

阿南市石灰鉱山由来の炭酸カルシウム耐性微生物の探索

—— 極限環境微生物班 (徳島生物学会) ——

佐藤 高則^{1*} 原 将希² 濱地 由衣² 井上 翔太² 高橋 昇汰² 中山 美咲²
 瀬部 直之² 牧野祐未子² 坂口 雅俊³ 大岩由利恵³ 石田 啓祐¹

要旨：本研究では、徳島県阿南市阿瀬比の石灰鉱山から20%炭酸カルシウム培地で生育可能な微生物をスクリーニングし、単離した28種の微生物の各ゲノムDNAを鋳型として16S rRNA遺伝子のDNA塩基配列決定および系統解析を行った。その結果、阿瀬比石灰鉱山土壌に生育する炭酸カルシウム耐性細菌は、*Pseudomonas*属、*Bacillus*属、*Arthrobacter*属、*Lysinibacillus*属、*Stenotrophomonas*属、*Staphylococcus*属細菌であることが明らかになった。

キーワード：石灰鉱山、炭酸カルシウム、16S rRNA遺伝子、スクリーニング

1. はじめに

四国山地には四国カルストをはじめ大小さまざまな石灰岩地層が存在する。一般的にこうした石灰岩の主成分である炭酸カルシウム (CaCO_3) は、その起源として化学反応起源と生物起源のものがあると考えられており、生物起源として塩湖、鍾乳洞、土壌などに存在する微生物による炭酸塩生成メカニズムが提案されている (幸村ら, 2008)。しかしながら、四国の石灰岩における微生物相や炭酸カルシウム生成に関与する微生物についての報告はこれまでなされていない。そこで本論文では、徳島県阿南市阿瀬比^{あせび}の石灰鉱山における炭酸カルシウム耐性微生物をスクリーニングし、単離した細菌の16S rRNA遺伝子を系統解析することにより、石灰岩中の炭酸カルシウム耐性微生物の推定を行い、さらに炭酸カルシウムの微生物による生成の可能性についても検討した。なお、この阿南市阿瀬比^{あせび}の石灰岩地層から産出した大理石は、「時鳥^{ほととぎす}」として国会議事堂の門柱や壁に使用されている (石田ら, 2004; 石田ら,

2007)。試料を採取した阿瀬比石灰鉱山の位置を図1に示す。

2. 実験方法

1) 阿南市阿瀬比石灰鉱山からの土壌試料の採取

まず、2013年11月24日に徳島県阿南市阿瀬比の石灰鉱山 (図2 (A)) において、本調査班の瀬部、牧野、坂口、石田により5種の粒径の異なる土壌試料1~5を採取した。採取地点の土壌写真を図2 (B)~(F) に示す。この石灰鉱山土壌は、中生代三畳紀後期の遠洋性石灰岩である。

2) 炭酸カルシウム耐性微生物のスクリーニング

採取した各土壌試料4gを滅菌水10mLに懸濁し静置後、得られた上清250 μL を0.5% (w/v) CaCO_3 を含むLB寒天培地 (0.5% Bacto Yeast Extract, 1% Bacto Tryptone, 1% NaCl, ナカライテスク, pH 7.0) に塗布し、30°C, 2日間培養した (一次スクリーニング)。試料1~5において一次スクリーニングで得られたコロニーを、5% (w/v) CaCO_3 を含む0.1×LB培地で培養し二次スクリーニングを行なっ

1 徳島大学大学院SAS研究部 2 徳島大学総合科学部 3 徳島大学大学院総合科学教育部

* 770-8502 徳島市南常三島町1-1 徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部 tsatoh@tokushima-u.ac.jp



図1 土壌試料を採取した石灰鉱山の位置（阿南市阿瀬比町阿利田）地図は電子国土Webを用いて作成した。

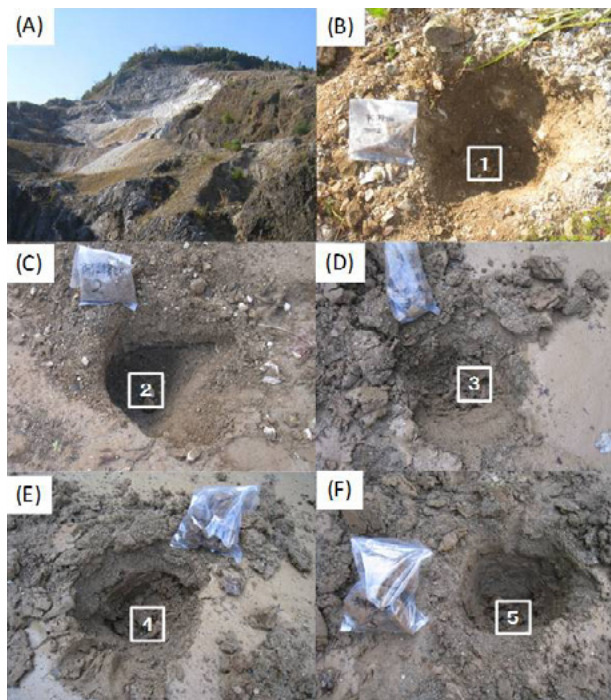


図2 石灰鉱山の写真 (A) と採取土壌 (B)～(F)
(B)～(F) 中の番号は、本文中の試料番号 (1～5) に対応する。

た。二次スクリーニングで生育可能なコロニーを、10% (w/v) CaCO_3 を含む $0.1 \times \text{LB}$ 培地で三次スクリーニングを行った後、生育可能なコロニーに対しさらに20% (w/v) CaCO_3 を含む $0.1 \times \text{LB}$ 培地で四次スクリーニングを行ない、生育可能な25種の炭酸カルシウム耐性微生物を単離した (Asebi CaCO_3 -Tolerant bacteria; 以下ACTと表記)。また、この炭酸カルシウムを含む培地でのスクリーニングの過

