

微生物を用いた水溶液からの銅の除去 — 中学校の科学クラブの指導を通して —

鶴田猛彦*・松村健司**・下川恭徳***

論文要約

香川県高松市立一宮中学校から中学校の科学部でできる研究テーマで特に微生物を利用した金属の除去の領域の中で紹介して欲しいという依頼があり、微生物を用いた水溶液からの銅の除去を紹介した。1年間の中学生3名の研究で、EM菌、納豆菌、乳酸菌を利用して微生物量、pH、温度などの条件で検討を行った結果、pH 3.0において納豆菌、pH 5.5において、乳酸菌に最も高い除去能が認められた。本研究は、平成28年度日本学生科学賞入選3等を受賞した。研究指導は電子メールおよび電話を通して行ったが、香川県の発表会の前日に出張して発表指導を行った。

キーワード：中学校、EM菌、納豆菌、乳酸菌、日本学生科学賞

Removal of copper from the aqueous solution using microorganism through the coaching for the science club in the junior highschool

Takehiko Tsuruta*, Kenji Matsumura** and Yasunori Shimokawa***

ABSTRACT

The request for the scientific research theme which can be done by junior high school students was received in the field of my research from Ichinomiya junior high school, Takamatsu, Kagawa. The removal of copper from the aqueous solution using microorganism was selected for the research theme for three students within one year. Some factors was examined to affect for the copper removal, such as the amount of microorganism, pH, and temperature using EM bacteria, *Bacillus natto*, or Lactic acid bacteria. *Bacillus natto* at pH 3.0 and Lactic acid bacteria at pH 5. were removed the largest amount of copper from the aqueous solution. This research was selected third grade of Japan Students Science Awards.

Keywords: Junior high school, EM bacteria, , *Bacillus natto*, Lactic acid bacteria, JAPAN Students Science Awards

平成30年1月5日

* 八戸工業大学工学部バイオ環境工学科・教授

** 香川県高松市立一宮中学校・教諭（現在、さくら伏石保育園）

*** 香川県高松市立一宮中学校・校長

1. 緒 言

近年、大学における地域貢献が強く求められている。地域貢献には地域産業への貢献とともに、地域の高等学校への貢献も求められている。

筆者はこれまでに八戸北高校のSSH事業に協力し、平成22年度は、「スタンプ式の寒天培地を用いた微生物のカウント」について応談したほか、平成25年度には「柿渋を用いたストロンチウムの吸着・除去」¹⁾、26年度「ストロンチウムの効率的な除去」²⁾、27年度「柿渋を用いたストロンチウムの効率的な除去」³⁾など、研究提案および指導協力を行ってきた。

平成22年度は、先方発案の研究テーマについて助言を行った。平成25年から27年は、先方からの依頼に基づき研究テーマを提案し、方法についても助言したもののその後の実施については、高校の先生が化学専門であり、分光光度計が高校側に備わっており、SSH事業の補助金があるという比較的恵まれた条件での研究であったため、ほぼ先方のみでの進行が可能であった。

平成28年6月に北東北地域ではなく、四国の高松市立一宮中学校から、科学体験発表の研究テーマの提案が電話及び電子メールにより寄せられた。地域貢献は大事なことではあるが、遠方であっても、教育現場からの依頼は、本学が教育・研究機関である以上、大切なことであるという信念から話を聞いてみることにした。当初、中学校の中だけで考えられる研究テーマでは、他より抜きん出るとは難しい傾向にあるということで、当方に考え得る研究テーマを相談したいということであった。加えて中学校からの提案には、中学校で使える予算の範囲内であるという条件がついた。微生物を用いる場合には遠心分離か菌を濾過するための減圧用のポンプが必要になるので、手回しの遠心器と水流アスピレータを提案し、水流アスピレータで決着した。このようにして、実験が可能になりそうだということで、「微生物を用いた銅イオンの除去について研究指導を行うことにした。

