

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03595

研究課題名（和文）酸性極限環境におけるバイオフィーム樹状構造化の謎とその金属元素循環への影響の解明

研究課題名（英文）Unraveling the Dendritic Biofilm Formation in Acidic Extreme Environments and Its Impact on Metal Element Cycling

研究代表者

稲葉 知大（Inaba, Tomohiro）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エネルギー・環境領域・主任研究員

研究者番号：90760439

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：日本国内のみならず、世界各地には、鉱物資源の採取が終了、もしくは休止した休廃止鉱山が多数存在する。休廃止鉱山からは、生物毒性の高い金属類を含む廃水が多量に排出されることがあり、その処理が問題となっている。本研究課題では、休廃止鉱山の非常に酸性の高い環境で生育する微生物の群集構造体「バイオフィーム」や、廃水中から重金属類を除去できる微生物の解析を実施した。本研究提案の成果は、極限環境における微生物の成育についての学術的発見をもたらすことにつながるとともに、微生物を利用した鉱山廃水処理の効率化に資するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究提案においては、酸性極限環境において特異な構造体を形成することで生育できる微生物群集の解析を実施した。こうした微生物の生態はこれまで知られていないものであり、微生物の群集生態を明らかにするうえで重要な知見を与えるものである。加えて、休廃止鉱山から排出されるような、重金属類を含む廃水で生育可能な微生物についても解析を実施した。その成果は、生物毒性の高い重金属類を含む水の処理、利用に資するものであり、新たな廃水処理方法の開発や、現行の生物処理の効率化に資するものである。

研究成果の概要（英文）：There are many abandoned or inactive mines where mineral extraction has ceased, not only in Japan but around the world. These mines often discharge large quantities of wastewater containing highly toxic metals, which prove challenging to treat. In this research project, we analysed the 'biofilm' community structures of microbes that grow in the highly acidic conditions of these abandoned mines, as well as microbes that can remove heavy metals from the wastewater. The results of this research proposal may contribute to academic knowledge of microbial growth in extreme environments and improve the efficiency of microbial-based treatments for mine wastewater.

研究分野：微生物生態学

キーワード：バイオフィーム 水処理再生

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地球上で最も存在量が多い生物が微生物であるという事実は広く認識されるようになったが、実にその 8 割がバイオフィームとして存在するという事はあまり知られていない。また、微生物はバイオフィームを形成することにより単独で生活しているときとは全く異なる機能・性質を示すが、その構造化が実環境中でどのような意味を持つのかはほぼわかっていない。樹状構造化によって微生物機能がどう変化するのか、それによって群集の生理機能にどのような影響を与えるかを示すことは微生物の理解、利用において非常に重要である。

### 2. 研究の目的

命が発生して以降、微生物は地球環境の形成に貢献してきた。これは、微生物が他の高等生物より進化的にずっと早くから存在し、その存在量が地球上で最大であることに起因する。これら微生物の代謝活性は元素循環に大きな影響を与え、炭素・窒素・金属元素を地球規模で循環させると考えられており、こうした循環が地球環境の形成に関わっているとされている。さらに注目すべきは、地球上に存在する全微生物のうち約 80%がバイオフィーム(微生物および細胞外多糖体等が個体表面に形成する集合体)状態にあるということである。これはつまり、微生物による地球規模の物質循環への寄与のほとんどが、バイオフィーム状態の微生物集団によってなされているということである。しかし、実環境において微生物がバイオフィーム化する意義や、それによって物質循環へどのように影響するのかについては全くといっていいほど分かっていない。本研究テーマでは、金属元素の循環に関わっている可能性がある、酸性極限環境に見られる巨大なバイオフィームを一例として、金属元素の代謝に関連している微生物及びそのバイオフィームを解析し、その構造がどのように機能しているのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

休廃止鉱山の水没坑道を中心に調査を行い、バイオフィームサンプルを探索した。採取したバイオフィームサンプルはレーザー光を透過する支持体を使用した固定による観察の検討を実施し、微細な構造の可視化、微生物学的な解析を試みた。バイオフィームの構造と関係する機能を調べるため、非破壊・非侵襲的な顕微鏡可視化を実施している。非侵襲的な顕微鏡法としては反射顕微鏡法を用い、共焦点顕微鏡と作動距離の長いレンズを使用することで大きな構造を持つ立体物の可視化をすすめた。また微生物学的な解析として、サンプル全体に対する微生物群集構造解析とメタトランスクリプトーム解析を行い、構造の形成や維持に寄与する、もしくは特定の構造に結びついた微生物群の特定を試みた。これらの解析を通して、特殊な構造を持つバイオフィームにおける立体構造と微生物生態的特徴についての基礎的な知見を蓄積しバイオフィームの実態に関する理解を深めた。また応用的な研究として、坑廃水にみられるような、金属元素を含む水の処理を行うバイオフィームの解析を実施した。

### 4. 研究成果

はじめに、休廃止鉱山の坑道を調査し、樹状バイオフィームサンプルの取得を行った。樹状バイオフィームは大きなもので 500 mm 以上になっており、その外見的形状から区分けを実施し、部位ごとの解析を実施した。バイオフィームの部位ごとの解析では、共焦点顕微鏡を用いた反射顕微鏡法による立体構造の可視化を実施した。バイオフィームの構造は比較的強固であるものの、圧力によって形状が容易に変化することから、形状をある程度固定した形での観察方法の検討を行い、樹状バイオフィームの可視化手法を確立するに至った。反射顕微鏡法による立体構造可視化により、樹状バイオフィームの形状を一部分可視化することに成功しており、現在はさらなる詳細な可視化と情報公開の準備を進めている。

