

4. 結果と考察

(1) 硝化細菌との共培養でのバイオMn 酸化物の生成

1) マンガン酸化細菌の集積培養結果

リアクターのマンガン酸化速度を図 4.1.1 に硝化反応とマンガン酸化反応との関係を図 4.1.2 に示す。実験開始直後には硝化反応が確認されたが、Mn 酸化は見られなかった。しかし、アンモニア性窒素負荷を上げながら根気強く運転したところ約 100 日と長期間を要したが、Mn 酸化反応が確認できるようになり、Mn 酸化細菌と硝化菌の微生物生態系が構築された。その後も窒素負荷、マンガン負荷を上げながら実験を継続（約 2 年）するとマンガン除去速度は、安定的に処理された。マンガン除去速度はアンモニア酸化速度と強い関係が見られた。これは、マンガン酸化細菌の増殖に硝化細菌の代謝有機物が利用され、その活性化には代謝量が重要であることを示唆している。マンガン酸化細菌は硝化細菌の代謝産物を利用して増殖することができるという仮説を証明することができた。

DHS リアクターにアンモニアと Mn (II)を含む人工排水を連続供給することで、マンガン酸化細菌の培養と MnO₂の生成に成功した。ただし、培養が観察されるようになるまでには長期間を要し、Mn (II)処理のスタートアップは遅かった。マンガン酸化細菌の増殖速度は遅く、Mn 酸化速度の向上には長期間を要した。Mn (II)の除去とマンガン酸化速度は、アンモニアの供給負荷と正の関係が見られた。しかし、アンモニアの供給負荷に限界があった。負荷を高め過ぎると不完全硝化により亜硝酸塩が生成され、これが Mn 酸化速度を阻害していると推察され、のため最大 Mn 酸化速度は 0.6kg Mn/m³/d であった。この速度は目標の約 1/2 であり、速度を高めるための運転方法の改善が必要である。

スポンジ担体は生成されたマンガン酸化物で覆われ黒くなっていた。また DHS リアクターの下部には沈殿物ができる。沈殿物を顕微鏡で観察するとバイオマンガン酸化物の集合体の中に細菌が埋もれているように見えマンガン酸化物と細菌が共に落下している。このことはバイオマンガン酸化物の回収において細菌との分離プロセスが必要であり、またマンガン酸化細菌がリアクターからウォッシュアウトして高速処理を阻む要因になることを示唆している。さらに、生成したバイオマンガン酸化物は完全には下部から回収できず、流出水にわずかではあるが混入しており実用化への課題が見えた。

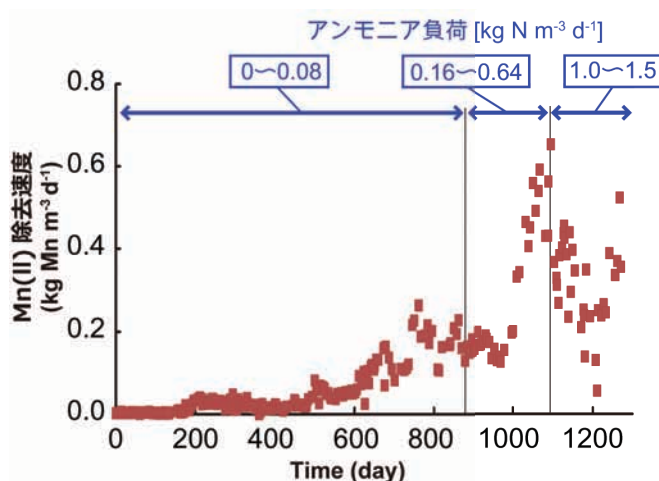


図 4.1.1 硝化細菌共存での Mn(II)除去速度

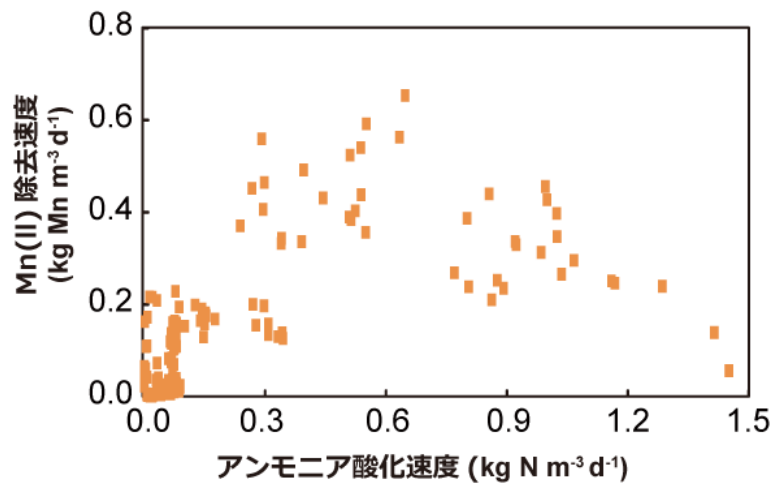


図 4.1.2 硝化速度との関係

2) 生成バイオマンガン酸化物のレアメタル吸着

運転 360 日目よりニッケルとコバルトを流入基質に添加し、金属除去性能を観察した(図 4.1.3)。DHS バイオリアクターで生成したバイオマンガン酸化物は過酸化水素との反応で市販のマンガン酸化物よりも非常に高い触媒活性を示し、比表面積の大きい構造である事がわかる。レアメタル吸着の特性を調べるために人口排水にニッケルとコバルトを添加して連続処理を行った。添加の直後にニッケルとコバルトは完全に除去されバイオマンガン酸化物に吸着されたことが察せられる。一方流出水のマンガンは流入よりも高い濃度で検出される。これはリアクター内で除去されるマンガンの全てがマンガン酸化物に吸着されるのではなく、一部は生成マンガン酸化物に吸着されていて吸着親和性の高いニッケルやコバルトが流入すると吸着しているマンガンと交換することによってマンガン流出してくると考えられる。定常での除去マンガンに対するニッケルとコバルトの除去量の比はそれぞれ 10、50%であり、吸着の選択制について報告されているようにコバルトのほうが優先的に除去された。DHS リアクターにマンガンとレアメタル含有水を通水するだけでバイオマンガン酸化物生成とレアメタル吸着が同時に起きてマンガンとレアメタルの回収が可能である。

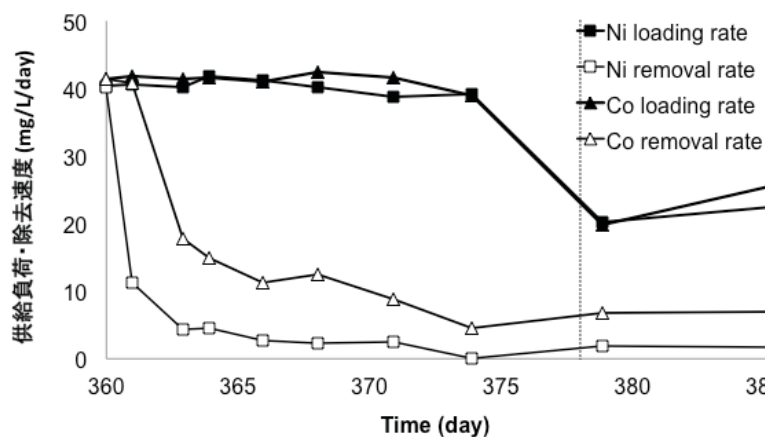


図 4.1.3 硝化細菌共培養リアクターにおけるニッケル・コバルト除去性能

3) 微生物解析結果

運転216日めに回収したバイオマスの16S rRNA遺伝子に基づくクローニング解析結果を表4.1.1に示す。DHS バイオリアクターにはアンモニア基質のみ供給されているので、スポンジ担体に保持されているバイオマスは主に硝化細菌で構成されると思われるが16S rRNA 遺伝子のクローニングによる微生物群集解析ではアンモニア酸化細菌の *Nitrosomonas* 属、亜硝酸酸化細菌は *Nitrobacter* 属と *Nitrospira* 属のクローンが検出されるがその割合は全体の約20%にとどまった。残り80%の細菌は硝化細菌の代謝産物により支えられていることになる。この代謝産物等を利用する従属栄養細菌は多種多様であり、未分類培養に属するクローンも多く検出された。マンガン酸化細菌に関してはマンガン酸化細菌と知られている *Bacillus* 属が1クローン検出されたのみであった。この *Bacillus* 属のクローンのみがマンガン酸化に関わっているとは考えにくく、未知のマンガン酸化細菌の存在が示唆され、それらがリアクター内でマンガン酸化を担っていると推測された。

表 4.1.3 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析結果

Phylogenetic group	This study		
	Number of clones	Remarks	Percentage
AOB (Betaproteobacteria)			
<i>Nitrosomonas</i> spp.	3		4%
NOB (Alphaproteobacteria)			
<i>Nitrobacter</i> sp.	5		6%
NOB (Nitrospira)			
<i>Nitrospira</i> spp.	11	Sublineage-I(8) ^a , Sublineage-II(3)	13%
MnOB (Firmicutes)			
<i>Bacillus</i> sp.	1		1%
Other alphaproteobacteria	10		12%
Other betaproteobacteria	8	<i>Burkholderiales</i> (4), <i>MND1</i> (4)	10%
<i>Gammaproteobacteria</i>	6	<i>Xanthomonadales</i> (4), <i>Legionellales</i> (2)	7%
<i>Deltaproteobacteria</i>	2		2%
<i>Actinobacteria</i>	2		2%
<i>Acidobacteria</i>	7	Gp1(1), Gp3(2), Gp4(4)	9%
<i>Bacteroidetes</i>	6	b-17BO(1), PHOS-HE21(4), <i>Saprospirales</i> (1)	7%
<i>Chamydiae</i>	1		1%
<i>Chlorobi</i>	3	OPB56(3)	4%
<i>Chloroflexi</i>	3	<i>Anaerolineae</i> (1), <i>Chloroflexi</i> (1)	4%
<i>Gemmatimonadetes</i>	3		4%
<i>Planctomycetes</i>	7	<i>Pirellulales</i> (1), <i>Planctomycetales</i> (4), <i>Gemmatales</i> (1), Other(1)	9%
<i>Verrucomicrobia</i>	2	Gp3(1), <i>Opiritatus</i> (1)	2%
WS3	1		1%
OD1	1		1%
OP10			
<i>Spirochaetes</i>			
Total	82		100%
^a () represent the clone number detected			

4) まとめ

- ・硝化酸化細菌との共生系でマンガン酸化細菌の集積培養が可能であった。

- ・マンガン除去速度はメタン消費速度と関係があり、本リアクターでは $0.6 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ に達した。
- ・培養が観察されるようになるまでには長期間を要し、Mn (II)処理のスタートアップは遅かった。
- ・硝化反応が進むにつれてマンガン除去速度は高くなっていったが、硝化速度が $0.6 \text{ kgN/m}^3/\text{day}$ 以上になると、pH の低下もしくは亜硝酸阻害によりマンガン除去速度は低下した。
- ・長期間の運転後、スポンジのマンガン酸化物形成、リアクター下部に沈殿が確認された。
- ・バイオマスを 16S rRNA に基づいた系統解析を実施した結果、2 割が硝化菌で残りの 8 割が硝化細菌の代謝産物によって増殖する菌であった。既知のマンガン酸化細菌に近縁なクローンはほとんど検出されなかった。このことから新種のマンガン酸化細菌の存在が示唆された。

(2) メタン酸化細菌との共培養でのバイオMn酸化物の生成

1) マンガン酸化細菌の集積培養結果

マンガン濃度の推移を図 4.2.1 に、マンガン除去速度を図 4.2.2 に、マンガン除去速度とメタン消費速度の推移を図 3.5 に示す。

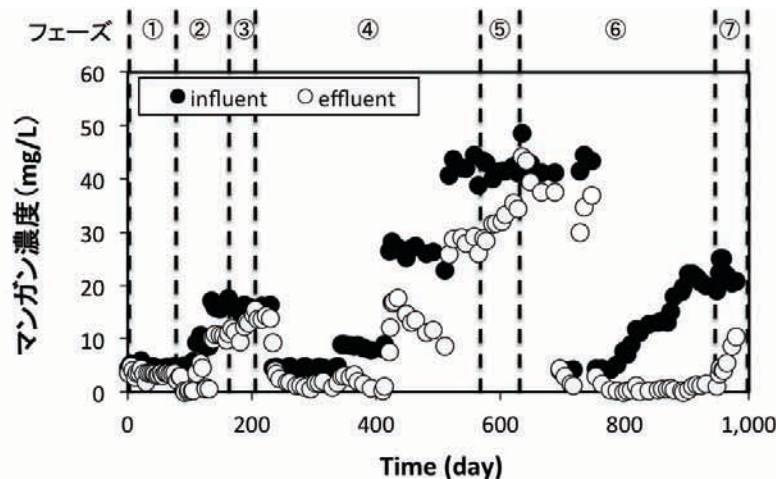


図 4.2.1 マンガン濃度推移

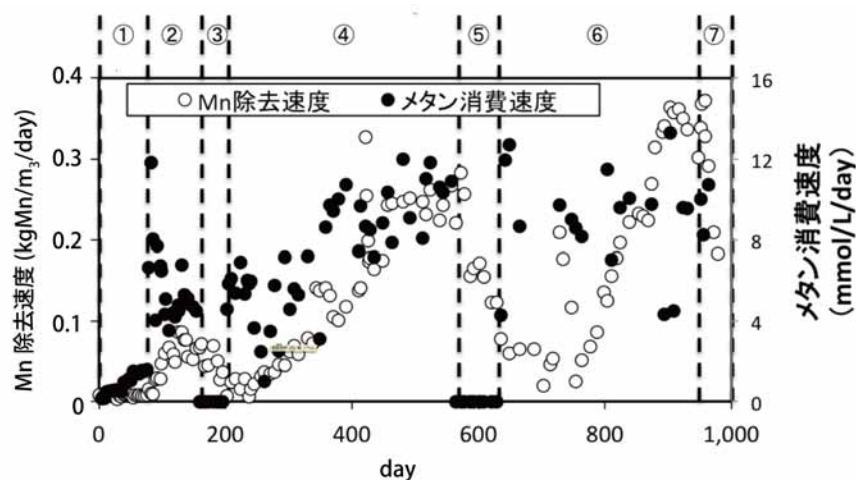


図 4.2.2 マンガン除去速度とメタン消費速度の推移

フェーズ 1 ではメタン消費が起きているがマンガン除去は発生しなかった。その原因をメタン酸化細菌の代謝物が少ないためであると考えフェーズ 2 からガス供給速度を 6 倍にし、メタン酸化細菌のさらなる培養を試みたところメタン消費速度は 2 倍になりメタン酸化細菌の培養に成功した。メタン消費速度の増加に続いてマンガンの除去がみられ、メタン酸化細菌との共生系でマンガン酸化細菌の培養に成功した。メタン消費速度とマンガン除去速度には関係があり (図 4.2.3) マンガン酸化細菌の集積培養にはメタン消費速度が重要であることがわかった。

