



岡山大学

平成 25 年度 博士論文

中等度酸性鉱山廃水中の微生物叢の解析

平成 26 年 3 月

岡山大学大学院

自然科学研究科

51422405 王 揚

目次

第 1 章 序論	1
1.1. 酸性環境の形成	エラー! ブックマークが定義されていません。
1.2. バクテリアリーチングの微生物	3
1.2.1. 鉄酸化細菌	3
1.2.2. 硫黄酸化細菌	5
1.3. 酸性環境の微生物生態系の解析	7
1.4. 中等度酸性環境の微生物の解析の意義	7
第 2 章 酸性鉱山廃水微生物叢の解析	9
2.1. 緒言	9
2.2. 実験材料と方法	9
2.3. 結果	20
2.3.1. 鉱山廃水の物理・化学的性質	20
2.3.2. 酸性鉱山水からの DNA の抽出	20
2.3.3. 鉱山廃水からの 16S rDNA の增幅	20
2.3.4. DGGE 解析	21
2.3.5. シークエンス解析	22
2.3.6. 特異的なプライマーによる解析	25
2.3.7. 古細菌特異的プライマーによる解析	30
2.3.8. 堆積物の顕微鏡観察	34
2.4. 考察	34
第 3 章 <i>Gallionella</i> の単離培養	37
3.1. 緒言	37
3.2. 実験材料と方法	38

3.3. 結果および考察	46
3.3.1. 溶存酸素グラジェント培地による培養	46
3.3.2. 褐色バンド形成に及ぼす pH の影響の検討	47
3.3.3. 褐色バンド形成に及ぼす培養日数の影響の検討	48
3.3.4. 上層培養液からの褐色バンドの分離	48
3.3.5. 褐色バンドの顕微鏡観察	49
3.3.6. DNA の抽出と PCR 分析	49式の 終わりが正しくありません。
3.3.7. 遠心沈殿管による培養	51
3.3.8. 濾紙から細菌の DNA の抽出と PCR 分析	51
3.3.9. 結論	51
第 4 章 総論	52
謝辞	55
参考文献	56

第1章 序論

1.1. 酸性環境の形成

地球を構成する元素の中で微生物がエネルギー源として利用できる無機化合物として、硫化水素 (H_2S)、元素硫黄(S^0)、チオ硫酸($S_2O_3^{2-}$)、テトラチオン酸($S_4O_6^{2+}$)などの還元型硫黄化合物、二価鉄(Fe^{2+})、アンモニア(NH_3)、亜硝酸(NO_2^-)や水素などがこれまでに知られている[1]。鉄や硫黄は、黄鉄鉱(FeS_2)、黄銅鉱($CuFeS_2$)、輝銅鉱(Cu_2S)、閃亜鉛鉱(ZnS)、方鉛鉱(PbS)などの硫化鉱石として地殻に存在している。酸素と水分が存在する酸化的な環境中では、 Fe^{3+} によって触媒される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する。 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(sulfur-oxidizing bacteria)や鉄酸化細菌(iron-oxidizing bacteria)によって酸化され、 Fe^{3+} や硫酸を生じるため、pH 2~3の酸性環境が形成される[2]。黄銅鉱 ($CuFeS_2$) を例に金属イオンの溶出機構を模式的に Fig. 1-1 に示した。黄銅鉱の銅は Fe^{3+} による強力な化学的酸化作用によって硫酸銅となって溶け出す。鉄酸化細菌は、 Fe^{2+} を Fe^{3+} に再酸化することによって、黄銅鉱から銅を酸化・溶出する触媒となる Fe^{3+} を再生成する段階で間接的に作用する。この機構は間接機構として知られているが、鉄酸化細菌が直接硫化鉱石に作用して金属イオンを溶出する直接機構も報告されている[3]。これらの作用は、バクテリアリーチング(bacterial leaching)という微生物を用いた鉱石からの銅、金、ウランなどの金属回収技術に応用されている[4, 5]。

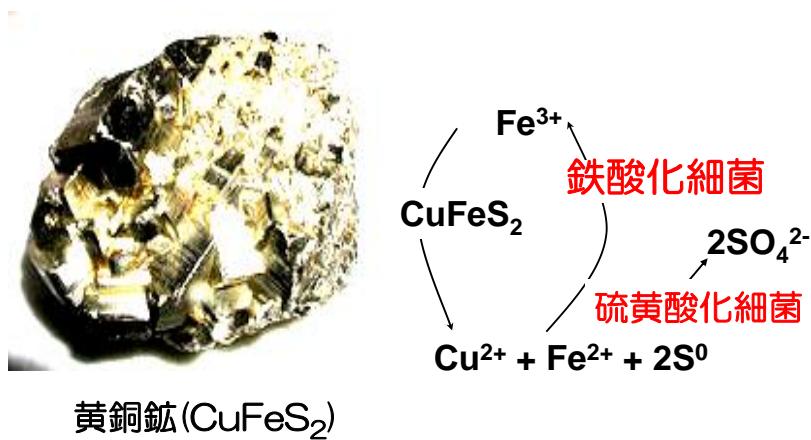
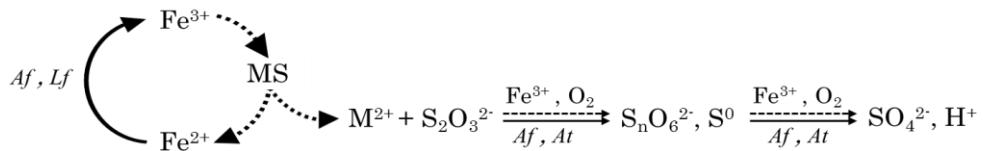


Fig. 1-1. Model for bacterial leaching catalyzed by iron-oxidizing and sulfur-oxidizing bacteria.

バクテリアリーチングについては、これまで多くの研究がそのメカニズムはほぼ解明されている[4]。バクテリアリーチング主要なメカニズムは三価鉄 (Fe^{3+}) やプロトン (H^+) が関与する化学的なプロセスによる金属溶出である。Rohwerder らは、鉱石の硫黄成分の酸化機構として、チオ硫酸の関与するチオ硫酸経路とポリサルファイドと元素硫黄の関与するポリサルファイド経路について詳細に述べている[4]。チオ硫酸酸化経路は酸に不溶な金属硫化物 (FeS_2 、 MoS_2 および WS_2) の酸化に利用され(Fig. 1-2 A)、ポリサルファイド経路は、酸可溶性金属硫化物(ZnS 、 PbS 、 FeAsS 、 CuFeS_2 および MnS_2) の酸化に利用される (Fig. 1-2 B) [6]。パイライト (FeS_2) のような金属硫化物は、三価鉄によって酸化される時、電子を受け取った三価鉄が二価鉄(Fe^{2+})に還元されて、硫黄部分がチオ硫酸として遊離する。金属硫化物がこの酸化される経路は、最初に遊離してくる硫黄化合物がチオ硫酸であるため、チオ硫酸経路と呼ばれている。この経路で生じたチオ硫酸は、テトラチオン酸 ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) などのポリチオン酸 (SnO_6^{2-}) を経て、最終的に硫酸にまで酸化される。このリーチング作用は、硫化鉱石の存在する環境では自然に生じており、特に閉山された鉱山などからは重金属を含んだ酸性鉱山廃水(acid mine drainage あるいは acid rock drainage)が流出し、河川や湖の酸性化・重金属汚染などの環境問題の原因となっている。

(A) Thiosulfate pathway



(B) Polysulfide pathway

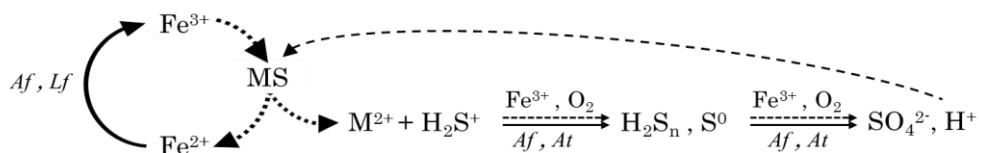


Fig. 1-2. Bioleaching processes by two different mechanisms via thiosulfate (A) and polysulfide (B).

1.2. バクテリアリーチングの微生物

1.2.1. 鉄酸化細菌

$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ に酸化した際に得られるエネルギーを用いて増殖する細菌を鉄酸化細菌という。化学合成独立栄養性の鉄酸化細菌は、二価鉄を酸化して得られるエネルギーを用いて、 CO_2 を炭素源として固定して増殖する。一方、従属栄養細菌の中にも鉄を酸化することができるものが存在する。それらの細菌は、鉄を酸化してエネルギーを獲得するが、酵母エキスのような有機物を炭素源に用いる。 Fe^{2+} は、pH 5以上になると酸素によって自動的に酸化されて Fe^{3+} に変換される。従って、鉄酸化細菌の多くは、 Fe^{2+} が安定に存在する環境、すなわち pH 5以下の酸性環境、あるいはそれ以上の pH では酸素の極めて少ない環境でないと生息できないことになる。Table 1-1 にこれまでに鉄を酸化して増殖することが確認されているいくつかの鉄酸化細菌を示した。鉄酸化活性を持つ好酸性の細菌は、系統分類学的に幅広い属の細菌を含んでいる。

酸性鉱山廃水やリーチングプラントから容易に分離できる最も代表的な鉄酸化細菌は、*Acidithiobacillus(At) ferrooxidans* である。この細菌は、 Fe^{2+} 以外に無機硫黄化合物や黄鉄鉱 (FeS_2) でも生育できることから、微生物による硫化鉱石からの金属溶出の機構を説明するためのモデル微生物として使用され、極めて多くの生理的・遺伝的な研究が行われてきた。これまでに分離されている *At. ferrooxidans* は、40°C 以上および pH 1.3以下の酸性環境では増殖できない。鉄と硫黄化合物の両方を酸化することができるという性質に加えて、この細菌は、高濃度の重金属(300 mM 以上の Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} など)の存在下で増殖可能である。バクテリアリーチングでは、硫化鉱石に含まれている重金属が溶出する。したがって、このような環境下で鉄を酸化して増殖するためには、重金属耐性は不可欠であり、この性質は *At. ferrooxidans* が高濃度の重金属環境へ適応してきた結果と考えることができる。なお、*At. ferrooxidans* には、窒素固定能があることが報告されている。

1972年に銅鉱山の酸性鉱山廃水から *At. ferrooxidans* と異なる鉄酸化細菌が分離され、*Leptospirillum(L)*と名づけられた。この細菌は、鉄は酸化することができるが、硫黄化合物を酸化することができない。しかし、*At. ferrooxidans* と異なり、 Fe^{2+} に対する親和性が非常に高く(*At. ferrooxidans* が 500 mg/l 以上を好むのに対して、10 mg/l でも良好に増殖する)、40°C以上でも増殖できる。これまで *L. ferrooxidans* と *L. ferriphilum* の2種が知られていた[7]。16S rDNA を用いた酸性鉱山廃水の微生物生態系の解析によって、この属に分類される新たな種の存在が示唆されていたが、その正体が明らかにされ、*L. ferrodiazotrophum* と命名された[8]。その他に、鉄や硫黄化合物を食べながら独立栄養的に、またグルコースを酸化して従属栄養的にも生育できる中温性(40~60°C)のグラム陽性の細菌である *Sulfobacillus* 属の細菌や、鉄を酸化するが従属栄養性の *Acidimicrobium ferrooxidans* などがいる。

Table 1-1. Iron- and sulfur-oxidizing bacteria and archaea.

Gram positive bacteria	Gram positive bacteria	Arcaeae
Iron-oxidizing bacteria		
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	<i>Ferroplasma acidiphilum</i>
<i>L. ferriphilum</i>		<i>F. acidarmanus</i>
<i>L. ferrodiazotrophum</i>		
<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>		
Sulfur-oxidizing bacteria		
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	<i>Sulfobacillus disulfidooxidans</i>	<i>Sulfolobus hakonensis</i>
<i>At. caldus</i>		<i>S. yangmingensis</i>
<i>Thiomonus cuprina</i>		<i>Metallosphaera</i> spp.
<i>Hydrogenobacter acidophilus</i>		
Iron and sulfur oxidizing bacteria		
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	<i>Sulfolobus metallicus</i>
<i>Thiobacillus prosperus</i>	<i>Sb. thermosulfidooxidans</i>	<i>Acidianus brierleyi</i>
	<i>Sb. monterratensis</i>	
	<i>Alicyclobacillus</i> spp.	

好酸性の古細菌として最初に分離されたのが、*Sulfolobus acidocaldarius* である。この属の古細菌は、60°C以上の環境で、無機硫黄化合物を食べながら独立栄養的に、また酵母エキスのような複合基質や糖、アミノ酸を食べながら従属栄養的にも増殖する[9]。*Sulfolobus* 属の細菌で、鉄や黄鉄鉱を食べながら生育できる *S. metallicus* は、高温環境下でのバクテリアリーチングで中心的な役割を演じることになる。比較的最近、鉄を酸化する古細菌が新たに発見され、*Ferroplasma*(F)と命名された[10]。この属の細菌は細胞壁を持たず、pH 0 でも生育できる。鉄や黄鉄鉱は酸化することができるが、硫黄化合物は食べない。*Acidianus* 属の細菌は、一般的に、好気条件下では S⁰ を SO₄²⁻ に酸化し、嫌気条件下では H₂ で S⁰ を H₂S に還元して増殖する硫黄酸化・還元細菌である。その中で *Acidianus brierleyi* は、Fe²⁺ と硫黄を酸化して独立栄養

的に、また、様々な有機基質培地で従属栄養的にも生育できる[8]。

1.2.2. 硫黄酸化細菌

S^0 、 H_2S 、 $S_4O_6^{2-}$ 、 $S_2O_3^{2-}$ 、 SO_3^{2-} などの無機硫黄化合物を酸化して、独立栄養的あるいは従属栄養的に増殖する微生物を硫黄酸化細菌という。硫黄酸化細菌は、酸性からアルカリまでの広い pH 域に生息している[10]。その中で好酸性の硫黄酸化細菌の主なものを Table 1-1 に示した。

Fig. 1-3 に示したように鉄酸化細菌 *At. ferrooxidans* と同じ属に、絶対独立栄養性の *At. thiooxidans* と *At. caldus* が存在する。*At. thiooxidans* は、分離された好酸性の細菌の中で最も古いものの一つで、pH 0.5～5.5 の範囲で無機硫黄化合物を食べながら生育する。35°C以上では増殖できない。*At. thiooxidans* と同定されたものの中に 40°Cあるいはそれ以上の温度でも増殖できる比較的耐熱性の細菌が含まれていた。最適増殖温度の違いを除いては生理的性質が *At. thiooxidans* と類似しているが、52°Cあるいはそれ以上の温度でも生育できる硫黄酸化細菌が、*At. caldus* として新たに分類された[12]。*At. thiooxidans* と *At. caldus* は、16S rDNA の塩基配列も類似しているため (Fig.1-3)、バクテリアリーチング環境や酸性鉱山廃水中の *Acidithiobacillus* 様の硫黄酸化細菌は、*At. thiooxidans* と考えられていた。しかし、最近では *At. caldus* が優勢な硫黄酸化細菌である酸性環境が多いことがわかつてきた。

これまでに知られている好酸性の硫黄細菌の中で最も高温で生息できるのが、*Hydrogenobacter acidophilus* である。この細菌は、中等度高温性の *At. caldus* (40～50°C) と異なり、低い pH 環境では生育できないため (最適増殖 pH が 3～4) バクテリアリーチング環境や強酸性の鉱山廃水中では優勢ではない。また、*Thiomonas* 属の多くの種は一般に好酸性ではないが、*Thiomonas cuprina* が好酸性の種として知られており、 S^0 や黄鉄鉱を酸化する。pH 3 付近では生育できるが、pH 2 では増殖できない。従って、この細菌もバイオリーチング環境や酸性鉱山排水中では優勢ではない。その他に、硫黄を酸化するために酵母エキスのような有機物を必要とする *Alicyclobacillus* 属の細菌もある。

Sulfolobus や *Acidianus* 属の古細菌が硫黄を酸化して生育できることは、鉄を酸化する古細菌の項で述べた。その他に、*Metallosphaera* (*M*) 属の古細菌は、元素硫黄、硫化鉱石や水素を食べながら独立栄養的に、あるいは酵母エキスのような有機基質を酸化して従属的に生育する。*M. sedula* は、80°Cの好気的条件下で FeS_2 、 $CuFeS_2$ 、 ZnS などの硫化金属から金属を溶出させることができる。高温の酸性鉱山廃水が生成される現場では、この古細菌が主役となりそうであるが、この古細菌の性質はよくわかつていない。

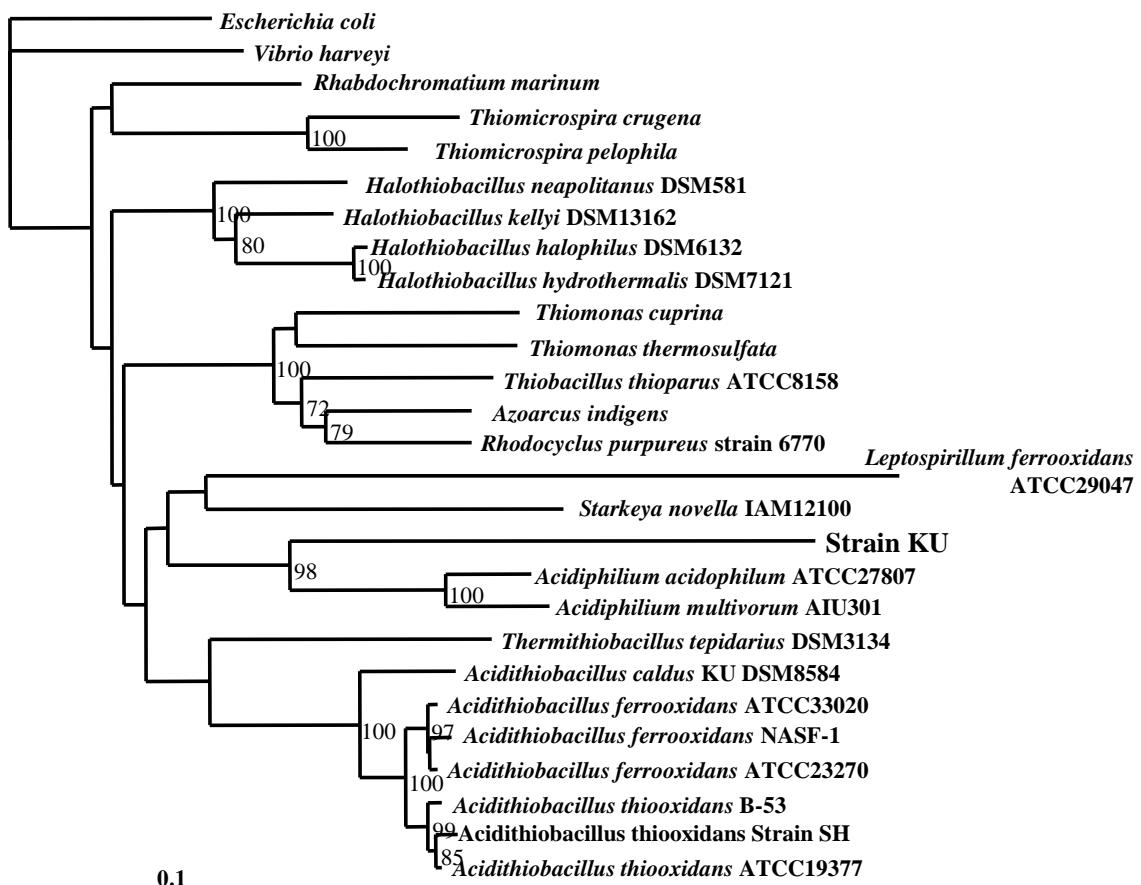


Fig. 1-3. Phylogenetic relationship of acidophilic bacteria.