なお、実験データについては、中学生が発表したものを引用した⁴⁾。

2. 実験装置および実験方法

2.1 実験装置

2.1.1 水流アスピレータ

実験後の水溶液と微生物を分離するための減圧状態を作るために安価なものを紹介した⁴⁾。実際には一体型のMS-1型を使用した。

2.1.2 吸引ろ過装置

実験後の水溶液と微生物を分離するための吸引ろ過装置としてADVANTEC KP475を使用した。

2.2 実験器具

2.2.1 メンブランフィルター

吸引濾過のフィルターとして0.2 μm のメンブランフィルター (ADVANTEC) を使用した。

2.2.2 pHペン

pHメータは高価なため、pHペンを溶液のpH調整用に使用した。

2.3 試薬

2.3.1 銅試薬

銅源として塩化銅を用い、水溶液にして使用した。

2.3.2 銅測定

高価な分析機器は使用できないため、銅測定用としてパックテスト VISCOCOLOR ECO を使用した。

2.3 微生物

2.3.1 *Bacillus natto*

市販の納豆を使用した。

2.3.2 EM菌

EM活性液を使用した。

2.3.3 乳酸菌

ヤクルト400を使用した。

2.4 実験方法

2.4.1 納豆の前処理

納豆に水20 mLを加え、混合後、懸濁液を駒込ピペットで採取した。

2.4.2 EM活性液の前処理

EM活性液140 mL、糖蜜40 mLに水320 mLを加え、3日間、日光に当てて発酵させた。

2.4.3 銅除去実験

基本的には塩化銅水溶液 (銅1.0 ppm, pH 5.0) 水溶液に26.0 $^{\circ}\text{C}$ で5分間で微生物含有水溶液1.0 mLと混合後、0.2 μm のメンブランフィルターで吸引濾過して微生物を濾過し、ろ液の銅濃度をパックテストで比色定量した。

上記実験条件の内、微生物含有液の体積、pH、温度のいずれかを微生物ごとに変化させて銅濃度に及ぼす影響を調べた。

3. 実験結果

3.1 納豆懸濁液を用いた銅除去

3.1.1 納豆懸濁液の体積の影響

納豆懸濁液の体積を 0.025 ~ 5.0 mL の範囲で変化させて、銅イオン濃度に及ぼす影響を検討した結果を図 1 に示した。図 1 から、0.025 mL では全く銅イオンの低下が認められないが、納豆懸濁液の増加とともに銅イオンの濃度は低下し、4 mL では完全に銅イオンを除去できることがわかった。

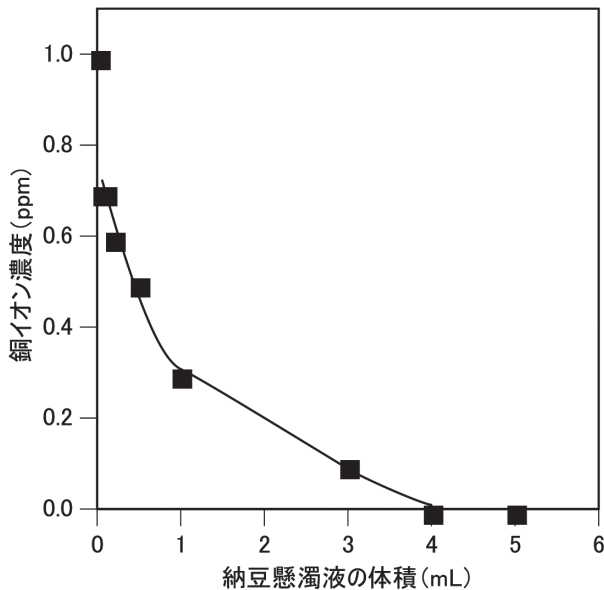


図 1 銅イオン濃度に及ぼす納豆懸濁液の体積の影響

3.1.2 溶液の pH の影響

納豆懸濁液を用いた銅イオン濃度に及ぼす溶液 pH の影響を調べ結果を図 2 に結果を示した。中学生の説明としては、pH3.5 ~ 5.0 の時濃度が 0.3ppm, pH 5.5 ~ 6.0 の時、0.5 ppm になり、pH 5.0 と 5.5 の間に境目が認められたということであった。

この実験の考察はこの実験データのみではかなり難しい。銅イオンと類似した正電荷を持つ金属イオンを微生物で処理する場合、低 pH 領域では菌体表面が正電荷を持ち、pH の上昇とともに菌体表面の電荷が低下し、等電点を超えると菌体表面が陰電荷を持つため、pH の上昇とともに溶液中の金属イオン濃度は低下する傾向がある⁵⁾。グラム陽性細菌の *Arthrobacter nicotianae* を使用したカドミウムの除去の場合⁵⁾、pH 1-5 の実験データであり、金属イオンの濃度低下が pH3.5 ~ 4.0 で急速に起こっており、この点はグラム陽性細菌で多く認めた共通点である。また、本研究で濃度上昇が認められた pH5.5 以上では検討していない。一方、放線菌の *Streptomyces levoris* を使用したウラン除去の場合、pH 2.00 ~ 2.25 で溶液濃度の急速な低下が認められ、pH3.5 ~ 6.0 でも低

下が認められるものの、その低下は僅かであることから本実験の pH3.5 ~ 5.0 ではほぼ一定濃度であった点と符合する⁶⁾。この点について検証するためには、さらに低い pH において pH の低下とともに濃度上昇が認められることを検証する必要がある。グラム陽性細菌の *A. nicotianae* を用いてウランの除去を pH3 ~ 8 で行った場合、pH 3 ~ 5 では、ウラン濃度の減少が認められたが、pH5 以上ではウラン濃度の若干の増加が認められた⁷⁾。このことは、溶液に含まれるウランのイオンの化学種の錯生成係数の計算値との比較から溶液中でウラニルイオンが水酸化物イオンとアニオン性の錯体を作るからであると考察している。本研究では、pH5.5 以上で銅イオンがアニオン性の錯体を作れば本データを説明できる根拠になりうる。以上、本実験よりも低い pH 領域で銅イオン濃度の上昇が認められ、pH5.5 以上でアニオン性錯体を形成すれば、本実験データを理論的に検証できると考えられる。

