

## 強酸性環境を中和する酵母

浦野 直人 (東京海洋大学 学術研究院海洋資源エネルギー学部門, urano@kaiyodai.ac.jp)

長岡 真太郎 (東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科, nagataro@icloud.com)

岡井 公彦 (東京海洋大学 学術研究院海洋環境科学部門, mokai01@kaiyodai.ac.jp)

### Aquatic Yeasts with the Neutralizing Ability of Acidic Environments

Naoto Urano (Department of Marine Resources and Energy, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Shintaro Nagaoka (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Masahiko Okai (Department of Ocean Science, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

#### 要約

筆者らは強酸性水圏由来の微生物群から、生息環境を中和する機能を持つ新奇酵母（アルカリ化酵母と称する）を発見した。本報ではアルカリ化酵母による酸性水中和機構、生態、環境に優しい中和水製造法を総論する。日本では、群馬県草津地方の吾妻川上流や秋田県仙北市の玉川上流等pH 1-4の強酸性淡水圏が点在しており、当該水圏では通常、多細胞生物（魚介類や植物など）の生息は観察されない。そこで、筆者らが単細胞生物の生息調査を行ったところ、原核生物（細菌）は検出されず、真核生物（酵母）が主たる微生物相を形成していた。単離した酵母は、全てpH 1-3の強酸性下で増殖可能な耐酸性菌であり、それらの中にアルカリ化酵母が存在した。アルカリ化酵母を酸性培地で培養すると、細胞がアミノ酸のアミノ基を切断してアンモニウムイオン $\text{NH}_4^+$ を放出することで、酸性液を中和していることがわかった。次に、一般の中性淡水圏にてアルカリ化酵母の探索を行ったところ、単離した耐酸性酵母の9.4%がアルカリ化酵母であった。酵母の28S rDNA  $D_1/D_2$ ドメイン塩基配列解析を行ったところ、中性水圏由来のアルカリ化酵母中に、筆者らが強酸性水圏から単離して登録済の塩基配列と同一の配列を持つ株が複数存在した。これらの結果から、アルカリ化酵母は強酸性水圏に偏在するのではなく、中性水圏にも広く生息すること、そして両水圏由来のアルカリ化酵母とも、酸性環境下にて水を中和する機能を発揮することがわかった。更に、アルギン酸ゲルビーズに包括したアルカリ化酵母をカラム内に充填して、酸性水（pH3.6）を流入したところ、酵母が中和水（pH7前後）を連続的に生産した。この中和水をゼオライト充填カラムに通したところ、pH 7近傍を維持した状態で水中の $\text{NH}_4^+$ 濃度を著しく減少させた。こうして、強酸性水から環境に優しい中性水を製造できるバイオリアクターを構築することができた。

#### キーワード

強酸性水圏, 中性水圏, 中和, アルカリ化酵母, バイオリアクター

#### 1. はじめに

酸性の水圏が造成される原因に酸性雨や火山活動が挙げられるが、日本は火山が多いため強酸性泉が各地に点在している。よく知られている例に秋田県の玉川温泉（pH 1.2）（若狭他, 2015; 渡辺, 1996）や群馬県の草津温泉（pH 2.1）（田瀬, 2011; 小坂, 1991）があり、玉川温泉が流入する玉川上流域は塩酸性河川、草津温泉と白根山の鉱山廃水が流入する吾妻川上流は硫酸性河川が形成されている。これらの強酸性水圏では多細胞生物（魚介類や植物など）の生息が見られず、周辺住民が河川水を農業用水や生活用水として使用することが難しい上、鉄やコンクリートまでもが短期間で劣化するなどの諸問題が生じるため、玉川は「玉川毒水」、吾妻川は「死の川」などと呼ばれていた。そして1940年、戦時下の国策により玉川水を田沢湖に流入させたため、湖全体が酸性化して漁獲高や農作高が激減し、とりわけ天然記念物のクニマスが絶滅するなど、酸性水による負の影響が拡大した。戦後、秋田県や群馬県では酸性水の改善策として、河川上流域に石灰の投入工場を建設して、河川水の中和事業を開始した。その結果、中和地点より下流ではpHが上昇して、一部の魚

介類の生息が認められるようになったが、クニマスなど石灰に対して敏感な生き物の田沢湖での回帰は、今日まで報告されていない。

さて、筆者らは2006年頃に、吾妻川の八ッ場ダム建設委員会の賛同を受けて、河川の中和地点前後の微生物調査を中心に環境モニタリングを試みた。その結果、中和地点上流の河川水を固体培地で培養すると、原核単細胞生物（細菌）コロニーは検出されず、真核単細胞生物（酵母）コロニーが多数検出された。このことから中和前の強酸性河川では酵母群が主たる微生物相を形成していることがわかった。一方、中和地点下流の河川水を固体培地で培養すると、生育コロニーのほとんどが細菌であり、中和後の主たる微生物相は一般河川と同様に細菌群であることがわかった（岡崎他, 2007）。また、中和点前後から単離した酵母は全て酸性培地（pH1-3）で増殖し、耐酸性能を持つことが確認された（田中他, 2009）。これらの耐酸性酵母中から新奇のアルカリ化酵母を発見した過程を以下に記述する。また、強酸性河川水は当然のこと、石灰による中和河川水も、飲料水や生活水、農業・養殖などの産業水としての使用は困難である。そこで、筆者らは強酸性水の有効利用を目指して、アルカリ化酵母による環境に優しい中和水の製造を試みた。これらの結果を併せて、以下に総論する。

