

平成 22 年 6 月 2 日 現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19510091  
 研究課題名 (和文) 鉄・マンガン酸化細菌群集による微量金属の除去機構と地下水浄化技術への応用  
 研究課題名 (英文) Trace metal removal by iron and manganese oxidizing microbial communities and its application to purification of contaminated groundwater  
 研究代表者  
 宮田 直幸 (MIYATA NAOYUKI)  
 秋田県立大学・生物資源科学部・准教授  
 研究者番号：20285191

研究成果の概要 (和文)：本研究は、鉄・マンガン酸化細菌を集積したバイオリアクターを構築し、金属汚染地下水浄化への適用可能性を示すことを目標とした。集積培養系により産生される鉄・マンガン酸化物が亜鉛等の微量金属を高効率で吸着除去できることを明らかにした。さらにこの金属酸化物の形成には、 $\alpha$ -プロテオバクテリア綱に属する新奇細菌群が大きく関与することを示した。鉄・マンガン酸化集積培養系による金属浄化においては、この細菌群の挙動に着目して浄化プロセスの管理を行うことが重要であると考えられた。

研究成果の概要 (英文)： The aim of this study was to develop a microbial enrichment culture that produces biogenic ferromanganese oxides and to show the applicability of the microbial culture to purification of groundwater contaminated with trace metal ions. The biogenic oxides showed a high ability for sorption of dissolved trace metals such as  $Zn^{2+}$ . It was suggested that an unknown group of  $\alpha$ -*Proteobacteria* played a major role in the Mn oxide production. Further analysis of such bacteria would lead to the development of effective bioprocesses for purification of contaminated groundwater.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：環境微生物工学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：鉄・マンガン酸化細菌、難培養性細菌、細菌群集構造、微量金属、地下水浄化

## 1. 研究開始当初の背景

近年、重金属やヒ素など微量有害金属による地下水汚染が大きな問題になっている。我が国では、鉛やカドミウム、セレン、ヒ素など数元素が水質環境基準に挙げられているほか、ニッケル、モリブデン、アンチモン、

マンガン、ウランが要監視項目に挙がっており、さらに平成 15 年には亜鉛の環境基準が設定され、人の健康保護だけでなく生態系保全の観点からも金属汚染リスクの重要性が議論されるようになった。また、東南アジア諸国でみられるように、水資源の需要拡大や

枯渇化のため、地質的要因により著しく汚染された地下水であっても利用せざるを得ない逼迫した状況も生じている。このような汚染地下水の浄化技術として、キレート樹脂やイオン交換樹脂等による物理化学的処理法が挙げられるが、概して高コストのため、経済性の高い浄化技術の開発が課題となっている。

一方、微生物の鉄・マンガン酸化作用を利用した地下水の除鉄・除マンガン処理は、薬品注入が不要であり、低環境負荷の処理法として近年注目されている。さらに、微生物の鉄・マンガン酸化作用で生成する鉄・マンガン酸化物は低結晶性で表面積が大きいいため、金属イオンの優れた吸着担体として機能することが明らかにされつつある。従って、鉄・マンガン酸化微生物を高度に保持した安定な開放系（非滅菌系）バイオリアクターを構築できれば、地下水中の鉄・マンガンを沈積させながら、混在する微量有害金属を連続除去できることが期待された。

## 2. 研究の目的

本研究では、鉄・マンガン酸化微生物を利用した金属汚染地下水の浄化技術を開発することを最終目的として、基礎的な検討を進めた。まず、鉄・マンガン酸化微生物の安定な集積培養系の構築を検討した。次に、得られた集積培養系による鉄・マンガンの酸化特性や微量金属イオンの吸着特性を調査して、金属イオンの除去性能を評価した。また分子生物学的手法や培養手法を用いて集積培養系の細菌群集構造を解析し、鉄・マンガン酸化反応を担う細菌群の特定を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 集積培養法： マンガン (Mn) 酸化細菌の集積培養系は、以前に河川床生物膜を植種として作製し、継代維持していたものを用いた<sup>1)</sup>。この集積培養系の一部を 1~5 mg/L の  $Mn^{2+}$  及び鉄 ( $Fe^{2+}$ ) を含む集積用培地 2 L (50 mg/L 酢酸ナトリウム、20 mg/L ペプトン、5 mg/L  $KH_2PO_4$  を水道水に溶解) で回分培養し、 $Fe \cdot Mn$  酸化細菌集積培養系を調製した。なお、培養液の pH は、pH コントローラーにより  $7.0 \pm 0.2$  に維持した。