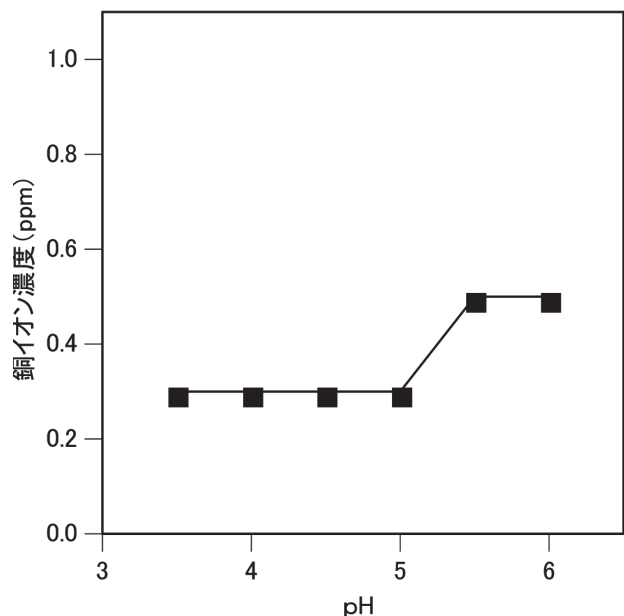


図 2 納豆懸濁液処理における銅イオン濃度に及ぼす pH の影響

以上の納豆菌を用いた銅イオン濃度に及ぼす pH の影響（低 pH 溶液も含めて）を中学生に説明したところ、全てを理解したわけではないと思われるが、以下のような理解をしたようであった⁴⁾。

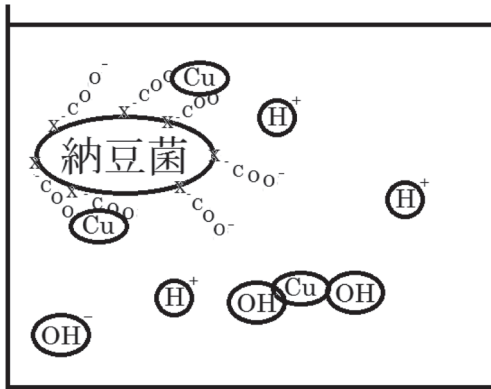
pH3.5 ~ 5.0 においては図 3 (A) に示したように銅イオンは納豆菌表面のカルボキシル基などに結合している。一方で若干は溶液中の水酸化物イオンとも結合している。pH5.5 以上では図 3 (B) に示したように、pH の上昇と共に水溶液中の水酸化物イオンが増え、水酸化物イオンが銅イオンと結合するため、相対的に納豆菌と結合できるものが減少する。一方、pH 3.0 以下では図 3(C) に示したように、水素イオンが菌体表面のカルボキシル

基などに結合するため銅イオンが納豆菌に結合できなくなる。この考察は pH 5.5 以上では納豆菌の実験結果を

反映しているが、pH5.0 以下では、後述する乳酸菌の結果をむしろ反映している。

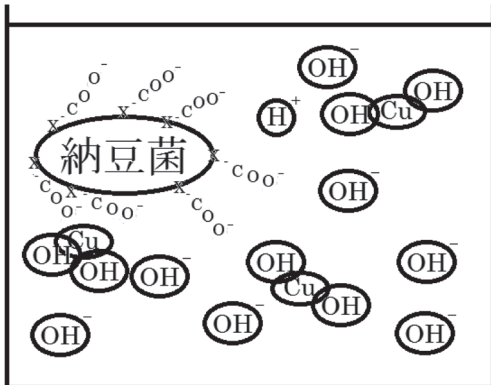
(A)

pH5.0



(B)

pH5.5 以上



(C)

pH3.0 以下

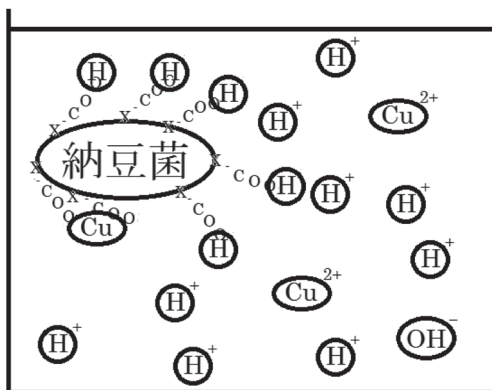


図3 納豆菌と銅イオン結合に及ぼす pH の影響の概念図⁴⁾

3.1.3 溶液の温度の影響

納豆菌を使用した銅イオン濃度に及ぼす温度の影響について検討し結果を図4に示した。30℃において、若干の濃度上昇が認められたが、この温度範囲で温度は銅イオン濃度にほとんど影響を与えなかった。藻類の *Chrorella regularis* を用いたウラン除去の場合もその除去量はほとんど温度の影響を受けないことが同様に報告されている⁸⁾。

