

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760689

研究課題名(和文)古細菌を利用した新規ヒ素不動態化バイオプロセスの開発

研究課題名(英文) Immobilization of arsenic using acidophilic, iron-oxidizing archaeon

研究代表者

沖部 奈緒子 (Okibe, Naoko)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30604821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ヒ素(As)は製錬廃液に多く含まれる不純物であり、As含有硫化鉱物に由来している。Asは溶液中において亜ヒ酸(As(III))またはヒ酸(As(V))として存在し得るが、製錬廃液中には、特に毒性・溶解性の高い前者の形態で多く含有されている。本研究では、好熱好酸性・鉄硫黄酸化古細菌*Acidianus brierleyi*のAs(III)酸化能を見出し、それを利用したバイオプロセスにおいて、製錬廃液中のAs(III)を酸化・不動態化することを試みた。最終的に、Asの廃棄形態として理想的であるとされる二次鉱物スコロダイト($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)のバイオミネラルイゼーション(生物的鉱化)に成功した。

研究成果の概要(英文)：Scorodite ($\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) is a thermodynamically stable mineral with advantages as an arsenic disposal compound. With an aim to immobilize highly toxic As(III) contained in the copper refinery process solution, eventually in the form of crystalline scorodite, the use of thermo-acidophilic iron-oxidizing archaeon, *Acidianus brierleyi*, was investigated. Microbial growth on yeast extract was applied to facilitate As(III) oxidation by Fe(II) on cell surface. When the initial Fe(II)/As(III) ratio was set at 1.4 in the presence of yeast extract, both ions were readily oxidized and 86-100% of As was precipitated as crystalline scorodite. The molar ratio of microbially-oxidized Fe(II) and As(III) was an important factor to determine the type of the secondary mineral formed. This study demonstrates the applicability of an one-step bioprocess which enables treatment of As(III)-bearing copper refinery process solution by producing biogenic crystalline scorodite.

研究分野：生物工学

科研費の分科・細目：総合工学・地球・資源システム工学

キーワード：ヒ素 スコロダイト バイオミネラルイゼーション 環境修復 製錬廃液

1. 研究開始当初の背景

ヒ素は、地質からの供給、酸性鉱山廃水、電子産業、または過度の殺虫剤の使用などによって環境中に存在する。地殻で 20 番目に多く存在する元素であり、水圏では主に亜ヒ酸($\text{H}_3\text{As(III)O}_3$)またはヒ酸($\text{H}_2\text{As(V)O}_4$)として存在する。As(III)は As(V)に比べてより毒性が高く、かつ流動性が高い。金属資源開発においては、近年の高品位鉱石の枯渇、および、それに伴う資源ナショナリズムによって、鉱石の世界的な需給バランスが懸念されている。日本は世界有数の金属資源消費国であるものの、その供給は完全に輸入に依存している。したがって、低品位鉱石・難処理鉱石の処理技術の開発は今後ますます重要になってくると言える。実際、銅鉱山の開発においては、より深部の鉱体から銅鉱石を採掘するようになり、それとともにヒ素含有量が高くなっている。ヒ素は銅鉱石が含有する最も一般的な不純物であり、enargite (Cu_3AsS_4) や tennantite ($\text{Cu}_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$) は主要なヒ素含有硫化鉱である。鉱山開発に伴って発生する酸性鉱山廃水(AMD)の処理には莫大なコストがかかっているが、上記のような背景がますます問題に拍車をかける状況にある。また、銅の精錬工程においてもヒ素の溶出が問題となっており、ヒ素の安定的な分離法の開発は、日本が今後、安定的に金属資源を確保していくためにも避けて通れない重要な課題である。現在、ヒ素汚染水処理のためのバイオプロセスに関して各国で研究がなされているが、未だ実用化に至っていない。実用化されている水処理技術としては、濾過、凝集、イオン交換、逆浸透圧があるが、最初のステップでは、強力な酸化剤(過マンガン酸カリウム、過酸化水素、オゾン)を用いて As(III)を As(V)に酸化する。As(V)は Fe(III)や硫黄との共沈、また、粘土、カルサイト、有機物、水酸化鉄に吸着することにより分離可能である。しかし、このような化学的な As(III)酸化法にかかるコストは莫大であり、実用化へのハードルを高くしている。一方、バイオプロセスを組み込むことができれば、経済性があり、かつ環境負荷の少ない代替技術の開発が期待できる。筆者らは、ヒ素含有難処理鉱のバイオリーチングおよび、それに伴うヒ素汚染水のバイオレメディエーション技術に関する研究を行う中で、好熱性鉄酸化古細菌 *Acidianus brierleyi* (以下、*Ac. brierleyi*) に着目した。本菌はヒ素耐性を獲得することができ、これまでにほとんど成功例のない enargite のバイオリーチングを効果的に行えるだけでなく、ヒ素汚染水からのヒ素の不動化にも利用できる可能性を見出した。本菌のヒ素酸化能についての報告は無いが、応募者らの実験において、ある一定の培養条件下で、As(III)酸化が観察されることが見出された。真正細菌によるヒ素酸化については知見が

