

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15318

研究課題名（和文）海洋微生物を用いた濃縮海水からのレアメタル回収

研究課題名（英文）Recovery of rare metal from concentrated seawater using marine microorganisms

研究代表者

寺原 猛 (TERAHARA, TAKESHI)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号：70547059

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：東京湾や岩手県大槌湾などで採取した海底堆積物から微生物を分離した。六価クロム（以下、Cr(VI)）50 mg/Lを含有した培地に分離株を画線してCr(VI)耐性を調べた結果、100株以上のCr(VI)耐性株が得られた。また、oil spreading testにより、分離株のバイオサーファクタント（以下、BS）産生を調べた結果、100株以上のBS産生株が得られた。それらの分離株の中には、新種として提唱したBS産生株や、Cr(VI)含有の液体培地を用いた培養により、培養物にクロムが含まれることが確認された菌株があり、新たな知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境中に存在する細菌種の数に比べると、現在知られている細菌種は僅かであると推定されていることから、大槌湾の海底堆積物から分離されたBS産生株を新種として提唱したことは学術的意義があるといえる。また、Cr(VI)は毒性がある一方でクロムはレアメタルの一つであり、海底堆積物から分離された菌株において、Cr(VI)含有の液体培地を用いた培養により、培養物にクロムが含まれることが示唆された知見が得られたことは、更なる検討が必要ではあるが、意義のあることと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Microorganisms were isolated from marine sediments collected from Tokyo Bay and Otsuchi Bay. More than 100 isolates were observed to be Cr(VI)-resistant using a medium containing Cr(VI) concentration of 50 mg/L. In addition, more than 100 isolates showed the ability to produce biosurfactant (BS) according to oil spreading test. Of these isolates, further analysis revealed that a BS-producing bacterium was found to be a novel species, and chromium was detected in some cultures after incubation using liquid media containing Cr(VI) concentration of 50 mg/L.

研究分野：環境微生物

キーワード：海底堆積物 微生物 クロム バイオサーファクタント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レアメタルは身の回りの様々な機器に使用されており、我々の生活に欠かすことができないものである。しかしながら、レアメタルの産出は地域的な偏りがあることが多く、輸出入に関して不安定な政情等に左右されることもあることから、その供給構造は脆弱といえる。また、アジア・アメリカ・ヨーロッパの主要 10 か国の経済成長モデルに基づいて、種々の金属の需要量を予測したところ、2050 年までの累積需要量が現有埋蔵量を上回る金属が数多く存在することが予測されている(文献)。このように、レアメタルは安定的な確保が求められるものであるが、レアメタルに該当する金属の中には、強い毒性によって環境基準が設けられているものもある。たとえば、クロムはレアメタルの一つである一方、六価クロム(以下、Cr(VI))の毒性は強く、環境基準(0.05 mg/L 以下、水道水の水質基準値は 2020 年 4 月より 0.02 mg/L 以下に見直し)が設けられている。

一方、海水中には微量ではあるが、多くのレアメタルが存在している。また、日本には海洋深層水取水施設や海水淡水化施設があり、このような施設からは濃縮海水が副産物として放出されている。海水中のレアメタルは低濃度で様々な物質と共存しており、このような状況では生物機能を活用した手法の方が物理・化学的手法よりも省エネルギー・環境適合型技術として有望であると考えられる。近年、生物による多様な金属の代謝や、金属との相互作用に関わる反応を利用する生物学的技術として「メタルバイオテクノロジー」が提唱され、注目されている(文献)。そして、微生物のバイオソープション(生物吸着)に着目したインジウムの回収(文献)や、微生物機能を用いたレアメタル(セレン・テルル)の回収に関する研究が報告されている(文献)。また、研究代表者も東京湾の荒川河口域の底泥から分離した放線菌を調べたところ、塩分(NaCl 6%)の条件下で、基準株(土壌からの分離株)に比べて、Cr(VI)濃度を顕著に減少することを報告した(文献)。このようなことから、海洋環境から分離した微生物の中には耐塩性があり、レアメタル回収にも適用できることも考えられるが、研究はあまり行われていない。

