

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651079

研究課題名(和文) 微生物機能を利用した水環境からのバナジウム回収技術の開発

研究課題名(英文) Development of biological recovery method of vanadium from water environment

研究代表者

惣田 訓 (Satoshi, Soda)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30322176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：水環境からのバナジウム資源の回収技術が必要とされている。水溶性の五価バナジウムを難溶性の四価に還元する細菌が報告されており、それらの利用によってバナジウムを沈殿回収できる可能性がある。本研究では、底泥から単離したV4株と、典型株である *Shewanella oneidensis* MR-1 の二種のバナジウム還元細菌によるバナジウム沈殿に影響を与える培養条件を解明した。両株は、貧栄養培地でバナジウムを還元し、V、P、Caを含む沈殿を形成した。水溶性バナジウムは、リン酸塩およびカルシウムの高濃度条件で培養された細菌株によって $Cax(VO)_y(PO_4)_z$ として沈殿することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Technologies for vanadium recovery from water environments are needed for sustainable development. Several bacteria capable of reducing vanadium from soluble V(V) to poorly soluble V(IV) have been reported. They have a potential to precipitate vanadium with other chemicals. The objective of this study was to elucidate culturing conditions affecting vanadium recovery by two vanadate-reducing bacteria: strain V4, which was newly isolated from a sediment sample, and an authentic strain *Shewanella oneidensis* MR-1. Both bacterial strains were able to reduce V(V) especially in nutrient-poor media. TEM-EDS analysis showed that strain V4 and strain MR-1 formed precipitation containing V, P, and Ca. A larger amount of soluble vanadium was removed by bacteria pre-cultured at high phosphate and calcium concentrations, suggesting they formed precipitation in the form of $Cax(VO)_y(PO_4)_z$.

研究分野：環境工学

キーワード：バナジウム 微生物反応 沈殿 資源回収 レアメタル

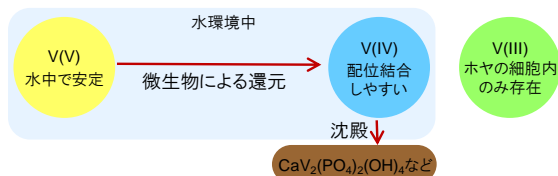
1. 研究開始当初の背景

レアメタルの一種であるバナジウムは、その埋蔵および生産が極少数の国に偏在しており、ほぼ全量を特定国からの輸入に依存せざるを得ないため、我が国では1983年度より国家備蓄対象鉱種に指定されている。そこで、地下水や海水からのバナジウム回収が可能になれば、小規模ながらもその安定供給に貢献できる。今日までに、水環境中で5価のバナジウム(V(V))を4価(V(IV))へ還元し、沈殿を形成するバナジン酸還元細菌の存在が確認されており、生物機能を用いた水環境中からのバナジウムの回収は、新たな資源回収の手法として有望である。微生物を用いた事例としては、産業由来のバナジウムで汚染された地下水中のバナジウムの無毒化としての観点から検討された事例は報告されているが、資源化を目的とした回収事例は未だ報告されておらず、その効率に影響を及ぼす要因には不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、環境負荷の少ない触媒として微生物の還元能力に着目し、その機能を利用した水環境からのバナジウム回収技術の開発を目的とする。まず、産業廃水・地下水・海水からV価のバナジウムをIV価に還元し、カルシウムやリンとの沈殿物として回収し得る微生物の集積培養系の構築を目指すことにした。次に、集積培養系からのバナジウム回収微生物の純粋分離と特徴づけを行うことにした。

バナジウム 産業上重要性が高く、国家備蓄の対象環境中では有用鉱石・原油・海水・地下水中に存在する
 銑鉄製造時の副成分として生産されることから供給が不安定



水環境中からのバナジウム回収の可能性を秘めている

微生物を用いた水環境中からのバナジウムの回収および資源化

3. 研究の方法

(1) バナジウム回収微生物の集積培養系の構築

バナジウム回収工場の排水溝の生物膜と土壌を採取し、バナジン酸還元(回収)微生物の集積のための植種源とした。フラスコに無機塩培地を分注し、グルコースまたは乳酸ナトリウムを20 mM、V価のバナジウム(五酸化バナジウム V₂O₅)を2~10 mMとなるように添加して培養を開始した。各系ともに嫌気条件と好気条件で培養する。IV価のバナジウムは緑色を示すため、バナジウム濃度の分析と色調の変化を目安に、培養液の一部を新しい培養液に移す。これを繰り返し、バナジン酸還元(回収)微生物が優占化した集積

