

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：21401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19880

研究課題名（和文）ウッドルフ鉱微結晶の微生物生成系を利用した坑廃水処理技術への挑戦

研究課題名（英文）A challenge to technology for mine drainage treatment using a microbial system capable of producing a woodruffite mineral

研究代表者

宮田 直幸（Miyata, Naoyuki）

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：20285191

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：坑廃水中で進行する生物学的マンガン酸化プロセスを解明することを目的とした。比較的高濃度のマンガンと亜鉛を含有し、有機物を殆ど含まない坑廃水において、マンガン酸化細菌の寄与によりバーネス鉱またはウッドルフ鉱が生成していることが示された。このマンガン酸化微生物系を用いて模擬坑廃水の処理を試みた結果、有機物無添加条件でも両金属とも十分に除去可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マンガン酸化細菌を活用した廃水処理技術の開発が進められているが、マンガン酸化細菌は従属栄養性であり、有機性基質を供給する必要がある。本研究では有機物含量の低い坑廃水中でマンガン酸化が進行していることに着目して研究を行い、有機物無添加条件でもマンガン含有廃水を十分に処理可能であることを示した。マンガン酸化細菌の新しい応用技術を示した内容で波及効果も見込めるため、学術的、社会的意義は大きいといえる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the Mn oxidation occurring in a mine drainage containing Mn and Zn. Mn-oxidizing bacteria were shown to contribute to the deposition of Mn oxide mineral, birnessite and/or woodruffite, in the presence of relatively high concentrations of Mn and Zn but a little organic substance. Furthermore, we examined treatment of artificial wastewater using the microbial Mn oxidation system obtained from the drainage. The results demonstrated that such system was able to sufficiently remove both metal ions without addition of organic substrates.

研究分野：環境生物学

キーワード：坑廃水 マンガン酸化細菌 バーネス鉱 亜鉛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 全国に散在する休廃止鉱山では、重金属を含有する坑廃水が常時発生するため、恒久的な鉱害防止対策として、アルカリ条件で重金属を水酸化物として沈殿させる中和処理が行われている。マンガン含有坑廃水の処理では排水基準を満たすために pH 10 以上に上げる必要があり、放流前に処理水の再中和(逆中和)も必要である。昨今、全国的に施設老朽化に伴う設備更新や維持管理費の逼迫、排水基準規制強化への対応が求められており、新しい処理技術の開発、導入が急務の課題になっている。

(2) マンガン酸化菌は pH 中性付近でマンガンを酸化してマンガン酸化物を析出させることから、マンガン酸化菌を利用することにより、薬剤使用量を削減した処理プロセスの構築が可能である。このため国外ではマンガン酸化菌を利用した坑廃水処理が盛んに研究され、実用化も進められている。しかしながら、マンガン酸化菌を利用する上で、プロセスの安定化や効率化に直接関係した幾つかの課題が残されている。一つは、高濃度マンガン(例えば 50 mg/L)や亜鉛等他の重金属の存在下では、微生物のマンガン酸化活性が著しく低下することが報告されている。このため、種々の金属を含む坑廃水ではマンガン酸化菌の適用は通常困難であると予想される。もう一つは、既知のマンガン酸化菌は従属栄養性であるため、坑廃水のような無機性廃水では有機性基質の供給方法が課題である。

(3) 研究代表者は最近、休廃止鉱山の亜鉛及びマンガンを含む坑廃水中で、微生物のマンガン酸化反応によりウッドルフ鉱($ZnMn_3O_7 \cdot 2H_2O$)の微結晶が沈積し、亜鉛、マンガンの水中濃度が減少する現象を見出した。亜鉛を含む坑廃水中での微生物によるマンガン酸化反応は従来の知見では説明が難しい特異的な現象であると考えられた。この現場を詳細に解析してしくみを解明できれば、マンガン酸化菌を活用した廃水処理技術への道が拓けると期待された。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、この坑廃水中でマンガン酸化を担う微生物群集の生態・機能を解析し、ウッドルフ鉱微結晶の微生物生成系を解明することを目的とした。現地調査を行い、坑道内坑廃水路におけるマンガン及び亜鉛イオンの挙動を明らかにするとともに、マンガン酸化物の構造特性を明らかにすることとした。

(2) 坑廃水路内でマンガン酸化に関与する細菌群を特定するため、次世代シーケンサーを用いたアンプリコン解析によって、坑道内沈積物の細菌群集構造を網羅的に調査した。また、沈積物からのマンガン酸化細菌の分離を試みた。

