

吉野川流域の鉱山跡周辺における重金属耐性微生物の探索

吉野川市高越鉱山・東山鉱山など

—— 極限環境微生物班 (徳島生物学会) ——

佐藤 高則^{*1} 遠藤 陽介^{*2} 柴垣 明佳^{*3} 西山 賢一^{*1} 石田 啓祐^{*1} 山城 考^{*1}

要旨：吉野川流域にある白滝鉱山跡（高知県大川村），高越鉱山跡本坑口，久宗坑口，川田山坑口（徳島県吉野川市山川町），東山鉱山跡（徳島県吉野川市美郷）の採掘滓から，硫酸銅または硫酸鉄存在下でも生育可能な細菌の探索を行った。その結果，白滝鉱山跡では3種の*Streptomyces*属細菌，東山鉱山跡からは*Pseudomonas*属細菌，高越鉱山跡からは*Staphylococcus*属細菌および*Bacillus*属細菌と推定される重金属耐性細菌をそれぞれ単離した。非火山帯の四国においても，鉱山跡採掘滓に重金属耐性細菌が存在し，白滝鉱山跡由来細菌の重金属耐性には，酸化酵素活性が寄与している可能性が示唆された。

キーワード：銅鉱山跡，重金属耐性細菌，16SrRNA遺伝子，スクリーニング，酸化酵素活性

1. はじめに

四国には過去に別子，白滝など日本有数の黄銅鉱，硫化鉄鉱の鉱山が存在した。採掘の際に出た採掘滓は周辺に埋め立てられ，微生物の作用による金属漏出が原因となる周辺水質や土壌の酸性化が問題となっている。硫黄濃度が高い火山帯における銅鉱山跡では鉱山排水の強酸性化が生じ，この強酸性化に関与する細菌として，好酸性好熱性の鉄酸化細菌等が単離されており，その適応機構や酸性化機構が提唱されている（塩田ら，1989）。しかしながら，四国などの非火山帯の銅鉱山跡における重金属耐性細菌の存在の有無に関してはほとんど報告がない。

これらの観点から，非火山帯の吉野川流域の銅鉱山跡における重金属（銅・鉄）耐性細菌の特性について知見を得ることを目的として，吉野川水系河川流域にある白滝鉱山跡（高知県大川村），東山鉱山跡および高越鉱山跡本坑口，久宗坑口，川田山坑口（徳島県吉野川市）の採掘滓から，硫酸銅および硫

酸鉄存在下でも生育可能な細菌の探索を行った。試料を採取した各鉱山跡の位置を図1に示す。

2. 白滝鉱山跡における重金属耐性細菌の探索

1) 鉱山跡採掘滓からの土壌試料採取と重金属耐性細菌のスクリーニング

吉野川上流に存在する白滝鉱山跡は高知県大川村朝谷に位置し（図2(A)），含銅硫化鉄鉱などを採掘していた。この時に生じた採掘滓により整地した土地に，鉱山で働く住民が居住していた。白滝鉱山は1972年に閉山し，鉱山跡地は治山治水資料館や自然王国白滝の里（野外活動センター）として現在利用されている。これら採掘滓で整地された土地では，風化や雨水などの影響により漏出した銅などの金属や酸性水が河川に流れ込み，周辺環境に影響を与える可能性がある。前述したように，四国の鉱山跡採掘滓に生育する細菌に関する知見はほとんどない。そこで本研究では，白滝鉱山跡採掘滓から銅や鉄な

* 1 徳島大学大学院SAS研究部

* 2 徳島大学大学院総合科学教育部

* 3 徳島大学大学院人間・自然環境研究科

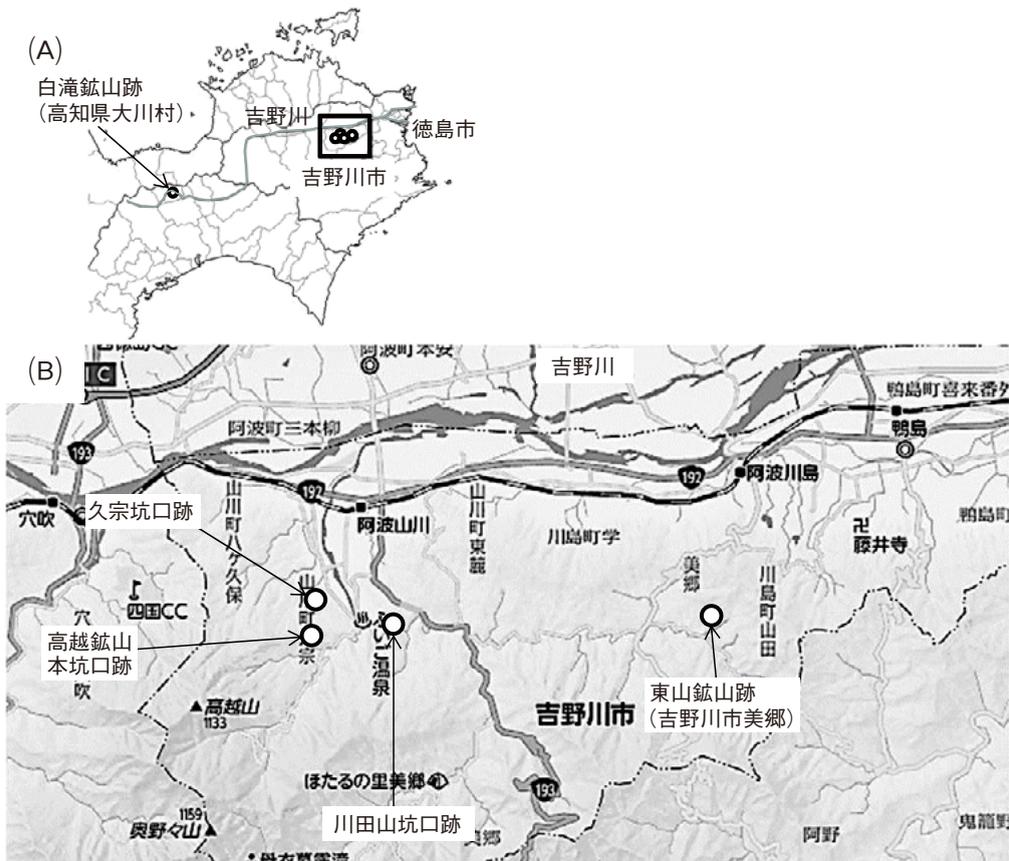


図1 試料を採取した各鉱山跡の位置 (A) 概略図 (B) 吉野川市周辺拡大図 (Aの枠内を拡大)

