

抗生物質添加培地を用いたコンポストからの好熱菌の分離

矢部修平^{1)*}, 相羽由詞¹⁾, 酒井康輝¹⁾, 葉坂 勝¹⁾, 横田 明²⁾

¹⁾ 株式会社県南衛生工業ハザカプラント研究所 〒989-1311 宮城県柴田郡村田町大字足立字稲荷山 44 番地

²⁾ 東京大学分子細胞生物学研究所バイオリソース研究分野 〒113-0032 東京都文京区弥生 1 丁目 1 番 1 号

コンポストはその生成過程で様々な微生物の代謝熱によって 70-80°C 付近まで上昇する発酵生産物であり、身近な新規好熱菌の探索源でもある。筆者らはカナマイシンなどの抗生物質を含む培地を用いてコンポストから 83 菌株の好熱菌を純粋分離した。それらの菌株の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析の結果、28 菌株は既知種と 88-98% の相同性であった。これらは *Firmicutes* 門, *Actinobacteria* 門, *Proteobacteria* 門, *Bacteroidetes* 門の中で 8 つの独立した系統を形成した。

キーワード：熱菌, コンポスト, クテドノバクテリア

好熱菌は耐熱性酵素や医薬品, 農水産加工, 化学工業, 環境保全などの産業への利用の範囲が広く, 生物資源として貴重である。現在でも多くの研究者により地熱地帯にある温泉や地中, 熱水噴出孔などから様々な新規好熱菌が分離・分類されている。一方, 新規好熱菌の分離源としてあまり注目されてこなかったが, その探索源として期待できる身近な環境にコンポストがある。コンポストは有機性廃棄物が多種多様の微生物によって分解されて生成されたものであり, 土壌に施肥され植物への養分供給や通気性の改善など土壌環境を整える作用を有する。コンポスト生成過程に微生物による有機物の分解熱によって温度が 80°C 付近まで到達することがあるが, それに関与する好熱菌相については未だ未解明な部分が多い。

ハザカ式コンポスター (株式会社ハザカプラント工業製) は比較的大規模 (処理容量 10 m³/日) な装置で長年安定的に稼働しており, 生成コンポストの一部を再び原料と混合して戻す (以下, 戻しコンポスト) 半連続方式のスクープ攪拌機付きコンポスターである (Pedro *et al.*, 2001; Yabe *et al.*, 2009)。このコンポスターでは発酵初期の温度上昇に伴い 70-80°C 付近まで上昇し, 原料由来の多くの細菌が淘汰されて戻しコンポストの細菌相に戻り, その後, 攪拌による温度低下と発酵熱による温度上昇を繰り返して, 後期には有機物の減少に伴い温度が上昇しなくなり, コンポスト化が完了する。この間, 細菌相はあまり変動せず安定していることが分子生物学的手法により解明されている

(Pedro *et al.*, 2001; 矢部ら, 2006)。このようにコンポストの生成過程は高温域で温度変化が激しい特殊な環境であり, その選択圧によってコンポスト環境に適した好熱菌が集積している可能性がある。近年, コンポストからは *Symbiobacterium* 属 (Ohno *et al.*, 2000), *Calditerricola* 属 (Moriya *et al.*, 2011), *Planifilum* 属 (Hatayama *et al.*, 2005), *Tuberibacillus* 属 (Hatayama *et al.*, 2006) など属レベルで新規な好熱菌が提唱されているが, 分離方法を工夫することで更に多くの新規好熱菌を獲得できる可能性がある。

そこで本研究ではハザカ式コンポスターで生産されたコンポストから, カナマイシンなどの抗生物質を添加した種々の培地を用いて新規好熱菌を分離することを目的とした。

ハザカ式コンポスターを用いて牛糞を主原料として生成したコンポスト (以下, 牛糞コンポスト; CC) とモヤシや大豆粕, 果実, パンなどの食品残渣を原料としているコンポスト (以下, 食品汚泥コンポスト; FC) を分離源とした。それぞれのコンポスト約 500 g をジップロックに採取し, 48 時間以内に分離作業を行った。なお, コンポスト採取時の温度は CC 及び FC とともに約 40°C であった。

