

# 微生物機能を用いたレアメタル回収技術開発研究

平成 23 年度～平成 27 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業  
研究成果報告書

平成 28 年 5 月

学校法人名 学校法人芝浦工業大学

大学名 芝浦工業大学

研究組織名

芝浦工業大学 SIT 総合研究所

レアメタルバイオリサーチセンター

研究代表者 山下光雄

(芝浦工業大学工学部応用化学科)

## はしがき

人類の豊かな生活は、少なからず金属の利用に依存している。ヒトの金属の利用は、紀元前 5500 年頃のペルシャにおける銅精錬に遡るとされる。その後、青銅器、鉄器の時代を経て、現代では、“金属”という概念も、銅、鉄といった典型的な金属元素のみならず、ヒ素やアンチモンのような半金属元素（メタロイド）や、金属に類似した特性を持つセレン、テルルのような非金属元素（ノンメタル）にまで拡大してきており（“金属類”と総称する）、これまでは耳慣れなかった周期表上の金属類がさまざまな分野で用いられるようになってきた。例えば、レアメタル／レアアースは産業のビタミンと呼ばれるように、特に半導体、超電導、宇宙工学等の先端産業において不可欠なものとなっており、我々の日常活動における金属類への依存性はますます大きなものとなっている。

本研究の基盤となる“メタルバイオテクノロジー”は、これまで進化・発展してきた人類と金属類との関わりにおいて、新たな技術を与えるものである。私的には、メタルバイオテクノロジーを、「微生物、植物等による多様な金属代謝や、生体材料による金属の結合など多様な生物作用を探求して駆使し、人類と金属類の関わりを広範にサポートする技術」と定義している。これまで、金属類の採鉱、製錬や加工、利用から処理・処分までのライフサイクルに関する各工程において適用されてきた技術のほとんどは、物理・化学的プロセスによるものであったが、これを生物学（生物化学）的なプロセスに置き換えようとするものであり、既存技術において生じていた問題の解決や、全く新規な金属類の利活用技術の開発に寄与することが期待される。つまり、生物機能を用いたメタル回収技術開発を意図している。

従来の物理・化学的プロセスは、概して省資源・省エネルギー性や経済性が高いとはいえず、高温・高圧や強酸・強塩基等の激しい条件を用いることから環境適合型でもないという欠点がある。これに対して、生来このような欠点がない生物プロセスを用いるメタルバイオテクノロジーは、地球に優しいヒトと金属類との関わりを実現することができるという大きな魅力を持っている。特に、ターゲットとする金属類が低濃度・低含量で複雑な物質が混入しているような環境中や排水・廃棄物中での反応では、物理・化学的プロセスに比べて明確な利点を有しており、環境・資源関連分野での適用は有望であると考えられる。具体的には、金属類含有排水・廃棄物の処理・無害化、土壌等汚染環境の修復などの環境保全技術、および、排水・廃棄物や汚染環境中からの有価金属類の回収・リサイクル技術である。排水や廃棄物からの金属類の回収は、環境保全と資源回収・リサイクルの両立を可能とする。いわゆる一石二鳥の技術であり、極めて重要な課題である。メタルバイオテクノロジーにより、現状は物理・化学的プロセスで行われている金属類の製錬や加工を、環境に優しい生物プロセスで代替することができれば、持続産業の構築にも貢献することができる。

もうひとつのメタルバイオテクノロジーの魅力は、物理・化学的プロセスの研究・開発からでは、想像できないような新しい反応や材料を得ることのできる可能性を秘めているところにある。生物による金属類の代謝は意外にも多様であり、酸化・還元、水素化、アルキル化を含めた有機化などにより、金属類に多様な形態や特性を与える。日々新たな生物反応や酵素・遺伝子、微生物や植物が発見されて、さらに新しい金属類代謝反応の存在も明らかにされつつある。多岐に渡る生物反応を駆使すれば、既存の金属類の変換・加工や材料合成等の工業プロセスをこれまでにない斬新なものに考案できるかもしれない。

メタルバイオテクノロジーのさまざまな技術が開発・実用化されていくことで、今世紀の人類の最大の課題である環境劣化と資源枯渇という問題の一端が解決されることを大いに期待している。

## 目次

1. 研究成果の概要.....	1
(1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要.....	1
(2) 研究組織.....	1
(3) 研究施設・設備等.....	2
(4) 研究成果の概要.....	2
(5) 研究発表の状況.....	11
(6) その他の研究成果.....	16
(7) 選定時及び中間評価時に付された留意事項とそれへの対応.....	16
2. 研究成果の詳細.....	18
(1) 平成 23 年度.....	19
(2) 平成 24 年度.....	49
(3) 平成 25 年度.....	74
(4) 平成 26 年度.....	96
(5) 平成 27 年度.....	123
3. 総括.....	147
(1) 全体総括.....	147
(2) 他の金属・元素への展開.....	149
(3) おわりに.....	149
4. 謝辞.....	150

## 1. 研究成果の概要

### (1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

近年、IT 関連産業、自動車産業等の先端産業におけるレアメタルの消費が世界的に急伸しており、資源に乏しい我が国においては、技術力を基盤とした先端産業の国際競争力の高さが極めて重要となる。このような状況の中、資源ナショナリズム等によるレアメタル供給の不安定化は国の死活問題と言っても過言ではない。

本研究では、微生物の金属代謝機能を利用することで、現在では極めて困難とされている産業廃水・廃棄物などからのレアメタルの効率的除去と、市場価値のある資源としての鉱種の回収・リサイクルを同時に達成する実用的な一連の技術群を確立することを目的とする。技術開発は、既に有効な微生物を取得しているセレン (Se) を先行モデルとして実施するとともに、これまでに分離したレアアース元素 (REE) を特異的に代謝できる微生物を用い、REE を回収する技術を開発する事で、レアメタル回収プロセスの潜在的な市場拡大の知的基盤を構築する。

微生物とレアメタルに関する知見は、学術的に希少であり未開拓の分野である。特に金属代謝機能として水溶液中に溶けた金属を結晶にする生物固化 (Biominalization) や、水溶液中の金属を揮発化する生物気化 (Biovolatilization) を工学的に利用しようとした例は極めて少なく、ヒ素や水銀の底質や土壌からの除去に利用する事が提案されている程度である。レアメタルという価値の高い資源の回収に焦点を当てた研究については世界でも例を見ず、極めて新規な研究である。また固体の REE と微生物間の反応はこれまでに知見はなく、微生物反応による元素の相変化の解明は無機生物化学の研究分野では大変興味深いものである。将来的には、鉱物などの固体物質と微生物との関係性を明らかにしている一助になると考えられる。

本技術が完成すれば、多様な元素が混在しているために既存の物理化学技術では不可能とされていた排水・廃棄物からのレアメタル回収が可能となる。特に金属元素は相変化することしかできないので、固形物を気化物に生物変換すること (異なった濃縮方法の開発) により物理的な場所を占めないという利点が生じる。ひいては完全リサイクルシステムが確立されることとなり、真の循環利用システム構築につながるものといえる。商業性の高いレアアースの回収に有効な新規微生物の取得にも取り組み、各種レアメタルをめぐる資源循環型社会システムの基盤を形成するとともに、レアメタル回収プロセスの潜在的市場拡大の知的基盤を構築することを最終的な目的とする。

### (2) 研究組織

本研究プロジェクトに参加する研究者総数は5名で、学内研究者は以下の3名である。氏名、所属職名、役割分担を順に記載する。

山下光雄：芝浦工業大学工学部応用化学科・教授、研究代表者として各研究者と密に連携をとり、プロジェクト全体のとりまとめを行う。

今林慎一郎：芝浦工業大学工学部応用化学科・教授、物理化学的手法によるレアメタルの回収・メタルバイオセンサーの開発を行う。

新井剛：芝浦工業大学工学部材料科学科・准教授、バイオレアメタル精錬開発を行う。

学内研究者間は不定期に研究打ち合わせを行い、レアメタルの定量定性分析は以下の研究施設で行い、連携をとっている。

学外研究者は以下の2名である。

池道彦：大阪大学大学院工学研究科・教授、金属代謝微生物の作用メカニズムの解析を行う。

大貫敏彦：日本原子力研究開発機構先端基礎研究センター・上席研究主席、バイオレアメタルの分析を行う。

研究代表者と学外研究者は日本生物工学会メタルバイオテクノロジー研究部会員で大会毎に研究打ち合わせを行うと共に、電子メールで頻繁に情報交換を行っている。研究成果は代表者のホームページやメタルバイオテクノロジー研究部会に一部掲載している。毎年、数名の学部

生や大学院生をアルバイト雇用し、一般生物化学実験や元素分析の補佐、簡単な報告書の作成を手伝っている。

### (3) 研究施設・設備等

主として芝浦工業大学先端工学研究機構棟内レアメタルバイオリサーチセンター（実験室 100m<sup>2</sup>、居室 15m<sup>2</sup>）において、学生・研究員合わせて 6-8 名で研究している。レアメタルを代謝する微生物を分離するため、それらの反応を最適化するために、複数の振盪培養器と卓上型バイオリアクター（5L 容）を常時用いている。また実証研究を目指したスケールアップではバイオリアクター（100L 容）を用いている。微生物による反応サンプルの調整や遺伝子増幅のために、冷却小型遠心機や PCR 装置を常時用いている。微生物の形態観察とそれらが反応した元素を可視化分析するために、簡易型電子顕微鏡（SEM）とエネルギー分散 X 線分光装置（EDX）を常時用いている。微生物の動態を解析するために、微生物群集解析システムを使用している。微生物培養液の上清と沈殿物や固体サンプル中のレアメタル濃度を定性定量するために、誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）、誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-AES）やイオンクロマトグラフィーを常時用いている。微生物によるレアメタルの相変化（気体）を定性定量するために、ガスクロマト質量分析装置（GC-MS）を用いている。微生物によるレアメタルを含む廃水等から有価金属を回収後の培養液中の有機物濃度、無機物濃度を測定するために、COD メータや多項目水質計を用いている。

### (4) 研究成果の概要

本研究プロジェクトを推進するために大きく 3 つの研究テーマ、1. 廃水・廃棄物などからのレアメタル除去・回収バイオリアクターの開発、2. レアメタル含有バイオマスからの精錬プロセスの開発、3. 多様なレアメタル回収・資源化に適用できる新規金属代謝微生物の取得に分けて進めた。

#### 1. 廃水・廃棄物などからのレアメタル除去・回収バイオリアクターの開発

##### 1. 1 セレン

セレン（Se）は非鉄金属製錬所で銅の副産物として生産され、2012 年度世界総生産量の約 33% に当たる 650 トンが日本で生産されており、その生産量は世界第一位である。セレンは工業的に重要な金属資源で、コピー機やガラス染色、CIGS 型太陽電池の半導体原料などに利用されている。Se は必須元素であり、体内ではセレン含有アミノ酸に合成されるが、過剰に摂取すると急性毒性を起し頭痛や嘔吐などの症状が現れる。工場廃水に含まれているセレン酸化物イオンであるセレン酸や亜セレン酸は生物に対して高い毒性を有することから、日本では 2009 年に一律排出基準が設けられ、環境中に排出する際には 0.1ppm（0.1mg/L）以下まで浄化することが義務付けられている。非鉄金属製錬所やガラス製造工場、太陽電池製造工場、火力発電所ではセレンを含む廃水の排出基準を満たすために、廃水中のセレンは物理化学処理（電気・化学還元や凝集沈殿・吸着剤法）により浄化されている。このような処理では大量の薬剤を投入することや大量の汚泥が発生するために高コストとなるため新しい技術が望まれている。

##### 1. 2 セレンの除去・回収バイオリアクターの開発

現状のセレン排水処理技術の問題点を解決する新たな処理方法として、廃水中に存在するセレン酸化物イオンを微生物により還元し、固体セレンや気体セレンに変換し回収する方法を提案している。このようなコンセプトから分離・育種した微生物が、好氣的セレン酸塩還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株である。NT-I 株はセレン酸を亜セレン酸へ還元し、亜セレン酸から固体の元素態セレンへ還元することができる。NT-I 株の生成する元素態セレンは赤色を呈しているため、培養を続けると培養液が赤くなる。その後も培養を続けると赤色が薄くなる。元素態セレンを還元して気体セレンを生成する特異的な NT-I 株の固化能と気化能を、セレン回収に応用することを考えた。

この NT-I 株を用いて、廃水中からセレンを浄化・回収するためのプロセスを開発するために培養中の温度、pH、攪拌速度、通気量を制御できるラボスケールのバイオリアクターの設計・構築を試みた。バイオリアクターを用いて NT-I 株のセレン酸化物イオン(40ppm(0.5mM))の還元最適培養条件を求めた。その結果、還元最適培養条件を温度 38°C、pH9.0、攪拌速度 250rpm、通気量 1L/min と決定した。この培養条件でのセレン気化速度を計算したところ 14 $\mu$ mol/L $\cdot$ h であった。NT-I 株の気化速度は既存の報告値よりも速かった。以上のことからこの培養条件を NT-I 株のセレン気化回収方法とした。セレン酸濃度(0.5mM)の人工モデル(模擬)廃水を用いてセレン気化回収試験を行った。NT-I 株によって培養開始から 120 時間目には初期セレン濃度の 71.2%の DMDSe を硝酸で回収することができた。次に気化セレン化合物の同定と合成メカニズムの解析を行った。気化セレンはセレン酸、亜セレン酸、元素態セレンからほぼ同等の率で生成された。ガスクロマトグラフィー質量分析から気化セレンは主としてジメチルジセレニド(DMDSe)と極少量のジメチルセレンからなる、メチル化セレンであることが分かった。

気化回収条件で培養を行うと元素態セレンは速やかに DMDSe に還元される。NT-I 株は菌体増殖後には通気が無い状態でも、攪拌することによってセレン酸から元素態セレンまで還元できた。酸素が還元反応に重要な役割を果たしていることを明らかにした。以上の結果から、培養温度 38°C、pH9.0、攪拌速度 250rpm、通気量 1L/min の条件で培養して菌体を増殖させ、培養開始から 12 時間目に通気を止めた時点でセレン酸を添加し、元素態セレンに変換する方法をセレン固化回収方法とした。模擬廃水を用いたセレン固化回収実験では、培養開始から 22 時間目に元素態セレン量が最大となった。初期セレン濃度の 87.8%を元素態セレン(バイオセレン)として回収できた。

次に可溶性セレンを 5.5mM 含む実廃水セレン(セレン酸が約 85%、亜セレン酸が約 15%含有)からのセレン気化回収、固化回収実験を行った。セレン以外にもケイ素やカルシウム、カリウムが含まれていた。実廃水を培地で希釈して、模擬廃水のセレン濃度に合わせて回収試験を行った。

気化回収試験での各セレンの経時変化は、培養開始から 120 時間で初期セレン濃度の 38.9%にあたる DMDSe を硝酸にて回収できた。模擬廃水での回収率 71.2%と比べると、実廃水での回収率は約半分であり、培養液に未知セレンが 25.9%含まれていた。分析の結果、未知セレンは DMDSe であった。以上の結果から、実廃水時の気体回収率の低下の原因は DMDSe が可溶性セレンとして残存していることと考えられる。回収時に可溶性セレンに含まれる DMDSe が全て気体として硝酸で回収できたとする、気化回収率は初期セレン濃度の 64.8%(気体回収率 38.9%+可溶性セレンに含まれる DMDSe 含量 25.9%)となる。これはモデル廃水を用いた時と同等の回収率である。

実廃水を用いた固化回収試験のセレンは培養開始から 24 時間で初期セレン濃度の 78.8%を元素態セレンとなり、この時点で回収することに成功した。モデル廃水と比較すると回収率が若干低下したものの、実廃水を用いても高い回収率が得られた。

以上実廃水の実験をまとめると、セレン固化回収最適化条件と気化回収最適化条件で培養し各々 78.8%と 38.9%の回収率が得られた。

### 1. 3 レアメタルバイオセンサーの開発

セレン代謝微生物菌体または酵素を用いて簡易なバイオセンサーの開発を行った。セレン酸還元菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-1 懸濁液をグラスカーボン(GC)電極上に滴下、乾燥したあと、ポリカーボネート膜(孔径 0.4  $\mu$ m)で被覆して、電極と膜間に閉じ込め、MV<sup>2+</sup>をメディエーターとするセレンオキシアニオンセンサーを作製した。その結果、この電極の-0.75 Vにおける還元電流値は 0.1~1.0 mmol dm<sup>-3</sup>で亜セレン酸濃度に比例して増加し、亜セレン酸センサーとして使用できる可能性が分かった。ただし、現時点の感度は排水中に含まれる亜セレン酸の濃度領域は測定できるが、排出の許容限度 0.1 mg dm<sup>-3</sup>(1.3  $\mu$ mol dm<sup>-3</sup>)をカバーできなかった。100 倍程度の高感度化が必要である。次に、セレン酸を用いた-0.75 Vにおける

還元電流値は  $0.1\sim 1.0\text{ mmol dm}^{-3}$  でセレン酸濃度に比例して増加するが、電流値は亜セレン酸添加の 1/5 程度であり、感度がよくなかった。ストリッピング法（セレンオキサニオン中の Se と電極表面の金属からなる合金を形成させることで、溶液中の Se を電極表面に濃縮させた後、合金を還元的に脱離させるときの電流値から溶液中の亜セレン酸を決定すること）や、電極自体を多孔化して実表面積を増やすことによって高感度化できると思われる。

## 2. レアメタル含有バイオマスからの精錬プロセスの開発

### 2. 1 簡易精錬プロセスの検討

セレン酸濃度  $0.5\text{mM}$  の模擬廃水を用いてセレン気化回収試験を行った。高純度セレンの気化回収を目指してガスフィルターユニットとして気液分離槽と回収槽（硝酸トラップ）を構築した。セレン酸還元細菌 NT-I 株によって培養開始から 120 時間目には初期セレン濃度の 71.2% の  $\text{DMDSe}$  を硝酸で回収できた。硝酸による捕集効率を考慮するとセレンを 87.9% 捕集することに成功した。この硝酸中のセレン濃度を測定したところ  $7.2\text{mM}$  であり、模擬廃水中の初期セレン濃度よりも 14 倍濃縮して回収できた。検出した夾雑物は硫黄のみであり、高純度セレンの回収に成功した。

固化セレンを回収するために模擬廃水からの NT-I 株培養液を遠心分離し、沈殿物を得た。蒸留水とエタノール洗浄を行って元素態セレンを含む汚泥を簡単に濃縮できた。汚泥（バイオセレン）を粗精製した後、誘導結合プラズマ発光分光分析（ICP-AES）で元素の定量分析を行ったところ、粗精製物にはセレンが 2% (wt/wt)、マグネシウムが 4%、カルシウムが 2% 含まれていた。エネルギー分散型 X 線分析（EDX）の分析結果、粗精製物全体にセレンが検出・濃縮されており、粗精製物は平均 2% のセレンを含んでいた。模擬廃水の初期セレン濃度は  $0.004\%$  であるので、粗精製物は約 500 倍に濃縮され、資源化の可能性を示した。次にバイオセレンを蒸留水とエタノール洗浄を繰り返し、脱水を行った。その結果セレンを 11-14% (wt/wt) 含有したバイオセレンの精錬に成功した。

### 2. 2 酸化焙焼による精錬プロセスの開発

バイオセレンは元素態セレンと微生物由来の有機成分と培地由来の無機塩からなる。バイオセレンを酸化焙焼に供すると、有機成分とともに Se は酸化揮発し、低温部にて焙焼ガスから二酸化セレン ( $\text{SeO}_2$ ) を析出分離できると考えられる。酸化揮発傾向や焙焼生成物の水溶解性や還元性の相違から、無機成分の低減も期待できる。一方で、有機成分と Se は競合酸化し、Se の酸化が不十分な場合には不溶な元素態セレンが析出することが予想される。そこで、熱力学計算によってバイオセレンの焙焼条件を検討、試行した。その結果、バイオセレンを  $700^\circ\text{C}$  で酸化焙焼したところ、酸素量が大きい場合には Se は十分に酸化され、固体の  $\text{SeO}_2$  が得られた。本実験では、酸素  $50\text{ml/min}$  の流量で焙焼した際に、Se の総収量のうちの  $\text{SeO}_2$  としての収率が最大 97% となった。析出した  $\text{SeO}_2$  は金属成分の総和に対する Se 分率が約 99% であり、酸化焙焼による精製効果が認められた。より高純度のセレンを得るために還元剤を用いて精製したところ 99% 以上の金属セレンを得た。模擬廃水中から微生物代謝を利用し、バイオセレンから金属セレンを高純度にまで精錬することに成功した。

### 2. 3 セレン含有実廃棄物からのセレン浄化

セメント製造工程で発生する塩素バイパスダストは自然由来のセレンが含有し浄化対象となっており、高塩濃度のために大量の水で希釈した後に物理化学処理を行って浄化されている。そこで塩素バイパスダストからのセレンの新しい浄化回収を試みた。まず特定の溶出助剤を用いて水溶液中にセレンを溶出させ、溶出液の 4 倍希釈溶液を NT-I 株を用いて初期濃度の 90% のセレンを固化回収することに成功した。

### 2. 4 セレンオキサニオンの電解還元反応と元素態セレン回収

セレンオキサニオンの直接的な電極還元は、亜セレン酸については強酸性条件でのみで起こ

り、セレン酸については起こらないと報告されている。検討の結果、メチルビオロゲン ( $MV^{2+}$ ) をメディエーターとして用いると、中性 pH 領域においてセレンオキサニオンの還元が可能になることを電気化学手法によって見出した。

#### 2. 4. 1 セレンオキサニオン電気還元の見出し

メチルビオロゲン ( $MV^{2+}$ ) 添加によるセレンオキサニオンの還元が促進される反応機構について解析した。その結果、①  $MV^{2+}$  が電極から亜セレン酸に電子を運搬するメディエーターとして働いており、還元電流は  $[MV^{2+}] = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$  までは濃度とともに増加し、それ以上では飽和した。②  $MV^{2+}$  以外にも、ビオロゲン、キノン、フェナジン各化合物のなかにメディエーターとして機能する物質があり、式量電位が負であるメディエーターほど還元電流が大きい傾向があった。③ 電極表面にアルキル鎖を介して固定化した  $MV^{2+}$  もメディエーターとして機能することがわかった。固定化により排液毎に  $MV^{2+}$  を添加する必要がなくなるため、実用に適する。④ リン酸緩衝液 (PBS)、クエン酸緩衝液、イミダゾール/HCl 緩衝液、Tris/HCl 緩衝液、MES 緩衝液、PIPES 緩衝液は亜セレン酸還元に必要な  $H^+$  の供給源であると同時に、電解質の pH を亜セレン酸が活性型  $HSeO_3^-$  をとる領域に保持する働きをしている。従って、共役酸 HA である必要があり、緩衝液の  $pK_a$  が亜セレン酸の酸塩基平衡 ( $SeO_3^{2-} + H^+ \rightleftharpoons HSeO_3^-$ ) の  $pK_a$  より大きいことが必要である。⑤ COOH 基をもつイオン交換ビーズを緩衝液の代わりに使用できる。  $H^+$  供給により COOH 基は  $COO^-$  に変化するが、イオンビーズは COOH 基を再生後、利用可能である。⑥  $MV^{2+}$  添加によりセレン酸も還元可能になるが、反応促進は亜セレン酸還元よりも小さかった。酸化還元電位と亜セレン酸還元に対するメディエーター能力には相関がある。ビオロゲン化合物の疎水性の R 基を変換することによってより優れたメディエーター能を発揮する化合物を探した。その結果プロピオン酸を R 基にもつプロピオン酸ビオロゲンは COOH 基の影響を大きく受けることが分かった。

#### 2. 4. 2 元素態セレン回収方法の見出し

セレンオキサニオンのメディエーター型電解還元反応による元素態セレン回収の可能性を検討するために、電解試験を行った。  $[MV^{2+}] = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $[HSeO_3^-] = 10, 1.0, \text{ or } 0.1 \text{ mmol dm}^{-3}$  また  $[SeO_4^{2-}] = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$  を含む  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  PBS (pH6) を電解液とし、77mL を自家製セルに入れ、Ar で除酸素した。作用極：カーボンフェルト電極 (MV 還元ピーク電流からは見積もった表面積  $76.29 \text{ cm}^2$ )、対極：白金黒線、参照極：Ag|AgCl (飽和 KCl) を入れ、定電位  $-0.8 \text{ V vs. Ag|AgCl}$  で電解した。原子吸光測定と ICP 発光測定によってオキサニオン濃度を定量し、電解に使用した電気量と除去率から電流効率を決定した。その結果、① 亜セレン酸  $[HSeO_3^-] = 10, 1.0 \text{ mmol dm}^{-3}$  の時、除去率は 99% 以上、回収率は 95% 以上であり、除去した亜セレン酸が Se として回収されることがわかった。MV による亜セレン酸還元は電極近傍の電解液中で起こるため、生成した Se は電極表面に析出せず、電解液に懸濁した状態で得られ、ろ別が容易である。  $MV^{2+}$  を添加しない場合でも亜セレン酸の電解は可能であったが、2 倍以上の電解時間を要し、かつ生成した Se のほとんどが回収に適さない電極上に析出した状態で得られた。② セレン酸  $[SeO_4^{2-}] = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$  における除去率および回収率はそれぞれ 13%、10% と、亜セレン酸と比べて低かった。  $MV^{2+}$  による  $SeO_4^{2-}$  の還元効率が低いために電流が流れにくいことを示唆する。  $MV^{2+}$  を添加しない場合は、セレン酸はまったく還元されなかった。電気化学的にセレン酸が還元される例はほとんど報告がなく、今後電流効率の向上は課題である。③ 排水中の  $SO_4^{2-}$ 、 $NO_3^-$ 、 $NO_2^-$ 、 $CO_3^{2-}$  を妨害物質として調べた。  $SO_4^{2-}$ 、 $NO_3^-$ 、 $CO_3^{2-}$  については、亜セレン酸共存および非共存下とも、  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  までの濃度では  $MV^{2+}$  のレドックスを妨害しなかった。亜セレン酸電解還元の電流効率は  $NO_2^-$  を加えることで 93 % から 3 % 減少するに留まり、ほとんど妨害の影響がなかった。

#### 2. 5 イオン液体を用いたレアメタル精錬開発

微生物等を利用したバイオ分離技術は特定の金属イオンに対して選択性を示す菌体を用いて、バイオメタルとして目的の金属を分離・回収する技術である。しかし、バイオメタルは菌体由来の有機物が多く、菌体内の金属イオンを精錬する必要があり、一般的な製錬技術を適用することは難しい。分離を菌体で行うため、夾雑物質の可能性も否定できず、純度の低下が懸念さ



れる。これまで、バイオメタルから酸性水溶液への抽出の可能性及び新規の無機-有機複合型イオン交換体へのレアメタルの吸脱着特性の基礎性能を明らかにした。さらに高効率・高純度の精錬を目指して、イオン液体を用いたレアメタルの精錬技術開発を検討した。イオン液体には金属イオンの抽出能の他に高導電性、難燃性などの特長を有するので、新たな製錬技術が開発できる可能性があると思われる。以上のことから、イオン液体を用いたレアメタル製錬プロセスについて基礎研究を行った。

#### 2. 5. 1 イオン液体の合成と金属イオンの抽出率

イオン液体は一般に、カチオンとなる物質にアルキル基を導入するアルキル化反応と、目的物質を得るためのアニオン交換反応の2つの反応で構成される。本研究では1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムヘキサフルオロホスファート ( $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ ) を合成することにした。この  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$  に対する各金属イオンの抽出特性を調査するためバッチ式抽出試験を行った。その結果、Al(III)、Fe(III)は高い抽出分率を示した。特に、イオン交換樹脂等では殆ど吸着されない Al(III)が塩酸濃度によらず抽出されることは特筆すべき特徴である。Al(III)は塩酸濃度の増加に伴う抽出量の増大傾向が確認され、1 M 以上では90 %を超える抽出分率が示された。Cu(II)は何れの塩酸濃度においても非抽出であった。Zn(II)は塩酸濃度の増加に伴い抽出分率が増加したが、最大25 %であった。鉄族元素は塩酸濃度の増加に伴う抽出分率の増大が見られた。Co(II)、Ni(II)とも20 %前後の抽出分率であり、抽出に適していない。白金族元素の抽出傾向に関しては、Ru(III)は塩酸濃度によらずほぼ非抽出、Pd(II)とPt(IV)については塩酸濃度の増加に伴い抽出分率は低下し、負の相関を示した。0.1 M 塩酸においてPd(II)とPt(IV)の抽出分率は各々80%と90%であり良好な抽出性が得られた。希土類元素も塩酸濃度と抽出分率の間に正の相関が確認されたが、6 M 以上の塩酸では試験後に沈殿物の生成が確認された。この沈殿の影響により、抽出分率が100 %近い値になったと推察される。他の元素に関しては、V(III)、Ga(III)、Zr(IV)、In(III)は塩酸濃度と抽出分率に正の相関が得られた。Mo(VI)、Re(VII)は本実験の塩酸濃度では何れにおいても抽出された。Se(IV)はほぼ非抽出であることが示され、Bi(III)については最も抽出される1 M 塩酸においても20 %であり低抽出性であった。

#### 2. 5. 2 イオン液体に抽出された金属イオンの抽出速度

これまでに得られた抽出試験結果より、良好な抽出反応を示す Al(III)、V(III)、Fe(III)、Ga(III)、Zr(IV)、Mo(VI)、Pd(II)、In(III)、Re(VII)、Pt(IV)の抽出速度試験を行った。その結果、V(III)とIn(III)を除く8元素に関しては10分以内に抽出反応は平衡に達することが確認でき、良好な抽出速度であることが示された。これは抽出剤として用いる場合において有利な特徴であり、実プロセスにも適した性能であると考えられる。V(III)とIn(III)は抽出に最適な塩酸濃度が6 M であるため、 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ の溶解反応などにより平衡到達時間の推定は困難であった。V(III)やIn(III)をアニオン種とするイオン液体は、疎水性が弱いことが予想される。

#### 2. 5. 3 イオン液体に抽出された金属イオンの電気化学挙動

イオン液体の特長として、高導電性であることが挙げられる。この特長を活かし、金属イオンが抽出されたイオン液体を電解還元し、電析により直接金属として回収するプロセスの構築を目指している。本試験では、 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ に抽出された金属イオンの電気化学挙動についてサイクリックボルタンメトリー (CV) により検討した。その結果、 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ は幅広い2~-2Vの電位窓を持つことにより、イオン液体中における金属の価数変化や電析が期待できるものと考えた。また、全体を通してフラットな電流-電位曲線であり、不純物などの影響も僅かであることが示され、イオン液体中での金属の価数変化が良好に観測される可能性が示唆された。先述の試験結果から良好な結果が得られ、電析による直接回収の可能性のあるPd(II)のCVを行った。Pd(II)は0.1 M 塩酸において抽出した $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ をCVに用いた。その結果Pd(II)抽出後のCVは非可逆を示し、幾つかのピークが確認され、Pd(II)の還元波と考えられるピークが-0.5 V 付近に観察された。また酸化波が0 V 近傍に観察された。非可逆性を示していることから、CV測定中に析出物が生成されている可能性が示された。繰り返し試験の結果、CVに用いた $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ から黒色の析出物を確認した。これはパラジウムブラックの可能性が考えられ、電析試験によりPd(II)が回収される可能性が示唆された。

## 2. 5. 4 イオン液体に抽出された Pd(II)の電析挙動

電気化学試験より、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]に抽出された Pd(II)は、電解還元反応により直接回収できる可能性が示唆された。本試験では、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]に抽出された Pd(II)の電析挙動について検討した。電析試験中の外観写真から、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]中に黒色の電析物の生成が確認された。この黒色析出物の同定を行うため、蛍光 X 線と SEM-EDX による分析を行った。両分析装置とも溶液を測定することは困難であるため、メンブレンを用いてろ過、回収して分析に用いた。SEM 像より、電析物は微小な球状物質の集合体であることが示され、電析物は Pd 単体である可能性が示された。続いて電解還元法による[C<sub>n</sub>mim][PF<sub>6</sub>]に抽出された金属イオンの電析回収について詳細に検討した。[C<sub>n</sub>mim][PF<sub>6</sub>]に抽出された Pd(II)は、電解還元により数μm 径のワイヤー状を呈した電析物として回収できた。また、[C<sub>n</sub>mim][PF<sub>6</sub>]のアルキル側鎖長や希釈剤が Pd の電析物の形状に影響を及ぼすことが確認された。さらに、[C<sub>n</sub>mim][PF<sub>6</sub>]よりも電気化学特性に優れる 1-アルキル-3-メチルイミダゾリウムビス(トリフルオロメタンスルホニル)イミド ([C<sub>n</sub>mim][Tf<sub>2</sub>N]と略記)の金属イオンの抽出特性並びに電気化学特性について検討した。[C<sub>n</sub>mim][Tf<sub>2</sub>N]は[C<sub>n</sub>mim][PF<sub>6</sub>]と比較して金属イオンの抽出性能が低いこと、広い電気窓を有し電気化学的に優れることを明らかにした。

## 3. 多様なレアメタル回収・資源化に適用できる新規金属代謝微生物の取得と遺伝子の特定

### 3. 1 セレン酸代謝遺伝子の特定

好氣的セレン酸塩還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株はセレン酸を亜セレン酸と元素態セレンを介して、メチル化セレン (ジメチルジセレニド) に還元することができる。しかし各還元に関する遺伝子や酵素の知見は明らかでない。そこで基礎的知見を得るために NT-I 株のゲノム DNA を解析後、金属還元酵素遺伝子やメチル基転移酵素遺伝子との相同性を調べ、NT-I 株内に数個の候補遺伝子を見出した。その結果、セレン酸を亜セレン酸に還元するセレン酸還元遺伝子と元素態セレンをジメチルジセレニドに合成する遺伝子を特定し、組換え大腸菌において発現に成功した。

### 3. 2 セレン以外の新規な金属代謝微生物の分離

#### 3. 2. 1 テルル酸代謝微生物の取得

セレン以外のレアメタルを回収・資源化するため新規な金属代謝微生物の分離を試みた。テルルはセレンと同周期にある半金属である。テルルの主要用途は、鉄の機械加工性を向上させるための冶金用添加剤、加硫剤およびゴム生成の促進剤、合成繊維生産用の触媒として使用される。機能的用途としては近年、Cd-Te 系太陽電池への使用が増加している。テルルも工業的に幅広い用途で使用されるが、セレンと同様に生体に対する高い毒性を有しており、環境省によって水質汚濁防止法の要調査項目に指定されている。高毒性や近年の使用量の増加から、その処理と再資源化方法の確立が急務であるといえる。

テルル酸化物陰イオン (テルル酸, 亜テルル酸) は毒性が高く、亜テルル酸は 3.9 μM の低濃度でほとんどの微生物に対して毒性を示す。一般的に金属の固体や揮発化物はその酸化物陰イオンよりも毒性が小さいため、その固体化・揮発化反応は解毒メカニズムの一種であると考えられている。そこでテルルの浄化・回収プロセスを構築するため、金属精錬工場から採取した排水溝底泥水から亜テルル酸耐性微生物を分離し、固体化・揮発化能力を有しているかを調べた。その結果、1mM の亜テルル酸に対して耐性を示す集積培養系から、亜テルル酸耐性を有する細菌 Ti-1 株, Ti-2 株, Ti-3 株を分離することに成功した。分離した Ti-1 株, Ti-2 株, Ti-3 株は 30mM の亜テルル酸存在下で増殖可能なことから、これまで報告されている微生物の中で最も高い亜テルル酸耐性を有しているだけでなく、テルル酸, 亜テルル酸に対して強い還元能を示した。同定した結果、これら 3 株を *Stenotrophomonas maltophilia* Ti-1, *Ochrobactrum anthropi* Ti-2, *Ochrobactrum anthropi* Ti-3 と命名した。次にテルル酸還元細菌 3 株の還元特徴を解析した。Ti-2,3 はテルル酸還元能に差はなかったが、Ti-1 株はこの 2 株に比べて低温, 低 pH, 高塩濃度での還元能が優れていた。合成された元素態テルルは細胞

外に分泌され、遠心分離や限外濾過などの方法で簡単に回収ことに成功した。また浄化・回収対象となる廃水・廃棄物は多元素で高塩濃度であることが多いので、塩耐性を持つ新たなテルル酸・亜テルル酸還元微生物を海洋環境試料から分離することを試みた結果、初発濃度の 50% 以上を溶液から取り除くことができる微生物を 18 株分離した。それらの細菌は多様な分類系統で 9 属に分類できた。その内 6 属はこれまでテルル酸化物の還元が報告されていない新しい菌株であった。

### 3. 2. 2 レアアース元素(REE)代謝微生物の取得

REE とは、周期表第三族の原子番号 21 番のスカンジウム (Sc) 及び 39 番のイットリウム (Y) と、57 番から 71 番のランタノイドと総称される 15 元素のグループのことをいう。REE は特殊な電子軌道の原子構造をしており、蛍光材料や永久磁石、超伝導材料として日本の産業にとって必須金属である。特に、ジスプロシウム (Dy) は耐熱性ネオジム (Nd) 磁石と呼ばれる高温に耐える強力磁石の原料としてその需要が増加している。この Nd 磁石はモーターとして次世代型自動車や携帯電話、パソコンに利用されており、その製造工程から排出される研磨屑は、物理化学的処理によるリサイクルが試みられているが、この方法では完全に回収することが出来ず、その廃棄物中の残存 REE の回収が望まれている。そこで、固形廃棄物から選択的に REE 抽出を行う微生物の取得と REE 含有溶液から特異的に REE を分離・濃縮する新規代謝微生物の分離を行い、バイオプロセス構築に向けて検討した。

バイオリーチングは低品位鉱石から微生物を用いて銅などの有用非鉄金属を抽出する技術である。現在ではバイオリーチングの応用研究が進み、ウランやコバルト、金などの抽出にも利用されている。本研究では REE リーチング微生物を分離することを主とし、その REE リーチング能を評価して REE 回収に向けた有用性を検討した。実験の結果、酸性湖の環境試料から REE 抽出微生物群を 3 菌群得た。このうち S20 菌群は、培養 1 日目でも REE 含有廃棄物から Dy を約 70%、Nd を約 55%、Pr を約 65%抽出し、リサイクルに不要な Fe はほとんど抽出しなかった。

有用金属の濃縮・回収手段として、金属代謝微生物によるバイオミネラリゼーションは広く研究されている。これまで金属イオン還元菌 *Shewanella algae* を利用した Pd, Pt, Au 等の貴金属回収があげられる。そこで、REE の中でも高価なジスプロシウム (Dy) に重点をおき、Dy 含有溶液から特異的に Dy を固化・濃縮する新規代謝微生物を分離して、その固化・濃縮能を評価して REE 回収に向けた有用性を検討した。その結果、廃鉱山の環境試料から Dy 代謝能をもつ微生物 T9 株を単離した。SEM と EDX による解析から、菌体上に Dy とリン(P)を固化濃縮していることが分かった。さらに、生育培地にリン酸を添加することで、Dy の蓄積率が 90%に向上した。以上の結果から、取得した Dy 代謝微生物 T9 株は高効率に Dy を濃縮する可能性があると思われる。T9 株を分子生物学的に同定したところ *Penidiella* sp. T9 株と命名した。*Penidiella* 属はこれまで Dy を代謝した報告例がなかった。Dy を蓄積した T9 株を焙焼することにより酸化ジスプロシウムを得ることができ、一連のリサイクル系を構築できた。

### 3. 2. 3 バイオ鉱物合成微生物の取得

福島県原子力発電所の事故で問題となっている放射性核種は全てレアメタルに属する元素であり、それらの核種 (コバルト (Co), ストロチウム (Sr), セシウム (Cs)) を浄化・回収対象とした新規なバイオ修復材料を開発し、社会貢献していくことを目指している。高塩濃度条件では地下水で有効であるスメクタイト (粘土鉱物) などの吸着効率が非常に低下するため、Co や Sr は従来の吸着材料を用いることは困難である。そこで高塩濃度下で微生物が合成するバイオ鉱物に Co や Sr を取り込ませて固化し浄化・回収することを目的とした。海水試料からカルサイト (炭酸カルシウム) を生成する菌種を探索したところ TK2d 株を単離した。この微生物は 1 mM の Sr を 5 日間で約 99.3%培養液から取り除く能力があった。

〈成果の特に優れた点〉

好氣的セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を用いた、ラボスケールのバイオリクターの設計・構築に成功した。40ppm (0.5mM)濃度のセレン酸、亜セレン酸を含む模擬

廃水から、固体セレン又は気体セレンを、約 90%という高効率で回収に成功した。実廃水から固体セレンまたは気体セレンを各 78.8%, 38.9%の収量で回収することに成功した。気体セレンを質量分析により定性分析をした結果、気体セレンは主として  $\text{DMDSe}$  であることを発見した。回収した沈殿物から、エタノール洗浄という簡易な処理を検討し、セレンの結晶化物を濃縮・精錬し、その後酸化焙焼することによって 96.7%の収量で金属セレンを精錬することに成功した。微生物によるバイオセレンから金属セレンを高純度で精錬した初めての例である。レアアースエレメントにおいては、模擬廃水中の Dy を蓄積・固化する T9 株を獲得し、Dy 蓄積後の菌体を焙焼することにより酸化ジスプロシウムを得ることができるとの一連の回収系を構築できた。

レア金属の電気化学的手法により精錬においては、セレンオキシアニオンの直接的な電極還元は、亜セレン酸については強酸性条件でのみで起こり、セレン酸については起こらない。検討の結果、メチルビオロゲン ( $\text{MV}^{2+}$ ) をメディエーターとして用いると、中性 pH 領域においてセレンオキシアニオンの還元が可能になることを電気化学手法により発見した。

貴金属の電気化学的手法により精錬においては、本試験結果より  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$  に抽出された Pd(II) は、電解還元により Pd 単体として回収可能であることが示された。

セレン以外のレア金属であるテルル、レアアースエレメントを代謝する新規な微生物の分離に成功した。

最終年度における優れた成果としては、模擬廃水から微生物作用によって得られたバイオセレンを高純度 (99%以上) にまで精錬する一連のプロセスの構築ができた。セレン代謝に関する遺伝子が特定でき基礎的知見が得られた。レアアースエレメントを蓄積する微生物を用いて模擬廃水から初発濃度の 90%の収量で Dy を回収資源化できるプロセスの構築ができた。放射性核種の 1 種である Sr を 5 日間で初発濃度の 99%以上バイオ鉱物として取込む微生物を獲得できた。

#### 〈研究の課題点〉

先行研究として行ったセレンを含む模擬廃水を用いて *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を培養した場合、固体セレンも気体セレンも、約 90%という高効率でセレンの回収に成功したが、実廃水からの回収効率は模擬廃水よりもよくなかった。実廃水はセレン酸と亜セレン酸が混在しているので、各還元反応速度が異なり、単純に通気を止めるだけでは元素態セレンの還元を完全に抑制することができていない。セレン酸化物イオンの混合比によって培養条件を変える等の工夫が必要である。元素態セレンの還元を完全に阻止できれば、より高回収率で固化回収ができると考える。特にセレン気化回収ではモデル廃水と比べると回収率は低かった。その原因は実廃水に固体セレン、気化セレンの合成プロセスを阻害する物質が存在すること、培養液中に未知セレンが多く存在して気化しなかったことなどが考えられ、合成メカニズムを解明すると共に、阻害因子を特定・除去することで、NT-I 株によるセレン気化回収の回収率が高くなる可能性がある。

セレン酸還元細菌 NT-I 株を用いてレア金属バイオセンサーを構築しているが、排水基準値を直接測定できない。ストリッピング法や電極自体の実表面積を増やすことにより高感度化できるかもしれない。

電気化学手法によるレア金属の精錬を検討したが、セレン酸については、特定のメディエーターを添加しても除去率および回収率が、亜セレン酸と比べて低かった。電流効率の向上が課題である。

イオン液体を用いてレアアースの回収を試みたが、特定の Pd(II) の回収には成功したが、多くの有用元素を回収できるイオン液体を用いた系を開発する必要がある。

テルル酸、REE、他のレアアースを代謝する特異な微生物を取得できたが、廃水・廃棄物から有用元素を回収できるに耐える可能性があるかなど実用化に向けての検討をする必要がある。

#### 〈自己評価の実施結果と対応状況〉

微生物を可視化する装置と反応容器を設置するために研究費を用いた。これらにより微生物の分離からプロセスの構築までのフローが完成でき、大きな成果が得られた。想定以上にレアメタル代謝微生物、遺伝子も分離できた。プロジェクトを細目化して専門家を配置することにより一連の基盤研究の成果を得た。

#### 〈外部（第三者）評価の実施結果及び対応状況〉

SIT 総合研究所の研究センター（レアメタルバイオリサーチセンター）として、毎年外部の有識者（大学、企業等）からなる評価委員会を実施し、多角的な視点から忌憚のない評価やアドバイスを受けている。本研究における外部評価者のコメントと対応状況は以下の通りである。各年度成果の増分を明らかにするために、成果の特に優れた点に記述した。メタルバイオ（レアメタル回収に果たす微生物の役割やリサイクル回収技術）を産業界に広めるために、「地球を救うメタルバイオテクノロジー」を編集し周知した。さらに本学生命化学研究室やメタルバイオテクノロジー研究部会のホームページにアップしていくつもりである。実用化するためにはエネルギーの低減化と処理時間の短縮すること、手法の妥当性を評価する客観的なデータを取ることで、実用化に向けたプラントを稼働させ事業化を進めることに対しては、研究期間終了後の展望に記述するとともに、実用化に向けて企業との共同研究を進め、新たな研究助成費を獲得して大きな装置を構築し、客観的なデータを取得していく。エネルギーの低減化と処理時間の短縮を含めたコストダウンをラボスケールやベンチスケールの装置を用いて検討していくつもりである。

#### 〈研究期間終了後の展望〉

将来日本の産業が生き残る道は、技術力をベースにした、省エネやリサイクル技術を含む技術開発力に集約されると思われる。特にレアメタルから発展する環境・エネルギービジネスがキーテクノロジーとなる。太陽発電、燃料電池、電気自動車等はレアメタルから発想できる事業である。持続的にレアメタルを供給するために、備蓄する事、新規な探鉱を開発する事や代替材料を開発する事は必須であるが、かなりの時間がかかると言われている。本技術開発は、既に多量に存在する使用済製品や廃水・廃棄物からの有価金属の回収であり、免税制度から民間活力を利用すれば、3R (reduce, reuse, recycle) 技術が確立できると思われる。レアメタルは有用資源として注目されているが、新たな環境汚染が懸念されている。本研究は廃棄物からのレアメタル処理技術も兼ねており、資源循環と環境保全の一石二鳥の技術として、循環型社会の構築に大いに寄与するものである。

セレンを先行研究とした廃水・廃棄物からセレンを回収できるプロセスフローを資源化まで開発したので、他のレアメタル除去・回収を達成する微生物を活用した一連の技術群の基盤が構築できたと思われる。学術的（微生物や遺伝子の特定）にも経済的にも（特許を含む）、さらなる知的基盤情報が構築できると思われる。これら一連の大きな成果はブラジルの大手資源開発企業 Vale 社と我々が日本では初めて共同研究して、微生物を用いた鉱物の新処理方法の開発を目指すことになった。さらに実用化するためには共同研究先を増やし実証化レベルのプラントを設置すると共に、国内外に循環型社会システムの必要性をマスメディアを通して認知、流布させることにより、市場拡大を目指したレアメタルの資源循環型社会システムの基盤を形成することである。また新たに、福島県原子力発電所の事故で問題となっている放射性核種は全てレアメタルに属する元素である。それらの核種を浄化・回収対象とした新規なバイオ修復材料を開発し、社会貢献していくことを目指している。

#### 〈研究成果の副次的効果〉

得られた研究成果は特許出願し、セレン関連会社と共同出願を行い、産学連携活動を推進することができた。

1. <発明者>山下光雄、<発明名称>タンパク質、核酸、組み換えベクター、形質転換体、及びジメチルジセレニドの製造方法、<出願人>芝浦工業大学、<出願日>平成27年12月14日、<出願番

号>特願2015-243298号

2. <発明者>山下光雄, <発明名称>放射性核種を固化する能力を有する好塩菌, <出願人>芝浦工業大学, <出願日>平成27年7月2日, <出願番号>特願2015-133419号
3. <発明者>山下光雄, <発明名称>希土類元素の回収方法, <出願人>芝浦工業大学, <出願日>平成27年4月24日, <出願番号>特願2015-089492号
4. <発明者>山下光雄, 三浦彰, <発明名称>新規セレン還元微生物及び該当微生物を使用したセレン処理方法, <出願人>JX 日鉱日石金属株式会社, <出願番号>特願 2014-131926, <出願日>平成 26 年 12 月 24 日
5. <発明者>山下光雄, <発明名称>希土類元素を固化する能力を有する微生物及び希土類元素の固化する方法, <出願人>芝浦工業大学, <出願日>平成25年7月17日, <出願番号>特願2013-148344
6. <発明者>山下光雄, <発明名称>希土類元素を溶出させる能力を有する微生物及び希土類元素の溶出方法, <出願人>芝浦工業大学, <出願日>平成25年7月17日, <出願番号>特願2013-148343
7. <発明者>山下光雄, 三浦彰, <発明名称>セレンの処理方法, <出願人>JX 日鉱日石金属株式会社, <出願番号>特願 2013-131926, <出願日>平成 25 年 6 月 24 日.
8. <発明者>山下光雄, <発明名称>セレンの回収方法, <出願人>芝浦工業大学, <国際特許出願番号>PCT/JP2012/052922, <出願日>平成24年2月9日, <出願番号>特願2011-191309, 出願日:平成23年9月2日.
9. <発明者>山下光雄, 池道彦, 惣田訓, 鈴木務, 花田昌子, <発明名称> セメント製造工程における金属の回収方法, <出願人>芝浦工業大学, 大阪大学, 太平洋セメント(株), <出願番号>特願2012-26189, <出願日>平成24年2月9日.
10. <発明者>山下光雄, 池道彦, <発明名称>セレン酸還元活性を示すタンパク質, <出願人>芝浦工業大学, <国際特許出願番号>PCT/JP2011/071442, <出願日>平成23年9月21日, <出願番号>特願2011-65289, 出願日:平成23年3月24日.
11. <発明者>山下光雄, <発明名称>セレンの回収方法, <出願人>芝浦工業大学, <出願番号>特願2011-191309, <出願日>平成23年9月2日.
12. <発明者>山下光雄, 惣田訓, 池道彦, 花田昌子, 鈴木務, <発明名称>セメント製造工程における金属の回収方法, <出願人>芝浦工業大学, 大阪大学, 太平洋セメント(株), <出願番号>特願 2011-172045, <出願日>平成 23 年 8 月 5 日.

#### (5) 研究発表の状況

<雑誌論文>

1. Bioleaching of gallium from gallium arsenide by *Cellulosimicrobium funkei* and its application to semiconductor/electronic wastes. Sirikan Maneesuwannarat, Alisa S. Vangnai, Mitsuo Yamashita, and Paitip Thiravetyan, Process Safety and Environment Protection, 査読有. 99, 80-87, (2016).
2. Selenium recovery form kiln powder of cement manufacturing by chemical leaching and bioreduction. Satoshi. Soda, Ai Hasegawa, Masashi Kuroda, Akiko Hanada, Mitsuo Yamashita, and Michihiko Ike.: Water Science and Technology, 査読有. 72(8), 1294-1300, (2015). 査読有
3. 酸化焙焼によるバイオセレンからのセレン分離の検討, 大塚治、築場豊、吉川健、山下光雄、日本金属学会誌, 査読有. 79 (6), 330-337, (2015).
4. A new isolate, *Penidiella* sp. T9, accumulates the rare earth element dysprosium. Takumi Horiike, and Mitsuo Yamashita, Appl. Environ. Microbiol., 査読有. 81(9), 3062-3068, (2015).
5. Draft Genome Sequence of *Bacillus selenatarsenatis* SF-1<sup>T</sup>, a promising agent for bioremediation of environments contaminated with selenium and arsenic. Masashi Kuroda, Hiroyuki Ayano, Kazunari Sei, Mitsuo Yamashita, and Michihiko Ike, Genome Announc., 査読有. 3(1), 1-2, (2015).
6. 高効率分離を目指したトリフェニルホスフィン抽出剤による都市鉱山からの白金族元素の

- 分離プロセスの提案, 松本佑美、鈴木亮利、千葉雄大、新井剛, *Journal of MMIJ*, 査読有. 131(8-9), 481-486 (2015).
7. セレン酸還元細菌NT-I株を用いた廃水からのセレン回収, 山下光雄、大塚治, *水環境学会誌*, 査読無、37(2)、1-5 (2014).
8. Fumiya Koshikumo, Wakana Murata, Akiyuki Ooya, and Shin-ichiro Imabayashi, “Acceleration of Electroreduction Reaction of Water-Soluble Selenium Compounds in the Presence of Methyl Viologen”, *Electrochemistry*, 査読有. 81(5), 350-52 (2013).
9. イオン液体を用いた都市鉱山からの有用金属の分離・回収技術の開発, 新井剛、剣持達也、十時一晃, *化学工業*, 査読無、Vol.64, 148-156, 2013.
10. Selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. Tsubasa Kagami, Takanobu Narita, Masashi Kuroda, Emi Notaguchi, Mitsuo Yamashita, Kazunari Sei, Satoshi Soda, and Michihiko Ike. *Water Research*. 査読有. 47, 1361-1368, 2012.
11. Isolation and characterization of bacteria capable of reducing tellurium oxyanions to insoluble elemental tellurium for tellurium recovery from wastewater. Tsubasa Kagami, Akira Fudemoto, Noriyuki Fujimoto, Emi Notaguchi, Masaya Kanzaki, Masashi Kuroda, Satoshi Soda, Mitsuo Yamashita, and Michihiko Ike. *Waste and Biomass Valorization*. 査読有. 3(4), 409-418, 2012.
12. メタルバイオ技術による排水からのレアメタル回収の可能性, 池道彦、山下光雄、黒田真史, *環境バイオテクノロジー学会誌*, 査読無、vol.12、3-8、(2012).
13. Laboratory-scale bioreactors for soluble selenium removal from selenium refinery wastewater using anaerobic sludge. Satoshi Soda, Masami Kashiwa, Tsubasa Kagami, Masashi Kuroda, Mitsuo Yamashita, and Michihiko Ike. *Desalination*. 査読有. 279, 433-438 (2011).
14. Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. Masashi Kuroda, Emi Notaguchi, Akiko Sato, Masaya Yoshioka, Ai Hasegawa, Tsubasa Kagami, Takanobu Narita, Mitsuo Yamashita, Kazunari Sei, Satoshi Soda, and Michihiko Ike. *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有. 112(3), 259-264 (2011).
15. Molecular cloning and characterization of the *srdBCA* operon encoding the respiratory selenate reductase complex from the selenate-reducing bacterium, *Bacillus selenatarsenatis* SF-1. Masashi Kuroda, Mitsuo Yamashita, Kanako Imao, Noriyuki Fujimoto, Hisayo Ono, Kouta Nagano, Emiko Miwa, Kazunari Sei, and Michihiko Ike. *J. Bacteriol.*, 査読有. 193(9), 2141-2148 (2011).
16. イオン交換法による使用済液晶パネル中からのインジウム分離・回収の基礎研究, 井上亮、山田竜生、河村卓哉、新井剛、永山勝久, *日本イオン交換学会誌*, 査読有.Vol.22, No.3, p.87-95, (2011) .

#### 〈図書〉

1. 「セレン等の揮発化回収」, 山下光雄、大塚治、 *バイオベース元素戦略 ー都市鉱山・海底鉱山に眠る貴金属・レアメタル回収技術ー* 小西康裕編集, 2014年7月10日 (株)シーエムシー出版
2. 「第2章 メタルバイオテクノロジー」, 山下光雄、清和成編集, “地球を救うメタルバイオテクノロジー - 微生物と金属資源のはなし - ” 成山堂書店. 2014年.
3. 「レアメタルのバイオ濃縮回収技術の可能性」.成田尚宣、山下光雄.*応用微細藻類学*.小柳津広志、倉橋みどり編集.成山堂書店.分担.190. 2012.
4. 「バイオボータリゼーションによるセレンの回収」. 成田尚宣, 山下光雄. *リサイクル・廃棄物事典*.産業調査会事典出版センター.分担.600. 2012.
5. Phytoremediation for soils contaminated by heavy metals using the symbiosis between *Astragalus sinicus* with rhizobacteria. Mitsuo Yamashita. *Handbook of Metal Biotechnology—Applications for Environmental Conservation and Sustainability*. Pan Stanford Publishing. 231. 2012.
6. 「レンゲと根粒菌の共生による重金属ファイトレメディエーション」.山下光雄.*植物機能のポ*

テンシヤルを活かした環境保全・浄化技術 ～地球を救う超環境適合・自然調和型システム～.  
CMC 出版. 261. 2011.

@学会発表

- 1.大塚治、黒田真史、池道彦、山下光雄. *Pseudomonas stutzeri* NT-I株のDimethyl diselenide合成速度促進因子の探索 (日本農芸化学会2016年度大会 (平成28年度)、札幌、3月27-30日)
2. 山下光雄. 微生物培養による廃水や廃棄物からのレアメタル回収技術 (2015年度第67回日本生物工学会大会、鹿児島、10月26-28日)
3. T. Ohnuki, N. Kozai, F. Sakamoto, T. Saito, Q. Yu, M. Yamashita, T. Horiike, S. Utsunomiya. Coprecipitation of radioactive strontium in sea water during formation of biogenic calcite. 15th International Conference on the Chemistry and Migration Behaviour of Actinides and Fission Products in the Geosphere. September 13-18, 2015, Santa Fe Community Convention Center, Santa Fe, NM, USA
4. Masashi Kuroda, Satoshi Soda, Michihiko Ike, and Mitsuo Yamashita. Selenium recovery from simulated wastewater using Selenium reducing bacteria *Pseudomonas stutzeri* NT-I. Osamu Otsuka, Hydroprocess 2015 (7<sup>th</sup> International Seminar on Process Hydrometallurgy. July 22-24, 2015, Antofagasta, Chile)
5. 堀池巧、大塚治、寺原猛、今田千秋、山下光雄. 海洋環境から分離した好気性テルル酸還元微生物の多様性. (マリンバイオテクノロジー学会 2015年度大会 (平成27年度)、東京海洋大学、5月30日-31日)
6. 大塚治、築場豊、吉川健、山下光雄. セレン酸還元菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I株を用いた模擬廃水からのセレン再資源化. (廃棄物資源循環学会 2014年度春の研究発表会 (平成27年度)、川崎、5月28日)
- 7.北義弘、大胡貴仁、新井剛. “[C<sub>n</sub>mim][PF<sub>6</sub>]<sub>2</sub>による複合反応系を用いた都市鉱山からの希少金属回収技術開発”、2015年日本イオン交換学会・日本溶媒抽出学会連合年会、(2015)
- 8.松本佑美、矢田祐士、山中拓実、新井剛. “イオン液体を溶媒とした白金族元素回収の新規・分離回収技術開発”、2015年日本イオン交換学会・日本溶媒抽出学会連合年会、(2015)
- 9.大胡貴仁、北義弘、新井剛. “LCST型イオン液体を用いた金属イオンの抽出挙動の基礎研究”、2015年日本イオン交換学会・日本溶媒抽出学会連合年会、(2015)
- 10.矢田祐士、松本佑美、新井剛. “[C<sub>n</sub>mim][Tf<sub>2</sub>N]-Tributyl phosphate 混合抽出相からのギ酸アンモニウムによる希土類元素の逆抽出”、2015年日本イオン交換学会・日本溶媒抽出学会連合年会、(2015)
- 11.北義弘、大胡貴仁、新井剛. “イオン液体を用いた複合反応系による都市鉱山からの有用金属の直接回収技術開発”、平成27年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、(2015)
- 12.松本佑美、矢田祐士、室井悟、新井剛. “[C<sub>n</sub>mim][Tf<sub>2</sub>N]を溶媒とした都市鉱山からの白金族元素新規分離・回収技術開発”、平成27年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、(2015)
- 13.大胡貴仁、北義弘、新井剛. “イミダゾリウム系イオン液体の抽出挙動に及ぼすアニオン構造変化の影響”、平成27年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、(2015)
- 14.矢田祐士、松本佑美、新井剛. “Tributyl Phosphateの希釈溶媒に[C<sub>n</sub>mim][Tf<sub>2</sub>N]を用いた場合の塩酸水溶液中における希土類元素の抽出・逆抽出挙動”、平成27年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、(2015)
- 15.村上大昌、今林慎一郎. 「亜セレン酸の電極還元促進に対するピオロゲンメディエーター構造の影響」、第61回ポーラログラフおよび電気分析化学討論会、2015/11/24、イーグレひめじ.
- 16.今林慎一郎、村上大昌、越雲文也. 「メディエーター型亜セレン酸還元反応に対するメディエーター構造の影響」、2015年電気化学秋季大会、2015/9/11、埼玉工業大学.
- 17.赤塚秀太、越雲文也、今林慎一郎. 「メディエーター型水溶性セレン還元反応に基づくセレン回収法の可能性」、電気化学会第82回大会、2015/3/17、横浜国立大学.
18. Sirikan Maneesuwannarat, Alisa S. Vangnai, Mitsuo Yamashita and Paitip Thiravetyan.



Bioleaching of gallium from semiconductor/electronic wastes: Screening and characterization of gallium arsenide-extracting bacteria. ENRIC2014: Global Climate Change and Sustainability pathway 6-7/November,2014, Bangkok,Thailand.

19. S. Soda, A. Hasegawa, M. Kuroda, A. Hanada, M. Yamashita, M. Ike. Selenium recovery from kiln powder as by-product of cement manufacturing by using chemical leaching and bacterial reduction. (The International water association (IWA) World Water Congress & Exhibition, September 21-26, 2014, Lisbon, Portugal)

20. M. Ike, T. Narita, M. Kuroda, S. Soda, M. Yamashita. Recovery of Selenium in Wastewater through Biovolatilization by Using *Pseudomonas stutzeri* NT-I. (The International water association (IWA) World Water Congress & Exhibition, September 21-26, 2014, Lisbon, Portugal)

21. 大塚治、山下光雄.循環型社会を目指した実廃水・実廃棄物からのレアメタル回収技術. (エコデザインプロダクト&サービスシンポジウム、東京大学本郷キャンパス、2014)

22. 大塚治、黒田真史、池道彦、山下光雄. 微生物を用いた廃水からのセレン気化回収技術の検討. (廃棄物資源循環学会 2014 年度春の研究発表会 (平成 26 年度)、川崎)

23. 堀池巧、大塚治、田中康寛、寺原猛、今田千秋、山下光雄.海洋環境からの好気性テルル酸還元微生物の単離とテルル酸還元能の解析.(マリンバイオテクノロジー学会 2014 年度大会 (平成 26 年度)、三重大学)

24. 堀池巧、大塚治、田中康寛、寺原猛、今田千秋、山下光雄.テルルを代謝する新規海洋性微生物の獲得とその機能解析. (日本農芸化学会2014年度 (平成26年度)、東京、3月27-30日)

25. 大塚治、成田尚宣、黒田真史、池道彦、山下光雄. *Pseudomonas stutzeri* NT-Iのジメチルジセレニド合成能の特徴. (日本農芸化学会2014年度大会 (平成26年度)、東京、3月27-30日)

26. 赤塚秀太、今林慎一郎.「メドイエータ型亜セレン酸還元反応はセレン回収方法として有用か? -反応機構解析結果に基づく電解還元条件の検討-」、第 60 回ポーラログラフおよび電気分析化学討論会、2014/11/16、京都工繊大

27. 越雲文也、今林慎一郎.「電子メドイエータを介する亜セレン酸の電極還元反応機構の解析」、電気化学会第 81 回大会、2014/3/29、関西大学千里山キャンパス

28. 北義弘、新井剛、十時一晃. “廃棄物の減容化を目指した都市鉱山からのイオン液体による有用資源の直接回収技術の創生”. 平成 26 年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、2014.

29. 北義弘、十時一晃、新井剛. “[C<sub>n</sub>mim][PF<sub>6</sub>]を用いた複合反応系による塩酸水溶液中からの Pd の直接回収に関する基礎研究”. エコデザイン学会/NPO エコデザイン推進機構 「エコデザイン・プロダクト&サービスシンポジウム」、2014.

