

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3505570号
(P3505570)

(45)発行日 平成16年3月8日(2004.3.8)

(24)登録日 平成15年12月26日(2003.12.26)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
C 1 2 N 1/14		C 1 2 N 1/14 A
1/00	Z A B	1/00 Z A B S
1/16		1/16 G
// (C 1 2 N 1/14		1/14
C 1 2 R 1:67)		C 1 2 R 1:67

請求項の数7(全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-38429(P2000-38429)
(22)出願日 平成12年2月16日(2000.2.16)
(65)公開番号 特開2001-224358(P2001-224358A)
(43)公開日 平成13年8月21日(2001.8.21)
審査請求日 平成12年2月16日(2000.2.16)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年9月17日に
関西大学工学部で開催された平成11年度日本生物工学会
大会において文書をもって発表

微生物の受託番号 FERM P-17723
微生物の受託番号 FERM P-17724
微生物の受託番号 FERM P-17725
微生物の受託番号 FERM P-17726
微生物の受託番号 FERM P-17727
微生物の受託番号 FERM P-17728

(73)特許権者 394025980
岡山大学長
岡山県岡山市津島中一丁目1番1号
(72)発明者 河合 富佐子
岡山県倉敷市白楽町294-7 つくし館
202
(72)発明者 杉本 学
岡山県岡山市東睦59の20
(74)代理人 100058479
弁理士 鈴江 武彦 (外5名)

審査官 田村 明照

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 耐酸性・耐アルミニウム菌

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 耐酸性・耐アルミニウム性を有する *Aspergillus flavus* Link F-6b (FERM P-17723)。

【請求項2】 耐酸性・耐アルミニウム性を有する *Penicillium* sp. F-8b (FERM P-17724)。

【請求項3】 耐酸性・耐アルミニウム性を有する *Penicillium janthinellum* Biourge F-13 (FERM P-17725)。

【請求項4】 耐酸性・耐アルミニウム性を有する *Trichoderma asperellum* F-15 (FERM P-17726)。

【請求項5】 耐酸性・耐アルミニウム性を有する *Rhodothorula glutinis* Y-2a (FERM P-17727)。

【請求項6】 耐酸性・耐アルミニウム性を有する *Cryptococcus humicola* Y-6 (FERM P-17728)。

【請求項7】 酸性環境中のアルミニウムイオンを除去する方法であって、請求項1ないし6の何れか1項記載の微生物を、前記酸性環境中で生育させる工程を具備する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、耐酸性・耐アルミニウム性を有する新規微生物に関する。更に本発明は、前記微生物を用いて酸性土壌および酸性水中の遊離アルミニウムイオンを除去し、土壌の健全化および水質の改善をはかる方法に関する。

【0002】このように本発明は、植物の根に有害なア

ルミニウムイオンを無害化して土壌および水系の環境を改善し、植物の生産性を向上させることができるため、農業・林業・環境分野において重要な意味を有するものである。

【0003】

【従来の技術】地球上には30～40%の酸性土壌が存在するといわれ、このような酸性条件下において、アルミニウムは優先的にイオンの形態で存在する。酸性土壌及び酸性水中の遊離アルミニウムイオン (Al^{3+}) は、植物の根の成長阻害をもたらす他、生物全般に対して毒性を有することが指摘されている。このように、酸性土壌及び酸性水中の有害 Al^{3+} が溶出すると、作物栽培等に悪影響を及ぼすことが知られている。

【0004】従来、中性条件下でのアルミニウム耐性菌の研究は広く行われているが、酸性条件下でのアルミニウム耐性菌の分離報告は極めて少ない。酸性条件下でのアルミニウム耐性菌に関するKonishiらの報告は、耐性菌が細菌であるためその耐性はかび、酵母の真菌に比べて低く、生育限界もpH3.0であった (Biosci. Biotech. Biochem., 58(11), 1960-1963, 1994)。また、Kanazawaらの報告は、酸性土壌から真菌の分離を行っているが、その耐性測定はリン酸その他を含む寒天培地で行われているので、培地成分による毒性緩和が考えられ、実際にどの程度まで耐性であるかについては更に検討が必要である (Soil Sci. Plant Nutr., 42(1), 165-173, 1996)。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上述のように過酷な酸性条件下で有害なアルミニウムイオンを無害化することが可能な、耐酸性・耐アルミニウム性の新規微生物を提供すること、並びに前記微生物を利用した、アルミニウムイオンの不活性化・除去方法を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成できる耐酸性・耐アルミニウム菌の単離に成功し、本発明に至った。

