

令和元年5月27日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00593

研究課題名(和文) 電気培養高活性鉄酸化細菌の諸性質解明と重金属資源回収システムの開発

研究課題名(英文) Oxidizing Bacteria and Development of Heavy Metal Resource Recovery System

研究代表者

竹内 文章 (Takeuchi, Fumiaki)

岡山大学・環境管理センター・教授

研究者番号：90294446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は、バクテリアリーチングや環境浄化などで非常に有用な細菌として注目されている。しかし、これらの菌株は、増殖が非常に遅いという問題点がある。

本研究では、重金属の回収及び環境浄化を効率よく行うために、自然界から高活性の鉄酸化細菌を単離している。これらの細菌の有用酵素などの生化学的な諸性質について解明を進めてきた。また、高濃度培養が可能な新たな電気培養装置を開発した。本装置で得られた高活性菌体を担体に固定化することで菌体の継続利用及び重金属の回収及び環境浄化において高効率が可能となるシステムの開発を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SDGs(持続可能な開発目標)において、資源利用効率の向上と環境浄化技術、産業プロセスの導入拡大を通じたインフラ改良や産業改善が掲げられており、特に資源の枯渇や環境汚染の対策が急務の課題である。これらの対策に向けて、高いエネルギーを使わない資源回収及び環境修復を行う技術として、微生物の生化学的機能を十分に活用する方法について検討を行っている。鉄酸化細菌は、バクテリアリーチングや酸性鉱山排水処理などに利用できる菌として注目されている。我々は、保有する多くの単離株の中から資源回収及び環境浄化を行うための高度な活性を示す菌株の諸性質を解明及び実際への応用技術について検討してきた。

研究成果の概要(英文)：Iron-oxidizing bacteria, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, have attracted attention as extremely useful in bacteria leaching and environmental cleanup. However, slow growth remains an issue.

In this study, we used highly active iron-oxidizing bacteria isolated from nature to perform heavy metal recovery and environmental cleanup. We clarified the biological characteristics of useful enzymes generated by these bacteria. We developed a new electrochemical system capable of high-concentration cultivation. We also developed a highly efficient system for the continual use of bacteria, heavy metal recovery, and environmental cleanup by immobilizing the highly active bacteria obtained by this system on carrier.

研究分野：環境応用微生物学

キーワード：鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* 高活性株 環境浄化 資源回収 生化学的解析 電気培養 微生物固定化

1. 研究開始当初の背景

SDGs（持続可能な開発目標）の「産業と技術革新の基盤をつくろう」というにおいて、資源利用効率の向上とクリーン技術及び環境に配慮した技術・産業プロセスの導入拡大を通じたインフラ改良や産業改善が掲げられている。特に、資源の枯渇や環境汚染の対策が急務の課題であり、その対策に向けて、高いエネルギーを使わない資源回収及び環境修復を行う技術として、微生物の生化学的機能を十分に活用する方法について検討を行っている。金属資源の寿命として、埋蔵量 R を年間生産量 P で除した値で R/P で表されるが、銅 34、ニッケル 44、金 24 と非常に低い値ということが、従来から課題となっており、今後は、鉱山における金属回収においては、現地に生育する菌株に頼るのでなく、高活性の微生物を活用したバクテリアリーチング技術の開発が望まれている。そのために、銅を始めとする金属の回収において、低品位のため採掘を行っていない鉱山、新たな課題として都市鉱山における金属リーチング、重金属の浄化等において高活性を示す有能菌株のスクリーニング、育種（調整）を行っている。種々の高活性株については、一連の研究で開発を進めてきた電気培養システムで高濃度培養技術を確立し、その培養液の活用方法の検討を行っている。

