

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510100

研究課題名(和文)高活性鉄酸化細菌の解析と電気培養菌固定化による重金属回収システムの構築

研究課題名(英文)Construction of a heavy metal collection system by immobilized high revitalization iron-oxidization bacterium on electrochemical cultivation

研究代表者

竹内 文章 (Takeuchi, Fumiaki)

岡山大学・環境管理センター・准教授

研究者番号：90294446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：高活性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1は、水銀に強い耐性を持ち、無機あるいは有機水銀から金属水銀として還元気化する高い活性を持っており水銀汚染土壌、水銀廃液処理等の環境浄化に活用できる。MON-1株及びその他代表的な株について、鉄酸化活性、金属溶出活性、水銀気化活性、Cytochrome c oxidase等の諸性質について検討し環境浄化及び資源回収における基礎資料を得た。これらの菌株は、増殖が遅いため、新たに電気培養装置を開発した。従来法よりも高濃度培養が可能となり、固定化することで環境浄化、資源回収の実用化のための知見を得た

研究成果の概要(英文)： *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1 was immobilized on various pellet-shaped grains for volatilization and recovery of mercury from mercury-polluted soil and wastewater. The bacterium was grown by electrochemical cultivation at 30 °C in 9K ferrous iron medium (pH 2.5). In the present study, a highly efficient electrochemical cultivation system was developed. The immobilized *A. ferrooxidans* MON-1 cells can volatilize both inorganic and organic mercuric compounds from mercury medium. This study shows feasible and economical immobilization materials for the bioremediation treatment of mercuric compounds. In addition, the enzyme of iron-oxidization bacterium used for the bioleaching was clarified.

研究分野：環境応用微生物

 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

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、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あり、重金属を溶解するのに好ましい酸性条件下で生育する。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、300株の単離された *A. ferrooxidans* の中から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スクリーニングしており諸性質を解明してきた。

2. 研究の目的

我々が保有する多種の鉄酸化細菌の中でも、特に銅のリーチング活性が非常に高い *A. ferrooxidans* D3-2 株、無機及び有機水銀を分解して金属水銀として気化する活性が著しく高い *A. ferrooxidans* MON-1 株を用いた資源回収、環境浄化の応用可能な技術を確立することを目的とした。本菌は、重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せず、空気中の CO₂ 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、従来の培養法に比べ、少量の培地で 200 倍以上の収量が得られる独自の電気培養装置の開発を長年行ってきた。今回さらに装置改良を行い効果的な運転条件を調べる。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った。

3. 研究の方法

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。本法の基本的原理、あるいは標準株についての報告例はあるのが、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体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、著者が培養効率を高め、それを応用する目的で長年取り組み開発したシステムのように、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を設計し作成した。

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。生物膜法は、担体(8種類)について、担体 1 g に対して二価鉄添加培地 10 ml に洗浄細胞液あるいは電気培養液を 0.1 mg-protein の割合で添加し、30、120 rpm の振とう培養によって 4 日間で固定化した。包括法については、他の包括法に比べ材料が安価なポリビニルアルコール(PVA)を用いる方法について検討した。PVA はクラレ(株)製の PVA-HC 16% (二価鉄培地と混ぜて滅菌)を用い、冷凍させて固定化する方法(PVA-F法)及び飽和ホウ酸液に添加させて固定化する方法(PVA-B法)について、菌体濃度 0.01 mg-protein/g の条件で比較した。

4. 研究成果

4.1 実験結果

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を開発した。5種類の菌株について、一般的な振とう培養法(7~10日間)に対する本装置による電気培養(15~25日間)での菌体濃度を比較したものである。詳細には条件によって異なるが、本装置における収

量は、何れの菌株においても、従来の方法に比べ 100 ~ 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検討し、種々の使用目的等に応じて継続的に菌体を活用するための知見を得た。固定化物の作り易さ、活性評価、粒の破砕性、利用に関して固定層、流動層、土壌・鉱石等、更に、コスト面において評価をした。本研究では、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。電気培養装置による高濃度培養液を使用して効率よく固定化することが可能となった。

銅、金等の有価金属を低コストで溶出させるバクテリアリーチングの実際にも利用されているが、高活性株を利用した効率化については、実例も少なく、今後重要な課題である。得られた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生化学的解析が進めていく。

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、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 が大きく関与していることを確かめた。

