

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510089

研究課題名（和文）元素回収システム構築のための金属イオン耐性を有する新規マンガン酸化物の探索

研究課題名（英文）Biogenic manganese oxides for recovering inorganic elements from aqueous media

研究代表者

谷 幸則 (TANI YUKINORI)

静岡県立大学・環境科学研究所・准教授

研究者番号：10285190

研究成果の概要（和文）：

Acremonium strictum KR21-2 を主たるモデル微生物として用いて、真菌の Mn(II)酸化酵素によって形成したバイオマンガン酸化物（BMO）と様々な無機元素（重金属や無機ヒ素）との相互作用について研究した。真菌が形成した BMO は、Mn(II)酸化酵素が安定的に保持され、自己修復機能を有することが明らかとなった。BMO は、“バイオマンガン酸化物の高い元素吸着力”と“真菌の Mn 酸化酵素活性”の重要な特性を合わせ持ち、効率的な元素回収に応用できることが示された。

研究成果の概要（英文）：

We have investigated the interactions of biogenic manganese oxides enzymatically formed by *Acremonium strictum* KR21-2 with various elements such as heavy metal ions and inorganic As species. Mn(II) oxidase is readily embedded in BMO and effectively oxidizes Mn(II) to Mn(IV). Consequently, BMO possesses the strong affinity to various inorganic elements as we as the “self-regeneration” ability, indicating that BMO can be applicable for effective elemental recycling processes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 ・ 環境技術・環境材料

キーワード：リサイクル技術・資源回収・レアメタル・重金属・マンガン酸化菌

1. 研究開始当初の背景

近年、地下資源の涸渇から、近代産業に不可欠なレアメタル（希少金属）の国際的な争奪戦が起きており、既に輸入された資源（いわゆる「都市鉱山」）からレアメタルを回収・再使用する動きが活発化している。しかしながら、廃棄物品のリサイクル過程では、有害

元素を含む多種類の元素が同時に排出され、これらが微量濃度で多量に存在する場合、高度なイオン交換処理技術など高コスト・高エネルギー消費型の処理が必要になってしまふ。これらの背景から、単価が高い金・白金類などの一部の金属がリサイクルされているに過ぎない。よって希薄な濃度で存在する

様々な元素に対する低コストの元素回収システムの構築は、「元素戦略」や「環境保全」の立場から最も重要な課題の一つである。

近年、微生物による無機化合物の代謝(酸化還元反応)を利用した微生物による低コスト・低エネルギー型の元素回収技術の基礎研究が盛んに行なわれてきている。中でも、溶存 Mn(II)を酵素的に酸化し、不溶性マンガ酸化物を形成するマンガ酸化微生物の研究が国内外で盛んに行なわれている(例えば、総説で、Tebo *et al.*, 2004; Villalobos *et al.*, 2005; Tebo *et al.*, 2005; Miyata, Tani *et al.*, 2007)。微生物によって形成するマンガ酸化物(biogenic Mn oxide: 以下 BMO と略す)は、MnO₂による二次元状シート構造のナノサイズ粒子であり、その構造中では Mn(IV)の結晶欠陥密度が高い(例えば、Villalobos *et al.*, 2006)。この高密度に存在する結晶欠陥は、マイナス4の電荷を有し、陽イオン交換サイトとなる。これらの構造的特性から、BMO は重金属イオンに対し、非常に高い吸着容量を示す。例えば、Pb²⁺は、*Leptothrix discophora* SS-1 の産生した BMO に対し、Pb/Mn 比が 0.5 まで吸着する(Nelson *et al.*, 1999)。また、*Bacillus* sp. SG-1 の産生した BioMnOx に対し、UO₂²⁺が U/Mn 比で 0.32 まで吸着する(Webb *et al.*, 2006)。本研究代表者らは、マンガ酸化能を有する真菌 *Acremonium strictum* KR21-2 株をモデル微生物として、それが産生する BMO に対する Ni²⁺, Zn²⁺, Co²⁺の高い吸着能力(例えば、Zn/Mn 比で 0.3)(Tani, *et al.*, 2004a)を報告した。また、より最近では、*Bacillus* sp. WH4 の形成した BMO が Cd²⁺イオンを Cd/Mn モル比で 0.68 まで吸着することが示された(Meng, *et al.*, 2009)。これらの報告は、元素濃度が数μM から数十μM で吸着試験がおこなわれており、BMO がμM レベルの低濃度のカチオン種に対して、大きな吸着能力(Mn に対し数 10%)を有していることを示している。これらの学術的な背景から、BMO を利用することによって、高効率な重金属イオン回収システムを開発できる可能性が高い。

