

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15222

研究課題名（和文）生分解性プラスチックを利用したMn酸化細菌培養・レアメタル回収法の開発

研究課題名（英文）Development of a cultivation method for Mn-oxidizing bacteria using a biodegradable plastic

研究代表者

青木 仁孝（Aoki, Masataka）

国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境保全領域・研究員

研究者番号：80775809

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、バイオMn酸化物を活用したレアメタル回収技術の確立とその低コスト化に必要なMn酸化細菌の新規集積培養法の開発を試みた。本研究により、生分解性プラスチックの1種であるポリカプロラクトンが海洋性Mn酸化細菌の集積培養に有効であること、さらには、ポリカプロラクトンを個体基質として充填した新規Mn酸化バイオリアクターがMn酸化物の形成に有効であることが明らかとなった。また、16S rRNA遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンス解析やメタゲノム解析の適用により、Pseudomonadota門に属する細菌群などがポリカプロラクトンの分解やMn酸化反応に関与している可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レアメタルは「産業のビタミン」とも呼ばれるように、機能性材料、電子材料、構造材などの製造に必要な不可欠な金属資源である。本研究は、レアメタルを含む重金属イオンに対して優れた吸着特性を示すバイオMn酸化物を利用したレアメタル回収技術の確立およびその低コスト化に必要なマンガン酸化細菌の新しい集積培養技術の開発を試みたものである。国内で消費されるレアメタルの大部分を輸入依存している我が国の状況を考慮すると、都市鉱山や自然環境からレアメタルを高効率に回収する技術開発に資する本研究は、学術的のみならず社会的にも重要な意義があると言える。

研究成果の概要（英文）：This study developed a novel enrichment method for Mn-oxidizing bacteria, which is essential for the development of biologically-produced Mn oxide-based minor metal recovery technology and its cost reduction. The successful enrichment of Mn-oxidizing bacteria and the formation of Mn oxides in a bioreactor packed with polycaprolactone were confirmed. Furthermore, the involvement of bacterial groups belonging to the Pseudomonadota phylum in the degradation of polycaprolactone and Mn oxidation was suggested by 16S rRNA gene amplicon sequencing and metagenomic analyses.

研究分野：環境微生物学

キーワード：Mn酸化 生分解性プラスチック バイオリアクター 個体基質 集積培養 レアメタル回収

1. 研究開始当初の背景

レアメタルは機能性材料、電子材料、構造材などの製造に必要な不可欠な金属資源である。一方、それらの主要な産出地は一部の国々に限られている。我が国の高いレアメタル輸入依存度を考慮すると、都市鉱山や自然環境からレアメタルを高効率に回収可能な技術の開発は重要な研究課題の1つと言える。ここで、マンガン(Mn)酸化細菌による酸化触媒作用で形成される不溶性Mn酸化物「バイオMn酸化物」は、レアメタルを含む様々な重金属イオンに対して優れた吸着特性を示すことが知られている^[1]。このため、バイオMn酸化物を活用したレアメタル回収技術が近年盛んに研究されている。そしてこのレアメタル回収技術の確立に必要な不可欠な技術は、バイオMn酸化物の形成を担うMn酸化細菌の培養法である。

なお、Mn酸化細菌を無菌条件下で培養する場合、その無菌化操作のために多大なエネルギー・コストが必要となる。このため、雑菌が存在する開放系でもMn酸化細菌の培養が可能な集積培養技術の利用が実用上望ましい。しかし、開放系でのその培養において問題となるのが、Mn酸化細菌の多くが貧栄養環境での生存戦略に長けた従属栄養細菌である可能性が高い点である^[2]。例えば、Cao et al.^[2]の報告では、液状有機物を供給するバイオリアクターによりMn酸化細菌の集積培養を試みているが、おそらく富栄養環境を好む雑菌が集積培養装置内で先に優占化してしまい、この結果としてMn酸化細菌群をうまく集積化できなかった可能性を報告している。このような既往の知見に基づき、メタン酸化細菌やアンモニア酸化細菌が作り出す代謝産物をMn酸化細菌にゆるやかに供給するMn酸化細菌の貧栄養集積培養法が開発されている^[2-4]。しかし、メタン酸化細菌を用いる方法では可燃性のメタンガスを用いる点、アンモニア酸化細菌を用いる方法では窒素汚染を引き起こす亜硝酸体窒素や硝酸態窒素が代謝産物として排水に残存する点が、維持・管理上の課題として挙げられる。