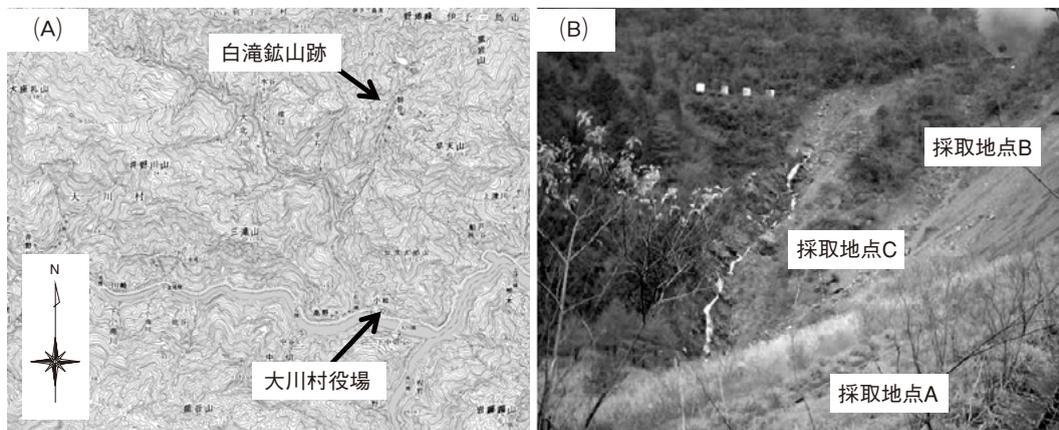


図2 高知県白滝鉱山跡の位置 (A) と試料採取地点 (B)

どに耐性を示す細菌の単離・同定を行った。

採掘滓からの土壌試料は、図2(B)に示したA～Cの三地点の地表10～30cmの土壌を8～21g採取した。A地点は採掘滓により整地された土壌で、地表から10cm, 20cm, 30cmの土壌を採取した。B地点は採掘滓を投棄して形成された斜面で、粒径数cmの碎石が表層に見られ、ここでは地表から10cm, 20cm, 30cmの粒径の細くなった土壌を採取した。

C地点は採掘滓により形成された斜面下部で、B地点より粒径の大きな碎石が多く地盤が固いため、ここでは地表より10cmの土壌のみ採取した。これらの試料4gを滅菌水2mlに懸濁し、静置後、その上清を6,000rpm、5分間遠心分離を行った。得られた上清300μlを、Konstantinidisほか(2003)の文献を参考に、LB寒天培地(0.5% Bacto Yeast Extract, 1% Bacto Tryptone, 1% NaCl, いず

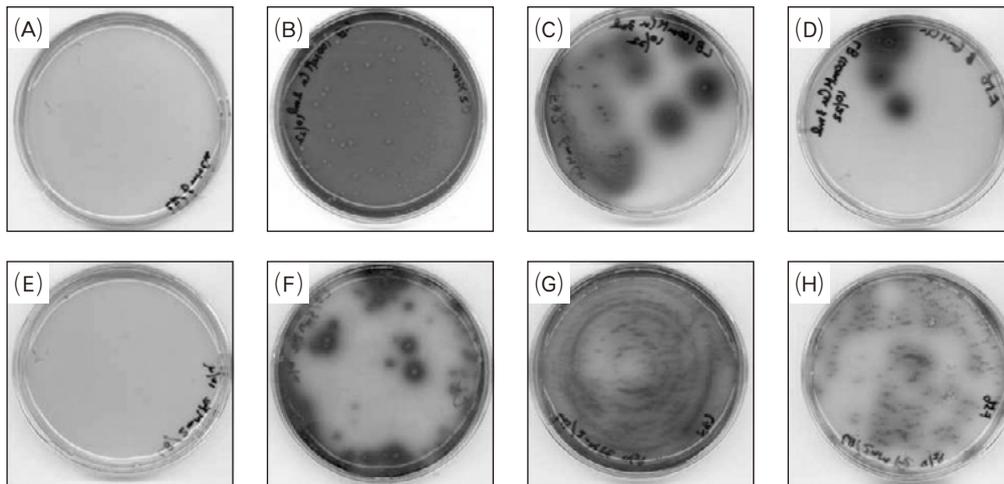


図3 白滝鉱山跡採掘滓より単離した各細菌の培養後の硫酸銅・硫酸鉄培地
(A)–(D) はLB/4mM CuSO₄培地を, (E)–(H) はLB/2mM FeSO₄培地を使用した。
(A), (E) : 培地のみ, (B), (F) : C2を培養後の培地, (C), (G) : F47を培養後の培地,
(D), (H) : F56を培養後の培地

表1 白滝鉱山跡採掘滓から単離した細菌の性状

Bacteria	培養		16S rRNA	コロニー性状			グラム染色		
	LB寒天培地	LB液体培地	PCR増幅	色	形状	サイズ (mm)	グラム染色	形態	サイズ (μm)
C2	LB/6mM CuSO ₄ (茶変) LB/5mM FeSO ₄ (黒変)	LB/2mM CuSO ₄	+	灰白色, 肌色	球状,光沢,Smooth (Fe) 平板,光沢,Rough (Cu)	0.5~3	+	球菌, 菌糸形成	<2.5
F47	LB/2mM FeSO ₄ (黒変), LB/6mM CuSO ₄ (茶変)	LB/2mM FeSO ₄	+	灰白色	球状,光沢,Smooth(Fe), 綿状,Rough(Cu)	1~2	+	球菌, 菌糸形成	2.5~5
F56	LB/2mM FeSO ₄ (黒変), LB/6mM CuSO ₄ (茶変)	LB/2mM FeSO ₄	+	薄い 茶褐色	球状,光沢,Smooth(Fe), 光沢,Rough(Cu)	1~2	+	球菌, 菌糸形成	2.5~5

