

自然環境中のマンガン酸化細菌の特性とその影響予測に関する一考察

金井 豊¹・三田直樹²・竹内理恵¹・吉田信一郎³・朽津信明⁴

Yutaka Kanai, Naoki Mita, Rie Takeuchi, Shin-ichiro Yoshida and Nobuaki Kuchitsu (2006) Study on characterization of manganese-oxidizing bacteria in the natural environment and estimation of its effect. *Bull. Geol. Surv. Japan*, vol. 57(1/2), p.1 - 15, 9 figs, 5 tables.

Abstract: Microorganisms were collected from the deposits in a cave and a stream bottom in Japan and their activities for manganese oxidation were studied. The microorganisms were isolated and identified by observation and DNA analysis. Furthermore, a preliminary research for manganese-oxidizing bacteria in core samples of borehole was conducted.

The gram-positive rod bacteria such as *Bacillus* and *Curtobacterium* and gram-negative rod bacteria such as *Burkholderia* were found from the deposits. The manganese-oxidizing bacteria were also found from the bore-hole sediments of more than 20 m depth, which indicates the importance of biological survey for deep geological environments. Besides, the bio-ecological optimum conditions were studied experimentally.

As microorganisms give direct and indirect effects on the chemical environments concerning radionuclide transportation, their biomass, composition, characteristics, optimum conditions and activities are important subjects. They may be different among the microorganisms, so it is necessary to collect their data systematically and make a good database system.

Keywords: manganese oxidizing bacteria, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Burkholderia*, estimation of effect

要 旨

洞窟内の沈殿物や河床に生成する沈殿物に棲息する微生物などを日本各地から採取し、その中の微生物のマンガン酸化活性を調べた。更にマンガン酸化能を持つ微生物の分離を行い、その分離株について分類や 16S rDNA による同定を試みた。また、予察的にボーリングコア中のマンガン酸化細菌の調査を行った。

その結果、洞窟や河床からの沈殿物からはグラム陽性桿菌の *Bacillus* や *Curtobacterium*、グラム陰性桿菌の *Burkholderia* 等が分離された。ボーリングコアでは 20 m 以深においても微生物の存在が確認され、堆積性の地下環境でも微生物研究が重要であることが示された。更に、微生物生態学的に様々な条件下における微生物のマンガン酸化活性についての実験を行い、最適環境条件等を調査した。

微生物は核種移行に関わる化学環境に直接・間接的な形で影響を与えるため、微生物の総量、種類とその特質、生存環境と活性の有無とが重要な課題である。このようなデータは微生物の種類ごとに相違すると考えられるため、系統的にデータを収集してデータベース化を進める必要がある。

1. はじめに

高レベル放射性廃棄物の地層処分における長期安定性を考える上で、地震や火山活動など処分領域における直接的な影響を考慮すると同様に母岩領域では地下水移行シナリオに基づいて安全性の評価がなされている。地下水移行シナリオでは、核種移行を規制する地質特性の中で、特に重要なものは地下水流動及び化学環境であると考えられる。地下水流動は実質的な物質移動であり、これによって核種移行が起こるので重要なことはいうまでもないが、後者の化学環境因子は、核種の移行を促進したり遅延したりする要因となっており、共存化学種・温度・圧力・水素イオン濃度 (pH)・酸化還元電位 (Eh) 等、それらの実態と影響度を把握する必要がある。

これらの化学環境因子の中で、無機的な化学種のみならず、微生物や腐植物質等の有機物も化学環境に与える作用が大きいにもかかわらず、その実態や影響の詳細は不明な点が多い。有機物は金属イオンを吸着すると同時に種々の錯体を作り易いことが知られており、分子量が大きくなるとコロイドとして溶液とは異なる挙動をすると考えられている。更に無機粒子と有機物

¹深部地質環境研究センター (Research Center for Deep Geological Environments, GSJ)

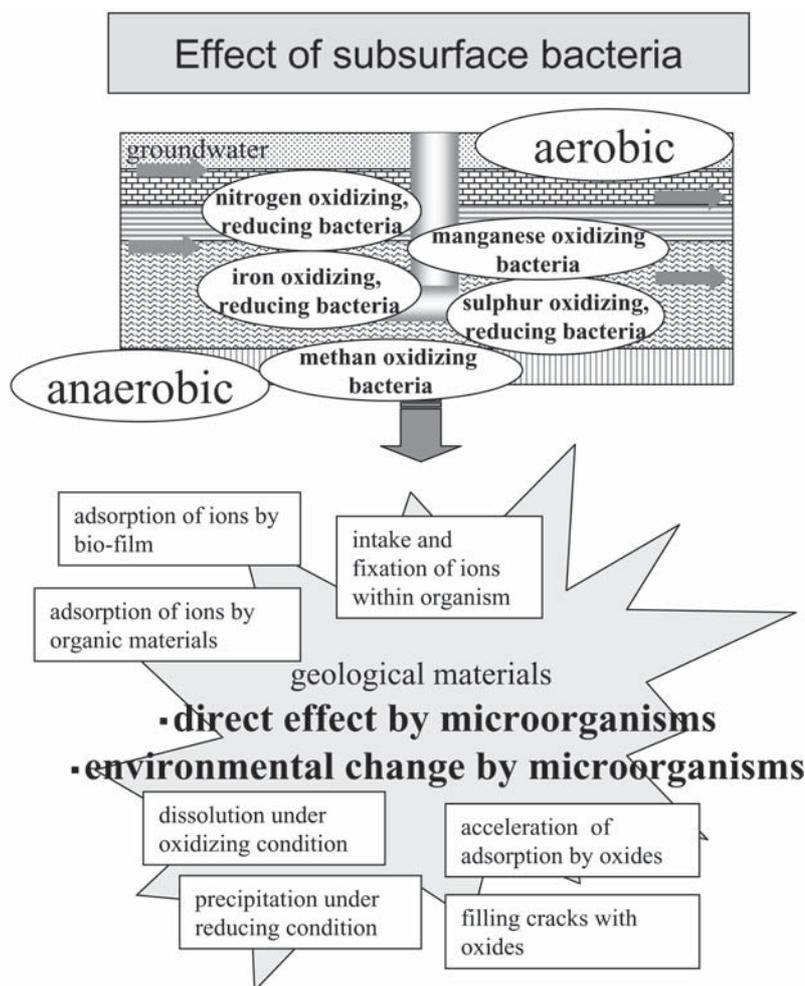
²生物機能工学研究部門 (Institute for Biological Resources and Functions, AIST)

³日本食品分析センター 多摩研究所 (Japan Food Research Laboratories, 6-11-10, Nagayama, Tama, Tokyo, 206-0025, Japan)

⁴東京文化財研究所 (National Research Institute for Cultural Properties, Tokyo, 13-43, Ueno Park, Taito-ku, Tokyo, 110-8713, Japan)

との混成態 (Takahashi *et al.*, 2002) も考慮する必要があり, その重要性はますます高まっている。また, 微生物に関しては高レベル放射性廃棄物処分が計画されている数百mの深度でもその生存が確認された報告もあり, 地下微生物が地質特性に与える影響について検討することが重要となっている。地衣類や微生物等は重金属類を濃集したり酸化還元状態を変える働きがあり (例えば, 坂口, 1996; Bencheikh-Latmani and Leckie, 2003; Loppi *et al.*, 2003; Boyanov *et al.*, 2003; Gu and Chen, 2003; Kappler and Nerman, 2004; Ishii *et al.*, 2004; Sani *et al.*, 2004; Ohnuki *et al.*, 2004; Wightman and Fein, 2005; Rancourt *et al.*, 2005), 微生物地球化学として新たな分野を開きつつある (*Geochim. Cosmochim. Acta* vol.68 Issue 15 は微生物地球化学の特別号を組んでいる)。このような微生物の注目すべき点は, 地下深部環境の中で化学反応に様々な影響を与えて, 熱力学的な平衡論では扱えない現象を可能としたり, また, 生体活性作用として化学環境の形成, 直接的な反応に関与したりしている。具体的な微生物の作用としては, 微生物の代謝過程で核種を体内に取り込んで固定する作用, 微生物の死後に有機物として核種を吸着・固定する作用, 微生物の代謝物が金属を可溶化するなどの直接的な作用の他に, 微生物が代謝によって周りの環境を変えて可溶化, 不溶化したりする間接効果とが考えられる。

地層処分における核種移行の安全性評価においては, 微生物によるこれらの作用を考慮して様々な微生物に関するデータを集め, それを系統的に検討し, 化学環境に関する影響評価をすることは不可欠である。自然界では微生物はどこにでも存在しているにも係わらず, 現在までに知られている種類はそのほんの一部に過ぎない。化学反応に影響を与えとされる微生物は多様であり, マンガン酸化・還元細菌, 鉄酸化・還元細菌, イオウ酸化・還元細菌, 窒素酸化・還元細菌, メタン生成・酸化細菌などが化学環境に直接的な関与をしていると考えられ (第1図), これらの微生物について実態を把握しておくことが必要である。我が国では, 生物学と地質学の境界領域ではバイオミネラリゼーションという形で一部研究が進みつつあるが, 廃棄物の地層処分関係では岐阜県の東濃ウラン鉱山の花崗岩



第1図 放射性核種に対する地下における微生物による作用と化学環境。
Fig. 1 Effects of subsurface bacteria on radionuclides and chemical environments.