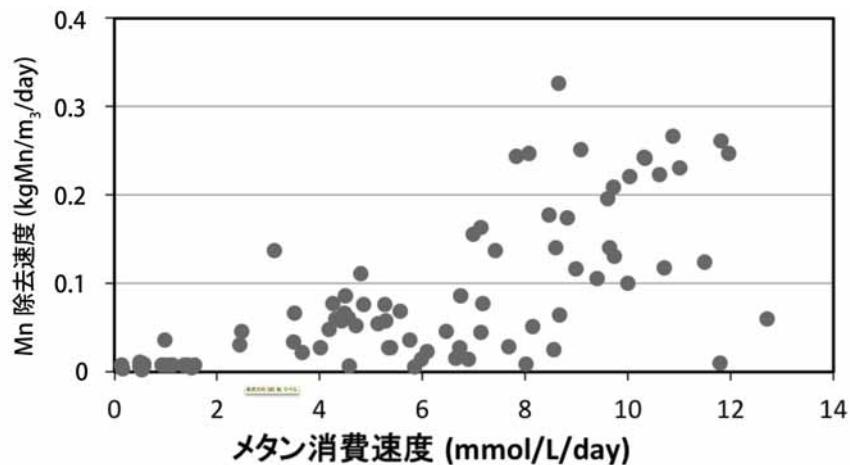


図 4.2.3 メタン消費速度とマンガン除去速度の関係

図 4.2.2 におけるフェーズ 3、5 はメタン供給を止めた期間である。マンガン除去性能はメタンを止めても直ちに悪化することはなく、どちらのフェーズにおいても 2 週間ほど維持できたがその後低下した (図 4.2.3)。代謝物がない環境でもマンガン酸化が起きたことからマンガン酸化細菌は代謝物だけでなく、菌体を摂取できる可能性が示唆された。

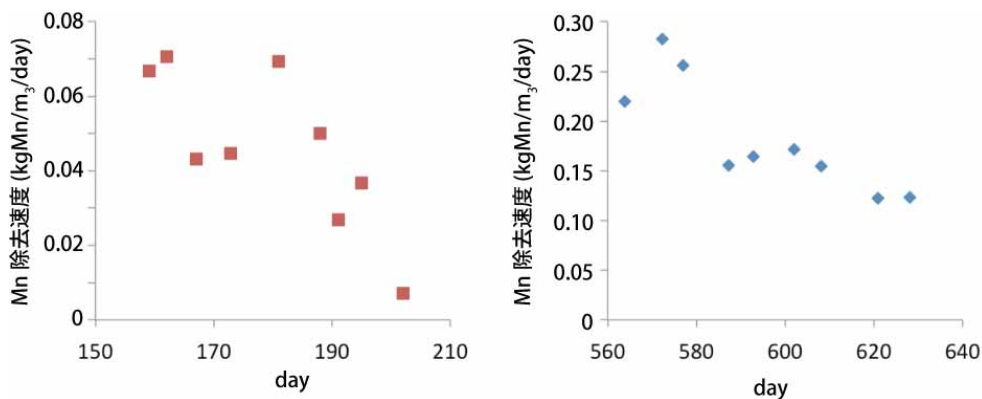


図 4.2.4 メタン無供給期間のマンガン除去速度推移 (左: フェーズ 3、右: フェーズ 5)

フェーズ 5 のメタンを止めた期間でマンガン除去速度が大きく低下したフェーズ 6 ではメタン供給を開始してもマンガン除去が回復しなかった (図 4.2.5 の②)。このときマンガン濃度はリアクター内で 30 mg/L

以上であり、高濃度マンガン環境がマンガン酸化細菌の培養に適さないことが示唆された。高濃度マンガン環境でマンガン酸化が起こらないことは *Leptothrix discophora* を用いた実験で報告されている¹³⁾。運転 750 日目からマンガン濃度の管理に注意して低濃度マンガン環境で運転を行ったところ顕著なマンガン除去の回復がみられ (図 4.2.5 の③) マンガン除去速度は最高で $0.35 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ を記録した。このことからマンガン酸化細菌の培養には低濃度のマンガン環境が適することが示唆された。

本リアクターのメタン消費速度は概ね 10 mmol/L/day を推移した (図 4.2.2)。幡本らは DHS リアクターを用いてメタン酸化細菌を集積培養した結果、メタン酸化速度が最大で $2.2 \text{ kgCOD/m}^3/\text{day}$ を記録したと報告している¹⁴⁾。単位を換算すると約 70 mmol/L/day となり、本装置のリアクターよりも 6 倍ほどメタンを酸化することができる。さらにこれまで報告された知見より MOB の最大活性として、バイオフィーム形成培養実験系での MOB の CH_4 酸化能力は $280 \text{ g CH}_4/\text{m}^3/\text{day}$ と報告されている。これらよりリアクター内で MOB が何らかの活性阻害を受けていることは明瞭であった。また担体に含まれる物質のうち MOB が最も触れる機会を有しているものとして生物生成 MnO_2 が挙げられる。これについてはマンガン酸化細菌が環境中で MnO_2 を生成することで近傍に生息する基質競合従属栄養微生物に対して活性阻害を引き起こし自身にとって優位な環境を創造するような生存戦略を用いていることが考えられる。

本系では上記で示したマンガン酸化細菌の AOB の共培養実験で観察された pH 低下を解決するためメタン酸化細菌(MOB)を用いたマンガン酸化細菌の共培養を試みた実験である。MOB はマンガン酸化細菌と同様に従属栄養細菌に分類される微生物であり、その名称にあるとおり CH_4 を酸化して増殖する。また CH_4 は気体としてリアクターに供給することが可能で、担体部分でのマンガン酸化細菌の有機基質供給源を MOB の代謝産物のみ限定できる。さらには MOB の代謝が AOB とは異なり pH に影響することはほとんど無いため、リアクターの運転管理をより容易にするものである。

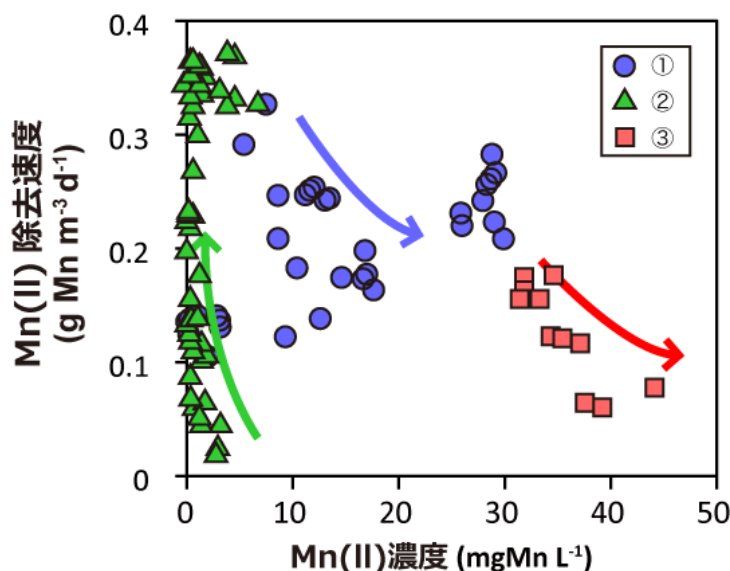


図 4.2.5 マンガン除去速度とリアクター内マンガン濃度の関係
(① : 343-577 日、 ② : 577-695 日、 ③ : 754-903 日)



図 4.2.6 運転 189 日目スポンジの様子

2) 生成バイオマンガン酸化物のレアメタル吸着

生物学的マンガン酸化物は高い金属吸着能力を持つことが知られているが、本実験でリアクター内に生成されたマンガン酸化物がレアメタルであるニッケル・コバルトを吸着するのかを調査した。そのためフェーズ 7 からニッケル・コバルトを 10 mg/L の濃度で添加した。図 4.2.7 にニッケル・コバルトの除去速度を示す。

添加開始時からニッケル・コバルトの除去が起き、リアクター内に生成されたマンガン酸化物の高いレアメタル吸着性能が示された。時間の経過とともに除去性能は低下した。これは供給されるニッケル・コバルトに対してリアクター内で新たに生成されるマンガン酸化物の量が釣り合っていないからである。ニッケル・コバルトの添加開始からマンガン除去速度は下がっているためリアクターの定常的なレアメタル除去性能を調査することはできなかった。生物学的マンガン酸化物ではニッケルよりもコバルトに対して吸着親和性が高いことが知られているが、この実験でも一貫してコバルトの方が吸着されていることがわかった。

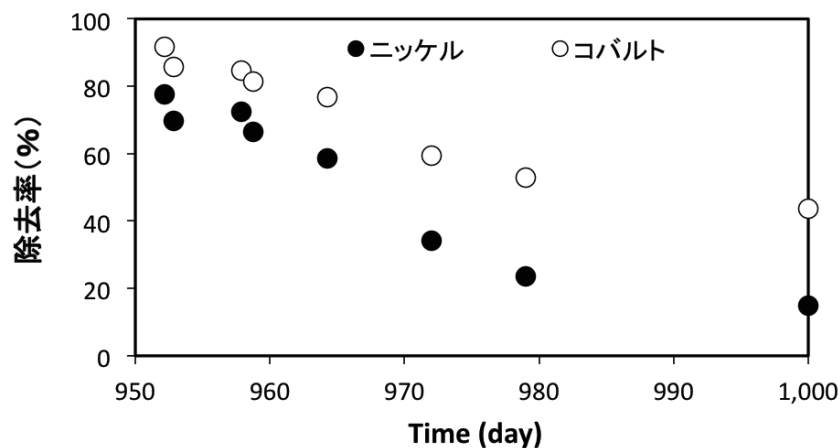


図 4.2.7 ニッケル・コバルト除去速度の推移

3) 微生物解析結果

運転 189 日目のバイオマスに対して細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に基づいたクローン解析を行った結果を表 4.2.1 に示す。クローニング解析の結果、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。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* 属に分類されるメタン酸化細菌がそれぞれ 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。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。このことから本リアクター内で新種のマンガン酸化細菌がマンガン酸化に関与している可能性が示唆された。

表 4.2.1 16S rRNA 遺伝子に基づく微生物解析結果

Phylogenetic group	Number of clones
MOB (<i>Alphaproteobacteria</i>)	
<i>Methylocistaceae</i>	1
MOB (<i>Gammaproteobacteria</i>)	
<i>Methylocaldum</i>	10
Other <i>Proteobacteria</i>	26
<i>Bacteroidetes</i>	16
<i>Chlamydiae</i>	1
<i>Chloroflexi</i>	2
<i>Gemmatimonadetes</i>	2
<i>Acidobacteria</i>	1
OP10	1
<i>Verrucomicrobia</i>	5
<i>Planctomycetes</i>	6
<i>Actinobacteria</i>	6
Unclassified bacteria	4
Total	81

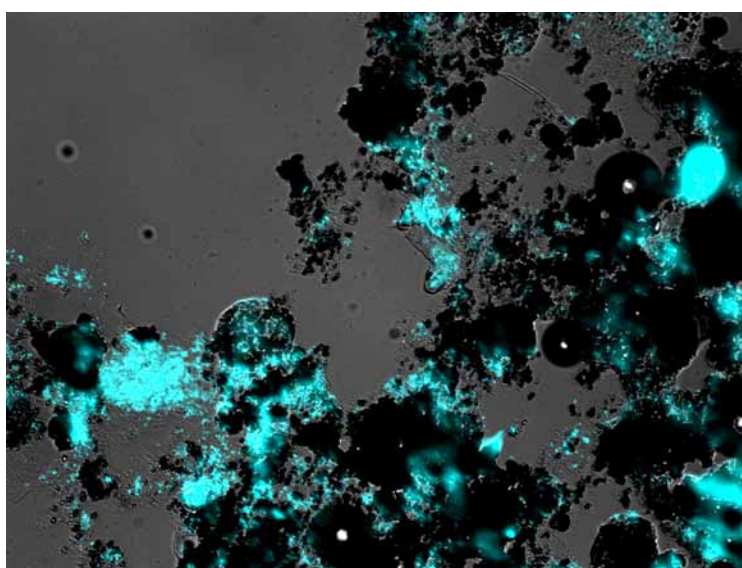


図 4.2.8 DAPI 染色結果

運転 189 日目の沈殿物に対して DAPI 染色を行った。図 4.2.8 では水色に染色されたものが細菌であり、黒色のものはマンガン酸化物と思われる。この画像からマンガン酸化物と微生物は密接に存在していることがわかった。今回の研究では DHS リアクターの下部にマンガン酸化物が自然に堆積することを期待しているが、この画像からはマンガン酸化物だけでなくマンガン酸化細菌を含む細菌も共に剥離・落下していることが明らかになった。このため、マンガン酸化物を回収したい場合は両者を分離するプロセスを開発する必要があると考えられる。