れもナカライテスク, pH7.2), 0.7mM CuSO₄を含むLB寒天培地 (LB/CuSO₄, pH7.2), 0.8mM FeSO₄を含むLB寒天培地 (LB/FeSO₄, pH7.2) にそれぞれ塗布し, コロニーが出現するまで37°Cで1~7日間培養を行った。その結果, LB培地では225個, LB/CuSO₄培地では103個, LB/FeSO₄培地では370個のコロニーが得られた。得られたコロニーを2~10mM LB/CuSO₄寒天培地または2~10mM LB/FeSO₄寒天培地に継代培養し, 生育の見られる細菌のスクリーニングを行った。その結果, 最終的に三種の重金属耐性細菌 (C2, F47, F56) を単離した。C2は終濃度4mM CuSO₄または5mM FeSO₄を含むLB培地で, F47, F56は6mM CuSO₄または2mM FeSO₄を含むLB培地でそれぞれ生育可能で, 培養後にLB/CuSO₄培地またはLB/FeSO₄培地を, それぞれ茶変または黒変させた (図3)。C2, F47, F56の三種の細菌のコロニー性状は, い

ずれも光沢のある球状 (LB/FeSO₄培地) または平板状 (LB/CuSO₄培地) であった。また, この三種の細菌 (C2, F47, F56) をグラム染色したところ, いずれもグラム陽性で菌糸を形成していた (表1)。

2) 単離された重金属耐性細菌の生化学的試験 および16SrRNA遺伝子解析

上記で単離された重金属耐性細菌の特徴を検討するために, Nordほか (1974) の方法を利用した一般細菌検出キットAPI20E (日本ビオメリュー社) を用いて生化学的試験を行った。三種の細菌のコロニーを滅菌水に懸濁し, 菌体浮遊液をAPI20Eの乾燥基質に添加, 懸濁後, 37°C, 24時間保温した。これを3回行い, 乾燥基質の色の変化を観察し, 標準の比色表と対比させることで判定した (表2)。その結果, 3種の細菌は, クエン酸利用 (CIT), トリプトファンデアミニダーゼ活性 (TDA), ゼラチナーゼ活性 (タンパク質分解酵素活性, GEL) に陽

表2 白滝鉱山跡採掘滓から単離した細菌の生化学試験

Bacteria	OPNG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	VP
C2	-	+	-	-	+	-	+	+	-
F47	+	+	+	+	+	+	-	+	-
F56	+	-	-	-	+	-	-	+	-

Bacteria	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
C2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+/-
F47	+	+/-	-	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-
F56	+	+/-	-	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-

OPNG: β-ガラクトシダーゼ, ADH: アルギニンジヒドロラーゼ, LDC: リジナルカルボキシラーゼ, ODC: オルニチンデカルボキシラーゼ, CIT: クエン酸利用, H₂S: H₂S産生, URE: ウレアーゼ, TDA: トリプトファンデアミナーゼ, VP: アセトイン産生, GEL: ゼラチナーゼ, GLU: グルコース利用, MAN: D-マンニトール利用, INO: イノシット利用, SOR: D-ソルビトール利用, RHA: L-ラムノース利用, SAC: サッカロース利用, MEL: D-メリビオース利用, AMY: D-アミグダリン利用, ARA: L-アラビノース利用
+; 陽性, -; 陰性

性を示した。またC2は、アルギニンジヒドロラーゼ活性 (ADH) に陽性を示し、グルコース (GLU) やサッカロース (SAC) を利用可能であった。F47は、β-ガラクトシダーゼ (OPNG), ADH, リジナルカルボキシラーゼ (LDC), オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) の酵素活性を有していた。F56は、OPNGに陽性を示した。また、F47およびF56の糖利用については、単糖であるラムノース (RHA) やアラビノース (ARA), 二糖類であるアミグダリン (AMY) で陽性を示した場合もあったが、再現性が得られなかったため、判定不能であった。これより三種の細菌では、タンパク質やアミノ酸を炭素源または窒素源として、グルコース、ガラクトース, サッカロースの単糖類または二糖類を炭素源として利用可能であることが示唆された。

さらに、これら3種の重金属耐性細菌の同定を行うために、16SrRNA遺伝子を指標とした遺伝子解析を行った。まず、C2, F47, F56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ほか (1996) の方法を参考に、*E.coli* 16SrRNA遺伝子の11-26位に相当する Upper primer: 5'-ATTCTAGAGTTTGATC ATGGCTCA-3' (24mer, Tm=53℃) および*E.coli* 16SrRNA遺伝子の1393-1411位に相当する Lower primer: 5'-ATGGTACCGTGTGACGGG CGGTGTGTA-3' (27mer, Tm=67℃) を用いて、得られたゲノムDNAを鋳型にして、ASTEPC707サーマルサイクラーによりPCRを行った。PCRプログラムは、98℃, 10秒で変性後、98℃, 10秒→58℃,

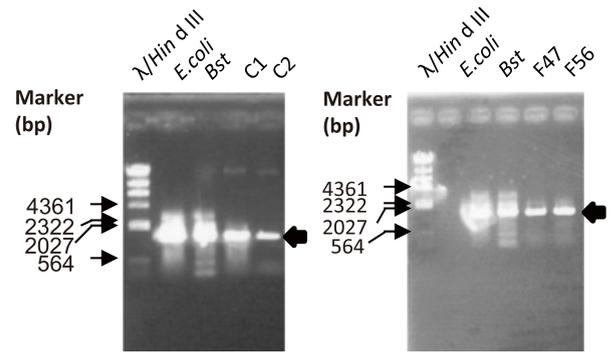


図4 16SrRNA遺伝子のPCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動

白滝鉱山跡採掘滓より単離した細菌のゲノムDNAを鋳型とし、*E.coli* 16SrRNA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。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、TAベクターに挿入し、DNA塩基配列決定を行った。*E.coli*および*Bst* (*Geobacillus stearothermophilus*) のゲノムDNAより増幅したものを、対照として用いた。

表3 白滝鉱山跡採掘滓からの単離した細菌の16SrRNA遺伝子塩基配列のデータベース検索結果

C2		
Accession	Description	Homology (%)
AJ781372.1	<i>Streptomyces viridobrunneus</i> 16S rRNA gene, type strain LMG 20317	99.5
AB184389.1	<i>Streptomyces showdoensis</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13417	99.4
AB184714.1	<i>Streptomyces viridobrunneus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 15902	99.3
F47		
Accession	Description	Homology (%)
AB245392.1	<i>Streptomyces ginsengisoli</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Gsoil 021	97.0
AF331830.1	<i>Streptomyces</i> sp. R25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97.0
AY736239.1	Uncultured actinobacterium clone R24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96.3
F56		
Accession	Description	Homology (%)
GQ332764.1	<i>Streptomyces</i> sp. g2b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98.5
AY360655.1	Uncultured actinobacterium clone M10Ba67 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98.4
EU668315.1	<i>Streptomyces</i> sp. A7(2008) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98.4