3.2 EM 活性液を用いた銅除去

3.2.1 EM 活性液の体積の影響

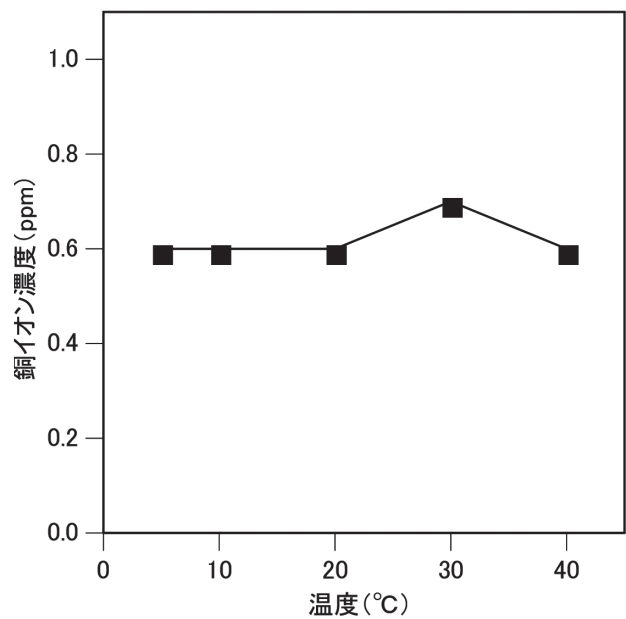


図4 納豆菌懸濁液処理における銅イオン濃度に及ぼす溶液温度の影響

EM 活性液の体積を 1.0 ~ 5.0 mL に変化させて銅除去に及ぼす EM 活性液の体積の影響を調べた。図5に示したように体積が 3.0 mL で濃度が 0.4 ppm であったが、他の体積では 0.5 ppm であった。本実験結果ではこの添加量の範囲では EM 活性液の体積は同イオン濃度にほとんど影響しないと考えられる。また、納豆菌に比較した場合銅イオン濃度低下能力は低いと判断される。

3.2.2 溶液の pH の影響

銅溶液の pH を 3.5 ~ 6.0 まで変化させて、銅除去に及ぼす pH の影響を調べた結果を図6に示した。本実験では、全 pH 範囲で同程度の銅イオン濃度になった。この結果を 3.1.2 と同様に考えると、本実験範囲より低い pH 領域で濃度の上昇が認められれば、本実験では濃度が低下して一定になったと判断できる。