4) まとめ

- ・メタン酸化細菌との共生系でもマンガン酸化細菌の集積培養が可能であった。
- ・DHS リアクターを用いてメタン酸化細菌との共培養によるマンガン酸化細菌の集積培養に成功した。硝化菌では pH の低下などに注意を払わねばならないが、メタン酸化細菌を用いることで容易にマンガン酸化細菌の集積培養ができる。
- ・マンガン除去速度はメタン消費速度と関係があり、本リアクターでは $0.35 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ に達した。
- ・マンガン酸化細菌はメタン酸化細菌の代謝物だけでなく菌体を摂取できる可能性が示唆された。
- ・マンガン酸化細菌は高濃度マンガン環境では増殖できないもしくは悪くなること、培養には低濃度マンガン環境が適することが示唆された。
- ・バイオマスを 16S rRNA に基づいた系統解析を実施した結果、メタン酸化細菌は検出されたものの、既知のマンガン酸化細菌に近縁なクローンは検出されなかった。また、多種多様な細菌が検出された。このことから新種のマンガン酸化細菌の存在が示唆された。

(3) 活性汚泥を唯一の基質としたマンガン酸化細菌の集積培養

4) 実験結果

図 4.3.1 に Mn(II)濃度、Mn 流入負荷・除去速度、酸素除去速度を示す。リアクターは最初、 5 mgMn/L 、HRT12 時間で開始したが、Mn(II)除去が確認されなかったため、46 日目に硝化細菌共生系を利用した Mn 酸化バイオリアクターのバイオマスを再植種した。その結果、Mn 酸化反応が確認されるようになり、マンガン酸化細菌の培養に成功した。そこで、フェーズ 2 からフェーズ 4 まで徐々に HRT を短縮し、Mn(II)の供給負荷を高めた。その結果 153 日目にはマンガン除去速度は $0.01 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ に達した。しかしながら、その後 Mn 除去速度は低下したため有機物供給が必要であると判断し、適時活性汚泥を添加した。その結果、Mn 除去速度はフェーズ 3 には $0.044 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ 、フェーズ 4 には $163 \text{ g/m}^3/\text{day}$ に達した。フェーズ 4 以降、Mn 供給負荷を上げるために、流入の Mn(II)濃度を上げたが Mn 除去速度は低下した。これは Mn(II)イオンがマンガン酸化細菌に対して毒性を有するためであると考えられる。Phaes 5、6、7 でも同様に活性汚泥を添加し、その後 Mn 除去のピークが表れ、その後除去速度が低下する傾向が繰り返された。この期間の最大 Mn 除去速度は $0.36 \text{ g/m}^3/\text{day}$ であった。このような間欠的な活性汚泥供給を繰り返しながら、流入 Mn 負荷を過剰に上げたフェーズ 8 では Mn 除去速度 $1.69 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ を達成した。すなわち、Mn 酸化細菌は溶解性有機性基質でなくても、固形性の活性汚泥、細菌の死骸を利用することができ、基質として産業廃棄物の活性汚泥を用いてマンガン酸化細菌は集積培養でき、しかも Mn(II)除去速度は既存の共培養による方法よりも数倍高く、本研究で目標としている性能を超える成果が得られた。

Mn 除去速度は目標値であった $1 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ を大幅に越える、これまでに報告されていない画期的なマンガン処理速度である。その後、マンガン除去速度が低下したため汚泥を追加で添加した所、マンガン処理速度はある程度維持されたが、Mn 酸化速度が早いためリアクターの様々な箇所にマンガン酸化物が形成されるトラブルが頻繁に起こるようになり、結果として処理能力は低下した。安定したマンガン処理性能を確保するため、マンガン酸化物が肥大化した後の回収法を検討する必要がある。

酸素の消費量も Mn 除去速度の増加に伴い増えていった。酸素消費量は特に活性汚泥添加直後に増加する傾向が得られた。培養期間中にはリアクター下部に大量の Mn 酸化物が沈殿、回収された。組成を調査した結果、重量比で沈殿物乾燥重量の 67% を Mn が占めていた。

2) 微生物解析結果

657 日目に採取されたバイオマスに対して次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子解析を行った結果を表 4.3.1 に示す。運転リアクター中のバイオマスには様々な微生物群集が存在していた。特にマンガン酸化細菌として知られている *Hyphomicrobium* 及び *Pedomicrobium* も検出されており本リアクターでマンガン酸化を担っていた有力な微生物群の一つであると考えられる。しかしながらそれぞれ 2%、0.8% と存在割合は低い結果となった。最も検出されたのは、アルファプロテオバクテリア門の unclassified に属する *Rhodospirillaseae* であったが既往の報告でマンガン酸化グループは報告されていない。マンガン酸化細菌にもマンガン酸化能力の高いグループと低いグループが存在しており、*Pedomicrobium* sp. ACM3067 といったマンガン酸化細菌は MCO を有しており高速マンガン除去が達成出来る事が報告されている^{22), 23)}。マンガン酸化に利用されていると推測されているスーパーオキシドを細胞外で合成する細菌群はほとんど存在していないと考えられていた。しかしながら近年の研究では様々な種および環境条件でスーパーオキシドを生成している事が示されている²⁴⁾。本リアクターでは集積培養されているグループはいなかったと考えられるが、大量に MCO もしくはスーパーオキシドを合成する少数精鋭の微生物グループがマンガン酸化を担っていたと考えられる。

3) まとめ

- ・ 活性汚泥を基質として供給する事でマンガン酸化細菌の集積培養が可能であった。
- ・ マンガン除去速度は $1.69 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ で実用化の目標値であった $1.0 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ に達した。
- ・ スタートアップに 200 日以上かかり、その後 $1.0 \text{ kg/m}^3/\text{day}$ を超えるまで 2 年以上かかった。

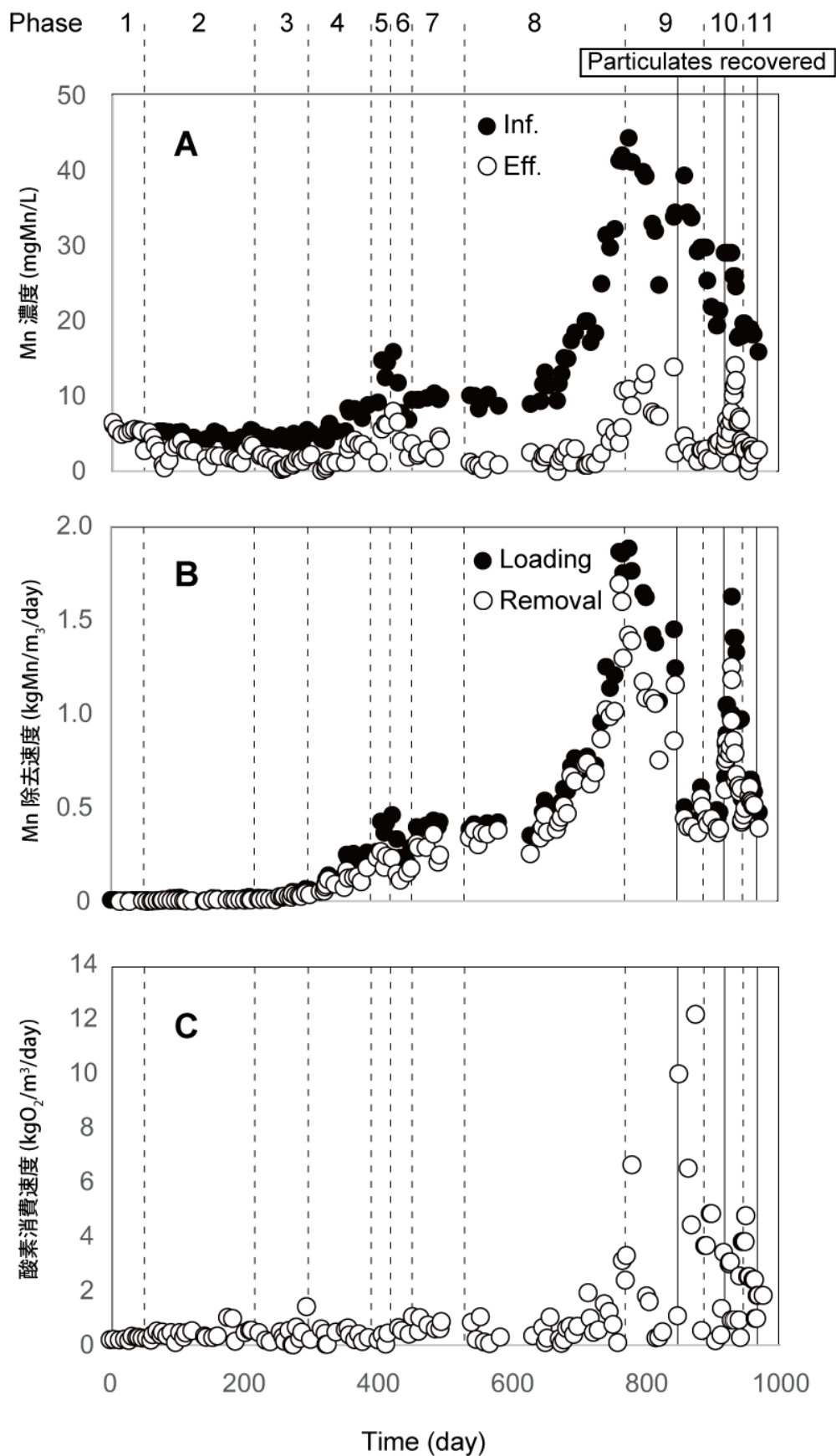


図 4.3.1 汚泥基質リアクターにおける Mn(II)濃度、 Mn 流入負荷・除去速度、 酸素除去速度

表 4.3.1 次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子解析

Phylogenetic group	Percentage
<i>Acidobacteria</i>	11.6%
Unclassified_ <i>Solibacterales</i>	0.8%
Unclassified_ <i>Chloracidobacteria</i>	6.4%
Unclassified_Ellin6075	1.6%
<i>Candidatus Chloracidobacterium</i>	0.8%
<i>Actinobacteria</i>	5.2%
<i>Mycobacterium</i>	3.2%
<i>Rhodococcus</i>	0.8%
<i>Armatimonadetes</i>	0.8%
Unclassified_ <i>Fimbriimonadales</i>	0.8%
<i>Bacteroidetes</i>	6.0%
Unclassified_ <i>Cytophagaceae</i>	4.4%
Unclassified_ <i>Saprospiraceae</i>	0.8%
<i>Chloroflexi</i>	4.4%
Unclassified_A4b	3.6%
<i>Cyanobacteria</i>	5.6%
Unclassified_MLE1-12	2.4%
Unclassified_SM1D11	3.2%
<i>Nitrospirae</i>	3.2%
<i>Nitrospira</i>	3.2%
<i>Planctomycetes</i>	2.0%
Unclassified_ <i>Phycisphaerales</i>	0.8%
<i>Planctomyces</i>	1.2%
<i>Proteobacteria</i>	56.2%
Unclassified_ <i>Alphaproteobacteria</i>	17.5%
Unclassified_BD7-3	0.8%
<i>Phenylobacterium</i>	1.2%
Unclassified_ <i>Rhizobiales</i>	0.8%
Unclassified_ <i>Bradyrhizobiaceae</i>	3.2%
MnOB (<i>Hyphomicrobium</i>)	2.0%
MnOB (<i>Pedomicrobium</i>)	0.8%
Unclassified_ <i>Rhodospirillaceae</i>	14.7%
Unclassified_ <i>Sphingomonadales</i>	2.4%
<i>Sphingomonas</i>	3.6%
Unclassified_MND1	0.8%
Unclassified_ <i>Chromatiales</i>	1.2%
Unclassified_ <i>Ectothiorhodospiraceae</i>	0.8%
Unclassified_ <i>Xanthomonadaceae</i>	0.8%
<i>Verrucomicrobia</i>	1.6%
Unclassified_ <i>Opitutaceae</i>	1.6%
Other	4.0%
Total (251 species)	100.0%

(4) マンガン酸化物の好気性微生物への活性阻害実験

1) マンガン酸化物がメタン酸化細菌に与える影響調査の結果

図 4.4.1 にメタン濃度の測定結果を示す。Mn 酸化物を添加しなかった系は 8 時間でメタンがほぼなくなっている。Mn 酸化物を 0.5g 添加した系ではわずかにメタン酸化活性が低下した。マンガン酸化物が 2 g 以上添加された系はいずれもほぼ同じメタン濃度の推移を示した。この結果からマンガン酸化物がメタン酸化細菌に阻害を与えることが明らかになった。図 4.4.2 は Mn 酸化物の濃度によるメタン酸化活性の変化を示したものである。このグラフからは Mn 酸化物濃度が増えてもメタン酸化活性は 60% 以下にはならないことがわかる。メタン酸化細菌との共培養リアクター運転では長期間運転すると Mn 酸化物がスポンジに蓄積され、Mn 酸化物濃度は高くなっていると考えられるが、メタン消費速度はほぼ一定の値を示した。この結果は Mn 酸化物濃度が増えてもメタン酸化活性は一定以上悪くならないというバッチ実験の結果と一致する。このためメタン酸化細菌共培養リアクターでは Mn 酸化物の阻害の影響によりメタン酸化が定常に達していたと考えられる。

