

臭気低減化細菌の16S rDNA遺伝子配列解析による系統分類

佐藤留美*・蒲生卓磨・島 純・川本伸一

Comparative 16S rDNA gene sequence analyses of the deodorant bacterial strains isolated from composting of animal feces

Rumi SATO*, Jun SHIMA, Takuma GAMO and Shinichi KAWAMOTO

*Graduate school of Human Life Sciences, Jissen Women's University
National Food Research Institute

Abstract

Almost entire region (about 1.5 kb) of 16S rDNA gene was PCR-amplified and sequenced for the 12 deodorant bacterial strains isolated from composting of animal feces. These strains had been classified into five groups based on the deodorizing malodorous compounds; group 1, hydrogen sulfide (one strain); group 2, volatile fatty acids and sulfur compounds (one strain); group 3, methylmercaptane (three strains); group 4, trimethylamine (five strains); group 5, ammonia (two strains). Sequence analysis of the 16S rDNA gene among the 12 strains revealed that strains in the same group are highly homologous (more than 99% similarity) and could be recognized as a single taxon at the species level. By phylogenetic tree analysis of the 16S rDNA gene sequence using a CLUSTALW program, the strains in group 1 and 2 were identified as *Brevibacterium* sp. and *Rhodococcus* sp., respectively, and the other strains were all identified as *Bacillus* sp..

(Received Sep. 28, 2001; Accepted Dec. 25, 2001)

近年、都市における近接農耕地への宅地化の拡大に伴い、畜産廃棄物すなわち豚ふんや鶏ふんなどの家畜ふん尿による悪臭公害が住民と畜産農家側にとって大きな問題になっている^{1,2)}。その悪臭成分としては、硫化水素、メチルメルカプタン、硫化メチル、二硫化メチルなどの悪臭硫黄化合物や低級脂肪酸とアンモニアが主たるものである^{3,4)}。このような悪臭は、特に家畜ふん尿処理技術の代表である堆肥化の際に問題となる。悪臭成分を物理的・化学的手法で除去するには大きな設備や維持費を必要とするため、最近では低コストな微生物の作用を利用した効率的臭気低減化技術の開発研究が注目されている⁵⁻⁹⁾。すでに堆肥化での悪臭除去のた

めに添加する多くの微生物資材が実際に市販されている。しかしながら、これら添加資材の悪臭防除効果については、賛否両論があつて確定したものとはなっていない¹⁰⁾。微生物による臭気の効率的低減化のためには、微生物活性を最大限に活用する必要がある。そのためには微生物学的見地から臭気低減型堆肥等における混合菌相での活性微生物の分類・同定や活性微生物の動態を的確に把握し、迅速かつ正確に評価する技術開発などの研究が必須となる。そこで本研究では、堆肥から分離された臭気低減活性を有する細菌12株について、16SリボソームDNA(16S rDNA)の塩基配列解析による分類学的位置づけに関して検討を行った。

*実践女子大学大学院 生活科学環境研究科

2001年9月28日受付, 2001年12月25日受理

実験方法

1. 使用菌株・使用培地

表1に使用した臭気低減活性を持つ分離菌株を示した。これら使用菌株は、臭気低減堆肥などから単離されたものである³⁻⁹⁾。それぞれの菌株の臭気低減活性は、無臭化処理槽での官能的判定法と機器による検出法を併用した臭気度の測定により評価された^{4,5)}。これら菌株の同定は、Bergey's Manualを参考に簡単な糖の資化性などの生理学的性状および形態学的観察に基づいて行われた。なお*Brevibacterium* sp. BN53-1株については、16S rDNA部分塩基配列解析により同定された。

菌株の培養は、Difco社製のTryptic soy broth(TSB)培地を用いて通常37℃で行った。なお、高温菌であるTAT105株とTAT112株については、50℃で培養した。固形培地には、1.5%(w/v)の寒天を添加した。

2. ゲノムDNAの抽出

Bio-Rad社製のInstaGene Matrixキットを用いて、マニュアルに従い寒天培地上のコロニーまたは培養菌体からゲノムDNAを抽出した。

3. 16S rDNAのPCR増幅およびシーケンシング用プライマー

表2に使用した16S rDNAのPCR増幅およびシーケンシング用プライマーの配列を示した。これらプライマーは、大腸菌の16S rDNA塩基配列情報を基に設計した。

