

## *Trichosporon pullulans* ZL7-4-2 株の高濃度硫酸および アルミニウムに対する耐性とそれらの除去

河東田 茂義<sup>1)</sup>・西 沢 美 知<sup>1)</sup>・原 田 庄 一<sup>1)</sup>・吉 本 光 里<sup>1)</sup>  
小 山 高 明<sup>1)</sup>・我 妻 忠 雄<sup>1)</sup>・森 井 直 也<sup>2)</sup>・滝 田 潤<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>山形大学農学部生物資源学科生物資源利用化学講座・<sup>2)</sup>日東ベスト株式会社  
(平成17年10月3日受理)

Tolerance and Removal Ability of *Trichosporon pullulans* ZL7-4-2  
against High Concentration of Sulfuric Acid and Aluminum Ions

Shigeyoshi KATO<sup>1)</sup>, Misato NISHIZAWA<sup>1)</sup>, Shoichi HARADA<sup>1)</sup>,  
Misato YOSHIMOTO<sup>1)</sup>, Takaaki KOYAMA<sup>1)</sup>, Tadao WAGATSUMA<sup>1)</sup>,  
Naoya MORII<sup>2)</sup>, Jyun TAKITA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Section of Bioresource Utilization, Faculty of Agriculture, Yamagata University, Tsuruoka 997-8555, Japan,

<sup>2)</sup>Food Research Section, Center Institution, NittoBest Corporation, Sagae 991-8610, Japan

(Received October 3, 2005)

### Summary

Two strains of yeast, designated ZL7-4-1 and ZL7-4-2 isolated from the acidic wastewater (pH 1.8) of disused Zao-mine could grow in the medium of pH 0.8 and were identified as *Trichosporon pullulans*. The influence of aluminum (Al) ions on the growth and bioaccumulation properties of growing cells of *T. pullulans* strain ZL7-4-2 was studied. The strain showed strong resistance to high concentration (200 mM) of Al ions. The pH of Al containing medium (lower concentrations than 10 mM) shifted from 2.5 to neutral and Al were almost accumulated in cells after cultivation of 5 days. The Al accumulation and the yeast growth were dependent on the increases in the initial values of pH and Al concentration of medium. These results suggest that this yeast can be utilized for bioremediation of strong acidic wastewater containing extremely high concentration of Al ions.

**Key Words** : wastewater, *Trichosporon pullulans*, acid tolerance, aluminum accumulation

### 緒 論

pH 3.0 以下の硫酸酸性排水は日本全国の100ヶ所以上の温泉や鉱山および休廃止鉱山から排出されている<sup>1)</sup>。山形県内にも約10ヶ所の廃止鉱山があり、その多くで、雨水や地下水が坑道やその周辺の岩盤を流れる際に酸素の存在下で黄鉄鉱などの硫化鉱物と化学反応して生じた硫酸や、硫酸酸性下で可溶化した有害な重金属(ヒ素, カドミウム, 鉛など)を含む抗廃水が河川に流出してい

る。このため操業を停止した後も半永久的に廃水処理問題が発生している。現在、坑廃水のほとんどは未処理のまま流出されるか、一部で消石灰あるいは炭酸カルシウムによる中和凝集沈殿処理が行われている。しかし、化学的な中和処理により生じるスラッジ(汚泥)は多量であり、その処理は困難で、ほとんどは沈殿池などの産業廃棄物処理場に送られる。現在、それらの処理場の確保は日々困難になってきている<sup>2)</sup>。うえ、実際これらの化学的中和処理に携わる人の中には、噴霧の際の

キーワード: 鉱山廃水, *Trichosporon pullulans*, 硫酸耐性, アルミニウム吸着

消石灰の吸引は避けられず、アルカリの持つタンパク質溶解などの毒性に苦しむ人も少なくない。現在、現行の化学的中和処理法に比べて低コストで、廃棄物の削減と回収がより容易であり、人体に対しより安全な方法が緊急の課題である。近年硫酸還元細菌による硫酸の除去方法<sup>1,3)</sup>や、金属耐性の硫酸還元細菌をはじめとする微生物による生きた細胞での吸収や吸着による重金属の除去法が提案されている<sup>4,5)</sup>。真菌類もまた各種の重金属除去能を有しており、酵母の中にはこの機能性の優れている菌株も存在し<sup>6)</sup>、耐酸性能、酸中和能およびアルミニウム耐性を有する酵母 *Rhodotorula* 属の数菌株が、土壤中から分離されている<sup>7-9)</sup>。われわれは、これまで優れた耐酸性能と強い酸中和能を有する酵母 *Trichosporon pullulans* の2菌株を蔵王廃鉱山より初めて単離、同定し、それらの諸性質を検討してきた。この酵母の持つ耐酸性能および酸中和能を坑廃水処理のために利用するためには、それらの能力の限界や最適条件の検討が必要である。特に酸性土壌での植物の生育阻害は Al 毒性が最大の原因になっている<sup>10)</sup>。そこで本研究は、本研究室保存の *T. pullulans* の2菌株を用い、硫黄鉱山廃水に約 2.3–2.9 mM (63–78 mg/l) と高濃度含まれ、植物細胞への毒性が強いことが示されている可溶性アルミニウム<sup>10)</sup>への抵抗性や吸着能を解明することを目的とした。