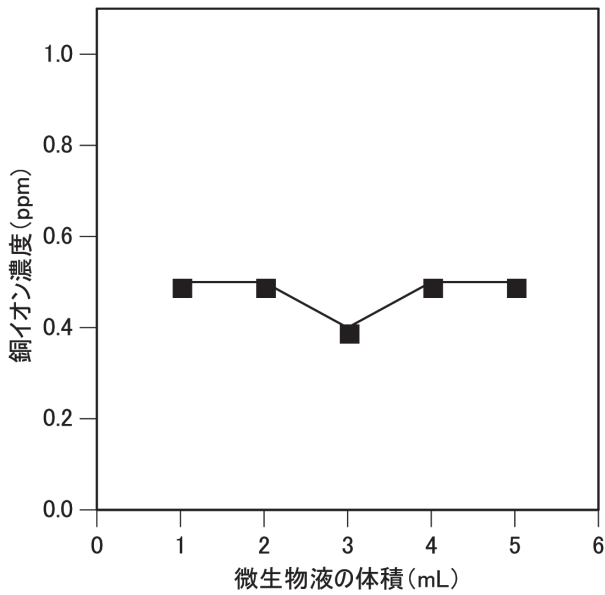


図5 EM 活性液処理における銅イオン濃度に及ぼす EM 活性液の体積の影響

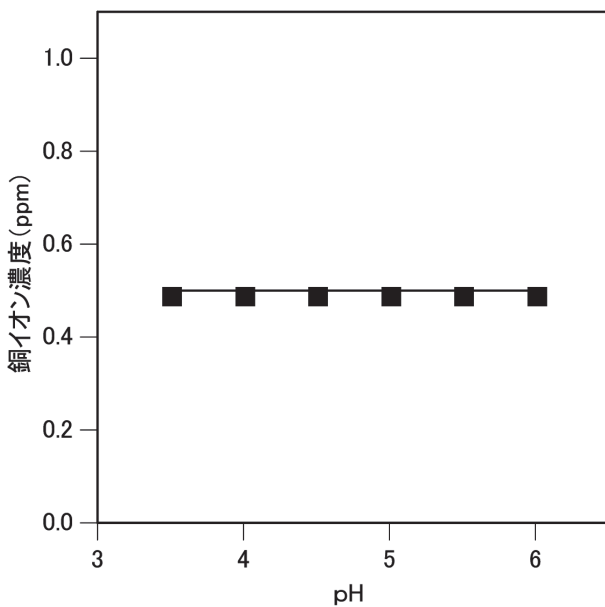


図6 EM 活性液処理における銅イオン濃度に及ぼす pH の影響

3.2.3 溶液の温度の影響

溶液の温度を 5 ~ 40℃ の範囲で変化させた場合の温度の影響について検討した結果を図 7 に示した。図 7 から、この温度領域で溶液の温度を変化させても EM 活性液を用いた銅イオンの除去後の濃度には影響がないことがわかった。

3.3 乳酸菌を用いた銅除去

3.3.1 乳酸菌の体積の影響

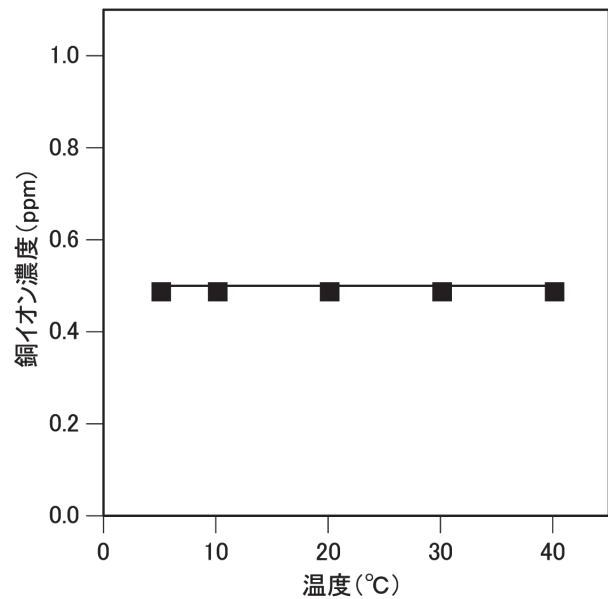


図7 EM 活性液を用いた銅イオン濃度に及ぼす溶液温度の影響

乳酸菌液の体積を 1.0 ~ 5.0 mL に変化させて銅除去に及ぼす乳酸菌液の体積の影響を調べた。図 8 に示したように体積が 1.0 mL で濃度が 0.4 ppm であったが、他の体積では 0.3 ppm であった。本実験結果ではこの添加量の範囲では EM 活性液よりは銅イオン低下の能力があるが、納豆懸濁液ほどではないことが判断された。

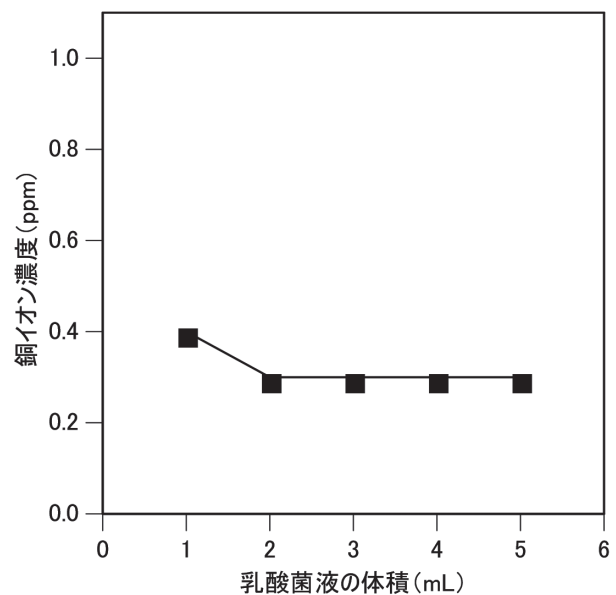


図8 乳酸菌液処理における銅イオン濃度に及ぼす乳酸菌液の体積の影響

3.3.2 溶液のpHの影響

銅溶液のpHを3.5～5.5まで変化させて、銅除去に及ぼすpHの影響を調べた結果を図9に示した。本実験では、pHの上昇とともに銅イオン濃度の低下が認められた。この結果は、本実験範囲内でpHの上昇、すなわち菌体の表面電荷の低下とともに、銅イオン濃度が低下するということで*A. nicotianae*を用いたカドミウム濃度の低下と一致した⁵⁾。また、pH5においては納豆懸濁液より溶液中の銅濃度が高かったが、pH 5.5では乳酸菌処理液の方が濃度が低いため、銅イオン除去に及ぼすpH依存性が微生物により異なり、pHによってより銅イオンを除去できる微生物が異なることがわかった。

