

1. 背景と目的

今日のハイテク製品製造に必要不可欠であるレア金属の安定確保は、日本における重要課題の一つである。ある種の工業排水や河川、湖沼、海洋には、希薄ではあるが膨大な量のレア金属が存在している。レア金属吸着作用に優れた生物学的マンガン酸化物 (BioMnOx) を用いることで、効率的にレア金属の濃縮回収ができるのではないかと考え、まずは BioMnOx を生成するマンガン酸化細菌の集積培養に着目した。マンガン酸化細菌は従属栄養性であるが、浄水処理の生物濾過槽など有機物が乏しい環境中からの検出例が多いことから、低濃度有機物環境下を好むと推測できる。そのため、独立栄養細菌の代謝産物を有機物源としたマンガン酸化細菌の集積培養を試みた。先行研究では、アンモニアを供給して硝化細菌群を培養することでマンガン酸化性能の向上が確認された (硝化依存マンガン酸化)¹⁾。しかし、硝化反応の卓越により pH が低下し、マンガン酸化性能が悪化するという問題も明らかとなった。そこで本研究では、アンモニアの代わりにメタンを供給してメタン酸化依存のマンガン酸化細菌の培養を試みた。図-1 にマンガン酸化細菌の培養構想を示した。まずメタンを供給し、メタン酸化細菌 (MOB) を培養する。そして、メタン酸化細菌の代謝物を低濃度有機物としてマンガン酸化細菌 (MnOB) に供給することで培養を試みた。

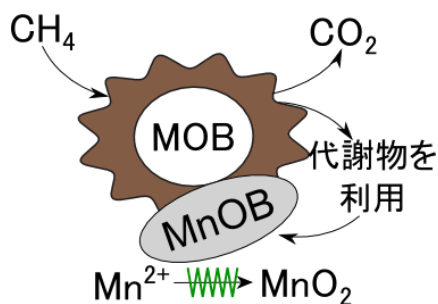


図-1 マンガン酸化細菌の培養イメージ

本研究ではメタン供給によりマンガン酸化が進行するのかの検証、マンガン酸化反応に関与する細菌群の調査、生成されたマンガン酸化物の調査を行うことを目的とした。メタンを用いる利点としては、メタン酸化に伴う (硝化反応による pH 低下のような) 槽内環境の変化は小さく運転管理が容易であること、エネルギーとして利用価値の少ない中途半端な濃度のメタンを利用できることなどが挙げられる。また、メタン酸化細菌も硝化細菌と同様に、多様な有機物を細胞外に放出することが知られている。

2. 実験方法

2.1. 実験装置および運転条件

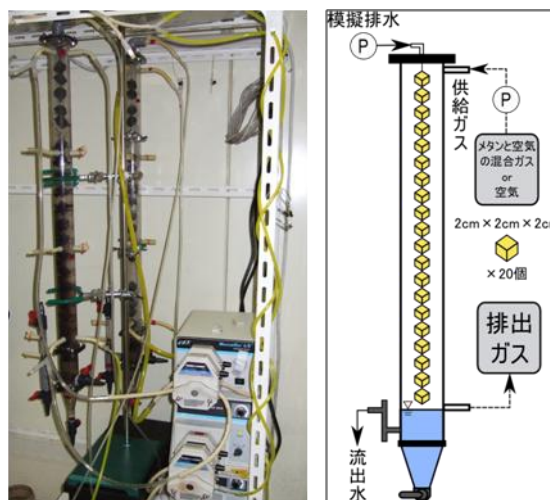


図-2 実験装置および概要図

本実験では20 mm 角のスポンジ担体20個をリアクター上部より一列に吊るして円柱型容器に入れた密閉型の下降流懸垂型スポンジ(DHS) リアクターを2台用いた。植種源には以前稼働していたマンガン酸化 DHS リアクターのバイオマスと活性汚泥を用いた。MnCl₂を5~20 mg-Mn・L⁻¹に、窒素源としてNaNO₃を5 mg-N・L⁻¹にそれぞれ調整した無機模擬廃水を各リアクターの上部より供給し、一方にはメタンと空気の混合ガスを、他方には空気のみを