(3) 最後に、坑廃水路中に堆積したマンガンスラッジを植種源として、ラボスケールの接触酸化型バイオリアクターを構築し、マンガン及び亜鉛を含有する模擬廃水を対象として有機性基質無添加条件で除マンガン処理が可能であるか、検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 休廃止鉱山の坑道内を流下する約 200 m の坑廃水路で水質調査を行った。坑廃水中の金属イオン濃度は ICP 発光分光分析法で、イオン成分の濃度はイオンクロマトグラフィー法で定量した。また、水路中のマンガンスラッジを採取し、凍結乾燥した後、超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡(FE-SEM; Hitachi SU 8010)及び粉末 X 線結晶回折装置(XRD; Rigaku Rint-2500)を用いて構造特性を解析した。スラッジに含まれるマンガン及び亜鉛の含量は FE-SEM 付属のエネルギー分散型 X 線分析装置で半定量的に求めた。

(2) マングンスラッジから全 DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子を 515F/806R プライマーを用いて PCR 増幅した後、Illumina Miseq を用いたアンプリコン解析を行い、細菌群集構造を調査した。また試料を適宜希釈後、平板培地を用いてマンガン酸化菌を分離した。

(3) プラスチック製コンテナ(縦 19 cm、横 33 cm、高さ 12 cm)を使用して接触酸化槽を作製した。この中に、エアポンプで曝気するために散気球を 2ヶ所設置した後、微生物付着担体として、20~40 mm 程度の石灰石を 9 kg 充填した(有効容積 3 L)。模擬廃水は水道水に、硫酸マンガンスラッジ水和物(80 mg/L)、硫酸亜鉛七水和物(35 mg/L)、硫酸アンモニウム(20 mg/L)または硝酸ナトリウム(25 mg/L)、リン酸水素二カリウム(5 mg/L)など、種々の無機塩を溶解させたものを使用した。pH は無調整で、常時、7.0 以上 8.0 未満であった。処理槽を模擬廃水で満たしてから、坑道内坑廃水路で採取したマンガンスラッジを投入し、送液ポンプで模擬廃水の流入を開始した。処理槽内の水温は 17~18 で推移していた。

4. 研究成果

(1) 坑廃水路でのマンガン酸化と細菌群集

坑廃水路において、水質測定及びスラッジ試料の採取を行った。調査した坑廃水の性状として、pH 6.6~6.7、水温 15~16、溶存酸素 3.1~5.8 mg/L、全有機性炭素 0.8~1.2 mg/L、無機性

窒素 0.06 ~ 0.16 mg/L、溶存性の鉄、マンガン、亜鉛は各々 0.1 ~ 0.4 mg/L、22 ~ 27 mg/L、6.4 ~ 8.2 mg/L であった。200 m の水路を流下するとマンガン、亜鉛は各々 17% 及び 21% が水相から除去されていたこと、水路内には黒色のマンガン酸化物スラッジが堆積していたことから、微生物のマンガン酸化作用が進行していたと結論付けた。

FE-SEM 及び XRD を用いた解析により (図 1) 坑廃水路で析出しているマンガン酸化物はシート構造をもつバーネス鉱様、または含亜鉛マンガン酸化物鉱物であるウッドルフ鉱様であること、マンガン酸化物中には亜鉛が Mn に対するモル比で 10 ~ 20% と高濃度で取り込まれていることが明らかになった。

マンガンスラッジ試料の細菌群集構造を解析した結果、水路の上流から下流にかけて鉄酸化及び硝化 (図 2) のほか、硫酸酸化、メタン酸化に関与すると推察される細菌群が検出された。これら以外にも種々の従属栄養細菌が検出された。有機性炭素の含有量の低い廃水において多様な従属栄養細菌が検出されたことから、微生物生態系への有機物供給経路があると考えられる。独立栄養細菌である鉄・硫酸酸化細菌群、硝化細菌群による炭酸固定がその機能を担っている可能性が示された。

マンガン酸化細菌に関して、以前に代表者らが別の環境試料から分離した *-*プロテオバクテリア綱 U9-1i 株¹⁾ とよく一致する配列が検出された (図 2)。またマンガン酸化細菌 *Pedomicrobium manganicum* の近縁種が検出された。さらに U9-1i 近縁種については、同様の配列を有する細菌株をマンガンスラッジから分離することができた。いずれも従属栄養性であるため、他からの有機物供給により増殖し、坑廃水中のマンガン酸化に関与していると推察された。

(2) バイオリアクターによる模擬坑廃水処理
硫酸アンモニウムを含む模擬廃水を対象として処理を検討した。HRT 3 日で運転した結果、溶存マンガン 20 mg/L 及び亜鉛 6 mg/L のほぼ全量が除去されていた (図 3)。その後、HRT を 1 日まで段階的に減少させ、さらにマンガン濃度を 60 mg/L にまで上昇させたが、マンガン、亜鉛ともに高い除去率が維持された (図 3)。槽内に充填した石灰石の表面には黒色マンガン酸化物が析出した。