程で、4℃にて増殖・分泌能を有する微生物を単離した (Asebi secretary bacteria; 以下Asecと表記)。スクリーニングおよび単離細菌の培養は基本的に30℃で行ない、一部の単離細菌の培養は37℃で行なった。

3) 炭酸カルシウム生成実験

炭酸カルシウムの生物による生成には、微生物が産生する分泌型Ureaseが関与しているとの報告が

表1 石灰鉱山土壌試料からの炭酸カルシウム耐性微生物のスクリーニング

土壌試料	形状	pH	コロニー数			
			1st screening	2nd screening	3rd screening	4th screening
			LB/ 0.5%CaCO ₃	0.1×LB/ 5%CaCO ₃	0.1×LB/ 10%CaCO ₃	0.1×LB/ 20%CaCO ₃
1	砂状	9.10	234	119	37	10
2	砂状	9.23	100	29	7	4
3	粘土質	8.70	77	33	8	2
4	粘土質	8.65	54	18	4	3
5	粘土質	8.41	51	27	6	6
合計			516	226	62	25

ある (Hammes *et al.*, 2003)。そこで, 1.5M Urea, 0.5M CaCl₂を含む0.1×LB液体培地に微生物を接種し, 4℃で静置し, 白色沈殿の生成を観察した。対照としては微生物を接種しない1.5M Urea, 0.5M CaCl₂を含む0.1×LB液体培地を用いた。

4) 単離した炭酸カルシウム耐性微生物の16S rRNA 遺伝子の解析

単離した炭酸カルシウム耐性微生物の同定を行うために, 16S rRNA遺伝子を指標とした遺伝子解析を行った。まず, 単離した微生物をLB培地で37℃, 20時間振とう培養し, 集菌後, 各細菌のゲノムDNAを調製した。Beffaら (1996) の方法を参考に, 大腸菌 (*E.coli*) 16S rRNA遺伝子の11-26位に相当するUpper primer: 5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3' (24mer, Tm=53℃) および*E.coli* 16S rRNA遺伝子の1393-1411位に相当するLower primer: 5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3' (27mer, Tm=67℃) を用いて, 得られたゲノムDNAを鋳型にして, ASTEC社製PC707サーマルサイクラーによりPCRを行った。ここでTmとは, 二本鎖DNAが50%一本鎖DNAに解離する温度を示し, 上記二種のprimerのTmを考慮して, PCRプログラムを次のように設定した。98℃で10秒間DNAを変性させ, 58℃で60秒間primerをアニーリング (徐冷再対合) し, 72℃で90秒間DNA鎖の伸長を行うサイクルを30サイクル繰り返した。得られたPCR産物をpGEM-Tベクター (Promega社製) に挿入し, 構築したプラスミドをABI社製310 Genetic analyzerでDNA塩基配列決定を行った。解析可能であった約1300bpについて塩基配列をNCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) のblastn

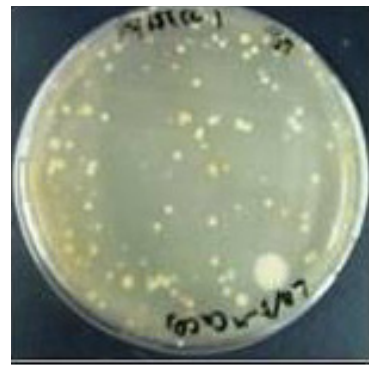


図3 土壌試料1の一次スクリーニング (LB+0.5% (w/v) CaCO₃培地)

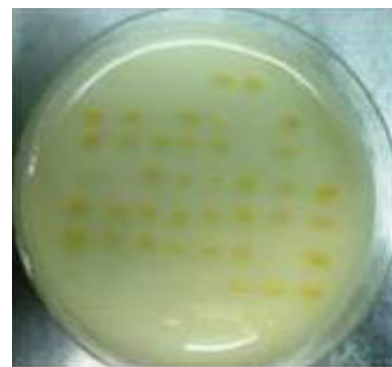


図4 炭酸カルシウム培地での三次スクリーニング (0.1×LB+10% (w/v) CaCO₃培地)

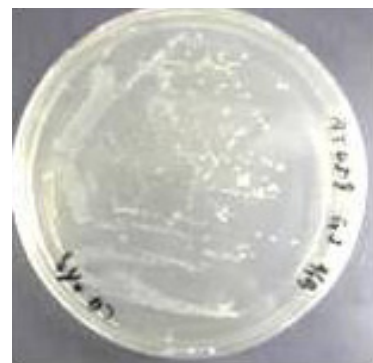


図5 単離した炭酸カルシウム耐性微生物 (ACT059, LB培地)



図6 単離した分泌型炭酸カルシウム耐性微生物 (Asec004, LB培地)