60秒→72℃, 90秒のサイクルを30サイクル繰り返し、最後に72℃, 90秒伸長反応を行った。この結果、予想される約1.5kbpの位置にPCR産物が確認された (図4)。さらに、得られたPCR産物をpTA2ベクター (Toyobo) に挿入し、ABI 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について結果をNCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 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3), C2では*Streptomyces viridobrunneus*の16SrRNA遺伝子の塩基配列と99.5%一致し、他には

Streptomyces showdoensis (99.4%), *Streptomyces lipmanii* (99.2%) などと高い相同性を示した。F47は, *Streptomyces ginsengisoli* (97.0%), *Streptomyces sp.* R25 (97.0%), *Streptomyces recifensis* (95.5%) の16SrRNA遺伝子と相同性が見られ, F56は, *Streptomyces sp.* g2b (98.5%), *Streptomyces sp.* A7 (98.4%) の16SrRNA遺伝子と相同性が見られたが, C2と比べ, 既知の細菌の16SrRNA遺伝子との相同性は若干低かった。これらの遺伝子解析の結果より, 今回単離された3種の重金属耐性細菌は*Streptomyces*属細菌であると推定した。

3) 単離された重金属耐性細菌の酸化酵素活性

上記で単離した3種の重金属耐性細菌 (C2, F47, F56) が, 培養後にLB/CuSO₄培地やLB/FeSO₄培地を変色させたことから, 次にこれら3種の細菌中の酸化酵素活性 (Ferroxidase, Ascorbate oxidase, Ascorbate peroxidase) を検討した。まず各細菌を, 2 mM硫酸銅を含むLB液体培地300mlで37℃, 2日間培養し, 遠心分離 (6,000rpm, 20分, 4℃) により集菌後, 20mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.0) で懸濁し, Yeastbuster (Novagen) で30℃, 20分間反応させ, 細菌を溶菌させた。8,000rpm, 20分間, 4℃で遠心分離後の上清を回収・透析し, 粗抽出液を調製した。得られた粗抽出液について, 各酵素活性を測定した。

Ferroxidase活性の測定はBonomiほかの方法 (1996) に従って行った。終濃度0.2mMのFe (SO₄)₂ (NH₄)₂を含む20mM Tris-HCl緩衝液 (pH7.0) 中に, 各細菌の粗抽出液50~200 μ lを混合し, 315nmにおける吸光度を室温で1分間測定し, Fe³⁺の生成量から酵素反応速度を算出した。L-ascorbate oxidase活性の測定は, Pitariほかの方法 (1998) に従って行った。終濃度0.1mMのL-アスコルビン酸ナトリウムを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 中に, 各細菌の粗抽出液50 μ lを混合し, 265nmにおける吸光度を室温で2分間測定し, L-アスコルビン酸の減少量から酵素反応速度を算出した。L-ascorbate peroxidase活性の測定は, Shigeokaほかの方法 (1980) に従って行った。終濃度0.1mMのL-アスコルビン酸ナトリウムおよび0.1mMH₂O₂を含む0.1M

リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 中に, 各細菌の粗抽出液50 μ lを混合し, 265nmにおける吸光度を室温で2分間測定し, L-アスコルビン酸の減少量から酵素反応速度を算出した。

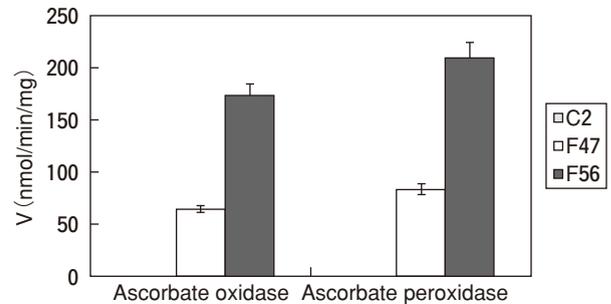


図5 各細菌粗抽出液の酸化酵素活性
試料50 μ l, 基質濃度: 0.1mM, 測定温度: 室温
図中のバーはSDを示す。

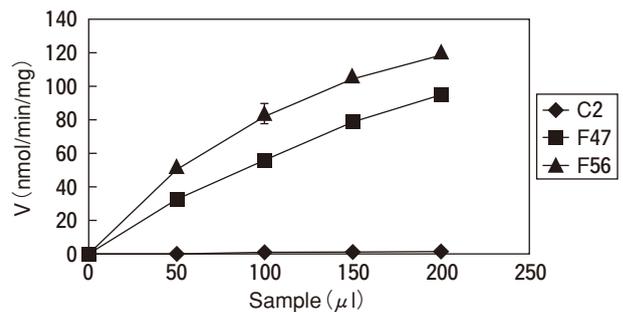


図6 各細菌粗抽出液のFerroxidase活性
基質濃度: 0.2mM, 測定温度: 室温.
図中のバーはSDを示す。

各細菌の粗抽出液におけるAscorbate oxidase活性およびAscorbate peroxidaseの結果を図5に, Ferroxidase活性の測定結果活性を図6に示す。これらの結果から, C2では酸化酵素活性は見られなかったが, F47およびF56の粗抽出液ではL-ascorbate oxidaseおよびL-ascorbate peroxidaseの酸化酵素活性が検出され, またこれらのFerroxidase活性は酵素量依存的に増加した。特にF56は, 検討した3種の細菌抽出液の中で, 最も高い酸化酵素活性が観察された。さらに他の酸化酵素活性として, Peroxidase活性およびPeroxi-redoxin活性 (Chengほか, 2004) についても検討を行ったところ, Peroxidase活性はC2, F47, F56で, Peroxi-redoxin活性はF47およびF56で検出された (データ未掲載)。前述の硫酸銅および硫酸鉄培地の色の変化は, これ

らの酸化酵素の作用により生成した Cu_2O や $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ などが要因であり，単離した*Streptomyces*属細菌はこの酸化物を利用して生育可能であると推定されるが，酸化物の利用形態や硫酸銅・硫酸鉄耐性との相関については今後詳細な検討が必要である。