2. 研究の目的

上述したレアメタルの課題に対する解決の一つとして、既往研究を踏まえて、「海洋微生物を用いた濃縮海水からのレアメタル回収」を着想した。これまでの研究成果から、東京湾の河口域には有望微生物が存在すると考えられるので、東京湾の荒川・江戸川・多摩川の河口域から採取したサンプルから微生物を分離する。また、日本各地で採取した海底堆積物からも微生物の分離を行う。分離株についてはCr(VI)耐性などを調べ、有望株は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列により、微生物種の同定を行う。そして、培養温度・pH・塩分濃度などの種々の条件にて、有望株のレアメタル回収を検証し、最適条件を検討する。また、培養液上清や超音波破砕で得られる菌体破砕液についても、レアメタル回収効果を調べる。これらにより、海水の塩分(NaCl 3.5%)以上の高塩分濃度でのレアメタル回収技術の開発に向けた知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

東京湾の荒川・江戸川・多摩川の河口域などから、本学の研究練習船「ひよどり」を活用し、海底堆積物を採取した。採取の様子を図 1 に示す。また、岩手県大槌湾でも堆積物を採取した。採取時には、水温・塩分などの環境データも水質計(DataSonde5 (Hydrolab, USA) など)により測定した。

採取した堆積物を 3%食塩水で適宜希釈した。Bushnell-Haas 培地(文献)や ISP-4 培地(文献)を基にして改良した NaCl 濃度 3%の培地(滅菌したオリーブオイルもしくはエンジンオイルを唯一の炭素源として添加)を用い、希釈したサンプルを 100 μ L 塗抹し、27 $^{\circ}$ C で 1 週間程度培養した。培養後、コロニーを選択し、純粋分離を行った。分離株のバイオサーファクタント(以下、BS)産生を Oil spreading test(文献)により評価した。さらに BS 産生株の培養上清中の BS の性質を調べ、有望株については 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいた細菌種の同定を行った。なお、大槌湾より分離された 1 株については、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性の結果に基づいて、最も近縁とされる既知の細菌種 2 株も用い、ドラフトゲノムのデータ、および生理・生化学的諸性状などについて比較・評価を行った。

また、採取した堆積物を生理食塩水などで適宜希釈した後、放線菌用の分離培地である ISP-4 培地に塗抹し、27 $^{\circ}$ C で 2 週間の培養も行った。培養後、放線菌様のコロニーを目視により選択し、純粋分離を行った。分離した菌株は、50 mg/L の Cr(VI)を含む培地にて培養し、Cr(VI)耐性を調べた。さらに、50 mg/L の Cr(VI)耐性が確認された菌株については、より高濃度での Cr(VI)耐性の評価、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいた細菌種の同定、ならびに液体培地を用いた培養過程において、培養上清や菌体の Cr(VI)濃度と総 Cr(VI)濃度を測定した。



図 1 東京湾での採泥の様子

4. 研究成果

採取した堆積物を適宜希釈した後、NaCl 濃度 3%の培地(滅菌したオリーブオイルもしくはエンジンオイルを唯一の炭素源として添加)を用いて細菌を分離・培養し、Oil spreading test により分離株の BS 産生を評価した結果、100 株以上の BS 産生株が得られた。そして、BS 産生株の培養上清を調べた結果、それらの中にはアニオン性の BS が含まれることが示された。金属イオンはカチオン性であり、アニオン性の BS は金属イオンとの結合が示唆される。また、大槌湾より分離された BS 産生株の中で、16S rRNA 遺伝子に基づいた同定の結果、最も近縁とされる既知の細菌種 2 株との相同性が 98.8%である菌株 (OTB305 株) が得られた。そこで、種々の基準株の 16S rRNA 遺伝子配列を用いて系統解析を行ったところ、OTB305 株は最も近縁とされる 2 菌株とともにクラスターを形成したが、これら 2 菌株とは異なることが示唆された (図 2)。

