濃縮海水中の金属回収に有用な海洋性マンガン酸化細菌 バシラス族 NI-1 株の分離

仲山英樹[*1]，池上康之[*2]

Isolation of a Manganese Oxidizing Bacterium, *Bacillus* sp. NI-1, as a Tool for Metal Recovery from Concentrated Seawater

Hideki NAKAYAMA[*3] and Yasuyuki IKEGAMI

[*3] Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology
8916-5 Takayama-cho, Ikoma, Nara 630-0192, Japan

Metal pollution and metal shortage are a growing threat to the global environment and world high-tech industry. As inorganic metals and mineral salts are concentrated simultaneously in desalination process, metals dissolved in concentrated seawater produced by the process have both of bad and good potentials as metal-pollution and as metal-mine. Therefore, we reason that the key to a successful marine metal-biotechnology is to develop a novel biotechnology that can be applied for concentrated seawater. Halophilic bacteria are typical inhabitants of high-salinity sites such as seawater. Therefore, in order to develop marine metal-biotechnology coupling with desalination process, we isolated Mn(II)-oxidizing marine bacteria from Imari Bay, Imari, Saga, Japan. One of the isolates, *Bacillus* sp. NI-1 strain showed Mn(II)-oxidizing activity on cell-surface under high-salinity conditions. At present, we are aiming to develop superior marine metal-biotechnology for metal-recovery from concentrated seawater using *Bacillus* sp. NI-1.

Key Words : metal-biotechnology, desalination, concentrated seawater, manganese oxidizing bacteria

1. 緒　　言

近代化とともに発展してきたハイテク産業の副産物として環境中に廃棄された金属類は，現在に至るまで土壌や海洋等の環境中で残存して累積された結果，深刻な環境問題を引き起こしている．特に，水産資源への被害が懸念される海洋の金属汚染に対しては，飲料水などの淡水を対象とした既存の環境技術は高濃度の塩分が阻害的に作用するため適用できない．そこで，本研究では海水並びに海水淡水化プロセスの副産物として生成する濃縮海水中で汚染源または有用資源として溶存する金属の浄化・回収に有用な新規金属バイオ技術の開発を目指す．特に本研究では，高塩環境に適応した好塩性微生物の生物機能を活用し，海洋温度差発電・淡水化に伴い生成する濃縮海水からの金属回収・浄化へ応用可能な新規金属バイオ技術の創出を目的とした．

なお，本研究は平成 19-20 年度佐賀大学海洋エネルギー研究センター全国共同利用研究 (07004A および 08005A)として行った．

[*1] 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科
（〒630-0192　奈良県生駒市高山町 8916-5）
[*2] 佐賀大学 海洋エネルギー研究センター
E-mail: nakayama.hideki01@bs.naist.jp

2. 実験材料と方法

2・1　環境微生物試料の採取　本研究における環境微生物試料は，佐賀県伊万里市の佐賀大学海洋エネルギー研究センターに設置された伊万里湾海水の取水口付近の底泥および取水口から採取した海水を用いた．

2・2　マンガン酸化微生物選抜培地　マンガン（Mn）酸化微生物の選抜用の平板培地には，人工海水，LEPT 培地，K 培地を使用した[(1)]．ここで，選択培地に添加する Mn(II)として $MgCl_2$ を使用し，微生物の培養温度は 30℃とした．

2・2　金属元素の定量分析　本研究における金属元素の定量は，佐賀大学海洋エネルギーセンター共同利用設備である ICP 発光分析装置を使用した．

2・2　微生物の生物学的実験　微生物の培養試験，遺伝子同定など分子生物学的実験は奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科の設備を使用した．

3. 結　　果

3・1　Mn(II)酸化微生物の分離　ICP 発光分析により、佐賀大学海洋エネルギーセンターで採取した伊万里湾海水中には比較 Mn 溶存量が高いことが示された(data not shown). そこで本研究では, 佐賀大学海洋エネルギーセンターの取水口付近の底泥および取水した海水を環境試料として用い, Mn 回収・浄化に有用な Mn (II) 微生物を探索することにした. これまでに, 2 株の Mn(II)酸化細菌 NI-1 (Fig.1) および NI-2 (Fig. 2) を取得した[2].