30. 樋口靖典、成田尚宣、黒田真史、惣田訓、山下光雄、池道彦. ジャーファーマンターを用いた *Pseudomonas stutzeri* NT-I によるセレンオキソアニオン還元特性の検討. (2013 年度 (第 50 回) 日本水処理生物学会、神戸市、11 月 13-15 日)

31. Masashi Kuroda, Emiko Miwa, Kazunari Sei, Satoshi Soda, Mitsuo Yamashita, and Michihiko Ike. Analyses of selenate reduction mechanism in *Pseudomonas stutzeri* NT-I, the promising biocatalyst for selenium-removal and recovery from contaminated water. (Metals and Related Substances in Drinking Water 5th international Conference, November 6-9, 2013, Shanghai, China)

32. M. Kuroda, T. Kagami, T. Narita, S. Soda, M. Yamashita, and M. Ike. *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of reducing selenate/selenite into elemental selenium and methyl selenides; a versatile microbial agent for biotreatment/ bioremediation of selenium contamination. (VJSE: Vietnamese-Japanese Students' Scientific Exchange Meeting, September 23, 2013, Osaka, Japan)

33. Mitsuo Yamashita, Takumi Horiike. Development of recycling technology of rare-earth elements (REE) from wastes using microorganism's metabolism. (Japan Sustainable Mining, Investment & Technology business forum 2013, 東京、5 月 16-17 日)

34. 越雲文也、今林慎一郎.「メチルピオロゲンを介した亜セレン酸の電極還元反応に対する緩衝液の影響」、電気化学会第 80 回大会 (東北大学)、2013/3/29、東北大学川内キャンパス

35. 十時一晃、北義弘、新井剛. “[C<sub>n</sub>mim][PF<sub>6</sub>]<sub>n</sub>]によるレアメタルの抽出及び電気化学挙動に関する研究”、日本溶媒抽出学会「第 32 回 溶媒抽出討論会」、2013.
37. 黒田真史、三輪美恵子、清和成、惣田訓、山下光雄、池道彦. *Pseudomonas stutzeri* NT-I によるセレン酸還元機構の解析. (日本農芸化学会2013年度 (平成25年度)、仙台、3月25-28日)
38. 大塚治、長谷川智美、坂本康太、生田裕馬、池道彦、山下光雄. テルル酸還元細菌 *Ochrobactrum anthropi* Ti-3株のテルル酸還元能の解析. (日本農芸化学会2013年度 (平成25年度)、仙台、3月25-28日)
39. 越雲文也、今林慎一郎. 「回転電極測定法を用いた水溶性セレン化合物の電極還元反応の解析」、第 58 回ポーラログラフおよび電気分析化学討論会 (高尾)、2012/11/27、八王子市高尾の森わくわくビレッジ
40. 十時一晃、劔持達也、木暮勇、佐々木琴江、新井剛. “イオン液体に含まれる金属イオンの電氣的回収に関する研究”、平成 24 年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、2012.
41. 木暮勇、十時一晃、劔持達也、新井剛. “低融点イオン液体のアルキル鎖変化による塩酸溶液中の金属イオンの抽出挙動に関する研究”、平成 24 年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、2012.
42. 黒田真史、三輪恵美子、清和成、惣田訓、山下光雄、池道彦. 二種のセレン酸還元細菌のセレン酸還元関連遺伝子の解析. (2012年度 (第49回) 日本水処理生物学会、北里大学白金高輪キャンパス、11月24-25日)
43. 黒田真史、成田尚宣、三輪美恵子、鏡つばさ、惣田訓、山下光雄、池道彦. *Pseudomonas stutzeri* NT-Iを用いたセレン揮発化除去・回収プロセスの試行.(2012年度日本生物工学会大会、神戸国際会議場、10月23-26日)
44. F. Koshikumo, W. Murata, A. Ooya and S. Imabayashi, “Electrochemical reduction of selenite and selenate accelerated by methyl viologen”, PRiME2012, 2012/10/9, Honolulu, Hawaii.
45. 越雲文也、今林慎一郎. 「メチルビオロゲン共存下における水溶性セレン化合物の電極還元反応の解析」、電気化学会第 79 回大会、2012/3/30、アクトシティ (浜松) .
46. 成田尚宣、鏡つばさ、黒田真史、惣田訓、池道彦、山下光雄. セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-Iを用いたセレン酸および亜セレン酸還元の最適化. (2012年度日本農芸化学会大会、京都女子大学、3月22-25日)
47. Shun Ochiai, Takanobu Narita, Kazunari Sei, Satoshi Soda, Michihiko Ike, and Mitsuo Yamashita. Recycling of selenium from K-powder in selenate reducing bacterium, *Pseudomonas stutzeri* NT-I. (SEATUC 6th congress, March, 6-7, 2012)
48. 越雲文也、今林慎一郎. 「水溶性セレン化合物の電極還元反応におけるメチルビオロゲンの役割」、第 57 回ポーラログラフおよび電気分析化学討論会、2011/12/1、沖縄県男女共同参画センター (那覇) .
49. 劔持達也、木暮勇、新井剛、永山勝久. “イオン液体を用いた塩酸水溶液中からの有用金属の分離・回収プロセスの研究” 資源・素材 2011(堺)、2011.
50. Tsubasa Kagami, Akira Fudemoto, Noriyuki Fujimoto, Emi Notaguchi, Masaya Kanzaki, Masashi Kuroda, Satoshi Soda, Mitsuo Yamashita, and Michihiko Ike. Isolation and characterization of bacteria capable of reducing tellurium oxyanions to insoluble elemental tellurium. (Ecomate, 2011 年 11 月 28-30 日)
51. 長谷川愛、黒田真史、花田晶子、惣田訓、山下光雄、池道彦. セメント工場から発生する K パウダーからのセレン回収方法の基礎検討. (廃棄物資源循環学会第 22 回研究発表会、東洋大学、11月3-5日)
52. 池道彦、山下光雄. メタルバイオ技術による排水からのレアメタル回収の可能性. (2011 年日本生物工学会、東京農工大学、東京、9月26-28日)
53. 落合俊、成田尚宣、清和成、惣田訓、池道彦、山下光雄. セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を用いた K パウダーからのセレンの回収. (2011 年日本生物工学会、東京農工大学、東京、9月26-28日)

54. T. Narita, M. Kashiwa, S. Yamazaki, T. Horiike, Y. Tokunaga, S. Kuboyama, H. Shirai, S. Ogiyama, S. Soda, M. Ike, and M. Yamashita. Optimization of seleno-oxyanions reduction and recovery of elemental and gaseous selenium with selenate reducing bacterium, *Pseudomonas stutzeri* NT-I. (International Union of Microbiological societies 2011 Congress, Sapporo, 2011年9月6-10日)
55. E. Miwa, M. Kuroda, E. Notagushi, A. Sato, M. Yoshioka, A. Hasegawa, T. Kagami, K. Sei, S. Soda, M. Yamashita, and M. Ike. *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of reducing selenater/selenite into elemental selenium and voltatizing them as methylated selenium. (International Union of Microbiological societies 2011 Congress, Sapporo, 2011年9月6-10日)
56. Masahi Kuroda, Mitsuo Yamashita, Emiko Miwa, Kazunari Sei, and Michihiko Ike. Molecular cloning and characterization of the *srdBCA* operon encoding the respiratory selenate reductase complex from the selenate-reducing bacterium, *Bacillus selenatarsenatis* SF-1. (Asian Congress on Biotechnology ACB-2011, Outstanding awards for young scientists, 2011年5月11-15日, Shanghai, China)

〈研究成果の公開状況〉

成果を以下のように公開している。

芝浦工業大学工学部応用化学山下研究室（生命化学研究室）のホームページ (<http://www.ch.shibaura-it.ac.jp/yamashitalab/index.html>)に一部情報を公開している。  
公益社団法人 日本生物工学会 メタルバイオテクノロジー研究部会の代表をしており、 ([http://www.sbj.or.jp/division/division\\_metalbio.html](http://www.sbj.or.jp/division/division_metalbio.html))に一部情報を公開している。

(6) その他の研究成果

1. ブラジル Vale 社と「Investigation of ore processing using microorganisms」という題目で日本との初めて共同研究締結
2. 太平洋セメント（株）と「セメント製造工程におけるセレンおよび他の有害物質浄化技術の開発」という題目で共同研究。
3. JX 日鉱日石金属（株）と JX 日鉱日石金属由来の廃水サンプルを用いて低コストで高効率なレアメタルを回収するためのプロセスの開発を目指して、「レアメタル回収実証プラント構築を目指した開発研究」という研究題目で共同研究。
4. 三菱レーヨン(株)と「分離膜を用いたセレン処理・回収技術の研究」という研究題目で共同研究。
5. テレビ朝日 スーパーJチャンネル 平成25年5月1日（水） 「ゴミに隠れた『宝』を発掘 レアメタル鑑定」という番組で本研究内容の微生物によるレアメタル回収が取材、放映された。
6. 朝日新聞 平成25年7月31日（水）夕刊 「レアメタル 微生物で回収」とタイトルの記事が掲載された。
7. 電気新聞 平成25年10月15日(火)「全国理系学び舎紀行」に研究室と研究内容が紹介された。
8. 化学工業日報 平成26年1月6日(月)「グリーンイノベーション」に研究内容（微生物でレアメタル回収）が掲載された。
9. 化学工業日報平成27年11月17日（火）「微生物でレアアース回収」が掲載された。

(7) 「選定時」及び「中間評価時」に付された留意事項とそれへの対応

@ 「選定時」に付された留意事項

基盤形成の観点からの研究成果に留意されたい。

@ 「選定時」に付された留意事項への対応

将来につなげる基礎的な実験結果を取得することを心がけ、学术论文や著書や学会発表での成果をあげることを重視した。さらに基礎的な研究を実用化に結びつけるため、企業と共同研究を行ない、特許申請も行った（研究成果の副次的効果参考）。

@ 「中間評価時」に付された留意事項

学术论文・学会・特許出願などの成果が認められる。しかしながら、研究代表者と学外研究者1名の成果のみで、プロジェクトとしての連携が必ずしもうまくいっているとは思えない。今後、連携を深め、基盤形成のための研究成果の蓄積を期待する。

@ 「中間評価時」に付された留意事項への対応

付された留意事項に対し、どのような対応策を講じ、また、それにより、どのような成果があがったか等について、詳細に記載してください。

中間報告では提出枚数に制限があり、全てを網羅して記述できなかった。そこで本報告では研究発表の状況欄に加筆した。当初の目標であるレアメタル代謝微生物の分離、リアクターの構築、精練技術の開発及び一連のフローからの派生研究までを示すことができる研究成果をあげた。

学内研究者の業績欄に研究代表者の名前が記載されていないのは、貢献度を低く設定したので削除した。実際上は、本実験研究で行った元素分析の一部を分担し、担当学生の分析技術指導を行っている。

学外研究者のうち1名は東北地域で生じた災害のために研究ができなくなり、レアメタル分析に関しての示唆をいただくことでプロジェクトの役割を担って頂くことにした。その後、実験研究する事が可能になったので、多様なレアメタル回収に適用できる微生物の取得と分析研究に関しての役割を担って頂いた。

## 2. 研究成果の詳細

以下，本研究を実施した5年間に渡り各年度ごとに成果をまとめた．

(1) 平成 23 年度

# セレン回収技術開発を目指した模擬排水 での還元最適化

〔所属機関名・所属部局名 研究分担者〕  
(芝浦工業大学・工学部応用化学科) 山下 光雄

## 1. 研究目的

セレン (Se) は、原子番号 34、原子量 78.96 の非金属元素であり、地殻存在量は 0.05mg/L (ppm) とされている。セレンは化学的に硫黄と似ており、生物作用を受けやすく、土壌中のセレン濃度は地域により明確な差がある。Se は、工業的にも重要な金属資源で、コピー機やガラス染色、半導体原料などに利用されており、工場などから水系に放出されている。生物にとっても必須微量元素であり、体内でセレン含有アミノ酸の合成に利用される。一方で、水中での存在形態であるオキサニオン (酸化物イオン) のセレン酸塩 ( $\text{SeO}_4^{2-}:\text{Se(VI)}$ ) や亜セレン酸 ( $\text{SeO}_3^{2-}:\text{Se(IV)}$ ) は、生物に対して慢性・急性の毒性を有することから、排出基準が厳しく定められており、環境中に排出する際には 0.1ppm 以下まで浄化することが義務付けられている。現在は電気還元、化学還元や凝集沈殿・吸着剤法にて浄化が行われている。大量の化学薬品の使用や廃棄物が排出されることなどために高コストであり、また、廃棄物量に含まれる Se 含量が低いことから Se を資源として回収する事は難しい。現状の物理化学的 Se 含有排水処理技術の有するエネルギー・資源の大量消費、高コストなどの問題点を解決する新たな処理方法として、排水中に存在する Se オキサニオンを微生物により還元し、無毒・固形の元素態セレン (Se (0)) に変換する方法が考えられる。

Se オキサニオンを還元する微生物としては、これまでに *Bacillus selenatarsenatis* SF-1 株が分離されている<sup>1)</sup>。SF-1 株は嫌気条件下においてセレン酸の還元を行い、元素態セレンを細胞内に蓄積する。しかし、工業的利用を考えた場合、操作的な面や菌体の増殖といった面で嫌気条件下では扱いにくい。そこで、新たに好氣的条件下においてセレン酸を還元することができる *Pseudomonas*

*stutzeri* NT- I 株が分離された<sup>2)</sup>。NT-I 株は、酸素が存在する条件下でセレン酸を還元し元素態セレンを生成することができる新規なセレン酸塩還元細菌である。高いセレン酸還元能力を有し、高濃度の亜セレン酸還元が可能であるうえ、亜セレン酸から元素態セレンへの還元もスムーズであり、水溶性 Se 除去の効率は世界で最も高いと言える<sup>3)</sup>。生成した元素態セレンは、約 20 nm 径の微粒子として微生物の細胞外に赤色アモルファスの状態で蓄積される。このとき沈殿から回収される Se 濃度は添加量の約 70% 以上と非常に高く、排水からの Se 資源回収プロセスへと発展するポテンシャルを秘めている。

さらに NT-I 株はセレン酸の還元が進み元素態 Se が析出してきた後も、培養を続けると、今度は元素態 Se によって赤くなっていた培養液の色が消失し、培養液の気相においてメチル化した Se が検出された<sup>3)</sup>。つまり、この NT-I 株は、溶液中のセレン酸を固体の元素態 Se にするというミネラルイゼーションだけでなく、さらに固体の元素態 Se から気体のメチル化 Se にすることでボラタリゼーションを行っていることがわかった。気相中においては、夾雑物が少なく、培養汚泥に比べ、Se が非常に高い純度を持っている。これは、Se を回収するうえでは、非常に大きなメリットとなる。そこで、本報告書では、NT-I 株の将来的な実機スケールでのセレン回収技術開発を踏まえ、培養容量のスケールアップを計ると共に、バイオリクターシステムによるセレン酸および亜セレン酸の還元最適条件を検討することを目的とした。

## 2. 研究計画 (平成23~27年度までの年度)

平成 23 年度は、セレンを含有する模擬排水を用いて、セレンを回収するための最適化条件を決定

した。平成 24 年度は、模擬排水を用いて決定した最適化条件を用いて、実排水に有効利用することを試みる。その上でセレンを固化または気化物として回収を行う予定である。平成 25 年度は、実排水だけでなく、実廃棄物またはその抽出溶液を用いて、セレンを固化物または気化物として回収を行う予定である。平成 26 年度は、レアアース元素代謝微生物を用いて、模擬排水や廃棄物からのレアアース元素を回収するためのリアクターの開発を行う予定である。最終年度の平成 27 年度は、開発したリアクターを用いてのバイオリーチングの最適化条件を検討し、レアアース元素を回収し、成功に導く予定である。

### 3. 計画の進行状況

#### 3. 1 実験材料及び方法

##### 3. 1. 1 菌株と培養条件

本研究では *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株が用いられた<sup>2)</sup>。NT-I 株の培養には、Bacto™ Tryptic Soy Broth (TSB ; Becton-Dickinson, NJ, USA) 培地が使われた。セレン酸、亜セレン酸還元試験には、セレン酸、亜セレン酸のナトリウム塩(ナカライテスク(株)、京都)が用いられた。その他の試薬には、市販の特級品が用いられた。

##### 3. 1. 2 ジャーファーメンターを用いてのセレン酸・亜セレン酸還元試験

NT-I 株の一白金耳量を 100 ml 容バイアルに分注した 50 mL の TSB 培地に植種し、30℃、120rpm の条件に設定した回転振盪培養器で 24 時間培養した。この培養液を新しい 50 ml の TSB 培地を含む 100 ml 三角フラスコに 0.5 ml 添加し、再度 12 時間の前培養を行った。続いて、還元試験を行うために、遠心分離により菌体を回収し、回収した菌体を 0.9%塩化ナトリウム溶液により OD<sub>600</sub> が 1.0 になるように調整した。この溶液 30 ml の種菌は、任意の濃度のセレン酸もしくは亜セレン酸を含んだ TSB 培地 3 L を分注した 5 L 容ジャーファーメンター (Bioneer-C500N 型 5L(S)、株式会社丸菱バイオエンジ、東京) に添加され、培養された。培養液の温度、攪拌速度、pH はそれぞれ任意の値に保たれた。pH は 30% の NaOH 溶液、2 規定の HCl 溶液で調整された。溶存酸素 (DO) および pH は、それぞれ DO 電極 (OX-2500、株式会社丸菱バイオエンジ) と pH コンビネーション電極 (MPS-220、株式会社丸菱バイオエン

ジ) で測定された。経時的に培養液中のセレン酸、亜セレン酸、元素態セレン、および全水溶性セレンが定量された。セレン酸および亜セレン酸の還元速度 (mol/hr/cell) は、セレン酸または亜セレン酸の減少量が 1 時間当たりで最大になる速度 (mol/hr) を、光学密度から算出した菌体数 (cells) で割ることで算出された。

##### 3. 1. 3 気体セレンの回収

排気はテフロンチューブ (内径 5 mm、外径 6 mm) を用いて、水蒸気による溶液量の変化を緩和するために空の 250 ml の試薬瓶を通してから、250 ml の試薬瓶に分注した 150 ml の濃硝酸を通過させた。テフロンチューブの先端にはエアーストーンを用いた。濃硝酸は経時的にサンプリングされ、濃硝酸中の元素は誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) (iCAP 6300 Duo、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、横浜) を用いて定性、定量分析された。

##### 3. 1. 4 分析方法

培養菌体の細胞増殖は、分光光度計 (V-600、日本分光株式会社、日本) を用いて、600 nm における光学密度 (OD<sub>600</sub>) から計算された。菌体密度は以下の式から計算された。菌体密度 (cells/ml) = OD<sub>600</sub> × 8.5 × 10<sup>8</sup>。この式は OD<sub>600</sub> の値とカウンティングチャンバーを用いて位相差顕微鏡 (DM1000、ライカマイクロシステムズ株式会社、東京) による細胞直接計測によって決定された。培養液の 2 mL を遠心分離 (15,000 × g、5 min、室温) して固液分離し、得られた上清を 0.2 μm のフィルター (ステラディスク 13、クラボウ、大阪) でろ過したものをサンプルとした。サンプル中のセレン酸および亜セレン酸イオンは、イオンクロマトグラフィー (ダイオネクス社、ICS-1100、検出器 DS6 HEATED CONDUCTIVITY CELL、カラム IonPac AS12A、ガードカラム AG12A、サブレッサー ASRS300、溶離液 3.0 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、流速 1.5 ml/min) で定性・定量した。また、同サンプルの溶液は、ICP-AES (iCAP 6300 Duo) を用いて、全水溶性セレンを定量された。沈殿物には超純水 2 ml を加え、ボルテックスにより混合した後、遠心分離 (15,000 × g、5 min、室温) により沈殿物を回収した。2 回繰り返し、洗浄作業を行った後、沈殿試料に 1500 μl の濃硝酸と 50 μl の濃硫酸を添加し、ボルテックスにより混合し沈殿物を溶解させた。溶解液は遠心分離 (15,000 × g、5 min、室温) を



行い、上清と沈殿物に分離した。上清は 10 ml メスフラスコに分取された。沈殿物を再度同条件で溶解操作を行い、得られた上清は、同じメスフラスコに分取された。10 ml メスフラスコに超純水を標線まで足し、定容したものを測定試料とした。測定試料は ICP-AES で定量され、セレンの値は元素態セレンとした。気体トラップの濃硝酸中の元素は ICP/AES で測定し、硝酸中の全存在元素と濃度を求めた。

排気の定性分析は、ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS) (FocusGC DSQ II、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、横浜) により行われた。GC カラムには DB-624 を用いた。カラムの長さは 30 m、I.D. は 0.250 mm である。測定はスプリットレスモードで行われた。スプリットバルブは注入 1 分後に開かれた。ヘリウムガスの流量は 1.0 ml/min とした。昇温プログラムは 40°C を 5 分間保持し、10°C/min の速度で 240°C まで昇温させ、240°C で 1.5 分間保持させる条件に設定された。GC の注入口および GC と MS をつなぐラインは 200°C に保たれた。イオン化は 220°C のイオン源によって、ポジティブイオンモードで行われた。試料は 250 $\mu$ l シリンジを用いて 250  $\mu$ l 注入された。すべて測定は 3 回行い、平均値が算出された。

### 3. 2 結果及び考察

#### 3. 2. 1 セレン酸および亜セレン酸還元における最適化

NT-I 株は、これまでにフラスコレベルにおいて好氣的条件下でセレン酸および亜セレン酸を還元することが知られている<sup>2)</sup>。NT-I 株により大量のセレン含有排水からセレンを回収するためには、還元時間の短縮が課題となる。そこで、セレン酸還元の最適化を行うために、ジャーファーマンターでの培養条件の検討を行った。様々な温度、pH、攪拌速度での比還元率の結果を示した (図 1)。

図の横軸はそれぞれの検討項目の値を、縦軸は比還元率を示している。比還元率は初期条件 (38°C、120rpm、1 L/min、初期 pH7.0 (pH 調整なし)) における還元速度 (セレン酸:  $3.1 \times 10^{-16}$  mol/hr/cell、亜セレン酸:  $8.8 \times 10^{-17}$  mol/hr/cell) を基に算出した。本実験での培養条件は、フラスコレベルでの増殖実験の結果から pH、温度の範囲を決定した<sup>2)</sup>。NT-I 株は pH6-9 で増殖可能だったので、本実験でも pH6-9 でのセレン酸還元を調べた。セレン酸還元は、弱アルカリ性の pH7.5-8.0 において最も高く、初期条件の 150%

であった (図 1A)。比還元率は酸性側アルカリ性側のどちらに変化しても減少した。次に温度を可変して還元能を調べた。NT-I 株は 10°C-42°C で増殖可能であり、38°C で最も生育が良かった<sup>2)</sup>。そこで本実験では選択的に 38°C 近辺でのセレン酸還元を調べた。セレン酸の比還元率は 35-40°C において高く、調べた限りでは 38°C で 118% と最も高かった。30°C での還元速度は 38°C での還元速度の約 3 分の 1 に減少した。 (図 1B)。最後に攪拌速度を可変して還元速度を調べてみた。セレン酸の比還元率は攪拌速度が遅くなると減少し、セレン酸の比還元率は 120rpm で 120% と最も高く、攪拌速度が速くなるほど減少した。攪拌速度を

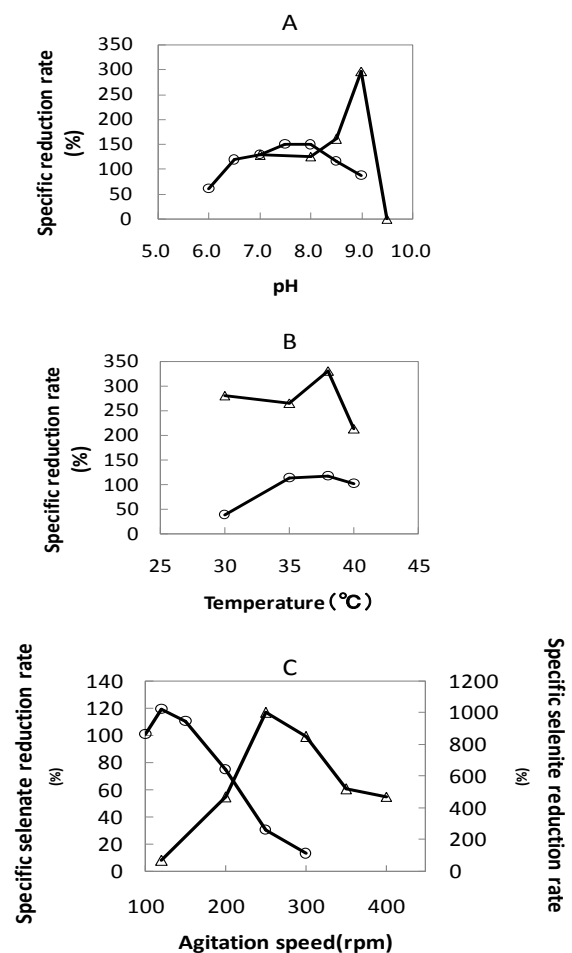


図1 セレン酸および亜セレン酸の比還元速度 (A)pHの影響 (B)温度の影響 (C)攪拌速度の影響 ○: セレン酸、△: 亜セレン酸

300rpm にした時、比還元率は 20% 以下となった (図 1C)。

セレン酸の還元速度は物理的な攪拌因子か、培養液中の酸素濃度に影響されると思われる。

以上の結果からセレン酸還元の最適条件は、38°C、pH7.5-8.0、120rpm であることがわかった。

NT-I 株のホールセルを用いたセレン酸還元最適は、40℃、pH8.0であった<sup>2)</sup>。ジャーファーメンターを用いた培養増殖系でのセレン酸還元能もほとんど同様な結果が得られたことになる。

続いて亜セレン酸還元最適化を行うために、ジャーファーメンターでの培養条件の検討を行った。条件検討はセレン酸還元と同様に、温度、pH、攪拌速度について行われた(図1)。培養条件は前述のセレン酸還元最適条件を求めた時と同様に、フラスコレベルでの増殖実験の結果から pH、温度の範囲を決定した<sup>2)</sup>。まず最初に pH を可変して還元能を調べた。亜セレン酸の比還元率は、pH9.0においてピークに達し、初期条件と比較して 297%と顕著に高い値が得られた。ところが pH9.5 では菌体がほとんど増殖せず、亜セレン酸の還元は観察されなかった(図1A)。以前行ったフラスコでの培養実験でも、pH10 では増殖しなかった<sup>2)</sup>、本結果は妥当だと思われる。次に温度を可変して還元能を調べた。亜セレン酸の比還元率は、温度による影響は少なく、30~40℃において比還元率はほぼ同じであった。しかし、初期条件と比較して調べたどの温度範囲でも、200%以上の還元率が上昇していることから、亜セレン酸の還元はセレン酸の還元と比較して影響が大きいと思われる(図1B)。最後に攪拌速度を可変して還元能を調べた。攪拌速度を 100rpm から 250rpm まで可変した場合、攪拌速度が速くなるほど比還元率は増加した。攪拌速度が 250rpm に時に比還元率はピークに達し、それ以降 300rpm を超えると比還元率は減少した(図1C)。比還元率は 200rpm 以上の攪拌速度で 400%以上と非常に高く、250rpm において 1003%と最も高くなった。これらの結果から、亜セレン酸還元最適条件は 38℃、pH9.0、250rpm であることがわかった。NT-I 株のホールセルを用いた亜セレン酸還元での最適は、50℃、pH7.0であった<sup>2)</sup>。ジャーファーメンターを用いた培養増殖系ではホールセルでの条件とかなり値の違いが見られた。これは亜セレン酸還元が反応溶液中の変因子によって大きな影響を受けているように示唆される。特に、ホールセル系では、酸化還元反応に重要な因子となる溶存酸素を測定することができない。このことは検討の余地があると思われる。

以上のジャーファーメンターを用いたセレン酸および亜セレン酸還元における培養条件最適化の結果を踏まえ、セレン酸から元素態セレンまで還元する場合の還元最適条件の決定を試みた。比

還元率の基とした初期培養条件(38℃、pH 調整なし、120rpm、1 L/min)ではセレン酸の還元は開始から 4 時間以内に終わるが、生成した亜セレン酸の還元は 23 時間もかかる。このことから亜セレン酸の還元が、処理時間短縮の課題であることが示唆された。そこでセレン酸から亜セレン酸を経由して元素態セレンを生成する還元最適条件は、セレン酸の還元が阻害されず、かつ亜セレン酸の還元速度が最も速い 38℃、pH9.0、250 rpm に決定することにした。なお、通気量は本実験では検討していないことから、最初に設定した 1 L/min を用いることにした。

### 3.2.2 最適培養条件下におけるセレンのトータルマスバランス

還元最適培養条件下(38℃、pH9.0、250rpm、1 L/min)でのセレンの挙動を調べるため、初期にセレン酸 0.5 mmol/L を添加した後に、固体・液体・気体の 3 相におけるセレン濃度の変化を経時的に測定した(図2)。図は横軸が時間を、縦軸が各形態のセレン濃度を示している。還元最適条件下において、セレン酸は培養開始 4 時間目に還元が始まり、6 時間目までにすべて還元された。続いて生成した亜セレン酸は培養 6 時間目(セレン酸還元終了時)に 0.42 mmol/L でピークになり、培養 7 時間目までにすべて還元された。

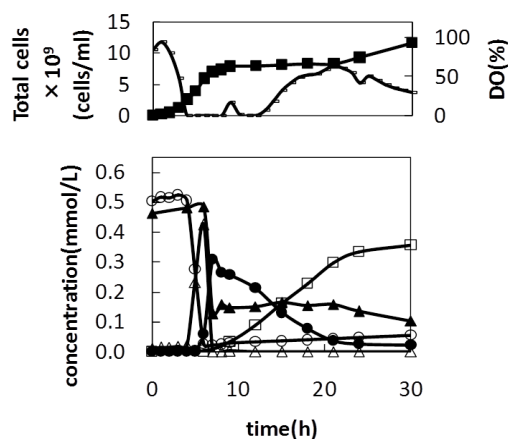


図2 最適条件下の培養におけるセレントータルマスバランスの変化  
○:セレン酸、△:亜セレン酸、▲:溶存セレン、●:元素態セレン、□気体セレン

還元最適培養条件では初期条件と比べ、すべてのセレンオキソアニオンが還元されるまでの時間が、23 時間から 7 時間に短縮された。つまり約 1/3 以下になった。培養 7 時間目の培養液中には、セレン酸および亜セレン酸は検出されていないことから、固体セレン、気体セレンを加算しても初

期添加量に見合うだけのセレン総量にならなかった。セレン酸および亜セレン酸以外の液体セレン、すなわち、溶液中に溶解している溶存セレン濃度を ICP-AES で測定したところ、培養 7 時間目に 0.13 mmol/L であった。未知の形態のセレン化合物が存在していると考えられた。溶存セレン濃度は、元素態セレンがほぼゼロになる 21 時間目まで一定であり、それ以降に徐々に減少した。減少した分だけ気化セレンに変換した様に思われる。

NT-I 株は亜セレン酸を還元し、固体である赤色の元素態セレンを生成する。最適条件下では、元素態セレン濃度は亜セレン酸の還元に伴い培養 6 時間目以降に増加し始め、培養 7 時間目（セレン酸および亜セレン酸が検出されない時間）の値が 0.31 mmol/L と最も高かった。元素態セレンはその後速やかに減少し、培養 24 時間目の値は 0.03 mmol/L であった。

NT-I 株は元素態セレンを気体セレンに変換するバイオボラタリゼーションを行うことが報告されている<sup>2)</sup>。そこでジャーファーメンター中の排気ガスを GC-MS で分析したところ、ジメチルジセレンが主要成分として検出された。また、微量ながらジメチルセレンも検出された。ジャーファーメンターの排気ガスを回収するために硝酸でトラップし、硝酸中のセレン濃度を測定したところ、培養 9 時間目からセレンが気化物としてトラップされて増加していることがわかった。気体セレンは元素態セレンの減少と反比例して増加し続け、培養 120 時間目が最も高く 0.36 mmol/L であった（表 1）。このときの気体セレンをトラップしている硝酸中の Se 総濃度は約 5 mmol/L であり、初発添加時の 10 倍近く濃縮されることがわかった。また、硝酸中の元素は ICP-AES による多元分析で調べたところ、セレンと硫黄のみが検出された。硫黄は培地成分由来だと思われる。そこで、培地成分中の硫黄の濃度を低減化できれば、硝酸中に高純度の Se をトラップすることができる。

以上の結果をまとめると、初発に添加したセレン酸 0.5 mmol/L を 100% として、培養 120 時間目のセレンマスバランスを示した（表 1）。セレン酸を基質として最適条件下で培養した結果、培養 120 時間目での回収率は、液体 10.5%、固体 4.0%、気体 71.2% で、3 相の合計は 85.8% であった。硝酸でメチル化セレンをトラップした場合の回収率は、81.3% であると報告されている<sup>4)</sup>。この回収

率を考慮すると気体セレンの見かけ上の収率は 87.6% となり、3 相のセレン濃度の合計は 102.2% となる。以上の結果から、培養 120 時間目における還元最適条件下でのセレンマスバランスはほぼ 100% となり、整合性がとれることがわかった。

### 3. 2. 3 セレン酸および亜セレン酸還元と DO の関係

これまでのフラスコレベルの NT-I 株の還元実験において、セレン酸は好気条件または嫌気条件のどちらにおいても還元されるが、亜セレン酸は好気条件でのみしか還元されないことが報告されている<sup>2)</sup>。しかしフラスコレベルでの還元実験では、溶存酸素（DO）が測定できなかったことなどから、セレン酸および亜セレン酸の還元と培養液中の DO の関係性は解明されていない。同様の還元反応にも関わらず、酵素存在下での挙動が異なることに興味を持ち、ジャーファーメンターを用いて様々な攪拌速度におけるセレン酸および亜セレン酸の還元と DO との関係性を調べた。

各攪拌速度でのセレン酸濃度と DO の変化を示した（図 3）。横軸は培養時間を、左の縦軸はセレン酸濃度を、右の縦軸は DO を示している。150rpm では、DO は培養開始 2 時間後に約 40% まで減少し、培養開始 3 時間目で DO がほぼ 0% となった。セレン酸還元は DO が 0% になった直後から開始し、培養 5 時間目までに終了した。200rpm では、培養開始 4 時間目までに DO が 0% となり、4 時間目以降減少し 5 時間目までにほぼすべてのセレン酸は還元された。250rpm では、培養開始 4 時間目までに DO が 0% となり、培養 6 時間目までに約 80% のセレン酸は還元され、培養 9 時間目までにはほぼすべてのセレン酸は還元された。300rpm では、培養 6 時間目に DO がほぼ 0% まで減少し、その直後からセレン酸の還元が開始した。その後培養 9 時間目に DO 約 40% まで上昇し、この時点でセレン酸の還元は約 0.2 mM で停止した。DO はその後も上昇し 12 時間目以降から 80% 前後を維持したまま変化せず、セレン酸の還元も停止した。これらの結果から、セレン酸の還元は、攪拌速度に関係なく DO の値がほぼ 0% で進行することがわかった。

次に、先ほどの実験とは異なる値の攪拌速度を用いて、各攪拌速度での亜セレン酸濃度と DO の変化を示した（図 4）。横軸は培養時間を、左の縦

表1 各相のセレン収量

cultivation condition	soluble Se		elemental Se		gaseous Se		Total	
	mmol/L	%	mmol/L	%	mmol/L	%	mmol/L	%
optimal*1	0.05	10.5	0.02	4.0	0.36	71.2	0.43	85.8
elemental recovery*2	0.04	8.7	0.44	87.8	N.D.	N.D.	0.48	96.0

\*1 pH9.0, 38°C, 1 L/min, 250rpm, 120h

\*2 pH9.0, 38°C, 0 L/min, 250rpm, 22h

N.D.; Not determined

軸は亜セレン酸濃度を、右の縦軸は DO を示している。200rpm では、培養 3 時間目で DO はピークに達し 90% あった。培養 9 時間目に亜セレン酸の還元が開始され、DO は急激に減少して 0% となった。その後、培養 15 時間目にはすべての亜セレン酸が還元され、DO は 40% まで上昇した。

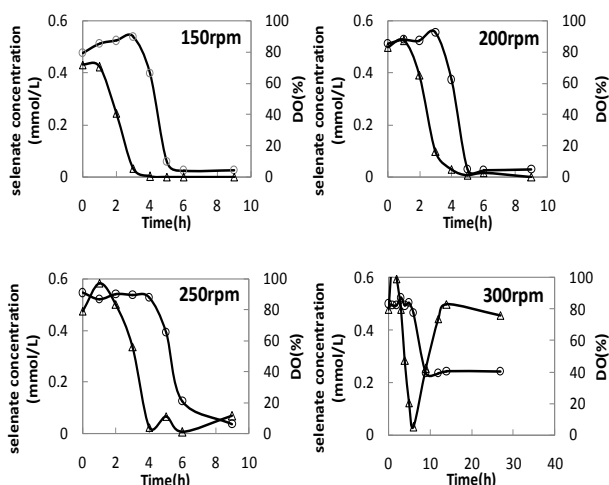


図3 セレン酸還元と溶存酸素(DO)の関係  
○: セレン酸、△: DO

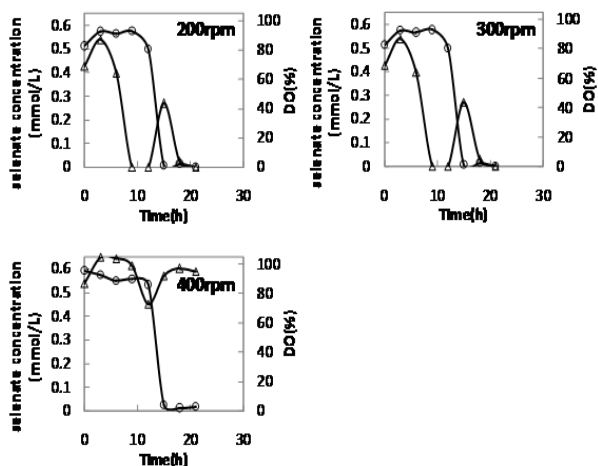


図4 亜セレン酸還元と溶存酸素(DO)の関係  
○: 亜セレン酸、△: DO

300rpm では、6 時間目以降から亜セレン酸の還元が始まり、DO が急激に減少した。培養 9 時間目に DO はほぼ 0% となり、亜セレン酸が約 0.3 mM まで還元された。培養 12 時間目ではすべての亜セレン酸が還元され、DO は 40% まで上昇した。400rpm では、DO は常に高い値に維持され

た。培養 12 時間目で DO は 70% と最も低くなり、亜セレン酸の還元が開始し、15 時間目までに終わった。

以上の結果から、どの攪拌速度においても DO は亜セレン酸還元中に減少し、亜セレン酸還元終了後に上昇した。以上の結果から、亜セレン酸の還元は酸素を消費していることが示唆された。また、亜セレン酸の還元は、DO が 0% になる必要はなく、DO が高いままでも還元が進行することがわかった。これはセレン酸の還元は DO がゼロにならないと起こらないこととは対照的である。つまり亜セレン酸の還元は DO に因らないで生じると思われる。

### 3. 3 まとめ

セレンは電子材料、鋼材の添加剤、ガラスの着色脱色剤、化学触媒などの幅広い用途に利用されているが、排水中での存在形態であるオキシアニオンは生物に対して、慢性、急性の毒性を有することから、我が国においては平成 6 年 2 月に水質汚濁防止法によって 0.1mg/L という厳しい排水基準が設置された。しかし、実用に耐える排水処理技術は未だ確立されたとはいえず、特に、セレン酸を排水中から除去することは容易ではない。現在のところ最も有効なセレン含有排水の処理技術は触媒還元でセレン酸を亜セレン酸にまで還元した後、鉄塩やアルミ塩などの凝集剤を大量に加えて凝集沈殿し、固液分離にて除去する方法であるが、セレン酸の還元や凝集沈殿に必要なエネルギー、薬剤など資源の消費が大きく、経済的ではない。また、セレンは凝集沈殿により鉄等の化学汚泥中に吸着されるが、その含量が 1% 程度以下と低いことから、資源としてリサイクルする価値が無く。現状では脱水された後、産業廃棄物としてコストをかけて廃棄処分するしかない。言い換えれば、一旦排水中に移行したセレンは高いコストをかけて排水基準を満たすよう、どうにか除去されているものの、資源として回収されることはなく失われてしまう。

セレンは様々な生物地化学作用によって、気圏、水圏、土壌圏を循環している<sup>5)</sup>。このうち水圏に存在するセレン酸や亜セレン酸は、主に微生物の還元作用により元素態セレン等の固形セレンとなって土壌圏へ移行することが知られ、バイオミネラルイゼーション作用と呼ばれる。固形セレンは還元、メチル化されることで気相に移行し、これをバイオボラタリゼーション作用と呼ぶ。化学的に行うセレン酸や亜セレン酸の固相や気相への還元

は経済的に合わないが、微生物反応は理論上は非常に安価になり得るため、効率的なセレン代謝微生物を獲得することができれば、低コストで水溶性セレンを固相あるいは気相へと分離・除去するプロセスが実現できる。

排水からのセレン回収プロセスを実現できる代謝微生物の候補として、セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を取得した<sup>2)</sup>。NT-I 株は好気条件下で、セレン酸を速やかに還元し亜セレン酸を経て元素態セレンに転換する特長をもつセレン酸還元細菌であり、セレン精錬工場の排水溝に形成された生物膜より分離した。これまでに報告されているセレン酸還元細菌<sup>6-8)</sup>の何れにも劣らない速度で元素態セレンに転換することができる。本報告では、ジャーファーマンターを用いて *P.stutzeri* NT-I 株のセレン酸および亜セレン酸還元の最適化を行い、NT-I 株によるセレン回収プロセスの可能性を検討した。模擬排水を用いて還元最適化条件を決定した。亜セレン酸還元はセレン酸還元より、還元速度が遅いことから、セレン酸から亜セレン酸を介して元素態セレンを合成する場合、亜セレン酸還元が律速段階になっていることが分かった。そこでセレン酸還元を阻害しない条件で、亜セレン酸還元の最適化を行った。その結果、還元培養上条件を 38°C、pH9.0、250rpm に決定した。NT-I 株をこの条件下で、初期濃度 0.5 mM のセレン酸を添加したところ 7 時間という高速で還元することがわかった。還元時間の短縮は、Se 除去・回収リアクターの運用において非常に重要であり、1 日当たりの処理能力が大幅に向上し、設備規模の縮小や省コスト化につながる。

セレン酸や亜セレン酸の還元状態を培地中の溶存酸素の観点から調べてみた。セレン酸の還元は、DO の値が 0% になってから始まることがわかった。まず、初期の好気条件において NT-I 株が増殖していく。菌体量が増加するに連れて、酸素の消費量が増えていく。培地中の溶存酸素は無くなり、嫌気的環境に変化していく。嫌気的環境が整い還元が進んでいくに従って、セレン酸の還元が進行していくと考えられる。一方で、亜セレン酸の還元は通気を行った場合の方が、通気を行わない場合よりも約 2.6 倍促進されていることが分かった。亜セレン酸の還元は、セレン酸の還元とは異なる機構で進行し、酸素が還元反応を促進していることが示唆された。

還元最適条件での培養においてセレン酸は、速やかに亜セレン酸、元素態セレンに還元され、其

の後、メチル化セレンに変換されて、初期添加量の約 71.2% が気体セレンとして硝酸にトラップされた。培養液中に存在するセレン酸でも亜セレン酸でもない溶存セレン濃度は、元素態セレン存在下においてはほぼ一定量の存在していた。しかし、元素態セレンがなくなると、減少する傾向が見られた。気体セレンは元素態セレン消失後も増加していることから、元素態セレンがメチル化され液中に溶存した後に、揮発化して気体セレンとなるプロセスが考えられる。

以上の結果を総合的にまとめると、*P.stutzeri* NT-I 株は、セレン酸および亜セレン酸の両水溶性セレンをバイオミネラルイゼーション、さらには、バイオボラタリゼーションを行うことに長けた、セレン代謝能が優れた菌株である。NT-I 株はセレン酸または亜セレン酸を含む排水から、固体セレンまたは気体セレンを回収することができる可能性が高いことを示す生体触媒である。

#### 4. 参考文献

- 1) Fujita M *et al.*: Isolation and characterization of a novel selenate-reducing bacterium, *Bacillus* sp. SF-1. *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 517-522, 1997.
- 2) Kuroda, M. *et al.*: Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. *J. Biosci. Bioeng.*, 112(3), 259-264, 2011.
- 3) 池道彦: メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回収, CMC 出版, p27-33, 2009.
- 4) Winkel, L. *et al.*: Quantitative and qualitative trapping of volatile methylated selenium species entrained through nitric acid. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 382-387, 2010.
- 5) Haygarth, P. M.: Global importance and global cycling of selenium. 1-27. W. T. Frankenberger, Jr. and S. Benson. (ed.) in *Selenium in the environment*. Marcel Dekker, Inc, NY, 2011.
- 6) Losi, M. E. *et al.*: Reduction of selenium oxyanions by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1: Isolation and growth of the bacterium and its expulsion of selenium particles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3079-3084, 1997.
- 7) Macy, J. M. *et al.*: Selenate reduction by a *Pseudomonas* species: a new mode of anaerobic respiration. *FEMS Microbiol. Lett.*, 61, 195-198, 1989.
- 8) Oremland, R. S. *et al.*: Isolation, growth, and metabolism of an obligately anaerobic,

selenate-respiring bacterium, strain SES-3. Appl. Environ. Microbiol., 60, 3011-3019, 1994.

5. 学会投稿状況

(1) Mitsuo Yamashita.: Phytoremediation for soils contaminated by heavy metals using the symbiosis between *Astragalus sinicus* with rhizobacteria. Chapter 7. M. Ike, M. Yamashita, and S. Soda. (eds.) in Handbook of Metal Biotechnology: Applications for Environmental Conservation and Sustainability. Pan Stanford Publishing, 2011.

(2) 山下光雄:「レンゲと根粒菌の共生による重金属ファイトレメディエーション」197-203, 植物機能のポテンシャルを活かした環境保全・浄化技術～地球を救う超環境適合・自然調和型システム～. CMC 出版, 2011.

Ike.: Laboratory-scale bioreactors for soluble selenium removal from selenium refinery wastewater using anaerobic sludge. Desalination 279, 433-438, 2011.

(4) Masashi Kuroda, Emi Notaguchi, Akiko Sato, Masaya Yoshioka, Ai Hasegawa, Tsubasa Kagami, Takano Narita, Mitsuo Yamashita, Kazunari Sei, Satoshi Soda, and Michihiko Ike.: Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. J. Biosci. Bioeng., 112(3), 259-264, 2011.

(5) Masashi Kuroda, Mitsuo Yamashita, Kanako Imao, Noriyuki Fujimoto, Hisayo Ono, Kouta Nagano, Emiko Miwa, Kazunari Sei, and Michihiko Ike.: Molecular cloning and characterization of the *srdBCA* operon encoding the respiratory selenate reductase complex from the selenate-reducing bacterium, *Bacillus selenatarsenatis* SF-1. J. Bacteriol., 193(9), 2141-2148, 2011.

(3) Satoshi Soda, Masami Kashiwa, Tsubasa Kagami, Masashi Kuroda, Mitsuo Yamashita, and Michihiko

# セレン還元酵素を用いたセンサーの開発

[所属機関名・所属部局名 研究分担者]  
(芝浦工業大学・工学部応用化学科 今林 慎一郎)

## 1. 研究目的

レアメタルに含まれるセレンは半導体の原料など先端技術に使われる重要な元素で-2, 0, +4, +6の酸化数をとるが、毒性のあるセレン酸(+6)または亜セレン酸(+4)の形で工場廃水などに溶け、廃水から環境へ流出することが問題になっている。本研究で対象とするセレン酸還元菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I は報告されているセレン酸還元菌の中で最も高いセレン酸や亜セレン酸の還元能をもつグラム陰性の好気性桿菌である。<sup>1)</sup> NT-I が有するはセレンオキシアニオンを水に難溶性で毒性の低い元素態セレンに還元できる能力を、工業排水中に含まれるこれらセレンオキシアニオンの除去や元素態セレンとしての回収に応用することが期待されている。

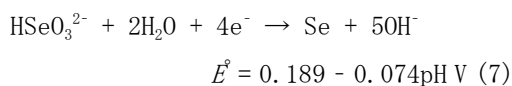
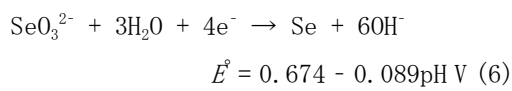
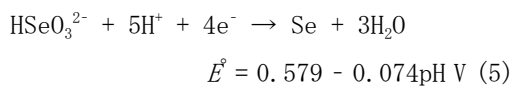
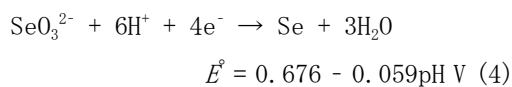
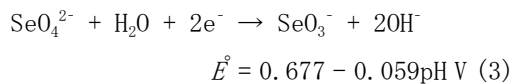
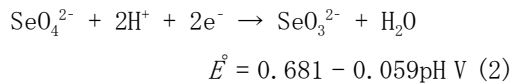
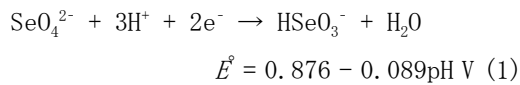
酸化還元酵素や微生物に含まれる酵素の触媒反応を電極反応と共役させた酵素電極反応系は生物燃料電池やバイオセンサーなどに利用できる。さらに、自然環境中の微生物の増殖や代謝を電氣的に制御することも考えられている。セレン酸還元菌 NT-I を利用した酵素電極反応系を構築できれば、廃水中のセレンオキシアニオン濃度を簡便に定量できるセンサーや廃棄物から電気エネルギーを取り出す微生物燃料電池に展開できる可能性がある。本研究は、セレン酸還元菌（あるいは単離されたセレン酸あるいは亜セレン酸還元酵素）を用いた酵素電極反応系の構築、さらにこの酵素電極反応系をベースにセレンオキシアニオンセンサーの作製を目的としている。酵素触媒反応と電極反応を電氣的につなぐ方法として、直接的な電子移動経路を構築する方法と適当な酸化還元物質（メディエータ）を仲介させて電子移動経路を構築する方法がある。<sup>2)</sup> 平成 23 年度本年度は後者（メディエータ型電子移動経路）構築の可能性を

検討した。

電子移動経路構築において、反応を担う酵素の構造や酸化還元特性は重要な知見であるが、NT-I による好気・嫌気条件下のセレン酸還元を担っている酵素は下記のように十分解明されていない。セレン酸還元酵素は精製・単離されていないが、構造遺伝子および推測されるアミノ酸配列が 83～95%という高い相同性を示す *T. selenatis* の酵素 SerABC と同様の構造をもった3つのサブユニットから成る水溶性のモリブデン酵素であり、ペリプラズム中に存在すると推測されている。SerC に含まれる heme-*b* が電子供与体から電子を受け取り、SerB を経由して SerA の molybdopterin 補因子に移動した電子によりセレン酸が亜セレン酸に還元される。*T. selenatis* の heme-*b* の電位は 0.035 V vs. Ag | AgCl と報告されている。<sup>3)</sup>

一方、亜セレン酸還元を担っている酵素については特定もされていない。元素態セレンのナノ粒子が菌体外に生成することから、ペリプラズム中もしくは細胞表面に存在し、菌体細胞内のチトクロムなどが酵素に電子を渡していると推測される。

基質であるセレン酸や亜セレン酸は pKa 値から、NT-I が増殖できる 6.5-9.0 の pH 域では前者は  $\text{SeO}_4^{2-}$ 、後者は  $\text{HSeO}_3^-$  あるいは  $\text{SeO}_3^{2-}$  として存在していると考えられる。セレン酸あるいは亜セレン酸の酸化還元電位は pH に依存し、セレン酸および亜セレン酸の活量が 1 と仮定すると、下記のような (V vs, Ag|AgCl)。実際に実験を行なった pH 7 ではセレン酸の還元電位は+0.26 V、亜セレン酸の還元電位は+0.26~-0.33 V 程度と見積もられる。<sup>4)</sup>



以上のデータから、メディエータからセレン酸あるいは亜セレン酸へ自発的に電子が流れるためには、*T. selenatis* の heme-*b* の電位 0.035 V あるいはセレン酸、亜セレン酸の還元電位の下限-0.33 V よりも負の酸化還元電位を持つ物質がメディエータとして相応しいと考えられる。

NT-I におけるセレンオキシアニオン還元を担う酵素は単離されていないため、本研究では微生物を様々な酵素が入った袋と捉え、ホールセルを電極表面に固定化して酵素電極系を構築できるかを検討した。この場合、メディエータがペリプラズム内の酵素と電子授受

するためには微生物細胞の外膜を透過する必要があるが、ポリンと呼ばれる膜貫通タンパク質の孔をメディエータが出入りする過程は律速にならないことが報告されている。<sup>5)</sup>

## 2. 研究計画

### 平成 23 年度

セレン酸還元菌ホールセルあるいはセレン酸還元酵素を用いた酵素電極反応系を構築する方法として、メディエータ型電子移動経路構築の可能性について検討する。

### 平成 24 年度

セレン酸還元菌ホールセルあるいはセレン酸還元酵素を用いた酵素電極反応系を構築する方法として、メディエータ型電子移動経路（平成 23 年度より継続）のみならず直接電子移動経路についても構築の可能性を検討する。

### 平成 25 年度

平成 23, 24 年度の検討結果を基に、セレン酸還元菌ホールセルを用いた酵素電極反応系を構築する。

### 平成 26 年度

平成 25 年度に構築したセレン酸還元菌ホールセルを用いた酵素電極反応系を基に、水溶性セレン（セレン酸、亜セレン酸）センサーのプロトタイプを作製する。

### 平成 27 年度

平成 26 年度に作製した水溶性セレン（セレン酸、亜セレン酸）センサーの性能評価を行って実用上の問題点を明らかにすると同時に、これを解決するための方法などを検討する。



さらに、可能ならば酵素電極反応系の他の応用展開について探索する。

### 3. 計画の進行状況

#### 3.1 メディエータ型酵素電極構築のための実験系の検討

(1) NT-I 菌体を懸濁させた溶液を用いた検討  
 次の方法で寒天培地から培養した菌体を用いた。4°Cで保存されているコロニーを白金耳により試験管内の TSB 培地に植菌し、24 時間培養した。この培養液を遠心分離にかけて集菌し、10 mmol dm<sup>-3</sup> リン酸緩衝液 (pH 7) に懸濁させた。懸濁液の 600nm における吸光度 (OD<sub>600</sub>) を菌体量の指標としたが、OD<sub>600</sub> = 0.1 ~ 1 は菌体量 1 × 10<sup>8</sup> ~ 1 × 10<sup>9</sup> cell mL<sup>-1</sup> に相当した。

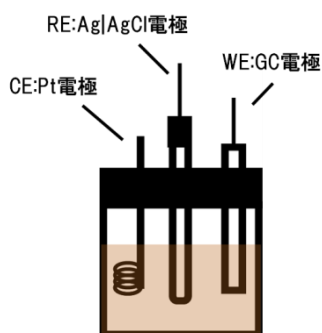


図 1 懸濁系における測定セルの模式図

表 1 検討したメディエータの酸化還元特性

メディエータ	式量電位 (V vs. Ag AgCl)	$\Delta E_p$ (mV)
MV	-0.63	65
BV	-0.56	58
ARS	-0.55	70
NR	-0.53	38
SF (Safranin)	-0.48	53

VK3	-0.21	119
HQ	+0.10	319

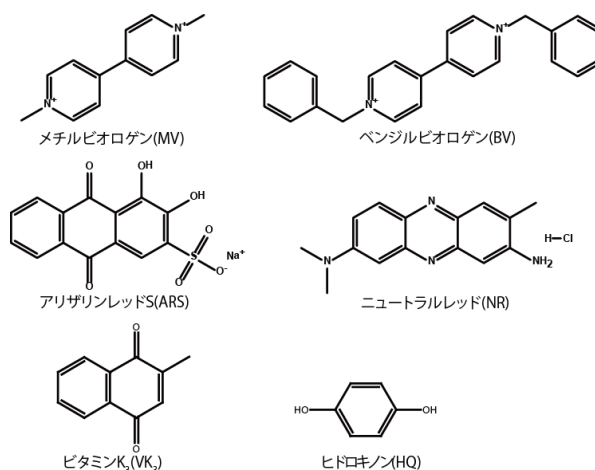


図 2 使用したメディエータの構造

電気化学測定には図 1 に示す 3 電極セルを用いた。本研究で使用したメディエータの電気化学特性および化学構造をそれぞれ表 1 および図 2 に示す。実験系の検討には最も負な式量電位を有し、電子供与性が大きいメチルビオロゲン MV を用いた。Ar バブリングを 15 分間行って除酸素した 1.0 mmol dm<sup>-3</sup> MV を含む NT-I 懸濁液 (OD<sub>600</sub> = 0.3) に亜セレン酸を加えた時のサイクリックボルタモグラム (CV) が、亜セレン酸を加えると触媒電流の典型的な形であるシグモイド型に変化し、図 4 のような電極系が構築できたと考えられる。MV の式量電位よりほぼ 0.1 V 負電位の -0.75 V における電流値 (亜セレン酸濃度 0 のときの電流値との差) を触媒電流値  $I_{cat}$  とし、亜セレン酸濃度に対してプロットすると、図 5 に示すようにミカエリス・メンテン型のプロットが得られた。亜セレン酸 10 mmol dm<sup>-3</sup> を超えると  $I_{cat}$  が低下したが、後述するように緩衝

能を超える亜セレン酸が添加されたことによって溶液 pH が変化したこと起因すると思われる。亜セレン酸 0~2 mM の範囲でプロットの直線性が得られ、センサーへ応用可能なことが示唆された。

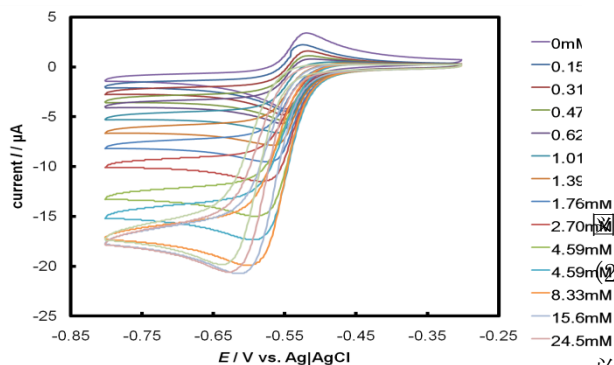


図 3 MV を含む NT-I 懸濁液に亜セレン酸を加時の CV

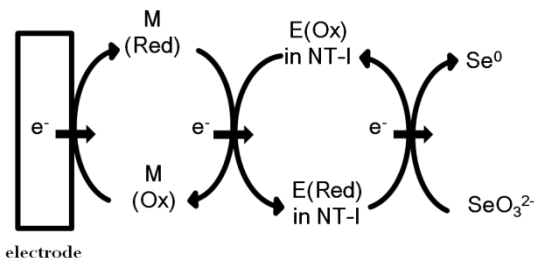


図 4 懸濁系におけるメディエータ型電子移動経路

次いで、亜セレン酸を基質飽和濃度  $20 \text{ mmol dm}^{-3}$  に固定して、メディエータの最適濃度を調べた。[MV] =  $0 \sim 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  において触媒電流値は MV 濃度に対して直線的に増加したが、 $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  を越えると電流の減少は見られないものの直線性が崩れた。以上より、今

後の実験ではメディエータ濃度を  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  とした。

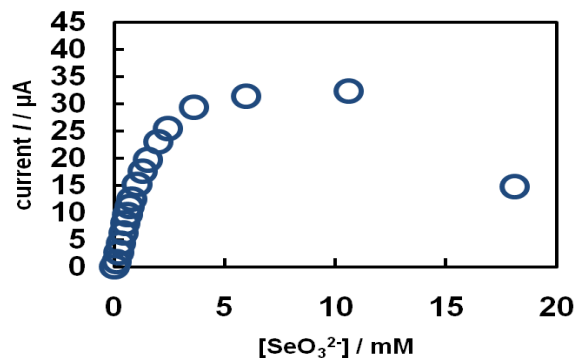


図 5 触媒電流と亜セレン酸濃度の関係

NT-I 菌体を固定化した電極を用いた検出センサー利用には電極上への菌体固定化が必要である。菌体数と菌体の存在する空間の体積の比を考えると、固定化によって菌体濃度を懸濁系よりも増加し、検出感度が上昇することも期待される。図 6 のように NT-I 懸濁液をグラッシーカーボン電極 (GCE) 表面に滴下し、乾燥させた後にポリカーボネート膜 (孔径  $0.4 \mu\text{m}$ ) を被覆した。NT-I 菌体の大きさは  $1.0 \mu\text{m}$  以上なので、孔径  $0.4 \mu\text{m}$  の膜により電極表面近傍に閉じ込めることが可能である。

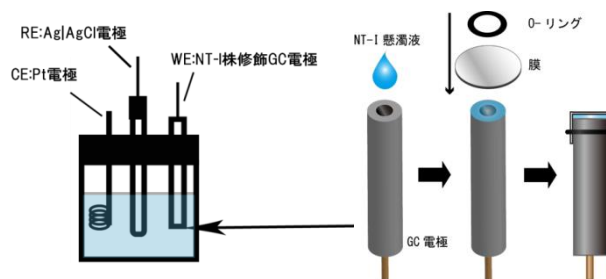


図 6 固定化系における測定セルの模式図

$\text{OD}_{600} = 2.0$  の NT-I 懸濁液を  $20 \mu\text{l}$  滴下した場合は明確に触媒電流が減少し、NT-I 濃度が

濃すぎるために電極表面に菌体の層ができ、電極と MV の反応を妨害したと推察された。次いで、 $OD_{600}$  を 0.6 に下げると、図 7 に示すように懸濁系よりはかなり小さいが触媒電流が観察された。 $OD_{600}$  を 0.05、0.1、0.3 と変化させて亜セレン酸濃度に対する電流値の変化を観測した結果、0.3 の時に触媒電流値が最大となった。全ての場合において亜セレン酸濃度が  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$  を超えると電流値が減少した。前述のように緩衝能を超える亜セレン酸が添加されたためと考えているが、懸濁系よりも低い亜セレン酸濃度から減少が見られた。

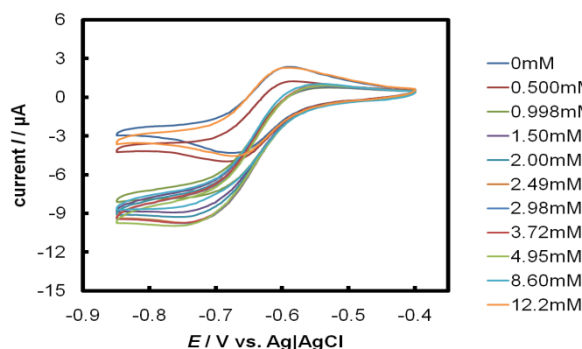


図 7  $OD_{600} = 0.6$  の NT-I 懸濁液を用いて作製した電極で測定した CV

### (3) 電極応答の再現性を指標にした NT-I 株培養方法の検討

寒天培地から培養した菌体の懸濁液 ( $OD_{600} = 0.3$ ) で作製した固定化電極を用いて、亜セレン酸濃度  $0 \sim 15 \text{ mmol dm}^{-3}$  の範囲で繰り返し測定した。亜セレン酸濃度増加に伴う触媒電流値増加の程度について測定毎のバラつきが大きく、再現性が低いことがわかった。

次いで、ジャーファーメンターを用いて条件を揃えて大量培養した ( $\text{pH}9.0$ 、 $38^\circ\text{C}$ 、攪拌速度  $250 \text{ rpm}$  で 7 時間培養) 菌体を用いて同

様の測定を行った。NT-I 培養液を遠心分離して得られた沈殿を凍結乾燥した乾燥菌体を  $4^\circ\text{C}$  以下で保存し、使用時に  $10$  または  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$  リン酸緩衝液 ( $\text{pH}7$ ) に懸濁させた。触媒電流値と亜セレン酸濃度の関係について再現性の向上が見られたので、今後の測定はジャーファーメンターによって培養した乾燥菌体を用いて行うこととした。

### 3.2 亜セレン酸還元可以使用できるメディエータの検討

表 1 に示した MV 以外の物質について、メディエータとして機能するかを検討した。NR や SF でピークセパレーションが 1 電子可逆反応の理論値  $59 \text{ mV}$  を下回っているが、電極表面  $0.998 \text{ mM}$  へ吸着した物質の反応を含むためと考えられる。実際、実験中に白金線への強い吸着が観察されている。なお、化学構造からは、MV と BV がビオロゲン化合物、ARS, VK3, HQ がキノン化合物、NR と SF がフェナジン化合物に分類される。

メディエータとしての可能性を基礎的に検討するため、複雑なファクターを含まない懸濁系を用いた。菌体懸濁溶液の  $OD_{600}$  は全て  $0.3$  とし、電気化学測定前に Ar バブリングを 15 分間行なって除酸素した。MV と BV 以外の物質については、亜セレン酸濃度の増加に伴って CV ピークのネガティブシフトが観察されたが、 $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  リン酸緩衝液の緩衝能を超えるために pH が変化したと考えた。特に、キノン化合物は pH が大きくなるとネガティブ側に電位シフトすることが知られている。比較的弱い酸である亜セレン酸を大量に加えた結果、pH が増加したことが考えられる。そこで、NR、SF、VK3 については、リン酸緩衝

液の濃度を  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$  にして CV 測定したところ、電位シフトがなくなったので、pH の変化が電位シフトの原因であることが確認された。

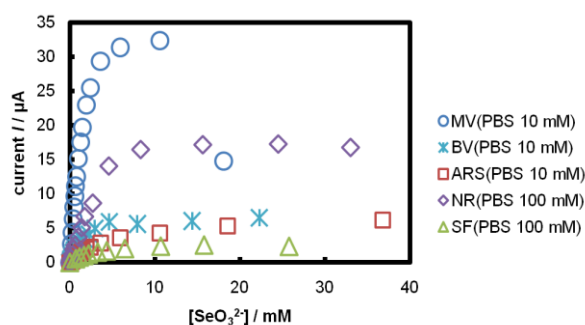


図 8 NT-I 懸濁系において測定した各種メディエータに関する触媒電流と亜セレン酸濃度の関係

HQ や VK3 では触媒電流が観察されなかった。NR では緩衝液の濃度を上げたことで電流値の増加が観察された。すなわち、触媒電流がリン酸緩衝液のイオン強度によって変化することを示唆している。MV、BV、ARS では  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  のみ測定を行なったため、今後緩衝液のイオン強度の影響を検討する必要がある。リン酸緩衝液の濃度が異なるので単純に比較できないが、各物質の式量電位よりも  $100 \text{ mV}$  負の電位における触媒電流値を亜セレン酸濃度に対してプロットした(図 8)。得られた結果から、以下のことがわかった。

- MV を用いた時に最大の触媒電流値が得られた。しかし、亜セレン酸高濃度域で見られた電流の減少は MV のみで見られる現象である。
- HQ や VK3 で触媒電流が得られないのに対して、他のメディエータでは触媒電流が得られたことから、亜セレン酸還元酵素の電子の

入口の電位は  $-0.21 \sim -0.48 \text{ V vs. Ag|AgCl}$  にあると予想される。

- 式量電位がネガティブな物質ほど得られる触媒電流値が大きい傾向があるが、NR は BV や ARS よりも大きく、触媒電流値がメディエータ電位のみ依存するわけではない。
- ビオロゲン化合物、キノン化合物、フェナジン化合物から少なくともひとつの物質はメディエータとして機能しており、化合物構造はメディエーション能の決定因子ではない。
- NR について、緩衝液濃度が  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$  の方が  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  よりも大きな触媒電流が得られ、触媒電流値の大きさがリン酸緩衝液濃度に依存して変化する可能性が得られた。他のメディエータについても検討する必要がある。

これまでの測定では NT-I 懸濁液の除酸素を行なったが、ARS ( $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) をメディエータに使用した系で除酸素の有無による影響を検討した。除酸素していない場合はしている場合に比べて、ARS のみの CV において酸化電流が小さくなり、還元電流が大きくなった。脱気を行わない場合、還元掃引で精製した ARS 還元体が溶存酸素によって酸化されるため、折り返しの酸化掃引における酸化電流値の減少がおきたと考えられる。よって、NT-I による触媒電流を正確に観察するためには、除酸素が必要と考えられる。

### 3.3 セレン酸還元を使用できるメディエータの検討

#### (1) NT-I 菌体を懸濁させた溶液を用いた検討

3.2 と同様の方法で、セレン酸還元を使用できるメディエータの検討を、表 1 に示した物質について行った。

- MV, BV, ARS, VK3 についてはセレン酸添加後、CV における酸化電流が減少し、還元電流が顕著に増加した(図 9、10)。よって、これら4種のレドックス活性物質は NT-I の whole cell 中に含まれるセレン酸還元酵素と電極の間の電子メディエータとして機能することがわかった。

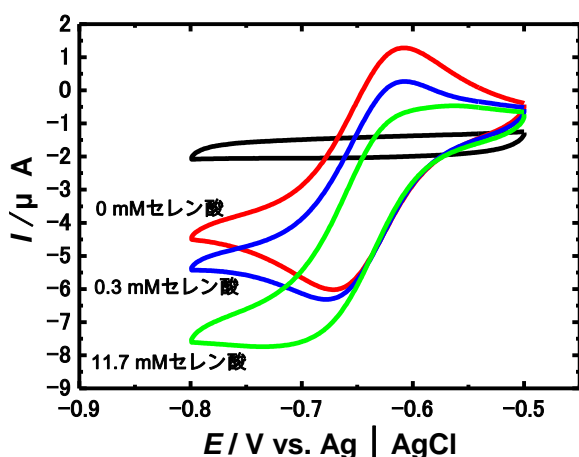


図9 1 mmol dm<sup>-3</sup> MV を含む NT-I 懸濁系において測定した CV

- MV, BV, ARS をメディエータに用いた場合は触媒電流の流れ始める電位(開始電位)が、メディエータの還元開始電位とほぼ一致したのに対し、VK3 では触媒電流の開始電位が VK3 の式量電位よりもかなり負にシフトした。VK3 は酵素触媒反応の速度が遅い、もしくは反応が起こりにくいことが考えられる。

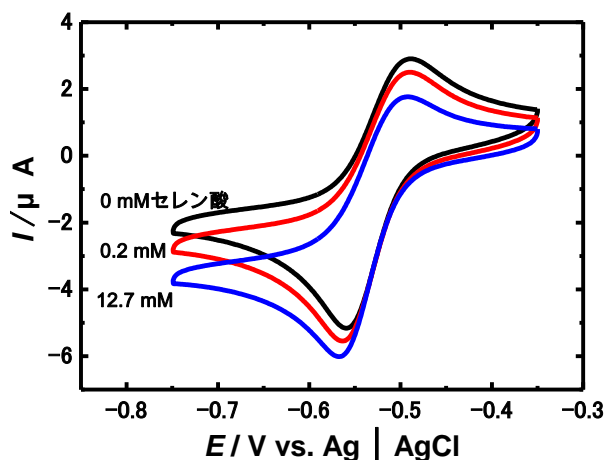


図10 1 mmol dm<sup>-3</sup> ARS を含む NT-I 懸濁系において測定した CV

- NR の CV おいても、セレン酸添加により還元電流値がわずかに増加し、セレン酸還元酵素と電極の間の電子メディエータとして機能していると考えられる。ただし、電極へ吸着しやすい問題がある。
- 式量電位が -0.19 V vs. Ag | AgCl よりネガティブなレドックス活性物質 MV, BV, ARS, NR, VK3 で触媒電流が観測されたことから、電子メディエータと反応する NT-I のセレン酸還元酵素のサブユニットは  $E^0$  が -0.19 V vs. Ag | AgCl よりポジティブであると推測される。この値は *T. selenatis* の heme-*b* の電位 0.035 V より 50 mV 負である。
- ビオロゲン系化合物である MV と BV の最大触媒電流  $I_{\max}$  は、キノン系化合物である ARS と VK3 の  $I_{\max}$  と比べて 2.5-7.5 倍大きな値となった。しかし、亜セレン酸還元の触媒電流値(図 8)と比べると 1/10 であった。
- 酸化還元の式量電位がより負電位な物質

ほど酵素反応の速度が速く、効率的な電子移動が起こる傾向が観られた。

- $k_m$ については、キノン系化合物であるARSとVK<sub>3</sub>の $k_m$ は、Notagutiらによって報告された値に近い値となった。<sup>6)</sup> また、キノン系化合物はビオロゲン系化合物に比べて比較的低濃度のセレン酸にも効率的な還元が可能であることが示された。

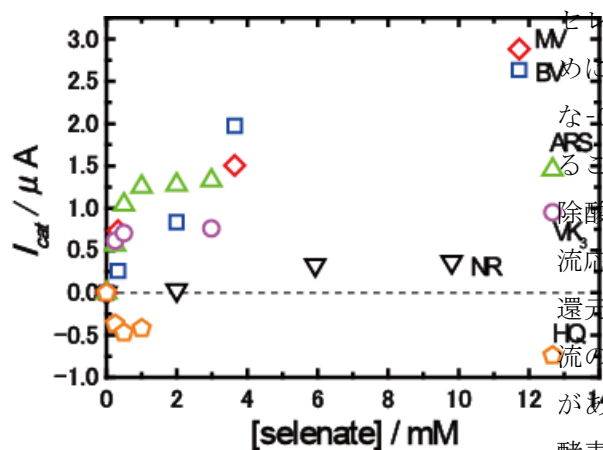


図 11 触媒電流とセレン酸濃度の関係

## (2) ARS をメディエータに用いた酵素電極反応系の検討

検討したメディエータのなかでは、ビオロゲン化合物を用いた場合に最大の触媒電流値が得られたが、セレン酸還元菌 NT-I が存在しなくてもビオロゲン化合物が存在すればセレン酸の還元反応が起こることがわかった。しかし、VK<sub>3</sub> をメディエータに用いた場合は、NT-I 非存在下のセレン酸還元反応が起こらなかった。NT-I 非存在下のセレン酸還元反応については今後、より詳細に検討する必要がある

る(両反応の切り分けは平成 24 年度に実施する予定)が、ここでは VK<sub>3</sub> をメディエータとして用いて、①NT-I 懸濁溶液中で CV 測定を行ってセレン酸の添加による還元電流の増加に NT-I が関与しているかどうかを確認するとともに、②触媒電流の NT-I 濃度依存性および触媒反応による電流応答の経時変化を測定した。さらに、NT-I を電極上に固定化した電極を用いて CV 測定を行い、NT-I 固定化電極系について検討した。

VK<sub>3</sub> を電子メディエータに用いた NT-I のセレン酸還元における電流応答を測定するために、VK<sub>3</sub> の式量電位よりも十分ネガティブな -0.35 V vs. Ag|AgCl に電極電位を固定することで常に VK<sub>3</sub> の還元が起こる状態にして、除酸素下で NT-I のセレン酸還元に対する電流応答を観測した。セレン酸を添加すると、還元電流値の大きな増加が観測されたが、電流の増加分とセレン酸濃度の間には比例関係があり、セレン酸濃度の増加に伴って NT-I の酵素触媒反応サイクルが回転していることを示している。また、セレン酸の添加直後に触媒電流は増加するが、徐々に減少し、一定値になるまでに約 5 分程度要することがわかった。

次に、NT-I 菌体を固定化した電極について VK<sub>3</sub> を電子メディエータとして除酸素下で電極触媒反応を CV により観測した。セレン酸非存在下においては、VK<sub>3</sub> の酸化波・還元波のみが得られた。セレン酸を添加すると、酸化電流の顕著な減少と還元電流の増加が観測された。よって、電極に固定した NT-I のホールセル中に含まれるセレン酸還元酵素がセレン酸および VK<sub>3</sub> と反応し、セレン酸還元による酵素電極反応サイクルが回転していると推察

される。図 12 は  $-0.35 \text{ V vs. Ag} | \text{AgCl}$  における CV 還元電流値とセレン酸濃度の関係について、NT-I 固定化電極と NT-I 懸濁溶液とを比較した。NT-I 固定化電極では、NT-I 懸濁溶液と同様にセレン酸濃度の増加に伴い触媒電流が増加した。NT-I 固定化電極では、電極表面の NT-I 濃度の違いにより NT-I 溶液と比べて約 1/2 に電流値が減少したがプロットの形状はほぼ一致し、セレン酸濃度の低い領域でも触媒電流が観測された。

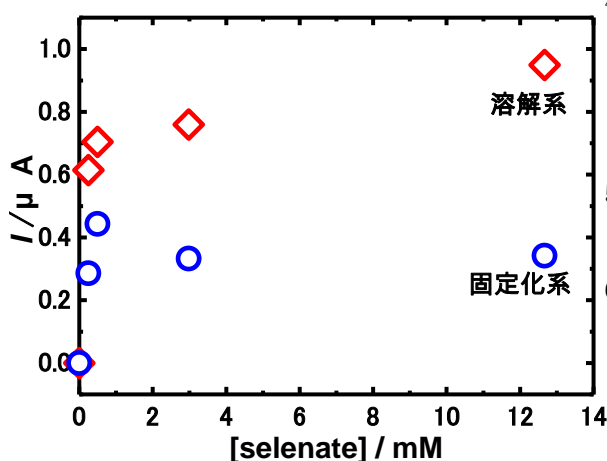


図 12  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  VK3 をメディエータとして用いた場合の NT-I 懸濁液系あるいは NT-I 固定化電極系における触媒電流とセレン酸濃度の関係

#### 4. 参考文献

1) M. Kuroda, E. Notaguchi, A. Sato, M.

