

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K11696

研究課題名（和文）高活性鉄酸化細菌を用いた環境負荷低減型資源回収・環境浄化システムの開発

研究課題名（英文）Development of Resource Recovery and Environmental Clean-up System By Highly Active Iron-Oxidizing Bacteria

研究代表者

竹内 文章 (TAKEUCHI, Fumiaki)

岡山大学・教育学研究科・非常勤研究員

研究者番号：90294446

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：自然界から単離した金属資源回収及び環境浄化に利用可能な高活性鉄酸化細菌の有用酵素などの性質について解明した。高濃度培養が可能な独自の電気培養装置を開発し、得られた菌体の固定化による活性の継続性と高効率化が可能となり、水銀気化高活性菌株の解析と新規の酵素反応系による水銀気化回収技術を構築した。また、種々の高活性株の育種や機能物質の諸性質及び利用方法を検討した。鉄酸化細菌によって生成するシュベルトマナイトとその複合物について、様々な有害物質の吸着剤、脱臭剤、種々の機能物質の利用法及び電気培養法等によるこれらの物質の高効率な製造法を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

持続可能な開発目標において、資源利用効率の向上、環境浄化技術等が掲げられており、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 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 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高濃度電気培養装置を開発し実際への応用技術を示した。

研究成果の概要（英文）： We clarified the characteristics of useful enzymes contained in highly active iron-oxidizing bacterium, *A. ferrooxidans* usable for the recovery of metal resources isolated from nature and for the purification of the environment. In addition, we developed an electric culture apparatus capable of high cell-density cultivation, which made it possible to ensure continuity and high efficiency of activation through the immobilization of bacterial cells obtained by using this apparatus. Specifically, we established mercury vapor removal technology using the analysis of bacterial cells with high mercury volatilization activity and new enzyme reaction systems.

Furthermore, we examined a highly efficient production method for Schwertmannite and its composites produced by *A. ferrooxidans* using absorbents for wide ranging hazardous substances, deodorants, and functional substances, and electric culture methods.

研究分野：応用環境微生物学

キーワード：鉄酸化細菌 高活性株 資源回収 環境浄化 生化学的解析 電気培養 シュベルトマナイト 固定化利用

1. 研究開始当初の背景

持続可能な開発目標において、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の実用化が望まれている。金属資源の寿命は、非常に低いことが、従来から課題となっており、今後は、国内外における鉱山における金属回収においても現地に生育する菌株に頼るのではなく、高活性の微生物を活用したバクテリアリーチング技術による低コストで高効率化が重要である。

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ている。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、特定施設で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について、高エネルギーを使用しないで、微生物による気化活性を活用し、外部に漏洩しない安全回収設備とを併用したシステムが期待されている。

そのために、我々は銅を始めとするニッケル、モリブデン、亜鉛、コバルト、クロム、マンガンの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、あるいは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）を行ってきた。また、水銀耐性で水銀気化活性の強い菌株について検討を行ってきた。これらの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た。

本研究で取り組んでいる高活性鉄酸化細菌は、金属資源のバクテリアリーチングや排水、地下水、土壌の浄化及びの高効率化を可能とするのみでなく、微生物反応で生じる副産物等の有効利用等を含めた総合システムの確立を目指すものである。

2. 研究の目的

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の諸性質を解明及び活用方法について検討しており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た。

本研究の目的は、更に数多くの鉄酸化細菌の中から、各種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ない、それらの株及び更に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と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重ね、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。

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に、低温条件下等の様々な生育環境に関しての活性化等の検討を行う。また、本プロジェクトを推進するために産業界等との協力体制が必要であり、企業との実用化に向けた「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」等に基づく、試験研究、処理過程及び処理後の環境評価等を行う。これまで得られたシステムの改善を図るとともに、本研究の課題以外の対象物質についても資源回収あるいは環境浄化について検討を進める。特に鉄酸化細菌により生産される機能物質であるシュベルトマナイト（Schwertmannite）に注目し、その諸性質と活用方法、その効率的生産方法についての検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 高活性株の調整

我々の研究グループでは、多くの鉄酸化細菌の単離株から特徴ある菌株について検討してきた。特に様々な金属等について耐性で溶出活性の高い株、浄化に活用できる菌株についてスクリーニングするとともに培養条件をコントロールすることで誘導株を育種する。さらに高耐性化・高活性化および活性保持することによって環境負荷低減型資源回収・環境浄化への実用化を進める。本菌の一般的に好ましい生育環境は、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、至適生育温度は 30 と高いことに注目して、さらに中性に近い pH 条件で生育する菌株、冬季においても活性を示すように 4 で非常に長期間における継続培養を行った。

(2) 高濃度電気培養法

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。本研究では、これまでの長年開発を進めてきた電気培養法について、反応槽形状の改良、通気、攪拌、pH 制御機能を有し、膜選択と設置構造及び電極形状等改良、高濃度培養液回収及び培地補給機能、さらに、固定化担体への菌体固定化機能を備えた設備として設計・製作した。培養装置の反応槽容量が 3L 前後のものを用いて、主要菌株について並行して、継続的に高濃度培養を行った。