プログラムでDNA塩基配列データベースと照合し、炭酸カルシウム耐性微生物の菌種の推定を行なった。一方、塩基配列の相同性解析はDDBJ (DNA Data Bank of Japan) のClustal W ver.2.1プログラム (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) を用い、系統樹の作成・解析はTreeViewプログラムによりNJ (Neighbor joining method) 法により行なった。Outgroupには*Bacillus subtilis* (枯草菌) の16S rRNA遺伝子の塩基配列を用い、Bootstrap 値の計算は1000回行ない、結果を進化距離として表わした。

3. 実験結果

1) 阿瀬比石灰鉱山土壌試料からの炭酸カルシウム耐性微生物のスクリーニング

2.2) の実験方法に述べた方法により、阿南市

阿瀬比町阿利田の石灰鉱山より採取した土壌試料1～5より、炭酸カルシウム耐性微生物のスクリーニングを行なった(表1)。使用した土壌試料を滅菌水で懸濁した懸濁液のpHは8.4～9.2の弱アルカリ性であった。各懸濁液上清250 μLを0.5% (w/v) CaCO₃を含むLB寒天培地で一次スクリーニングを行なったところ(図3)、516個のコロニーが得られた。次にこれらのコロニーを、より培地の栄養条件を厳しくした5% (w/v) CaCO₃を含む0.1×LB培地に植え継ぎ、二次スクリーニングを行なったところ、226個のコロニーの生育が観察された。さらに、10% (w/v) CaCO₃を含む0.1×LB培地で三次スクリーニングを行なったところ(図4)、62個の生育可能なコロニーが得られた。これらを20% (w/v) CaCO₃を含む0.1×LB培地で四次スクリーニングを行ない、最終的に25種の炭酸カルシウム耐性微生物を単離した(ACT001, 0051, 0052, 008, 0091, 0092, 010, 013, 016, 031, 035, 039, 041, 045, 048, 058, 059(図5), 060, 061, 064, 065, 066, 068, 071, 104)。一方、三次スクリーニングの過程で、低温にて増殖・分泌能を有する3個のコロニーが観察されたため、別途単離しこれらを分泌型微生物とした(Asec003, Asec004(図6), Asec005)。以上の阿瀬比石灰鉱山土壌からのスクリーニングにより、28種の炭酸カルシウム耐性微生物を単離した(表1)。

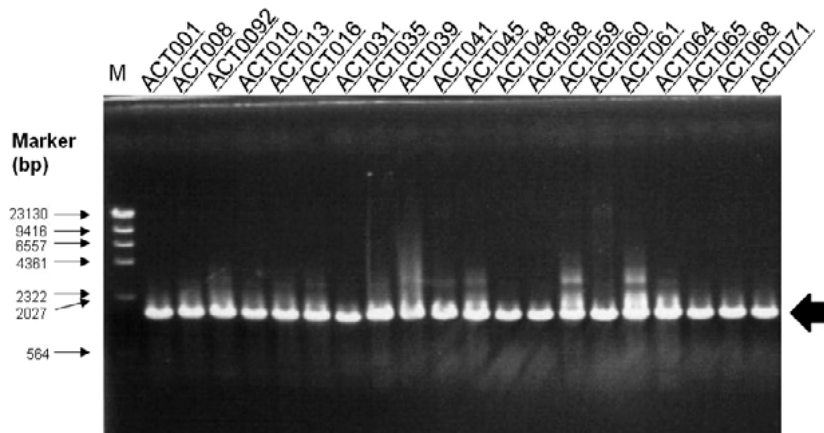


図7 単離した炭酸カルシウム耐性細菌由来16S rRNA遺伝子のPCR増幅

石灰鉱山土壌より単離した細菌のゲノムDNAを鋳型とし、*E.coli* 16S rRNA遺伝子に相補的なprimerおよびTakara ExTaq DNA polymeraseを用いてPCRを行った。このうち反応液10 μLを電気泳動に用いた。PCR産物(太矢印)を切り出し後、pGEM-Tベクターに挿入し、DNA塩基配列を決定した。図中に示されていないACT0051, 0052, 0091, 066, 104についても、PCR産物を別途確認後、同様の実験を行った。Mは分子量マーカー(λ/Hin d III)であり、予想されるPCR産物は1300～1500bpである。