2. 研究の目的

「生分解性プラスチック」には微生物分解を受けることで、従属栄養細菌群が炭素源として利用可能な水溶性低分子有機物を持続的に徐放する性質がある。このため、適切な生分解性プラスチックを利用することで、Mn酸化細菌の集積培養に好適と考えられる貧栄養環境を創出できるのでは無いかと考えた。そこで本研究課題では、生分解性プラスチックを個体基質としたMn酸化細菌の新規集積培養法の開発を目的とした研究を行った。

3. 研究の方法

生分解性プラスチックの1種であるポリカプロラクトンが、Mn酸化細菌群の集積培養に有効な個体基質となり得るのかについてまずは実験的な検証を行った。本検証実験においては、約3mmのペレット状のポリカプロラクトン(平均Mn=80,000)を投入したMn(II)含有人工海水培地を用いて、和歌山県御坊市にて採取した海水からの海洋性Mn酸化細菌群の集積培養を試みた。本実験は3,340時間継続して行ったが、一定期間ごとに集積培養液の一部を新たに調整したMn(II)含有人工海水培地を交換する作業を繰り返した。本検証実験の終了後、ポリカプロラクトンを充填したラボスケールバイオリアクターを構築し、これにMn(II)含有人工海水培地を連続的に供給することでそのMn酸化性能を評価した。本研究でMn酸化性能を評価したバイオリアクターは、ポリカプロラクトンをろ床として用いた散水ろ床式リアクターと polycaprolactone-packed aerated biofilm (PAB) リアクター(図1)の2種類である。これらのバイオリアクターは、前述の検証実験で得られた集積培養液を植菌してスタートアップを行った。また、集積化されたMn酸化微生物群集については、16S rRNA 遺伝子可変領域 V4 を対象としたアンプリコンシーケンス解析とメタゲノム解析を適用し、優占種やその微生物機能の把握を試みた。