地下水などで調査研究が行われている程度で, まだ一部の研究しかなされていない。東濃ウラン鉱山の花崗岩地下水では, メタン生成細菌, 亜硝酸細菌, 硝酸細菌, 脱窒細菌は検出されなかったが, 鉄関連細菌や硫酸還元菌が特定の深度のところで観察されたという (JNC, 2000)。

これまで鉄関連細菌 (Kappler and Nerman, 2004; Wightman and Fein, 2005; Rancourt *et al.*, 2005) や硫酸還元菌 (Sani *et al.*, 2004) についての報告は多いが, マンガン酸化細菌については一般的に取扱いが困難で研究があまり進んでいない。マンガン酸化物は, 鉄の水和酸化物と同様に金属イオンを吸着する作用が高く, 自然界では核種遅延効果が期待されているため, マンガン酸化物の形成に関する知見は有用である。

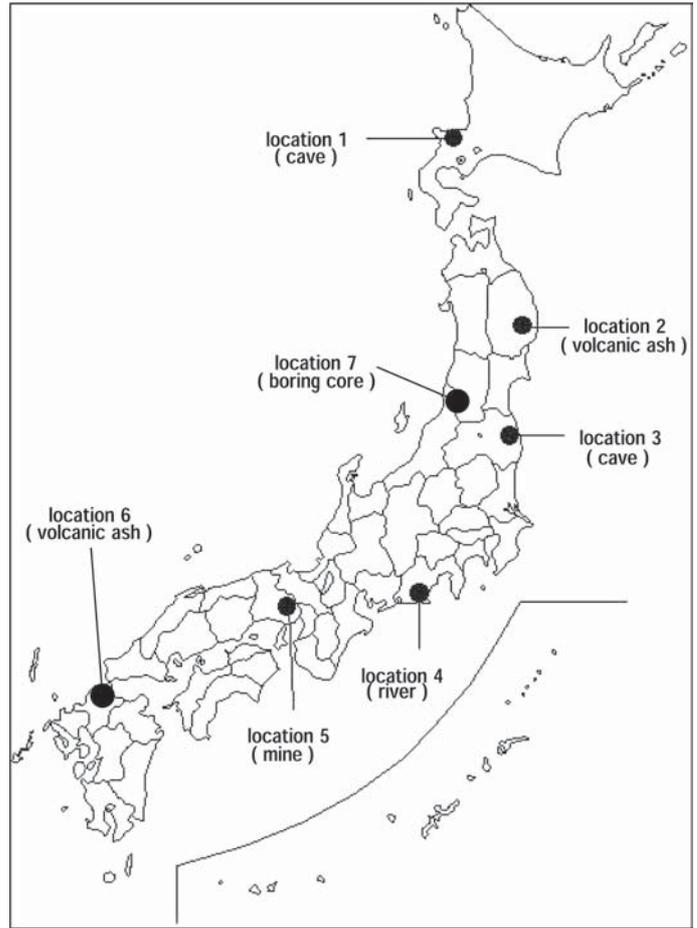
マンガン酸化物は無機化学的の反応でもできるが, マンガン酸化細菌によって微生物学的に沈殿物が形成されることがわかってきた。マンガン酸化微生物として

は, *Metallogenium*がこれまでに知られている. ある種のマンガン酸化細菌は, 北海道の雌阿寒岳山麓の湯の滝において分離され (Mita *et al.*, 1994; Mita and Miura, 2003), このほかにも国内数箇所まで分離されてきているが, 詳細は不明な点も多い. そこで本論文では, これまでの調査で分離されたマンガン酸化細菌を中心にその種類と作用についてこれまでに検討したことを総括し, 地質分野の研究者の理解を広げることがを目的として報告をする. 更に, 微生物と地層処分に関わる化学環境との関わりについて検討・考察している.

本研究では, これまでに環境中のマンガン酸化細菌等の微生物を解明する目的で河川の岩石に生成する沈殿物に棲息する微生物 (藻類や細菌) や, 地層処分環境となる光の到達しない地下深部 (約300 m以深とされている; 特定放射性廃棄物の最終処分に関する法律 [平成十二年六月七日法律第十七号]) の類似として光のない洞窟内の沈殿物に棲息する微生物, わずかな光しかない洞窟内で棲息する酸素発生型光合成微生物 (藻類) などを採取し, それらの微生物のMn酸化活性に関する調査研究に参画した. また, 活性のある微生物を含む試料について微生物の分離を行い, その分離株について鑑定を行った. その一部については16S rDNAの分析も行い種類の特定を試みた. 更に地下深部についての微生物情報を得るため, 実際のボーリング試料の中に存在する微生物についても予察的に検討を行うと同時に, 微生物生態学的にどのような条件下で様々な微生物の作用が生じるのか, 環境適応性についての検討も行った.

2. 試料と実験方法

本研究に供した微生物試料の採取場所を第2図に示した. 地点1と3は地下深部と類似する洞窟内で, いずれも二酸化マンガン沈殿物の存在が認められた場所である (朽津・三田, 1997). 地点1は, 北海道余市町の国指定史跡・フゴッペ洞窟内部である. このフゴッペ洞窟は新第三系凝灰質岩の海蝕洞を利用した今から1,500年前頃の遺跡で, 壁面には線刻の壁画が描かれている. この壁面には, ところどころ黒色物質が沈着しているのが認められており, これらは時に線刻画を覆って存在する可能性があることから, 壁画が描かれて以降, 現在に至るまでの間に形成されたものと確認される (フゴッペ洞窟保存調査委員会編, 2004). ここから凝灰質岩の表面を被覆する藻類と二酸化マンガン沈殿物を採取した. 地点2は岩手県の火山灰堆積層であり, 環状の二酸化マンガン固形物を採取した. 地点3は, 福島県双葉町の国指定史跡・清戸迫横穴内部であ



第2図 試料採取地点.

Fig. 2 Locations of sampling.

る. 清戸迫横穴は, 新第三系凝灰質岩の崖に, 7世紀頃に人為的に刻まれたと考えられている横穴墓で, 内部には赤で彩色壁画が描かれている. 採取した黒色物質はその奥壁下部に沈着していたものであり, 7世紀頃に人為的に刻まれたと考えられる壁面に存在することから, 黒色物質は7世紀以降に形成されたことが確認される (福島県双葉町, 1984). 地点4は静岡県の菊川であり, 河床岩石の表面を被覆する二酸化マンガン沈殿物を採取した (杉山ほか, 2000a; 2000b). 地点5は兵庫県のロウ石鉱山であり, 二酸化マンガン沈殿物を採取した. 地点6は福岡のAso-4火山灰 (約9万年前) 層中のMnハロイサイトノジュールである. 試料採取はアルコール殺菌した金属スプーンを用いて無菌バックにとり, できるだけ冷蔵保管して実験室に持ち帰った. これらの試料は関係機関の協力を得て採取された.

ボーリングコアの予察的微生物調査は, 地点7に示した新潟県と山形県の県境近くの金丸地区で行われたボーリングコア (平成14年度掘削, 全長35 m) を用いて行われ, 試料はつくばの研究所に搬入されたコア

からアルコール殺菌した金属スプーンを用いて同様に無菌バックに採取された。採取深度は0.20～0.25 m, 6.20～6.25 m, 10.30～10.35 m, 15.30～15.35 m, 21.60～21.65 m, 23.60～23.65 mと約5 m間隔の6箇所において、汚染を避けるためコアの中心部分から採取した(第3図参照)。

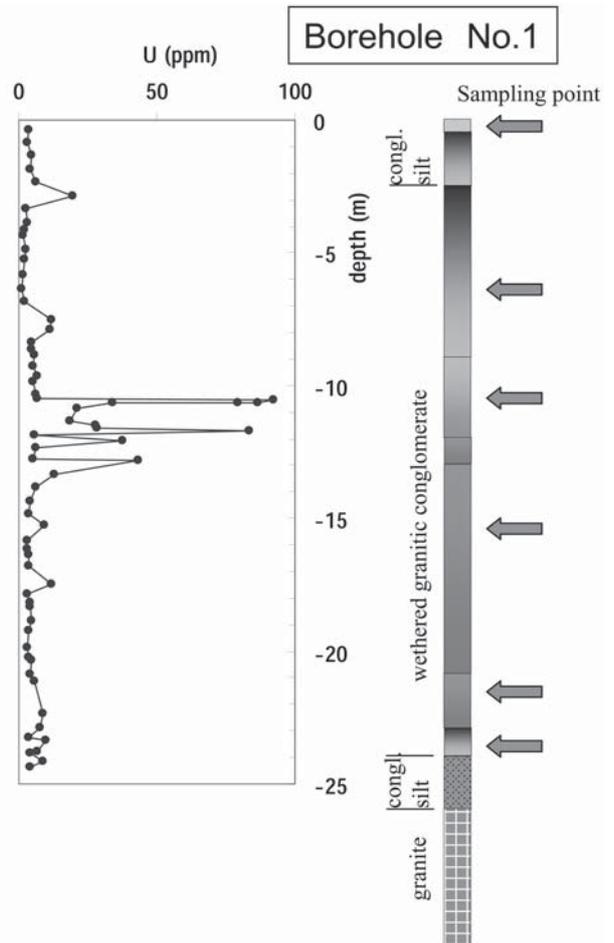
これら試料には多様な微生物が含まれるため、一部に見られた藻類は専用培地と顕微鏡観察下で分離し(地点1の洞窟からは楕円形と糸状の2種類の藻類を分離, その一つは28S rDNAの解析から *Chlorella ellipsoidea* に近縁であった), マンガン酸化細菌は専用培地によってマンガン酸化活性を確認した後分離した(Mita *et al.*, 1994)。活性の有無を調べるためのマンガン濃度測定は原子吸光法もしくは比色法により定量した。菌株のコロニーの色調, 菌体の形態観察, 16S rDNA解析, 生理活性試験などは, 日本食品分析センターにおいて行われた。16S rDNAによる系統解析は, 塩基配列をGenBankに登録されている配列及びMicroSeq Analysis Software[Applied Biosystems]のデータベースと比較し, 更に, 近縁種との系統樹をMicroSeq Analysis Softwareを用いて近隣結合法(NJ法)により作成して, 系統解析を行った。

