 株のコロニー。

られるのに対し, 10^2 倍希釈のスポットから急激にコロニー形成が阻害された (図 1)。これは EPa45 株が Phn 分解能を有すると同時に Phn によって生育阻害を受けることを意味している。EPa45 株の初期接種密度が低いと Phn 分解活性が不安定になるのは, この EPa45 株の密度依存的な生育阻害と関連していると考えられる。

Phn 分解コンソーシアム MixEPa4 では非分解菌が優占していたことを考慮して, 様々な割合で EPa45 株と非分解菌 Bcrs1W 株を混合して Phn 培地にスポットした。その結果, 非分解菌が十分な密度で存在すれば, EPa45 株自身の菌密度が低い場合でもコロニー形成できることがわかった (図 1)。このような非分解菌による生育阻害の緩和効果は, MixEPa4 の構造的利点の一つと捉えることができる。非分解菌と分解菌を別々にスポットしたり, 非分解菌の培養上清や死細胞を混合しても, Phn による分解菌の生育阻害を緩和できないことから, 両細胞が接していることが重要であると予想された。

これまでの結果から浮き出てきた「細胞密度」と「接触」というキーワードから, 本現象を確率的現象としてシミュレーションした。先に述べた通り EPa45 株は Bcrs1W 株との共培養でなくとも, 高密度であれば単独培養でも生育阻害は見られない。このことから, 「EPa45 株は寒天培地上で他の細胞と接触していないと Phn による生育阻害を受ける」と仮定した。 1 mm^2 の平面上に n 個の EPa45 株の細胞 ($1 \mu\text{m}^2$ とする) を配置した時に細胞同士が接触せずに Phn による生育阻害を受ける確率を求める。ここでは単純化して, 1 mm^2 の平面を縦横 $1 \mu\text{m}$ のマス目に分けた時に (合計 10^6 個のマス目), n 個の細胞全てが違うマス目に配置される確率 ($10^6 \text{Pn}/10^{6 \times n}$) として計算した (図 2)。 $100 \text{ cells}/\text{mm}^2$ 以下ではほぼ 100% の確率で細胞同士が接触しないが, $1,000 \text{ cells}/\text{mm}^2$ 前後から急激に確率が低下し始め, $3,000 \text{ cells}/\text{mm}^2$ 以上ではほぼ 0% になる (ほぼ 100% の確率で細胞が接触するマス目が生じる)。では実際のケースではどうだろうか。Phn 培地における EPa45 株単独のコロニー形成率は 10^2 倍を境に急激に低下した (図 1)。無機塩培地のスポット内コロニー数から細胞密度を概算してみると, 生育阻害が起きない 10 倍希釈の密度は約 $240 \text{ CFU (Colony Forming Unit)}/\text{mm}^2$ であった。CFU が全菌数よりも小さいことを考慮すれば, 「細胞が接触しない確率 (阻害を受ける確率)」が低下し始める密度と概ね同レベルと考えられる。また 10 倍希釈の液滴を寒天培地全体にプレートアウトすると, 細胞密度が低下してコロニー形成が阻害されることがわかった。非分解菌との共培養で EPa45 株が希釈率に応じたコロニー形成が起きたのは, EPa45 株自身の密度は低くても, 非分解菌を合わせた全体として細胞密度が高ければ生育阻害が緩和されたためだと解釈できる。もちろんこれらの議論はシミュレーションに過ぎず, 実際に細胞同士がダイレクトに接触する必要があるのか, あるいは一定範囲内であれば距離があっても問題ないのか, 今後顕微鏡レベルでの詳細な解析が必要である。しかしこれまでの結果を鑑みるに, 生育阻害ならびにその緩和効果に細胞密度とそれに付随する確率的な現象が介在した可能性は高いだろう。