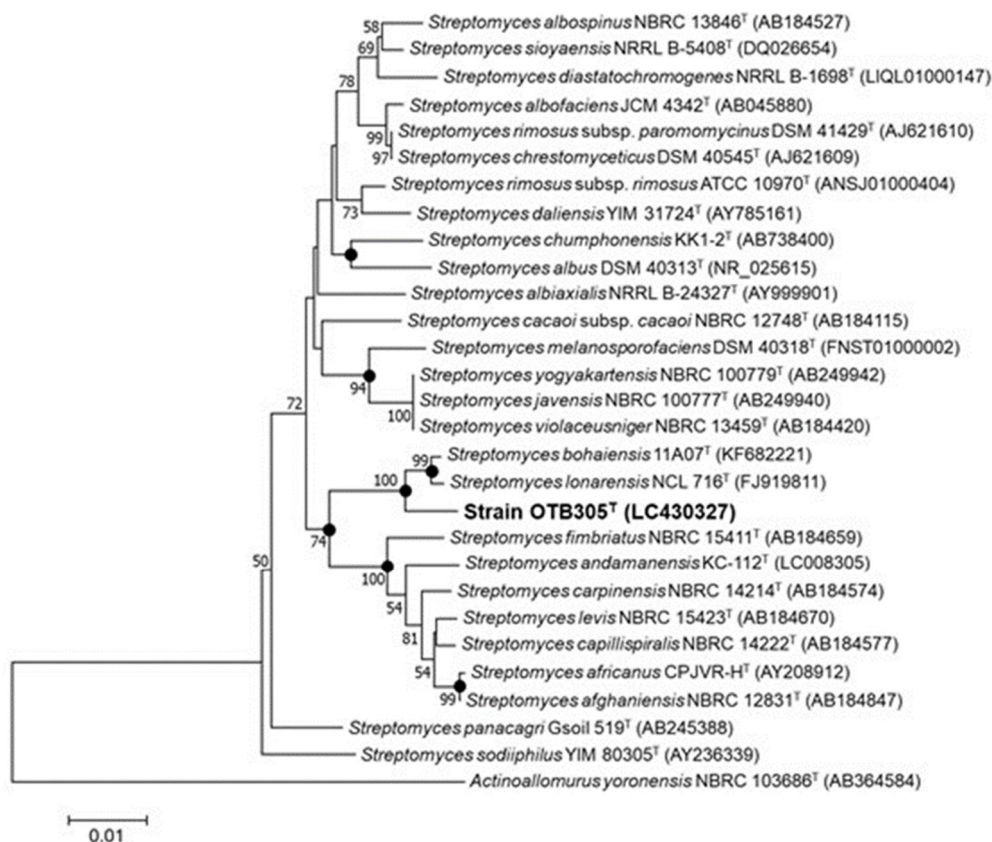


図 2 OTB305 株と種々の基準株の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹 (Terahara et al. 2019)

16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性と DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験の結果を比較・評価した結果、16S rRNA 遺伝子配列の相同性 98.7-99.0%は、新種が示唆される閾値として報告されている (文献)。そのため、ゲノム情報を用いて詳細に解析することとした。OTB305 株とこれら 2 菌株のドラフトゲノムを取得して解析した結果、OTB305 株は新種であることが示唆された。そこで、生理・生化学的諸性状なども加えて比較・評価し (表 1) 新種として提唱した。

表 1 OTB305 株と近縁種 2 株の生理・生化学的諸性状などの比較 (Terahara et al. 2019)