1.3. 酸性環境の微生物生態系の解析

環境中の微生物生態系を解析する手法として、培養による方法と DNA 等の解析による方法がある。しかし、環境中の微生物の大部分が培養困難であることが明らかになってきているので、培養に基づく微生物生態系の解析には限界があることは明らかである。微生物に特異的なオリゴヌクレオチドを用いる *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH 法) や環境から抽出した DNA を用いて微生物生態系を解析する手法は、その限界を打ち破るものである。多くの微生物種が酸性環境下で生息しているが、その種類はほかの環境に比べて少ないほうである。酸性鉱山廃水中の微生物生態系が DNA 主に 16S rDNA で解析された結果、これまで中心的な役割を演じていると考えられていた *At. ferrooxidans* が、鉱石から Fe²⁺ の溶出や硫酸生成が起こっている環境であるにもかかわらず、場合によってはほとんど検出されず、*L. ferrooxidans* が優勢である環境が多く存在することが報告された [13, 14, 15, 16, 17]。さらに、Fe²⁺ が酸化されている（鉄酸化細菌が存在すると考えられる）強酸性環境下 (pH 1.3 以下) で、それまでに鉄酸化細菌として知られていた *At. ferrooxidans* や *L. ferrooxidans* がほとんど検出されず、古細菌特有のプローブによって検出される微生物が高い濃度で存在することも明らかとなった [13]。好酸性で鉄酸化能を持つ古細菌として、それまでは *Acidianus* 属や *Sulfolobus* 属の古細菌が知られているのみであったが、細胞壁を持たない *Thermoplasma* 科に属する古細菌が新たに発見された [14]。*Ferroplasma* と命名されたこの細菌は、高濃度の Fe²⁺ や重金属に耐性を持っていた。鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌の研究は、50 年以上の古い歴史を持っているが、*Ferroplasma* の発見は、硫化鉱石を食べながら酸性環境を作り出す微生物に関するこれまでの固定概念を大きく変えるものであった。分離には従来の方法に少し工夫を凝らした方法が用いられたが、この細菌の発見は、FISH 法や 16S rDNA の解析といった分子生物学な手法を導入することによって初めて成し遂げられたものである。古典的な培養手法だけではこの古細菌は決して分離されなかったかもしれない。このように、16S rDNA を用いた微生物生態系の解析は、そのデータがきわめて豊富なことから、主要な解析手法となっている。

1.4. 中等度酸性環境の微生物の解析の意義

バクテリアリーチングは、鉱石から有用金属を回収する技術として古くから使用されている。そのため、リーチング環境の微生物生態系の解析に関する報告は極めて多い。また、さらに強酸性の環境中の微生物についても、新たに *Ferroplasma* が発見されたように、特殊環境下の微生物機能の利用の観点から、精力的に研究がされている。しかし、中等度酸性環境 (pH 3~5) の微生物生態系の解析は極めて少ない。これは、リーチング環境の pH が一般に 1.5~2.5 であることに起因し、リーチング効率の改善のために、その環境の生態系の解析に重点が置かれたことによるのかもしれない。

ない。しかし、自然環境中には、中等度酸性環境は普遍的に存在し、特殊な微生物がその環境に適応して生息しているものと考えられる。そこで、本研究では、岡山県柵原鉱山近辺の中等度酸性の鉱山廃水中の微生物生態系を 16S rDNA によって解析することとした。

第2章 酸性鉱山廃水微生物叢の解析

2.1. 緒言

鉄や硫黄は、黄鉄鉱 (FeS_2)、黄銅鉱 (CuFeS_2)、輝銅鉱 (Cu_2S)、閃亜鉛鉱 (ZnS)、方鉛鉱 (PbS) などの硫化鉱石として地殻に存在している。酸素と水が存在する酸化的な環境中では、 Fe^{3+} によって触媒される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 (sulfur-oxidizing bacteria) や鉄酸化細菌 (iron-oxidizing bacteria) によって酸化され、 Fe^{3+} や硫酸を生じるため、pH 2~3 の酸性環境が形成される[2]。

岡山県の北西部にある柵原鉱山は、かつて東洋一の黄鉄鉱の産出量を誇っていた鉱山である。戦後は化学肥料（硫安）の原料として、高度成長期には化学工業に必要な硫酸の原料として、鉱石が利用されていた。現在は廃鉱となっているが、地下の鉱床には未だに黄鉄鉱が残存しており、地下水が滲み出すことによって、酸性鉱山廃水が流出している。酸性鉱山廃水は、前述のように、鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌の作用で生成する。これまでに、*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *L. ferriphilum*, *Ferrimicrobium acidiphilum*, *Acidimicrobium ferrooxidans* や *Ferroplasma acidiphilum* などの鉄酸化細菌や *Acidithiobacillus thiooxidans*, *At.caldus*、*Hydrogenobacter acidophilus*、*Sulfobacillus disulfidooxidans*、*Sulfolobus hakonensis* などの硫黄酸化細菌が、酸性鉱山水の形成に関与していることが報告されている[18]。我々は、柵原鉱山の酸性鉱山廃水処理システム中の微生物相の解析を行ってきた。処理システムからは鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* や *A. thiooxidans* が検出されたが、鉱山廃水からは、鉄酸化に関する微生物は検出されず、酸性鉱山廃水の形成に関する微生物を特定することはできなかった[19, 20]。柵原鉱山の酸性廃水の pH は 4 付近であり、これまでに報告されている酸性鉱山廃水と比較して、酸性度は高くない。従って、柵原鉱山の酸性排水がどのような機構で形成されるかを明らかにすることは、酸性水の生成の防止方法の開発や、処理システムの維持・管理方法の検討にとって重要である。また、鉱山廃水の生成に関する新たな鉄酸化細菌の分離は、新たな鉄酸化物の材料の開発にもつながると考えられる。そこで本研究では、柵原鉱山の酸性鉱山廃水の微生物群集を 16S rDNA を用いて解析し、酸性水の形成に関する微生物を明らかにすることとした。

2.2. 実験材料と方法

2.2.1. 試料

黄鉄鉱(FeS_2)を産出していた岡山県久米郡美咲町柵原鉱山の坑道から流れる酸性鉱山水を試料とした。休石坑道は、Fig. 2-1 および Fig. 2-2 に示すように、柵原鉱山

の主坑道に近くにあり、吉井川からの河川水の混入が無い場所である。酸性の鉱山廃水は Fig. 2-3 に示したように洞窟の岩の隙間から流れ出ており、坑道口入口に溜まっている。Fig. 2-3B に示した場所から、赤色の沈殿物を含んだ廃水を採取して、分析試料とした。試料の採取時期は、2009 年 7 月（夏 DNA）であり、pH は 4.7 で、水温は 23°C であった。

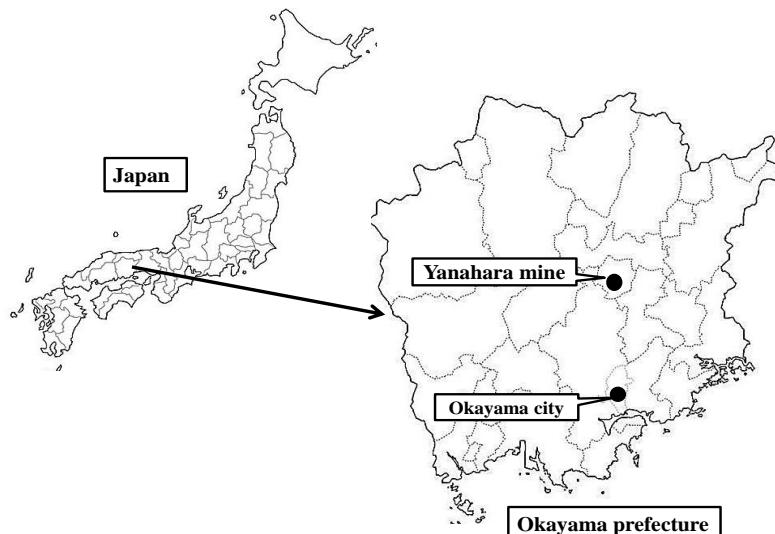


Fig. 2-1. Location of sampling site of acid mine drainage.

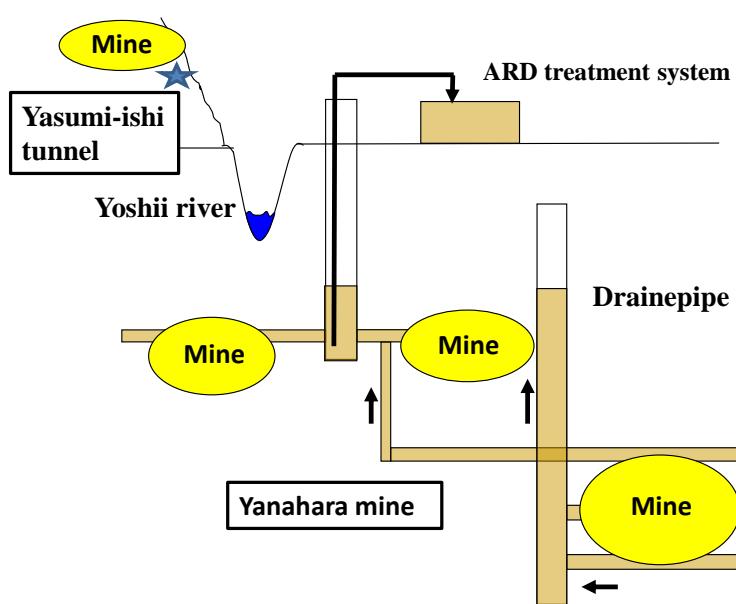


Fig. 2-2. Location of Yasumi-ishii tunnel in Yanahara mine.



Fig. 2-3. Photographs of a sampling site (Yasumiishi tunnel). A, Yasumiishi tunnel; B, ARD seeps through the hole of tunnel. Precipitates of iron hydroxides are formed in the pond.; C, arrows indicate the hole from which ARD sample for an analysis of physicochemical properties was collected; D, RAD-containing sediments were collected to analyze microbial community structure.

2.2.2. 酸性鉱山水からの細菌の調製（その1）

酸性鉱山水は、静置すると鉄の沈殿を生じる。この沈殿を一度再懸濁し、再び静置することによって鉄を沈殿させてから、その上清およそ 4 L を、1,000 rpm で 2 分間遠心分離して、処理水に含まれる鉄を沈殿させた。上清を回収し、7,000 rpm で 10 分間遠心した。沈殿物を DW に懸濁し、10,000 rpm で 10 分間遠心分離して、上清を取り除いた。沈殿物を DW に再懸濁し、10,000 rpm で 10 分間遠心分離して、上清を取り除き、沈殿を洗浄菌体とした。調製方法の概略を Fig. 2-4 に示した。

2.2.3. シュウ酸アンモニウム処理した試料からの菌体の調製（その2）

酸性鉱山水の沈殿は一度再懸濁し、再び静置することによって鉄を沈殿させてから、その沈殿およそ 5 ml に 5 ml の 0.3 M シュウ酸アンモニウムを加え、10,000 rpm で 10 分間遠心分離して、上清を取り除いた。沈殿物を再びシュウ酸アンモニウムに懸濁し、氷上に 20 分間静置したのち、10,000 rpm で 10 分間遠心分離して、上清を取り除いた。上述の手順は 4 回繰り返したのち、沈殿物を DW に懸濁し、氷上に 20 分

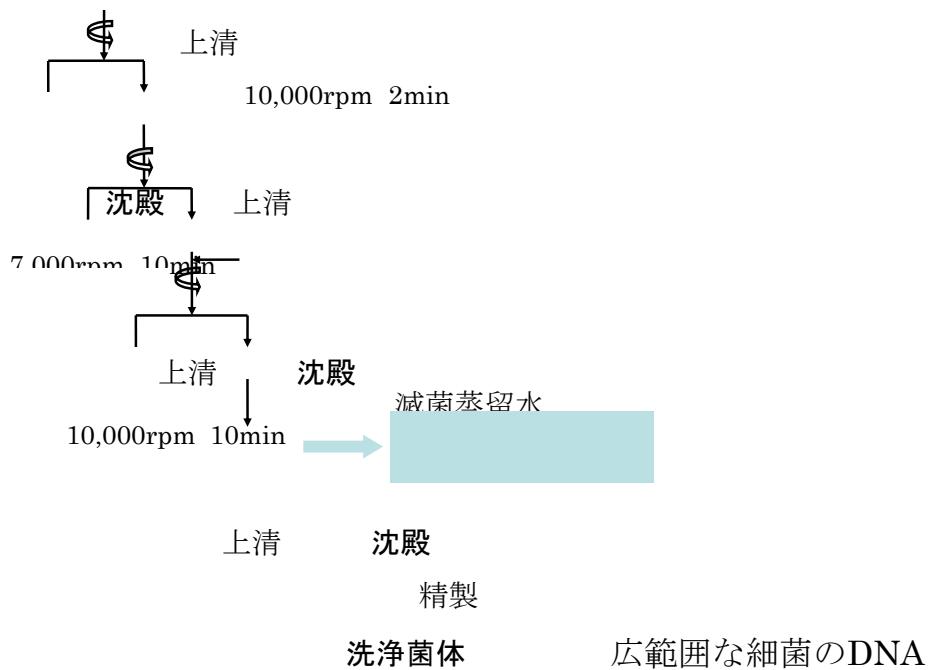


Fig. 2-4 Preparation of bacteria from acid mining water.

間静置したのち、10,000 rpm で 10 分間遠心分離して、上清を取り除いた。上述の手順は 3 回繰り返した。沈殿を洗浄菌体とした。

2.2.4. DNA の抽出

回収した菌体からの DNA の抽出には UltraClean™ Soil DNA Kit (TMO BIO) を用いた。Bead Solution tube に酸性鉱山水の洗浄菌体を加え、Voltex でよく懸濁した。60 µl の Solution S1 を加えて数回チューブを転倒混和し、200 µl の Solution IRS を加え、Voltex では最大スピードで 10 分間攪拌した。12,000 rpm で 30 秒間遠心分離し上清を新しい遠心チューブに移した。250 µl の Solution S2 を加え、Voltex で 5 秒間攪拌し、4°Cで 5 分間静置したのち、12,000 rpm で 1 分間遠心分離した。沈殿を取らないようにし、上清を新しい遠心チューブに移し、1.3 ml の Solution S3 を加えて Voltex で 5 秒間攪拌し、約 700 µl をスピンドルフィルターに乗せて 12,000 rpm で 1 分間遠心を行った。ろ液を捨てて、スピンドルフィルターに 300 µl の Solution S4 を加え、12,000 rpm で 30 秒間遠心を行った。ろ液を捨て、さらに 12,000 rpm で 1 分間遠心を行った後、スピンドルフィルターを新しいチューブに取り付け、50 µl の Solution S5 をフィルター膜の中央に加えた。12,000 rpm で 30 秒間遠心を行い、スピンドルフィルターを除去し、ろ液中に含まれる DNA を -20°Cで保存した。

2.2.5. PCR 法による 16S rDNA の増幅

酸性鉱山水から抽出、精製した DNA を鋳型に用いて、16S rDNA を PCR によって増幅させた。PCR に用いたプライマーは、全細菌を対象とする 16S rDNA 全長 27F-1492R プライマーセット及び塩基配列が決定されている大腸菌(*Escherichia coli*)の 16S rDNAにおいて保存性の高い領域を選択して合成した Forward primer 341F-GC (*E. coli*のヌクレオチド番号 : 341)、と Reverse primer 518R-DGGE (518) を用いた。まず、Forward primer 27F と Reverse primer 1492R を用いて、Touch Down 法によって長さ約 1465bp の断片を増幅し（1段階目）、この PCR 産物を鋳型にして Forward primer 341F-GC と Reverse primer 518R-DGGE を用いて長さ約 217bp の断片を増幅した（2段階目）。

増幅した PCR 産物は 3%アガロースゲル上で電気泳動により確認した。泳動バッファーは、Tris-acetate EDTA (TAE) バッファー[40 mM Tris, 40 mM acetate, 1 mM EDTA (pH 8.0)]を用いた。分子量マーカーとして、100bp DNA ladder marker(Bio Labs)を用いた。

それぞれの PCR の反応溶液組成、反応条件および使用したプライマーの塩基配列組成は、下記に示したとおりである。

<1段階目の PCR 反応液組成>

AmpliTaq buffer	5.0 μ l
10 mM Forward primer 27F	0.5 μ l
10 mM Reverse primer 1492R	0.5 μ l
Template DNA	1.0 μ l
滅菌蒸留水	3.0 μ l
Total Volume	10.0 μ l

<1段階目の PCR 反応条件>

95°C	10 min	1 cycle
95°C	15 sec	
55°C	15 sec	30 cycles
72°C	1 min	
72°C	7 min	1 cycle

＜2段階目のPCR反応液組成＞

AmpliTaq buffer	5.0 μ l
10 mM Forward primer 341F-GC	0.5 μ l
10 mM Reverse primer 518R-DGGE	0.5 μ l
Template DNA	1.0 μ l
滅菌蒸留水	3.0 μ l
Total Volume	10.0 μ l

<2段階目のPCR反応条件>

95°C	10 min	1 cycle
95°C	15 sec	
55°C	15 sec	30 cycles
72°C	30 sec	
72°C	7 min	1 cycle