Yoshioka, A. Hasegawa, T. Kagami, T. Narita, M. Yamashita, K. Sei, S. Soda, M. Ike, *J. Biosic. Bioeng.*, **112**, 259-64 (2011).

2) 加納健司監修、“バイオ電池の最新動向”、第 1 章、第 6 章、シーエムシー出版(2011)。

3) E. C. Lowe, S. Bydder, R. S. Hartshorne, H. L. U. Tape, E. J. Dridge, C. M. Debieux, K. Paszkiewicz, I. Singleton, R. J. Lewis, J. M. Santini, D. J. Richardson, C. S. Butler et al., *J. Biol. Chem.*, **285**, 18433 (2010).

4) S. I. Zhdanov, in A. J. Bard (Ed.), *Encyclopedia of Electrochemistry of the Elements*, vol. IV, Marcel Dekker, New York, 1974, Ch. 7.

5) T. Ikeda, K. Kano, *J. Biosic. Bioeng.*, **92**, 9-18 (2001).

6) E. Notaguchi, 2008 年度大阪大学大学院修士論文

#### 5. 学会投稿状況

##### (1) 学会発表

- ・ 越雲文也、今林慎一郎、第 57 回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会、2011 年 12 月 1 日、沖縄県男女共同参画センター (那覇)。
- ・ 越雲文也、今林慎一郎、電気化学会第 79 回大会、2012 年 3 月 30 日、アクトシティ浜松 (浜松)。

## バイオレアメタル精錬開発

〔所属機関名・所属部局名 研究分担者〕

(芝浦工業大学・工学部材料工学科 新井 剛)

### 1. 研究目的

近年、資源の有効利用の観点から都市鉱山等から有用元素を回収する試みが数多くなされている。それらの回収方法は、湿式精錬から乾式精錬に至るまで複数の提案がなされている。特に、昨今の環境負荷の低減を鑑みた場合、都市鉱山からの分離回収技術においても低環境負荷の技術開発が求められている。その中でも微生物等を利用したバイオ分離技術が注目を集めており、研究開発も数多くなされている。そこで本研究では、バイオ分離が有効とされている Se に着目した。Se は銅精錬時に生じる銅電解スライムからの副産物として得られる。銅精錬の副産物としての Se の回収は、炭酸ナトリウム存在下において精錬残渣を酸化し、その後、二酸化セレンとして抽出回収することが知られている<sup>1)</sup>。しかしながら、Se 含有バイオメタルからの Se 精錬に関する報告は殆ど無く、新たに製錬技術を検討する必要がある。Se バイオメタルは、菌体由来の有機物が多く、また、菌体に内包されている Se を精錬する必要があり、一般的な製錬技術を適用することができない。また、Se の分離を菌体で行うため、夾雑物質の可能性も否定できず、Se 純度の低下が懸念される。そこで本開発では、Se バイオメタルからの Se 精錬濃縮技術開発スキームを提案した。提案スキームは、Se バイオメ

タルから酸性溶液に Se を抽出し、酸性溶液に抽出された Se を電気分解法、若しくは化学還元法により精錬することを想定している。また、抽出液に夾雑元素が混入した場合を想定し、クロマトグラフィー法や溶媒抽出法等により Se から夾雑元素を分離に資することを想定している。

本提案スキームは Se バイオメタルに限らず、その他のバイオメタルに対しても有効な製錬技術であると考えられる。そこで、本研究では本提案スキームの構築を目指し、各主要な技術に対して開発を行う。

### 2. 研究計画

平成 23 年度は、Se バイオメタルからの酸性溶液への抽出挙動及び新規のイオン交換体を用いたクロマトグラフィー法の適用性について検討する。本研究開発では、バイオメタルから酸性水溶液への抽出の可能性について検討すると共に、無機-有機複合型イオン交換体へのレアメタルの吸脱着特性の基礎性能を確認する。これにより、バイオレアメタルから抽出したレアメタル間相互の分離特性について基礎的に検討する。

平成 24 年度は、電気化学法によるバイオメタルの製錬技術開発の検討を実施する。本研究では、前年度の抽出-イオン交換クロマトグラフィーにより分離したレアメタルを電気化学的な精錬の可能性を模索、検討



する。

平成 25 年度は、イオン液体によるレアメタルの溶媒抽出特性について検討する。近年、良好な導電性を示すイオン液体が開発され、それはレアメタルに対して抽出能を示す可能性が示唆された。このようなイオン液体によりレアメタルの抽出-精錬が単一のセル内で実施できる可能性がある。そこで本研究では、イオン液体を合成し、それらを用いてレアメタルの抽出挙動の検討を行う。

平成 26 年度は、イオン液体に抽出されたレアメタルの電気化学特性を検討する。前年度に検討したイオン液体に抽出できるレアメタルを用いて、イオン液体中におけるレアメタルの電気化学特性を確認し、本法の成立性について検討する。

平成 27 年度は、イオン液体と電気化学法を組み合わせた直接製錬技術開発を実施する。本年度は、これまでの成果を基に本研究で提案するスキームの成立性並びに妥当性について検討する。

### 3. 計画の進行状況

#### 3.1 Se バイオメタルからの酸性溶液への抽出試験

本開発で提案した Se バイオメタルからの Se 精錬プロセスは、Se バイオメタルから酸性溶液に抽出し、その後、種々の方法により Se を精錬することを想定している。このことから本プロセスの成立の要は、Se バイオメタルからの酸性溶液への抽出特性にある。本開発では、環境負荷の低減を勘案し、酸性抽出試薬として塩酸水溶液を選定した。本試験では、塩酸水溶液濃度、抽出時間、及び抽出温度に着目し、Se バイオ

メタルからの塩酸水溶液への Se 抽出挙動を検討し、最適な抽出条件を選定することを目的とする。

本開発では時間をパラメータとした試験が多いため、即時に Se の分析に資する必要がある。そこで Se 濃度測定には、紫外・可視吸光度計を用いた吸光度法により行った。紫外・可視吸光分析により得られる吸光度には、式(1)に示す Lambert・Beer の法則が成立する。

$$E = \log \frac{I_0}{I} = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon Cl \quad \text{式} \quad (1)$$

ここで  $E$  ; 吸光度、 $I_0$  ; 対照セルを通過した光の強度、 $I$  ; 試料を通過した光の強度、 $\varepsilon$  ; 吸光係数、 $C$  ; 測定物質のモル濃度、 $l$  ; 光路長を示す。Lambert・Beer の法則から光路長および測定条件が同一であれば、濃度と吸光度の間には直線関係がある。そこで本研究の測定セルには、光路長 10 mm の石英ガラス製のものを用い、石英ガラスの個体差を少なくするため同一の透過度のものを選別して用いた。

また、Se は水溶液中において無色であるため、3,3'-ジアミノベンジン (3,3'-DAB) を用いて呈色に資した。本法は、所定濃度に希釈した試料に  $0.1 \text{ mol/dm}^3$  の塩酸溶液に 0.5 wt% の 3,3'-DAB を溶解した溶液を所定量注入し、恒温振とう槽中において  $50^\circ\text{C}$  で 15 分間、呈色反応を進行させた。図 1 に 3,3'-DAB と Se(IV) の反応式を、図 2 に呈色後の Se 溶液の吸収スペクトル及びその外観写真を示す。

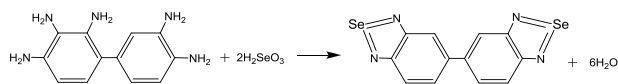


図 1 3,3'-DAB と Se(IV) の反応による

ピアズセレンールの生成

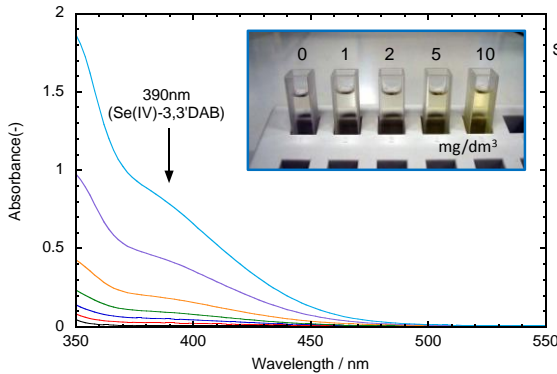


図2 3,3'-DAB と Se(IV)の反応によるピアズセレンールの吸光スペクトル及び外観写真

図1より 3,3'-DAB と Se(IV)が反応することによりピアズセレンールが生成される。これにより、図2に示すように Se は黄色に呈色し、500 nm よりも短波長側に吸光ピークが検出された。本試験では、390 nm を測定波長とし Se の検量線を得た。図3に Se(IV)及び Se(VI)の 3,3'-DAB 発色による検量線を示す。

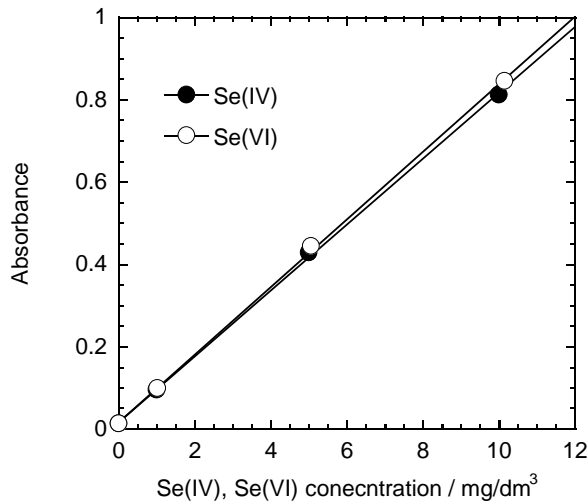


図3 Se(IV), (VI)の 3,3'-DAB による検量線

図3より、390 nm の吸光度における Se(IV)及び Se(VI)の検量線は、濃度に対し極めて良好な線形の相関が得られた。また、

本法により Se(IV)、Se(VI)共に定量できることが明らかとなった。

本試験では、Se バイオメタルの塩酸水溶液への抽出試験をバッチ式抽出試験法で行った。図4にバッチ式抽出試験の概略図を示す。

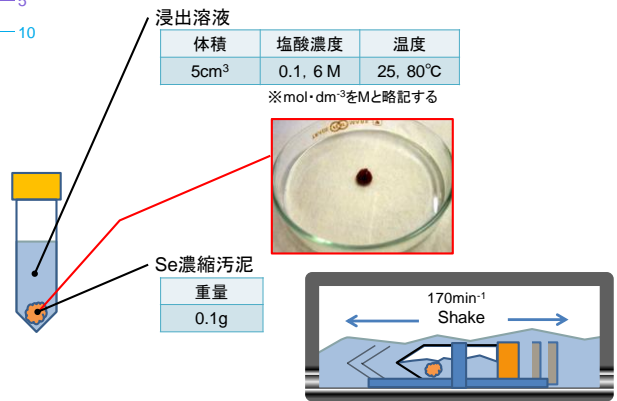


図4 Se バイオメタルからの塩酸水溶液へのバッチ式抽出試験の概略図

バッチ式抽出試験では、遠沈管に湿潤状態の Se バイオメタルを 0.1 g 精秤し、そこへ 0.1 及び 6 mol/dm<sup>3</sup> の塩酸水溶液を各々注入した。その後、25 及び 50 °C に設定した恒温振とう水相中に試料が注入された遠沈管を設置し、170 min<sup>-1</sup> の速度で所定時間攪拌した。その後、上澄み液を採取し、メンブレンフィルターにより固液を完全分離した後に Se の定量分析を行った。本試験の条件を表1に示す。

表1 Se バイオメタルからの抽出試験条件

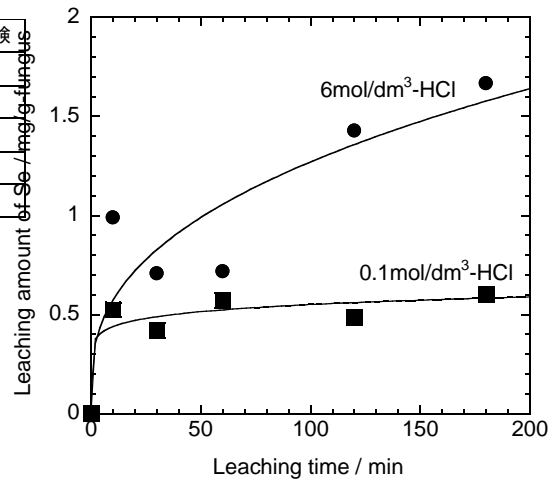
	塩酸濃度依存試験	抽出温度依存性試験
Se 濃縮汚泥 (g)	0.1	0.1
塩酸濃度 (mol/dm <sup>3</sup> )	0.1, 6	6
振とう時間 (min)	0~180	0~180
固液比	1:20	
振とう条件	170min <sup>-1</sup>	

また、得られた Se 濃度から式(2)を用いて、Se バイオメタルからの塩酸への抽出挙動を検討した。

$$L = C_{Se} \times \frac{V_L}{W_F} \quad \text{式(2)}$$

ここで  $L$ ; 抽出量 (mg/g-fungus)、 $C_{Se}$ ; 塩酸水溶液に抽出された Se 濃度 (mg/dm<sup>3</sup>)、 $V_L$ ; 抽出に用いた塩酸水溶液量 (dm<sup>3</sup>)、 $W_F$ ; Se バイオメタルの湿潤重量 (g) を示す。

Se バイオメタルから塩酸水溶液に Se を抽出するためには、適切な塩酸濃度を決定する必要がある。また、抽出に要する時間は、システムを最適化する上で欠くことの出来ないデータである。そこで本開発では、Se バイオメタルからの塩酸水溶液への Se の適切な抽出条件を検討するために、塩酸濃度を変化させた場合の Se 抽出試験を行った。図 8 に 25 °C における各塩酸濃度による Se バイオメタルからの Se 抽出挙動を示す。



Fungus body:0.1g, Leaching solution:5cm<sup>3</sup>, Temp.25°C

図 5 各塩酸による Se バイオメタルからの Se 抽出挙動

図 5 より Se バイオメタルからの塩酸水溶液の Se 抽出特性は、高濃度の塩酸水溶液の方が優れていることが示された。また、試験時間 240 分における Se 抽出量は、0.1 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸水溶液で 0.6 mg/g-fungus、6 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸水溶液で 1.7 mg/g-fungus であり、約 3 倍の抽出量があることが確認された。このことは外観観察からも確認されており、0.1 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸水溶液では Se バイオメタルが試験開始時とほぼ同様の形状を保持しているのに対し、6 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸水溶液では Se バイオメタルが粉化し分散していることが確認された。このことから、塩酸濃度の増加により Se バイオメタルが粉化・分散することで Se と塩酸水溶液の接触面積が増大し、これにより Se が効率的に抽出されたものと推察される。

これまでの試験において、Se バイオメタルから塩酸水溶液に Se を抽出するためには、高濃度の塩酸水溶液が適していることが示された。しかし、完全に Se を抽出するためには、約 180 分程度を要することが明

らかとなった。そこで、短時間で Se を塩酸水溶液に抽出するために抽出温度を変化させて試験を行った。図 6 に各温度による Se バイオメタルからの  $6 \text{ mol/dm}^3$  塩酸水溶液への Se 浸出挙動を示す。

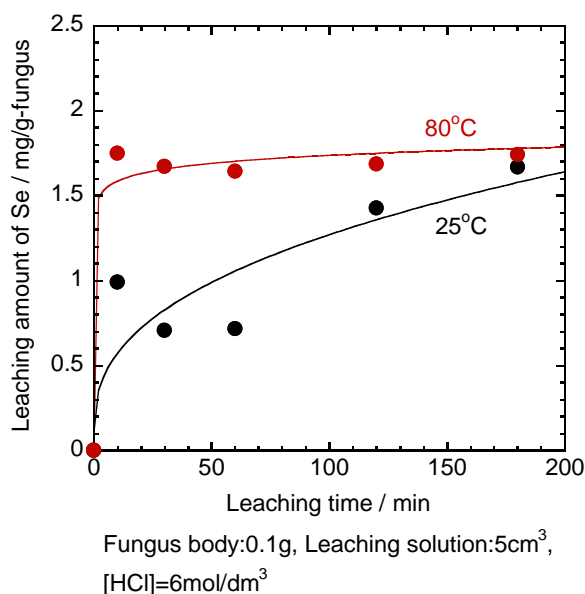


図 6 各温度による Se バイオメタルからの  $6 \text{ mol/dm}^3$  塩酸水溶液への Se 浸出挙動

図 6 より抽出温度の上昇に伴い、塩酸水溶液への Se 抽出速度は飛躍的に増加することが示された。80 °C の抽出温度では、約 10 分程度で全量の Se が塩酸水溶液に抽出されることが確認された。また、外観観察から、80 °C の試験では Se バイオメタルが黒色を呈し、25 °C の試験よりも Se バイオメタルが微粉化していることが確認された。

本開発の試験結果より、Se バイオメタルの塩酸水溶液の Se 抽出は、高温、高濃度の塩酸水溶液を用いることで短時間に行えることが明らかとなった。

### 3.2 クロマトグラフィー法によるバイオ

#### メタルに含有する夾雑元素の分離試験

本開発では、Se バイオメタルから塩酸水溶液に抽出した Se を精錬するために、電解法や化学還元法を提案している。しかしながら、何れの精錬方法においても夾雑元素が混入した場合、回収効率や純度の低下は免れない。そこで、本開発では Se バイオメタルに夾雑元素が混入した場合を想定し、Se バイオメタルからの塩酸抽出工程後に、オプションとしてクロマトグラフィー分離システムの付加を検討している。クロマトグラフィー法は、イオン交換法や抽出クロマトグラフィー法に代表される様に、吸着材を充填した固定層に対象溶液、溶離液等を通液することで、吸着アフィニティーの差を利用して元素間相互を分離する方法である。一方、クロマトグラフィー法は、吸着材の特性に分離の性能が大きく左右されるため、吸着材の選定は極めて重要である。そこで本開発では、夾雑元素と Se を分離することを目的に、ピリジン型陰イオン交換樹脂を合成し、各元素の吸着挙動を検討した。また、従来の陰イオン交換樹脂は、三次元網目構造を有する有機骨格を基体としており、長期的な使用を鑑みると、通液によるイオン交換による流路の閉塞などが懸念される。そこで本開発では、多孔性  $\text{SiO}_2$  を骨格とした複合型陰イオン交換体を重合し、動的溶離特性等についても検討を加えた。

本開発では、弱塩基性と強塩基性のピリジン型陰イオン交換樹脂を合成した。弱塩基性ピリジン型陰イオン交換樹脂 (4VP-N3) は、モノマーである 4-ビニルピリジンと架橋剤であるジビニルベンゼンの懸濁重合によって合成した。本研究では、

架橋度を中程度の 30% と一定にした。懸濁剤水溶液とベースポリマー溶液は、各試料を電子天秤で秤とり、ビーカーに投入した。それをスターラーにかけ、十分に攪拌させた。試料の攪拌が十分に行われた後、設置したセパラブルフラスコにゆっくりと試料を投入した。その後、オイルバス、冷却器を重合装置に設置した。投入した試料を、スリーワンモーターにより 100 rpm の回転速度で攪拌した。その後、所定の温度プログラムを設定し、重合を開始した。また、4VP-N3 の合成スキームを図 7 に示す<sup>2)</sup>。

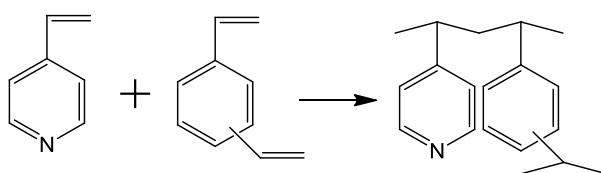


図 7 4VP-N3 の合成スキーム

強塩基性ピリジン型陰イオン交換樹脂 (4VP-N4) は、4VP-N3 に求核置換反応を行うことで得た。4VP-N3 に質量比が 1:1 の水とメタノールを樹脂の 2 倍重量加えた。これに、硫酸ジメチルを二回に分けて投入した。硫酸ジメチルを加えることで溶液が酸性になるため、4VP-N3 の交換基である窒素原子にプロトンが付加し、4 級化が進行し難くなる。そのため、水酸化ナトリウムで溶液を中和することで、反応を促進させた。その後、水、アセトンにより洗浄し、分級を行った。4VP-N4 の合成スキームを図 8 に示す<sup>2)</sup>。

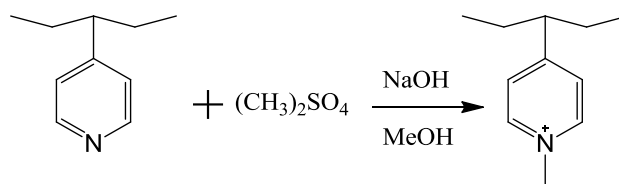


図 8 4VP-N4 の合成スキーム

複合型陰イオン交換体は、ピリジン系陰イオン交換樹脂を多孔性  $\text{SiO}_2$  担体に添着合成し作製した。複合型ピリジン系アニオン交換体 (SiPyR-N3) は、4-ビニルピリジンとジビニルベンゼンが共重合体を成すと、それ自身が陰イオン交換能を有するため環化反応を必要としない。SiPyR-N3 の合成は、 $\text{SiO}_2$  担体上に付着させた液体状のモノマー溶液を一定条件下で合成し、 $\text{SiO}_2$  担体の表面をイオン交換樹脂で包含することにより行った。これにより、多孔性の  $\text{SiO}_2$  担体の内部までイオン交換樹脂が浸透し、 $\text{SiO}_2$  担体内部にも官能基が高度に濃縮する特徴を有している。電子天秤により、 $\text{SiO}_2$  担体をナスフラスコ中に秤量した。その後、 $\text{SiO}_2$  担体が入ったナスフラスコをエバポレーターに設置し、エバポレーター内を脱気した。ベースポリマー溶液は各試薬を電子天秤で秤量しビーカーに採取した。ビーカーに採取した各試薬は、スターラーで十分に混合した後、メスシリンダーへ移した。脱気したナスフラスコを装着したエバポレーターに、メスシリンダーからベースポリマー溶液をエバポレーターのバルブを解放し投入した。ベースポリマー投入後、エバポレーター内を Ar ガスで常圧に戻した。そして、ナスフラスコをエバポレーターで攪拌し、 $\text{SiO}_2$  担体にベースポリマー溶液を浸透させた。十分に溶液が  $\text{SiO}_2$  担体に馴染んだ後、

ナスフラスコをオイルバスにより段階的に昇温し、合成を行った。合成時の温度プログラムは、ピリジン型陰イオン交換樹脂と同様に行った。ポリマー合成が終了した後、ナスフラスコから合成物をガラスフィルター上に取り出し、熱湯およびアセトンにて十分洗浄した。これにより得られた合成物が SiPyR-N3 である。SiPyR-N3 は、 $1 \text{ mol/dm}^3$  の塩酸水溶液中で保存した。得られた SiPyR-N3 の電子顕微鏡写真を図 9 に示す。

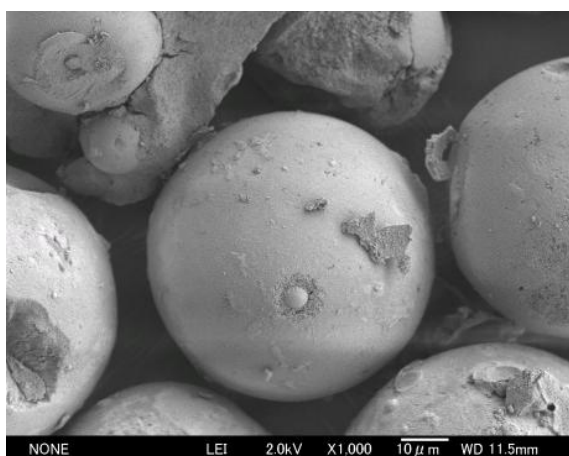


図 9 SiPyR-N3 の電子顕微鏡写真

本試験では、自製したイオン交換樹脂の吸着挙動を検討した。対象元素として太陽光パネル等に多含する Se(IV)及び In(III)、Sn(II)、Sn(IV)、Cu(II)、Ni(II)、Al(III)を用いた。各金属試料は、各試験で設定された濃度分を試薬瓶より採取し、電子天秤を用いて秤量した。秤量した試料は、所定濃度の塩酸溶液で調製し試験溶液とした。

吸着試験はバッチ式吸着試験法で行った。バッチ式吸着試験法は、コンディショニング、振とう、性能評価の三段階で行った。コンディショニングは、ネジ付き三角フラスコに陰イオン交換樹脂と各塩酸濃度溶液

を投入し、約 1 時間振とうさせることで行った。コンディショニング後、陰イオン交換樹脂と試験溶液を固液比 1:10 で調整したものを、サンプル瓶に注入し、所定温度の恒温振とう槽中で  $170 \text{ min}^{-1}$  の振とう速度で吸着に資した。吸着試験後、吸着溶液をマイクロチューブにサンプリングし、遠心分離器を用いて固液分離を行った。固液分離を行った溶液は、金属濃度の分析を行った。また、吸着試験後のイオン樹脂は、 $60^\circ\text{C}$  のオープン内で 24 時間乾燥し乾燥重量を測定した。

本開発では、自製したイオン交換樹脂への各金属元素の吸着性能を評価するため、吸着分配係数を算出した。吸着分配係数は吸着平衡時の陰イオン交換樹脂と溶液側の金属濃度の比である<sup>3)</sup>。吸着分配係数を式(3)で定義する。

$$Kd = \frac{(C_0 - C_s)}{C_s} \times \frac{V}{W_R} \quad \text{式(3)}$$

ここで  $Kd$  ; 吸着分配係数,  $C_0$  ; 吸着前の金属溶液濃度,  $C_s$  ; 吸着後の金属溶液濃度,  $V$  ; 試験溶液の体積,  $W_R$  ; 乾燥樹脂重量を示す。

クロマトグラフィーとは、吸着能を有する固定相と、これに接して流れる移動相との間に混合物を分布させ、この 2 つの相間における分析対象物質の相互分離の差を利用して各成分を分離させる方法である<sup>4)</sup>。そのため、充填層に通液される際の動的吸着・溶離特性の把握は極めて重要である。そこで本開発では、SiPyR-N3 を用いてカラム吸着・溶離試験を実施した。図 10 にカラム試験装置の概略図を示す。

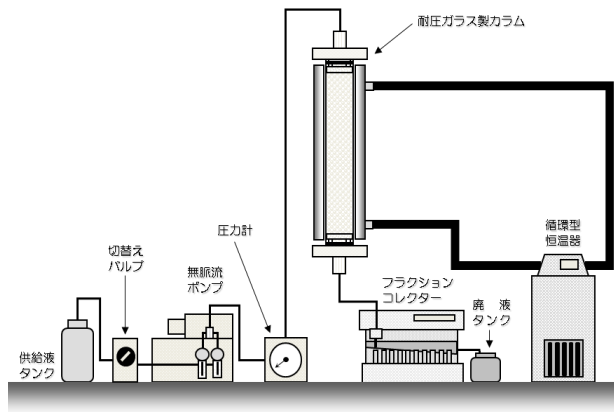


図 10 カラム試験装置の概略図

本試験では、SiPyR-N3 を  $\phi 10 \times h 500$  mm の耐圧ガラスカラムに圧密充填した。カラム吸着試験では、SiPyR-N3 を圧密充填したカラムに所定の流速で Se(IV) を含む吸着溶液を通過し、カラム下端から流出する溶液を一定量毎にフラクシオンコレクターで分画採取した。各フラクシオンの Se 濃度を測定することで吸着破過曲線を得た。カラム溶離試験では、4VP-N3 若しくは SiPyR-N3 を圧密充填したカラムに  $5 \text{ cm}^3/\text{min}$  の通過速度で展開溶液を順次通過した。カラム下端から流出する溶液を一定量毎にフラクシオンコレクターで分画採取し、各フラクシオンの Se 濃度を測定し溶離クロマトグラムを得た。

本試験では、Se(IV) の吸着挙動を検討した。図 11 に塩酸水溶液中における 4VP-N3 及び 4VP-N4 に対する Se(IV) の吸着挙動を示す。図 11 より塩酸水溶液中において Se(IV) は、何れのイオン交換樹脂に対しても  $6 \text{ mol}/\text{dm}^3$  以上の塩酸水溶液中において僅かに吸着することが明らかとなった。このことから、ピリジン型陰イオン間樹脂を用いて Se(IV) を吸着するためには、 $6 \text{ mol}/\text{dm}^3$  以上の塩酸水溶液が必要であることが明らか

となった。

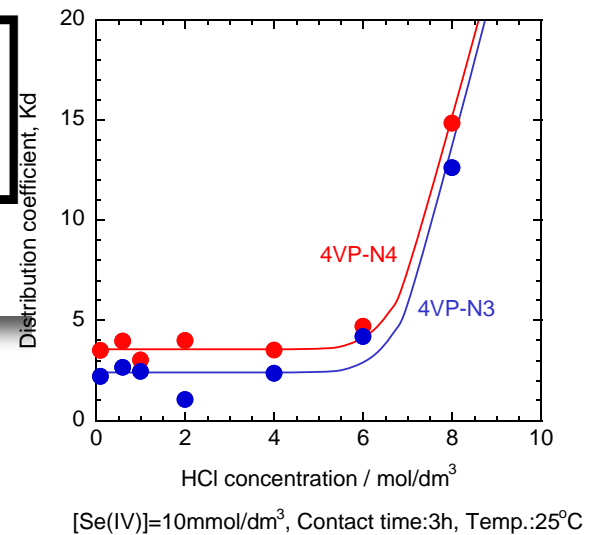


図 11 塩酸水溶液中における 4VP-N3 及び 4VP-N4 に対する Se(IV) の吸着挙動

図 12、図 13 に塩酸水溶液中における 4VP-N3 及び 4VP-N4 に対する他元素の吸着挙動を示す。図 12、図 13 より In(III)、Sn(II)、Sn(IV)、Cu(II) は、 $6 \text{ mol}/\text{dm}^3$  以上の塩酸水溶液中において何れのイオン交換樹脂に対しても強く吸着することが明らかとなった。一方、Ni(II) 及び Al(III) は、何れの塩酸濃度においても非吸着であることが示された。このことから、In(III)、Sn(II)、Sn(IV)、Cu(II) が夾雑元素として Se バイオメタルに混入した場合は、 $6 \text{ mol}/\text{dm}^3$  以上の塩酸水溶液中において In(III)、Sn(II)、Sn(IV)、Cu(II) を吸着させ、Se(IV) を溶液中に残存させることで分離できる可能性が示唆された。一方、Ni(II) 及び Al(III) は、Se(IV) と同伴するため相互に分離することが困難である。この場合、回収した Ni(II)、Al(III) 及び Se(IV) を含むフラクシオンの塩酸濃度を  $8 \text{ mol}/\text{dm}^3$  以上に再調整し、Se(IV) を吸着させ Ni(II) 及び Al(III)

を溶液に残存させることで  $\text{Se(IV)}$  を単離することが可能であると考えられる。また、何れの元素の吸着挙動においても 4VP-N3 及び 4VP-N4 共に大きな差異は確認されなかった。

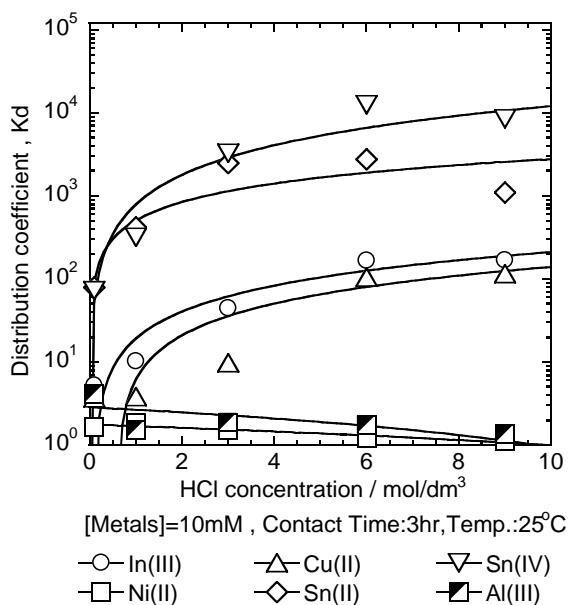


図 12 塩酸水溶液中における 4VP-N3 への他元素の吸着挙動

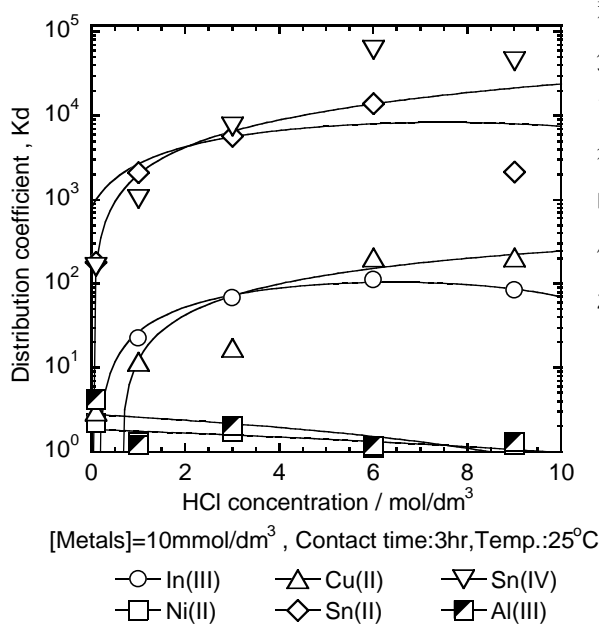


図 13 塩酸水溶液中における 4VP-N4 への他元素の吸着挙動

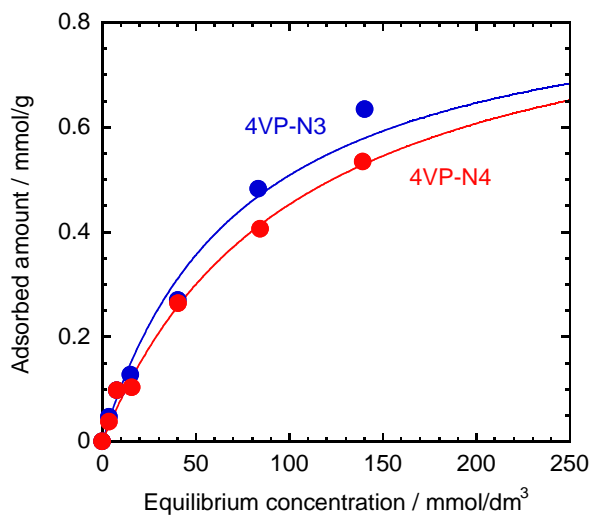
次いで 4VP-N3 及び 4VP-N4 の吸着容量を検討するために吸着等温線を作成した。図 14 に  $8 \text{ mol/dm}^3$  塩酸水溶液中における 4VP-N3 及び 4VP-N4 に対する  $\text{Se(IV)}$  の吸着等温線を示す。図 25 中の実線は、Langmuir 吸着等温式で計算した理論曲線を示す。Langmuir 吸着等温式は、式(4)で示される。

$$A = \frac{A_s kc}{1 + kc} \quad \text{式(4)}$$

ここで、 $A$  ; 吸着量、 $A_s$  ; 飽和吸着量、 $k$  ; 吸着平衡定数、 $c$  ; 吸着平衡濃度を示す<sup>5)</sup>。

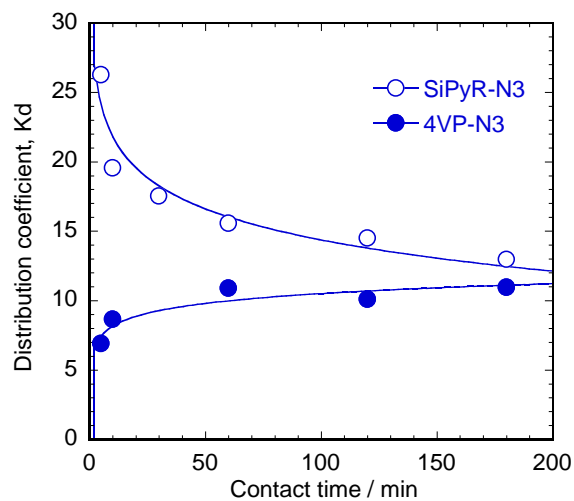
図 14 より何れのイオン交換樹脂に対する  $\text{Se(IV)}$  の測定値は Langmuir の吸着等温式により良好な相関を得ることができた。また、 $8 \text{ mol/dm}^3$  塩酸水溶液中における 4VP-N3 の  $\text{Se(IV)}$  の飽和吸着量は約  $0.7 \text{ mmol/g}$ 、4VP-N4 は約  $0.6 \text{ mmol/g}$  であった。このことから、4VP-N3 の方が僅かに飽和吸着容量が大きいと考えられる。吸着材の飽和吸着量は目的の吸着種の吸着性能を示し、飽和吸着量が多い吸着材は良好な吸着材であると考えられる。これらの試験により得られた成果から、合成工程が簡素で飽和吸着容量の大きい 4VP-N3 の方が  $\text{Se(IV)}$  と他元素の分離材として適していると推測される。





[HCl]=8mol/dm<sup>3</sup>, Contact time:3h, Temp.:25°C

図 14 8 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸水溶液中における Se(IV)の吸着等温線



[Se(IV)]=10mmol/dm<sup>3</sup>, [HCl]=8mol/dm<sup>3</sup>, Temp.:25°C

図 15 4VP-N3 及び SiPyR-N3 の Se(IV)の吸着経時変化

これまでの試験において Se(IV)と他元素との分離には、4VP-N3 が適していることが示された。4VP-N3 は、スチレンージビニルベンゼン共重合体の有機骨格を基体としているため、充填層に溶液を通液する際に圧密化し粉化する可能性がある。また、4VP-N3 は MR 型のイオン交換樹脂のため細孔径が比較的小さく、吸着種の溶離に多量の通液が必要となる可能性がある。そこで、本開発では SiO<sub>2</sub> 担体に 4VP-N3 を添着合成した SiPyR-N3 を自製し、Se(IV)の基礎的な吸着特性を検討した。図 15 に 8 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸水溶液中における 4VP-N3 及び SiPyR-N3 の Se(IV)の吸着経時変化を示す。

図 15 より SiPyR-N3 は、吸着の経時に伴い徐々に吸着分配係数が低下し、180 分の吸着時間において 4VP-N3 と同程度の吸着分配係数を示すことが明らかとなった。これは吸着時間の経時に伴い Se(IV)が Se(VI)に酸化され、原子価の変化により吸着分配係数が低下したと推察される。また、これは SiPyR-N3 の吸着速度が速いことを示唆しており、Se(IV)が 8 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸水溶液中において安定に存在することが可能であれば、比較的高い吸着を示すものと考えられる。一方、4VP-N3 は、吸着平衡に到達するのに約 60 分かかることが確認された。

これまでの試験結果から、塩酸水溶液中において Se(IV)は Se(VI)に原子価が変化すると考えられ、SiPyR-N3 のように吸着速度に優れる陰イオン交換体であれば比較的高い吸着分配係数が得られることが示唆された。そこで本開発では、吸着温度を変化させて Se(IV)の吸着試験を実施し、吸着温度の影響について検討した。図 16 に各吸着

温度における SiPyR-N3 に対する Se(IV) の吸着挙動を示す。また、図 17 に 50 °C の吸着試験後の試料の外観写真を示す。図 16 より吸着温度の上昇に伴い、吸着分配係数が増大する傾向が確認された。また、図 17 に示した外観写真より 50 °C における吸着試験後の試料は、高濃度の塩酸水溶液中において赤色の沈殿が確認された。これは、吸着温度の上昇に伴い吸着速度も増大し、SiPyR-N3 に吸着された Se(IV) が、イオン交換樹脂の官能基によって Se(IV) から金属 Se まで還元されたものと考えられる。即ち、Se(IV) の原子価変化は、温度によって大きく影響されるものと考えられた。今後、この現象について更に検討を必要とする。

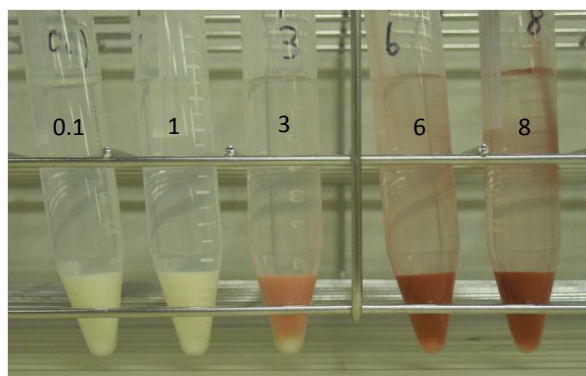
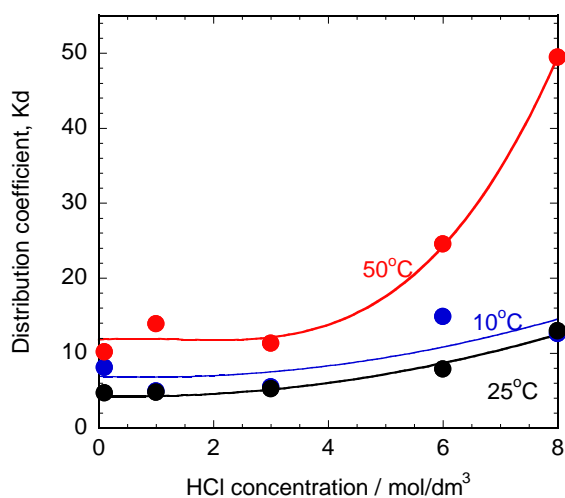


図 17 50 °C の吸着試験後の試料の外観写真

これまでの吸着試験の結果より、ピリジン型陰イオン交換樹脂を用いることで Se と夾雑元素を分離できる可能性が示唆された。実プロセスにおいては、吸着塔にイオン交換樹脂を装填した連続運転を想定しているため、動的吸着・溶離特性の把握は極めて重要である。そこで本試験では、SiPyR-N3 を充填したカラムによる動的な吸着・溶離特性について検討した。

図 18 に SiPyR-N3 充填カラムを用いた Se(IV) の破過挙動に及ぼす通液速度の影響を示す。図 18 より何れの通液速度においても Se(IV) の破過曲線の立ち上がりは急峻であり吸着速度に優れていることが示された。このことから SiPyR-N3 は、線速度で 6.4 cm/min までにおいて十分な動的吸着能を有することが示された。



[Se(IV)]=10mmol/dm<sup>3</sup>, [HCl]=8mol/dm<sup>3</sup>, Shaking time : 3hour

図 16 各吸着温度における SiPyR-N3 に対する Se(IV) の吸着挙動

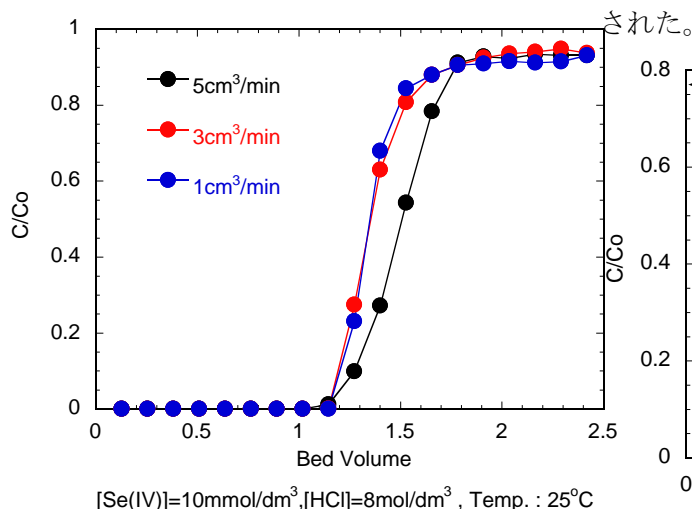


図 18 SiPyR-N3 充填カラムを用いた Se(IV) の破過挙動に及ぼす通液速度の影響

次いで動的溶離特性を検討するためにカラム溶離試験を行った。本試験では、SiPyR-N3 の比較として 4VP-N3 を用いたカラム溶離試験も行った。図 19 に SiPyR-N3 及び 4VP-N3 充填カラムを用いた Se(IV) のカラム溶離挙動を示す。図 19 より SiPyR-N3 の Se(IV) のカラム溶離挙動は、溶離液の通液と同時に溶離ピークが確認され、約 1 BV の溶離液の通液によりほぼ全量の Se(IV) を回収できることが明らかとなった。一方、4VP-N3 の Se(IV) のカラム溶離挙動は、ブロードな形状を呈しており、ほぼ全量の Se(IV) の回収には約 2 BV の溶離液の通液が必要であった。これは、SiPyR-N3 が多孔性の SiO<sub>2</sub> を担体としているため、細孔内部まで溶離液が達する速度が速いことを示唆している。さらに、SiPyR-N3 を用いることで Se(IV) の溶離液量を半分に減容することが可能であると推算される。これまでの試験結果より、Se バイオメタルに夾雑元素が混入した場合、SiPyR-N3 を分離材としたクロマトグラフィー法により高効率且つ低廃液量で Se と夾雑元素を分離できることが示

された。

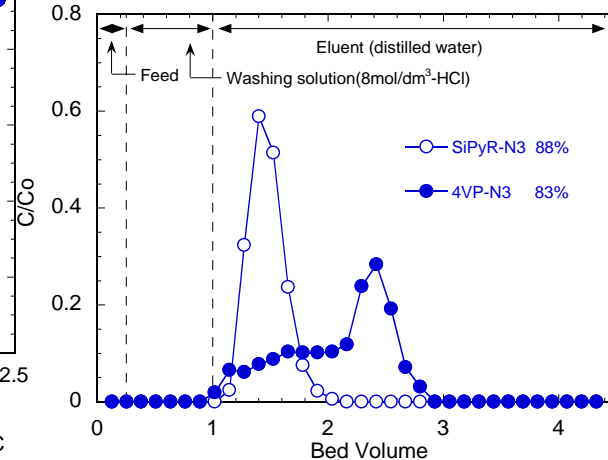


図 19 SiPyR-N3 充填カラムを用いた Se(IV) の破過挙動に及ぼす通液速度の影響

### 3.3 まとめ

Se バイオメタルからの塩酸水溶液中への Se 抽出は、高温、高濃度の塩酸水溶液を用いることで短時間に行えることが明らかとなった。また、Se バイオメタルに夾雑元素が混入した場合、SiPyR-N3 を分離材としたクロマトグラフィー法により高効率且つ低廃液量で Se と夾雑元素を分離できることが示された。

### 4. 参考文献

- 1) (独)石油天然ガス・金属鉱物資源機構, “鉱物資源マテリアルフロー 2009”(2009), p.264-269
- 2) 野上雅伸, 東京工業大学学位論文(1996)
- 3) 産業創造研究所, “ITO 透明電極からのインジウムの回収に関する技術調査”(2007)
- 4) 高木誠, “ベーシック分析科学”, 化学同人(2006), p98
- 5) 竹内節, “吸着の化学”, 産業図書(1996), p55

(2) 平成 24 年度

## セレン還元細菌を用いたセレン回収技術開発

芝浦工業大学工学部応用化学科 山下 光雄

### 1. 序論

セレン (Se) は、原子番号 34、原子量 78.96 の非金属元素であり、地殻存在量は 0.05mg/L (ppm) とされている。セレンは化学的に硫黄と似ており、生物作用を受けやすく、土壌中のセレン濃度は地域により明確な差がある。Se は、工業的にも重要な金属資源で、コピー機やガラス染色、半導体原料などに利用されており、工場などから水系に放出されている。生物にとっても必須微量元素であり、体内でセレン含有アミノ酸の合成に利用される。一方で、水中での存在形態であるオキソアニオン (酸化物イオン) のセレン酸塩 ( $\text{SeO}_4^{2-}:\text{Se(VI)}$ ) や亜セレン酸 ( $\text{SeO}_3^{2-}:\text{Se(IV)}$ ) は、生物に対して慢性・急性の毒性を有することから、排出基準が厳しく定められており、環境中に排出する際には 0.1ppm 以下まで浄化することが義務付けられている。現在は電気還元、化学還元や凝集沈殿・吸着剤法にて浄化が行われている。大量の化学薬品の使用や廃棄物が排出されることなどために高コストであり、また、廃棄物量に含まれる Se 含量が低いことから Se を資源として回収する事は難しい。現状の物理化学的 Se 含有排水処理技術の有するエネルギー・資源の大量消費、高コストなどの問題点を解決する新

たな処理方法として、排水中に存在する Se オキソアニオンを微生物により還元し、無毒・固形の元素態セレン ( $\text{Se}(0)$ ) に変換する方法が考えられる。

Se オキソアニオンを還元する微生物としては、これまでに *Bacillus selenatarsenatis* SF-I 株が分離されている<sup>1)</sup>。SF-I 株は嫌気条件下においてセレン酸の還元を行い、元素態セレンを細胞内に蓄積する。しかし、工業的利用を考えた場合、操作的な面や菌体の増殖といった面で嫌気条件下では扱いにくい。そこで、新たに好气的条件下においてセレン酸を還元することができる *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株が分離された<sup>2)</sup>。NT-I 株は、酸素が存在する条件下でセレン酸を還元し元素態セレンを生成することができる新規なセレン酸塩還元細菌である。高いセレン酸還元能力を有し、高濃度の亜セレン酸還元が可能であるうえ、亜セレン酸から元素態セレンへの還元もスムーズであり、水溶性 Se 除去の効率は世界で最も高いと言える。生成した元素態セレンは、約 20 nm 径の微粒子として微生物の細胞外に赤色アモルファスの状態で蓄積される。このとき沈殿から回収される Se 濃度は添加量の約 70%以上と非常に高く、排水からの Se 資源回収プロセスへと発展するポテンシ

ヤルを秘めている。

さらにNT-I株はセレン酸の還元が進み元素態 Se が析出してきた後も、培養を続けると、今度は元素態 Se によって赤くなっていた培養液の色が消失し、培養液の気相においてメチル化した Se が検出された<sup>3)</sup>。つまり、このNT-I株は、溶液中のセレン酸を固体の元素態 Se にするというミネラルリゼーションだけでなく、さらに固体の元素態 Se から気体のメチル化 Se にすることでボラタリゼーション(気化)を行っていることがわかった。気相中においては、夾雑物が少なく、培養汚泥に比べ、Se が非常に高い純度を持っている。これは、Se を回収するうえでは、非常に大きなメリットとなる。そこで、本報告書では、NT-I株の将来的な実機スケールでのセレン回収技術開発を踏まえ、培養容量のスケールアップを計ると共に、バイオリクターシステムによるセレン酸及び亜セレン酸からの気化セレンへの還元最適条件を検討することを目的とした。

## 2. 研究計画

平成23年度は、セレンを含有する模擬排水を用いて、セレンを回収するための最適化条件を決定した。平成24年度は、模擬排水を用いて決定した最適化条件を用いて、実排水に有効利用することを試みる。その上でセレンを固化または気化物として回収の最適化条件を決定した。平成25年度は、実排水だけでなく、実廃棄物またはその抽出溶液を用いて、セレンを固化物または気化物として回収を行う予定である。平成26年度は、レアアース元素代謝微生物を用いて、模擬排水や廃棄物からのレアア

ース元素を回収するためのリアクターの開発を行う予定である。最終年度の平成27年度は、開発したリアクターを用いてのバイオリチングの最適化条件を検討し、レアアース元素を回収し、成功に導く予定である。

## 3. 計画の進行状況

### 3. 1 実験材料及び方法

#### 3. 1. 1 菌株と培養条件

本研究では *Pseudomonas stutzeri* NT-I株が用いられた<sup>2)</sup>。NT-I株の培養には、Bacto™ Tryptic Soy Broth (TSB; Becton-Dickinson, NJ, USA) 培地が使われた。セレン酸、亜セレン酸還元試験には、セレン酸、亜セレン酸のナトリウム塩(ナカライテスク(株))が用いられた。その他の試薬には、市販の特級品が用いられた。

#### 3. 1. 2 ジャーファーマンターを用いてのセレン酸・亜セレン酸還元試験

NT-I株の一白金耳量を100 ml容バイアルに分注した50 mLのTSB培地に植種し、30℃、120rpmの条件に設定した回転振盪培養器で24時間培養した。この培養液を新しい50 mlのTSB培地を含む100 ml三角フラスコに0.5 ml添加し、再度12時間の前培養を行った。続いて、還元試験を行うために、遠心分離により菌体を回収し、回収した菌体を0.9%塩化ナトリウム溶液によりOD<sub>600</sub>が1.0になるように調整した。この溶液30 mlの種菌は、任意の濃度のセレン酸もしくは亜セレン酸を含んだTSB培地3 Lを分注した5 L容ジャーファーマンター(Bioneer-C500N型5L(S)、株式会社丸菱バ

イオエンジ) に添加され、培養された。培養液の温度、攪拌速度、pH はそれぞれ任意の値に保たれた。pH は 30% の NaOH 溶液、2 規定の HCl 溶液で調整された。溶存酸素 (DO) および pH は、それぞれ DO 電極 (OX-2500、株式会社丸菱バイオエンジ) と pH コンビネーション電極 (MPS-220、株式会社丸菱バイオエンジ) で測定された。経時的に培養液中のセレン酸、亜セレン酸、元素態セレン、および全水溶性セレンが定量された。セレン酸および亜セレン酸の還元速度 (mol/hr/cell) は、セレン酸または亜セレン酸の減少量が 1 時間当たりで最大になる速度 (mol/hr) を、光学密度から算出した菌体数 (cells) で割ることで算出された。

### 3. 1. 3 気体セレンの回収

気体セレンは硝酸にて捕集できることから<sup>4)</sup>、ジャーファーマンターからの排気はテフロンチューブ (内径 5 mm、外径 6 mm) を用いて、水蒸気による溶液量の変化を緩和するために空の 250 ml の試薬瓶を通してから、250 ml の試薬瓶に分注した 150 ml の濃硝酸を通過させた。テフロンチューブの先端にはエアーストーンを用いた。濃硝酸は経時的にサンプリングされ、濃硝酸中の元素は誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) (iCAP 6300 Duo、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用いて定性、定量分析された。

### 3. 1. 4 分析方法

培養菌体の細胞増殖は、分光光度計 (V-600、日本分光株式会社) を用いて、600 nm における光学密度 ( $OD_{600}$ ) から計算された。菌体密度は以下の式から計算された。

菌体密度 (cells/ml) =  $OD_{600} \times 8.5 \times 10^8$  とし、この式は  $OD_{600}$  の値とカウンティングチャンバーを用いて位相差顕微鏡 (DM1000、ライカマイクロシステムズ株式会社) による細胞直接計測によって決定された。培養液の 2 mL を遠心分離 ( $15,000 \times g$ 、5 min、室温) して固液分離し、得られた上清を 0.2  $\mu$ m のフィルター (ステラディスク 13、クラボウ) でろ過したものをサンプルとした。サンプル中のセレン酸および亜セレン酸イオンは、イオンクロマトグラフィー (ダイオネクス社、ICS-1100、検出器 DS6 HEATED CONDUCTIVITY CELL、カラム IonPac AS12A、ガードカラム AG12A、サプレッサー ASRS300、溶離液 3.0 mM  $Na_2CO_3$ 、流速 1.5 ml/min) で定性・定量した。また、同サンプルの溶液は、ICP-AES (iCAP 6300 Duo) を用いて、全水溶性セレンを定量された。沈澱物には超純水 2 ml を加え、ボルテックスにより混合した後、遠心分離 ( $15,000 \times g$ 、5 min、室温) により沈殿を回収した。2 回繰り返し、洗浄作業を行った後、沈澱試料に 1500  $\mu$ l の濃硝酸と 50  $\mu$ l の濃硫酸を添加し、ボルテックスにより混合し沈澱物を溶解させた。溶解液は遠心分離 ( $15,000 \times g$ 、5 min、室温) を行い、上清と沈澱物に分離した。上清は 10 ml メスフラスコに分取された。沈澱物を再度同条件で溶解操作を行い、得られた上清は、同じメスフラスコに分取された。10 ml メスフラスコに超純水を標線まで足し、定容したものを測定試料とした。測定試料は ICP-AES で定量され、セレンの値は元素態セレンとした。気体トラップの濃硝酸中の元素は ICP/AES で測定し、硝酸中の全存在元素と濃度を求めた。

排気の定性分析は、ガスクロマトグラフ

質量分析装置 (GC-MS) (FocusGC DSQ II、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、横浜) により行われた。GC カラムには DB-624 を用いた。カラムの長さは 30 m、I.D.は 0.250 mm である。測定はスプリットレスモードで行われた。スプリットバルブは注入 1 分後に開かれた。ヘリウムガスの流量は 1.0 ml/min とした。昇温プログラムは 40°C を 5 分間保持し、10°C/min の速度で 240°C まで昇温させ、240°C で 1.5 分間保持させる条件に設定された。GC の注入口および GC と MS をつなぐラインは 200°C に保たれた。イオン化は 220°C のイオン源によって、ポジティブイオンモードで行われた。試料は 250 $\mu$ l シリンジを用いて 250  $\mu$ l 注入された。すべて測定は 3 回行い、平均値が算出された。

### 3. 2 結果及び考察

#### 3. 2. 1 元素態セレン減少量への通気の影響

還元最適条件下において、NT-I 株を 12 時間培養後、セレン酸を添加し、通気を 1 L/min に保った場合と、0 L/min に変更し通気を止めた場合の結果を示した (図 1)。どちらの条件においても、セレン酸添加後から速やかに元素態セレンが生成することがわかった。元素態セレンの生成は通気をした場合の方が速く、元素態セレンの最大濃度は 0.37 mmol/L であった。しかし、その後急速に減少していった。一方、通気を止めた場合には元素態セレンの生成がやや遅れるものの、元素態セレンの最大濃度は 0.44 mmol/L と通気をした場合よりも高く、その後 150 時間近くあまり減少しなかった (図 1A)。

この結果から、元素態セレンの減少は明らかに通気の影響を受けており、通気をすることで、元素態セレンの減少が促進されることがわかった。還元速度の算出法と同様の方法で元素態セレン減少速度を算出した。通気した場合には元素態セレンの減少速度が  $2.6 \times 10^{-18}$  mol/cell/hr であり、通気を止めた場合には  $0.5 \times 10^{-18}$  mol/cell/hr となり、通気をすることで約 5.3 倍に減少が促進されることがわかった (図 1B)。