## 実験方法

### 1. 使用酵母菌株および酸性培地の調製と培養条件

供試2菌株は、2001年7月に山形県上市市の蔵王廃鉱山より採集し、その後 pH2.5 の硫酸酸性 YEPD 培地を用いて集積培養後に同寒天培地で純粋分離し、“The Yeasts, a taxonomic study, 4ed.”<sup>12)</sup>に従って *Trichosporon pullulans* と同定したものである。*T. pullulans* はこの属で唯一ビタミン要求性がないことに特徴がある。これらの2菌株を pH2.5 の硫酸酸性 YEPD 寒天平板培地で培養したところ、それぞれ酵母状と桿状形態を示したことから、ZL7-4-1 と ZL7-4-2 に類別した。これら両菌株とも YEPD 寒天スラント (pH6.0) 上で、4℃で保存し、2ヶ月毎に維持した。これらの菌株の生理学的特性を Table 1 に示した。“The Yeasts, a taxonomic study, 4 ed.”<sup>12)</sup>によれば、*T. pullulans* は30℃で生育できないこととなっているが、本菌株は生育が可能であ

Table 1. Physiological characteristics of ZL7-4-1 and ZL7-4-2 isolated from the wastewater of disused Zao-mine.

Fermentation : absent			
Assimilation :			
Glucose	+	D-Xylose	+
Galactose	+	D-Ribose	+
Sucrose	+	Mannitol	+
Maltose	+	L-Rhamunose	+
Lactose	–	myo-Inositol	+
Melibiose	+	D-Glucuronate	+
Melezitose	+	Erythritol	+
Raffinose	+		+
Growth in the vitamin-free medium used ammonium sulfate as the nitrogen source :			+
Nitrate growth : +			
Nitrite growth : +			
Growth pH : 0.8-8.0			
Growth at 30℃ : +			

The medium containing 5.0 g glucose, 5.0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.1 g CaCl<sub>2</sub>, 0.1 g NaCl in one liter of distilled water.

ることが異なった。

前培養は、培地 100 ml 当り 2 M 硫酸を 1.8 ml 添加して pH 2.5 に調節した後、ディスクフィルター(0.20 μm)で濾過滅菌した硫酸酸性 YEPD 培地を試験管に 10 ml ずつ分注し、それに菌体を 2 白金耳分接種し、30℃、48 時間静置培養を行った。本培養は、静置培養の場合、培地を硫酸でそれぞれ目的の pH 値 (pH 0.8-1.5) に調節し、ディスクフィルターで濾過滅菌した硫酸酸性 YEPD 培地をそれぞれ 5 ml ずつ分注し、前培養後の菌体濃度が 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml に調節して接種し、培養した。以下に述べる各種の本培養における菌体濃度はすべてこの濃度に統一した。本培養を振とう培養で行う場合は、Kanazawa and Kunito<sup>13)</sup>の方法に準じ、硫酸酸性培地 (pH 1.0, 1.5, 2.0 および 2.5) では 2 M 硫酸をそれぞれ 3.9 ml, 3.3 ml, 2.6 ml および 1.8 ml 加え、YEPD 培地 (100 ml) の pH を変化させることで調整した。その YEPD 培地と硫酸溶液は別々に 121℃ で 15 分間滅菌し、混合した。硫酸酸性 YEPD 培地 (pH 2.5) で前培養した菌体は 500 ml 容三角フラスコ中の硫酸酸性 YEPD 培地に接種し、回転振とう培養 (200 rpm) を行った。硫酸酸性条件下における酸中和能調査における初期 pH 値の変化を検討するために ZL7-4-2 株を用いて以下の

培養を行った。前培養は、前述と同様の方法で行ったが、本培養は、500 ml 容三角フラスコに硫酸 (pH 1.9 の培地は培地 100 ml 当たり 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 2.8 ml, pH 2.0 の培地は 2.6 ml 投入) を加えて pH を調整した YEPD 培地を用い、回転振とう培養を行った。

