

機関番号： 23803
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2008~2010
 課題番号： 20560509
 研究課題名 (和文) 異化的鉄還元を利用した新たな重金属含有排水処理システムの構築
 研究課題名 (英文) Development of advanced treatment process of wastewater containing heavy metals using dissimilarly iron reduction
 研究代表者
 岩堀 恵祐 (IWAHORI KEISUKE)
 静岡県立大学・環境科学研究所・教授
 研究者番号：40183199

研究成果の概要 (和文)： 本研究は、異化的鉄還元能を有する嫌気性集積培養系を活用した新たな重金属含有排水処理システムの構築を目指したものである。安定で高密度な異化的鉄還元集積培養系を構築できた。集積培養系で形成されたマグネタイトは、各種重金属イオンに対する優れた吸着剤として機能することが判った。新たな重金属含有排水処理システムの構築に重要な知見が得られ、システム構築の可能性が期待される。

研究成果の概要 (英文)： The aim of this study was to develop the advanced anaerobic treatment of wastewater containing heavy metals using dissimilarly iron reduction. Fe(III)-reducing enrichment culture of stable and high density was developed. Biogenic magnetite formed in the enrichment culture was shown to be excellent as the adsorbent of various heavy metal ions. Valuable information to develop the advanced heavy metal-containing wastewater treatment system would be obtained and its applicability would be expected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 工学

科研費の分科・細目： 土木工学・土木環境システム

キーワード： 異化的鉄還元、重金属含有排水、マグネタイト、嫌気性集積培養、PCR-DGGE

1. 研究開始当初の背景

平成 15 年 11 月、水環境基準 (生活環境項目) に全亜鉛の基準値が追加され、事業所などからの亜鉛排出濃度・総量に尚一層の対策を講じることが必要となってきた。重金属を含有した事業系排水では、主として凝集沈殿法や吸着法、フェライト法により処理されているが、排出規制が強化されれば、事業所の規模や業種によってはコスト面で対応が困難になる場合や、薬注量の増加に伴う汚泥発

生量の増大が懸念される。昨今の循環型社会の形成という社会的要請に鑑み、排水中からの重金属の回収・資源化という観点に立つと、より効率的な排水処理・重金属回収システムの構築が重要かつ急務の課題である。

本研究は、研究代表者らの獲得した、鉄(III)水和酸化物を異化的に磁性鉄化合物に変換する嫌気性集積微生物群を、より安定で高密度な鉄還元菌集積培養系に展開させ、その環境保全技術への活用、特に低コスト・低

環境負荷の処理が可能なバイオプロセスの導入による新たな重金属含有排水処理システムの構築を目的としたものである。本研究で検討・開発するシステムは、微生物による鉱物形成作用（バイオミネラリゼーション）を応用したものであり、低コストで低環境負荷であると予想される。したがって、既存処理の代替法または一部を補完する高度処理法として、広範な事業系排水に適用されるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究は、異化的鉄還元能を有する嫌気性集積培養系を活用した新たな重金属含有排水処理のシステム構築を最終目的としたもので、①鉄還元菌集積培養系の構築と生産されたマグネタイトの特性評価、②マグネタイト形成過程における重金属の除去・回収特性の評価、③バイオリクターへの適用に関する培養条件の検討を行い、システム構築の可能性を考察する。

3. 研究の方法

(1) 鉄還元菌集積培養の構築と生産されたマグネタイトの特性評価

嫌気性集積微生物群の継代培養を通じて、鉄酸化物濃度や培養温度、培養 pH、栄養源（炭素・窒素等）を変えた種々の条件での培養実験により、微生物増殖とマグネタイト生産に及ぼす環境因子の影響を明らかにする。次に、上記の継代培養で、スポット的に培養液を採取し、その菌叢を解析する。その手法は、PCR-DGGE 法（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）による 16S rRNA 遺伝子の増幅断片を解析する方法である。即ち、全 DNA を抽出し、GC クランプ付プライマーで V3 領域を PCR 増幅し、増幅断片の DGGE バンドパターンの比較から、主要構成細菌の断片を特定し、それらの塩基配列を決定する。データベースによる相同性検索により、主要構成細菌に既知の鉄還元菌（マグネタイト生産菌）群が含まれるか否かを調査する。さらに、粉末 X 線結晶解析 (XRD) 法で鉱物形態の同定、電子顕微鏡観察や化学合成マグネタイトとの性状比較により、鉄還元菌集積培養系の構築を物性化学的な側面から支援する。