また, 分離菌の環境対応機能調査実験では, 検体を種々のpH及び温度条件で培養し, 生育の有無を調べた。基礎培地には1/2 TZ-Mn-20液体培地(pH 7.6, 温度37°C, マンガン濃度5 ppm, 人工海水濃度20%, 有機物濃度0.3%)を用い, pHを3.0から10.0まで1.0刻みで変化させた8条件, 並びに温度を4, 10, 20, 30, 40, 50°Cの6条件で14～21日間培養した。更に, マンガン濃度, 人工海水濃度及び有機物濃度を変化させて同様に培養し, 生育状況を調査した。

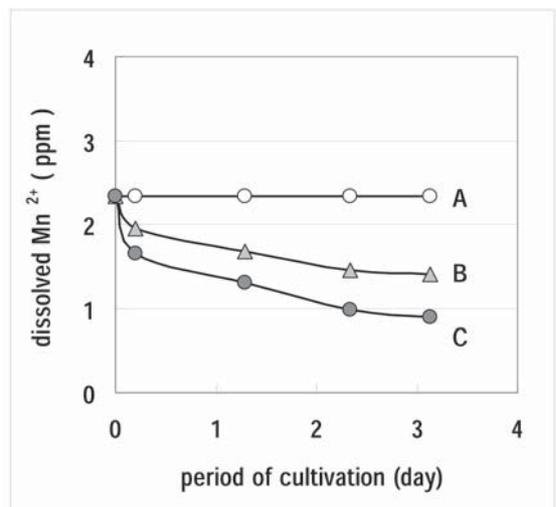
3. マンガン酸化細菌の調査結果と考察

3.1. 洞窟等における微生物のマンガン酸化活性と同定

天然試料においてマンガン酸化活性は専用培地を用いて調べたが, 実際の確認例を第4図に示した。マンガンを含む滅菌温泉水(約2.3 ppm)の系(A)を調製し, Bではこれに地点3から採取した凝灰岩質マンガン酸化物を滅菌したものに加え, Cでは地点3から採取した凝灰岩質マンガン酸化物を滅菌しないで加えて培養をし, 溶液に残存するマンガン濃度を調べた。対照となるAのマンガン濃度は, 最初から最後まで変化しなかった。Bでは幾分減少したが, Cでは更に大きく減少した。また, 河床のMn酸化物の例では, 滅菌河川水にマンガン約10 ppmを含ませた系(A)を調製し, Aと同じ液に地点4で得られた新鮮な黒色マットに覆われた石を添加して(C)その変化をみた(杉山ほか, 2000a; 2000b)。その結果, 10日目にマンガン濃度が初期濃度の50%ま



第3図 ボーリングコアの柱状図概要とサンプリングポイント。
Fig. 3 Outline of boring core and sapling points.



A: Mn solution (reference)
B: addition of sterilized Mn deposit (taken from location 3) to A
C: addition of tuffaceous Mn deposit (taken from location 3) to A

第4図 地点3で得られたマンガン沈澱物によるマンガン酸化実験。

Fig. 4 Manganese oxidizing experiment of manganese deposit taken at location 3.

第1表 環境試料から分離されたマンガン酸化細菌の性状一覧.

Table 1 Characterization of manganese oxidizing bacteria found in the environment.

| item\bacteria | T-1 (location 3) Fukushima/cave | T-2 (location 5) Hyogo/mine | M-1 (location 4) Shizuoka/river | M-2 (location 4) Shizuoka/river | Z-1 (location 4) Shizuoka/river | C01 (location 6) Fukuoka/volcanic ash |
|--------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|
| Morphology | rod | rod | rod | pleomorphic rod | pleomorphic rod | rod |
| Gram's stain | + | + | + | + | + | + |
| Spore | + | + | - | - | - | + |
| Shape | | | | | | ellipsoidal |
| position | | | | | | central~subterminal |
| sporangium | | | | | | not swollen |
| Motility | + | + | + | + | + | + |
| Oxygen requirement | facultatively anaerobic | microaerobic | facultatively anaerobic | aerobic | aerobic | |
| Oxidase | NT ^{*1} | NT ^{*1} | + | - | - | |
| Catalase | + | + | + | + | + | + |
| Colony pigment | NP ^{*2} | NP ^{*2} | orange | orange | yellow | |
| rod-coccus cycle | NT ^{*1} | NT ^{*1} | NT ^{*1} | + | + | |
| G+C% of DNA | | | | | | 38 |
| identification | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus</i> sp. | | <i>Curtobacterium pusillum</i> | | <i>Bacillus megaterium</i> |

*1 NT: Not tested

*2 NP: non-pigmented

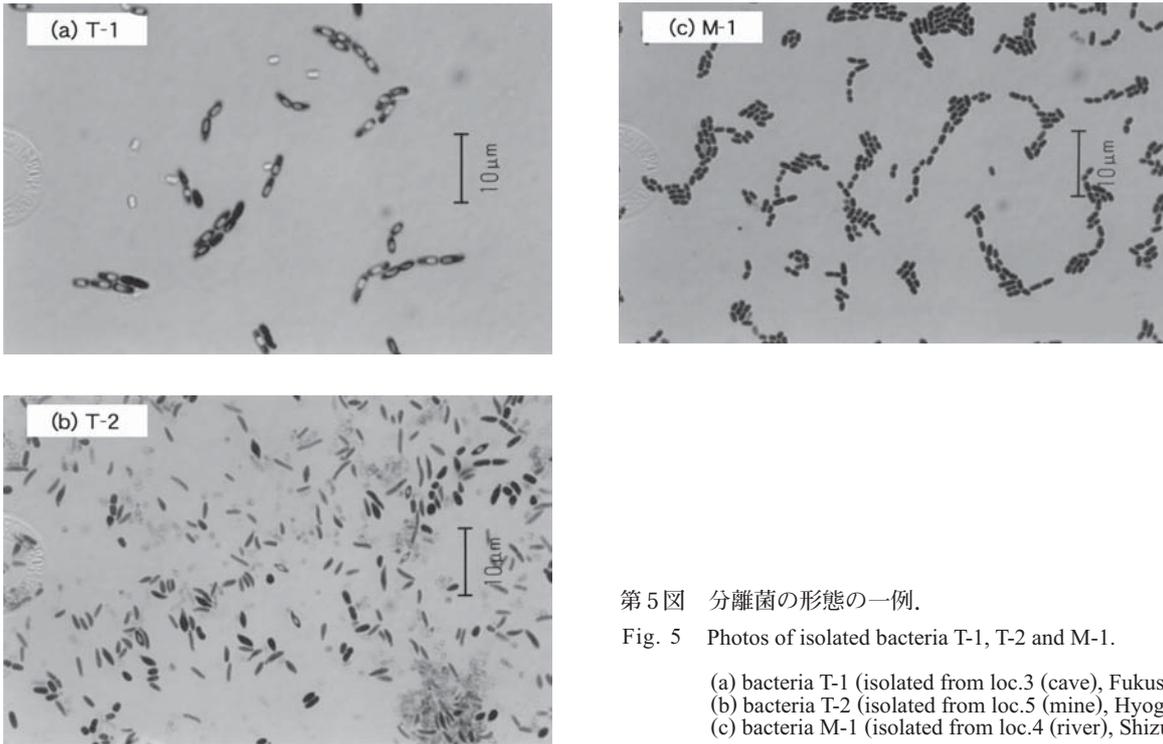
で減少し、50日目で10%、141日目で1%以下まで減少し、沈澱量が増加した。これに対し、対照液であるAのマンガン濃度は、最初から最後まで変化せず、Aと同じ液に高压蒸気滅菌した黒色マットに覆われた石を添加した系(B)では、10日目にマンガン濃度が初期濃度の80%まで減少したものの、その後は大きな減少はなかった。この両者の実験とも同様な結果を示しており、Bの濃度低下は死菌や既に存在する酸化マンガンによる吸着に起因し、これに対してBとCの差(滅菌の有無)は、未処理の試料に付着している微生物によるマンガニオンの吸着及び二酸化マンガンへの酸化(沈澱生成)に起因した濃度低下であると考えられる。この結果は、他のところでも述べてきたが、微生物の作用がマンガン酸化作用のみならず、有機物体としての吸着作用を考慮する必要性のあることを示唆している。

分離されたマンガン酸化細菌の性状を、まとめて第1表に示した。各マンガン酸化細菌は、便宜上T-1、T-2のような記号で示してある。採取された試料のうち、地点2の二酸化マンガン固形物はマンガン酸化活性を示さず、マンガン酸化細菌も分離されなかった。無機的に沈殿物が生じたか、または寄与した微生物が長期の風雨に曝されてかなり以前に消滅していたものと考えられる。これに対して地点1、3~6の各試料の二酸化マンガン沈殿物は、いずれもマンガン酸化細菌の存在を示唆する活性を示した。

特に地点3の洞窟から分離したマンガン酸化細菌T-1と地点5の鉱山からの分離細菌T-2は、ともに強いマンガン酸化活性を示したため、形態観察、生理的性状試験を行った。その試験結果から判断してこれらは耐熱性胞子を有する*Bacillus* sp.であった。*Bacillus*の関連