さらに，*Streptomyces*属細菌は細胞外にProtease inhibitor (SSI) を分泌することが知られているため (Taguchiほか, 1994)，代表的なProteaseであ

るTrypsinおよびSubtilisinに対する培養液遠心後上清の阻害活性についても検討したところ，F47およびF56では阻害能が見られた (データ未掲載)。以上の形態観察，生化学的特性，遺伝子解析および酵素科学的特徴を踏まえ，今回単離した三種の細菌は，放線菌の一種である*Streptomyces*属細菌であると推定され，非火山帯の四国においても，鉱山跡採掘滓に重金属耐性細菌が存在し，白滝鉱山跡由来細菌の重金属耐性には，*Streptomyces*属細菌の酸化酵

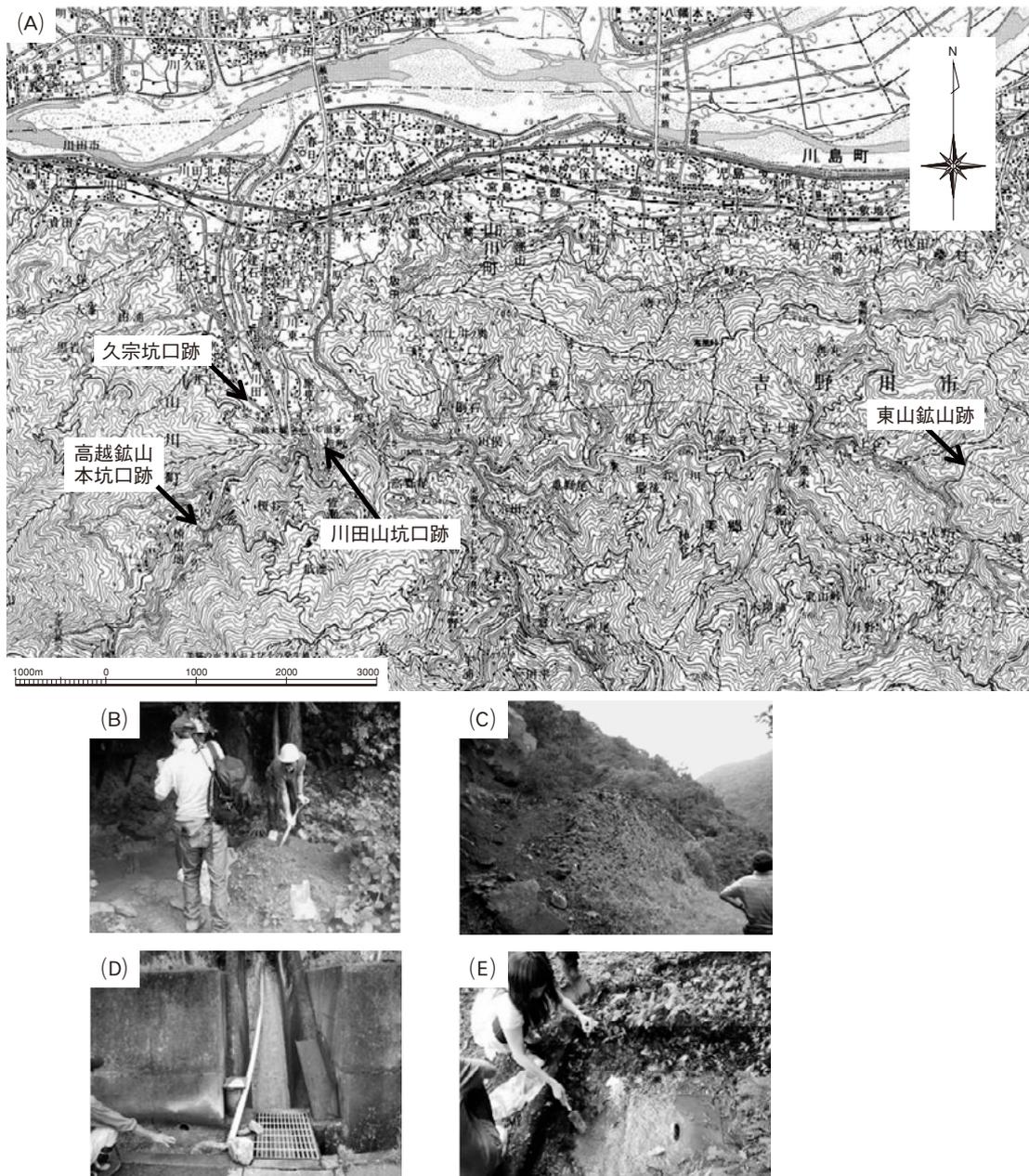


図7 高越鉱山(本坑口，川田山坑口，久宗坑口)および東山鉱山跡の位置 (A) と試料採取地点 (B) 高越鉱山本坑口坑道入口，(C) 高越鉱山川田山坑口 (ふいご橋精錬所跡)，(D) 高越鉱山久宗第三坑口湧水，(E) 東山鉱山鉱泉湧水

素活性が寄与している可能性が考えられる。

3. 高越, 名越, 久宗, 東山鉱山跡における重金属耐性細菌の探索

1) 鉱山跡採掘滓からの土壌試料採取と重金属耐性細菌のスクリーニング

高越鉱山跡本坑口, 久宗坑口, 川田山坑口は吉野川市山川町に位置し (図7), 含銅硫化鉄鉱などを採掘していたが, 久宗坑口は1971年に閉山した (山川町史編集委員会, 1987)。一方, 東山鉱山は吉野川市美郷 (旧美郷村) に存在し (図7), 徳島県内では最大級の含銅硫化鉄鉱脈を有していたが, 終戦期に閉山した。前章の白滝鉱山と同様に, これらの鉱山跡でも採掘で生じた採掘滓が積み上げられており (東明ほか, 2012), 過去には風化や雨水などの影響により漏出した銅などの金属や酸性水が河川に流れ込み, 田畑などに鉱毒被害を与えたとの記録がある (山川町史編集委員会, 1987)。しかし, これらの鉱山跡採掘滓に生育する細菌に関する知見はこれまでほとんどない。そこで, 高越および東山鉱山跡採掘滓から銅や鉄などに耐性を示す細菌の単離・同定を行った。

