

# 鉄酸化及び硫黄酸化化学合成独立栄養細菌 *A.ferrooxidans* 及び *A.thiooxidans* の利用と増殖制御に関する研究

Studies on the Utilization and Growth Regulation of Iron- and Sulfur-Oxidizing Chemolithoautotroph, *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans*

根岸敦規 Atsunori NEGISHI\*

## 要 旨

*Acidithiobacillus* 属細菌の主要メンバーとして、硫黄化合物のみを酸化できる硫黄細菌 *A. thiooxidans* と 2 価鉄と硫黄化合物の両方を酸化できる鉄細菌 *A. ferrooxidans* が知られている。両細菌はパイオリーチングや地球の無機物循環反応に重要な役割を果たしているとともに、硫黄の酸化に伴い大量の硫酸を生成することから、河川の酸性化、コンクリートの腐食劣化など人間生活に害作用を及ぼすことも知られている。本研究は、*Acidithiobacillus* 属細菌の有効利用と増殖制御の両方を目指している。

### 1. *A. ferrooxidans* の有効利用に関する研究

水銀耐性 *A. ferrooxidans* SUG 2-2株中に活性を見出した新規水銀還元酵素、即ち「2価鉄依存性の水銀還元酵素」の水銀汚染土壌のバイオレメディエーションへの利用を検討した。水銀汚染土壌からの微生物関与の水銀回収に関する研究は、従来、*Pseudomonas* 属など中性 pHでのみ増殖可能な水銀耐性従属栄養細菌でのみ試みられてきたが、酸性pHで生育する細菌での例はない。独立栄養細菌は炭酸ガスと無機塩のみで増殖が可能であり、高価な栄養素を供給する必要がなく水銀処理時の微生物管理が従属栄養細菌の場合に比較し容易である。本研究は、好酸性の独立栄養細菌を用いて大量の水銀汚染土壌からの水銀の気化・回収の可能性を検討した。回転ドラムからなる反応槽と気化した金属水銀を完全にトラップできるシステムを合わせ持った水銀回収装置を考案した。10kgの水銀汚染土壌（1000mg Hg/10kg）に2価鉄、無機塩、SUG 2-2株の洗浄細胞（104mg）を添加し、30℃で4週間、処理土壌を攪拌する事によって700mgのHgを気化・回収する事に成功した。2価鉄依存性の水銀還元酵素による水銀気化機構をより詳細に解析するために、SUG 2-2株より誘導した更に水銀耐性能の高いMON-1株から鉄酸化酵素の主要成分であるcytochrome *c* oxidaseを精製し、精製酵素がTMPDを電子供与体として水銀を気化できることを明らかにした。この結果は、末端酸化酵素としてのみ知られていた *cyt. c* oxidaseが分子状酸素以外にHg<sup>2+</sup>をも還元でき、呼吸以外の機能、即ち、水銀耐性に関与していることを示している。

### 2. *A. thiooxidans* 及び *A. ferrooxidans* の増殖制御に関する研究

硫酸を生成する *A. thiooxidans* 及び *A. ferrooxidans* の増殖制御に関する研究として、コンクリート腐食に対する防菌剤の開発、コンクリート腐食の解析法、及び、開発した防菌剤の *A. thiooxidans* 並びに *A. ferrooxidans* に対する増殖阻害機構について検討した。両菌は、ともにpH4 以下の酸性でタングステン (W) を強く結合し増殖が大きく阻害された。一方、Wは中性pHでは両細胞に結合しなかった。Wは、*Escherichia coli* 及び *Saccharomyces cerevisiae* に対しては結合も増殖阻害も起こさなかった。この様にWは中性では菌体に結合しない性質を持っているので、酸性pHでのみ増殖する *Acidithiobacillus* 属細菌に特異的な阻害剤で、選択毒性を持った理想的な防菌剤であることを明らかにした。金属ニッケル (Ni) は中性で強い阻害効果があった。特にWの阻害効果がない中性pHで増殖する硫黄細菌 *Paracoccus versutus* 及び *Starkeya novella* に強い阻害効果を示したことから、防菌剤としてはWとNiの併用使用が理論的に望ましいことが示唆された。

