

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6324161号
(P6324161)

(45) 発行日 平成30年5月16日 (2018. 5. 16)

(24) 登録日 平成30年4月20日 (2018. 4. 20)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 N 1/20 (2006. 01)	C 1 2 N 1/20 Z A B A
B O 9 C 1/10 (2006. 01)	C 1 2 N 1/20 D
C 1 2 R 1/01 (2006. 01)	C 1 2 N 1/20 F
	B O 9 C 1/10
	C 1 2 N 1/20 Z A B A
	請求項の数 3 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-69830 (P2014-69830)	(73) 特許権者	000000284
(22) 出願日	平成26年3月28日 (2014. 3. 28)		大阪瓦斯株式会社
(65) 公開番号	特開2015-188416 (P2015-188416A)		大阪府大阪市中央区平野町四丁目 1 番 2 号
(43) 公開日	平成27年11月2日 (2015. 11. 2)	(73) 特許権者	306022513
審査請求日	平成28年12月7日 (2016. 12. 7)		新日鉄住金エンジニアリング株式会社
微生物の受託番号	NPMD NITE P-01828		東京都品川区大崎一丁目 5 番 1 号
		(73) 特許権者	000236610
			株式会社不動テトラ
			東京都中央区日本橋小網町 7 番 2 号
		(74) 代理人	110001818
			特許業務法人 R & C
		(72) 発明者	山下 信彦
			大阪府大阪市中央区平野町四丁目 1 番 2 号
			大阪瓦斯株式会社内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規微生物および金属シアノ錯体分解方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

金属シアノ錯体分解能力を有する新規微生物ロドコッカス・キングシェンギ H-3 株（
受託番号 N I T E P-01828）。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の新規微生物を好気性環境下で金属シアノ錯体を含有する土壤に適用して前記金属シアノ錯体を分解する金属シアノ錯体の分解方法。

【請求項 3】

前記金属シアノ錯体が鉄シアノ錯体である請求項 2 に記載の金属シアノ錯体の分解方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規微生物および金属シアノ錯体分解方法に関する。

【背景技術】

【0002】

シアン化合物は、炭素と窒素からなる無機物質であり、土壤汚染対策法（以下、土対法という）においては重金属類として第二種特定有害物質に分類されている。シアン化合物には、シアン化物と金属シアノ錯体と称される化合物群がある。前記シアン化物は、「遊離シアン」とも呼ばれているもので、一般式 $A_n(CN)_x$ で表され、A には水素 (H)

、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、アンモニウム (NH₄)、カルシウム (Ca) などがあり、シアン化合物の中で最も毒性の高い形態である。また、前記金属シアノ錯体は、シアン化水素の金属塩と金属とが過剰のシアン化物イオン (CN⁻) と化合したもので、一般式 $A_n [M (CN)_x]$ で表される。ここで、Mには銀 (Ag)、金 (Au)、カドミウム (Cd)、コバルト (Co)、銅 (Cu)、鉄 (Fe)、ニッケル (Ni)、亜鉛 (Zn) などの金属が該当し、溶液中に溶存、あるいは懸濁状で存在している。

【0003】

前記シアン化合物は、産業排水等に含まれていることがあり、浄化処理で取り除かれるべき性質の物質である。シアン化合物を排出する工場としては、メッキ工場、選鉱精錬所、鉄鋼熱処理工場、コークス製造工場等がある。これら工場では、シアン化合物を銅、亜鉛、ニッケル、金等の建浴過程や、製品製造過程でシアン化合物が副生されるため、工場内にシアン排水処理設備を設置している。「平成20年度土壌汚染対策法の施行状況および土壌汚染調査・対策事例等に関する調査結果：平成22年2月：環境省」（以下、「土対法事例結果」という）によれば、シアン化合物による土壌環境基準超過の業種区分は、金属製品製造業、ガス業、化学工業の順となっている。日本では、中小規模のメッキ工場が多く、全国で約2,000社以上存在する。その多くは戦後の高度経済成長期に都市部周辺に建設されており、操業時のシアン化合物の漏出や設備の経年劣化によるメッキ浴槽や配管からの漏えいにより、潜在的に調査結果以上の工場敷地内で土壌がシアン化合物によって汚染されていることが予想される。