この重金属イオンに対する高い吸着容量と高い吸着親和性を有する BMO を回収システムに応用しようとする場合、用いるマンガ酸化微生物の成長やマンガ酸化物形成活性に対する共存重金属イオン(本システムでは、処理対象になる)の影響(阻害)が根本的な問題となってくる。申請者が以前よりモデル微生物として用いている *A. strictum* KR21-2 は、Ni²⁺, Co²⁺, Zn²⁺がそれぞれ 20 μM, 30 μM, 50 μM 程度以上の濃度で BMO の産生に阻害効果を示す。よって高い重金属イオン共存下で BMO を形成できる条件等を検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、微生物によって形成されるマンガ酸化物ナノ粒子が有する、重金属イオンへの高い吸着親和性と高い吸着収容力を利用する低エネルギー型の元素回収技術の開発を最終的な目的とした。この目的のために比較的高い濃度で様々な重金属イオンが混在する処理水中において、その阻害を受けることなく連続的にマンガ酸化物ナノ粒子を形成しうるマンガ酸化菌の培養条件など検索を行う。また、微生物によるマンガ酸化物形成反応に対する各重金属イオンや無機ヒ素などの阻害の程度や相互作用機構を解明し、微生物による連続的なマンガ酸化物ナノ粒子の形成を利用した重金属イオンの高効率な回収法の実用化を検討する。

3. 研究の方法

1) 活性マンガ酸化物によるマンガ除去効果と自己修復機構の解明

A. strictum KR21-2 孢子懸濁液を 1 mM Mn(II)を含む HAY 液体培地(50 mL)に植菌し、25°C で 72 時間振とう培養した。上清と固相(BMO と菌体)に分離し、固相を塩酸ヒドロキシルアミン(HEPES buffer; pH 7.0)溶液中で処理し、BMO を溶解した。この溶液を限外ろ過によって 200 倍濃縮し、HEPES buffer (pH 7) で透析した。上清も限外ろ過によって 200 倍濃縮し、HEPES buffer (pH 7) で透析した。これらの濃縮液を 1 mM Mn(II)を含む 20 mM HEPES(pH 7.0)溶液に加え、30°C 水浴で反応し、形成した Mn 酸化物を回収し、形成能を評価した。*A. strictum* KR21-2 株が形成した BMO に、1 mM Mn(II)を含む 20 mM HEPES(pH 7.0)溶液(50 mL)を加え、振とうした。24 時間毎に溶液を交換しながらこの操作を 3 回繰り返し、(連続処理)、Mn(II)の酸化率を調べた。NaN₃ 添加、加熱処理、凍結乾燥、冷凍した BMO についても同様な実験をおこなった。

2) 活性マンガ酸化物による重金属イオン回収

A. strictum KR21-2 株孢子懸濁液を 1 mM Mn(II)を含む HAY 液体培地に植菌し、25°C で 72 時間振とう培養し、BMO を形成させた。洗浄後、Mn(II)と重金属イオン(Cd(II), Co(II), Ni(II)及び Zn(II))を含む 20 mM HEPES(pH 7.0)溶液で連続的(24 時間毎)に処理し、重金属イオン濃度減少を ICP-AES で測定した。BMO に吸着した重金属イオンは、10 mM CuSO₄ 水溶液と 50 mM 塩酸ヒドロキシルアミン水溶液で逐次的に抽出し、その吸着形態を調べた。1 mM Mn(II)と重金属イオンを