## 2. アルミニウムに対する耐性および不溶化

アルミニウム (Al) に対する耐性試験には、50 mM, 100 mM または 200 mM の Al を含む酸性 YEPD 培地 (pH 2.0, 100 ml) を用いた。この培地は 1 M 硫酸アルミニウム (Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>), 1 M 塩化アルミニウム (AlCl<sub>3</sub>) あるいは 1 M 硝酸アルミニウム (Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 溶液と酸性 YEPD 培地量混合比を変化させることで調製した。1 M の Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> は、Kanazawa and Kunito<sup>13)</sup>の方法に従って調製し、他の Al 溶液も同様に調製した。これらの溶液はディスクフィルターで濾過滅菌した。このようにして調製した本培養用培地に前培養後の培養液を接種して、回転振とう培養を行った。10 mM 以下の Al 濃度の不溶化実験の基本的な操作は、我妻<sup>14,15)</sup>の示した方法に従った。本培養は可溶性 Al の安定性を考慮して、塩酸性 Al 含有 (pH 2.5 で 2.5 mM, 5.0 mM, 7.5 mM あるいは 10 mM Al を添加) YEPD 培地で行った。Al を含む培地は、4 M HCl 溶液を適正量 (2.5 mM, 5.0 mM, 7.5 mM および 10 mM Al ではそれぞれ 1.55%, 1.5%, 1.45% および 1.4% (v/v)) を加え、次に 0.1 M AlCl<sub>3</sub> 溶液あるいは 0.1 M Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> を目的の濃度になるように加えて調製した。この本培養用の培地に培養液を接種して、回転振とう培養を行った。Al の不溶化量を測定するため培養終了後の培養液を遠心分離 (10,000 rpm × 15 min) し、沈殿に蒸留水を加え、上記の条件で 3 回菌体洗浄を行った。それらの上清液と洗浄液中の可溶性 Al 量を測定し、添加量から減少量を求め、不溶化した Al 量を推定した。

## 3. Al の菌体吸着および吸収

ZL7-4-2 株を用い、可溶性 Al 濃度 2.5 mM および 7.5 mM を添加した培地で前述の培養方法で培養した。培養終了後、Zhang ら<sup>16)</sup>の方法に従い、培養液を 2 分し、それぞれ 10 mM クエン酸溶液と蒸留水で遠心洗浄 (10,000 rpm, 15 min) を 3 回繰り返した。洗浄後の菌体を凍結乾燥した。それらの標品約 2 mg を密封試験管に入れ、1 M 塩酸 1 ml を加えて 100℃、16 時間加熱した。

冷却後、適宜希釈した後、ディスクフィルターで濾過し、Al 量を測定した。クエン酸溶液洗浄した細胞を標品として測定した Al 量を菌体内吸収 Al、蒸留水洗浄した細胞を標品として測定した Al 量 (菌体内吸収 Al および表層付着 Al 量の総和) を菌体吸着 Al とした。

## 4. 分析方法

供試菌の生長は、660 nm の O. D. を分光光度計 (日立 U-1000) により測定し求めた。培養終了時に、遠心分離 (3,000 rpm × 5 min) により菌体除去した培地上清を、ディスクフィルターで濾過した後、その濾液の還元糖量と pH 値をそれぞれ測定した。菌体乾燥重量は上記の遠心分離で集菌した菌体を蒸留水で 3 回洗浄し、凍結乾燥後の重量から求めた。pH の測定は pH メーターで行い、還元糖量はジニトロフタル酸法 (DNPA 法) により求めた<sup>17)</sup>。培地上清中の可溶性 Al の測定は誘導結合プラズマ (ICP) 発光分析装置 (Varian, International AG, Zug, Switzerland, Liberty 200) で行った。

## 結 果

### 1. 耐酸性能の検討

*Trichosporon pullulans* の ZL7-4-1 株および ZL7-4-2 株 2 菌株の初期 pH 0.8-1.5 下における生育試験の結果を Fig. 1 に示した。静置培養においては両菌株とも pH

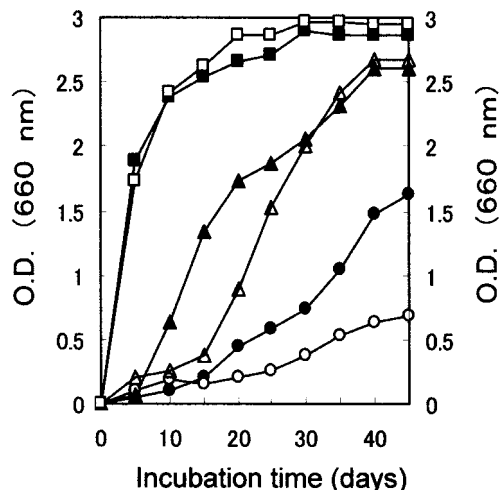


Fig. 1. Change of growth in *T. pullulans* strain ZL7-4-1 (closed) and ZL7-4-2 (open) in acidic medium of pH 0.8 (circles), pH 1.2 (triangles) and pH 1.5 (squares).