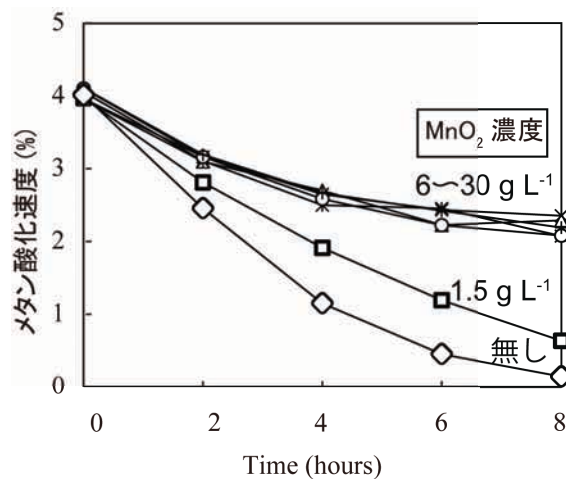


図 4.4.1 メタン濃度測定結果

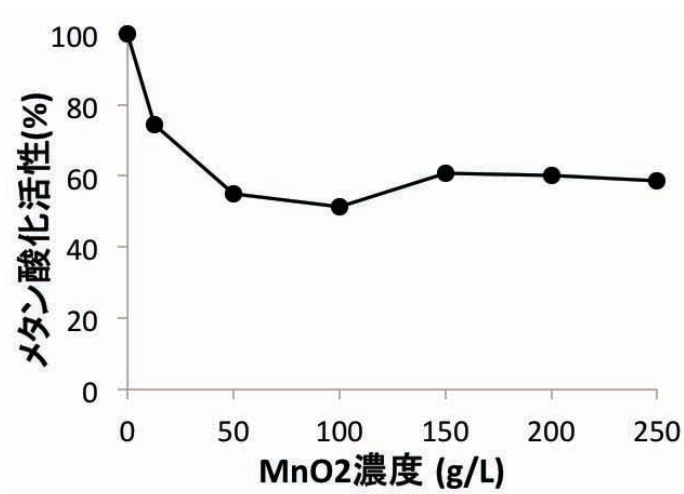


図 4.4.2 メタン酸化活性に対する Mn 酸化物濃度の影響

2) マンガン酸化物が従属栄養細菌に与える影響調査の結果

MnO_2 濃度を0、10、50、100 g/Lとして4系列での回分試験を36時間培養により行った。本実験系では MnO_2 添加量による有機物分解能力に差異が認められた(図 4.4.3)。 MnO_2 濃度が増加するにつれ有機物分解量は減少した。これより高濃度 MnO_2 環境下で微生物活性が低下することが示された。しかしながら、能力に差は認められる一方で全系列での有機物消費が観察された。初期 COD 濃度が設定値である 300 mgCOD/L よりも高い値を示した原因としては、馴致培養で添加した有機基質の持込によるものであると判断した。また、本実験系では MnO_2 添加系(ろ紙封入)と非添加系で活性汚泥の培養し、添加した有機基質消費量の観察を行った(図 4.4.4)。その結果、両系ともに有機物の消費は観察された。加えて、その有機物消費能力は等しかった。これから MnO_2 による微生物の有機物消費量の低下は培地中の基質の MnO_2 への吸着作用に起因する必須栄養素の不足に伴うものではなく何らかの直接的な作用であることが明らかになった。

活性汚泥の沈降性を粉末 MnO_2 添加系と非添加系で比較した結果、 MnO_2 添加系(100 g L⁻¹)で非常に高い沈降性が観察された(図 4.4.5)。評価に際し 10 分程度両系の沈降性を観察したが、完全混合状態から 30 秒程度で添加系のフラスコ内は内部物質の沈降が観察されたさらにその詳細な挙動として MnO_2 と活性汚泥がブロック状のものが形成され沈降していることが観察された(図 4.4.5)。これより、 MnO_2 と生物固体については微生物細胞との親和性が非常に高いことも示唆された。

これらの結果より、Mn 酸化細菌が Mn(II)を酸化する理由は明らかになっていないが、バッチ実験の結果から Mn 酸化細菌にとって Mn 酸化物を合成することはメリットになると考えられる。つまり、Mn 酸化細菌は Mn 酸化物を生成することにより基質競争する他の従属栄養細菌を阻害し、自らが有利に生存できると考えられる。この仮説通りであるならば Mn 酸化細菌自身がマンガン酸化物に阻害されないか阻害の影響を受けにくい必要がある。

また、共培養リアクターの実験では Mn 酸化細菌の培養において低濃度 Mn 環境が適していることが示唆された。Mn を酸化することと、生成された Mn 酸化物が Mn イオンを吸着することにより周囲の Mn イオン濃度を下げるため、マンガン酸化細菌は戦略的にマンガン酸化物を生成している可能性も考えられる。

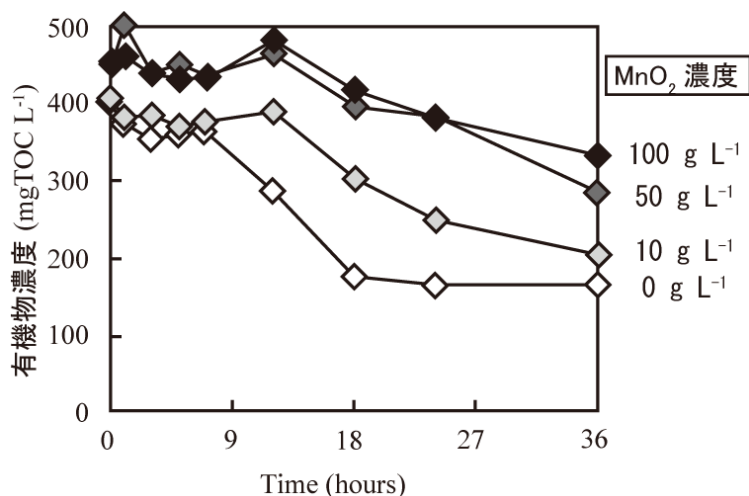


図 4.4.3 従属栄養細菌阻害実験結果

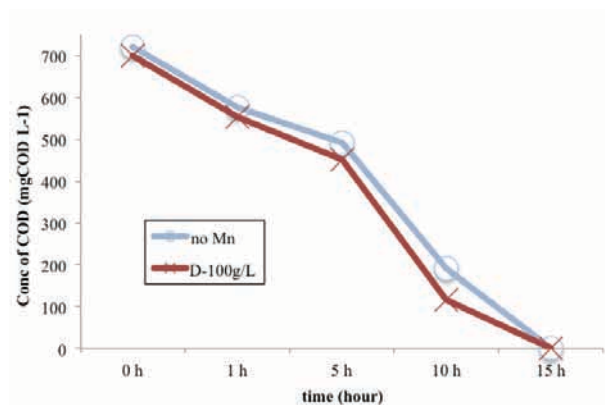


図 4.4.4 Mn 酸化物非接触系実験結果

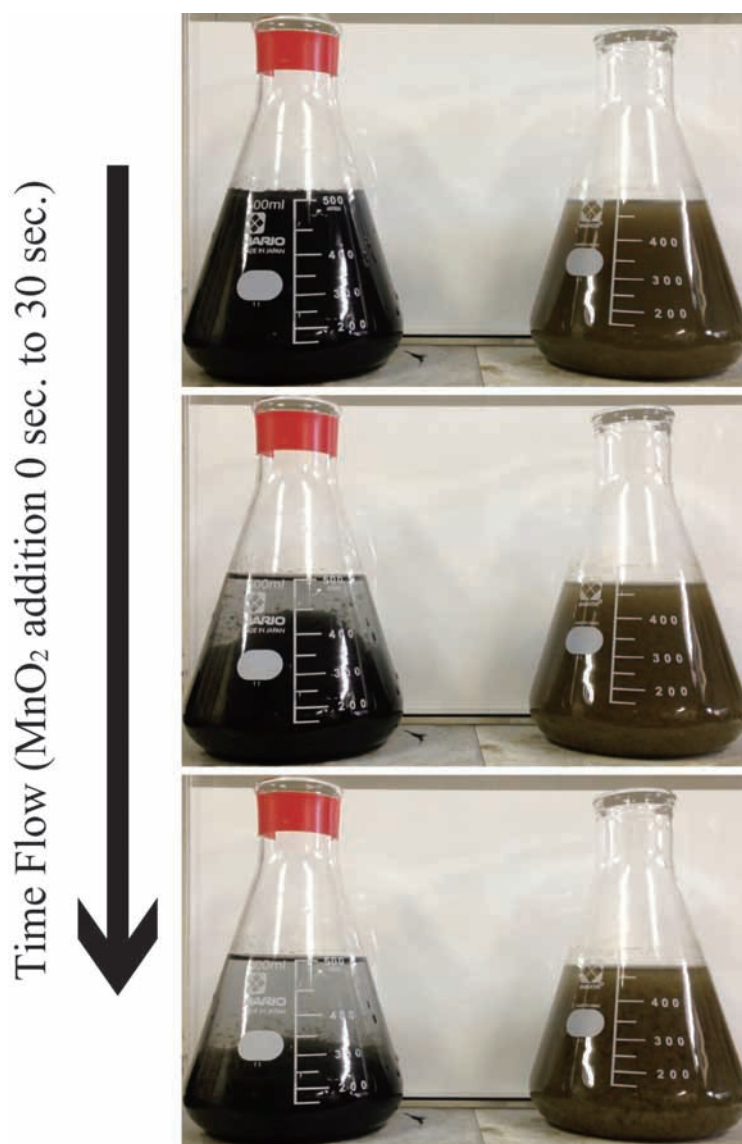


図 4.4.5 Mn 酸化物添加による活性汚泥凝集沈殿

3) まとめ

- ・メタン酸化細菌の阻害にマンガン酸化物が関わっていることが明らかになった。
- ・マンガン酸化物はメタン酸化細菌だけでなく多種多様な微生物に対して阻害の影響を与えることが明らかになった。
- ・マンガン酸化細菌がマンガン酸化する理由として、他の基質競合する従属栄養細菌を阻害して有利な環境を作るためである可能性が考えられる。

(5) マンガン酸化細菌の分離・培養

1) 培養方法の検討

固形培地組成として Agar とリン酸バッファー (リン(P)濃度: 0.02 mM) を使用した培養より、培地性能の検証を開始した。しかしながら、 MnO_2 プレートでの安定的なコロニーの獲得には至らなかった。さらに低 pH 環境を至適として増殖する真菌(カビ)によるコンタミネーションが生じるなど、獲得したコロニーの生態を検証が不可能な状態となった(図 4.5.1)。Agar とリン酸バッファーを併用する場合基質の安定性が低下するとの報告もあり²⁵⁾、Agar から GellunGum、リン酸バッファーから HEPES バッファーへと基質の変更を行った。



図 4.5.1 MnO_2 プレートへのカビの混入

b 培養効率調査

GellunGum を用いる事で安定的なコロニーの獲得が可能となった。24 時間培養で MnO_2 プレートならびに Blank プレート両系からコロニーの獲得が可能であり、同時に発現コロニーが他の発現コロニーの重ならない植種菌体濃度を決定した。これはブラックメンブレン上での DAPI 染色を施したセルカウンティングにより、採取した活性汚泥の初期菌体数を計上した。採取活性汚泥中の初期菌体数は総じて平均 1.0×10^9

cell mL⁻¹であった。各種菌体濃度環境で培養を両系で行いその傾向を観察した結果に基づいて、プレート上で発現したコロニーが重合しない菌体濃度は 2.0×10^7 cell per plate と決定した。

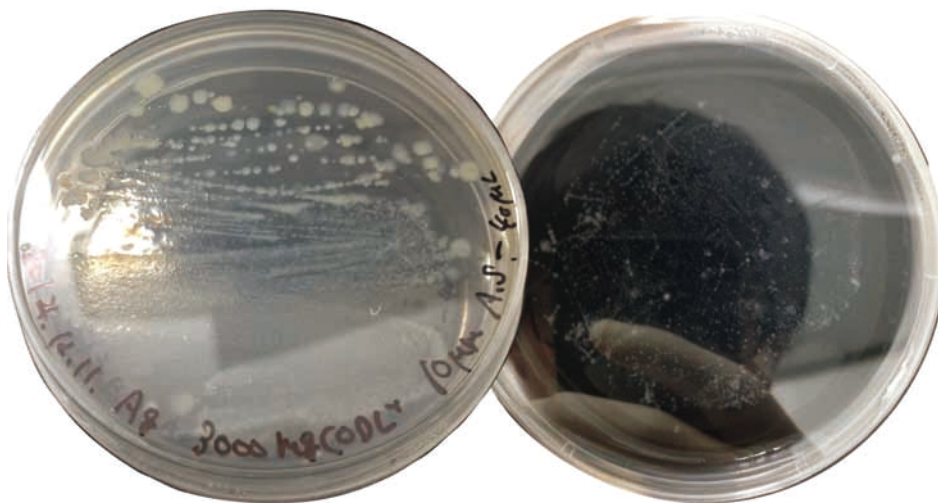


図 4.5.2 24 時間後の活性汚泥プレート培養(左:ブランクプレート、右: MnO₂ プレート)

これより培養を行い、本実験系で使用する培地で増殖したコロニー数を培養 20 時間で計上した。MnO₂ プレート及び Blank プレートはそれぞれ 20 枚ずつ任意の微生物量で植種し、培養を行った。MnO₂ プレートで発現したコロニー数は MnO₂ 非含有プレートに比べ劣る培養効率であった。

MnO₂ プレートから発現したコロニー数が 30 コロニーとなるように植菌濃度を変更した MnO₂ プレートを培養した結果、24 個のコロニーを獲得した。これに対して、Mn(II)添加/非添加した K-medium を与えた液体培地中で培養を行った。24 時間培養の結果 Mn(II)酸化反応が生じ MnO₂ が発現したコロニーは 2/24 コロニーであった(図 4.5.3)。

