

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-261234
(P2005-261234A)

(43) 公開日 平成17年9月29日(2005.9.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/20	C 1 2 N 1/20 Z N A A	4 B O 2 4
C O 2 F 3/34	C 1 2 N 1/20 D	4 B O 6 3
// C 1 2 N 15/09	C O 2 F 3/34 Z	4 B O 6 5
C 1 2 Q 1/04	C 1 2 N 15/00 A	4 D O 4 O
(C 1 2 N 1/20	C 1 2 Q 1/04	

審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-75390 (P2004-75390)
(22) 出願日 平成16年3月16日 (2004.3.16)

(71) 出願人 504224153
国立大学法人 宮崎大学
宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地

(74) 代理人 240000039
弁護士 弁護士法人 衛藤法律特許事務所

(72) 発明者 林 幸男
宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地
宮崎大学工学部内

(72) 発明者 宮武 宗利
宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地
宮崎大学工学部内

(72) 発明者 田辺 公子
宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地
宮崎大学フロンティア科学実験総合センター
一内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規微生物と微生物によるヒ素類の除去方法

(57) 【要約】

【課題】ヒ素類吸着能を有する新規微生物及びそれによるヒ素類の除去方法、並びに公知微生物による簡単で安価なヒ素類の除去方法を提供する。

【解決手段】本発明の第1発明は、土壌から単離されたヒ素吸着能を有する新菌株バシルス・メガテリウムUM-123 (*Bacillus megaterium* UM-123、2004年2月12日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託、寄託番号[FERM P-19682])を提示する。本発明の第2発明は、この新菌株を用いたヒ素類の除去方法で、これまで知られていないAs(3)に対して高い除去率を示す。本発明の第3発明であるヒ素類の除去方法では、細菌として、バシルス・メガテリウム及びバシルス・サブティリス、並びにエセリシア・コリを用い、糸状菌としてアスペルギルス・ニガー、酵母としてサッカロマイセス・セレビシエを用いる。

【選択図】 図1

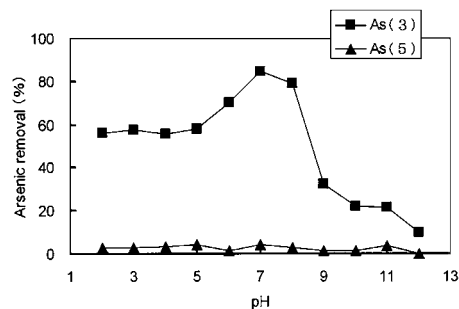


Fig.1 Effect of pH

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒ素吸着能を有することを特徴とする新菌株バシルス・メガテリウムUM-123。

【請求項 2】

請求項 1 の新菌株バシルス・メガテリウムUM-123 を用いて、ヒ素類含有水溶液を処理することを特徴とする微生物によるヒ素類の除去方法。

【請求項 3】

ヒ素類が 3 価のヒ素類であることを特徴とする請求項 2 記載の微生物によるヒ素類の除去方法。

【請求項 4】

水溶液の pH が 2 ~ 11 であることを特徴とする請求項 2 記載の微生物処理によるヒ素類の除去方法。

【請求項 5】

水溶液の pH が 2 ~ 8 であることを特徴とする請求項 2 記載の微生物処理によるヒ素類の除去方法。

【請求項 6】

水溶液の pH が 6 ~ 8 であることを特徴とする請求項 2 記載の微生物処理によるヒ素類の除去方法。

【請求項 7】

処理温度が 30 ~ 50 であることを特徴とする請求項 2 記載の微生物によるヒ素類の除去方法。

【請求項 8】

バシルス属に属するヒ素類吸着能を有する細菌、エセリシア属に属するヒ素類吸着能を有する細菌、アスペルギルス属に属するヒ素類吸着能を有する糸状菌、及びサッカロマイセス属に属するヒ素類吸着能を有する酵母からなる群から選ばれた少なくともひとつを含む処理剤を用いて、ヒ素含有水溶液を処理することを特徴とする微生物によるヒ素類の除去方法。

【請求項 9】

バシルス属に属する細菌がバシルス・メガテリウム及びバシルス・サブティリスからなる群から選ばれた少なくともひとつであることを特徴とする請求項 8 記載の微生物処理によるヒ素類の除去方法。