MixEPa4 には Bcrs1W 株以外に *Bordetella* 属や *Dyella*

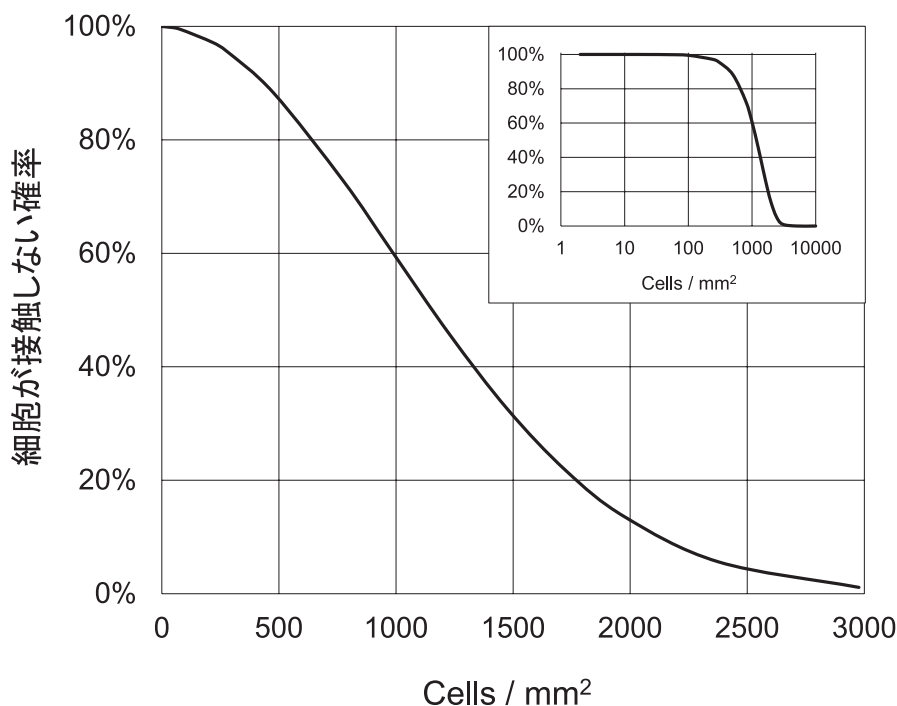


図2. 様々な細胞密度の EPa45 株を寒天培地にスポットした際に、培地表面で細胞が接触しない確率。

属など、異なる family や class の *Proteobacteria* の非分解菌株も取得されている。これらの分離株についても程度の差こそあれ、Bcrs1W 株と同様の緩和効果が認められた。さらに全く分離源の異なる大腸菌についても明確な緩和効果が確認された。よって非分解菌による生育阻害の緩和は、限られた株との特異的な関係性というよりは、特定の細菌群に限定されない緩い関係性において発揮されるように思われる。このような緩い関係性は、土壤環境が短期的に汚染された際に重要であろう。初期状態の土壤では分解菌の存在量は極めて低密度であり、そのキープレイヤーが機能を発揮しようとする時に、周囲のメジャーなオーディエンスがどのような細菌群であるかはその時の環境条件による。先行研究である汚染土壤の 16S rRNA 遺伝子の次世代シーケンス解析でも、初期状態の土壤で *Mycobacterium* 属は細菌叢全体の 0.05% しか存在せず、また優占している細菌群は経時的に変化し続けた⁹。このような条件においては、幅広い細菌間で成り立つ緩い関係性の方が有効に働く可能性が高い。

では非分解菌による生育阻害緩和はどのようなメカニズムによって起きるであろうか。これまでも複合微生物系を対象としたバイオレメディエーションの研究は数多く存在する^{8,14}。分解促進のメカニズムを分子レベルで明らかにした例はまだ少ないのが現状であるが、例えば共生菌によるデッドエンドな中間代謝産物の分解や、バイオサーファクタントの生産、分解に伴う酸化ストレスの低減などが知られている¹⁴。今回の EPa45 株の生育阻害が細胞密度依存的であることを考慮すると、*Pseudomonas* 等で報告がある芳香族化合物分解遺伝子の Quorum sensing を介した発現制御¹⁾も疑う必要があるだろう。現在、EPa45 株および *Burkholderia* 株のトランスクリプトーム解析や遺伝子破壊株を用いた遺伝学レベルの解析を進めており、今後の実験により、EPa45