菌は、自然界に広く分布している耐熱性の胞子を形成するグラム陽性桿菌であり、本研究でも対象とした試料の多くにこの菌種が分離されている。地点4の河川からの分離細菌M-1、M-2、Z-1、及び地点6の火山灰層の分離細菌C01は、いずれも強い酸化活性を示すグラム陽性桿菌であった。分離細菌C01は、形態観察、生理的性状試験及び菌体内DNAのGC含量の測定から、*Bacillus megaterium*と同定された(Gordon *et al.*, 1973; Sneath *et al.*, 1986)。この菌は主に土壌から分離されることが多く、火山灰起源である可能性が高い。細菌T-1、T-2、M-1の顕微鏡写真を第5図に示す。分離細菌M-2とZ-1は多形性桿菌で、時間とともに形態の変化が観察されている(第6図参照)。

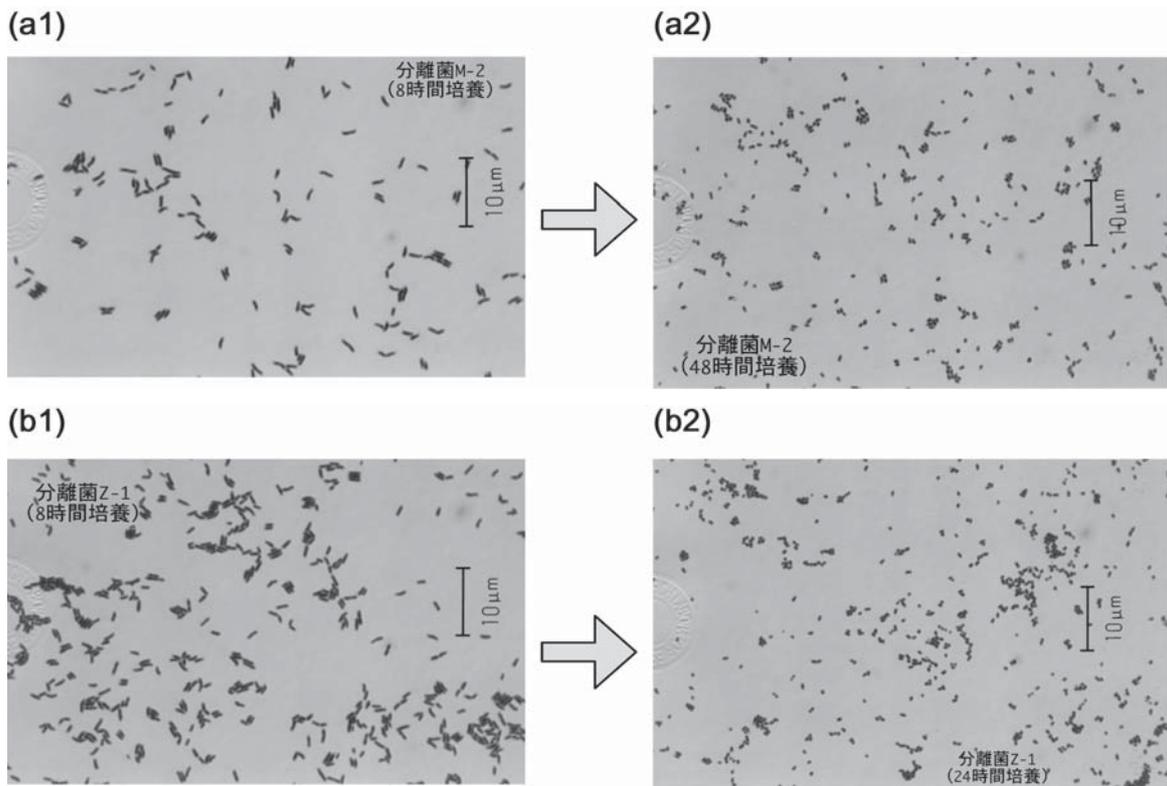
菌株M-2及びT-1については、更に詳しい同定を行うため16S rDNAの増幅を行い、塩基配列から近隣結合法(NJ法)により系統樹(第7図参照)を作成する16S rDNAの系統解析を行った。その結果、菌株M-2は解読された全ての塩基配列1451 bpを用いた系統解析では*Curtobacterium pusillum*に最も近縁であり、菌株M-2との相同性は99.3%であった。一般に、97%以上の相同性で類縁関係、99%以上で同種と考えられている。*Curtobacterium*は多形性を示す無芽胞のグラム陽性桿菌で、植物からの分離例が知られており、この中の*Curtobacterium pusillum*は ω -cyclohexylundecanoic acidを主成分とする特異的な脂肪酸を含有する。また、菌株T-1については解読された全ての塩基配列1476 bpを用いて系統解析を行ったところ、自然界に広く分布している耐熱性の胞子を形成するグラム陽性桿菌である*Bacillus*の関連菌に近縁であることが確認された。菌株T-1と近縁種との相同性は、(1) *Bacillus thuringiensis* が99.6%、(2) *Bacillus cereus* が99.6%、



第5図 分離菌の形態の一例.

Fig. 5 Photos of isolated bacteria T-1, T-2 and M-1.

- (a) bacteria T-1 (isolated from loc.3 (cave), Fukushima).
- (b) bacteria T-2 (isolated from loc.5 (mine), Hyogo).
- (c) bacteria M-1 (isolated from loc.4 (river), Shizuoka).

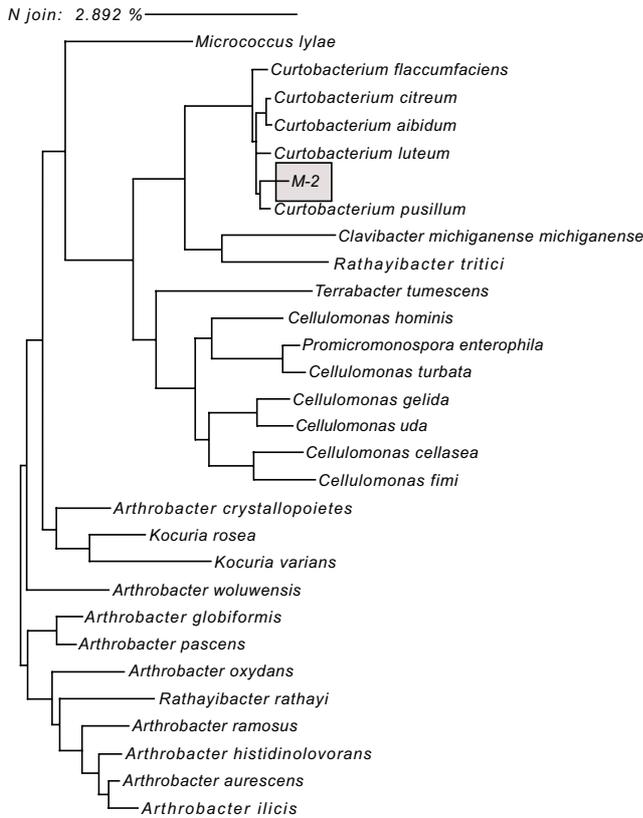


第6図 分離菌 M-2 と Z-1 の形態変化の一例.

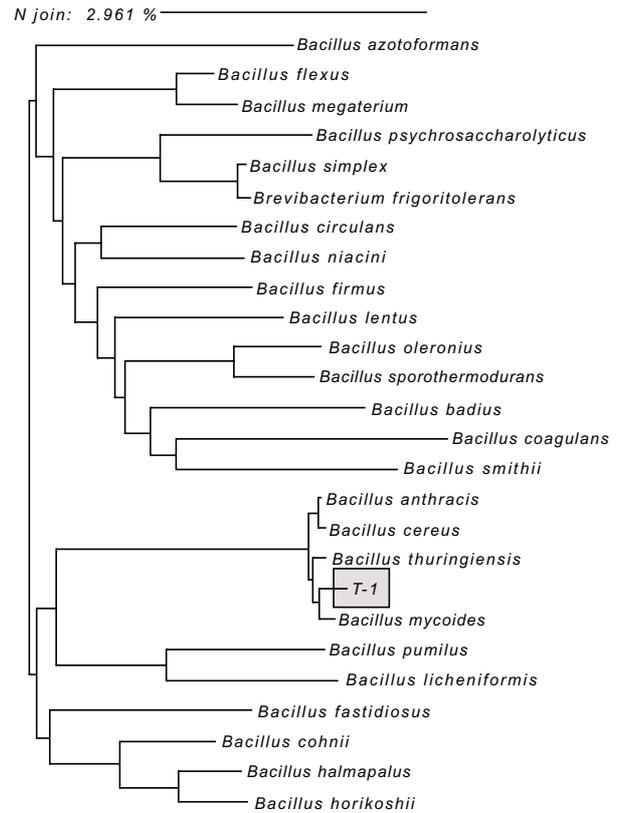
Fig. 6 Photos of isolated bacteria of M-2 and Z-1.

- (a) M-2 (isolated from loc. 4, the river in Shizuoka Pref.). (a1) after cultivation for 8 hrs, (a2) after cultivation for 48 hrs.
- (b) Z-1 (isolated from loc. 4, the river in Shizuoka Pref.). (b1) after cultivation for 8 hrs, (b2) after cultivation for 24 hrs.

(a) M-2



(b) T-1



第7図 菌株M-2, T-1とその近縁種との系統図。

Fig. 7 A phylogenetic tree of bacteria M-2, T-1 and adjacent species.