鉄細菌の増殖は0.2 mMのNa<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>の存在で完全に阻害された。Wは鉄酸化酵素を阻害した。鉄酸化酵素の成分では、iron:cytochrome *c* oxidoreductaseに対しては阻害効果がなく、精製*cyt. c* oxidaseを0.1 mMで完全に阻害し、191 μg/mgのWが精製酵素に結合した。*A. ferrooxidans* 細胞中に、Wを特異的に結合できるW結合タンパク質が存在することを初めて明らかにした。本結合タンパク質は1506 μg/mgのWを結合できる能力を持っており、12 kDaおよび20.7 kDaの2種類のsubunitから構成されていた。

硫黄細菌の増殖は0.05 mMのNa<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>の存在で完全に阻害された。本菌には鉄細菌に存在するW結合タンパク質は存在していなかった。硫黄酸化に関与する初発酵素であるsulfur dioxygenaseのsubunit構造に関する報告例はない。NB1-3株よりsulfur dioxygenaseを高度に精製した。本酵素は19.5 kDaのmonomer酵素であること、また、本精製酵素が1.0 μMのNiで完全阻害されることを初めて明らかにした。従来硫黄細菌の末端酸化酵素に関する知見は無かった。

\* 環境事業部

「岡山大学学位論文 2006.3」の要旨を掲載

*A. thiooxidans* NB1-3株の末端酸化酵素が $aa_3$ 型のubiquinol oxidaseであること、また57, 34, 23 kDaの3種類のsubunit から構成されていることを今回初めて特定した。本精製酵素はNi及びWにより強く阻害された。

コンクリートの腐食速度を、腐食コンクリート内への硫酸の進入速度の測定、また腐食コンクリート中の石膏(Gypsum)及びettringite生成量をEPMAで分析することによって正確に評価する方法を新たに開発した。この分析法を用い、3カ所の本邦都市下水処理施設マンホール内で防菌剤添加・無添加コンクリートバーの暴露試験を2年間続け腐食速度を測定した。28 ppmの硫化水素が存在する汚水処理施設マンホール内での暴露試験で、0.075%の $\text{CaWO}_4$ と0.075%のNiを添加したコンクリートが0.075%のNiのみを添加したものより腐食速度が顕著に遅いことを、従って、両防菌剤を併用することが防菌効果に必須であることを明らかにした。本研究で、防菌剤として用いているWとNiが*A. ferrooxidans* 及び *A. thiooxidans* のどの酵素を阻害するか、阻害機構を精製酵素を用いて初めて明らかにしたが、精製酵素からの知見と暴露試験による腐食速度の結果が合致していることが確かめられた。なお、WとNiの両方を混入させた防菌剤入りコンクリートは、現在、年間1万トン生産・利用されている。

キーワード：硫黄酸化細菌，鉄酸化細菌，コンクリート，劣化防止，水銀汚染，バイオリメディエーション，防菌剤

## Summary

We understand now the existence of a group of bacteria, chemolithoautotrophic bacteria, which play an important role on the cycle of inorganic compounds on the earth, such as carbon, nitrogen, hydrogen, sulfur, and heavy metals including iron, nickel, mercury, molybdenum, tungstate, uranium and so on. The sulfur-oxidizing acidophilic chemolithotrophs *Acidithiobacillus thiooxidans* (formerly *Thiobacillus thiooxidans*) and *Acidithiobacillus ferrooxidans* (formerly *Thiobacillus thiooxidans*) derive their energy for growth from the oxidation of inorganic reduced sulfur compounds and/or ferrous iron. Both *A. thiooxidans* and *A. ferrooxidans* are considered to be the most useful microorganisms for the bacterial leaching of sulfide ores. Bacterial leaching is a technology by which valuable metals for a human being, such as copper, nickel, uranium and gold, are solubilized or precipitated separately from the ore bodies with an aid of bacterial activity. Attention to bacterial leaching has increased in recent years because of its application to low-grade ores. This can be attributed to a unique ability of *A. ferrooxidans* to use both the iron and sulfur moieties in sulfide ores for growth.

It has been known that *A. ferrooxidans* cells are in general resistant to many heavy metals including iron, copper, zinc, and nickel, but sensitive to mercury, silver, molybdenum, and tungsten. The growth inhibition of *A. ferrooxidans* cells by mercury, silver, molybdenum and tungsten and the sites of inhibition in enzyme system of these bacteria have been reported. Among these toxic metals mercury is highly toxic for almost all of the organisms because they have a strong affinity for thiol groups in proteins. The bacteria that are highly resistant to  $\text{Hg}^{2+}$  and/or organomercurial compounds have the ability to volatilize metal mercury ( $\text{Hg}^0$ ) from inorganic and organic mercurial compounds. Wide ranges of Gram-negative and Gram-positive bacteria have mercury reductases that reduce  $\text{Hg}^{2+}$  with NADPH as an electron donor. *A. ferrooxidans* cells have mercury reductase activity and the genes involved in the volatilization of mercury have been clone and characterized in detail.