含む HAY 液体培地で *A. strictum* KR21-2 株胞子懸濁液を振とう培養し、培養時における共存の重金属イオンの菌体成長、BMO 形成能への影響を調べた。

3) 活性マンガ酸化物と無機ヒ素との相互作用

Mn(II) 1 mM を含む HAY 液体培地 (pH 7.0) に Mn 酸化真菌 *A. strictum* KR21-2 株の胞子を接種し、振とう培養し、様々な培養時間で BMO を形成させた。この形成させた BMO_x(x は培地初期 Mn(II)に対する形成した固相 Mn(II)の割合(%)を示す。)を用いて Mn(II)及び 16 mMAs(V)もしくは As(III)が共存する条件で吸着及び酸化試験をおこなった。

4. 研究成果

1) 活性マンガ酸化物によるマンガ除去効果と自己修復機構の解明

BMO を溶解・濃縮した溶液と上清を濃縮した溶液の Mn 酸化活性を比較したところ、BMO を溶解した濃縮溶液で高いが認められた。一方、上清濃縮液では、僅かな Mn(II)酸化活性しか認められなかった。また、初期 Mn(II)を添加しない系 (BMO が形成されない系)で同様な実験を試みたところ、固相 (菌体)からの Mn(II)酸化活性は認められなかった。以上の結果から、*A. strictum* KR21-2 株によって発現された Mn 酸化酵素は、Mn(II)存在下で形成する BMO 中に選択的に保持されることが明らかとなった。形成させた BMO を 1 mM Mn(II)を含む HEPES 溶液中で連続処理したところ、添加した Mn(II)の 99%以上が溶液から除かれた。得られた固相 Mn を二段階抽出したところ、酸化物態 Mn は 85%以上に達し、連続処理における溶存 Mn の減少の原因が、酸化物の形成であることが示された。Mn(II)を含まない培養で得られた菌体による Mn 酸化物の形成は認められず、培養段階で形成された BMO が Mn 酸化酵素を保持する上で重要な役割を果たしていると考えられた。NaN₃を添加した場の BMO による Mn(II)酸化速度は、添加した NaN₃に対して濃度依存的に減少し、30 mM 以上添加すると、酸化活性が完全に失われた。加熱処理の場合にも、処理温度に依存して Mn(II)酸化速度が減少し、85°C、1 時間処理すると完全に不活化された。BMO を溶解・濃縮して得られた濃縮液でも同様な結果を示した。

この“活性”バイオ Mn 酸化物の Mn(II)酸化活性の保存性を明らかにするために、形成した BMO を凍結乾燥と冷凍保存(-80°C)し、1 mM Mn(II)を含む HEPES 溶液中で連

続処理した。冷凍保存では、一か月以上保存した BMO でも、98%以上の Mn(II)酸化率を示し、Mn 酸化活性を長期間保持できることが明らかとなった。一方、凍結乾燥保存では、Mn(II)の酸化率は最大でも 20%であり、Mn 酸化活性が大きく減少することが明らかとなった。

2) 活性マンガ酸化物による重金属イオン回収

Mn(II)イオンのみを添加して予め形成させた BMO による Ni(II)、Zn(II)、Co(II)、Cd(II)の吸着は、見掛け上 Langmuir 吸着等温式に従い、飽和吸着量は固相 Mn に対するモル比でそれぞれ 0.26、0.28、0.76 と 0.25 に達した。すべての場合、BMO からの Mn(II)の溶出は検出されなかった。