採掘滓からの土壌試料は, 図7に示した各鉱山跡採掘滓の地表より10~30cmの土壌を約20g採取した。高越鉱山跡本坑口では6地点, 久宗坑口および川田山坑口ではそれぞれ2地点, 東山鉱山跡では3地点で土壌試料を採取した。高越鉱山跡本坑口はコンクリートで封鎖されているが, 廃水口から内部廃水が排出されている (図7(B))。ここでは, 廃水溜り底部の堆積泥 (2地点), 坑口横の粘土質堆積土壌 (4地点) を採取した。川田山坑口 (図7(C)) は精錬所跡で, 粒径数cmの碎石が表層に見られ傾斜地で地盤が固いため, ここでは地表から10cmの2地点で土壌試料を採取した。久宗坑口 (図7(D)) は, 第3坑口湧水口に堆積したバイオフィーム状の試料 (2地点) を採取した。最後に東山鉱山跡では, 東山鉱山鉱泉湧水 (図7(E)) 底部の赤褐色粘土質土壌を10~30cm採取した。これらの各試料4gを, 前述の白滝鉱山跡試料と同様の処理 (Konstantinidisほか, 2003) を行い, 2 mM CuSO_4 を含むLB寒天培地 (LB/ CuSO_4 , pH7.2), 2 mM FeSO_4 を含む

LB寒天培地 (LB/ FeSO_4 , pH7.2), 2 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ を含むLB寒天培地 (LB/ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, pH7.2) にそれぞれ塗布し, コロニーが出現するまで37°Cで1~7日間培養を行った。その結果, LB/ CuSO_4 培地では87個, LB/ FeSO_4 培地では52個, LB/ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 培地では84個のコロニーが得られた。また, 得られたコロニーの採取場所別の内訳は, 高越本坑口41コロニー, 久宗坑口5コロニー, 川田山坑口24コロニー, 東山153コロニーであった。得られたコロニーを2~4 mM LB/ CuSO_4 寒天培地または2~8 mM LB/ FeSO_4 寒天培地に継代培養し, 生育の見られる細菌のスクリーニングを行った。その結果, 最終的に4種の重金属耐性細菌 (HYC24, K2F10, K2F13, K2F20) を単離した。

HYC24は東山鉱山跡採掘滓由来の試料で, グラム陰性の桿菌であった。残り3種 (K2F10, K2F13, K2F20) は高越鉱山跡本坑口採掘滓由来の試料でいずれもグラム陽性細菌であり, LB/8 mM FeSO_4 で培養後に細菌が茶色に着色していた。形状はK2F13のみ桿菌で, K2F10およびK2F20は球菌であった (表4)。また, これらの細菌では, 培養後の培地の黒変または茶変などの変化は観察されなかったため, 酸化酵素活性については今回検討していない。

表4 高越および東山鉱山跡採掘滓から単離した細菌の性状

Bacteria	培養		16S rRNA遺伝子		グラム染色	
	LB寒天培地	PCR増幅	PCR増幅	グラム染色	形態	サイズ (μm)
HYC24	LB/4mM CuSO_4	+	+	-	桿菌	2.5~5
K2F10	LB/8mM FeSO_4	+	+	+	球菌	<2.5
K2F13	LB/8mM FeSO_4	+	+	+	桿菌	<2.5
K2F20	LB/8mM FeSO_4	+	+	+	球菌	<2.5

+; 陽性, -; 陰性

2) 単離された重金属耐性細菌の生化学的試験および16SrRNA遺伝子解析

上記で単離された重金属耐性細菌の特徴を検討するために, 前述の白滝鉱山跡試料と同様に, API20E (日本ビオメリュー社) を用いて生化学的試験を行った (Nordlほか, 1974) (表5)。その結果, 4種の細菌は, クエン酸利用 (CIT), トリプトファンデアミナーゼ活性 (TDA) に陽性を示した。またHYC24は, アルギニンジヒドロラーゼ (ADH), ウレアーゼ (URE), アセトイン産生

表5 高越および東山鉱山跡採掘滓から単離した細菌の生化学試験

Bacteria	OPNG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	VP
HYC24	-	+	-	-	+	-	+	+	+
K2F10	-	-	-	+	+	-	+	+	-
K2F13	+	+	-	-	+	-	-	+	+
K2F20	+	-	-	+	+	-	+	+	-

Bacteria	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
HYC24	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
K2F10	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
K2F13	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
K2F20	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-

OPNG: β-ガラクトシダーゼ, ADH: アルギニンジヒドロラーゼ, LDC: リジンデカルボキシラーゼ, ODC: オルニチンデカルボキシラーゼ, CIT: クエン酸利用, H₂S: H₂S産生, URE: ウレアーゼ, TDA: トリプトファンデアミナーゼ, VP: アセトイン産生, GEL: ゼラチナーゼ, GLU: グルコース利用, MAN: D-マンニトール利用, INO: イノシット利用, SOR: D-ソルビトール利用, RHA: L-ラムノース利用, SAC: サッカロース利用, MEL: D-メリビオース利用, AMY: D-アミグダリン利用, ARA: L-アラビノース利用 +; 陽性, -; 陰性

(VP) に陽性を示し, グルコース (GLU) やサッカロース (SAC) を利用可能であった。K2F10は, オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) とUREに陽性を示した。K2F13は, β-ガラクトシダーゼ (OPNG), ADH, VP, ゼラチナーゼ (GEL) に陽性を示し, 糖としてGLU, SACに加え, D-マンニトール (MAN), イノシット (INO), D-ソルビトール (SOR) L-アラビノース (ARA) を利用可能であることが示唆された。K2F20では, OPNG, オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC), UREに陽性を示し, 糖としてGLU, MAN, SACを利用可能であった。

さらに, これら4種の重金属耐性細菌の同定を行うために, 先に述べた白滝鉱山跡試料と同様の方法 (Beffaほか, 1996) にて, 16SrRNA遺伝子を指標とした遺伝子解析を行った。各細菌ゲノムDNA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産物が確認された (図8)。さらに, 得られたPCR産物をpGEM-Tベクター (Promega) に挿入した後, 全領域解析のためFasmac株式会社に塩基配列決定を依頼し, 16SrRNA遺伝子全長の塩基配列を決定した。

得られた結果をNCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 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6), HYC24では*Pseudomonas rhodesiae*の16SrRNA遺伝子の塩基配列と99.9%一致したため,