(2) 金属イオンの吸着実験： 各集積培養系より金属酸化物を含む培養菌体を回収し、水洗後に凍結乾燥して使用した。凍結乾燥試料を 40 mM HEPES 緩衝液 (pH7.0) に懸濁して、種々の濃度で  $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  または  $Zn^{2+}$  を添加した。水相の金属濃度は誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) により定量した。

また各集積培養系を一定量採取し、 $Fe^{2+}$  と  $Mn^{2+}$  を 5 mg/L ずつ添加して回分培養した。このとき微量 (50、100  $\mu g/L$ ) の  $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  及

び  $Zn^{2+}$  を同時に添加し、 $Fe \cdot Mn$  を酸化しながら微量の金属イオンを吸着除去できるか試験した。

(3) 細菌群集構造の解析： 集積培養物から UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MO BIO) を用いて核酸を抽出した後、16S rRNA 遺伝子をユニバーサルプライマー (519f, 1492r) を用いて PCR 増幅した。PCR 産物を用いてクローンライブラリーを作製した後、ライブラリーより約 50 クローンを選出し、塩基配列の解析を行った。得られた塩基配列について、遺伝子データベースを用いて BLAST による相同性検索を行った。また分子系統樹の作成は近隣結合法で行った。

【参考文献】 1) N. Miyata et al. J. Biosci. Bioeng., 103, 432-439 (2007)

## 4. 研究成果

(1)  $Fe \cdot Mn$  酸化集積培養系の構築： 培養開始直後では 1 mg/L の溶存  $Mn^{2+}$  を除去するのに 2 週間を要したが、回分培養を繰り返すことで、添加した  $Mn^{2+}$  (1~5 mg/L) は 2~3 日で除去されるようになった (図 1)。従って、培養日数の経過とともに Mn 酸化細菌が集積し、その後安定して維持されたものと推察された。一方試験開始直後から、溶存態 Fe は添加後直ちに除去されたため、Fe 除去では化学酸化の寄与が大きいと考えられた。

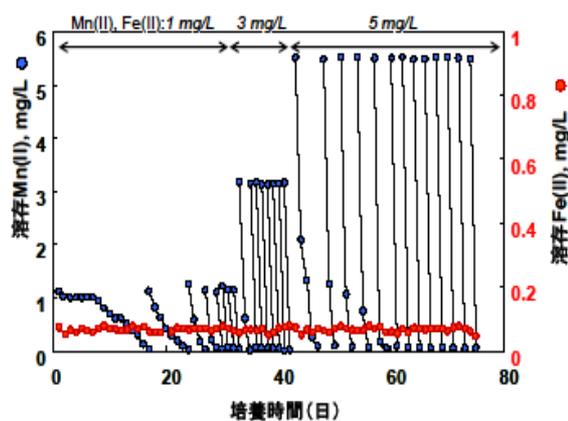


図 1. 鉄・マンガン酸化集積培養系の構築 (回分式リアクター)

(2) 集積培養系の金属イオン吸着特性：Mn 酸化集積系及び Fe・Mn 酸化集積系中の酸化形態 Fe、Mn の含量を調べたところ、調査した培養期間において、Fe・Mn はほぼ一定量保持されていることが示された (表 1)。

これらの Mn 酸化または Fe・Mn 酸化集積系を用い、Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> に対する吸着等温線を作成した (図 2 及び表 2)。両集積系において、各金属イオンの吸着は Freundlich 式によく従うこと、また金属イオンの吸着性能は同程度であることがわかった。両集積系の Mn 酸化物の含量は同等であること (表 1)、また一般的に、pH 中性付近で Mn 酸化物は負に、Fe 酸化物は正の電荷に富むことから、両試料による金属陽イオンの吸着には Mn 酸化物が主要な役割を果たしていると推察された。Fe による金属イオン吸着の顕著な妨害は認められなかった。

表 1. 集積培養系の酸化形態 Fe・Mn 含量

培養系	期間(日)	SS(mg/L)	Mn(wt%)	Fe(wt%)
Mn 酸化系	195-393	96-355	21±2*	-
Fe・Mn 酸化系	60-75	449-456	18±2**	6.0±0.3**