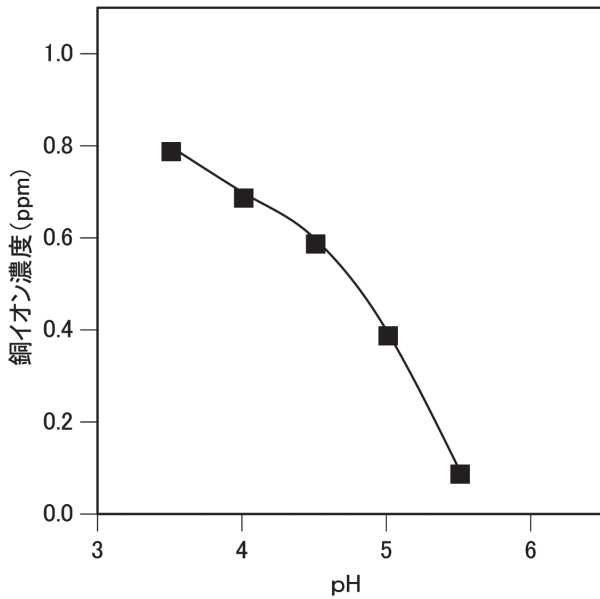


図9 乳酸菌液処理における銅イオン濃度に及ぼすpHの影響

3.3.3 溶液の温度の影響

溶液の温度を5～40℃の範囲で変化させた場合の温度の影響について検討した結果を図10に示した。図10から、乳酸菌液を用いて銅イオンを処理した場合、温度の上昇とともに銅イオン濃度が低下した。5℃では乳酸菌処理液の銅イオン濃度が最も高いが、40℃では最も低い。このことは、乳酸菌液と銅イオンの結合が吸熱反応であることを示している。同様に、放線菌の*S. viridochromogenes*の固定化菌体を用いたウランの除去においても吸熱反応であることが認められている⁹⁾。

この結果を縦軸に吸着反応の平衡定数の自然対数lnK横軸に絶対温度T(K)の対数を取ると図11がえられる。Van't Hoff プロットは、

$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R$$

(ΔH はエンタルピー変化、 ΔS はエントロピー変化、 R は気体定数)で表されるので、この直線の傾きと縦軸の切片から、エンタルピー変化は、33 kJ/mol、エントロピー変化は114 J/(K·mol)と算出される。

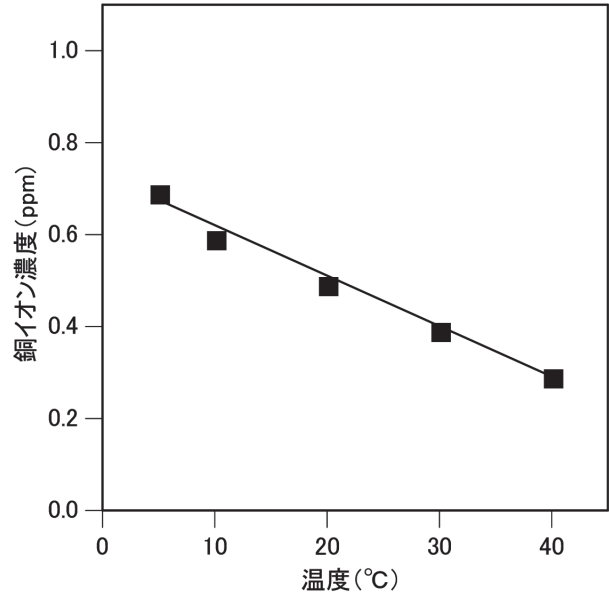


図10 乳酸菌液処理における銅イオン濃度に及ぼす溶液温度の影響

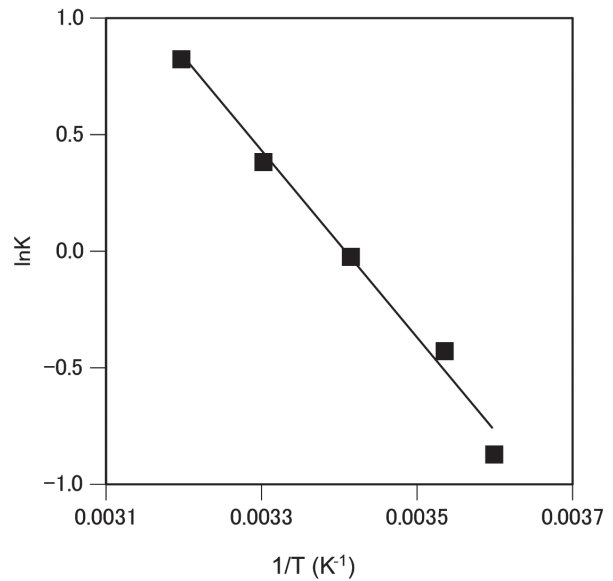


図11 乳酸菌液処理における銅イオン吸着平衡に及ぼす温度の影響に対するVan't Hoffプロット

3.4 3種類の微生物を用いた銅除去の整理

ここまでは、中学生の整理したデータをもとに3種類の微生物ごとにそれぞれ3種類の処理結果を述べてきたが、各処理ごとに3種類の微生物を同じ図にまとめて、各処理における微生物の違いを比較してみた。