多いものの、古細菌については未だにほとんど報告がない。ただし、ヒ素含有環境にて古細菌由来 DNA は検出されており、また、*Sulfolobus* 属のゲノムにヒ素酸化酵素のホモログが存在するため、古細菌のヒ素酸化への関与は示唆されている。本研究では、本菌のヒ素酸化メカニズムおよび、ヒ素不動化メカニズムを明らかにすることにより、ヒ素汚染水のバイオレメディエーション基盤技術の開発を目指す。

2. 研究の目的

金属資源の乏しい日本にとって、近年の高品位鉱石の枯渇により、低品位・難処理鉱石の処理技術の開発は重要である。実際に、近年、銅鉱石のヒ素含有量は増加している。それに伴い、ヒ素で汚染した産業廃水や鉱山廃水からのヒ素の不動化技術の開発は、日本が今後、安定的に金属資源を確保していくために不可欠な課題である。本研究では、ヒ素の不動化を *Ac. brierleyi* などの鉄酸化古細菌を利用することにより、経済性があり、環境負荷の低い、ヒ素のバイオレメディエーション基盤技術を確立することを目的とする。また、未だ確固たる報告例のない古細菌のヒ素酸化メカニズムを明らかにすることにより、技術的貢献のみならず、学術的な観点からの新規知見の発展へ貢献することを目指す。

3. 研究の方法

まず、好熱性鉄酸化古細菌 *Ac. brierleyi* は、経代培養を行う度に液体培地中の As(III)濃度を若干量ずつ上げることで As(III)含有培地に適応させ、ヒ素耐性の強化を行った。また、本菌の As(III)酸化能については、培養開始時の As(III)濃度、Fe(II)濃度、S 源濃度を振ることによって、As(III)酸化が起こる条件の特定を行った。また、初期の Fe(II)と As(III)のモル比によって、生成する二次鉱物の種類にどのような変化があるかについて評価した。鉱物の分析および、生成メカニズムの解明を、以下に挙げる種々の手法を組み合わせることで行った。

- ICP 発光分光分析法: ICP-AES 溶液中の金属イオン濃度の測定、●Nano-Band Explorer: ヒ素の形態分析、●TEM(Transmission Electron Microscope) /SEM (Scanning Electron Microscope) -EDS: 二次鉱物の分布分析、●XRD (X-ray diffraction): 結晶構造解析、●XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy): 表面の元素分析、●レーザーラマン分光装置およびフーリエ変換赤外分光法 (FTIR): 鉱物の同定。

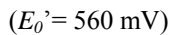
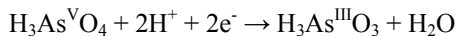
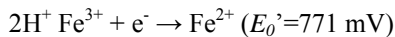
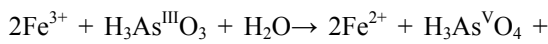
4. 研究成果(「B&I バイオサイエンスとインダストリー; トピックス」(2014年5月号掲載予定)にて発表した文章をもって、本研究成果報告とする)