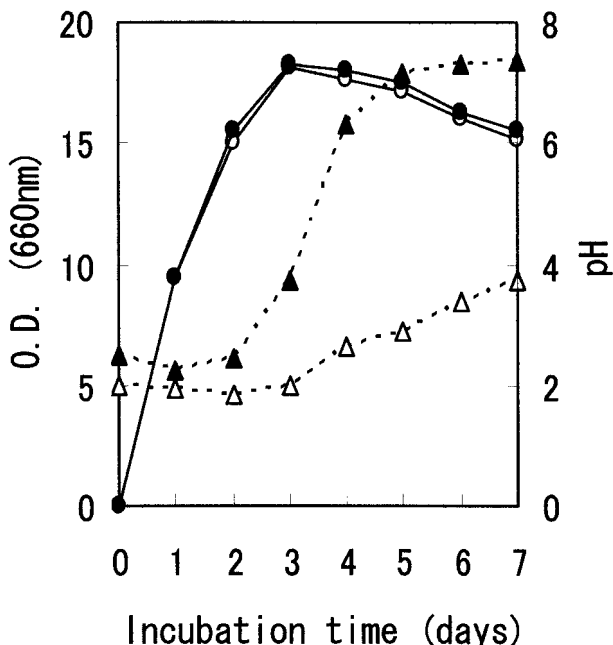


Fig. 2. Change of growth (circles) and pH value (triangles) in *T. pullulans* strain ZL7-4-2 in acidic medium of pH 2.0 (open) and pH 2.5 (closed)

0.8 (培養終了時の50日目ではいずれも pH 0.77) 以上の硫酸酸性 YEPD 培地で生長可能であったが、初期 pH は培養終了後も変化しなかった。しかし、両菌株とも pH 0.7 以下では生育できなかった。振とう培養における耐酸性の調査は pH 0.8 および 1.0 の培地で行ったが、両菌株とも pH 0.8 では共通して生育せず、pH 1.0 の培地では 10 日目とともに生育し O. D. (660 nm) 値が 2.8 となるとともに、培地の還元糖量はほとんど消失した。しかし、培地の pH は変動しなかった (結果は省略)。ZL7-4-1 株および ZL7-4-2 株の菌体収量はそれぞれ、2.15 g/L, 5.18 g/L であり、ZL7-4-2 株のほうが高かった。このため、以降の実験は ZL7-4-2 株を用いて行った。酸中和能を調べる目的で pH 2.0 および 2.5 に調整した硫酸酸性 YEPD 培地を用いて培養した結果を Fig. 2 に示した。pH 2.0 および 2.5 における生長パターンも培養 7 日目の菌体収量も約 6 g/L であり生長量の差は認められなかったが、硫酸酸性 YEPD 培地の中和経過は大きく異なり、pH 2.5 は培養 2 日目以降急激に上昇し、5 日目では中性を示した。一方、pH 2.0 においては培養 7 日目でも pH 4.0 以下であった。

## 2. ZL7-4-2 株の可溶性 Al 耐性

Kawai ら<sup>7)</sup>は *Rhodotorula glutinis* の 1 菌株の Al 耐性は pH 3.0 の培地で 100 mM が限度であることを示した。そこで ZL7-4-2 株の Al に対する耐性を調べる目的で、50 mM, 100 mM および 200 mM の Al を含む硫酸アルミニウム ( $Al_2(SO_4)_3$ )、あるいは可溶性 Al の形状の安定性を考慮し、塩化アルミニウム ( $AlCl_3$ ) および硝酸アルミニウム ( $Al(NO_3)_3$ ) を加えた酸性 YEPD 培地 (pH 2.5) を用いて試験した。供試菌株はいずれの場合も、生長可能であり、培養 5 日目の O. D. (660 nm) 値は 15 を超えたが、培養期間中は可溶性 Al の減少は認められなかった (結果は省略)。1 例として 100 mM の Al 含有酸性 YEPD 培地 (pH 2.5) における結果を Fig. 3 に示した。pH についてはいずれの Al 塩濃度条件下でも、培養 10 日目で上昇が認められたが、4.0 を超えることはなかった。このような高濃度の Al の存在では、供試菌株の高い中和能は認められなかった。さらに菌体生長もいずれの種類 Al 塩においても大差なく、また Al の有無もほとんど影響がなかった。

しかし、唯一  $AlCl_3$  添加の場合のみ、培養 6 日目以降で菌体はフロックを形成し、吸光度の測定ができなかった。加えて培養過程における培地上清の可溶性 Al 濃度

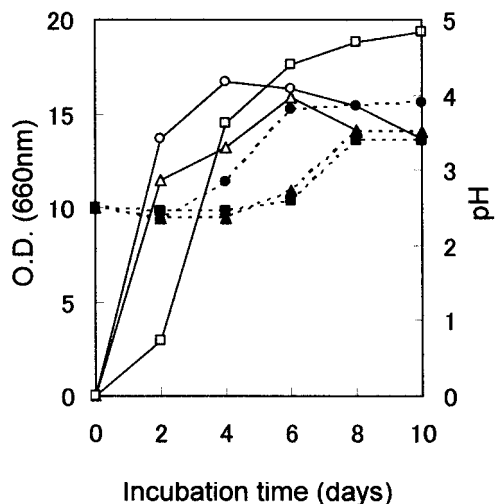


Fig. 3. Change of growth (open) and pH value (closed) in *T. pullulans* strain ZL7-4-2 in acidic medium of pH 2.5 containing 100 mM  $Al_2(SO_4)_3$  (circles),  $AlCl_3$  (triangles) and  $Al(NO_3)_3$  (squares)