培養系の構築を試みた。

水溶性全バナジウム濃度の分析には、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 ICP-AES を用いた。また、ペルフェナジンによる分光光度定量法を用いて V 価のバナジウム濃度を測定した。培養系の沈殿物を回収し、過型電子顕微鏡-エネルギー分散型 X 線分析(TEM-EDX)分析によって、バナジウムの存在を確認した。

細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とした T-RFLP 法(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)により、集積培養系中の細菌相を解析した。T-RFLP 解析とは、末端蛍光標識したプライマーセットで鋳型 DNA を PCR 増幅し、制限酵素による消化後、フラグメント解析を行い、塩基配列の違いから制限酵素切断部位が異なることを利用し、検出ピークの強度、位置、数により評価・比較する断片多型性解析である。この分析で、集積培養系中の(優占)細菌数と、およその存在比率を知ることができる。

(2) 集積培養系からのバナジウム回収微生物の純粋分離と特徴づけ

バナジウムの安定した還元と沈殿が得られる集積培養系から、回収微生物(細菌)の純粋分離を試みた。バナジウムを含む平板培地(TSB や R2A など一般的な培地)に集積培養液を塗布し、細菌コロニーを分離した。集積培養系と同様の試験を行い、バナジウムの還元と沈殿の有無を確認した。

純粋分離株に対し、その生理学的な特性を評価した。バナジン酸還元細菌として知られている *Shewanella oneidensis* MR-1 を比較対照に用いた。組成の異なる9種類の培地に両細菌株を植種した。各培地に 100 μM となるように NaVO₃ を添加し、嫌気条件で培養した。また、両菌株を PO₄³⁻濃度と Ca²⁺濃度の異なる12種類の培地で前培養し、100 μM の VOSO₄ を含んだ緩衝剤(HEPES)に植種し、嫌気条件で培養した。

4. 研究成果

(1) バナジウム回収微生物の集積培養系の構築

バナジウム回収工場で採取した底泥、生物膜、および土壌試料からのバナジン酸還元細菌の集積培養を試みた。試料 A~E を 4~10mM の V(V)を含む液体培地に植種したところ、好気集積系 A、B および嫌気集積系 A、B、E においてバナジウムの還元が確認された。好気集積系では V(V)濃度が時間とともに減少しても水溶性全バナジウム濃度は一定であった。一方、嫌気集積系では V(V)濃度の減少に伴い、水溶性全バナジウム濃度も減少した。植え継後、十分に時間が経過すると、嫌気集積系のみならず、好気集積系の水溶性全バナジウム濃度も減少した。なお、微生物を含む試料を添加しない対照系では、バナジウム濃度に変化は生じなかった。

TEM-EDX 分析によって、水相から減少したバナジウムは、嫌気集積系では沈殿物に含まれていることが明らかとなり、好気集積系では細菌細胞内に含まれているか、酸に不要な化学形態で沈殿していることが示唆された。以上より、少なくとも嫌気条件では、集積した細菌によって、水相からバナジウムを回収することができることが明らかとなった。TRFLP 法により、各集積系には異なる細菌群集が形成されていることが明らかとなった。

(2) 集積培養系からのバナジウム回収微生物の純粋分離と特徴づけ

集積培養系から形状の異なる 18 個の細菌コロニーを得た。これらの細菌株の 15 株が 6 日間で 1mM の V(V) を 50% 以上還元した。嫌気培養系では、8 株が V(V) の全量を還元し、多くが培養開始 1 日以内に還元を開始していた。一方、好気培養系では 6 株が 70-90% の V(V) を還元し、培養開始 2 日以降に還元が始まるものが多かった。嫌気培養系の細菌は十分に高いバナジン酸還元能力を有しているといえる。還元率は低いものの、好気培養系による V(V) の還元も生物学的には興味深いものである。