(1) *Ac. brierleyi* の As(III)酸化能
ここで対象とする銅製錬廃液は、高温

(50-80) かつ強酸性(pH 1-2)であり、Fe(II)およびAs(III)がそれぞれ 1000 ppm 程度含まれる。一方、*Ac. brierleyi* は至適 pH1.5-2.0、温度 70 とし、Fe(II)をエネルギー源として利用できるため、本菌の廃液処理への適用を考えた。当初、*Ac. brierleyi* がAs(III)酸化能を有することは未知であったため、As(III)酸化をFe(III)還元との化学的カップリング反応にて促進させるための電子媒体（鉱物表面など）の供給が必要であろうと思われた。ところが、本研究において、Fe(II)無添加培地においても微生物学的にAs(III)がAs(V)に酸化されること（ただしエネルギー源としては利用していない）、また酵母エキスの添加によってその反応が促進され、さらに初期As(III)濃度が高いほど、As(III)酸化が顕著に起こることが示された。

(2) As(III)・Fe(II)の酸化と不動化

上述のように、*Ac. brierleyi* による微生物学的なAs(III)酸化は酵母エキスの添加によって促進されるが、培地にFe(II)と酵母エキスを同時に添加し混合栄養的に増殖させた場合、As(III)酸化効率は更に大きく向上した。熱力学的には、下記に示すように、As(III)からAs(V)への酸化反応は、Fe(III)からFe(II)への還元反応とカップリングし得る。ところが、この反応速度は非常に遅く、電子媒体の存在無しではバルク溶液中にて観察されない。



ところが、*Ac. brierleyi* 植菌培地においては、細胞表面が電子媒体となって、この反応が大きく促進されている可能性が考えられる。鉄酸化細菌において、細胞表面の細胞外ポリマー(EPS)領域にFe(III)イオンが蓄積することが報告されているが、*Ac. brierleyi* においては、Fe(II)酸化に加えて微生物学的なAs(III)酸化も起こることから、EPS領域内でこれらのイオン種の濃度が局所的に高くなることで、反応が促進される可能性が考えられる（図1）。