(3) *Bacillus mycoides*が99.5%, (4) *Bacillus anthracis*が99.5%となった。ここに示した(1) *B.thuringiensis*は細胞内タンパク結晶の形成能があり、このタンパク結晶に殺虫効果があることから微生物農薬に利用されている。(2) *B.cereus*は食中毒の原因菌としても知られている。(3) *B.mycoides*は(2) *B.cereus*と近縁の種であるが、rhizoid型(根足状)集落の形成がみられるのが特徴である。(4) *B.anthraxis*は土壌などに分布しており、ヒトや家畜に感染し炭疽病を起こす事で知られる病原菌である。菌株T-1は、第1表に示した集落性状及び生理活性や、細胞内タンパク結晶の形成が認められないこと、rhizoid型(根足状)集落の形成が認められないこと、運動性があること等の事実から、(2) *Bacillus cereus*に最も近縁と考えられる。

このように形態観察、生理的性状試験及び菌体内DNAのGC含量測定、16S rDNAの系統解析を行った結果から同定した結果を第1表に示してある。また、分離菌C01におけるこれら以外の種々の生理活性機能について検討した結果を、第4表の一部に示した。細菌の様々な条件下での反応や作用の有無がわかる。

3. 2. ボーリングコア中の微生物の予察的鑑定と同定

地下深部に成育する微生物の実態と特性を把握するため、ボーリングコアから採取した試料中の微生物について、予察的な鑑定とコロニーを形成する微生物についての同定を行った。検体ごとのマンガン酸化能の相対的強度と分離菌の概要を第2表に示した。

また、分離菌のマンガン酸化能力の例を第8図に示した。すなわち、マンガン (Mn^{2+}) を含む培地に分離菌を接種し、その培養液について経時的に残存マンガン濃度を測定することにより分離菌のマンガン酸化能を定量的に評価した。試験対象とした分離菌は、B01, B02, D01, D02である。B01の作用はあまり大きくないが、非発酵性グラム陰性桿菌のB02, D01, D02ではマンガン酸化能が大きいことがわかる。固定されたマンガンイオンがどのような形態で菌体にあるのかを確認するために光学顕微鏡による観察を行ったが、菌体周囲のマンガン結晶を確認することができなかった。このため、走査型電子顕微鏡による菌体表面の観察を行ったが、菌体D02を除いては同様に菌体の周囲にマンガンの結晶は認められず、マンガンの菌体への固定

第2表 ポーリングコアから分離された微生物と Mn 酸化能の概要.

Table 2 Outline of the manganese oxidizing bacteria and their abilities found in the boring core samples.

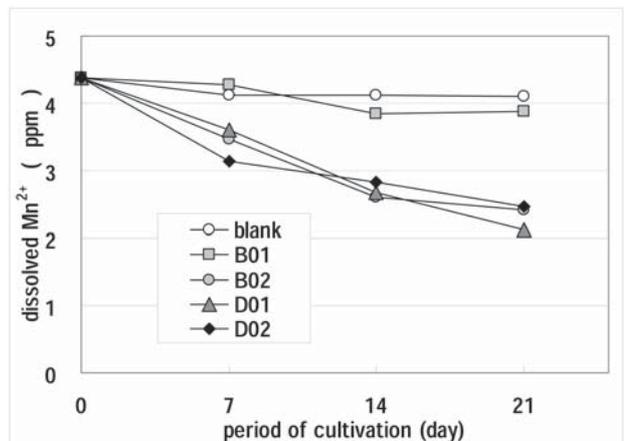
| | Kanakmaru No.1 sampling depth / m | manganese oxidizing ability of sample on medium (mixed microorganisms) | Isolates | manganese oxidizing ability of isolates | No. of isolates |
|---|--------------------------------------|--|---|--|--------------------|
| 1 | 0.20~0.25 | ++ | Gram-negative rod Gram-positive rod | +++ ++ | A01 A02 |
| 2 | 6.20~6.25 | W | Gram-positive pleomorphic rod Gram-positive pleomorphic rod yeast Gram-negative rod | + W + W | B01 |
| 3 | 10.30~10.35 | + | Gram-negative rod unknown Gram-negative rod Gram-negative rod | + + ++ ++ | B02 |
| 4 | 15.30~15.35 | + | Gram-negative rod Gram-negative rod Gram-negative rod Gram-negative rod | + + + + | D01 |
| 5 | 21.60~21.65 | -W | Gram-negative rod Gram-negative rod Gram-negative rod Gram-negative rod Gram-negative rod | + + + W + | |
| 6 | 23.60~23.65 | -W | Gram-negative rod Gram-negative rod Gram-negative rod | + + + | D02 |

W : weak -W : very weak

は確認できなかった。菌体D02では菌体の周囲には結晶様の固まりが認められたが、菌体内ではないためマンガンを固定して結晶化したものか否かを確定するには至らなかった。

表層ではマンガン酸化細菌の酸化能が相対的に高く、深部ではかなり微弱になっていることが判明した。酸化的な表層にこれらの菌が存在していることを示しており、環境条件と生存場所との対応が調和的である。また、20 mを超えるような深度においても弱い作用ながらもMn酸化細菌が生育していることが判明した。第2表に示されるように、上位部で一部グラム陽性桿菌や多形性桿菌も見られたが、ほとんどがグラム陰性桿菌である。この結果は、洞窟や河川で見られた細菌の多くがグラム陽性であったことと比較すると（第1表を参照）、興味深い結果となっている。このコアでの限られた試料だけのことなのか、何か条件が関係しているのか不明であるが、今後データを集めて検討する必要がある。

今回分離されたMn酸化能を有する微生物の中から、特に興味深い6菌株（A01, A02, B01, B02, D01, D02）



第8図 コア試料から分離された細菌によるマンガン濃度変化.

Fig. 8 Variation of manganese concentration by the isolated bacteria from core sample.

第3表 ポーリングコアから分離された Mn 酸化細菌の性状一覧.

Table 3 Characterization of manganese oxidizing bacteria found in the boring core samples.

| isolate | A01 | A02 | B01 | B02 | D01 | D02 |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Morphology | rod | rod | pleomorphic | short rod | rod | short rod |
| Gram staining | - | + | + | - | - | - |
| Spore | - | + | - | - | - | - |
| | | spherical subterminal swollen | | | | |
| Motility | + | + | - | + | + | - |
| Flagella | polar | | | | | |
| Oxygen requirement | aerobic | | aerobic | aerobic | aerobic | aerobic |
| Oxidase | + | | - | + | + | + |
| Catalase | + | + | + | + | + | + |
| O-F | O | - | NG ^{*2} | - | - | - |
| Colony pigment | NP ^{*1} | - | NP ^{*1} | NP ^{*1} | yellow | yellow |
| rod-coccus cycle | | | + | NT ^{*3} | | |
| G+C% of DNA | 66 | 38 | | | | |
| identification | <i>Burkholderia cepacia</i> | <i>Bacillus sphaericus</i> | aerobic, pleomorphic, non-sporing Gram-positive rod | aerobic Gram- negative rod | aerobic Gram- negative rod | aerobic Gram- negative rod |

*1 NP: non-pigmented

*2 NG: No growth

*3 NT: Not tested

について、更に詳細な同定を行い、その結果を第3表に示した。形態観察、生理的性状試験、キノン系及び菌体内DNAのGC含量の測定等から、分離菌A01は文献(Krieg *et al.*, 1984; Zhao *et al.*, 1995)を参考にして *Burkholderia cepacia*と同定された。*Burkholderia*は極鞭毛により運動する非発酵性のグラム陰性桿菌で、1992年にYabuuchiほか(1992)によって *Pseudomonas*属から独立している。分離菌A02は *Bacillus sphaericus*である(Gorden *et al.*, 1973; Sneath *et al.*, 1986)。*Bacillus*は既に述べているように自然界に広く分布している耐熱性胞子を形成するグラム陽性桿菌で、*Bacillus sphaericus*は土壌や水等からの分離例が知られている。分離菌B01, B02, D01, D02については、形態観察及び生理的性状試験結果からB01は好気性・多形性・無芽胞グラム陽性桿菌、その他は非発酵性グラム陰性桿菌と同定された。

これまでに知られているマンガン酸化微生物としては、*Metallogenium*が知られており、まだまだ不明な点も多い(一瀬ほか, 2003)。また、鉄酸化細菌の中にはマンガン酸化機能を有する菌もある。海洋中には、*Letothrix discophora SS-1*(Adams and Ghiorse, 1987)、や *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Flavobacterium* sp.

(佐藤ほか, 2000; 2001)などが報告されている。本研究において分離されたマンガン酸化活性のある微生物は、グラム陽性桿菌の *Bacillus*や *Curtobacterium*, グラム陰性桿菌の *Burkholderia*等であり、微生物の系統とマンガン酸化機能との関係を把握する上で有用な知見が得られた。

分離菌における種々の生理活性機能について検討した結果を、先の分離菌C01とあわせて第4表に示した。細菌の種類によって反応や作用、エネルギー源として利用できるか、生育できるか等の条件が異なっていることがわかる。今回扱った細菌の中には、D-キシロースやD-リボースを利用したり、細胞内で炭水化物(本研究ではグルコース)を原料としてPHB (poly-β-hydroxybutyrate)を生産・蓄積するものがあることが判明し(ポーリングコアから分離したA01菌株)、マンガンだけをエネルギー源とする微生物ではないことが示された。このような“多才な”微生物に対しては、微生物の作用と影響を考慮する上では特に注意が必要であろう。

3.3. 分離菌の環境対応機能調査

微生物はその作用によって環境を作ると同時に、周

第4表 分離菌に対する種々の試験結果.