株の分解遺伝子の発現制御や生育阻害、また非分解菌による緩和効果の分子メカニズムが明らかになることが期待される。

3. HCH 分解菌への非分解菌のコロニー接近現象

ここまでは多環芳香族化合物であるフェナントレン分解コンソーシアムを紹介してきた。多環芳香族化合物は汚染歴のない土壤では微生物分解に数週間以上要することもあるので難分解性の化合物と言えなくもないが、そもそも自然由来の化合物（主な起源は生体や化石燃料の燃焼）²⁵であるために、環境中から比較的容易に分解細菌を分離することができ、それら分解菌は長い進化の過程で高度に組織化された代謝系を有していることが多い⁴。ここでは環境中での微生物分解性が極めて低い有機塩素系殺虫剤 HCH の分解コンソーシアムを紹介する。HCH は 1825 年に初めて人工的に合成され、1942 年に γ 異性体である γ -HCH の殺虫剤活性が発見されて以降、様々な国の土壤環境に使用されてきた^{10,11}。環境中での高い残留性や生体への毒性が指摘され、1990 年代には多くの国で使用が中止されているが、未だに環境汚染物質として大きな問題になっている。このような背景から、微生物が HCH と出会ってから数十年しか経過しておらず、その分解遺伝子は現在進行形で進化の途中にあると考えられている²²。よって、HCH 分解菌ならびにその分解コンソーシアムは、どのように HCH 代謝系や共生系が構築されるのか、その最初のステップを見るのに適した研究対象だと言える。

HCH 分解菌はこれまで世界各地で取得されており、特に sphingomonads においては酵素・遺伝子・ゲノムレベルで研究が進められている^{22,24}。しかし HCH 分解コンソーシアムの研究については、好気的環境では汚染土

壤や分解コンソーシアムの系統学的解析を行った研究や^{3,15,16,18)}、機能遺伝子の解析を含めたものは汚染土壌のメタゲノム研究等が報告されているだけである^{2,9,13,19,21)}。我々は国内の HCH 汚染汚泥を接種源として HCH のみを炭素源とした集積培養を行うことで、安定的に分解活性を示すコンソーシアム EB2 を取得した。EB2 からは HCH 分解・資化能を有する *Sphingobium* sp. TKS 株と、それら能力を示さない *Cupriavidus* sp. TKC 株や *Pseudomonas* sp. TKP 株が純粋分離された。TKS 株は完全ゲノム配列が決定されており、11 個のレプリコンを有する複雑なゲノム構造や、既知の HCH 分解遺伝子と相同性が極めて高い遺伝子セットを保持していることがわかっている²²⁾。EB2 を対象にしたメタゲノム解析では HCH 代謝経路の各遺伝子が見つかるが、分解に重要な上流代謝遺伝子は全て *Sphingobium* 属タイプに由来することから、EB2 は TKS 株をメインの分解菌とするコンソーシアムであると考えられる。しかしながら、同メタゲノム解析による菌叢構造は *Sphingobium* 属で単独優勢しておらず、*Cupriavidus* 属が同程度以上の割合で存在していることがわかった (図 3)。このような分解菌 sphingomonads と非分解菌 *Proteobacteria* から構成されるコンソーシアムは、インドの汚染土壌を由来とする HCH 分解コンソーシアムからも取得されており、何らかの構造的利点があるのではないかと予想している。

上記の通り TKS 株は単独で HCH を分解・資化できるものの、分解活性は非常に不安定である。HCH のみを炭素源とした無機塩寒天培地においても、中間代謝産物が蓄積したと思われる褐色の小さいコロニーが形成される。しかしながら TKS 株は単独培養ではなく、コンソーシアムの状態で接種すると褐色化せずに不定形の大きなコロニーが形成される。そこで我々は寒天培地上のコロニーという状態に注目し、様々な条件において分解