4. PCR反応

供試菌株の16S rDNA遺伝子全長増幅のためのPCR反応は、LATAq DNA polymerase(宝酒造)により50ul反応容量でGeneAmp 9700 thermal cycler (Applied Biosystems)を使用して行った。PCR条件は、96℃、5分間熱変性次いで95℃で45sec(熱変性)、54℃で45秒間(アニーリング)、72℃で90秒間(伸長反応)を40サイクルさらに72℃での伸長反応を5分間であった。得られたPCR産物は、QIAquick PCR purificationキット(QIAGEN)を用いて精製後、直接DNAシーケンシングに供した。

5. DNAシーケンスと塩基配列解析

DNAシーケンシングは、BigDye terminator cycle sequencing FS ready reactionキット(Applied Biosystems)を用い、ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems)で行った。塩基配列解析は、DNASISソフトウェアver.3.7(日立エンジニアリング)を用いて行った。

分類学的系統樹作成にあたっては、国立遺伝研究所のCLUSTALW解析プログラムを利用した。なお、12株の決定した16S rDNA遺伝子配列は、日本DNA データバンク(DDBJ)に登録した。アクセッション番号は、AB066336(TP50株)、AB066337(TP81株)、AB066338(No.6株)、AB066339(No.44株)、AB066340(BN53-1株)、AB066341(TAT112株)、AB066342(TAT105株)、AB066343(B184株)、AB066344(No.51株)、AB066345(No.54株)、AB066346(TH64株)、AB066347(No.49株)である。

実験結果と考察

1. 16S rDNA 遺伝子増幅のためのPCR条件

表1に示した臭気低減活性を有する細菌12株(高温菌であるTAT112とTAT105の2株以外は、すべて中温菌である)から、DNAシーケンシングに直接使用可能な16S rDNA 遺伝子全長をPCR増幅するための条件検討を行った。鋳型となるゲノムDNAの抽出に関して、既存の方法^{11,12)}や市販のキットを検討したところ、実験方法に記載した市販キットを使用することにより簡便かつ短時間に寒天培地上の微小コロニーや少量の培養菌体(10⁴細胞程度)からゲノムDNA を効率良く抽出できることが明らかとなった。次に大腸菌の16S rDNA 遺伝子配列をもとに2種の5'側プライマー10Fと12Fおよび2種の3'側プライマー1530Rと1540Rを作成した(表2)。これらプライマーの組み合わせを検討した結果、供試12菌株すべてから、ほぼ全長に匹敵する約1.5kbの16S rDNA 遺伝子PCR増幅産物を得ることに成功した。すなわちBN53-1, No.51, No.61の3株は、プライマー12Fと1530Rの組み合わせをこれら以外の株は、プライマー10Fと1540Rの組み合わせを用いた。さらにPCR条件の検討を行ったところ、図1に示したように、特にサイクル中のアニーリング温度を50℃から54℃に上げることにより、副産物の殆どない直接DNAシーケンスに使用可能な16S rDNA遺伝子PCR産物を得ることができた。

2. 16S rDNA遺伝子配列解析

得られたPCR増幅産物を用いて、供試12菌株の16S rDNA 遺伝子配列を決定した。シーケンシング用のプライマーは表2に示した大腸菌の配列をもとに作成した17種のものを使用した。図2にこれら臭気低減活性細菌12株の16S rDNA遺伝子配列の相同性解析の結果を示した。トリメチルアミン臭気低減活性を有する5株は、お互いに極めて相同性が高く、その内4株は