(2) マグネタイト形成過程における重金属の除去・回収特性の評価

上記(1)で構築した鉄還元菌集積培養系を用いて、マグネタイト形成過程における重金属の除去・回収特性を検討する。

本研究では、実際の事業系排水を考慮して、亜鉛等の二価金属イオン (Zn、Ni、Co、Cu、Cd; 1~100mg/L 程度の範囲で設定) を添加し、回分培養による溶存態重金属の除去・回収特性を明らかにする。また、同様の実験で、これら重金属の微生物増殖とマグネタイト生

産に及ぼす影響も検討する。溶存態重金属の定量は、原子吸光法または ICP-MS 法で行い、添加した重金属の沈積形態を元素分析や XRD 等により調査する。

(3) バイオリクターへの適用に関する培養条件の検討

マグネタイト生産に及ぼすリン酸塩の影響や集積培養系の重金属耐性など、バイオリクターへの適用に不可欠な培養条件を明らかにする。

大型バイアル瓶 (250mL 容) にリン酸溶液 (終濃度: 0~20mM) を添加し、これまでと同様の手順で培養を行い、フェリハイドライトのリン酸イオン吸着特性と鉄酸化物の構造解析、磁気応答性などから、集積培養系の生物活性に及ぼす影響を明らかにする。また、集積された培養系への重金属類 (Cd、Cu) 添加実験により、集積培養系の重金属耐性を検討する。以上の検討結果とマグネタイト形成過程における重金属の除去実験 (回分培養) の結果から、異化的鉄還元を利用した新たな重金属含有排水処理のシステム構築を試みる。

4. 研究成果

(1) 鉄還元菌集積培養系の構築と生産されたマグネタイトの特性評価

研究代表者らが獲得した嫌気性鉄還元菌集積培養系で、フェリハイドライト ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、酢酸ナトリウム 16mM を含む基礎培地 (pH7.2~7.4) で継代培養を繰り返したところ、黒色の鉄化合物に変換され、磁性を有していたため、マグネタイト (磁鉄鉱) の生産が推定された (図 1)。そこで、XRD 測定を行ったところ、マグネタイトに類似した鉱物形態であることが確認された (図 2)。培養中における鉄 (III, II) の経日変化から、鉄 (III) の還元、即ち鉄 (II) の生成が認められ、これらの最終濃度がそれぞれ、140mM と 64mM であったことから、マグネタイトの組成比 (2:1) に近い値であったので、フェリハイドライトはほぼ完全にマグネタイトに変換されたことが明らかとなり、鉄還元集積培養系が構築できた。

培養 0 日目



培養 7 日目



図 1 継代培養での色調の変化と磁性確認

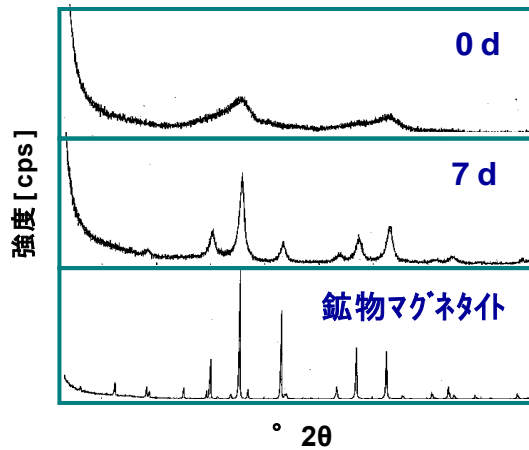


図2 形成された鉄酸化物のXRDパターン

フェリハイドライトのマグネタイトへの変換に及ぼす培養条件の影響を検討したところ、マグネタイト形成では酢酸塩が電子供与体として利用され、また pH と温度の影響は、それぞれ pH 7.1~7.8、26~37°Cの範囲において活発な Fe(III) の還元が認められ、マグネタイトの形成には、リン酸塩の添加濃度に大きく影響を受けることが明らかとなった。