【0007】本発明により単離された新規微生物は、(1) *Aspergillus flavus* Link F-6b (FERM P-17723)、(2) *Penicillium* sp. F-8b (FERM P-17724)、(3) *Penicillium janthinellum* Biourge F-13 (FERM P-17725)、(4) *Trichoderma asperellum* F-15 (FERM P-17726)、(5) *Rhodotorula glutinis* Y-2a (FERM P-17727)、(6) *Cryptococcus humicola* Y-6 (FERM P-17728) である (これ以降、菌株名で略して記載することもある)。尚、本発明の菌株は全て、従来技術に記載のKanazawaらの報告した菌株とは種が異なる。

【0008】更に本発明は、酸性環境中のアルミニウムイオンを除去する方法であって、前記(1)ないし

(6)の何れか1記載の微生物を、前記酸性環境中で生育させる工程を具備する方法である。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明の新規微生物について詳細に説明する。

単離方法 市販栄養培地 (普通ブイヨン“栄研”、栄研化学(株))の5倍希釈液を、1N塩酸でpH3.5に設定した。この溶液に、 $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 水溶液を最終濃度1～10mMになるよう、フィルター濾過で無菌的に添加したものを基本培地とした ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 水溶液の最終濃度は、当初1mMとしたが順次濃度を上げた)。

【0010】上記基本培地に、茶園土壌 (京都府相楽郡)の懸濁上清みを適宜添加した (好ましくは、基本培地の2～3%容量の土壌懸濁液を添加した)。これを、28～30℃で振盪培養し、土壌中の微生物の生育が認められたものについて集積培養を数回繰り返した。また、この集積培養後の培養液を、上記培地に寒天2%を加えた固体平板培地に塗布した。次いで、出現したコロニーを同じ組成の平板培地に塗布した。これを同一コロニーのみが見出されるようになるまで繰り返して純粋培養とした。

【0011】上述の単離により、耐酸性・耐アルミニウム性を有する新規な4種類のかび及び2種類の酵母が得られた。純粋培養の保存は、同じ組成の斜面培地で行った。

【0012】以下に市販栄養培地1000mLあたりの組成を示す。

肉エキス	3g
ペプトン	10g
NaCl	5g
pH	7.0

【0013】培養条件 本発明の6菌株を継代培養するために用いられる培地の栄養源としては、通常の微生物の生育に必要なであって、各菌株が資化可能な栄養源であれば如何なる炭素源、窒素源および無機塩類等でもよく、例えばGM培地およびS-LB培地で培養することが可能である。

【0014】以下にGM培地およびS-LB培地の組成を示す。

【0015】GM培地

グルコース	1.0 wt%
NaCl	1.0 wt%
ペプトン	0.05 wt%
酵母エキス	0.02 wt%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02 wt%
pH	3.5～7.0
<u>S-LB培地</u>	
土壌抽出液*	1.0 L
ペプトン	0.05 wt%
酵母エキス	0.025 wt%

NaCl 1.0 wt%

pH 3.5~7.0

* 土壌100gを1Lの脱塩水に懸濁、攪拌後、濾過および遠心分離して得られた上澄み。

【0016】培養温度は、各菌株が良好に生育出来る温度範囲であればよく、好ましくは28~30である。また、培養時のpHは、各菌株が良好に生育出来る範囲であればよく、pH3.5~7.0が好ましい。

【0017】継代培養は、上述の斜面培養されている菌株から、一白金耳(鉤)を取り、4mLのGM培地もし

くはS-LB培地を含む試験管に接種し、28~30で振盪培養する。更に、これを100mLの同培地(500mL肩付き振盪フラスコ内)に接種して同様に培養することにより行われる。