【請求項 10】

エセリシア属に属する細菌がエセリシア・コリであることを特徴とする請求項 8 記載の微生物処理によるヒ素類の除去方法。

【請求項 11】

アスペルギルス属に属するヒ素類吸着能を有する糸状菌が、アスペルギルス・ニガーであることを特徴とする請求項 8 記載の微生物処理によるヒ素類の除去方法。

【請求項 12】

サッカロマイセス属に属する酵母が、サッカロマイセス・セレヴィシエであることを特徴とする請求項 8 記載の微生物処理によるヒ素類の除去方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規微生物及び微生物によるヒ素類の除去方法、特にヒ素類含有水溶液を微生物処理してヒ素類を除去する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

廃液中のヒ素類の除去には、例えば鉄(3)を塗布したアルギニンゲル(非特許文献1)や鉄粒子(非特許文献2)で吸着する方法、活性化された赤泥(非特許文献3)やフライアッシュ(非特許文献4)に吸着させる方法、化学的沈殿方法(非特許文献5)、モリ

10

20

30

40

50

ブデン含浸キトサンビーズによる吸着（非特許文献6）、炭素ベース吸着剤による方法（非特許文献7）などが一般的に知られている。さらに生物的な吸着方法として、化学的に修飾されたバイオマス菌を用いて除去する方法も、実験室的にはあるが知られている（特許文献8）。尚、鉄（3）及びFe（3）は、3価の鉄（Fe）を示し、As（3）は、3価のヒ素（As）を示し、As（5）及びArsenic（5）は、5価のヒ素（As）を示す。

【非特許文献1】Min JH et al: Arsenate sorption by Fe(3)-doped alginate gels. *Water Res* 32 [1544] 52 (1998)

【非特許文献2】Matis KA et al: Sorption of As(5) by goethite particles and study of their flocculation. *Water Air Soil Pollut* 111 [297] 316(1999)

【非特許文献3】Bildik M. et al: Arsenic removal from aqueous solutions by adsorption on red mud. *Waste Manage* 22 [357] 63 (2002)

【非特許文献4】Diamantopoulos E et al: As(5) removal from aqueous solution by fly ash. *Water Res* 27(12) [1773] 7 (1993)

【非特許文献5】Harper TR et al: Removal of Arsenic from wastewaters using chemical precipitation methods. *Water Environ Res* 64 [200] 3 (1992)

【非特許文献6】Dambies I et al: Arsenic(5) sorption on molybdate-impregnated chitosan beads. *Colloids Surf A* 170 [19] 31 (2000)

【非特許文献7】Pattanayak J et al: A parametric evaluation of the removal of As(5) and As(3) by carbon-based adsorbents. *Carbon* 38 [589] 96 (2000)

【非特許文献8】Maria X et al: Removal of As(5) from wastewaters by chemically modified fungal biomass. *Water Res* 37 [4544] 52 (2003)

【0003】

一方、生物的吸着による重金属の除去に関しては、固定化 *M. rouxii* バイオマスによる生物吸着カラムでの除去（非特許文献9）や、アスペルギルス・ニガーを用いた方法（非特許文献10）等が知られている。

【非特許文献9】Yan G et al: Heavy metal removal in a biosorption column by immobilized *M. rouxii* biomass. *Bioresource Technology* 78 [243] 249 (2001)

【非特許文献10】Kapoor A et al: Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 70 [95] 104 (1999)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

重金属の生物吸着は、非特許文献9及び10を待つまでもなく広く知られているが、ヒ素類含有廃水からのヒ素類の除去に微生物を用いた例はほとんどない。マリア等の非特許文献8は数少ない例のひとつである。しかしながら、マリア等のヒ素類の吸着方法で実際に使用している菌は、ペニシリウム・クリソゲナムバイオマスである。また除去するヒ素類は、As（5）である。しかも、この菌バイオマス自体ではAs（5）の回収率は低く、菌バイオマスを通常の界面活性剤及び陽イオン電解液で前処理し、化学的に修飾したものでないと、所期の目的を達成しない。前処理は比較的簡単とされているが、工業的な実施に際してはコスト的にも大きな障害となる。これまでのところ、ヒ素類の除去に微生物を用いた例、特にAs（3）の微生物吸着による除去技術は知られていない。

【0005】

本発明は、前記のごとき課題を解決するヒ素類吸着能を有する新規微生物を提供することを目的としている。

【0006】

また本発明は、培養で大量に増やすことのできる、生分解性の微生物を用い、ヒ素またはヒ素化合物含有水溶液からヒ素類を回収する操作が簡単なヒ素類の除去方法を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【0007】