次に、PCR-DGGE 法で菌叢解析を行ったところ、図3に示したように、7つのバンドが確認され、相同性検索を行ったところ、バンドの位置から順に① *Firmicutes bacterium*、② *Delftia sp.*、③ *Clostridium litorale*、④ *Geobacter sulfurreducens* PCA 株、⑤ *Tissierella sp.*、⑥ *Clostridium sp.*、⑦ *Exiguobacterium sp.* であり、マグネタイト生産を担っている細菌は *Geobacter sulfurreducens* PCA 株の近縁種 (SL1 株) のみであることが明らかとなった。この細菌群の中で有機物として酢酸塩を利用できない細菌がいることから、培地に添加した酵母エキスを栄養源として増殖していると考えられる。このことから、環境中から異化的鉄還元細菌を単離するためには酵母エキスのような、他の細菌が利用できる有機物を添加しない培地を構築することが重要である。

さらに、XRD と高分解能透過型電子顕微鏡 (HRTEM) による分析結果 (図4) から、形成された Fe 化合物はマグネタイトであり、10 nm 程度の微粒子であることから、超常磁性を有し、均質なマグネタイト磁気微粒子が生産されたことが示唆された。

(2) マグネタイト形成過程における重金属の除去・回収特性の評価

上記(1)の鉄還元菌集積継代培養系を用いて、マグネタイト形成過程における重金属の除去・回収特性を検討した。その結果、Mn(II)、Co(II)、Ni(II) および Zn(II) の吸着は Langmuir の吸着等温式によく従うことが明

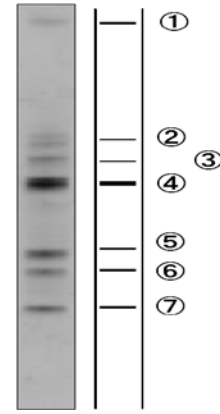
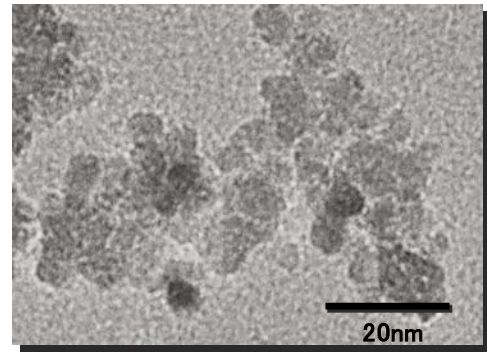