\*, n=8; \*\*, n=4

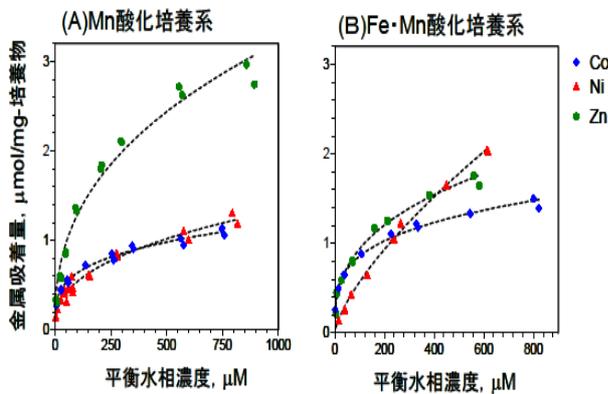


図 2. 集積培養系による金属イオンの吸着等温線 (pH = 7.0、25°C)

表 2. 集積培養系による金属イオンの吸着特性\*

	Mn 酸化集積系			Fe・Mn 酸化集積系		
	A	B	r <sup>2</sup>	A	B	r <sup>2</sup>
Co <sup>2+</sup>	0.19	0.27	0.984	0.26	0.26	0.993
Ni <sup>2+</sup>	0.09	0.39	0.972	0.02	0.71	0.996
Zn <sup>2+</sup>	0.21	0.40	0.975	0.18	0.36	0.984

\* Freundlich 式でフィッティングして求めた

$$q = A \cdot c^B$$

q: 固相濃度 (μmol/mg)

c: 水相濃度 (μmol/L)

(3) 集積培養系による微量金属イオンの同時除去：50 μg/L の Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>及び Zn<sup>2+</sup>を添加した培地 (Fe<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> : 5 mg/L 添加) で各集積系を回分培養した結果を図 3 に示す。Mn 酸化集積系よりも Fe・Mn 酸化集積系の方が、添加した Mn<sup>2+</sup>は急速に減少し、高い除去率が得られた。このことから、Fe が溶存態 Mn の除去 (酸化または吸着) に影響を及ぼすことが示唆された。両培養系において、Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>及び Zn<sup>2+</sup>の高い除去率 (70~99%) が得られた。このことは、高濃度の Mn、Fe が存在しているも、微量で混在する金属イオンを同時除去可能であることを示している。微量金属イオンの除去速度や除去率を比較すると、高い順に Co > Ni > Zn となった。Co は Mn 酸化物により酸化されて不溶化するため、高い除去率が得られたと推察された。3 種の金属イオンを 100 μg/L の濃度で添加しても、同様の結果を得ることができた。