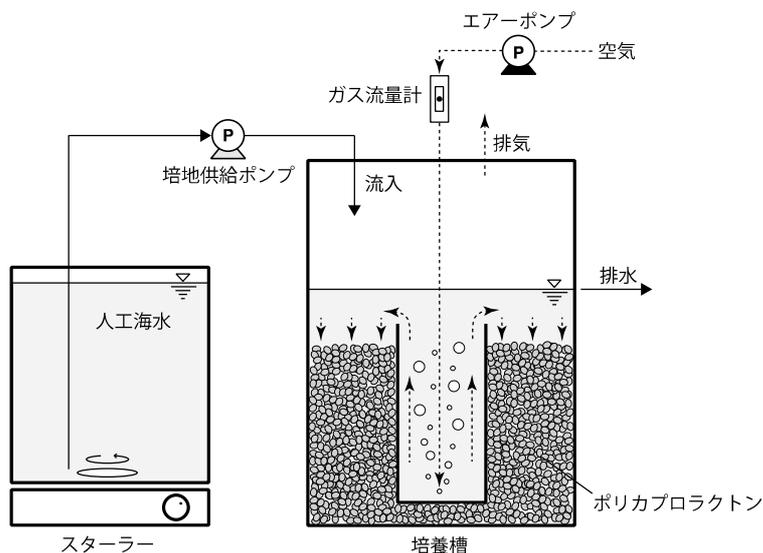


図1 Polycaprolactone-packed aerated biofilm (PAB) リアクター

4. 研究成果

ポリカプロラク톤を用いた集積培養法の有効性検証実験における Mn(II)含有人工海水培地中の溶存 Mn 濃度の経時変化を図 2 に示す。培地交換を行いながら集積培養を継続したところ、3 度目の培地交換以降、Mn(II)の酸化反応に起因する溶存 Mn 濃度の低下が比較的短時間で確認できるようになった。また、本実験で得られた集積培養液についてロイコベルベリンブルー I を用いた Mn 酸化物の比色分析法^[5]を適用したところ、Mn 酸化物の存在が確認された。さらに、原核生物が共通して保有する 16S rRNA 遺伝子 V4 領域を対象としたアンプリコンシーケンス解析からは、ポリカプロラクトン分解能力や Mn 酸化能力を保有する複数の分離株の存在が報告されている *Pseudomonadota* 門細菌群が高度に集積化されていることが明らかとなった。集積化された *Pseudomonadota* 門細菌群のうち、*Rhizobiaceae* 科の未培養細菌グループ SPNT01 に属する細菌に関しては、そのメタゲノムアセンブルゲノムの取得に成功した。このメタゲノムアセンブルゲノム配列には、Mn 酸化反応に関与することが知られているマルチ銅オキシダーゼ^[6-7]のホモログ遺伝子の存在が確認された。以上の結果から、ポリカプロラク톤を用いた新規集積培養法が海洋性 Mn 酸化細菌群の培養に有効であると判断した。

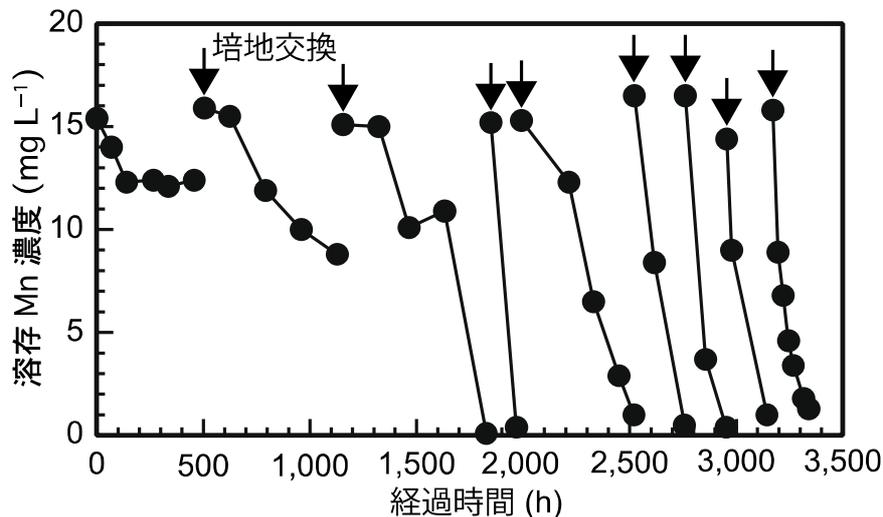


図 2 ポリカプロラク톤を個体基質として用いて集積化した Mn 酸化微生物群集による Mn(II)含有人工海水培地中の溶存 Mn 除去 (矢印: 培地交換のタイミング)

続いて、上述の検証実験結果に基づき、ポリカプロラク톤を個体基質とする新規 Mn 酸化バイリアクターを 2 種類構築し、それらに Mn(II)含有人工海水培地を通水することで、それらの Mn 酸化性能を評価した。なお、構築した 2 種類のバイリアクターのうち、散水ろ床型リアクターに関しては、溶存 Mn の効果的な除去を確認することができなかった (データ非表示)。この原因の 1 つとしては、バイリアクター内で過度な短絡流が発生し、Mn 酸化細菌群と供給した Mn(II)含有人工海水培地がうまく接触しなかった可能性が挙げられる。一方、PAB リアクターにおいては、スタートアップ直後から Mn 酸化反応に起因する溶存 Mn の除去を確認することができた。このため、PAB リアクターについては、様々な溶存 Mn 濃度ならびに理論水理学的滞留時間条件下において 238 日間の連続運転を行った。その結果、0.4~2.3 mg/L/day の平均溶存 Mn 除去速度が確認された。この溶存 Mn 除去速度は、メタン酸化細菌の代謝産物を海洋性 Mn 酸化細菌の培養に利用したバイリアクター^[3]の平均 Mn 除去速度 (5.4 mg/L/day) よりもやや低い数値であったものの、PAB リアクターを用いることで連続的に Mn 酸化物の形成が可能であることが示された。しかし、実用上はさらなる高効率な Mn 酸化反応が求められるため、長期間にわたる集積培養やリアクター運転方法や装置構造のさらなる最適化などの必要性が明らかとなった。なお、充填したポリカプロラク톤に形成したバイオフィームでは *Marinobacter* 属細菌および *Pseudohoeftlea* 属細菌、バイリアクター内で形成した黒色・暗褐色沈殿物 (Mn 酸化物を含有) に付着したバイオフィームからは *Lewinella* 属細菌および未分類 *Alphaproteobacteria* 綱細菌が優占化していることが 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析から明らかとなった。これらの細菌群については、PAB リアクターにおけるポリカプロラク톤の分解および Mn 酸化反応に大きく寄与している可能性が考えられた。