酵母エキス 0.1% (オリエンタル酵母社製), バクトペプトン 0.2% (Difco 社製), NaCl 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.1% 及び寒天 2% の組成の培地を基本培地とし, 以下の培地を作製した。

・TNC 培地: 基本培地にトリメトプリム (20 mg/l) とナリジクス酸 (100 mg/l) 及びコンポスト抽出液 5% (v/v) (コンポスト抽出液は水道水 1000 ml に牛糞コンポスト 100 g を添加して, 120°C, 60 時間オートクレーブ後の上澄み) を添加した培地。

*Corresponding author

E-mail: kennan-6@kennan-e.co.jp

Accepted: August 5, 2011

Table 1 The isolates from composts and the closet relatives based on 16S rRNA gene sequences

No.	Isolation media (kanamycin conc.)	Isolation temp. (°C)	Isolation source ^{a)} (No. of isolates)	Closest relatives (Accession no.)	Ranges of 16S rRNA gene sequence similarity (sequence length)
1	TNC	50	FC ^{a)} (4) CC ^{b)} (10)	<i>Thermobifida fusca</i> SSCT81 (AB210960)	99-100% (531-628 bp)
2		50	CC (3)	<i>Streptomyces thermovulgaris</i> DSM 40579 (Z68098)	100% (639-655 bp)
3		50	FC (2) CC (7)	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i> KCTC 9076 (AF138739)	99-100% (533-597 bp)
4		60	CC (8)	<i>Thermomonospora curvata</i> DSM 43183 (X97893)	99-100% (711-760 bp)
5	TNKC (100 ppm)	50	CC (1)	<i>Nocardiopsis composta</i> KS8 (AF360733)	99% (820 bp)
6		50	CC (1)	<i>Thermocrispum municipal</i> DSM 44069 (X79184)	100% (699 bp)
7	(20 ppm)	60	FC (2) CC (2)	<i>Thermomonospora curvata</i> DSM 43183 (X97893)	100% (726-782 bp)
8	TNK (100 ppm)	50	CC (1)	<i>Paenibacillus hodogayensis</i> SG (AB179866)	94% (811 bp)
9		50	CC (1)	<i>Phyllobacterium trifolii</i> BIHB4156 (FJ550309)	95% (863 bp)
10		50	CC (4)	<i>Sphingobacterium composti</i> T5-12 (AB244764)	92% (802 bp)
11		50	FC (4) CC (4)	<i>Niabella aurantiaca</i> R2A15-11 (DQ457019)	93% (827 bp)
12		50	FC (1)	<i>Tuberibacillus calidus</i> 607 (AB231786)	91% (833 bp)
13	TNKI (20 ppm)	50	FC (2) CC (3)	<i>Actinopolymorpha singaporensis</i> IM744 (AF237815)	94% (895 bp)
14	TNKC (20 ppm)	50	CC (1)	<i>Ktedonobacter racemifer</i> SOSPI-21 (AB510917)	88% (863 bp)
15		80	FC (1) CC (2)	<i>Thermus thermophilus</i> CT1 (AJ251940)	100% (701-722 bp)
16	TNCG	78	FC (4) CC (3)	<i>Thermaerobacter subterraneus</i> C21 (AF343566)	98.0-98.2% (523-801 bp)
17		80	FC (4) CC (8)	<i>Thermus thermophilus</i> CT1 (AJ251940)	99-100% (562-678 bp)