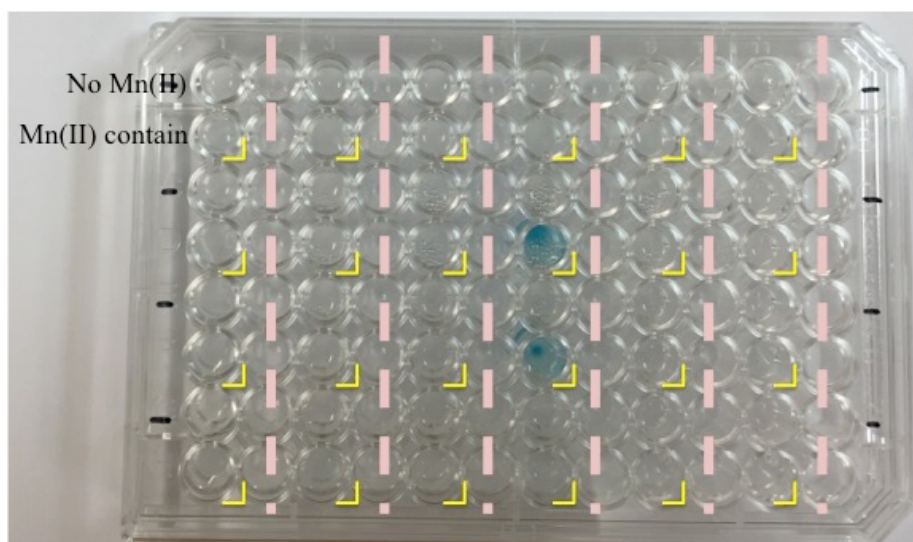


図 4.5.3 LBB 染色によるマンガン酸化細菌の検出

得られた結果より活性汚泥中のコロニーを形成する細菌群のうち約 98%が MnO_2 に対して耐性を持っておらず、更にその耐性を有する細菌群のうちおよそ 8%がマンガン酸化能力を有する結果となった(図 4.5.4)。よって、活性汚泥中に存在するコロニーを形成する微生物群集のうちマンガン酸化能力を有する種は 0.2%のみである事が示された。これは既往の知見である有機物が豊富に存在する環境でマンガン酸化細菌が優占化出来ずほとんど存在しない結果と一致する。

MnO_2 プレートでの培養は培養基質やその組成がコロニーの発現に大きく影響をおよぼすことが明らかになった。固形培地組成に GellumGum ならびに HEPES バッファーを使用することでより容易にコロニーの獲得が可能となった。これは K-medium を使用した本培地組成での培養では Agar より GellumGum 培養がより適しているためであると考えた。実際の MnO_2 高含有リアクターでの培養は、担体中において微生物間の相互作用等が生じることが考えられ、 MnO_2 による微生物活性阻害が確実に生じている環境とは断定できない。一方、 MnO_2 プレート上での培養は植種された微生物は 1 細胞ごとに隔離された状態での培養となる。そのため、微生物の休眠等を考慮しない場合、 MnO_2 による従属栄養細菌活性への阻害作用の影響をより直接的に受けることが推察できる。よって、 MnO_2 プレート上で発現したコロニーは完全なマンガン耐性菌であると言及できる。以上から、今後 MnO_2 プレートより獲得したマンガン耐性菌と考えられる微生物の系統的解析等を行うことで、マンガン耐性菌の MnO_2 耐性機構を明らかにすることが可能であると考ええる。

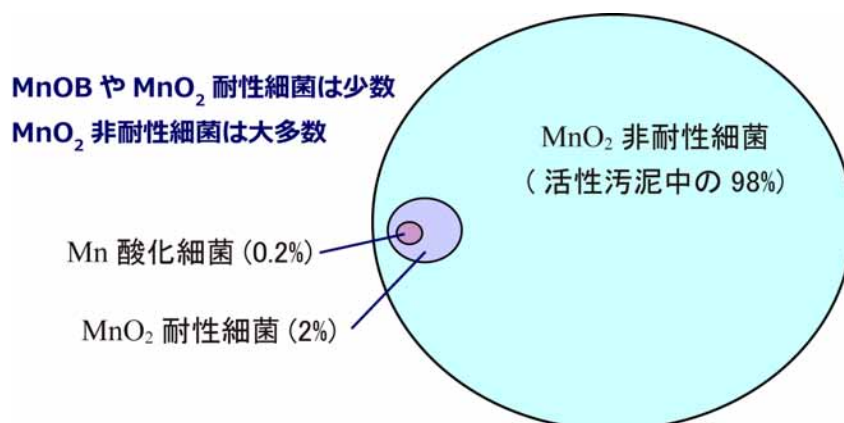


図 4.5.4 活性汚泥中に存在するマンガン耐性菌とマンガン酸化細菌のポピュレーションサイズ

5) まとめ

- ・ MnO_2 プレート培養では培地組成として、固化成分に GellumGum、pH 緩衝液に HEPES バッファーを使用することで安定的に活性汚泥を植種源としたコロニーの獲得が可能であることが明らかになった。
- ・ 活性汚泥中の約 90%が MnO_2 非耐性菌で残りの 10%が MnO_2 耐性菌であった。更にその約 1 割が Mn 酸化能力を有する事が示唆された
- ・ MnO_2 プレート上で従属栄養細菌活性阻害が菌体に作用していることが明らかになった。
- ・ マンガン酸化細菌の培養とマンガン酸化のスタートアップは非常に遅かったが、運転の開始時に MnO_2 を塗布しておけば、従属栄養細菌群を排除する事でスタートアップが早まることが予測される。

(6) DHS リアクターを用いた MnO_2 の有無による Mn(II) 酸化のスタートアップ比較

1) リアクター培養結果

本実験では約 80 日間リアクターの運転を行った(図 4.6.1)。また前項で観察された pH 低下にともなうリアクター性能の破綻を防ぐため、培地作成時に添加する pH バッファーならびに微量栄養素濃縮液を短期間での作り替えを行った。これら濃縮液の更新は培地性能におおきく影響しうるため、短期間での定期的な更新を行った。RUN 1~3 は培養期間中一貫して有機物除去が観察された。

RUN 1 は運転開始から Mn(II) の際立った除去は観察されなかった。1 mgMn(II)/L 程度の除去は運転開始 28 日まで観察されているが、この期間における Mn(II) の消費はリアクター内のスポンジ担体並びに生物膜への吸着さらには Mn(II) 測定の誤差等を考慮すると生物学的な Mn(II) 酸化に伴う Mn(II) 除去とは断定できない。これは除去速度が経時的に一定であることから推察できる。運転開始 30 日以降から経時的な Mn(II) の除去速度の増加が確認され始めた。これはリアクター内で微量ながらもマンガン酸化細菌の増殖したことに伴うものと考えられる。というのは、RUN 1 におけるスポンジ担体 20 個のうち上部 1、2 個の色が活性汚泥植種直後の茶色からやや黒味がかかった茶色へと変化したことから十分推察される(MnO_2 の色は黒)。しかしながら、42 日以降から除去速度が $0.013 \text{ mgMn(II) m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ 程度から除去速度の増加が見られず一定値を示すようになった。これはスポンジ担体中に含まれるマンガン酸化細菌と他の従属栄養細菌との基質競合の関係により、これ以上のマンガン酸化細菌の増殖については Mn(II) 除去性能の向上はさらなる培養期間を要するものと考えられる。

RUN 2 では運転開始直後より生物学的 Mn(II) 除去が観察された。運転開始 12 日から RUN 2 において供給 Mn(II) 濃度を増加させた(5→10 mgMn(II)/L)。その結果、運転開始 35 日の培養で $0.2 \text{ kgMn(II)/m}^3/\text{d}$ の Mn(II) 除去性能が観察された。そこから約 2 週間程度の継続的な Mn(II) 除去が確認された。これは、塗布した MnO_2 による Mn(II) の吸着ではないことは上記に記した吸着処理からも明瞭であり、生物学的な Mn(II) 除去である。生物学的な Mn(II) 除去プロセスの複合微生物系(活性汚泥)から約 2 週間で確立させた報告はこれまでなく、本研究室で過去に行ったものと比較すると 200 日程度短縮化することに成功した。

培養 60 日まで培養担体への MnO_2 が塗布された状態で、 Mn(II) 非供給運転がなされてきた RUN 3 に Mn(II) 供給を行った(培養 60 日)。結果として供給直後から、 Mn(II) 除去が観察された。同時に Mn(II) 供給負荷を増加させると、RUN 3 への Mn(II) 供給開始およそ 10 日程度で RUN 2 で確認された最大 Mn(II) 除去速度である $0.2 \text{ kgMn(II)/m}^3/\text{d}$ を達成した。

仮説通り MnO_2 塗布ならびに低負荷での有機基質、 Mn(II) を供給した培養系列で短期間での生物学的 Mn(II) 除去リアクターの立ち上げに成功した。本実験系で確認された最大 Mn(II) 除去速度は $0.35 \text{ kgMn(II) m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ であった。これはメタン共培養系で 600 日間の培養で得られた最大除去速度と同様の能力であったが、培養期間に鑑みると本系で獲得した性能は相当量の Mn(II) 除去性能であると評価した。この短期間での Mn(II) 除去性能の獲得は短期間での Mn(II) 酸化微生物の集積培養に成功したと言及できる。有機基質ならびに Mn(II) 供給していたにも関わらず MnO_2 の非塗布系では培養期間中一貫して Mn(II) 除去は発現しなかった。環境微生物群(活性汚泥)からのマンガン酸化細菌集積培養が 200 日以上培養でも立ち上がらなかった結果と同様であった。これは自然環境下における Mn(II) 酸化微生物の基質競合能力が乏しいことを示唆しており MnO_2 を高濃度で塗布した環境で培養することで、自然環境中では基質の競合能力に乏しいと Mn(II) 酸化能を有する微生物が、 MnO_2 による競合従属栄養細菌の活性阻害にともない優占化したと考えた。

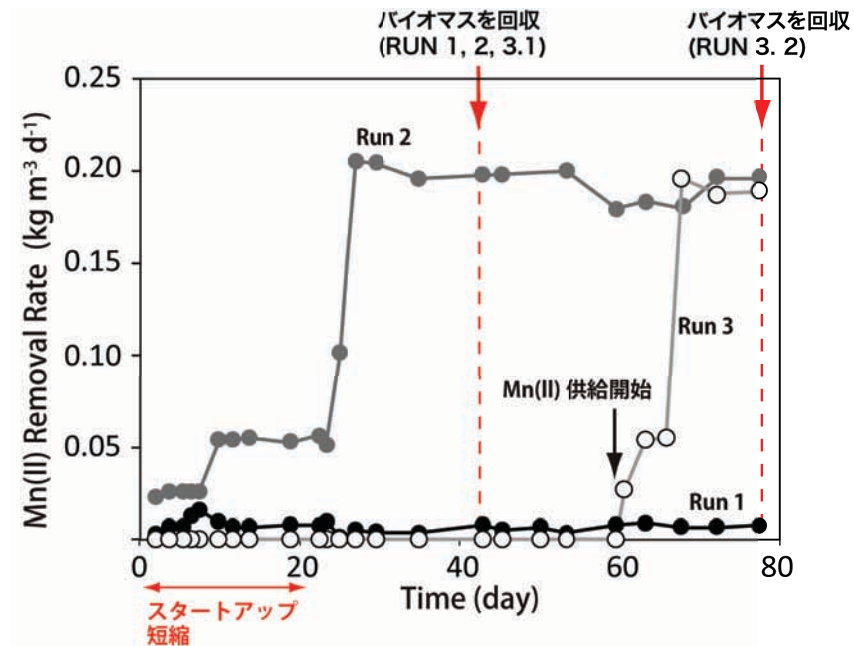


図 4.6.1 マンガン酸化速度及びバイオマス回収ポイント

2) 電気泳動による微生物解析結果

獲得した培養サンプルから DNA を抽出し、種々のプライマーを用いて PCR にて DNA を増幅させ獲得した PCR 精製産物に対して電気泳動実験を行った(図 4.6.2)。全細菌対象プライマーである 341F-805R を使用して電気泳動を行った結果、所定の塩基数でバンドが発現した。全古細菌対象プライマー arc109F-915R を用いた結果、バンドは発現しなかった。加えて全真菌対象プライマー2種類(EF4-EF3 & EF4-fung5)を用いた場合、すべてのサンプルからバンドが発現した。

各ドメインそれぞれに対応した DNA プライマーによる PCR ならびに電気泳動実験の結果、本リアクターで培養された微生物群集は真正細菌(Bacteria)と真菌(Fungi)に分類される微生物群によって構成されていることが示された。しかしながら、本培養系で使用した基質は *Bacteria* による資化が可能な基質として知られる培地を使用したため、このポピュレーションとしては真菌の優占化は考えにくいと推察した。

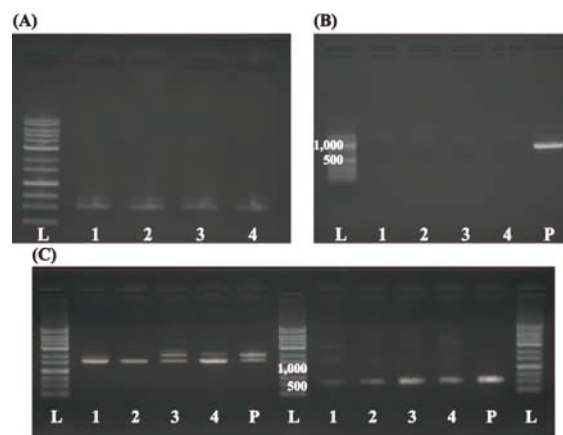


図 4.6.2 (A)真正細菌、(B)古細菌、(C)真菌に特異的なプライマーを用いた電気泳動結果
(1:RUN 1、2:RUN 2、3:RUN 3.1、4:RUN 3.2、L:Ladder)