リアクター内に送った。前者を Run 1、後者を Run 2 とした。

2.2.測定項目

マンガン酸化性能はリアクター流入・流出時の溶存マンガン（大部分が Mn^{2+} ）濃度を比色法（HACH）で測定することで評価した。各イオン態窒素濃度は IC を、酸素とメタン濃度は GC-TCD を用いてそれぞれ測定した。その他の運転パラメータとして、供給水および供給ガスの流入量、流入・流出時の pH についても測定を行った。

2.3.細菌群集構造解析

運転 189 日目にメタン酸化リアクターの上・中・下 3 カ所のスポンジ担体からバイオマスを採取し、細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析を行った。PCR 増幅には EUB338Fmix と BAC1389Rm17mer(5'-ACGGGCGGTGTGTACAA-3') のプライマーセットを用いた。クローン化されたコロニーを無作為に選択し、両端のベクター領域からの塩基配列解析をタカラバイオ(株)に委託した。アセンブリングして 1000 塩基長以上になった 84 クローンに対して、Classifier と ClustalW を用いてグループ分けをした後、arb および MEGA5 を用いて系統的位置の推定を行った。

3. 実験結果および考察

3.1.マンガン酸化リアクターの運転結果

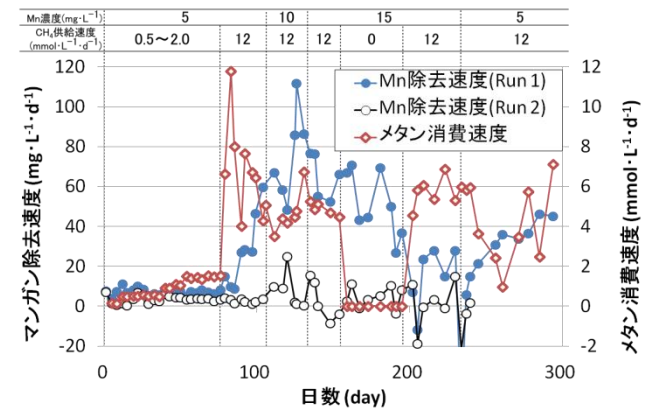


図-3 マンガン除去速度とメタン消費速度の経日変化

マンガン除去速度とメタン消費速度の経日変化を図-3 に示した。Run 1 では運転 76 日目にメタン供給負荷を $12\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ （メタン分圧 5%）に上げたところ、メタン消費速度の増加に続いて、マンガン除去速度の上昇が確認された。その後、マンガン流入負荷を段階的に上げたところ、マンガン除去速度は一時的に $100\text{ mg}\cdot\text{Mn}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ を超えたが、概ね $60\text{ mg}\cdot\text{Mn}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ を平均として変動していた。これは Run 2 のマンガン除去速度と比べても十分に高くマンガン酸化におけるメタン供給の有効性が示された結果となった。一方で、運転 155 日目からはメタン供給を止めて空気のための供給に変更したが、マンガン除去速度は引き続き $60\text{ mg}\cdot\text{Mn}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ を平均として推移した。この結果より、メタン酸化リアクター内のマンガン酸化細菌は MOB の代謝産物だけでなく、(死滅した細胞の) 菌体成分も有機物源として利用している可能性が示唆された。供給マンガン濃度が 15 mg/L の期間（運転 133～196 日）においてマンガン除去速度の低下が確認された。供給マンガン濃度を 5 mg/L に変更したところ、マンガン除去性能の回復傾向がみられた。この結果から高濃度マンガンによるマンガン酸化反応の阻害の可能性が示唆された。