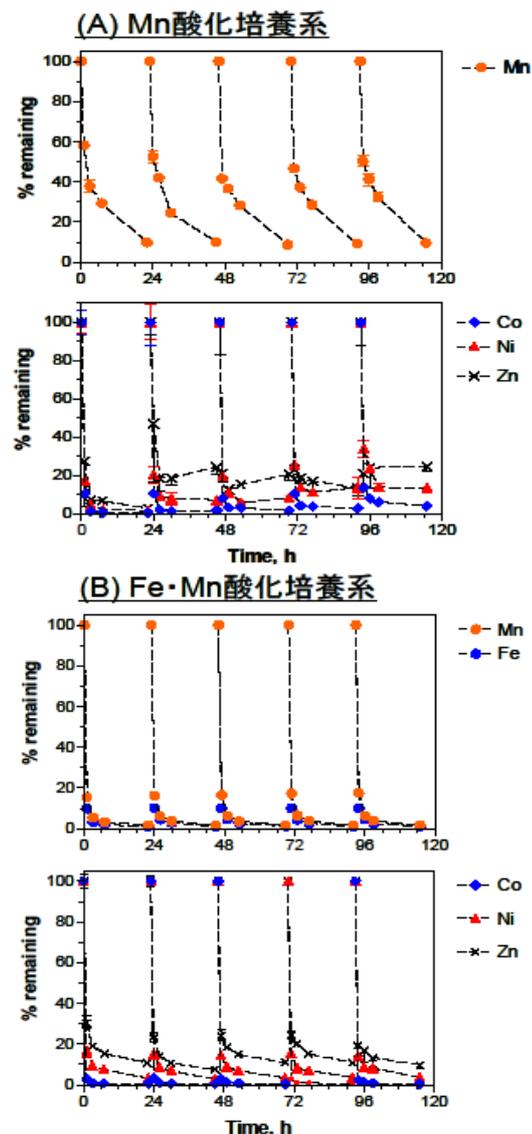


図 3. 集積培養系による微量金属イオンの同時除去【添加濃度】Mn・Fe = 5 mg/L、Co・Ni・Zn = 50 μg/L

(4) 集積培養系の細菌群集構造：集積培養系による微量金属イオンの除去には、Mn 酸化物が大きく関与していた。そこで、Mn 酸化物形成を担う細菌群を明らかにするため、Mn 酸化集積系を対象として細菌群集構造の解析を行った。その結果、 $\alpha$ -Proteobacteria 綱 (*Rhizobiaceae*、*Hyphomicrobiaceae*、*Rhodobacteraceae* 及び *Acetobacteraceae*) や *Bacteroides* 門 (*Crenotrichaceae*、*Flexibacteraceae* 及び *Saprospiraceae*) のほか、系統的に多様な細菌種がクローンとして検出された (図 4)。その中で、既知の Mn 酸化細菌である *Pedomicrobium* 属 及び *Leptothrix* 属に近縁の配列が見いだされ (図 5: MSU56 及び MSU31)、それらに近縁の Mn 酸化細菌が存在していたことがわかった。しかし、クローン配列の検出数は、解析したクローン全体 (44 個) の内、各々 1 個ずつと少なく、本集積系の主要な細菌群ではない可能性が考えられた。

(5) 集積培養系の Mn 酸化に関与する細菌群の特定：クローン解析では Mn 酸化に関与する細菌群を特定することは困難であったため、平板培地を用いた培養法により Mn 酸化細菌の分離を試みた。Mn 酸化集積系から Mn 酸化細菌 UAY-3 株と UJ-2 株を単離した。16S rRNA 遺伝子配列の解析により、UAY-3 株は *Bosea* 属、UJ-2 株は新奇の Mn 酸化細菌であることがわかった。しかし両菌株とも、クローン解析では相同性の高い配列は検出されなかったため (図 5)、集積系の主要な Mn 酸化細菌であるかは不明であった。

その後の検討により、平板培地上で酵母様微生物と共存してコロニーを形成する Mn 酸化細菌 (I 株) を取得した (図 6)。I 株と酵母様微生物は細胞サイズの違い (各々、約 0.5  $\mu\text{m}$  と 2.5  $\mu\text{m}$ ) により、孔径 0.8  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルターを用いて濾過分離することができた。分離した I 株は、用いた培地 (3 mM 酢酸ナトリウム、150 mg/L 酵母エキス、10 mg/L 硝酸カリウム、5 mg/L リン酸水素二カリウム、0.1 mM 塩化マンガン、10 mM HEPES 緩衝液 (pH7.0)、ほか無機塩類及びビタミン類を含む) では、単独で増殖できなかつた (図 7)。しかし、上記の酵母様微生物のほか、*Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* など種々のグラム陰性・陽性細菌、*Aspergillus niger* 等の真菌が共存すると増殖し、Mn<sup>2+</sup>を酸化することが明らかになった (図 7)。

16S rRNA 遺伝子解析の結果、I 株は  $\alpha$ -Proteobacteria 綱に属するが、種々の未培養の環境クローン配列と独自のクラスターを形成した (図 8)。さらに、I 株の遺伝子配列と一致する配列が Mn 酸化集積培養系のクローンライブラリー中に見いだされた (図 5・図 8 中の“MSU51”)。この配列は全クロー