【0018】菌株の同定 耐酸性・耐アルミニウム性を有する新規な4種類のかび及び2種類の酵母の同定結果を表1に示す。

【0019】

【表1】

表 1

耐酸性・耐アルミニウム菌の同定

菌株名	カテゴリー	同定種
Y-6	酵母	<i>Cryptococcus humicola</i>
Y-2 a	酵母	<i>Rhodotorula glutinis</i>
F-6 b	かび	<i>Aspergillus flavus</i> Link
F-8 b	かび	<i>Penicillium sp.</i>
F-13	かび	<i>Penicillium janthinellum</i> Biourge
F-15	かび	<i>Trichoderma asperellum</i>

【0020】A. かび

かびの同定は専ら形態的な観察に基づいて行った。かびの形態的な観察結果を図1~図4に示す。図1は、*Aspergillus flavus* Link F-6 b (FERM P-17723)、図2は、*Penicillium sp.* F-8 b (FERM P-17724)、図3は、*Penicillium janthinellum* Biourge F-13 (FERM P-17725)、図4は、*Trichoderma asperellum* F-15 (FERM P-17726)の形態を示す顕微鏡写真である。

【0021】4種類の分離菌はいずれも隔壁のある菌糸を形成したので、藻菌類以外と判断され、菌叢の色と分生子の形態、着生状態等から、それぞれ*Aspergillus*、*Penicillium*、*Trichoderma*と判断でき、以下の参考書を参照して、それぞれの該当種と判定した。*Penicillium sp.* F-8 bのみ、該当する種が見出せなかったため、種の同定はなされていない。

【0022】B. 酵母

以下に示す菌学的性質、並びに以下の参考書を参照してそれぞれの該当種と同定した。酵母の形態的な観察結果を図5、図6に示す。図5は、*Rhodotorula glutinis* Y-2 a (FERM P-17727)、図6は、*Cryptococcus humicola* Y-6 (FERM P-17728)の形態を示す顕微鏡写真である。

【0023】「参考書」

微生物の分類と同定 : 長谷川武治編著 東京大学出版会

酵母の分類同定法 : 飯塚廣、後藤昭二著 東京大学出版会

食品菌類ハンドブック : 宇田川、松田監訳 医歯薬出版

菌類図鑑 上下 : 宇田川俊一他 講談社

【0024】「菌学的性質」本発明で新たに取得された

酵母2菌株の菌学的性質を以下に示す。まず、*Rhodotorula glutinis* Y-2 a (FERM P-17727)について示す。

【0025】a) 培養温度 : 25

b) 形態学的性状

(1) ピンクコロニーの形成 : +

(2) レモン形細胞の形成 : -

(3) せんい状 : -

(4) 分裂子 : -

(5) 子嚢胞子 : -

(6) 出芽細胞 : +

(7) 菌糸上の出芽 : -

(8) 仮性菌糸 : -

(9) 射出子 : -

(10) 分裂細胞 : -

(11) 隔壁のある菌糸 : -

(12) 対称的射出子 : -

c) 糖発酵性

(1) D-グルコース : -

(2) D-ガラクトース : -

(3) マルトース : -

(4) スクロース : -

(5) ラクトース : -

(6) ラフィノース : -

d) 炭素源の利用性

(1) D-グルコース : +

(2) D-ガラクトース : +

(3) L-ソルボース : -

(4) D-グルコサミン : -

(5) D-リボース : -

(6) D-キシロース : -

- (7) L-アラビノース： +
 (8) L-ラムノース： -
 (9) スクロース： +
 (10) マルトース： +
 (11) , -トレハロース： +
 (12) メチル -D-グルコシド： -
 (13) セロピオース： +
 (14) メリピオース： -
 (15) ラクトース： -
 (16) ラフィノース： +
 (17) メレジトース： +
 (18) グリセロール： -
 (19) エリスリトール： -
 (20) D-グルシトール： -
 (21) D-マンニトール： -
 (22) ミオイノシトール： -
 (23) 2-ケト-D-グルコン酸： -
 (24) D-グルコン酸： -
 (25) D-グルキュロン酸： -
 (26) DL-乳酸： -
 d) 窒素源の利用性
 (1) 硝酸： +
 (2) カダヴェリン： +
 (3) エチルアミン： -
 (4) D-グルコサミン： -
 (5) L-リジン： -
 e) 発育性
 (1) 0.01%シクロヘキシミド： -
 (2) 酢酸産生： -
 f) 生育温度 37 : +
 以上の諸性質から、本菌株は、Rhodotorula glutinisに属していると認められた。
 【0026】次いで、Cryptococcus humicola Y - 6 (FERM P - 17728) について示す。
 【0027】a) 培養温度：25
 b) 形態学的性状
 (1) ピンクコロニーの形成： -
 (2) レモン形細胞の形成： -
 (3) せんい状： +
 (4) 分裂子： -
 (5) 子嚢胞子： -
 (6) 出芽細胞： +
 (7) 菌糸上の出芽： -
 (8) 仮性菌糸： +
 (9) 射出子： -
 (10) 分裂細胞： -
 (11) 隔壁のある菌糸： +
 (12) 対称的射出子： -
 c) 糖発酵性
 (1) D-グルコース： -