(3) 高活性株の諸性質

主要菌株及び鉄酸化細菌の標準株について、高濃度電気培養法で得られた洗浄細胞による諸性質の解明、生物膜画分、精製酵素 Cytochrome *c* oxidase 等を用いて、鉄酸化酵素系等に係わる鉄酸化活性、リーチング活性、金属水銀 (Hg^0) 気化活性等の諸性質について比較検討した。

(4) 微生物の固定化

微生物固定化法として、微生物包括固定化法(包括法)と生物膜固定化法(生物膜法)について検討した。高濃度電機培養装置で培養した菌液あるいは洗浄細胞を用いた。包括法では、液状の高分子材料としてポリビニルアルコール、ポリウレタン等の溶液に菌液等を混入して架橋剤を使用して固定化する。生物膜法では、多孔質のポリビニルアルコールの粒体、セラミックス等の粒体の資材に菌液等と所用時間接触させる。包括法については、通常に通気培養で得られた菌液、電気培養で得られた菌液、また、それぞれの培養法の洗浄細胞液を使用する方法について比較した。さらに、固定化することによる阻害物質となる重金属、有機塩素化合物等の含有濃度の影響、低温における活性等を調べた。

(5) 実用化システム

高濃度菌液を固定化することで重金属資源回収及び環境浄化等のシステムを確立する。特に高度水銀耐性株である *A. ferrooxidans* MON-1 株及びさらに誘導株 *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活性が著しく高いこと等のこれまで得られている基本的データを解析し、今後はこれらの菌株による気化水銀を安全に吸着トラップする装置及び電気培養装置と微生物固定化装置を組み合わせた総合システムについて検討を行う。

本研究の総合的なシステム化に関連して、抗廃水処理施設等において、鉄酸化細菌を用いた処理によって生成される機能物質である水酸化鉄硫酸塩のシュベルトマナイトに注目して、砒素、リン酸、アンモニア等の吸着機能を確認するとともに、その資材を機能材料としての固定化及びハンドリング技術さらに上記の培養装置による高効率生産法について検討する。また、粒状化等による多機能を有する様々な資材として具体的な利用方法について試験を行なう。

4. 研究成果

(1) 高活性株の調整

我々の研究グループでは、これまでの一連の研究で種々の性質を有する鉄酸化細菌の菌株を単離してきた。主に特徴ある菌株の一つとして高度水銀耐性菌 *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活性を有する。MON-1 株をさらに調製した誘導株 *A. ferrooxidans* FT 株を得た。さらに、MON-1 株、FT 株等の主要株について、低温 4 において充分生育するように 10 年以上の年月をかけて育種した。また、培地の pH 及び組成等を実際の様々な環境条件に対応可能なように調整して育種してきた。これらの得られた耐性株は、実用化のために企業における研究所においても継続培養を続けている。

(2) 高濃度電気培養法

本研究で用いられた鉄酸化細菌は、増殖が遅いために、独自の電気培養法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等において主要な 5 種類の菌株、具体的には高度な銅リーチング活性、すなわち銅鉱石等に対して銅の溶出が著しく高い *A. ferrooxidans* D3-2 株は、銅鉱山におけるバクテリアリーチングの高効率化に活用できる。また、先に説明した *A. ferrooxidans* MON-1 株及び *A. ferrooxidans* FT 株と水銀感受性株 *A. ferrooxidans* AP19-3 株さらに、鉄酸化細菌の標準株の *A. ferrooxidans* ATCC 23270 株について 130 回を超える電気培養を継続的に実施した。一般的な振とう培養法あるいは、通気による培養方法に比べて、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。通常培養菌液から洗浄細胞を集菌し酵素生成するためには、容量が 3L 程度のバッチ式培養を 10 回以上繰返す必要があるが、本培養装置の利用で各種酵素生成を行う作業や実用化のための微生物固定化が非常に短期間で効率よく行うことができるようになった。

さらに、本培養装置を用いて、様々な物質に対する耐性株・有能株の育種、pH、温度、培地組成等の条件を変えて培養することで特異的な微生物の調製及び後述する鉄酸化細菌により生産される機能物質の高効率製造を可能にした。

(3) 高活性株の諸性質

通常培養法及び高濃度電気培養法で得られた菌液による洗浄細胞、精製酵素 Cytochrome *c* oxidase 等を用いて、鉄酸化酵素系等に係わる鉄酸化活性、リーチング活性、金属水銀 (Hg^0) 気化活性等の諸性質について比較した。高度活性株は、環境浄化及び資源回収に係わる活性が高

いこと等の生化学的諸性質が更に明確に分かってきた。特に本研究で主に扱った水銀耐性高活性株は、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、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更に明確になった。水銀耐性高活性株については、水銀化合物、実際の水銀含有廃液、水銀汚染土壌を用いた気化を検出した実験に加え、阻害物質となる重金属類、有機塩素化合物の影響等の諸性質に関する一連の実験資料を整理した。