Table 4 Results of several tests for the isolated bacteria.

| isolate | C01 | A01 | A02 | B01 | B02 | D01 | D02 |
|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | volcanic ash | boring core (sediment) | | | | | |
| | <i>Bacillus megaterium</i> | <i>Burkholderia cepacia</i> | <i>Bacillus sphaericus</i> | aerobic Gram-positive rod | aerobic Gram-negative rod | aerobic Gram-negative rod | aerobic Gram-negative rod |
| Accumulation of PHB | | + | | | | | |
| Anaerobic growth | - | | | | | | |
| V-P reaction | - | | | | | | |
| pH in V-P broth | 5 | | 7.7 | | | | |
| Arginine dihydrolase | | - | | | | | |
| Acid from glucose | + | | - | | | | |
| Gas from glucose | - | | - | | | | |
| Cleavage of protocatechuate | | <i>ortho</i> | | | | | |
| Gelatin liquefaction | + | + | + | | | | |
| Starch hydrolysis | + | - | - | | | | |
| Utilization of | | | | | | | |
| D-Xylose | | + | | | | | |
| D-Ribose | | + | | | | | |
| L-Rhamnose | | - | | | | | |
| Levulinate | | + | | | | | |
| Mesaconate | | - | | | | | |
| D(-)-Tartrate | | - | | | | | |
| 2,3-Butylene glycol | | + | | | | | |
| Tryptamine | | - | | | | | |
| Utilization of citrate | + | | - | | | | |
| Utilization of propionate | + | | - | | | | |
| Lecithinase (egg yolk) | - | | - | | | | |
| Denitrification | | - | | | | | |
| Nitrate reduction | - | | - | | | | |
| Quinone system | | Q-8 | | | | | |
| Growth at pH 6.8 (Nutrient broth) | + | | + | | | | |
| Growth at pH 5.7 | + | | - | | | | |
| Growth in 5% NaCl | + | | - | | | | |
| Growth in 7% NaCl | - | | - | | | | |
| Growth at 5 °C | - | | - | | | | |
| Growth at 10 °C | + | | + | | | | |
| Growth at 30 °C | | | + | | | | |
| Growth at 40 °C | + | -*1 | - | | | | |
| Growth at 50 °C | - | | | | | | |
| Vitamin requirement | | | | - | + | + | + |
| cultivation in 0 % YE medium * | | | | + | - | - | - |
| cultivation in 0.02 % YE medium | | | | + | + | + | + |
| cultivation in 0.1 % YE medium | | | | + | + | + | + |
| Oxygen requirement | | | | + | + | + | + |

* YE: Yeast Extract[Difco]

圃の環境からの影響で微生物自身の活性が増減する。寒冷化、熱水の貫入、高pH地下水の流入、塩水の浸入等、様々なイベントが考えられる。そこで、本研究ではマンガン酸化細菌を例にして様々な環境要因を変化させ、マンガン酸化活性の変化を調査した。微生物の活性に影響すると考えられる環境要因の例として、溶液のpH、温度等が考えられる。そこで、河床から分離された好気性多形桿菌の菌株M-2、洞窟内から分離された菌株T-1、鉱山からの菌株T-2の3種類を用いてこれらの要因についての実験を行い、その結果を第5表に示

した。

その結果、これらの菌に関してはpHに関してはおおむね弱酸性-弱アルカリ域での生育が良好で、生育温度域については10~30 °C程度が良好であった。極端に強酸や強アルカリ条件下でも活性を有する細菌ではなかったが、pH 9でも活性を有していることが判明した。

更に培地の種々の濃度を変化させて菌の増殖を調べるため、振とう温度勾配培養装置バイオフォトレコーダー TN-2621 (アドバンテック東洋(株)製)を使用して振とう培養を行い、測定波長660 nmでの吸光度を連

第5表 各種条件下におけるマンガン酸化細菌の生育の有無(1/2 TZ-Mn-20 液体培地).

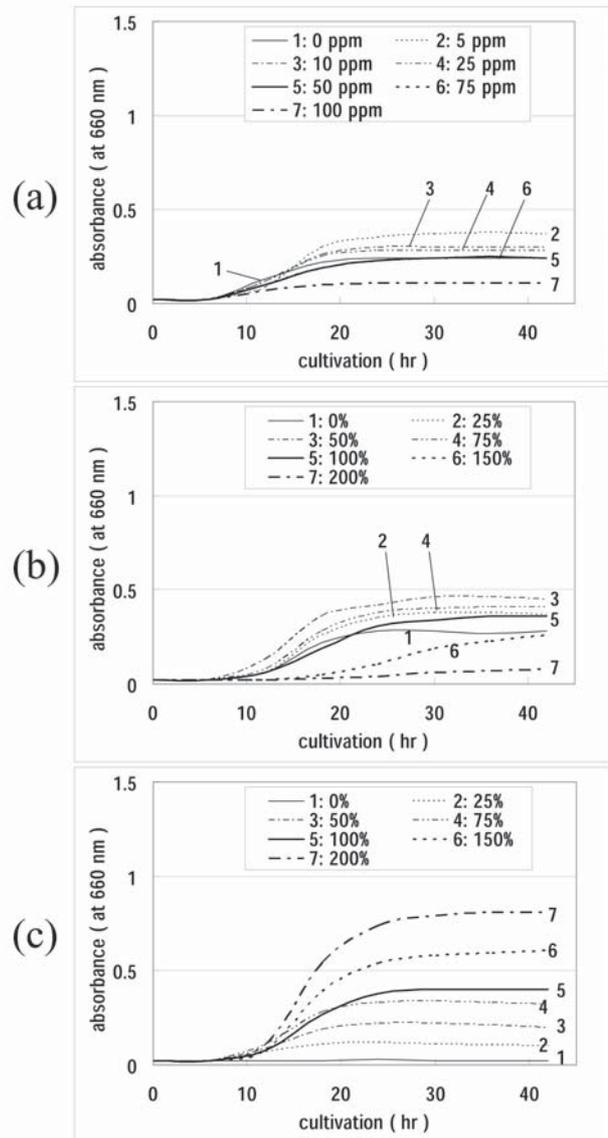
Table 5 Tests of growth of manganese oxidizing bacteria under various conditions (1/2 TZ-Mn-20 liquid medium).

| isolate | M-2 | | | T-1 | T-2 |
|---------|------------------------|---------------------|--------------------------------|-----|-----|
| | river | cave | mine | | |
| | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus sp.</i> | <i>Curtobacterium pusillum</i> | | |
| 4 | weak | — | — | | |
| 10 | + | — | + | | |
| 20 | + | + | + | | |
| 30 | + | + | + | | |
| 40 | + | + | + | | |
| 50 | — | — | — | | |
| 3.0 | — | — | — | | |
| 4.0 | + | — | — | | |
| 5.0 | + | + | — | | |
| 6.0 | + | + | + | | |
| 7.0 | + | + | + | | |
| 8.0 | + | + | + | | |
| 9.0 | — | + | + | | |
| 10.0 | — | — | — | | |

続的にモニターして生育曲線を得た。菌株M-2についての例を第9図に示してある。この実験結果からは、菌株M-2については培地中のマンガン濃度が5 ppmで最良な生育を示し、100 ppmではほとんど生育が認められなかったが、菌株T-1並びに菌株T-2では100 ppmで増殖の遅れが認められた。他の条件では大きな差は認められなかった。

一方、淡水・塩水化問題を考慮して培地中の人工海水濃度を変化させた場合、菌株M-2については50%で最も良好な生育を示し、150%では生育速度が遅いながらも最終的にはある程度の増殖が認められ、200%ではほとんど生育が認められなかった。菌株T-1並びに菌株T-2では菌の増殖の遅れが認められ(T-1では、100%で培養24時間後、150%で培養45時間後に増殖が開始、T-2では150%で培養17時間後、0%では培養20時間後)、200%では菌株M-2同様に生育は認められなかった。培地中の有機物濃度に関しては、有機物の割合にほぼ比例して生育も良くなるという結果が得られた。

以上のようにマンガン酸化細菌の例では、共存イオンの影響として多少の増殖の遅れはあるものの100 ppmのマンガンイオンや海水濃度の150%濃度が共存した環境でも生育可能な菌種があることが判明した。このように、共存イオンや栄養塩濃度がかなり変化しても生育する可能性があることや、また、孢子形成で悪環境でも遅く生き残る術を持つ菌種では、環境が整えば再度活発化することになるので、そうした面から



第9図 マンガン酸化細菌(M-2)の生育条件を変化させることによる環境適応調査結果.

- (a) マンガン濃度
- (b) 塩濃度 (人工海水濃度に対する比)
- (c) 有機物濃度 (1/2 TZ-Mn-20液体培地に対する比)

Fig. 9 Tests of environmental adaptation for manganese oxidizing bacteria (M-2).