硝酸ナトリウムを含む模擬廃水にかえて処理試験を実施した。その結果、硝酸ナトリウムにおいても、さらには窒素源無添加条件でもマンガン及び亜鉛が十分に除去できることが明らかになった (図 4)。最終的に HRT 0.5 日で運転し、マンガン容積負荷 15 mg/L-処理槽/日において 79% 以上のマンガン及び亜鉛の除去率が得られた。以上の結果から、本研究で構築した接触酸化槽を用いてマンガン及び亜鉛を排水基準値 (Mn: 10 mg/L、Zn: 2 mg/L) 以下に除去可能であることが示された。

接触酸化槽内で析出したマンガン酸化物の XRD パターンはウッドルフ鉱に類似していた。

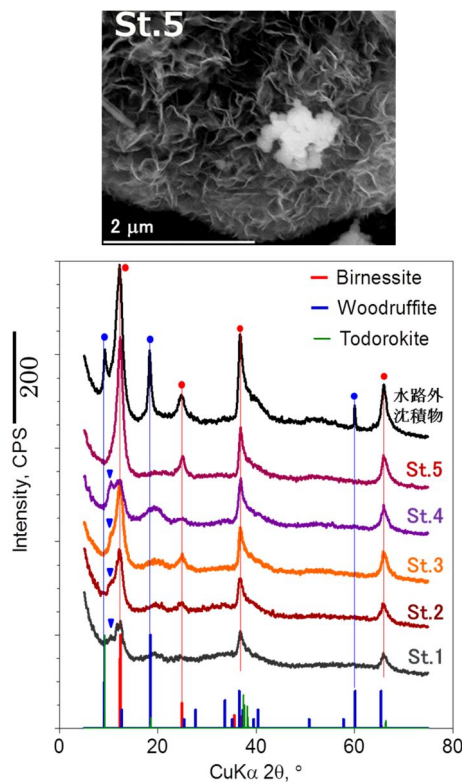


図 1 坑廃水路中で析出したマンガンスラッジの構造特性
(上) FE-SEM 像、(下) XRD パターン

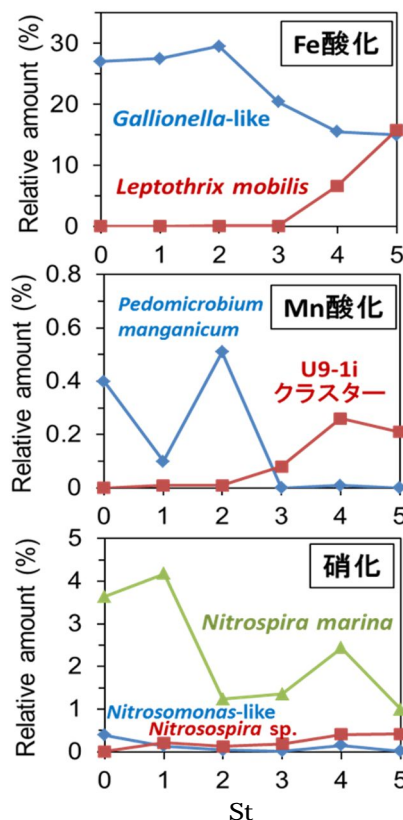


図 2 坑廃水路 (200 m, St 1 : 上流側 - St 5 : 下流側) のマンガンスラッジの細菌群集

以上の結果から、本研究で構築した接触酸化槽を用いてマンガン及び亜鉛を排水基準値 (Mn: 10 mg/L、Zn: 2 mg/L) 以下に除去可能であることが示された。

マンガン酸化に伴って、亜鉛はマンガン酸化物構造中に取り込まれるか(ウッドルフ酸生成)酸化物表面への吸着により除去されたと推察された。

接触酸化槽内の析出物の菌叢解析により、経過日数で検出量は異なっていたが、既知の従属栄養マンガン酸化細菌として、植種源(坑廃水路マンガンスラッジ)と同様に -プロテオバクテリア綱 U9-1i 株及び *Pedomicrobium* 属近縁種が検出された(表1)。これら以外にも、機能は不明であるが多様な従属栄養細菌群が検出された。

(3) まとめ

鉱山の坑道内廃水路において、比較的高濃度のマンガン及び亜鉛を含む坑廃水中で、生物学的なマンガン酸化反応が進行していた。混在する金属に加えて、有機物含量が少ない廃液中にも関わらず、マンガン酸化物形成が認められ、特異的なマンガン酸化作用とそれを支える有機物供給システムが備わっていると推察された。今後、さらなるメカニズムの解明が待たれる。