前記課題を解決した本発明の第1の発明である新規微生物は、土壌から単離されたヒ素吸着能を有する新菌株バシルス・メガテリウムUM-123 (*Bacillus megaterium* UM-123、2004年2月12日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託、寄託番号[FERM P-19682])を特徴としている。

【0008】

本発明の第2の発明である微生物によるヒ素類の除去方法は、新菌株バシルス・メガテリウムUM-123を用いて、ヒ素類含有水溶液を処理することを特徴としている。

【0009】

第2の本発明は、特にAs(3)のヒ素類の除去において効果的である。この場合、被処理水溶液のpHは2~11、望ましくは2~8、さらに望ましくは6~8の範囲が除去率の観点から好適である。また処理温度は、約30~50の範囲が除去率の観点から望ましい。

10

【0010】

本発明の第3の発明である微生物によるヒ素類の除去方法は、バシルス属に属するヒ素類吸着能を有する細菌、エセリシア属に属するヒ素類吸着能を有する細菌、アスペルギルス属に属するヒ素類吸着能を有する糸状菌、及びサッカロマイセス属に属するヒ素類吸着能を有する酵母からなる群から選ばれた少なくともひとつを含む処理剤を用いて、ヒ素含有水溶液を処理することを特徴としている。

20

【0011】

第3の発明において、使用する細菌としてはバシルス属に属するバシルス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)及びバシルス・サブティリス(*Bacillus subtilis*)、またはエセリシア属に属するエセリシア・コリ(*Escherichia coli*)であることが望ましい。

【0012】

第3の発明において、使用する糸状菌としてはアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、使用する酵母としてはサッカロマイセス・セレヴィシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)であることが望ましい。

【0013】

以下、本発明でヒ素類とは、三価または五価のヒ素、As(3)As(5)またはそれらを含むヒ素化合物をいう。

30

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、以下の産業上の効果及び利点がある。

【0015】

(1)本発明の第1及び第2の発明によれば、バシルス属に属する新規菌株バシルス・メガテリウムUM-123を用いることにより、これまで前例のないAs(3)をマイルドな条件下で、ヒ素類含有水溶液からヒ素類を約85%の高い回収率でもって除去できる。

【0016】

(2)本発明の第3の発明によれば、微生物の中でもバシルス属及びエセリシア属に属する細菌、アスペルギルス属に属する糸状菌、サッカロマイセス属に属する酵母の使用により、ヒ素類含有水溶液からヒ素類を除去できる。

40

【0017】

前記各本発明では、生分解性あるいは自己消化性の微生物によりヒ素類を吸着することにより、化学的吸着等にくらべると、ヒ素除去後の廃棄物の環境負荷が少ない利点がある。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明の第1の発明である新規菌株バシルス・メガテリウムUM-123は、土壌を滅

50

菌水に懸濁後、その上清を例えばヒ素含有寒天平板培地に塗布して培養し、菌株を単離することにより得ることができる。培養に使用する培地に特に制限はないが、ヒ素含有培地の使用は、ヒ素類に耐性のある菌の選択を考慮したためである。

【0019】

得られた新規菌株バシルス・メガテリウムUM-123の菌学的性質及び同種公知菌との相違は、後述の実施例1及び実施例1に基づく表1に示すとおりである。

【0020】

【表1】

検体番号	S I I D 2 5 8 8	
培養温度 (°C)	3 0	
細胞形態	桿菌 (1. 0-1. 1×2. 0-3. 0 μm)	
グラム染色	+	
孢子	+	
運動性	-	
コロニー形態	培地: Nutrient Agar 培養時間: 24時間 円形 周縁波状 低くて平ら やや光沢あり クリーム色	
培養温度 (°C)	3 7	+
	4 5	+
カタラーゼ	+	
オキシダーゼ	-	
酸/ガス産生 (グルコース)	-/-	
O/Fテスト (グルコース)	-/-	
類似の性状を示す類似群	B a c i l l u s	

注: +; 陽性、-; 陰性、W; 反応弱

10

20

30

【0021】

本発明の第2、第3の発明で吸着除去可能なヒ素類としては、ヒ素の単体、三価As(3)及び五価As(5)並びにそれらのヒ素化合物など特に制限はない。しかし、新菌株バシルス・メガテリウムUM-123を用いる第2の発明では、図1から明らかなように、三価のヒ素化合物、三酸化二ヒ素(As₂O₃)の除去率は、五価のヒ素化合物、ヒ酸二ナトリウム七水和物(Na₂HAsO₄·7H₂O)のそれに比べていちじるしく高い。したがって、第2の発明は、As(3)において特に有効である。