バナジウムを回収する上で最も有望な細菌株として V4 株を選定した。16SrRNA 遺伝子の配列を解析したところ、この細菌は *Citrobacter* または *Kluyvera* 属に類縁であることが明らかとなった。

両菌株による還元により、すべての培地の液相の V(V) 濃度が 7 日間で 90 % 以上減少した。一方、液相の V(V) が還元されても、必ずしも沈殿物は生じなかった。両菌株に共通して、水溶性バナジウム濃度の減少率と培地の全有機炭素濃度との間には、負の相関があった (図 1)。全有機炭素濃度の高い LB 培地や TSB 培地では、培地中の負の電荷を帯びた高分子有機物がキレート剤として作用してバナジウム回収を阻害したと考えられる。また、バナジン酸還元細菌によるバナジウムの沈殿回収量は細胞重量に依存し、上限があることが明らかとなった。

V(V) を含む HEPES 培地中の沈殿物には、粒径 ~ 500 nm ほどの固形物が確認され、V の他に培地には含まれていない P や Ca が検出された (図 2)。このことから、バナジン酸還元細菌が前培養時に吸収した P や Ca を用いて、 $\text{Ca}_x(\text{VO})_y(\text{PO}_4)_z$ のような形態で V を沈殿させていることが示唆された。

前培養で添加した PO_4^{3-} および Ca^{2+} 濃度の増加に伴い、V4 株による水溶性バナジウム濃度の減少率が高くなった (図 3a)。 Ca^{2+} 無添加の培地で前培養をした場合でも水溶性バナジウムが減少したことから、バナジウム回収に Ca^{2+} は必須ではないが、促進することが明らかとなった。MR-1 株を用いた場合にも、V4 株ほど顕著ではなかったが、同様の傾向が得られた (図 3b)

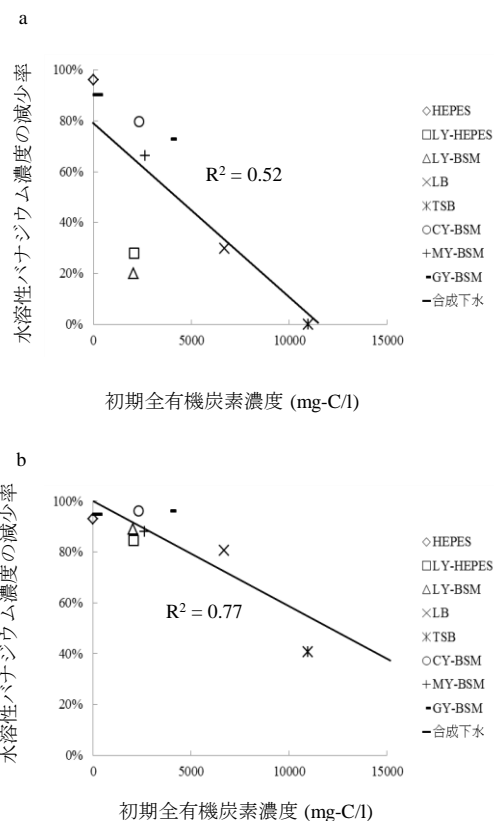


図 1 バナジン酸還元細菌によるバナジウム回収試験における水溶性バナジウム濃度と初期全有機炭素濃度との相関. a: V4 株, b: MR-1 株

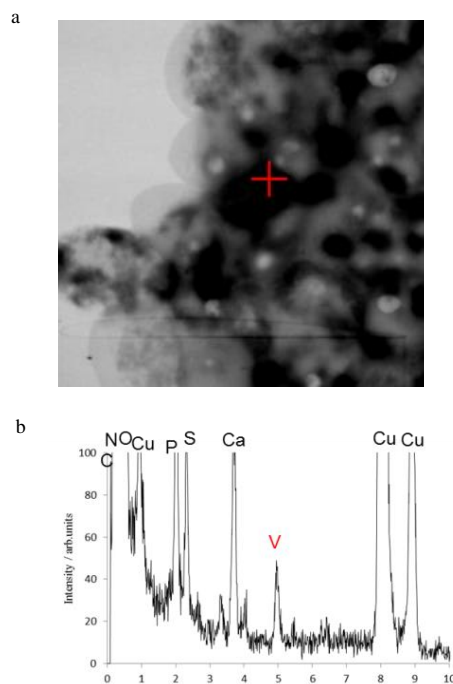


図 2 V4 株の TEM 画像と EDS スペクトル. a: TEM 画像, b: EDS スペクトル.

