

活性汚泥内の微生物に及ぼすマンガン酸化物の影響

広島大学 学生会員 ○白石 亮平
 広島大学 正会員 尾崎 則篤
 広島大学 正会員 金田一 智規
 広島大学 正会員 大橋 晶良

1. はじめに

今日、近代産業の発展に伴いレアメタルの需要が拡大している¹⁾。レアメタルは供給源に偏りがあるため、効率的な資源回収・再利用技術の開発が急務である。また発展途上国では排水などに含まれる重金属が環境問題につながっており、金属含有排水処理に微生物プロセスを適用することが注目されている。我々はレアメタル吸着能に優れた生物生成マンガン酸化物(BioMnO_x)を生成するマンガン酸化細菌(以下 MnOB)に注目し、金属除去・レアメタル回収を兼ねた生物学的排水処理の技術開発を行っている。MnOB は多くの菌種での分離培養例が報告されているが、集積培養が難しいことに加えなぜ酸化するのは分かっていない。技術の実用化に向けて MnOB の集積培養が急務であるため、MnOB について新たな知見を得る必要がある。本研究室の先行研究では、MnO₂をあらかじめ DHS リアクターに塗布して排水処理運転をすることで、MnOB が早期に培養でき、Mn(II)酸化性能のスタートアップが早くなることを発見している²⁾。この要因として、MnO₂が多くの微生物に対して活性阻害を及ぼし、それに耐えうる MnOB が優占的に培養されたのではと考えられた。

2. 目的

改良したプレート培養(MnO₂ プレート)で MnOB を分離培養し、活性汚泥中の MnO₂ 耐性菌の構成比を明らかにすること、さらには MnO₂ 耐性菌を同定することを本研究の目的とした。

3. 実験方法

微生物培養の一般的な手法の一つに、固形培地を用いたプレート培養がある。この培地を高濃度の MnO₂を加えた培地(MnO₂ プレート)に代えることで、MnO₂に耐性のある細菌のみがコロニーを形成すると考えられる。すなわち、MnO₂非耐性細菌は培養されないことになる。そこで一般的な K-medium 培地(Culture プレート)だけでなく、MnO₂プレートの二種類を作成し、コロニー形成に違いが見られるのかを調べた。MnO₂プレートの培地には 100g L⁻¹となるように化学合成マンガン酸化物(キシダ化学)を添加した。培養微生物は東広島浄化センターの活性汚泥を用いた。活性汚泥は超音波(Amplitude, Time: 30, 10s/ 液量 1. 5mL)により分散処理した。

Table 1 培養条件と培地組成

Cultivation Conditions		Trace element (mg L ⁻¹)	
Main solid compound	Gellan Gum (8g 300mL ⁻¹)	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
pH Buffer (pH 7.8)	HEPES Buffer 20mM	NaSeO ₄	0.005
Organic Conc.	300mg COD L ⁻¹	NiCl ₂ 6H ₂ O	0.019
Conc. of MnO ₂	100g L ⁻¹	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.024
Organic Compounds	K-medium (Peptone, Yeast Extract)	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.022
Temp.	30 °C	H ₃ BO ₃	0.001
Inocula	Activated Sludge	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.043

