



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on interaction between bacteria and hematite under seawater condition for the elution of iron [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Aneksampant, Apichaya
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第13653号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74197
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Apichaya_Aneksampant_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (工学)	氏名	Apichaya Aneksampant
審査担当者	主 査 准教授	中島 一紀	
	副 査 教 授	川崎 了	
	副 査 教 授	廣吉 直樹	
	副 査 准教授	佐藤 久	

学位論文題名

Study on interaction between bacteria and hematite under seawater condition for the elution of iron
(海水条件下での鉄溶出を目的としたバクテリアとヘマタイトの相互作用に関する研究)

世界各国において、農村地域の開発や都市の急成長により、森林破壊や動植物へのミネラル供給不足など様々な環境問題が引き起こされている。深刻な問題の一つに、森林から海域への鉄の供給不足が挙げられ、これが沿岸域での海藻の枯渇・減少（磯焼け現象）につながっている。溶出した鉄は海藻の増殖や成長に不可欠であり、森林からの鉄の供給は非常に重要な要素である。しかしながら、海水の条件下 ($0 < Eh$, pH 8) では鉄イオンは安定な状態では存在できず、溶出した Fe(II) は容易に Fe(III) に酸化され、Fe(III) は水酸化物となり沈殿する。一方、腐植物質などの有機物が Fe(II) と錯体を形成し、溶出した鉄を海水中で安定化させることが知られている。そこで、製鋼スラグと堆肥からなる肥料を磯焼けが見られる沿岸域に投入する試みが行われている。この肥料は、鉄を海水に供給するため鉄肥料と呼ばれる。鉄肥料から溶出する微量の鉄についての研究が行われており、藻場が数年で復活することが知られている。バクテリアが鉄の溶出に重要な役割を果たしている証拠も見出されている。

本論文では、バクテリアの機能と酸化鉄を組み合わせたシステムを開発し、環境問題解決への応用を検討した。バクテリアによる鉄の溶出メカニズムの解明について、特にバクテリアの吸着に着目して検討を行った。また、より積極的な酸化鉄への吸着が可能なバクテリアの作製を行った。

本学位論文は全 5 章から構成される。

第 1 章は序論であり、研究の背景と目的を示した。

第 2 章では、バクテリア共存下での鉄の溶出メカニズムについて議論した。沿岸域の海水中で 6 ヶ月間使用した鉄肥料中から、鉄の溶出に関与すると考えられるバクテリアを単離し、16S rRNA に基づく分子系統解析により *Exiguobacterium oxidotolerans* と同定された。このバクテリアをヘマタイト共存下で培養することにより、鉄の溶出が確認された。この培養により、培地の ORP は 0 mV から -400 mV に変化したことから、還元溶出により Fe が溶出したと考えられる。鉄の溶出は、有機物のモデルとして系に添加した Anthraquinone-2,7-disulfonate (AQDS) に大きく影響され、*E. oxidotolerans* とヘマタイトのみの系での鉄の溶出は 22.3 mg/L であるのに対し、AQDS を添加した計では 38 mg/L の鉄の溶出が見られた。また、AQDS の添加系では比較的高い濃度の有機酸（シュウ酸）の生成が見られた。バクテリアとともに 30 日間培養したヘマタイトの表面を FE-SEM, XPS, ATR-FTIR により解析を行い、鉄の溶出およびバクテリアの付着による表面特性の変化を確認した。以上より、*E. oxidotolerans* は海水条件下でヘマタイトから鉄を還元溶出することが

示された。AQDS はバクテリアとヘマタイト粒子の間の電子アクセプター/ドナーとして機能し、鉄の溶出を促進していることが示唆された。

第3章では、鉄の溶出における主要なファクターを見出すため、バクテリア細胞とヘマタイト表面での相互作用を調査した。鉄溶出メカニズムを解明するため、次の4つの反応系での鉄溶出を検討した。1つ目は、バクテリアとヘマタイトが直接接触する通常の反応系である。2つ目は、バクテリア細胞とヘマタイト粒子を透析膜で隔離し、有機酸などの代謝物は透過するものの、細胞と粒子が直接接触しない系である。3つ目は、バクテリアは添加せずに、バクテリアが代謝により生産することが分かっている有機酸をヘマタイトに添加した系である。4つ目はネガティブコントロールで、ヘマタイト粒子のみの系である。これら4つの系の中で、バクテリアとヘマタイトが直接接触する系のみで十分な量の鉄の溶出が確認された。ヘマタイト粒子の分散状態や表面状態が大きく変化していることが確認された。これらの実験から、バクテリア細胞がヘマタイト粒子に直接接触することにより、細胞膜から電子がヘマタイト粒子に移動し、それにより鉄が還元溶出したことが推察された。

第4章では、ヘマタイト表面へのバクテリア細胞の吸着能力を遺伝子工学的手法により調査した。第3章において、バクテリアとヘマタイトの直接接触が鉄の溶出に重要であることが示されたが、より効率的な吸着が可能となれば鉄溶出量が増大すると考えられる。そこで、ヘマタイトに積極的に吸着することが可能なバクテリアの作製を行った。ここで、ヘマタイトに強く結合することが知られている2種類の鉄結合ペプチド (IBP1, IBP2) を用いた。モデルバクテリアとして大腸菌 *Escherichia coli* を用い、*E. coli* の細胞外膜タンパク質 (OmpA) の細胞外突出部位に鉄結合ペプチド (iron binding peptide) を導入した。このようにして作製した IBP1 あるいは IBP2 を細胞表層に提示した *E. coli* を用いてヘマタイトへの吸着実験を行い、LIVE/DEAD 染色後に蛍光顕微鏡観察によりバクテリアの吸着を評価した。その結果、IBP2 を細胞表層提示した *E. coli* はヘマタイト表面に強く吸着することが明らかとなった。また、pH7 付近では菌体の吸着が見られたが、pH8 以上の溶液では吸着しないことが示された。同様の手法により、銅、チタン、ジルコニウム、タングステンなど他の金属への吸着実験を行ったところ、IBP2 細胞表層提示 *E. coli* はヘマタイトにより強く吸着することが示された。

第5章は結論であり、本研究によって得られた成果をまとめている。

以上を要するに、筆者はヘマタイトからの鉄の溶出におけるバクテリアの影響について検討を行い、鉄の溶出と有機酸の生成に相関関係が見られたこと、およびバクテリア細胞とヘマタイト粒子の直接接触が鉄の溶出に重要であることを明らかにした。さらに、遺伝子工学的手法によりヘマタイトに強く吸着するバクテリアの作製に成功した。これらは、金属と微生物の相互作用に関する重要な知見であり、資源環境工学の発展に貢献するところ大なるものがある。よって筆者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格があるものと認める。