第1表 使用菌株

菌株名	臭気低減活性	生化学的・生態学的同定	16SrDNA塩基配列解析による同定*
BN53-1	硫化水素	<i>Brevibacterium</i> sp.	<i>Brevibacterium</i> sp.
B184	低級脂肪酸類 硫黄化合物類	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Rhodococcus</i> sp.(<i>R.pyridinovorans</i>)
TP50	メチルメルカプタン	<i>Acinetobactor</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.(<i>B.lentus</i>)
TH64	メチルメルカプタン	<i>Acinetobactor</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.(<i>B.lentus</i>)
TP81	メチルメルカプタン	<i>Acinetobactor</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.(<i>B.lentus</i>)
No.44	トリメチルアミン	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.(<i>B.megaterium</i>)
No.49	トリメチルアミン	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.(<i>B.megaterium</i>)
No.51	トリメチルアミン	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.(<i>B.megaterium</i>)
No.54	トリメチルアミン	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.(<i>B.megaterium</i>)
No.61	トリメチルアミン	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.(<i>B.megaterium</i>)
TAT105	アンモニア	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
TAT112	アンモニア	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.

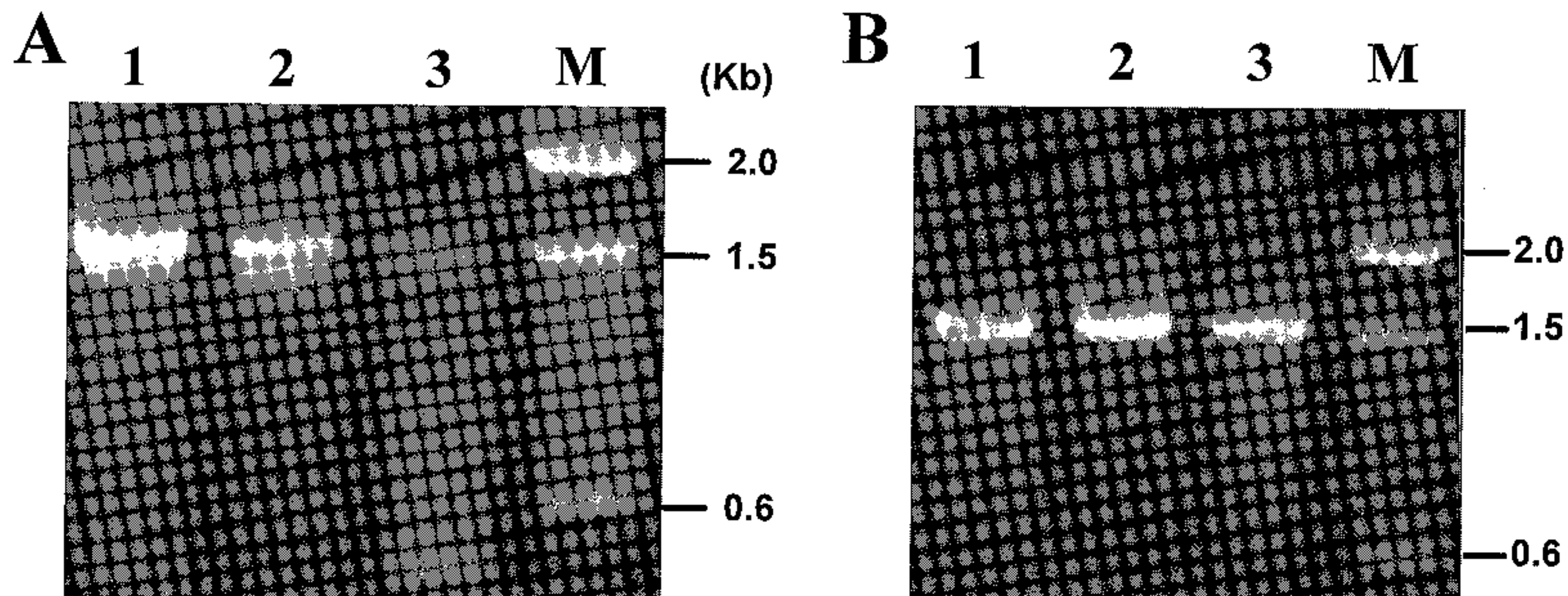
*括弧内には、本研究での16S rDNA塩基配列解析により推定した最も近縁の細菌種を記載した。