さらに、環境浄化に関しては、重要な緊急事項として、水銀対策が挙げられる。水銀汚染対策は、「水銀による環境の汚染の防止に関する法律」の目的にも掲げるように水銀は環境中を循環し残留しており、生物の体内に蓄積する特性を有し、人の健康及び生活環境に係る被害を生ずる恐れがある物質であることに鑑み、国際的に協力して水銀による環境の汚染を防止するため、水銀の環境への排出を抑制し、もって人の健康の保護及び生活環境の保全に資することを目的とする対策が進められている。ただし、現在は、規制された用途の使用禁止、水銀廃棄物の適正管理、利用状況の調査等に限られており、汚染された環境中の水銀浄化に関しては、今後の大きな課題となっている。水銀含有物質からの水銀の回収について、既存の技術としては、高い熱エネルギーを使用した浄化方法が主であるが、今後は地球規模で汚染された様々な形態の水銀を高いエネルギーを使用いなく、微生物の機能を活用した回収技術について確立が望まれている。

鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は、二価鉄及び還元型無機硫黄化合物をエネルギー源とし、二酸化炭素を炭素源として増殖する化学合成独立栄養細菌で、酸性鉱山排水処理、銅等のバクテリアリーチングなどに利用されている。我々は、環境浄化及び資源回収を行うための高度な活性を示す菌株を保有しており諸性質を解明及び活用方法について検討しており、上記の課題に取り組んでいる。特に銅鉱石から銅を溶出させる活性が高い菌株、水銀含有物から水銀を金属水銀として気化する活性の高い菌株を保有している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、数多くの鉄酸化細菌の中から、それぞれの金属に対して特異的な性質を有する株についてスクリーニングを行っており、それらの株及び調整した高活性株について、金属のリーチングあるいは金属の回収に係わる諸性質の解明を行うことである。さらに、それらの高活性株を用いた資源回収、環境浄化の応用技術を確立することである。本菌は、金属が溶出しやすい酸性条件下で、有機物等の栄養源は必要としなく、空気中の二酸化炭素の炭素源をエネルギー源として生育する。しかし、増殖が遅いという課題があるために、独自の電気培養装置の開発を行ってきた。今回さらに装置改良を行い効果的な運転条件を調べると共に培養を繰り返し、菌体の諸性質の解明を行う。更に高度活性を持つ菌体を一度の使用で廃棄あるいは流失することなく持続的に活用するために、電気培養装置で得られた高濃度の菌液を担体に固定化し、実際の現地において効率的な資源回収、環境浄化が可能となる総合システムの開発を行うものである。

さらに、実用化を考慮した各菌株のそれぞれの活性強化のための育種とその評価を行う。また、本株の生育環境に関して、低温条件下における活性化について育種及び評価を行う。

3. 研究の方法

本研究の課題としては、これまでの長年開発を進めてきた電気培養法の改良、電気培養法で得られた高濃度菌液を用いて菌体そのものの諸性質の解明（主に酵素的な解析）、高濃度菌液を固定化することで重金属資源回収等システムの検討である。

鉄酸化細菌の電気培養法は、生育によって酸化した培地中の三価鉄を微弱な電位で二価鉄への還元を繰り返しながら培養する方法である。装置運転等が難しいために実用化例の紹介、及び特殊の機能を持つ菌株について高濃度培養が実用化されている報告例は寡聞にしてない。また、バッチ方式の装置による報告はあるが、通気及び攪拌機能、pH 制御機能、高濃度培養液回収、培地補給、さらに、固定化担体への菌体固定化機能を備えたものはない。これまでの開発により完成した高濃度電機培養装置と担体固定化システムは、これらの機能を取揃え、実際の応用を考慮したものとして設計及び作成した。

次に微生物固定化法として、生物膜固定化法（生物膜法）と微生物包括固定化法（包括法）について検討した。生物膜法による方法が実用的であり、好ましい固定化材について紹介してきたが、特に固定化することによる保存の長期化について検討した。また包括法については、

通常の培養液，電気培養液，菌体の洗浄細胞液を使用する方法について比較した。

本菌の好ましい生育環境について，pH については，重金属が溶出しやすい 2.5 程度と低いこと，温度も 30 と高いことに注目して，上記の固定化することによる影響，低温における誘導株の育種を行っている。

また，電気培養装置で得られた高濃度培養液の活用として，研究協力者との共同研究による精製酵素による諸性質の検討，実際の複合汚染（水銀及び有機塩素化合物）された土壌浄化に関する検討を進めている。