坑廃水路のマンガン酸化システムを利用することで、有機物添加を必要としない坑廃水処理が可能であるか検討した。マンガン及び亜鉛を含む模擬廃水の接触酸化処理を試験し、有機物無添加、及び硝酸ナトリウム添加または無添加条件において、両金属とも排水基準以下にまで十分に低減できることが示された。槽内で従属栄養性マンガン酸化細菌が保持されていたため、現地坑廃水路と同様に何らかの有機物供給システムが備わっていると推察され、今後、詳細を解明する必要がある。

<引用文献>

1) Okano, K., Furuta, S., Ichise, S., Miyata, N.: Whole genome sequences of two manganese(II)-oxidizing bacteria, *Bosea* sp. strain BIWAKO-01 and *Alphaproteobacterium* strain U9-1i, Genome Announcements, 4 (6), e01309-16 (2016).

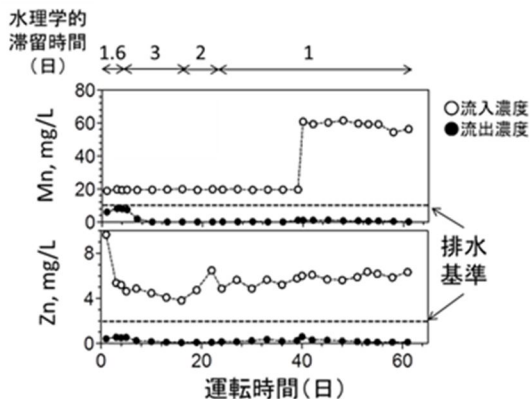


図3 模擬坑廃水処理試験の結果(硫酸アンモニウム添加条件)

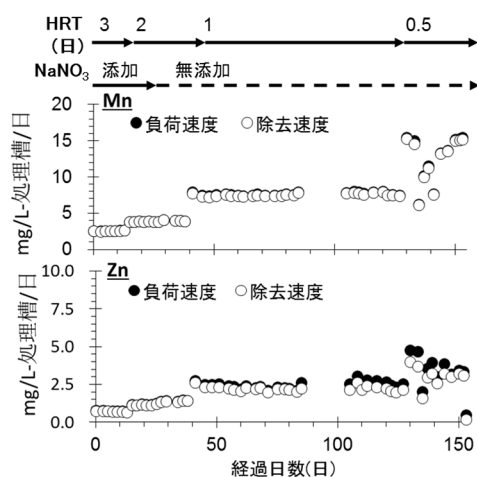


図4 模擬坑廃水処理試験の結果(硝酸ナトリウム添加及び窒素源無添加条件)

表1 接触酸化槽内の既知のマンガン酸化細菌群

検出近縁種	相対存在量 (%)		
	0日	126日	154日
U9-1i 株	0.05	0.21	0.05
<i>P. manganicum</i>	0.05	0.02	0.01

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮田直幸
2. 発表標題 微生物を利用したマンガン含有坑廃水処理の取組みと課題
3. 学会等名 平成30年度資源・素材関係学協会合同秋季大会（資源・素材2018）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮田直幸, 岡野邦宏, 菅沼玲奈, 藤林恵
2. 発表標題 マンガン含有鉱山坑廃水中における生物学的マンガン沈積過程の解析
3. 学会等名 日本水処理生物学会第55回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮田直幸, 岡野邦宏, 藤林恵, 小原義之, 長安孝明, 福山賢仁
2. 発表標題 マンガン含有坑水処理に向けた微生物活用取組み
3. 学会等名 資源・素材学会平成31年度春季大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田直幸, 岩崎瑞生, 岡野邦宏, 藤林恵, 瀧寛則, 根岸昌範
2. 発表標題 高濃度マンガン及び亜鉛等重金属存在下におけるマンガン酸化細菌のマンガン酸化特性
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田直幸
2. 発表標題 坑廃水処理におけるマンガン酸化菌の役割
3. 学会等名 環境資源工学会第138回学術講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田直幸，菅沼玲奈，簾内君仁，岡野邦宏，藤林恵
2. 発表標題 ベンチスケールリアクターによるマンガン含有坑廃水の連続処理特性
3. 学会等名 資源・素材2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 簾内君仁，宮田直幸，岡野邦宏，藤林恵
2. 発表標題 マンガン酸化細菌を用いた有機物無添加条件でのマンガン含有坑廃水の接触酸化処理
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会（誌上発表）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 廃水処理装置、微生物群集、微生物群集の培養方法、及び廃水処理方法	発明者 宮田直幸、藤林恵、 岡野邦宏	権利者 公立大学法人秋 田県立大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019-164687	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	岡野 邦宏 (Okano Kunihiro) (30455927)	秋田県立大学・生物資源科学部・助教 (21401)	
研究分担者	藤林 恵 (Fujibayashi Megumu) (70552397)	九州大学・工学研究院・助教 (17102)	