表2 単離した炭酸カルシウム耐性細菌の16S rRNA遺伝子解析による菌種の同定

Samples				Identification of bacteria by 16S rRNA sequence			
Isolated bacteria	Determined length (bp) of 16S rRNA gene	DDBJ* Accession Number	Sampling point	Identified species	Length (bp) of 16S rRNA gene in database	Accession number	Homology (%)
Asec bacteria							
Asec003	1363	AB987914	4	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	1481	KF475871	99.8
Asec004	1362	AB987915	5	<i>Bacillus indicus</i>	1505	NR_029022	99.6
Asec005	1365	AB987916	5	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	1481	KF475871	99.3
ACT bacteria							
ACT001	1362	AB987917	1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1550	JF682516	99.8
ACT0051	1361	AB987918	1	<i>Bacillus indicus</i>	1505	NR_029022	99.1
ACT0052	1364	AB987919	1	<i>Bacillus indicus</i>	1505	NR_029022	99.6
ACT008	1372	AB987920	1	<i>Bacillus nanhaiensis</i>	1504	JQ799091	99.9
ACT0091	1362	AB987921	1	<i>Bacillus cibi</i>	1502	JF772067	99.9
ACT0092	1380	AB987922	1	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	1478	NR_114207	99.4
ACT010	1372	AB987923	1	<i>Bacillus nanhaiensis</i>	1504	JQ799091	99.8
ACT013	1367	AB987924	1	<i>Bacillus indicus</i>	1502	JX393081	99.3
ACT016	1363	AB987925	1	<i>Bacillus indicus</i>	1502	JX393081	99.8
ACT031	1343	AB987926	1	<i>Arthrobacter aurescens</i>	1441	EU086809	99.8
ACT035	1363	AB987927	1	<i>Bacillus indicus</i>	1502	JX393081	99.7
ACT039	1377	AB987928	2	<i>Staphylococcus warneri</i>	1557	NR_102499	99.9
ACT041	1372	AB987929	2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1539	EU442189	99.6
ACT045	1362	AB987930	2	<i>Bacillus indicus</i>	1505	NR_029022	99.7
ACT048	1346	AB987931	2	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1488	KC934768	99.8
ACT058	1345	AB987932	3	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1488	KC934768	99.7
ACT059	1344	AB987933	3	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1488	KC934768	100
ACT060	1344	AB987934	4	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1488	KC934768	100
ACT061	1364	AB987935	4	<i>Bacillus indicus</i>	1505	NR_029022	99.7
ACT064	1365	AB987936	4	<i>Bacillus indicus</i>	1502	JX393081	99.7
ACT065	1343	AB987937	5	<i>Arthrobacter aurescens</i>	1441	EU086809	99.9
ACT066	1370	AB987938	5	<i>Bacillus cibi</i>	1502	JF772067	98.4
ACT068	1344	AB987939	5	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1488	KC934768	99.9
ACT071	1343	AB987940	5	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1488	KC934768	99.9
ACT104	1362	AB987941	5	<i>Bacillus cibi</i>	1502	JF772067	99.7

*本研究で単離した細菌の16S rRNA遺伝子の塩基配列データは、表に示したAccession Number (AB987917~987941) によりDDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録されている。

2) 単離した炭酸カルシウム耐性微生物の16S rRNA 遺伝子の解析

上記で述べたように、石灰鉱山土壌試料中には炭酸カルシウムに耐性を示す微生物の存在が明らかとなった。そこで、この炭酸カルシウム耐性微生物の同定を行うために、16S rRNA遺伝子を指標とした遺伝子解析を行った。単離された微生物が細菌であれば16S rRNA遺伝子を有するため、PCRでこの遺伝子が増幅される。

単離した各微生物よりゲノムDNAを調製し、これらを鋳型としてPCRを行った結果、予想される約1.5kbpの位置にPCR産物が確認され、単離した微生物は細菌であることが示唆された(図7)。さらに、得られたPCR産物をpGEM-Tベクターに挿入し、16S rRNA遺伝子の塩基配列決定を行なった。

得られた結果をNCBI BLASTのblastnプログラ

ムでDNAの塩基配列データベースと照合したところ(表2)、分泌型細菌Asec003およびAsec005は*Pseudomonas frederiksbergensis*の16S rRNA遺伝子の塩基配列と99.3%以上一致し、Asec004は*Bacillus indicus*と99.6%一致した。一方、炭酸カルシウム耐性細菌ACTでは、ACT001が*Pseudomonas chlororaphis*と99.8%一致し、ACT0051, ACT0052, ACT013, ACT016, ACT035, ACT045, ACT061, ACT064は*Bacillus indicus*と99.1%以上一致した。また、ACT008およびACT010は*Bacillus nanhaiensis*と99.8~99.9%一致し、ACT0091, ACT066, ACT104は*Bacillus cibi*と高い相同性を示した。*Pseudomonas*属と*Bacillus*属以外の細菌では、ACT0092が*Lysinibacillus boronitolerans*と、ACT039が*Staphylococcus warneri*と、ACT041が*Stenotrophomonas maltophilia*と99.4~99.9%一致した。またACT031とACT065は*Arthrobacter*