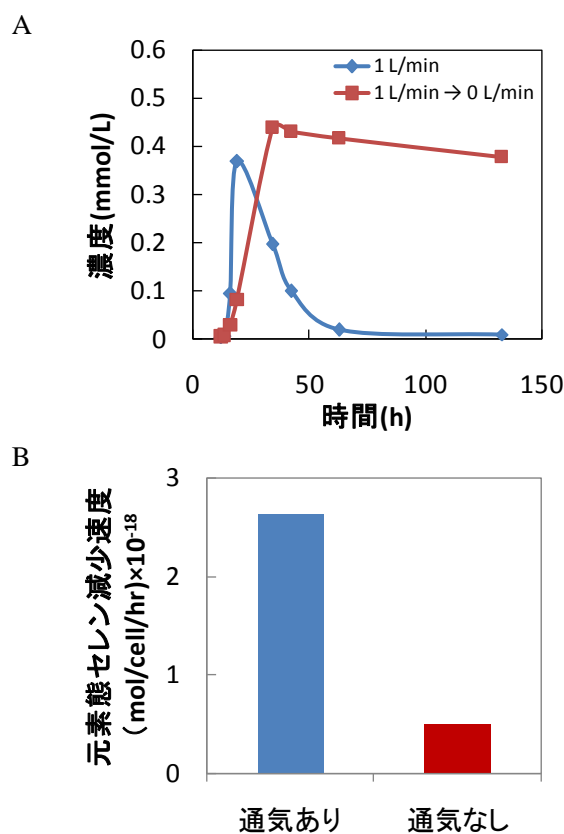


図 1 通気による元素態セレン減少への影響

これらの結果から、セレノオキソアニオン還元最適条件は気体セレン回収と一致す



ると分かった。また、固体セレン回収条件は 38 度、pH9.0、250rpm、1 L/min で菌体増殖後、通気を 0 L/min に停止することとした。最初から通気を停止した場合、菌体生育への影響が大きいことから、セレノオキソアニオン還元最適条件で 12 時間培養後に基質（セレン酸）を添加することで固体セレン回収を行うこととした。

### 3.2 気体セレンの定性

元素態セレンの減少に伴い合成されると考えられる気体セレンの定性を行うため、GC-MS を用いて気相の定性分析を行った（図 2）。この結果、ジャーファーメンター培養においては、ジメチルジセレナイド（DMDSe）がメインピークとして検出された。またジメチルセレネニルスルフィド（DMSeS）と推定される保持時間（約 12.7 分）に小さなピークが検出された。セレンを含まないが、ジメチルジスルフィド（DMDS）が検出された。

DMSeS は、DMDSe と DMDS の存在下において、反応性が高い DMDSe と DMDS の化学反応により生成することが考えられる。室温において市販の  $99.4 \times 10^3 \text{ mg/L}$  の DMDSe 350 $\mu\text{l}$  と  $53 \times 10^3 \text{ mg/L}$  の DMDS 350 $\mu\text{l}$  を保存バイアル瓶中に混合し、常温において密閉下で 12 時間静置した後、GC-MS により液相を測定した。

保持時間 12.7 min 付近に DMSeS のピークが検出された（図 3）。この結果、保持時間 12.7 min 付近に DMSeS のピークが検出された（図 3）。このことから、今回培養中の気相部から検出された DMSeS については、微生物反応により生成した DMDSe と DMDS が化学反応を起こすことで生成した可能性があると思われるが、詳しく分析する必要がある。

### 3.3 硝酸トラップによる気体回収とマスバランス

元素態セレンの減少に伴い生成する気体セレンの経時的な定量を行うため、ジャーファーメンター培養の排気を硝酸に通すことで気体セレンをトラップし気体回収を試みた。還元最適下培養条件でのセレン濃度の経時変化を示した（図 4）。この結果、セレン酸・亜セレン酸の還元が進行し元素態セレンが生成した後に、元素態セレンの減少が始まり、気体セレンが生成していることがわかった。培養 120 時間後の各相の収量を算出したところ、気体セレンが 0.356 mmol/L で 71.2%の回収率であった（表 1）。

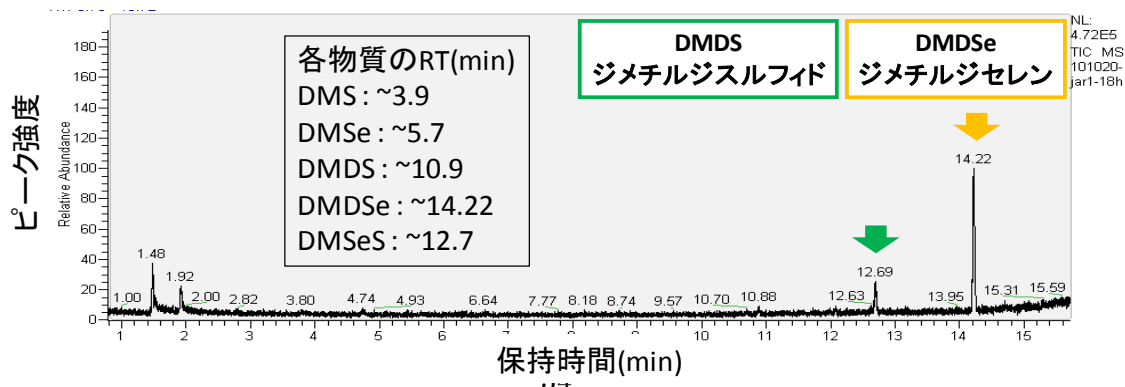


図 2 ジャーファーメンター培養時の気相部の GC-MS クロマトグラフ

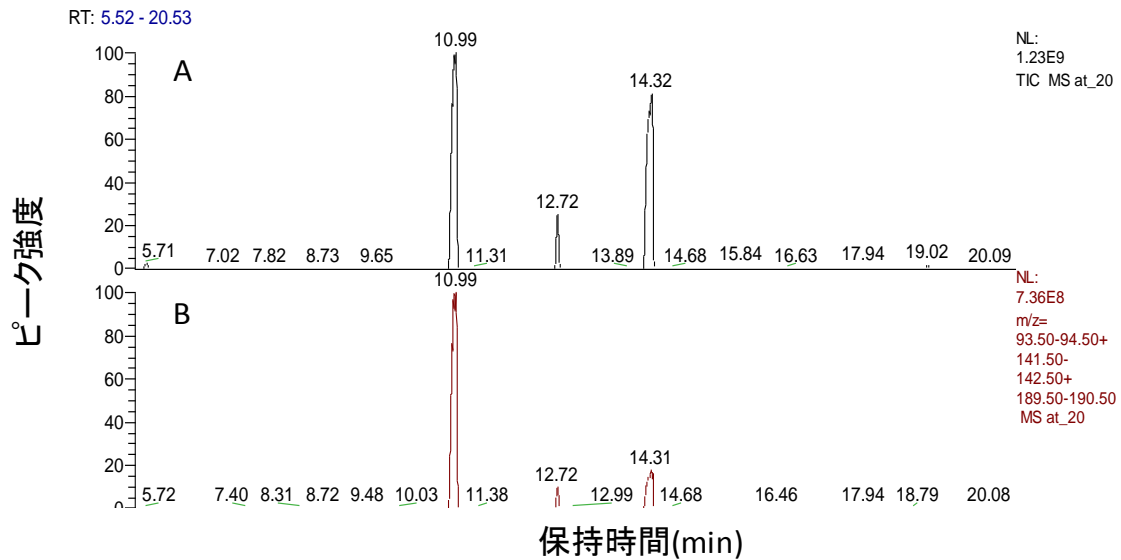


図3 DMDSe および DMDS の平衡反応後の GC-MS による測定

A : トータルイオンクロマトグラフ

B : DMDS (MW:94)、DMDSe(MW:142)、DMSeS(MW:190)でフィルタリング

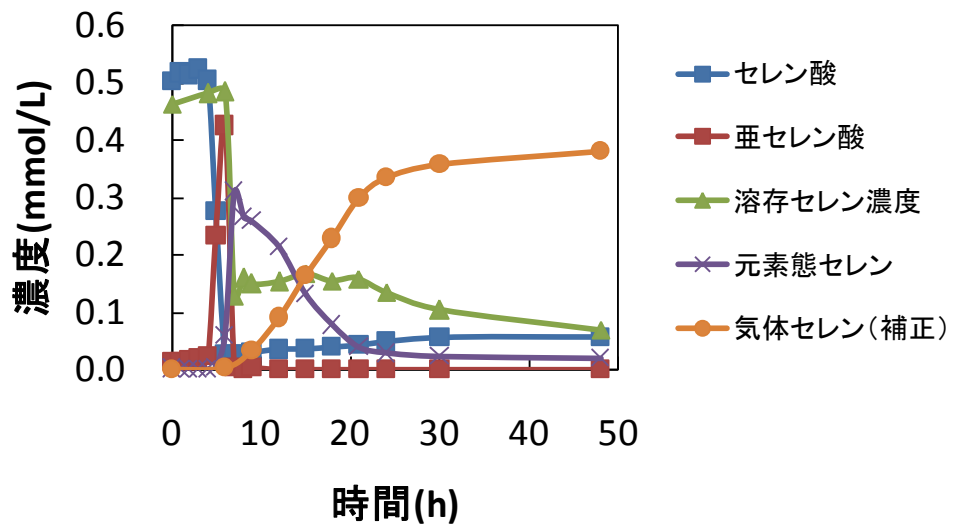


図4 還元最適条件における各相のセレン濃度変化

表1 還元最適条件における各相の収量 (38°C、pH9.0、1 L/min、250rpm、120 h)

項目名	溶液	固体	気体	合計	気体(補正)	補正後
mmol/L	0.053	0.020	0.356	0.429	0.438	0.511
%	10.5	4.0	71.2	85.8	87.6	102.2

\* 硝酸によるメチル化セレンのトラップ効率(81.3%)から算出

硝酸トラップによる DMDSe の回収効率は 81.3%という値が報告されている<sup>4)</sup>。この文献値を用いて補正すると、87.6%が気体セレンとして生成していると考えられた。微生物の生成する気体セレンを定量的に回収した前例はなく、今回 70%以上の高回収率で気体セレンを回収し経時的に測定できたことは世界でも初めての結果である。

NT-I 株はセレン酸や亜セレン酸を高速度で元素態セレンに還元する<sup>2)</sup>。さらに好気培養を続けると元素態セレンがメチル化され固相から気相にセレンが相変化した。つまり液相・固相から揮発化除去できることが明らかとなった。

これまでにセレン酸を-2 価の気体状セレンまで還元することが知られている微生物の気化速度は遅く、*Bacillus* sp. STG-83 株は 1 mmol/L のセレン酸を LB 培地に添加した場合、4 日間で約 0.03%<sup>5)</sup>、*Enterobacter cloacae* SLD1a-1 株は 1 mmol/L の亜セレン酸を TSB 培地に添加した場合 10 日間で約 0.5%を気化すると報告されている<sup>6)</sup>。これらの微生物と比べて、NT-I 株によるジャーファーマンター培養では、非常に速い速度で気体セレンが生成していると言える。

また、セレン酸および亜セレン酸が一度元素態セレンに還元される(図 4)。培養 10 時間目にセレン酸および亜セレン酸がほぼゼロになっても溶存セレン濃度は 0.15 mmol/L あり、20 時間目までは一定値を保ったあと、その後は徐々に減少していく。以上のことから、DMDSe などが一度液相に溶

出している可能性が考えられる。DMDSe は元素態セレンの減少に従ってその量が増加していくことから元素態セレンから合成されると思われるが、亜セレン酸から直接合成される代謝経路があるかどうかは現時点では分からない。

培養 120 時間後の各相の収量を合計すると初期量の 85.8%となる(表 1)。これに硝酸による気体セレンの回収率を考慮すると 102.2%となることから、NT-I 株によるセレン酸還元における気相、液相、固相のマスバランスがとれていると言える。

### 3.4 活性炭での気体セレン回収の検討

将来的な気体セレンの回収方法として、活性炭吸着法を考えた。つまり運搬が簡便であり、危険性の伴わない活性炭に気体セレンを吸着させて回収できるかどうかを試みた。還元最適条件下において、セレン酸を添加し、NT-I 株によるジャーファーマンター培養を行った。ジャーファーマンターの排気管に活性炭を直列に 2 本接続し、ジャーファーマンターに近いものを活性炭①、次を活性炭②とした。活性炭の後ろには硝酸を入れた捕集瓶を介して通気を行った。各活性炭および硝酸の元素測定結果を図 5 に示した。この結果、添加したセレン酸の量から、元素態セレンおよび溶存セレンの量を引いた予想気化量に対して、前部に接続した活性炭①で 79.9%、後部に接続した活性炭②で 7.6%の気体セレンが吸着していることがわかった。このうち活性炭①においては 59.5%が、活性炭②においては 14.6%が DMDSe であることを GC-MS により確認した。

ップすることで、活性炭による気体セレンの吸着効率が向上する可能性も考えられる。

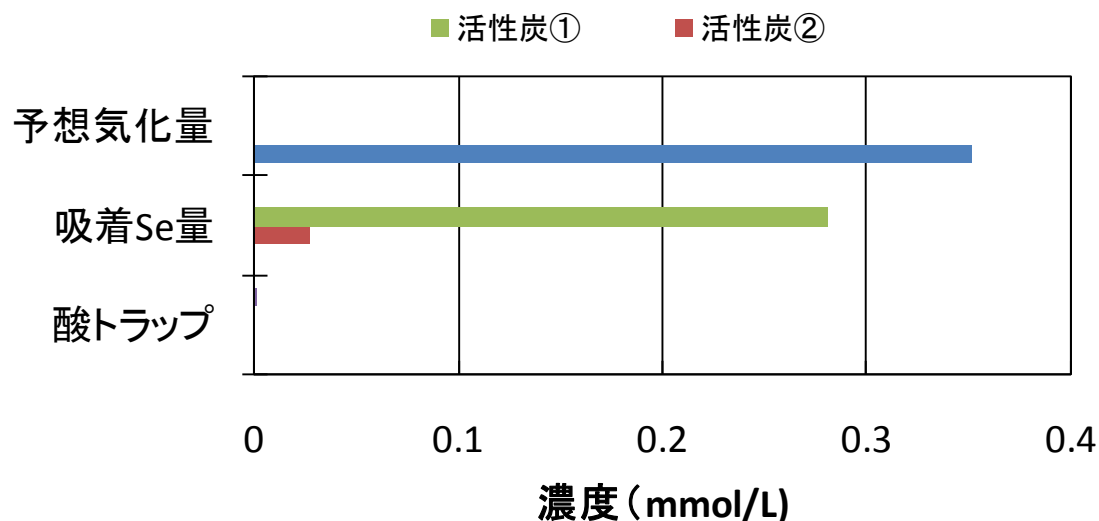


図5 活性炭による気体セレンの回収 (38°C、pH9.0、1 L/min、250rpm、48h)

DMDSe 以外の化合物としては DMS<sub>2</sub>Se のピークを検出したことから、残りは DMS<sub>2</sub>Se であると考えられた。これらの活性炭の後に接続した硝酸トラップからはセレンは検出されなかった。よってほぼすべての気体セレンが活性炭に吸着されたものと考えられる。2本の活性炭による吸着量は合計で87.5%となる。約12-13%の損失は、活性炭からのジエチルエーテルによる抽出効率や、抽出操作中のメチル化Seの揮発などの影響が考えられる。活性炭を用いて微生物由来のメチル化セレンを回収した前例はなく、本結果は高効率で活性炭によりメチル化セレンを濃縮回収した初めての成功例であると思われる。また活性炭によって100%吸着できなかった原因としては、水蒸気による吸着効率の低下も考えられる。活性炭による吸着操作の前段階においてジャーファーマンターから生じる水蒸気を効率的にトラ

#### 4. 参考文献

- 1) Fujita M *et al.*: Isolation and characterization of a novel selenate-reducing bacterium, *Bacillus* sp. SF-1. *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 517-522, 1997.
- 2) Kuroda, M. *et al.*: Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. *J. Biosci. Bioeng.*, 112(3), 259-264, 2011.
- 3) Kagami, T. *et al.*: Selenium Volatilization under Aerobic Conditions and Recovery from Aqueous Phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. *Water Research*, 47, 1361-1368, (2012).
- 4) Lenny W. *et al.*: Quantitative and qualitative trapping of volatile methylated selenium species entrained through nitric acid. *Environ. Sci. Technol.*, 44(1), 382-387, 2010.
- 5) Souidi, M. *et al.*: Bioprocessing of

seleno-oxyanions and tellurite in a novel *Bacillus* sp. strain STG-83: A solution to removal of toxic oxyanions in presence of nitrate. *Journal of Hazardous Materials.*, 165, 71-77, 2009.

6) Dungan, R. S. and Frankenberger, Jr. W. T.: Biotransformation of selenium by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1: Formation of dimethylselenide. *Biogeochemistry.*, 55, 73-86, 2001.

##### 5. 学会論文等投稿・発表状況

1) Tsubasa Kagami, Takanobu Narita, Masashi Kuroda, Emi Notaguchi, Mitsuo Yamashita, Kazunari Sei, Satoshi Soda, and Michihiko Ike.: Selenium Volatilization under Aerobic Conditions and Recovery from Aqueous Phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. *Water Research*, 47, 1361-1368, (2012).

2) Tsubasa Kagami, Akira Fudemoto, Noriyuki Fujimoto, Emi Notaguchi, Masaya Kanzaki, Masashi Kuroda, Satoshi Soda, Mitsuo Yamashita, and Michihiko Ike.: Isolation and characterization of bacteria capable of reducing tellurium oxyanions to insoluble elemental tellurium for tellurium recovery from wastewater. *Waste and Biomass Valorization*, 3(4), 409-418 (2012).

3) 池道彦, 山下光雄, 黒田真史. 「メタルバイオ技術による排水からのレアメタル回収

の可能性」環境バイオテクノロジー学会誌、12 巻, 3-8, (2012).

4) 成田尚宣, 山下光雄. 「バイオプラタリゼーションによるセレンの回収」 pp. 432-433 リサイクル・廃棄物事典. 産業調査会 事典出版センター, 2012(2012).

5) 黒田真史, 三輪美恵子, 清和成, 惣田訓, 山下光雄, 池道彦. *Pseudomonas stutzeri* NT-Iによるセレン酸還元機構の解析. (2013年度日本農芸化学会、仙台)

6) 大塚治, 長谷川智美, 坂本康太, 生田裕馬, 池道彦, 山下光雄. テルル酸還元細菌 *Ochrobactrum anthropi* Ti-3株のテルル酸還元能の解析. (2013年度日本農芸化学会、仙台)

7) 黒田真史, 三輪恵美子, 清和成, 惣田訓, 山下光雄, 池道彦. 二種のセレン酸還元細菌のセレン酸還元関連遺伝子の解析. (2012年度(第49回)日本水処理生物学会、東京)

8) 黒田真史, 成田尚宣, 三輪美恵子, 鏡つばさ, 惣田訓, 山下光雄, 池道彦. *Pseudomonas stutzeri* NT-Iを用いたセレン揮発化除去・回収プロセスの試行. (2012年度日本生物工学会大会、神戸)

# セレン還元酵素を用いたセンサーの開発

芝浦工業大学工学部応用化学科

今林 慎一郎

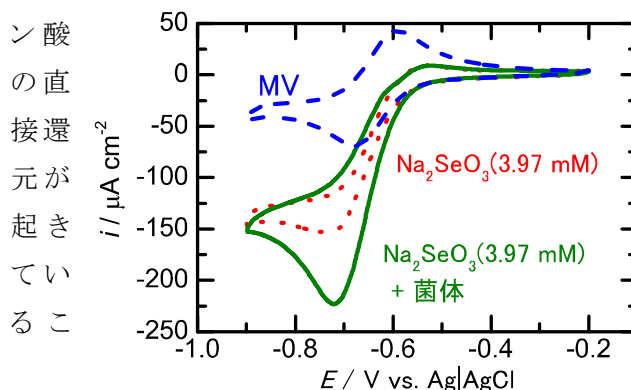
## 1. はじめに

セレンは化合物系太陽電池用の半導体など先端材料に使用されるレアメタルである。酸化数-2, 0, +4, +6のうち、毒性のあるセレン酸(+6)または亜セレン酸(+4)は工場排水などに含まれ、環境へ流出することが問題になっている。セレン酸還元菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I はこれまで報告されているセレン酸還元菌の中で最も高いセレンオキシアニオン(セレン酸や亜セレン酸)の還元能をもつグラム陰性の好気性桿菌である。<sup>1)</sup>セレンオキシアニオンを水に難溶で毒性の低い元素態セレンに還元できる NT-I の能力を活かして、工業排水中に含まれるセレンオキシアニオンを除去、元素態セレンとして回収することが試みられている。<sup>2)</sup>

単離した酸化還元酵素や微生物に含まれる酵素による触媒反応を電極反応と共役させた酵素電極反応系は生物燃料電池やバイオセンサーなどに利用されている。<sup>3,4)</sup> セレン酸還元菌 NT-I を利用した酵素電極反応系が構築できれば、排水中のセレンオキシアニオン濃度を簡便に定量できるセンサーや廃棄物から電気エネルギーを取り出す微生物燃料電池に展開できる可能性がある。本研究は、セレン酸還元菌 NT-I (あるいは単離されたセレンオキシアニオン還元酵素)を用いた酵素電極反応系の構築し、この反応系をベースにしたセレンオキシアニオンセンサーを作製することを目的

としている。

現時点では NT-I が有するセレンオキシアニオン還元酵素は単離されていないため、昨年度は NT-I のホールセルを酵素が入った袋と捉え、電極上へ滴下、乾燥、メンブレンフィルターで覆うことで電極上に固定化し、適当な酸化還元物質(メディエータ)を仲介させることで、セル中に含まれるセレンオキシアニオン還元酵素と電極を電気的につなぐこと(メディエータ型電子移動経路の構築)が可能かを検討した。ビオロゲン化合物(メチルビオロゲン: MV、ベンジルビオロゲン: BV)、キノン化合物(アリザリンレッド S: ARS)、フェナジン化合物(ニュートラルレッド: NR)の 4 種の物質がメディエータとして機能することがわかった。**Fig.1** から MV を含むリン酸緩衝液(pH 7.0)に、亜セレン酸  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  を添加すると、菌体非存在下よりも還元電流が大きく増加し、亜セレン酸の還元が促進されていることがわかる。しかし、検討を重ねた結果、菌体が無くても同程度の触媒電流が観測されることがわかり、MV による亜セレン酸



とが示唆された。ただし、少ないながらも菌体存在下で大きな触媒電流が得られたことから、菌体に含まれる酵素を介した亜セレン酸還元反応も同時に起きていると推察された。

**Fig.1** 1.0 mmol dm<sup>-3</sup> MV を含む 10 mmol dm<sup>-3</sup> リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 5.56 mmol dm<sup>-3</sup> Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> を添加したときのボルタモグラム

以上の経緯から、本年度は、菌体中に含まれる酵素を介した亜セレン酸還元反応の程度を把握し、これを促進さらには優先的に起こす方法を模索した。

## 2. 研究計画

### 平成 24 年度

セレン酸還元菌ホールセルあるいはセレン酸還元酵素を用いた酵素電極反応系を構築する方法として、メディエータ型電子移動経路 (平成 23 年度より継続) のみならず直接電子移動経路についても構築の可能性を検討する。

### 平成 25 年度

平成 23, 24 年度の検討結果を基に、セレン酸還元菌ホールセルを用いた酵素電極反応系を構築する。

### 平成 26 年度

平成 25 年度に構築したセレン酸還元菌ホールセルを用いた酵素電極反応系を基に、セレンオキシアニオン (セレン酸、亜セレン酸) センサーのプロトタイプを作製する。

### 平成 27 年度

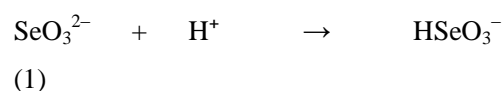
平成 26 年度に作製した水溶性セレン (セレン酸、亜セレン酸) センサーの性能評価を行って実用上の問題点を明らかにすると同時に、これを解決するための方法などを検討する。さらに、可能ならば酵素電極反応系の他の応用展開について探索する。

## 3. 計画の進行状況

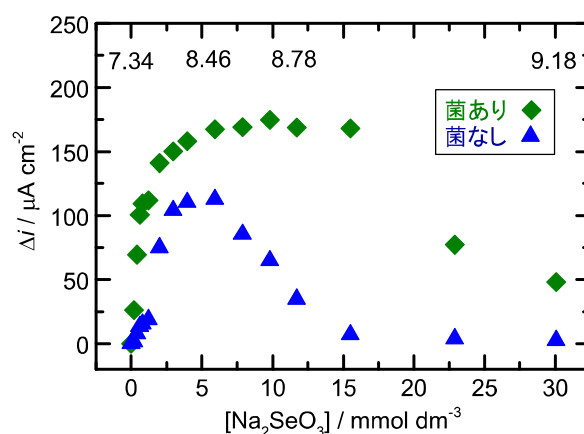
### 3.1 リン酸緩衝液濃度の影響

NT-I の菌体非存在下で 1 mmol dm<sup>-3</sup> MV、ARS あるいは NR を含む 10 mmol dm<sup>-3</sup> リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中に亜セレン酸を加えたとき、ARS については **Fig.1** に示した MV と同様の触媒電流が観測されたが、NR は触媒電流を示さなかった。次いで菌体を懸濁させて同様の測定を行ったところ、ARS では電流値が著しく減少し、還元電流が流れ始める電位が Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 添加につれて負電位にシフトした。10 mmol dm<sup>-3</sup> リン酸緩衝液の緩衝能は低いため、pH 7 で Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> を加えると、反応(1)によって pH が上昇する。この結果、キノン化合物である ARS は電位シフトしたと考えられる。

MV は電位シフトしない。



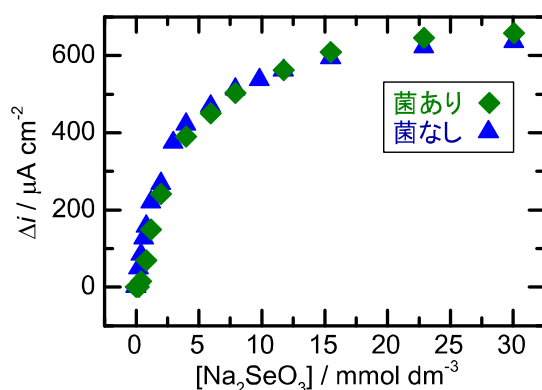
-0.75 V における亜セレン酸添加時と無添加時の電流値の差  $\Delta i$  は、菌体の有無に関わらず Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 濃度と共に増加するが、菌体非存在下では 5.93 mmol dm<sup>-3</sup> で最大となった後、徐々に減少し 15.50 mmol dm<sup>-3</sup> 以上ではほとんどゼロになった。一方、菌体存在下では 9.80 mmol dm<sup>-3</sup> で最大値をとった後の減少度合が小さく、15.50 mmol dm<sup>-3</sup> 以上でも有意な  $\Delta i$  が観測された (**Fig.2**)。



**Fig.2**  $1.0 \text{ mmol dm}^{-3}$  MV を含む  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  リン酸緩衝液 (pH 7.0) における  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  濃度に依存した  $\Delta i$  (at  $-0.75 \text{ V}$ ) の変化

反応(1)により、**Fig.2** の図中上部に示すように、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  添加に応じて pH が上昇する。NT-I の亜セレン酸還元活性は pH 9.0 までほとんど減少しないので菌体を介した亜セレン酸還元はあまり変化しない<sup>1)</sup> のに対して、MV による亜セレン酸の直接還元は pH 上昇とともに減少する<sup>5)</sup> ことが、高  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  濃度域、すなわち高 pH 域で大きな  $\Delta i$  の差が観られた理由と考えている。なお、電極への菌体の吸着を防ぐために電極表面をポリカーボネート膜で覆っている。

リン酸緩衝液濃度を  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  から  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$  に上げると、 $\Delta i$  は増大するが菌体の有無による差が小さくなった (**Fig.3**)。これは、緩衝液濃度を上げると MV による直接還元の割合が上がるためと考えている。<sup>5)</sup> 今後の測定は菌体の寄与を明確に観測できる  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  緩衝液中で行った。

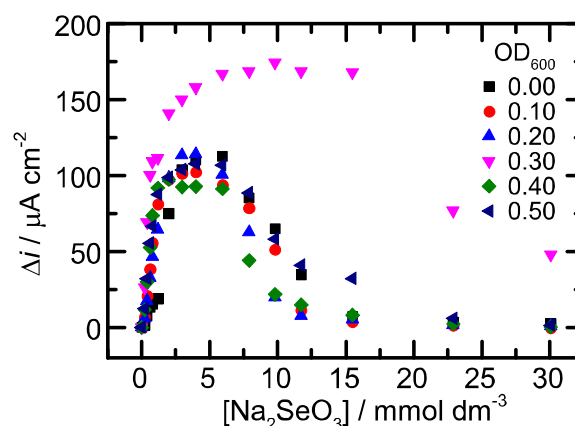


**Fig.3**  $1.0 \text{ mmol dm}^{-3}$  MV を含む  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$  リン酸緩衝液 (pH 7.0) における  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  濃度に依存した  $\Delta i$  (at  $-0.75 \text{ V}$ ) の変化

### 3.2 緩衝液中に懸濁している菌体量の影響

$\text{OD}_{600}$  は菌体懸濁液の  $600 \text{ nm}$  における吸光度であり、数値が大きいほど菌体量が多い。

3.1 の測定は  $\text{OD}_{600} = 0.30$  で行ったが、菌体の懸濁量 ( $\text{OD}_{600} 0 \sim 0.5$ ) を変えると **Fig.4** に示すように  $\Delta i$ - $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]$  プロットが変化した。 $\text{OD}_{600} 0.30$  において最大の  $\Delta i$  が得られ、CV 測定後のポリカーボネート膜表面に赤褐色の元素態セレンが析出した。しかし、他の菌体濃度では  $\text{OD}_{600} = 0.30$  よりも  $\Delta i$  が小さく、ほとんど差が観られなかった。 $\text{OD}_{600} = 0.30$  で  $\Delta i$  が最大になる傾向は、高  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  濃度域で  $\Delta i$  がバラツク (後述する温度による影響と考えられる) ものの再現性があり、実験後の元素



**Fig.4**  $1.0 \text{ mmol dm}^{-3}$  MV を含む  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  リン酸緩衝液 (pH 7.0) で測定した  $\Delta i$ - $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]$  プロットに対する菌体の懸濁濃度の影響

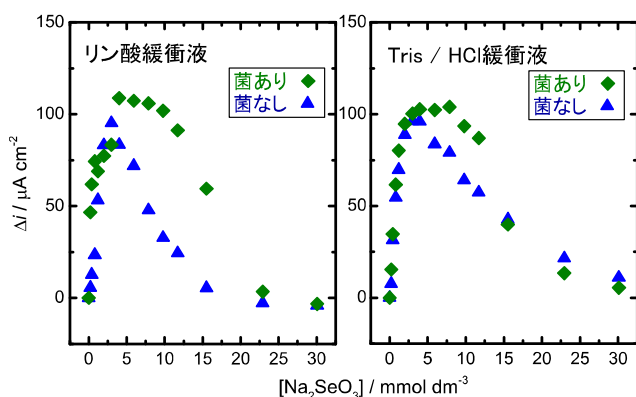
態セレンの析出も起こった。以上より、菌体の懸濁量は  $\text{OD}_{600} 0.30$  が至適であることが判明したが、理由は現時点で明らかでない。

### 3.3 緩衝液による差異

**Fig.5** に示すように、リン酸緩衝液から Tris/HCl 緩衝液へ変更すると、 $\Delta i$ - $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]$  プロットにおいて菌体の有無による  $\Delta i$  の差が大きく減少した。菌体有の場合は緩衝液によるプロットの差はほとんどなかった (**Fig.5** 右) が、菌体非存在下の  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 4.0 \text{ mmol dm}^{-3}$  以上ではより大きな  $\Delta i$  が Tris/HCl 緩衝液中で観測された (**Fig.5** 左)。これは、高  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  濃度域



における MV による亜セレン酸の直接還元反応が、Tris / HCl 緩衝液中でより促進されたためと考えている。



**Fig.5**  $1.0 \text{ mmol dm}^{-3}$  MV を含む  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  リン酸緩衝液 (pH 7.0) あるいは  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.0) 中で測定した  $\Delta i$ - $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]$  プロット。菌体濃度  $\text{OD}_{600} = 0.30$

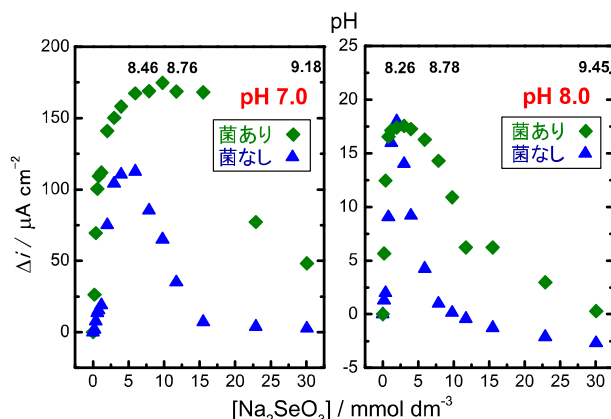
### 3.4 緩衝液 pH および温度の影響

3.3 までの結果は、NT-I を経由する亜セレン酸還元反応は確かに起きているようだが、MV による亜セレン酸の直接還元が同時に起きることを示す。本節では、緩衝液の pH と温度を NT-I による亜セレン酸還元に適する条件に変えることで、NT-I を経由する亜セレン酸還元反応を定常的に起こすことが可能であるかを検討した。

**Fig.6** は、リン酸緩衝液の pH を 7.0 から 8.0 へ変更したときの  $\Delta i$ - $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]$  プロットである。NT-I の亜セレン酸還元活性は pH 9.0 までほとんど減少しない<sup>1)</sup> が、MV による亜セレン酸の直接還元は pH 上昇とともに減少する<sup>5)</sup> ため、pH を上げることで前者のみが定常的に起こることを期待した。**Fig.6** に示すように、菌体の有無に限らず、pH を 8.0 に上げると  $\Delta i$  はおよそ 10 分の 1 まで減少したが、 $\Delta i$ - $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]$  プロットの形は大きく変化しなかった。MV による亜セレン酸の直接還元反応による

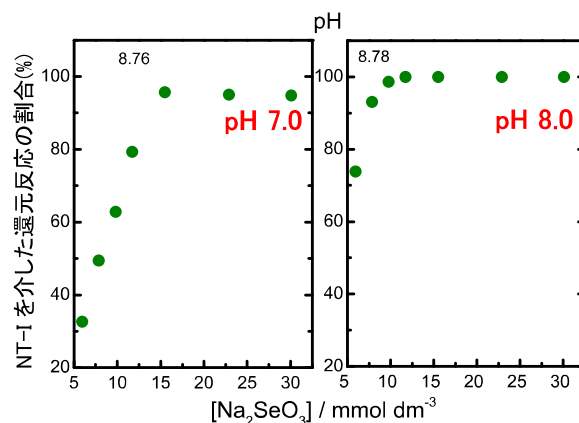
$\Delta i$  (菌なし) は pH 8.26~8.46 間で最大値をとり、pH 8.8 を超えるとほぼ 0 に減少するのに対して、菌体存在下では pH 8.8 を超えても  $\Delta i$  が観測さ

れた。



**Fig.6**  $1.0 \text{ mmol dm}^{-3}$  MV を含む  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  リン酸緩衝液 (左: pH 7.0, 右: pH 8.0) における  $\Delta i$ - $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]$  プロット

菌体存在下で観測された触媒電流を  $\Delta i$ 、菌体非存在下で観測された触媒電流を  $\Delta i'$  として、式(2)によって NT-I を経由する亜セレン酸還元反応の割合(%)を見積もり、亜セレン酸濃度に対してプロットした (**Fig.7**)。



**Fig.7**  $1.0 \text{ mmol dm}^{-3}$  MV を含む  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  リン酸緩衝液 (左: pH 7.0, 右: pH 8.0) における NT-I を経由する亜セレン酸還元反応の割合(%)の  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  濃度依存性

$$\left[ \frac{(\Delta i - \Delta i')}{\Delta i} \right] \times 100 \quad (2)$$

Fig.7からわかるように、どちらのpHでもpH 8.8以上ではNT-Iを介した亜セレン酸還元反応の割合(%)がほとんど100%になった。また、pHを7.0から8.0に上げることでNT-Iを介した亜セレン酸還元反応のみが起きている亜セレン酸の濃度領域を低濃度側に拡大できた。しかし、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$   $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ 以下の低濃度域では、MVによる亜セレン酸の直接還元反応も起こるため、NT-Iを経由する亜セレン酸還元反応を定常的に起こすことはできなかった。

MVによる亜セレン酸の直接還元反応の温度依存性は明らかになっていないが、NT-Iを経由する亜セレン酸還元反応はNT-Iの至適温度<sup>1)</sup>で行うことで促進できる可能性があると考えた。Fig.8に示すように、検討したどの温度条件下でも菌体存在下でより大きな $\Delta i$ が観測された。菌体非存在下では、 $\Delta i$ は $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 濃度3.97 mM付近で最大になった後、高濃度域で急激に減少するのに対し、菌体存在下では $\Delta i$ が相対的に大きく、最大値を取った後も減少が緩やかであった。温度が高くなると菌体の有無に限らず $\Delta i$ が増加するが、これは温度上昇によって反応種の拡散が速くなることに起因すると考えられる。

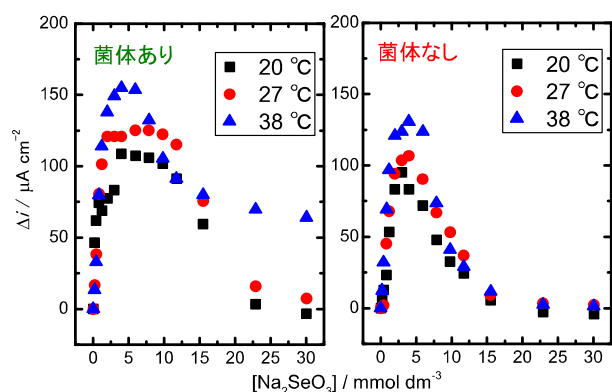


Fig.8  $1.0 \text{ mmol dm}^{-3}$  MVを含む  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  リン酸緩衝液 (pH 7.0) における  $\Delta i$  -  $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]$ プロットに対する温度の影響

以上より、NT-Iによる亜セレン酸還元の至適

温度にすることで、NT-Iを経由する亜セレン酸還元による $\Delta i$ を増加させられるが、低  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 濃度域では拡散係数の増加によってMVによる亜セレン酸の直接還元も上がるため、NT-Iを経由する亜セレン酸還元反応のみを定常的に起こすことはできなかった。

### 3.5 まとめ

- (1) メディエータとしてメチルビオロゲン (MV) を用いた  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  リン酸緩衝液 (pH 7) 中、懸濁させる菌体量が  $\text{OD}_{600} = 0.30$  のときに最大の触媒電流が得られた。
- (2) MVによる亜セレン酸の直接還元反応の割合は、リン酸緩衝液のpHが上がると減少し、pH 8.8以上ではほぼ0になる。これに対してNT-Iを介する亜セレン酸還元反応はpH 8.8以上でも起こるため、緩衝液のpHを7.0から8.0へ上げることでNT-Iを介した亜セレン酸還元反応の割合(%)を高くすることができた。
- (3) 反応を行う温度をNT-Iの至適温度  $38^\circ\text{C}$  にすることでNT-Iを経由する亜セレン酸還元反応が促進されるため、高  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 濃度域における $\Delta i$ を増大できた。
- (4) 限られた条件下ではNT-Iを経由する亜セレン酸の還元のみが生起できるが、MVをメディエータとして使用する限り、菌体を経由しないMVによる直接還元反応が相当量同時に起きるため、前者のみを定常的に起こすことはできなかった。

## 4. 今後の計画及び学会、論文等投稿・発表状況

### 今後の計画

平成 25 年度は引き続きセレン酸還元菌ホー

ルセルを用いた酵素電極反応系の構築方法を検討する。メディアータ型電子移動経路については、平成 24 年度の研究結果を受けて、亜セレン酸を直接還元する可能性がなく、かつ電極から亜セレン酸へ効率の良く電子移動を仲介する物質を探索する。同時に、直接電子移動経路についても構築の可能性を検討する。

当初の実験計画では「平成 23, 24 年度の検討結果を基にセレン酸還元菌ホールセルを用いた酵素電極反応系を構築する」予定になっていたが、これについては平成 26 年度以降にずれ込む可能性がある。

#### 学会発表

- (ア) F. Koshikumo, W. Murata, A. Ooya, and S. Imabayashi, "Electrochemical reduction of selenite and selenate accelerated by methyl viologen", PRiME2012, 2012/10/9, Honolulu, Hawaii (USA).
- (イ) 越雲文也, 今林慎一郎, "回転電極測定法を用いた水溶性セレン化合物の電極還元反応の解析", 第 58 回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会、2012/11/27、八王子市高尾の森わくわくビレッジ.
- (ウ) 越雲文也, 今林慎一郎, "メチルビオロゲンを介した亜セレン酸の電極還元反応に

対する緩衝液の影響", 電気化学会第 80 回大会、2013/3/29、東北大学川内キャンパス.

#### 投稿論文

準備中

#### 参考文献

- 7) M. Kuroda, E. Notaguchi, A. Sato, M. Yoshioka, A. Hasegawa, T. Kagami, T. Narita, M. Yamashita, K. Sei, S. Soda, M. Ike, *J. Biosic. Bioeng.*, **112**, 259-64 (2011).
- 8) T. Kagami, T. Narita, M. Kuroda, E. Notaguchi, M. Yamashita, K. Sei, S. Soda, M. Ike, *Water Res.*, **47**, 1361-68 (2013).
- 9) 加納健司監修, "バイオ電池の最新動向", 第 1, 6 章, シーエムシー出版(2011).
- 10) 池田篤治監修, "バイオ電気化学の実際-バイオセンサ・バイオ電池の実用展開-", 第 4, 6, 14, 18 章, シーエムシー出版(2007).
- 11) F. Koshikumo, W. Murata, A. Ooya, and S. Imabayashi, *Electrochemistry*, **81**(5), 350-52 (2013).

## バイオレアメタル精錬開発

芝浦工業大学工学部材料工学科 新井 剛

### 1. 研究目的

近年、資源の有効利用の観点から都市鉱山等から有用元素を回収する試みが数多くなされている。それらの回収方法は、湿式精錬から乾式精錬に至るまで複数の提案がなされている。特に、昨今の環境負荷の低減を鑑みた場合、都市鉱山からの分離回収技術においても低環境負荷の技術開発が求められている。その中でも微生物等を利用したバイオ分離技術が注目を集めており、研究開発も数多くなされている。そこで本研究では、バイオ分離が有効とされている Se に着目した。Se は銅精錬時に生じる銅電解スライムからの副産物として得られる。銅精錬の副産物としての Se の回収は、炭酸ナトリウム存在下において精錬残渣を酸化し、その後、二酸化セレンとして抽出回収することが知られている<sup>1)</sup>。しかしながら、Se 含有バイオメタルからの Se 精錬に関する報告は殆ど無く、新たに製錬技術を検討する必要がある。Se バイオメタルは、菌体由来の有機物が多く、また、菌体に内包されている Se を精錬する必要があるが、一般的な製錬技術を適用することができない。また、Se の分離を菌体で行うため、夾雑物質の可能性も否定できず、Se 純度の低下が懸念される。そこで本開発では、Se バイオメタルからの Se 精錬濃縮技術開発スキームを提案した。提案スキームは、Se バイオメタルから酸性溶液に Se を抽出し、酸性溶液に抽出された Se を電気分解法、若しくは化学還元法により精錬することを想定している。また、抽出液に夾雑元素が混入した場合を想定し、クロマトグラフィー法や溶媒抽出法等により Se から夾雑元素を分離に資することを想定している。

本提案スキームは Se バイオメタルに限らず、その他のバイオメタルに対しても有効な製錬技

術であると考えられる。そこで、本研究では本提案スキームの構築を目指し、各主要な技術に対して開発を行う。

### 2. 研究計画

昨年度までにおいて、Se バイオメタルからの酸性溶液への抽出挙動及び新規のイオン交換体を用いたクロマトグラフィー法の適用性について検討した。本研究開発より、バイオメタルから酸性水溶液への抽出の可能性及び新規の無機-有機複合型イオン交換体へのレアメタルの吸脱着特性の基礎性能が明らかとなった。これにより、バイオレアメタルから抽出したレアメタル間相互の分離の基礎特性を明らかとした。

平成 24 年度は、電気化学法によるバイオメタルの製錬技術開発の検討を実施する。本研究では、前年度の抽出-イオン交換クロマトグラフィーにより分離したレアメタルを電気化学的な精錬の可能性を模索、検討する。

平成 25 年度は、イオン液体によるレアメタルの溶媒抽出特性について検討する。近年、良好な導電性を示すイオン液体が開発され、それはレアメタルに対して抽出能を示す可能性が示唆された。この様なイオン液体によりレアメタルの抽出-精錬が単一のセル内で実施できる可能性がある。そこで本研究では、イオン液体を合成し、それらを用いてレアメタルの抽出挙動の検討を行う。

平成 26 年度は、イオン液体に抽出されたレアメタルの電気化学特性を検討する。前年度に検討したイオン液体に抽出できるレアメタルを用いて、イオン液体中におけるレアメタルの電気化学特性を確認し、本法の成立性について検討する。

平成 27 年度は、イオン液体と電気化学法を組み合わせた直接製錬技術開発を実施する。本年度

は、これまでの成果を基に本研究で提案するスキームの成立性並びに妥当性について検討する。

### 3. 計画の進行状況

#### 3. 1 電解析出法による Se 精錬試験

##### 3. 1. 1 試験目的

昨年度までの研究成果より、Se 濃縮汚泥から塩酸水溶液中に Se を抽出できることが確認され、且つ夾雑元素が混入した場合においてもクロマトグラフィー法により Se の単離の可能性が示唆された。塩酸水溶液に抽出された Se を再利用するためには、Se を精錬する必要がある。本開発では、Se の精錬に対して電解析出法に着目した。電解析出法は、電極と電解質との界面において電気化学的に還元反応を誘起し金属を析出させる。そのため、余剰の廃液発生も少なく、電解電位を規制することで目的の元素のみを回収することができる等の利点がある。そこで本開発では、Se 濃縮汚泥から塩酸水溶液中に抽出された Se の電解析出法による精錬技術の確立を目的に、塩酸水溶液中における Se(IV)の電解析出の基礎データの採取、及び連続的に電解析出処理が可能なフロー型電解槽による電解析出挙動の検討を行った。

##### 3. 1. 2 実験方法

#### (1) CV による塩酸水溶液中における Se(IV)の電解基礎試験

本実験ではサイクリックボルタンメトリー (CV) により塩酸水溶液中における Se(IV)の基礎的な電解挙動の検討を行った。CV は電極表面あるいは電極近傍の電解反応を直接的に推定することができる。CV 法には、エレクトロケミカルアナライザー (BAS-100B ; BAS 株式会社製) を使用した。CV 用電極には、作用電極にグラッシーカーボン電極 ( $\phi=3\text{ mm}$ ,  $S=7.07\text{ mm}^2$ )、対極に白金線、参照電極に Ag/AgCl 電極 (飽和 KCl) を用いた。試験溶液は、 $0.1\sim 4\text{ mol/dm}^3$  塩酸水溶液に  $1\text{ mol/dm}^3$  の亜セレン酸を溶解して調製した。本試験では、 $300\sim -800\text{ mV(vs Ag/AgCl)}$ の電位範囲で  $50\text{ mV/s}$  の電位掃引速度で測定し、得られたサイクリックボルタモグラムより Se(IV)の電解挙動を検討した。

#### (2) 有隔膜電解槽による塩酸水溶液中の Se(IV)の電解析出試験

塩酸水溶液中における Se(IV)の電解析出挙動を

検討するために、有隔膜電解槽を用いて Se の電解析出試験を行った。有隔膜電解槽は、陰極室と陽極室の間を  $\text{SiO}_2$  焼結板により連結・隔離されている。作用電極には、 $\phi 6\text{ mm}$  のグラッシーカーボン棒に端部から  $40\text{ mm}$  のところに熱収縮チューブで被覆し電極表面積を  $7.8\text{ cm}^2$  と一定としたものを用いた。対極には白金板を、参照電極に Ag/AgCl (飽和 KCl) を用いた。また、電解還元制御システムは、ポテンショ/ガルバノスタット、データ処理装置で構成される。ポテンショ/ガルバノスタットは、HABF-501 (北斗電工株式会社製) を用いた。

本試験方法は、所定濃度の塩酸水溶液に亜セレン酸を  $1\text{ mmol/dm}^3$  となるように調製した電解溶液を有隔膜電解槽の陰極室に  $80\text{ cm}^3$  注入し、陽極室には調製溶液と同濃度の塩酸水溶液を  $80\text{ cm}^3$  注入した。陰極室内の溶液は、試験開始の 30 分前から窒素ガスを通気して溶存酸素を出来るだけ除去した。何れの試験においても、定電位電解還元法 ( $-800\sim -2000\text{ mV vs. Ag/AgCl}$ ) により、試験温度  $25\text{ }^\circ\text{C}$  で実施した。試験溶液は、所定時間毎にサンプリングし Se の定量分析に資した。

また、電解析出反応によって生じた電極表面上の析出物は、フィルター上で十分に水洗した後に固液分離し、 $60\text{ }^\circ\text{C}$  に設定したオーブン中で一昼夜乾燥した。それらの電析物を走査型分析電子顕微鏡 (SEM-EDX) で表面状態を観察すると共に元素分布を測定した。

#### (3) フロー型電解槽による塩酸水溶液中の Se(IV)の電解析出試験

フロー型電解槽には、HX-201 (北斗電工株式会社製) を用いた。フロー型電解槽の外観写真を図 1 に示す。また、表 1 にフロー型電解槽の仕様を示す。

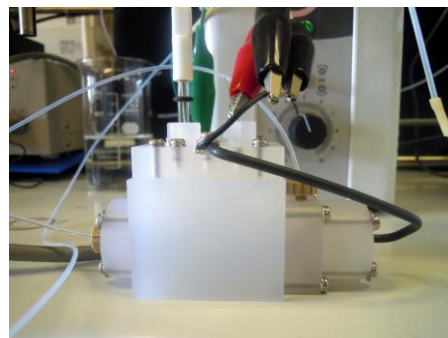


図 1 フロー型電解槽の外観写真

表 1 フロー型電解槽の仕様

Cell	Flow type
Cell volume	2cm <sup>3</sup>
Working electrode	Vycor glass/Carbon fiber (Surface area≒2000cm <sup>2</sup> )
Counter electrode	Pt wire (φ0.3×300mm)
Reference electrode	Ag/AgCl

フロー型電解槽は、電解溶液を通液しながら電解還元が可能である。そのため、電解質と電極の接触が極めて良好で高い還元率および電流効率を得ることが可能である。また、このフロー型電解槽による電解還元効率の向上は、作用電極面積が約 2000 cm<sup>2</sup> と極めて大きいことにも由来する。作用電極は、隔膜であるバイコールガラスカラムにグラッシーカーボン繊維を密に充填することで構成される。バイコールガラスは、Na<sub>2</sub>O-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub>系ガラスの「からみ合い」型の分相組織を利用して作られた 96 % SiO<sub>2</sub> のハイシリカガラスである。また、バイコールガラスは、細孔直径が最小で 2.0 nm、200 m<sup>2</sup>/g 程度の多孔性を有する。本試験で用いたバイコールガラスは、平均細孔 4.0 nm、空隙率 28 %、比重 1.5 のものである。作用電極のバイコールガラスはカラム状のもので、外径 10 mm、内径 8 mm、肉厚 1 mm、長さ 50 mm のものを用いた。グラッシーカーボンは、ガラス状炭素で電気抵抗 40~50<sup>4</sup> Ω・cm、熱伝導率 0.8~0.9 W/cmK、比重 1.46~1.50 である。作用電極で用いたグラッシーカーボン繊維の性状は、約 10 μm のグラッシーカーボン繊維が数 10 本一束となり、200 μm 程度の集合繊維がさらに密に絡み合っている。これらのグラッシーカーボン繊維をバイコールガラスカラム内に充填し、作用電極として構成される。

フロー型電解槽による Se の電解析出試験は、所定濃度の塩酸水溶液に亜セレン酸を 1 mmol/dm<sup>3</sup> となるように調製し電解溶液として用いた。電解試験は陰極室に先の電解液を定量ポンプにより 1 cm<sup>3</sup>/min の流速で通液し、作用電極と参照電極間の電位を -1200 mV vs Ag/AgCl となるようにポテンショスタットにより一定に制御し試験を実施した。電解試験開始より、所定時間毎に流出した溶液をフラクションコレクターで分画採取し、各フラクションの Se 濃度分析を行った。

### 3. 1. 3 結果及び考察

#### (1) 塩酸中における Se(IV)の電解挙動

本開発では、Se 濃縮汚泥から塩酸水溶液に抽出した Se を、電解析出法により精錬することを想定している。Se を電解析出法により精錬するためには、電極表面の反応が極めて重要であり、各電位における塩酸水溶液中における電気化学反応を検討する必要がある。本試験では、CV により塩酸水溶液中の基礎的な電気化学挙動を検討した。図 2 に各濃度の塩酸水溶液中における Se(IV) のサイクリックボルタモグラムの示す。

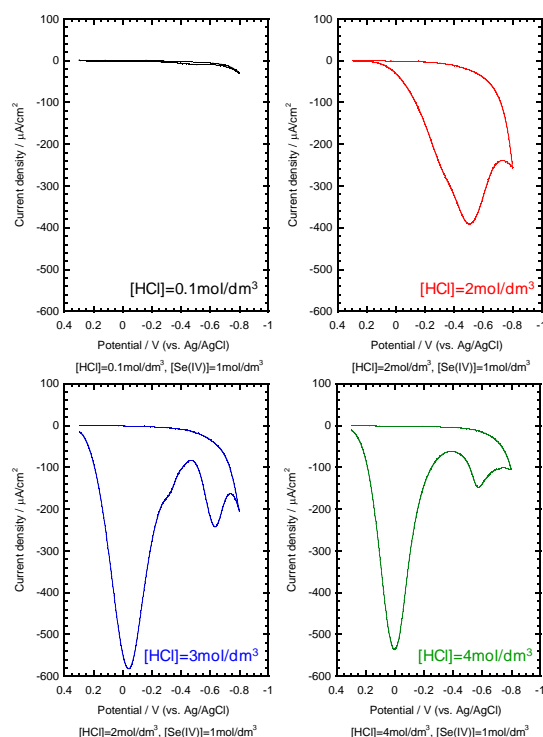


図 2 各濃度の塩酸水溶液中における Se(IV)のサイクリックボルタモグラム

図 2 より、-800~-2000 mV vs. Ag/AgCl の電解電位において、0.1 mol/dm<sup>3</sup> 以上の塩酸水溶液中において 2 つの還元波が確認された。また、何れの塩酸濃度においても酸化波は確認されなかった。このことから、Se(IV)の電気化学反応は非可逆反応であり、電解析出した Se は溶解し難いことが示された。さらに、塩酸濃度の増加に伴い、0 mV vs Ag/AgCl 近傍の還元波が大きくなることが確認された。このことから、0 mV vs Ag/AgCl 近傍の還元波は、塩酸の電気分解に由来するピークと考えられる。また、-600 mV vs Ag/AgCl の近傍の還元波は、式(1)に示される Se の電解析出反応に起因すると推測される。



式(1)より Se(IV)から Se への電解析出反応には、 $\text{H}^+$ の寄与が大きいことが推測される。このことは、図2に示した試験結果とも整合性が示された。

そこで本試験では、塩酸濃度の増加に伴う電極表面における Se の電解速度を検討するために、光電気化学セルを用いて電極近傍の Se(IV)の電解挙動の観察を行った。本試験において作用電極には白金メッシュ、対極には白金線、参照電極には Ag/AgCl 電極を用いた。本試験は、光電気化学セルに設置されている各電極に CV を接続し、300 ~ -800 mV(vs Ag/AgCl)の電位範囲で 50 mV/s の電位掃引速度で電位を付与した際の紫外可視吸光スペクトルを 2 秒毎に測定した。

図3に 0.1 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸水溶液中における電極近傍の Se(IV)の電解還元挙動を、図4に 6 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸水溶液中における電極近傍の Se(IV)の電解還元挙動を示す。図3、図4より、何れの塩酸濃度においても、電位が卑になるほど 300 及び 450 nm 近傍の Se(IV)に帰属すると考えられる吸光ピークが低下する傾向が確認された。

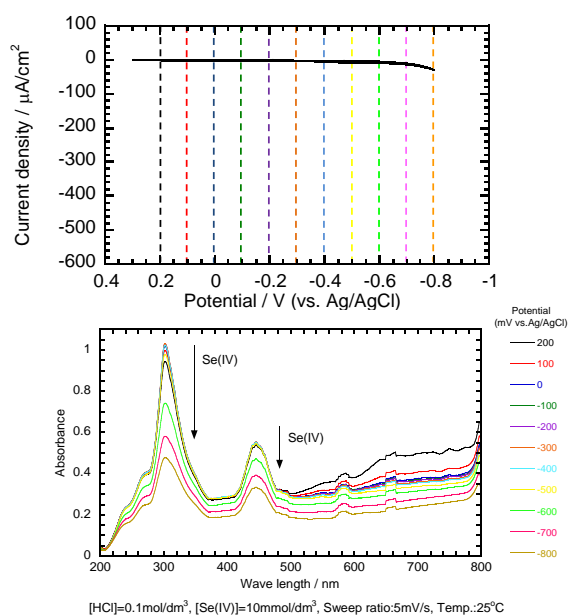


図3 0.1 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸水溶液中における電極近傍の Se(IV)の電解還元挙動

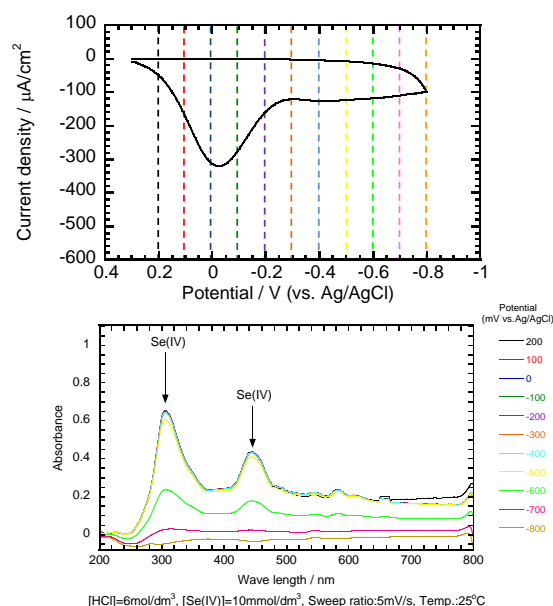


図4 6 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸水溶液中における電極近傍の Se(IV)の電解還元挙動

また、その傾向は 6 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸水溶液の方がより顕著であり、電解速度が速くなっていることが示唆された。図5に光電気化学セルを用いた電解試験後の白金メッシュ電極の外観写真を示す。

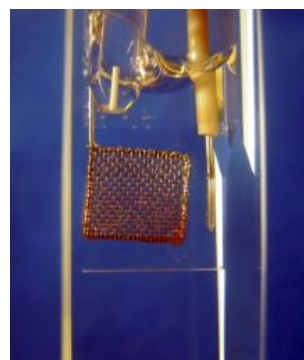


図5 光電気化学セルを用いた電解試験後の白金メッシュ電極の外観写真

図5より、電解試験後の白金メッシュの周りに赤色の析出物が確認された。これは Se(IV)が還元され、Se として電解析出したものと推察される。このことから電位が卑になるほど吸光ピークが低下したのは、電極表面の Se(IV)が Se に還元されることで、溶液中の Se(IV)濃度が低下したことに起因するものと考えられる。また、6 mol/dm<sup>3</sup> 塩酸水溶液中において -600 mV vs. Ag/AgCl の電位より卑な電位において吸光ピークの減少が顕著であり、これは CV 結果と良好な相関が得られ

た。このことから、塩酸水溶液中における Se(IV) を迅速且つ効率的に電解析出に資するためには、高濃度塩酸水溶液中で -600 mV vs. Ag/AgCl 以上の電位を付与することが好ましいと考えられる。

## (2) 有隔膜電解槽による塩酸水溶液中の Se(IV) の電解析出

これまでの基礎試験において塩酸水溶液中において Se を電解析出できることが見いだされた。また、CV 測定の結果から塩酸水溶液中における Se の電解析出に必要な電位は、-600 mV vs Ag/AgCl であることが示された。そこで本試験では、これまでの成果を基に有隔膜電解槽を用いて Se の電解精錬試験を実施した。図 6 に有隔膜電解槽による Se の電解析出挙動に及ぼす電解電位の影響を示す。

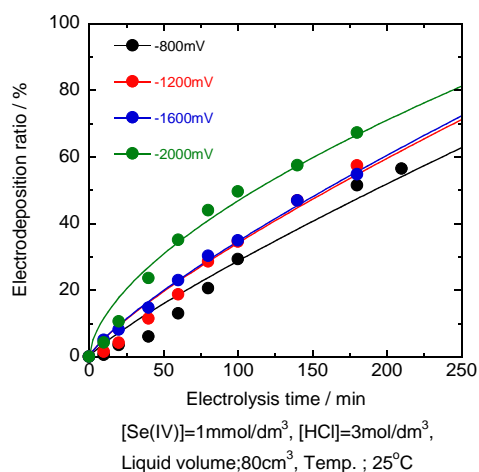


図 6 有隔膜電解槽による Se の電解析出挙動に及ぼす電解電位の影響

図 6 より、電解電位の増加に伴い Se の電解析出速度の上昇が確認された。電解析出時間 180 分において、50~65 % 程度の Se が電解析出することが示された。電極表面に電解析出した Se は赤色を呈しており、微少な粒径で電極表面全体に電解析出することが確認された。また、図 7 に電解析出量と電流密度より算出した電流効率の計算結果を示す。電流効率は、電解電位の増加に伴い低下する傾向が確認された。電解電位 -800 mV vs Ag/AgCl の時で電流効率は約 90 % を示し、殆ど副反応が生じていないことが示唆された。一方、それ以上の電解電位では、30 % 以下であり塩酸の電気分解や水の電気分解等に電流が消費されていると推測された。これらの試験結果から有隔膜

電解槽を用いて Se を電解精錬する場合、電解速度や電流効率を勘案すると -800 ~ -1200 mV vs Ag/AgCl 程度の電位を付与することが好ましいと考えられる。

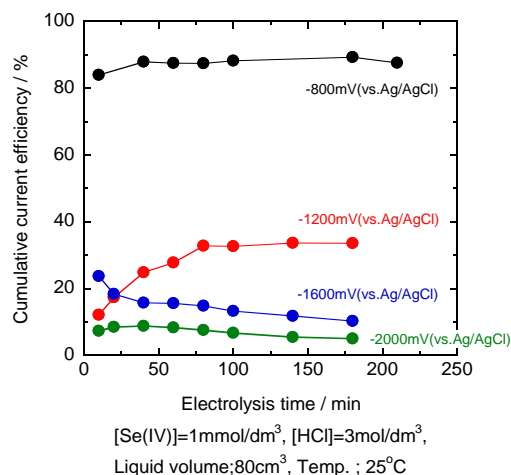


図 7 Se の電解析出試験時の電流効率変化の電解電位依存性

次いで有隔膜電解槽を用いて Se の電解精錬に及ぼす塩酸濃度影響について検討した。図 8 に有隔膜電解槽による Se の電解析出挙動に及ぼす塩酸濃度の影響を示す。図 8 より 3 mol/dm<sup>3</sup> 以上の塩酸水溶液中においては、Se の電解析出速度に大きな差異は確認されなかった。しかし、0.1 mol/dm<sup>3</sup> の塩酸水溶液中では、それ以上の塩酸濃度の電解析出速度と比較すると遅いことが明らかとなった。これは、式(1)に示したように Se の電解析出には H<sup>+</sup>が大きく関与していることに起因するものと考えられる。また、塩酸濃度の高い試料の方が電極表面に密に Se が電解析出していることが確認された。これらの試験結果から、Se を電解精錬するためには、3 mol/dm<sup>3</sup> 以上の塩酸水溶液を用いる必要があると考えられる。



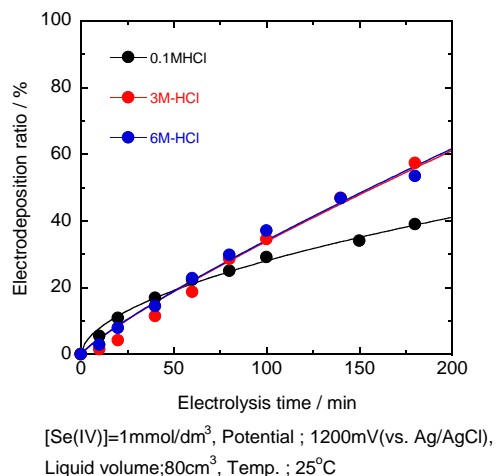


図8 Se(IV)の電解析出に及ぼす塩酸濃度の影響

これまでの成果より Se 濃縮汚泥から Se を塩酸水溶液に抽出した後、 $3 \text{ mol/dm}^3$  以上の塩酸水溶液で  $-800 \sim -1200 \text{ mV vs Ag/AgCl}$  の電解電位により定電位電解を行うことで効率的に Se を精錬できることが明らかとなった。工業的に Se をリサイクルするためには、電解精錬により回収した Se の性状を明らかとする必要がある。そこで本試験では、電解精錬により回収した Se を SEM-EDX により分析に資した。図 9 に電解析出した Se の外観写真と SEM-EDX 分析の結果を示す。

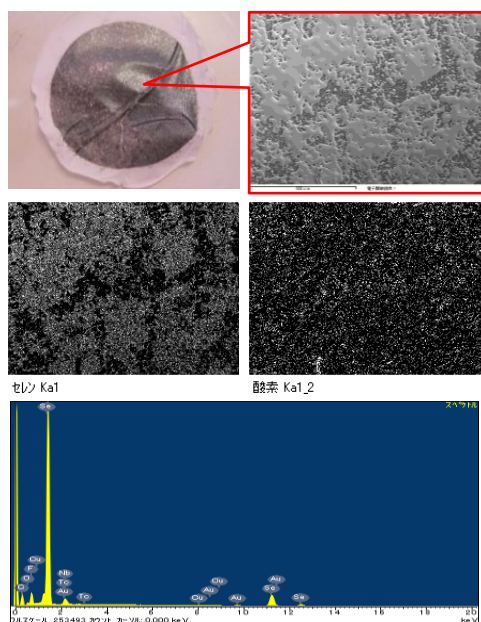


図9 電解析出した Se の外観写真と SEM-EDX 分析結果

図 9 より、電解析出時の Se は赤色を呈していたが、 $60^\circ\text{C}$  で一昼夜乾燥することで銀黒色に変化することが確認された。また、電解析出した Se