はほとんど変化しなかった(結果は省略)。

### 3. アルミニウムの不溶化と菌体吸収

以上のように 50 mM 以上の高濃度の Al の存在下では、酸性培地の中和も Al の不溶化も生じなかったことから、低 Al 濃度における酸性培地の中和と Al の不溶化を検討した。自然界において最も高濃度の Al を含む廃水は硫黄鉱山の廃水である<sup>10)</sup>が、その濃度は 3 mM 以下である。そこで本試験では、2.5, 5, 7.5 および 10 mM の Al を酸性培地に加え、ZL7-4-2 株による可溶性 Al の不溶化を検討した。なお、可溶性 Al の形状の安

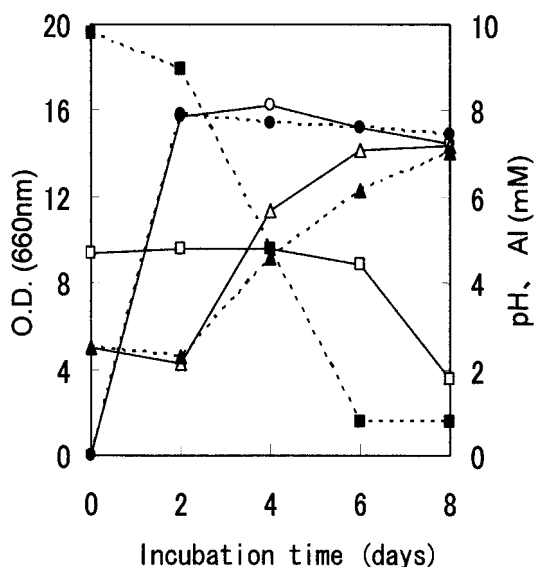


Fig. 4. Change of growth (circles) pH value (triangles) and aluminum ion (squares) in *T. pullulans* strain ZL7-4-2 in acidic medium of pH 2.5 containing 5 mM (open) and 10 mM (closed) of  $AlCl_3$ .

Table 2. Changes in O. D., pH, Al concentration and viable cell number in the spent acidified YEPD medium (pH 2.5) after growing of strain ZL7-4-2 for 6 days.

	$AlCl_3$ (mM) added				$Al(NO_3)_3$ (mM) added			
	2.5	5.0	7.5	10.0	2.5	5.0	7.5	10.0
O.D. (660nm)	21.5	12.8	13.5	14.2	21.1	15.0	17.3	14.8
pH	7.00	8.00	7.20	7.28	6.67	7.22	7.20	7.03
Soluble Al ions (mM)	2.32	4.47	2.02	0.64	2.38	4.18	1.85	0.73
Viable cells (log CFU/ml)	1.65	N. D.	7.13	N. D.	3.34	N. D.	6.61	N. D.

N. D. : Not determined.

定性を考慮し、 $AlCl_3$  および  $Al(NO_3)_3$  を加えた酸性 YEPD 培地 (pH 2.5) を用いた。5 mM および 10 mM の  $Al(NO_3)_3$  を加えた酸性 YEPD 培地の経時的状況を Fig. 4 に、 $AlCl_3$  および  $Al(NO_3)_3$  を加えた培養終了後(8日目)の結果を Table 2 に示した。10 mM の添加では培養 6 日目で培地の可溶性 Al はほとんど消失したが、5 mM の添加では培養 6 日目までは減少せず、8 日目で約 2 mM の可溶性 Al が残った (Fig. 4)。この傾向は、 $AlCl_3$  を添加した場合も同様であった (結果は省略)。培養 6 日目には全ての試験区で培地が中和され、2.5 mM や 5.0 mM の Al を添加した場合は可溶性 Al の除去はほとんど認められず、むしろ 10 mM の Al を添加したほうが培地上清に残留した可溶性 Al 量が少なかった。さらに、生菌数 (log CFU/ml) は 7.5 mM の Al を添加したほうが 2.5 mM 添加区に比べ著しく多かった (Table 2)。対照として、Al を添加せず 6 日間培養した場合の O. D. (660 nm), pH および生菌数 (log CFU/ml) はそれぞれ 18.3, 7.2 および 2.4 であった。これらのことから ZL7-4-2 株はこのような酸性環境条件下では生長に一定濃度の可溶性 Al が必要であることが示された。