表3 単離した炭酸カルシウム耐性細菌の16S rRNA遺伝子の相同性

	Sequence homology of 16S rRNA gene (%)																											
	Asec 003	Asec 004	Asec 005	ACT 001	ACT 0051	ACT 0052	ACT 008	ACT 0091	ACT 0092	ACT 010	ACT 013	ACT 016	ACT 031	ACT 035	ACT 039	ACT 041	ACT 045	ACT 048	ACT 058	ACT 059	ACT 060	ACT 061	ACT 064	ACT 065	ACT 066	ACT 068	ACT 071	ACT 104
Asec003	—																											
Asec004	81	—																										
Asec005	99	81	—																									
ACT001	98	81	97	—																								
ACT0051	81	99	81	81	—																							
ACT0052	81	99	81	82	99	—																						
ACT008	81	92	80	81	92	92	—																					
ACT0091	81	99	81	81	99	99	92	—																				
ACT0092	81	92	81	81	92	92	92	93	—																			
ACT010	81	92	81	81	92	92	99	92	92	—																		
ACT013	81	99	80	81	99	99	92	99	92	92	—																	
ACT016	81	99	81	81	99	99	92	99	92	92	99	—																
ACT031	78	81	78	79	81	81	81	81	81	81	81	81	—															
ACT035	81	99	81	81	99	99	92	99	92	92	99	99	81	—														
ACT039	80	91	80	80	91	91	91	91	92	91	91	91	82	91	—													
ACT041	88	80	88	88	79	79	79	80	80	80	79	80	79	80	80	—												
ACT045	81	99	81	81	99	99	92	99	92	92	99	99	81	99	91	80	—											
ACT048	78	81	78	78	81	81	80	81	81	81	81	81	97	81	81	79	81	—										
ACT058	78	81	78	78	81	81	81	81	81	80	81	81	97	81	81	79	81	99	—									
ACT059	79	81	78	79	81	81	81	81	81	80	81	81	97	81	81	79	81	99	99	—								
ACT060	79	81	78	79	81	81	81	81	81	80	81	81	97	81	81	79	81	99	99	100	—							
ACT061	81	99	81	82	99	99	92	99	92	92	99	99	81	99	91	79	99	81	81	81	81	—						
ACT064	81	99	81	81	99	99	92	100	92	92	99	99	81	99	91	79	99	81	81	81	81	99	—					
ACT065	78	81	78	79	81	81	82	81	81	81	81	99	81	99	81	82	79	81	97	97	97	81	81	—				
ACT066	80	98	80	80	98	98	91	99	92	91	98	98	81	98	91	79	98	81	81	81	81	98	98	81	—			
ACT068	79	81	78	79	81	81	81	81	81	80	81	81	97	81	81	79	81	99	99	99	99	81	81	97	81	—		
ACT071	79	81	78	79	81	81	81	81	81	80	81	81	97	81	81	79	81	99	99	100	100	81	81	97	81	99	—	
ACT104	81	99	81	81	99	99	92	99	92	92	99	99	80	99	91	79	99	80	81	81	81	99	99	80	98	81	81	—

*aurescens*と、ACT048, ACT058, ACT059, ACT060, ACT068, ACT071は*Arthrobacter oxydans*と99.7～100%一致した。以上より、石灰鉱山土壌に生育する炭酸カルシウム耐性細菌は、*Pseudomonas*属、*Bacillus*属、*Arthrobacter*属、*Lysinibacillus*属、*Stenotrophomonas*属、*Staphylococcus*属細菌であることが明らかとなった。

次に単離した細菌の16S rRNA遺伝子の決定した塩基配列（1343～1380bp）について、DDBJのClustal W ver.2.1を用いて、多重アライメント解析を行なった（表3）。*Pseudomonas frederiksbergensis*と相同なAsec003は、Asec005, ACT001と相同性が高く（98～99%）、この3種の細菌は*Pseudomonas*属の近縁種であることが示唆された。

同様に表3の結果より、*Bacillus indicus*と相同なAsec004は、ACT0051, ACT0052, ACT0091, ACT013, ACT016, ACT035, ACT045, ACT061, ACT064, ACT066, ACT104と高い相同性（98～99%）を示し、*Bacillus nanhaiensis*と相同なACT008とACT010は99%の相同性であった。この*Bacillus nanhaiensis*と相同なグループと上記の*Bacillus indicus*と相同なグループでは相同性に約7%の差が見られることから相同性は比較的強く、同じ*Bacillus*属でも異なる

グループであると推定される。また、*Arthrobacter aurescens*と相同なACT031はACT065と最も相同性が高く（99%）、*Arthrobacter oxydans*と相同なACT048, ACT058, ACT059, ACT060, ACT068, ACT071とも高い相同性（97%）が見られた。この*Arthrobacter oxydans*と相同な細菌群のうち、ACT059, ACT060, ACT071の16S rRNA遺伝子の塩基配列は完全に一致した（100%）。一方、ACT0092, ACT039, ACT041の三種の細菌に関しては、それぞれ*Lysinibacillus boronitolerans*, *Staphylococcus warneri*, *Stenotrophomonas maltophilia*と推定したが、他の炭酸カルシウム耐性細菌とは相同性が95%を超えるものは無く、他の細菌との類似性は低いと考えられる。

さらに、これら炭酸カルシウム耐性細菌の16S rRNA遺伝子のアライメントを元に、系統樹による系統解析を行なった（図8）。その結果、本研究で単離した細菌は、その属に基づいて大きく6つのグループ（グループI～VI）に分類されることが示唆された。グループIは*Bacillus*属細菌で、これは一般的にグラム陽性の桿菌であり自然界に広く分布している。このグループIはさらにIa (*Bacillus nanhaiensis*), Ib (*Bacillus cibi*), Ic (*Bacillus indicus*) のサブ