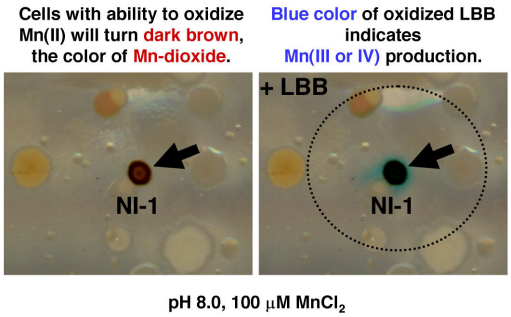

Fig. 1　Isolation of NI-1 strain on ASWYP media.

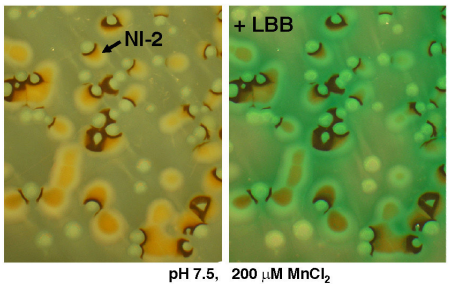

Fig. 2　Isolation of NI-2 strain on LEPT media.

3・2　高塩環境下での Mn(II)酸化活性　濃縮海水環境においても Mn(II)酸化活性を有する株を選抜するため, 3-6% NaCl 環境下における各株の Mn(II) 酸化能を比較した. その結果, NI-1 株のみが高い Mn(II) 酸化能を維持していたことから, 濃縮海水中で利用可能な株として NI-1 株を選択した (Fig. 3).

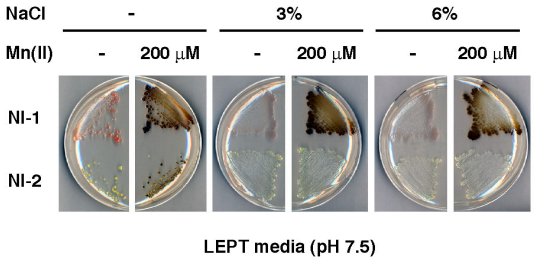

Fig. 3　NI-1 cells exhibit Mn(II)-oxidizing activity under high-salinity conditions.

3・3　海水からの Mn 回収試験　NI-1 株の Mn(II)酸化活性により、海水からの Mn 回収が可能であるか調査するため、伊万里湾海水で作製した液体培地に異なる濃度の $MnCl_2$ を添加して NI-1 株を培養し、細胞ともに海水培地から回収された Mn を定量化した. その結果、海水中の Mn(II)濃度によらず、20 または 200 μM Mn(II)を少なくとも 90%の割合で回収できることが示された(Fig. 4).

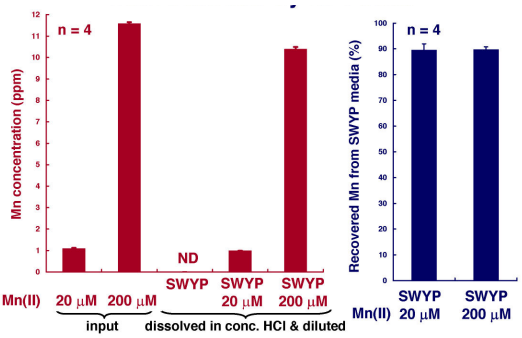

Fig. 4　Mn could be recovered from seawater by NI-1 cells.

3・3　Mn 酸化物の細胞内局在　Mn 酸化物を蓄積した NI-1 株の細胞を走査型電子顕微鏡で観察したところ, 胞子を形成した細胞の表層にフィラメント状の Mn 酸化物の蓄積が確認された.

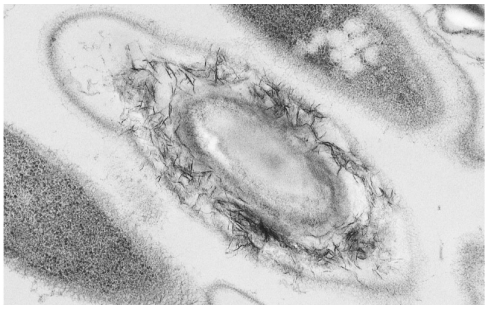

Fig. 5　Accumulation of Mn oxides on the cell-surface of NI-1 spore were confirmed by TEM.

3・4　NI-1 株の分子系統解析　ゲノム PCR 法によりクローニングした NI-1 株の 16S rRNA 遺伝子の配列情報を基に、NI-1 株の分子系統解析を行った. その結果、NI-I 株は *Bacillus* 族の Mn(II)酸化細菌であることが示された(Fig. 6). また、本研究で取得した *Bacillus* sp. NI-1 株は, 既知の海洋性 Mn(II)酸化 *Bacillus* sp. に広く存在する Mn(II)酸化酵素 MnxG[3] の相同遺伝子を有することも明らかとなった(data not shown).