次に、可溶性 Al の減少が菌体付着によるものか菌体内吸収によるかを明らかにする目的で、Zhang ら<sup>16)</sup>の方法に従い、クエン酸溶液と蒸留水の 2 通りの洗浄を行い、それぞれ Al の吸収量と吸着量を測定し、その結果を Table 3 に示した。 $AlCl_3$  あるいは  $Al(NO_3)_3$  を 2.5 mM 添加した場合、いずれも菌体が吸収および吸着した Al 量は少なく、添加量の 30% 程度しか除去されなかった。一方、7.5 mM ではいずれの Al 塩の場合においても 50% 以上の Al を吸収した。特に  $AlCl_3$  を加えて培養した菌体においては 90% 以上の吸着を示した。Al 2.5 mM および 7.5 mM 相当量の  $AlCl_3$  あるいは  $Al(NO_3)_3$

Table 3. Al adsorption and Al incorporation into the cells of strain ZL7-4-2 grown on acidified YEPD medium (pH 2.5) for 6 days.

	AlCl <sub>3</sub> (mM) added		Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (mM) added	
	2.5	7.5	2.5	7.5
Al adsorption <sup>1)</sup> (mg/g dry weight of cells)	2.7	22.4	4.0	27.2
Yield of dry weight (g/100 ml)	0.73	0.83	0.60	0.98
Al contents of cells (mg/cells per 100 ml)	1.97	18.47	2.39	13.09
Al contents of cells/ Al added(%)	29.2	91.8	35.5	64.6
Al incorporation <sup>2)</sup> (mg/g dry weight of cells)	2.1	27.2	2.8	13.8
Yield of dry weight (g/100 ml)	0.75	0.83	0.68	0.83
Al contents of cells (mg/cells per 100 ml)	1.57	12.14	1.90	11.37
Al contents of cells/ Al added(%)	23.3	60.0	28.1	56.1

<sup>1)</sup>: Cells were washed with distilled water, and lyophilized.

<sup>2)</sup>: Cells were washed with 10 mM citric acid solution, and lyophilized.

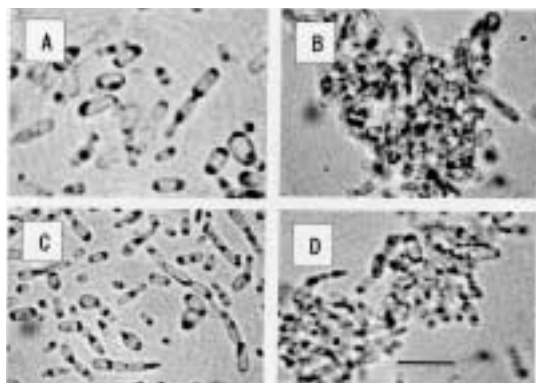


Fig. 5. Micrographs of *T. pullulans* strain ZL7-4-2 cells grown in acidic medium of pH 2.5 containing 2.5 mM (A) and 7.5 mM (B) of AlCl<sub>3</sub>, and containing 2.5 mM (C) and 7.5 mM (D) of Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> incubated for 5 days.

を添加した培地において5日間培養した場合の顕微鏡写真を Fig. 5 に示した。2.5 mM 添加ではいずれの Al 塩においても菌体のフロックは認められなかったが、7.5 mM 添加の場合はいずれもフロックを形成した。

## 考 察

自然界より単離された pH 1.5 以下の硫酸酸性で生長できる酵母はこれまで *Rhodotorula* 属の 1 菌株 (Ahn ら<sup>18)</sup>), 耐酸性酵母 *R. glutinis* R-1 株 (Nguyen ら<sup>9)</sup>) および *R. mucilaginosa* YR-2 株 (滝田ら<sup>19)</sup>) のみである。しかし、われわれが蔵王廃鉱山から分離した酵母菌 *Trichosporon pullulans* 2 菌株は本実験で強い硫酸酸性環境下においても生息可能な耐酸性を持つ微生物であることが判明した。さらに、*T. pullulans* ZL7-4-2 株は Fig. 2 に示した pH 2.5 以上の硫酸酸性 YEPD 培地を中和可能にする性質を有し、廃水に含まれる Al を不溶性の水酸化化合物に変化させる<sup>21)</sup> など、金属の不溶化に利用できることを示唆した。加えて、pH 1.0 のような苛酷な酸ストレス条件下では菌体の著しい形態変化をおこすことが特徴であった (Fig. 5)。Nguyen ら<sup>9)</sup> は、*R. glutinis* R-1 株を pH 1.5 のような強い酸性条件下で生育させた場合、細胞表層が肥厚化することを報告している。しかし、ZL7-4-2 株の場合は菌体の連鎖とそれに伴うフロックの形成が見られたが、細胞表層の肥厚化は確認できなかった。金属除去能を有する酵母において、細胞表層の多糖や糖タンパク質の関連が示唆されており<sup>6)</sup>,