【0022】

本発明の第3の発明において使用する細菌としては、バシルス属及びエセリシア属に属するヒ素類吸着能を有するバシルス・メガテリウム及びバシルス・サブティリスをあげることができる。特に、後述する新規菌株バシルス・メガテリウムUM-123の使用は、高いAs(3)の除去率を示す。またエセリシア属に属するヒ素類吸着能を有するエセリシア・コリも有用である。糸状菌としてはアスペルギルス・ニガー、酵母としてはサッカロマイセス・セレヴィシエを挙げることができる。バシルス・サブティリス(IF003335)とエセリシア・コリ(IF03301)、アスペルギルス・ニガー(IF04414)、サッカロマイセス・セレヴィシエ(IF02044)は、いずれも(財)発酵研究所から購入可能な公知菌である。

40

【0023】

本発明に用いる微生物類の培養には、例えば培地には、肉エキス、ペプトン、塩化ナトリウム、燐酸-水素カリウム等を用い、pH7程度に調整する。オートクレーブで滅菌し

50

た培地に菌を接種し、30 で24時間、110ストローク/分で振盪培養する。培養後、培養液から遠心分離機により菌体を分離し、生理食塩水により洗浄後、凍結乾燥して菌体を得る。

【0024】

本発明のヒ素類の除去は、一般的に被処理水溶液のpH調整、温度、圧力、菌体類添加量、混合攪拌時間等に依存する。

【0025】

pHは使用する菌体の種により異なるので特定できないが、本発明の第2の発明では、図1が示すように、As(3)の除去率の観点から、pH2~11、好ましくは8以下、さらに好ましくは6~8の中性近傍が好適である。温度は、図2に示すように、30~50、特に30~45の範囲はが好適である。

10

【0026】

菌体類の添加量は、ヒ素類の濃度、菌体の種類により異なるが、例えばヒ素類濃度が1mg/Lであれば、菌体量は0.2~2.0w/v程度でよい。

【0027】

攪拌時間は、2時間程度で十分である。2時間以上長時間に亘っても、除去率に大きな変化はない。処理後は、遠心分離機等により菌体と上清を分けて菌体を除けば、ヒ素を除去した清浄な水が得られる。

【実施例1】

【0028】

20

(本発明の第1の発明による新菌株の取得と同定)

[新菌株の取得]

宮崎県内の畑の土壌を滅菌水に懸濁後、その上清を平板培地に塗布し30 で培養した。平板培地には、商品名「Nutrient Agar」(日水製薬株式会社製)に三酸化二ヒ素[As₂O₃:As(3)]を1mg/Lになるように加えたものを用いた。主な成分は、肉エキス0.5%、ペプトン1.0%、塩化ナトリウム0.5%、寒天1.5%で、pHは7である。平板培地上のコロニーを分画操作より単一にした。得られた菌株を培地に接種した。培地には、商品名「Nutrient Broth」(日水製薬株式会社製)に三酸化二ヒ素[As₂O₃:As(3)]を1mg/Lになるように加えたものを用いた。主な成分は、肉エキス0.5%、ペプトン1.5%、塩化ナトリウム0.5%、リン酸-水素カリウム0.5%で、pHは7である。接種後、30 で24時間、110ストローク/分の振盪培養を行った。次いで、遠心分離機により、培養液から菌体を分離し、その上清のヒ素濃度を測定した。ヒ素濃度の測定は、宮崎大学フロンティア科学実験総合センター実験支援部門機器分析分野木花分室のヒ素形態別分析システム(ヒ素形態別前処理装置-原子吸光分光光度計)によった。培養上清のヒ素濃度の低下が著しかったものを新規菌株とした。

30

【0029】

[新菌株の同定1:微生物第1段階試験]

新菌株UM-123(登録番号SID2588)につき、(株)エヌシーアイエムビー・ジャパンで、形態学的・生理生化学的試験の結果からSID2588と類似の性状を示す分類群を推定するため、下記の試験を実施した。