^{a)} FC: Food sludge compost, ^{b)} CC: Cow dung compost

- ・ TNCG 培地：TNC 培地の寒天をゲランガムに代えて、0.2% CaCl₂ を加えた培地。
- ・ TNK 培地：基本培地にトリメトプリム (20 mg/l) とナリジクス酸 (100 mg/l) 及びカナマイシン (20 or 100 mg/l) を添加した培地。
- ・ TNKC 培地：TNK 培地にコンポスト粉末 (コンポスト粉末は牛糞コンポストを 60°C で一昼夜乾燥させ、磨り潰したもの) 5% (w/v) を添加した培地。
- ・ TNKI 培地：ISP [International Streptomyces Project (Shirling & Gottlieb, 1966) 3 培地, 以下 ISP3] 培地にトリメトプリム (20 mg/l) とナリジクス酸 (100 mg/l) 及びカナマイシン (20 mg/l) を添加した培地。

上記の培地はすべて室温にて 1M NaOH または 1M HCl を用いて pH 7.0 に調製した。分離方法として、

滅菌生理食塩水に各コンポストを適宜希釈し、希釈平板法にて 50, 60, 78, 80°C で上記の各培地を用いて 5-7 日間培養を行った。出現したコロニーは少なくとも 3 回以上分離操作を繰り返して純粋化した。なお、TNC, TNCG, TNKC 培地を用いた試験においては、試料の希釈液を添加しないブランクも同様に培養し、無菌であることを確認した。

TNCG 及び TNC 培地からランダムに 53 菌株を純粋分離し、カナマイシンを添加した培地である TNKC, TNK, TNKI 培地から 30 菌株を純粋分離した。

分離株の 16S rRNA 遺伝子を以下の方法に従って決定した。プライマー F27 (5'-AGAGTTTGATCAT GGCTCGA-3'), R1492 (5'-GGCTACCTTGTTACGA CTT-3') (*Escherichia coli* 16S rRNA 遺伝子の 8-27

Table 2 Information of bacteria isolated from composts

No.	Strain name	Accession No.	Closest relatives (Accession no.)	Ranges of 16S rRNA gene sequence similarities (sequence length)
8	Nis2	AB563784	<i>Paenibacillus hodogayensis</i> SG (AB179866)	93.8% (1333 bp)
9	Nis3	AB563785	<i>Phyllobacterium trifolii</i> BIHB4156 (FJ550309)	94.9% (1373 bp)
10	CKTN2	AB563783	<i>Sphingobacterium composti</i> T5-12 (AB244764)	92.6% (1407 bp)
11	F1	AB535716	<i>Niabella aurantiaca</i> R2A15-11 (DQ457019)	93.4% (1404 bp)
12	Mi-1	AB563786	<i>Tuberibacillus calidus</i> 607 (AB231786)	91.2% (1421 bp)
13	<i>Thermasporomyces composti</i> I3 ^{a)}	AB535715	<i>Actinopolymorpha singaporensis</i> IM744 (AF237815)	95.5% (1447 bp)
14	<i>Thermosporothrix hazakensis</i> SK20-1 ^{b)}	AB500145	<i>Ktedonobacter racemifer</i> SOSP-21 (AB510917)	88.7% (1415 bp)
15	<i>Thermaerobacter composti</i> Ni80 ^{c)}	AB454087	<i>Thermaerobacter subterraneus</i> C21 (AF343566)	98.2% (1566 bp)