<16S rDNA の增幅に用いたプライマー>

Primer	Sequence (5'-3')	Tm(°C)
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	59
1492R	TACGGYTACCTTGTACGACTT	48
341F-GC	GC clump* CCTACGGGAGGCAGCAG	103
518R-DGGE	ATTACCGCGGCTGCTGG	67

*GCclump:CGCCCGCCGCGCCCCGGCGCCCGTCCCGCCGCCCGCCCCG

2.2.6. PCR 産物のエタノール沈殿

PCR 産物を DGGE に供試するため、PCR 産物の 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム溶液及び 2 倍量の 100% 冷エタノールを加え、均一になるまでよく混ぜて、氷上で 2~10 分間静置したのち、12,000 rpm、10 分間の遠心分離を行った。核酸の沈殿を確認したのち、上清を捨て、沈殿に 70% 冷エタノールを 500 μ l 加え軽く振り、12,000 rpm、5 分間の遠心分離によって得た沈殿を乾燥させて滅菌水 10 μ l に懸濁し、DGGE に供試した。濃縮産物のうち 0.5 μ l をとり、滅菌水で 20 倍に希釈して、3% アガロースゲルでの電気泳動により濃度を確認した。泳動バッファーは、TAE バッファーを用い、

分子量マーカーとして、100bp DNA ラダーマーカー(Bio Labs)を用いた。

2.2.7. DGGE 解析

DGGE に用いる 10% アクリルアミドゲルを作成した。その組成は、下記に示した通りである。変性剤(Urea と Formamide)の濃度勾配は経験的に決定し、16S rDNA では 30-60% が最適であった。DGGE は D-Code System (Bio-Rad) を用いて行なった。サンプルは 10.0 μ l の PCR で増幅させた DNA を用いて、等量の 2×loading バッファーにより loading した。7 L の 0.5×TAE バッファー [20 mM Tris, 10 mM Acetic acid, 0.5 mM EDTA(pH 8.0)] 中で温度を 60°C に設定し、定電圧 130 V で 12 時間泳動した。その後、ゲルを取り出し 10 ml の滅菌蒸留水に SYBR Green I (Cambrex Bio Science Rockland, Inc. USA) を 10 μ l 加えたもので 10 分間染色し、トランスイルミネータで発光させ、写真撮影を行なった。

<10% アクリルアミド変性剤濃度勾配ゲル組成>

変性剤濃度	30%	60%
40% Acrylamide/ Bis (37.5:1)	5.0 ml	5.0 ml
50×TAE buffer	400 μ l	400 μ l
Formamide	2.4 ml	4.8 ml
Urea	2.52 g	5.04 g
TEMED	18 μ l	18 μ l
Dye Solution*	—	400 μ l
滅菌蒸留水	to 20 ml	to 20 ml

ゲル作成直前に 10% 過硫酸アンモニウム 50 μ l を加える。

*0.5% Bromophenol blue, 0.5% Xylene cyanol, 1×TAE バッファー

2.2.8. PCR による DGGE ゲルに得た DNA の増幅

DGGE ゲル上の主要な DNA バンド計 12 本を切り出し、25 μ l の滅菌水で抽出した DNA 断片を鋳型に用いて 16S rDNA を PCR によって増幅させた。PCR に用いたプライマーは塩基配列が決定されている *E. coli* の 16S rDNA において保存性の高い領域を選択して合成した Forward primer 341F-GC (*E. coli* のヌクレオチド番号：341) と Reverse primer 518R (518) を用いた。反応溶液組成、反応条件および使用したプライマーの塩基配列は下記に示した通りである。

<PCR 反応液組成>

AmpliTaq buffer	5.0 μ l
10 mM Forward primer 27F	0.5 μ l
10 mM Reverse primer 1492R	0.5 μ l
Template DNA	1.0 μ l
滅菌蒸留水	3.0 μ l
Total Volume	10.0 μ l

<PCR 反応条件>

95°C	10 min	1 cycle
95°C	15 sec	
55°C	15 sec	30 cycles
72°C	30 sec	
72°C	7 min	1 cycle

<16S rDNA の增幅に用いたプライマー>

Primer	Sequence (5'-3')	Tm(°C)
341F-GC	GC clump*CCTACGGGAGGCAGCAG	103
518R-DGGE	ATTACCGCGGCTGCTGG	67

*GCclump:CGCCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCC GCCGCCCCGCCCCG

2.2.9. シーケンス解析

PCRによって増幅したDNAの濃度検定には3%アガロースゲル電気泳動法を用いた。泳動バッファーは、1×TAE バッファーを用い、分子量マーカーとして、100bp DNA ラーダーマーカー(Bio Labs)を用いた。マーカーの濃度は4.5 ng/ μ lで、電気泳動後、UV 照射時におけるマーカーのバンドの蛍光度とサンプルの蛍光度とを視覚で比較し、サンプルのDNAの濃度を決定した。

PCR 産物からプライマーやその他の余分な成分を取り除くために、illustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)を用いて抽出・精製した。PCR 産物に1/5量の6×試料用バッファーを加え、3%アガロースゲル上で電気泳動をし、目的のバンドをゲルから切り出した。切り出したゲルは1.5 ml チューブに入れ、ゲルの重さを測定した後、ゲル 10 μ gあたり 10 μ l のCapture buffer

type2 を加えた。60°Cのウォーターバス中で時々攪拌し、ゲルを完全に溶解させた。GFX MicroSpin™ column と Collection tube を組み立て、溶液 600 μl を MicroSpin™ column に乗せて 60 秒間室温放置したのち、13,200 rpm で 30 秒間遠心を行った。ろ液を捨て、500 μl の Wash buffer type1 を加え、13,200 rpm で 1 分間遠心を行った。ろ液を捨て、さらに 13,200 rpm で 1 分間遠心を行い、カラム内に残留するエタノールを除去した。MicroSpin™ column を DNase-free の 1.5 ml チューブに移し、10 μl の Elution buffer type6 を加え、60 秒間室温で放置した後、13,200 rpm で 1 分間遠心を行い、ろ液を精製 DNA とした。その後、回収した DNA の濃度検定を 3%アガロースゲル電気泳動により行なった。

回収した DNA の塩基配列を決定するために、ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Pty Ltd.)および 341F primer を用いた。反応産物 10 μl につき、125 mM EDTA を 2.5 μl 加え混合し、100% 冷エタノールを 30 μl 添加した。よく混合し、15 分間室温放置した後、13,200 rpm, 15 分間の遠心を行った。上清を捨て、沈殿に 70%冷エタノールを 60 μl 添加し、13,200 rpm, 15 分間の遠心を行った。上清を捨て、アスピレーターで減圧乾燥し、ホルムアミド HiDi 15 μl に溶解させ、遮光し 4°Cで保存した。シークエンスの直前に 98°Cで 5 分間インキュベート後、急冷し、供試した。シークエンサーは、ABI PRISM™ 3130NT Genetic Analyzer (Applied Biosystems Co.,Ltd.)を用いた。

シークエンスに用いた反応溶液組成、反応条件および使用したプライマーの塩基配列は下記に示したとおりである。

<シークエンス反応の反応液組成>

5×Sequencing Buffer	0.5 μl
Cycle Sequencing Mix	1.75 μl
3.2 pmol Forward primer 341F	1.0 μl
Template DNA	5.0 μl
滅菌蒸留水	1.75 μl
Total volume	10.0 μl

<シークエンス反応の反応条件>

96°C	1 min	1 cycle
96°C	10 sec	
50°C	5 sec	30 cycles
60°C	4 min	

<シーケンス反応に用いたプライマー>

Primer	Sequence (5'-3')	Tm(°C)
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	103

2.2.10. 16S rDNA 塩基配列に基づく微生物の同定

シークエンスによって決定された 16S rDNA の塩基配列を用いて、Blast 解析 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を行い、微生物を同定した。

2.2.11. 特異的なプライマーによる 16S rDNA の増幅

酸性鉱山水の中の特定の微生物を検出するため、*Acidithiobacillus ferrooxidans* 、 *Acidiphilium* 、 *Archaea* 、 *Acidithiobacillus caldus* 、 *Leptospirillum* 、 *Sulfobacillus* 、 *Acidithiobacillus thiooxidans* に特徴的な 16S rDNA 部位を用いて 7 対プライマーを設計した。夏に採取した試料から調製した DNA および、その DNA を使って 27F-1492R のプライマーを用いて増幅した 16S rDNA を鋳型に用いて、それぞれのプライマーを用いて特定な 16S rDNA 領域を PCR 増幅した。PCR の反応溶液組成、反応条件および使用したプライマーの塩基配列は下記のとおりである。

<PCR 反応液組成>

AmpliTaq buffer	5.0 µl
10 mM Forward primer	0.5 µl
10 mM Reverse primer	0.5 µl
Template DNA	1.0 µl
滅菌蒸留水	3.0 µl
Total Volume	10.0 µl

<主要な細菌の確定ために 7 対 Primer>

Group specificity	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')
<i>At.ferrooxidans</i>	FERR1473R	TACCGTGGTAACCGCCCT
<i>At.ferrooxidans</i>	FERR458F-GC	GGGTTCTAATACAATCTGCT
<i>Acidiphilium</i>	ACIDO1150R	AGAGTGCCCACCCAAACAT
<i>Acidiphilium</i>	ACIDO594F-GC	ACAGTCAGGCGTGAAATTCTG
Archaea	ARC519R	TTACCGCGGCKGCTG
Archaea	ARC344F-GC	ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA
<i>At. caldus</i>	CALD1475R	TATAACGTGGTCGTCGCC
<i>At. caldus</i>	CALD460F-GC	ATTACGGTCTGCTACCGAA
<i>Leptospirillum</i>	LEPTO679R	AAATTCCGCTTCCCTCTCC
<i>Leptospirillum</i>	LEPTO176F-GC	CGAATAGTATCCGGTTCCG
<i>Sulfobacillus</i>	SULFO606R	AAACCGCTACGTATCGCAC
<i>Sulfobacillus</i>	SULFO170F-GC	CAATCCGCATACGTTCC
<i>At.thiooxidans</i>	THIO1473R	TACCGTGGTCATGCCCT
<i>At.thiooxidans</i>	THIO458F-GC	GGGTGCTAATAWCGCCTGCTG

*GC clump: CGCCCCGCCGCGCCCCCGGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCG

2.3. 結果

2.3.1 鉱山廃水の物理・化学的性質

柵原の鉱山廃水の生成に関与している微生物を明らかにするため、柵原鉱山の主坑道から鉱山廃水を採取して、その微生物叢を解析した結果、鉱山廃水には吉井川の河川水の混入が推測され、酸性環境での生息が報告されていない微生物が主要な微生物として検出された。従って、本研究では吉井川の河川水の影響がないと考えられる石水坑道からの試料を分析に用いた。物理化学的性質を Table 2-1 に示した。pH は柵原鉱山の主坑道の排水と同様に中程度の酸性であった。主坑道の排水中の鉄含量が 1200 mg/ml であったのに対して休石坑道の排水の鉄含量は非常に低かった。

Table 2-1. The composition of the ARD sample of Yasumi-ishii tunnel.

pH	Total Fe	Total N	Cu	Zn	Ca	Mn	Cd	Pb	As	Se
4.2	51	0.45	0.16	0.38	55	0.99	ND	ND	ND	ND

All concentrations are in mg/L.

ND, not detected.

2.3.2. 酸性鉱山廃水からの DNA の抽出

酸性鉱山水中の微生物の多様性を解析するために DNA を前で述べた方法により回収し、抽出した DNA を 3%アガロースゲル電気泳動で確認した。その結果を Fig. 2-5 に示した。

シュウ酸アンモニウム処理によって、鉄の沈殿物に吸着している細菌が回収できるとの報告があるが、回収された DNA は、無処理のものより量的に少なかった (Fig. 2-5, レーン 2)。

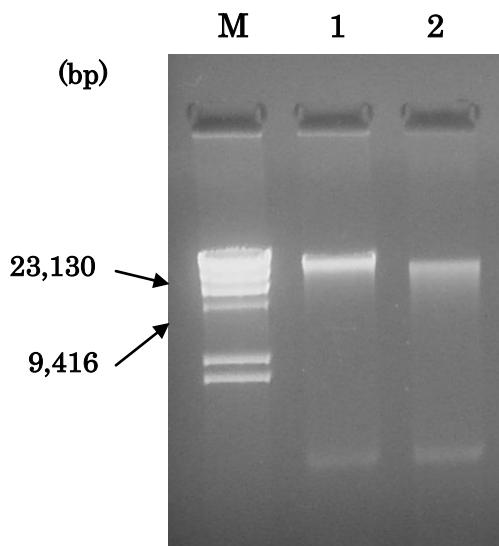


Fig. 2-5. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from acid mine water of Yasumi-ishii tunnel.
Lane M; λ -HindIII digest, Lane 1; DNA extracted UltraClean Soil DNA Kit, Lane 2; DNA extracted from samples treated with ammonium oxalate.

2.3.3. 鉱山廃水からの 16S rDNA の增幅

プライマー 341F-GC と 518R-DGGE を用いて、PCRを行った。最終的に長さ約 200bp の断片を增幅し、エタノール沈殿法により濃縮した。3%アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の増幅を確認した。

図 3-2 に示したように、通常の方法で抽出した DNA、シュウ酸アンモニウム処理した試料から抽出した DNA を鋲型にした場合 2 本のバンドが増幅された。

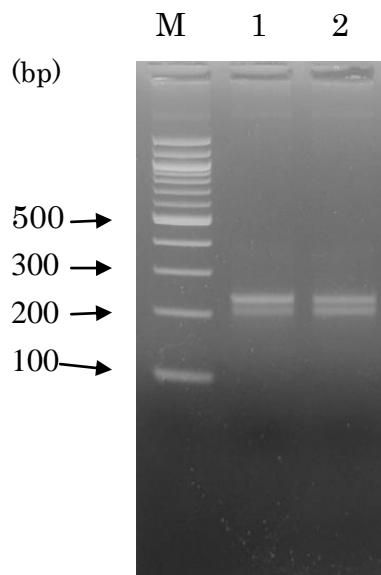


Fig. 2-6. 16S rDNA fragments amplified from DNA of acid mining water
Lane M; 100 bp DNA ladder marker, Lane 1; DNA extracted UltraClean Soil DNA Kit, Lane 2; DNA extracted from samples treated with ammonium oxalate.

2.3.4. DGGE 解析

夏の酸性鉱山水から抽出した DNA から PCR により 16S rDNA を増幅させ、DGGE に供試した。Fig. 2-7 には夏に採取した酸性鉱山水由来の 16S rDNA の DGGE 写真を示した。通常のシュウ酸アンモニウム処理をしていない試料のもの (Fig. 2-7、レーン 2) と比較して、シュウ酸アンモニウム処理したもの (Fig. 2-7、レーン 1) ではバンドの数が非常に少なかった。このことは、シュウ酸アンモニウム処理によって、細菌の溶菌等が生じている可能性が示唆された。しかし、通常の処理では観察されないバンドが検出されたことから、両方法を用いて調製した DNA を共に解析に用いた方が、微生物群集の解析に有効であると考えられた。図中の Yasu1～Yasu8 の番号を振った主要な DNA バンドを DGGE ゲルから切り取り、次のシークエンス分析に供試した。

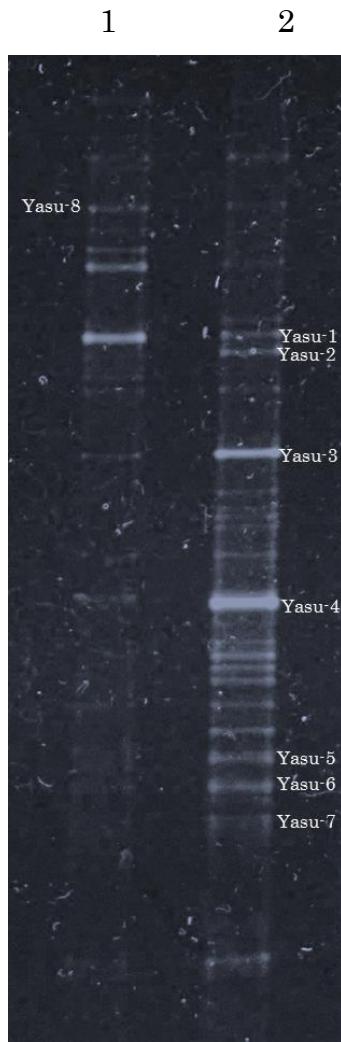


Fig. 2-7. DGGE analysis of 16S rDNA amplified from DNA of acid mining water obtained from Yasumiishi tunnel in summer.

Lane 1; DNA extracted from samples treated with ammonium oxalate, Lane 2; DNA extracted UltraClean Soil DNA Kit.