第2表 16S rDNAのPCR増幅およびシーケンス用プライマーの塩基配列

プライマー名	塩基配列(5'→3')	サイズ(mer)	Tm値(℃)	GC含量(%)
10F	AGTTTGATCCTGGCTC	16	47.3	50
12F	TTGATCCTGGCTCAGG	16	53.0	56
120R	GTGTTACTCACCCGT	15	41.7	53
270R	TTACCCACCAACTAGCTAATGC	23	57.0	49
350F	TACGGGAGGCAGCAG	15	54.3	67
340R	AGTCTGGGCCGTGTCTGAG	19	59.0	63
350R	CTGCTGCCTCCCGTAG	16	55.8	69
520F	ACCGCGGCTGCTGGC	16	69.1	81
520R	ACCGCGGCTGCTGGC	15	59.0	80
680R	TCTACGCATTTACC	15	43.9	47
800F	ATTAGATACCCTGGTA	16	37.9	38
800R	CTACCAGGGTATCTAAT	17	40.0	41
920R	GTCAATTCCTTTGAGTTT	18	46.2	33
1100F	GCAACGAGCGCAACCC	16	62.5	69
1100R	AGGGTTGCGCTCGTTG	16	59.2	63
1240R	CCATTGTAGCACGTGT	16	47.4	50
1400F	TGTACACACCGCCCGT	16	57.4	63
1400R	ACGGGCGGTGTGTAC	15	53.5	67
1500R	GGCTACCTTGTTACGA	16	45.9	50
1530R	AGGTGATCCAGCCGCAC	17	57.0	81
1540R	AAGGAGGTGATCCAGCC	17	55.4	59

100%の相同性を示した。従って、これら5株は、同じ種に属するものと推察された。なお、100%相同性を示した4株の内、No.51株に関しては他の3株の16S rDNA遺伝子が前項で述べたようにプライマー10Fと1540Rの

組み合わせでPCR増幅されるのに対して、この組み合わせでは増幅されずプライマー12Fと1530Rの組み合わせで増幅されることから、16S rDNA遺伝子の5'或いは3'末端側で塩基配列の違いが存在する可能性が極めて高い



第1図 16S rDNA遺伝子PCR産物のアガロースゲル電気泳動分析
PCR反応サイクルのアニーリング温度を50℃(A)と54℃(B)で行った。レーン1,
No.44株;レーン2, No.54株;レーン3, No.49株;レーンM, DNA分子量マーカー

と考えられる。メチルメタン臭気低減活性を有する3株も同様にお互いに相同性が高く(内2株は相同性100%), 同じ種に属するものと推察された。アンモニア臭気低減活性を有する高温菌2株についてもやはりお互いに高い相同性を示し、同じ種に属するものと推察された。