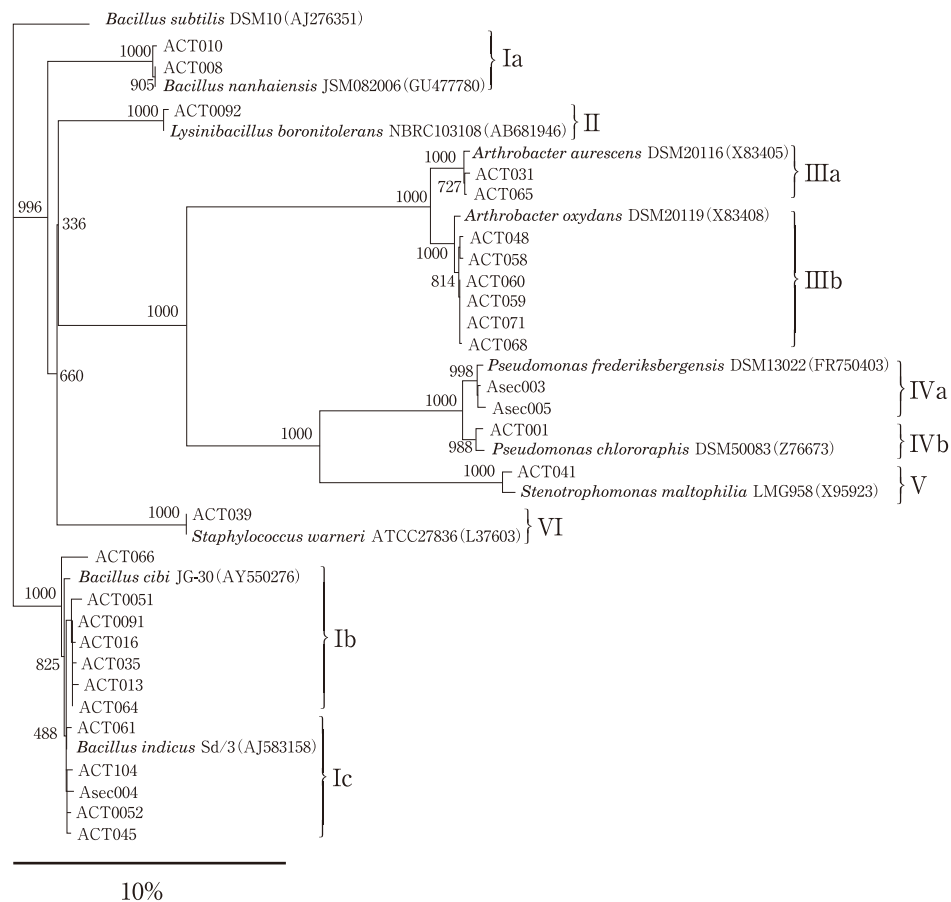


図8 炭酸カルシウム耐性細菌の16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく系統樹(近接結合(NJ)法)
 図中の数字は1000回計算のBootstrap値を、バーは10%の塩基配列の相違をそれぞれ示す。Outgroupは、*Bacillus subtilis*の16S rRNA遺伝子の塩基配列を使用した。細菌属に基づくグループ、I: *Bacillus*属、II: *Lysinibacillus*属、III: *Arthrobacter*属、IV: *Pseudomonas*属、V: *Stenotrophomonas*属、VI: *Staphylococcus*属

グループに分類され、IbとIcは系統的に進化距離が短く近縁であった。Iaサブグループの*Bacillus nanhaiensis*は好アルカリ・好塩性の15~45℃で生育可能な好気性グラム陽性桿菌と報告されており(Chen *et al.*, 2011), 単離した細菌ではACT008およびACT010が属すると考えられる。Ibサブグループの*Bacillus cibi*は好塩性の10~45℃, pH6.5~7.5で生育可能な好気性グラム陽性桿菌と報告されており(Yoon *et al.*, 2005), 本研究の細菌ではACT0051, ACT0091, ACT016, ACT035, ACT064が該当する。Icの*Bacillus indicus*はヒ素に耐性を示すグラム陽性桿菌で15~37℃, pH6.0~7.0で生育可能であると報告されており(Suresh *et al.*, 2004), このサブグループにはAsec004, ACT0052, ACT045, ACT061, ACT104が分類される。

グループIIは*Lysinibacillus*属細菌で、標準株の*Lysinibacillus boronitolerans*はホウ素耐性を有し、

pH6.0~7.0, 16~45℃で生育可能な好塩性グラム陽性桿菌と報告されており(Ahmed *et al.*, 2007), 単離した細菌ではACT0092がこのグループに分類される。

グループIIIは*Arthrobacter*属細菌で、これは好気性グラム陽性桿菌/球菌で、至適生育温度は30℃程度と低く、DNA中の高いG+C含量とペプチドグリカン産生能を有する特徴があり、土壌などから単離されている(Koch *et al.*, 1995; Wauters *et al.*, 2000)。このグループIIIはさらにIIIa (*Arthrobacter aureus*), IIIb (*Arthrobacter oxydans*) のサブグループに分類される。IIIaの*Arthrobacter aureus*は除草剤アトラジンや六価クロムに耐性を示すグラム陽性細菌として単離され(Strong *et al.*, 2002; Horton *et al.*, 2006), *Arthrobacter aureus* TC1株では全ゲノム解析がなされている(Mongodin *et al.*, 2006)。本研究で単離した細菌ではACT031およびACT065がIIIa

サブグループに該当する。一方IIIbの*Arthrobacter oxydans*は、好気性グラム陽性細菌で、厚いペプチドグリカン層と高い脂肪酸含量を有する (Kodama *et al.*, 1992)。このサブグループにはACT048, ACT058, ACT059, ACT060, ACT068, ACT071が分類される。

グループIVは好気性グラム陰性桿菌の*Pseudomonas*属細菌で、これまで100種以上報告されており、さまざまな有機化合物の分解に関与している (Anzai *et al.*, 2000)。グループIVはさらにIVa (*Pseudomonas frederiksbergensis*)とIVb(*Pseudomonas chlororaphis*)のサブグループに分類される。IVaの*Pseudomonas frederiksbergensis*はフェナントレン分解能を示すグラム陰性桿菌で、生育温度は4~30℃である (Andersen *et al.*, 2000)。単離した細菌ではAsec003およびAsec005がこのグループに分類される。またIVbの*Pseudomonas chlororaphis*はグラム陰性桿菌で、脂肪酸含量やDNA中のG+C含量が高いことが知られている (Moore *et al.*, 1996; Peix *et al.*, 2007)。このサブグループにはACT001が該当する。