Co(II)吸着実験において窒素ガス置換した場合(N₂系)、見掛け飽和吸着量は Co/Mn モル比で 0.45 に減少し、Co 吸着に伴う有意な Mn(II)の溶出(吸着 Co/溶出 Mn モル比約 2)が認められた。Mn 酸化酵素活性を阻害する NaN₃ 添加(NaN₃系)や加熱(80°C、1 時間; Heat 系)した場合には、溶存酸素が存在しているも、N₂系と同様な低い飽和吸着量と有意な Mn(II)の溶出が認められた。これらの結果から、BMO による Co(II)から Co(III)への酸化が生じるとともに、還元された Mn(II)が BMO に保持されている Mn(II)酸化酵素によって BMO へと再酸化していることが示唆された。

Ni(II)、Zn(II)と Cd(II)の吸着の N₂系や NaN₃系においては、これらの吸着に伴った Mn(II)の溶出が認められ、BMO に吸着していた Mn(II)と重金属イオンとの交換反応によると考えられた。一方、溶存酸素を含む通常系では、Mn(II)の溶出は認められず、イオン交換によって溶出した Mn(II)が速やかに BMO に保持されている酵素活性によって BMO へ再酸化されたことを示唆した。また、重金属イオン共存下、Mn(II)を添加した場合にも、Mn(II)の酸化と形成した BMO への重金属イオンの吸着が認められ、“活性”BMO による重金属イオンの連続処理が可能であることが示された。BMO による Mn(II)の酸化反応は、共存する重金属イオン濃度が 1 mM 以上でも認められた。

重金属イオンを培養前に添加した場合、KR21-2 株によるマンガ酸化物の形成は、その濃度が数 10 μM 以下でのみで認められた。添加した重金属イオン濃度がより高い(数 10 μM 以上)では、マンガ酸化活性や菌体成長への阻害が認められた。

このように、重金属イオン添加前に Mn(II)酸化酵素を保持した BMO を形成させることで、比較的高濃度の重金属イオンを含む溶液

中でも、BMOを連続的に形成できることが明らかとなった。Mn(II)を新たに供給することで、新規にBMOが形成され、ここに共存する重金属イオンが吸着(Co(II)の場合はCo(III)への酸化を含む)することで、重金属イオンの連続処理が可能であることが示された。BMOに保持されている酵素活性は、重金属イオン回収過程におけるBMOからのMn(II)の溶出を防止する上で重要な役割を果たすことが示された。

3) 活性マンガ氧化物と無機ヒ素との相互作用

A. strictum KR21-2株を回分培養し、様々なMn(II)変換率(初期Mn(II)が固相Mnに変換された割合)でBMOを形成し、それに対するAs(V)の吸着量を調べた。同時に、粉末X線結晶回折(XRD)、BET法による比表面積、ヨウ素還元滴定による平均酸化数、放射光によるAsのX線吸収端近傍構造(XANES)を測定した。As(V)の酸化物態Mnに対する吸着量は、BMOの形成過程において大きく変化することが明らかとなり、低Mn(II)変換率でより高いAs(V)吸着量が認められた。XRDや比表面積では有意な変化は見られなかった。一方、平均酸化数はMn(II)変換率に依存し、低Mn(II)変換率でより低い酸化数を示した。平均酸化数とイオン交換態(吸着態)Mn(II)量から、低Mn(II)変換率のBMOはMn(II)とMn(III)に富むことが明らかとなった。様々な濃度のMn(II)を共存させてAs(V)吸着量を調べたところ、As(V)とMn(II)の吸着は高い正の相関関係($R^2 = 0.92$, $p < 0.01$)を示し、As(V)とMn(II)がMn(III)に富む低Mn(II)変換率のBMOに共吸着し、高いAs(V)吸着量を示すことが明らかとなった。XANESの解析結果からも低Mn(II)変換率のBMOではAs(V)とMn(II)の共吸着が示唆された。これらの結果から、*A. strictum* KR21-2株によるBMOの形成過程においてBMOの化学的特性が変化し、それによってAs(V)の吸着挙動が大きく影響を受けることが明らかとなった。特に、低Mn(II)変換率のBMOは、酸化物態Mnに対しモル比で最大0.13の高いAs(V)吸着量を示し、効率的な吸着剤として利用できることが示された。