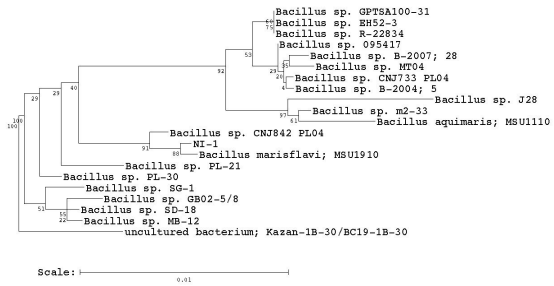

Fig. 6　The NI-1 strain is classified in *Bacillus* sp. based by DNA sequencing of the 16S rRNA gene.

4. 考　　察

本研究では、ハイブリッド型の海洋温度差発電システムなどの海水淡水化により生成する濃縮海水中に溶存する金属類の回収・除去に有用なメタルバイオ技術(Fig. 7)の開発を目指し，Mn(II)酸化細菌の探索を行った．その結果，Mn(II)酸化活性を有する *Bacillus* sp. NI-1 株を用いたバイオミネラリゼーション（biomineralization）により，海水中に溶解したMn(II)を酸化してMn(IV)として回収・除去することが可能であることが示された(Figs. 3-5)．

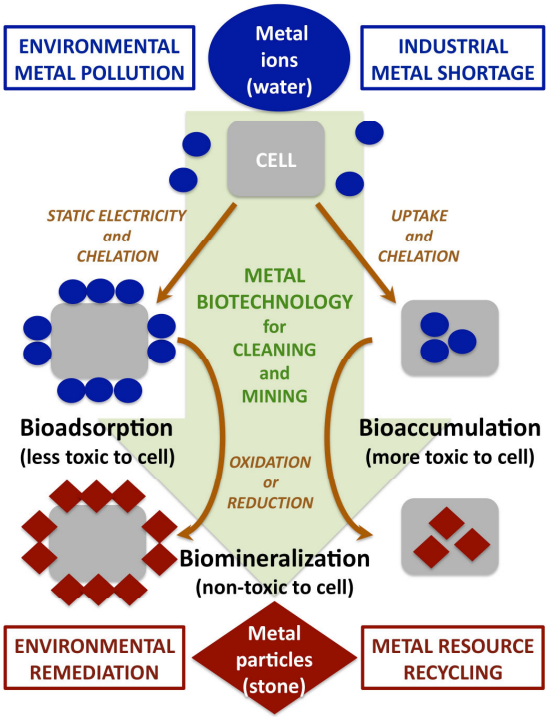

Fig. 7　Metal-biotechnology for metal-recovery and -removal from environmental water systems.

今後は，Mn 系吸着剤を用いた海洋からのリチウム回収システムにおいて，リチウムとともに不純物として回収される Mn の除去に本研究成果を応用することより，回収リチウムの高純度度化が可能になることが期待される．さらに、本研究の進展により，海水淡水化プロセスに付随した金属回収システムが実現化されれば，持続可能な省エネルギー型の環境メタルバイオ技術の創出が可能となる点が意義深い．

5. 謝　辞

本共同研究を遂行するにあたり，佐賀大学海洋エネルギー研究センターにおいて海水サンプルの採取など技術的なサポートをして頂いた 浦田和也氏に，また ICP 分析装置の使用についてご助言いただいた志水倫恵氏に感謝いたします．そして，NI-1 株の透過型電子顕微鏡写真を撮影して頂いた奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科の岩野恵氏および永井里奈氏に感謝いたします．

文　　献

(1) Dick, G.J., Lee, Y.E., and Tebo, B.M. (2006). Manganese(II)-oxidizing *Bacillus* spores in Guaymas Basin hydrothermal sediments and plumes. Appl Environ Microbiol 72, 3184-3190.
(2) Nakauama, H., Ikegami, Y. (2008). Screenimg Abstract of the 60th Annual Meeting of Japan Society of Biological Engineering.
(3) Dick, G. J., J. W. Torpey, T. J. Beveridge, and B. M. Tebo, B. M. (2008). Direct identification of a bacterial manganese(II) oxidase, the multicopper oxidase MnxG, from spores of several different marine *Bacillus* species. Appl Environ Microbiol 74, 1527-1534.