^{a)}Yabe *et al.*, 2011, ^{b)}Yabe *et al.*, 2010, ^{c)}Yabe *et al.*, 2009

及び 1510-1492 のポジション) のプライマーを用いて TaKaRa PCR Thermal Cycler MP-3000 (TaKaRa Bio) にて 94°C・2 分を行った後, 続いて, 94°C・1 分, 52°C・1 分, 72°C・1 分を 30 回繰り返す, 最後に伸長反応 72°C・2 分行い増幅させた. 精製 PCR 産物は Lin *et al.* (2004) の記述に従って配列決定した. なお, 決定にはプライマー 27F を用い部分解析を行い (523-895 bp), 必要に応じ, 全長配列を解析した (1373-1566 bp). 相同性検索は BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) または FASTA (<http://www.genome.jp/tools/fasta/>) を用いた. 分離菌株と比較する 16S rRNA 遺伝子配列情報は GenBank または Ribosomal database project (RDP) に登録されている配列から取得した. マルチプルアライメントは ClustalW (version 1.83) (Thompson *et al.*, 1994) で行い, BioEdit (Hall, 1999) にてマニュアルで未決定塩基やギャップを削るなどして編集した. 分子系統樹作成のアルゴリズムは近隣結合法 (Saitou & Nei, 1987) を用い, 1000 回の Bootstrap 値を付記した (Felsenstein, 1985). 進化距離は Kimura's two-parameter 法 (Kimura, 1980) を用いて算出した.

それぞれの 16S rRNA 遺伝子の部分配列を決定して, 相同性検索を行った結果を Table 1 に示した. TNC 培地と TNCG 培地を用いて純粋分離した 34 菌株は *Thermobifida fusca* SSCT81 や *Thermus thermophilus* CT1 などと 16S rRNA 遺伝子配列の相同性が 99% 以上であった. TNCG 培地を用いて 78°C で純

粋分離した 7 菌株は同コンポストから分離された *Thermaerobacter composti* Ni80 と 100% の相同性であった. また, カナマイシン添加培地から純粋分離した 30 菌株中, 23 菌株 (7 系統) は正式に提唱されている菌種との 16S rRNA 遺伝子配列と相同性が 96% 以下の好熱菌であった. 16S rRNA 遺伝子の相同性が 98% 以下の菌株から 8 株の 16S rRNA 遺伝子配列全長を解析し (Table 2), 分子系統樹を作成した (Fig. 1). 過去に報告した 3 株を含めカナマイシン添加培地から分離した分離株 7 菌株は *Firmicutes* 門 (Nis2 株, Mi-1 株), *Actinobacteria* 門 (I3 株), *Bacteroidetes* 門 (CKTN2 株), *Proteobacteria* 門 (Nis3 株) の他, コンポストから分離例が無い *Chloroflexi* 門 (SK20-1 株) など幅広い系統に含まれた. TNKI 培地を用いて 50°C で分離した 5 菌株はすべて遺伝子配列が類似した. 未分類のコロニーも形状が類似しており, 本培地で選択的に分離された可能性がある.

Nis2 は *Paenibacillus hodogayensis* の 16S rRNA 遺伝子配列と最も高い相同性 (93%) を示した. 近縁にはコンポストから検出された clone FS862 (FN667102) やコンポスト由来の *Paenibacillus* sp. AHK180-5 (AB306508) などが存在した. Nis3 株は *Phyllobacterium trifolii* BIHB4156 の 16S rRNA 遺伝子配列と最も高い相同性 (95%) を示した. 近縁にはコンポストから検出された clone PS3384 (FN667469) が存在した. CKTN2 株は *Sphingobacterium composti* T5-12 の 16S rRNA 遺伝子配列と 92% の相同性を