キーワード マンガン酸化細菌, マンガン酸化物耐性菌, 微生物活性阻害, 希少金属回収

連絡先 〒739-0046 広島県東広島市鏡山 1 丁目 3-2 広島大学工学研究科(A2-441) 環境保全工学研究室

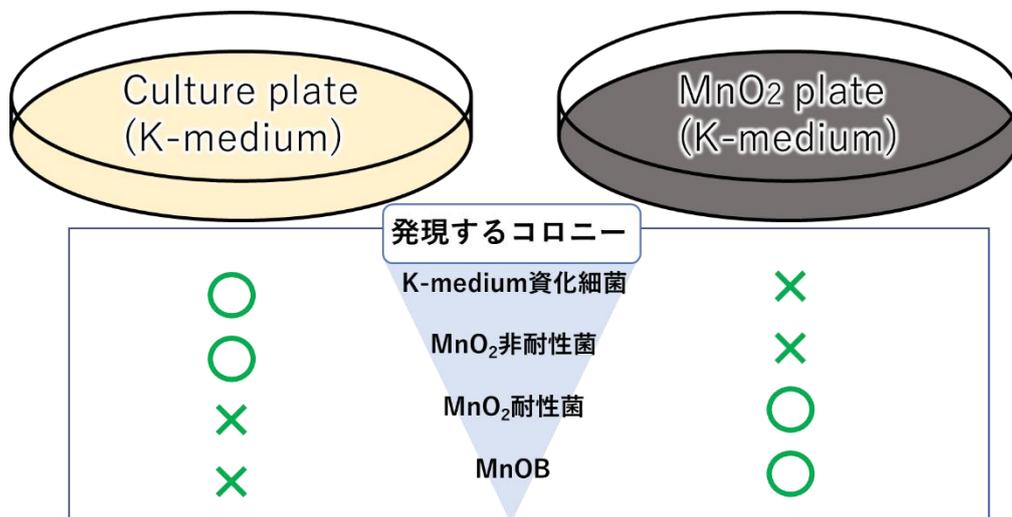


Fig.1 プレート培養と発現するコロニー

これら二種類のプレートに対して PBS (×1) で希釈した分散汚泥を 50 μ L 植種し、7日間培養を行った。プレート上に形成されたコロニーは目視で数えた。また、形成されたコロニーの一部は分離培養を行うために植え継ぎを行った。10mg Mn (II) L⁻¹ を含んだ液体培地 (Table 1 の固形成分を除いたもの) で培養した MnO₂ 耐性細菌のマンガン酸化能は、MnO₂ に反応して青色に呈色する LBB 試薬により調べた。また 16S rRNA 遺伝子解析により MnO₂ 耐性菌の同定を行った。

4. 結果および考察

一般的なプレート培養方法から MnO₂ を加えた MnO₂ プレートでの培養を確立するまで約半年の時間を要した。これは高温で滅菌した MnO₂ を培地に加えると、pH に影響を及ぼす、培地のせん断強度が低下するなどの問題点が発生したからである。そこで培地組成や条件を以下のように変更した。培地のせん断強度を高めるために Gellan Gum を 7g→8g300mL⁻¹ とし、培地の設定 pH をより保ちやすくするため pH 緩衝液である HEPES Buffer を 10mM→20mM に変更した。さらに水分によるカビの発生を防ぐため分散汚泥の植種量を 100 μ L→50 μ L に変更した。以上より MnO₂ を加えた MnO₂ プレートにおいても、目視で確認できるコロニーが形成された。しかし Culture プレートでのコロニー数よりも非常に少なかった。

このことは、MnO₂ がある微生物に対して強い阻害物質であることを示しており、仮説を強く支持するものである。

K-medium 資化従属栄養細菌の中で、MnO₂ に耐性のあると考えられる細菌はわずか約 0.4% であり、残りの約 99.6% が MnO₂ に耐性のない細菌であった。MnO₂ プレートで形成された大きいコロニー (MnO₂ 耐性菌) を植え継ぎ、マンガン酸化能を調べると約 80% が有していることが明らかになった。一方で LBB 試薬による呈色反応の大きさから、菌体により能力の大小は異なることが考えられた。

二種類のプレート培養から得られた MnO₂ 耐性菌の構成比は、先行研究であるリアクターでの構成比と明らかに異なっ

ていた。具体的には、プレート培養での MnO₂ 耐性菌の構成比はとても少ない結果であった。これは、リアクター内では死骸を基質として取り込む細菌が優占化されやすく、それらが MnO₂ 耐性菌や MnOB である可能性が考察された。