- (2) D-ガラクトース： -
 (3) マルトース： -
 (4) スクロース： -
 (5) ラクトース： -
 (6) ラフィノース： -
 d) 炭素源の利用性
 (1) D-グルコース： +
 (2) D-ガラクトース： +
 (3) L-ソルボース： +
 (4) D-グルコサミン： +
 (5) D-リボース： +
 (6) D-キシロース： +
 (7) L-アラビノース： +
 (8) L-ラムノース： +
 (9) スクロース： +
 (10) マルトース： +
 (11) , -トレハロース： +
 (12) メチル -D-グルコシド： +
 (13) セロピオース： +
 (14) メリピオース： +
 (15) ラクトース： +
 (16) ラフィノース： -
 (17) メレジトース： +
 (18) グリセロール： +
 (19) エリスリトール： +
 (20) D-グルシトール： +
 (21) D-マンニトール： +
 (22) ミオイノシトール： +
 (23) 2-ケト-D-グルコン酸： +
 (24) D-グルコン酸： +
 (25) D-グルキュロン酸： +
 (26) DL-乳酸： +
 d) 窒素源の利用性
 (1) 硝酸： -
 (2) カダヴェリン： +
 (3) エチルアミン： +
 (4) D-グルコサミン： +
 (5) L-リジン： +
 e) 発育性
 (1) 0.01%シクロヘキシミド： +
 (2) 酢酸産生： -
 f) 生育温度 37 : -
 以上の諸性質から、本菌株は、Cryptococcus humicolaに属していると認められた。
 【0028】次に、本発明の微生物の利用方法について説明する。本発明の微生物何れか一つを用いて、酸性環境中(例えば、酸性土壌中、酸性水中など)のアルミニウムイオンを除去することができる。すなわち、本発明の微生物が生育可能な酸性環境下に、本発明の微生物を添加し、生育させることにより、酸性環境下に存在する

アルミニウムイオンを無害化することができる。無害化の機構は、実施例で後述されるとおり、アルミニウムイオン以外の無害な形態に変換される場合と、沈澱除去される場合とがある。何れも、本発明の微生物の耐酸性・耐アルミニウム性ゆえに、アルミニウムイオンを生物に無害な形に変換することができる。

【0029】また本発明の微生物は、予め培養しておいた菌体をカラム等に固定化し、アルミニウムイオンを含む水を循環させることでアルミニウムイオンを除去する

表 2

分離菌の耐酸性

培地の 初期 pH	0 mMまたは10 mMアルミニウム下での増殖											
	F-13		F-15		F-8b		F-6b		Y-6		Y-2a	
	0mM	10mM	0mM	10mM	0mM	10mM	0mM	10mM	0mM	10mM	0mM	10mM
3.5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++
3.0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++++	+++
2.8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++++	+++
2.7	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++++	+++
2.6	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	++++	+++
2.5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	++++	++
2.3	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	-	-	-	-
2.2	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-

++++: 非常に良好な増殖あり、+++ : 良好な増殖あり、++ : 増殖あり、+ : 僅かな増殖あり、- : 増殖なし

【0032】GM培地のpH (pH2.2~pH3.5)が、微生物の増殖に及ぼす影響を調べた。本発明の菌株を、表2に記載の各pH値を有するGM培地において、30で168時間(7日間)振盪培養し、その増殖を評価した。本発明の6菌株すべてにおいて、pH2.5での増殖が観察された。また、F-13およびF-15において