## 2. アルカリ化酵母の発見

筆者らが吾妻川上流由来の耐酸性酵母を1株ずつ酸性培地 (pH4.0) で培養したところ、多くの株の培養液のpHは2-3に低下していたが、一部の培養液がpH 6-8まで上昇していた。これは新鮮な発見であり、筆者らは1つの仮説を立ててみた。微生物の耐酸性機構は、これまで主に2つ報告されている。1つは細胞膜中のプロトンポンプ(H<sup>+</sup>-ATPase)の働きによる。酸性環境下ではプロトンポンプが激しく働き、H<sup>+</sup>を細胞内から細胞外へ汲み出して細胞内を中性に保つことで微生物が耐酸性を保つ機構の存在である (Pedersen et al., 2007)。もう1つは細胞膜脂質中にテトラヒドロバクテリオホパネイン含量が増加することにより、細胞外のH<sup>+</sup>が細胞内に流入するのを防ぎ、細胞内を中性に保つ機構である (Tahara et al., 1988)。そして筆者らは新奇な耐酸性機構として、酸性環境下で自細胞周囲を中和する微生物の存在を仮定してみた。その実証実験として、酸性では無色・中性では青色を呈する色素—プロモクレゾールパープル (BCP) を使用した。BCPを混合した酸性固体培地で吾妻川由来の酵母を培養したところ、コロニー周囲の培地が青色を呈する酵母が全体の1割程度存在した。よって、耐酸性酵母が酸性固体培地で増殖する際に、細胞外に塩基性物質を分泌して、コロニー周囲を中和する酵母が存在することを発見した (浦野他, 2012a; 2012b)。筆者らはこの微生物を「アルカリ化酵母」と称して、その中和機構の解明と有効利用を模索してみた。

## 3. アルカリ化酵母による中和機構

筆者らは酸性水の中和機能が高いアルカリ化酵母株として、吾妻川支流から *Candida fluviatilis* CeA16、田沢湖畔から *Cryptococcus* sp. T1 を単離して、この2株による酸性水中和機構の解明を試みた。具体的には (1) 酵母は何を変化させてpHを上昇させるのか、(2) 酵母が生成する塩基性物質は何か、を解析した。その結果、(1) 酵母は培養液にカザミノ酸が存在すると酸性水のpHを上昇させていた。(2) 酵母は酸性液中に

アンモニウムイオンNH<sub>4</sub><sup>+</sup>を放出していた。よって (1)、(2) から、アルカリ化酵母はカザミノ酸を分解してNH<sub>4</sub><sup>+</sup>を放出することで、酸性水の中和を行っていると推測された。

次に、タンパク質加水分解物であるカザミノ酸の代替として、17種のアミノ酸の合成混合液 (pH3.0) を用いてアルカリ化酵母を培養した。図1にCeA16酵母を培養時のpH、混合アミノ酸濃度、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度の変化を示す。

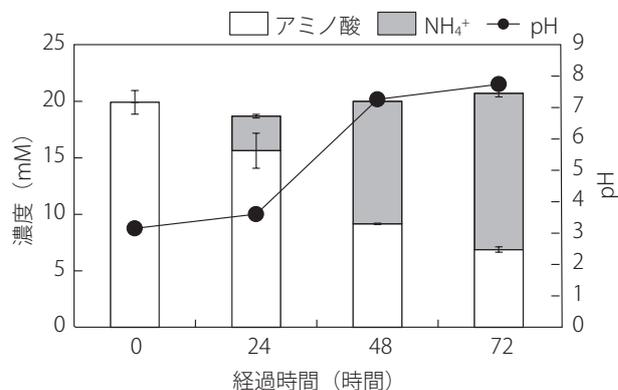


図1: CeA16培養時の混合アミノ酸酸性液の成分変化

CeA16を3日間培養すると、培養液のpHが7-8に上昇し、同時にアミノ酸濃度は減少してNH<sub>4</sub><sup>+</sup>濃度が増加した。また [アミノ酸+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]濃度はほぼ一定値を示した。この結果から、アミノ酸分解とNH<sub>4</sub><sup>+</sup>生成は、総じて1分子:1分子反応であると考えられた。よって、CeA16は酸性下でアミノ酸の主鎖アミノ基を切断して、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を生成することで、酸性水を中和する機構が示唆された。図2にアミノ酸混合液中の各アミノ酸濃度の経時変化を示す。CeA16はアミノ酸17種を均一速度で分解するのではなく、アミノ酸種により分解速度が異なっており、酵母によるアミノ酸分解には選択優位性があった (林他, 2013; Mitsuya et al., 2017)。本選択の規則性に関しては現