3.4.1 微生物の体積の影響

各微生物の部分でも触れたが、図12に示したように、納豆菌懸濁液による処理では体積の増加とともに銅イオン濃度が低下し、4 mL以上の処理で完全な除去が可能

であった。乳酸菌液でも体積増加による銅イオンの低下が認められた。EM 活性菌では体積増加による影響が少なかった。

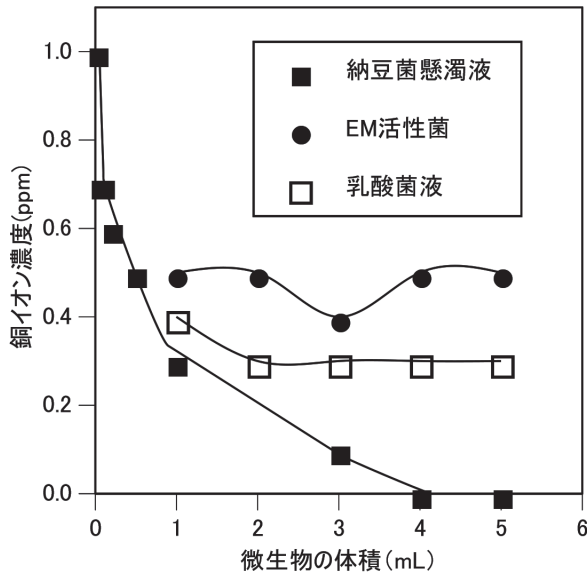


図 12 微生物処理における銅イオン濃度に及ぼす微生物液の体積の影響

3.4.2 溶液の pH の影響

乳酸菌液処理における銅イオン除去に及ぼす pH の影響は図 13 に示したように pH の上昇とともに銅イオン濃度が上昇しており、微生物の表面電荷の減少（陰電荷の増加）に伴って銅イオンとの結合が増加するため、銅イオン濃度が低下したと考えられる。EM 活性液では銅

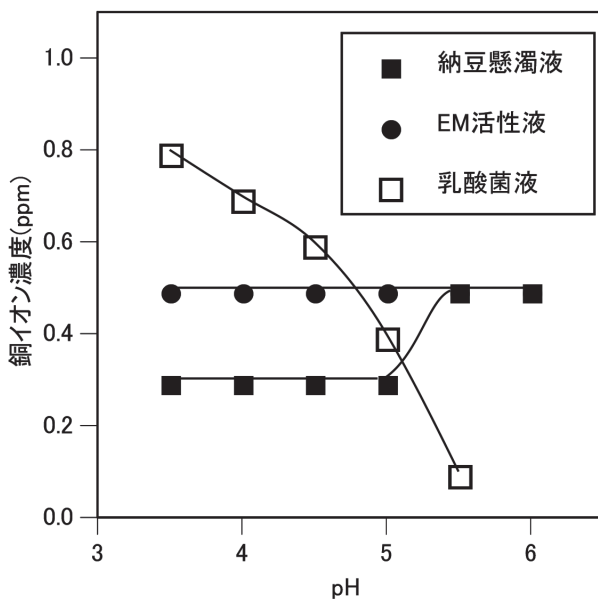


図 13 微生物処理における銅イオン濃度に及ぼす pH の影響

イオンの濃度は本実験条件の範囲で pH の影響をほとんど受けなかった。納豆懸濁液の場合も pH3.5 ~ 5.0 の範囲ではほとんど pH の影響を受けなかったが、pH5.5 以上では水酸化イオンとの競合により銅イオンと微生物の結合量が低下したため銅イオン濃度が増加したと思われる。これら 2 つの微生物の処理をさらに低 pH で行った場合は、銅イオン濃度の増加が認められるのではないかと考える。

3.4.2 溶液の温度の影響

乳酸菌液処理における銅イオン濃度に及ぼす温度の影響は図 14 に示したように、温度の上昇とともに銅イオン濃度が低下し、このことは、乳酸菌と銅イオンの結合が吸熱反応であることを示している。EM 活性液による処理ではほとんど温度の影響は認められなかった。納豆懸濁液でも温度の影響は小さかったが本実験は唯一納豆懸濁液の銅イオンが EM 活性液処理よりも高く、他の実験におけるデータと異なっているので、このあたりはデータの再検討が必要と考えられる。