3) 次世代シーケンサーによる微生物解析結果

Illumina MiSeq による微生物群集解析の結果を以下に示す(図 4.6.3)。すべての系列で多様な微生物群集の培養がなされてきたことは明瞭であった。門レベルでの微生物コミュニティの比較を行うと、MnO₂ 塗布により *Firmicutes* 門に属する微生物群の割合が減少していた。属レベルでは、Mn(II)酸化が行われたリアクター系列でマンガン酸化細菌分離培養例の多い *Psuedomonas* 属の優占化が確認された。

各サンプルのリード数は R1 : 233、470、R2 : 230、886、R3.1 : 227、548、R3.2 : 225、128 であった。これより得られた塩基配列に QUIME を用いた群集解析を行うにあたり、インデックス配列に依る各リードデータの検体識別ならびにデータの Cleanup が施された。その後抽出されたリードについて QUIME の OTU 生成プログラムを用いて、similarity threshold(しきい値) 97 % の条件で分類し、OTU が生成された。さらに各 OTU より代表配列を抽出し、これをインプットとして QUIME のアノテーションプログラム(デフォルト設定)を用いて、16SrDNA データベースについて similarity 90 % 以上の条件にて相同性検索を行い各 OTU にて各階層(Kingdom / Phylum / Class / Order / Family / Genus / Species)の Taxonomy 情報を取得した。16SrDNA データベースは、QUIME Resources サイトよりダウンロードされた Greengenes データベースの配列情報および分類情報を使用した。

微生物群集解析の結果より、キメラを除いた OTU 群でデータの精査を行った。全 OTU 数ならびに各 OTU で検出されたリード数等の基本情報を以下の表 4.6.1 にまとめて記載した。検出 OTU のうち、リードカウント数が 1 のみだった OTU 数はすべての系列で 50 % 程度占めていた。これに対応して、ポピュレーションの各系列%が 0.1 % を下回るものが全 OTU の 90 % を上回っていた。上記より、本実験で培養された微生物群集に多様であることが明らかである。

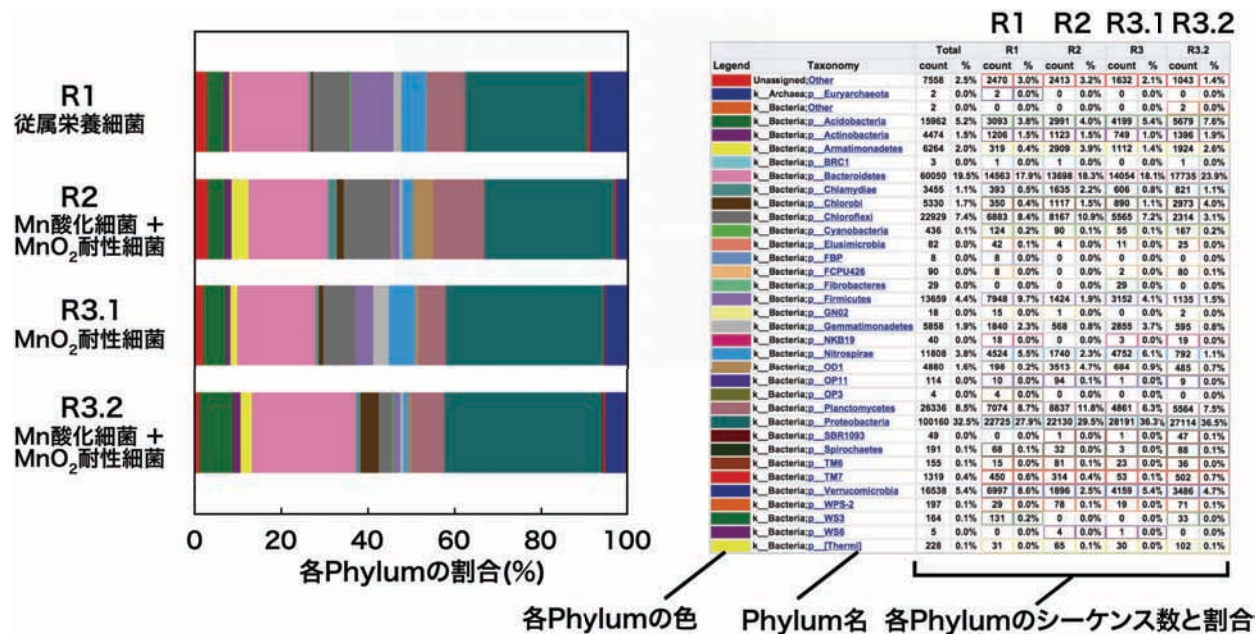


図 4.6.3 Illumina MiSeq による微生物群集解析結果

表 4.6.1 各条件におけるリード数及び OTU 数

	R1	R2	R3.1	R3.2	total
Read total	81539	74926	77692	74240	308397
Total OTU number	2784	2179	2769	2473	7052
Average (read / OTU)	29	34	28	30	43
Average %	0.035	0.045	0.036	0.040	0.014
count = 1	1296	1068	1431	1145	3607
count > ave	305	239	273	278	633
count < ave	2479	1940	2496	2195	6419
% > 0.1 %	160	142	143	158	—
% < 0.1 %	2624	1940	2496	2195	—
% > 0.01 %	603	511	539	617	—
% < 0.01 %	2181	1668	2230	1856	—

Read total: リードされたカウント値

Total OTU number: OTU 合計値

Average (read / OTU): 1 OTU あたりのリード数

Average %: 全リード数に対する Average の割合

count = 1: 1 だけリードされた OTU 数

count > ave: Average(%)のリード数より大きいリードをカウントした OTU 数

count < ave: カウントされた OTU のうち Average(%)よりも小さい OTU 数

% > 0.1: カウントされた OTU のうち全リード数に対する割合が 0.1 を上回る OTU 数

% < 0.1: カウントされた OTU のうち全リード数に対する割合が 0.1 を下回る OTU 数

% > 0.01: カウントされた OTU のうち全リード数に対する割合が 0.01 を上回る OTU 数

% < 0.01: カウントされた OTU のうち全リード数に対する割合が 0.01 を下回る OTU 数

各系列でのポピュレーション(%)に鑑みて、微生物群集の生理特性の推察を行い考えうる分類群ならびにその意義を以下に列挙する。これらを分類する上で、しきい値を設定した。しきい値は各系列における全リード数に対する各 OTU で検出されたリード数の割合で 0.1 % に設定した。これは各系の検出 OTU のうちリードカウント数が 1 のみであった OTU は全系で共通して 50 % 程度を占めていた。これに対応して、ポピュレーションである各系列%が 0.1 % を下回るものが全 OTU 90 % 以上であった。以上より、本リアクターで培養された微生物群集が多様的であることが明らかになった。これより、0.1 % をしきい値として設定することにより、リアクターで活動的に生育していた微生物群集の生態特性の分類決定を行えると考えた。

既知の Mn 酸化細菌グループには *Bacillus*、*Pseudomonas*、*Hyphomicrobium*、*Pedimicrobium*、*Rhodoplanes*、*Cytophaga* 等が報告されている。また、それぞれの培養条件により微生物群集を MnO₂ 非耐性菌や MnO₂ 非耐性菌といったカテゴライズ、特性を特定できると考えた。表 4.6.2 に微生物群集のカテゴライズを示す。また、それにより得られた各リアクターの微生物群集に占める各微生物の割合を表 4.6.3 に示す。これにより、どの微生物グループがどのような MnO₂ 耐性の性質を持っているか大まかな予測が可能となった。しかしながら、これらの結果より MnO₂ がどのような微生物種の共通項に影響を及ぼしているのか等の MnO₂

の従属栄養細菌活性に阻害を及ぼす機構について推察するには不十分であるため、実証には各微生物の分離株を用いて調査する必要がある。

表 4.6.2 微生物群集のカテゴリ例

MnO₂ 非耐性菌	MnO ₂ による従属栄養細菌活性への阻害影響を受ける細菌群(RUN1で優占化するがRUN2、RUN3.1、RUN3.2のどの系よりも50%以下のグループを選択)
MnO₂ 耐性菌	MnO ₂ による従属栄養細菌活性阻害の影響を受けない(が少ない)細菌群(RUN2、RUN3.1、RUN3.2は全てここに属する)
Mn(II)酸化反応発現系増殖菌	Mn(II)酸化反応発現リアクターで増殖し、コミュニティを保持している細菌群(RUN2、RUN3.2全てがRUN1、RUN3.1の20倍のグループを選択、Mn(II)酸化反応に寄与している微生物種を含む可能性がある)
Mn(II)阻害菌	Mn(II)の存在により阻害影響を受ける菌(RUN3.1からRUN3.2で5%以下に減少したグループを選択)

表 4.6.3 各微生物群集の割合

グループ	R1	R2	R3.1	R3.2
既知 Mn 酸化細菌 <i>Bacillus, Pseudomonas, Hyphomicrobium, Pedomicrobium, Rhodospirillum, Cytophaga</i> のみをソート	0%	11.9%	1.2%	2.5%
MnO₂ 耐性菌		100% <i>Pseudomonas</i> 等	100% <i>Nitrospira</i> 等	100% <i>Lysobacter</i> 等
MnO₂ 非耐性菌	21.1% <i>Ferruginibacter</i> 等			
Mn 酸化で活性化		15.7% <i>Chthonomonadates</i> 等		8.9% <i>Planctomycetes</i> 等

5) まとめ

- ・高濃度 MnO₂ 塗布担体に対して K-medium を供給し培養した結果(RUN 2、RUN3)、リアクター運転開始直後から生物的 Mn(II)除去が観察された。これより、短期間での Mn(II)酸化細菌の集積培養ならびにその Mn(II)酸化能力の発現に成功した。
- ・非塗布系(RUN 1)では本実験系における培養期間中に生物的 Mn(II)酸化は観察されなかった。
- ・本系列で培養された Mn(II)酸化能を有する微生物群集は有機物を利用し、Mn(II)を除去していることが示された。
- ・分生物学的手法より、本系で培養された微生物のうち微生物群集のポピュレーションが減少するような MnO₂による従属栄養細菌活性阻害の影響を受ける微生物種が明らかになった。

(7) 実二次電池廃液からの金属回収

1) リアクター運転結果

流入水中の各金属濃度測定した結果、実廃二次電池溶解処理液の各金属の組成はマンガン:10.6 mg/L、ニッケル:1.70 mg/L、コバルト 1.25 mg/L であった。これに HEPES バッファーと K-medium を加えた基質をリアクターに通水した。得られたマンガン除去速度を図 4.7.1 に、ニッケル、コバルト除去速度を図 4.7.2 に示す。運転開始直後よりマンガン除去が確認された。そこで、運転初期では HRT を 4.2 時間に設定していたが、流出水中でマンガンが完全に除去されていたのが確認されたため、徐々に Mn 供給負荷を上げていった。最終的に運転 3 週間以降の HRT は 0.2 時間に達した。その結果、すぐに目標値であったマンガン除去速度 $1 \text{ kg Mn/m}^3/\text{d}$ に 1 ヶ月もしないうちに到達した。また、マンガン除去と同時にニッケル、コバルトも除去されており、マンガン除去に対する金属除去比はそれぞれ $\text{Ni/Mn}=0.10$ 、 $\text{Co/Mn}=0.15$ であった(図 4.7.2)。運転期間中、ニッケルとコバルトはマンガン除去速度に比例して除去されており連続廃水処理が可能である事が示された。

2) まとめ

これらの知見を基に実廃二次電池の溶解処理液を用いたニッケル、コバルト、マンガンの連続リアクター一運転を行った結果、3 週間のスタートアップでそれぞれ $1.69 \text{ kg Mn/m}^3/\text{d}$ 、 $0.17 \text{ kg Co/m}^3/\text{d}$ 、 $0.12 \text{ kg Ni/m}^3/\text{d}$ の除去速度に到達し、本研究の目標を達成した。マンガン酸化物を塗布する事により実廃二次電池溶解処理液からの Mn 除去の早期スタートアップおよび高速 Mn 除去、金属イオンの同時回収が実証され、実用化に大きく前進した。