は箔状の形状であることが SEM-EDX の分析結果から観察された。さらに、SEM-EDX の元素分布の結果から電子顕微鏡写真と Se とは良好な一致がみられたが、酸素はあまり相関が得られなかった。このことから、電解精錬した Se は、酸化物や塩化物ではなく、Se 単体として回収されていることが示唆された。このことから、電解精錬法により Se は高純度に回収できるものと考えられ、本法で回収した Se は工業的にも使用の可能性が高いと考えられる。

### (3) フロー型電解槽による塩酸水溶液中の Se(IV)の電解析出

塩酸水溶液中の Se(IV)は、電解精錬により金属の Se として回収できる見通しが得られた。しかし、有隔膜電解槽等の従来の電解槽は、バッチ処理であるためバッファータンク等の付帯設備が必要であり、さらに十分な電解速度が得られない等の改善すべき点がある。そこで本開発では、新たな電解槽としてフロー型電解槽を提案した。フロー型電解槽は、立体構造を有する作用電極に電解溶液を通液し、それと同時に電位を付与することで電解液を止めることなく電解操作が可能な連続処理システムである。そこで本開発では、フロー型電解槽による塩酸水溶液中の Se の電積試験を行った。図 10 にフロー型電解槽による Se の電解析出挙動の塩酸濃度依存性を示す。図 10 より  $1 \text{ mol/dm}^3$  以上の塩酸水溶液中の Se(IV)は、フロー型電解槽への通液と同時に全量が Se へ還元され、流出溶液中に Se(IV)は検出されなかった。また、作用電極体積の 30 倍の通液を行っても Se(IV)は検出されなかった。このことから、フロー型電解槽を用いることで塩酸水溶液中の Se(IV)は、瞬時に電極に Se として電解析出しているものと考えられた。このように迅速な電解反応を可能としているのは、作用電極の比表面積が極めて大きいことに依るもの推察される。一方、 $0.1 \text{ mol/dm}^3$  の塩酸水溶液中の Se(IV)は、約 96 %程度の電解析出率に止まった。これは、先述のように  $\text{Se(IV)} \rightarrow \text{Se}$  の反応は  $\text{H}^+$  に大きく寄与することに起因するものと考えられる。

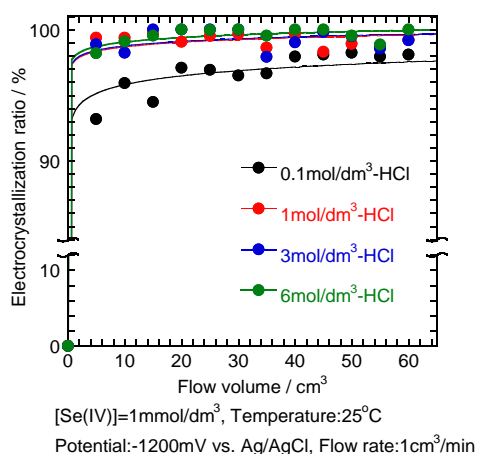


図 10 フロー型電解槽による Se の電解析出挙動の塩酸濃度依存性

また、図 11 に Se 電解析出試験後のフロー型電解槽の電極状態を示す。図 11 より Se 電解析出試験後の電極には、一様に赤色の電解析出した Se が観察された。また、流出溶液中には赤色の微粒子が確認された。これは、電極表面に電解析出した Se が通液とともに溶液中に漏洩したものと考えられる。このことから、今後、電解析出した Se を電極表面に保持させる方法や、漏洩した Se 微粒子の回収方法などの検討を必要とする。

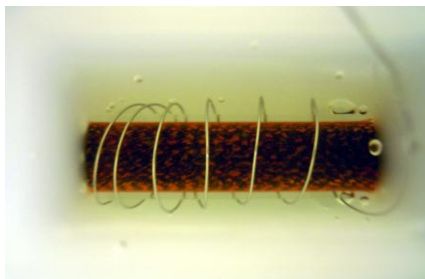


図 11 Se 電解析出試験後のフロー型電解槽の電極状態

また、本試験では、作用電極表面上に電解析出した Se の性状を走査型電子顕微鏡により観察した。図 12 に電解析出試験後の作用電極の走査型電子顕微鏡写真を示す。図 12 よりグラッシーカーボン繊維電極の表面上に Se が電解析出している様子が確認された。また、電解析出した Se の一部がグラッシーカーボン繊維電極より剥離している状態も確認された。これらの剥離した Se が流出液に混入したものと考えられる。一方、電極表面から剥離しやすいことは、電極からの回収も容易であることを示唆する結果でもある。今後、

電極表面に回収された Se の固体状態での回収方法等の検討を進める必要がある。

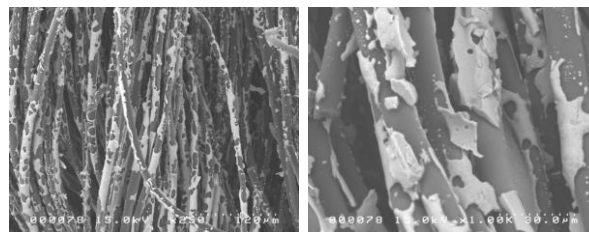


図 12 フロー型電解槽による Se の電解析出試験後の作用電極の走査型電子顕微鏡写真

これまでの試験結果から、フロー型電解槽による Se の電解精錬は、従来の電解槽よりも効率的に Se を回収できる見通しが得られた。今後、更に詳細に電解条件を最適化することで、従来の電解精錬よりも優れたシステムを形成できるものと考えられる。

### 3. 2 化学還元法による Se 精錬試験

#### 3. 2. 1 試験目的

これまでの研究成果より Se 濃縮汚泥から塩酸水溶液に抽出した Se は、電解精錬法により回収できる見通しが得られた。しかし、電解析出法を工業的に適用する場合、電源、電解槽、バッファータンク等のユーティリティー、ガルバニ腐食に耐性のある材料の選定、電解条件のコントロール等、操業までに多くの解決すべき課題がある。これらの操業に至るまでのコストや定常的なランニングコストは、精錬回収した Se の単価に大きく影響するため、プロセスは可能な限りシンプル且つランニングコストを抑制できる方が好ましい。そこで本開発では、電解精錬技術の開発とともに化学還元法についても検討を加えた。化学還元法は、還元性の試薬を対象溶液に注入し、液電位を卑にして化学的に目的物質を還元させる方法である。本研究では、還元試薬としてヒドラジンに注目した。ヒドラジンは無機の化合物で、化学式は  $N_2H_4$  で示される。化学式からも明化のように、ヒドラジンを構成する元素は窒素と水素であるため、化学還元により発生する廃液が環境を汚染する可能性も殆どないと考えられる。本開発では、Se 濃縮汚泥から塩酸水溶液に抽出した Se のヒドラジンによる化学還元法について検討したので報告する。

#### 3. 2. 2 実験方法

本試験では所定の濃度に調製した塩酸水溶液に  $10 \text{ mmol/dm}^3$  となるように亜セレン酸を溶解し試験溶液とした。還元試薬はヒドラジン水和物 ( $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) を  $1 \text{ mol/dm}^3$  となるように純水で希釈し調製した。化学還元試験は、共栓付き三角フラスコに  $50 \text{ cm}^3$  の試験溶液を入れ、そこへ還元試薬を 10 分毎に  $1 \text{ cm}^3$  ずつ、最大で  $10 \text{ cm}^3$  注入した。所定時間毎に試験溶液をサンプリングし、ディスクフィルターで固液分離後、試験溶液中の Se 濃度を測定した。また、得られた沈殿物はメンブレンフィルター上で十分に洗浄後、 $60^\circ\text{C}$  に設定したオーブン中で一昼夜乾燥し、走査型電子顕微鏡及び X 線回折により構造分析を行った。

### 3. 2. 3 結果及び考察

本試験では、各塩酸濃度の試験溶液に所定量の還元試薬を注入し、Se の還元挙動を検討した。図 13 にヒドラジン注入による Se の化学還元挙動の外観写真を示す。図 13 より何れの塩酸濃度の試料においても、ヒドラジンの注入により赤色の沈殿が確認された。これは、電解析出試験の時に確認された赤色の沈殿物と類似した外観を呈していた。また、ヒドラジン添加量の増大に伴い、沈殿物同士が凝集することが確認された。このことから、一定以上のヒドラジン添加により比較的大きな沈殿物を形成することができ、濾過特性の向上が期待される。

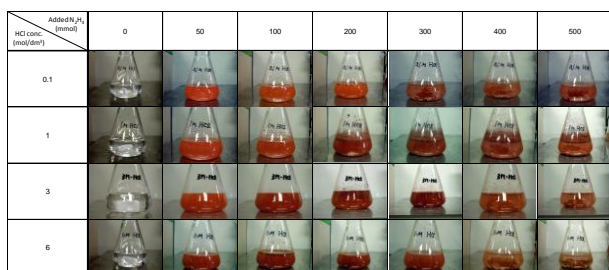


図 13 ヒドラジン注入による Se の化学還元の外観写真

また、本試験のヒドラジン注入に伴う塩酸水溶液中の Se 濃度変化を図 14 に示す。図 14 より何れの塩酸濃度においても  $1 \text{ mmol}$  のヒドラジンを注入することで、ほぼ全量の Se が沈殿することが示された。塩酸溶液中の Se(IV) は  $0.5 \text{ mmol}$  存在しているため、2 倍量のヒドラジンの注入で十分に全量の Se を沈殿できることが示された。また、 $0.1 \text{ mol/dm}^3$  塩酸水溶液中の Se は、 $5 \text{ mmol}$  以上の

ヒドラジンを添加した場合に再溶解が確認された。

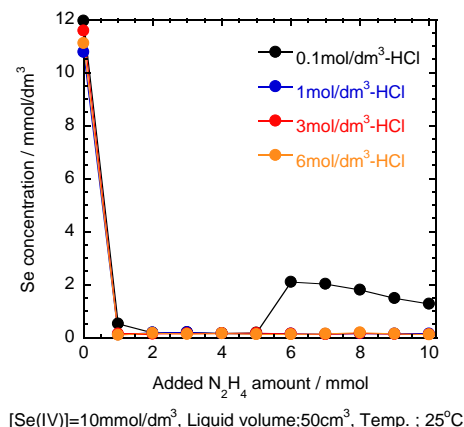


図 14 ヒドラジン注入に伴う塩酸水溶液中の Se 濃度変化

本試験では、ヒドラジン注入により得られた Se 沈殿物の固体観察を行った。図 15 にヒドラジン注入により得られた Se 沈殿物の走査型電子顕微鏡写真を、図 16 に Se 沈殿物の X 線回折結果を示す。

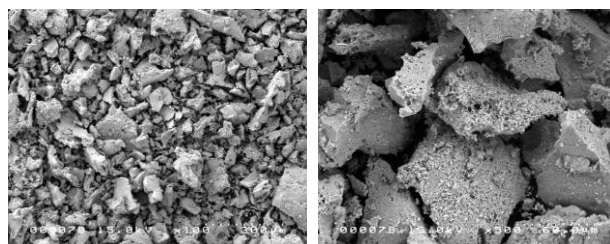


図 15 ヒドラジン注入により得られた Se 沈殿物の走査型電子顕微鏡写真

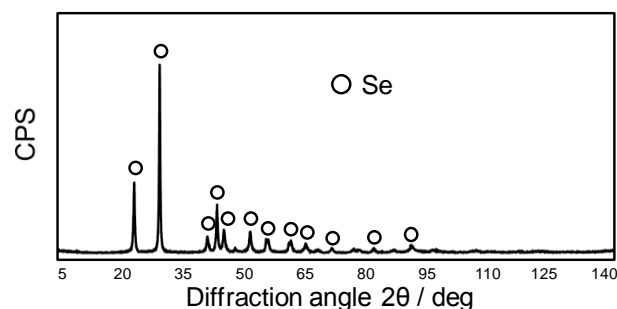


図 16 ヒドラジン注入により得られた Se 沈殿物の X 線回折結果

図 15 より、ヒドラジン注入で得られた Se 沈殿物は、 $100 \mu\text{m}$  程度の比較的大きな固体として回収できることが観察された。また、Se 沈殿物の表面

には、細孔が確認された。これは、ヒドラジンにより  $\text{Se(IV)}$  が還元される際にガスの発生を伴うことが推測される。次いで、X 線回折により  $\text{Se}$  沈殿物の構造の同定を試みた。図 16 より、ヒドラジン注入により得られた  $\text{Se}$  沈殿物は、金属  $\text{Se}$  と良好な一致が見られた。このことから、ヒドラジン注入により  $\text{Se(IV)}$  は、金属  $\text{Se}$  に還元されることが明らかとなった。推定されるヒドラジンと  $\text{Se(IV)}$  の反応式を式(2)に示す。



式(2)より、先の走査型電子顕微鏡で観察された細孔は、 $\text{N}_2$  の発生に起因するものと考えられる。これまでの試験成果から、ヒドラジン注入による  $\text{Se}$  の化学還元は、極めて有効な精錬方法であると考えられる。実機のプロセスを想定した場合、化学還元法は操作が極めて容易であり、付帯設備の簡素化も十分に期待できる。本法の課題としては、試薬注入に伴う廃液の増大や固液の分離技術の開発等が考えられ、今後、更に還元試薬の注入条件、廃液の処理法等を最適化する必要がある。

### 3. 3 Se 精錬プロセスの提案

本開発で得られた成果を基に各項目について相対的な評価を行った。

#### (Se 純度)

電解析出法は、元素固有の電位を付与することで特定の元素のみを回収することができるため、高純度の  $\text{Se}$  を回収できるものと考えられる。化学還元法は、還元試薬の注入により共沈する元素が存在すると  $\text{Se}$  の高純度化は困難と推測する。

#### (付帯設備)

電解析出法は、電解槽、電源、配線、供給ポンプ、バッファータンク等の付帯設備が大きくなることが推測される。化学還元法は、還元槽、攪拌機、試薬注入器、バッファータンク等で構成できると考えられるため、付帯設備は小さくできると考えられる。

#### (運転性)

電解析出法は、電流、電位の制御、電解析出物の回収等、運転性は困難と考えられる。化学還元法は、攪拌翼の回転、液性の分析等、最も簡便に運転が可能と考えられる。

#### (センシング性)

電解析出法の計測は、電流、電位、流速等であるため、センシング性は比較的優れると考えられ

る。化学還元法の計測は、液位、時間、攪拌翼の回転速度等であるため、センシング性に優れると考えられる。

#### (廃液発生量)

電解析出法は、 $\text{Se}$  濃縮汚泥から塩酸水溶液に  $\text{Se}$  を抽出するため廃液発生量が多いと推測される。化学還元法は、塩酸水溶液に  $\text{Se}$  を抽出した後更に還元試薬を注入するため廃液発生量は極めて多いと考えられる。

#### (環境負荷)

電解析出法は電気分解時に塩素ガスの発生や電気消費量が大きいため、運転条件により環境に負荷を与える可能性がある。化学還元法は廃液発生量が多いため、試薬の賦活を勘案しないと環境に負荷を与える可能性がある。

#### (経済性)

電解析出法は、電気消費量が多く、付帯設備が大きい、消耗品が多い等の観点から経済性に劣ると考えられる。化学還元法は、還元試薬の値段に大きく左右されるが、ヒドラジンは十分に安価であり、かつ付帯設備も小さく、センシングシステムも安価であるため、最も経済性に優れると考えられる。

これまでの試験の成果から、本開発では  $\text{Se}$  濃縮汚泥からの  $\text{Se}$  精錬プロセスを提案した。図 16 に本開発で提案する  $\text{Se}$  濃縮汚泥からの  $\text{Se}$  精錬プロセスを示す。本提案では、 $\text{Se}$  の付加価値、使用用途、純度等、目的に応じて精錬プロセスを選定する必要があると考える。

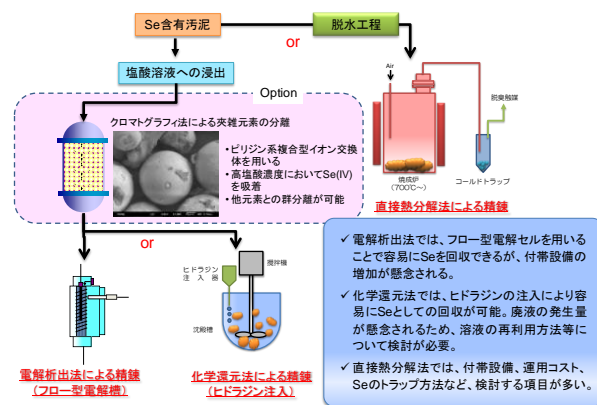


図 16 本研究成果を基にした  $\text{Se}$  精錬プロセスの提案

### 4. 今後の計画及び学会論文等投稿・発表状況

今後は、新たな分離媒体（イオン液体等）を用いて有用資源の分離・回収試験を実施する。

(3) 平成 25 年度

## セレン還元細菌を用いたセレン回収技術開発

芝浦工業大学工学部応用化学科 山下 光雄

### 1. 序論

セレン (Se) は、原子番号 34、原子量 78.96 の非金属元素であり、地殻存在量は 0.05mg/L (ppm) とされている。セレンは化学的に硫黄と似ており、生物作用を受けやすく、土壌中のセレン濃度は地域により明確な差がある。Se は、工業的にも重要な金属資源で、コピー機やガラス染色、半導体原料などに利用されており、工場などから水系に放出されている。生物にとっても必須微量元素であり、体内でセレン含有アミノ酸の合成に利用される。一方で、水中での存在形態であるオキソアニオン (酸化物イオン) のセレン酸塩 ( $\text{SeO}_4^{2-}:\text{Se(VI)}$ ) や亜セレン酸 ( $\text{SeO}_3^{2-}:\text{Se(IV)}$ ) は、生物に対して慢性・急性の毒性を有することから、排出基準が厳しく定められており、環境中に排出する際には 0.1ppm 以下まで浄化することが義務付けられている。現在は電気還元、化学還元や凝集沈殿・吸着剤法にて浄化が行われている。大量の化学薬品の使用や廃棄物が排出されることなどために高コストであり、また、廃棄物量に含まれる Se 含量が低いことから Se を資源として回収する事は難しい。現状の物理化学的 Se 含有排水処理技術の有するエネルギー・資源の大量消費、高コストなどの問題点を解決する新

たな処理方法として、排水中に存在する Se オキソアニオンを微生物により還元し、無毒・固形の元素態セレン (Se (0)) に変換する方法が考えられる。

Se オキソアニオンを還元する微生物としては、これまでに *Bacillus selenatarsenatis* SF-1 株が分離されている<sup>1)</sup>。SF-1 株は嫌気条件下においてセレン酸の還元を行い、元素態セレンを細胞内に蓄積する。しかし、工業的利用を考えた場合、操作的な面や菌体の増殖といった面で嫌気条件下では扱いにくい。そこで、新たに好气的条件下においてセレン酸を還元することができる *Pseudomonas stutzeri* NT- I 株が分離された<sup>2)</sup>。NT- I 株は、酸素が存在する条件下でセレン酸を還元し元素態セレンを生成することができる新規なセレン酸塩還元細菌である。高いセレン酸還元能力を有し、高濃度の亜セレン酸還元が可能であるうえ、亜セレン酸から元素態セレンへの還元もスムーズであり、水溶性 Se 除去の効率は世界で最も高いと言える。生成した元素態セレンは、約 20 nm 径の微粒子として微生物の細胞外に赤色アモルファスの状態で蓄積される。このとき沈殿から回収される Se 濃度は添加量の約 70%以上と非常に高く、排水からの Se 資源回収プロセスへと発展するポテンシ

ヤルを秘めている。

さらにNT-I株はセレン酸の還元が進み元素態 Se が析出してきた後も、培養を続けると、今度は元素態 Se によって赤くなっていた培養液の色が消失し、培養液の気相においてメチル化した Se が検出された<sup>3)</sup>。つまり、このNT-I株は、溶液中のセレン酸を固体の元素態 Se にするというミネラルリゼーションだけでなく、さらに固体の元素態 Se から気体のメチル化 Se にすることでボラタリゼーション(気化)を行っていることがわかった。気相中においては、夾雑物が少なく、培養汚泥に比べ、Se が非常に高い純度を持っている。これは、Se を回収するうえでは、非常に大きなメリットとなる。そこで、本報告書では、NT-I株の将来的な実機スケールでのセレン回収技術開発を踏まえ、模擬排水から実廃水を用いて培養容量のスケールアップを計ると共に、バイオリクターシステムによるセレン酸及び亜セレン酸からの気化セレンへの還元最適条件を検討することを目的とした。

## 2. 研究計画

平成23年度は、セレンを含有する模擬排水を用いて、セレンを回収するための最適化条件を決定した。平成24年度は、模擬排水を用いて決定した最適化条件を用いて、実排水に有効利用することを試みる。その上でセレンを固化または気化物として回収の最適化条件を決定した。平成25年度は、実排水だけでなく、実廃棄物またはその抽出溶液を用いて、セレンを固化物または気化物として回収を行う予定である。平成26年度は、レアアースエレメント代謝微生物を

用いて、模擬排水や廃棄物からのレアアースエレメントを回収するためのリアクターの開発を行う予定である。最終年度の平成27年度は、開発したリアクターを用いてのバイオリーチングの最適化条件を検討し、レアアースエレメントを回収し、成功に導く予定である。

## 3. 計画の進行状況

### 3. 1 実験材料及び方法

#### 3. 1. 1 菌株と培養条件

本研究では *Pseudomonas stutzeri* NT-I株が用いられた<sup>2)</sup>。NT-I株の培養には、Bacto™ Tryptic Soy Broth (TSB; Becton-Dickinson, NJ, USA) 培地が使われた。セレン酸、亜セレン酸還元試験には、セレン酸、亜セレン酸のナトリウム塩(ナカライテスク(株))が用いられた。その他の試薬には、市販の特級品が用いられた。

#### 3. 1. 2 ジャーファーマンターを用いてのセレン酸・亜セレン酸還元試験

NT-I株の一白金耳量を100 ml容バイアルに分注した50 mLのTSB培地に植種し、30℃、120rpmの条件に設定した回転振盪培養器で24時間培養した。この培養液を新しい50 mlのTSB培地を含む100 ml三角フラスコに0.5 ml添加し、再度12時間の前培養を行った。続いて、還元試験を行うために、遠心分離により菌体を回収し、回収した菌体を0.9%塩化ナトリウム溶液によりOD<sub>600</sub>が1.0になるように調整した。この溶液30 mlの種菌は、任意の濃度のセレン酸もしくは亜セレン酸を含んだTSB培地3 Lを分注した5 L容ジャーファーマンター

(Bioneer-C500N 型 5L(S)、株式会社丸菱バイオエンジ) に添加され、培養された。培養液の温度、攪拌速度、pH はそれぞれ任意の値に保たれた。pH は 30% の NaOH 溶液、2 規定の HCl 溶液で調整された。溶存酸素 (DO) および pH は、それぞれ DO 電極 (OX-2500、株式会社丸菱バイオエンジ) と pH コンビネーション電極 (MPS-220、株式会社丸菱バイオエンジ) で測定された。経時的に培養液中のセレン酸、亜セレン酸、元素態セレン、および全水溶性セレンが定量された。セレン酸および亜セレン酸の還元速度 (mol/hr/cell) は、セレン酸または亜セレン酸の減少量が 1 時間当たりで最大になる速度 (mol/hr) を、光学密度から算出した菌体数 (cells) で割ることで算出された。

### 3. 1. 3 気体セレンの回収

気体セレンは硝酸にて捕集できることから<sup>4)</sup>、ジャーファーマンターからの排気はテフロンチューブ (内径 5 mm、外径 6 mm) を用いて、水蒸気による溶液量の変化を緩和するために空の 250 ml の試薬瓶を通してから、250 ml の試薬瓶に分注した 150 ml の濃硝酸を通過させた。テフロンチューブの先端にはエアーストーンを用いた。濃硝酸は経時的にサンプリングされ、濃硝酸中の元素は誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) (iCAP 6300 Duo、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用いて定性、定量分析された。

### 3. 1. 4 分析方法

培養菌体の細胞増殖は、分光光度計 (V-600、日本分光株式会社) を用いて、600 nm における光学密度 (OD<sub>600</sub>) から計算さ

れた。菌体密度は以下の式から計算された。菌体密度 (cells/ml) = OD<sub>600</sub> × 8.5 × 10<sup>8</sup> とし、この式は OD<sub>600</sub> の値とカウンティングチャンバーを用いて位相差顕微鏡 (DM1000、ライカマイクロシステムズ株式会社) による細胞直接計測によって決定された。培養液の 2 mL を遠心分離 (15,000×g、5 min、室温) して固液分離し、得られた上清を 0.2 μm のフィルター (ステラディスク 13、クラボウ) でろ過したものをサンプルとした。サンプル中のセレン酸および亜セレン酸イオンは、イオンクロマトグラフィー (ダイオネクス社、ICS-1100、検出器 DS6 HEATED CONDUCTIVITY CELL、カラム IonPac AS12A、ガードカラム AG12A、サプレッサー ASRS300、溶離液 3.0 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、流速 1.5 ml/min) で定性・定量した。また、同サンプルの溶液は、ICP-AES (iCAP 6300 Duo) を用いて、全水溶性セレンを定量された。沈澱物には超純水 2 ml を加え、ボルテックスにより混合した後、遠心分離 (15,000×g、5 min、室温) により沈殿を回収した。2 回繰り返し、洗浄作業を行った後、沈澱試料に 1500 μl の濃硝酸と 50 μl の濃硫酸を添加し、ボルテックスにより混合し沈澱物を溶解させた。溶解液は遠心分離 (15,000×g、5 min、室温) を行い、上清と沈澱物に分離した。上清は 10 ml メスフラスコに分取された。沈澱物を再度同条件で溶解操作を行い、得られた上清は、同じメスフラスコに分取された。10 ml メスフラスコに超純水を標線まで足し、定容したものを測定試料とした。測定試料は ICP-AES で定量され、セレンの値は元素態セレンとした。気体トラップの濃硝酸中の元素は ICP/AES で測定し、硝酸中の全存在元素と濃度を求めた。



排気の定性分析は、ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS) (FocusGC DSQ II、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、横浜) により行われた。GC カラムには DB-624 を用いた。カラムの長さは 30 m、I.D.は 0.250 mm である。測定はスプリットレスモードで行われた。スプリットバルブは注入 1 分後に開かれた。ヘリウムガスの流量は 1.0 ml/min とした。昇温プログラムは 40°C を 5 分間保持し、10°C/min の速度で 240°C まで昇温させ、240°C で 1.5 分間保持させる条件に設定された。GC の注入口および GC と MS をつなぐラインは 200°C に保たれた。イオン化は 220°C のイオン源によって、ポジティブイオンモードで行われた。試料は 250 $\mu$ l シリンジを用いて 250  $\mu$ l 注入された。すべて測定は 3 回行い、平均値が算出された。

### 3. 2 結果及び考察

#### 3. 2. 1 模擬排水を用いた気化セレン回収

完全培地にセレン酸を終濃度 0.5mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> (0.004% wt  $\cdot$  wt<sup>-1</sup>) となるように添加したモデル廃水を用いた場合のセレン回収試験の結果を示す (図 1)。

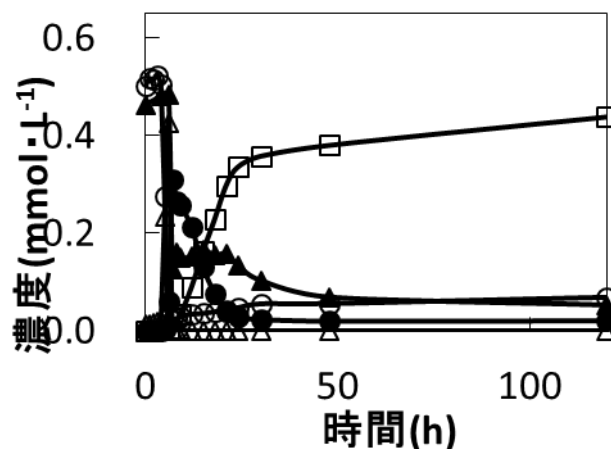


図 1 模擬排水を用いたセレン気化回収試験 ○: セレン酸, △: 亜セレン酸, ▲: 可溶性セレン, ●: 元素態セレン, □: 気化セレン。

ジャーファーメンターを用いて NT-I 株のセレン酸化物イオン還元最適培養条件を求めた。その結果、還元最適培養条件を温度 38°C, pH9.0, 攪拌速度 250rpm, 通気量 1L/min と決定した。この培養条件でのセレン気化速度を計算したところ 14  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $\cdot$  h<sup>-1</sup> であった<sup>3)</sup>。NT-I 株の気化速度は既存の報告値よりも速いことがわかった<sup>5)-8)</sup>。この培養条件でのセレン回収試験を NT-I 株のセレン気化回収方法とした。

セレン酸濃度 0.5mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> の模擬排水を用いてセレン気化回収試験を行った。セレン酸, 亜セレン酸, 可溶性セレン, 元素態セレン, 気化セレンの経時変化を図 1 に示した。表 1 に回収時の可溶性セレン, 固化セレン, 気化セレンの濃度と初期濃度と比較した割合 (%) ( $\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) を示した。NT-I 株によって培養開始から 6 時間で初期セレン濃度のほぼ 100% のセレン酸が亜セレン酸に還元され, 7 時間目には約 95% の

亜セレン酸が元素態セレンに還元された。120 時間目には初期セレン濃度の 71.2%の DMDSe を硝酸で回収することができた。この硝酸中のセレン濃度を測定した結果  $7.2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  であり、模擬排水中の初期セレン濃度  $0.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  よりも 14 倍濃縮して回収できた。硝酸中に検出できた夾雑物は硫黄  $12.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  のみであり、硫黄以外の培地成分や菌体成分が含まれない高純度セレンの回収に成功した。

### 3. 2. 2 模擬排水を用いた固化セレン回収

気化回収条件で培養を行うと生産された元素態セレンは速やかに DMDSe に還元される。セレンを固化回収するために、我々は元素態セレンの還元を阻止できる培養条件を検討した。NT-I 株は菌体増殖後には通気が無い状態でも、攪拌することによってセレン酸から元素態セレンまで還元できる。そのまま通気を止めておくと元素態セレンの還元（つまり減少）を抑制できることがわかった。以上の結果を利用してセレンの固化回収方法を考案した。培養温度  $38^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}9.0$ 、攪拌速度  $250\text{rpm}$ 、通気量  $1\text{L}/\text{min}$  の条件で培養して菌体を増殖させ、培養開始から 12 時間目に通気を止めた時点でセレン酸を添加し、元素態セレンに変換する方法をセレン固化回収方法とした。

図 2 にモデル廃水を用いたセレン固化回収実験での各セレンの経時変化を示した。培養開始 12 時間目にセレン酸を添加すると、13 時間目には初期添加濃度のほぼ 100%のセレン酸が亜セレン酸へ還元された。15 時間目までに初期添加濃度の約 90%の亜セ

レン酸が元素態セレンに還元された。そして 22 時間目に元素態セレン量が最大となった。初期セレン濃度の 87.8%にあたる元素態セレンを汚泥として回収できた(表 1)。

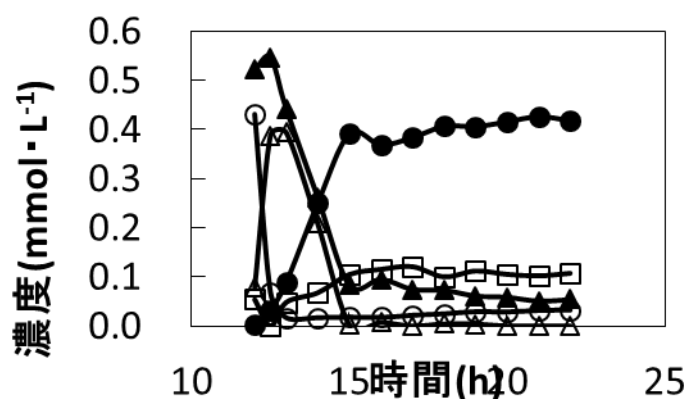


図 2 模擬排水を用いたセレン気化回収試験 ○：セレン酸，△：亜セレン酸，▲：可溶性セレン，●：元素態セレン，□：気化セレン。

汚泥を粗精製した後、誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) で構成元素の定量分析を行った。測定の結果、粗精製物にはセレンが  $2\%$  ( $\text{wt}\cdot\text{wt}^{-1}$ )、マグネシウムが  $4\%$  ( $\text{wt}\cdot\text{wt}^{-1}$ )、カルシウムが  $2\%$  ( $\text{wt}\cdot\text{wt}^{-1}$ ) 含まれていることがわかった。ICP-AES では測定ができない炭素、酸素、窒素等の低元素分析のためエネルギー分散型 X 線分析 (EDX) で半定量分析を行った。本研究で得られた粗精製物の電子顕微鏡写真 (図 3(A))、元素組成分析結果 (図 3(B)) と EDX 元素スペクトル (図 3(C)) を示した。粗精製物全体にセレンが検出され、特に白

い部分にセレンが濃縮されていた(図 3(A))。EDX の分析結果も ICP-AES の分析結果と一致しており、粗精製物には平均 2% (wt・wt<sup>-1</sup>) のセレンが含まれていた。モデル廃水の初期セレン濃度は 0.004% (wt・wt<sup>-1</sup>) であるので、粗精製物は約 500 倍に濃縮した粗精製セレンであり、資源化の可能性が示唆された。固化回収は気化回収と比較して培養開始から回収までの時間が短く、セレンの濃縮倍率も高い。既存の報告では水溶液からセレンを浄化・除去することを目的としており<sup>9) -13)</sup>、資源化の報告は未だない。我々は模擬排水からセレンを含む汚泥を回収し、セレンが 2%(wt・wt<sup>-1</sup>)含まれる粗精製セレンの獲得に初めて成功した。

模擬排水を用いた実験では気化回収で初期セレン酸濃度の 71.2%, 固化回収で 87.8% を回収できた。気化回収での回収率が固化回収より低い理由は、硝酸による DMDSe の捕集効率(81%)を考慮していないからである<sup>4)</sup>。捕集効率を計算にいれると、気化回収率は 87.9%となり、回収率は固化回収とほぼ同じになる。

次にセレン含有実廃水からのセレン気化回収、固化回収実験の結果を紹介する。可溶性セレンを 5.5mmol・L<sup>-1</sup> 含む実廃水の提供を受けた。イオンクロマトグラフィーで定性定量分析を行ったところ、セレン酸が約 85%, 亜セレン酸が約 15%の割合で混在していた。セレン以外にもケイ素やカルシウム、カリウムが含まれていた。実廃水を

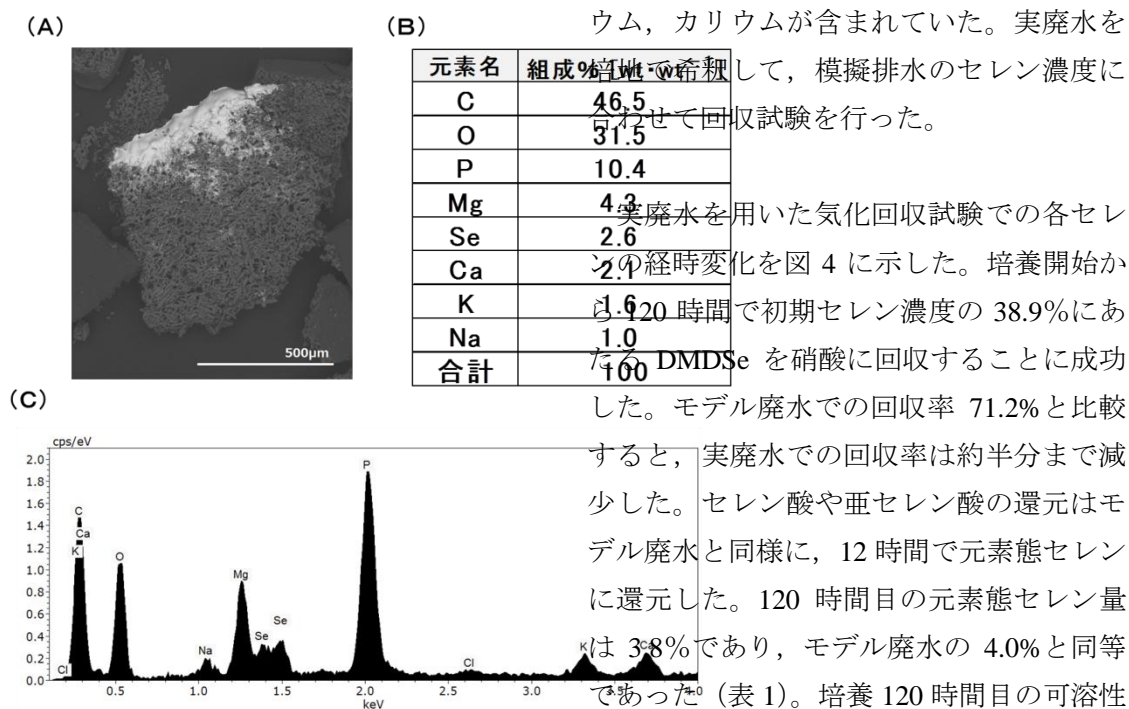


図 3 粗精製セレンの電子顕微鏡写真 (A)、元素組成分析 (B) と EDX 分析スペクトル (C) .

### 3. 2. 3 実廃水を用いた気化セレン回収

模擬排水を用いた実験では、模擬排水のセレン濃度に合わせて回収試験を行った。実廃水を用いた気化回収試験での各セレン濃度の経時変化を図 4 に示した。培養開始から 120 時間で初期セレン濃度の 38.9%にあたる DMDSe を硝酸に回収することに成功した。モデル廃水での回収率 71.2%と比較すると、実廃水での回収率は約半分まで減少した。セレン酸や亜セレン酸の還元はモデル廃水と同様に、12 時間で元素態セレンに還元した。120 時間目の元素態セレン量は 3.8%であり、モデル廃水の 4.0%と同等であった(表 1)。培養 120 時間目の可溶性セレンの割合はモデル廃水の 10.5%に比べて実排水では 35.9%となっている。可溶性セレン中のセレン酸と亜セレン酸濃度は各々 5%であるので、未知セレンが培養液中に 25.9%含まれていた。分析の結果、未知セレンは主に DMDSe であった。

以上の結果から、実廃水を用いた時の気体回収率の低下は DMDSe が可溶性セレンとして残存していることが原因だと考えられる。回収時に可溶性セレンに含まれる DMDSe が全て気体として硝酸で回収できたと仮定すると、気化回収率は初期セレン濃度の 64.8% (気体回収率 38.9% + 可溶性セレンに含まれる DMDSe 含量 25.9%) となる。これはモデル廃水を用いた時と同等の回収率である。DMDSe が培養液中に残存する要因は検討中であるが、モデル廃水には存在しない元素等に起因していると考えられる。この要因を取り除くことで、NT-I 株によるセレン気化回収の回収率が高くなる可能性がある。

セレンとして回収することに成功した。モデル廃水では 22 時間で 87.7% の回収率が得られている。モデル廃水と比較すると回収率が若干低下したものの、実廃水を用いても高い回収率が得られた。

実廃水では培養開始から 24 時間目には、可溶性セレンが 8.6% 存在している (表 1)。可溶性セレン、元素態セレン以外の 12.5% は NT-I 株が元素態セレンを還元して DMDSe を合成し、気化したものと考えられる。実廃水はセレン酸と亜セレン酸が混在しているため、各還元反応速度が異なり、単純に通気を止めるだけでは元素態セレンの還元を完全に抑制することができていない。セレン酸化物イオンの混合比によって培養条件を変える等の工夫が必要である。元素態セレンの還元を完全に阻止できれば、より高回収率で固化回収ができると考える。

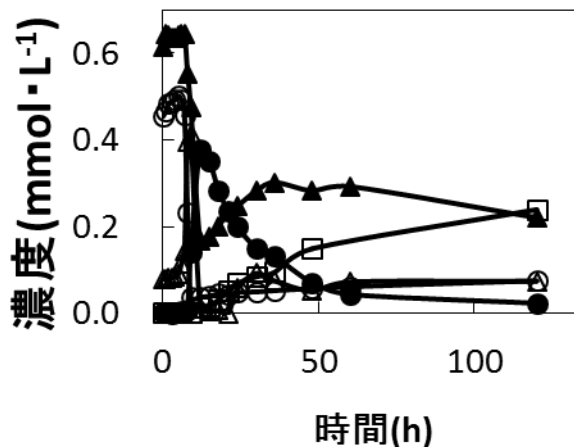


図4 実廃水を用いたセレン気化回収試験  
○：セレン酸，△：亜セレン酸，▲：可溶性セレン  
●：元素態セレン，□：気化セレン。

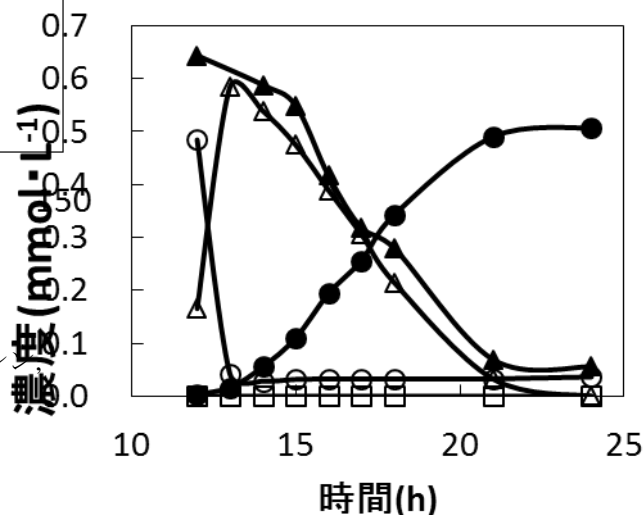


図5 実廃水を用いたセレン気化回収試験  
○：セレン酸，△：亜セレン酸，▲：可溶性セレン，  
●：元素態セレン，□：気化セレン。

### 3. 2. 4 実廃水を用いた固化セレン回収

実廃水を用いた固化回収試験の各セレンの経時変化を図 5 に示した。培養開始から 24 時間で初期セレン濃度の 78.8% を元素態

### 3. 2. 5 実廃水を用いたセレン回収まとめ

本稿ではNT-I株による実廃水を用いたセレンの気化、固化回収の結果を紹介した。セレン気化回収では模擬排水と比べると回収率は低かったが、回収率を向上できる可能性がある。セレン固化回収では高回収率でセレン汚泥を回収できた（表1）。

セレン気化回収では培養終了までの時間は長い、夾雑物の少ないセレンを単位プロセスで回収することができる。セレン固化回収では培養終了までの時間は短い、回収した汚泥には微生物由来の夾雑物が含まれる。このため高純度セレンを精錬するには汚泥からの別工程が必要となる。浄化回収ニーズに見合った2種類の回収方法（気化回収・固化回収）を選択できるのがNT-I株を利用したセレン回収の特徴である。

表1 セレン回収時における可溶性セレン、元素態セレン、気化セレンのマスバランス。

サンプル	培養条件	可溶性セレン		元素態セレン		気化セレン		Dimethylselenide and dimethyltelluride	
		mmol・L <sup>-1</sup>	%	mmol・L <sup>-1</sup>	%	mmol・L <sup>-1</sup>	%	mmol・L <sup>-1</sup>	%
モデル廃水	気化回収条件*1	0.05	10.5	0.02	4.0	0.36	71.2	0.43	85.8
モデル廃水	固化回収条件*2	0.04	8.7	0.44	87.8	N.D.	N.D.	0.48	97.6
実廃水	気化回収条件*1	0.22	35.9	0.02	3.8	0.24	38.9	0.48	78.6
実廃水	固化回収条件*3	0.06	8.6	0.51	78.8	N.D.	N.D.	0.58	88.4

\*1 38°C, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 120時間目に回収  
 \*2 38°C, pH9.0, 0 L/min, 250rpm, 22時間目に回収  
 \*3 38°C, pH9.0, 0 L/min, 250rpm, 24時間目に回収  
 N.D.: Not determined

### 4. 参考文献

- 1) Fujita M *et al.*: Isolation and characterization of a novel selenate-reducing bacterium, *Bacillus* sp. SF-1. *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 517-522, 1997.
- 2) Kuroda, M. *et al.*: Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. *J. Biosci. Bioeng.*, 112(3), 259-264, 2011.
- 3) Kagami, T. *et al.*: Selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. *Water Research*, 47, 1361-1368, 2013.
- 4) Lenny W. *et al.*: Quantitative and qualitative trapping of volatile methylated selenium species entrained through nitric acid. *Environ. Sci. Technol.*, 44(1), 382-387, 2010.
- 5) de Souza, M.P., Amini, A., Dojka, M.A., Pickering, I.J., Dawson, S.C., Pace, N.R., and Terry, N.: Identification and characterization of bacteria in a selenium contaminated hypersaline evaporation pond. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 3785-3794, 2001.
- 6) Doran, J.W. and Alexander, M.: Microbial transformations of selenium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 31-37, 1977.
- 7) Fleming, R.W. and Alexander, M.: Dimethylselenide and dimethyltelluride formation by a strain of *Penicillium*. *Appl. Microbiol.*, 24, 424-429, 1972.
- 8) Saudi, M. R., Ghazvini, P.T.M., Khajeh, K. and Gharavi, S.: Bioprocessing of seleno-oxyanions and tellurite in a novel *Bacillus* sp. strain STG-83: A solution to

removal of toxic oxyanions in presence of nitrate. *J. Hazard. Mater.*, **165**, 71–77, 2009.

9) Hageman, S.P., van der Weijden, R.D., Weijma, J. and Buisman, C.J.: Microbiological selenate to selenite conversion for selenium removal. *Water Res.*, **47**, 2118-2128, 2013.

10) Cantafio, A.W., Hagen, K.D., Lewis, G.E., Bledsoe, T.L., Nunan, K.M. and Macy, J.M.: Pilot-scale selenium bioremediation of San Joaquin drainage water with *Thauera-selenatis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3298-3303, 1996.

11) Lenza M., Van Hullebusch, E.D., Hommes, G., Corvinic, P.F.X. and Lens, P.N.L.: Selenate removal in methanogenic and sulfate-reducing upflow anaerobic sludge bed reactors. *Water Research.*, **42**, 2184-2194, 2008.

12) Lenz, M., Enright, A.M., O'Flaherty, V., van Aelst, A.C., and Lens, P.N.L.: Bioaugmentation of UASB reactors with immobilized *Sulfurospirillum barnesii* for simultaneous selenate and nitrate removal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83**, 377-388, 2009.

13) Lortie, L., Gould, W.D., Rajan, S., McCready, R.G., and Cheng, K.J.: Reduction of selenate and selenite to elemental selenium by a *Pseudomonas stutzeri* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 4042-4044, 1992.

## 5. 学会論文等投稿・発表状況

1) 山下光雄、大塚治：「セレン酸還元細菌 NT-I 株を用いた廃水からのセレン回収」。水環境学会誌、37(2)、66–70 (2014)。

2) 成田尚宣、山下光雄：「レアメタルのバイ

オ濃縮回収技術の可能性」121–132, 応用微生物学。小柳津広志、倉橋みどり編集。成山堂書店。(2013)。

3) 大塚治、成田尚宣、黒田真史、池道彦、山下光雄： *Pseudomonas stutzeri* NT-I のジメチルジセレニド合成能の特徴。(2014年度日本農芸化学会大会、東京)。

4) 堀池巧、大塚治、田中康寛、寺原猛、今田千秋、山下光雄：テルルを代謝する新規海洋性微生物の獲得とその機能解析。(2014年度日本農芸化学会、東京)。

5) 樋口靖典、成田尚宣、黒田真史、惣田訓、山下光雄、池道彦：ジャーファーメンターを用いた *Pseudomonas stutzeri* NT-I によるセレンオキソアニオン還元特性の検討。(2013年度(第50回)日本水処理生物学会、神戸市)。

6) Masashi Kuroda, Emiko Miwa, Kazunari Sei, Satoshi Soda, Mitsuo Yamashita, and Michihiko Ike.: Analyses of selenate reduction mechanism in *Pseudomonas stutzeri* NT-I, the promising biocatalyst for selenium-removal and -recovery from contaminated water. (Metals and Related Substances in Drinking Water 5<sup>th</sup> international Conference (IWA Metals 2013), Shanghai, China, 2013).

7) M. Kuroda, T. Kagami, T. Narita, S. Soda, M. Yamashita, M. Ike.: *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of reducing selenate/selenite into elemental selenium and methyl selenides; a versatile microbial agent for biotreatment/bioremediation of selenium contamination. (VJSE: Vietnamese-Japanese Student's Scientific Exchange Meeting. 2013), Osaka, Japan, 2013).

8) Mitsuo Yamashita and Takumi Horiike: Development of recycling technology of

rare-earth elements (REE) from wastes using microorganism's metabolism. (Japan Sustainable Mining, Investment & Technology business forum, Tokyo, Japan, 2013) .

## セレン還元酵素を用いたセンサーの開発

芝浦工業大学工学部応用化学科

今林 慎一郎

### 1. はじめに

セレンは化合物系太陽電池用の半導体など先端材料に使用されるレアメタルである。酸化数-2, 0, +4, +6のうち、毒性のあるセレン酸(+6)または亜セレン酸(+4)は工場排水などに含まれ、環境へ流出することが問題になっている。セレン酸還元菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I はこれまで報告されているセレン酸還元菌の中で最も高いセレンオキシアニオン(セレン酸や亜セレン酸)の還元能をもつグラム陰性の好気性桿菌である。<sup>1)</sup>セレンオキシアニオンを水に難溶で毒性の低い元素態セレンに還元できる NT-I の能力を活かして、工業排水中に含まれるセレンオキシアニオンを除去、元素態セレンとして回収することが試みられている。<sup>2)</sup>

単離した酸化還元酵素や微生物に含まれる酵素による触媒反応を電極反応と共役させた酵素電極反応系は生物燃料電池やバイオセンサーなどに利用されている。<sup>3,4)</sup> セレン酸還元菌 NT-I を利用した酵素電極反応系が構築できれば、排水中のセレンオキシアニオン濃度を簡便に定量できるセンサーや廃棄物から電気エネルギーを取り出す微生物燃料電池に展開できる可能性がある。

本研究は、セレン酸還元菌 NT-I(あるいは単離されたセレンオキシアニオン還元酵素)を用いた酵素電極反応系を構築し、この反応系をベースにしたセレンオキシアニオンセンサー

を作製することを目的としている。現時点では NT-I が有するセレンオキシアニオン還元酵素は単離されていないため、平成 23,24 年度は NT-I のホールセルを酵素が入った袋と捉え、電極上へ滴下、乾燥、メンブレンフィルターで覆うことで電極上に固定化し、適当な酸化還元物質(メディエータ)を仲介させることで、セル中に含まれるセレンオキシアニオン還元酵素と電極を電気的につなぐこと(メディエータ型電子移動経路の構築)が可能かを検討した。メチルビオロゲン(MV)をメディエータとして使用することで限られた条件下では NT-I を経由する亜セレン酸の還元のみを生起できることがわかった。しかし、菌体を経由しない MV による直接還元反応が相当量同時に起きるため、NT-I を経由する亜セレン酸の還元のみを定常的に起こすことはできなかった。

このため、平成 25 年度は亜セレン酸を直接還元する可能性がなく、かつ電極から亜セレン酸へ効率の良く電子移動を仲介する物質を探索する予定であったが、MV 以上の特性を示す物質は見つかっていない。本報告書では、セレン酸還元菌 NT-I によるセレンの回収に関連して、(1) 硝酸中にトラップされた気化セレン化合物の反応、(2)回収された元素態セレン(Bio-Se)と市販のセレンの酸化還元性の比較について検討した結果を報告する。



## 2. 研究計画

### 平成 25 年度

平成 23, 24 年度の検討結果を基に、セレン酸還元菌ホールセルを用いた酵素電極反応系を構築する。

### 平成 26 年度

平成 25 年度に構築したセレン酸還元菌ホールセルを用いた酵素電極反応系を基に、セレンオキシアニオン(セレン酸、亜セレン酸)センサーのプロトタイプを作製する。

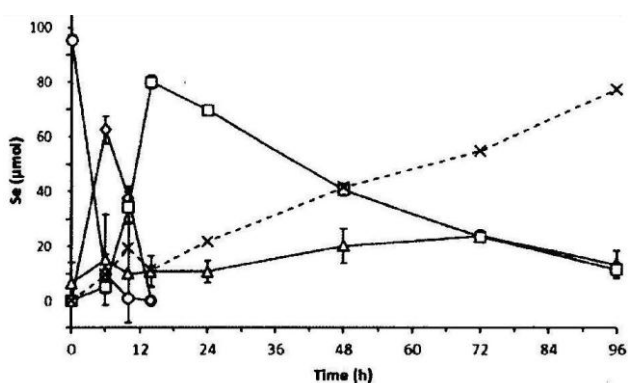
### 平成 27 年度

平成 26 年度に作製した水溶性セレン(セレン酸、亜セレン酸)センサーの性能評価を行って実用上の問題点を明らかにすると同時に、これを解決するための方法などを検討する。さらに、可能ならば酵素電極反応系の他の応用展開について探索する。

## 3. 計画の進行状況

### 3.1 硝酸トラップ中の気化セレン化合物の反応に関する一考察

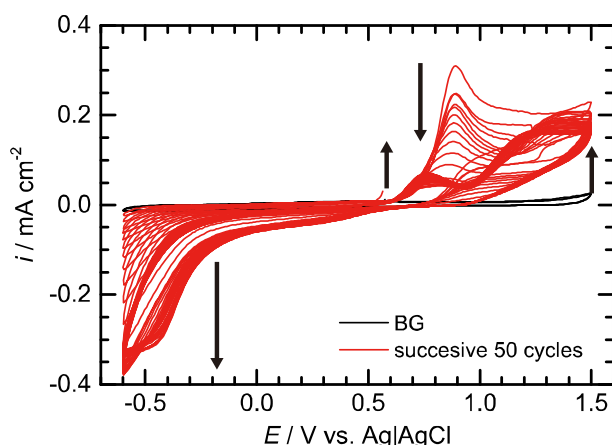
**Fig.1** はセレン酸還元菌 NT-I の培養液に加えたセレン酸(○、酸化数+6)が時間とともにどのように変化するかを示したものである。<sup>2)</sup> 初期の 14 時間でセレン酸は完全に還元され、その還元で生成した亜セレン酸(◇、酸化数+4)も 6 時間後に最大濃度になった後、14 時間後には無くなる。代わりに固体セレン(□、酸化数 0)が生成するが、時間と共に気化セレン(×)が増加し、96 時間後には初期セレン量の 74% が気化セレンに変化することがわかる。



**Fig.1** NT-I によるセレン酸からセレンの気化(文献 2)より引用)

GC/MS 測定により、気化セレンは主としてジメチルジセレニド(DMDSe)であり、少量のジメチルセレニド(DMSe)などを含むこと、メルカプトメタンなどの硫黄化合物も相当量含むことがわかっている。<sup>2)</sup> 微生物培養装置(ジャーファメンター)を用いると反応効率が向上するため、48 時間後に初期セレン量の 81% が気化セレンとなり、これを硝酸中に通気することで気化セレンの 66% が回収可能であることが確認されている。<sup>2)</sup> 排液中に含まれるセレン化合物を固体(元素態)セレンとして回収する方法とは別に、気化セレンとして回収できるならば、菌の培養を中断せずに回収が行えるなどの利点がある。硝酸中にトラップされると、DMDSe はメチルセレニン酸(MSeA)に、DMSe はジメチルセレノキサイド(DMSeO)に変化すると報告されており<sup>5)</sup>、MSeA や DMSeO を元素態セレンに変換する方法が気化セレンとして回収するために必要である。MSeA の Se 酸化数は +2<sup>6)</sup>、DMSeO は +4<sup>7)</sup> であることから、これら物質の還元が元素態セレンを得るために必要であり、電気化学的な還元が可能かを検討している。

**Fig.2** は  $10.4 \text{ mmol dm}^{-3}$  DMDSe を含む  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  硝酸中で測定したボルタモグラムである。Ar バブリングによって除酸素した硝酸中に DMDSe を添加し、その直後から 50 サイクル電位掃引した。電位掃引につれて  $0.9 \text{ V}$  の酸化ピークが減少したが、この電流減少は吸



**Fig.2**  $10.4 \text{ mmol dm}^{-3}$  DMDSe を含む  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  硝酸中で測定したボルタモグラム。作用極:GC 電極

着による電極表面ブロッキングやDMDSeの揮発に依らないことを確認している。同時に電位0.75 Vと1.0 Vへの酸化ピーク、0~-0.5 Vの還元ピークが増大し、DMDSeが反応していることを示唆する。ジスルフィド化合物は有機溶媒中、電気化学還元されてジスルフィド結合が開裂する( $RSSR \rightarrow 2RS^- + 2e^-$ )ことが報告されており<sup>8)</sup>、DMDSeも類似の反応を起こすことが予想されるが、0.9 Vのピークは酸化反応由来であり、帰属できていない。新たに表れた反応生成物由来の3ピークのうち、0.75 Vの酸化ピークと0~-0.5 Vの還元ピークはFig.3に示すように関連していることがわかった。

Fig.3は50サイクル電位掃引後に測定したボルタモグラムであるが、0.6 Vから正電位方向に電位掃引した場合(破線)の1stサイクルや0.6 Vより正電位領域でのみ電位掃引した場合(赤実線)は0.75 Vの酸化ピークは見られない。一方、負電位方向に電位掃引した場合は0~-0.5 Vの還元ピークが現れた後、正電位掃引で0.75 Vのピークが見られた(黒実線)。また、正電位方向に電位掃引した場合でも2ndサイクル以降は0.75 Vのピークが見られた。以上から、0~-0.5 Vの還元生成物が0.75 Vで酸化されるものと考えられる。

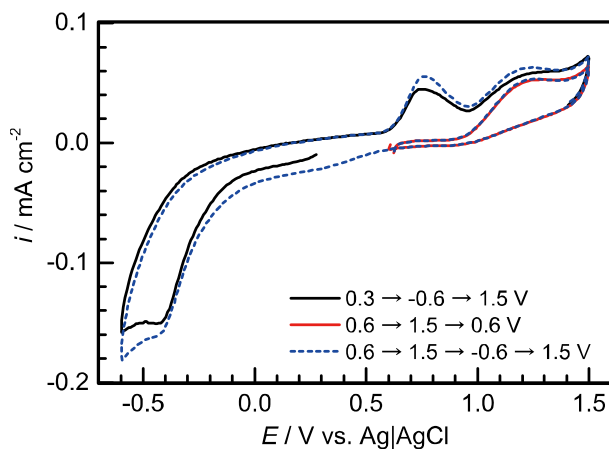


Fig.3 10.4 mmol dm<sup>-3</sup> DMDSeを含む1 mol dm<sup>-3</sup> 硝酸中で電位掃引範囲を変えて測定したボルタモグラム. 作用極:GC 電極

Fig.4は0.3 V以上の電位領域に限り、50サイクル電位掃引した時のボルタモグラムの変化を示す。0.9 Vの酸化ピークは20サイクルまでは残っている。1サイクルの電位掃引に要する時間は48秒であり、ピーク消滅までに要する時間は16~24分と見積られる。濃硝酸中、

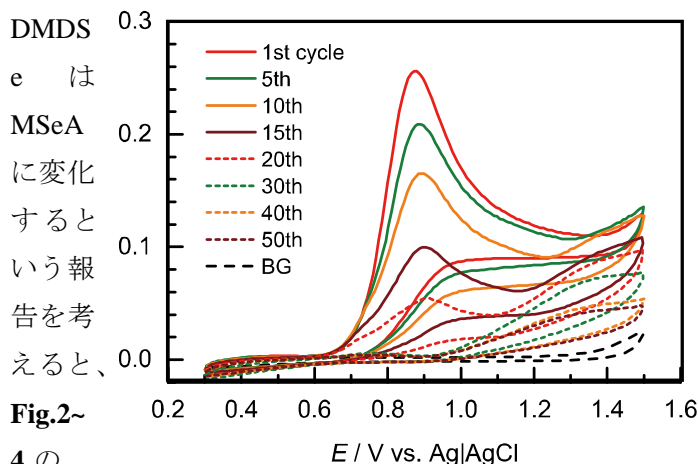


Fig.4 10.4 mmol dm<sup>-3</sup> DMDSeを含む1 mol dm<sup>-3</sup> 硝酸中で測定したボルタモグラム. 作用極:GC 電極

Fig.2~4のボルタモグラムの変化が電極反応由来

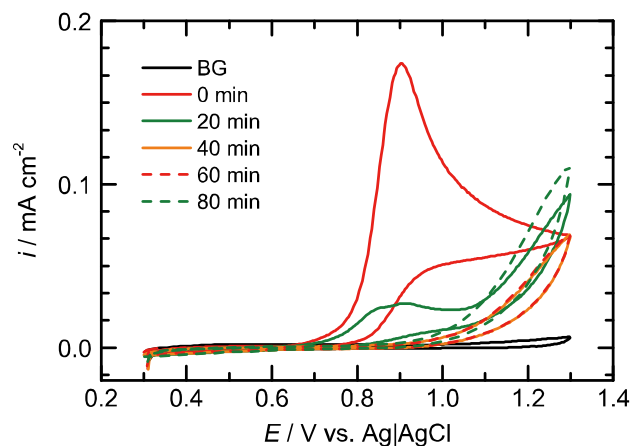


Fig.5 10.4 mmol dm<sup>-3</sup> DMDSeを1 mol dm<sup>-3</sup> 硝酸に添加後、20min毎に測定したボルタモグラム. 作用極:GC 電極

なのか、バルク溶液中の反応由来なのかとの疑問が出てくる。そこで、硝酸にDMDSe添加後、連続的な電位掃引を行わずに20

分毎に測定したボルタモグラムの変化をFig.5に示す。20分までは0.9 Vの酸化ピ

ークが観られるが、40 分以降は消滅し、1.0 V 以下の酸化ピークのみになる。0.9 V の酸化ピーク消滅までの時間は Fig.4 の結果とほぼ一致する。よって、測定したボルタモグラムの変化はバルク硝酸中で起きている DMDSe の反応を反映したものと結論される。

DMDSe の反応によって出現した 3 ピーク中、0.75 V の酸化ピークは 0~0.5 V の還元生成物由来であるため、1.2 V の酸化ピーク、0~0.5 V の還元ピークが DMDSe の反応生成物由来と考えられる。そこで、硝酸中の DMDSe 反応生成物と報告されている MSeA のボルタモグラムと比較した。Fig.6 に示すように、MSeA のボルタモグラムは -0.5 V 付近の還元ピークと 0.85 V の酸化ピークを持つ。Fig.3 と同様に、正電位方向から掃引を始めると 1st サイクルには 0.85 V の酸化ピークが現れないが、負電位掃引を先にするとことから、このピークは -0.5 V 付近の還元で生成する物質由来（おそらく、 $\text{CH}_3\text{SeH}^0$ ）と判断できる。酸化ピークの電位が 0.1 V ほど異なるが、Fig.2, 3 で観られた 0.75 V の酸化ピークと -0.5 V 付近の還元ピークは DMDSe から生成した MSeA 由来と考えることもできる。その場合、1.0 V 以上で観測される酸化ピークは MSeA 以外の物質由来となり、硝酸中の DMDSe の反応生成物は MSeA のみではないことになる。

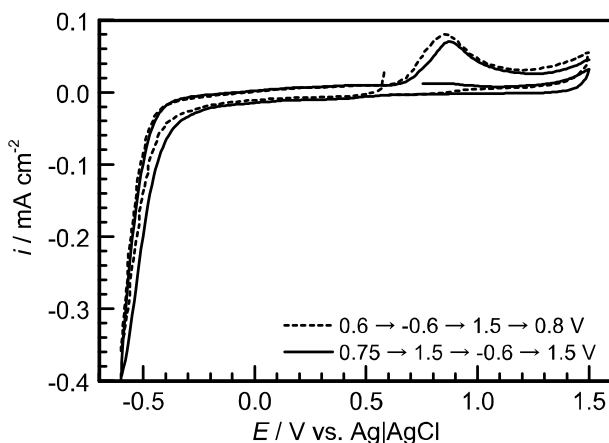


Fig.6 10.4 mmol dm<sup>-3</sup> MSeA を含む 1 mol dm<sup>-3</sup> 硝酸で測定したボルタモグラム. 作用極:GC 電極

### 3. 2 Bio-Se と無機 Se の酸化還元性の比較

セレン酸還元菌 NT-I が水溶性セレンを還元して生成する元素態セレン (Bio-Se) は、さらに NT-I によってメチル化されて気化セレンになるが、市販の無機粉末セレン (Se) を NT-I はメチル化でき

ないことがわかっている。しかし、その違いが何に起因するかは明らかになっていない。

Fig.7 はセレン

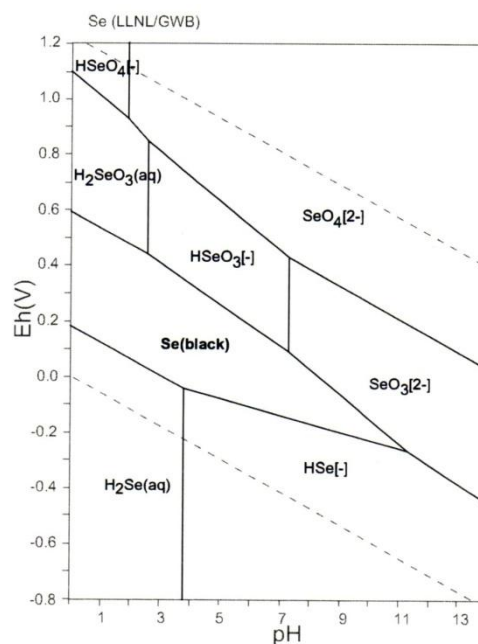


Fig.7 セレンの電位-pH 図

の電位-pH 図<sup>9)</sup>で、平衡状態において水中で安定に存在する化学種を電位 (標準水素電極 SHE 基準) と pH の 2 次元座標上に図示したものである。ただし、平衡論を基にしているので、速度論的な情報は示していない。この図によれば、元素態セレンは pH 6 において 0.2 V vs. SHE (0 V vs. Ag|AgCl) 以上の電位では  $\text{HSeO}_3^-$  として、-0.1 V vs. SHE (-0.3 V vs. Ag|AgCl) 以下では  $\text{HSe}^-$  として存在する。

そこで、Bio-Se あるいは Se のリン酸緩衝液 (pH 6) における平衡電位を、カーボンペースト電極 (CPE) を用いて測定した。カーボンペースト (CP) は均一な粒子径のグラファイトパウダーとパラフィンオイル (接着剤) を

混合したもので、これに Bio-Se あるいは Se を適量混合したものを専用の電極に充填して CPE とした。CPE をリン酸緩衝液に浸漬すると、微量のセレンが  $\text{HSeO}_3^-$  ( $\text{Se} + 3\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HSeO}_3^- + 5\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ ) あるいは  $\text{HSe}^-$  ( $\text{Se} + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{HSe}^-$ ) として溶解して平衡電位 0 V あるいは  $-0.3$  V vs. Ag|AgCl を示すものと予想した。しかし、実際に測定された電位は  $0.1 \sim 0.3$  V vs. Ag|AgCl であり、 $\text{HSeO}_3^-$  との平衡電位の予想値よりも大きく、加えて測定毎のバラツキや経時変化を示すなど安定性に欠ける問題があった。そのため、平衡電位によって Bio-Se と市販 Se の差異を議論できないが、Bio-Se は市販 Se よりも低い平衡電位を示す傾向が観られた。また、緩衝液中に  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  程度の亜セレン酸を加えると平衡電位が  $50 \sim 100$  mV 上昇し、これはネルンスト式 ( $E = E^\circ - 2.303(5RT/4F) \text{ pH} + (RT/4F) \ln [\text{HSeO}_3^-]$ ) に従う挙動と思われる。

次いで、平衡電位から電位を正電位側あるいは負電位側に掃引して、 $\text{HSeO}_3^-$  への酸化あるいは  $\text{HSe}^-$  への還元が起こるかを観測した (Fig.8)。なお、Bio-Se は CP:Bio-Se (9:1)、市販の Se は CP:Se (3:1) で CP 電極を調製した。Bio-Se の方が Se の比率が低い理由は、市販 Se と同じ比率にすると CP が吸水、膨潤するために測定ができないからである。この事実は Bio-Se は吸水性(水との馴染み)が高いことを示唆する。

酸化側で  $0.8$  V 付近から始まる酸化は Se を含まない CP のみと電極では観測されない。電極表面に沈着した Se フィルムが酸化的に剥離する電位と一致する<sup>10)</sup> ことから、Se の酸化 ( $\text{Se} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HSeO}_3^- + 5\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ ) に起因すると考えられる。Bio-Se、市販 Se とも酸化開始電位は大差ないが、CP 中の含有量が少ないに

も関わらず Bio-Se の方が大きな酸化電流値 (Bio-Se については、図中の値は実測値の  $1/20$ ) を示した。この差が何を反映しているかは現時点で明らかでないが、次の可能性が考えられる。

- Bio-Se は吸水性が高いために、電極の実効表面積が増加した ( $0.5$  V の充電電流から、市販 Se の場合の  $200$  倍程度と見積もられる)。
- Bio-Se は酸化反応が速い (酸化の過電圧が小さい)。ただし、CP 中の Se 含有量が異なるため、詳細な議論はできない。

一方、平衡電位より還元側のボルタモグラムは CP のみと市販 Se を含む場合とで大差なく、Se 由来の還元反応は起きていないと思われる。

Bio-Se の特異性については、手探りながら、今後も検討を行う予定である。

#### 4. 今後の計画及び学会、論文等投稿・発表状況

##### 今後の計画

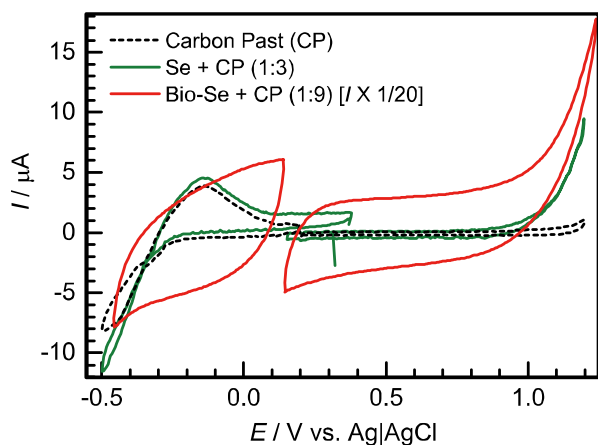
平成 26 年度は本報告書で述べた (1) 生物学的 Se 回収方法を補完する電気化学反応系の構築、(2) Bio-Se の特異性の検討を続ける。

当初の研究目的であるセレン酸還元菌ホールセルを用いた酵素電極反応系の構築については、平成 23, 24 年度に検討した MV メディエーターとして用いる電極反応系はセレンオキシアニオンセンサーに展開するためには検出感度が不十分であり、平成 26 年度前半に課題内容、研究計画を含めて抜本的に見直す予定でいる。

##### 学会発表

越雲文也, 今林慎一郎, “電子メディエーターを介する亜セレン酸の電極還元反応機構の

解析”,電気化学会第 81 回大会、2013/3/29、  
関西大学千里山キャンパス。



**Fig.8**  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  リン酸緩衝液中で測定した Bio-Se あるいは市販 Se を含む CPE のボルタモグラム。リファレンスとして、CP のみの電極も測定した。掃引速度:  $100 \text{ mV s}^{-1}$

## 投稿論文

準備中

## 参考文献

- 1) M. Kuroda, E. Notaguchi, A. Sato, M. Yoshioka, A. Hasegawa, T. Kagami, T. Narita, M. Yamashita, K. Sei, S. Soda, M. Ike, *J. Biosic. Bioeng.*, **112**, 259-64 (2011).
- 2) T. Kagami, T. Narita, M. Kuroda, E. Notaguchi, M. Yamashita, K. Sei, S. Soda, M.