【0004】

溶液（排水）中でのシアン化合物の存在形態に関しては、排水処理分野で多くの研究が行なわれており、その形態は大部分が前記遊離シアンと前記金属シアノ錯体であることが報告されている。これらのシアン化合物を含有する排水の処理方法としては、アルカリ塩素法、オゾン酸化法、電解酸化法、紺青法（難溶性錯化合物沈殿法）、酸分解燃焼法、煮詰法（煮詰高温燃焼法）、湿式加熱分解法、および、吸着法などが知られている。しかし、これらの処理方法においては、安定性の高い金属シアノ錯体、たとえば鉄、コバルト、銀、金のシアノ錯体については適用されなかったり、反応条件が過酷で大規模な設備が必要であったり、生成物の処理がさらに必要であったりするという問題があった。そこで、生物機能を利用して環境を修復する技術、所謂、バイオレメディエーション (bioremediation) が注目されており、前記シアン化合物分解能力を有する微生物の検

【0005】

現在、シアン化カリウム、シアン化ナトリウムなどの前記遊離シアンの微生物分解に関しては、遊離シアン分解菌として *Pseudomonas putida*、*Pseudomonas* sp.、*Acinetobacter* sp.、*Fusarium* sp.、*Klebsiella* sp. などの微生物が単離、同定されたという報告がある。

【0006】

そして、前記金属シアノ錯体に関しては、ニッケルシアノ錯体 ($[K_2Ni(CN)_4]$) を分解する金属シアノ錯体分解微生物として、*Fusarium solani*、*Trichoderma polysporum* が報告されている。また、鉄シアノ錯体であるフェロシアン化カリウム ($[K_4Fe(CN)_6]$) の分解菌としては、*Fusarium oxysporum*、*Scytalidium thermophilum*、*Penicillium miczynski* が報告されている（いずれも非特許文献1）。また、本願出願人においても、鉄シアノ錯体を分解する種々の金属シアノ錯体分解微生物を単離、同定している（たとえば特許文献1、2等、本願出願人以外の同定例として特許文献3等）。

【0007】

しかし、前記鉄シアノ錯体を分解する場合に、上記金属シアノ錯体分解微生物は、いずれも好気性条件下で働くものであるため、その金属シアノ錯体分解微生物の施用形態が限られ、ほとんど酸素供給のない土壌中で鉄シアノ錯体を分解することができないなど、実

際に用いるうえで、技術的に種々の問題を抱えているため、実用化には至っていない。なお、前記特許文献3に記載されている金属シアノ錯体分解微生物は、嫌気条件下で鉄シアノ錯体を分解する可能性のあるものであるが、分解菌の*Klebsiella pneumoniae* はBSL2の病原菌であり、原位置処理法のオーグメンテーション法による嫌気性条件における鉄シアノ錯体分解処理には適さず、やはり、技術的に種々の問題を抱えているため、実用化には至っていない。

【0008】

また、上述のような事情を鑑みれば、鉄シアノ錯体の浄化は土壌中、特に飽和層まで達した汚染土壌に対して適用されることが望まれる。

汚染土壌の処理の実態としては、土地所有者の心理的要因や、不動産取引における経済的側面を考慮して、完全浄化を目的とした掘削除去を選択することが多い。特に重金属類は、鉛やカドミウム等のようにそれ以上の分解は不可能であり、掘削除去による対策費用は5万円/m³以上の高コストであるにも関わらず、第二種特定有害物質の超過事例の83%で掘削除去が採用されている（「土対法事例結果」による）。掘削除去の比率が、83%と非常に高いのは、原位置浄化技術が確立されていないことも大きな理由である。特に、シアノ化合物については、原位置浄化技術が適用できる範囲が限られている。不溶化処理は、長期的なモニタリングを必要とし、開発の際には土地造成が制限される。薬剤添加処理（フェントン法）やオゾン注入処理は、安定なフェロシアン（鉄とシアンの錯体）には適用できないなど、一部の金属シアノ錯体化合物に限られる。掘削除去の場合は、別途掘削土壌の無害化処理が必要であり、セメント原料化を代表とする熱処理や、化学処理である不溶化処理、薬剤添加処理、オゾン分解処理、物理処理である分級洗浄処理がある。前述のように、金属シアノ錯体は分解が容易でなく、熱処理が採用されることが多い。また、その熱処理についても、セメント原料化の場合での受入基準は厳しいものとなっており、専用の熱処理施設に処理を委ねるしか手段がない。したがって、金属シアノ錯体の処理費は、通常重金属処理費に比べても高価なものになっており、より低コストな処理方法として原位置浄化技術の適用が求められている。