40

【0030】

光学顕微鏡U-LH1000(オリンパス、日本)による細胞形態、グラム染色性、胞子の有無、鞭毛による運動性の有無の観察を行った。Nutrient Agar(Oxoid, イングランド、英国)平板培地上でのコロニー形態を観察した。カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、ブドウ糖からの酸/ガス産生、ブドウ糖の酸化/醗酵(O/F)について試験した。結果を表1に示す。

【0031】

表1から明らかなように、SID2588は、グラム染色陽性、桿菌、芽胞形成、好気条件下での生育性、カタラーゼ反応要請などの性状を示し、BARROW, G.I. et al:Cowan

50

and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd. Ed. 1993, Cambridge University Press、及びSNEATH, P. H. A. et al: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 1984, Williams and Wilkins, Baltimoreを参考にして、バシルス属に属する菌株と推定した。

[新菌株の同定 2 : 16S rDNA - 500塩基配列解析]

【0032】

次に、登録番号S I I D 2 5 8 8につき、(株)エヌシーアイエムビー・ジャパンで、16S rDNA (16S rRNA遺伝子)の部分塩基配列500bpを用いて検体の帰属分類群を推定するため、塩基配列解析を行った。

【0033】

S I I D 2 5 8 8をNutrient Agar (Oxoid, England, UK)に植菌し、30℃で2日間培養した。その後、この菌体をDNA抽出の供試菌体とした。

【0034】

ゲノムDNAの抽出には、PrepMan Method (Applied Biosystems, CA, USA)を使用した。抽出したゲノムDNAを鋳型としてPCRにより16S Ribosomal RNA遺伝子(16S rDNA)のうち5'末端側約500bpの領域を増幅した。その後、増幅された塩基配列をシーケンシングし、検体の16S rDNA部分塩基配列を得た。PCR産物の精製、サイクルシーケンスには、MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA)を使用した。20 サーマルサイクラーには、GenAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, CA, USA)、DNAシーケンサーには、ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems, CA, USA)を使用した。なお、ゲノムDNA抽出からサイクルシーケンスまへの基本操作は、Applied Biosystems社のプロトコール(P/N 4308132 Rev. A)に従った。

【0035】

解析では、得られた16S rDNAの塩基配列を用いて相同性検索を行い、相同率の上位10株を決定した。さらに検索された上位10株と検体の16S rDNAを用いて近隣結合法(SAITOU, N. et al: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4 406-425 (1987))により分子系統樹を作製、検体の近縁種及び帰属分類群の検討を行った。相同性検索及び系統樹の作製には、MicroSeq Microbial Identification System Software V.1.4.1を、相同性検索を行う際のデータベースとしてMicroSeq Bacterial 500 Library v.0023 (Applied Biosystems, CA, USA)を使用した。また、MicroSeq Bacterial 500 Libraryに対する相同性検索において、相同率100%で一致する菌株が検索されなかった場合は、BLASTには、ALTDCHUL, S. F. et al: Gapped BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25 3389-3402 (1997)及びSKERMAN V. B. D. et al: Approved lists of Bacterial Names. Int. J. Syst. Bacteriol., 30 225-420 (1980)を用いて、DNA塩基配列データベース(GenBank / DDBJ / EMBL)に対して相同性検索を行った。40

【0036】

Microseqによる検体[UM-123](S I I D 2 5 8 8)株の16S rDNA塩基配列解析結果は、次の配列表のフリーテキストに示す。

【0037】

(配列表のフリーテキスト)

10

20

30

40

【配列表のフリーテキスト】

16S rDNA塩基配列

1 tggagagttt gatcctggct caggatgaac gctggcggcg tgcctaatac
 51 atgcaagtcg agcgaactga ttagaagctt gcttctatga cgtagcggc
 101 ggacgggtga gtaacacgtg ggcaacctgc ctgtaagact gggataactt
 151 cgggaaaccg aagctaatac cggataggat cttctccttc atgggagatg
 201 attgaaagat ggtttcggct atcaactaca gatgggcccg cggatgcatta
 251 actagtttgt gaggtaacgg ctcaccaagg caacgatgca tagccgacct
 301 gagagggtga tcggccacac tgggactgag acacggccca gactcctacg
 351 ggaggcagca gtagggaatc ttccgcaatg gacgaaagtc tgacggagca
 401 acgccgcgtg agtgatgaag gctttcgggt cgtaaaactc tgttgtagg
 451 gaagaacaag tacragagta actgctygtc ccttgacggt acctaaccg
 501 aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggta

10

【0038】

本検体と近縁とされる菌株とその相違性

Library : 500 0023 0.9 1286 / 1286

BLAST : 536 S I I D 2 5 8 8

0.37% 536 Bacillus megaterium

3.54% 536 Bacillus flexus

10.26% 536 Bacillus cohnii

10.75% 530 Bacillus psychrosaccharolytic

us

11.57% 536 Bacillus horikoshii

12.03% 532 Bacillus circulans

12.15% 535 Bacillus azotoformans

12.17% 534 Bacillus fastidiosus

12.73% 534 Bacillus marinus

12.87% 537 Bacillus cereus

30

【0039】

本検体と近縁上位株との相違点

4

7

7

S I I D 2 5 8 8

Y

Bacillus megaterium

T

【0040】

本検体と近縁株との近隣結合法による系統樹は、図3に示す。

40

【0041】

BLAST Result DNA塩基配列データベースに対して行った相同性検索の結果：検索された上位20エントリーの内エントリー上位5位塩基配列とS I I D 2 5 8 8塩基配列とのアイデンティティの比較を表2に示す。

【0042】

【表 2】

エントリー名	株名	Accession No	Identity
Bacillus megaterium	QMB1511	AF142677	532/535=99.4%
Bacillus sp.	No.49	AB066347	529/531=99.6%
Bacillus sp.	No.54	AB066345	529/531=99.6%
Bacillus megaterium	Cl	AJ491841	531/534=99.4%
Bacillus sp.	98TH11316	AY159884	530/533=99.4%

【0043】

10

さらにS I I D 2 5 8 8 r D N Aとエントリー最上位のD N Aとの塩基配列の配列比較を実施した。結果は図4に示す。

【0044】

これらの結果、M i c r o S e qを用いた解析では、S I I D 2 5 8 8の16S r D N A部分塩基配列は、相同率99.63%でB a c c i l l u s m e g a t e r i u m (STACKEBRANDT, E. et al:Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology.Int. J. Syst. Evol. Microbiol., [52] 1043-1047 (2002))の16S r D N Aに対し高い相同率を示し、2株の16S r D N A間の相違点はI U Bコード(Y=CまたはT)で1塩基のみであった。分子系統樹上でもS I I D 2 5 8 8の16S r D N Aは、B a c i l l u s m e g a t e r i u mの16S r D N Aと同じ場所に位置した。B L A S Tを用いたG e n B a n k / D D B J / E M B Lに対する相同性検索の結果、S I I D 2 5 8 8の16S r D N Aは、相同率99.4%でB a c i l l u s m e g a t e r i u m Q M B 1 5 5 1株の16S r D N Aに対し最も高い相同性を示した。上記の結果から、S I I D 2 5 8 8は、B a c i l l u s m e g a t e r i u mに帰属する新規な菌株と推定、B a c i l l u s m e g a t e r i u m U M - 1 2 3と命名した。

20

【実施例2】

【0045】

(第2の発明によるヒ素類の除去)

土壌から得られたバシルス・メガテリウムUM-123を培地に接種した。培地には、商品名「Nutrient Broth」(日水製薬株式会社製)を用いた。主な成分は、肉エキス0.5%、ペプトン1.5%、塩化ナトリウム0.5%、燐酸-水素カリウム0.5%で、pHは7である。接種後、30で24時間、110ストローク/分の振盪培養を行った。次いで、遠心分離機により、培養液から菌体を分離し、生理食塩水で洗浄後、凍結乾燥して菌体を得た。

30

【0046】

pHを下記のごとく調整した緩衝液(M c l l v a i n e , C a r m o d y)に、三酸化二ヒ素[As₂O₃:As(3)]とヒ酸二ナトリウム七水和物[Na₂HAsO₄·7H₂O:As(5)]を1mg/Lになるように加えた。このヒ素水溶液に下記の量の菌体、バシルス・メガテリウムUM-123を添加し、下記の時間攪拌した後静置し、各上清を採取した。

40

pH調整; pH 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12

(菌体添加量2.0w/v、攪拌時間2時間)

菌体添加量; 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0%(w/v)

(pH 7、攪拌時間4時間)

攪拌時間; 2、4、6時間

(pH 7、菌体添加量2.0%(w/v))

【0047】

各上清のヒ素濃度を測定した。ただし、各試験にあってはヒ素初濃度; As(3)1mg/Lとした。pH依存性試験にあっては菌体添加量; 2.0%(w/v)、攪拌時間;