Ike, *Water Res.*, **47**, 1361-68 (2013).

3) 加納健司監修、“バイオ電池の最新動向”、第 1, 6 章、シーエムシー出版 (2011)。

4) 池田篤治監修、“バイオ電気化学の実際- バイオセンサ・バイオ電池の実用展開-”、第 4, 6, 14, 18 章、シーエムシー出版 (2007)。

5) L. Winkel, J. Feldmann, A. A. Meharg, *Environ. Sci. Technol.*, **44**, 382-87 (2010).

6) U. Gundimeda, J. E. Schiffman, D. Chhabra, J. Wong, A. Wu, R. Gopalakrishn, *J. Biol. Chem.*, **283**, 34519-31 (2008). 4 電子還元

( $\text{CH}_3\text{SeO}_2\text{H} + 4\text{RSH} \rightarrow \text{CH}_3\text{SeH} + 2\text{RSSR} +$

$2\text{H}_2\text{O}$ ) で MSeA が生成するとの記述あり。メチルセレノール  $\text{CH}_3\text{SeH}$  の Se 酸化数は -2 と考えられるので、MSeA の Se 酸化数は +2 となる。

7) Y. Q. Zhang, W. T. Frankenberger, Jr., *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 776-83 (2000).

8) M. Liu, S. J. Visco, L. C. De Jonghe, *J. Electrochem. Soc.*, **136**, 2570-75 (1989).

9) 竹野直人, “Eh-pH 図アトラス 熱力学データベースの相互比較”, 地質調査総合センター研究資料集 No.419, 産業技術総合研究所, 2005 年 5 月。

10) R. W. Andrews, D. C. Johnson, *Anal. Chem.*, **47**, 294-299 (1975).

# バイオレアメタル精錬開発

〔芝浦工業大学工学部 材料科学・化学群 材料工学科 新井 剛〕

## 1. 研究目的

近年、資源の有効利用の観点から都市鉱山等から有用元素を回収する試みが数多くなされている。それらの回収方法は、湿式精錬から乾式精錬に至るまで複数の提案がなされている。特に、昨今の環境負荷の低減を鑑みた場合、都市鉱山からの分離回収技術においても低環境負荷の技術開発が求められている。その中でも微生物等を利用したバイオ分離技術が注目を集めており、研究開発も数多くなされている。そこで本研究では、バイオ分離が有効とされている Se に着目した。Se は銅精錬時に生じる銅電解スライムからの副産物として得られる。銅精錬の副産物としての Se の回収は、炭酸ナトリウム存在下において精錬残渣を酸化し、その後、二酸化セレンとして抽出回収することが知られている<sup>1)</sup>。しかしながら、Se 含有バイオメタルからの Se 精錬に関する報告は殆ど無く、新たに製錬技術を検討する必要がある。Se バイオメタルは、菌体由来の有機物が多く、また、菌体に内包されている Se を精錬する必要があり、一般的な製錬技術を適用することができない。また、Se の分離を菌体で行うため、夾雑物質の可能性も否定できず、Se 純度の低下が懸念される。そこで本開発では、Se バイオメタルからの Se 精錬濃縮技術開発スキーム

を提案した。提案スキームは、Se バイオメタルから酸性溶液に Se を抽出し、酸性溶液に抽出された Se を電気分解法、若しくは化学還元法により精錬することを想定している。また、抽出液に夾雑元素が混入した場合を想定し、クロマトグラフィー法や溶媒抽出法等により Se から夾雑元素を分離に資することを想定している。

本提案スキームは Se バイオメタルに限らず、その他のバイオメタルに対しても有効な製錬技術であると考えられる。そこで、本研究では本提案スキームの構築を目指し、各主要な技術に対して開発を行う。

## 2. 研究計画

昨年度までにおいて、Se バイオメタルからの酸性溶液への抽出挙動及び新規のイオン交換体を用いたクロマトグラフィー法の適用性について検討した。本研究開発より、バイオメタルから酸性水溶液への抽出の可能性及び新規の無機-有機複合型イオン交換体へのレアメタルの吸脱着特性の基礎性能が明らかとなった。これにより、バイオレアメタルから抽出したレアメタル間相互の分離の基礎特性を明らかとした。また、電気化学法によるバイオメタルの製錬技術開発の検討を実施した。本研究の成果より、抽出-イオン交換クロマトグラフィーによ

り分離した Se を電解法により回収できることが示唆され、Se のバイオメタルから Se を回収するプロセスを提案した。

本年度は、イオン液体によるレアメタルの溶媒抽出特性について検討する。近年、良好な導電性を示すイオン液体が開発され、それはレアメタルに対して抽出能を示す可能性が示唆された。このようなイオン液体によりレアメタルの抽出-精錬が単一のセル内で実施できる可能性がある。そこで本研究では、イオン液体を合成し、それらを用いてレアメタルの抽出挙動の検討を行う。

平成 26 年度は、さらに複数のイオン液体を用いてレアメタルの抽出挙動の検討、並びに電気化学特性を検討する。前年度、当該年度に検討したレアメタルを抽出できるイオン液体の選定、さらにはイオン液体中におけるレアメタルの電気化学特性を確認し、本法の成立性について検討する。

平成 27 年度は、イオン液体と電気化学法を組み合わせた直接製錬技術開発を実施する。本年度は、これまでの成果を基に本研究で提案するスキームの成立性並びに妥当性について検討する。

### 3. 計画の進行状況

#### 3.1 イオン液体の合成

イオン液体は一般に、カチオンとなる物質にアルキル基を導入するアルキル化反応と、目的物質を得るためのアニオン交換反応の 2 つの反応工程で構成される<sup>1)</sup>。本研究では 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムヘキサフルオロホスファート（以下、[BMIm][PF<sub>6</sub>]と略記）を合成した。第一段階目の反応は、1-メチルイミダゾールと 1-ブロモブタンによる S<sub>N</sub>2 反応である。第一

段階目で得られる 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムブロミド（以下[BMIm][Br]）は親水性イオン液体であり、水溶系の溶媒抽出法で抽出溶媒として用いるには不向きである。そこで第二段階目において、アニオンを交換し疎水性のイオン液体を得た。Fig.1 に合成スキームを示す。

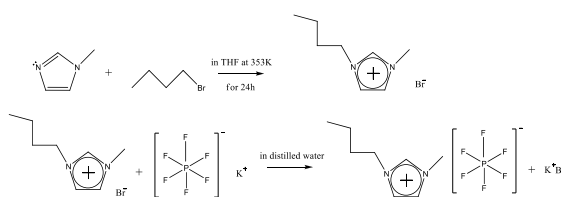


Fig.1 [BMIm][PF<sub>6</sub>]の合成スキーム

第一段階目では、モノマーである 1-メチルイミダゾール、1-ブロモブタンをそれぞれ 0.1 mol ずつ秤量し、同一の三角フラスコへ投入した。次に極性非プロトン溶媒として用いるテトラヒドロフラン(THF)を 0.1 dm<sup>3</sup>秤量し、モノマーが入った三角フラスコへ加えた。この 3 種類の試薬が入った三角フラスコを重合装置に設置し、24 時間 353 K に加熱しながら攪拌した。これが第一段階目の S<sub>N</sub>2 反応である。この反応で [BMIm][Br]を得た。エバポレーターを用い、得られた[BMIm][Br]から THF を蒸留除去した。

その後、第二段階目で 0.1 mol のヘキサフルオロリン酸カリウムを入れたビーカーに[BMIm][Br]を投入し、蒸留水を 0.5dm<sup>3</sup>加えて室温で混合することで[BMIm][PF<sub>6</sub>]を得た。合成した[BMIm][PF<sub>6</sub>]からモノマーや溶媒の残渣を取り除くために蒸留水による洗浄とデカンテーションを繰り返し行った。5 回以上の洗浄を行った[BMIm][PF<sub>6</sub>]は、オイルバスで加熱して大まかに水分を除去した後、室温で真空乾燥を施した。本

実験ではこれらの工程で得た[BMIIm][PF<sub>6</sub>]を用いた。

自製した[BMIIm][PF<sub>6</sub>]の合成の可否を確かめるために、自製試料と和光純薬製を標準試料として比較した。Fig.2 に各[BMIIm][PF<sub>6</sub>]と合成に使用した各試薬の赤外分光スペクトルを示す。Fig.2 より、自製試料と標準試料のスペクトルには良好な類似性が確認された。Fig.2 で確認された自製試料と標準試料の差は、自製試料中の未反応物質に起因すると考えられる。1670～1770 cm<sup>-1</sup>と2870～3000 cm<sup>-1</sup>の間に見られるピークはブロモブタンに特有の波数であることから、ブロモブタンの残渣が存在すると推定した。また、自製試料に3200 cm<sup>-1</sup>以降に見られるブロードなピークは水の特徴的なピークであり、脱水が不完全であった可能性を示している。この様に精製の不完全性が所々に不純物の残渣として現れているが、全体としては概ね良好な合成結果となっている<sup>2)</sup>。即ち、本実験の合成方法により[BMIIm][PF<sub>6</sub>]が得られているものと考えた。また、本合成法による[BMIIm][PF<sub>6</sub>]の収率は重量分析の結果から約70%であった。以降の試験では、自製した[BMIIm][PF<sub>6</sub>]を用いて各試験に資した。

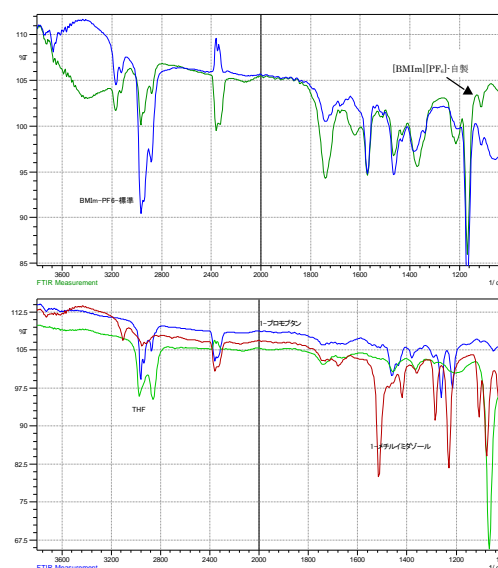


Fig.2 各[BMIIm][PF<sub>6</sub>]と合成に使用した各試薬のFT-IRスペクトル

### 3.2 イオン液体による金属イオンの抽出挙動の検討

本研究で自製した[BMIIm][PF<sub>6</sub>]に対する各金属イオンの抽出特性を調査するためバッチ式抽出試験を行った。抽出対象元素にはPd(II)を用い、塩酸を用いてPd(II)を含む所定濃度の塩酸溶液を調整し試験溶液とした。試験条件は、1.5 gのイオン液体に対して3 cm<sup>3</sup>の金属溶液を用いる液液比一定の下で行なった。所定の試験温度に設定した恒温振とう槽中で一定速度において振とうした。イオン液体へのPd(II)の抽出量は、試験前後の金属溶液の濃度差を測定することで推定した。

また、イオン液体の抽出能の指標として抽出分配係数K<sub>d</sub>を算出した。K<sub>d</sub>を式(1)で定義した。

$$K_d = \frac{C_L}{C_S} \times \frac{V}{W_L} \quad \dots \text{式 (1)}$$

ここでC<sub>L</sub>はイオン液体の金属濃度[M]、C<sub>S</sub>は抽出溶液の金属濃度[M]、Vは抽出溶



液の体積[cm<sup>3</sup>]、W<sub>L</sub>はイオン液体の質量[g]を示す。

[BMIm][PF<sub>6</sub>]が Pd(II)の抽出材として適当であるか調査した。また、FT-IR の結果より自製試料には若干の不純物が含まれていることが観察された。この不純物が抽出に与える影響を調査した。その際、FT-IR と同様に和光純薬製の[BMIIm][PF<sub>6</sub>]を標準試料として用い、Pd(II)への抽出性能を自製試料と比較検討した。に標準試料と自製の[BMIIm][PF<sub>6</sub>]の Pd(II)の抽出挙動を示す。

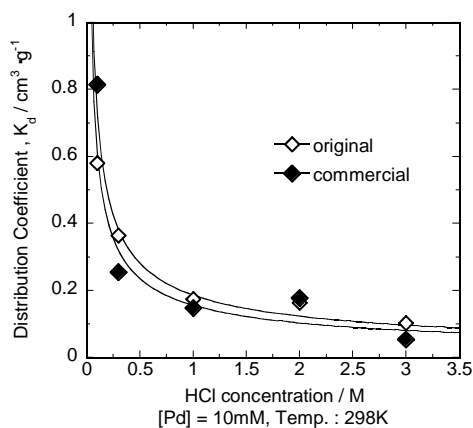


Fig.3 自製と標準試料の K<sub>d</sub> の比較

何れの[BMIIm][PF<sub>6</sub>]も塩酸濃度の増加に伴い急激に K<sub>d</sub> が低下する傾向が明らかとなった。この結果より、自製した[BMIIm][PF<sub>6</sub>]に含まれる僅少の不純物は、Pd(II)の抽出に大きく影響を及ぼさないことが示唆された。また、[BMIIm][PF<sub>6</sub>]への Pd(II)の抽出特性は、0.1 M 以下の塩酸が最も抽出に適していると考えられた。

次いで抽出場の温度が抽出反応に与える影響を調査するため、温度を変化させて抽出平衡試験を行った。Fig.4 に各温度における[BMIIm][PF<sub>6</sub>]の K<sub>d</sub> の塩酸濃度依存性を示す。Fig.4 から、各温度の K<sub>d</sub> の違いは小さいことが明らかとなった。[BMIIm][PF<sub>6</sub>]

の融点は 280 K であり、278 K における[BMIIm][PF<sub>6</sub>]は非常に粘性が高くなると予想され、抽出効率の悪化を見込んだ。しかし、K<sub>d</sub> の差は僅少であり、誤差の範囲であると考えられた。これらのことから[BMIIm][PF<sub>6</sub>]への Pd(II)の抽出特性は温度に依存しないと推論される。

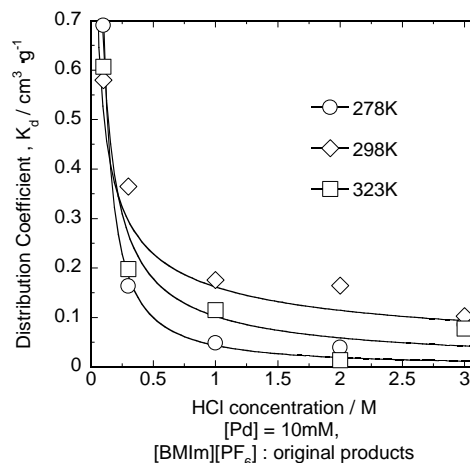


Fig.4 各温度における Pd(II)の K<sub>d</sub> 変化

次いで、抽出速度について検討した。抽出速度は抽出剤の性能指標の一つである。これは抽出の時間的効率性を意味する重要な指標である。そこで抽出速度を得るため、抽出反応が平衡に至るまでの時間を観察した。Fig.5 に抽出速度の試験結果を示す。

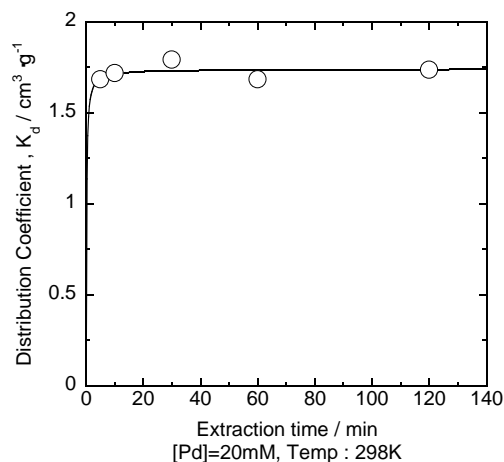


Fig.5 Pd(II)の抽出速度試験結果

Fig.5 より 298 K における抽出平衡時間は 5 分以内であることが明らかとなった。イオン液体は粘性が高く、抽出平衡時間に達するまでの時間が長くなることが危惧されたが、本試験結果では従来の抽出溶媒と同様、迅速に反応が進むことが明らかとなった<sup>3)</sup>。これは従来の溶媒抽出剤と同様に溶液内で[BMIIm][PF<sub>6</sub>]が細かいミセル状になることを示していると推察された。この結果から、[BMIIm][PF<sub>6</sub>]は Pd(II)の抽出剤として実用可能な抽出速度を有していると考えられる。

本試験では、[BMIIm][PF<sub>6</sub>]に対する Pd(II)の飽和抽出量について検討した。Fig.6 に各塩酸濃度における[BMIIm][PF<sub>6</sub>]に対する Pd(II)の抽出等温線を示す。

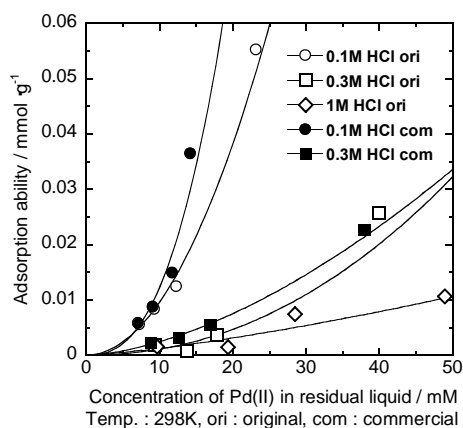


Fig.6 298 K における Pd(II)の抽出等温線

Fig.6 から、0.1 M における抽出試験が最も良好な抽出量を示しており、Fig.3 に示した塩酸濃度依存性と一致する傾向を得た。また、塩酸濃度が増加すると抽出等温線の傾きは緩やかとなり、抽出量の増加幅は低下することが示された。

#### 4. 今後の計画及び学会、論文等投稿・発表状

#### 況

今後は[BMIIm][PF<sub>6</sub>]を改良し、Pd(II)以外のレアメタルについても検討を加える。また、イオン液体の特性を活かし、電気化学的な回収法についても調査する。本成果は、資源素材学会、日本イオン交換学会等の学術誌への投稿を検討している。

#### 【参考文献】

- 1) 大野弘幸：イオン液体 II、シーエムシー (2006)、pp44-46.
- 2) 堀口博：赤外吸光図説総覧、三共出版、(2001)、pp357-387.
- 3) Keiji KIDANI, et.al., Analytical Sciences, Vol.24(2008), pp1251-1254.

(4) 平成 26 年度

# セレン還元細菌を用いたセレン回収技術開発

芝浦工業大学工学部応用化学科 山下 光雄

## 1. 序論

セレン (Se) は、原子番号 34、原子量 78.96 の非金属元素であり、地殻存在量は 0.05mg/L (ppm) とされている。セレンは化学的に硫黄と似ており、生物作用を受けやすく、土壌中のセレン濃度は地域により明確な差がある。Se は、工業的にも重要な金属資源で、コピー機やガラス染色、半導体原料などに利用されており、工場などから水系に放出されている。生物にとっても必須微量元素であり、体内でセレン含有アミノ酸の合成に利用される。一方で、水中での存在形態であるオキソアニオン（酸化イオン）のセレン酸塩 ( $\text{SeO}_4^{2-}:\text{Se(VI)}$ ) や亜セレン酸 ( $\text{SeO}_3^{2-}:\text{Se(IV)}$ ) は、生物に対して慢性・急性の毒性を有することから、排出基準が厳しく定められており、環境中に排出する際には 0.1ppm 以下まで浄化することが義務付けられている。現在は電気還元、化学還元や凝集沈殿・吸着剤法にて浄化が行われている。大量の化学薬品の使用や廃棄物が排出されることなどために高コストであり、また、廃棄物量に含まれる Se 含量が低いことから Se を資源として回収する事は難しい。現状の物理化学的 Se 含有排水処理技術の有するエネルギー・資源の大量消費、高コストなどの問題点を解決する新たな処理方法として、排水中に存在する Se

オキソアニオンを微生物により還元し、無毒・固形の元素態セレン ( $\text{Se (0)}$ ) に変換する方法が考えられる。

Se オキソアニオンを還元する微生物としては、これまでに *Bacillus selenatarsenatis* SF-1 株が分離されている<sup>1)</sup>。SF-1 株は嫌気条件下においてセレン酸の還元を行い、元素態セレンを細胞内に蓄積する。しかし、工業的利用を考えた場合、操作的な面や菌体の増殖といった面で嫌気条件下では扱いにくい。そこで、新たに好氣的条件下においてセレン酸を還元することができる *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株が分離された<sup>2)</sup>。NT-I 株は、酸素が存在する条件下でセレン酸を還元し元素態セレンを生成することができる新規なセレン酸還元細菌である。高いセレン酸還元能力を有し、高濃度の亜セレン酸還元が可能であるうえ、亜セレン酸から元素態セレンへの還元もスムーズであり、水溶性 Se 除去の効率は世界で最も高いと言える。生成した元素態セレンは、約 20 nm 径の微粒子として微生物の細胞外に赤色アモルファスの状態で蓄積される。このとき沈殿から回収される Se 濃度は添加量の約 70%以上と非常に高く、排水からの Se 資源回収プロセスへと発展するポテンシャルを秘めている。

さらに NT-I 株はセレン酸の還元が進み元

素態 Se が析出してきた後も、培養を続けると、今度は元素態 Se によって赤くなっていた培養液の色が消失し、培養液の気相においてメチル化した Se が検出された<sup>3)</sup>。つまり、この NT-I 株は、溶液中のセレン酸を固体の元素態 Se にするというミネラルイゼーションだけでなく、さらに固体の元素態 Se から気体のメチル化 Se にすることでボラタリゼーション(気化)を行っていることがわかった。気相中においては、夾雑物が少なく、培養汚泥に比べ、Se が非常に高い純度を持っている。これは、Se を回収するうえでは、非常に大きなメリットとなる。そこで、本報告書では、NT-I 株の将来的な実機スケールでのセレン回収技術開発を踏まえ、模擬排水から実廃水を用いて培養容量のスケールアップを計ると共に、バイオリクターシステムによるセレン酸及び亜セレン酸からの気化セレンへの還元最適条件を検討することを目的とした。

## 2. 研究計画

平成 23 年度は、セレンを含有する模擬排水を用いて、セレンを回収するための最適化条件を決定した。平成 24 年度は、模擬排水を用いて決定した最適化条件を用いて、実排水に有効利用することを試みる。その上でセレンを固化または気化物として回収の最適化条件を決定した。平成 25 年度は、実排水だけでなく、実廃棄物またはその抽出溶液を用いて、セレンを固化物または気化物として回収を行う予定である。平成 26 年度は、レアアース元素代謝微生物を用いて、模擬排水や廃棄物からのレアアース元素を回収するためのリアクター

の開発を行う予定である。最終年度の平成 27 年度は、開発したリアクターを用いてのバイオリーチングの最適化条件を検討し、レアアース元素を回収し、成功に導く予定である。

## 3. 計画の進行状況

### 3. 1 実験材料及び方法

#### 3. 1. 1 菌株と培養条件

本研究では *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株が用いられた<sup>2)</sup>。NT-I 株の培養には、Bacto™ Tryptic Soy Broth (TSB ; Becton-Dickinson, NJ, USA) 培地が使われた。セレン酸、亜セレン酸還元試験には、セレン酸、亜セレン酸のナトリウム塩 (ナカライテスク (株)) が用いられた。その他の試薬には、市販の特級品が用いられた。

#### 3. 1. 2 ジャーファーマンターを用いてのセレン酸・亜セレン酸還元試験

NT-I 株の一金耳量を 100 ml 容バイアルに分注した 50 mL の TSB 培地に植種し、30°C、120rpm の条件に設定した回転振盪培養器で 24 時間培養した。この培養液を新しい 50 ml の TSB 培地を含む 100 ml 三角フラスコに 0.5 ml 添加し、再度 12 時間の前培養を行った。続いて、還元試験を行うために、遠心分離により菌体を回収し、回収した菌体を 0.9% 塩化ナトリウム溶液により OD<sub>600</sub> が 1.0 になるように調整した。この溶液 30 ml の種菌は、任意の濃度のセレン酸もしくは亜セレン酸を含んだ TSB 培地 3 L を分注した 5 L 容ジャーファーマンター (Bioneer-C500N 型 5L(S)、株式会社丸菱バイオエンジ) に添加され、培養された。培

養液の温度、攪拌速度、pH はそれぞれ任意の値に保たれた。pH は 30% の NaOH 溶液、2 規定の HCl 溶液で調整された。溶存酸素 (DO) および pH は、それぞれ DO 電極 (OX-2500、株式会社丸菱バイオエンジニア) と pH コンビネーション電極 (MPS-220、株式会社丸菱バイオエンジニア) で測定された。経時的に培養液中のセレン酸、亜セレン酸、元素態セレン、および全水溶性セレンが定量された。セレン酸および亜セレン酸の還元速度 (mol/hr/cell) は、セレン酸または亜セレン酸の減少量が 1 時間当たりで最大になる速度 (mol/hr) を、光学密度から算出した菌体数 (cells) で割ることで算出された。

### 3. 1. 3 固体セレンの回収

*Pseudomonas stutzeri* NT-I 株の培養には濃度 30 g/L の TSB 培地を用いた。本培養開始までは前述のように行った。滅菌処理後の TSB 培地に Se 終濃度が 5 mmol/L となるようにセレン酸ナトリウムを加えて模擬廃水とした。この模擬廃水に前培養液 30 ml を植菌し、培養温度 38 °C、pH 9.0、攪拌速度 250 rpm、通気量 1 L/min の条件で 48 時間培養した。模擬廃水中の Se(VI) は NT-I 株によって 12 時間後にはほぼ全て Se(IV) に還元され、さらに 48 時間後には約 90 % (wt · wt<sup>-1</sup>) の Se(VI) が Se(0) へと還元された。培養開始から 48 時間後に通気を止め、その後 24 時間培養を続けた。

培養終了後に 4 °C、8000 rpm、20 分間の遠心分離により沈殿物を回収した。沈殿物に純水 600 ml を加えて混合し、遠心分離を行う操作を繰り返し行い洗浄した後、沈殿物に 70 % (wt · vol<sup>-1</sup>) エタノールを 600 ml 加えて混合し、4 °C、15000 rpm、20 分間の

遠心分離により沈殿物を回収した。この沈殿物をバイオセレンとした。バイオセレンを定温乾燥器により 40 °C もしくは 60 °C で 24 時間以上保持して乾燥した。

### 3. 1. 4 気体セレンの回収

気体セレンは硝酸にて捕集できることから<sup>4)</sup>、ジャーファーマンターからの排気はテフロンチューブ (内径 5 mm、外径 6 mm) を用いて、水蒸気による溶液量の変化を緩和するために空の 250 ml の試薬瓶を通してから、250 ml の試薬瓶に分注した 150 ml の濃硝酸を通過させた。テフロンチューブの先端にはエアーストーンを用いた。濃硝酸は経時的にサンプリングされ、濃硝酸中の元素は誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) (iCAP 6300 Duo、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用いて定性、定量分析された。

### 3. 1. 5 分析方法

培養菌体の細胞増殖は、分光光度計 (V-600、日本分光株式会社) を用いて、600 nm における光学密度 (OD<sub>600</sub>) から計算された。菌体密度は以下の式から計算された。菌体密度 (cells/ml) = OD<sub>600</sub> × 8.5 × 10<sup>8</sup> とし、この式は OD<sub>600</sub> の値とカウンティングチャンバーを用いて位相差顕微鏡 (DM1000、ライカマイクロシステムズ株式会社) による細胞直接計測によって決定された。培養液の 2 mL を遠心分離 (15,000 × g、5 min、室温) して固液分離し、得られた上清を 0.2 μm のフィルター (ステラディスク 13、クラボウ) でろ過したものをサンプルとした。サンプル中のセレン酸および亜セレン酸イオンは、イオンクロマトグラフィー (ダイオ

ネクス社、ICS-1100、検出器 DS6 HEATED CONDUCTIVITY CELL、カラム IonPac AS12A、ガードカラム AG12A、サプレッサー ASRS300、溶離液 3.0 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、流速 1.5 ml/min) で定性・定量した。また、同サンプルの溶液は、ICP-AES (iCAP 6300 Duo) を用いて、全水溶性セレンを定量された。沈澱物には超純水 2 ml を加え、ボルテックスにより混合した後、遠心分離 (15,000×g、5 min、室温) により沈殿を回収した。2 回繰り返し、洗浄作業を行った後、沈澱試料に 1500 μl の濃硝酸と 50 μl の濃硫酸を添加し、ボルテックスにより混合し沈澱物を溶解させた。溶解液は遠心分離 (15,000×g、5 min、室温) を行い、上清と沈澱物に分離した。上清は 10 ml メスフラスコに分取された。沈澱物を再度同条件で溶解操作を行い、得られた上清は、同じメスフラスコに分取された。10 ml メスフラスコに超純水を標線まで足し、定容したものを測定試料とした。測定試料は ICP-AES で定量され、セレンの値は元素態セレンとした。気体トラップの濃硝酸中の元素は ICP/AES で測定し、硝酸中の全存在元素と濃度を求めた。

排気の定性分析は、ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS) (FocusGC DSQ II、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、横浜) により行われた。GC カラムには DB-624 を用いた。カラムの長さは 30 m、I.D.は 0.250 mm である。測定はスプリットレスモードで行われた。スプリットバルブは注入 1 分後に開かれた。ヘリウムガスの流量は 1.0 ml/min とした。昇温プログラムは 40°C を 5 分間保持し、10°C/min の速度で 240°C まで昇温させ、240°C で 1.5 分間保持させる条件に設定された。GC の注入

口および GC と MS をつなぐラインは 200°C に保たれた。イオン化は 220°C のイオン源によって、ポジティブイオンモードで行われた。試料は 250 μl シリンジを用いて 250 μl 注入された。すべて測定は 3 回行い、平均値が算出された。

### 3. 2 結果及び考察

#### 3. 2. 1 模擬排水を用いた気化セレン回収

完全培地にセレン酸を終濃度 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> (0.004% wt · wt<sup>-1</sup>) となるように添加したモデル廃水を用いた場合のセレン回収試験の結果を示す (図 1)。

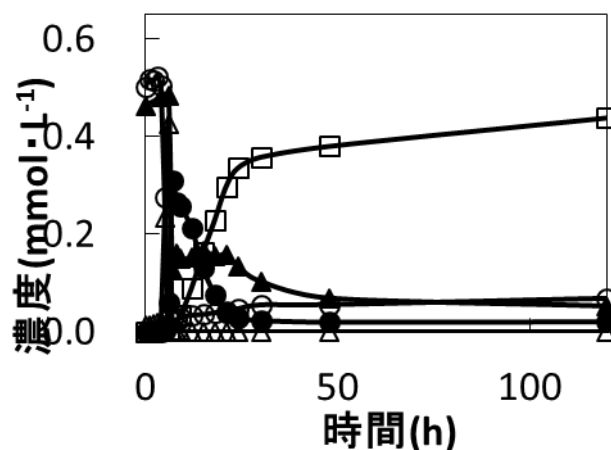


図 1 模擬排水を用いたセレン気化回収試験 ○: セレン酸, △: 亜セレン酸, ▲: 可溶性セレン, ●: 元素態セレン, □: 気化セレン。

ジャーファーメンターを用いて NT-I 株のセレン酸化物イオン還元最適培養条件を求めた。その結果、還元最適培養条件を温度 38°C, pH9.0, 攪拌速度 250rpm, 通気量

1L/min と決定した。この培養条件でのセレン気化速度を計算したところ  $14 \mu \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  であった<sup>3)</sup>。NT-I 株の気化速度は既存の報告値よりも速いことがわかった<sup>5)-8)</sup>。この培養条件でのセレン回収試験を NT-I 株のセレン気化回収方法とした。

セレン酸濃度  $0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  の模擬排水を用いてセレン気化回収試験を行った。セレン酸、亜セレン酸、可溶性セレン、元素態セレン、気化セレンの経時変化を図 1 に示した。表 1 に回収時の可溶性セレン、固化セレン、気化セレンの濃度と初期濃度と比較した割合 (%) ( $\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) を示した。NT-I 株によって培養開始から 6 時間で初期セレン濃度のほぼ 100% のセレン酸が亜セレン酸に還元され、7 時間目には約 95% の亜セレン酸が元素態セレンに還元された。120 時間目には初期セレン濃度の 71.2% の DMDSe を硝酸で回収することができた。この硝酸中のセレン濃度を測定した結果  $7.2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  であり、模擬排水中の初期セレン濃度  $0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  よりも 14 倍濃縮して回収できた。硝酸中に検出できた夾雑物は硫黄  $12.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  のみであり、硫黄以外の培地成分や菌体成分が含まれない高純度セレンの回収に成功した。

### 3. 2. 2 模擬排水を用いた固化セレン回収

気化回収条件で培養を行うと生産された元素態セレンは速やかにジメチルジセレニド (DMDSe) に還元される。セレンを固化回収するために、我々は元素態セレンの還元を阻止できる培養条件を検討した。NT-I 株は菌体増殖後には通気が無い状態でも、攪拌することによってセレン酸から元素態

セレンまで還元できる。そのまま通気を止めておくと元素態セレンの還元 (つまり減少) を抑制できることがわかった。以上の結果を利用してセレンの固化回収方法を考案した。培養温度  $38^\circ\text{C}$ , pH9.0, 攪拌速度 250rpm, 通気量 1L/min の条件で培養して菌体を増殖させ、培養開始から 12 時間目に通気を止めた時点でセレン酸を添加し、元素態セレンに変換する方法をセレン固化回収方法とした。

図 2 にモデル廃水を用いたセレン固化回収実験での各セレンの経時変化を示した。培養開始 12 時間目にセレン酸を添加すると、13 時間目には初期添加濃度のほぼ 100% のセレン酸が亜セレン酸へ還元された。15 時間目までに初期添加濃度の約 90% の亜セレン酸が元素態セレンに還元された。そして 22 時間目に元素態セレン量が最大となった。初期セレン濃度の 87.8% にあたる元素態セレンを汚泥として回収できた(表 1)。

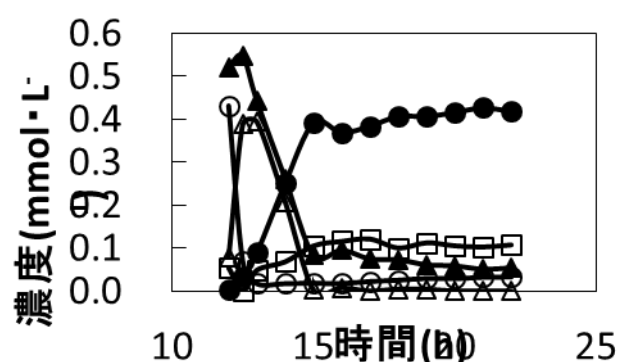


図 2 模擬排水を用いたセレン固化回収試験 ○: セレン酸, △: 亜セレン酸, ▲: 可溶性セレン, ●: 元素態セレン, □: 気化セレン。

汚泥を粗精製した後、誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) で構成元素の定量分析を行った。測定の結果、粗精製物に



はセレンが2% (wt・wt<sup>-1</sup>), マグネシウムが4% (wt・wt<sup>-1</sup>), カルシウムが2% (wt・wt<sup>-1</sup>) 含まれていることがわかった。ICP-AES では測定ができない炭素, 酸素, 窒素等の低元素分析のためエネルギー分散型 X 線分析 (EDX) で半定量分析を行った。本研究で得られた粗精製物の電子顕微鏡写真 (図 3(A)), 元素組成分析結果 (図 3(B)) と EDX 元素スペクトル (図 3(C)) を示した。粗精製物全体にセレンが検出され, 特に白い部分にセレンが濃縮されていた (図 3(A))。EDX の分析結果も ICP-AES の分析結果と一致しており, 粗精製物には平均 2% (wt・wt<sup>-1</sup>) のセレンが含まれていた。モデル廃水の初期セレン濃度は 0.004% (wt・wt<sup>-1</sup>) であるので, 粗精製物は約 500 倍に濃縮した粗精製セレンであり, 資源化の可能性が示唆された。固化回収は気化回収と比較して培養開始から回収までの時間が短く, セレンの濃縮倍率も高い。既存の報告では水溶液からセレンを浄化・除去することを目的としており<sup>9) -13)</sup>, 資源化の報告は未だない。我々は模擬排水からセレンを含む汚泥を回収し, セレンが 2%(wt・wt<sup>-1</sup>)含まれる粗精製セレンの獲得に初めて成功した。

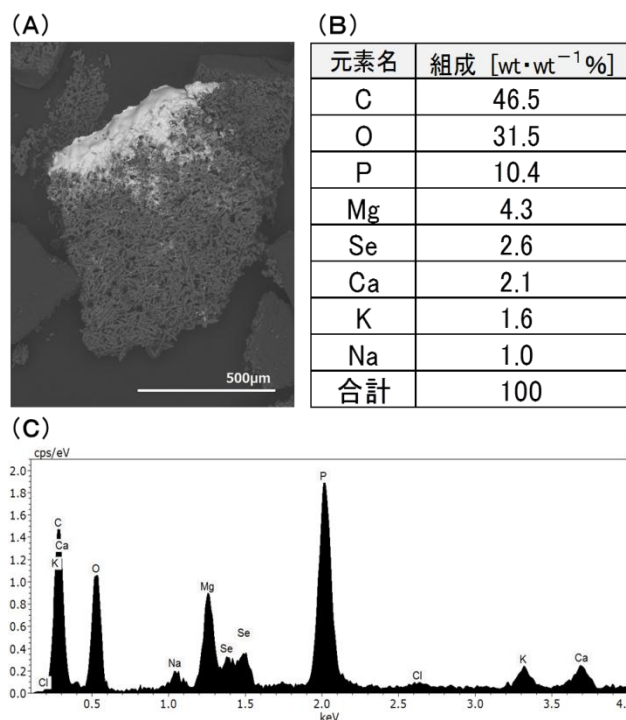


図 3 粗精製セレンの電子顕微鏡写真 (A)、元素組成分析 (B) と EDX 分析スペクトル (C) .

### 3. 2. 3 実廃水を用いた気化セレン回収

模擬排水を用いた実験では気化回収で初期セレン酸濃度の 71.2%, 固化回収で 87.8% を回収できた。気化回収での回収率が固化回収より低い理由は, 硝酸による DMDS<sub>Se</sub> の捕集効率(81%)を考慮していないからである<sup>4)</sup>。捕集効率を計算にいれると, 気化回収率は 87.9%となり, 回収率は固化回収とほぼ同じになる。

次にセレン含有実廃水からのセレン気化回収, 固化回収実験の結果を紹介する。可溶性セレンを 5.5mmol・L<sup>-1</sup>含む実廃水の提供を受けた。イオンクロマトグラフィーで定性定量分析を行ったところ, セレン酸が約 85%, 亜セレン酸が約 15%の割合で混在していた。セレン以外にもケイ素やカルシウム, カリウムが含まれていた。実廃水を

培地で希釈して、模擬排水のセレン濃度に合わせて回収試験を行った。

実廃水を用いた気化回収試験での各セレンの経時変化を図 4 に示した。培養開始から 120 時間で初期セレン濃度の 38.9%にあたる DMDSe を硝酸に回収することに成功した。モデル廃水での回収率 71.2%と比較すると、実廃水での回収率は約半分まで減少した。セレン酸や亜セレン酸の還元はモデル廃水と同様に、12 時間で元素態セレンに還元した。120 時間目の元素態セレン量は 3.8%であり、モデル廃水の 4.0%と同等であった (表 1)。培養 120 時間目の可溶性セレンの割合はモデル廃水の 10.5%に比べて実排水では 35.9%となっている。可溶性セレン中のセレン酸と亜セレン酸濃度は各々 5%であるので、未知セレンが培養液中に 25.9%含まれていた。分析の結果、未知セレンは主に DMDSe であった。

以上の結果から、実廃水を用いた時の気体回収率の低下は DMDSe が可溶性セレンとして残存していることが原因だと考えられる。回収時に可溶性セレンに含まれる DMDSe が全て気体として硝酸で回収できたと仮定すると、気化回収率は初期セレン濃度の 64.8% (気体回収率 38.9% + 可溶性セレンに含まれる DMDSe 含量 25.9%) となる。これはモデル廃水を用いた時と同等の回収率である。DMDSe が培養液中に残存する要因は検討中であるが、モデル廃水には存在しない元素等に起因していると考えられる。この要因を取り除くことで、NT-I 株によるセレン気化回収の回収率が高くなる可能性がある。

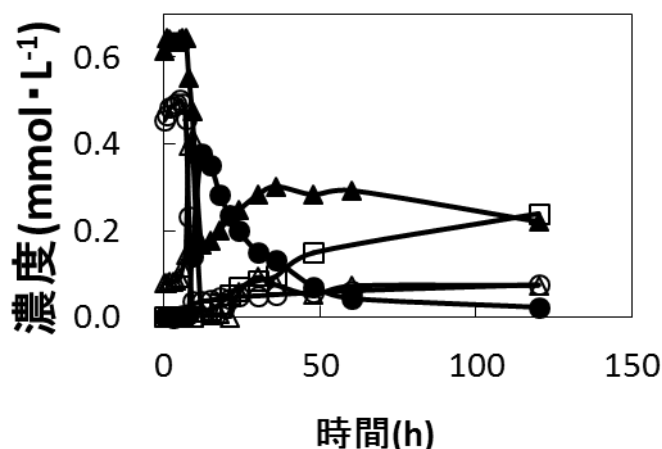


図 4 実廃水を用いたセレン気化回収試験

○: セレン酸, △: 亜セレン酸, ▲: 可溶性セレン, ●: 元素態セレン, □: 気化セレン。

### 3. 2. 4 実廃水を用いた固化セレン回収

実廃水を用いた固化回収試験の各セレンの経時変化を図 5 に示した。培養開始から 24 時間で初期セレン濃度の 78.8%を元素態セレンとして回収することに成功した。モデル廃水では 22 時間で 87.7%の回収率が得られている。モデル廃水と比較すると回収率が若干低下したものの、実廃水を用いても高い回収率が得られた。実廃水では培養開始から 24 時間目には、可溶性セレンが 8.6%存在している (表 1)。可溶性セレン、元素態セレン以外の 12.5%は NT-I 株が元素態セレンを還元して DMDSe を合成し、気化したものと考えられる。実廃水はセレン酸と亜セレン酸が混在しているため、各還元反応速度が異なり、単純に通気を止めるだけでは元素態セレンの還元を完全に抑制することができていない。セレン酸化物イオンの混合比によって培養条件を変える等の工夫が必要である。元素態セレンの還元を完全に阻止できれば、より高回収率で固化回収ができると考える。

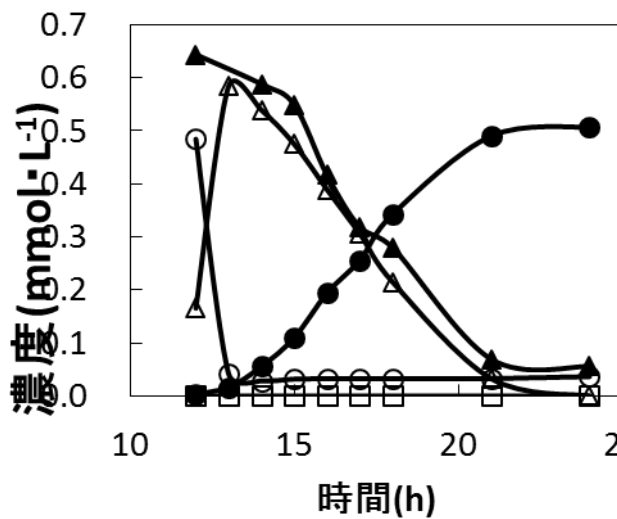


表1 セレン回収時における可溶性セレン，元素態セレン，気化セレンのマスバランス。

サンプル	培養条件	可溶性セレン		元素態セレン		気化セレン		合計	
		mmol·L <sup>-1</sup>	%	mmol·L <sup>-1</sup>	%	mmol·L <sup>-1</sup>	%	mmol·L <sup>-1</sup>	%
モデル廃水	気化回収条件*1	0.05	10.5	0.02	4.0	0.36	71.2	0.43	85.8
モデル廃水	固化回収条件*2	0.04	8.7	0.44	87.8	N.D.	N.D.	0.48	96.0
実廃水	気化回収条件*1	0.22	35.9	0.02	3.8	0.24	38.9	0.48	78.6
実廃水	固化回収条件*3	0.06	8.6	0.51	78.8	N.D.	N.D.	0.56	87.5

\*1 38℃, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 120時間目に回収

\*2 38℃, pH9.0, 0 L/min, 250rpm, 22時間目に回収

\*3 38℃, pH9.0, 0 L/min, 250rpm, 24時間目に回収

N.D.: Not determined

図5 実廃水を用いたセレン固化回収試験

○：セレン酸，△：亜セレン酸，▲：可溶性セレン，●：元素態セレン，□：気化セレン。

### 3. 2. 5 実廃水を用いたセレン回収まとめ

本稿ではNT-I株による実廃水を用いたセレンの気化，固化回収の結果を紹介した。セレン気化回収では模擬排水と比べると回収率は低かったが，回収率を向上できる可能性がある。セレン固化回収では高回収率でセレン汚泥を回収できた（表1）。

セレン気化回収では培養終了までの時間は長い，夾雑物の少ないセレンを単位プロセスで回収することができる。セレン固化回収では培養終了までの時間は短い，回収した汚泥には微生物由来の夾雑物が含まれる。このため高純度セレンを精錬するには汚泥からの別工程が必要となる。浄化回収ニーズに見合った2種類の回収方法（気化回収・固化回収）を選択できるのがNT-I株を利用したセレン回収の特徴である。

### 3. 2. 6 酸化焙焼による精錬プロセス

バイオセレンは元素態セレンと微生物由来の有機成分，培地由来の無機塩から構成される。バイオセレンを酸化焙焼に供すると有機成分とともにSeは酸化揮発し，低温部にて焙焼ガスから二酸化セレン（SeO<sub>2</sub>）を析出分離できると考えられる。また，酸化揮発傾向や焙焼生成物の水溶解性や還元性の相違から，無機成分の低減も期待できる。一方で，有機成分とSeは競合酸化し，Seの酸化が不十分な場合には水に不溶性元素態セレンが析出することが予想される。そこで，熱力学計算によってバイオセレンの焙焼条件を検討し，バイオセレンの酸化焙焼を試みた。その結果，バイオセレンを700℃で酸化焙焼したところ，酸素量が大きい場合にはSeは十分に酸化され，固体のSeO<sub>2</sub>が得られた。本実験では，酸素50ml/minの流量で焙焼した際に，Seの総収量のうちのSeO<sub>2</sub>としての収率が最大97%となった。析出したSeO<sub>2</sub>は金属成分の総和に対するSe分率が約99%であり，酸化焙焼による精製効果が認められた。

### 3. 2. 7 テルル酸代謝微生物の取得

テルルはセレンと同周期にある半金属である。テルルの主要用途は、鉄の機械加工性を向上させるための冶金用添加剤、加硫剤およびゴム生成の促進剤、合成繊維生産用の触媒として使用される。機能的用途としては近年、Cd-Te 系太陽電池への使用が増加している。テルルも工業的に幅広い用途で使用されるが、セレンと同様に生体に対する高い毒性を有しており、環境省によって水質汚濁防止法の要調査項目に指定されている。高毒性や近年の使用量の増加から、その処理と再資源化方法の確立が急務であるといえる。

テルル酸化物陰イオン（テルル酸、亜テルル酸）は毒性が高く、亜テルル酸は  $3.9 \mu\text{M}$  の低濃度でほとんどの微生物に対して毒性を示す。一般的に金属の固体や揮発化物はその酸化物陰イオンよりも毒性が小さいため、その固体化・揮発化反応は解毒メカニズムの一種であると考えられている。亜テルル酸に耐性のある微生物を選択すれば、亜テルル酸の固体化・揮発化能を持つ微生物を取得できる可能性が高いと考えた。そこでテルルの浄化・回収プロセスを構築するため、金属精錬工場から採取した排水溝底泥水から亜テルル酸耐性微生物を分離し、固体化・揮発化能力を有しているかを調べた。その結果、 $1\text{mM}$  の亜テルル酸に対して耐性を示す集積培養系から、亜テルル酸耐性を有する細菌 TI-1 株、TI-2 株、TI-3 株を分離することに成功した。分離した TI-1 株、TI-2 株、TI-3 株は、 $30\text{mM}$  の亜テルル酸存在下で増殖可能なことから、これまで報告されている微生物の中で最も高い亜テルル酸耐性を有することを明らかにした。また

これら 3 株はテルル酸、亜テルル酸に対して還強い還元能を示した。同定した結果、これら 3 株を *Stenotrophomonas maltophilia* Ti-1 , *Ochrobactrum anthropi* Ti-2 , *Ochrobactrum anthropi* Ti-3 と命名した。次にテルル酸還元細菌 3 株の還元特徴を解析した。Ti-2,3 はテルル酸還元能に差はなかったが、Ti-1 株はこの 2 株に比べて低温、低 pH、高塩濃度での還元能が優れていた。合成された元素態テルルは細胞外に分泌され、遠心分離や限外濾過などの方法で簡単に回収ことに成功した。また浄化・回収対象となる廃水・廃棄物中は多元素で高塩濃度であることが多いので、塩耐性を持つ新たなテルル酸・亜テルル酸還元微生物を海洋環境試料から数株を分離した。

### 3. 2. 8 レアアースエレメント(REE)代謝微生物の取得

REE とは、周期表第三族の原子番号 21 番のスカンジウム (Sc) 及び 39 番のイットリウム (Y) と、57 番から 71 番のランタノイドと総称される 15 元素の元素グループのことをいう。REE は、特殊な電子軌道の原子構造をしており、蛍光材料や永久磁石、超伝導材料として日本の産業にとって必須金属である。特に、ジスプロシウム (Dy) は、耐熱性ネオジム (Nd) 磁石と呼ばれる高温に耐える強力磁石の原料としてその需要が増加している。この Nd 磁石は、モーターとして次世代型自動車や携帯電話、パソコンに利用されており、その製造工程から排出される研磨屑は、物理化学的処理によるリサイクルが試みられているが、この方法では完全に回収することが出来ず、その廃棄物中の残存 REE の回収が望まれている。

そこで、固形廃棄物から選択的に REE 抽出を行う微生物の取得と REE 含有溶液から特異的に REE を分離・濃縮する新規代謝微生物の分離を行い、バイオプロセス構築に向けて検討した。

バイオリーチングは低品位鉱石から微生物を用いて銅などの有用非鉄金属を抽出する技術である。現在ではバイオリーチングの応用研究が進み、ウランやコバルト、金などの抽出にも利用されている。本研究では REE リーチング微生物を分離することを主とし、その REE リーチング能を評価して REE 回収に向けた有用性を検討した。実験の結果、酸性湖の環境試料から REE 抽出微生物群を 3 菌群得た。このうち S20 菌群は、培養 1 日目で REE 含有廃棄物から Dy を約 70%、Nd を約 55%、Pr を約 65% 抽出し、Fe はほとんど抽出しなかった。

有用金属の濃縮・回収手段として、金属代謝微生物によるバイオミネラリゼーションは広く研究されている。代表的な例として、金属イオン還元菌 *Shewanella algae* を利用した Pd, Pt, Au 等の貴金属回収があげられる。そこで、REE の中でもジスプロシウム (Dy) に重点をおき、Dy 含有溶液から特異的に Dy を固化・濃縮する新規代謝微生物を分離して、その固化・濃縮能を評価して REE 回収に向けた有用性を検討した。その結果、廃鉱山の環境試料から Dy 代謝能をもつ微生物 T9 株を単離した。SEM と EDX による元素分析から、菌体上に Dy とリン(P) を固化濃縮していることが分かった。以上の結果から、取得した Dy 代謝微生物 T9 株は高効率に Dy を濃縮する可能性があると思われる。

#### 4. 参考文献

- 1) Fujita M *et al.*: Isolation and characterization of a novel selenate-reducing bacterium, *Bacillus* sp. SF-1. *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 517-522, 1997.
- 2) Kuroda, M. *et al.*: Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. *J. Biosci. Bioeng.*, 112(3), 259-264, 2011.
- 3) Kagami, T. *et al.*: Selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. *Water Research*, 47, 1361-1368, 2013.
- 4) Lenny W. *et al.*: Quantitative and qualitative trapping of volatile methylated selenium species entrained through nitric acid. *Environ. Sci. Technol.*, 44(1), 382-387, 2010.
- 5) de Souza, M.P., Amini, A., Dojka, M.A., Pickering, I.J., Dawson, S.C., Pace, N.R., and Terry, N.: Identification and characterization of bacteria in a selenium contaminated hypersaline evaporation pond. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 3785-3794, 2001.
- 6) Doran, J.W. and Alexander, M.: Microbial transformations of selenium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 31-37, 1977.
- 7) Fleming, R.W. and Alexander, M.: Dimethylselenide and dimethyltelluride formation by a strain of *Penicillium*. *Appl. Microbiol.*, 24, 424-429, 1972.
- 8) Saudi, M. R., Ghazvini, P.T.M., Khajeh, K. and Gharavi, S.: Bioprocessing of seleno-oxyanions and tellurite in a novel *Bacillus* sp. strain STG-83: A solution to

removal of toxic oxyanions in presence of nitrate. *J. Hazard. Mater.*, **165**, 71–77, 2009.

9) Hageman, S.P., van der Weijden, R.D., Weijma, J. and Buisman, C.J.: Microbiological selenate to selenite conversion for selenium removal. *Water Res.*, **47**, 2118-2128, 2013.

10) Cantafio, A.W., Hagen, K.D., Lewis, G.E., Bledsoe, T.L., Nunan, K.M. and Macy, J.M.: Pilot-scale selenium bioremediation of San Joaquin drainage water with *Thauera-selenatis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3298-3303, 1996.

11) Lenza M., Van Hullebusch, E.D., Hommes, G., Corvinic, P.F.X. and Lens, P.N.L.: Selenate removal in methanogenic and sulfate-reducing upflow anaerobic sludge bed reactors. *Water Research.*, **42**, 2184-2194, 2008.

12) Lenz, M., Enright, A.M., O'Flaherty, V., van Aelst, A.C., and Lens, P.N.L.: Bioaugmentation of UASB reactors with immobilized *Sulfurospirillum barnesii* for simultaneous selenate and nitrate removal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83**, 377-388, 2009.

13) Lortie, L., Gould, W.D., Rajan, S., McCready, R.G., and Cheng, K.J.: Reduction of selenate and selenite to elemental selenium by a *Pseudomonas stutzeri* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 4042-4044, 1992.

## 5. 学会論文等投稿・発表状況

1) 山下光雄、大塚治：「セレン酸還元細菌 NT-I 株を用いた廃水からのセレン回収」。水環境学会誌、37(2)、66–70 (2014)。

2) 山下光雄、清和成編集・分担「第2章 メタルバイオテクノロジー」，“地球を救うメ

タルバイオテクノロジー - 微生物と金属資源のはなし - ” 成山堂書店, (2014)。

3) Sirikan Maneesuwannarat, Alisa S. Vangnai, Mitsuo Yamashita and Paitip Thiravetyan. Bioleaching of gallium from semiconductor /electronic wastes: Screening and characterization of gallium arsenide-extracting bacteria. ENRIC2014: Global Climate Change and Sustainability pathway 6-7/November, 2014, Bangkok, Thailand.

4) S. Soda, A. Hasegawa, M. Kuroda, A. Hanada, M. Yamashita, and M. Ike.: Selenium recovery from kiln powder as by-product of cement manufacturing by using chemical leaching and bacterial reduction. The International water association World Water Congress & Exhibition, September 21-26, 2014, Lisbon, Portugal.

5) M. Ike, T. Narita, M. Kuroda, S. Soda, and M. Yamashita.: Recovery of Selenium in wastewater through Biovolatilization by Using *Pseudomonas stutzeri* NT-I. The International water association World Water Congress & Exhibition, September 21-26, 2014, Lisbon, Portugal.

6) 大塚治、山下光雄. 循環型社会を目指した実廃水・実廃棄物からのレアメタル回収技術. エコデザインプロダクツ&サービスシンポジウム、東京大学本郷キャンパス、2014年7月30日、東京。

7) 大塚治、黒田真史、池道彦、山下光雄. 微生物を用いた廃水からのセレン気化回収技術の検討. 廃棄物資源循環学会 2014年度春の研究発表会（平成26年度）、2014年5月29–30日、川崎。

8) 堀池巧、大塚治、田中康寛、寺原猛、今田千秋、山下光雄. 海洋環境からの好気性テ

ルル酸還元微生物の単離とテルル酸還元能の解析. マリンバイオテクノロジー学会 2014 年度大会 (平成 26 年度)、5 月 31 日、三重大学.

9) 堀池巧、大塚治、田中康寛、寺原猛、今

田千秋、山下光雄.テルルを代謝する新規海洋性微生物の獲得とその機能解析.日本農芸化学会 2014 年度 (平成 26 年度)、3 月 27-30 日、東京.