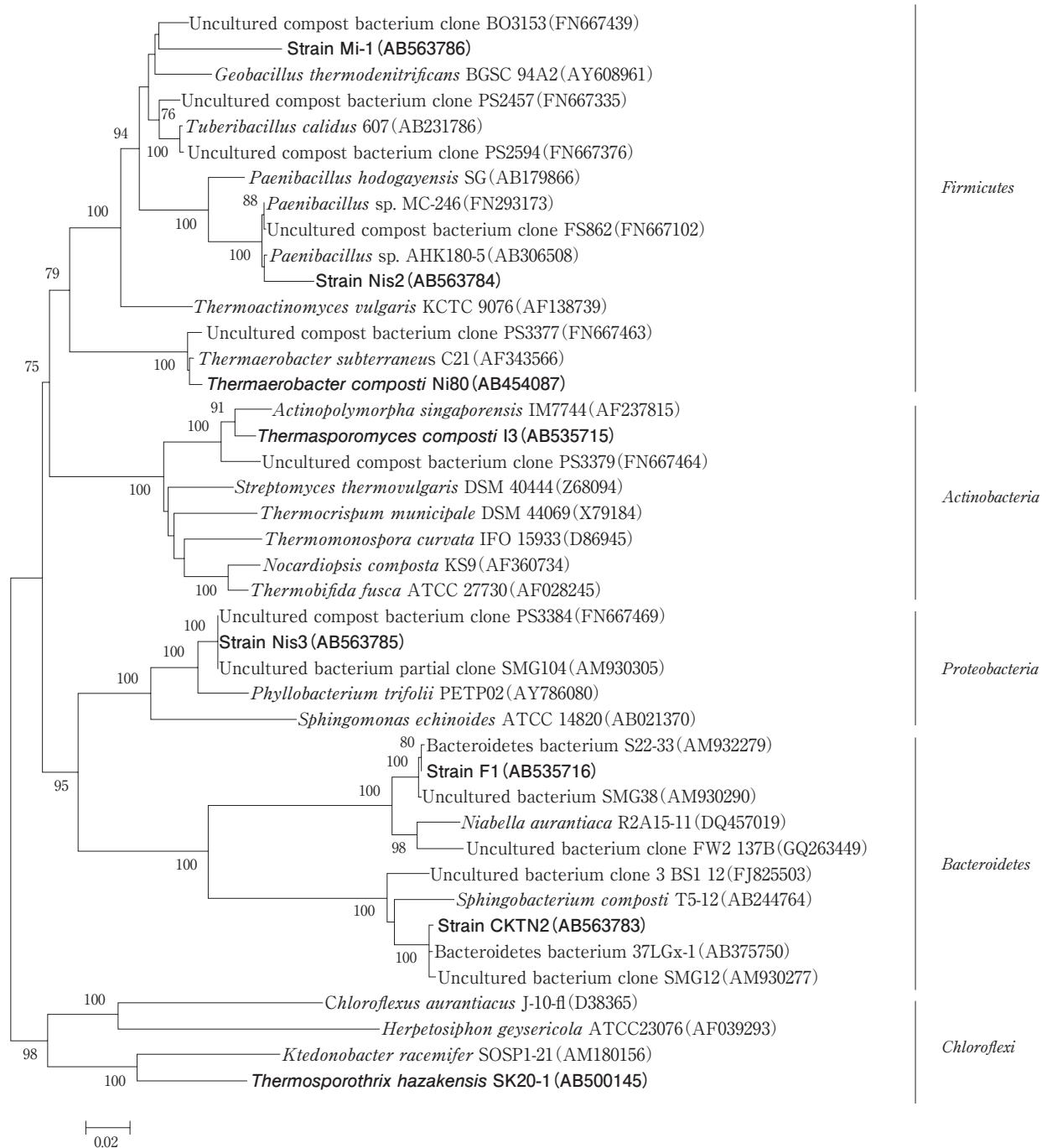


Fig. 1 Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of isolates among members of the phyla. Numbers at nodes are bootstrap percentages based on 1000 replicated datasets; only values greater than 70% are shown.