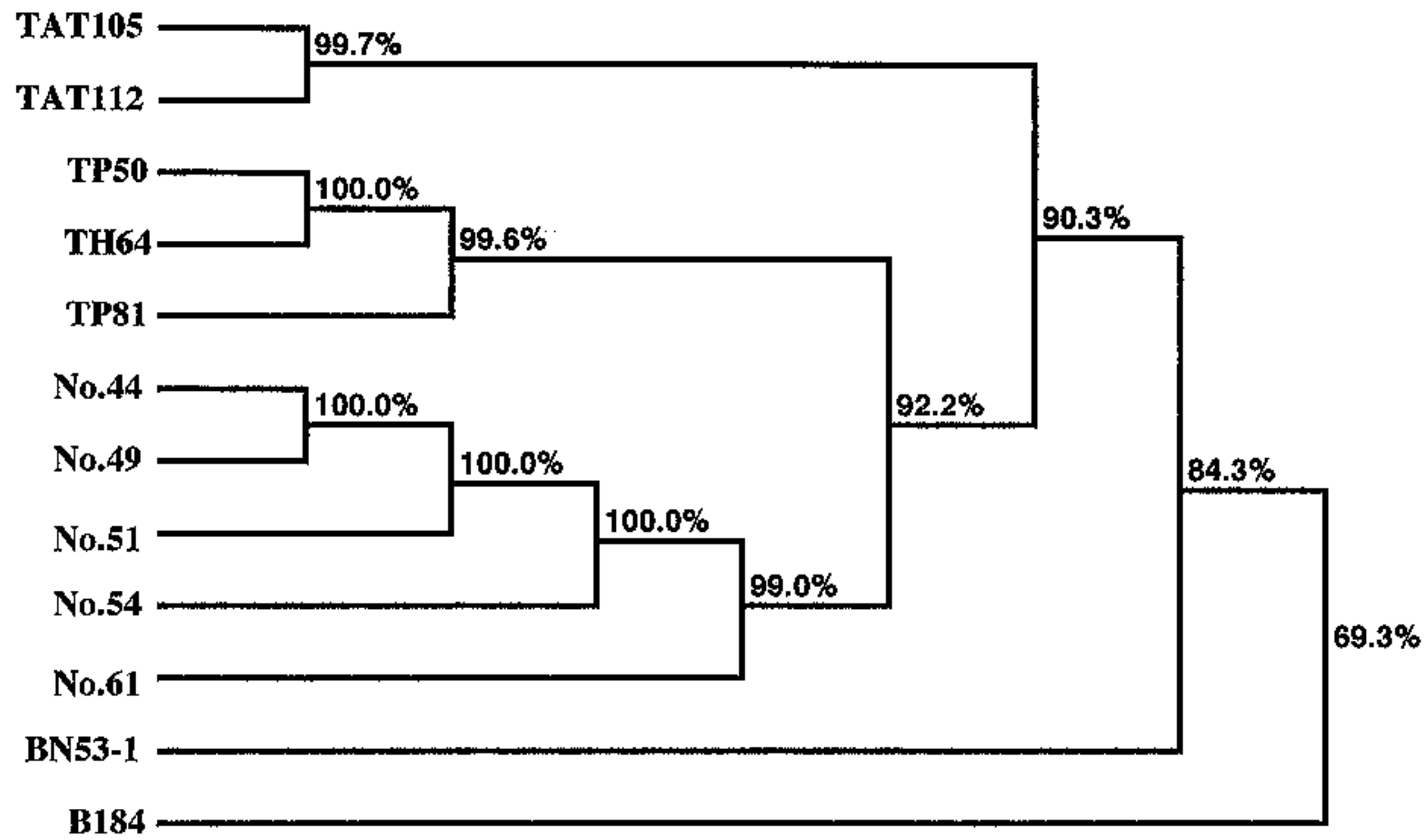
これら12菌株の16S rDNA遺伝子配列に関してBLASTX DNAデータベースでホモロジー検索を行った。その結果、BN53-1株とB184株は、それぞれ*Brevibacterium*属と*Rhodococcus*属の菌株と残りの10株は、*Bacillus*属の菌株の16S rDNA遺伝子配列と高い相同性(95%以上)を示した。そこで、国立遺伝研究所のCRISTALWプログラムを用いて、16S rDNA遺伝子配列によるこれら臭気低減活性細菌と既知細菌群との分類学的系統樹を作成した(図3)。

その結果、トリメチルアミン臭気低減活性を有する5株とメチルメルカプタン臭気低減活性を有する3株は、それぞれ*Bacillus megaterium*と*Bacillus lentus*が最も近縁の細菌種であることが明らかとなった。これら分離株の上記既知菌種への同定には、基準株とのDNA-DNAハイブリダイゼーション解析による判定が必要である。アンモニア臭気低減活性を有する高温菌2株は、高温菌*B. stearothermophilus*と低温菌*B. phycophilus*の間に位置付けられる*Bacillus* sp.であった。硫化水素臭気低減活性を有するBN53-1株は、*Brevibacterium* sp. に低級脂肪酸・硫黄化合物類臭気低減活性を有するB184株は、放