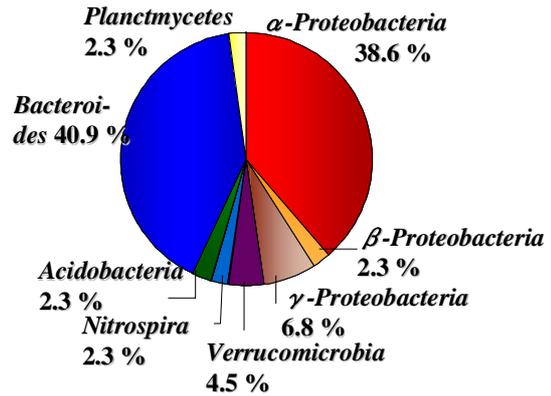


図 4. クローンライブラリー法による Mn 酸化集積培養系の細菌群集構造の解析結果

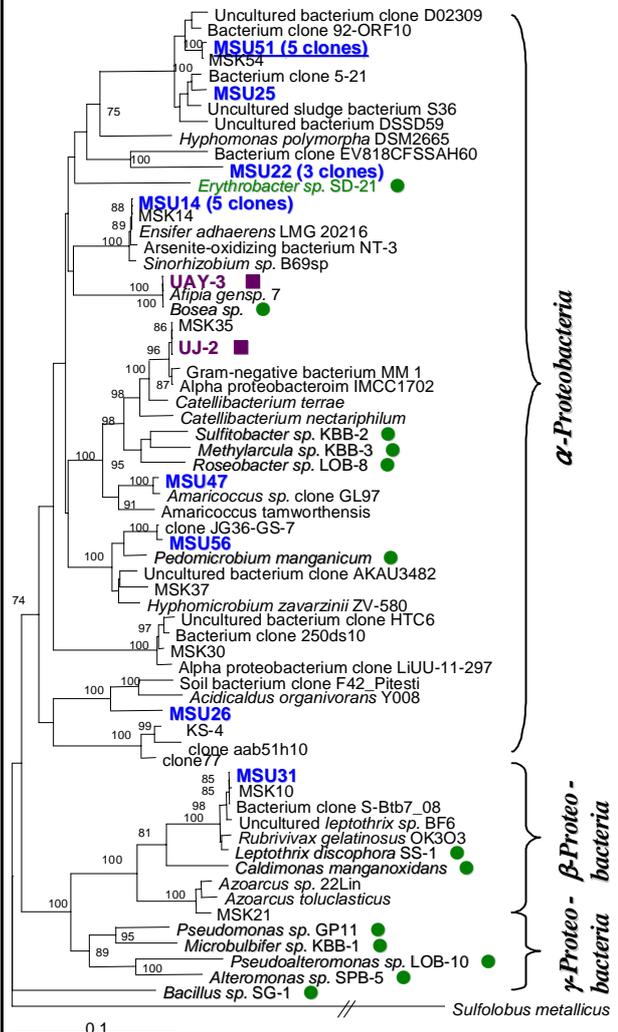


図 5. Mn 酸化集積系より得られたクローン配列及び培養法により分離された Mn 酸化細菌  
 MSU : Mn 酸化集積系由来のクローン配列  
 ■ : " Mn 酸化細菌 (単離株)  
 ● : 既知の Mn 酸化細菌

ンの11%を占めていたことから、I株（またはその近縁種）が、本集積培養系の主要細菌群としてMn酸化機能を担っていることが示唆された。

この細菌群をPCR検出可能なプライマーを作製し、もう一方のFe・Mn酸化集積培養系についてもクローンライブラリー法による解析を行った。その結果、この集積系からもI株と高い相同性を示す配列を検出することができた。さらに、ある水処理プロセスで

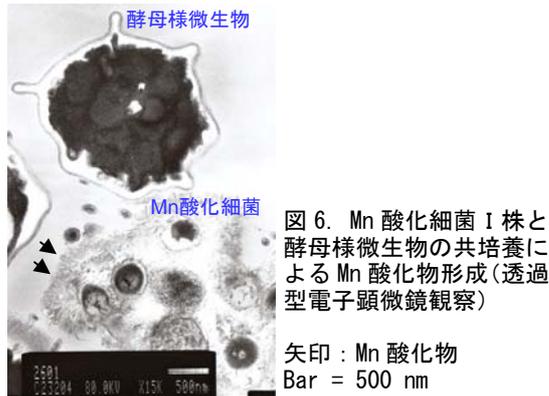


図6. Mn酸化細菌I株と酵母様微生物の共培養によるMn酸化物形成(透過型電子顕微鏡観察)