2.3.5 シークエンス解析

Fig. 2-7 の DDGE によって検出されるすべての 16S rDNA バンドの塩基配列の決定を試みたが、非常に薄いバンドや十分に分離していないバンドの塩基配列は決定することが出来なかった。塩基配列が決定された 8 つのバンドについて、BLAST 解析によって微生物を同定した。それぞれのクローンと最も近縁なものを Table 3-2 にまとめて示した。また、相同性の高いクローンとの系統的解析結果を Fig. 2-8 に示した。

DGGE 分析の結果、鉱山廃水中で最も主要な微生物と考えられる Yasu-4 は、アメリカのカリフォルニア海岸の酸性鉱山排水中に検出された BioPlates2-D01(HE587166; 99%)、鉱山排水からヒ素を取り除く実験室反応装置中から

検出された LOP-83(DQ241393; 99%)[21]、およびアメリカのイリノイ州、カーボンデールの近くに位置する Tab-Simco 炭鉱 (pH 3.09) の酸性鉱山廃水中に検出された AMD-B1-20B (JN127457; 99%) [22]などの難培養性細菌のクローンと高い相同意を示した。また、Yasu-4 は、フランスの山地本部地域のペービン湖（低硫酸塩を含む湖）から検出された *Gallionella* sp. clone eub62A12 (GQ390167; 98%) [23]と比較的高い相同意を示すことから、*Gallionella* に近縁の細菌であると考えられた。

Yasu-3 は細菌コミュニティの中で 2 番目に支配的なクローンであった。このクローンは、日本三宅島の火山性堆積物 (pH 3.0~3.6) における細菌群集に検出された難培養性細菌のクローン OY07 C183 (AB552454; 100%)[24]と同一の塩基配列を示した。また、*Ferrovum myxofaciens* EHS8 (KC155322、96%)とも低いながら相同意を示した。

Yasu-2 は Yasu-3 と 96% の同一性を示し、Fig. 3-4 に示したように同一のクラスターに属した。Yasu-2 はアメリカのイリノイ州、カーボンデールの近くにある Tab-Simco 石炭鉱の鉱山廃水中 (pH 3.12, Fe 33.5 mg/L) から検出されたクローン (JN127416, 99%) と高い相同意を示した[22]。また、イギリスの北ウェールズの酸性で金属を多く含む水から検出された *F. myxofaciens* PSTR (EF133508; 95%) や *F. myxofaciens* EHS8 (KC155322, 95%) と低いながら相同意を示した [25]。

Yasu-1 はドイツの中東部の Lusatian 鉱区の酸性湖(pH 3.3~4.0)の iron snow に検出された *Geobacter* sp. clone (HE604057)、採炭によって形成された湖の弱酸性沈殿物 (pH 5)に検出された *Geobacter* sp. clone (AM712149; 99%) [26]と高い相同意を示した。*Geobacter* 属の細菌は、広い pH 領域 (pH 5.5~8.1) で、三価鉄イオンを還元することが知られている[27]。

Yasu-5 は、フランス南部の Carnoulès Pb-Zn 鉱山の酸性鉱山廃水 (pH 2.39-5.5, Fe 12-25 mM) 中に検出された *Acidocella* sp. D7 (HF568984; 100%) [28]、フィンランドのオストロボタニアの Risöfladan 実験場から採取された酸性硫酸土 (pH 3.7~4.2) から検出された B10H8 (JX869438, 100%)[29]と同一の塩基配列を示した。

Yasu-6 は、微生物燃料電池陽極の濃縮微生物集団中に検出された *Magnetospirillum* sp. clone MFC63G03 (FJ823930, 98%) と高い相同意を示した [30]。また、同じく微生物燃料電池の微生物相中に検出された可培養 bacterium clone (KC481497, 98%)、鉄還元微生物の集積培養液に検出された *Rhodospirillales* bacterium MFC-1-L1 (JX944514, 98%)、などと密接な関連性を示した。

Yasu-7 は、小麦わらとミミズの存在下で 16 日実験的にインキュベーションした土壤サンプルに検出された clone (FQ788966; 99%) に関連があった。Fig. 3-4 に示したように *Firmicutes* bacterium clone (FJ475352; 99%) がこのクラスターに関連図を蹴られているが、Yasu-7 に高い塩基配列の相同意を示すほぼすべてのクローンが *Firmicutes* と関連付けされていないので、*Firmicutes* との関連付けは疑わしい。

Yasu-8 は、中性環境に存在する従属栄養細菌である *Staphylococcus hominis* strain 88BP (KC865282; 100%) と密接に関係がありました。

Table 2-2 BLAST results of the bacterial 16S rRNA gene sequences from the acid mine drainage of Yasumiishi tunnel.

Group	DDBJ accession no.	Physiological class	Closest cultivated relative (NCBI accession no.)	Identity(%)
Yasu-1	AB858435	Fe(III)-reducing heterotroph	<i>Geobacter</i> sp.(AM712149)	99
Yasu-2	AB858436	Iron-oxidizing autotroph	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain EHS8(KC155322)	95
Yasu-3	AB858437	Iron-oxidizing autotroph	<i>Ferrovum myxofaciens</i> strain P3G(HM044161)	96
Yasu-4	AB858438	Iron-oxidizing autotroph	<i>Gallionella</i> sp. (GQ390167)	98
Yasu-5	AB858439	Acidophilic	<i>Acidocella facilis</i> strain(KC924945)	100
Yasu-6	AB858440	Microaerophilic	<i>Magnetospirillum</i> sp.(FJ823930)	98
Yasu-7	AB858441	Obligate anaerobe	<i>Firmicutes</i> bacterium(FJ475352)	99
Yasu-8	AB858442	Facultative anaerobic	<i>Staphylococcus</i> sp. (JX104071)	100

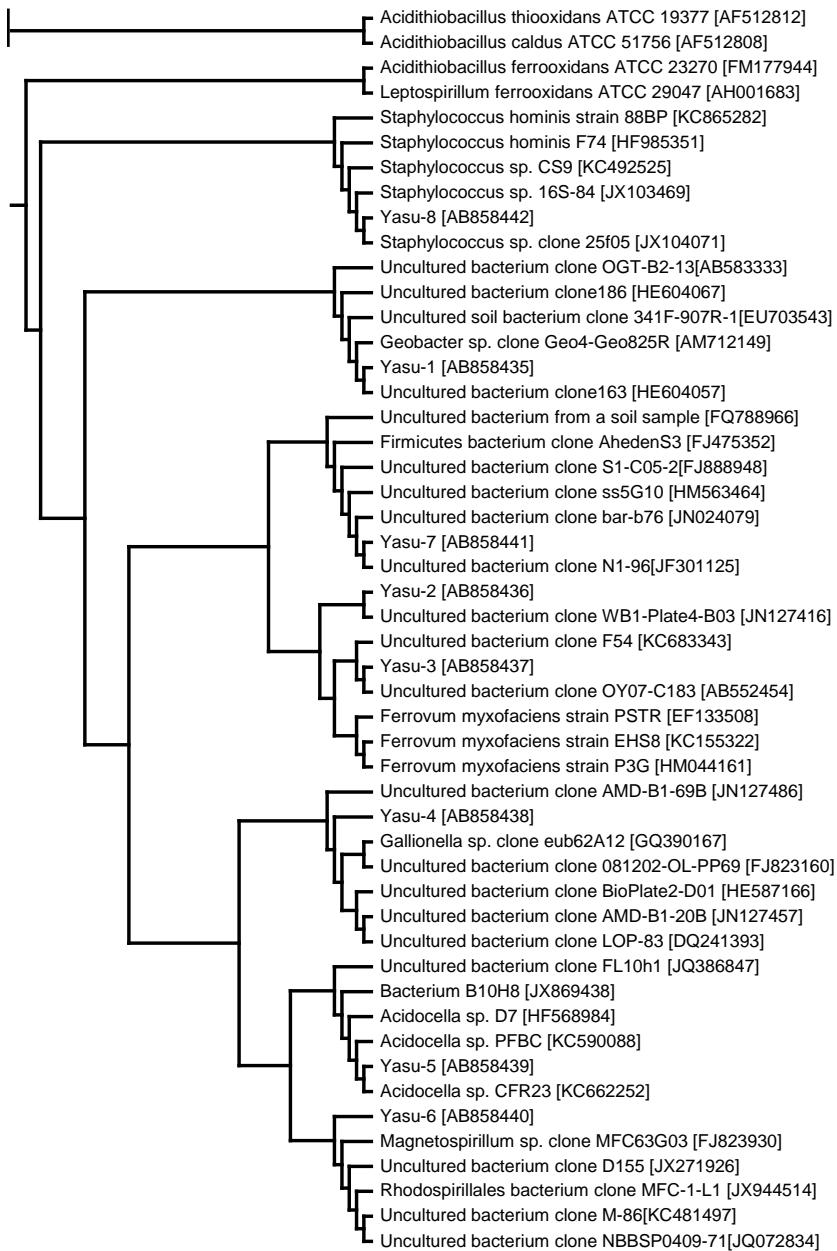


Fig. 2-8. Phylogenetic relationships of bacterial 16S rRNA gene sequences from the Acid mine drainage of the Yasumi-ishi tunnel to closely related sequences from GenBank.

2.3.6. 特異的なプライマーによる解析

採取した試料から抽出したDNAを鋳型に用いて解析した結果、これまでに酸性鉱山廃水中に存在することが報告されている。鉄酸化細菌である *At. ferrooxidans*, *Leptospirillus sp*、硫黄酸化細菌である *At. thiooxidans*, *At. caldus*は検出されなかった。そこで、これらの細菌が本当に存在しないのかどうかを明らかにするために、これらの細菌を特異的に增幅できるプライマーを用いて解析を行った。

2.3.6.1. *At. ferrooxidans* に特異的なプライマーによる解析

夏サンプルを鋳型 DNA に使って、異なる PCR 伸長温度で PCR を行った。増幅した反応液は 3%アガロースゲル電気泳動で確認した。その結果を Fig. 2-9 に示した。その結果、抽出した DNA を直接鋳型に用いた時には、バンドが検出されなかった（レーン 1～5）。そこで、抽出した DNA を鋳型にして増幅した 27F-1492R の 16S rDNA を鋳型に用いて、増幅を試みたが、増幅バンドは検出できなかった（レーン 7）。*At. ferrooxidans* の DNA を鋳型に用いた時には期待された長さ（約 1060 bp）が増幅された（レーン 6）ので、夏サンプル DNA の試料中には *At. ferrooxidans* は存在しないものと考えられた。

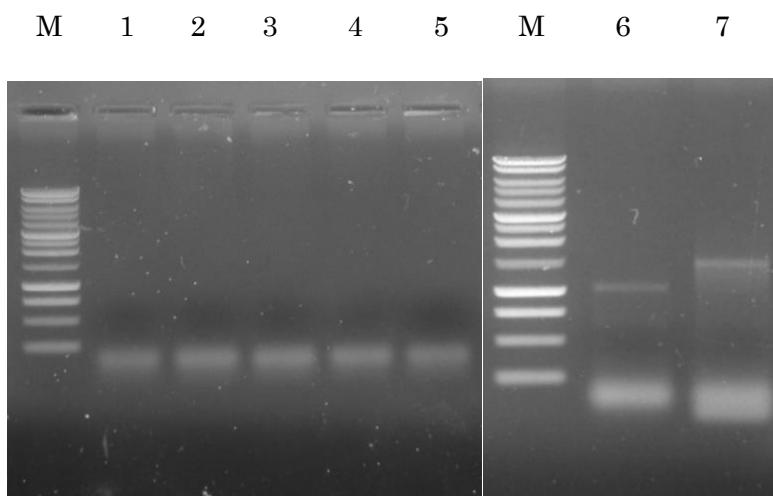


Fig. 2-9. Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA amplified by PCR using *A. ferrooxidans* primers (FERRO1473R and FERRO458F-GC).
Lane M, 1000 bp DNA ladder marker; Products amplified by PCR with extension temperature of 42 °C, 48 °C, 52 °C, 55 °C, or 58 °C; Lane 6, Product amplified from *A. ferrooxidans* DNA; Lane 7, PCR product amplified from 16S rDNA amplified from extracted DNA (extension temperature of 55 °C).

2.3.6.2. *Acidiphilium* に特異的なプライマーによる解析

酸性環境の微生物生態系からは *Acidiphilium* や *Acidocella* などの従属栄養細菌が検出される。抽出した DNA を直接用いた解析で *Acidocella* が検出された。*Acidiphilium* がいるかどうかが特異的なプライマーを用いて解析した。

Fig. 2-10 に示したように、目的の長さのバンド (600bp) が増幅され、*Acidiphilium* 属の細菌が存在することが示唆された。

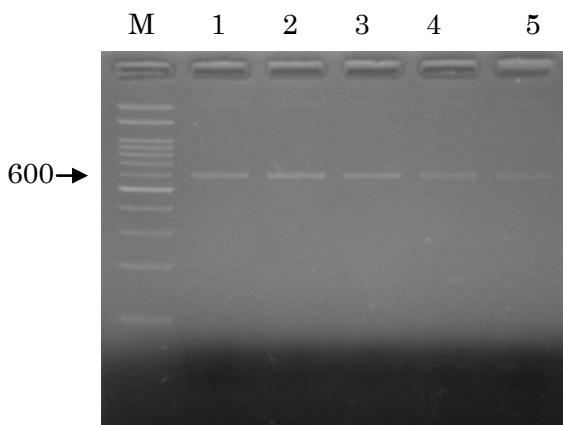


Fig. 2-10. Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA amplified by PCR using *Acidiphilium* primers (ACIDO1150R and ACIDO594F-GC).

Lane M, 100 bp DNA ladder marker; Lane 1~5: Products amplified by PCR with extension temperature of 42 °C, 48 °C, 52 °C, 55 °C, or 58 °C.

2.3.6.3. 古細菌に特異的なプライマーによる解析

古細菌の中にも、鉄や硫黄の酸化・還元をするものがいる。341F-518R のプライマーは古細菌の解析には、不適切であったため、古細菌特異的なプライマーを用いて解析を行った。

Fig. 2-11 に示したように、抽出した DNA を鋳型に用いて、目的とする長さのバンド (200bp) が検出され、古細菌の存在が示唆された。

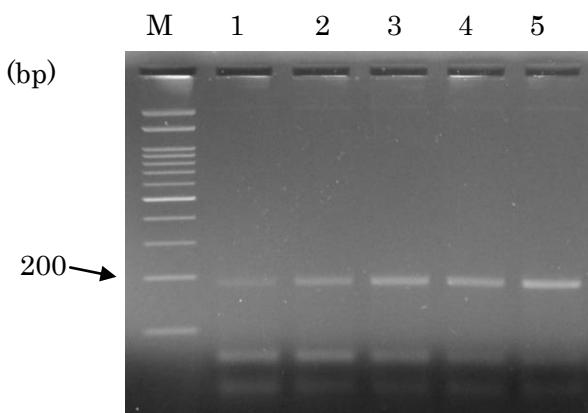


Fig. 2-11. Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA amplified by PCR using archaea primers (ARC519R and ARC344F-GC).

Lane M, 100 bp DNA ladder marker; Lane 1~5, Products amplified by PCR with extension temperature of 42 °C, 48 °C, 52 °C, 55 °C, or 58 °C.

2.3.6.4. *Acidithiobacillus caldus* に特異的なプライマーによる解析

Table 2-2 に示したように、抽出した DNA を鋸型に 341F-518R のプライマーで解析すると、酸性鉱山水中からは硫黄酸化細菌である *At. caldus* は検出されなかった。そこで、特異的なプライマーを用いて解析した。その結果、Fig. 2-12 に示したように、増幅バンドは検出されなかった。抽出した DNA を鋸型に用いて増幅した 27F-1492R の 16S rDNA を鋸型に用いても、レーン 7 に示したようにバンドは増幅できなかった。したがって、試料中には *At. caldus* は存在しないものと考えられた。

2.3.6.5. *Leptospirillum* に特異的なプライマーによる解析

Leptospirillum 属の細菌は鉄酸化細菌として知られている。Table 2-2 に示したように。抽出した DNA を用いて直接解析した時には、この細菌は検出されなかった。そこで、*Leptospirillum* に特異的なプライマーを用いて解析した。その結果を Fig. 2-12 に示した。本来なら約 550bp の断片が増幅されるはずであるが（レーン 6）、700bp 付近に増幅されたバンドが検出された（レーン 7）。予想された長さと異なることもあり、*Leptospirillum* の新しい菌である可能性も考えられるので、今後検討する必要がある。

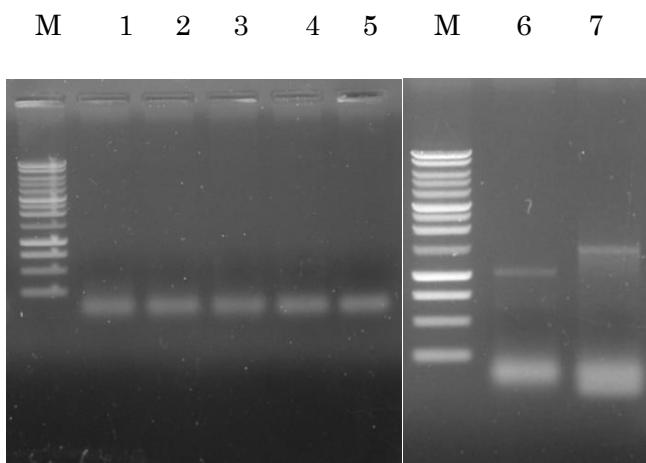


Fig. 2-12. Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA amplified by PCR using *At. caldus* primers (CALD1475R and CALD460F-GC).

Lane M, 1000 bp DNA ladder marker; Lane 1~5, Products amplified by PCR with extension temperature of 42 °C, 48 °C, 52 °C, 55 °C, or 58 °C; Lane 6, PCR product amplified from *A. ferrooxidans* DNA; Lane 7, PCR product amplified from 16S rDNA of 27F-1492R amplified from extracted DNA (extension temperature of 55 °C).

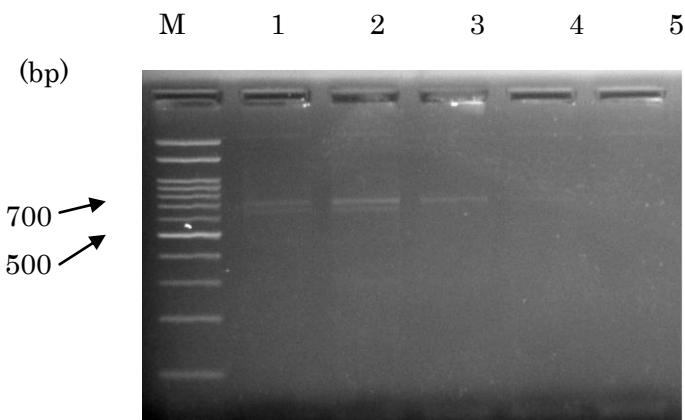


Fig. 2-13. Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA amplified by PCR using *Leptospirillum* primers (LEPTO679R and LEPTO176F-GC).

Lane M, 100 bp DNA ladder marker; Lane 1~5, Amplified DNA by PCR with extension temperature of 42 °C, 48 °C, 52 °C, 55 °C, or 58 °C.

2.3.6.6. *Sulfobacillus* に特異的なプライマーによる解析

酸性環境で硫黄を酸化する細菌に *Sulfobacillus* などグラム陽性の細菌が存在する。Table3-1 に示したように、抽出した DNA を鑄型に用いた時には、硫黄細菌は検出できなかった。そこで、硫黄細菌である *Sulfobacillus* 属の細菌を特異的なプライマーで解析した。その結果、Fig. 2-14 に示したように、目的とする 480bp 付近にはバンドが検出されず、200bp 付近に増幅バンドが検出された。新しい *Sulfobacillus* である可能性も考えられるが、このバンドの塩基配列はまだ解析していない。今後の検討が必要である。

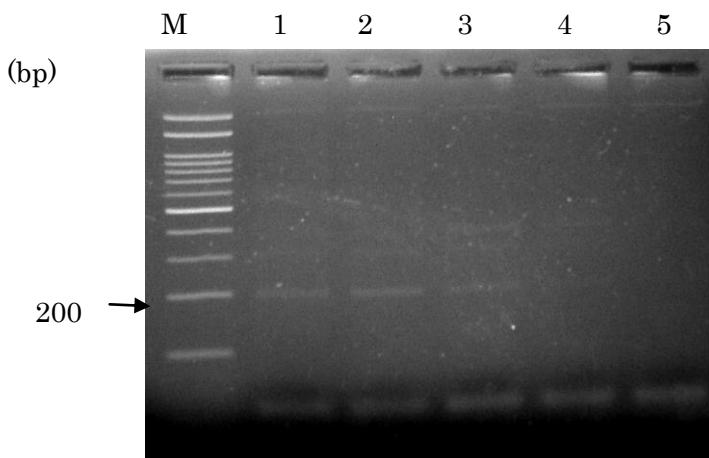


Fig. 2-14. Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA amplified by PCR using *Sulfobacillus* primers (SULFO606R and SULFO170F-GC).