# セレン還元酵素を用いたセンサーの開発

芝浦工業大学工学部応用化学科

今林 慎一郎

## 1. 序論

セレンは化合物系太陽電池用の半導体など先端材料に使用されるレアメタルである。酸化数-2, 0, +4, +6のうち、毒性のあるセレン酸(+6)または亜セレン酸(+4)は工場排水などに含まれ、環境へ流出することが問題になっている。セレン酸還元菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I はこれまで報告されているセレン酸還元菌の中で最も高いセレンオキサニオン(セレン酸や亜セレン酸)の還元能をもつグラム陰性の好気性桿菌である。<sup>1)</sup>セレンオキサニオンを水に難溶で毒性の低い元素態セレンに還元できる NT-I の能力を活かして、工業排水中に含まれるセレンオキサニオンを除去、元素態セレンとして回収することが試みられている。<sup>2)</sup>

単離した酸化還元酵素や微生物に含まれる酵素による触媒反応を電極反応と共役させた酵素電極反応系は生物燃料電池やバイオセンサーなどに利用されている。<sup>3,4)</sup> セレン酸還元菌 NT-I を利用した酵素電極反応系が構築できれば、排水中のセレンオキサニオン濃度を簡便に定量できるセンサーや廃棄物から電気エネルギーを取り出す微生物燃料電池に展開できる可能性がある。

本研究は、セレン酸還元菌 NT-I(あるいは単離されたセレンオキサニオン還元酵素)を用いた酵素電極反応系の構築し、この反応系をベースにしたセレンオキサニオンセンサーを作

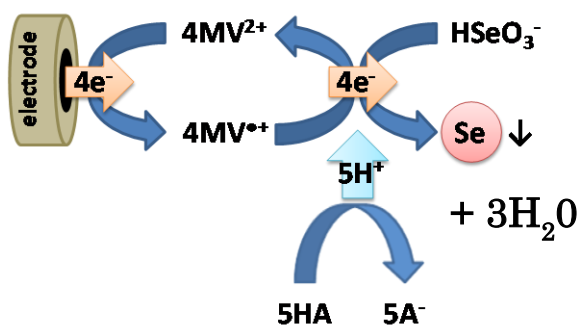
製することを目的としている。現時点では NT-I が有するセレンオキサニオン還元酵素は単離されていないため、平成 23,24 年度は NT-I のホールセルを酵素が入った袋と捉え、電極上へ滴下、乾燥、メンブレンフィルターで覆うことで電極上に固定化し、適当な酸化還元物質(メディエーター)を仲介させることで、セル中に含まれるセレンオキサニオン還元酵素と電極を電気的につなぐこと(メディエーター型電子移動経路の構築)が可能かを検討した。メチルビオロゲン(MV)をメディエーターとして使用することで限られた条件下では NT-I を経由する亜セレン酸の還元のみを生起できることがわかった。しかし、菌体を経由しない MV による直接還元反応が相当量同時に起きるため、NT-I を経由する亜セレン酸の還元のみを定常的に起こすことはできなかった。亜セレン酸を直接還元する可能性がなく、電極から亜セレン酸へ効率の良く電子移動を仲介する物質は依然として見つけられていない。

上記セレンオキサニオンの直接還元反応は、亜セレン酸については強酸性条件でのみで起こることが、セレン酸については起こらないと報告されてきた。<sup>5)</sup> 上記のように、MV を添加すると、中性 pH 領域でもセレンオキサニオンの還元が可能になることを偶然発見し、種々の電気化学測定結果を基に、**図 1** に示す反応機構のように MV が電極からセ



レンオキサニオンへの電子移動を仲介していることがわかった。この MV 共存下のセレンオキサニオン還元反応をセレンオキサニオン除去・元素態セレン回収に展開することについて、可能性と課題を検討した結果を報告する。

図 1 MV をメディエーターとする亜セレン酸の還元反応機構



## 2. 研究計画

### 平成 26 年度

平成 25 年度に構築したセレン酸還元菌ホールセルを用いた酵素電極反応系を基に、セレンオキサニオンセンサーのプロトタイプを作製する。

### 平成 27 年度

平成 26 年度に作製したセレンオキサニオンセンサーの性能評価を行って実用上の問題点を明らかにすると同時に、これを解決するための方法などを検討する。さらに、可能ならば酵素電極反応系の他の応用展開について探索する。

## 3. 計画の進行状況

### (1) MV をメディエーターとする電極還元反応を用いるセレンオキサニオン除去、元素態セレン回収の可能性と課題

未処理の工業排液にオキサニオンが  $10 \sim 0.1 \text{ mmol dm}^{-3}$  含まれることを示す調査報告が

ある(未公開資料)。MV 共存下の電極還元反応を利用したセレンオキサニオンの除去、元素態セレン回収の効率がオキサニオンの初濃度によってどのように変化するかを検討した。 $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  MV を含む  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  リン酸緩衝液 (PBS, pH 6.00) に適量の亜セレン酸あるいはセレン酸を加えた電解質 (77 mL) 中、カーボンフェルト (厚さ 3 mm, 直径 23 mm) を作用極、 $\text{Ag}|\text{AgCl}$  (飽和 KCl) を参照極、白金黒線を対極として電解還元を行った。電極で生成したカチオンラジカル ( $\text{MV}^{\bullet+}$ ) がオキサニオンの還元で使用されず、電解質が青色に着色し始めた時点で電解を終了し、電解質中のセレン残量 (原子吸光あるいは ICP 測定によって定量) からセレン除去率を、析出したセレン量 (重量あるいは ICP 測定によって定量) からセレン回収率を、電解電気量と除去率から電流効率をそれぞれ計算した。

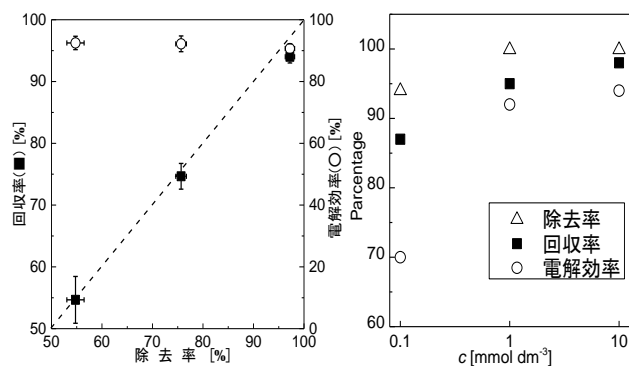


図 2 (左)  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  亜セレン酸における除去率に対する回収率、電解効率、(右) 各亜セレン酸濃度における除去率、回収率、電解効率

図 2 に示すように、電解質中の亜セレン酸初濃度が  $10, 1.0 \text{ mmol dm}^{-3}$  の場合、メディエーター型電極還元反応を利用した電解によって電流効率 95% 以上で 99% 以上の亜セレン酸が除去でき、その大半が元素態セレンとして回収された。しかし、亜セレン酸が  $0.1 \text{ mmol dm}^{-3}$  の場合、除去率は 94% に、回収率は 87%

に減少し、電流効率も70%程度であった。これは、電解質着色までの電解では  $6 \mu\text{mol dm}^{-3}$  程度の亜セレン酸が残ることを反映している ( $(1 \times 10^{-4} - 6 \times 10^{-6}) \times 100 / 1 \times 10^{-4} = 94\%$ )。電流効率は低下するが、電解質着色後も電解を続ければ排出規制値 ( $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) 以下にできる。

$\text{MV}^{+}$ による亜セレン酸の還元は電極近傍の電解質中で起こるため、生成した元素態セレンは電極表面に析出せず、電解質に懸濁した状態で得られる。これは、元素態セレンをろ別によって回収できる利点につながる。これに対して、 $\text{MV}$  を添加しない場合は亜セレン酸の電解は可能であったが、2倍以上の電解時間を要し、かつ生成した元素態セレンの大半が回収に適さない電極上に析出した状態で得られた。

上記結果と下記①～③の実験結果から、メディアーター型電解還元反応による亜セレン酸から元素態セレンの回収は十分可能性があると結論された。

- ① 電解質体積を13倍(1 L)に増やした場合、回収率は93%に、電流効率は72%に低下したが、除去率は99%以上で変わらなかった。
- ② 電解質を除酸素しない場合、 $\text{MV}^{+}$ が溶存酸素で消費されるために電流効率が5～10%低下するものの、除去、回収率の大きな低下は認められなかった。
- ③ カーボンフェルト電極を繰り返して3回使用した場合(各回とも、亜セレン酸濃度は  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ )でも、除去率は99%以上を保った。回収率は増減があるものの、85%以上を維持した。

一方、セレン酸は初濃度が  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  のときの除去率および回収率がそれぞれ13%、

10%であり、亜セレン酸と比べて除去、回収されにくい。電流効率は84%とそれほど低くないことから、 $\text{MV}^{+}$ によるセレン酸の還元効率が低いために電流が流れ難く、除去率、回収率が低くなったものと考えられる。しかし、 $\text{MV}$  を添加しない場合、セレン酸はほとんど還元が起らず、電気化学的にセレン酸が還元される例はほとんど報告がなく、本結果は興味深い。今後、電流効率の向上を検討したい。

## (2) 排液含有物質が $\text{MV}$ をメディアーターとする電極還元反応を妨害する可能性

(1)の検討は、所定濃度のセレンオキサニオン、 $\text{MV}$  を含む緩衝液というモデル系で行った。しかし、産業排液中にはセレンオキサニオン以外に多くの物質を含んでいる。その中には、 $\text{MV}$  によるセレンオキシアニオンのメディアーター型電極還元を妨害する物質が含まれている可能性がある。そこで、セレンを含む排水に対して実施した元素分析結果(非公開データ)を基に、妨害する可能性のある物質を電気化学測定によって推定した。

広義には標準電極電位が  $\text{MV}$  の還元開始電位 ( $-0.5 \text{ V vs. Ag|AgCl}$ ) よりもポジティブかつ酸化体である物質が妨害物質になり得る。排液の元素分析において10 ppm以上含まれていた元素を抽出し、金属製造業や石炭火力発電所などの排水中に含まれる同じ元素を持つ物質と比較することで、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ を妨害物質と推定した。

$\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ については、これら物質を濃度  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ まで加えても、亜セレン酸共存および非共存下ともボルタモグラムに変化は見られなかったことから、 $\text{MV}$  のレドックスを妨害する可能性は低い。しかし、 $\text{NO}_2^-$ は電極反応で生成する  $\text{MV}^{+}$ から亜セレン酸へ

渡される電子を奪う妨害を起こす可能性あり、 $\text{Fe}^{2+}$ についてはその反応が電極表面で起こる MV の還元と競合する妨害が起こることが予想された。

そこで、 $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  MV を含む  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  PBS (pH 6) に  $\text{Fe}^{2+}$ あるいは  $\text{NO}_2^-$ を  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  加えて、亜セレン酸の電解還元を行い、亜セレン酸の除去率、元素態セレンの回収率、電解の電流効率に対する影響を測定した。 $\text{NO}_2^-$ を加えた場合、亜セレン酸電解還元の電解効率は 93 % から 90 % に減少したが、亜セレン酸の除去率、元素態セレンの回収率とも大きく変化しなかった。 $\text{Fe}^{2+}$ の場合、電流効率は変化しなかったが、亜セレン酸の除去率が 5% 低下した。さらに、回収率が 130% と増加し、これは ICP 分析から、元素態セレンに Fe 化合物が混入したためであることがわかった。Fe 化合物は電極還元反応で生成したのではなく、 $\text{Fe}^{2+}$ が溶存酸素と反応して  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  が化学的に生成し、沈殿したことが疑われた。したがって、亜セレン酸の電極還元の前に酸素を吹き込むなどして除去することによって、影響を無くすことが可能と思われる。以上のように、メディエーター型電極還元反応を妨害する物質は現時点で確認できていない。

### (3) メディエーターを含む電解質を繰り返し利用可能にするための検討

現時点でメディエーター型電極還元反応を工業排液中に含まれるセレンオキシアニオンに対して適用するためには、電解質中にメディエーターである MV および緩衝剤を添加する必要がある。これは、経済的にも操作的にも好ましくない。そこで、他の物質、可能ならば繰り返し利用できる代替物を検討した。

電極表面へ固定化した MV によって亜セ

レン酸の還元が可能ならば、排液毎に MV を添加する必要がなくなる。4, 4'-ビピリジニウム基を Au-S 結合を介して金電極表面へ固定化しても、亜セレン酸の触媒的還元が起こることを確認した。固定化すると排液ごとに MV を添加する必要がなくなるため、実用的である。ただし、単分子層吸着による固定化ではメディエーター量が限られるため、溶解系よりも電流が小さかった。現在、カーボンフェルト電極表面への固定化を検討している。

回転電極法による測定から、緩衝液として PBS を使用した場合、 $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$  まで濃度を下げると、十分な速度で電極還元が起こらず、緩衝剤の低濃度化はあまり現実的でないことがわかった。セレンオキシアニオンの電極還元における緩衝剤の役割は、①緩衝機能、②  $\text{H}^+$ 供給、③導電性付与である。①と②については、 $\text{pKa}$  値 5~8 を有するプロトン解離性の官能基で代用できると考え、表面に  $-\text{SO}_3\text{H}$  基や  $-\text{COOH}$  基を有するイオン交換樹脂(それぞれ、IR120, IRC76)が緩衝剤を代替できるかを検討した。図 3 に示すように、 $\text{COOH}$  基を表面に修飾したイオン交換樹脂が弱酸～中性域 (pH5~8) で緩衝能を有することがわかった。

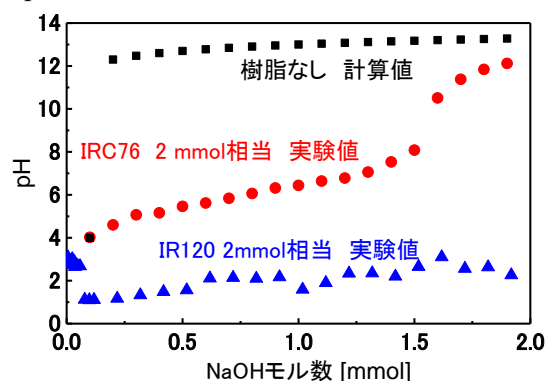


図 3 イオン交換樹脂 (IR120: 表面  $-\text{SO}_3\text{H}$  基, IRC76: 表面  $-\text{COOH}$  基) の滴定曲線。

反応に必要な  $\text{H}^+$  を供給すると  $\text{COOH}$  基は脱プロトンして  $\text{COO}^-$  に変化するが、イオン樹脂を

ろ別して酸で処理することによってCOOH基を再生、再利用可能である。しかし、イオン交換樹脂のみでは③電解質の導電率が不足するため、塩(NaCl, KCl, LiClなど)を添加する必要がある。このとき、塩のカチオンによる差はあるが、塩添加によって表面COOH基の解離が進み、そこに静電的に捕捉されることでMVの実効濃度が減少する問題が観られた。そこで、実効濃度が $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ になるように過剰のMVを添加し、亜セレン酸の電極還元反応を行った結果、図4のようにPBSを使用した場合とほぼ同程度の電流、すなわち同程度の反応速度になり、イオン交換樹脂がリン酸緩衝液の代替に成り得ることがわかりました。今後、メディエーターの電極表面への固定化や廃液に含まれるイオン成分の利用などと併用することで、イオン交換樹脂の利用について検討する予定である。

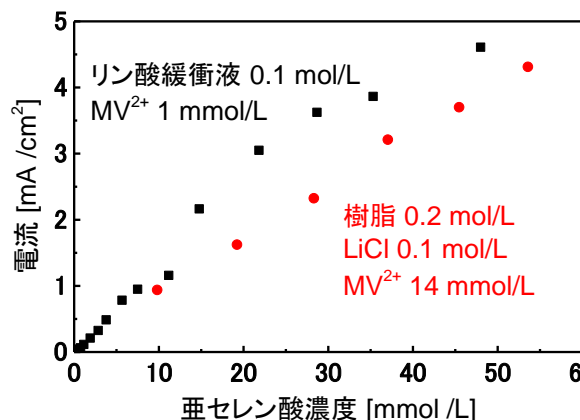


図4 亜セレン酸還元電流と濃度の関係

#### 4. 今後の計画及び学会論文等投稿・発表状況

##### 今後の計画

当初の研究目的であるセレン酸還元菌 NT-I を用いた酵素電極反応系の構築とこの反応系をベースにしたセレンオキサニオンセンサーを作製については、平成 23, 24 年度に検討した

MV をメディエーターとして用いる酵素電極反応系では検出感度が不十分であり、センサーに使用できない。

平成 27 年度は、今回報告した MV をメディエーターとする非酵素の亜セレン酸還元反応をベースにした亜セレン酸濃度測定法について検討する。これまでの研究で主として用いてきたCV法で測定できる下限濃度は  $20 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  程度と見積られるが、センサーとして実用に供するためには少なくとも排水基準値  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  ( $1.3 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ )、可能ならば水質基準値  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0.13 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ )以下に下げることが必要である。電位掃引法ではなく、電位ステップに伴って流れる電流あるいは電気量の測定、微分パルスボルタンメトリーなどの高感度電気化学測定法を用いることで、下限濃度をどこまで下げられるかを検討する。必要ならば、さらにストリッピング法(例えば、カソードストリッピング法としては、 $\text{Cu}^{2+}$ を共存させ、反応  $\text{HSeO}_3^- + 2\text{Cu}^{2+} + 5\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow \text{Cu}_2\text{Se} + 3\text{H}_2\text{O}$  によって溶液中の亜セレン酸を電極上に  $\text{Cu}_2\text{Se}$  として濃縮し、その量を電気化学的に測定する。電極上に  $\text{Se}(0)$ を電析させて濃縮し、 $\text{Se}(IV)$ へ酸化する電気量から定量するアノードストリッピング法も可能である)を併用して検出下限値を測定し、セレンオキサニオンセンサーに用いる反応系としての可能性を議論する。

##### 参考文献

- 1) M. Kuroda, E. Notaguchi, A. Sato, M. Yoshioka, A. Hasegawa, T. Kagami, T. Narita, M. Yamashita, K. Sei, S. Soda, M. Ike, *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 259-64 (2011).
- 2) T. Kagami, T. Narita, M. Kuroda, E. Notaguchi, M. Yamashita, K. Sei, S. Soda, M.

Ike, *Water Res.*, **47**, 1361-68 (2013).

3) 加納健司監修、“バイオ電池の最新動向”、第 1, 6 章、シーエムシー出版(2011).

4) 池田篤治監修、“バイオ電気化学の実際-バイオセンサ・バイオ電池の実用展開-”、第 4, 6, 14, 18 章、シーエムシー出版(2007).

5) V. S. Saji and C.-W. Lee, *RSC Adv.*, **3**, 10058- 10077 (2013).

基づくセレン回収法の可能性」、電気化学学会第 82 回大会、2015/3/17、横浜国立大学

2) 赤塚秀太、今林慎一郎、「メデイエータ型亜セレン酸還元反応はセレン回収方法として有用か？ー反応機構解析結果に基づく電解還元条件の検討ー」、第 60 回ポーラログラフおよび電気分析化学討論会、2014/11/16、京都工繊大

#### 学会発表

1) 赤塚秀太、越雲文也、今林慎一郎、「メデイエータ型水溶性セレン還元反応に

#### 投稿論文

準備中

# バイオレアメタル精錬開発

〔芝浦工業大学工学部 材料科学・化学群 材料工学科 新井 剛〕

## 1. 研究目的

近年、資源の有効利用の観点から都市鉱山等から有用元素を回収する試みが数多くなされている。それらの回収方法は、湿式精錬から乾式精錬に至るまで複数の提案がなされている。特に、昨今の環境負荷の低減を鑑みた場合、都市鉱山からの分離回収技術においても低環境負荷の技術開発が求められている。その中でも微生物等を利用したバイオ分離技術が注目を集めており、研究開発も数多くなされている。バイオ分離技術は、特定の金属イオンに対して選択性を示す菌体を用いて、バイオメタルとして目的の金属を分離・回収する技術である。しかしながら、バイオメタルは、菌体由来の有機物が多く、また、菌体に内包されている金属イオンを精錬する必要があり、一般的な製錬技術を適用することができない。また、分離を菌体で行うため、夾雑物質の可能性も否定できず、純度の低下が懸念される。そこで本開発では、バイオメタルからの精錬濃縮技術開発を行っている。本技術開発では、これまでに、Se を含有するバイオメタルから酸性溶液に Se を抽出し、酸性溶液に抽出された Se を電気分解法、若しくは化学還元法により精錬することを提案した。本法によりバイオメタル中から Se を回収で

きることを確認した。

昨年度、本研究では新たな試みとしてイオン液体を用いたレアメタルの精錬回収技術に着手した。昨年度の結果から、疎水性のイオン液体である 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムヘキサフルオロホスファート ( $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ ) は Pd(II) に対して極めて強い抽出能を有することが明らかとなった。イオン液体には、金属イオンの抽出能の他に高導電性、難燃性などの特長を有する。この高導電性であることを利用することで、これまでにない新たな製錬技術が開発できる可能性がある。そこで、本研究では、イオン液体を用いたレアメタル製錬プロセスについて基礎的に研究を行ったので報告する。

## 2. 研究計画

昨年度までにおいて、Se バイオメタルからの酸性溶液への抽出挙動及び新規のイオン交換体を用いたクロマトグラフィー法の適用性について検討した。本研究開発より、バイオメタルから酸性水溶液への抽出の可能性及び新規の無機-有機複合型イオン交換体へのレアメタルの吸脱着特性の基礎性能が明らかとなった。これにより、バイオレアメタルから抽出したレアメタル間相互の分離の基礎特性

を明らかとした。また、電気化学法によるバイオメタルの製錬技術開発の検討を実施した。本研究の成果より、抽出-イオン交換クロマトグラフィーにより分離した Se を電解法により回収できることが示唆され、Se のバイオメタルから Se を回収するプロセスを提案した。

また、昨年度は、 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ によるレアメタルの溶媒抽出特性について検討した。その結果、 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ は Pd(II)に対して高選択性を有することが明らかとなった

本年度は、さらに $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ に対する複数の金属イオンの抽出挙動の検討、並びに電気化学特性について検討を加えた。また、電析法によりイオン液体に抽出された金属イオンの直接回収についても基礎的な検討を行った。

平成 27 年度は、イオン液体と電気化学法を組み合わせた直接製錬技術開発を実施する。本年度は、これまでの成果を基に本研究で提案するスキームの成立性並びに妥当性について検討する。

### 3. 計画の進行状況

#### 3.1 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ の合成

イオン液体は一般に、カチオンとなる物質にアルキル基を導入するアルキル化反応と、目的物質を得るためのアニオン交換反応の 2 つの反応工程で構成される<sup>1)</sup>。本研究では 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムヘキサフルオロホスファート (以下、 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ と略記) を合成した。第一段階目の反応は、1-メチルイミダゾールと 1-ブロモブタンによる  $\text{S}_{\text{N}}2$  反応である。第一段階目で得られる 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムブロミド (以下  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{Br}]$ ) は親水性イオン液体であり、水溶性の溶媒抽出法で抽出溶媒として用いるに

は不向きである。そこで第二段階目において、アニオンを交換し疎水性のイオン液体を得た。

Fig.1 に合成スキームを示す。

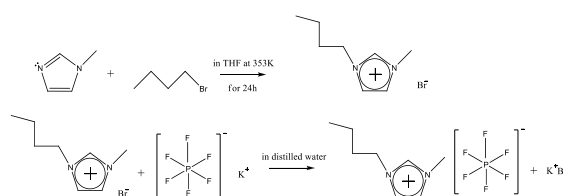


Fig.1  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ の合成スキーム

第一段階目では、モノマーである 1-メチルイミダゾール、1-ブロモブタンをそれぞれ 0.1 mol ずつ秤量し、同一の三角フラスコへ投入した。次に極性非プロトン溶媒として用いるテトラヒドロフラン(THF)を 0.1 dm<sup>3</sup>秤量し、モノマーが入った三角フラスコへ加えた。この 3 種類の試薬が入った三角フラスコを重合装置に設置し、24 時間 353 K に加熱しながら攪拌した。これが第一段階目の  $\text{S}_{\text{N}}2$  反応である。この反応で $[\text{C}_4\text{mim}][\text{Br}]$ を得た。エバポレーターを用い、得られた  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{Br}]$  から THF を蒸留除去した。

その後、第二段階目で 0.1 mol のヘキサフルオロリン酸カリウムを入れたビーカーに  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{Br}]$ を投入し、蒸留水を 0.5dm<sup>3</sup>加えて室温で混合することで $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ を得た。合成した $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ からモノマーや溶媒の残渣を取り除くために蒸留水による洗浄とデカンテーションを繰り返し行った。5 回以上の洗浄を行った $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ は、オイルバスで加熱して大まかに水分を除去した後、室温で真空乾燥を施した。本実験ではこれらの工程で得た $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ を用いた。

#### 3.2 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ による金属イオンの抽出挙動の検討

本研究で自製した[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]に対する各金属イオンの抽出特性を調査するためバッチ式抽出試験を行った。試験溶液は、所定濃度の塩酸溶液を用いて各々の金属イオンが 10 mmol·dm<sup>-3</sup> (以下、mol·dm<sup>-3</sup> を M と略記) となるように調整した。抽出試験はイオン液体と金属溶液の体積比を 1:1 として、所定の試験温度に設定した恒温振とう槽中で一定振とう速度において行った。ただし、イオン液体は一般に粘性が大きく、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]も例外ではなかったため、正確な体積を秤量することは困難であった。そこで、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]の密度を算出し、体積を重量に変換し抽出試験を行った。試験後の金属溶液にはミセル状の[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]が分散しているため、溶液を遠心分離によって分離し、そのうちの金属溶液を分析に資した。イオン液体への抽出量は、試験前後の金属溶液の濃度差を測定することで推定した。イオン液体の抽出性能の指標として抽出分率 E (%)を算出した。E (%)は式(1)で定義した。

$$E(\%) = \frac{C_o V_o}{C_w V_w + C_o V_o} \times 100 \quad (1)$$

ここでC<sub>w</sub>は試験後の水相の金属濃度[M]、V<sub>w</sub>は金属溶液の体積[cm<sup>3</sup>]、C<sub>o</sub>は試験後のイオン液体中の金属濃度[M]、V<sub>o</sub>はイオン液体の体積[cm<sup>3</sup>]を示す。

抽出平衡試験により[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]による各金属イオンに対する抽出挙動を得た。塩酸水溶液中における[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]に対する各金属イオンの抽出試験結果を Fig.2 に示す。

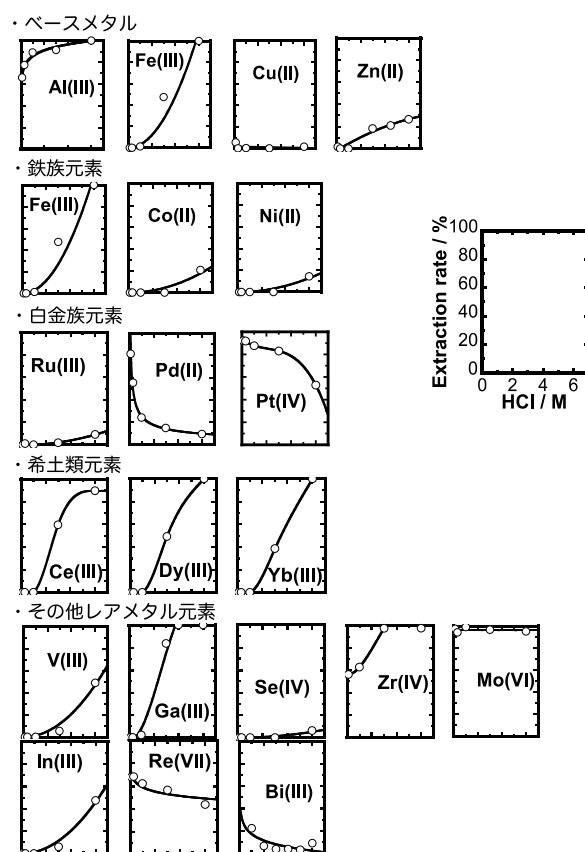


Fig.2 塩酸水溶液中における[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]に対する各金属イオンの抽出挙動

Fig.2 より Al(III)、Fe(III)は高い抽出分率を示すことが明らかとなった。特に、イオン交換樹脂等では殆ど吸着されないAl(III)が塩酸濃度によらず抽出されることは特筆すべき特徴である。Al(III)は塩酸濃度の増加に伴う抽出量の増大傾向が確認され、1 M 以上の塩酸濃度では 90 %を超える抽出分率が示された。また Fe(II)は低塩酸濃度では非抽出であったが、3 M 以上においては顕著に抽出分率が増大し、6 M において抽出分率は 100 %に達した。一方、Cu(II)は何れの塩酸濃度においても非抽出であることが示された。Zn(II)については塩酸濃度の増加に伴い抽出分率が増加したが、最大でも 25 %であった。

鉄族元素は一樣に塩酸濃度の増加に伴う抽



抽出分率の増大が見られた。しかし、Co(II)、Ni(II)とも 20 %前後の抽出分率であり、抽出に適しているとは言い難い。

白金族元素の抽出傾向に関しては、Ru(III)は塩酸濃度によらずほぼ非抽出、Pd(II)とPt(IV)については塩酸濃度の増加に伴い抽出分率は低下し、負の相関を示すことが確認された。Pd(II)は 0.1 M 塩酸において抽出分率 80 %を示し、Pt(IV)も 90 %と良好な抽出性が得られた。

希土類元素も塩酸濃度と抽出分率の間に正の相関が確認されたが、6 M 以上の塩酸では試験後に沈殿物の生成が各委任された。この沈殿生成の影響により、抽出分率が総じて 100 %近い値になったと推察される。

その他の元素に関しては、V(III)、Ga(III)、Zr(IV)、In(III)は塩酸濃度と抽出分率に正の相関が得られた。Mo(VI)、Re(VII)は本実験の塩酸濃度では何れにおいても抽出されることが明らかとなった。Se(IV)はほぼ非抽出であることが示され、Bi(III)については最も抽出される 1 M 塩酸においても 20 %前後の抽出分率であり弱抽出性であることが示された。

### 3.3 [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]による金属イオンの抽出速度の検討

これまでに得られた試験結果より、良好な抽出反応を示すものに関して、抽出速度の検討を行った。Fig.3 に Al(III)、V(III)、Fe(III)、Ga(III)、Zr(IV)の抽出速度試験結果を示す。

Fig.3 より、V(III)を除く 4 元素に関しては 10 分以内に抽出反応は平衡に達することが確認でき、十分に早い抽出速度であることが示された。これは抽出剤として用いる場合において有利な特徴であり、実プロセスにも適した性能であると考えられる。V(III)に関しては抽出平

衡を得ることが難しく、120 分まで一次関数的な抽出分率の増加傾向が示された。

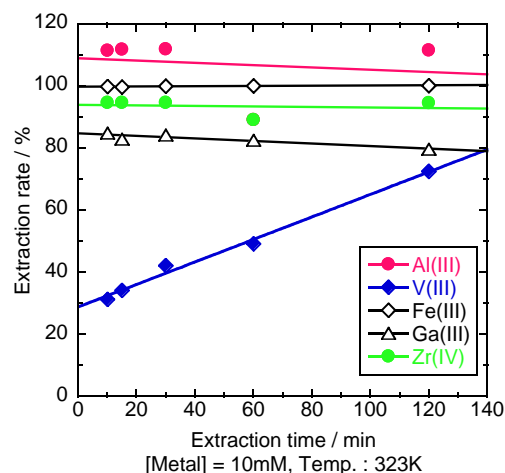


Fig.3 Al(III), V(III), Fe(III), Ga(III), Zr(IV)の抽出速度試験結果

次いで Fig.4 に Mo(VI)、Pd(II)、In(III)、Re(VII)、Pt(IV)の抽出速度試験結果を示す。

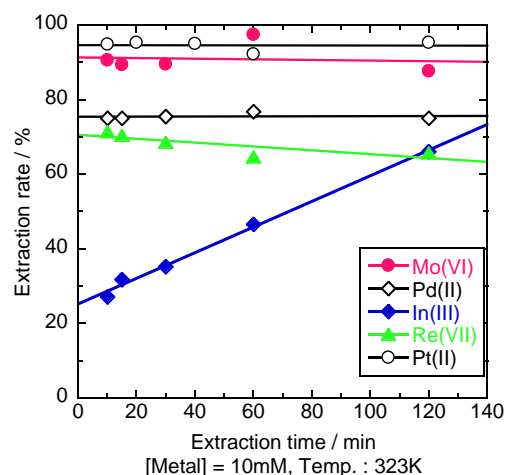


Fig.4 Mo(VI), Pd(II), In(III), Re(VII), Pt(IV)の抽出速度試験結果

Fig.4 より、In(III)を除く 4 元素に関しては 10 分以内に抽出平衡に達することが明らかとなった。In(III)、V(III)共に、抽出に最適な塩酸濃度が 6 M であるため、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]の溶解反応などにより、平衡到達時間の推定は困難であった。

Fig.3 及び Fig.4 の結果を踏まえると、総じて 10 分以内で抽出反応が平衡に達することが明らかとなった。また、V(III)や In(III)は一次関数的な抽出分率の増大傾向が示され、平衡を確認することは困難であった。抽出最適塩酸濃度が 6 M の金属は他にも Fe(III)があるが、こちらは迅速な抽出平衡を確認し、溶解も殆ど見られなかった。このことから、V(III)や In(III)をアニオン種とするイオン液体は、疎水性が弱いことが予想される。

### 3.4 [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]に抽出された金属イオンの電気化学挙動の検討

イオン液体の特長として、高導電性であることが挙げられる。筆者らはこの特長を活かし、金属イオンが抽出されたイオン液体を電解還元し、電析により直接金属として回収するプロセスの構築を目指している。そこで本試験では、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]に抽出された金属イオンの電気化学挙動についてサイクリックボルタンメトリー (CV) により検討した。まず [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]の電位窓を確認した。Fig.5 に [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]のサイクリックボルタモグラムを示す。

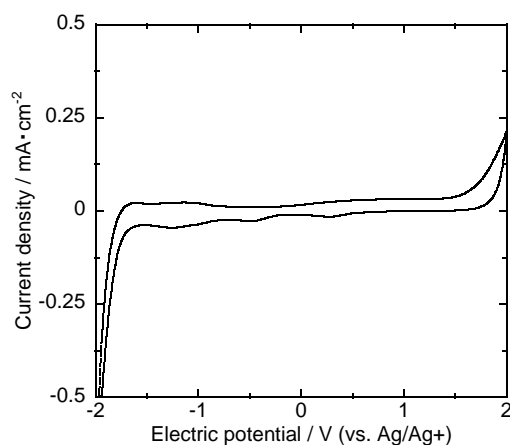


Fig.5 [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]のサイクリックボルタモグラム

Fig.5 のサイクリックボルタモグラムから明らかなように、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]は幅広い電位窓を持つことが改めて確認され、およそ 2 ~ -2 V の電位窓を持つことが示された。これにより、イオン液体中における金属の価数変化や電析が期待できるものと考えた。また、全体を通してフラットな電流-電位曲線であり、不純物などの影響も僅かであることが示され、イオン液体中での金属の価数変化が良好に観測される可能性が示唆された。

次いで Fe(III)が抽出された[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]の CV を行った。Fig.6 に Fe(III)を抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]のサイクリックボルタモグラムを示す。Fe(III)は 6 M 塩酸において抽出試験を行ったものを用いて CV を行った。

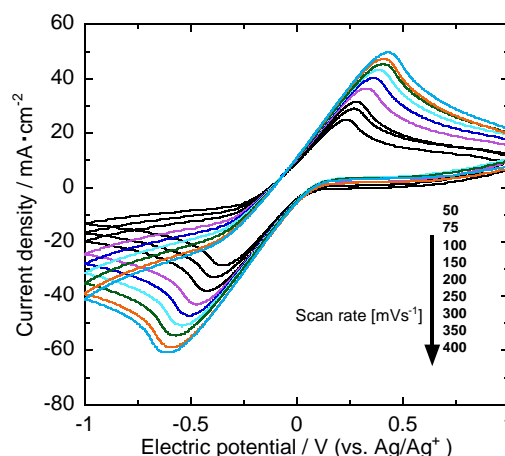
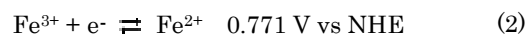


Fig.6 Fe(III)を抽出した[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]のサイクリックボルタモグラム

Fig.6 より、-0.6 V 近傍に還元波、0.3 V 近傍において顕著な酸化波が確認された。[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]中において明確な酸化還元反応が確認され、準可逆反応であることが示された。酸化還元反応としては式(2)、(3)の反応が挙げられる。





また、掃引速度の増大に伴う酸化還元波の掃引方向へのシフトが確認された。これは [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] 内において拡散律速の状態であることを示している。また、塩酸による影響は殆ど見られないことが明らかとなった。これは Fe(III) を抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] が塩酸に対して溶解性を示さなかったことに由来すると考えられる。

Fe(III) が抽出された [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] の CV より、イオン液体中において金属イオンの原子価が変化することが明らかとなった。この試験結果からイオン液体に抽出された金属を電析により直接回収できることが示唆された。

先述の試験結果から本試験では、電析による直接回収の可能性がある Pd(II) の CV を行った。Fig.7 に Pd(II) を抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] のサイクリックボルタモグラムを示す。Pd(II) は 0.1 M 塩酸において抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] を CV に用いた。

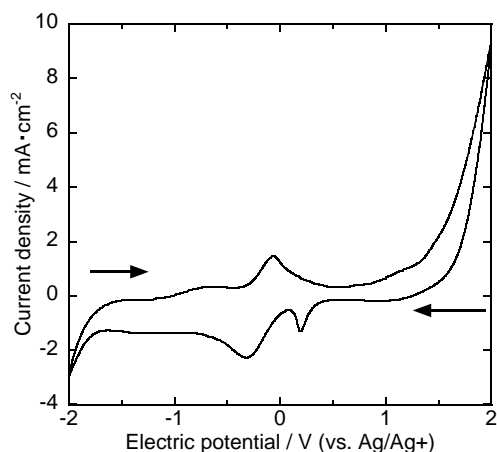
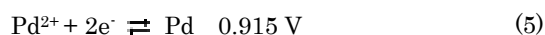
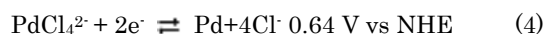


Fig.7 Pd(II) を抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] のサイクリックボルタモグラム

Fig.7 より Pd(II) 抽出後のサイクリックボルタモグラムは非可逆を示し、幾つかのピークが確認され、Pd(II) の還元波と考えられる

ピークが -0.5 V 付近に観察された。また酸化波が 0 V 近傍に観察された。[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] 中で誘起すると考えられる Pd(II) の酸化還元反応を式(4)~(6)示す



また非可逆性を示していることから、CV 測定中に析出物が生成されている可能性が示された。また繰り返し試験を行った結果、CV に用いた [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] から黒色の析出物を確認した。これはパラジウムブラックの可能性が考えられ、電析試験により Pd(II) が回収される可能性が示唆された。

### 3.4 [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] に抽出された Pd(II) の電析挙動の検討

先述の電気化学試験より、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] に抽出された Pd(II) は、電解還元反応により直接回収できる可能性が示唆された。そこで本試験では、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] に抽出された Pd(II) の電析挙動について検討した。Fig.8 に Pd(II) を抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] の電析試験中の外観写真を示す。



Fig.8 Pd(II) を抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] の電析試験中の外観

Fig.8 から明らかなように、試験の結果、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] 中に黒色の電析物の生成が確

認められた。この黒色析出物の同定を行うため、蛍光 X 線と SEM-EDX による分析を行った。両分析装置とも溶液を測定することは困難であるため、メンブレンフィルターを用いてろ過、回収して分析に資した。Fig.9 に蛍光 X 線スペクトルを示す。

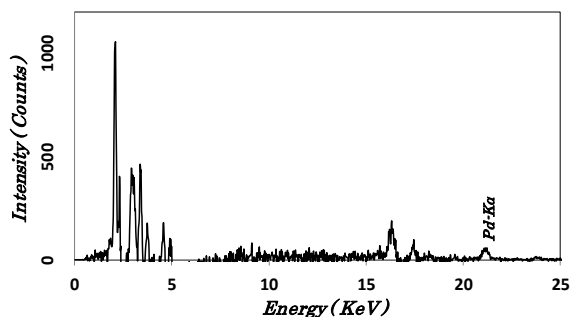


Fig.9 電析物の蛍光 X 線スペクトル

Fig.9 より濾紙を分析した結果、僅かながら Pd の存在が確認され、析出物に Pd が含まれることは明らかとなった。強度の弱さは、フィルター上の Pd が密集していないことに起因するものと考えられる。そこで SEM-EDX により電析物の同定を行った。Fig.9 に SEM-EDX による電析物の分析結果を示す。

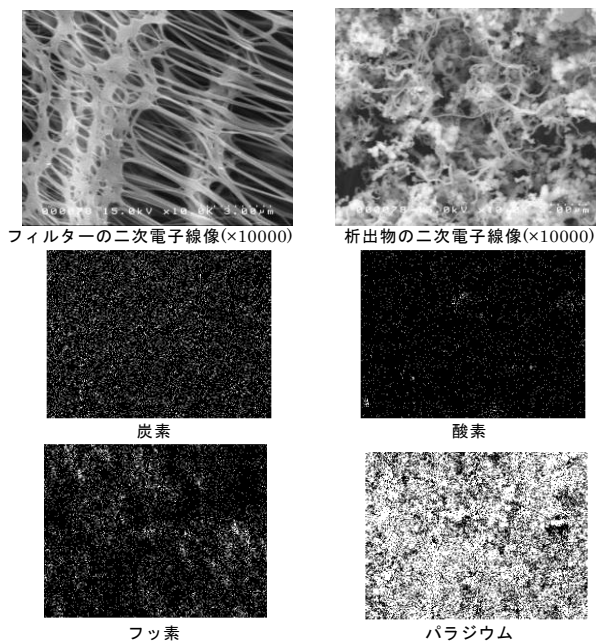


Fig.9 SEM-EDX による電析物の定性結果

Fig.9 の SEM 像より、電析物は微小な球状物質の集合体とヒューム状の混在した状態であることが示された。ヒューム状の析出物が得られたのは、通電域に沿って析出したためと考えられる。正負のイオンから構成されるイオン液体は、電場の中で配向性を示すものと考えられ、これが通電帯となりヒューム状の析出物が得られたものと推察される。また、EDX の測定結果から、検出された炭素やフッ素はメンブレンフィルターの組成を反映したものであると考えられる。酸素は微量ながら観測され、Pd に関しては観測範囲全体において検出された。即ち、電析物は Pd 単体である可能性が示された。

本試験結果より [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] に抽出された Pd(II) は、電解還元により Pd 単体として回収可能であることが示された。

#### 4. 今後の計画及び学会論文等投稿・発表状況

今後の計画  
 今後は、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] の側鎖を変化させ、金属イオンの抽出並びに電析特性について調査し、新たな精錬プロセスを提案する。本成果は資源素材学会等の学術誌への投稿を検討している。

#### 論文, 学会発表

1. 新井剛、剣持達也、十時一晃 “イオン液体を用いた都市鉱山からの有用金属の分離・回収技術の開発” 化学工業、Vol.64, No.1 (2013), p.148-156
2. 北義弘、新井剛、十時一晃、“廃棄物の減

容化を目指した都市鉱山からのイオン液体による有用資源の直接回収技術の創生”、平成26年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、(2014)

3. 北義弘、十時一晃、新井剛、“[C<sub>n</sub>mim][PF<sub>6</sub>]

を用いた複合反応系による塩酸水溶液中からのPdの直接回収に関する基礎研究”、エコデザイン学会/NPOエコデザイン推進機構「エコデザイン・プロダクツ&サービスシンポジウム」、(2014)

(5) 平成 27 年度

# セレン還元細菌を用いたセレン回収技術開発

芝浦工業大学工学部応用化学科 山下 光雄

## 1. 序論

セレン (Se) は、原子番号 34、原子量 78.96 の非金属材料であり、地殻存在量は 0.05mg/L (ppm) とされている。セレンは化学的に硫黄と似ており、生物作用を受けやすく、土壌中のセレン濃度は地域により明確な差がある。Se は、工業的にも重要な金属資源で、コピー機やガラス染色、半導体原料などに利用されており、工場などから水系に放出されている。生物にとっても必須微量元素であり、体内でセレン含有アミノ酸の合成に利用される。一方で、水中での存在形態であるオキソアニオン (酸化物イオン) のセレン酸塩 ( $\text{SeO}_4^{2-}:\text{Se(VI)}$ ) や亜セレン酸 ( $\text{SeO}_3^{2-}:\text{Se(IV)}$ ) は、生物に対して慢性・急性の毒性を有することから、排出基準が厳しく定められており、環境中に排出する際には 0.1ppm 以下まで浄化することが義務付けられている。現在は電気還元、化学還元や凝集沈殿・吸着剤法にて浄化が行われている。大量の化学薬品の使用や廃棄物が排出されることなどために高コストであり、また、廃棄物量に含まれる Se 含量が低いことから Se を資源として回収する事は難しい。現状の物理化学的 Se 含有排水処理技術の有するエネルギー・資源の大量消費、高コストなどの問題点を解決する新たな処理方法として、排水中に存在する Se オキソアニオンを微生物により還元し、無毒・固形の元素態セレン (Se (0)) に変換する方法が考えられる。

Se オキソアニオンを還元する微生物としては、これまでに *Bacillus selenatarsenatis* SF-1 株が分離されている<sup>1)</sup>。SF-I 株は嫌気条件下においてセレン酸の還元を行い、元素態セレンを細胞内に蓄積する。しかし、工業的利用を考えた場合、操作的な面や菌体の増殖といった面で嫌気条件下では扱いにくい。そこで、新たに好氣的条件下においてセレン酸を還元することができる *Pseudomonas stutzeri* NT- I 株が分離された<sup>2)</sup>。NT-I 株は、酸素

が存在する条件下でセレン酸を還元し元素態セレンを生成することができる新規なセレン酸塩還元細菌である。高いセレン酸還元能力を有し、高濃度の亜セレン酸還元が可能であるうえ、亜セレン酸から元素態セレンへの還元もスムーズであり、水溶性 Se 除去の効率は世界で最も高いと言える。生成した元素態セレンは、約 20 nm 径の微粒子として微生物の細胞外に赤色アモルファスの状態で蓄積される。このとき沈殿から回収される Se 濃度は添加量の約 70% 以上と非常に高く、排水からの Se 資源回収プロセスへと発展するポテンシャルを秘めている。

さらに NT-I 株はセレン酸の還元が進み元素態 Se が析出してきた後も、培養を続けると、今度は元素態 Se によって赤くなっていた培養液の色が消失し、培養液の気相においてメチル化した Se が検出された<sup>3)</sup>。つまり、この NT-I 株は、溶液中のセレン酸を固体の元素態 Se にするというミネラルイゼーションだけでなく、さらに固体の元素態 Se から気体のメチル化 Se にすることでボラタリゼーション(気化)を行っていることがわかった。気相中においては、夾雑物が少なく、培養汚泥に比べ、Se が非常に高い純度を持っている。これは、Se を回収するうえでは、非常に大きなメリットとなる。そこで、本報告書では、NT-I 株の将来的な実機スケールでのセレン回収技術開発を踏まえ、模擬排水から実廃水を用いて培養容量のスケールアップを計ると共に、バイオリクターシステムによるセレン酸及び亜セレン酸からの気化セレンへの還元最適条件を検討することを目的とした。

## 2. 研究計画

平成 23 年度は、セレンを含有する模擬排水を用いて、セレンを回収するための最適化条件を決定

した。平成 24 年度は、模擬排水を用いて決定した最適化条件を用いて、実排水に有効利用することを試みる。その上でセレンを固化または気化物として回収の最適化条件を決定した。平成 25 年度は、実排水だけでなく、実廃棄物またはその抽出溶液を用いて、セレンを固化物または気化物として回収を行う予定である。平成 26 年度は、レアアースエレメント代謝微生物を用いて、模擬排水や廃棄物からのレアアースエレメントを回収するためのリアクターの開発を行う予定である。最終年度の平成 27 年度は、開発したリアクターを用いてのバイオリーチングの最適化条件を検討し、レアアースエレメントを回収し、成功に導く予定である。

### 3. 計画の進行状況

#### 3. 1 実験材料及び方法

##### 3. 1. 1 菌株と培養条件

本研究では *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株が用いられた<sup>2)</sup>。NT-I 株の培養には、Bacto™ Tryptic Soy Broth (TSB ; Becton-Dickinson, NJ, USA) 培地が使われた。セレン酸、亜セレン酸還元試験には、セレン酸、亜セレン酸のナトリウム塩 (ナカライテスク (株)) が用いられた。その他の試薬には、市販の特級品が用いられた。

##### 3. 1. 2 ジャーファーマンターを用いてのセレン酸・亜セレン酸還元試験

NT-I 株の一白金耳量を 100 ml 容バイアルに分注した 50 mL の TSB 培地に植種し、30°C、120rpm の条件に設定した回転振盪培養器で 24 時間培養した。この培養液を新しい 50 ml の TSB 培地を含む 100 ml 三角フラスコに 0.5 ml 添加し、再度 12 時間の前培養を行った。続いて、還元試験を行うために、遠心分離により菌体を回収し、回収した菌体を 0.9%塩化ナトリウム溶液により OD<sub>600</sub> が 1.0 になるように調整した。この溶液 30 ml の種菌は、任意の濃度のセレン酸もしくは亜セレン酸を含んだ TSB 培地 3 L を分注した 5 L 容ジャーファーマンター (Bioneer-C500N 型 5L(S)、株式会社丸菱バイオエンジ) に添加され、培養された。培養液の温度、攪拌速度、pH はそれぞれ任意の値に保たれた。pH は 30%の NaOH 溶液、2 規定の HCl 溶液で調整された。溶存酸素 (DO) および pH は、それぞれ DO 電極 (OX-2500、株式会社丸菱バイ

オエンジ) と pH コンビネーション電極 (MPS-220、株式会社丸菱バイオエンジ) で測定された。経時的に培養液中のセレン酸、亜セレン酸、元素態セレン、および全水溶性セレンが定量された。セレン酸および亜セレン酸の還元速度 (mol/hr/cell) は、セレン酸または亜セレン酸の減少量が 1 時間当たりで最大になる速度 (mol/hr) を、光学密度から算出した菌体数 (cells) で割ることで算出された。

##### 3. 1. 3 固体セレンの回収

*Pseudomonas stutzeri* NT-I 株の培養には濃度 30 g/L の TSB 培地を用いた。本培養開始までは前述のように行った。滅菌処理後の TSB 培地に Se 終濃度が 5 mmol/L となるようにセレン酸ナトリウムを加えて模擬廃水とした。この模擬廃水に前培養液 30 ml を植菌し、培養温度 38 °C、pH 9.0、攪拌速度 250 rpm、通気量 1 L/min の条件で 48 時間培養した。模擬廃水中の Se(VI) は NT-I 株によって 12 時間後にはほぼ全て Se(IV) に還元され、さらに 48 時間後には約 90 % (wt · wt<sup>-1</sup>) の Se(VI) が Se(0) へと還元された。培養開始から 48 時間後に通気を止め、その後 24 時間培養を続けた。

培養終了後に 4 °C、8000 rpm、20 分間の遠心分離により沈殿物を回収した。沈殿物に純水 600 ml を加えて混合し、遠心分離を行う操作を繰り返して洗い洗浄した後、沈殿物に 70 % (wt · vol<sup>-1</sup>) エタノールを 600 ml 加えて混合し、4 °C、15000 rpm、20 分間の遠心分離により沈殿物を回収した。この沈殿物をバイオセレンとした。バイオセレンを定温乾燥器により 40 °C もしくは 60 °C で 24 時間以上保持して乾燥した。

##### 3. 1. 4 気体セレンの回収

気体セレンは硝酸にて捕集できることから<sup>4)</sup>、ジャーファーマンターからの排気はテフロンチューブ (内径 5 mm、外径 6 mm) を用いて、水蒸気による溶液量の変化を緩和するために空の 250 ml の試薬瓶を通してから、250 ml の試薬瓶に分注した 150 ml の濃硝酸を通過させた。テフロンチューブの先端にはエアーストーンを用いた。濃硝酸は経時的にサンプリングされ、濃硝酸中の元素は誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) (iCAP 6300 Duo、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用いて定性、定量分析された。



### 3. 1. 5 分析方法

培養菌体の細胞増殖は、分光光度計 (V-600、日本分光株式会社) を用いて、600 nm における光学密度 ( $OD_{600}$ ) から計算された。菌体密度は以下の式から計算された。菌体密度 (cells/ml) =  $OD_{600} \times 8.5 \times 10^8$  とし、この式は  $OD_{600}$  の値とカウンティングチャンバーを用いて位相差顕微鏡 (DM1000、ライカマイクロシステムズ株式会社) による細胞直接計測によって決定された。培養液の 2 mL を遠心分離 (15,000×g、5 min、室温) して固液分離し、得られた上清を 0.2  $\mu$ m のフィルター (ステラディスク 13、クラボウ) でろ過したものをサンプルとした。サンプル中のセレン酸および亜セレン酸イオンは、イオンクロマトグラフィー (ダイオネクス社、ICS-1100、検出器 DS6 HEATED CONDUCTIVITY CELL、カラム IonPac AS12A、ガードカラム AG12A、サプレッサー ASRS300、溶解液 3.0 mM  $Na_2CO_3$ 、流速 1.5 ml/min) で定性・定量した。また、同サンプルの溶液は、ICP-AES (iCAP 6300 Duo) を用いて、全水溶性セレンを定量された。沈澱物には超純水 2 ml を加え、ボルテックスにより混合した後、遠心分離 (15,000×g、5 min、室温) により沈殿を回収した。2 回繰り返す、洗浄作業を行った後、沈澱試料に 1500  $\mu$ l の濃硝酸と 50  $\mu$ l の濃硫酸を添加し、ボルテックスにより混合し沈澱物を溶解させた。溶解液は遠心分離 (15,000×g、5 min、室温) を行い、上清と沈澱物に分離した。上清は 10 ml メスフラスコに分取された。沈澱物を再度同条件で溶解操作を行い、得られた上清は、同じメスフラスコに分取された。10 ml メスフラスコに超純水を標線まで足し、定容したものを測定試料とした。測定試料は ICP-AES で定量され、セレンの値は元素態セレンとした。気体トラップの濃硝酸中の元素は ICP/AES で測定し、硝酸中の全存在元素と濃度を求めた。

排気の定性分析は、ガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS) (FocusGC DSQ II、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、横浜) により行われた。GC カラムには DB-624 を用いた。カラムの長さは 30 m、I.D. は 0.250 mm である。測定はスプリットレスモードで行われた。スプリットバルブは注入 1 分後に開かれた。ヘリウムガスの流量は 1.0 ml/min とした。昇温プログラムは 40°C を 5 分間保持し、10°C/min の速度で 240°C まで昇温させ、240°C で 1.5 分間保持させる条件に設

定された。GC の注入口および GC と MS をつなぐラインは 200°C に保たれた。イオン化は 220°C のイオン源によって、ポジティブイオンモードで行われた。試料は 250  $\mu$ l シリンジを用いて 250  $\mu$ l 注入された。すべて測定は 3 回行い、平均値が算出された。

### 3. 2 結果及び考察

#### 3. 2. 1 模擬排水を用いた気化セレン回収

完全培地にセレン酸を終濃度  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $0.004\% \text{ wt} \cdot \text{wt}^{-1}$ ) となるように添加したモデル廃水を用いた場合のセレン回収試験の結果を示す (図 1)。

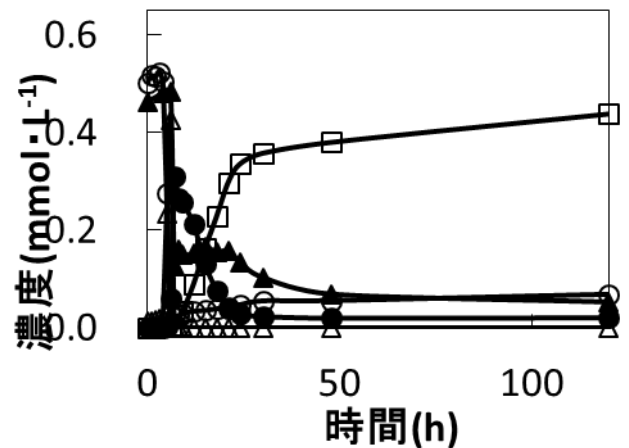


図 1 模擬排水を用いたセレン気化回収試験 ○: セレン酸, △: 亜セレン酸, ▲: 可溶性セレン, ●: 元素態セレン, □: 気化セレン.

ジャーファーマンターを用いて NT-I 株のセレン酸化物イオン還元最適培養条件を求めた。その結果、還元最適培養条件を温度 38°C、pH9.0、攪拌速度 250rpm、通気量 1L/min と決定した。この培養条件でのセレン気化速度を計算したところ  $14 \mu \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  であった<sup>3)</sup>。NT-I 株の気化速度は既存の報告値よりも速いことがわかった<sup>5) - 8)</sup>。この培養条件でのセレン回収試験を NT-I 株のセレン気化回収方法とした。

セレン酸濃度  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  の模擬排水を用いてセレン気化回収試験を行った。セレン酸、亜セレン酸、可溶性セレン、元素態セレン、気化セレンの経時変化を図 1 に示した。表 1 に回収時の可溶

性セレン、固化セレン、気化セレンの濃度と初期濃度と比較した割合 (%) ( $\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) を示した。NT-I 株によって培養開始から 6 時間で初期セレン濃度のほぼ 100% のセレン酸が亜セレン酸に還元され、7 時間目には約 95% の亜セレン酸が元素態セレンに還元された。120 時間目には初期セレン濃度の 71.2% の  $\text{DMDSe}$  を硝酸で回収することができた。この硝酸中のセレン濃度を測定した結果  $7.2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  であり、模擬排水中の初期セレン濃度  $0.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  よりも 14 倍濃縮して回収できた。硝酸中に検出できた夾雑物は硫黄  $12.5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  のみであり、硫黄以外の培地成分や菌体成分が含まれない高純度セレンの回収に成功した。

### 3. 2. 2 模擬排水を用いた固化セレン回収

気化回収条件で培養を行うと生産された元素態セレンは速やかにジメチルジセレニド ( $\text{DMDSe}$ ) に還元される。セレンを固化回収するために、我々は元素態セレンの還元を阻止できる培養条件を検討した。NT-I 株は菌体増殖後には通気が無い状態でも、攪拌することによってセレン酸から元素態セレンまで還元できる。そのまま通気を止めておくと元素態セレンの還元 (つまり減少) を抑制できることがわかった。以上の結果を利用してセレンの固化回収方法を考案した。培養温度  $38^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}9.0$ , 攪拌速度  $250\text{rpm}$ , 通気量  $1\text{L}/\text{min}$  の条件で培養して菌体を増殖させ、培養開始から 12 時間目に通気を止めた時点でセレン酸を添加し、元素態セレンに変換する方法をセレン固化回収方法とした。

図 2 にモデル廃水を用いたセレン固化回収実験での各セレンの経時変化を示した。培養開始 12 時間目にセレン酸を添加すると、13 時間目には初期添加濃度のほぼ 100% のセレン酸が亜セレン酸へ還元された。15 時間目までに初期添加濃度の約 90% の亜セレン酸が元素態セレンに還元された。そして 22 時間目に元素態セレン量が最大となった。初期セレン濃度の 87.8% にあたる元素態セレンを汚泥として回収できた (表 1)。

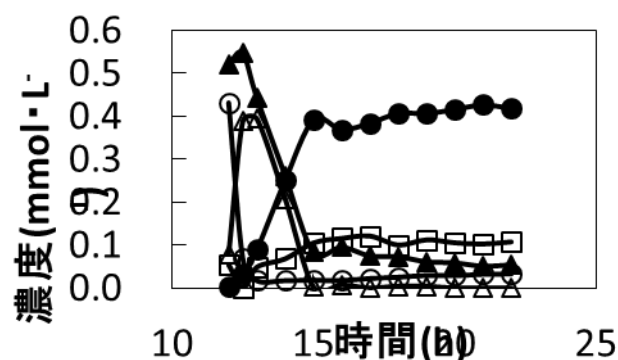


図 2 模擬排水を用いたセレン固化回収試験 ○: セレン酸, △: 亜セレン酸, ▲: 可溶性セレン, ●: 元素態セレン, □: 気化セレン.

汚泥を粗精製した後、誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) で構成元素の定量分析を行った。測定の結果、粗精製物にはセレンが  $2\% (\text{wt} \cdot \text{wt}^{-1})$ 、マグネシウムが  $4\% (\text{wt} \cdot \text{wt}^{-1})$ 、カルシウムが  $2\% (\text{wt} \cdot \text{wt}^{-1})$  含まれていることがわかった。ICP-AES では測定ができない炭素、酸素、窒素等の低元素分析のためエネルギー分散型 X 線分析 (EDX) で半定量分析を行った。本研究で得られた粗精製物の電子顕微鏡写真 (図 3(A))、元素組成分析結果 (図 3(B)) と EDX 元素スペクトル (図 3(C)) を示した。粗精製物全体にセレンが検出され、特に白い部分にセレンが濃縮されていた (図 3(A))。EDX の分析結果も ICP-AES の分析結果と一致しており、粗精製物には平均  $2\% (\text{wt} \cdot \text{wt}^{-1})$  のセレンが含まれていた。モデル廃水の初期セレン濃度は  $0.004\% (\text{wt} \cdot \text{wt}^{-1})$  であるので、粗精製物は約 500 倍に濃縮した粗精製セレンであり、資源化の可能性が示唆された。固化回収は気化回収と比較して培養開始から回収までの時間が短く、セレンの濃縮倍率も高い。既存の報告では水溶液からセレンを浄化・除去することを目的としており<sup>9) -13)</sup>、資源化の報告は未だない。我々は模擬排水からセレンを含む汚泥を回収し、セレンが  $2\% (\text{wt} \cdot \text{wt}^{-1})$  含まれる粗精製セレンの獲得に初めて成功した。

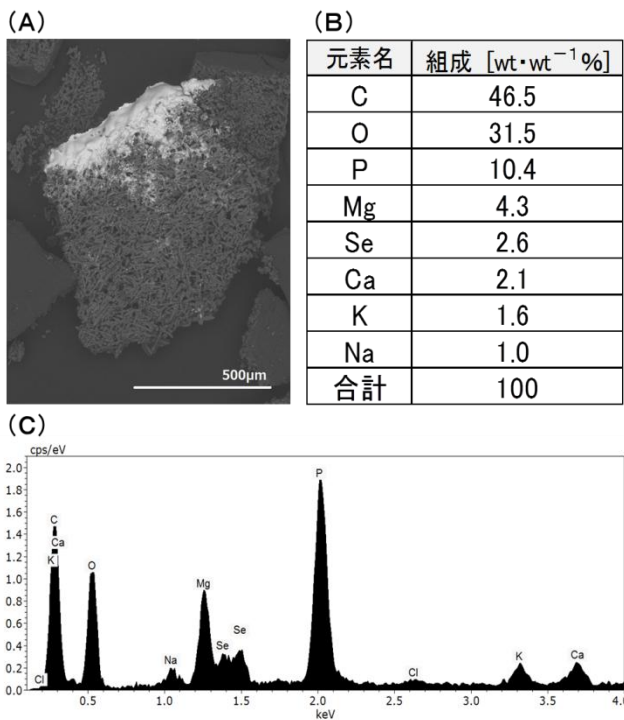


図3 粗精錬セレンの電子顕微鏡写真 (A)、元素組成分析 (B) と EDX 分析スペクトル (C) .