4.2 応用技術の検討

銅等のバクテリアリーチングによる資源回収においては、その現場に生息する菌株を利用している例も多い現状であるが、保有する重金属溶出活性を用い、その環境における阻害物質に耐性な株、高濃度培養法、固定化技術を活用することでさらに高効率な資源回収が可能となる。

また、水銀廃液、汚染土壌あるいはその洗浄水を実際に処理するために高活性菌体を固

定化することにより流出なく連続的な運転が可能となるシステム提案した。

4.3 研究結果のまとめ

本研究で用いられた鉄酸化細菌は、増殖が遅いため、独自の電気培養装置による高濃度培養技術を開発した。また、菌体の微生物固定化法について検討し、種々の使用目的等に応じて継続的に菌体を活用するための知見を得た。銅、金、ニッケル等の有価金属を低コストで溶出させるバクテリアリーチングの効率化は、大きな課題である。得られた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、亜硫酸耐性等の生化学的解析が進められている。

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等を進めていきたい。

<引用文献>

杉尾剛,竹内文章: 鉄酸化細菌

Acidithiobacillus ferrooxidans の基礎と応用
水銀耐性鉄酸化細菌の分離と水銀耐性機構, *極限環境生物学会誌*, 10 (1) 43 -53 (2011)

Fumiaki TAKEUCHI and Tsuyoshi SUGIO:
Volatilization and Recovery of Mercury from Mercury-polluted Soils and Wastewaters Using Mercury-Resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains SUG 2-2 and MON-1, *Environmental Sciences*, 13 (6) 305-316 (2006)

Fumiaki TAKEUCHI and Tsuyoshi SUGIO
他: Volatilization and Recovery of Mercury from Mercury Wastewater Produced in the Course of Laboratory Work using *Acidithiobacillus ferrooxidans* SUG 2-2 cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95 (3) 239-244 (2003)

Fumiaki TAKEUCHI and Tsuyoshi SUGIO
他: Volatilization of Mercury under Acidic

Conditions from Mercury-polluted Soil by a Mercury-resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* SUG 2-2, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **65** (9) 1981-1986 (2001)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

竹内文章, 高度活性鉄酸化細菌の電気培養菌固定化による重金属回収と環境浄化の効率化システム開発, 山陽放送学術文化財団リポート, 査読無, **57**, 32-36 (2013)

〔学会発表〕(計 4 件)

Tsuyoshi SUGIO Rie SUGIO Atushi NEGISHI Fideki IGAWA and Fumiaki TAKEUCHI, Production of sulfite from reduced inorganic sulfur compounds by cytochrome oxidase of *A. ferrooxidans*, The114th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2014年5月17日~20日〔Boston〕

杉尾 剛, 杉尾理恵, 根岸敦規, 井川秀樹, 竹内文章, *A. ferrooxidans* 由来 cytochrome oxidase による還元型無機硫黄化合物からの亜硫酸の生成, 日本農芸化学会 2014 年度会, 2014.年 3 月 28 日~29 日〔神奈川〕

杉尾 剛, 杉尾理恵, 竹内文章, *Acidithiobacillus ferrooxidans* より精製した cytochromes oxidase は元素硫黄依存性の鉄還元酵素活性を持っている, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 10 月 18 日~21 日〔広島〕

Tsuyoshi SUGIO Rie SUGIO and Fumiaki TAKEUCHI, Involvement of Cytochrome Oxidase in an Elemental Sulfur Dependent Ferric Iron Reduction by *Acidithiobacillus ferrooxidans*, The113th General Meeting of the American Society for Microbiology,

2013 月 5 月 18 日~21 日〔Denver〕

Tsuyoshi SUGIO and Fumiaki TAKEUCHI, Involvement of *aa*₃-type cytochrome *c* oxidase in ubiquinol oxidase of iron- and sulfur grown *A. ferrooxidans* cells. The112th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2012年6月16日~19日〔San Francisco〕

〔その他〕

ホームページ等

<http://soran.cc.okayama-u.ac.jp/view?l=ja&u=84a371b8723d2a2074506e4da22f6611&a2=1000025&o=affiliation&sm=affiliation&sl=ja&sp=1>

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/emc/takeuchi/paper1.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹内 文章 (TAKEUCHI FUMIAKI)

岡山大学・環境管理センター・准教授

研究者番号: 90294446