表 3

分離菌のAl耐性

菌株	培地中のアルミニウム (mM)						
	0	10	50	100	150	200	300
F-13	++++	++++	++++	+++	++	+	-
F-15	++++	++++	++++	++++	+++	++	-
F-8b	++++	++++	++++	++	-	-	-
F-6b	++++	+++	+++	++	Nt	Nt	Nt
Y-6	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
Y-2a	++++	++++	+++	++	-	-	-

Nt : 試験せず、++++: 非常に良好な増殖あり、+++ : 良好な増殖あり、++ : 増殖あり、+ : 僅かな増殖あり、- : 増殖なし

【0035】GM培地中に含有されるアルミニウム(0~300mM)が、微生物の増殖に及ぼす影響を調べた。GM培地(pH3.0)において、30で168時間(7日間)振盪培養し、その増殖を評価した。本発明の6菌株すべてにおいて、アルミニウム濃度100mMまで増殖が観察された。特にF-13、F-15およびY-6においては、アルミニウム濃度200mMまで明らかに増殖が見られた。この結果から、本発明の菌株全てが、これまでに報告されたことがない高いアルミニウム耐性を有す

際にも利用することができる。

【0030】

【実施例】以下、本発明の菌株の、耐酸性、耐アルミニウム性実験の結果について記載する。

実施例1 分離菌の耐酸性を調査し、その結果を表2に示す。

【0031】

【表2】

は、pH2.2でも明らかに増殖が見られた。この結果から、本発明の菌株の耐酸性が証明された。

【0033】 実施例2 分離菌の耐アルミニウム性を調査し、その結果を表3に示す。

【0034】

【表3】

ることが証明された。

【0036】 実施例3 GM培地およびS-LB培地それぞれにおいてPenicillium janthinellum Biourge F-13を培養し、各培地に1mMアルミニウムイオンを添加した際のpH、アルミニウムイオン(Al³⁺)、および全アルミニウム(tAl)の変化を調べた。その結果を図7に示す。

【0037】まず、GM培地においては、添加したアルミニウムイオンは減少し、3日目にはほぼ検出されな

ったが、全アルミニウムとしては残存している。この結果より、培養液中の有害なアルミニウムイオンは、同じく培養液中の不活性なアルミニウム形態に変換されたと考えられる。一方、S-LB培地においては、添加したアルミニウムイオン、全アルミニウムともに培養液から完全に沈澱除去された。

【0038】このように培地組成によって、アルミニウム耐性機構は異なるが、アルミニウムイオンを除去するという点では共通している。またこれらの現象は、本発明の他の菌株についても同様にみられ、本発明の菌株がアルミニウムイオンを除去できることが実証された。

【0039】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の新規微生物は、健全土壌から分離されたものであるため、病原性を発揮する可能性は少ない。

【0040】また本発明の微生物は、一般に微生物の生育が阻害される酸性土壌および酸性水系の環境において、その耐酸性ゆえに生存・生育可能である。本発明の微生物はpH3.0以下でも（菌株によっては最大pH2.2まで）生育可能であり、従来技術におけるKonishiらの菌、およびKanazawaらの菌に比べてその耐酸性度は高いものであった。

【0041】更に本発明の微生物は、耐アルミニウム性を発揮し、酸性土壌、酸性水系から、植物の根に有害なアルミニウムイオンを無害化することができる。本

発明の微生物は、菌株によっては最大200 mMまでのアルミニウムに耐性であり、上記従来技術より高い耐性を有している。また従来技術においては、分離菌によるアルミニウムイオンの無毒化・除去効果は記載されておらず、本発明において初めて分離菌株によるアルミニウムイオンの無毒化・除去能が示された。

【0042】このように本発明の微生物を利用してアルミニウムイオンを無害化することにより、酸性環境を改善し、植物の生産性を向上させることが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 *Aspergillus flavus* Link F - 6 b (FERM P - 17723) の顕微鏡写真。