50

2時間、菌体添加量依存性試験にあつてはpH；7、攪拌時間；4時間、攪拌時間依存性試験にあつてはpH；7、菌体添加量；2.0%（w/v）とした。ヒ素濃度の測定は、宮崎大学フロンティア科学実験総合センター実験支援部門機器分析分野木花分室のヒ素形態別分析システム（ヒ素形態別前処理装置 - 原子吸光分光光度計）によつた。pH依存性の結果を表3及び図1に、菌体添加量依存性の結果を表4に、攪拌時間依存性を表5に示す。

【0048】

【表3】

ヒ素除去率のpH依存性

試料	pH毎のヒ素除去率（%）										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
As（3）	56.0	57.6	55.7	58.0	70.1	84.5	79.1	32.2	21.9	21.4	9.7
As（5）	2.9	2.6	3.2	4.0	1.4	4.4	2.9	1.3	1.5	3.9	0

10

【0049】

【表4】

ヒ素除去率の菌体添加量依存性

試料	菌体添加量毎のヒ素除去率（%）				
	0.2	0.5	1.0	1.5	2.0
As（3）	12.5	30.4	58.9	77.4	85.8

20

【0050】

【表5】

ヒ素除去率の攪拌時間依存性

試料	攪拌時間毎のヒ素除去率（%）		
	2	4	6
As（3）	84.7	85.8	85.6

【0051】

表3及び図1から明らかなように、pH依存性については、As（3）はpH7付近で84.5%の高い除去率を示したが、As（5）ではpH依存性がなく5%以下の除去率しか示さなかった。このことから、バシルス・メガテリウムUM-123による微生物処理では、これまでに例のないAs（3）に関して、pH8以下、望ましくはpH6～8の範囲で、きわめて高い選択的吸着が起こることが判明した。

30

【0052】

表4から明らかなように、菌体添加量が多いほど除去率が高いことが判明した。また表5から明らかなように、攪拌時間は、2時間以上であれば変化が認められない。

【実施例3】

【0053】

（第3の発明によるヒ素類の除去）

pH7調整した緩衝液（McIlvaine, Carmody）に、三酸化二ヒ素[As₂O₃：As（3）]を1mg/Lになるように加えた。このヒ素水溶液に下記の菌体を2.0%（v/w）添加し、4時間攪拌した後静置し、各上清を採取した。

- ・バシルス・メガテリウムUM-123 (Bacillus megaterium UM-123)
- ・バシルス・サブティリス (Bacillus subtilis)
- ・エセリシア・コリ (Escherichia coli)
- ・アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger)
- ・サッカロマイセス・セレヴィシエ (Saccharomyces cerevisiae)

【0054】

50

各検体の上清につき、実施例 1 と同じ方法で A s (3) の除去率をみた。結果を表 6 に示す。

【 0 0 5 5 】

【表 6】

試料	ヒ素除去率 (%)
バシルス・メガテリウムUM-123	85.8
バシルス・サブティリス	75.3
エセリシア・コリ	50.2
アスペルギルス・ニガー	24.3
サッカロマイセス・セレヴィシエ	41.6

10

【 0 0 5 6 】

表 6 から明らかのように、バシルス属及びエセリシア属のヒ素吸着可能菌の使用により、A s (3) を 5 0 % 以上の有効率で除去し得ることが分かった。また除去率はそれほど高くはないが、糸状菌及び酵母でもヒ素類の除去が可能ながことが判明した。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 5 7 】

本発明のヒ素類吸着能を有する新規菌株バシルス・メガテリウムUM-123とそれを用いたヒ素類除去方法、またはバシルス属に属するヒ素類吸着能を有する細菌、エセリシア属に属するヒ素類吸着能を有する細菌を用いたヒ素類の除去方法は、いずれも土壌のヒ素汚染による地下水からのヒ素類の除去に有効に利用できる。さらに、アスペルギルス属に属する糸状菌、サッカロマイセス属に属する酵母も、同様にヒ素類の除去に利用可能である。

20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 8 】

【図 1】本発明の第 2 発明におけるヒ素除去方法での pH 依存性を示すグラフである。

【図 2】本発明の第 2 発明におけるヒ素除去方法での温度依存性を示すグラフである。

【図 3】本発明の第 1 発明における新菌株同定での本検体と近縁株との近隣結合法による系統樹図である。

30

【図 4】本発明の第 1 発明における新菌株同定での S I I D 2 5 8 8 r D N A と エ ン ト リー最上位の D N A と の 塩 基 配 列 の 配 列 比 較 図 である。