示し、近縁にはコンポストから検出された clone SMG12 (AM930277) などが存在した。F1 株の近縁種は *Niabella aurantiaca* R2A15-11 で、16S rRNA 遺伝子配列の相同性は 93% であった。この菌株の近縁にはコンポストから検出された clone SMG38

(AM930290) など多くのコンポスト由来の未培養クローンと高い相同性を示した。Mi-1 株は近縁種である *Tuberibacillus calidus* 607 の 16S rRNA 遺伝子配列と 91% の相同性を示した。

以上、抗生物質を含む培地等を用いることで、コン

ポストから新規性の高い好熱菌を分離することに成功した。

文 献

- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Hatayama, K., Shoun, H., Ueda, Y. & Nakamura, A. 2005. *Planifilum fimeticola* gen. nov., sp. nov. and *Planifilum fulgidum* sp. nov., novel members of the family 'Thermoactinomycetaceae' isolated from compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2101-2104.
- Hatayama, K., Shoun, H., Ueda, Y. & Nakamura, A. 2006. *Tuberibacillus calidus* gen. nov., sp. nov., isolated from a compost pile and reclassification of *Bacillus naganoensis* Tomimura *et al.* 1990 as *Pullulanibacillus naganoensis* gen. nov., comb. nov. and *Bacillus laevolacticus* Andersch *et al.* 1994 as *Sporolactobacillus laevolacticus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2545-2551.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- Lin, Y.-C., Uemori, K., de Briel, D.A., Arunpairojana, V. & Yokota, A. 2004. *Zimmermannella helvola* gen. nov., sp. nov., *Zimmermannella alba* sp. nov., *Zimmermannella bifida* sp. nov., *Zimmermannella faecalis* sp. nov. and *Leucobacter albus* sp. nov., novel members of the family *Microbacteriaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1669-1676.
- Moriya, T., Hikota, T., Yumoto, I., Ito, T., Terui, Y., Yamagishi, A. & Oshima, T. 2011. *Calditerricola satsumensis* gen. nov., sp. nov. and *Calditerricola yamamurae* sp. nov., extreme thermophiles isolated from a high temperature compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 631-636.
- Ohno, M., Shiratori, H., Park, M.J., Saitoh, Y., Kumon, Y., Yamashita, N., Hirata, A., Nishida, H., Ueda, K. & Beppu, T. 2000. *Symbiobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov., a symbiotic thermophile that depends on co-culture with a *Bacillus* strain for growth. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1829-1832.
- Pedro, M.S., Haruta, S., Hazaka, M., Shimada, R., Yoshida, C., Hiura, K., Ishii, M. & Igarashi, Y. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale compost. *J. Biosci. Bioeng.* **91**: 159-165.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Shirling, E.B. & Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 479-491.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- 矢部修平, 吉田直人, 進藤 斉, 角田潔和, 葉坂 勝, 小泉武夫 2006. 高温コンポストにおける発酵初期の品温変化とマイクロフローラの変動. *土と微生物* **60**: 109-115.
- Yabe, S., Kato, A., Hazaka, M. & Yokota, A. 2009. *Thermaerobacter composti* sp. nov., a novel extremely thermophilic bacterium isolated from compost. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **55**: 323-328.
- Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M. & Yokota, A. 2010. *Thermosporothrix hazakensis* gen. nov., sp. nov., isolated from compost and description of *Thermosporotrichaceae* fam. nov. within the class *Ktedonobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 1794-1801.
- Yabe, S., Aiba, Y., Sakai, Y., Hazaka, M. & Yokota, A. 2011. *Thermasporomyces composti* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic actinomycete isolated from compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 86-90.

Isolation of thermophilic bacteria from compost on antibiotic-supplemented medium

Shuheï Yabe¹⁾, Yoshifumi Aiba¹⁾, Yasuteru Sakai¹⁾, Masaru Hazaka¹⁾ and Akira Yokota²⁾

¹⁾ Hazaka Plant Research Center, Kennan Eisei Kogyo, Co., Ltd.

²⁾ Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo

Compost contains various thermophilic bacteria; however, few reports describe the isolation of novel thermophilic bacteria from compost. Eighty-three strains were isolated from compost using the media containing the antibiotics such as kanamycin. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequence revealed that the identify of 28 putative bacteria were 88-98% with known bacterial speceies, and formed eight independent lineages in the phyla *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Chloroflexi*.

(担当編集委員：田中尚人)