【0009】

特許文献4には、弱アルカリ性の生育条件下で、鉄シアノ錯体分解能力を有する嫌気性鉄シアノ錯体分解微生物について記載されているが、これらは病原菌または日和見菌であり、開放系の土壌浄化には適さない問題があった。

【0010】

現状のシアノ化合物汚染土壌のバイオレメディエーションは、栄養剤、溶存酸素水および空気を土壌中に注入して微生物活性を促す「注入工法」が行なわれている。しかし、「注入工法」適用には条件があり、汚染サイトが、

<1>比較的分解の容易な遊離シアンや銅シアノ錯体の汚染土壌である、なおかつ、
<2>注入工法に適した地層条件（透水性が良く、注入物質の移動が容易に行なわれる飽和層）

といった場合において浄化を確認した実証研究段階にとどまっている。

シアノ化合物はその形態が多岐にわたり、特に鉄シアノ錯体は非常に安定な物質である。製鉄業やガス事業で問題になっている石炭ガス由来のシアノ化合物汚染土壌に含まれるシアノ化合物は、ほとんどが鉄シアノ錯体であることが知られている。また、メッキ工場でのシアノ汚染土壌は、メッキ浴に使用した重金属による銅シアノ錯体であるが、土壌中には鉄が多く含まれるため、地中に浸透拡散したシアノ化合物は鉄シアノ錯体としても存在しており、環境基準達成のためには難分解な鉄シアノ錯体の分解が必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】特開2000-270847号公報

【特許文献2】特開2003-275791号公報

【特許文献3】特開2006-281053号公報

10

20

30

40

50

【特許文献4】特開2001-269166号公報

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Knowles C. J. et. al, Enzyme and Microbial Technology 22:223-231, (1998)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

また、このような地中に浸透拡散したシアン化合物を分解除去するために、本発明者らは、新規微生物クロストリジウムクロモレダクタンズ (*Clostridium chromoreductans*) ER-CL-1株(寄託番号NITE P-1434)が有用に用いられることを見出している。

10

【0014】

しかし、上記微生物は嫌気性において鉄シアノ錯体を分解する性質を有しており、実際の土壌に対して上記微生物を適用するためには、環境を嫌気性に維持するための工夫が別途必要になるため、現実的には取り扱いが困難になる傾向があり、鉄シアノ錯体を分解する性質を有し、かつ、取り扱い容易な微生物が求められていた。

【0015】

そこで、本発明の目的は、上記実情に鑑み、新規微生物ロドコッカス・キングシェンギ (*Rhodococcus qingshengii*) H-3株(受託番号 NITE P-01828)(以下新規ロドコッカスH-3株等と称する)および鉄シアノ錯体を含みうる廃水、土壌等から有効に金属シアノ錯体を分解除去できる金属シアノ錯体分解方法を提供することにある。

20

【課題を解決するための手段】

【0016】

〔構成1〕

上記目的を解決するために本発明は、金属シアノ錯体分解能力を有する新規微生物ロドコッカス・キングシェンギH-3株(受託番号 NITE P-01828)を提供するものである。

【0017】

30

〔作用効果1〕

本発明者らは、フェロシアンを唯一の窒素源、グルコースを炭素源として、一般土壌またはシアン汚染土壌を分離源として中性領域のpHで好氣的に集積培養を行い、フェロシアンを好氣的に分解する好気性フェロシアン分解コンソーシアムを得た。