今後 ZL7-4-2 株の耐酸性と細胞表層の組成変動との関連を検討することが必要と思われる。

酸性土壌での植物の生育阻害は Al 毒性が最大の原因<sup>10)</sup>であり、硫酸酸性鉱山廃水を含む流域での栽培植物への影響も大きい<sup>1)</sup>。まず、Al 除去能を検討する前に、酵母 ZL7-4-2 株の可溶性 Al への抵抗性程度を検討するため、Kanazawa and Kunito<sup>13)</sup>あるいは Nguyen ら<sup>9)</sup>の行った方法に従って、50-200 mM という自然界にはありえない著しい高濃度の Al が含有した酸性培地 (pH 2.5) で検討した (Fig. 3)。その結果、50 mM 以上の Al を含む培地では、Al の pH 緩衝作用<sup>21)</sup>により培地の酸中和が妨げられ (pH 3.8 までは上昇した)、Al の不溶化は見られなかったが Al に対する抵抗性は同程度有していることが判明した。一方、10 mM 以下の Al の pH 緩衝作用は ZL7-4-2 株の酸中和能および生長にほとんど影響がみられなかった (Fig. 4)。さらに、Kanazawa and Kunito<sup>13)</sup>が分離した数属の真菌類あるいは Nguyen ら<sup>9)</sup>の *R. glutinis* R-1 株の場合は、pH 3.0 における Al への抵抗性を調査したものであるのに対して、本研究はより過激な条件である pH 2.5 で行っているため、ZL7-4-2 株はさらに強い Al への抵抗性があることが示唆された。日本のような酸性土壌が多い地域において栽培植物に対する Al の毒性は深刻な問題である。Al 感受性植物にとっては、可溶性 Al の毒性はその根を Al 活動度の低い pH 5.2 の塩酸性下<sup>21)</sup>でも、2.5 μM の Al 溶液に短時間浸しただけで根の伸長が阻害される<sup>10)</sup>。また、松本<sup>22)</sup>は Al 抵抗性のコムギ (Atlas 66) でさえ 50 μM の Al で 3 時間処理しただけで根の伸長域の細胞死が見られることを示している。これらのことから、酵母を含むこれらの真菌類の Al 耐性は植物に比べてはるかに高いことから、これら真菌類の Al 耐性機構の解明あるいは遺伝子の利用が植物育種にも応用できる一端を示していると思われる。

一方、廃水の環境汚染を除去するためには、Al そのものの除去が望ましい。今回試験した ZL7-4-2 株による Al の不溶化実験において、AlCl<sub>3</sub> 2.5 mM および 5.0 mM の Al 添加では可溶性 Al はほとんど減少しなかったが、むしろ高濃度の 7.5 mM 添加では約 25% 前後、10 mM では、Al の 10% 以下が可溶性 Al として回収されたのみであった (Table 2)。しかし、培養終了後蒸留水で遠心洗浄しても培養過程で不溶化した Al の多くが pH の上昇や菌体表層との相互作用により回収できないこと

が考えられる。そのため一般に不溶性 Al の可溶化に用いられるクエン酸による洗浄<sup>16)</sup>と蒸留水洗浄の比較を行った (Table 3)。その結果、7.5 mM から 10 mM の濃度で添加した可溶性 Al の多くは、細胞内に吸収され、付着量は少ないと思われた。しかし、5 mM 以下の濃度で添加した場合、酵母細胞の生存率も低く、Al の吸収も極めてわずかであったことから、著しい酸性環境における ZL7-4-2 株の生長には一定濃度の Al が必要なのかもしれない。このような比較的高濃度の Al が必須栄養素であるという微生物の例は今まで報告されておらず、さらに詳細な検討が必要と思われる。

Nguyen ら<sup>9)</sup>は *R. glutinis* R-1 株が Al 耐性とともにもマグネシウムに対しても同程度の濃度で耐性であることを示した。また、Salinas ら<sup>8)</sup>や Malik<sup>6)</sup>は他属の酵母細胞による重金属吸着現象について報告している。今後は本試験で用いた酵母 ZL7-4-2 株のほかの重金属耐性能や吸着能の検討も行いたい。

## 摘 要

蔵王廃鉱山の酸性廃水 (pH 1.8) より単離した ZL7-4-1 および ZL7-4-2 と名付けた酵母 2 菌株は、pH 0.8 の培地で生長可能であり、*Trichosporon pullulans* と同定した。*T. pullulans* ZL7-4-2 株の生長細胞の生長および生物蓄積におけるアルミニウム (Al) イオンの影響を調査した。この菌株は高濃度の Al (200 mM) にも強い耐性を示した。10 mM 以下の Al を含む pH 2.5 の培地で 5 日間培養した場合、培地は中和され、Al はほとんど細胞内に蓄積した。この Al 蓄積と酵母の生長は培地の初期 pH と Al 濃度に依存した。これらの結果は、この酵母菌株が高濃度の Al を含む強い酸性鉱山廃水の微生物除去に有用である可能性を示唆した。