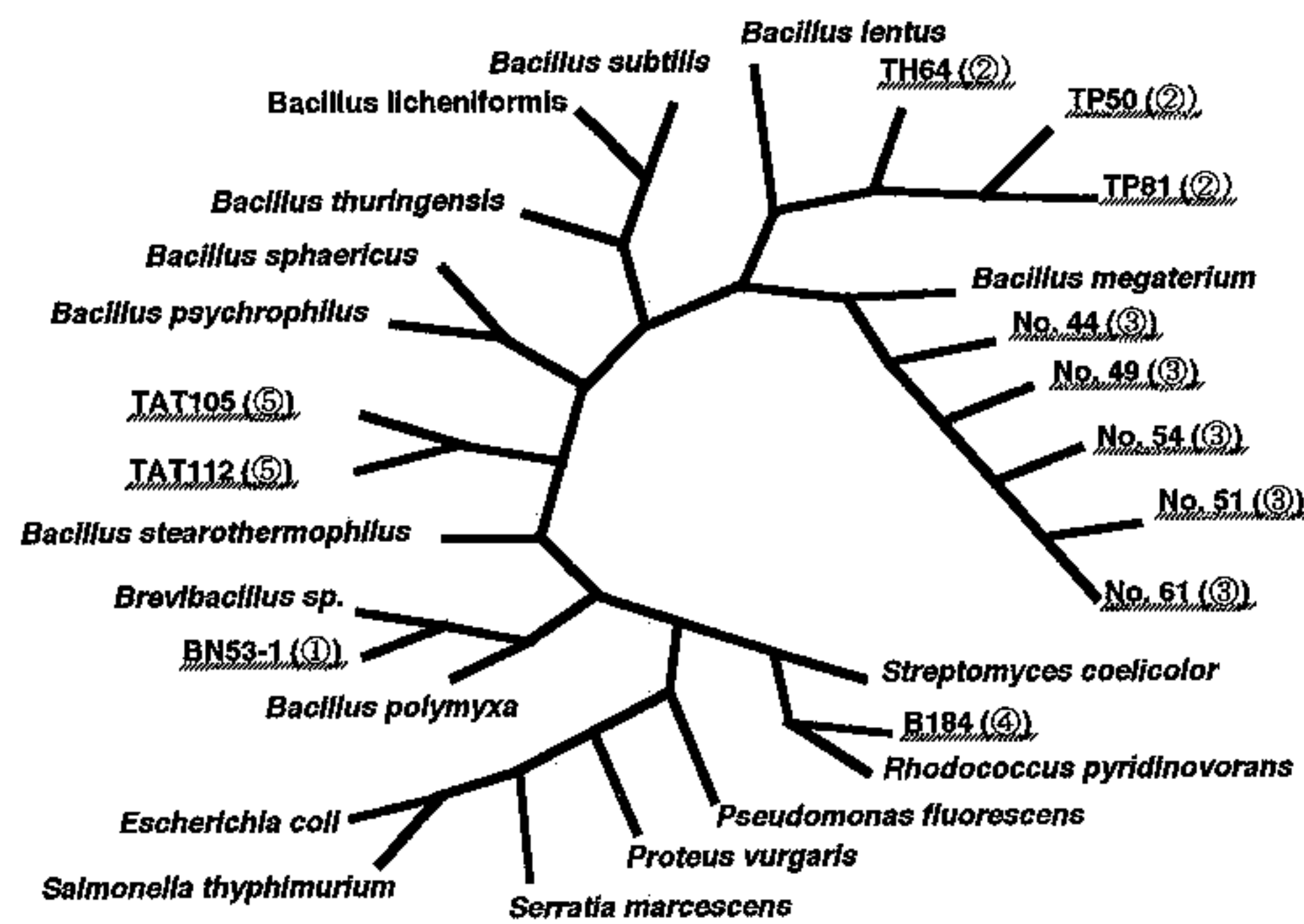
線菌群に属する*Rhodococcus pyridinovorans*に極めて近縁の種であることが推察された。

以上の結果から、調べた臭気低減化細菌のすべてがグラム陽性細菌に属し、その大半が耐熱性の内生孢子を形成する*Bacillus*属に分類されることが明らかとなった。今回調べた12株の内、7株で古典的な生理・形態観察による同定と16S rDNA遺伝子配列解析による同定の間に大きな違いが認められた。この結果は、精度を上げるために多くの生理特性などの検討に時間を要する古典的な微生物の分類・同定法に比べ、16S rDNA遺伝子配列解析による分類・同定手法は、簡便性、迅速性および正確性の点で極めて優れていることを示している。本研究で用いた菌株は、臭気低減化堆肥から分離されたものである。従って、堆肥化の際に生ずる60℃以上にも及ぶ発酵熱発生に対して、生存可能な孢子を形成する*Bacillus*属の臭気低減化菌株が優先的に分離されたことが上記の結果に反映されていると考えられる。