4．研究成果

本研究で用いられた鉄酸化細菌は，増殖が遅いために，独自の電気培養装置による高濃度培養技術について開発を行い，バクテリアリーチング及び資源回収において重要な 5 種類の菌株について電気培養を実施した。一般的な振とう培養法あるいは通気による培養方法に対して，開発した電気培養装置を用いることで，菌体収量は，何れの菌株においても 300～500 培の高濃度培養液を得ることが可能となった。

また，菌体の微生物固定化法について，生物膜固定化法（生物膜法）と微生物包括固定化法（包括法）について種々の担体を用いて実験を行った。利用目的すなわち固定層，流動層，土壌散布あるいは鉱山への散布等の利用に応じて固定化微生物の活性評価，活性の持続性，コスト面等について評価を行った。本研究では，通常の培養方法による培養液を利用するよりも本研究で得られた電気培養装置による高濃度培養液を使用する担体固定化システムの利用により実用的な面でも著しく効率がよくなった。さらに，高濃度培養液と菌体の洗浄細胞を（同一菌体量で比較）利用する場合とを比較すると，同等あるいは前者の方がより高い活性が得られることが確認できた。

銅等の有価金属についてのバクテリアリーチングにも利用されているが，高活性株を利用した高効率化については，実例も少なく，今後重要な課題である。得られている銅のリーチング活性の高い株 *A. ferrooxidans* D3-2 株のように，溶出活性が高いことだけでなく，亜硫酸耐性等も有するためさらに高効率化が期待できる。

一方，これまでの研究で得られた，高度水銀耐性菌 *A. ferrooxidans* MON-1 株は，無機水銀及び有機水銀を分解して金属水銀として気化するために，活性炭などによるトラップする水銀吸着装置と組み合わせることによって，低コストで水銀汚染水あるいは土壌等の修復が可能であることを確認した。これらの水銀分解気化活性には，Cyt. c oxidase がどのように関与していることを確かめた。

今後，電気培養法による菌体収集が容易になったために，更に生化学的な機能解析及び実際への応用技術の検討を進めていきたい。

高度水銀耐性株である *A. ferrooxidans* MON-1 株及びさらに調製した誘導株 *A. ferrooxidans* FT 株は，水銀を含有する廃液，地下水，土壌中の水銀を金属水銀として気化する活性が著しく強いので，既存の気化水銀をトラップする水銀吸着装置との組み合わせで気化回収が可能であるために，従来の高温による高いエネルギーを要する回収技術と異なり，新規の応用技術としての実用化の検討を進める。本株は，NADPH 依存性の水銀還元酵素活性を持つとともに二価鉄依存性の新規の水銀還元システムとして，鉄酸化酵素系の重要成分である Cyt. c oxidase が水銀の気化に重要な役割を持っていることが示唆されており，それらの株及びさらに誘導株について完全に精製した酵素を用いて明確になった。

本菌は酸性条件下で生育しやすい菌であるが，これまでの基礎実験では，中性及びアルカリ性の水銀汚染土壌においても，電気培養液の使用で気化活性を得られている。これは，菌体を取り巻く様々な微環境（pH，温度，無機栄養塩等）の影響が考えられるために，固定化微生物法による効率化と再利用，阻害の抑制効果等の検討を行う。また，固定化物の活性の持続性，流動層あるいは固定層としての装置化，鉱山，土壌への散布等について好ましい条件を調べる。

寒冷地における活性低減に対する対策，活性阻害物質の影響，土壌浄化に関しては，複合汚染，土壌洗浄あるいは地下水の浄化技術等の課題について取り組む。

連続的な電気培養装置を含めた総合的なシステムとして開発を進める。また，本株を実際技術として活用するうえでの「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」に基づく浄化事業計画を策定する。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 鉄酸化細菌を用いた重金属浄化及び資源回収システムの開発，竹内文章，水環境学会 第 17 回 水環境フォーラム，2018 年 12 月 8 日

(2) 微生物を利用した水銀等汚染地下水の浄化技術 (S1-12),
根岸敦規・杉尾 剛・竹内文章, 地下水・土壌汚染とその防止に関する研究集会,
2017年11月9日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 杉尾 剛
ローマ字氏名: SUGIO TSUYOSHI

研究協力者氏名: 根岸敦規
ローマ字氏名: NEGSHI ATUNORI

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。