Characteristics	Strain OTB305 ^T	<i>S. bohaiensis</i> JCM 19630 ^T	<i>S. lonarensis</i> DSM 42084 ^T
Morphology of:			
Spore chains	Rectiflexibiles	*Straight or rectiflexibiles	*Rectus-Flexibilis
Spore surface	Smooth	*Smooth	*Smooth
NaCl conc. range for growth (w/v, %)	1-6	*0-11	*0-6
Biosurfactant production by oil spreading test (cm)	2.5	-	-
Enzyme activity of:			
Acid phosphatase	w	w	+
β-glucosidase (Esculin hydrolysis)	-	+	+
Trypsin	-	w	+
Pyrazine amidase	+	-	-
Valine arylamidase	w	w	+

-. negative, w: weakly positive, +: positive

* Data taken from Pan et al. *J Antibiot* (2015) and Sharma et al. *Antonie van Leeuwenhoek* (2016)

Terahara et al. (2019) "*Streptomyces otsuchiensis* sp. nov., a biosurfactant-producing actinobacterium isolated from marine sediment." *Int J Syst Evol Microbiol* 69:3740-3744

また、採取した堆積物から種々の条件で分離・培養した細菌について、Cr(VI)50 mg/L を含有した培地に分離株を画線して Cr(VI)耐性を調べた結果、100 株以上の Cr(VI)耐性株が得られた。これらの耐性株について、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいた細菌種の同定を行ったところ、種々の細菌種が同定された。さらに、これらの耐性株の中から、より高濃度での Cr(VI)耐性の評価や Cr(VI) 50 mg/L 含有の液体培地を用いた培養を行い、培養液や菌体などにおける Cr(VI)濃度と総クロム濃度を調べた。その結果、培養後のいくつかの菌体にクロムが含まれることが示唆された。今後、更なる検討が必要ではあるが、微生物を用いた資源の回収に向けた知見が得られた。

<引用文献>

- (独)物質・材料研究機構、2050年までに世界的な資源制約の壁、2007、
<https://www.nims.go.jp/news/press/2007/02/200702150/p200702150.pdf>
- 山下 光雄、清 和成、地球を救うメタルバイオテクノロジー-微生物と金属資源のはなし-、成山堂書店、2014
- 東 あるみ、齋藤 範三、荻 崇、小西 康裕、バイオ吸着によるインジウムの回収と使用済み液晶パネル資源化への応用、日本金属学会誌、75 巻、2011、620-625
- Soda, S., Hasegawa, A., Kuroda, M., Hanada, A., Yamashita, M., & Ike, M. Selenium recovery from kiln powder of cement manufacturing by chemical leaching and bioreduction. *Water Science and Technology*, 72, 2015, 1294-1300
- Kagami, T., Fudemoto, A., Fujimoto, N., Notaguchi, E., Kanzaki, M., Kuroda, M., Soda, S., Yamashita, M., & Ike, M. Isolation and characterization of bacteria capable of reducing tellurium oxyanions to insoluble elemental tellurium for tellurium recovery from wastewater. *Waste and Biomass Valorization*, 3, 2012, 409-418
- Terahara, T., Xu, X., Kobayashi, T., & Imada, C. Isolation and characterization of Cr(VI)-reducing Actinomycetes from estuarine sediments. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175, 2015, 3297-3309
- Bushnell, L. D., & Haas, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 41, 1941, 653-673
- Shirling, E. T., & Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16, 1966, 313-340
- Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y., & Imanaka, T. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *Journal of bacteriology*, 175, 1993, 6459-6466.
- Stackebrandt, E., & Ebers, J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today*, 33, 2006, 152-155

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeshi Terahara, Takuya Naemura, Yukiko Nampo, Takeshi Kobayashi, Chiaki Imada, Moriyuki Hamada, Tomohiko Tamura	4. 巻 69
2. 論文標題 Streptomyces otsuchiensis sp. nov., a biosurfactant-producing actinobacterium isolated from marine sediment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 3740-3744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.003638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南保 由貴子, 苗村 卓弥, 寺原 猛, 浜田 盛之, 田村 朋彦, 小林 武志, 今田 千秋
2. 発表標題 大槌湾海底堆積物より分離したバイオサーファクタント生産放線菌の諸性状
3. 学会等名 第33回（2018年度）日本放線菌学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----