- (a) manganese concentration
- (b) salt concentration (ratio to artificial seawater)
- (c) organic nutrient concentration (ratio to 1/2 TZ-Mn-20 liquid medium)

も微生物のモデル化において考慮する必要がある。

4. 微生物の環境影響評価に関する一考察

はじめにも述べたが、微生物が処分環境に及ぼす影響の中で核種遅延に作用する事項としては、微生物の

代謝過程で核種を体内に取り込んで固定したり細胞壁に吸着させる作用 (Bencheikh-Latmani and Leckie, 2003; Loppi *et al.*, 2003; Boyanov *et al.*, 2003; Ohnuki *et al.*, 2004; Wightman and Fein, 2005), 微生物の死後に有機物として核種を吸着・固定する作用, 微生物が代謝によって回りの環境を変えて不溶化環境を形成する, 等が考えられる。ある種の微生物は, Tc, U, Np や Pu 等の酸化還元活性な核種を酵素反応により還元してエネルギーを得ており, 還元された核種は不溶性の鉱物を作りやすい。また, 一般的に正常な増殖 pH 域 (約 5~8 の間) では, 微生物の細胞壁や周りの組織にある構造ポリマーは通常陰イオンのである (Beveridge, 1989) ので, 金属イオンを表面に蓄積する。アクチニドでは細胞への蓄積は主に代謝に依存しない生物吸着によって起こると考えられており, 実際死んだバイオマスへの吸着容量は生きている細胞よりも大きい (Konhauser *et al.*, 2002)。生きている細胞ではプロトンが金属イオンの結合位置に対して競合するが, 細胞の分解によって競合しなくなり, 更に金属結合の可能な官能基が増えるからである。微生物は大きさが小さいので, 細胞の体積に対して莫大な表面積を有する。更に微生物はあらゆる環境中に存在しているだけでなくその数も巨大である。海底泥, 土では 10^8 cell/g 以上, 河川水中では 10^5 cell/ml, バイオフィームでは 10^8 cell/cm² といわれており, その作用は大きいと考えられる。バイオマスによる U の吸着は, 種類によるがバイオマス 1 kg 当たり 23~9000 gU という (Konhauser *et al.*, 2002)。また, 微生物のコロニーが岩石の割れ目や水の通り道をふさぐことも考えられる。

一方, 核種移行を促進する作用と考えられるのは, 微生物の代謝物が金属を溶かし出すなどの直接的な作用の他に, 微生物が代謝によって回りの環境を変えて不溶化しているものを可溶化したりする間接効果が考えられる。更には, 微生物自体がコロイド態となり, 地下水中の核種移行を促進することも想定される。有機代謝物がリガンドとして作用しアクチニドの移動度を増加する例として, siderophore のような特別な鉄のキレーターがあり, これは自然界では $0.01 \sim 3 \mu\text{mol/kg}$ で有機酸やフミン物質と比べると 3~4 桁小さいが, シュウ酸, クエン酸, EDTA と同じかそれ以上のキレート剤である (Konhauser *et al.*, 2002)。しかし, 有機代謝物は他の微生物にすぐに使用されてしまうこともあり, アクチニドへの作用に関しては一時的で, むしろ酸化還元電位を変える作用の方が大きいといわれている。また, 微生物によって間隙水に放出された重炭酸, リン酸塩, 二価鉄, 硫化水素などの無機代謝物も, アクチニドの状態や移動性に影響する。有機物の分解で放出された二酸化炭素の増大によって, pH>6 の溶液で $\text{M(VI)O}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ と $\text{M(V)O}_2(\text{CO}_3)$ のような中性もしくは

陰イオンのアクチニド-炭酸塩錯体を作り可溶化することは, ウランの例を挙げるまでもなくよく知られている。

また, 放射性核種の溶解度は酸化物鉱物相の沈殿または溶解に影響される。例えば, 鉄酸化細菌によって鉄酸化水和物が生成すると, アクチニド元素の溶解度は鉄酸化水和物のような固相表面の吸着によって制限される。本研究でのマンガン酸化細菌によるマンガン酸化物も同様である。例えば, Davranche *et al.* (2005) は希土類元素-フミン錯体の二酸化マンガンへの吸着について検討している。逆に水酸化鉄が溶解すると, 吸着していた元素が放出されることとなる。アクチニド核種は Fe/Mn 水酸化物の還元で堆積物から脱着し, また, 還元的環境にさらされることでアクチニド核種が還元され, 引き続き新しい鉱物表面に吸着する (Barnes and Cochran, 1993)。ちなみに, 鉄が還元された場合, Fe^{2+} は U(VI) の還元の役割を担うことになる。

いずれにおいても, これらのケースをモデル化し, それぞれの起こりうる可能性と重要性を加味して, より評価しやすい確実なモデルを作る必要がある。その場合には, モデルに必要なパラメータとして化学反応の素反応に対応するようなメカニズムごとのパラメータを設定し, モデル計算, シミュレーションを行って評価することとなる。

微生物は存在していてもその活性を示すか否かはそこでの環境に依存している。また, その環境に順応した微生物の存在も確認されている。極端な環境下でも成育する微生物もあり, $-10 \text{ }^\circ\text{C} \sim 113 \text{ }^\circ\text{C}$ の温度範囲, 1,000 気圧もの高圧, pH 1~pH 11, 25% 食塩以上の塩濃度の浸透圧という厳しい条件下でも生存する微生物が分離されている (今中, 2002)。本研究では, マンガン酸化の活性があるかどうかを調査したが, 活性がなければ微生物が存在しないということではない。微生物は生存しながらも活性を示さないだけかもしれない。したがって, 活性を示す環境条件を調べることは有用である。このような最適環境条件データは微生物の種類ごとに相違していることが考えられるため, 系統的にデータを収集・整理してデータベース化する必要がある。

微生物の影響を考慮する場合, 微生物の総量, 種類とその特質, そして生存環境を明らかにする必要がある。そして, 微生物の作用, 機能についても把握しておくことが必要である。ある微生物が, 環境に対応して複数の機能を発揮することも考えられるので, 一種の微生物に対する機能を一つと特定化せずに総体的にとらえた方がよいと考えている。

5. まとめ

光のない洞窟内の沈殿物や河床に生成する沈殿物に棲息する微生物などを日本各地から採取し、その中の微生物のMn酸化活性を調べた。更に活性のある微生物の分離を行い、その分離株について鑑定やDNA解析による種類の特定を試みた。また、地下深部についての予察的な微生物情報を得るため、新潟・山形県境に近い金丸地区において採取されたボーリングコア中のマンガン酸化細菌の調査を行った。

その結果、洞窟や河床からの沈殿物からはグラム陽性桿菌の*Bacillus*や*Curtobacterium*、グラム陰性桿菌の*Burkholderia*等が分離された。ボーリングコアでは20 m以深においても微生物の存在が確認され、堆積性の地下環境でも微生物研究が重要であることが示された。更に、微生物生態学的にどのような条件下で微生物の作用活性が現れるかについて実験を行い、最適環境条件等を調査した。

微生物の存在が廃棄物処分に関わる処分領域に直接影響を与えるということではないが、核種移行に関わる化学環境に直接・間接的な形で影響を与えるため、微生物の総量、種類とその特質、生存環境と活性の有無とが重要である。このようなデータは微生物の種類ごとに相違していることが考えられるため、系統的にデータを収集し体系化する必要がある。

化学環境に影響を与える微生物には本研究で検討したマンガン酸化細菌のほかにも、鉄酸化細菌、イオウ酸化・還元細菌、窒素酸化細菌、メタン生成・酸化細菌などがあるので、それらについても調査検討を進めるとともに種類と作用についてのデータベース化も開発する必要がある。また、処分事業では地下空間に地表面からの微生物がもたらされる可能性も高い。廃棄物処分の初期では酸化的な環境と考えられるが、その後還元的になるにつれて、微生物群の生態も変化していくかもしれない。その様子をモデル化してスペキュレーションするためにも、いろいろな微生物についての情報をデータベース化する必要がある。更には、微生物の世代交代は速いので、世代交代の中で何らかの突然変異を生じて新たな機能を生じる可能性もあろう。どのように突然変異を起こしていくのかについての規則性が解明されることも望まれる。

微生物に関する我々の知識はほんの一部にすぎず、地球上にはまだまだ未知の微生物がかなり存在するといわれている。これらについてすべてを把握することは困難であろうが、系統的に整理・推定することで、そのかなりの部分が当該分野の知識・学問で把握可能になると期待している。

謝辞：本研究を行うに当たり、試料採取に関して地質

情報研究部門松浦浩久氏、建設省浜松工事事務所（当時）杉山紀行氏をはじめ関係諸氏に大いにお世話になった。また、試料採取を許可して下さった文化庁をはじめ関係機関に深く御礼申し上げる。最後に、本論文に貴重なコメントをくださった匿名の査読者に深く感謝する。

文 献

- Adams, L.F. and Ghiorse, W.C. (1987) Characterization of extracellular Mn²⁺-oxidizing protein from *Leptothrix Discophora* SS-1. *J. Bacteriol.*, **169**, 1279-1285.
- Barnes, C.E. and Cochran, K.J. (1993) Uranium geochemistry in estuarine sediments: controls on removal and release processes. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **57**, 555-569.
- Boyanov, M.I., Kelly, S.D., Kemner, K.M., Bunker, B.A., Fein, J.B. and Fowle, D.A. (2003) Adsorption of cadmium to *Bacillus subtilis* bacterial cell walls: A pH-dependent X-ray adsorption fine structure spectroscopy study. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **67**, 3299-3311.
- Bencheikh-Latmani, R. and Leckie, J.O. (2003) Association of uranyl with the cell wall of *Pseudomonas fluorescens* inhibits metabolism. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **67**, 4057-4066.
- Beveridge, T.J. (1989) Role of cellular design in bacterial metal accumulation and biomineralization. *Annual Review of Microbiology*, **43**, 147-171.
- Davranche, M., Pourret, O., Gruau, G., Dia, A. and Coz-Bouhnik, M.L. (2005) Adsorption of REE (III)-humate complexes onto MnO₂: Experimental evidence for cerium anomaly and lanthanide tetrad effect suppression. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **69**, 4825-4835.
- フゴッペ洞窟保存調査委員会編 (2004) 国指定史跡フゴッペ洞窟保存調査事業報告書, 余市町教育委員会.
- 福島県双葉町 (1984) 双葉町史 第二編 古代, 福島県双葉町.
- Gordon, R.E., Haynes, W.C. and Pang, C.H. (1973) The Genus *Bacillus*, U.S. Department of Agriculture, USA, 283p.
- Gu, B. and Chen, J. (2003) Enhanced microbial reduction of Cr(VI) and U(VI) by different natural organic matter fractions. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **67**, 3575-3582.
- 一瀬 諭・若林徹哉・岡本高弘・藤原直樹・井上 健・加賀爪敏明・宮島利宏 (2003) 琵琶湖北湖深層