矢印: Mn酸化物  
Bar = 500 nm

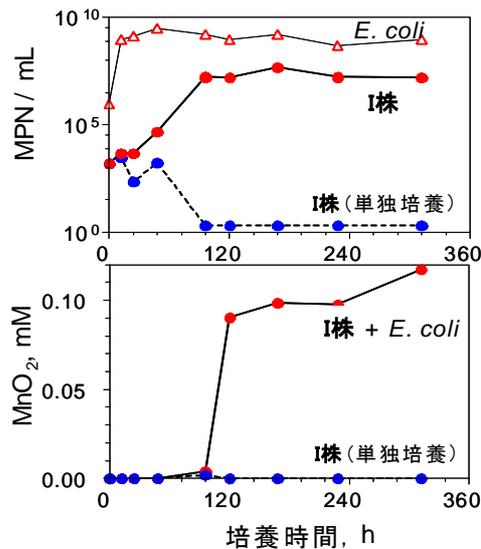


図7. *Escherichia coli* との共培養におけるMn酸化細菌I株の増殖及びMn酸化物の形成

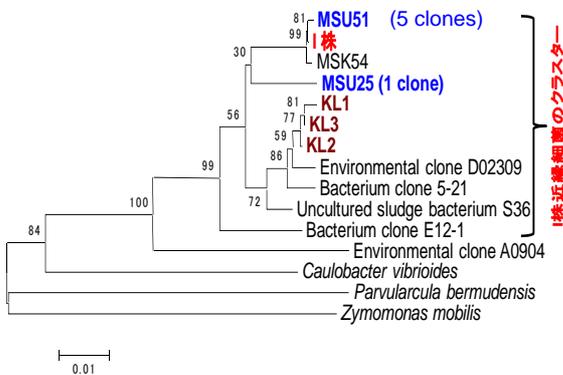


図8. Mn酸化細菌I株を含む細菌群の分子系統樹 ( $\alpha$ -Proteobacteria)

沈積したMn酸化物(散水濾床の濾材表面で形成)を入手し試験したところ、やはり同様の配列が得られ、この細菌群が種々の環境におけるMn酸化物形成に広く関わっている可能性が示された(図8: KL1~3)。

以上の結果から、I株を含む新奇 $\alpha$ -Proteobacteria網細菌群が集積培養系の主要なMn酸化細菌として機能していることが示唆された。I株は多様な微生物共存下で増殖してMnを酸化することから、微生物集団の中で生残し易い特性をもつことが窺えた。本研究により、本菌とその近縁種がMn動態に関わる重要な機能をもつことが示された。

#### (6) まとめ

- 本研究では、回分培養法により2つの集積培養系(Mn酸化とFe・Mn酸化)を構築し、微量金属イオンの浄化性能、及びその集積系の機能を担う細菌群を明らかにした。Fe・Mn酸化集積系において、Fe酸化は主として化学反応の寄与が、Mn酸化は生物反応の寄与が大きいと推察された。
- 各集積培養系の $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 及び $\text{Zn}^{2+}$ の吸着等温線を作成した結果、Freundlich式に従うことが示された。また、5 mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ ・ $\text{Mn}^{2+}$ と微量(50または100  $\mu\text{g/L}$ )の $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 及び $\text{Zn}^{2+}$ を同時に添加して回分培養したところ、Mn酸化物の形成に伴い、微量金属イオンが水相より高効率で除去されることが明らかになった。これにより、金属汚染地下水の浄化への適用可能性が示された。
- 集積培養系による金属浄化の鍵となるMn酸化細菌群について調査解析した。集積培養系より分離したI株は、 $\alpha$ -Proteobacteria網に属する新規Mn酸化細菌であった。さらに、細菌群集構造の解析により、本菌またはその近縁種が集積培養系の主要な細菌群として機能していたことが示唆された。本研究により、I株を含む細菌群が金属酸化に関わる重要な機能をもつことが明らかになった。Fe・Mn酸化集積培養系による金属浄化においては、この細菌群の挙動に着目しながら浄化プロセスの管理を行うことが重要であると考えられた。

## 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下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Miyata, N., Tani, Y., Sakata, M., and Iwahori, K., Microbial manganese oxide formation and interaction with toxic metal ions, Journal of Bioscience and Bioengineering, 104 (1), 1-8 (2007).  
査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 宮田直幸, 齊藤和之, 山口天聡, 岡野邦宏, 尾崎保夫: 難培養性マンガン酸化細菌の分離とその増殖特性, 日本水処理生物学会第46回大会(高知市) (2009年11月12日)
- ② Miyata, N., Saito, K., Okano, K., and Ozaki, Y., Manganese(II) oxidation by a unique alphaproteobacterium that grows symbiotically in cocultures with a broad range of microorganisms, ISEB 19 (Hamburg, Germany) (September 18, 2009)
- ③ 宮田直幸, ヲウワホリケン・アヲ, 谷幸則, 坂田昌弘, 岩堀恵祐, 鉄・マンガン酸化細菌群集による微量有害金属の除去特性, 第42回日本水環境学会年会(名古屋市) (2008年3月20日)

[図書] (計1件)

- ① 宮田直幸, 岩堀恵祐, 貴金属・レアメタルのリサイクル技術集成, 第2編第8節 微生物(Mn(II)酸化菌)によるマンガン回収技術, p 353-358, エヌ・ティー・エス(2007).

[その他]

ホームページ:

<http://www.akita-pu.ac.jp/bioresource/db/eeco/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮田 直幸 (MIYATA NAOYUKI)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号: 20285191

### (2) 研究分担者

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

(H20→H21 連携研究者)

### (3) 連携研究者

—