3.2. メタン供給 DHS 内の微生物群集解析

微生物群集解析結果(赤字:メタン酸化細菌)			
Phylogenetic group	検出クローン数	Phylogenetic group	検出クローン数
<i>Chlamydiae</i>	1	<i>Proteobacteria</i>	37
<i>Chloroflexi</i>	2	<i>α Proteobacteria</i>	23
<i>Gemmatimonadetes</i>	2	<i>Methylocaldum</i>	1
<i>Acidobacteria</i>	1	<i>β Proteobacteria</i>	5
OP10	1	<i>δ Proteobacteria</i>	5
<i>Verrucomicrobia</i>	5	<i>γ Proteobacteria</i>	4
<i>Planctomycetes</i>	6	<i>Methylocistaceae</i>	10
<i>Actinobacteria</i>	6	<i>Bacteroidetes</i>	16
unclassified bacteria	4	クローン数合計	81

図-4 微生物群集解析結果

運転 189 日目に採取したメタン酸化リアクターの担体内バイオマスからは、13 門 60 ファイロタイプに分類される細菌種が検出された（図-4）。メタン供給を止めて 30 日程度経過していたが、*Methylocaldum* 属および *Methylosystis* 属に分類される MOB がそれぞれ 1 クローンおよび 10 クロー

ン検出された。他に検出頻度の高かったグループとしては *Hyphomicrobiaceae* 科 (9 クローン), *Bacteroidetes* 門内 PHOS-HE21 グループ (8 クローン), MRC17 グループ (6 クローン) などがみられた。一方で、既知のマンガン酸化細菌に近縁なクローンは検出されておらず、本リアクター内でマンガン酸化に関与している細菌種を特定することはできなかった。

3.3 生成されたマンガン酸化物の調査

メタン供給 DHS リアクター下部の沈殿物の調査を行った。沈殿物は運転 189 から 288 日間に堆積したものをを用いた (図-5 左)。この期間に除去されたマンガンは 380mg だった。一方、沈殿物中のマンガンは 4mg であり、マンガン酸化物の回収率は約 1% となった。スポンジは黒くなっており (図-5 右) 大半のマンガン酸化物はスポンジに吸着していると考えられる。効率的な回収方法を検討する必要がある。



図-5 沈殿物とスポンジ写真

左：運転 189～288 日間の Run 1 リアクター沈殿物
右：Run 1 スポンジ(運転 274 日目)

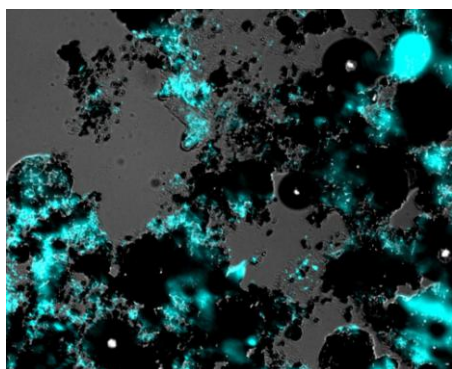


図-6 DAPI 染色された沈殿物

また、沈殿物を DAPI によって染色し、顕微鏡での観察を行った (図-6)。水色に染色された微生物を確認することができた。また、マンガン酸化物と考えられる黒い物体を確認することができた。

4. まとめ

メタンを供給することでマンガン酸化が進行することが確認された。またメタン供給を止めても一定期間はマンガン酸化が維持されることが示された。クローン解析からは既知のマンガン酸化細菌に近縁な細菌種の存在は確認されなかった。沈殿物の顕微鏡観察ではマンガン酸化物と思われる黒い物体を確認することができた。

5. 今後の課題

得られたマンガン酸化物のレアメタル吸着性能を調査する必要がある。アンモニア依存のマンガン酸化物と吸着性能の比較を行う。

マンガン酸化物の回収率は 1% であり、効率的な回収方法を検討する必要がある。

マンガン酸化反応に関与する微生物を特定するには、Multicopper oxidase などのマンガン酸化機能遺伝子やスーパーオキシドに関係する機能遺伝子を用いた菌叢解析を行う必要がある。

<参考文献>

- 1) Cao ら, Biological Oxidation of Manganese by Down-flow Hanging Sponge Reactor, 第 45 回水環境学会年会講演集, p280 (2011).