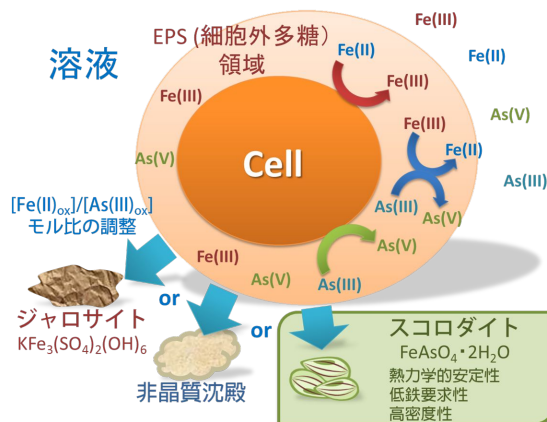


図1 As(III)酸化・不動化モデル

(3) 微生物学的に酸化されたFe(II)/As(III)のモル比と、生成する二次鉱物の種類

Fe(II)濃度とAs(III)濃度の初期設定値および、酵母エキスの有無によって、微生物学的に酸化されるFe(II)/As(III)のモル比（ $[\text{Fe(II)}]_{\text{ox}} / [\text{As(III)}]_{\text{ox}}$ ）は大きく左右される。 $[\text{Fe(II)}]_{\text{ox}} / [\text{As(III)}]_{\text{ox}} > 6.3$ では、二次鉱物として生成するのはジャロサイト($\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$)であり、この場合Asはジャロサイト表面への吸着のみで不動化している。 $2.5 < [\text{Fe(II)}]_{\text{ox}} / [\text{As(III)}]_{\text{ox}} < 5.4$ で生成する二次鉱物は非晶質であったが、 $[\text{Fe(II)}]_{\text{ox}} / [\text{As(III)}]_{\text{ox}} = 1.3$ においては、白緑色の結晶性スコロダイトが生成した。 $[\text{Fe(II)}]_{\text{ox}} / [\text{As(III)}]_{\text{ox}}$ 値がこれよりも低くなると、非晶質の沈殿物しか生成しない。そこで、 $[\text{Fe(II)}]_{\text{ox}} / [\text{As(III)}]_{\text{ox}} = 1.3$ を満たすように初期条件を設定したところ、Fe(II)とAs(III)の初期濃度が実廃液に近い1000 ppm（それぞれ18mM、13mM）において、100%に近いAs不動化効率が達成でき（図2）、また、初期酵母エキス濃度や初期細胞密度を高くすることにより、スコロダイトの結晶性を向上することが出来た。

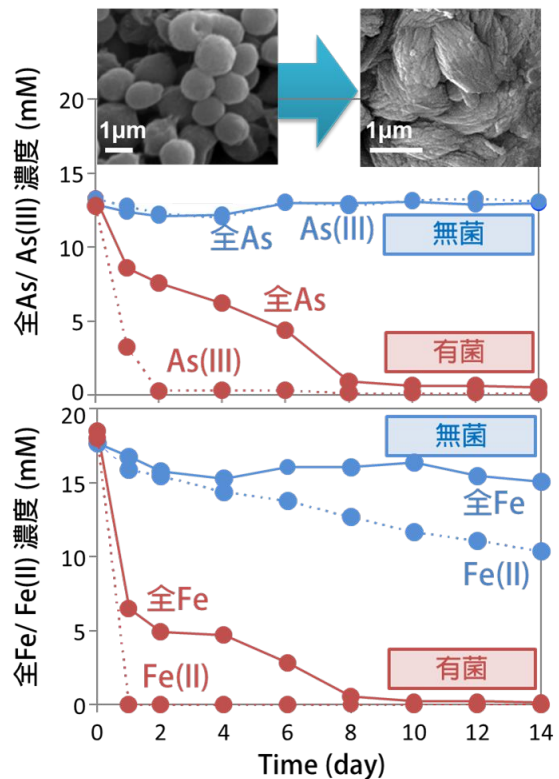


図2 溶液中のAs・Fe経時変化およびスコロダイトの析出

(4) まとめ

自然環境におけるAsサイクルには、多様な微生物代謝（As(V)還元、As(III)酸化、Asメチル化など）が関与している。これらのAs代謝に加えて、Fe(II)酸化微生物は、Fe(III)二次鉱物のバイオミネラリゼーションを通して、環境中でのAsの移動性を制御している

と考えられる。スコロダイトも As 汚染地域などで自然に生成し得る二次鉱物の1つであるが、その熱力学的安定性、低鉄要求性、高密度性といった特徴から、最も安定な As(V) 形態として廃棄に際して理想的であると言える。また、真正細菌と比較して、古細菌が As の地球化学的循環に及ぼす影響については報告が少ない。本研究では、鉄硫酸化古細菌 *Ac. brierleyi* が有する As(III)酸化能を見出し、利用することによって、ワンステップのバイオプロセスにて As(III)の酸化とスコロダイトとしての不動化を達成した。As(III)を初期基質としてワンステップにて結晶性スコロダイトを生成した例は、この研究成果が世界で初めてであり、高いインパクトをもって本成果を国際ジャーナル(Hydrometallurgy, 2014)に発表できたものとする。また、今後は、この研究成果をいかに実用化に向けて発展させるかが重要であり、製錬業界との共同研究にて技術としての発展を目指したい。

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6件)[全て査読付き国際誌]

