

氏名	王 揚
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農 学
学位授与番号	博甲第 4 9 7 6 号
学位授与の日付	平成 2 6 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第 5 条第 1 項該当)
学位論文の題目	中等度酸性鉱山廃水中の微生物叢の解析
論文審査委員	教授 上村 一雄 教授 稲垣 賢二 准教授 金尾 忠芳

### 学位論文内容の要旨

硫化鉱石が存在する地域では、化学的酸化反応によって、 $S^0$ や $Fe^{2+}$ がこれらの鉱石から溶出される。 $S^0$ や $Fe^{2+}$ は、化学合成独立栄養細菌である硫黄酸化細菌や鉄酸化細菌によって酸化され、 $Fe^{3+}$ や硫酸を生じるため酸性の鉱山廃水が生成する。酸性鉱山廃水は、多量の二価鉄イオンと有害な金属イオンを含んでいるため、河川や湖の酸性化や重金属汚染の原因となる。そのため、日本では、酸性環境下で微生物的に鉄を三価鉄に酸化したのち、中和処理によって鉄や金属を除去する処理システムが開発され、廃水処理がなされている。微生物学的処理には pH 2 付近に最適な増殖 pH を持つ鉄酸化細菌が用いられている。一方、この細菌は前述の比較的酸性度の低い廃水の処理には適さない。そこで、pH 4 付近で鉄を酸化して増殖する鉄酸化細菌を用いた鉱山廃水処理システムの開発を目的に、これまでほとんど解析されていない pH 3 ~5 の酸性環境の微生物叢の解析とその環境中に存在する鉄酸化細菌の分離を試みた。

鉄の沈殿を含む採取試料から Soil DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出し、特異的なプライマーを用いて増幅した 16S rDNA を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法で解析した。すべての微生物の 16S rDNA が増幅できるプライマーを用いて解析した結果、独立栄養性の鉄酸化細菌と推測される *Gallionella* や *Ferrovum* に属する細菌が検出された。さらに鉄を還元し、マグネタイトを形成する従属栄養細菌 *Geobacter* や *Magnetosprillum* に属する細菌、同じく鉄還元能を持つ好酸性の従属栄養細菌である *Acidocella* 属の細菌が検出された。しかし、酸性環境の微生物叢の解析で、これまでに報告されていた *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *A. caldus*, *Leptospirillum* などの細菌は検出できなかった。*A. ferrooxidans* や *A. thiooxidans* は pH 2 付近で増殖するのに対して、*Ferrovum* はそれより高い pH 環境に適応している鉄酸化細菌であると考えられるが、この細菌は、遺伝子レベルでその存在が報告されているが、まだ純粋培養の報告はない。また、主要な微生物として検出された *Gallionella* 属の細菌は、中性の微好気環境に存在する鉄酸化細菌として報告されており、酸性環境からは純粋培養されていない。アーキア特異的なプライマーを用いて解析した結果、鉄の酸化・還元あるいは硫黄の酸化・還元との関連は不明であるが、これまでに酸性環境から検出されているアーキアとは系統分類学的に異なるアーキアが検出された。

本研究では、遺伝子 (16S rDNA) を用いた解析によって、中等度酸性環境 (pH 4 付近) に特異的に適応した鉄酸化細菌とアーキアの存在を明らかにし、休石坑道の酸性鉱山廃水中の鉄や硫黄をエネルギーとした微生物生態系を推測した。また、新たに検出された鉄酸化細菌 *Gallionella* の単離を試み、その培養方法の糸口を得た。検出された *Gallionella* や *Ferrovum* は、比較的酸性度の高くない廃水の処理に使用できる可能性があるとともに、新たな遺伝子資源として利用できる可能性を秘めていると考えている。

## 論文審査結果の要旨

本論文では、pH 4付近で鉄を酸化して増殖する鉄酸化細菌を用いた鉱山廃水処理システムの開発を目的に、これまでにほとんど解析されていないpH 3~5の酸性環境の微生物叢の解析とその環境中に存在する鉄酸化細菌の分離を試みている。

微生物叢の解析には、16S rDNAを変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法で分析する方法が用いられた。その結果、独立栄養性の鉄酸化細菌と推測される*Gallionella*や*Ferrovum*に属する細菌を検出した。さらに鉄を還元し、マグネタイトを形成する従属栄養細菌*Geobacter*や*Magnetosprillum*に属する細菌、同じく鉄還元能を持つ好酸性の従属栄養細菌である*Acidocella*属の細菌を検出した。しかし、酸性環境の微生物叢の解析で、これまでに報告されていた*A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *A. caldus*, *Leptospirillum*などの細菌が存在しないことを明らかにした。*Ferrovum*は、世界各地のpH 4付近の環境からクローンが検出されており、pH 4付近の環境に適応している鉄酸化細菌であると考えられるが、まだ純粋培養の報告はない。また、主要な微生物として検出された*Gallionella*属の細菌は、中性の微好気環境に存在する鉄酸化細菌として報告されており、酸性環境からは純粋培養されていない。また、アーキア特異的なプライマーを用いて解析した結果、これまでに酸性環境から検出されているアーキアとは系統分類学的に異なるアーキアを検出した。

本研究では、遺伝子 (16S rDNA) を用いた解析によって、中等度酸性環境 (pH 4付近) に特異的に適応した鉄酸化細菌とアーキアの存在を明らかにし、これらの微生物が、中等度酸性鉱山廃水中の鉄や硫黄の循環にどのように関わっているかを推測している。また、新たに検出された鉄酸化細菌*Gallionella*の単離を試み、その培養方法の糸口を得た。発見された*Gallionella*や*Ferrovum*は、新たな遺伝子資源としての可能性を秘めていると同時に、鉱山廃水処理の新規なシステム開発に大きく寄与する。従って、学位審査委員会は、本論文が博士 (農学) の学位に値するものであると判定した。