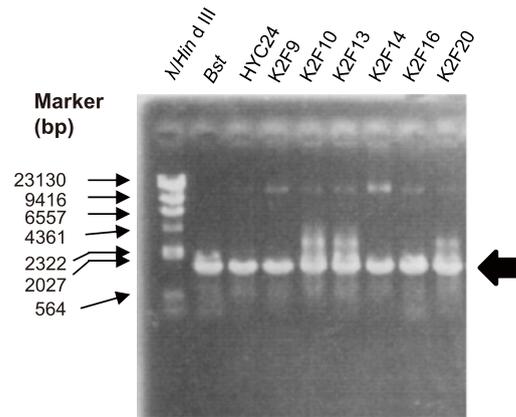


図8 16SrRNA遺伝子のPCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動

高越および東山鉱山跡採掘滓より単離した細菌のゲノムDNAを鋳型とし, *E.coli* 16SrRNA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。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, TAベクターに挿入し, DNA塩基配列決定を行った。Bst (*Geobacillus stearothermophilus*) のゲノムDNAより増幅したものを, 対照として用いた。

表6 高越および東山鉱山跡採掘滓から単離した細菌の16SrRNA遺伝子塩基配列のデータベース検索結果

HYC24【東山鉱山】		
Accession	Description	Homology (%)
FJ462694.1	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> strain NO5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.9
NR_024911.1	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> strain CIP 104664 16S ribosomal RNA, complete sequence	99.9
HM316012.1	Uncultured bacterium clone ncd489e02c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.9
K2F10【高越鉱山】		
Accession	Description	Homology (%)
FJ957612.1	Uncultured <i>Staphylococcus</i> sp. clone JPL-S3_E01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
FJ768459.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain MB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
AY741152.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain S09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
K2F13【高越鉱山】		
Accession	Description	Homology (%)
GQ903333.1	<i>Bacillus licheniformis</i> strain dhs-55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.6
GQ360077.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain SQR9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.6
GQ249662.1	<i>Bacillus subtilis</i> strain HJ5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99.6
K2F20【高越鉱山】		
Accession	Description	Homology (%)
AM696873.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0002A058	95.8
HM339341.1	Uncultured bacterium clone ncd1134h04c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95.8
HM333526.1	Uncultured bacterium clone ncd1104e11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95.8

*Pseudomonas*属細菌 (グラム陰性細菌) であると推定される。K2F10は, *Staphylococcus* sp.や*Staphylococcus epidermidis*の16SrRNA遺伝子の塩基配列と100%一致し, *Staphylococcus*属細菌 (グラム陽性細菌) であることが示唆された。また, K2F13では, *Bacillus licheniformis* (99.6%),

Bacillus subtilis (99.6%) などと高い相同性を示し、*Bacillus*属である可能性が示唆された。最後に K2F20は、未同定の細菌 (Uncultured bacterium) の16SrRNA遺伝子と95.8%の相同性が見られたが、他の細菌の検索結果と比べ相同性は若干低く、データベース上で候補となる具体的な細菌名が無かったため、具体的な細菌の推定に至らなかった。

以上の形態観察、生化学的特性、遺伝子解析の結果を踏まえ、東山鉱山跡採掘滓には*Pseudomonas*属細菌が、高越鉱山跡採掘滓にはブドウ球菌である*Staphylococcus*属細菌と*Bacillus*属細菌が、それぞれ硫酸銅／硫酸鉄 (II) に耐性を示す細菌として単離された。今後、これらの細菌の重金属耐性に寄与する因子 (遺伝子や酵素など) の同定が課題である。

4. まとめ

火山帯や鉱山跡採掘滓などから単離されている鉄酸化細菌としては好酸性グラム陰性細菌の*Acidithiobacillus ferrooxidans*や*Acidithiobacillus thiooxidans*が報告されており (塩田ほか, 1989; Johnsonほか, 1992; Paulinoほか, 2001), これらの細菌が関与する金属硫化鉱物からの金属溶出および酸性化機構 (間接溶出説) が提唱されている。塩田ほか (1989) によると、黄鉄鉱 (FeS_2) が空気酸化を受け FeSO_4 と硫酸が生成し、この酸性条件下 (pH2.0) で鉄酸化細菌により $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ が生成する。生成した $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ は再度黄鉄鉱に作用し、 FeSO_4 と硫酸を生じる。酸性条件下で鉄酸化細菌の存在により、このサイクルが繰り返されることが、周辺環境の酸性化や鉄溶出の原因と考えられている。一方でこれらの鉄酸化細菌は、岩手県旧松尾鉱山跡の強酸性鉱山廃水の処理やバイオリッチングなどにも用いられている (Wangほか, 2009)。

一方本研究では、吉野川流域に存在した黄銅鉱、硫化鉄鉱の鉱山跡採掘滓から、硫酸銅または硫酸鉄に耐性を示す細菌の探索を行った。その結果、白滝鉱山跡 (高知県大川村) では3種の*Streptomyces*属細菌を (C2, F47, F56), 東山鉱山跡 (徳島県吉野川市美郷) からは*Pseudomonas*属細菌を (HYC24), 高越鉱山跡 (徳島県吉野川市山川町) からは*Staphylococcus*属細菌 (K2F10) および

*Bacillus*属 (K2F13) と推定される重金属耐性細菌をそれぞれ見出した。これより、非火山帯の四国においても、鉱山跡採掘滓に硫酸銅／硫酸鉄 (II) 耐性細菌が存在し、このうち白滝鉱山跡由来細菌の硫酸銅／硫酸鉄 (II) 耐性には、酸化酵素活性が寄与している可能性が示唆された。本研究で硫酸銅／硫酸鉄耐性細菌として推定した*Streptomyces*属細菌は、他の事例でもCu, Feなどに耐性を示す株が報告されており、Superoxide dismutaseやCupric reductaseのような酸化還元酵素の寄与が推定されている (Schmidtほか, 2007; Albarracinほか, 2008; Louisほか, 2009)。また*Pseudomonas*属細菌では、細胞内に取り込んだ銅を活性中心とする multicopper oxidaseがferroxidase活性を示すことでFe (II) を利用可能であるとの報告もある (Hustonほか, 2002)。一方*Staphylococcus*属細菌や*Bacillus*属でも重金属に耐性を持つ株が報告されている (Turgayほか, 2012)。本研究で単離された細菌は硫酸銅／硫酸鉄 (II) 耐性を示し、窒素源や炭素源として、それぞれ前述のアミノ酸や糖を利用可能であり、また中性付近で生育が可能であったが、好気的かつ中性条件下で FeSO_4 を用いてスクリーニングを行ったため Fe^{3+} への空気酸化の影響があり、硫酸鉄 (II) 耐性として単離された細菌が、実際の黄鉄鉱等のFe (II) を利用可能かどうかは不明である。前述の間接溶出説では酸性条件下の場合であるが、中性、アルカリ性での黄鉄鉱などからの金属溶出には嫌気性の中性鉄酸化細菌や光合成細菌などの関与が示唆されており、鉱石や採掘滓内部の嫌気的な環境にあるFe (II) を酸化する (塩田ほか, 1989)。この点に関しては、今回単離した2種の*Streptomyces*属細菌 (F47, F56) がFerroxidase活性を有しており、Fe (II) を酸化できる可能性があることから、今後、嫌気的条件下または酸性条件下での鉄酸化能や実際の黄鉄鉱等への作用を検討する必要がある、その他の単離した細菌に関しても同様の検討を行うことで、将来的には硫酸銅／硫酸鉄 (II) 耐性細菌を用いたバイオレメディエーションに応用できる可能性があると考えられる。