【図2】 *Penicillium* sp. F - 8 b (FERM P - 17724) の顕微鏡写真。

【図3】 *Penicillium janthinellum* Biourge F - 13 (FERM P - 17725) の顕微鏡写真。

【図4】 *Trichoderma asperellum* F - 15 (FERM P - 17726) の顕微鏡写真。

【図5】 *Rhodotorula glutinis* Y - 2 a (FERM P - 17727) の顕微鏡写真。

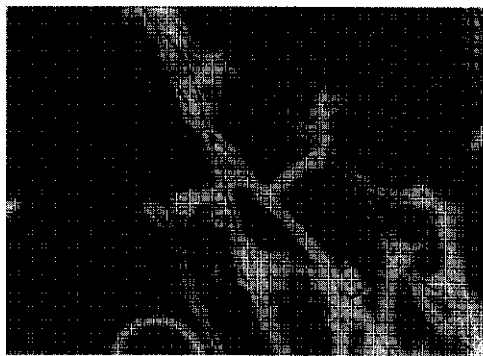
【図6】 *Cryptococcus humicola* Y - 6 (FERM P - 17728) の顕微鏡写真。

【図7】 F - 13の培養経過における培地のpH、アルミニウムイオン、および全アルミニウムの変化を示す図。

【図1】



【図2】



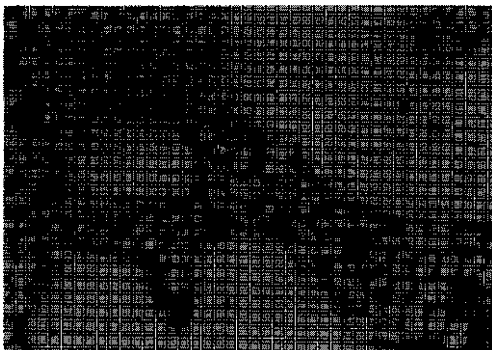
【図3】



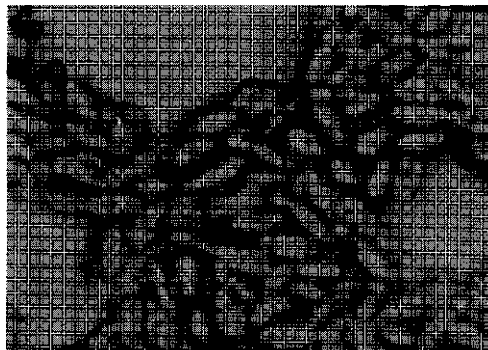
【図4】



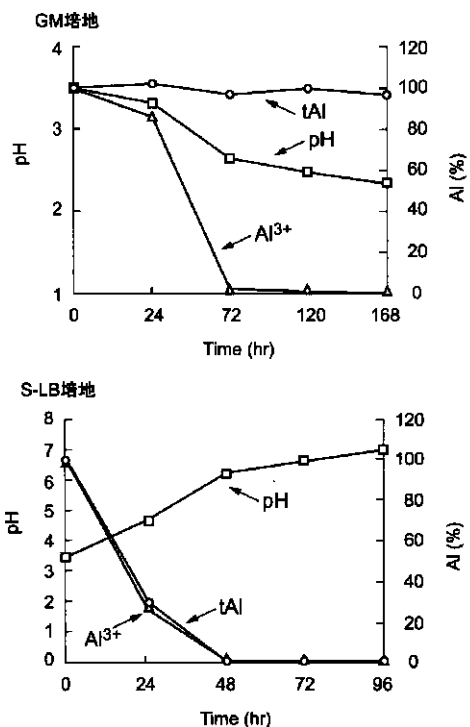
【図5】



【図6】



【図7】



Penicillium janthinellum F-13の培養経過におけるpH(□), Al³⁺(Δ) およびtAl(O)の変化

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

- (C 1 2 N 1/14
- C 1 2 R 1:80)
- (C 1 2 N 1/14
- C 1 2 R 1:885)
- (C 1 2 N 1/16
- C 1 2 R 1:645)

- C 1 2 R 1:80
- 1:885
- C 1 2 N 1/16
- C 1 2 R 1:645

(56)参考文献 特開 平5 - 227979 (JP, A)
特開 平7 - 213279 (JP, A)
特開 平10 - 271990 (JP, A)
FEMS Microbiol. Lett., Vol. 189, No. 2, pp. 143 - 147, 2000年
Journal of Biotechnology, Vol. 27, pp. 91 - 116, 1993年

(58)調査した分野(Int.Cl.7, DB名)
C12N 1/00
C12N 1/14
C12N 1/16
BIOSIS/WPI(DIALOG)
JSTPlusファイル(JOIS)