グループVは自然界の土壌や水環境に存在する*Stenotrophomonas*属細菌で、標準株の*Stenotrophomonas maltophilia*は42℃でも生育可能な好気性好塩性グラム陰性桿菌である (Moore *et al.*, 1997; Coenye *et al.*, 2004)。本研究の単離した細菌では、ACT041がこのグループに分類される。

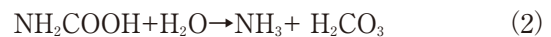
グループVIは*Staphylococcus*属細菌で、自然界や生物表皮などに存在するグラム陽性球菌である。標準株の*Staphylococcus warneri*は至適生育温度が45℃、10% NaCl培地でも生育可能であるなどの特徴を持つ (Kloos *et al.*, 1975)。本研究の単離した細菌では、

ACT039がこのグループに分類される。

以上の本研究で単離した細菌グループのうち、グループIの*Bacillus*属細菌、グループIVの*Pseudomonas*属細菌、グループVIの*Staphylococcus*属細菌については、炭酸塩形成菌として報告があるが (幸村ら, 2008)、その他のグループの細菌の炭酸カルシウム耐性に関する報告はなく、本研究による新たな知見である。

3) 分泌型炭酸カルシウム耐性微生物の炭酸カルシウム生成の検討

Hammesらによると、Ureaseを産生する微生物を用いて炭酸カルシウムを生成したとの報告がある (Hammes *et al.*, 2003)。それによると、下記の化学反応によりアンモニアの共存下 (下式5) で、炭酸カルシウムが生成する (下式6) と報告されている。



(3) および (4) 式より、



そこで、1.5M Urea, 0.5M CaCl₂を含む0.1×LB液体培地に分泌型炭酸カルシウム耐性微生物 (Asec003, Asec004, Asec005) を接種し、4℃にて静置し、白色沈殿の生成を観察した。その結果、3週間後にAsec003を接種した培地において白沈の生成が観察された (図9)。先に述べたように、Asec003は*Pseudomonas frederiksbergensis*と同定され、これまでこの細菌による炭酸カルシウム生成の報告はなされていない。一方、*Pseudomonas*属細菌による炭酸カルシウムの生成は報告例があることから (Connolly, 2013)、現段階ではこの白沈が炭酸カルシウムであるかどうかについて言及できないが、今後この細菌のUrease産生能や機能解析を行い、またこの生成した沈殿が炭酸カルシウムであることを化学分析することで、阿南市の石灰鉱山より単離したAsec003が、炭酸カルシウム生成に関与しているかを検討する予定である。



図9 分泌型炭酸カルシウム耐性微生物Asec003の尿素—カルシウム培地での沈殿生成 (1.5M Urea, 0.5M CaCl₂を含む0.1×LB液体培地)

4. まとめ

本論文では、徳島県阿南市阿瀬比の石灰鉱山から炭酸カルシウム耐性微生物をスクリーニングし、単離した細菌の16S rRNA遺伝子を解析することにより微生物の推定を行った。

まず、徳島県阿南市阿瀬比の石灰鉱山より、5種の粒径の異なる土壌試料を採取した(図2)。これらを0.5~20%炭酸カルシウムを含むLB培地にて、炭酸カルシウム耐性微生物のスクリーニングを行ない(図3, 4)、炭酸カルシウム耐性を有する25種の微生物(ACT)および低温にて増殖・分泌能を有する3種の微生物(Asec)を単離した。

次に、単離したACT25種およびAsec3種の微生物からゲノムDNAを抽出し、これらを鋳型として16S rRNA遺伝子(約1.5kbp, 図7)のPCRクローニングを行ない、それぞれDNA塩基配列決定、相同性解析(表2)および系統学的解析(図8)を行った。その結果、阿南市阿瀬比の石灰鉱山に生育する炭酸カルシウム耐性微生物は、大きく6つのグループ(I~VI)に分類され、分泌型細菌Asecは*Pseudomonas*属および*Bacillus*属細菌であり、炭酸カルシウム耐性細菌ACTは上記2属の他に、*Arthrobacter*属、*Lysinibacillus*属、*Stenotrophomonas*属、*Staphylococcus*属細菌であることが明らかとなった。さらに、分泌型Asec003では尿素-カルシウム液体培地で白沈生成が見られたことから(図9)、今回単離した炭酸カルシウム耐性細菌の炭酸カルシウム生成の可能性について、関連遺伝子・酵素等の詳細な検討を行う必要がある。