Lane M: 100 bp DNA ladder marker. Lane 1~5, Amplified DNA by PCR with extension temperature of 42 °C, 48 °C, 52 °C, 55 °C, or 58 °C.

2.3.6.7. *At. thiooxidans* に特異的なプライマーによる解析

酸性環境で硫黄を酸化する細菌に、*At. thiooxidans* などグラム陰性の細菌が存在する。Table 2-2 に示したように、抽出した DNA を鋸型に用いた時には、硫黄細菌は検出できなかった。そこで、硫黄細菌である *At. thiooxidans* を特異的なプライマーで解析した。その結果、Fig. 2-15 に示したように、抽出した DNA を直接鋸型に用いた場合（レーン 1～5）、抽出した DNA を鋸型にして増幅した 27F-1492R の 16S rDNA を鋸型に用いた場合（レーン 7）、両方とも増幅バンドは検出できなかった。*At. Thiooxidans* の DNA を鋸型に用いると期待された長さの断片（約 1060bp）が増幅できた。したがって、*At. thiooxidans* は試料中に存在しないものと考えられた。

2.3.7 古細菌に特異的プライマーによる解析

PCR による DNA の増幅の結果からアーキアのプライマーだけ目的とする長さの DNA が増幅された。*A. ferrooxidans*、*A. caldus*、*Leptospirillum*、*Sulfobacilium*、*A. thiooxidans* のプライマーでは目的とする長さの DNA が増幅できなかった。アーキアのプライマー（ARC344F-GC と ARC519R）を使って PCR 増幅させた 16S rDNA を DGGE に供試した結果を Fig. 2-16 に示した。4 本のバンドが検出され、アーキアの種類は、非常に少ないことが明らかとなった。図中の番号を振った主要な DNA バンドを DGGE ゲルから切り取り、次のシークエンス分析に供試した。

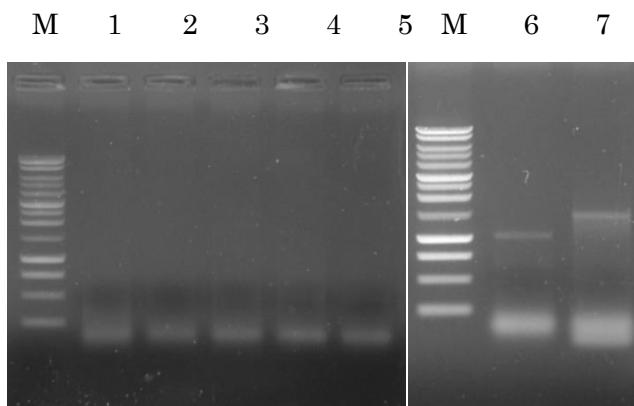


Fig. 2-15. Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA amplified by PCR using *At. thiooxidans* primers (THIO1473R and THIO458F-GC).

Lane M, 100 bp DNA ladder marker; Lane 1～5, Amplified DNA by PCR with extension temperature of 42 °C, 48 °C, 52 °C, 55 °C, or 58 °C; Lane 6, PCR product from *A. ferrooxidans* DNA; Lane 7, PCR product amplified from 16S rDNA of 27F-1492R amplified from extracted DNA (extension temperature of 55 °C).

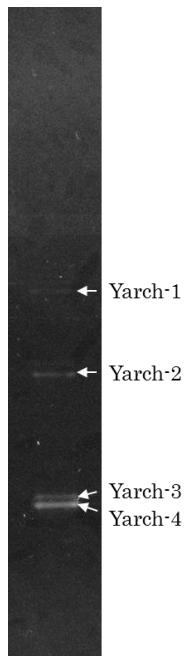


Fig. 2-16. DGGE analysis of 16S rDNA amplified by the Archaea specific primer pair.

2.3.7.1 古細菌クローニングのシークエンス解析

Yarch1–4 塩基配列を決定し、BLAST 解析によって近縁なアーキアを同定した。Table 3-3 にそれぞれのクローニングとともに近縁のアーキアをまとめて記載した。また、類縁関係を Fig. 3-12 に示した。古細菌を

主要なアーキアのクローニング Yarch 4 は、中国の安徽省銅陵黃鐵鉱山の酸性鉱山排水から検出された uncultured archaeon chone (KC537594; 100%)、廃棄された地下鉱山から流れ出す酸性金属汚染水に検出された clone DAAP3A2 (KC208501; 100%) [31]、フランスの Carnoulès 鉱山のヒ素に富んだ小川の沈殿物で検出された clone ArCoSdN9H67 (HE653795; 100%) [32]、と同一の塩基配列を示した。これらのアーキアは、*Thermoplasmatales* に属すると同定されている。

Yarch-2 は、二番目に優勢なアーキアであり、中国の安徽省銅陵黃鐵鉱山の廃水から検出された AMD-archF30 (KC537602; 98%)、フランスの Carnoulès 鉱山のヒ素に富んだ小川の沈殿物で検出された ArCoSdN9H43 (HE653791; 98%) [32]、タイの廃棄された水田の酸性硫酸土(pH 3.5)から検出された SDW_G32622(AB427084; 98%) [33]などのアーキアと高い相同意を示した。これらのクローニングも Yarch-4 同様に *Thermoplasmatales* と関連付けられている。

Yarch-1 は、前述のフランスの Carnoulès 鉱山のヒ素に富んだ小川の沈殿物で検出された clone ArCMSdJ9A29 (HE653803; 100%) [32]、中国中南部の強酸性の農地土

壤(pH 4.20-4.47)に検出された clone HF13 (JF91255; 100%) [34]、コロンビアのアンデス山脈の酸性温泉から検出された GBX-ACOQ1-14 (JF280342; 100%) [35]と密接に関連があった。これらのクローンはいずれも既知のアーキアとは関連付けられていない。

Table 2-3.3. BLAST results of the archaeal 16S rRNA gene sequences from the ARD of Yasumiishi tunnel.

Group	DDBJ accession no.	Physiological class	Closest cultivated relative (NCBI accession no.)	Identity (%)
Yarch-1	AB858447	Thermoacidophile	Thermoprotei (HQ671250)	100
Yarch-2	AB858448	Thermoacidophile	Thermoplasmatales (JX989254)	96
Yarch-3	AB858449	Thermoacidophile	Thermoplasmatales (JN982116)	100
Yarch-4	AB858450	Thermoacidophile	Thermoplasmatales (FJ228398)	100

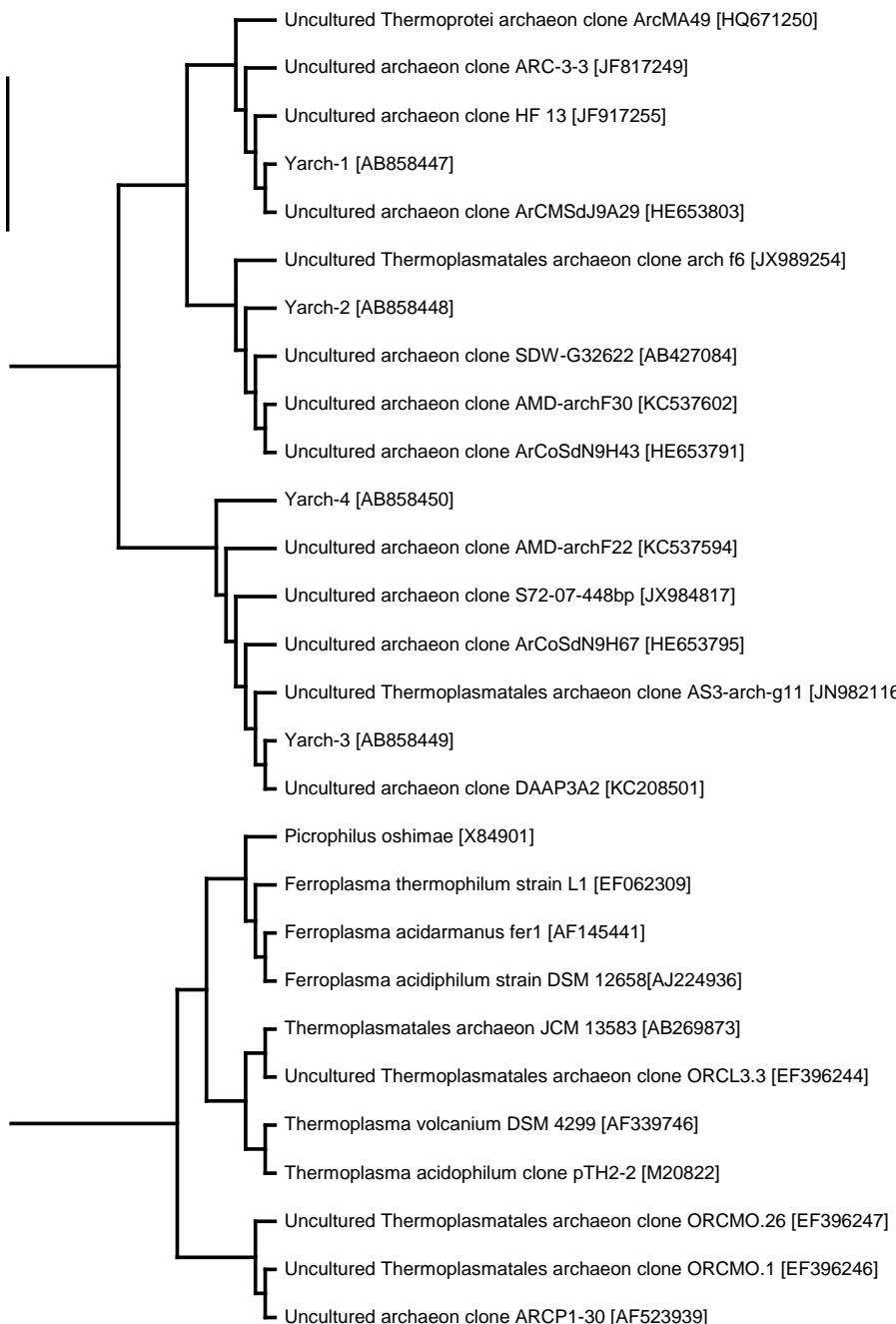


Fig. 2-17. Phylogenetic relationships of archaeal 16S rRNA gene sequences from the ARD sample of the Yasumi-ishi tunnel to closely related sequences from GenBank.

2.3.8 堆積物の顕微鏡観察

上述の石水坑道からの鉱山廃水中の微生物叢の解析によって、*Gallionella* 様の細菌が主要な細菌として検出された。*Gallionella* は鉄酸化物で覆われたらせん状の鞘を形成することが知られている [1]。そこで、鉱山廃水が溜まっている箇所から、堆積物を採取して顕微鏡観察した。その結果、非常に数は少ないものの、Fig. 2-18 に示したように、らせん状の構造物が観察された。

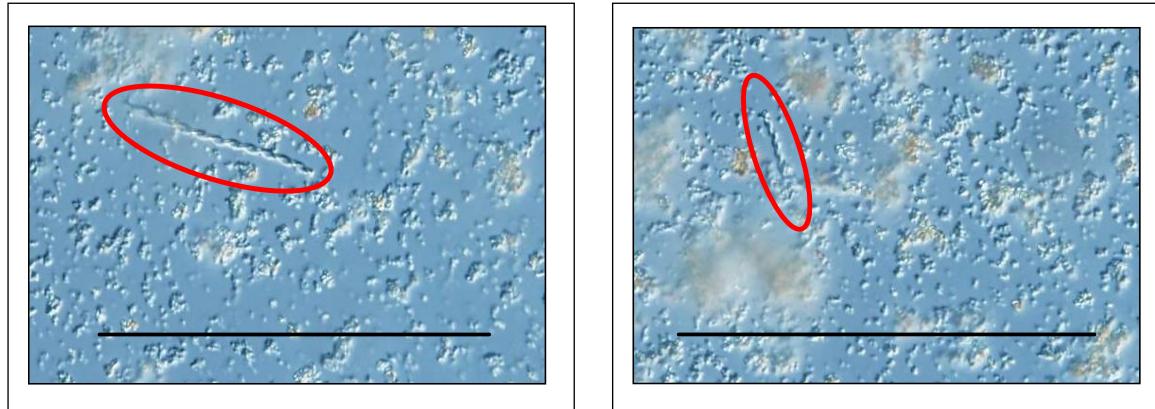


Fig. 2-18. Micrographs of sediment sample from the pond. Some twisted stalk-like structures were observed.

2.4. 考察

柵原鉱山の酸性廃水の生成に関する微生物を明らかにするため、これまでの解析には廃坑になった柵原鉱山の主坑道中の廃水を用いてきた。16S rDNA を指標に解析した結果、酸性環境に存在するという報告がない微生物が多く検出されたため、近くを流れる吉井川の河川水の微生物相を反映している可能性が示唆された。そこで、河川水の流入は起こらない場所から採取した鉱山廃水を解析に用いた。石水坑道は、柵原鉱山の一部で、山肌から染み出た地下水を坑口付近に一時貯留している。貯留池には赤色の鉄化合物が沈殿しており、採取した試料の pH は 4.2、水温は 23°C であった。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である *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нетタイトを形成する従属栄養細菌 *Geobacter* や *Magnetospirillum* 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。

鉱山廃水からは、鉄酸化細菌である *Acidithiobacillus ferrooxidans* と *Leptospirillum*、硫黄酸化細菌である *Acidithiobacillus thiooxidans*、

*Acidithiobacillus caldus*などの細菌が主要な微生物種として検出されている。しかし、DGGE 解析ではこれらの細菌は検出できなかった。存在しているが濃度が低いため検出されなかつた可能性と、解析が出来なかつた DNA バンドに含まれていた可能性が考えられる。DGGE 解析には、ユニバーサルなプライマーを用いて増幅した 16S rDNA を用いたので、低濃度存在する微生物の 16SrDNA を効率よく増幅できなかつた可能性がある。そこで特異的なプライマーを用いて、さらに分析を行つた。その結果、酸性鉱山廃水にしばしば検出される、*A. ferrooxidans* や *Leptospirillum* 属の鉄酸化細菌や *A. thiooxidans* や *A. caldus* は検出されなかつた。これらの細菌は、抽出した DNA およびそれから増幅した 16S rDNA を鑄型に用いて解析した際にも検出されなかつたことから、採取した酸性水には存在しないものと考えられた。検出されなかつた理由として、鉱山廃水の pH が 4.7 であったことが原因だと考えられた。*At. ferrooxidans* や *At. thiooxidans* は pH 2~3 で増殖し、*Ferrovum* はそれより高い pH でよく増殖することが報告されている[36]。一方、鉄還元に関与することが報告されている好酸性の従属栄養細菌である *Acidiphilium* 属の細菌と古細菌のクローニングが検出された。古細菌のクローニングについて、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。

相同検索の結果、優勢な細菌であった *Gallionella* や *Ferrovum* と相同性の高い細菌（あるいはクローニング）は、pH 3~4 の環境から検出されていた。このことは、この環境には、*Ferrovum* や *Gallionella* に関連付けられる、鉄酸化細菌と推測される細菌が優勢な環境が形成されていることを示唆した。

アキアを分析した結果、いずれのアキアも難培養クローニングに関連付けられ、その機能を推測することが出来なかつた。相同性の高いクローニングが検出された場所は、やはり pH 4 付近の酸性鉱山廃水であった。このことは、pH 4 付近の pH 環境に特異的なアキアの生態系があることを強く示唆した。

以上の解析の結果から、試料採取現場の酸性鉱山水の生成機構ならびに鉄や硫黄をエネルギーとした微生物生態系を推測した (Fig. 2-19)。1) 黄鉄鉱に Fe³⁺がケミカルに反応して Fe²⁺とチオ硫酸が形成される。2) Fe²⁺は *Ferrovum* 属の細菌によって酸化され黄鉄鉱に作用できる Fe³⁺を再生し、黄鉄鉱からのチオ硫酸とプロトンの連続的な溶出を可能にする。3) 一方、独立栄養性の *Ferrovum* の生成した有機物によって生育する *Acidiphilium* や *Acidocella* の細菌は Fe³⁺を還元し、*Ferrovum* 属細菌に利用可能な Fe²⁺を供給する。研究では、硫黄の代謝に関与する微生物を検出できなかつたが、検出された古細菌がその機能を担っているのかもしれない。今後さらに詳細な検討が必要である。

Ferrovum 属細菌は、最近その存在が検出された鉄細菌である[36]。また、詳細な生理学的な性質は明らかにされていないため、鉱山廃水からこの菌を分離して、その性質、特に鉄酸化に関与する因子を明らかにしたい。また、さらに詳細に微生物群落の構成、微生物の解析を行つて、柵原鉱山の酸性廃水の形成機構を明らかにしたい。

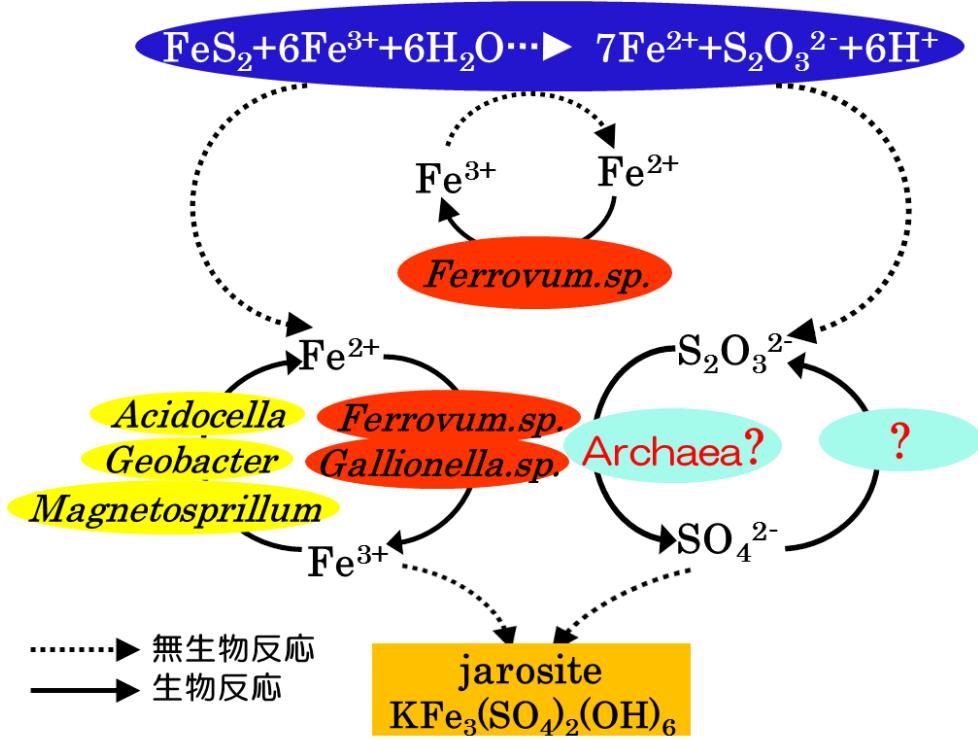


Fig. 2-19. Model for iron and sulfur element cycling pathways occurring in the microbial community structure in the pond of the Yasumi-ishi tunnel.