<引用文献>

- [1] Zhou H, Fu C (2020) Manganese-oxidizing microbes and biogenic manganese oxides: characterization, Mn(II) oxidation mechanism and environmental relevance. *Rev Environ Sci Biotechnol* 19:489–507.
- [2] Cao LTT, Kodera H, Abe K, Imachi H, Aoi Y, Kindaichi T, Ozaki N, Ohashi A (2015) Biological oxidation of Mn(II) coupled with nitrification for removal and recovery of minor metals by downflow hanging sponge reactor. *Water Res* 68:545–553.

- [3] Kato S, Miyazaki M, Kikuchi S, Kashiwabara T, Saito Y, Tasumi E, Suzuki K, Takai K, Cao LTT, Ohashi A, Imachi H (2017) Biotic manganese oxidation coupled with methane oxidation using a continuous-flow bioreactor system under marine conditions. *Water Sci Technol* 76:1781–1795.
- [4] Matsushita S, Komizo D, Cao LTT, Aoi Y, Kindaichi T, Ozaki N, Imachi H, Ohashi A (2018) Production of biogenic manganese oxides coupled with methane oxidation in a bioreactor for removing metals from wastewater. *Water Res* 130:224–233.
- [5] Johnson HA, Tebo BM (2008) In vitro studies indicate a quinone is involved in bacterial Mn(II) oxidation. *Arch Microbiol* 189:59–69.
- [6] Ridge JP, Lin M, Larsen EI, Fegan M, McEwan AG, Sly LI (2007) A multicopper oxidase is essential for manganese oxidation and laccase-like activity in *Pedomicrobium* sp. ACM 3067. *Environ Microbiol* 9:944–953.
- [7] Su J, Deng L, Huang L, Guo S, Liu F, He J (2014) Catalytic oxidation of manganese(II) by multicopper oxidase CueO and characterization of the biogenic Mn oxide. *Water Res* 56:304–313.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aoki Masataka, Miyashita Yukina, Tran P. Thao, Okuno Yoshiharu, Watari Takahiro, Yamaguchi Takashi	4. 巻 43
2. 論文標題 Enrichment of marine manganese-oxidizing microorganisms using polycaprolactone as a solid organic substrate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biotechnology Letters	6. 最初と最後の頁 813 ~ 823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10529-021-03088-z	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 -

1. 著者名 Aoki Masataka, Miyashita Yukina, Miwa Toru, Watari Takahiro, Yamaguchi Takashi, Syutsubo Kazuaki, Hayashi Kazuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Manganese oxidation and prokaryotic community analysis in a polycaprolactone-packed aerated biofilm reactor operated under seawater conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 3 Biotech	6. 最初と最後の頁 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13205-022-03250-y	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 -

1. 著者名 Aoki Masataka, Nakahara Nozomi, Kusube Masataka, Syutsubo Kazuaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Metagenome-Assembled Genome Sequence of Marine <i>Rhizobiaceae</i> sp. Strain MnEN-MB40S, Obtained from Manganese-Oxidizing Enrichment Culture	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00645-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.00645-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮下幸奈, 林和幸, 青木仁孝
2. 発表標題 PCLを用いたMn酸化バイオリクターの開発
3. 学会等名 第27回高専シンポジウムオンライン
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y. Miyashita, M. Aoki
2. 発表標題 A novel enrichment method for manganese-oxidizing microorganisms using polycaprolactone
3. 学会等名 令和2年度第3ブロック専攻科研究フォーラム
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------