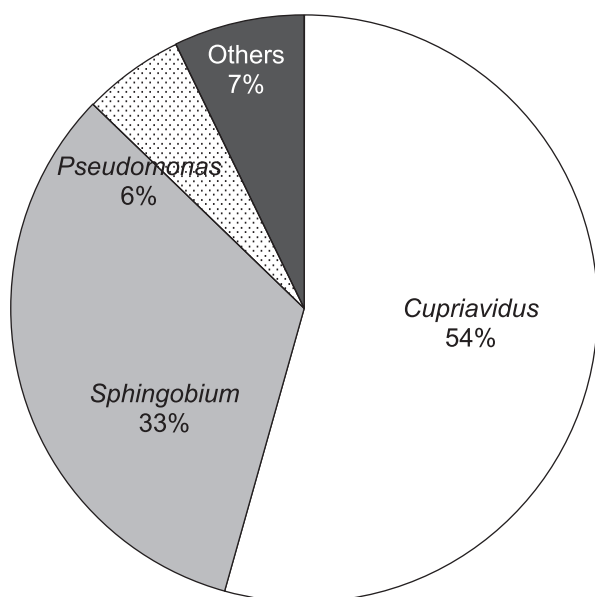


図 3. HCH 分解コンソーシアム EB2 の菌叢解析。EB2 のショットガンメタゲノムリードにおける 16S rRNA 遺伝子リードの集計。

菌と非分解菌のコロニーの状態を比較した。その結果、EB2 において最大優勢種であった *Cupriavidus* sp. TKC 株は無機塩寒天培地や栄養を抑えた R2A 寒天培地等でコロニー辺縁部が樹状に伸びる性質があり、周囲に TKS 株のコロニーが存在する場合は、その TKS コロニーに向かって辺縁部が方向性を持って成長するという現象を発見した (図 4a)。またさらに培養を続けると、TKC 株に周囲を囲まれた TKS 株のコロニーが拡大することがわかった (図 4b)。本現象と EB2 の不定形コロニーとの間に直接的な関係があるかはわからないが、少なくとも TKC 株が TKS 株の固体表面上での生育範囲拡大に寄与し得る現象として注目に値するだろう。

このような固体表面におけるコロニー辺縁部の拡大成長は、TKC 株の近縁種である *C. metallidurans* CH34 の swarming や twitching、また他の細菌への接近ならば粘液細菌の *Myxobacterium* の gliding など、様々な細菌種において広く知られる現象である^{5,20)}。現在のところ TKC 株の方向性コロニー成長がどの移動形式に帰属されるかは判明していないが、コロニー成長に数日から 1 週間程度を要することから、細胞分裂を基本とする移動性ではないかと考えている。また本株が *Cupriavidus* 属であることを考慮すると、この属の type species との関連性は特筆すべきものがある。この属は 1987 年に Casida らの研究グループによって提唱され、「a non-obligate bacterial predator of bacteria in soil」として *Cupriavidus*

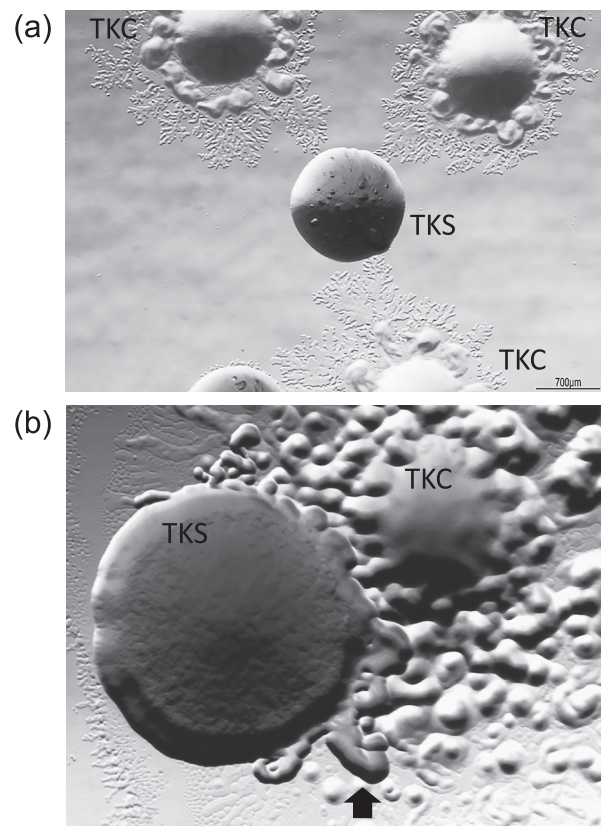


図 4. R2A 寒天培地における非分解菌 *Cupriavidus* sp. TKC 株の方向性コロニー成長。(a) TKC 株のコロニー辺縁部が HCH 分解菌 *Sphingobium* sp. TKS 株に接近する様子。(b) TKC 株に囲まれた後に観察される TKS 株の二次的なコロニー成長 (矢印部分)。

(lover of copper) *necator* (slayer) N-1 株が報告されている¹²⁾。N-1 株は様々な細菌の捕食を行うが、一部の被食細菌はその溶菌作用が刺激となって二次的な成長を起すことが知られている¹²⁾。TKC 株による TKS 株の溶菌作用は観察されてはいないものの、TKS 株への接近とそれに続く TKS 株の二次的成長は興味深い共通点と言えよう。