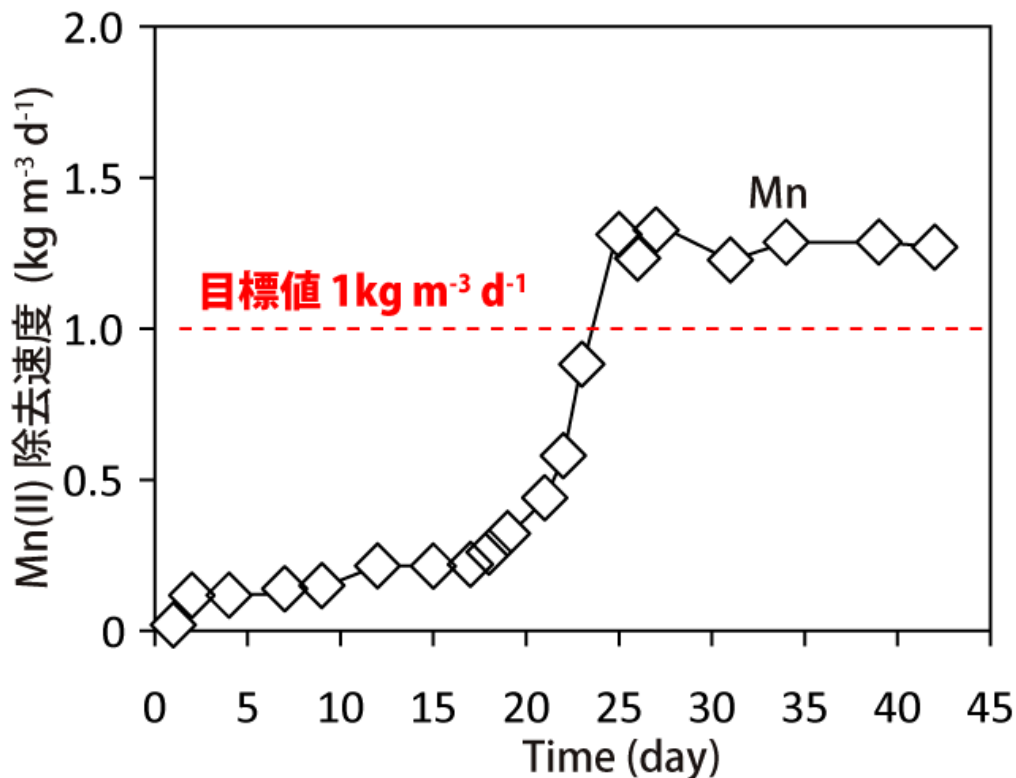


図 4.7.1 マンガン除去速度

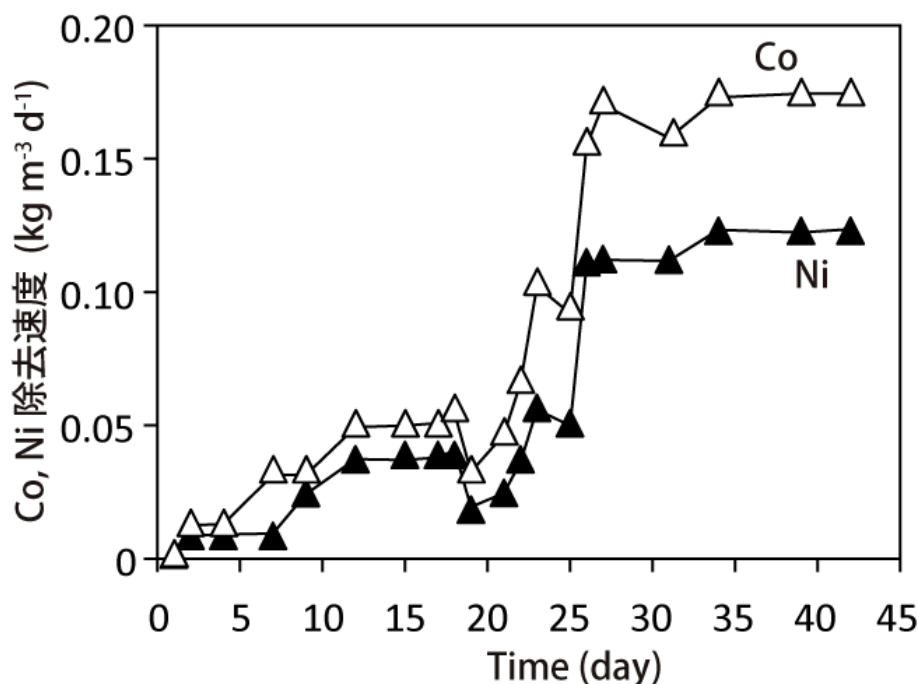


図 4.7.2 ニッケル、コバルト除去速度

(8) 本研究のまとめ

マンガン酸化細菌は貧栄養環境で検出されることから、基質親和性の高い種で極低濃度の有機物排水を供給すれば、開放系においても培養できるのではと考えられた。そこで、マンガン酸化細菌と硝化細菌との共存微生物生態を構築することを考えた。研究(1)の結果、アンモニア酸化細菌と共生培養において、最大マンガン酸化速度は $0.6 \text{ kg Mn/m}^3 \text{ d}$ を達成したが、硝化反応によって生じた pH 低下によってマンガン酸化反応は安定しない結果となった。そこで、アンモニアの次に目を付けたのがメタンである。メタン酸化細菌も硝化細菌同様に代謝産物を生成する事が知られている。研究(2)のメタンを単一の基質としてリアクターに供給した結果、マンガン酸化反応を確認し、pH の低下もみられ無かったが、マンガン酸化速度は $0.35 \text{ kg Mn/m}^3 \text{ d}$ であり目標のマンガン酸化速度 $1 \text{ kg Mn/m}^3 \text{ d}$ に到達しなかった。一方で、これらの実験中に興味深い知見が得られた。一つは、どちらのリアクターともアンモニアやメタンの供給基質を突然停止しても、そこから長期間マンガン酸化反応が確認された事である。この結果から、マンガン酸化細菌は代謝産物のみならず細菌の死骸も利用できる事が示唆された。次に、リアクターのスポンジ担体にマンガン酸化物が形成されると共存細菌であるメタン酸化細菌の活性が著しく低下する傾向が得られた。実際に研究(4)では、活性汚泥やメタン酸化細菌を用いたバッチ実験で確認を行ったが、マンガン酸化物が他の従属栄養細菌を阻害している事を発見した。他にも、負荷を上げる目的で供給マンガン濃度を上げた結果、急激にマンガン酸化速度が低下した事から、マンガン酸化細菌はマンガン(II)に阻害を受ける事が示された。

我々はここで、基質を供給しなくともマンガン酸化細菌が継続的に観測された事に着目した。マンガン酸化細菌は他の細菌を分解して増殖できる、すなわち活性汚泥を基質として供給する事でマンガン酸化細菌を培養できるのではないかと考えた。そこで、研究(3)では、活性汚泥を唯一の基質として連続処理を行った結果、マンガン酸化は最大 $1.69 \text{ kg Mn/m}^3 \text{ d}$ と微生物による世界最速のマンガン除去速度を達成した。ただし、硝化細菌及びメタン酸化細菌との共培養実験も同様であるが、リアクターのマンガン除去のスタートアップには2年以上と長期間を要した。このような時間がかかると、実用化は不可能である。そこで、

マンガン酸化のスタートアップさせるアイデアが必要となってくると考えた。そこで次に着目したのはマンガン酸化物の従属栄養細菌への活性阻害である。マンガン酸化物に従属栄養細菌が阻害を受けるのであればリアクターにマンガン酸化物を塗布することで、競合する他の従属栄養細菌の増殖を抑制、マンガン酸化反応のスタートアップ期間を短縮できるのではないかと考えた。研究(6)では、リアクター担体にマンガン酸化物を塗布し、スタートアップ期間への影響を観察した。その結果、リアクターにマンガン酸化細菌の優占的な培養に成功し、マンガン酸化細菌の培養を2週間程度に短縮することができた。このように、マンガン酸化物は他従属栄養細菌の増殖を抑制できる事がしめされた。そこで、研究(5)では、微生物を培養するプレート培地にマンガン酸化物を添加する事で、マンガン酸化物耐性細菌、マンガン酸化細菌に選別できるのではないかと考えた。その結果、活性汚泥から微生物群を分離する事ができた。さらに、活性汚泥中に存在するマンガン耐性菌は全体の2%である事、マンガン酸化細菌は全体の0.2%程度であった。

これら(1)~(6)の実験結果を用いて、実際に実廃二次電池の溶解処理液を用いたニッケル、コバルト、マンガンの連続リアクター運転を行った。その結果、3週間のスタートアップでそれぞれ1.69 kg Mn/m³/d、0.17 kg Co /m³/d、0.12 kg Ni/m³/dの除去速度にそれぞれ到達し、本研究の目標を達成した。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

リチウムイオン二次電池のリサイクルは、無機化学的にレアメタルを溶解処理および電解処理して金属原料に再生しようとしている。しかし、現状の一般的な無機化学的手法では経済的に採算が合わない。一方、生物学的手法は一般的に化学的手法よりも低コストであることから、有機性排水処理においては主流である。レアメタルの回収に対しても生物学的手法はランニングコストが低く、費用面での課題はないと言える。

マンガン酸化細菌は、開放系の混合微生物群集では培養しづらい。これは基質親和性の高い細菌であり、貧栄養環境において検出される。すなわち、極低濃度の有機物排水を供給すれば培養できる。硝化細菌あるいはメタン酸化細菌を培養して、その代謝物である低濃度の有機物を供給する方法を考案して、マンガン酸化細菌は開放系でも共培養できることを明らかにした。また、マンガン酸化細菌は細菌の死骸を資化できることを発見し、DHS リアクターを用い、活性汚泥を基質にして集積培養できることを示した。そのマンガン酸化速度は目標の1.0 kgMn/m³ dを超える能力である。さらに、多くの従属栄養細菌はMn酸化物に活性阻害を受けることを発見した。この現象を利用し、予めMn酸化物をDHSリアクターに塗布することで、マンガン酸化のスタートアップを早くすることに成功した。

これらの知見を基に、実廃二次電池溶解液に適用して、3週間のスタートアップでバイオMnO₂の高速生成1.0 kgMn/m³ dが可能であり、Mn、Ni、Coの同時回収できることを実証した。

(2) 環境政策への貢献

レアメタルの内レアアースは、大部分を中国から輸入しているが、中国との軋轢で継続的な輸入が心配されている。また、インドネシアにおいてもマンガンの輸出規制を検討していると報道されている。今後は世界的にレアメタルの需給バランスの逼迫が懸念されており、中国等の諸外国に依存しない早急な対策

が必要である。すなわち、各種の産業で使用されているレアメタル・レアアースを循環する技術開発は持続可能な社会を構築する上で不可欠である。

約 200kg の蓄電池を搭載している二次電池式電気自動車は、今後、普及することが予測されている。蓄電池は使用に伴い劣化し、廃車の時に廃棄されることになるが、この廃棄量は膨大になってくることが懸念されている。従って、蓄電池を経済的かつ環境にやさしく再生する技術の開発が希求されている。この鍵を握っているのが、溶解処理した液からの主成分であるマンガン、ニッケル、コバルトの回収であり、本研究ではこの回収技術として貢献できる。

本研究のバイオ Mn 酸化物生成技術はコバルト、ニッケルに止まらず他のレアメタル回収にも適用できる。メッキ工場などのレアメタル・レアアースを含有する各種産業排水や鉱山排水（鉱山が閉鎖された後も金属を含む浸出水は環境基準をクリアする処理が行われている）の低コスト型生物処理（回収）技術として提供でき、重金属の水環境汚染対策にも貢献できる。また、温泉やガス田といった環境にはレアメタルが溶存している。海水には低濃度ではあるが、リチウムなど金属資源が豊富である。これらを資源として捉え、レアメタル等の金属回収にも活用できる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

< 論文（査読あり） >

- 1) L.T.T. Cao and H. Kodera, K. Abe, H. Imachi, Y. Aoi, T. Kindaichi, N. Ozaki and A. Ohashi: Water Research, 68, 545-553 (2015)
"Biological oxidation of Mn(II) coupled with nitrification for removal and recovery of minor metals by downflow hanging sponge reactor"

< その他誌上発表（査読なし） >

- 1) D. Komizo, L.T.T. Cao, T. Kindaichi, N. Ozaki and A. Ohashi :The 12th International Conference on Civil and Environmental Engineering, 155-159 (2013) "Biological manganese oxidation using a down-flow hanging sponge reactor supplied with methane"
- 2) 大橋晶良：シーエムシー出版, 179-189 (2013)
「リサイクルバイオテクノロジーとの最前線（細菌を使った排水からのレアメタル回収システム）」
- 3) 大橋晶良：日本水環境学会, 37, 2, 56-60 (2014)
「廃水からの生物学的レアメタル回収技術の開発動向」

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 小溝大輔, L.T.T. Cao, 金田一智規, 尾崎則篤, 大橋晶良：第 48 回日本水環境学会年会(2014)「共生を利用したレアメタル吸着性 Bio-MnO₂ の高速生成」

- 2) L.T.T. Cao and D. Komizo, H. Imachi, Y. Aoi, T. Kindaichi, N. Ozaki A. Ohashi: Conference of Japan Society on Water Environment, 2014 “Biological Mn Oxidation Under Low pH Condition For Rare Metals Recovery From Industrial Wastewater”
- 3) T. Hiroe and L.T.T. Cao, and H. Kodera, T. Kindaichi, N. Ozaki A. Ohashi, International Society for Microbial Ecology, 2014 “Cocultivation of Manganese (II) oxidizing bacteria with methane oxidizing bacteria for rare metals recovery”
- 4) T. Hiroe and L.T.T. Cao, H. Kodera, T. Kindaichi, N. Ozaki A. Ohashi: The 13th International Conference on Civil and Environmental Engineering, (2014) “Cocultivation of Manganese (II) oxidizing bacteria with Methane Oxidizing Bacteria”
- 5) 廣江 貴史, L.T.T. Cao, 小寺 博也, 金田一 智規, 尾崎 則篤, 大橋 晶良: 第 49 回日本水環境学会年会 (2014)
「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」
- 6) 廣江 貴史, L.T.T. Cao, 小寺 博也, 金田一 智規, 尾崎 則篤, 大橋 晶良: 第 50 回日本水環境学会年会 (2014)

(3) 出願特許

- 1) 大橋晶良, 小寺博也, カオ ティ トゥイ リン, 金田一智規, 廣江貴史, 青井議輝, 井町寛之: 国立大学法人広島大学, 独立行政法人海洋研究開発機構; 「マンガン酸化細菌の集積培養方法, バイオマンガン酸化物の生成方法, 金属の回収方法及び微生物群集」, 特願 2015-051472, 平成 27 年 3 月 31 日
- 2) 大橋晶良, 阿部憲一, カオ ティ トゥイ リン, 幡本将史, 井町寛之: 「国立大学法人広島大学, 独立行政法人海洋研究開発機構; 金属の回収方法及び回収装置」, 特許番号 第 5736592 号, 平成 27 年 5 月 1 日