### 3. 2. 3 実廃水を用いた気化セレン回収

模擬排水を用いた実験では気化回収で初期セレン酸濃度の 71.2%、固化回収で 87.8% を回収できた。気化回収での回収率が固化回収より低い理由は、硝酸による DMDSe の捕集効率(81%)を考慮していないからである<sup>4)</sup>。捕集効率を計算にいと、気化回収率は 87.9% となり、回収率は固化回収とほぼ同じになる。

次にセレン含有実廃水からのセレン気化回収、固化回収実験の結果を紹介する。可溶性セレンを  $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  含む実廃水の提供を受けた。イオンクロマトグラフィーで定性定量分析を行ったところ、セレン酸が約 85%、亜セレン酸が約 15% の割合で混在していた。セレン以外にもケイ素やカルシウム、カリウムが含まれていた。実廃水を培地で希釈して、模擬排水のセレン濃度に合わせて回収試験を行った。

実廃水を用いた気化回収試験での各セレンの経時変化を図 4 に示した。培養開始から 120 時間で初期セレン濃度の 38.9% にあたる DMDSe を硝酸に回収することに成功した。モデル廃水での回収率 71.2% と比較すると、実廃水での回収率は約半分まで減少した。セレン酸や亜セレン酸の還元はモデル廃水と同様に、12 時間で元素態セレンに

還元した。120 時間目の元素態セレン量は 3.8% であり、モデル廃水の 4.0% と同等であった (表 1)。培養 120 時間目の可溶性セレンの割合はモデル廃水の 10.5% に比べて実排水では 35.9% となっている。可溶性セレン中のセレン酸と亜セレン酸濃度は各々 5% であるので、未知セレンが培養液中に 25.9% 含まれていた。分析の結果、未知セレンは主に DMDSe であった。

以上の結果から、実廃水を用いた時の気体回収率の低下は DMDSe が可溶性セレンとして残存していることが原因だと考えられる。回収時に可溶性セレンに含まれる DMDSe が全て気体として硝酸で回収できたと仮定すると、気化回収率は初期セレン濃度の 64.8% (気体回収率 38.9% + 可溶性セレンに含まれる DMDSe 含量 25.9%) となる。これはモデル廃水を用いた時と同等の回収率である。DMDSe が培養液中に残存する要因は検討中であるが、モデル廃水には存在しない元素等に起因していると考えられる。この要因を取り除くことで、NT-I 株によるセレン気化回収の回収率が高くなる可能性がある。

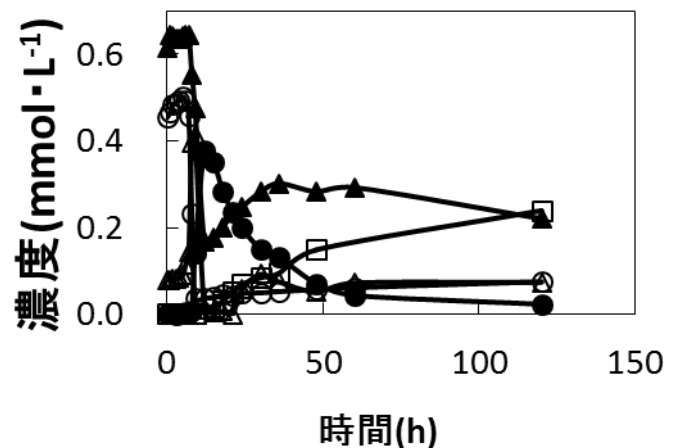


図4 実廃水を用いたセレン気化回収試験

○：セレン酸，△：亜セレン酸，▲：可溶性セレン，●：元素態セレン，□：気化セレン。

### 3. 2. 4 実廃水を用いた固化セレン回収

実廃水を用いた固化回収試験の各セレンの経時変化を図 5 に示した。培養開始から 24 時間で初期セレン濃度の 78.8% を元素態セレンとして回収することに成功した。モデル廃水では 22 時間で 87.7% の回収率が得られている。モデル廃水と比較すると回収率が若干低下したものの、実廃水を用いても高い回収率が得られた。

実廃水では培養開始から 24 時間目には、可溶性セレンが 8.6%存在している (表 1)。可溶性セレン、元素態セレン以外の 12.5%は NT-I 株が元素態セレンを還元して DMDSe を合成し、気化したものと考えられる。実廃水はセレン酸と亜セレン酸が混在しているので、各還元反応速度が異なり、単純に通気を止めるだけでは元素態セレンの還元を完全に抑制することができていない。セレン酸化物イオンの混合比によって培養条件を変える等の工夫が必要である。元素態セレンの還元を完全に阻止できれば、より高回収率で固化回収ができると考える。

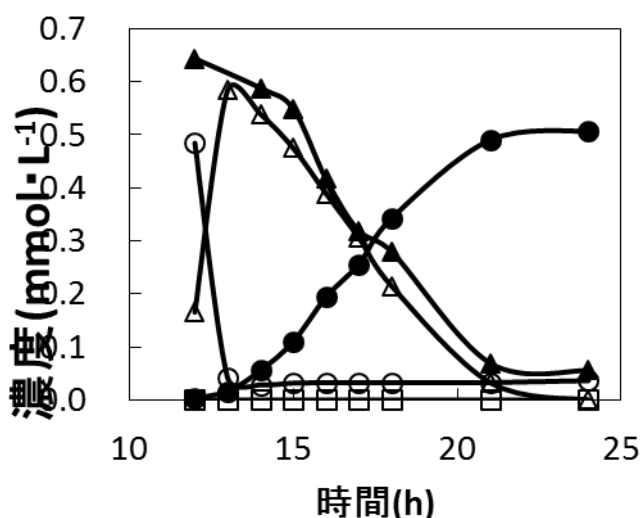


図 5 実廃水を用いたセレン固化回収試験  
○：セレン酸，△：亜セレン酸，▲：可溶性セレン，●：元素態セレン，□：気化セレン。

### 3. 2. 5 実廃水を用いたセレン回収まとめ

本稿では NT-I 株による実廃水を用いたセレンの気化、固化回収の結果を紹介した。セレン気化回収では模擬排水と比べると回収率は低かったが、回収率を向上できる可能性がある。セレン固化回収では高回収率でセレン汚泥を回収できた (表 1)。

セレン気化回収では培養終了までの時間は長い、夾雑物の少ないセレンを単位プロセスで回収することができる。セレン固化回収では培養終了までの時間は短い、回収した汚泥には微生物由来の夾雑物が含まれる。このため高純度セレンを精錬するには汚泥からの別工程が必要となる。

浄化回収ニーズに見合った 2 種類の回収方法 (気化回収・固化回収) を選択できるのが NT-I 株を利用したセレン回収の特徴である。

表 1 セレン回収時における可溶性セレン、元素態セレン、気化セレンのマスバランス。

サンプル	培養条件	可溶性セレン		元素態セレン		気化セレン		合計	
		mmol・L <sup>-1</sup>	%	mmol・L <sup>-1</sup>	%	mmol・L <sup>-1</sup>	%	mmol・L <sup>-1</sup>	%
モデル廃水	気化回収条件*1	0.05	10.5	0.02	4.0	0.36	71.2	0.43	85.8
モデル廃水	固化回収条件*2	0.04	8.7	0.44	87.8	N.D.	N.D.	0.48	96.0
実廃水	気化回収条件*1	0.22	35.9	0.02	3.8	0.24	38.9	0.48	78.6
実廃水	固化回収条件*3	0.06	8.6	0.51	78.8	N.D.	N.D.	0.56	87.5

\*1 38℃, pH9.0, 1 L/min, 250rpm, 120時間目に回収

\*2 38℃, pH9.0, 0 L/min, 250rpm, 22時間目に回収

\*3 38℃, pH9.0, 0 L/min, 250rpm, 24時間目に回収

N.D.: Not determined

### 3. 2. 6 酸化焙焼による精錬プロセス

バイオセレンは元素態セレンと微生物由来の有機成分、培地由来の無機塩から構成される。バイオセレンを酸化焙焼に供すると有機成分とともに Se は酸化揮発し、低温部にて焙焼ガスから二酸化セレン (SeO<sub>2</sub>) を析出分離できると考えられる。また、酸化揮発傾向や焙焼生成物の水溶性や還元性の相違から、無機成分の低減も期待できる。一方で、有機成分と Se は競合酸化し、Se の酸化が不十分な場合には水に不溶な元素態セレンが析出することが予想される。そこで、熱力学計算によってバイオセレンの焙焼条件を検討し、バイオセレンの酸化焙焼を試みた。その結果、バイオセレンを 700℃で酸化焙焼したところ、酸素量が大きい場合には Se は十分に酸化され、固体の SeO<sub>2</sub> が得られた。本実験では、酸素 50ml/min の流量で焙焼した際に、Se の総収量のうちの SeO<sub>2</sub> としての収率が最大 97%となった。析出した SeO<sub>2</sub> は金属成分の総和に対する Se 分率が約 99%であり、酸化焙焼による精製効果が認められた。酸化焙焼によって得られた金属 Se を亜硫酸ソーダやアスコルビン酸によって化学還元して得られた非晶質 Se を酸溶解し、バイオセレンの構成元素を定量分析した。Se 含有率は 99.9%以上であり、Ca, K, Na, S を極微量(0.1%以下)検出したのみであった。

以上のことから、バイオセレンを酸化焙焼に供し、生成 SeO<sub>2</sub> を溶解して化学還元することで、Se 含有率 99%以上の Se(0)を得られることが分かった。

### 3. 2. 7 テルル酸代謝微生物の取得

テルルはセレンと同周期にある半金属である。テルルの主要用途は、鉄の機械加工性を向上させるための冶金用添加剤、加硫剤およびゴム生成の促進剤、合成繊維生産用の触媒として使用される。機能的用途としては近年、Cd-Te 系太陽電池への使用が増加している。テルルも工業的に幅広い用途で使用されるが、セレンと同様に生体に対する高い毒性を有しており、環境省によって水質汚濁防止法の要調査項目に指定されている。高毒性や近年の使用量の増加から、その処理と再資源化方法の確立が急務であるといえる。

テルル酸化物陰イオン(テルル酸, 亜テルル酸)は毒性が高く、亜テルル酸は 3.9  $\mu\text{M}$  の低濃度でほとんどの微生物に対して毒性を示す。一般的に金属の固体や揮発化物はその酸化物陰イオンよりも毒性が小さいため、その固体化・揮発化反応は解毒メカニズムの一種であると考えられている。亜テルル酸に耐性のある微生物を選択すれば、亜テルル酸の固体化・揮発化能を持つ微生物を取得できる可能性が高いと考えた。そこでテルルの浄化・回収プロセスを構築するため、金属精錬工場から採取した排水溝底泥水から亜テルル酸耐性微生物を分離し、固体化・揮発化能力を有しているかを調べた。その結果、1mM の亜テルル酸に対して耐性を示す集積培養系から、亜テルル酸耐性を有する細菌 Ti-1 株、Ti-2 株、Ti-3 株を分離することに成功した。分離した Ti-1 株、Ti-2 株、Ti-3 株は、30mM の亜テルル酸存在下で増殖可能なことから、これまで報告されている微生物の中で最も高い亜テルル酸耐性を有することを明らかにした。またこれら 3 株はテルル酸, 亜テルル酸に対して還強い還元能を示した。同定した結果、これら 3 株を *Stenotrophomonas maltophilia* Ti-1、*Ochrobactrum anthropi* Ti-2、*Ochrobactrum anthropi* Ti-3 と命名した。次にテルル酸還元細菌 3 株の還元特徴を解析した。Ti-2,3 はテルル酸還元能に差はなかったが、Ti-1 株はこの 2 株に比べて低温、低 pH、高塩濃度での還元能が優れていた。合成された元素態テルルは細胞外に分泌され、遠心分離や限外濾過などの方法で簡単に回収ことに成功した。

また浄化・回収対象となる廃水・廃棄物は多元素で高塩濃度であることが多いので、塩耐性を持つ新たなテルル酸・亜テルル酸還元微生物を海洋

環境試料から分離することを試みた。その結果、初発濃度の 50%以上を溶液から取り除くことができる微生物を 18 株分離した。それらの細菌は多様な分類系統で 9 属に分類できた。その内 6 属はこれまでテルル酸化物の還元が報告されていない新しい菌株であった。

### 3. 2. 8 レアアースエレメント(REE)代謝微生物の取得

REE とは、周期表第三族の原子番号 21 番のスカンジウム (Sc) 及び 39 番のイットリウム (Y) と、57 番から 71 番のランタノイドと総称される 15 元素の元素グループのことをいう。REE は、特殊な電子軌道の原子構造をしており、蛍光材料や永久磁石、超伝導材料として日本の産業にとって必須金属である。特に、ジスプロシウム (Dy) は、耐熱性ネオジム (Nd) 磁石と呼ばれる高温に耐える強力磁石の原料としてその需要が増加している。この Nd 磁石は、モーターとして次世代型自動車や携帯電話、パソコンに利用されており、その製造工程から排出される研磨屑は、物理化学的処理によるリサイクルが試みられているが、この方法では完全に回収することが出来ず、その廃棄物中の残存 REE の回収が望まれている。そこで、固形廃棄物から選択的に REE 抽出を行う微生物の取得と REE 含有溶液から特異的に REE を分離・濃縮する新規代謝微生物の分離を行い、バイオプロセス構築に向けて検討した。

バイオリーチングは低品位鉱石から微生物を用いて銅などの有用非鉄金属を抽出する技術である。現在ではバイオリーチングの応用研究が進み、ウランやコバルト、金などの抽出にも利用されている。本研究では REE リーチング微生物を分離することを主とし、その REE リーチング能を評価して REE 回収に向けた有用性を検討した。実験の結果、酸性湖の環境試料から REE 抽出微生物群を 3 菌群得た。このうち S20 菌群は、培養 1 日目で REE 含有廃棄物から Dy を約 70%、Nd を約 55%、Pr を約 65%抽出し、Fe をほとんど溶出しなかった。

有用金属の濃縮・回収手段として、金属代謝微生物によるバイオミネラリゼーションは広く研究されている。代表的な例として、金属イオン還元菌 *Shewanella algae* を利用した Pd, Pt, Au 等の貴金属回収があげられる。そこで、REE の中でもジスプロシウム (Dy) に重点をおき、Dy 含有溶

液から特異的に Dy を固化・濃縮する新規代謝微生物を分離して、その固化・濃縮能を評価して REE 回収に向けた有用性を検討した。その結果、廃鉱山の環境試料から Dy 代謝能をもつ微生物 T9 株を単離した。SEM と EDX による元素分析から、菌体上に Dy とリン(P)を固化濃縮していることが分かった。以上の結果から、取得した Dy 代謝微生物 T9 株は高効率に Dy を濃縮する可能性があると思われる。T9 株を分子生物学的に同定したところ、*Penidiella* sp. T9 株と命名した。*Penidiella* 属はこれまで Dy を代謝した報告例がなかった。Dy を蓄積した T9 株を焙焼することにより酸化ジスプロシウムを得ることができ、一連のリサイクル系を構築できた。

### 3. 2. 9 バイオ鉱物合成微生物の取得

福島県原子力発電所の事故で問題となっている放射性核種は全てレアメタルに属する元素であり、それらの核種（コバルト (Co), ストロチウム (Sr), セシウム (Cs)) を浄化・回収対象とした新規なバイオ修復材料を開発し、社会貢献していくことを目指している。高塩濃度条件下では地下水で有効であるスメクタイト（粘土鉱物）などの吸着効率が非常に低下するため、Co や Sr は従来の吸着材料を用いることは困難である。そこで高塩濃度下で微生物が合成するバイオ鉱物に Co や Sr を取り込ませて固化し浄化・回収することを目的とした。海水試料からカルサイト（炭酸カルシウム）を生成する菌種を探索したところ *Bacillus* sp. TK2d 株を単離した。この微生物は 1 mM の Sr を 5 日間で約 99.3% 培養液から取り除く能力があった。

## 4. 参考文献

- 1) Fujita M *et al.*: Isolation and characterization of a novel selenate-reducing bacterium, *Bacillus* sp. SF-1. *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 517-522, 1997.
- 2) Kuroda, M. *et al.*: Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. *J. Biosci. Bioeng.*, **112**(3), 259-264, 2011.
- 3) Kagami, T. *et al.*: Selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. *Water Research*, **47**, 1361-1368, 2013.
- 4) Lenny W. *et al.*: Quantitative and qualitative trapping of volatile methylated selenium species entrained through nitric acid. *Environ. Sci. Technol.*, **44**(1), 382-387, 2010.
- 5) de Souza, M.P., Amini, A., Dojka, M.A., Pickering, I.J., Dawson, S.C., Pace, N.R., and Terry, N.: Identification and characterization of bacteria in a selenium contaminated hypersaline evaporation pond. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3785-3794, 2001.
- 6) Doran, J.W. and Alexander, M.: Microbial transformations of selenium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 31-37, 1977.
- 7) Fleming, R.W. and Alexander, M.: Dimethylselenide and dimethyltelluride formation by a strain of *Penicillium*. *Appl. Microbiol.*, **24**, 424-429, 1972.
- 8) Saudi, M. R., Ghazvini, P.T.M., Khajeh, K. and Gharavi, S.: Bioprocessing of seleno-oxyanions and tellurite in a novel *Bacillus* sp. strain STG-83: A solution to removal of toxic oxyanions in presence of nitrate. *J. Hazard. Mater.*, **165**, 71-77, 2009.
- 9) Hageman, S.P., van der Weijden, R.D., Weijma, J. and Buisman, C.J.: Microbiological selenate to selenite conversion for selenium removal. *Water Res.*, **47**, 2118-2128, 2013.
- 10) Cantafio, A.W., Hagen, K.D., Lewis, G.E., Bledsoe, T.L., Nunan, K.M. and Macy, J.M.: Pilot-scale selenium bioremediation of San Joaquin drainage water with *Thauera-selenatis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3298-3303, 1996.
- 11) Lenza M., Van Hullebusch, E.D., Hommes, G., Corvinic, P.F.X. and Lens, P.N.L.: Selenate removal in methanogenic and sulfate-reducing upflow anaerobic sludge bed reactors. *Water Research.*, **42**, 2184-2194, 2008.
- 12) Lenz, M., Enright, A.M., O'Flaherty, V., van Aelst, A.C., and Lens, P.N.L.: Bioaugmentation of UASB reactors with immobilized *Sulfurospirillum barnesii* for simultaneous selenate and nitrate removal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83**, 377-388, 2009.
- 13) Lortie, L., Gould, W.D., Rajan, S., McCready, R.G., and Cheng, K.J.: Reduction of selenate and selenite to elemental selenium by a *Pseudomonas stutzeri* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**,

4042-4044, 1992.

#### 5. 学会論文等投稿・発表状況

1) Sirikan Maneesuwannarat, Alisa S. Vangnai, Mitsuo Yamashita, and Paitip Thiravetyan, Biobleaching of gallium from gallium arsenide by *Cellulosimicrobium funkei* and its application to semiconductor/electronic wastes. *Process Safety and Environment Protection*, 査読有. 99, 80-87, (2016).

2) Satoshi Soda, Ai Hasegawa, Masashi Kuroda, Akiko Hanada, Mitsuo Yamashita, and Michihiko Ike. Selenium recovery form kiln powder of cement manufacturing by chemical leaching and bioreduction. *Water Science and Technology*, 査読有. 72(8), 1294-1300, (2015).

3) 大塚治、築場豊、吉川健、山下光雄、酸化焙焼によるバイオセレンからのセレン分離の検討, 日本金属学会誌, 査読有. 79 (6), 330-337, (2015).

4) Takumi Horiike, and Mitsuo Yamashita, A new isolate, *Penidiella* sp. T9, accumulates the rare earth element dysprosium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 査読有. 81(9), 3062-3068, (2015).

5) Masashi Kuroda, Hiroyuki Ayano, Kazunari Sei, Mitsuo Yamashita, and Michihiko Ike, Draft Genome Sequence of *Bacillus selenatarsenatis* SF-1<sup>T</sup>, a promising agent for bioremediation of environments contaminated with selenium and arsenic. *Genome Announc.*, 査読有. 3(1), 1-2, (2015).

6) 大塚治、黒田真史、池道彦、山下光雄. *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株の Dimethyl diselenide 合成速度促進因子の探索 (日本農芸化

学会2016年度大会 (平成28年度)、札幌、3月27-30日)

7) 山下光雄. 微生物培養による廃水や廃棄物からのレアメタル回収技術 (2015年度第67回日本生物工学会大会、鹿児島、10月26-28日)

8) T. Ohnuki, N. Kozai, F. Sakamoto, T. Saito, Q. Yu, M. Yamashita, T. Horiike, S. Utsunomiya. Coprecipitation of radioactive strontium in sea water during formation of biogenic calcite. 15th International Conference on the Chemistry and Migration Behaviour of Actinides and Fission Products in the Geosphere. September 13-18, 2015, Santa Fe Community Convention Center, Santa Fe, NM, USA

9) Masashi Kuroda, Satoshi Soda, Michihiko Ike, and Mitsuo Yamashita. Selenium recovery from simulated wastewater using Selenium reducing bacteria *Pseudomonas stutzeri* NT-I. Osamu Otsuka, Hydroprocess 2015 (7<sup>th</sup> International Seminar on Process Hydrometallurgy. July 22-24, 2015, Antofagasta, Chile)

10) 堀池巧、大塚治、寺原猛、今田千秋、山下光雄. 海洋環境から分離した好気性テレル酸還元微生物の多様性. (マリンバイオテクノロジー学会2015年度大会 (平成27年度)、東京海洋大学、5月30日-31日)

11) 大塚治、築場豊、吉川健、山下光雄. セレン酸還元菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を用いた模擬廃水からのセレン再資源化. (廃棄物資源循環学会2014年度春の研究発表会 (平成27年度)、川崎、5月28日)

# セレン還元酵素を用いたセンサーの開発

芝浦工業大学工学部応用化学科

今林 慎一郎

## 1. 序論

セレンは化合物系太陽電池用の半導体など先端材料に使用されるレアメタルである。酸化数-2, 0, +4, +6のうち、毒性のあるセレン酸(+6)または亜セレン酸(+4)は工場排水などに含まれ、環境へ流出することが問題になっている。セレン酸還元菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I はこれまで報告されているセレン酸還元菌の中で最も高いセレンオキサニオン(セレン酸や亜セレン酸)の還元能をもつグラム陰性の好気性桿菌である。<sup>1)</sup>セレンオキサニオンを水に難溶で毒性の低い元素態セレンに還元できる NT-I の能力を活かして、工業排水中に含まれるセレンオキサニオンを除去、元素態セレンとして回収することが試みられている。<sup>2)</sup>

単離した酸化還元酵素や微生物に含まれる酵素による触媒反応を電極反応と共役させた酵素電極反応系は生物燃料電池やバイオセンサーなどに利用されている。<sup>3,4)</sup> セレン酸還元菌 NT-I を利用した酵素電極反応系が構築できれば、排水中のセレンオキサニオン濃度を簡便に定量できるセンサーや廃棄物から電気エネルギーを取り出す微生物燃料電池に展開できる可能性がある。

本研究は、セレン酸還元菌 NT-I(あるいは単離されたセレンオキサニオン還元酵素)を用いた酵素電極反応系の構築し、この反応系をベースにしたセレンオキサニオンセンサーを作

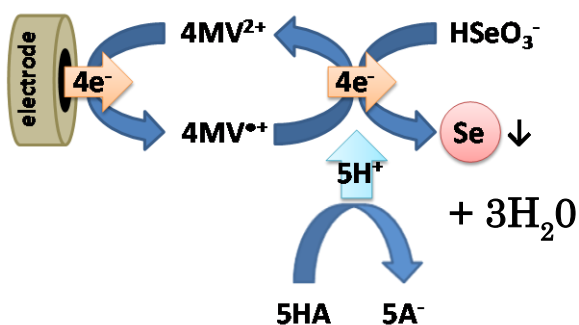
製することを目的としている。現時点では NT-I が有するセレンオキサニオン還元酵素は単離されていないため、平成 23,24 年度は NT-I のホールセルを酵素が入った袋と捉え、電極上へ滴下、乾燥、メンブレンフィルターで覆うことで電極上に固定化し、適当な酸化還元物質(メディエーター)を仲介させることで、セル中に含まれるセレンオキサニオン還元酵素と電極を電氣的につなぐこと(メディエーター型電子移動経路の構築)が可能かを検討した。メチルビオロゲン(MV)をメディエーターとして使用することで限られた条件下では NT-I を経由する亜セレン酸の還元のみを生起できることがわかった。しかし、菌体を経由しない MV による直接還元反応が相当量同時に起きるため、NT-I を経由する亜セレン酸の還元のみを定常的に起こすことはできなかった。亜セレン酸を直接還元する可能性がなく、電極から亜セレン酸へ効率の良く電子移動を仲介する物質は依然として見つけられていない。

上記セレンオキサニオンの直接還元反応は、亜セレン酸については強酸性条件でのみで起こることが、セレン酸については起こらないと報告されてきた。<sup>5)</sup> 上記のように、MV を添加すると、中性 pH 領域でもセレンオキサニオンの還元が可能になることを偶然発見し、種々の電気化学測定結果を基に、**図 1** に示す反応機構のように MV が電極からセ



レンオキサニオンへの電子移動を仲介していることがわかった。この MV 共存下のセレンオキサニオン還元反応をセレンオキサニオン除去・元素態セレン回収に展開することについて、可能性と課題を検討した結果を報告する。

図 1 MV をメディエーターとする亜セレン酸の還元反応機構



## 2. 研究計画

### 平成 26 年度

平成 25 年度に構築したセレン酸還元菌ホールセルを用いた酵素電極反応系を基に、セレンオキサニオンセンサーのプロトタイプを作製する。

### 平成 27 年度

平成 26 年度に作製したセレンオキサニオンセンサーの性能評価を行って実用上の問題点を明らかにすると同時に、これを解決するための方法などを検討する。さらに、可能ならば酵素電極反応系の他の応用展開について探索する。

## 3. 計画の進行状況

### (1) MV をメディエーターとする電極還元反応を用いるセレンオキサニオン除去、元素態セレン回収の可能性と課題

未処理の工業排液にオキサニオンが 10~0.1 mmol dm<sup>-3</sup> 含まれることを示す調査報告が

ある(未公開資料)。MV 共存下の電極還元反応を利用したセレンオキサニオンの除去、元素態セレン回収の効率がオキサニオンの初濃度によってどのように変化するかを検討した。1 mmol dm<sup>-3</sup> MV を含む 1 mol dm<sup>-3</sup> リン酸緩衝液 (PBS, pH 6.00) に適量の亜セレン酸あるいはセレン酸を加えた電解質 (77 mL) 中、カーボンフェルト (厚さ 3 mm, 直径 23 mm) を作用極、Ag|AgCl (飽和 KCl) を参照極、白金黒線を対極として電解還元を行った。電極で生成したカチオンラジカル (MV<sup>•+</sup>) がオキサニオンの還元で使用されず、電解質が青色に着色し始めた時点で電解を終了し、電解質中のセレン残量 (原子吸光あるいは ICP 測定によって定量) からセレン除去率を、析出したセレン量 (重量あるいは ICP 測定によって定量) からセレン回収率を、電解電気量と除去率から電流効率をそれぞれ計算した。

図 2 に示すように、電解質中の亜セレン酸初濃度が 10, 1.0 mmol dm<sup>-3</sup> の場合、メディエーター型電極還元反応を利用した電解によって電流効率 95% 以上で 99% 以上の亜セレン酸が除去でき、その大半が元素態セレンとして回収された。しかし、亜セレン酸が 0.1 mmol dm<sup>-3</sup> の場合、除去率は 94% に、回収率は 87%

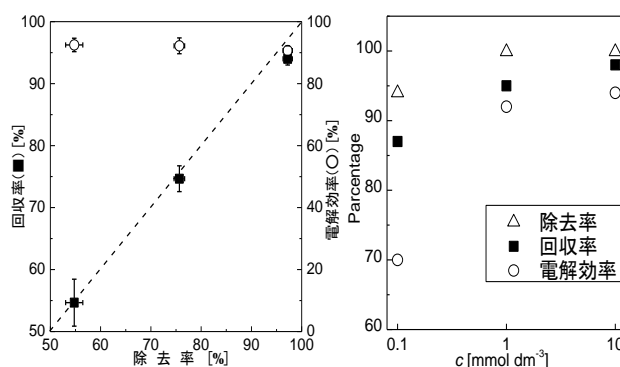


図 2 (左)10 mmol dm<sup>-3</sup> 亜セレン酸における除去率に対する回収率、電解効率、(右)各亜セレン酸濃度における除去率、回収率、電解効率

に減少し、電流効率も70%程度であった。これは、電解質着色までの電解では  $6 \mu\text{mol dm}^{-3}$  程度の亜セレン酸が残ることを反映している ( $(1 \times 10^{-4} - 6 \times 10^{-6}) \times 100 / 1 \times 10^{-4} = 94\%$ )。電流効率は低下するが、電解質着色後も電解を続ければ排出規制値 ( $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) 以下にできる。

$\text{MV}^{+}$ による亜セレン酸の還元は電極近傍の電解質中で起こるため、生成した元素態セレンは電極表面に析出せず、電解質に懸濁した状態で得られる。これは、元素態セレンをろ別によって回収できる利点につながる。これに対して、 $\text{MV}$ を添加しない場合は亜セレン酸の電解は可能であったが、2倍以上の電解時間を要し、かつ生成した元素態セレンの大半が回収に適さない電極上に析出した状態で得られた。

上記結果と下記①～③の実験結果から、メディアーター型電解還元反応による亜セレン酸から元素態セレンの回収は十分可能性があると結論された。

- ④ 電解質体積を13倍(1 L)に増やした場合、回収率は93%に、電流効率は72%に低下したが、除去率は99%以上で変わらなかった。
- ⑤ 電解質を除酸素しない場合、 $\text{MV}^{+}$ が溶存酸素で消費されるために電流効率が5～10%低下するものの、除去、回収率の大きな低下は認められなかった。
- ⑥ カーボンフェルト電極を繰り返して3回使用した場合(各回とも、亜セレン酸濃度は  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ )でも、除去率は99%以上を保った。回収率は増減があるものの、85%以上を維持した。

一方、セレン酸は初濃度が  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  のときの除去率および回収率がそれぞれ13%、10%であり、亜セレン酸と比べて除去、回収されにくい。電流効率は84%とそれほど低くないことから、 $\text{MV}^{+}$ によるセレン酸の還元効率が低いために電流が流れ難く、除去率、回収率が低くなったものと考えられる。しかし、 $\text{MV}$ を添加しない場合、セレン酸はほとんど還元が起らず、電気化学的にセレン酸が還元される例はほとんど報告がなく、本結果は興味深い。今後、電流効率の向上を検討したい。

## (2) 排液含有物質が $\text{MV}$ をメディアーターとする電極還元反応を妨害する可能性

(1)の検討は、所定濃度のセレンオキサニオン、 $\text{MV}$ を含む緩衝液というモデル系で行った。しかし、産業排液中にはセレンオキサニオン以外に多くの物質を含んでいる。その中には、 $\text{MV}$ によるセレンオキシアニオンのメディアーター型電極還元を妨害する物質が含まれている可能性がある。そこで、セレンを含む排水に対して実施した元素分析結果(非公開データ)を基に、妨害する可能性のある物質を電気化学測定によって推定した。

広義には標準電極電位が  $\text{MV}$  の還元開始電位 ( $-0.5 \text{ V vs. Ag|AgCl}$ ) よりもポジティブかつ酸化体である物質が妨害物質になり得る。排液の元素分析において  $10 \text{ ppm}$  以上含まれていた元素を抽出し、金属製造業や石炭火力発電所などの排水中に含まれる同じ元素を持つ物質と比較することで、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ を妨害物質と推定した。

$\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ については、これら物質を濃度  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  まで加えても、亜セレン酸共存および非共存下ともボルタモグラムに変化は見られなかったことから、 $\text{MV}$  のレドック

スを妨害する可能性は低い。しかし、 $\text{NO}_2^-$ は電極反応で生成する  $\text{MV}^{+}$ から亜セレン酸へ渡される電子を奪う妨害を起こす可能性あり、 $\text{Fe}^{2+}$ についてはその反応が電極表面で起こる  $\text{MV}$  の還元と競合する妨害が起こることが予想された。

そこで、 $1 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\text{MV}$  を含む  $1 \text{ mol dm}^{-3}$   $\text{PBS}$  ( $\text{pH} 6$ ) に  $\text{Fe}^{2+}$ あるいは  $\text{NO}_2^-$ を  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$  加えて、亜セレン酸の電解還元を行い、亜セレン酸の除去率、元素態セレンの回収率、電解の電流効率に対する影響を測定した。 $\text{NO}_2^-$ を加えた場合、亜セレン酸電解還元の電解効率は93%から90%に減少したが、亜セレン酸の除去率、元素態セレンの回収率とも大きく変化しなかった。 $\text{Fe}^{2+}$ の場合、電流効率は変化しなかったが、亜セレン酸の除去率が5%低下した。さらに、回収率が130%と増加し、これはICP分析から、元素態セレンにFe化合物が混入したためであることがわかった。Fe化合物は電極還元反応で生成したのではなく、 $\text{Fe}^{2+}$ が溶存酸素と反応して  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  が化学的に生成し、沈殿したことが疑われた。したがって、亜セレン酸の電極還元の前に酸素を吹き込むなどして除去することによって、影響を無くすことが可能と思われる。以上のように、メディエーター型電極還元反応を妨害する物質は現時点で確認できていない。

### (3) メディエーターを含む電解質を繰り返し利用可能にするための検討

現時点でメディエーター型電極還元反応を工業排水中に含まれるセレンオキシアニオンに対して適用するためには、電解質中にメディエーターである  $\text{MV}$  および緩衝剤を添加する必要がある。これは、経済的にも操作的にも好ましくない。そこで、他の物質、可能ならば繰り返

し利用できる代替物を検討した。

電極表面へ固定化した  $\text{MV}$  によって亜セレン酸の還元が可能ならば、排水毎に  $\text{MV}$  を添加する必要がなくなる。4, 4'-ビピリジニウム基を  $\text{Au-S}$  結合を介して金電極表面へ固定化しても、亜セレン酸の触媒的還元が起こることを確認した。固定化すると排水ごとに  $\text{MV}$  を添加する必要がなくなるため、実用的である。ただし、単分子層吸着による固定化ではメディエーター量が限られるため、溶解系よりも電流が小さかった。現在、カーボンフェルト電極表面への固定化を検討している。

回転電極法による測定から、緩衝液として  $\text{PBS}$  を使用した場合、 $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$  まで濃度を下げると、十分な速度で電極還元が起こらず、緩衝剤の低濃度化はあまり現実的でないことがわかった。セレンオキシアニオンの電極還元における緩衝剤の役割は、①緩衝機能、②  $\text{H}^+$ 供給、③導電性付与である。①と②については、 $\text{pKa}$  値 5~8 を有するプロトン解離性の官能基で代用できると考え、表面に  $-\text{SO}_3\text{H}$  基や  $-\text{COOH}$  基を有するイオン交換樹脂(それぞれ、 $\text{IR120}$ ,  $\text{IRC76}$ ) が緩衝剤を代替できるかを検討した。図3に示すように、 $\text{COOH}$  基を表面に修飾したイオン交換樹脂が弱酸~中性域 ( $\text{pH} 5\sim 8$ ) で緩衝能を有することがわかった。

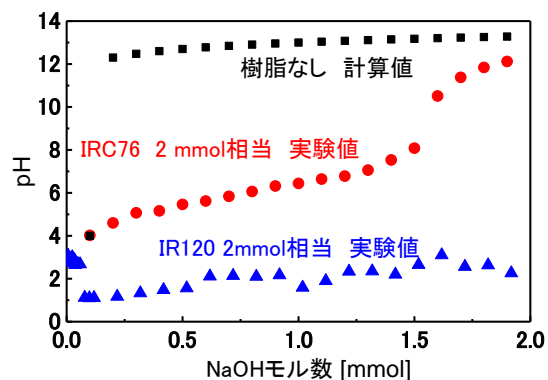


図3 イオン交換樹脂 ( $\text{IR120}$ : 表面  $-\text{SO}_3\text{H}$  基,  $\text{IRC76}$ : 表面  $-\text{COOH}$  基) の滴定曲線。

反応に必要な  $H^+$  を供給すると  $COOH$  基は脱プロトンして  $COO^-$  に変化するが、イオン樹脂をろ別して酸で処理することによって  $COOH$  基を再生、再利用可能である。しかし、イオン交換樹脂のみでは③電解質の導電率が不足するため、塩 ( $NaCl$ ,  $KCl$ ,  $LiCl$  など) を添加する必要がある。このとき、塩のカチオンによる差はあるが、塩添加によって表面  $COOH$  基の解離が進み、そこに静電的に捕捉されることで  $MV$  の実効濃度が減少する問題が観られた。そこで、実効濃度が  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  になるように過剰の  $MV$  を添加し、亜セレン酸の電極還元反応を行った結果、図 4 のように PBS を使用した場合とほぼ同程度の電流、すなわち同程度の反応速度になり、イオン交換樹脂がリン酸緩衝液の代替に成り得ることがわかりました。今後、メディエーターの電極表面への固定化や廃液に含まれるイオン成分の利用などと併用することで、イオン交換樹脂の利用について検討する予定である。

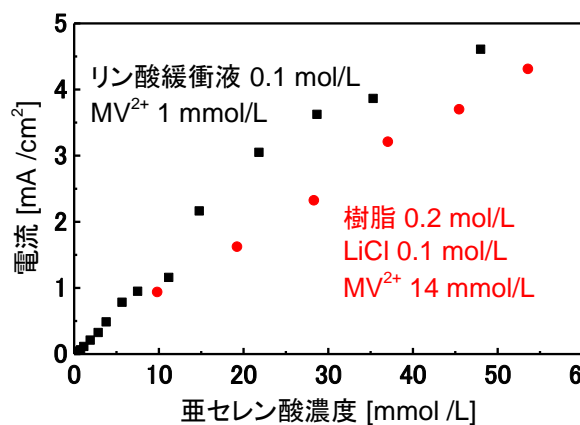


図 4 亜セレン酸還元電流と濃度の関係

#### 4. 今後の計画及び学会論文等投稿・発表状況

##### 今後の計画

当初の研究目的であるセレン酸還元菌 NT-I を用いた酵素電極反応系の構築とこの反応系

をベースにしたセレンオキサニオンセンサーを作製については、平成 23, 24 年度に検討した  $MV$  をメディエーターとして用いる酵素電極反応系では検出感度が不十分であり、センサーに使用できない。

平成 27 年度は、今回報告した  $MV$  をメディエーターとする非酵素の亜セレン酸還元反応をベースにした亜セレン酸濃度測定法について検討する。これまでの研究で主として用いてきた CV 法で測定できる下限濃度は  $20 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  程度と見積られるが、センサーとして実用に供するためには少なくとも排水基準値  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  ( $1.3 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ )、可能ならば水質基準値  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0.13 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ ) 以下に下げることが必要である。電位掃引法ではなく、電位ステップに伴って流れる電流あるいは電気量の測定、微分パルスボルタンメトリーなどの高感度電気化学測定法を用いることで、下限濃度をどこまで下げられるかを検討する。必要ならば、さらにストリッピング法 (例えば、カソードストリッピング法としては、 $Cu^{2+}$  を共存させ、反応  $HSeO_3^- + 2Cu^{2+} + 5H^+ + 8e^- \rightarrow Cu_2Se + 3H_2O$  によって溶液中の亜セレン酸を電極上に  $Cu_2Se$  として濃縮し、その量を電気化学的に測定する。電極上に  $Se(0)$  を電析させて濃縮し、 $Se(IV)$  へ酸化する電気量から定量するアノードストリッピング法も可能である) を併用して検出下限値を測定し、セレンオキサニオンセンサーに用いる反応系としての可能性を議論する。

#### 参考文献

- 1) M. Kuroda, E. Notaguchi, A. Sato, M. Yoshioka, A. Hasegawa, T. Kagami, T. Narita, M. Yamashita, K. Sei, S. Soda, M. Ike, *J. Biosic. Bioeng.*, **112**, 259-64 (2011).

- 2) T. Kagami, T. Narita, M. Kuroda, E. Notaguchi, M. Yamashita, K. Sei, S. Soda, M. Ike, *Water Res.*, **47**, 1361-68 (2013).
- 3) 加納健司監修、“バイオ電池の最新動向”、第 1, 6 章、シーエムシー出版(2011).
- 4) 池田篤治監修、“バイオ電気化学の実際-バイオセンサ・バイオ電池の実用展開-”、第 4, 6, 14, 18 章、シーエムシー出版(2007).
- 5) V. S. Saji and C.-W. Lee, *RSC Adv.*, **3**, 10058- 10077 (2013).

- 4) 赤塚秀太、今林慎一郎、「メディオエータ型亜セレン酸還元反応はセレン回収方法として有用か？ー反応機構解析結果に基づく電解還元条件の検討ー」、第 60 回ポーラログラフおよび電気分析化学討論会、2014/11/16、京都工繊大.

#### 投稿論文

準備中

#### 学会発表

- 1) 村上大昌、今林慎一郎、「亜セレン酸の電極還元促進に対するビオロゲンメディオエーター構造の影響」、第 61 回ポーラログラフおよび電気分析化学討論会、2015/11/24、イーグレひめじ.
- 2) 今林慎一郎、村上大昌、越雲文也、「メディオエーター型亜セレン酸還元反応に対するメディオエーター構造の影響」、2015 年電気化学秋季大会、2015/9/11、埼玉工業大学.
- 3) 赤塚秀太、越雲文也、今林慎一郎、「メディオエータ型水溶性セレン還元反応に基づくセレン回収法の可能性」、電気化学学会第 82 回大会、2015/3/17、横浜国立大学.

# バイオレアメタル精錬開発

〔芝浦工業大学工学部 材料科学・化学群 材料工学科 新井 剛〕

## 1. 研究目的

近年、資源の有効利用の観点から都市鉱山等から有用元素を回収する試みが数多くなされている。それらの回収方法は、湿式精錬から乾式精錬に至るまで複数の提案がなされている。特に、昨今の環境負荷の低減を鑑みた場合、都市鉱山からの分離回収技術においても低環境負荷の技術開発が求められている。その中でも微生物等を利用したバイオ分離技術が注目を集めており、研究開発も数多くなされている。バイオ分離技術は、特定の金属イオンに対して選択性を示す菌体を用いて、バイオメタルとして目的の金属を分離・回収する技術である。しかしながら、バイオメタルは、菌体由来の有機物が多く、また、菌体に内包されている金属イオンを精錬する必要があり、一般的な製錬技術を適用することができない。また、分離を菌体で行うため、夾雑物質の可能性も否定できず、純度の低下が懸念される。そこで本開発では、バイオメタルからの精錬濃縮技術開発を行っている。本技術開発では、これまでに、Se を含有するバイオメタルから酸性溶液に Se を抽出し、酸性溶液に抽出された Se を電気分解法、若しくは化学還元法により精錬することを提案した。本法によりバイオメタル中から Se を回収できることを確認した。

昨年度、本研究では新たな試みとしてイオ

ン液体を用いたレアメタルの精錬回収技術に着手した。昨年度の結果から、疎水性のイオン液体である 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムヘキサフルオロホスファート ( $[C_4mim][PF_6]$ ) は Pd(II) に対して極めて強い抽出能を有することが明らかとなった。イオン液体には、金属イオンの抽出能の他に高導電性、難燃性などの特長を有する。この高導電性であることを利用することで、これまでにない新たな製錬技術が開発できる可能性がある。そこで、本研究では、イオン液体を用いたレアメタル製錬プロセスについて基礎的に研究を行ったので報告する。

## 2. 研究計画

昨年度までにおいて、Se バイオメタルからの酸性溶液への抽出挙動及び新規のイオン交換体を用いたクロマトグラフィー法の適用性について検討した。本研究開発より、バイオメタルから酸性水溶液への抽出の可能性及び新規の無機-有機複合型イオン交換体へのレアメタルの吸脱着特性の基礎性能が明らかとなった。これにより、バイオレアメタルから抽出したレアメタル間相互の分離の基礎特性を明らかとした。また、電気化学法によるバイオメタルの製錬技術開発の検討を実施した。本研究の成果より、抽出-イオン交換クロマトグラフィーにより分離した Se を電解法によ

り回収できることが示唆され、Se のバイオメタルから Se を回収するプロセスを提案した。

また、昨年度は、 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ によるレアメタルの溶媒抽出特性について検討した。その結果、 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ は Pd(II)に対して高選択性を有することが明らかとなった

本年度は、さらに $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ に対する複数の金属イオンの抽出挙動の検討、並びに電気化学特性について検討を加えた。また、電析法によりイオン液体に抽出された金属イオンの直接回収についても基礎的な検討を行った。

最終年度は、イオン液体と電気化学法を組み合わせた直接製錬技術開発を実施する。これまでの成果を基に本研究で提案するスキームの成立性並びに妥当性について検討する。

### 3. 計画の進行状況

#### 3.1 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ の合成

イオン液体は一般に、カチオンとなる物質にアルキル基を導入するアルキル化反応と、目的物質を得るためのアニオン交換反応の 2 つの反応工程で構成される<sup>1)</sup>。本研究では 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムヘキサフルオロホスファート（以下、 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ と略記）を合成した。第一段階目の反応は、1-メチルイミダゾールと 1-ブロモブタンによる  $\text{S}_{\text{N}}2$  反応である。第一段階目で得られる 1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムブロミド（以下  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{Br}]$ ）は親水性イオン液体であり、水溶性の溶媒抽出法で抽出溶媒として用いるには不向きである。そこで第二段階目において、アニオンを交換し疎水性のイオン液体を得た。Fig.1 に合成スキームを示す。

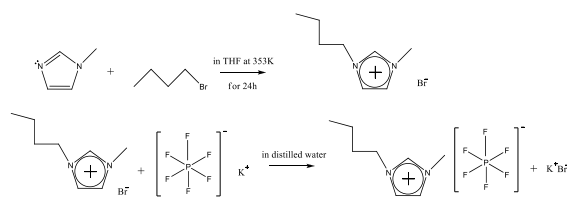


Fig.1  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ の合成スキーム

第一段階目では、モノマーである 1-メチルイミダゾール、1-ブロモブタンをそれぞれ 0.1 mol ずつ秤量し、同一の三角フラスコへ投入した。次に極性非プロトン溶媒として用いるテトラヒドロフラン(THF)を 0.1 dm<sup>3</sup>秤量し、モノマーが入った三角フラスコへ加えた。この 3 種類の試薬が入った三角フラスコを重合装置に設置し、24 時間 353 K に加熱しながら攪拌した。これが第一段階目の  $\text{S}_{\text{N}}2$  反応である。この反応で $[\text{C}_4\text{mim}][\text{Br}]$ を得た。エバポレーターを用い、得られた  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{Br}]$ から THF を蒸留除去した。

その後、第二段階目で 0.1 mol のヘキサフルオロリン酸カリウムを入れたビーカーに  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{Br}]$ を投入し、蒸留水を 0.5dm<sup>3</sup>加えて室温で混合することで $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ を得た。合成した $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ からモノマーや溶媒の残渣を取り除くために蒸留水による洗浄とデカンテーションを繰り返し行った。5 回以上の洗浄を行った $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ は、オイルバスで加熱して大まかに水分を除去した後、室温で真空乾燥を施した。本実験ではこれらの工程で得た $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ を用いた。

#### 3.2 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ による金属イオンの抽出挙動の検討

本研究で自製した $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$ に対する各金属イオンの抽出特性を調査するためバッチ式抽出試験を行った。試験溶液は、所定濃

度の塩酸溶液を用いて各々の金属イオンが  $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (以下、 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  を M と略記) となるように調整した。抽出試験はイオン液体と金属溶液の体積比を 1:1 として、所定の試験温度に設定した恒温振とう槽中で一定振とう速度において行った。ただし、イオン液体は一般に粘性が大きく、 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$  も例外ではなかったため、正確な体積を秤量することは困難であった。そこで、 $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$  の密度を算出し、体積を重量に変換し抽出試験を行った。試験後の金属溶液にはミセル状の  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$  が分散しているため、溶液を遠心分離によって分離し、そのうちの金属溶液を分析に資した。イオン液体への抽出量は、試験前後の金属溶液の濃度差を測定することで推定した。イオン液体の抽出性能の指標として抽出分率 E (%) を算出した。E (%) は式(1) で定義した。

$$E(\%) = \frac{C_o V_o}{C_w V_w + C_o V_o} \times 100 \quad (1)$$

ここで  $C_w$  は試験後の水相の金属濃度 [M]、 $V_w$  は金属溶液の体積 [ $\text{cm}^3$ ]、 $C_o$  は試験後のイオン液体中の金属濃度 [M]、 $V_o$  はイオン液体の体積 [ $\text{cm}^3$ ] を示す。

抽出平衡試験により  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$  による各金属イオンに対する抽出挙動を得た。塩酸水溶液中における  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$  に対する各金属イオンの抽出試験結果を Fig.2 に示す。

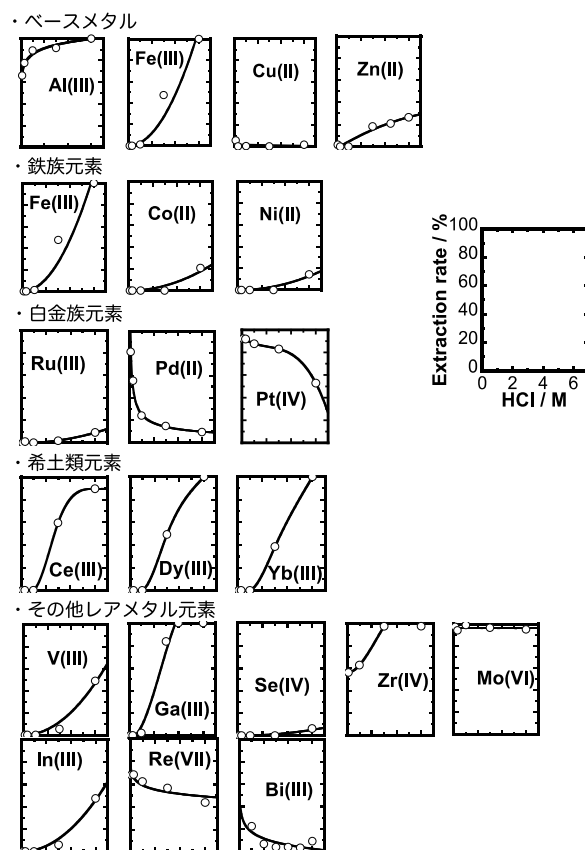


Fig.2 塩酸水溶液中における  $[\text{C}_4\text{mim}][\text{PF}_6]$  に対する各金属イオンの抽出挙動

Fig.2 より Al(III)、Fe(III) は高い抽出分率を示すことが明らかとなった。特に、イオン交換樹脂等では殆ど吸着されない Al(III) が塩酸濃度によらず抽出されることは特筆すべき特徴である。Al(III) は塩酸濃度の増加に伴う抽出量の増大傾向が確認され、1 M 以上の塩酸濃度では 90 % を超える抽出分率が示された。また Fe(II) は低塩酸濃度では非抽出であったが、3 M 以上においては顕著に抽出分率が増大し、6 M において抽出分率は 100 % に達した。一方、Cu(II) は何れの塩酸濃度においても非抽出であることが示された。Zn(II) については塩酸濃度の増加に伴い抽出分率が増加したが、最大でも 25 % であった。

鉄族元素は一樣に塩酸濃度の増加に伴う抽



出分率の増大が見られた。しかし、Co(II)、Ni(II)とも 20 %前後の抽出分率であり、抽出に適しているとは言い難い。

白金族元素の抽出傾向に関しては、Ru(III)は塩酸濃度によらずほぼ非抽出、Pd(II)とPt(IV)については塩酸濃度の増加に伴い抽出分率は低下し、負の相関を示すことが確認された。Pd(II)は 0.1 M 塩酸において抽出分率 80 %を示し、Pt(IV)も 90 %と良好な抽出性が得られた。

希土類元素も塩酸濃度と抽出分率の間に正の相関が確認されたが、6 M 以上の塩酸では試験後に沈殿物の生成が各委任された。この沈殿生成の影響により、抽出分率が総じて 100 %近い値になったと推察される。

その他の元素に関しては、V(III)、Ga(III)、Zr(IV)、In(III)は塩酸濃度と抽出分率に正の相関が得られた。Mo(VI)、Re(VII)は本実験の塩酸濃度では何れにおいても抽出されることが明らかとなった。Se(IV)はほぼ非抽出であることが示され、Bi(III)については最も抽出される 1 M 塩酸においても 20 %前後の抽出分率であり弱抽出性であることが示された。

### 3.3 [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]による金属イオンの抽出速度の検討

これまでに得られた試験結果より、良好な抽出反応を示すものに関して、抽出速度の検討を行った。Fig.3 に Al(III)、V(III)、Fe(III)、Ga(III)、Zr(IV)の抽出速度試験結果を示す。Fig.3 より、V(III)を除く 4 元素に関しては 10 分以内に抽出反応は平衡に達することが確認でき、十分に早い抽出速度であることが示された。これは抽出剤として用いる場合において有利な特徴であり、実プロセスにも適した性能であると考えられる。V(III)に関しては抽出平

衡を得ることが難しく、120 分まで一次関数的な抽出分率の増加傾向が示された。

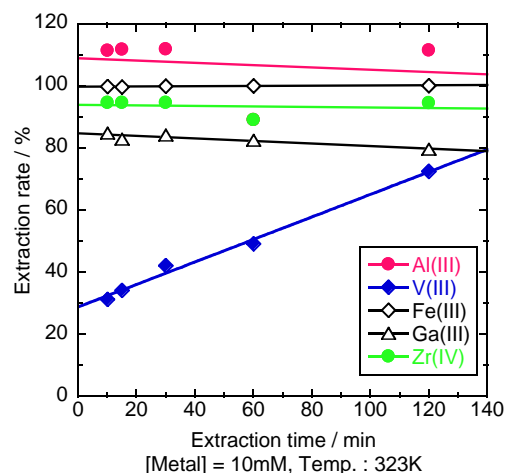


Fig.3 Al(III), V(III), Fe(III), Ga(III), Zr(IV)の抽出速度試験結果

次いで Fig.4 に Mo(VI)、Pd(II)、In(III)、Re(VII)、Pt(IV)の抽出速度試験結果を示す。

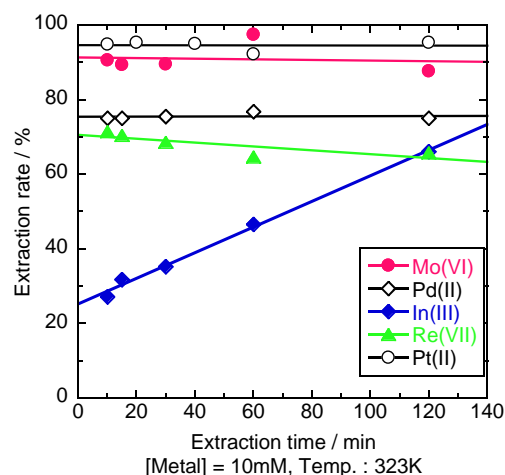


Fig.4 Mo(VI), Pd(II), In(III), Re(VII), Pt(IV)の抽出速度試験結果

Fig.4 より、In(III)を除く 4 元素に関しては 10 分以内に抽出平衡に達することが明らかとなった。In(III)、V(III)共に、抽出に最適な塩酸濃度が 6 M であるため、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]の溶解反応などにより、平衡到達時間の推定は困難であった。

Fig.3 及び Fig.4 の結果を踏まえると、総じて 10 分以内で抽出反応が平衡に達することが明らかとなった。また、V(III)や In(III)は一次関数的な抽出分率の増大傾向が示され、平衡を確認することは困難であった。抽出最適塩酸濃度が 6 M の金属は他にも Fe(III)があるが、こちらは迅速な抽出平衡を確認し、溶解も殆ど見られなかった。このことから、V(III)や In(III)をアニオン種とするイオン液体は、疎水性が弱いことが予想される。

### 3.4 [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]に抽出された金属イオンの電気化学挙動の検討

イオン液体の特長として、高導電性であることが挙げられる。筆者らはこの特長を活かし、金属イオンが抽出されたイオン液体を電解還元し、電析により直接金属として回収するプロセスの構築を目指している。そこで本試験では、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]に抽出された金属イオンの電気化学挙動についてサイクリックボルタンメトリー (CV) により検討した。まず [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]の電位窓を確認した。Fig.5 に [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]のサイクリックボルタモグラムを示す。

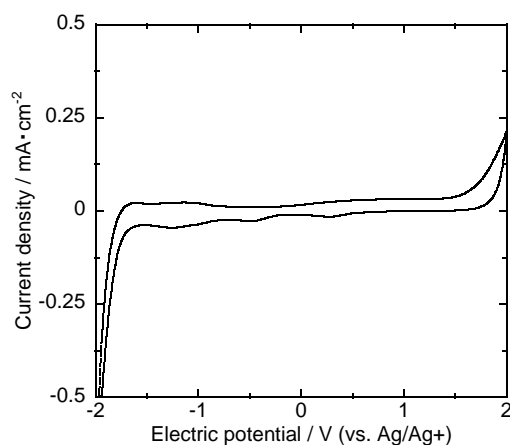


Fig.5 [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]のサイクリックボルタモグラム

Fig.5 のサイクリックボルタモグラムから明らかなように、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]は幅広い電位窓を持つことが改めて確認され、およそ 2 ~ -2 V の電位窓を持つことが示された。これにより、イオン液体中における金属の価数変化や電析が期待できるものと考えた。また、全体を通してフラットな電流-電位曲線であり、不純物などの影響も僅かであることが示され、イオン液体中での金属の価数変化が良好に観測される可能性が示唆された。

次いで Fe(III)が抽出された[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]の CV を行った。Fig.6 に Fe(III)を抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]のサイクリックボルタモグラムを示す。Fe(III)は 6 M 塩酸において抽出試験を行ったものを用いて CV を行った。

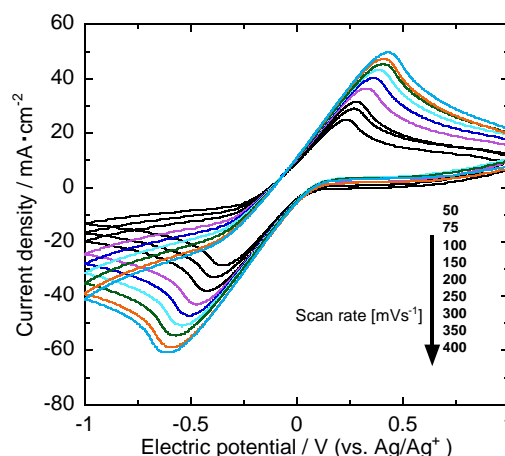
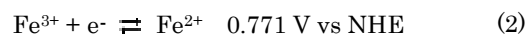


Fig.6 Fe(III)を抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]のサイクリックボルタモグラム

Fig.6 より、-0.6 V 近傍に還元波、0.3 V 近傍において顕著な酸化波が確認された。[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>]中において明確な酸化還元反応が確認され、準可逆反応であることが示された。酸化還元反応としては式(2)、(3)の反応が挙げられる。





また、掃引速度の増大に伴う酸化還元波の掃引方向へのシフトが確認された。これは [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] 内において拡散律速の状態であることを示している。また、塩酸による影響は殆ど見られないことが明らかとなった。これは Fe(III) を抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] が塩酸に対して溶解性を示さなかったことに由来すると考えられる。

Fe(III) が抽出された [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] の CV より、イオン液体中において金属イオンの原子価が変化することが明らかとなった。この試験結果からイオン液体に抽出された金属を電析により直接回収できることが示唆された。

先述の試験結果から本試験では、電析による直接回収の可能性がある Pd(II) の CV を行った。Fig.7 に Pd(II) を抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] のサイクリックボルタモグラムを示す。Pd(II) は 0.1 M 塩酸において抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] を CV に用いた。

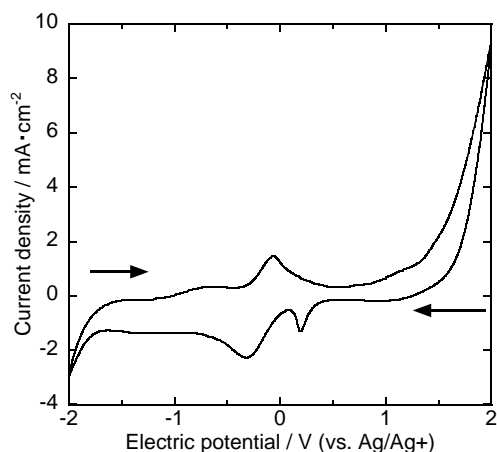
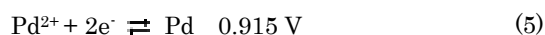
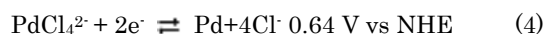


Fig.7 Pd(II) を抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] のサイクリックボルタモグラム

Fig.7 より Pd(II) 抽出後のサイクリックボルタモグラムは非可逆を示し、幾つかのピークが確認され、Pd(II) の還元波と考えられる

ピークが -0.5 V 付近に観察された。また酸化還元波が 0 V 近傍に観察された。[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] 中で誘起すると考えられる Pd(II) の酸化還元反応を式(4)~(6)示す



また非可逆性を示していることから、CV 測定中に析出物が生成されている可能性が示された。また繰り返し試験を行った結果、CV に用いた [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] から黒色の析出物を確認した。これはパラジウムブラックの可能性が考えられ、電析試験により Pd(II) が回収される可能性が示唆された。

### 3.4 [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] に抽出された Pd(II) の電析挙動の検討

先述の電気化学試験より、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] に抽出された Pd(II) は、電解還元反応により直接回収できる可能性が示唆された。そこで本試験では、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] に抽出された Pd(II) の電析挙動について検討した。Fig.8 に Pd(II) を抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] の電析試験中の外観写真を示す。



Fig.8 Pd(II) を抽出した [C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] の電析試験中の外観

Fig.8 から明らかなように、試験の結果、[C<sub>4</sub>mim][PF<sub>6</sub>] 中に黒色の電析物の生成が確

認められた。この黒色析出物の同定を行うため、蛍光 X 線と SEM-EDX による分析を行った。両分析装置とも溶液を測定することは困難であるため、メンブレンフィルターを用いてろ過、回収して分析に資した。Fig.9 に蛍光 X 線スペクトルを示す。

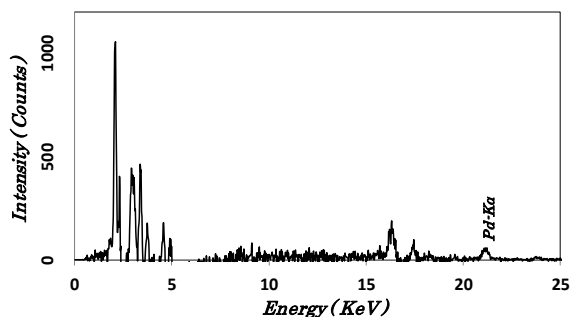


Fig.9 電析物の蛍光 X 線スペクトル

Fig.9 より濾紙を分析した結果、僅かながら Pd の存在が確認され、析出物に Pd が含まれることは明らかとなった。強度の弱さは、フィルター上の Pd が密集していないことに起因するものと考えられる。そこで SEM-EDX により電析物の同定を行った。Fig.9 に SEM-EDX による電析物の分析結果を示す。

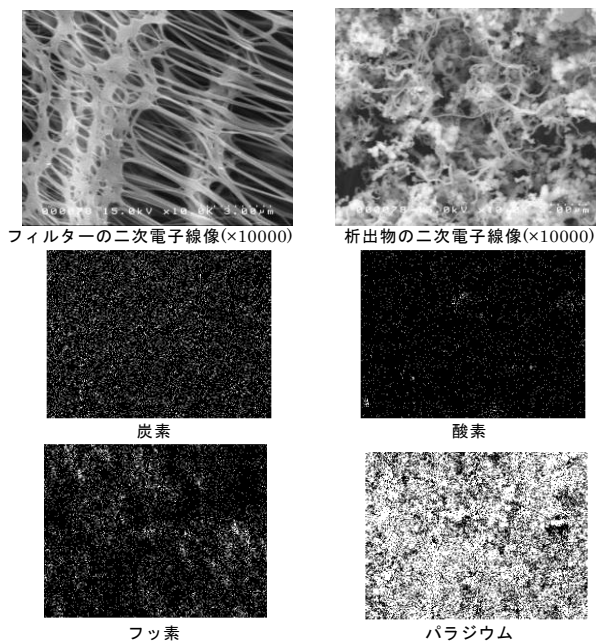


Fig.9 SEM-EDX による電析物の定性結果

Fig.9 の SEM 像より、電析物は微小な球状物質の集合体とヒューム状の混在した状態であることが示された。ヒューム状の析出物が得られたのは、通電域に沿って析出したためと考えられる。正負のイオンから構成されるイオン液体は、電場の中で配向性を示すものと考えられ、これが通電帯となりヒューム状の析出物が得られたものと推察される。また、EDX の測定結果から、検出された炭素やフッ素はメンブレンフィルターの組成を反映したものであると考えられる。酸素は微量ながら観測され、Pd に関しては観測範囲全体において検出された。即ち、電析物は Pd 単体である可能性が示された。

本試験結果より  $[C_4mim][PF_6]$  に抽出された Pd(II) は、電解還元により Pd 単体として回収可能であることが示された。

#### 4. 本年度の状況とまとめ

昨年度までには疎水性イオン液体である 1-アルキル-3-メチルイミダゾリウムヘキサフルオロホスファート (以下、 $[C_nmim][PF_6]$  と略記) には、塩酸水溶液中における金属イオンに対し抽出能を有することが明らかとなった。また、 $[C_nmim][PF_6]$  に抽出された金属イオンは、電氣的に原子価を調整できることが示され、電解還元等により直接回収できることが示された。そこで、本年度は電解還元法による  $[C_nmim][PF_6]$  に抽出された金属イオンの電析回収について詳細に検討した。本年度の研究成果より  $[C_nmim][PF_6]$  に抽出された Pd(II) は、電解還元により数  $\mu m$  径のワイヤー状を呈した電析物として回収できること

が明らかとなった。また、 $[\text{C}_n\text{mim}][\text{PF}_6]$ のアルキル側鎖長や希釈剤が Pd の電析物の形状に影響を及ぼすことが確認された。さらに本年度は、また、 $[\text{C}_n\text{mim}][\text{PF}_6]$ よりも電気化学特性に優れた 1-アルキル-3-メチルイミダゾリウムビス(トリフルオロメタンスルホニル)イミド (以下、 $[\text{C}_n\text{mim}][\text{Tf}_2\text{N}]$ と略記) の金属イオンの抽出特性並びに電気化学特性について検討した。本研究の成果から、 $[\text{C}_n\text{mim}][\text{Tf}_2\text{N}]$ は $[\text{C}_n\text{mim}][\text{PF}_6]$ と比較して金属イオンの抽出性能が低いことが明らかとなった。しかし、 $[\text{C}_n\text{mim}][\text{Tf}_2\text{N}]$ は $[\text{C}_n\text{mim}][\text{PF}_6]$ よりも広い電気窓を有し、電気化学特性に優れることが明らかとなった。

#### 学術論文

1. 松本佑美、鈴木亮利、千葉雄大、新井剛“高効率分離を目指したトリフェニルホスフィン抽出剤による都市鉱山からの白金族元素の分離プロセスの提案” *Journal of MMIJ*, Vol.131, No.8-9, pp.481-486 (2015)

#### 学会発表

2. 北義弘、大胡貴仁、新井剛“ $[\text{C}_n\text{mim}][\text{PF}_6]$ による複合反応系を用いた都市鉱山からの希少金属回収技術開発”、2015 年日本イオン交換学会・日本溶媒抽出学会連合年会、(2015)
3. 松本佑美、矢田祐士、山中拓実、新井剛“イオン液体を溶媒とした白金族元素回収の新規・分離回収技術開発”、2015 年日本

イオン交換学会・日本溶媒抽出学会連合年会、(2015)

4. 大胡貴仁、北義弘、新井剛“LCST 型イオン液体を用いた金属イオンの抽出挙動の基礎研究”、2015 年日本イオン交換学会・日本溶媒抽出学会連合年会、(2015)
5. 矢田祐士、松本佑美、新井剛“ $[\text{C}_n\text{mim}][\text{Tf}_2\text{N}]$ -Tributyl phosphate 混合抽出相からのギ酸アンモニウムによる希土類元素の逆抽出”、2015 年日本イオン交換学会・日本溶媒抽出学会連合年会、(2015)
6. 北義弘、大胡貴仁、新井剛“イオン液体を用いた複合反応系による都市鉱山からの有用金属の直接回収技術開発”、平成 27 年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、(2015)
7. 松本佑美、矢田祐士、室井悟、新井剛“ $[\text{C}_n\text{mim}][\text{Tf}_2\text{N}]$ を溶媒とした都市鉱山からの白金族元素新規分離・回収技術開発”、平成 27 年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、(2015)
8. 大胡貴仁、北義弘、新井剛“イミダゾリウム系イオン液体の抽出挙動に及ぼすアニオン構造変化の影響”、平成 27 年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、(2015)
9. 矢田祐士、松本佑美、新井剛“Tributyl Phosphate の希釈溶媒に $[\text{C}_n\text{mim}][\text{Tf}_2\text{N}]$ を用いた場合の塩酸水溶液中における希土類元素の抽出・逆抽出挙動”、平成 27 年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、(2015)

### 3. 総括

#### (1) 全体総括

本研究は、微生物の有する特殊な金属類代謝機能を活用することで、これまでは困難であった産業廃棄物や廃水中に有害物質として含まれるレアメタルの経済的な除去・浄化を達成すると同時に、これまでは低濃度のために実現することのできなかった廃水や廃棄物からのレアメタルの資源化を可能にするプロセスを構築することを目的に実施した基盤研究である。すなわち、ハイテク産業の伸張により消費や廃棄が急増しているレアメタルのために生じる環境汚染と資源枯渇という2つの重要な問題を解決するための技術開発を目指したものである。この実現は今世紀に求められている自然共生型、持続型産業の確立に貢献するものといえる。研究開発はすでにシーズが明確であるセレン (Se) に対して行い、Se を含む模擬排水を処理しつつ、バイオマス内外に生じる固化 Se とメチル化物としての気化 Se を個別に回収し、これらを精錬することで資源としてリサイクルできることを実証する主要な課題として行った。その結果、ラボスケールでのリアクターを開発し、回収・資源化することに成功した。Se 以外ではレアアース元素 (REE) についても回収・資源化を可能と金属代謝微生物の分離・育種に取り組み、ラボスケールでの回収・資源化に成功した。また放射性核種を捕集できる微生物とその浄化材料の構築にも成功した。各研究テーマの成果は以下の通りである。

研究テーマ1として掲げた、廃水・廃棄物などからのレアメタル除去・回収バイオリアクターの開発では、先行研究の Se においてスケールアップに成功すると共に、レアメタルの除去・回収に適応したプロセスの検討を行った。

以前分離した好気性セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT- I 株を利用しラボスケールリアクター (5L) で、高濃度 (0.5 mM) のセレノオキソアニオン (セレン酸、亜セレン酸) を含有する模擬廃水から初発濃度の 87.8% の固体セレン (元素態セレン) の回収に成功した。NT- I 株は固体セレンを還元してジメチルジセレニド (DMDS<sub>2</sub>) に変換することを明らかにした。そこで排気口に硝酸が入った容器を連結した気化セレン回収装置を作製した。気化セレン回収培養条件を用いてラボスケールリアクターで試行したところ、120 時間目における気体セレンへの変換効率は初期濃度の 71.2% (捕集効率換算値では 87.6%) であった。この結果、5L リアクターを用いた場合でも回収するセレン分子種に関係なく変換効率は約 90% 前後でスケールアップに成功した。前処理せずに模擬廃水中のセレンを還元し高濃度の固体・気体セレンとして回収できる 2 種類の独立したセレン回収プロセスのメリットは大きい。

次に実廃水を用いて初発セレン濃度が同程度になるように希釈したセレンを用いて実験した。固化セレンの回収率は約 78.8% であり、気化セレンの回収率は約 38.9% (捕集効率換算値では 48.0%) であった。実廃水には模擬廃水には含まれていない金属・元素など微生物によるセレンの還元を阻害する因子が含まれていると思われる。この要因を特定、除去す

ることで、セレン回収率が向上する可能性がある。

研究テーマ2として掲げた、レアメタル含有バイオマスからの精錬プロセスの開発では、Se濃縮バイオマスからの簡単な精錬プロセスの検討と、Seやレアアース元素(REE)の簡易の分離濃縮方法の検討等を行った。

研究テーマ1で得られた固化セレンは微生物汚泥を含むことからバイオセレン(セレン含有率約2%)と呼称した。蒸留水とエタノール洗浄で簡単にバイオセレン中のセレン含有率を11-14%に向上することに成功した。精製後のバイオセレンは市販セレンと物性が異なり、非晶質であることが分かった。酸化焙焼によりバイオセレンからセレン含有率99.3%の二酸化セレンを精錬した。その二酸化セレンを化学還元によって純度99.9%の金属セレンの精錬に成功した。初発のセレン濃度から換算すると回収率は約71%である。セメント工場で発生する塩素バイパスダストに自然由来のセレンが含有していることから、実廃棄物からのセレン浄化を試行した。特定のセレン溶出助剤で溶出し、その溶出液を希釈してNT-I株を用いて反応させてところ、初発セレン濃度の約90%のセレンが固化回収できた。

電気還元による可溶性セレンオキソアニオンからの固化セレン回収を試行したところ、メチルビオロゲンをメディエーターとして用いることによって、初発セレン濃度(1~10mM)の約99%以上の除去率を得ることに成功した。特定のイオン液体とアミド系抽出剤を用いることによりPd(II)、Pt(IV)、Rh(III)を分離回収することに成功した。

研究テーマ3として掲げた、多様なレアメタル回収・資源化に適用できる新規金属代謝微生物の取得では、セレン以外にも、テルル、レアアース元素(REE)、放射性核種の1つであるストロンチウム(Sr)を代謝する微生物資源の分離と浄化・回収するための基盤研究を行った。

セレン以外のレアメタル代謝微生物の探索を行った。既存テルル酸還元細菌*S.maltophilia* Ti-1、*O.anthropi* Ti-2、*O.anthropi* