

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24561008

研究課題名(和文) マンガン酸化微生物共生系とバイオリアクターを利用した海水中からのレアメタル回収

研究課題名(英文) Recovery of minor metals from seawater using Mn(II) oxidation symbiotic microbes system and bioreactor

研究代表者

宮崎 征行 (MIYAZAKI, Masayuki)

独立行政法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・技術主事

研究者番号：50399573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：微生物が作り出すマンガン酸化物はレアメタルを吸着しやすい事が知られている。そこで、本研究ではマンガン酸化物を連続的に作り出すことができる微生物群集をバイオリアクターに集積培養することを目的とした。植種源には海底堆積物サンプルを、バイオリアクターにはdown-flow hanging sponge (DHS) リアクターを採用し、二価のマンガンを含む人工海水を基本とした培地をリアクターに供給した。その結果、DHSバイオリアクター内に独立栄養細菌とマンガン酸化菌が繁茂し、微生物が生成したと思われるマンガン酸化物の生成が確認された。

研究成果の概要(英文)：It has been known that biogenic manganese oxides have been shown to adsorb minor metals. Therefore, if we produce bio-manganese oxides continuously, we should be able to capture minor metals such as nickel and cobalt from seawater. For this purpose, we tried to cultivate manganese-oxidizing microbial community from a marine sediment sample in a bioreactor, called the down-flow hanging sponge (DHS) bioreactor. As a result, a complex microbial community that contains autotrophic microorganisms and manganese oxidize microorganisms grew in the DHS bioreactor and production of bio-manganese oxides were observed.

研究分野：環境微生物分野

キーワード：DHSリアクター レアメタル マンガン酸化物 微生物間共生

1. 研究開始当初の背景

深海底にはマンガン団塊と呼ばれるマンガン-鉄酸化物が存在する。マンガン団塊はレアメタルである Ni, Co, Mo, Pt, W, Ti や Cu 等が多く含有していることが知られており、海底資源として注目を集めている。このマンガン団塊の形成の詳細なメカニズムは不明な点が多いが、水中の溶存 Mn (II) が Mn (IV) へ酸化されることで形成されることは分かっている。無機的な Mn (II) 酸化反応の速度は非常に遅いため、マンガン酸化物の形成には微生物(マンガン酸化菌)が関与しているとの報告がある。加えて、無機的な反応で作られるマンガン酸化物よりもマンガン酸化菌によって生成されるマンガン酸化物(バイオ Mn 酸化物)の方がレアメタルを多量に吸着することが知られている。

このような背景から、海洋性のマンガン酸化菌をうまく増殖させ、効率良くバイオ Mn 酸化物を作ることができれば、海水からレアメタルが回収できるのではないかと考えた。しかし、実際にマンガン酸化菌を優占的に培養するのは簡単ではない。その理由は、マンガン酸化菌は培養する技術が確立されていない難培養性の微生物であるからである。今のところ分かっている点は、マンガンを酸化しエネルギーを獲得して生きている独立栄養好気性菌ではなく、有機物を酸化する従属栄養好気性菌であって、理由は不明だがマンガンがあればついでに酸化しているということである。このような特徴からマンガンを加えた有機性海水培地を用いればマンガン酸化菌を簡単に培養できそうだが、優占的に増殖させることは容易ではないことが知られている。おそらくマンガン酸化菌は有機物濃度に対して親和性が高いため、極低濃度の有機物で培養を行えばマンガン酸化菌を優占的に増殖できるのではないかと考えた。その根拠は、マンガン団塊の世界の分布図を見ても、大陸縁辺部の有機物負荷量が高いところではなく、有機物濃度が低いと考えられる外洋に多く分布しているからである。また、レアメタルを回収するためには、連続的にマンガン酸化物を生成させる必要がある。これは、排水処理分野で利用されている Down-flow Hanging Sponge (DHS) リアクターを用いる事で連続的に生成することが可能となる。DHS リアクターはスポンジを微生物の固定化担体を利用する一種の散水床であるが、装置内は水で満たさず、酸素曝気なしに、気相から酸素がスポンジに供給されて好気状態に保たれることが特徴である。本研究で提案する技術は海洋環境で起きている自然現象 (=マンガン団塊形成) を DHS リアクター内部に再現し、効率的に行うもので、環境への負荷も少なくレアメタル

の回収が期待できる。

2. 研究の目的

海底のマンガン団塊に高濃度のレアメタルが濃縮されていることに着目し、微生物共生系とバイオリクターを利用することでマンガン酸化菌にマンガン酸化物を形成させ、海水中からレアメタルを回収する技術の開発を行う。

3. 研究の方法

本研究では大きく分けて3つの行程で行った。1つ目は、レアメタル回収用 DHS リアクターの作製である。プラスチック製の円柱状の筒の中に22個のスポンジを吊した。スポンジの大きさは $8\text{ cm}^3 (2 \times 2 \times 2\text{ cm})$ の立方体で、これらの総体積は 176 cm^3 となった。微生物増殖の貧栄養海水培地は、メタン酸化微生物及びアンモニア酸化微生物の独立栄養細菌により、マンガン酸化物を生産させるため、独立栄養細菌の培養に用いられる MJ 人工海水組成を元にアンモニアやメタンを加えた。両 DHS リアクターの水理学的滞留時間 (HRT, Hydraulic Retention Time) は4.5時間で行った。また、供給ガスはアンモニア酸化型リアクターでは純空気、メタン酸化型リアクターでは純空気に最終濃度2%になるようにメタンガスを加えた。気体滞留時間 (ART, Air Retention Time) はアンモニア酸化型リアクターでは8日間、メタン酸化型リアクターでは4.5時間で行った。微生物の植種源は、沖縄トラフ多良間海丘に広がる酸化鉄被膜地帯の海底堆積物サンプルを用いた。レアメタル回収 DHS リアクターは温度を15に設定した恒温器内に設置した。

2つ目に行ったことは、マンガン酸化物を DHS リアクター内に形成させるための条件検討である。これは、培地の基質量や滞留速度を変化させることにより、効率よくマンガン酸化物を形成させる為の条件検討を行った。マンガン酸化物の形成効率は、流入水及び流出水のマンガンイオン濃度 Mn(II) を測定することで、マンガンイオンの除去速度を算出した。

3つ目は、増殖した微生物群集解析によるマンガン酸化菌の特定である。スポンジ上に生育した微生物を人工海水に懸濁し回収した。回収した微生物から DNA を抽出し 16S rRNA 遺伝子に基づいたクローニング法により、生育した主要な微生物種の特定を行った。

4. 研究成果

(1) リアクターの作製

メタル回収用リアクターは図1のように作製した。15のクロマトチャンバー内に培地となる人工海水と反应用リアクターを設

置した。リアクターの下部は生成したマンガン酸化物が溜まることが予想されたので、下部から回収・排水できるように設計した。培地やガスの流速調整はチューピングポンプを使用した。

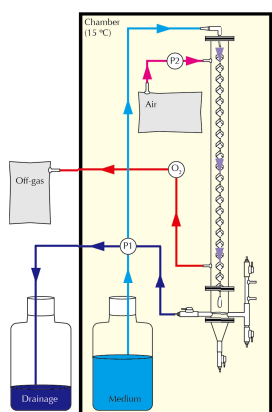


図1 マンガン酸化物形成リアクターの模式図。P：ポンプ、O₂：酸素濃度計

(2) マンガン形成の条件検討

メタン酸化型リアクターとアンモニア酸化型リアクターの両リアクターの初期条件 (Phase 1) は、Mn(II) 6.5 mg/L、アンモニア体窒素 363.3 μM、HRT 4.5 h、ART 8 h で行い、メタン酸化型リアクターのみメタンを最終濃度 2% になるように加えた。両リアクターの条件検討は表 1 に示す。

メタン酸化型リアクターの初期段階としてアンモニア酸化反応が起こり、pH が低下してきた為、アンモニア濃度を 1/10 にし、pH の低下を止めた (Phase 2, 72-196 日目)。168 日目からリアクター内部のメタン濃度の測定を行った所、検出限界以下までメタンが消費されていたため ART の速度を倍に速めた (Phase 3, 197-210 日目) が、それでも全て消費されていたため、濃度を倍の 4% とした (Phase 4, 211-231 日目)。流入水、流出水の化学分析の結果から、アンモニア酸化反応により硝酸が蓄積されていたことから、硝酸は不要の可能性があったため、硝酸を抜いた (Phase 5, 232-258 日目)。pH についてより海水に近づけるために pH 7.5 に変更した (Phase 6, 259-370)。この条件のまま運転を続けると、293 日目にメタンを流入している部分から黒色スポットが形成されたため、同条件で 100 日ほど運転を行った。しかし、マンガン酸化反応は進まなかった。添加しているマンガンが濃すぎて、生育するための阻害剤として働いている可能性があったため、マンガンの濃度を 1.5 mg/L に減らし、抜いていた硝酸についても初期濃度に戻した。また、メタンガスの流入口について下方に変更を行った。その後しばらく運転を続けるとガスの流入口付近でマンガン酸化反応が起こり、

スポンジが黒色に変化していった (図 2)。また、流出水のマンガンイオン濃度も減少した (Phase 7, 371-559 日目)。メタン酸化、硝酸還元のみでマンガン酸化が行われている可能性があったので、アンモニアを抜いた (Phase 8, 560-587 日目)。1 ヶ月ほど行ったが、急激にマンガン酸化反応が行われなくなったため、アンモニア濃度を元に戻した (Phase 9, 588-746 日目)。順調にマンガン酸化が行われたため、マンガン濃度を倍の 2.9 mg/L に上げた所、マンガン除去速度が低下した。 (Phase 10, 747-現在)