得られた好気性フェロシアン分解コンソーシアムを通常の栄養寒天培地上に展開して得られるコロニーについて、フェロシアンを窒素源とする液体培養を行うことで、フェロシアンを分解して増殖する株を得た。この株を解析した結果、16S rDNA塩基配列解析および形態観察、生理・生化学試験の結果から、carbendazim分解菌として報告のある*Rhodococcus qingshengii* (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2007), 57, 2754-2757)と極めて高い相同性があることがわかり、*Rhodococcus qingshengii*には、フェロシアン分解活性は知られていないため、新規な性質を有する菌株であることが推定されるものであった。また、この菌株はBSL-1のレベルであり、安全に汚染土壌の浄化プログラムに使用できる。

40

【0018】

〔構成2〕

また、本発明の金属シアノ錯体の分解方法の特徴構成は、新規ロドコッカスH-3株を好気性環境下で金属シアノ錯体を含有する土壌に適用して前記金属シアノ錯体を分解する点にある。

50

【0019】

新規ロドコッカスH-3株は、好気性環境下で鉄シアノ錯体を分解する能力を有するので、好気性環境下で金属シアノ錯体を含有する土壤に適用することによって前記金属シアノ錯体を分解することができ、土壤を浄化して無害化できる。ここで、新規ロドコッカスH-3株は、好気性菌であるから、菌や栄養源の供給路となる部分や土壤自体を嫌気性環境下に維持する必要はなく、取り扱い性よく土壤に適用することができる。

【0020】

〔構成3〕

尚、前記金属シアノ錯体が鉄シアノ錯体であってもよい。

【0021】

新規ロドコッカスH-3株は、鉄シアノ錯体を分解することができるから、土壤中で鉄シアノ錯体として安定化した金属シアノ錯体であっても分解浄化できるものと期待できる。

【発明の効果】

【0022】

したがって、本発明によると、難分解性の鉄シアノ錯体を含有するシアン錯体廃液や、シアン化合物汚染土壤であっても好適に浄化することができるようになった。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】(syn+0.1 mMフェロ)培地におけるH-3株培養結果を示すグラフ

【図2】(CN1+2+0.1 mMフェロ)培地におけるH-3株培養結果を示すグラフ

【図3】(CN1+2+1 mMニッケル)培地におけるH-3株培養結果を示すグラフ

【発明を実施するための形態】

【0024】

発明者らは、以下のようにして、フェロシアンを唯一の窒素源、グルコースを炭素源として、一般土壤またはシアン汚染土壤を分離源として中性領域のpHで好氣的に集積培養を行い、フェロシアンを好氣的に分解する好気性フェロシアン分解コンソーシアムを得た。得られた好気性フェロシアン分解コンソーシアムを通常の栄養寒天培地上に展開して得られるコロニーについて、フェロシアンを窒素源とする液体培養を行うことで、フェロシアンを分解して増殖する株を得た。以下に新規ロドコッカスH-3株のスクリーニング方法について具体的に示す。

【0025】

<実験方法>

森林、水田等から選ばれる9か所の土壤から下記手順にて金属シアノ錯体分解微生物の集積培養を行った。

【0026】

(1)採取した土壤各1gをそれぞれ別のバイアルビンに入れ、(syn+1 mMフェロ)培地を50 mL加える。

(2)30℃で振とう培養1週間

(3)培養液0.5 mLを新しい培地50 mLに加え室温で培養1週間

(4)培養液0.5 mLを新しい培地50 mLに加え室温で培養1週間

(5)培養液をSTD寒天培地に広げ30℃で培養

(6)コロニー8個を下記(syn+1 mMフェロ)培地2 mLに植菌して培養

【0027】

(1)～(6)の工程を行い、増殖の見られた菌株を単離した(以下H-3株とする)。

【0028】

基本合成(syn)培地

Na₂HPO₄・・・0.1%

KH₂PO₄・・・0.05%

NaCl . . . 0.05 %
 MgSO₄ . . . 1 mM
 CaCl₂ . . . 0.1 mM
 グルコース . . . 10 mM
 微量元素溶液 . . . 1 / 1000 量
 pH 7.0