次に*A. strictum* KR21-2株が形成したBMOによるAs(III)酸化反応速度に対するMn(II)変換率、溶存酸素、加熱処理、初期BMO/As比の影響を詳細に検討し、BMOによるAs(III)酸化の反応性を規定する要因を明らかにした。低Mn(II)変換率のBMOはAs(III)酸化反応性が低く、高Mn(II)変換率ではより高いAs(III)酸化反応性を示すことが明らかとなり、BMO形成過程においてAs(III)に対する反応性が大きく変化するこ

とが示された。低Mn(II)変換率では吸着態Mn(II)や酸化物態Mn(III)の割合が高く、このことが低いAs(III)酸化速度に寄与していることが推察された。溶存酸素を含まない場合には、BMOによるAs(III)酸化速度は、過剰量のBMOが残余しているにも関わらず、その進行とともに著しく低下し、BMOがAs(III)の酸化に対し不活化していることが示された。また、この場合には、有意なMn(II)の溶出が認められ、BMOの還元溶解が生じたことが示された。一方、溶存酸素が存在する場合、As(III)の酸化速度の低下とMn(II)の溶出は認められなかった。また、BMOを含まない対照実験では、As(III)の酸化は認められず、酸素による直接的または真菌を介するAs(III)酸化は起こらない。さらに、加熱処理したBMOでは、溶存酸素の有無に関わらず、As(III)酸化速度の低下とMn(II)の溶出が認められた。これらの結果から、BMO中のKR21-2株由来のMn(II)酸化酵素が、As(III)の酸化に伴って生じるMn(II)やMn(III)を再酸化することで、As(III)酸化速度の低下を防止すると推察された。

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は下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① J. Chang, Y. Tani, H. Naitou, N. Miyata, H. Seyama, Fungal Mn oxides supporting Mn(II) oxidase activity as effective Mn(II) sequestering materials. *Environmental Technology* 査読あり (On-line published). <http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2013.790066>
- ② J. Watanabe, Y. Tani, J. Chang, N. Miyata, H. Naitou, H. Seyama, As(III) oxidation kinetics of biogenic manganese oxides formed by *Acremonium strictum* strain KR21-2. *Chemical Geology* 査読あり (on-line published). <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.03.012>
- ③ J. Watanabe, Y. Tani, N. Miyata, H. Seyama, S. Mitsunobu, H. Naitou, Concurrent sorption of As(V) and Mn(II) during biogenic manganese oxide formation. *Chemical Geology* 査読あり 306-307, 123-128 (2012). <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemgeo.2012.03.004>
- ④ K. Tanaka, Y. Tani, T. Ohnuki, Specific sorption behavior of actinoids on biogenic Mn oxide, *Chemistry Letters* 査読あり 40(8), 806-807 (2011).