アンモニア酸化型リアクターもメタン酸化型リアクターと同様にアンモニア酸化反応の為 pH が低下したため、緩衝剤で pH の低下を押さえた。しかし、緩衝剤の作用のため、マンガン濃度がうまく測定できなかったため、緩衝剤を抜き、流速を半減した。それでも pH の低下が押さえられなかったため、アンモニア濃度を半減した。また、pH についてより海水に近づけるために pH 7.5 に変更した。メタン酸化型リアクターと同様にマンガンの濃度が濃すぎて、生育するための阻害剤として働いている可能性があったため、マンガンの濃度を 1.5 mg/L に減らした。また HRT の流速を当初と同じ条件に戻したが、マンガン酸化反応は起こらなかった。このため既にマンガン酸化反応が起こっているメタン酸化型リアクターに集中するためにアンモニア酸化型リアクターは 636 日目で終了した。

同じサンプルを用いて 2 種の独立栄養細菌との共培養を行ったが、マンガン酸化物が形成されたのはメタン酸化型リアクターの方だけであった。

表 1 DHS リアクターの条件検討履歴。黄色の部分は変更点を示す。

メタン酸化型リアクター							
Phase	days	Mn (mg/L)	NH ₃ (μM)	pH	CH ₄ (%)	HRT	ART
1	0-71	6.5	363.3	7	2	4.5	22.5
2	72-196	6.5	36.3	7	2	4.5	22.5
3	197-210	6.5	36.3	7	2	4.5	11.5
4	211-231	6.5	36.3	7	4	4.5	11.5
5	232-258	6.5	36.3	7	4	4.5	11.5
6	259-370	6.5	36.3	7.5	4	4.5	11.5
7	371-559	1.5	36.3	7.5	4	4.5	11.5
8	560-587	1.5	0.0	7.5	4	4.5	11.5
9	588-746	1.5	36.3	7.5	4	4.5	11.5
10	746-present	2.9	36.3	7.5	4	4.5	11.5

アンモニア酸化型リアクター							
Phase	days	Mn (mg/L)	NH ₃ (μM)	pH	CH ₄ (%)	HRT	ART
1	0-77	6.5	363.3	7	-	4.5	8
2	78-161	6.5	363.3	7	-	4.5	8
3	162-168	6.5	363.3	7	-	2.3	4
4	169-258	6.5	181.6	7	-	2.3	4
5	259-370	6.5	181.6	7.5	-	2.3	4
6	371-532	1.5	181.6	7.5	-	2.3	4
7	533-636	1.5	181.6	7.5	-	4.5	4

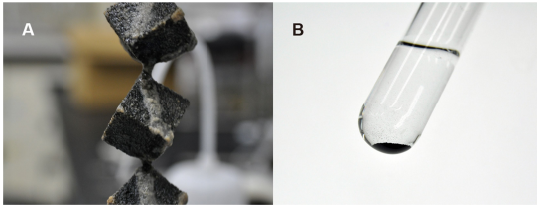


図2 生成した黒色物質。Aはスポンジ上に形成した状態。Bは試験管に回収した黒色物質。

(3) 微生物群集構造解析

マンガン酸化物の生成が確認されたメタン酸化型リアクターについてリアクター運転開始634日目に採取したサンプルについて、16S rRNA 遺伝子に基づいた微生物群集構造解析を行った。その結果、優占種としては、*-proteobacteria* 綱の *Methylophaga* 属が検出された。スポンジが黒色に変化したリアクター下部のサンプルとリアクター上部のサンプルを比較すると、*-proteobacteria* 綱の *Rhodospirillaceae* 科に属す細菌の割合が増加していた。本科に属す細菌がマンガン酸化反応の一端を担っている可能性が示唆される。

以上の結果から、本研究で目的とした、微生物共生系を利用し、連続的にマンガン酸化物を形成させる事に成功した。今後の研究としては、マンガン酸化物形成のさらなる効率化、マンガン酸化物に吸着するレアメタルの吸着効率や化学物質種を特定、本リアクターでマンガン酸化を担っている可能性のある *Rhodospirillaceae* 科細菌について、分離や遺伝子解析によるマンガン酸化機構の解明、実サンプル(海水)を用いた実験などを行って実用化に結び付けたい。

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1件)

Cao, L. T. T., Kodera, H., Abe K., Imachi, H., Aoi, H., 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 research*. 68: 545-553. 査読有、DOI: 10.1016/j.watres.2014.10.002

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 征行 (MIYAZAKI, Masayuki)
独立行政法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・技術主事

研究者番号：50399573

(2)研究分担者

井町 寛之 (IMACHI, Hiroyuki)
独立行政法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・主任研究員
研究者番号：20361933

(3)連携研究者

大橋 晶良 (OHASHI, Akiyoshi)
広島大学・工学研究科・教授
研究者番号：70169035