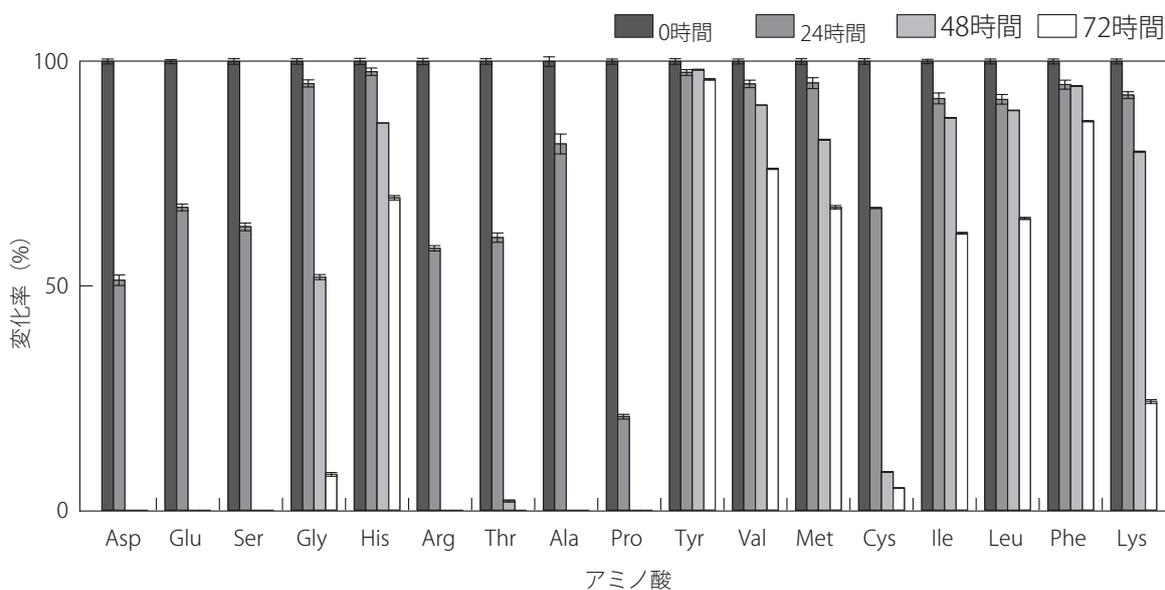


図2: 混合アミノ酸液中の各アミノ酸濃度の経時変化

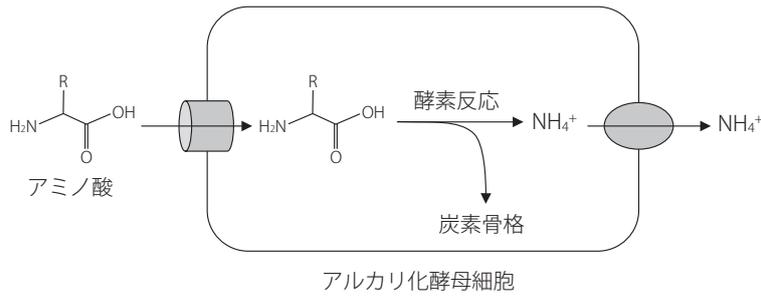


図3：アルカリ化酵母による酸性水中和機構

在解明中である。図3にアルカリ化酵母による酸性水中和機構の模式図を示す。アミノ基を切断してNH<sub>4</sub><sup>+</sup>を生成する酵素系は未だ特定されていないが、アンモニウムリアーゼ酵素の関与を推定しており、現在この酵素と遺伝子系の解明を行っている(長岡他, 2016; 2018) (データ詳細は掲載しない)。

#### 4. 中性水圏由来のアルカリ化酵母

アルカリ化酵母は強酸性水圏にて発見されたため、当初は酸性環境下に偏在していると推測していた。ところが、その後の調査により、筆者らが所属する大学構内の池(中性水)でもアルカリ化酵母の生息が確認された。そこで筆者らは、身近の中性水圏(pH6-8)である品川・横浜付近の用水路や池14ヶ所から採水して、アルカリ化酵母の広域単離を行った。中性水を酸性培地(pH3.0)で培養したところ、増殖した耐酸性酵母の全360コロニーのうち周囲が青色を呈する34コロニーが単離された。すなわち、中性水圏由来の耐酸性酵母中にも、アルカリ化酵母が9.4%も存在することがわかった。このことから、耐酸性酵母は強酸性水圏と比べて頻度が大きく低下するが、中性水圏でも生息することが確認できた。そして、両水圏由来の耐酸性酵母の1割程度がアルカリ化酵母であることが示唆された。

#### 5. アルカリ化酵母の菌種同定と中和活性

酵母34株に関して28S rDNA D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub>領域の塩基配列解析により菌種同定を行ったところ、表1に示すように13属21種に分類され、アルカリ化酵母種にかなりの多様性が存在した。そして、ko-w20は*Cryptococcus* sp.と同定され、田沢湖由来のT1と同一の塩基配列を持っていた。また、sm-w39は*Pseudozyma tsukubaensis*と同定され、吾妻川由来のCBS:6389と同一の塩基配列を持っていた。これらの結果から、強酸性水圏と中性水圏のいずれにも、同種のアルカリ化酵母が生息していることがわかった(Nagaoka et al., 2017)。