この TKC 株の方向性コロニー成長が TKS 株以外の細菌も対象とし得るのか調べた結果、同属の *Sphingobium* 属以外に *Sphingomonas* 属、*Novosphingobium* 属および *Sphingopyxis* 属の株に接近する一方で、大腸菌には接近しないことが明らかとなった。よって TKC 株は何らかの機構により *sphingomonads* を認識して接近している可能性が高い。しかし *Sphingopyxis* 属には低分子の生育因子を生産することで、他の細菌株の生育を促進することが知られており²³⁾、今後は TKC 株と *sphingomonads* の両面から方向性コロニー成長のメカニズムを追求することで、異種間のコンソーシアムが形成される初期段階のプロセスが明らかになるだろう。

4. おわりに

本稿では汚染物質分解コンソーシアムにおける分解菌と非分解菌の関係性として、Phn と HCH の分解コンソーシアムを紹介した。どちらのコンソーシアムにおいてもキープレイヤーである分解菌は菌叢の単独優占種にならず、非分解菌が同等もしくはそれ以上の割合で存在していた。筆者らは分解能力を持たない大多数のオーディエンスが、どのような役割を担い得るのかに焦点を絞り研究を進めてきた。その中で明らかにできた現象である Phn 分解コンソーシアムにおける生育阻害緩和、および HCH 分解コンソーシアムにおける方向性コロニー成長は、どちらも固体培地上での現象である。現象を定量的かつ多角的に解析するには、系内の均質性が高い液体培養を用いた実験が有利であるが、固体培地には気相と固相の境界面が存在する点で土壌の微小環境と類似するとも言える。将来的には本コンソーシアムで明らかになった両者の関係性が、土壌環境においてどのように働き得るのかを追求していきたいと考えている。

謝 辞

本研究は、文科省科研費新学術領域「ゲノム支援」、日本学術振興会の科学研究費補助金、公益財団法人発酵研究所からの助成を受けた。また研究に携わって頂いた多くの関係者の皆様に謝意を表します。

文 献

- 1) Diaz, E., J.I. Jimenez, and J. Nogales. 2013. Aerobic degradation of aromatic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24: 431–442.
- 2) Fang, H., L. Cai, Y. Yang, F. Ju, X.D. Li, Y.L. Yu, and T. Zhang. 2014. Metagenomic analysis reveals potential biodegradation pathways of persistent pesticides in freshwater and marine sediments. *Sci. Total Environ.* 470: 983–992.