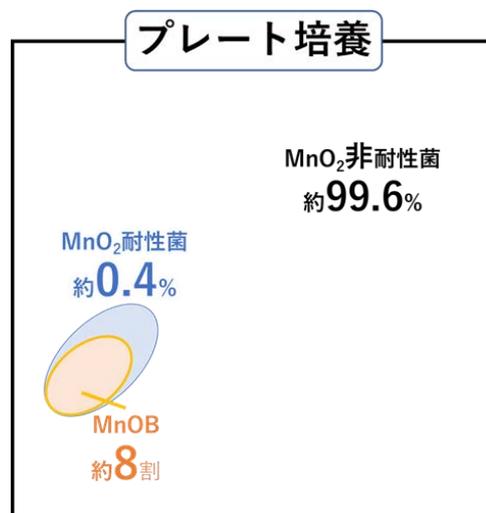


Fig. 2 K-medium 資化従属栄養細菌の構成比

さらに MnO₂ プレートで分離された MnO₂ 耐性菌を 16S rRNA 遺伝子を用いた塩基配列解析を行い、系統樹を作成することで同定を行った。系統学的に見ると、MnO₂ 耐性菌は多様な菌種を示していたが、綱レベルで 2 つのクラスに分類された。

これと LBB 試薬によるマンガン酸化能を照らし合わせると Fig.3 のようになった。系統樹から MnOB 近縁種でもマンガン酸化をしない細菌がいることが明らかになった。

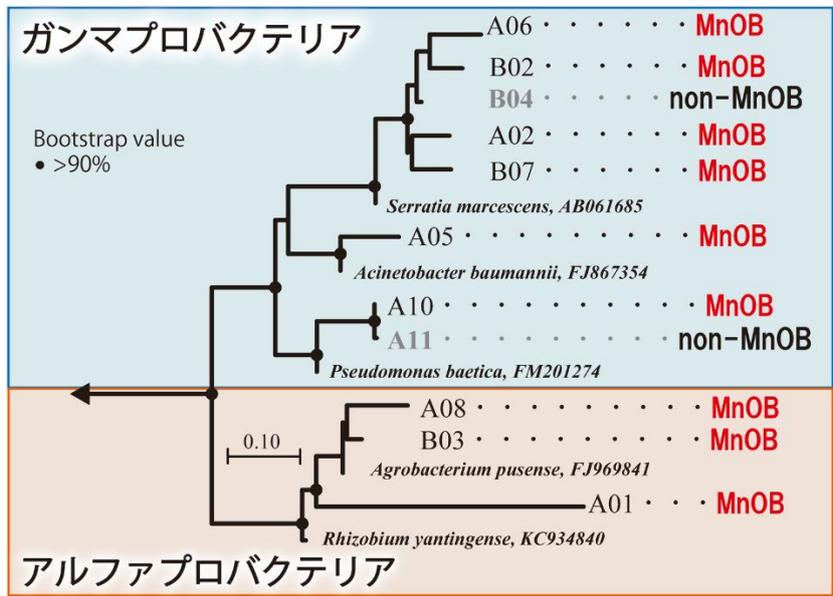


Fig.3 MnO₂ プレートから分離培養した MnO₂ 耐性菌の系統樹

上記の結果は K-medium 資化従属栄養細菌を対象にしたものであるが、他の基質を資化する細菌においても MnO₂ 耐性菌、非耐性菌が存在する可能性がある。しかし、どのようなメカニズムで MnO₂ は細菌の活性を阻害し、また耐性のある細菌はどのようにして回避するのかなど MnO₂ 耐性菌の特徴、共通点を明らかにすることはできなかった。

5. 結論

MnO₂ プレート培養では一般的なプレート培養に比べ、MnOB を効率良く分離培養できることを明らかにした。さらに活性汚泥内の MnO₂ 耐性菌の構成比を明らかにし、分離培養した MnO₂ 耐性菌を系統学的に分類した。

6. 今後の課題

MnO₂ 耐性菌の特徴、共通点の探索をするために MnO₂ プレートに形成されている小さいコロニーを含めて網羅的に解析する必要がある。本研究では化学合成マンガン酸化物を用いたが、生物生成マンガン酸化物でも同様の結果が得られるのか確かめる。

微生物死骸を基質とするリアクター運転により MnOB 集積培養効率が上がるのか確かめる。

参考文献

- 1) 吉田和哉, 植田充美, 池道彦: バイオテクノロジーシリーズ, メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回収「新元素戦略の新しいキーテクノロジー」, 2009.
- 2) 廣江 貴史ら: 第 49 回日本水環境学会年会, マンガン酸化細菌の微生物群集内における MnO₂ 生成の意義, 3-F-11-4, 2015.