第3章 *Gallionella* の単離培養

3.1. 緒言

DGGE 解析結果では、*Ferrovam* と *Gallionella* に属する鉄酸化細菌と推測される細菌が優勢な細菌として検出された。鉱山廃水には、濃度が低いものの鉄イオンが検出され、鉄酸化細菌が鉱山廃水の形成に関与していることが推測された。しかし、一般的にこれまでに報告されている鉄酸化細菌は検出されなかつたので、休石坑道の鉱山廃水の形成にはこれらの細菌が、関与していることが推測された。

Gallionella 属細菌は、pH 中性付近を好み、無機物のみを主要な栄養として利用して、微好気条件下で二価鉄を酸化して生育する化学合成独立栄養細菌である。この種の細菌は、特徴的な纖維状の構造体を産出することでしられている。このような微好気性の鉄酸化細菌は我々の身近な環境に存在する。例えば、田んぼや湧水池などに見られるオレンジ色の酸化鉄沈殿物を顕微鏡で観察すると、*Gallionella* 属細菌が産出するような纖維状構造体がしばしば確認できる。鉄酸化細菌に関する研究の歴史は古く、150 年以上前にはすでに *Gallionella ferruginea* の記載報告がなされている。*G. ferruginea* は、いろいろな異なる水生の生息地で見つかった鉄を酸化させている化学合成無機栄養性のバクテリアである。*G. ferruginea* は、第一鉄を酸化して大量の水酸化第二鉄の沈殿を作る。獲得エネルギーが小さいので炭酸同化の効率は悪いが、菌体量の数百倍の水酸化第二鉄が形成される。淡水性の微好気性鉄酸化独立栄養細菌の分離報告例はいくつかあるが、正式に新種として認められている株は現在一つもない。鉄酸化細菌は、身近に存在することが分かっているにも関わらず実験室内で培養できない。いわゆる「難培養性微生物」の代表の一つと言える。休石坑道の入り口にたまっている酸性鉱山廃水は pH が 4 付近であり、これまで *Gallionella* が生息しているとされている pH よりも低い pH である。従って、鉱山廃水中で検出される *Gallionella* 属細菌は、これまでに報告されているものとは異なる新種であると考えられている。同様に *Ferrovam* 属細菌は、最近その存在が認識され、前章で述べたように pH 3・4 付近に生育する化学合成独立栄養細菌であり、2 価鉄の酸化によってエネルギーを獲得しているとされているが、この細菌もまだ分離株を用いた性質検討はされていない。これらの細菌が、酸性鉱山廃水の形成にどのように関与しているかを明らかにするためには、単離株の最適増殖 pH、最適増殖温度や鉄酸化能、等の生理生化学的解析を欠かすことはできない。そこで、ここでは *Gallionella* の単離培養について述べる。

3.2. 実験材料と方法

3.2.1. 試料サンプル

黄鉄鉱(FeS₂)を産出していた岡山県久米郡美咲町柵原鉱山の近くの休石坑道の岩盤の排出口から流れ出している廃水と坑道口の貯留池から試料を採集した。試料は2011年夏に2種類のサンプルを採取した。排出口サンプルのpHは3.9で、貯留池サンプルのpHは3.5である。

3.2.2. 実験器具と培地溶液の製作

本実験の培養容器は口径16.5 mm、胴長135 mm の円底ネジ口試験管を使った。*Gallionella*の培養には完全合成培地 Modified Wolfe's Mineral Medium (MWMM) を用いて行う。完全合成培地の中にビタミンを添加する。それらの組成は下記に示した通りである。MWMMは1倍溶液として超純水で作製し、ビタミンは、規定量を測り取りそれぞれ超純水に溶解させ、1000倍ストック溶液として作製した。ビタミン水溶液の調製には、遮光、室温にて攪拌し、試薬を完全に溶解させた。また、1 M NaCO₃水溶液をストック溶液として調製した。NaCO₃水溶液、ビタミン水溶液はフィルター滅菌し、分注してMWMM培地と共に冷蔵庫で保存した。ビタミン水溶液はアルミホイルで遮光した。

< MWMM 培地 (pH 無調整) >

NH ₄ Cl	1.00 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.10 g
K ₂ HPO ₄	0.05 g
Distilled water	1.00 L

硫酸でpHを4に調製する

<ビタミン液組成 (mg/L) >

Folic acid	2.0
Pyridoxine hydrochloride	10.0
Thiamine hydrochloride	5.0
D-Biotin	2.0
Riboflavin(Vitamin B2)	5.0
Nicotinic acid	5.0
Calcium pantothenate (D-pantothenic Acid Calcium Salt)	5.0
Vitamin B12	0.1
β -Aminobenzoic acid	5.0
Lipoic acid	5.0
Monopotassium phosphate	900.0

3.2.3. MWMM の溶存酸素グラジェント培地の作製

分離培養には溶存酸素グラジェント法を用いた。その方法の概略を Fig. 3-1 に示す。本培地は Bottom agar と Top agar の 2 層から成る培地で、下層に鉄源となる FeS 包埋寒天[1%(w/v)]、上層に 0.15% の軟寒天培地を重層した。以下に、口径 16.5 mm、胴長 135 mm のねじ口試験管 10 本分の作製手順を記した。

Top 培地は、100 ml の MWMM と 0.15 g の Bacto agar(DIFCO)、攪拌子を 200 ml 三角フラスコに入れ、121°C、15 分間オートクレーブ滅菌した。Bottom 培地は、50 ml の MWMM、乳鉢で粉碎した 1 g の硫化鉄、0.5 g Bacto agar を三角フラスコに混合し、Top 培地と同様にオートクレーブ滅菌した。同時に、バイアル管 10 本、CO₂ 注入用の針をオートクレーブにかけた。

以下の操作はクリーンベンチで行った。初めに、オートクレーブから出した Bottom 培地が冷めないうちに、4 ml ずつバイアル管に分注した。この操作では、硫化鉄が三角フラスコ内で沈殿しているため十分にピペッティングながら分注した。分注した Bottom 培地が冷え固まったところで、室温まで冷ました Top 培地をマグネチックスターラーで攪拌しながら、100 μ l のビタミンストック溶液及(培地量の 1/1000 量)、500 μ l の 1 M NaCO₃ 水溶液(終濃度 5 mM)を添加し、Bottom 培地を入れたバイアル管に 8 ml ずつ分注した。その後、フィルター滅菌した CO₂ をバイアル管一本あたり 15 秒間通気させた。すべてのバイアル管(15 本)に CO₂ をガスボンベから注入した後で蓋を閉めると、バイアル管の中程でコロニー一帯が形成させる酸素グラジェントができた。蓋を閉めたバイアル管は、Top 培地に Fe²⁺を十分に分散させるために

室温で24時間置いた。その後、Top培地の1%(v/v)すなわち80 μ lの鉱山廃水試料をTop培地とBottom培地の間に植菌し、30℃のインキュベーターで静置培養した。

<勾配管中培地組成>

	8 ml MWMM 培地
Top 層	8 μ l ビタミン液 5 mM NaHCO ₃
	0.15% アガロース
	4 ml MWMM 培地
Bottom 層	0.02 g FeS 1% アガロース

*Gallionella*単離培養実験径路

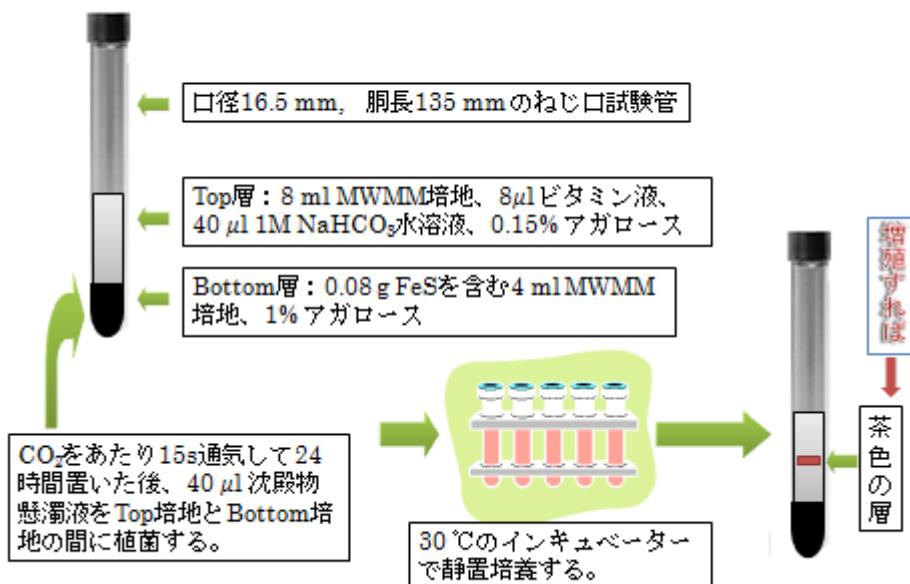


Fig. 3-1. Procedures used for cultivation and isolation of *Gallionella*.

3.2.4. 培養条件の検討

分離源として、休石坑道の岩盤の排出口から流れ出している廃水と坑道口の貯留池から採集したものを用いた。滅菌水を対照として、室温(25°C)で、培地が無調整(pH6.7)と調整後(pH4)を使って、2週間に培養した。

pH は微生物の増殖ばかりでなく、代謝生産物の種類や量にも重要な影響を及ぼす。*Gallionella* は、一般的に、pH 中性付近を好むとされているが、柵原鉱山の酸性水の pH を考慮して、pH 4、5、6 三つの pH 値で増殖を検討した。

3.2.5. 鉄酸化細菌の培養過程中試験管中の増殖の検出方法

試料を接種した試験管に鉄酸化細菌が増殖すると、試験管の Top 培地中に鉄の酸化に由来する茶色の層が観察される。その層では、Bottom 培地から供給された二価鉄を細菌が酸化して三価鉄を生じ、それが酸素と反応して水酸化鉄の沈殿が形成されている。試験管中では、Bottom 培地に含まれている二価鉄が、Top 培地へ供給されることによって、二価鉄の濃度勾配が形成される。一方、Top 培地には上層から下層に向かって酸素の濃度勾配が形成される。鉄酸化細菌が鉄を利用して生育するためには、鉄が酸化されない低 pH 環境か、酸素が極めて少ない環境である。鉄を酸化するためには酸素が必要であるため、*Gallionella* は、鉄の酸化速度が低い酸素濃度存在下で鉄を利用すると考えられており、茶色層の形成は鉄酸化細菌の存在を示している。30 °Cで培養し、この茶色層の形成を指標に菌の増殖を検討した。

3.2.6. 鉄酸化細菌の分離

培養した試験管中にいくつかの層が形成された。この層中の細菌を PCR 分析するために、層を分離する必要が生じた。そのため、上層から順にそれぞれの層を分取して、新しい試験管に接種して再培養した。同一の操作を繰り返して、最終的に試験管に単一層が形成されれば、細菌が純粋に分離されたものと考えて、分離実験を行った。その手順を Fig. 3-2 に示した。

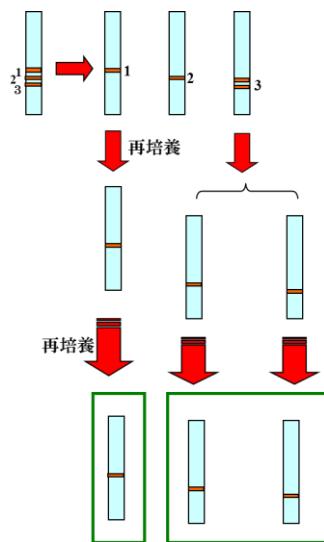


Fig. 3-2. Procedures used for the isolation of *Gallionella*.

3.2.7. DNA の抽出と PCR 分析

単一層になった試験管から、茶色層だけをマイクロピペットを使って採取し、DNA の抽出を行った。DNA の抽出には UltraClean™ Soil DNA Kit (TMO BIO) を用いた。Bead Solution tube に回収した菌体を加え、Voltex でよく懸濁した。60 µl の Solution S1 を加えて数回チューブを転倒混和し、200 µl Solution IRS を加え、Voltex では最大スピードで 10 分間攪拌した。12,000 rpm で 30 秒間遠心分離し上清を新しい遠心チューブに移した。250 µl の Solution S2 を加え、Voltex で 5 秒間攪拌し、4°C で 5 分間静置したのち、12,000 rpm で 1 分間遠心分離した。沈殿を取らないようにし、上清を新しい遠心チューブに移し、1.3 ml の Solution S3 を加えて Voltex で 5 秒間攪拌し、約 700 µl をスピンドルフィルターに乗せて 12,000 rpm で 1 分間遠心を行った。ろ液を捨てて、スピンドルフィルターに 300 µl の Solution S4 を加え、12,000 rpm で 30 秒間遠心を行った。ろ液を捨て、さらに 12,000 rpm で 1 分間遠心を行った後、スピンドルフィルターを新しいチューブに取り付け、50 µl の Solution S5 をフィルター膜の中央に加えた。12,000 rpm で 30 秒間遠心を行い、スピンドルフィルターを除去し、ろ液中に含まれる DNA を -20°C で保存した。

抽出、精製した DNA を鋳型に用いて、16S rDNA を PCR によって増幅させた。PCR に用いたプライマーは、塩基配列が決定されている大腸菌(*Escherichia coli*)の 16S rDNAにおいて保存性の高い領域を選択して合成した Forward primer 341F-GC (*E. coli* のヌクレオチド番号 : 341)、と Reverse primer 518R-DGGE (518) を用いて、長さ約 217bp の断片を増幅した。

増幅した PCR 産物は 3% アガロースゲル上で電気泳動により確認した。泳動バッファーは、Tris-acetate EDTA (TAE) バッファー [40 mM Tris, 40 mM acetate, 1 mM EDTA (pH 8.0)] を用いた。分子量マーカーとして、100bp DNA ladder marker (Bio

Labs)を用いた。反応液組成および条件は下記のとおりで、プライマーの塩基配列は前章で述べた。

<PCR 反応液組成>

AmpliTaq buffer	5.0 μ l
10 mM Forward primer 341F-GC	0.5 μ l
10 mM Reverse primer 518R	0.5 μ l
Template DNA	1.0 μ l
滅菌蒸留水	3.0 μ l
Total Volume	10.0 μ l

<PCR 反応条件>

95°C	10 min	1 cycle
95°C	15 sec	
55°C	15 sec	40 cycles
72°C	1 min	
72°C	7 min	1 cycle

3.2.8. 試験管から抽出方法の検討

前の培養容器は、口径 16.5 mm、胴長 135 mm の円底ネジロ試験管を用いた。培養後の試験管内壁に茶色の沈殿を付いており、この水酸化鉄の沈殿に微生物が存在することが考えられた。そこで、口径 32 mm、胴長 106 mm の円底ネジロ遠心沈殿管を用い、その管内壁に濾紙を巻いたものを用いて、30°Cで培養した。濾紙を採取し、そこから DNA の抽出を行った。操作方法の概略は、Fig. 3-3 に示した。

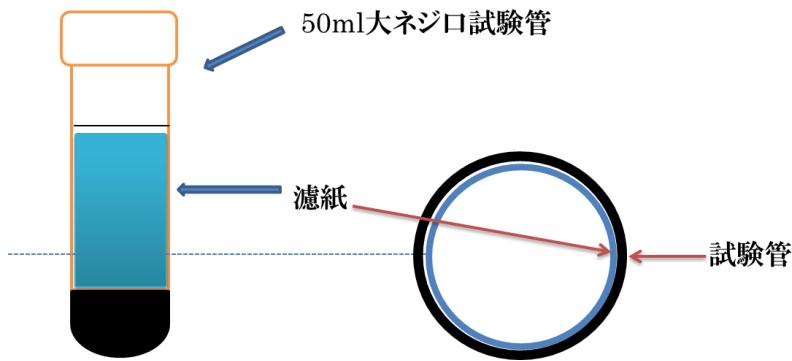


Fig. 3-3. Cultivation equipment used for recovery of cells grown on filter paper.