今回、臭気低減活性を有する多くの細菌に関する16S rDNA遺伝子配列情報を取得できた。この情報は、PCR増幅解析法による微生物資材等からの臭気低減化菌株の検出・評価や臭気低減化堆肥等における活性微生物の動態把握のための特異プライマーの設計に際して極めて有効であると考えられる。



第 2 図 臭気低減化細菌12株の16S rDNA遺伝子塩基配列の相同性比較



第 3 図 16S rDNA 遺伝子配列解析による臭気低減化細菌と
既知細菌群との分類学的系統樹

国立遺伝研究所のCRISTALWプログラムにより系統樹を作成した。①硫化水素低減活性細菌 ②メチルメルカプタン低減活性細菌 ③トリメチルアミン低減活性細菌 ④低級脂肪酸類・硫黄化合物低減活性細菌 ⑤アンモニア低減活性細菌

謝 辞

菌株を御供与頂いた広島大学生物生産学部微生物機能学研究室太田欽幸教授および独立行政法人農業研究機構畜産試験場飼養環境部汚染物質浄化研究室黒田和孝主任研究官に深く感謝致します。

本研究は、農林水産省「エコシステム」プロジェクトの研究助成により行われたものである。

要 約

堆肥より分離された臭気低減活性を有する細菌12株【硫化水素低減活性1株(グループ1), 低級脂肪酸類・硫黄化合物類低減活性1株(グループ2), メチルメルカプタン低減活性3株(グループ3), トリメチルアミン低減活性5株(グループ4), アンモニア低減活性2株(グループ5)】について、16S rDNA遺伝子塩基配列解析による系統分類を行った。その結果、グループ内の菌株間で16S rDNA遺伝子塩基配列の相同性が極めて高い(99%以上)ことが明らかとなった。さらに既知細菌群とのCRISTALWプログラムによる分類学的系統樹作成により、グループ1とグループ2の株は、それぞれ *Brevibacterium* sp.と *Rhodococcus* sp.とその他のグループの株はすべて *Bacillus* sp.と同定した。

文 献

- 1) 環境庁編, 平成4年度版「環境白書」(1992).
- 2) 農林水産省畜産局畜産経営課(1998)環境保全, 「平成10年畜産経営の動向」, 中央畜産会, 東京, pp.203-242
- 3) Ohta, Y. and Ikeda, M., Deodorization of pig feces by actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 487-491 (1978).
- 4) 太田欽幸, 池田貢, 逸見良則, 鶏ふんの微生物による急速無臭化法, 醗酵工学, **57**, 372-379 (1989).
- 5) 太田欽幸, 池田貢, 農化誌, 微生物による豚ふんの急速無臭化法, **53**, 227-284 (1979).
- 6) Ohta, Y. and Kuwada, Y., Rapid deodorization of cattle feces by microorganisms. *Biol. Wastes*, **24**, 227-240 (1988).
- 7) Zhang, L., Hirai, M., and Shoda, M., Removal characteristics of dimethyl sulfide, methanethiol, hydrogen sulfide by *Hyphomicrobium* sp. I55 isolated from peat biofilter. *J. Ferment. Bioeng.* **72**, 392-396 (1991).
- 8) 中田裕二, 太田欽幸, 無臭化細菌 *Bacillus* sp. BN53-1 による硫化水素除去, 生物工程, **75**, 425-431 (1997).
- 9) Osada, T., Kuroda, K., and Yonaga, Y., Reducing nitrous oxide gas emission from fill and draw type activated sludge process. *Water Res.*, **29**, 1607-1608 (1995).
- 10) 羽賀清典, 添加資材, 「マニユア・マネイジメント」, 羽賀清典監修(デーリイマン社, 東京), pp.36-37 (1997).
- 11) Kawamoto, S., Zhang, D., and Ochi, K., Molecular analysis of the ribosomal L11 protein gene (*rplK=relC*) of *Streptomyces griseus* and identification of a deletion allele. *Mol. Gen. Genet.*, **255**, 549-560 (1997).
- 12) Kawamoto, S., and Ochi, K., Comparative ribosomal protein (L11 and L30) sequence analyses of several *Streptomyces* spp. commonly used in genetic studies., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 597-600 (1998).