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 大橋晶良: 東京大学生物生産工学研究センター2013 年度シンポジウム「微生物機能をどう探る・どう使う? ~Bacterial Functions for Environmental Challenges~」(東京大学工学系水環境制御研究センター及び東京大学農学生命科学研究科共催, 2013 年 9 月 27 日, 東京大学弥生講堂アネックスセイホクギャラリー, 聴講者約 200 人) にて講演
「レアメタル吸着マンガン酸化物を生成する細菌の複合系での培養」
- 2) 大橋晶良: 第 31 回台日工程技術研討会にて「Novel technology for biological wastewater treatment」を講演 (主催: 台湾化学技術協会, 2015 年 11 月 29 日-12 月 4 日, 聴講者約 50 人)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

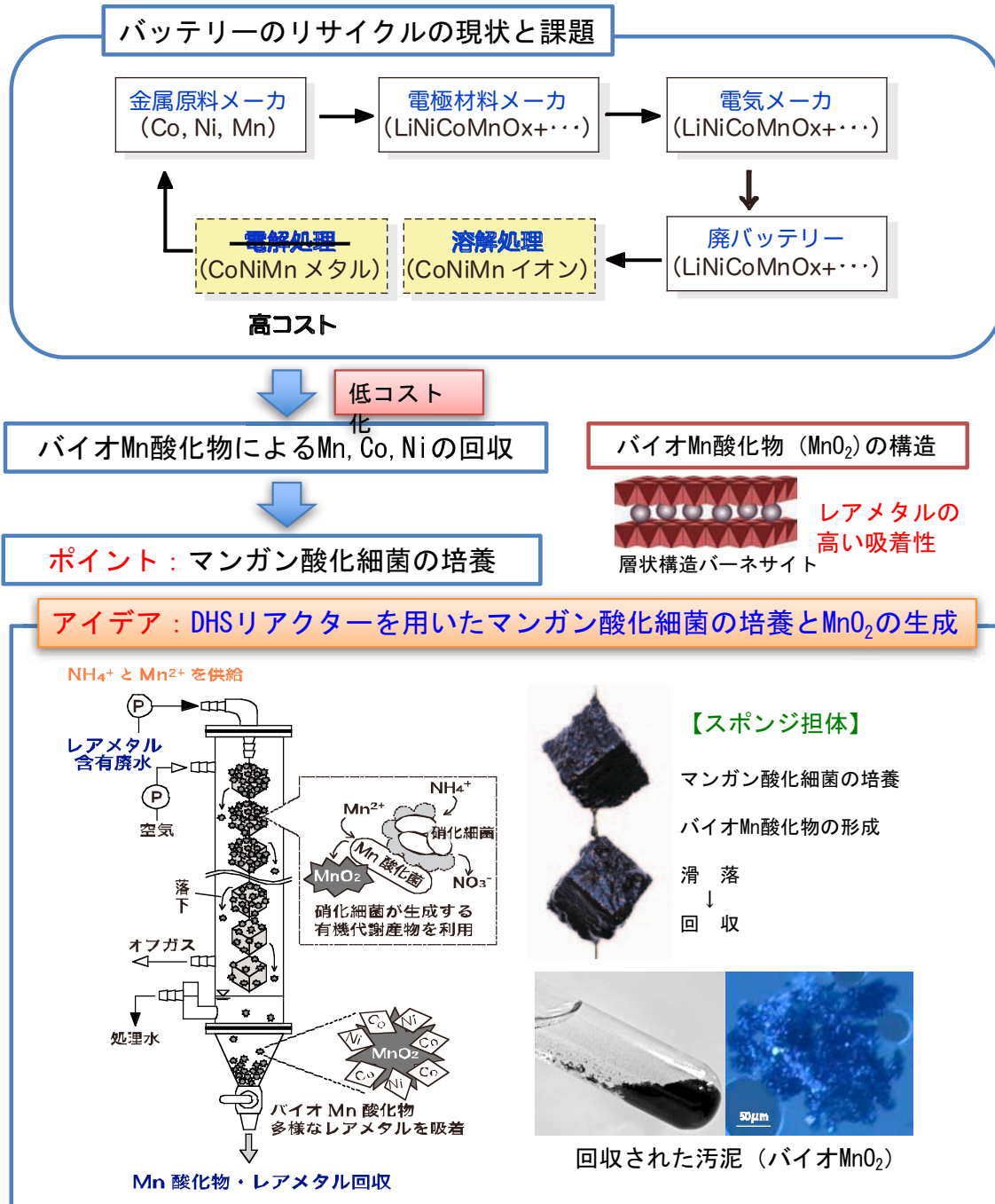
8. 引用文献

- 1) <http://www.nirs.go.jp/db/anzendb/NORMDB/PDF/31.pdf>, 独立行政法人放射線医学総合研究所, レアメタル・レアアース
- 2) http://www.okb-kri.jp/_userdata/pdf/report/135-33-42.pdf, 共立総合研究所, 身近なレアメタル
- 3) <http://ja.wikipedia.org>, Wikipedia, 尖閣諸島中国漁船衝突事件
- 4) B.M. Tebo, H.A. Johnson, J.K. McCarthy, A.S. Templeton, 2005. Geomicrobiology of manganese(II) oxidation. *Trends in Microbiology*, 13 (9), 421-428.
- 5) Y. Tani, N. Miyata, K. Iwahori, M. Soma, S. Tokuda, H. Seyama B.K.G. Theng, 2003. Biogeochemistry of manganese oxide coatings on pebble surfaces in the Kikukawa River System, Shizuoka, Japan. *Applied Geochemistry* 18 (10), 1541-1554.
- 6) W.C. Ghiorse, 1986, Applicability of ferromanganese-depositing microorganisms to industrial metal recovery processes. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 16, 141-148.
- 7) N. Miyata, Y. Tani, M. Sakata, K. Iwahori, 2007. Microbial Manganese Oxide Formation and Interaction with Toxic Metal Ions., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104, 1, 1-8.
- 8) Y.M. Nelson, L. W. Lion, M. L. Shuler, and W. C. Ghiorse. 2002. Effect of oxide formation mechanisms on lead adsorption by biogenic manganese (hydr)oxides, iron (hydr)oxides, and their mixtures. *Environmental Science and Technology*, 36, 421-425.
- 9) B.M. Tebo, J.R. Bargar, B.G. Clement, G.J. Dick, K.J. Murray, D. Parker, R. Verity, S.M. Webb, 2004, Biogenic manganese oxides: properties and mechanisms of formation. *The Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. 32, 287-328.
- 10) J.P.M. de Vrind, E.W. de Vrind de Jong, J.W.H. de Voogt, W. Peter, F.C. Boogerdet, R.A. Rosson, 1986, Manganese oxidation by spores and spore coats of a marine *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1096-1100.
- 11) M. Okazaki, T. Sugita, M. Shimizu, Y. Ohode, K. Iwamoto, E.W. de Vrind de Jong, J.P. de Vrind, P.L. Corstjens, 1997. Partial purification and characterization of manganese-oxidizing factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4793-4799
- 12) Adams, L.F. and Ghiorse, W.C. 1987. Characterization of extracellular Mn²⁺-oxidizing activity and isolation of an Mn²⁺-oxidizing protein from *Leptothrix discophora* SS-1. *J. Bacteriol.* 169, 1279-1285
- 13) M. Takeda, Y. Kitagata, W.C. Ghiorse, S. Hanada, J. Koizumi, 2002. *Caldimonas manganoxidans* gen. nov., sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading, manganese-oxidizing thermophile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 895-900.
- 14) C.A. Francis, E.M. Co, B.M. Tebo, 2001. Enzymatic manganese(II) oxidation by a marine α -proteobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4024-4029.
- 15) Y. Tani, N. Miyata, M. Ohashi, T. Ohnuki, H. Seyama, K. Iwahori, M. Soma 2004. Interaction of inorganic arsenic with biogenic manganese oxide produced by a Mn-oxidizing fungus, strain KR21-2. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6618-6624.

- 16) Y. Tani, M. Ohashi, N. Seyama, K. Iwahori, M. Soma, 2004. Sorption of Co(II), Ni(II), and Zn(II) on biogenic manganese oxides produced by a Mn-oxidizing fungus, strain KR21-2. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 39, 2641–2660.
- 17) K.J. Edwards, W. Bach, D.R. Rogers, 2003. Geomicrobiology of the ocean crust: a role for chemoautotrophic Fe-bacteria. *Biol. Bull.* 204, 180–185.
- 18) Tebo, B.M. 1997. Bacterially mediated mineral formation: insights into manganese(II) oxidation from molecular genetic and biochemical studies. In *Geomicrobiology: Interactions Between Microbes and Minerals (Reviews in Mineralogy)* (Vol. 35) (Banfield, J.F. and Nealson, K.H., eds), pp. 225–266, Mineralogical Society of America, Washington, D.C.
- 19) Parikh, S.J. and Chorover, J. 2005. FTIR spectroscopic study of biogenic Mn-oxide formation by *Pseudomonas putida* GB-1. *Geo-microbiol. J.* 22, 207–218.
- 20) K. Geszvain, J.K. McCarthy B.M. Tebo. 2013. Elimination of Manganese(II, III) Oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1 by a Double Knockout of Two Putative Multicopper Oxidase Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013, 79(1):357.
- 21) J.G. van Waasbergen, M. Hildebrand, B.M. Tebo 1996. *J. Bacteriol.* 178:3517–3530.
- 22) J.P. Ridge, M. Lin, E.I. Larsen, M. Fegan, A.G. McEwan, L.I. Sly, 2007. A multicopper oxidase is essential for manganese oxidation and laccase-like activity in *Pedomicrobium* sp. ACM 3067. *Environmental Microbiology*, 9 (4), 944–953.
- 23) E. I.Larsen, L. I. Sly, A.G. McEwan, 1999. Manganese(II) adsorption and oxidation by whole cells and a membrane fraction of *Pedomicrobium* sp. ACM 3067. *Arch Microbiol.*, 171(4), 257–264.
- 24) J. M. Diaz, C. M. Hansel, B. M. Voelker, C. M. Mendes, P. F. Andeer, T. Zhang, 2013) Widespread Production of Extracellular Superoxide by Heterotrophic Bacteria. *Science*, 340, 1223 – 1226.
- 25) S. Hara, R. Isoda, T. Tahvanainen, Y. Hashidoko, 2012. Trace Amounts of Furan-2-Carboxylic Acids Determine the Quality of Solid Agar Plates for Bacterial Culture. *PLOS ONE*, 7, (7), e41142.

[研究概要図]

廃リチウムイオン二次電池の溶解処理液からマンガン、ニッケル、コバルトを低コスト回収のためのレアメタルの吸着性に優れているバイオ Mn 酸化物を高速に生成する技術を開発する。



- 本研究成果**
- マンガン酸化速度の高速化を達成
 - 早期スタートアップを確立
 - 実廃二次電池溶解液からMn, Co, Niの同時回収を実証

- 展開**
- メッキ工場排水処理
 - 鉱山排水処理
 - 温泉・ガス田等からのレアメタル回収
 - 海洋資源

[英文概要]

Simultaneous recovery of Mn, Ni, Co from rechargeable battery waste with dissolution treatment by bioreactor

Principal Investigator: Akiyoshi OHASHI
Institution: Graduate school of Engineering, Hiroshima University
4-1, Kagamiyama 1 chome, Higashi-Hiroshima 739-8527, JAPAN
Tel: +81-82-424-5718 / Fax: +81-82-424-5718
E-mail: ecoakiyo@hiroshima-u.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Minor metals, Resource recovery, Recycle, Rechargeable battery waste, Manganese oxidizing bacteria, Mn oxides, Ni, Co

Production of electric car battery is increasing. In the near future, their disposal and recycling would become a big issue for sustainable society. Recovery of Mn, Co and Ni from rechargeable battery waste is conducted by mainly chemical and electrical procedures nowadays, which is very costly. The objective of this study is to develop a novel biological technology for recovering Mn, Co and Ni from rechargeable battery solution.

Biogenic Mn oxides (bio-MnO₂), products of biological Mn(II) oxidation by Mn oxidizing bacteria (MnOB), are well known for metals adsorption. If MnOB cultivation is possible under open environments, the bioreactor can be expected to be used in a promising system for simultaneous recovery of Co, Mn and Ni. However, it is difficult to enrich MnOB at high organic substrate concentrations, where other fast-growing heterotrophs usually dominate the microbial community. The enrichment of MnOB might be possible under very low substrate conditions. We have conceived a unique strategy for MnOB enrichment by co-culture with nitrifiers or methane oxidizing bacteria, in which low organic substrate is continuously provided because soluble microbial products (SMP) are excreted from nitrifiers and methane oxidizers.

Cultivations of MnOB and biological Mn(II) oxidation in DHS bioreactor were successful established in coupling with nitrification and methane oxidation by supplying Mn(II) and ammonium or methane gas, respectively. However, the maximum Mn(II) oxidation rates achieved only 0.6 and 0.35 kg Mn. m⁻³. d⁻¹, because of pH drop and methane oxidization activity inhibition by produced bio-MnO₂ respectively. In these experiments, we found a new interesting phenomenon that MnOB can grow on dead cells. Then, we tried to enrich MnOB on activated sludge as substrate and succeeded in the enrichment, achieving Mn(II) oxidation rate of 1.69 kg Mn. m⁻³. d⁻¹ over our target level.

We also found that a large variety of heterotrophs are inhibited by MnO₂, and conducted an enrichment of MnOB in a DHS reactor, where MnO₂ was initially installed, with organic

substrate fed. The results revealed that Mn(II) oxidation was quickly observed even in such condition.

Finally, a treatment test was performed using a real rechargeable battery solution based on the information obtained, in order to investigate whether Mn, Co and Ni are simultaneously recovered at $1 \text{ kg Mn} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. This research demonstrated that minor metals in rechargeable battery are able to be recycled by biological method.