【 図 1 】

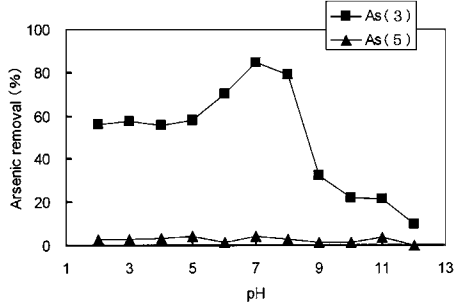
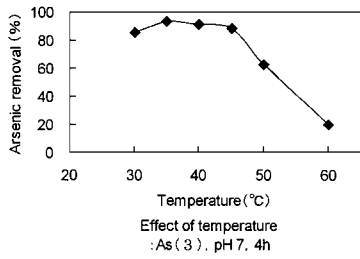


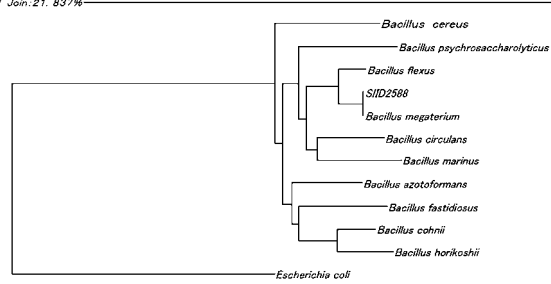
Fig.1 Effect of pH

【 図 2 】



【 図 3 】

本株と近縁株との近隣結合法による系統樹
N Join: 21. 837%



【 図 4 】

S11D2588 rDNAとエントリー最上位DNAとの増基配列と配列比較
[Query]はS11D2588を表している。
[Subject]はエントリー最上位配列を表している。

Query:2	ggagagtttgatcctggctcaggatgaacgctggcgcctgaatacatgcaagtcga	61
Subject:52740	ggagagtttgatcctggctcaggatgaacgctggcgcctgaatacatgcaagtcga	52681
Query:62	gogaactgattagaagcttgcctctatgaacttagcggcggacgggtgagtaacacgtgg	121
Subject:52680	gogaactgattagaagcttgcctctatgaacttagcggcggacgggtgagtaacacgtgg	52621
Query:122	gcaacctgctgtaagactgggataacttcgggaaaccgaagctaatacggataggatc	181
Subject:52620	gcaacctgctgtaagactgggataacttcgggaaaccgaagctaatacggataggatc	52561
Query:182	ttctcctcatgggatgattgaagatggtttcggctatcacttacagatggccgcc	241
Subject:52560	ttctcctcatgggatgattgaagatggtttcggctatcacttacagatggccgcc	52501
Query:242	ggtgcattagctagttggtgaggtaacggctcaccaggcaacgatgcatacggacctg	301
Subject:52500	ggtgcattagctagttggtgaggtaacggctcaccaggcaacgatgcatacggacctg	52441
Query:302	agagggtgatcgccacactgggactgagacaogccagactcactacggaggcagcag	361
Subject:52440	agagggtgatcgccacactgggactgagacaogccagactcactacggaggcagcag	52381
Query:362	tagggaatcttcgcaatggacgaagctgacggagcaacgccgctgagtgatgaagg	421
Subject:52380	tagggaatcttcgcaatggacgaagctgacggagcaacgccgctgagtgatgaagg	52321
Query:422	ctttcgggtgtaaaactgtgttttagggaaacaagtaacragagtaactgctygtac	481
Subject:52320	ctttcgggtgtaaaactgtgttttagggaaacaagtaacragagtaactgctygtac	52261
Query:482	cttgaogtaactaaccagaagccacgctaactacgtgccaagcagccggta	536
Subject:52260	cttgaogtaactaaccagaagccacgctaactacgtgccaagcagccggta	52206

【配列表】

2005261234000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
C 1 2 R 1:11) C 1 2 N 1/20 A
C 1 2 R 1:11

Fターム(参考) 4B024 AA17 CA02 CA11 GA27 GA30
4B063 QA13 QA18 QQ06 QR32 QR35
4B065 AA17X AA19X AA26X AA62X AA80X AC20 BA23 BB02 BC02 BC03
BC08 BD10 CA56
4D040 DD03 DD07 DD20