さらに、中性水圏由来のアルカリ化酵母をカザミノ酸溶液(pH4.0)で培養した際のpH変化を図4に示す。

中性水圏由来のアルカリ化酵母10株をpH4.0で培養すると、いずれも24時間後に培養液のpHは7以上になり、同条件で培養したT1とほぼ同等の中和活性を持っていた。よって、アルカリ化酵母による酸性液の中和活性は、単離した水圏の元pHとは無関係であることがわかった。以上の結果から、アルカリ化酵母は強酸性水圏と中性水圏のいずれにも生息しており、両水圏由来のアルカリ化酵母とも環境のpHが低下す

表1：中性水圏由来のアルカリ化酵母の菌種

株名	種名	相同性 (%)
fi-m10, r-w2, 3, 4	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100
h-m7	<i>Candida parapsilosis</i>	100
h-m8	<i>Candida</i> sp.	100
ko-w20	<i>Cryptococcus</i> sp.	100
ks-w31	<i>Bullera alba</i>	100
m-m25, n-w28	<i>Cryptococcus flavescens</i>	100
mi-w16	<i>Filobasidium magnum</i>	100
mi-w17	<i>Hannaella pagnoccae</i>	100
mr-w1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	100
n-w29	<i>Rhodotorula</i> sp.	100
n-w33	<i>Candida oleophila</i>	100
om-w41	<i>Auriculibuller</i> sp.	99
om-w42	<i>Cryptococcus</i> sp.	100
om-w44	<i>Papiliotrema flavescens</i>	100
om-w46	<i>Candida</i> sp.	100
si-w12	<i>Rhodotorula</i> sp.	100
si-w13	<i>Leucosporidium golubevii</i>	100
sm-w37	<i>Pseudozyma antarctica</i>	100
sm-w38	<i>Hannaella coprosmae</i>	100
sm-w39	<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	100
sm-w40	<i>Microbotryozyma collariae</i>	100
so-w34	<i>Candida cylindracea</i>	100

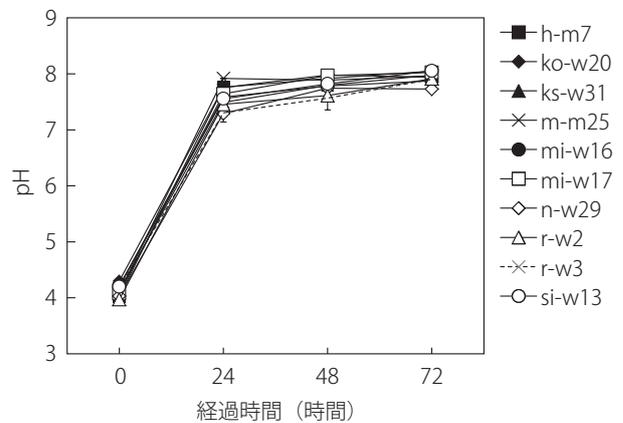


図4：中性水圏由来アルカリ化酵母をカザミノ酸溶液(pH4.0)で培養時のpH変化

ると、アミノ酸からNH<sub>4</sub><sup>+</sup>を生成することで、細胞周囲を中和する生存戦略を取る可能性が示唆された。

## 6. アルカリ化酵母の有効利用を目指して

吾妻川や玉川の強酸性水を石灰処理すると、カルシウムイオンCa<sup>2+</sup>濃度が高くなるため、中和河川水を飲料水、生活水、農業や養殖などの産業水等に利用することは困難である。また、吾妻川水は石灰投入により完全中和化に成功しているが、一方で玉川の場合には状況が少し複雑である。玉川温泉の廃水 (pH1.2) は石灰処理してもpHは3.6程度にしか上昇せず、処理水をそのまま玉川に流入しているため、玉川水はpH4-5の状態 で田沢湖に流れ込んでいる。現在、田沢湖全域のpHは5.5前後であるため、魚類では耐酸性の強いウグイが生息している。しかし、秋田県が唱える「クニマスの田沢湖里帰り計画」の実現には、田沢湖水の完全中和化とCa<sup>2+</sup>濃度の減少が必須と思われ、現状では有効な解決策が無い。しかしながら1つの対応策として、石灰中和前後の強酸性河川水を一部くみ取り、より環境に優しい方法で中和することで、有効利用可能な水を小規模でも製造することが期待される。

上記の背景を踏まえて、筆者らはアルカリ化酵母を用いる中和水製造法の開発を試みた(梶原他, 2016)。最初に、*Cryptococcus* sp. T1の菌体増殖と中和に培養液の初期pHが及ぼす影響を調べた結果を図5 (a)(b)に示す。

図5 (a)(b)により、T1が中和活性を示すための限界初期pHは2.6であり、2.5以下になると中和能を喪失することがわかった。従って、アルカリ化酵母による河川水中和には、酸性度がやや緩和されたpH2.6以上の水の適用が有効と判断された。

次に、アルカリ化酵母による中和にはどのような培養成分が有効であるかを再度検討してみた。図6 (a) (b)にT1の増殖と中和に及ぼす培養成分の影響を示す。

図6 (a)から、T1の増殖度は培養液成分をA (グルコース+スターチ+ピルビン酸+カザミノ酸)とB (グルコース+カザミノ酸)にした時に高く、C (スターチ+カザミノ酸)とD (ピルビン酸+カザミノ酸)にした時に低くなった。一方、図6 (b)から、T1の中和能は成分をCとDにした時に高く、AとBでは低くなり、培養液成分がT1に及ぼす影響は増殖度と中和能で相反する結果を得た。この現象に関しては、T1が培養成分中のカザミノ酸のアミノ基を体成分の合成に使用する際に高

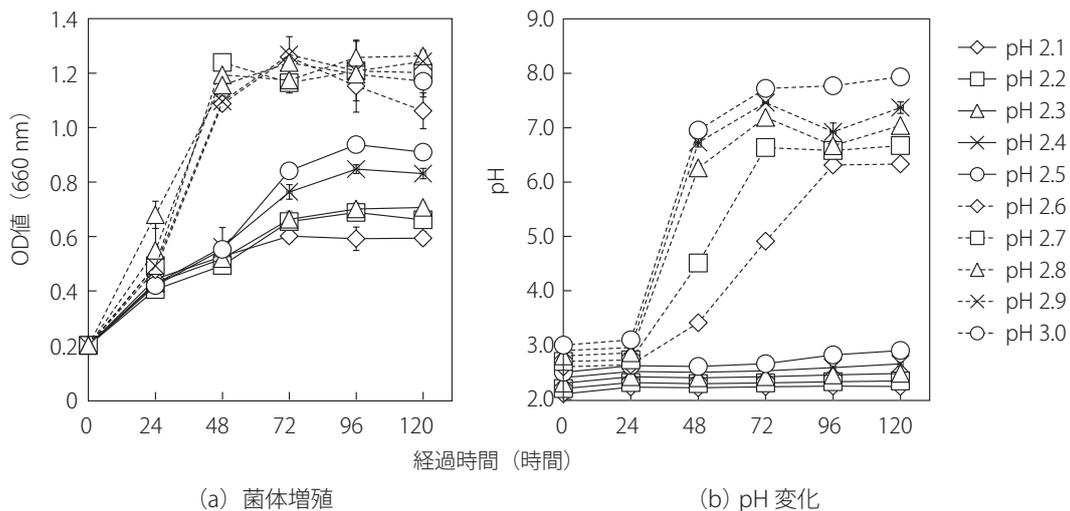


図5：初期pHが及ぼす*Cryptococcus* sp. T1への各種影響

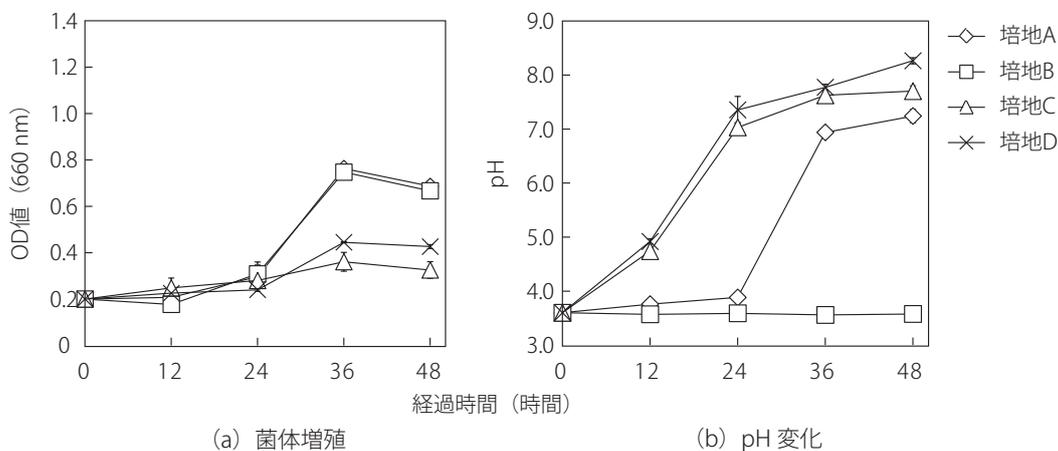


図6：培地成分が与える*Cryptococcus* sp. T1への各種影響

い増殖を示し、逆にアミノ基から $\text{NH}_4^+$ を生成して中和に利用する際には、増殖度が低くなることが示唆された。すなわちアルカリ化酵母は、細胞周囲が中性環境下にある時には窒素源を体内に取り入れて増殖するが、一方で酸性環境下にある時には増殖せずに、窒素源を分解して周囲環境の中和を促す生存戦略を持つことが推測された。