Naoko Okibe, Masaharu Koga, Shiori Morishita, Masahito Tanaka, Shinichi Heguri, Satoshi Asano, Keiko Sasaki, Tsuyoshi Hirajima, "Microbial formation of crystalline scorodite for treatment of As(III)-bearing copper refinery process solution using *Acidianus brierleyi*", Hydrometallurgy, 143, 34-41 (2014)
DOI: 10.1016/j.hydromet.2014.01.008

Naoki Higashidani, Takashi Kaneta, Nobuyuki Takeyasu, Shoji Motomizu, Naoko Okibe, Keiko Sasaki, "Speciation of arsenic in a thermoacidophilic iron-oxidizing archaeon, *Acidianus brierleyi*, and its culture medium by inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy combined with flow injection pretreatment using an anion-exchange mini-column", Talanta, 122, 240-245 (2014)
DOI: 10.1016/j.talanta.2014.01.057

Naoko Okibe, Masashi Maki, Keiko Sasaki, Tsuyoshi Hirajima, "Mn(II)-oxidizing activity of *Pseudomonas* sp. strain MM1 is involved in the formation of massive Mn sediments around Sambe hot springs in Japan", Materials Transactions, 54, 2027-2031 (2013)
DOI: 10.2320/matertrans.M-M2013825

Naoko Okibe, Nobuaki Suzuki, Masayuki Inui, Hideaki Yukawa, "pCGR2 copy

number depends on the par locus that forms a ParC-ParB-DNA partition complex in *Corynebacterium glutamicum*", Journal of Applied Microbiology, 115, 495-508 (2013)
DOI: 10.1111/jam.12257

Naoko Okibe, Masaharu Koga, Keiko Sasaki, Tsuyoshi Hirajima, Shinichi Heguri, Satoshi Asano, "Simultaneous oxidation and immobilization of arsenite from refinery waste water by thermoacidophilic iron-oxidizing archaeon, *Acidianus brierleyi*", Minerals Engineering, 48, 126-134 (2013)
DOI: 10.1016/j.mineng.2012.08.009

Keiko Sasaki, Yoshitaka Uejima, Atsushi Sakamoto, Yu Qianqian, Junichiro Ishibashi, Naoko Okibe, Tsuyoshi Hirajima, "Geochemical and Microbiological Analysis of Sambe hot springs, Shimane Prefecture, Japan", Resource Geology, 63(2), 155-165 (2013)
DOI: 10.1111/rge.12002

[学会発表](計19件)

Astuti Widi, 平島 剛, 笹木 圭子, 沖部 奈緒子, 「大気圧下でのクエン酸によるハルマヘラ島(インドネシア)産低グレード褐鉄鉱石のニッケル抽出」, 資源・素材学会(東京), 2014.03.26.

田中 雅仁, 澤田 満, 笹木 圭子, 平島 剛, 沖部 奈緒子, 「中度好熱・好酸性細菌を利用した難処理金鉱石のバイオオキシデーション」, 資源・素材学会(東京), 2014.03.27.

正木 悠聖, 平野 伸一, 笹木 圭子, 平島 剛, 沖部 奈緒子, 「別府血の池地獄における微生物群集構造解析及び資源工学への応用へ向けた有用微生物の探索」, 資源・素材学会(東京), 2014.03.27.

Masahito Tanaka, Mitsuru Sawada, Keiko Sasaki, Tsuyoshi Hirajima, Naoko Okibe, "Biooxidation of refractory gold ore concentrates using moderately thermophilic, acidophilic bacteria.", International Conference on Biological, Civil, and Environmental Engineering (BCEE-2014) (Dubai, UAE), 2014.03.17.

Naoko Okibe, "Formation of biogenic scorodite (FeAsO₄·2H₂O) for treatment of As(III)-bearing copper refinery process solution", Biotechnology and Chemistry for GREEN GROWTH(Osaka), 2013.03.10.