- 部における微生物由来のマンガン酸化物構造体—Metallogenium sp. の大量発生について(2002年)—. 滋賀衛環セ所報, **38**, 100-105.
- 今中忠行(2002) 序 地球の歴史と生命の進化—地球の先住民は微生物である. 今中忠行監修“微生物利用の大展開” エヌ・ティー・エス, 東京, 3-7.
- Ishii, N., Tagami, K., Enomoto, S. and Uchida, S. (2004) Influence of microorganisms on the behavior of technetium and other elements in paddy soil surface water. *J. Environ. Radioactivity*, **77**, 369-380.
- JNC (2000) 「わが国における高レベル放射性廃棄物地層処分技術的信頼性—地層処分研究開発第2次取りまとめ—」 分冊1, 核燃料サイクル開発機構.
- Kappler, A. and Nerman, D. (2004) Formation of Fe(III)-minerals by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **68**, 1217-1226.
- Konhauser, K.O., Mortimer, R.J.G., Morris, K. and Dunn, V. (2002) The role of microorganisms during sediment diagenesis: implications for radionuclide mobility. In Keith-Roach and Livens ed. “Interactions of microorganisms with radionuclides”. Elsevier, UK, 61-100.
- Krieg, N.R. and Holt, J.G. (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **Vol.1**, Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1-964.
- 朽津信明・三田直樹(1997) 洞窟遺跡などで観察される黒色の汚れについて. 日本文化財科学会第14回大会研究発表要旨集, 174-175.
- Loppi, S., Riccobono, F., Zhang, Z.H., Savic, S., Ivanov, D. and Pirintsos, S.A. (2003) Lichens as biomonitor of uranium in the Balkan area. *Environmental Pollution*, **125**, 277-280.
- Mita, N. and Miura, H. (2003) Evidence of Microbial Activity in the Formation of Manganese Wads at the Asahidake Hot Spring in Hokkaido, Japan. *Resource Geol.*, **53**, 233-238.
- Mita, N., Maruyama, A., Usui, A., Higashihara, T. and Hariya, Y. (1994) A growing deposit of hydrous manganese oxide produced by microbial mediation at a hot spring, Japan. *Geochem. J.*, **28**, 71-80.
- Ohnuki, T., Aoyagi, H., Kitatsuji, Y., Samadfam, M., Kimura, Y. and Purvis, O.W. (2004) Plutonium(VI) accumulation and reduction by lichen biomass: correlation with U(VI). *J. Environ. Radioactivity*, **77**, 339-353.
- Rancourt, D.G., Thibault, P.-J., Mavrocordatos, D. and Lamarche, G. (2005) Hydrous ferric oxide precipitation in the presence of nonmetabolizing bacteria: Constraints on the mechanism of a biotic effect. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **69**, 553-577.
- Sani, R.K., Peyton, B.M., Amonette, J.E. and Geesey, G.G. (2004) Reduction of uranium(VI) under sulfate-reducing conditions in the presence of Fe(III)-(hydr)oxides. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **68**, 2639-2648.
- 坂口孝司(1996) ウランの生体濃縮. 九州大学出版会, 福岡, 190p.
- 佐藤義夫・林 淳子・西森真理・小野信一・竹松 伸(2000) バクテリアの媒介によって生成するマンガン酸化物鉱物. 海の研究, **9**, 193-204.
- 佐藤義夫・西森真理・林 淳子・小野信一・竹松 伸(2001) 微生物の媒介によるマンガン酸化物の成長過程. 海の研究, **10**, 15-22.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (1986) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2, Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 965-1599.
- 杉山紀行・三田直樹・三浦裕行・村瀬健一(2000a) 静岡県菊川流域のマンガン被覆黒色石の生物地球化学的研究. 工業用水, **501**, 53-53.
- 杉山紀行・三田直樹・三浦裕行・村瀬健一(2000b) 静岡県菊川流域のマンガン被覆黒色石の生物地球化学的研究. 工業用水, **502**, 12-18.
- Takahashi Y., Kimura, T. and Minai, Y. (2002) Direct observation of Cm(III)-fulvate species on fulvic acid-montmorillonite hybrid by laser-induced fluorescence spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **66**, 1-12.
- Wightman, P.G. and Fein, J.B. (2005) Iron adsorption by *Bacillus subtilis* bacterial cell walls. *Chem. Geol.*, **216**, 177-189.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. and Arakawa, M. (1992) Proposal of *Burkholderia* gen.nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb.nov. *Microbiol. Immunol.*, **36**, 1251-1275.
- Zhao, N., Qu, C., Wang, E. and Chen, W. (1995) Phylogenetic evidence for the transfer of *Pseudomonas cocovenenans* (van Damme *et al.* 1960) to the genus *Burkholderia* as *Burkholderia cocovenenans* (van Damme *et al.* 1960) comb.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 600-603.

(受付: 2005年10月5日; 受理: 2006年3月2日)

補足

地質学の分野ではほとんど使わない微生物学専門用語があるので、ここでは幾つか用語解説を簡単に記しておく。

グラム染色：細菌の細胞表面構造の違いによる染色反応の分類で、ペプチドグリカンの厚みの違いにより染色性が変わる。厚い細胞壁を有するグラム陽性菌は青紫色に染まるが、細胞壁のほとんど無いグラム陰性菌ではアルコールで脱色されてしまう。

形態：細菌を顕微鏡でみた形態での分類で、球菌であったり桿菌であったりする。球菌は丸い菌、COC CUS (コッカス) とか COCCI (コッキー) ともいう。球菌でも、一対で存在していたり、ブドウの房のように固まって存在していたりする。桿菌は長細い菌をさし、球でない菌を指す場合もある。BACILLUS (バシラス) とか BACCI (バッシー)、ROD (ロッド = 杖の事) と表記する。

rod-coccus cycle：培養時間により細胞の形が桿菌状から球菌状に変化すること。多くのコリネ型細菌や放線菌で観察される。

オキシダーゼ：酸化を進める酵素であり、野菜や果物の切り口の色が変色する現象にはこの酵素が関わっている。チトクローム酸化酵素の有無を調べる試験。

カタラーゼ：有害な活性酸素の1つである過酸化水素を水と酸素に分解する酵素。酸素を利用して有機物を分解する細菌は、副産物として過酸化物が生成されてしまう。過酸化物の細胞毒性は強いので、酸素を利用する微生物のほとんどはこの過酸化物を無毒化するカタラーゼ酵素を有する。 $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

好気性：酸素がないと生活できない性質のこと。人間は好気性。エネルギーは“有気呼吸”という方法で獲得する。

嫌気性：酸素があるとその毒性で死んでしまう性質(例外有り)。エネルギーは“無気呼吸(発酵)”という形で得る。

通性嫌気性：酸素が存在してもしなくても生育可能な性質。ただし、一般的には酸素を利用した場合の方がエネルギー効率が良いために、その生育もよくなる。大腸菌やサルモネラ菌は通性嫌気性の細菌の代表である。細菌独特の性質で酸素があれば有気呼吸、無ければ発酵でエネルギーを産生するという万能型の性質。病原菌の中にはこの性質を持っている菌も多い。

OFテスト：Oxidation-Fermentationテストの略。微生物がグルコースを分解する際に『酸化的』にのみ分解するか、『発酵的』にも分解可能かを見る試験。酸化的にのみ分解する場合を『O』、発酵的にも分解する場合を『F』と判定する。

GC含量：染色体DNAに含まれる4種の塩基のうち、グアニン(G)とシトシン(C)の含有量のモル%。供試DNAを酵素的に4種のデオキシヌクレオチドに分解した後、高速液体クロマトグラフィーにより直接GC含量を測定される。

PHB：poly- β -hydroxybutylateのこと。ある種の微生物は細胞内で炭水化物を原料として貯蔵エネルギー物質を生産する。飢餓状態になったときに分解してエネルギーを得る。生分解性プラスチックの主成分でもある。

V-P反応：Voges-Proskauer反応の略で、ブドウ糖からアセチルメチルカルビノール(アセトイン)を産生するか否かを調べる。18~24時間培養した後、培地に0.3%クレアチニンと40%水酸化カリウム水溶液を加えると、アセトインは、強アルカリ下で酸化されジアセチルを生成してクレアチニンと縮合反応し赤色の生成物を生じる。この反応により赤色を呈した場合、VP反応陽性と判定する。

アルギニンジヒドロラーゼ：ADHと略す。アルギニンを分解して培地をアルカリ化するかを見る試験。

プロトカテキン酸の開裂：ベンゼン環を開裂する能力を有しているかを見る試験。

卵黄反応：卵黄を分解する酵素であるレシチナーゼを有しているかを見る試験。

キノ系：細胞膜に存在している呼吸鎖に係わる補酵素。グラム陰性菌の多くはユビキノン(Q)を、グラム陽性菌はメナキノン(Mk)を有している。

資化性：唯一の炭素源として添加した炭水化物などを利用することができるかどうかを見る試験。

ビタミン要求性：一般に微生物や植物は自らビタミンを合成し外部からの補強を必要としないが、独立栄養を営めない細菌類は種々のビタミンを要求し、その種類は特異的である。

16S rDNA：すべての生物に存在する基本となる遺伝子であり最も進化速度が遅いため保存性がよいとされる。1600bp程度の遺伝子であるが、1,000属、5,000種に及ぶ基準株の16S rDNA遺伝子の塩基配列が解読されデータベース化されているので、検体の16S rDNA遺伝子の塩基配列によって分類学的な位置が解析される。