上記の基礎データを踏まえて、筆者らは図7に示す簡易型バイオリアクターを設計した。アルカリ化酵母を培養した後、菌体をアルギン酸ゲルビーズ中に包括固定化した。作成した固定化酵母をカラム内に充填して、カラムに酸性水 (pH3.6) を連続的に通水した。なお酸性水のpHは、玉川温泉の石灰処理直後のpH3.6に一致させた。

玉川温泉廃水の石灰処理水を、上記バイオリアクターを用いて中和した結果を図8 (a) (b)に示す。(A) 対照として、人工酸性水 (pH3.6) の中和を行った。なお人工酸性水の成分は固定化酵母が増殖せずに中和を促進する培地D:0.05Mピルビン

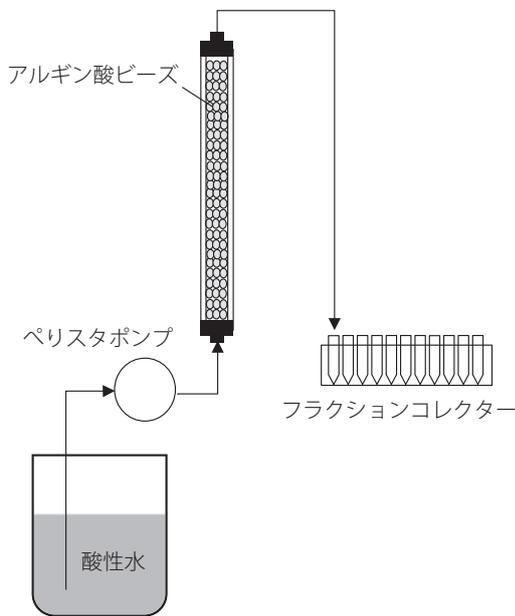


図7：強酸性水の中和バイオリアクター

酸+0.05%カザミノ酸を使用した。また(b)では玉川上流域の中和工場における石灰処理水を使用した。なお、処理水は日数の異なる複数種を利用した。

図8 (a)に示すように、人工酸性水をバイオリアクターに通過させると、カラム内がアルギン酸ビーズのみの場合にはpHが上昇せず、カラム内に固定化酵母が充填されている場合にはpH7以上の中和水を連続的に生産することができた。本バイオリアクターは十分な酸性水中和活性を保持していた。次に図8 (b)に示すように、玉川石灰処理水をバイオリアクターに通過させると、処理水の状態により中和の状態が多少異なるが、pH5-8程度の中和水を連続的に生産することができた。以上の結果から、アルカリ化酵母を利用したバイオリアクターにより、強酸性河川水の中和が可能であることがわかった。しかしながら、玉川中和処理水の場合には、その状態によりpH5からの上昇度が不安定であることがわかった (Okai et al., 2017)。

### 7. 今後の展望

上記により、バイオリアクターを用いて実験室レベルで強酸性河川水から中和水を連続的に製造することができた。しかしながら本手法には未だ改善すべき問題点を含んでいた。特に主な問題点(1)、(2)を示す。

- (1) バイオリアクターで製造した中和水は $\text{NH}_4^+$ 濃度が高く、そのままでは使用が困難であった。
- (2) 強酸性河川水は表2に示すように各種イオン濃度が高く、その中には図9に示すように微生物活性を阻害するイオンも存在するため、バイオリアクターの長期運転には不向きであった。

そこで筆者らは(1)の対応策として、ゼオライトを充填したカラムをバイオリアクターの下流に設置して、中和水を通したところ、ゼオライトが $\text{NH}_4^+$ を吸着して、 $\text{NH}_4^+$ 濃度を1/10程度の規制値以下に減少させた水を製造することができた。こうして(1)の問題点は克服することができた(学術論文投稿のため、詳細なデータは記載せず)。