3.2.9. 細菌 DNA の濾紙からの回収と PCR 分析

2週間に培養した濾紙から存在の細菌のDNAを提取することを行った。まず、濾紙を切って、小さい破片をチューブに入れて、DNAの抽出を行った。DNAの抽出にはUltraClean™ Soil DNA Kit (TMO BIO)を用いた。Bead Solution tubeに回収した菌体を加え、Voltexでよく懸濁した。60 µlのSolution S1を加えて数回チューブを転倒混和し、200 µlのSolution IRSを加え、Voltexでは最大スピードで10分間攪拌した。12,000 rpmで30秒間遠心分離し上清を新しい遠心チューブに移した。250 µlのSolution S2を加え、Voltexで5秒間攪拌し、4°Cで5分間静置したのち、12,000 rpmで1分間遠心分離した。沈殿を取らないようにし、上清を新しい遠心チューブに移し、1.3 mlのSolution S3を加えてVoltexで5秒間攪拌し、約700 µlをスピンドルフィルターに乗せて12,000 rpmで1分間遠心を行った。ろ液を捨てて、スピンドルフィルターに300 µlのSolution S4を加え、12,000 rpmで30秒間遠心を行った。ろ液を捨て、さらに12,000 rpmで1分間遠心を行った後、スピンドルフィルターを新しいチューブに取り付け、50 µlのSolution S5をフィルター膜の中央に加えた。12,000 rpmで30秒間遠心を行い、スピンドルフィルターを除去し、ろ液中に含まれるDNAを-20°Cで保存した。

濾紙から抽出、精製したDNAを鋳型に用いて、16S rDNAをPCRによって増幅させた。PCRに用いたプライマーは、塩基配列が決定されている大腸菌(*Escherichia coli*)の16S rDNAにおいて保存性の高い領域を選択して合成したForward primer 341F-GC (*E. coli*のヌクレオチド番号: 341)、と Reverse primer 518R-DGGE (518)を用いて、長さ約217bpの断片を増幅した。

増幅したPCR産物は3%アガロースゲル上で電気泳動により確認した。泳動バッファーは、Tris-acetate EDTA (TAE) バッファー[40 mM Tris, 40 mM acetate, 1 mM EDTA (pH 8.0)]を用いた。分子量マーカーとして、100bp DNA ladder marker(Bio Labs)を用いた。反応溶液組成と反応条件は下記の通りである。

<PCR 反応液組成>

AmpliTaq buffer	5.0 μ l
10 mM Forward primer 341F-GC	0.5 μ l
10 mM Reverse primer 518R	0.5 μ l
Template DNA	1.0 μ l
滅菌蒸留水	3.0 μ l
Total Volume	10.0 μ l

<PCR 反応条件>

95°C	10 min	1 cycle
95°C	15 sec	
55°C	15 sec	40 cycles
72°C	1 min	
72°C	7 min	1 cycle

3.3. 結果および考察

3.3.1. 溶存酸素グラジェント培地による培養

排出口(1)および貯留池(2)のサンプルを、pH 6.7 (W)と pH 4.0 (P)の蓋付寒天二重層試験管に接種して、25°Cで2週間、保温した。結果を Fig. 3-1 に示した。pH 6.7 の培地を用いた場合には、無接種試験管(W0)では培地の色の変化は観察できなかつた。排水口試料を接種した試験管(W1)では、上層寒天に幅の広い褐色のバンドが観察できたが、貯留地サンプルを接種した試験管(W2)には、シャープな褐色バンドが形成された。同様の試料を pH 4 の試料に接種すると、無接種試験管(P0)では上層寒天がわずかに褐変した。排水口サンプル(P1)および貯留地サンプル(P2)を接種した試験管では、ほぼ同じ高さに褐色のシャープなバンドが形成された。褐色のバンドは、下層から供給された二価鉄が酸化され、三価鉄になったものが試験管内に残存している酸素と反応して水酸化鉄を形成したものだと考えられた。

培地調製の際には、上層培地調整後に試験管内を二酸化炭素置換している。従って、上層寒天内には、若干酸素が残っているが、微好気環境が形成されていると考えられる。シャープな褐色バンドが形成されたことは、このバンドの中で鉄が酸化された結果であると考えられた。試料を接種していない試験管内にはシャープなバンドが検出されないことから、このバンドは鉄酸化細菌が鉄を酸化したことによって形成されたものだと考えられた。

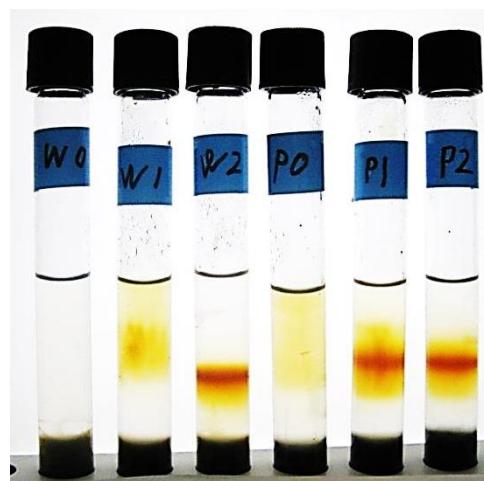


Fig. 3-1. Photographs of test tubes with double layer agar inoculated with an acid mine drainage and a sediment. W, medium adjusted at pH 6.7; P, medium adjusted at pH 4.0; 0, without inoculum; 1, inoculated with the acid mine drainage from Yasumi-ishii tunnel; 2, inoculated with the sediment from Yasumi-ishii tunnel. Test tubes were incubated at 25 °C for 2 weeks.

3.3.2. 褐色バンド形成に及ぼす pH の影響の検討

前項で述べたように、pH 6.7 と pH 4.0 では、検出される褐色バンドが異なった。そこで、褐色バンド形成と pH の関係を検討した。pH 4 (Y)、pH 5 (G)、pH 6 (R) の培養液に、排出口サンプル (H) および貯留池サンプル (T) を接種して、30°Cで 10 日間培養した。その結果を Fig. 3-2 に示した。前項と同様に貯留池サンプル (T) では、上層培地に一本薄い褐色のバンドが pH5 および pH6 の培地で検出された。このバンドは pH 5 と pH 6 の排水口サンプル (H) では観察できなかった。pH 4(Y) の培地では、排水口サンプル (H) と貯留池サンプル (T) の両方で、シャープな褐色バンドが検出された。排水口サンプル(YH)では 5 本のバンドが観察され、貯留池サンプル(YT)では少なくとも 2 本のバンドが検出された。これらの結果は、排水口サンプルには、pH 6 でも増殖可能な鉄酸化細菌が存在しているが、貯留池にはこの細菌は存在しないものと考えられた。また、pH 4 で増殖する鉄酸化細菌が排水口サンプルや貯留池サンプル中に複数存在することが示唆された。なお、pH 4 で多くの褐色バンドが検出されたことから、以下の実験には、pH 4 の培養液を用いることとした。

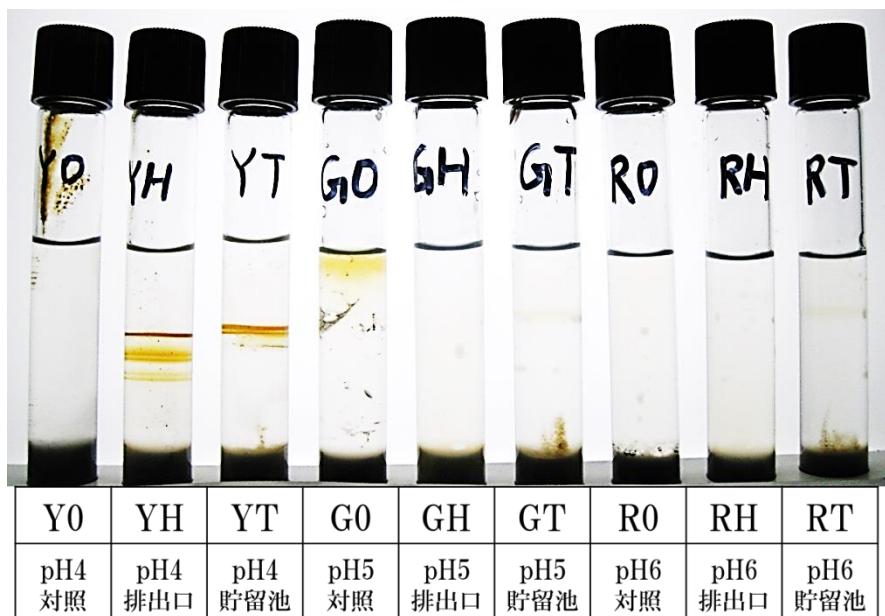


Fig.3-2. Photographs of test tubes with double layer agar inoculated with acid mine drainages. W, medium adjusted at pH 4.0; G, medium adjusted at pH 5.0; R, medium adjusted at 6.0; 0, without inoculum; H, inoculated with the acid mine drainage from Yasumi-ishii tunnel; T, inoculated with the sediment from Yasumi-ishii tunnel. Test tubes were incubated at 30 °C for 10 days.

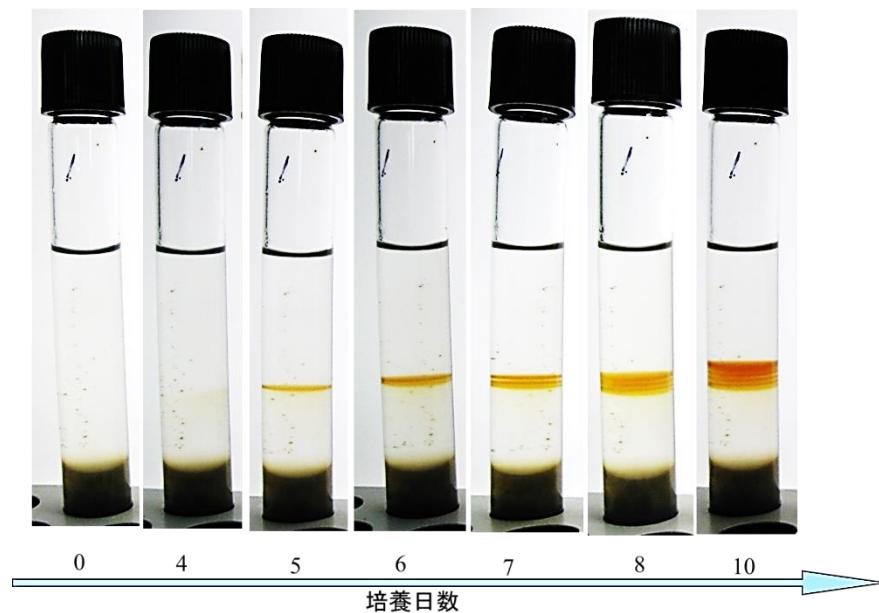


Fig.3-4. Time-dependent appearance of brown bands in the test tube inoculated with acid mine drainage from Yasumiishi tunnel.

3.3.3. 褐色バンド形成に及ぼす培養日数の影響の検討

排出口サンプルを pH 4 の培地に接種し、30°Cで培養した時の褐色バンド形成の経時変化を観察した。結果を Fig. 3-4 に示した。培養 4 日目から、上層培地の中部に薄い褐色バンドが現れ、徐々にそのバンドが濃くなつた。6 日目になるとそのバンドのすぐ下部に新たなバンドが出現した。7 日目にはさらにそのバンドが濃くなるとともに、10 日間の培養によって少なくとも 5 本の褐色バンドが形成された。以上の結果は、増殖速度の異なる鉄酸化細菌が少なくとも 5 種類排水口サンプル中に存在することを示唆している。

3.3.4. 上層培養液からの褐色バンドの分離

排出口サンプルを用いて、30 °Cで 7 日間に培養し、4 本の褐色のバンドを形成している試験管 (YH2) を用いて、褐色バンドの分離を試みた。マイクロピペットを使って、4 本の褐色バンドの層を別々に 20 µl 採取して、新しい培地試験管に植菌し、30 °Cで 7 日間に培養した。その結果を Fig. 3-5 に示した。YH2-2 と YH2-3 が単一のバンドを形成し、YH2-1 と YH2-4 では複数のバンドが形成された。Fig. 3-5 に示したように、同様の分離実験を繰り返した結果、第三段階の分離操作で 5 本の試験管に単一のバンドを形成させることができた。バンドの位置がほぼ同じである 2-1-1 と 2-1-3、2-1-2 と 2-4-2 は同じ菌である可能性があるが、この手法で菌の分離が可能であると考えられた。

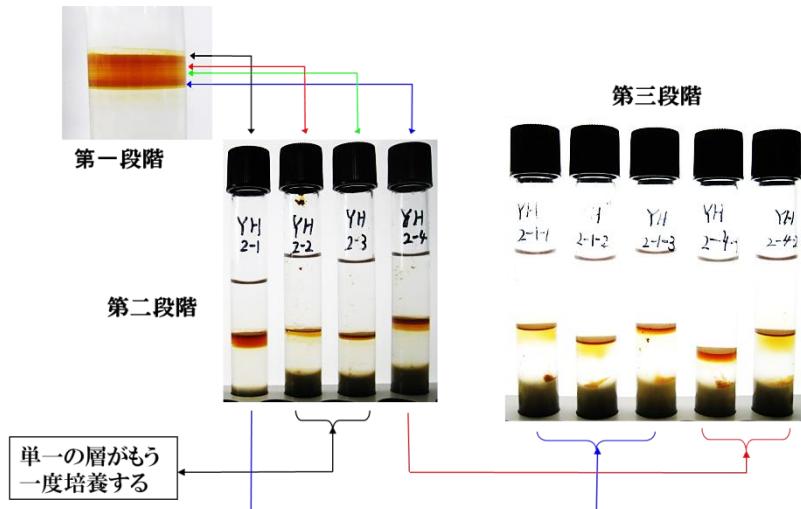


Fig. 3-5. Separation of brown bands formed in test tubes inoculated with acid mine drainage from Yasumi-ishi tunnel.

3.3.5. 褐色バンドの顕微鏡観察

単一になった褐色バンドの試料を採取し、微生物の存在を調べるために顕微鏡観察を行った。Fig. 3-6 に示したように、位相差顕微鏡観察では明確に細菌の存在を確認することができなかつたので、同一視野を DAPI 染色して蛍光顕微鏡で観察した。その結果、寒天に埋まった状態で細菌の存在が検出された。既に述べたように、*Gallionella* はねじれた細胞外構造物を形成する。その構造物は、細胞から分泌された多糖で構成された纖維状の構造物に鉄酸化物が沈着して形成されると考えられている。蛍光顕微鏡観察の結果、Fig. 3-6 に示したように、細胞分泌されたと考えられる纖維状の構造物が観察された。

以上の結果は、褐色バンドは細菌によって形成され、その細菌は鉄酸化能を持つ *Gallionella* であることを示唆した。

3.3.6. DNA の抽出と PCR 分析

試験管中の褐色バンドを採取し、方法に述べた方法で DNA を抽出した。その DNA を鋳型に用いてプライマー 341F-GC と 518R-DGGE により、16S rDNA を増幅した。3%アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の検出を行った結果、Fig. 3-7 に示したように抽出した DNA から期待される長さのバンドは増幅できなかつた。原因としては、褐色の形成に関与する細菌の数が低いこと、あるいは抽出の際に同時に採取したアガロースが DNA の抽出を阻害した可能性が考えられた。

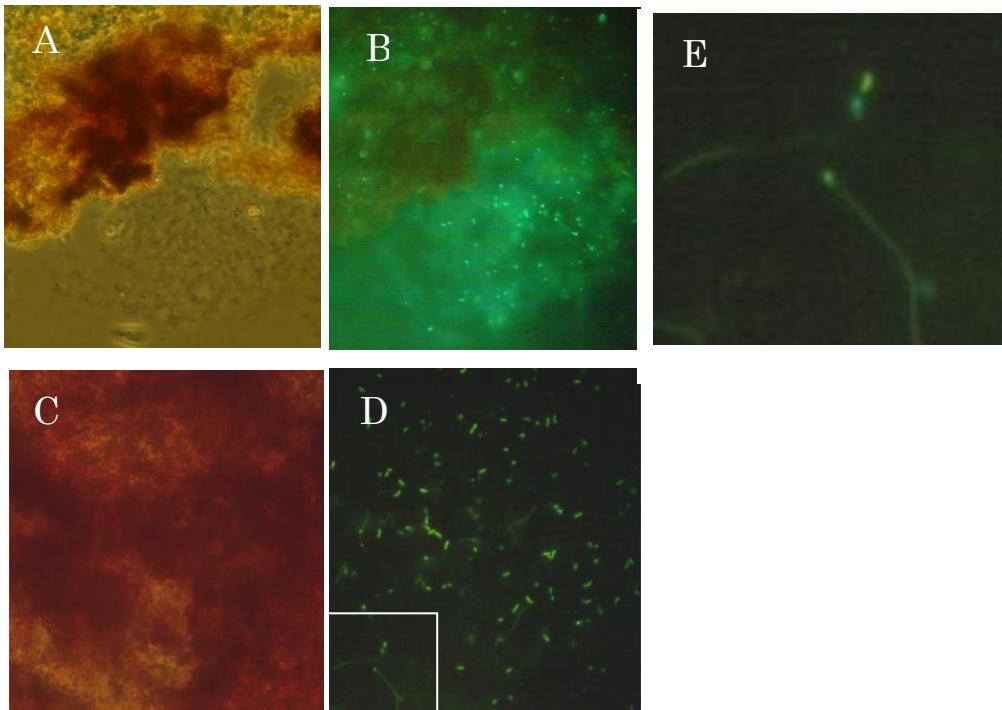


Fig. 3-6. Photo-micrographs of brown band formed in culture tube. A and C, phase contrast micrographs; B, D, and E, fluorescence micrographs; E, photograph enlarged an image enclosed with white line in photograph D.

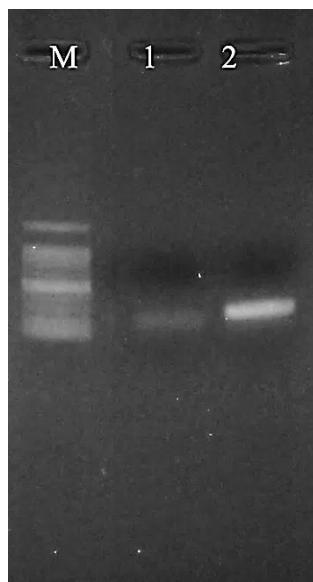


Fig. 3-7. Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA amplified by PCR using primers, 341F-GC and 518R-DGGE, and DNA extracted from medium in test tube.

Lane M, 100 bp DNA ladder marker; 1, PCR product form DNA extracted from medium; 2, *At. ferrooxidans* 16S rDNA.

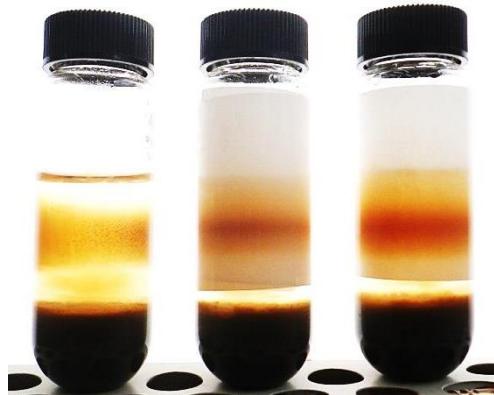


Fig. 3-8. Large scale cultivation of bacteria forming a brown band. Test tubes ($\phi 32$ mm \times 106 mm) were used for the cultivation.