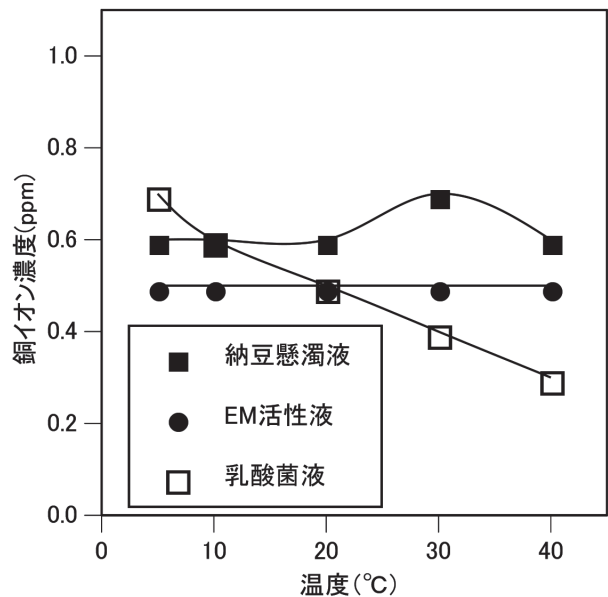


図 14 微生物処理における銅イオン濃度に及ぼす温度の影響

4. 結言

納豆懸濁液、EM 活性液、乳酸菌液の 3 種類の微生物を用いて微生物処理液の体積、溶液の pH、温度の 3 つの条件で中学生達が理科教員の指導のもと銅イオンの濃度に及ぼす影響を検討し研究を行った。これらの研究から、納豆処理液の体積を増加させることにより銅イオンを完全に除去することができたこと、pH 増加により乳酸菌液では pH5.5 で銅イオンを最もよく除去できること、乳酸菌処理では温度の上昇により銅イオンを低下さ

せることができ、この反応は吸熱反応でありそのエンタルピー変化は 33 kJ/mol、エントロピー変化は 113 (J/K·mol) であることなどが明らかになった。

これらの研究の過程で筆者は電子メールによる相談を行って研究をサポートしてきたが、香川県の科学研究発表会の前日に中学校を訪問し、生徒たちの発表練習に立ち会う機会を持つことができた。本研究は理科教員の指導のもとで行われていることはもちろんであるが、中学生の継続的な研究が基本にあり、そのような前提で、大学教員が協力するというのは、極めて有益に思われる。

本研究は香川県の科学研究発表会で優秀と認められ、さらに、日本学生科学賞入選3等を受賞した。本研究は平成29年度も継続され、活発な研究が続けられている。筆者も微力ながら電子メール等での相談等を行っており、次年度の結果は稿を改めて再度報告したい。

謝 辞

本来ならば実験を行なった中学生の名前を著者に加えたいと考えていたが、本稿では中学校の先生方と協議の上、割愛させていただいた。本実験を行ってきたのは高松市立一宮中学校パソコン・科学部生徒3名であり、彼らの真摯な継続的な努力に深謝申し上げます。

参考文献

- 1) 平成 22 年度指定スーパーサイエンスハイスクール研究開発実施報告書 第 4 年次、平成 26 年 3 月、青森県立八戸北高等学校、30、38、74 頁
- 2) 平成 22 年度指定スーパーサイエンスハイスクール研究開発実施報告書 第 5 年次、平成 27 年 3 月、青森県立八戸北高等学校、50、63、65、111 頁
- 3) [http://www.hachinohekita-h.asn.ed.jp/ssh/leaflet / ssh_leaflet.pdf](http://www.hachinohekita-h.asn.ed.jp/ssh/leaflet/ssh_leaflet.pdf)
- 4) 平成 28 年度香川県中学校生徒科学体験発表収録 10-1 - 10-9 (2016)
- 5) T. Tsuruta, D. Umenai, T. Hatano, T. Hirajima, K. Sasaki, Screening Micro-organisms for Cadmium Absorption from Aqueous Solution and Cadmium Absorption Properties of *Arthrobacter nicotianae*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 78, 1791-1796 (2014) .
- 6) T. Tsuruta, Adsorption of Uranium from Acidic Solution by Microbes and Effect of Thorium on Uranium Adsorption by *Streptomyces levoris*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 97, 275-277 (2004)
- 7) T. Tsuruta, Removal and Recovery of Uranyl Ion Using Various Microorganisms, Journal of Bioscience and Bioengineering, 94, 23-28 (2002).
- 8) T. Horikoshi, A. Nakajima, T. Sakaguchi, Uranium uptake by *Chlorella regularis*, Agric. Biol. Chem., 43, 617-623 (1979).
- 9) A. Nakajima, T. Horikoshi, T. Sakaguchi, Recovery of uranium by immobilized microorganisms, Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 16, 88-91 (1982).