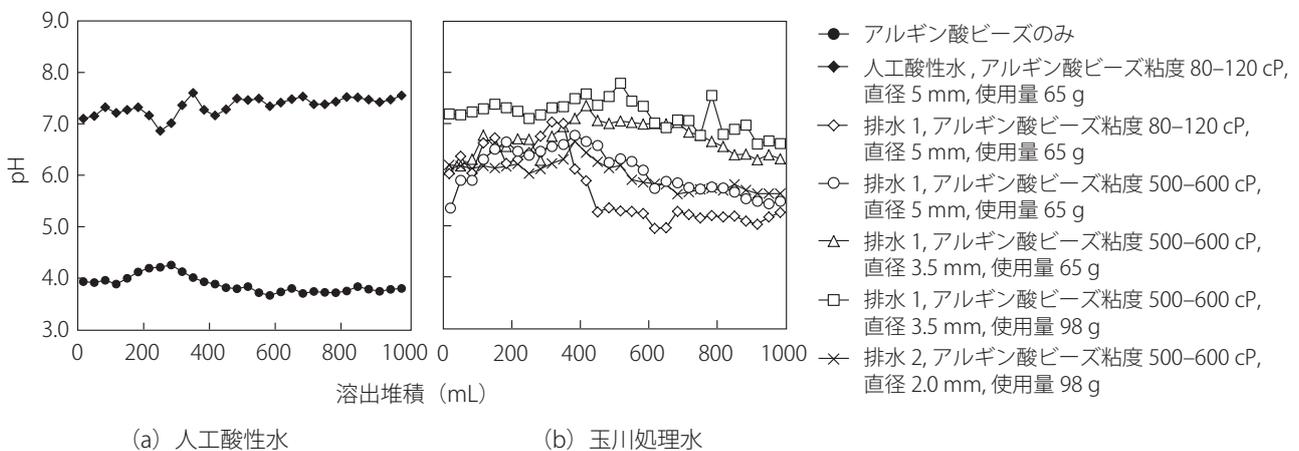


図8：バイオリアクターによる酸性水の中和

表2：玉川処理水と人工酸性水中の主な金属イオン濃度

	カルシウム (mg/L)	鉄 (mg/L)	アルミニウム (mg/L)
人工酸性水	78.7 ± 1.98	0.31 ± 0.03	0
排水1 (2013年8月9日)	811.3 ± 8.36	2.00 ± 0.01	44.6 ± 0.76
排水2 (2014年11月14日)	742.5 ± 13.75	3.65 ± 1.64	59.9 ± 0.73

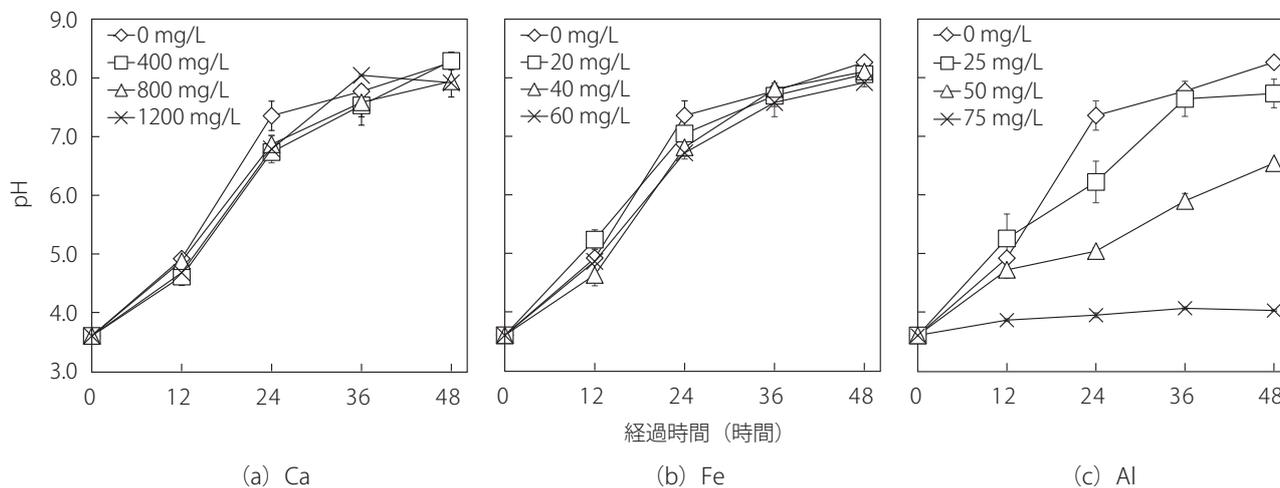


図9：Cryptococcus sp. T1の中和能に及ぼす無機成分の影響

注：(a) Ca、(b) Fe、(c) Alの濃度とpH上昇の関係性を示している。

次に(2)の対応策を模索してみた。表2に玉川処理水および人工酸性水中の主な金属イオン(Ca, Fe, Al)濃度を示す。図9(a) (b) (c) にこれらの金属イオンがアルカリ化酵母の活性に及ぼす影響を示す。

表2から、玉川処理水中のCaは700-800 ppm、Feは2-4 ppm、Alは40-50 ppmと高濃度含有していることがわかった。すなわち、玉川上流域に細菌がほとんど生息していない原因は、水が強酸性であることだけでなく、これらの金属イオンが影響している可能性も考えられる。そこで、当該バイオリアクターへの影響を解明するため、アルカリ化酵母の活性に及ぼす各金属イオンの影響を調べてみた。

図9によりT1の中和能はCaやFeの影響をほとんど受けないが、一方でAlの影響を強く受けることがわかった。特に玉川処理水のAl濃度である50 ppm付近を越えると酵母の活性が大きく減少したため、現状のバイオリアクターでは長期運転が困難であると判断された。そこで(2)の対応策として、バイオリアクターの上流にゼオライト充填カラムを設置して、Al高濃度含有水をゼオライトカラムに通水したところ、ゼオライトはAlを吸着して、Al濃度がほぼ0 ppmの水をバイオリアクターに流入することができた。こうして、pH7以上の水を連続生産できるバイオリアクターを構築することができた(梶原他, 2018) (学術論文投稿のため、詳細なデータは記載せず)。

以上、アルカリ化酵母を利用すると、石灰中和水と比べて、環境に優しい中和水を製造することができた。本方法では大容量の水を製造することはできないが、製造水を住民の生活