参考文献

- Andersen, S. M., Johnsen, K., Sorensen, J., Nielsen, P., Jacobsen, C. S. (2000) *Pseudomonas frederiksbergensis* sp. nov., isolated from soil at a coal gasification site, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 1957-1964.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H., Oyaizu, H. (2000) Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 1563-1589.
- Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P.F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J.L., Aragno, M. (1996) Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 degrees C). *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 5, 1723-1727.
- Chen, Y. G., Zhang, L., Zhang, Y. Q., He, J. W., Klenk, H. P., Tang, S. K., Zhang, Y. X., Li, W. J. (2011) *Bacillus nanhaiensis* sp. nov., isolated from an oyster, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **61**, 888-893.
- Coenye, T., Vanlaere, E., Falsen, E., Vandamme, P. (2004) *Stenotrophomonas africana* Drancourt et al. 1997 is a later synonym of *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 1235-1237.
- Connolly, J., Kaufman, M., Rothman, A., Gupta, R., Redden, G., Schuster, M., Colwell, F., Gerlach, R. (2013) Construction of two ureolytic model organisms for the study of microbially induced calcium carbonate precipitation, *J. Microbiol. Methods*, **94**, 290-299.
- Hammes, F., Boon, N., Villiers, J., Verstraete, W., Siciliano, S.D. (2003) Strain-Specific Ureolytic Microbial Calcium Carbonate Precipitation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 8, 4901-4909.
- Horton, R. N., Apel, W. A., Thompson, V. S., Sheridan, P. P. (2006) Low temperature reduction of hexavalent chromium by a microbial enrichment consortium and a novel strain of *Arthrobacter aurescens*, *BMC Microbiol.*, **6**, 5.
- 石田啓祐, 吉岡美穂, 岡本治香, 難波亜里子, 中尾賢一, 香西武 (2004) 徳島県産国会議事堂大理石の研究—その1. 産地と地質概要—, *徳島大学総合科学部自然科学研究*, **18**, 15-23.
- 石田啓祐, 中尾賢一, 東明省三 (2007) 徳島県産国会議事堂大理石の研究—その2. 採掘関連聞き取り調査と検証—, *徳島大学総合科学部自然科学研究*, **21**, 33-46.
- Kloos, W. E., Schleifer, K. H. (1975) Isolation and Characterization of *Staphylococci* from Human Skin. II. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus horninis*, and *Staphylococcus simulans*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **25**, 62-79.
- Koch, C., Schumann, P., Stackebrandt, E. (1995) Reclassification of *Micrococcus agilis* (Mi-Cohen 1889) to the Genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and Emendation of the Genus *Arthrobacter*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **45**, 837-839.
- Kodama, Y., Yamamoto, H., Amano, N., Amachi, T. (1992) Reclassification of Two Strains of *Arthrobacter oxydans* and Proposal of *Arthrobacter nicotinovorans* sp. nov., *Int. J. Syst. E.*, **94**, 290-299.
- Mongodin, E. F., Shapir, N., Daugherty, S. C., DeBoy, R. T., Emerson, J. B., Shvartzbeyn, A., Radune, D., Vamathevan, J., Riggs, F., Grinberg, V., Khouri, H., Wackett, L. P., Nelson, K. E., Sadowsky, M. J. (2006) Secrets of Soil Survival Revealed by the Genome Sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1, *PLoS Genetics*, **2**, 2094-2106.
- Moore, E. R. B., Maul, M., Arnscheidt, A., Bottger, E. C., Hutson, R. A., Collins, M. D., Peer, Y., Wachter, R., Timmis, K. N. (1996) The Determination and Comparison of the 16S rRNA Gene Sequences of Species of the Genus *Pseudomonas* (sensu stricto) and Estimation of the Natural Intrageneric Relationships, *System. Appl. Microbiol.*, **19**, 478-492.

- Moore, E. R. B., Kruger, A. S., Hauben, L., Seal, S. E., Baere, R. D., Wachter, R., Timmis, K. N., Swings, J. (1997) 16S rRNA gene sequence analyses and inter- and intragenetic relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*, *FEMS Microbiology Letters*, **151**, 145–153.
- Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J. M., Ramírez-Bahena, M. H., Mateos, P. F., Santa-Regina, I., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2007) Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* as a synonym of *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov., *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov. and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov., comb. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 1286–1290.
- Strong, L. C., Rosendahl, C., Johnson, G., Sadowsky, M. J., Wackett, L. P. (2002) *Arthrobacter aureescens* TC1 Metabolizes Diverse *s-Triazine* Ring Compounds, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5973–5980.
- Suresh, K., Prabakaran, S. R., Sengupta, S., Shivaji, S. (2004) *Bacillus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from an aquifer in West Bengal, India, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 733–736.
- Yoon, J. H., Lee, C. H., Oh, T. K. (2005) *Bacillus cibi* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 1369–1375.
- 幸村基世, 長沼 毅 (2008) 炭酸塩岩と微生物, *J. Environ. Biotech.*, **8**, 1, 3–7.
- Wauters, G., Charlier, J., Janssens, M., Delmée, M. (2000) Identification of *Arthrobacter oxydans*, *Arthrobacter luteolus* sp. nov., and *Arthrobacter albus* sp. nov., Isolated from Human Clinical Specimens, *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 2412–2415.

Exploration for calcium carbonate-resistant bacteria from Limestone mine, Anan city

SATOH Takanori*, HARA Masaki, HAMAJI Yui, INOUE Shouta, TAKAHASHI Shouta, NAKAYAMA Misaki, SEBE Naoyuki, MAKINO Yumiko, SAKAGUCHI Masatoshi, OHIWA Yurie, ISHIDA Keisuke.

* Laboratory of Biochemistry, Institute of Socio-Arts and Sciences, 1-1 Minami-josanjima cho, Tokushima, 770-8502 JAPAN

Proceedings of Awagakkai, No.60 (2015), pp.201–210.