## 謝 辞

本研究は、山形県地域結集型共同研究事業「遺伝子工学と生命センシングの複合技術による食材と生物材料の創世」(1998.9~2003.9) の 1 課題から派生した成果である。酵母の採取や鉱山廃水関連の資料採集に多大な便宜を図って頂いた山形県工業技術センターの山田享氏に心から謝意を表します。

## 引用文献

- 1) 嶋田協(1989). 硫酸塩還元細菌による抗排水中の重金属処理. 用水と廃水, 31: 440-444.
- 2) 金属鉱業事業団(1997). 技術開発部平成8年度公害防止技術調査研究報告書「坑廃水対策技術—坑廃水最適中和処理システム技術—」: 25-42.
- 3) K. Ueki, K. Kotaka, K. Ito, and A. Ueki(1988). Potential availability of anaerobic treatment with digester slurry of animal waste for the reclamation of acid mine water containing sulfate and heavy metals. J. Ferment. Technol., 6(1): 44-50.
- 4) 金属鉱業事業団(2000). 技術開発部平成11年度公害防止技術調査研究報告書「坑廃水対策技術—坑廃水最適中和処理システム技術—」: 158-218.
- 5) C. Garcia, D. A. Moreno, A. Ballester, M. L. Blazquez and F. Gonzales(2001) Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. Minerals Engineer., 14: 996-1008.
- 6) A. Malic(2004) Metal bioremediation through growing cells, Environ. International, 30: 261-278.
- 7) F. Kawai, D. Zhang, and M. Sugimoto(2000) Isolation and characterization of acid- and Al-tolerant microorganism. FEMS Microbiol. Lett., 189: 143-148.
- 8) E. Salinas, M. Elorza de Orellano, I. Rezza, L. Martinez, E. Mrachekvsky, and M. Sanz de Tossati(2000) Removal of cadmium and lead from dilute aqueous solutions by *Rhodotorula rubra*. Bioresource Technology., 72: 107-112.
- 9) V. A. T. Nguyen, K. Senoo, T. Mishima, and M. Hisamatsu(2001) Multiple tolerance of *Rhodotorula glutinis* R-1 to acid, aluminium ion and manganese ion, and its unusual ability of neutralizing acidic medium. J. Biosci. Bioeng., 92(4): 366-371.
- 10) 松本英明(2000). 酸性土壤中で発現するアルミニウムストレスに植物はどう対応するか. 化学と生物 38(7): 452-457.
- 11) 金属鉱業事業団(1997). 技術開発部平成8年度公害防止技術調査研究報告書「坑廃水対策技術—坑廃水最適中和処理システム技術—」: 巻末24-30.
- 12) C. P. Kurtzman and J. W. Fell(1998): "The yeasts, a taxonomic study" 4nd ed., Elsevier
- 13) S. Kanazawa and T. Kunito(1996) Preparation of pH3.0 agar plate, enumeration of acid-tolerant, and Al-resistant microorganisms in acid soils. Soil Sci. Plant Nutr., 42(1): 165-173.
- 14) 我妻忠雄(1994). 植物のアルミニウム耐性機構に関する諸仮説の評価. 低pH土壌と植物(日本土壤肥料学会編) 博友社: pp.99-121. 東京.
- 15) 我妻忠雄(1986). 植物のアルミニウム過剰害と耐性機構. 化学と生物, 24(12): 769-771.
- 16) D. Zhang, J. A. Duine and F. Kawai(2002) The extremely high Al resistance of *Penicillium janthelium* F-13 is not caused by internal or external sequestration of Al. BioMetals, 15, 167-174.
- 17) 百瀬 勉・矢野良子(1963). 3,6-ジニトロフタル酸による糖の微量定量. 化学の領域 17: 891-895.
- 18) N. V. Ahn, C. Jie-Mei, K. Teranishi, M. Hisamatsu and T. Yamada(1998) Isolation and characterization of a red yeast grown under strong acidic condition. Bull. Fac. Bioresources, 20: 31-36.
- 19) 滝田 潤・板野るり子・森井直也・海老名 太・松田 企一・河東田茂義(2005). *Rhodotorula mucilaginosa* YR-2 株によるマンナン生産性とその物理的性質. Journal of Applied Glycoscience, 52(1):255-257.
- 20) M. Havas and T. C. Hutchinson(1983) Smoking hills: natural acidification of an aquatic ecosystem. Nature, 301(6): 23-27.
- 21) R. G. Pina and C. Cervantes(1996) Microbial interactions with aluminium. BioMetals, 9, 311-316.
- 22) 松本英明(1994). 植物におけるアルミニウム耐性の生理生化学. 低pH土壌と植物(日本土壤肥料学会編) 博友社: pp.59-98. 東京.