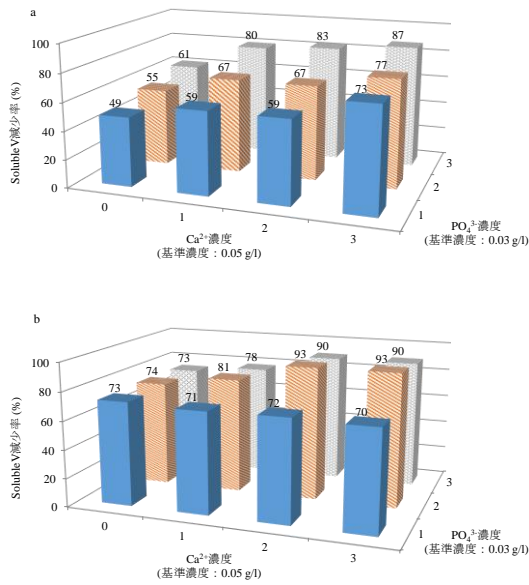


図3 前培養に添加する PO_4^{3-} ならびに Ca^{2+} 濃度と水溶性バナジウム濃度の減少率との関係。a: V4株, b: MR-1株。

(3) バナジン酸還元細菌によるバナジウム回収機構の仮説

LB培地で前培養したバナジン酸還元細菌を緩衝剤(HEPES)+V(V)培地に植菌した場合における、想定されるバナジウム回収モデルを図4aに示す。MR-1株は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)から細胞内膜中に存在する酸化型メナキノン(MQ)に電子を渡して還元型メナキノン(MQH₂)を生成し、さらに様々なシトクロムcタンパクを介して細胞外へ電子伝達を行う。HEPES+V(V)培地中には電子供与体となりうる有機炭素源が存在しないことから、バナジン酸還元細菌は前培養時に細胞内にNADHあるいはMQH₂の形態でV(V)に供与可能な電子を蓄積していたと考えられる。

さらに、前培養時にLB培地中のリン、カルシウム等の元素が細胞合成のために吸収され、HEPES+V(V)培地への植菌後にそれらは再度放出される。バナジン酸還元細菌はHEPES+V(V)培地中で細胞外高分子物質を生成し、細胞の保護ならびにバナジウム回収に必要な元素の吸着・濃縮を行い、細胞外で $\text{Ca}_x(\text{VO})_y(\text{PO}_4)_z$ と表される固形物を形成する。一方、LB+V(V)培地に植菌した場合にはバナジウム回収が行われず、菌体の減少も比較的早かったことから、バナジン酸還元細菌は栄養豊富な条件では細胞外高分子物質を生成せず、また、LB培地中にはセリン等により負に帯電したタンパク質が存在しており、そのキレート効果も相まって、 VO^{2+} や Ca^{2+} 、 Fe^{3+} (Fe^{2+})が細胞表面で濃縮されないまま培地中に拡散していたと考えられる(図4b)。

カルシウム無添加の培地で前培養をした

場合でも、HEPES+V(V)培地への植菌後にV(V)が還元されたことから、前培養時に乳酸を利用して細胞内にNADHあるいはMQH₂を蓄えていたと考えられる(図4c)。回収された沈殿物中には、Vの他にKやFe、P、S、Clが様々な原子数比で含まれていたことから、バナジン酸還元細菌がこれらの元素を前培養時に吸収し、また、HEPES+V(V)培地への植菌後に生成した細胞外高分子物質にこれらの元素を吸着・濃縮したと考えられる。