謝辞

本研究は、平成18年～20年度文部科学省現代的教育ニーズ取組み支援プログラム（現代GP）「豊饒な吉野川を持続可能とする共生環境教育」（実施校：徳島大学総合科学部）の援助を受け実施された。また、平成19年度徳島大学教育研究支援経費および平成21年度徳島大学総合科学部創生プロジェクト研究経費の援助を受けて実施された。

徳島県吉野川市山川町での高越鉱山跡での試料採取について、NPO法人元気やまかわネットワークの原井恵美様をはじめとする会員各位のご指導・ご協力を頂いた。また、白滝鉱山跡での試料採取について、徳島大学大学院金井拓氏、青木拓氏、北村真一氏のご協力を頂いた。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

文献

- Albarracin, V.H., Avila, A.L., Amoroso, M.J., Abate, C.M. (2008) Copper removal ability by *Streptomyces* strains with dissimilar growth patterns and endowed with cupric reductase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 288, 141–148.
- 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.
- Bonomi, F., Kurtz Jr., D.M., Cui, X. (1996) Ferroxidase activity of recombinant *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin. *J Biol Inorg Chem.* 1, 67–72.
- Cheng, X.J., Yoshihara, E., Takeuchi, T., Tachibana, H. (2004) Molecular characterization of peroxiredoxin from *Entamoeba moshkovskii* and a comparison with *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 138, 2, 195–203.
- Huston, W.M., Jennings, M.P., McEwan, A.G. (2002) The multicopper oxidase of *Pseudomonas aeruginosa* is a ferroxidase with a central role in iron acquisition. *Mol. Microbiol.* 45, 6, 1741–1750.
- Johnson, D.B., Ghauri, M.A., Said, M.F. (1992) Isolation and characterization of an acidophilic, heterotrophic bacterium capable of oxidizing ferrous iron. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 5, 1423–1428.
- Konstantinidis, K.T., Isaacs, N., Fett, J., Simpson, S., Long, D.T., Marsh, T.L. (2003) Microbial Diversity and Resistance to Copper in Metal-Contaminated Lake Sediment. *Microb. Ecol.* 45, 191–202.
- Louis, M.S., Kothe, E., Abate, C.M. (2009) Cadmium biosorption by *Streptomyces* sp. F4 isolated from former uranium mine. *J. Basic Microbiol.* 49, 1–8.
- Nord, C.E., Lindberg, A.A., Dahlbäck, A. (1974) Evaluation of five test-kits-API, AuxoTab, Enterotube, PathoTec and R-B-for identification of Enterobacteriaceae. *Med Microbiol Immunol.* 159, 3, 211–220.
- Paulino, L.C., Bergamo, R.F., Mello, M.P., Garcia Jr., O., Manfio, G.P., Ottoboni, L.M.M. (2001) Molecular characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains isolated from mine wastes in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 80, 65–75.
- Pitari, G., D'Andrea, G., Salucci, M.L., Rossi, A., Avigliano, L. (1998) Effect of tunicamycin on the activity and immunoreactivity of ascorbate oxidase (*Cucurbita pepo medullosa*) expressed in cultured green zucchini cells. *Glycoconj J.* 15, 8, 777–782.
- Schmidt, A., Schmidt, A., Haferburg, G., Kothe, E. (2007) Superoxide dismutase of heavy metal resistant *streptomycetes*. *J. Basic Microbiol.* 47, 56–62.
- Shigeoka, S., Nakano, Y., Kitaoka, S. (1980) Metabolism of hydrogen peroxide in *Euglena gracilis* Z by L-ascorbic acid peroxidase. *Biochem J.* 186, 1, 377–380.
- 塩田日出夫ほか高分子学会バイオ・高分子研究会編 (1989) 9. 硫黄・鉄酸化細菌の鉱床地帯における生態, 特異な機能を有する微生物とその応用, 学会出版センター, pp.189–211.
- Taguchi, S., Kojima, S., Terabe, M., Miura, K., Momose, H. (1994) Comparative studies on the primary structures and inhibitory properties of subtilisin-trypsin inhibitors from *Streptomyces*. *Eur J Biochem.* 220, 3, 911–918.
- 東明省三, 石田啓祐, 森江孝志, 阿部 肇, 西山賢一 (2012) 吉野川市山川町に分布する段丘堆積物と鉱山跡, 阿波学会紀要, 吉野川市山川町総合学術調査報告, 56, in press
- Turgay, O.C., Görmez, A., Bilen, S. (2012) Isolation and characterization of metal resistant-tolerant rhizosphere bacteria from the serpentine soils in Turkey. *Environ. Monit. Assess.* 184, 515–526.
- Wang, J., Bai, J., Xu, J., Liang, B. (2009) Bioremediation of metals from printed wire boards by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* and their mixture. *J. Hazard. Material.* 172, 1100–1105.
- 山川町史編集委員会編 (1987) 改訂山川町史, pp.275–282.

Exploration for Cu, Fe-resistant bacteria from copper mine spoils in the Yoshino River basin, Shikoku.

SATOH Takanori, ENDO Yousuke, SHIBAGAKI Haruka, NISHIYAMA Ken-ichi, ISHIDA Keisuke, YAMASHIRO Tadashi, Proceedings of Awagakkai, No.58 (2012), pp.187–196.