The bacterial abilities to volatilize metal mercury from mercuric compounds seem to be important not only from the point of basic microbiology but also from application point of view because these abilities are used for bioremediation for mercury polluted soil and wastewater. *A. ferrooxidans* SUG2-2 was isolated as a mercury resistant strain among one hundred *A. ferrooxidans* strains isolated from natural environments. It was reported that *A. ferrooxidans* SUG2-2 has an ability to volatilize metal mercury from mercury-polluted wastewater and soil under acidic conditions in the presence of ferrous iron and that SUG2-2 has not only NADPH-dependent mercury reductase activity but also  $\text{Fe}^{2+}$ -dependent mercury reductase activity in the cells. Cytochrome *c* oxidase purified from strain SUG2-2 volatilizes mercury in the presence of  $\text{Fe}^{2+}$ . Recently, a highly mercury resistant strain *A. ferrooxidans* MON-1 was isolated from a culture of strain SUG 2-2 after it was cultured successively in a  $\text{Fe}^{2+}$  medium with increased amounts of  $\text{Hg}^{2+}$  ranged from  $6\ \mu\text{M}$  to  $20\ \mu\text{M}$ . It was found that the  $\text{Fe}^{2+}$ -dependent mercury volatilization enzyme system is more important than NADPH-dependent mercury reductases for the acquisition of further mercury resistance in *A. ferrooxidans* cells and among components of iron oxidation enzyme system, cytochrome *c* oxidase activity of strain MON-1 increased accompanied with increase of mercury resistance. In this way a preliminary work to use the  $\text{Fe}^{2+}$ -dependent mercury volatilization

enzyme system of *A. ferrooxidans* MON-1 to the bioremediation of a large amount of mercury polluted soil has been done.

Importance of the use of *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* cells in bacterial leaching of sulfide ores and also in the bioremediation of acid mine drainage containing a high concentration of heavy metals has been generally accepted. However, since both *A. thiooxidans* and *A. ferrooxidans* can oxidize hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) to give a strong acid, sulfuric acid, as a reaction product, it has been known that these bacteria are potent agents responsible for concrete corrosion and acidification of rivers. Corrosion of concrete structures, especially, in sewer systems and sewage treatment plants, has become a big social problem. In 1945, Parker first presented evidence that concrete structures are corroded by sulfuric acid produced by the sulfur-oxidizing bacterium *Thiobacillus concretivorus*. The sulfuric acid which is produced in the sewer pipe by *A. thiooxidans*- and *A. ferrooxidans*- dependent oxidation of hydrogen sulfide reacts with the components of concrete such as calcium oxides and calcium hydroxide to form a sandy calcium sulfate (gypsum). Therefore, it is desirable that sulfur oxidation by *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* cells should be activated at the bacterial leaching sites or at bioremediation sites for acid mine drainage and mercury polluted soil, but rather strongly inhibited at the surface of concrete structure of sewer pipe. In this way, when we consider *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* from the view point of applied microbiology, it is important to develop two kinds of biotechnological methods: one which activates growth rate and yield of useful thiobacilli and the other which inhibits or represses the growth rate and yield of a harmful thiobacilli. Therefore, we should obtain bacterial strains which have a high growth rate, high iron- and sulfur-oxidation activities, and a high mercury volatilization activity when these bacteria are used to bacterial leaching and bioremediation of mercury. In contrast, in the case of concrete corrosion, we should look for the way to inhibit the growth of *A. thiooxidans* cells by inhibiting the enzyme systems involving in iron- and/or sulfur-oxidation, carbon dioxide fixation, and DNA and/or RNA syntheses.

In this thesis, author tried to clarify the mechanism of mercury reduction with a purified cytochrome *c* oxidase from mercury resistant *A. ferrooxidans* strains with TMPD as an electron donor to develop a microbiological system to remove mercury from mercury polluted soil. Author also tried to clarify the mechanism of tungstate and nickel inhibitions of sulfur oxidation enzyme systems of *A. thiooxidans* with purified sulfur dioxygenase and ubiquinol oxidase to develop bacteriostatic reagent for concrete corrosion. Now, more than 10,000 tons/year of concrete containing both tungsten and metal nickel are produced and used in Japan.