水、養殖や農業などの産業水の一部として、利用することは可能と思われる。本報にて、新規の中和水製造法を提案する。

#### 謝辞

本総論は東京海洋大学・海洋生化学研究室の学生：田中真美氏、王昱氏、林拓弥氏、諏訪千智氏、梶原優子氏らが修士論文にて行った研究を中心にまとめたものである。各氏には感謝申し上げる。

また本研究の遂行において、東京海洋大学学術研究院海洋環境科学部門・石田真巳教授に多大なる技術的支援をいただいたことを御礼申し上げます。

アルカリ化酵母の代謝解析では瀧川美緒・技術職員に分析いただいたことを御礼申し上げます。

本研究は、平成28-30年度科学研究費基盤研究(C)、課題番号16K07868により、研究費の一部を支出していることを報告する。

#### 引用文献

- 林拓弥・諏訪千智・石田真巳・浦野直人(2013). アルカリ化酵母を持つ酵母の単離とその機構解明. 平成25年度日本水産学会秋季大会, 8.
- 梶原優子・長岡真太郎・岡井公彦・石田真巳・浦野直人(2016). アルカリ化酵母・酵素バイオリアクターによる酸性水中和システムの構築. 平成28年度日本水産学会秋季大会, 68.
- 梶原優子・長岡真太郎・岡井公彦・石田真巳・浦野直人(2018). アルカリ化酵母による強酸性水中和システムに及ぼすアル

- ミニウムイオンの影響. 平成30年度日本水産学会春期大会, 147.
- 小坂丈予 (1991). 草津白根火山を源泉とする酸性河川湯川水系の石灰中和による水質改善. *Gypsum & Lime*, No. 234, 357-366.
- Mitsuya, D., Hayashi, T., Wang, Y., Tanaka, M., Okai, M., Ishida, M., and Urano, N. (2017). Isolation of aquatic yeasts with the ability to neutralize acidic media, from an extremely acidic river near Japan's Kusatu-Shirane Volcano. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 124, No. 1, 43-46.
- Nagaoka, S., Kobayashi, T., Kajiwara, Y., Okai, M., Ishida, M., and Urano, N. (2017). Characterization of yeasts capable of neutralizing acidic media from natural neutral environments. *Advances in Microbiology*, Vol. 7, 887-897.
- 長岡真太郎・梶原優子・岡井公彦・石田真巳・浦野直人 (2016). アルカリ化酵母・酵素による酸性水中和機構の解析. 平成28年度日本水産学会秋季大会, 68.
- 長岡真太郎・梶原優子・岡井公彦・石田真巳・浦野直人 (2018). アルカリ化酵母による酸性水中和の分子機構解析, 平成30年度日本水産学会春期大会, 148.
- Okai, M., Suwa, C., Nagaoka, S., Ishida, M., and Urano, N. (2017). Neutralization of acidic drainage by *Cryptococcus* sp. T1 immobilized in alginate beads. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 81, No. 11, 2216-2224.
- 岡崎恭子・石田真巳・渡辺英樹・小川剛・浦野直人・森下勇 (2007). 吾妻川由来の耐酸性酵母の単離と解析. 平成19年度日本水産学会春期大会講演要旨集, 231.
- Pedersen, B. P., Buch-Pedersen, M. J., Morth, J. P., Palmgren, M. G., and Nissen, P. (2007). Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature*, Vol. 450, No. 7172, 1111-1114.
- Tahara, Y., Yuhara, H., and Yamada, Y. (1988). Distribution of tetrahydroxy-bacteriohopane in the membrane fractions of *Zymomonas mobilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, Vol. 52, 607-609.
- 田瀬則雄・杉原修子 (2011). 「水文科学が解き明かす不思議な天然水」2. 赤い川—長野県の石堂沢とブドウ沢—. 日本水文科学会誌, Vol. 41, No. 2, 39-46.
- 田中真美・岡崎恭子・小川剛・石田真巳・浦野直人 (2009). 強酸性河川吾妻川由来の耐酸性酵母が持つ特殊形質の解析. 平成21年度日本水産学会春期大会講演要旨集, 188.
- 浦野直人・山下郁加・王ユウ・田中真美・石田真巳 (2012a). 吾妻川流域・湯釜の微生物相の解明. 平成24年度日本水産学会春期大会講演要旨集, 163.
- 浦野直人・王ユウ・山下郁加・田中真美・石田真巳 (2012b). 特殊生理活性を持つ酵母の単離と解析. 平成24年度日本水産学会春期大会講演要旨集, 163.
- 若狭幸・石山大三・松葉谷治・佐藤比奈子・申基徹・中野孝教 (2015). 秋田県渋黒川—玉川水系における流入する酸性温泉水と河川水の混合過程についてのストロンチウムおよび硫黄同位体比ならびに溶存化学成分を用いた解明—. 地球化学, Vol. 49, 153-161.
- 渡辺仁治・浅井一視 (1996). 強酸性水の中和対策と珪藻群集. 用水と廃水, Vol. 38, No. 8, 637-646.
- (受稿：2018年5月23日 受理：2018年6月2日)