図3 PCR-DGGE 法による鉄還元集積培養系のバンドパターン



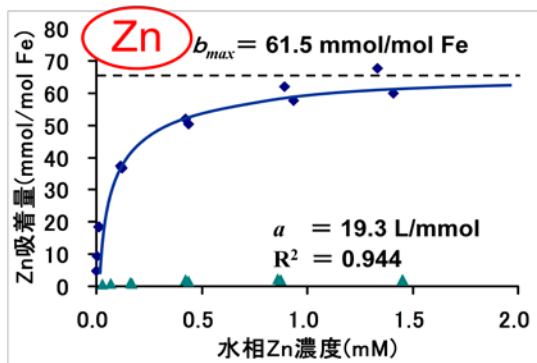
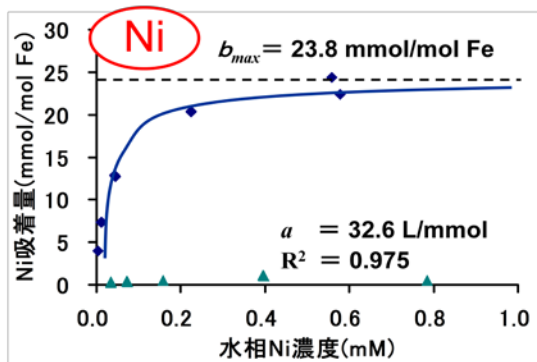
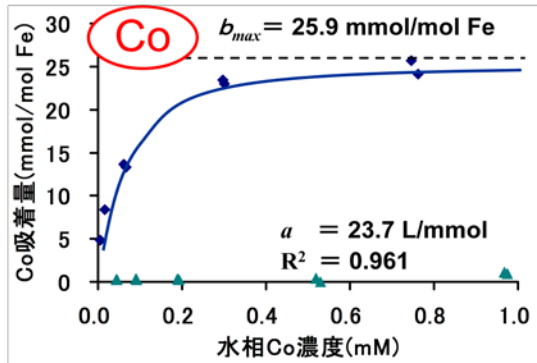
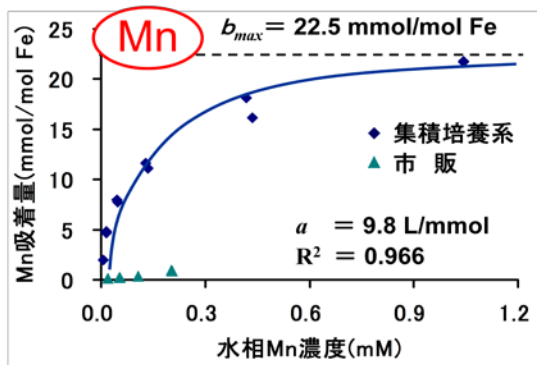
生合成マグネタイト (TEM)

図4 HRTEM 写真

らかとなった (図5、表1)。Langmuir 平衡定数を比較すると、Zn で 48.6 L/mmol、Ni で 32.6 L/mmol、Co で 23.7 L/mmol、Mn で 14.9 L/mmol となり、マグネタイトへの親和性は、Zn > Ni > Co > Mn であることが示唆された。また、これら金属の吸着量を市販のマグネタイトと比較したところ、例えば 0.1 mM の金属添加時では、Zn で 8.5 倍、Ni で 17 倍、Co で 20 倍、Mn で 21 倍であり、集積培養系により生産されたマグネタイトは、各種金属イオンに対する優れた吸着剤として機能することが明らかとなった。一方、集積培養系は pH 7.1~7.8 の中性域、26~37°C の中温で活発な鉄(III)の還元が再確認され、重金属含有排水処理への適用が期待されるが、集積培養系には比較的高濃度のリン酸塩が必要であり、鉄と化合して不溶性のリン酸塩鉱物が形成されるので、システム構築にあたり、リン酸塩の影響を検討する必要がある。

(3) バイオリクターへの適用に関する培養条件の検討

上記(1)の集積継代培養系を用いて、マグネタイト生産に及ぼすリン酸塩の影響を検討した。大型バイアル瓶 (250 mL 容) にリン酸溶液 (終濃度: 0~20 mM) を添加した培養実験から、培養 14 日目に 0~10 mM で



Langmuir 吸着等温式

$$v = b \cdot \frac{a \cdot p}{1 + a \cdot p}$$

v : 単位吸着媒体当たりの吸着量 (mmol/mol Fe)、
 b : 飽和吸着量 (mmol/mol Fe)、 a : 平衡定数 (L/mmol)、
 p : 吸着質の水相中の濃度 (mmol/L)

図5 マグネタイトによる各種重金属イオンの吸着

表1 Langmuir 平衡定数

	飽和吸着量 (mmol/mol Fe)	Langmuir 平衡定数 (L/mmol)	R ²
Zn	61.5±3.1	19.3± 6.0	0.944
Co	25.9±1.2	23.7± 4.6	0.961
Ni	23.8±0.9	32.6± 5.1	0.975
Mn	22.5±1.1	9.8± 1.8	0.966