(4) 微生物の固定化

菌体の微生物固定化法について、包括法と生物膜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方法よりも本研究で得られた高濃度電気培養装置による菌液による担体固定化システムの利用によって実用的な面でも著しく効率がよくなった。さらに、両者の培養方法による菌液を生物膜法による利用する場合について比較すると、後者の方がより高い活性が持続することが確認できた。

本菌は酸性条件下で生育しやすい菌であるが、中性及びアルカリ性あるいは低温条件、阻害物質を含む水銀廃液あるいは汚染土壌において、微生物の固定化によって、菌体を取り巻く pH、温度、阻害物等の様々な微環境が存在することによって、それらの阻害の抑制効果が確認できた。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示した。

(5) 実用化システム

本研究の成果は、銅等の資源枯渇のための低品位鉱山あるいは都市鉱山からの資源回収技術、水俣条約等にも関連し水銀汚染された土壌・地下水等の浄化技術として期待されている。これらの菌株は、重金属が溶出しやすい酸性条件下で生育するためにバイオリッチング、バイオフラタリゼーション技術として利用できる。鉄酸化細菌は、増殖が遅いために、長年開発を進めてきた独自の電気培養法を用いて高濃度培養が可能となり、有能酵素の生化学的メカニズムの解明が進んできた。さらに、高活性株の高濃度連続培養や特殊担体を用いた固定化微生物の活用によって、高効率化及び装置のコンパクト化も可能となる。特に鉄酸化細菌を活用した水銀の回収技術に関する実用化例は、国内外では寡聞にしてなく、一連の高活性株を活用した研究について、従来の高いエネルギーを使用する大型の高温加熱処理を必要としない省エネルギー的・経済的な重金属回収技術としての実用化を推進できる。特に、本株を実際技術として活用するうえでの土壌への残留性の試験等を実施して「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し、普及を進めている。高活性株や低温時に使用できる誘導株についての育種手法を確立しており、また、中性及びアルカリ性の領域における効率化、土壌等で処理後の管理方法の検討を進めた。

水銀耐性株は、土壌あるいは廃水中の水銀を生物濃縮するのではなく、金属水銀として気化する著しく強い活性を示し、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活性が著しく高いこと等のこれまで得られている基本的データを解析し、今後はこれらの菌株による気化水銀を安全に吸着トラップする装置及び高濃度電気培養装置と微生物固定化装置を組み合わせた総合システムについて設計を行った。また、高濃度電気培養システムによる種々の金属に対する高活性株の育種に利用可能である。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組んだ。

さらに、鉄酸化細菌を用いた環境負荷低減型資源回収及び環境浄化の総合システムを構築するうえで、処理後に発生する副産物の利用、処理後の土壌管理における菌体の残留性や pH 管理等を含む検討を進めた。成果の一例として、鉄酸化細菌を利用した処理において副産物として生成されるシュベルトマナイトは、陰イオン吸着、金属イオン吸着、脱臭等の機能が優れていることを、具体的には砒素、リン酸、フッ素等を吸着除去、アンモニアの吸着機能試験を実施することで確認した。この資材を粒状、板状等に固定化することで応用技術として展開しており、更に性能の優れたシュベルトマナイトを生産するために適した菌株のスクリーニングと高濃度電気培養装置を用いた高効率生産技術についての提案をした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 NEGISHI Atsunori, SUGIO Tsuyoshi, TAKEUCHI Fumiaki
2. 発表標題 A Pilot Scale Remediation Method for A Mercury Polluted Soil with A Mercury Resistant Acidithiobacillus ferrooxidans Strain MON-1
3. 学会等名 14th International Conference on Mearcury as a Global Pollutant , Krakow, POLAND (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内 文章
2. 発表標題 高活性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
3. 学会等名 水環境学会 第 17 回 水環境フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 中和シュベルトマナイトの固化体およびその製造方法、並びに中和シュベルトマナイトの固化体を用いた浄化方法	発明者 亀島欣一、石川彰彦、福田健作	権利者 DOWAホールディングス(株)
産業財産権の種類、番号 特許、2020-132515	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 繊維状吸着剤およびその製造方法、並びに、当該繊維状吸着剤を用いた重金属の固定化方法	発明者 赤堀文雄、石川彰彦、野中寿、関谷真司	権利者 DOWAホールディングス(株)、株)クラレ
産業財産権の種類、番号 特許、2021-065842	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 重金属の固定化方法および植物への重金属移行抑制方法	発明者 赤堀文雄、石川彰彦、原田太郎	権利者 DOWAホールディングス(株)
産業財産権の種類、番号 特許、第6716407号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	石川 彰彦 (ISHIKAWA Teruhiko) (10263617)	岡山大学・教育学域・教授 (15301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協 力 者	杉尾 剛 (SUGIO Tsuyoshi)	杉尾化学合成独立栄養細菌研究所	
研究 協 力 者	根岸 敦規 (NEGISHI Atunori)	安藤ハザマ技術研究所	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関