【0029】

(syn + 1 mM フェロ) 培地
 基本合成培地
 フェロシアン化カリ . . . 1 mM

10

【0030】

(syn + 0.1 mM フェロ) 培地
 基本合成培地
 フェロシアン化カリ . . . 0.1 mM

【0031】

(CN1 + 2) 培地
 CN1 . . . 2.5 g / L
 CN2 . . . 2.5 g / L

【0032】

(CN1 + 2 + 1 mM ニッケル) 培地
 CN1 + 2 培地
 K₂ [Ni (CN)₄] . . . 1 mM

20

【0033】

STD 寒天培地
 カゼイン ペプトン . . . 5 g / L
 イースト抽出物 . . . 2.5 g / L
 グルコース . . . 1 g / L
 寒天 . . . 15 g / L
 pH 6.9 - 7.1

【0034】

30

得られた菌を、(1) (syn + 0.1 mM フェロ) 培地、(2) (CN1 + 2 + 0.1 mM フェロ) 培地で培養してフェロシアンの測定を行った。同時にシアノニッケル錯体の分解能をみるため (3) (CN1 + 2 + 1 mM ニッケル) 培地で培養してシアノニッケル錯体の測定を行った。

【0035】

その結果、培地の pH および金属シアン錯体の濃度は、図1～図3のようになった。

図1、図2 (b)、より H-3 菌株は、フェロシアン分解能もっており、図3 (b) より、ニッケルシアノ錯体についても分解能力を示すことが分かった。また、図2 (b)、図3 (b) H-3 株が中性の pH 領域でフェロシアン分解活性を示し、環境条件を維持した状態でシアン分解能を維持できることが分かった。なお、図1, 2 中シアン濃度とあるのは、培地中に存在するフェロシアノ錯体とフェリシアノ錯体の合計量に該当する。図3 中のシアン濃度はニッケルシアノ錯体濃度である。

40

【0036】

そこで、H-3 株に対し、16S rDNA 塩基配列解析および形態観察、生理・生化学試験を実施した。

【0037】

<ロドコッカス属微生物との相同性>

アポロンDB、BA9.0 に対する BLAST 相同性検索の結果、H-3 の 16S rDNA 塩基配列は *Rhodococcus* 属の 16S rDNA 塩基配列に対し高い相同性を示し、*Rhodococcus qingshengii* の dj1-6 株に対し

50

相同率 100%の最も高い相同性を示した。しかし、*Rhodococcus quingshengii*にはフェロシアン分解活性は知られていないため、フェロシアン分解能を有するH-3株が、dj1-6株に完全に一致するとは言い切れず、新規な性質を有する菌株であることが推定されるものであった。

【0038】

従って、単離した微生物は、16SrDNA解析の結果、*Rhodococcus*属に含まれ、*R. quingshengii*に帰属する新規な菌株であることが確認された。この新規微生物は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（NPM D）に、新規微生物ロドコッカス・キングシェンギH-3株（受託番号 N I T E P-01828）として寄託されている。