- 3) Gebreil, A.S. and W.R. Abraham. 2016. Diversity and Activity of Bacterial Biofilm Communities Growing on Hexachlorocyclohexane. *Water Air Soil Poll.* 227: 295.
- 4) Habe, H. and T. Omori. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 225–243.
- 5) Jarrell, K.F. and M.J. McBride. 2008. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 466–476.
- 6) Kato, H., H. Mori, F. Maruyama, A. Toyoda, K. Oshima, R. Endo, G. Fuchu, M. Miyakoshi, A. Dozono, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, M. Hattori, A. Fujiyama, K. Kurokawa, and M. Tsuda. 2015. Time-series metagenomic analysis reveals robustness of soil microbiome against chemical disturbance. *DNA Res.* 22: 413–424.
- 7) Kato, H., N. Ogawa, Y. Ohtsubo, K. Oshima, A. Toyoda, H. Mori, Y. Nagata, K. Kurokawa, M. Hattori, A. Fujiyama, and M. Tsuda. 2015. Complete genome sequence of a phenanthrene degrader, *Mycobacterium* sp. strain EPA45 (NBRC 110737), isolated from a phenanthrene-degrading consortium. *Genome Announc.* 3: e00782-15.
- 8) Knackmuss, H.J. 1996. Basic knowledge and perspectives of bioelimination of xenobiotic compounds. *J. Biotechnol.* 51: 287–295.
- 9) Laquitaine, L., A. Durimel, L.F. de Alencastro, C. Jean-Marius, O. Gros, and S. Gaspard. 2016. Biodegradability of HCH in agricultural soils from Guadeloupe (French West Indies): Identification of the *lin* genes involved in the HCH degradation pathway. *Environ Sci Pollut R.* 23: 120–127.
- 10) Li, Y.F. 1999. Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: From 1948 to 1997. *Sci. Total Environ.* 232: 121–158.
- 11) Li, Y.F., M.T. Scholtz, and B.J. Van Heyst. 2003. Global gridded emission inventories of β -hexachlorocyclohexane. *Environ. Sci. Technol.* 37: 3493–3498.
- 12) Makkar, N.S. and L.E. Casida. 1987. *Cupriavidus-Necator* Gen-Nov, Sp-Nov—a Nonobligate Bacterial Predator of Bacteria in Soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 323–326.
- 13) Manickam, N., A. Pathak, H.S. Saini, S. Mayilraj, and R. Shanker. 2010. Metabolic profiles and phylogenetic diversity of microbial communities from chlorinated pesticides contaminated sites of different geographical habitats of India. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1458–1468.
- 14) Mikeskova, H., C. Novotny, and K. Svobodova. 2012. Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95: 861–870.
- 15) Mohn, W.W., B. Mertens, J.D. Neufeld, W. Verstraete, and V. de Lorenzo. 2006. Distribution and phylogeny of hexachlorocyclohexane-degrading bacteria in soils from Spain. *Environ. Microbiol.* 8: 60–68.
- 16) Murthy, H.M.R. and H.K. Manonmani. 2007. Aerobic degradation of technical hexachlorocyclohexane by a defined microbial consortium. *J. Hazard. Mater.* 149: 18–25.
- 17) Ohtsubo, Y., S. Nonoyama, N. Ogawa, H. Kato, Y. Nagata, and M. Tsuda. 2016. Complete genome sequence of *Burkholderia caribensis* Bcrs1W (NBRC110739), a strain co-residing with phenanthrene degrader *Mycobacterium* sp EPA45. *J. Biotechnol.* 228: 67–68.
- 18) Polti, M.A., J.D. Aparicio, C.S. Benimeli, and M.J. Amoroso. 2014. Simultaneous bioremediation of Cr(VI) and lindane in soil by actinobacteria. *Int Biodeter Biodegr* 88: 48–55.
- 19) Sangwan, N., P. Lata, V. Dwivedi, A. Singh, N. Niharika, J. Kaur, S. Anand, J. Malhotra, S. Jindal, A. Nigam, D. Lal, A. Dua, A. Saxena, N. Garg, M. Verma, J. Kaur, U. Mukherjee, J.A. Gilbert, S.E. Dowd, R. Raman, P. Khurana, J.P. Khurana, and R. Lal. 2012. Comparative Metagenomic Analysis of Soil Microbial Communities across Three Hexachlorocyclohexane Contamination Levels. *PLoS One* 7.
- 20) Shamim, S., A. Rehman, and M.H. Qazi. 2014. Swimming,

- Swarming, Twitching, and Chemotactic Responses of *Cupriavidus metallidurans* CH34 and *Pseudomonas putida* mt2 in the Presence of Cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66: 407–414.
- 21) Sharma, A., N. Sangwan, V. Negi, P. Kohli, J.P. Khurana, D.L.N. Rao, and R. Lal. 2015. Pan-genome dynamics of *Pseudomonas* gene complements enriched across hexachlorocyclohexane dumpsite. *BMC Genomics* 16: 313.
- 22) Tabata, M., S. Ohhata, Y. Nikawadori, K. Kishida, T. Sato, T. Kawasumi, H. Kato, Y. Ohtsubo, M. Tsuda, and Y. Nagata. 2016. Comparison of the complete genome sequences of four gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterial strains: insights into the evolution of bacteria able to degrade a recalcitrant man-made pesticide. *DNA Res.* 23: 581–599.
- 23) Tanaka, Y., S. Hanada, H. Tamaki, K. Nakamura, and Y. Kamagata. 2005. Isolation and identification of bacterial strains producing diffusible growth factor (s) for *Catellibacterium nectariphilum* strain AST4T. *Microbes Environ.* 20: 110–116.
- 24) Verma, H., R. Kumar, P. Oldach, N. Sangwan, J.P. Khurana, J.A. Gilbert, and R. Lal. 2014. Comparative genomic analysis of nine *Sphingobium* strains: Insights into their evolution and hexachlorocyclohexane (HCH) degradation pathways. *BMC Genomics* 15: 1014.
- 25) Wilcke, W. 2007. Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. *Geoderma* 141: 157–166.