樹状バイオフィームについては、構成する微生物群集の解析も実施した。微生物群集構造解析には、16S rRNA 遺伝子を対象にしたアンプリコンシーケンス解析を、イルミナシーケンサーを使用して実施した。その結果、坑廃水中での生育、バイオフィーム形成を可能にする微生物の特定が進んだ。詳細な解析を現在も進めている。また、同時にメタトランスクリプトーム解析を実施し、反射顕微鏡法による立体構造可視化の結果と合わせて、樹状構造と関係するバイオフィームの生理学的な機能解析を進めた。解析結果の処理を継続して進めており、樹状バイオフィームの形成・維持に関与する微生物種の特定に加え、生理機能に関係する遺伝子群の特定を行っていくことを予定している。

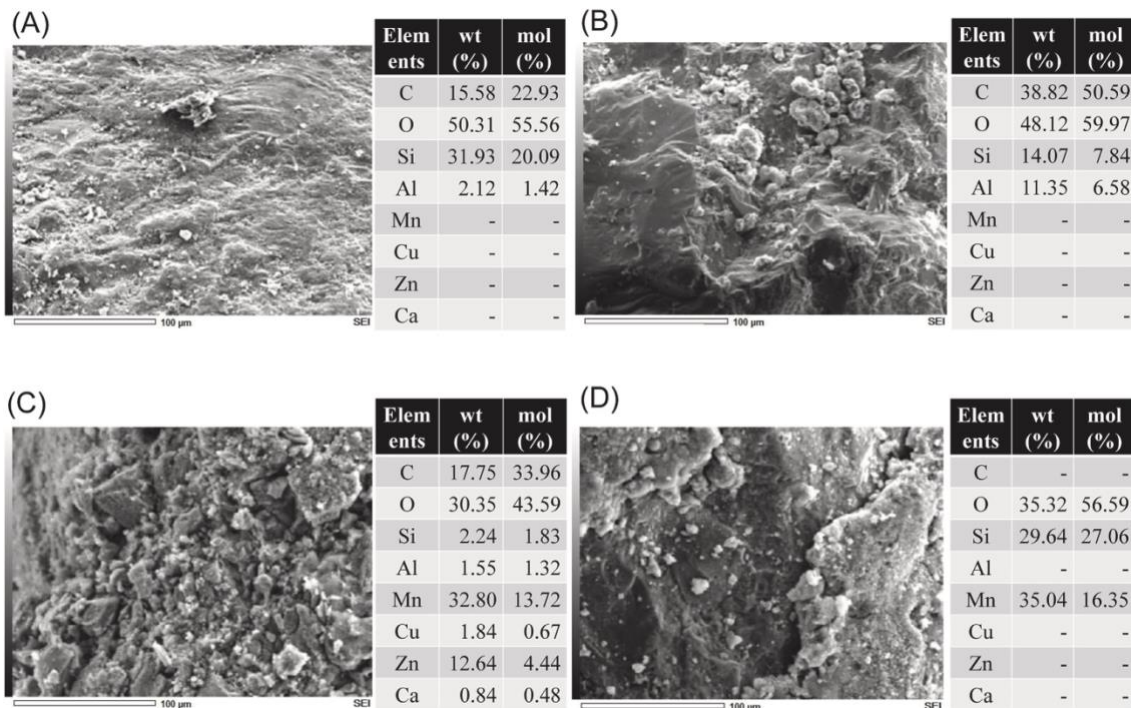


図 1. 廃水処理フィルター中の砂表面の電子顕微鏡画像と EDS 元素分析結果

Reprinted from Chemosphere Vol 343, Tomohiro Inaba, Hidenobu Aizawa, Tomo Aoyagi, Yuya Sato, Tomoyuki Hori, Takuro Nishimura, Hiroshi Habe, "Startup performance and microbial composition of a pilot-scale rapid sand filter for the treatment of manganese-containing mine water", Copyright (2023), with permission from Elsevier.

また、応用的な研究として坑廃水のような金属元素を含む水の処理を行うバイオフィルムの解析も実施した。ここでは、マンガンを含む水と生態系に深刻な影響を与える休廃止鉱山からの坑廃水の調査、処理方法についての研究を進めた。特に坑廃水中のマンガンを処理するため、微生物を利用した砂ろ過装置を使った処理技術を検証し、高濃度のマンガンを含む鉱山廃水から、薬品を使用せず砂ろ過装置への通水でマンガンを除去できるシステムに注目し、ろ過砂の観察を実施した。ろ過砂を走査型電子顕微鏡で可視化すると、表面上には金属様の析出物らしきものが観察され、EDS 元素解析の結果からはマンガンの蓄積が確認され、ろ過砂に含まれる微生物が砂上にマンガン酸化物を形成していることがわかった。こうした生態は樹状構造の形成に関与していると考えられる。今後は、樹状構造の形成及び環境中での生態についてより詳細な解析を行うとともに、本研究で得られた成果の発表準備を進めていく。

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 Inaba Tomohiro, Aizawa Hidenobu, Aoyagi Tomo, Sato Yuya, Hori Tomoyuki, Nishimura Takuro, Habe Hiroshi	4. 巻 343
2. 論文標題 Startup performance and microbial composition of a pilot-scale rapid sand filter for the treatment of manganese-containing mine water	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 140229 ~ 140229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemosphere.2023.140229	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0件

〔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
研究分担者	佐藤 由也  (Sato Yuya)  (80711291)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・エネルギー・環境領域・主任研究員    (82626)	

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