10

【0039】

この新規微生物の菌学的性質は、以下の通りである。

（以下の記載で、+は陽性、-は陰性、+wは弱い陽性を示す）

【0040】

細胞形態：桿菌、

グラム染色性：+、

胞子の有無：-、

運動性：-

【0041】

コロニー形態

20

色調：淡いピンク色、

形：円形、

隆起状態：レンズ状、

周縁：全縁、

表面の形状など：スムーズ、

透明度：不透明、

粘稠度：バター様

生育温度試験

37℃：-、45℃：-

【0042】

30

カタラーゼ反応：+、

オキシダーゼ反応：-、

グルコースからの酸/ガス産生：-/ー、

O/Fテスト：-/ー

硝酸塩還元：-、

ピラジニアミダーゼ：+、

ピロリドニルアリルアミダーゼ：-、

アルカリフォスファターゼ：+、

β-グルクロニダーゼ：-、

β-ガラクトシダーゼ：-、

40

α-グルコシダーゼ：+、

N-アセチル-β-グルコサミニダーゼ：-、

エスクリン：-、

ウレアーゼ：+、

ゼラチン加水分解：-、

ブドウ糖資化性：-、

リボース資化性：-、

キシロース資化性：-、

マンニトール資化性：-、

マルトース資化性：-、

50

ラクトース資化性：－、
 白糖資化性：－、
 グリコーゲン資化性：－、
 カタラーゼ：＋
 嫌気条件下での生育：－、
 5%NaClでの生育：＋

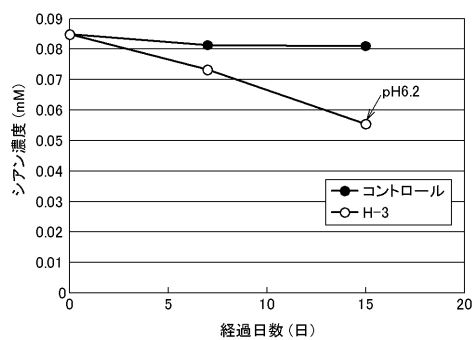
【産業上の利用可能性】

【0043】

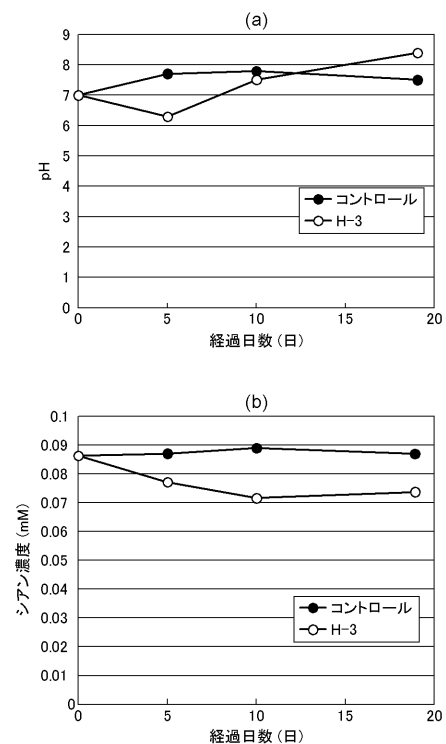
本発明の新規微生物および金属シアノ錯体分解方法は、シアノ化合物がプルシアンブルーやフェロシアンなど化学的に安定で難分解性の鉄シアノ錯体として存在している工場廃水や工場跡地のシアノ化合物汚染土壌の浄化に利用することができる。

10

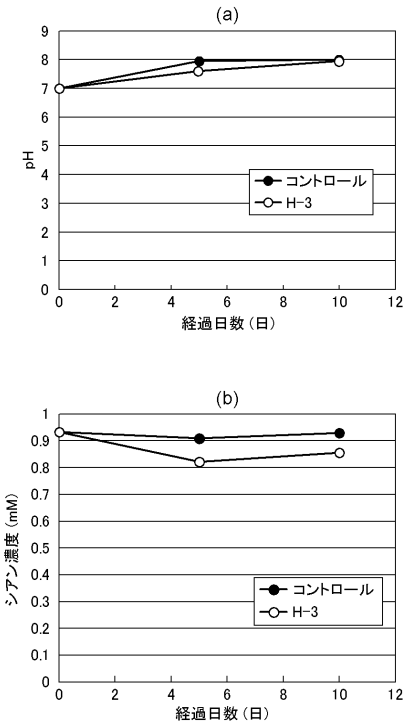
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 R 1:01

- (72)発明者 辻 拓也
大阪府大阪市中央区平野町四丁目1番2号 大阪瓦斯株式会社内
- (72)発明者 新村 知也
大阪府大阪市中央区平野町四丁目1番2号 大阪瓦斯株式会社内
- (72)発明者 福永 和久
東京都品川区大崎一丁目5番1号 大崎センタービル 新日鉄住金エンジニアリング株式会社内
- (72)発明者 今安 英一郎
東京都品川区大崎一丁目5番1号 大崎センタービル 新日鉄住金エンジニアリング株式会社内
- (72)発明者 野口 和宏
東京都品川区大崎一丁目5番1号 大崎センタービル 新日鉄住金エンジニアリング株式会社内
- (72)発明者 萩野 芳章
東京都中央区日本橋小網町7番2号 株式会社不動産テトラ内

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 特開2000-270847 (JP, A)
特開2000-270848 (JP, A)
特開2000-270849 (JP, A)
特開2000-270853 (JP, A)
特開2001-269166 (JP, A)
Biotechnol. Lett., 2011年, vol.33, no.9, pp.1809-1813

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1/00-1/38
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/
WPIDS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
PubMed