Masashi Maki, Keiko Sasaki, Tsuyoshi Hirajima, Naoko Okibe, "Biorecovery of vanadium (V) using Fe(III)-reducing, acidophilic bacterium, *Acidocella aromatica* strain PFBC", International Symposium on

Earth Science and Technology 2013(Fukuoka), 2013.12.03.
Yusei Masaki, Keiko Sasaki, Tsuyoshi Hirajima, Naoko Okibe, “Fundamental study on Cr(VI) reduction by acidophilic Fe(III)-reducing bacterium, International Symposium on Earth Science and Technology” 2013(Fukuoka), 2013.12.03.
Shiori Morishita, Keiko Sasaki, Tsuyoshi Hirajima, Naoko Okibe, “As(III)-oxidation activity of thermo-acidophilic iron sulfur-oxidizing archaeon, *Acidianus brierleyi*, and its use in biogenic scorodite (FeAsO₄) formation”, International Symposium on Earth Science and Technology 2013(Fukuoka), 2013.12.03.
Daisuke Nakayama, Keiko Sasaki, Tsuyoshi Hirajima, Naoko Okibe, “Formation of Pd(0) nanoparticles by bioreduction of Pd(II) using Fe(III)-reducing, acidophilic bacteria”, International Symposium on Earth Science and Technology 2013 (Fukuoka), 2013.12.03.
沖部 奈緒子, 笹木 圭子, 「バイオマイニング研究の新展開」, 日本生物工学会 (広島), 2013.09.20.
牧 昌史, 沖部 奈緒子, 笹木 圭子, 平島 剛, 「*Acidocella* sp. PFBC 株を利用した V(V)のバイオリカバリーに関する研究」, 資源・素材学会 (札幌), 2013.09.03.
正木 悠聖, 沖部 奈緒子, 笹木 圭子, 平島 剛, 「好酸性鉄還元細菌による Cr(VI)還元に関する基礎的研究」, 資源・素材学会 (札幌), 2013.09.03.
森下志織, 沖部 奈緒子, 笹木 圭子, 平島 剛, 「好熱好酸性鉄硫酸化古細菌 *Acidianus brierleyi* によるヒ素(As)酸化に関する研究」, 資源・素材学会 (熊本), 2013.05.31.
沖部奈緒子, 古賀雅晴, 笹木圭子, 平島剛, 平郡伸一, 浅野聡, 「好熱性古細菌を利用した As(III)の不動態化」, 資源・素材学会 (東京), 2013.03.
正木悠聖, 沖部奈緒子, 笹木圭子, 平島剛, 「好酸性鉄還元細菌を利用した Cr()のバイオレメディエーションに関する研究」, 資源・素材学会 (東京), 2013.03.
古賀雅晴, 沖部奈緒子, 笹木圭子, 平島剛, 「好熱性鉄酸化古細菌を用いた産業排水中の亜ヒ酸不動態化に関する研究」, 資源・素材学会 (秋田), 2012.09.
正木悠聖, 沖部奈緒子, 笹木圭子, 平島剛, 「酸性鉄還元細菌を利用した Cr()のバイオレメディエーションに関する研究」, 資源・素材学会 (秋田), 2012.09.
牧昌史, 沖部奈緒子, 笹木圭子, 平島剛, 「三瓶温泉からのマンガン酸化微生物の単離・同定および諸特性の解析」, 資源・素材学会 (秋田), 2012.09.
Naoko Okibe, Masaharu Koga, Keiko Sasaki,

Tsuyoshi Hirajima, “Simultaneous oxidation and immobilization of arsenite from refinery waste water by thermoacidophilic iron-oxidizing archaeon, *Acidianus brierleyi*,” Biohydrometallurgy `12 (Falmouth, UK), 2012.06.19.

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称: 砒素の処理方法
発明者: 沖部奈緒子、浅野聡、平群伸一
権利者: 同左
種類: 特許
番号: 特願 2012-188810
出願年月日: 2012 年 08 月 29 日
国内外の別: 国内

〔その他〕
<http://process.mine.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖部 奈緒子 (OKIBE, Naoko)
九州大学大学院 工学研究院
地球資源システム工学部門・准教授
研究者番号: 30604821