3.3.7. 遠心沈殿管による培養

前項で述べたように、試験管からの DNA の抽出はできなかった。培養終了後の試験管を観察すると、試験管表面に褐色の沈殿物が付着していた。微生物がこの沈着物の中に存在する可能性が考えられたため、新たな培養方法を考案した。前項で用いた口径 16.5 mm、胴長 135 mm の試験管に変えて、口径 32 mm、胴長 106 mm の円底ネジロ遠心沈殿管を用いた。試験管表面に沈着が観察されたことから、この沈着物を採取するために、Fig. 3-7 に示したように、その管内壁に濾紙を巻いた。単一の褐色バンドの試料を植菌して、30 °Cで、3 週間に培養した。Fig. 3-8 に示したように、濾紙を巻いたものも巻いていないもも幅の広い褐色バンドが観察された。

3.3.8. 濾紙から細菌の DNA の抽出と PCR 分析

濾紙を遠心沈殿管から取り出して、深い茶色の部分を細い破片に切って、遠心チューブに入れて、DNA を抽出することを行った。

遠心沈殿管中の濾紙から抽出した DNA を使って、プライマー 341F-GC と 518R-DGGE を用いて、3%アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の増幅を行った。しかし、Fig. 3-8 に示したように、試料から調製した DNA を鋳型に用いた PCR で増幅バンドを検出することはできなかった。

3.3.9. 結論

寒天二重層で、褐色のバンドが形成された。この部分の寒天を顕微鏡観察すると細菌の存在が観察できたので、バンドは鉄酸化細菌によって形成されたものと考えられる。顕微鏡観察によって、*Gallionella* が作ることが知られているねじれた構造物に似た構造物が観察されたため、褐色バンドを形成した細菌が *Gallionella* である可能

性があるとかんがえている。しかし、その細菌が *Gallionella* かどうかを確認することは出来なかった。今後、抽出方法や融点の低い寒天を使う等の検討を行い、増殖してきた微生物の同定を行う必要がある。

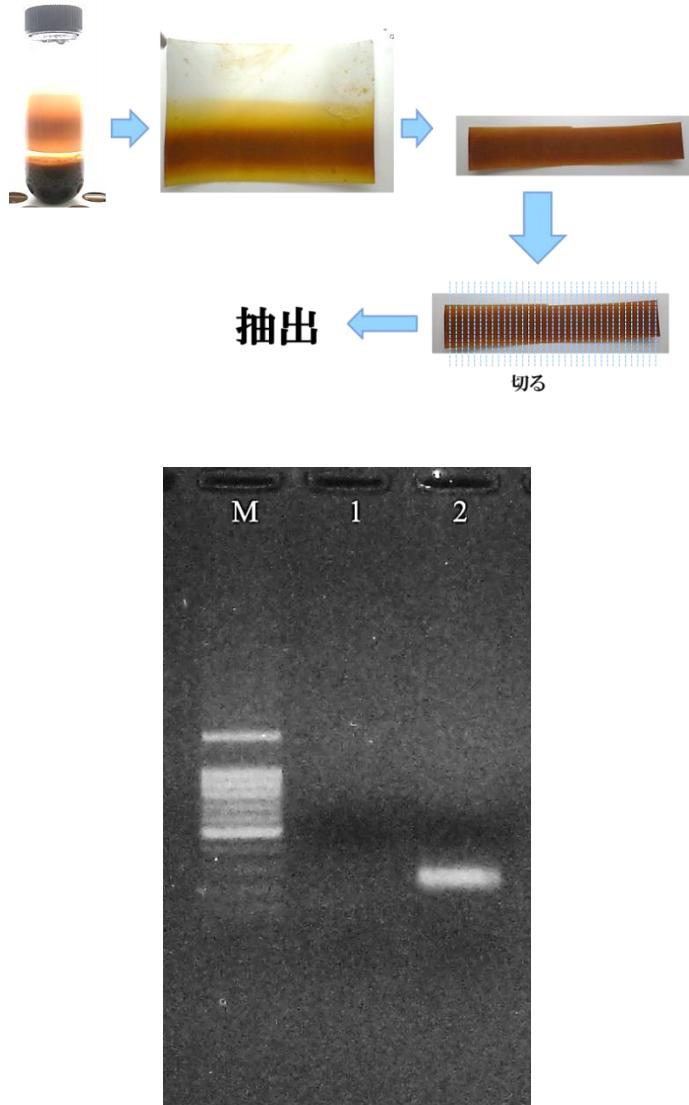


Fig. 3-8. Agarose gel electrophoresis of 16S rDNA amplified by PCR using primers, 341F-GC and 518R-DGGE, and DNA extracted from filter papers immersed in culture medium in test tube.

Lane M, 100 bp DNA ladder marker; 1, PCR product form DNA extracted from medium; 2, *At. ferrooxidans* 16S rDNA.

第4章 総論

酸性鉱山廃水は、世界的に深刻な環境問題である。日本では、特に大きな問題として取り上げられていないのは、我々の先駆者がこの問題に真剣に取り組み、解決方法を見いだしてくれているからである。日本の鉱山は、既にほとんど閉山されているが、低品位の鉱石は依然として鉱山内に存在している。このような場所は、好酸性微生物の格好の住みかで、いまだにそれらの微生物の作用で酸性鉱山廃水が流出している。この処理法の研究は、今井らによって精力的に研究された[1]。日本ではこのような酸性鉱山廃水は、鉄や重金属を除去した後、中和して放流されている。鉱山廃水中に多量に含まれている Fe^{2+} は、鉄酸化細菌の作用で Fe^{3+} に酸化された後、炭酸カルシウムの添加によって沈殿除去される。岡山県の中部に位置する柵原鉱山は、高品位の黄鉄鉱を産出していた。この鉱山からの酸性廃水もこの方法で処理されている。このシステムの構築には、当初、鉱山廃水から単離された鉄酸化細菌 *At. ferrooxidans* 株が使用された。現在もこの処理システムは、良好に酸性鉱山廃水を処理しており、*At. ferrooxidans* が鉄の酸化に関与している[20]。しかし、鉱山廃水処理は、残存する鉱石がなくなるまで続けなくてはならないため、経済的に安価な処理システムの開発が必要である。pH 2.5 付近での微生物処理に代えて、pH 4 付近で微生物処理が出来れば、廃水処理の中和に使用する薬品の費用を大幅に低減できる。

本研究で見出した *Ferrovum* や *Gallionella* は、pH 4 付近の酸性環境で鉄を酸化する細菌であると考えられるため、これらの細菌が、安価な処理システムの開発のための救世主になるものと考えている。そのためには、細菌の培養法の確立が不可欠である。古くから硫酸酸性の環境を作り出す微生物は、鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌であることがよく知られていた。酸性環境を作り出す微生物として、これまで最も詳細にその性質が研究してきた微生物は、*Thiobacillus ferrooxidans* と *Thiobacillus thiooxidans* (現在は再分類されて *At. ferrooxidans* および *At. thiooxidans* と呼ばれている)である。鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌の分離には、Silverman と Lundgren によって開発された 9K 基本塩をベースに用いる液体や固体培地が使用されてきた[37]。この 9K 基本塩培地は、*At. ferrooxidans* が増殖しやすいように最適化されたものなので、pH 2~3 で 20~30°C の酸性環境からは、 Fe^{2+} 、硫黄化合物、黄鉄鉱を酸化して独立栄養的に増殖する *At. ferrooxidans* や、元素硫黄や硫黄化合物を酸化して独立栄養的に増殖する *At. thiooxidans* がある意味では選択的に分離してきた。酸性環境で鉄や硫黄を酸化している細菌は *At. ferrooxidans* や *At. thiooxidans* ばかりではない。酸性環境中から DNA レベルで頻繁に検出される *L. ferrooxidans* は、*At. ferrooxidans* より 9K 培地での増殖が遅いため、9K 培地を用いると *At. ferrooxidans* しか分離されないことになる[38]。また、*L. ferrooxidans* は、固体培地での増殖率も低い。増殖速度の違いは、固体培地での細菌の検出や分離効率に大きな影響を及ぼす。これらの問題を克服し、好酸性で鉄や硫黄を酸化する細菌の分離効率

を向上させるために、分離用固体培地の改良が行われた[39]。この方法は、これまで問題視されていた、寒天やアガロースに含まれている増殖阻害物質（寒天やアガロースの加水分解物）を、従属栄養細菌によって分解・除去し、独立栄養細菌の分離効率を向上させようというものである。好酸性の従属栄養細菌である *Acidiphilum* を含んだ固体培地を下層に調製し、その上層に *Acidiphilum* を含まない固体培地を重層する分離用培地が開発された。この培地は、ある意味では自然の酸性微生物生態系を培養に反映させたものである。つまり、酸性環境では独立栄養細菌と従属栄養細菌が共存している。独立栄養細菌は、従属栄養細菌に栄養を与えており、従属栄養細菌は独立栄養細菌の増殖を阻害する有機物を除去している。この方法で、これまでとは全く性質の異なる多くの好酸性菌の鉄・硫黄酸化細菌が分離されるようになった[40]。これまで、9K 基本塩をベースに用いて頻繁に分離される *At. ferrooxidans* や *At. thiooxidans* が、酸性環境を作り出す微生物の主役であると考えられてきたが、酸性環境の詳細な化学的解析、培養手法の改良や微生物生態系の分子生物学的な解析手法の導入によって、その主役が大きく変わろうとしている。

本研究で検出された *Ferrovum* や *Gallionella*、あるいはアキーアはこれまでに存在が報告されていなかった微生物である。培養を可能にするためには、新たな培地や培養法の開発が必要であると考えている。今回培養に使用した、試験管を用いた寒天二重層の培養違法は、菌の検出には有効であるが、菌の分離や大量培養には、更なる培地や培養法の改良が必要である。培養法の確立には、メタゲノム解析等の手法を用いて、微生物の機能に関する情報を取得することも、有効であると考えている。鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌は、その極めて基本的な原則に基づいて生きており、地球規模での鉄や硫黄の循環において無くてはならない微生物である。人類は、金属資源の枯渇や重金属汚染などの環境問題に直面している。鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌のニューフェイスの発掘が、資源利用や環境修復に新たな展開をもたらすといつても良いかも知れない。

謝辞

本研究を行うにあたって、熱心に御指導していただきました岡山大学大学院自然科学研究科 上村一雄 教授に心より感謝し、厚く御礼申し上げます。適切な御助言を頂きました岡山大学大学院自然科学研究科 金尾忠芳 副教授に心より感謝いたします。適切な御助言をいただきました岡山大学大学院環境生命科学研究科 稲垣賢二 教授、岡山大学自然科学研究科 高田潤 教授に深く感謝の意を表します。また、本研究を行うにあたり、有益な議論・意見交換を行って、日々の研究生活の中で共に支えあってきた微生物機能学研究室の各位に感謝します。

最後に、研究生活を支えていたいた家族、友人に心より感謝いたします。

参考文献

1. 今井一民 1984 独立栄養細菌. Bioscience Series, 化学同人.
2. 上村一雄 2003 海洋微生物によるバクテリアリーチング. 月刊海洋 号外 No. 35, 255-260.
3. Sand W, Gehrke T, Jozsa P.G., and Schippers A, 1999. (Bio)chemistry of bacterial leaching – direct vs indirect bioleaching. Hydrometallurgy, 51, 115-129.
4. Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, and Sand W, 2003. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanism of bacterial metal sulfide oxidation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 63, 239-248.
5. Rawlings D.E., 2005 Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. Microb. Cell Fact., 4, 13.
6. Schippers A, Sand W, 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. Appl Environ Microbiol. 65, 319–321.
7. Coram N.J. and Rawlings D.E., 2002. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40°C. Appl. Environ. Microbiol., 68, 838-845.
8. Tyson G.W., Lo I, Baker B.J., Allen E.E., Hugenholtz P, Banfield J.F., 2005. Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an acidophilic microbial community. Appl. Environ. Microbiol. 71, 6319-6324.
9. 丸山 正 1998 好熱性古細菌 古賀洋介・亀倉正博編「古細菌の生物学」, 東京大学出版会, pp77-107.
10. Golyshina O.V. and Timmis K.N., 2005. *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. Environ. Microbiol. 7, 1277-1288.
11. Friedrich C.G., 1998. Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. Adv. Micro. Physiol. 39, 235-289.+
12. Hallberg K.B. and Lindström E.B., 1994. Characterization of *Thiobacillus caldus*, sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. Microbiology, 140, 3451-3456.
13. Schrenk M.O., Edwards K.J., Goodman R.M., Hamers R.J. and Banfield J.F., 1998. Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum*

- ferrooxidans*: implications for generation of acid mine drainage. Science, 279, 1519-1522.
14. Edwards K.J., Bond P.L., Gehringer T.M., and Banfield J.F., 2000. An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. Science, 287, 1796-1799.
 15. Peccia J., Marchand E.A., Silverstain J., and Hernandez M., 2000. Development and application of small-subunit rRNA probes for assessment of selected *Thiobacillus* species and members of the genus *Acidiphilum*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3065-3072.
 16. Bond P.L. and Banfield J.F., 2001. Design and Performance of rRNA Targeted Oligonucleotide Probes for in situ Detection and Phylogenetic Identification of Microorganisms Inhabiting Acid Mine Drainage Environments. Microb. Ecol. 41, 149-161.
 17. Mohmoud K.K., Leduc L.G., and Ferroni G.D., 2005. Detection of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on acid mine drainage environments using fluorescent in situ hybridization (FISH). J. Microbiol. Methods, 61, 33-45.
 18. Johnson D.B., Rolfe S., Hallberg K.B., and Iversen E., 2001. Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. Environ. Microbiol., 3, 630-637.
 19. Okabayashi A., Wakai S., Kanao T., Sugio T., and Kamimura K., 2005. Diversity of 16S ribosomal DNA-defined bacterial population in acid rock drainage from Japanese pyrite mine. J. Biosci. Bioengin., 100, 644-652.
 20. Kamimura K., Okabayashi A., Kikumoto M., Manchur M.A., Wakai S., and Kanao T., 2010. Analysis of iron- and sulfur-oxidizing bacteria in a treatment plant of acid rock drainage from a Japanese pyrite mine by use of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit gene, J. Biosci. Bioeng., 109, 244–248.
 21. Fabienne B.B., Yann I., Francis G., Fabian D., Catherine C., Catherine G., and Catherine J., 2006. A Simple Biogeochemical Process Removing Arsenic from a Mine Drainage Water, Geomicrobiol. J., 23, 201–211.
 22. Burns A.S., Pugh C.W., Segid Y.T., Behum P.T., Leftcariu L., and Bender K.S., 2012. Performance and microbial community dynamics of a sulfate-reducing bioreactor treating coal generated acid mine drainage. Biodegradation, 23, 4125-429.
 23. Biderre-Petit C., Boucher D., Kuever J., Alberic P., Chebance B., Borrel G., Fonty G., and Peyret P., 2011. Identification of sulfur-cycle prokaryotes in a low-sulfate lake (Lake Pavin) using aprA and 16S rRNA gene markers,

- Microb Ecol., 61, 313–27.
- 24. Fujimura R., Sato Y., Nishizawa T., Nanba K., Oshima K., Hattori M., Kamijo T., and Ohta H., 2012. Analysis of early bacterial communities on volcanic deposits on the island of Miyakew (Miyake-jima), Japan: a 6-year study at a fixed site, *Microbes Environ.*, 27, 19–29.
 - 25. Hallberg K.B., Coupland K., Kimura S., Johnson D.B., 2006. Macroscopic streamer growths in acidic, metal-rich mine waters in north Wales consist of novel and remarkably simple bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 2022–2030.
 - 26. Blöthe M., Akob D.M., Kostka J.E., Göschel K., Drake H.L., Küsel K., 2008. pH gradient-induced heterogeneity of Fe(III)-reducing microorganisms in coal mining-associated lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 1019–29.
 - 27. Cummings D.E., March A.W., Bostick B., S. Spring S., Fendorf S., and Rosenzweig R.F., 2000. Evidence for microbial Fe (III) reduction in anoxic, mining impacted lake sediments (Lake Coeur d'Alene, Idaho), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 154–162.
 - 28. Delavat F., Lett M.C., Lièvremont D., 2013. Yeast and bacterial diversity along a transect in an acidic, As-Fe rich environment revealed by cultural approaches. *Sci. Total. Environ.*, 463–464, 823–828.
 - 29. Wu X., Wong Z.L., Sten P., Engblom S., Osterholm P., Dopson M., 2013. Microbial community potentially responsible for acid and metal release from an Ostrobothnian acid sulfate soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 84, 555–63.
 - 30. Borole A.P., Mielenz J.R., Vishnivetskaya T.A., Hamilton C.Y., 2009. Controlling accumulation of fermentation inhibitors in biorefinery recycle water using microbial fuel cells. *Biotechnol Biofuels*, 2, 7, doi: 10.1186/1754-6834-2-7.
 - 31. Kay C.M., Rowe O.F., Rocchetti L., Coupland K., Hallberg K.B., and Johnson D.B., 2013. Evolution of Microbial 'Streamer' Growths in an Acidic, Metal-contaminated Stream Draining an Abandoned Underground Copper Mine, *Life* 3, 189–210.
 - 32. Volant A., Desoeuvr A., Casiot C., Lauga B., Delpoux S., Morin G., Personné J.C., Héry M., Elbaz-Poulichet F., Bertin P.N., and Bruneel O., 2012. Archaeal diversity: temporal variation in the arsenic-rich creek sediments of Carnoulès Mine, France. *Extremophiles*, 16, 645–657.
 - 33. Nakaya A., Onodera Y., Nakagawa T., Satoh K., Takahashi R., Sasaki S., and Tokuyama T., 2009. Analysis of ammonia monooxygenase and archaeal 16S rRNA gene fragments in nitrifying acid-sulfate soil microcosms, *Microbes*

- Environ., 24, 168–174.
- 34. Zhang L., Hu H., Shen J., He J., 2012. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. ISME J. 6, 1032-1045.
 - 35. Bohorquez L.C., Delgado-Serrano L., López G., Osorio-Forero C., Klepac-Ceraj V., Kolter R., Junca H., Baena S., and Zambrano M.M., 2012. In-depth characterization via complementing culture-independent approaches of the microbial community in an acidic hot spring of the Colombian Andes, Microb. Ecol., 63, 103–115.
 - 36. Tishler J.S., Jwair R.J., Gelhaar N.G., Drechsel A., Skirl A.M., Wiacek C., Janneck E., and Schlömann M., 2013. New cultivation medium for “*Ferrovum*” and *Gallionella*-related strains, J. Microbiol. Methods, 95, 138–144.
 - 37. 田野達夫 1991 好酸性微生物—真生細菌—「極限環境微生物ハンドブック」今中忠行・松沢 洋編, サイエンスフォーラム, pp223-232.
 - 38. Rawlings D.E., Coram N.J., Gardner M.N., and Deane S.M., 1999. *Thiobacillus caldus* and *Leptospirillum ferrooxidans* are widely distributed in continuous-flow biooxidation tanks used to treat a variety of metal-containing ores and concentrates. In: Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century. Part A. Edited by Amils R, and Ballester A, Elsevier Press, Amsterdam, 777-786.
 - 39. Johnson D.B., 1995. Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. J. Microbiol. Methods. 23, 205-218.
 - 40. Johnson D.B., 1998 Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. FEMS Microbiol Ecol. 27, 307-317.