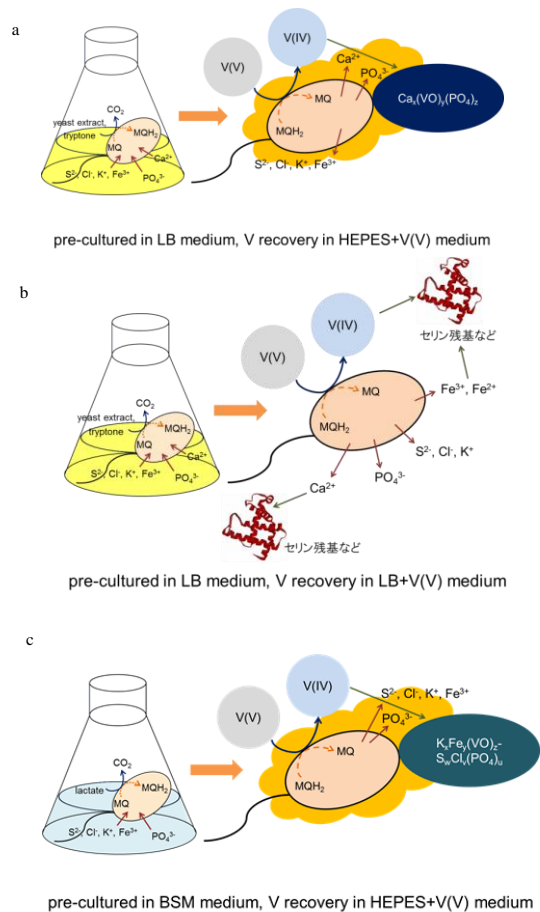


図4 培養条件の異なるバナジン酸還元細菌によるバナジウム回収モデル, a: HEPES+V(V)培地中で細胞外高分子物質を生成してバナジウムやその他の元素を濃縮・沈殿回収するモデル, b: LB+V(V)培地中で負に帯電したタンパク質により、還元したV(IV)や Ca^{2+} がキレートされるモデル, c: Ca^{2+} の非存在下で、V(IV)が PO_4^{3-} 、 S^{2-} 、 Cl^- 、 K^+ 、 Fe^{3+} と沈殿を形成するモデル。

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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

① 惣田訓、寺澤加奈子、黒田真史、池道彦

- (2012) バナジウム還元微生物の集積培養とその特徴づけ. 第 64 回日本生物工学会大会講演要旨集, p. 237.
- ②長尾知明、黒田真史、惣田訓、池道彦 (2013) バナジン酸還元細菌によるバナジウムの沈殿生成に及ぼす培養条件の影響. 第 13 回環境技術学会年次大会研究発表会予稿集, pp. 18-19.
- ③長尾知明、黒田真史、惣田訓、池道彦 (2013) バナジン酸還元細菌によるバナジウムの沈殿生成に及ぼす培養条件の影響. 日本水処理生物学会誌別巻, 32, p. 92.
- ④長尾知明、黒田真史、惣田訓、池道彦 (2014) バナジン酸還元細菌によるバナジウムの沈殿生成に及ぼす培養条件の影響. 第 48 回日本水環境学会年会講演集, p. 173.
- ⑤長尾知明、黒田真史、惣田訓、池道彦 (2014) バナジン酸還元細菌による水中からのバナジウム回収:回収効率に及ぼす培養条件の影響. 日本水処理生物学会誌別巻, 34, p.62.
- ⑥Tomohiro Nagao, Masashi Kuroda, Satoshi Soda, Michihiko Ike (2014) Effects of culture media composition on vanadium precipitation by vanadate-reducing bacteria. The 7th Workshop on Advanced Engineering Technology for Environment and Energy.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

惣田 訓 (Satoshi SODA)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：3 0 3 2 2 1 7 6

(2) 研究分担者

池 道彦 (Michihiko IKE)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：4 0 2 2 2 8 5 6

(3) 連携研究者

黒田 真史 (Masashi KURODA)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：2 0 5 1 1 7 8 6

(4) 研究協力者

寺澤 加奈子 (Kanakano TERASAWA)

長尾 知明 (Tomoaki NAGAO)