ほぼ同量の鉄還元量が表示されたが、10mM では鉄還元速度が約 1/2 となり、20mM では鉄還元は行われなかった (図6)。これは、リン酸イオンがフェリハイドライトに化学的に吸着したことで、鉄還元細菌との接触障害もしくは電子の移動障害が起こったためと推測された。また、形成されたマグネタイトの量とその磁性は、リン酸塩濃度により異なっていたので、化学合成法の代替としての適用可能性が期待された。

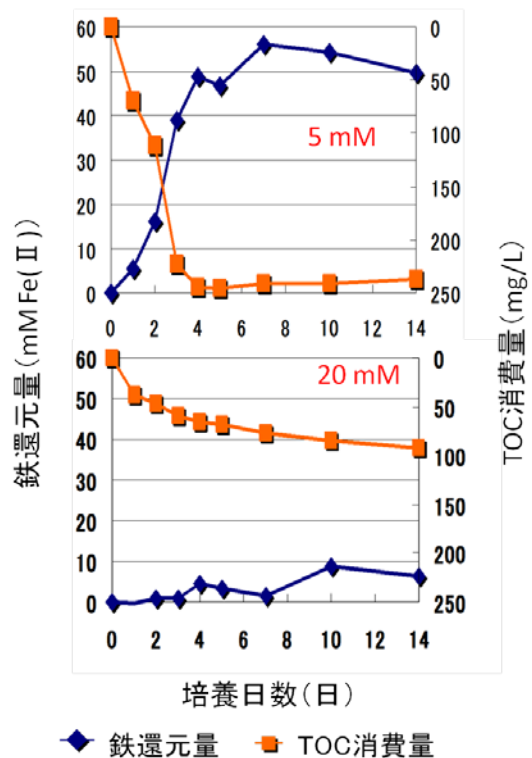


図6 各種リン酸塩添加量での鉄還元量お TOC 消費量

次に、鉄還元集積培養系への重金属添加実験 (添加濃度: 1.0mM、1.5mM) により、集積培養系の重金属耐性を検討した。その結果、Fe(III)の還元速度は低下するが、Mn、Se およびCr に対する耐性が強いことが明らかとなった。また、マグネタイト粒子の鉄(II)と鉄(III)の組成比がほぼ 1:2 と理論値に近いことから、これら重金属はマグネタイト形成に影響を及ぼさないといえる。一方、Cd と Cu が存在する各培養系では、0.5mM の濃度でも、鉄

(Ⅲ)の還元は行われなかった。この原因は、異化的鉄還元細菌に対する生体毒性が直接的に作用していることが示唆された。

以上のことから、異化的鉄還元集積培養系を利用した重金属含有排水処理のシステム構築に重要な知見が得られたものとする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ①岩堀恵祐：環境保全のためのバイオ・エコテクノロジー、環境保全、第92号、16-19 (2011). 査読なし

[学会発表] (計2件)

- ①岩堀恵祐、武安裕也、関川貴寛：鉄還元集積培養系のマグネタイト生産特性に及ぼす培養条件の影響、日本水処理生物学会第45回大会(秋田市) (2008年11月13日)
②渡邊淳一、関川貴寛、岩堀恵祐：鉄還元集積培養系におけるマグネタイトの生産とその菌叢解析、日本水処理生物学会第45回大会(秋田市) (2008年11月13日)

[その他]

ホームページ：

<http://env-eng.u-shizuoka-ken.ac.jp/env-eng/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩堀 恵祐 (IWAHORI KEISUKE)
静岡県立大学・環境科学研究所・教授
研究者番号：40183199

(2) 研究分担者

関川 貴寛 (SEKIKAWA TAKAHIRO)
静岡県立大学・環境科学研究所・助教
研究者番号：20511728

(3) 連携研究者

—