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① 谷 幸則, 常 佳寧, 内藤博敬, 宮田直幸, 瀬山春彦: 真菌が形成した活性バイオマンガン酸化物による重金属イオンの連続回収 第 47 回日本水環境学会年会 (大阪工業大学 大宮キャンパス) 講演集 p. 506 (3-G-13-4), 2013 年 3 月 11-13 日
- ② 常 佳寧, 谷 幸則, 内藤博敬, 宮田直幸, 瀬山春彦: 活性バイオマンガン酸化物によるマンガンイオンの連続回収 第 47 回日本水環境学会年会 (大阪工業大学 大宮キャンパス) 講演集 p. 505 (3-G-13-3), 2013 年 3 月 11-13 日
- ③ 谷 幸則, 渡邊淳一, 常 佳寧, 内藤博敬, 宮田直幸, 瀬山春彦: Mn 酸化真菌が産生するバイオ Mn 酸化物の形成過程における有害元素との相互作用 日本水処理生物学会第 49 回大会 日本水処理生物学会誌 別巻 32 号 p85 (北里大学白金キャンパス) 平成 24 年 11 月 24-25 日
- ④ 常 佳寧, 谷 幸則, 内藤博敬, 宮田直幸, 瀬山春彦: 活性バイオマンガン酸化物による重金属イオンの連続回収 日本水処理生物学会第 49 回大会 日本水処理生物学会誌 別巻 32 号 p84 (北里大学白金キャンパス) 平成 24 年 11 月 24-25 日
- ⑤ 常 佳寧, 谷 幸則, 内藤博敬, 宮田直幸, 瀬山春彦, 田中万也: バイオマンガン酸化物と菌体の混合物を用いた重金属吸着に関する研究 第 46 回日本水環境学会年会 (東洋大学 白山第 2 キャンパス) 講演集 p. 278 (2-G-09-4), 2012 年 3 月 14-18 日
- ⑥ 常 佳寧, 谷 幸則, 内藤博敬, 田中万也, 宮田直幸, 瀬山春彦: バイオ Mn 酸化物と真菌混合系による Co(II) の高効率な回収 日本水処理生物学会第 48 回大会 日本水処理生物学会誌 別巻 31 号 p86 (立命館大学びわこ・くさつキャンパス) 平成 23 年 11 月 16-18 日
- ⑦ 渡邊淳一, 谷 幸則, 内藤博敬, 光延聖, 宮田直幸, 瀬山春彦: バイオマンガン酸化物の形成過程における Mn(II) および As(V) の共吸着量の変化とその要因 日本水処理生物学会第 48 回大会 日本水処理生物学会誌 別巻 31 号 p23 (立命館大学びわこ・くさつキャンパス) 平成 23 年 11 月 16-18 日
- ⑧ Y. Tani, J. Chang, J. Watanabe, H. Naitoh, N. Miyata, H. Seyama, K. Tanaka: Biogenic manganese oxides as a potential material for toxic metal removal. The 37th Congress on Science and Technology of Thailand

(STT37), Abstract p350 O-O0007, October 10-12, 2011, Bangkok, Thailand.

- ⑨ K. Tanaka, Y. Tani, T. Ohnuki: Specific sorption of Th(IV), Np(V) and U(VI) on biogenic Mn oxide. Goldschmidt2011, August 14-19, 2011, Prague, Czech Republic.
- ⑩ N. Miyata, Y. Tani: Biogenic manganese and iron oxides nanoparticles and interactions with metal ions. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology/XIII International Congress of Mycology, AM72-1, September 6-10, 2011, Sapporo, Japan.
- ⑪ K. Tanaka K, Y. Tani, T. Ohnuki: Sorption anomaly of Ce by biogenic Mn oxide: A Specific Ce(III) oxidation to Ce(IV) by biogenic Mn oxide. Migration 2011, September 18-23, 2011, Beijing, China.

〔図書〕(計 2 件)

- ① 谷 幸則, 宮田直幸, 常 佳寧: Mn 酸化物形成能を有する微生物によるレアメタルの回収, リサイクルバイオテクノロジーの最前線 (植田充美 監修), pp170-178, シーエムシー出版 (2013) (ISBN978-4-7813-0800-5) .
- ② N. Miyata, Y. Tani, Microbial manganese(II) oxidation: A potential tool for treatment of metal-contaminated waters, In Handbook of Metal Biotechnology: Applications for Environmental Conservation and Sustainability, M. Ike, M. Yamashita, S. Soda (eds.) Chapter 1, p1-10, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.(2012).

〔その他〕

ホームページ

<http://mc12408b.u-shizuoka-ken.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 幸則 (TANI YUKINORI)
静岡県立大学・環境科学研究所・准教授
研究者番号: 10285190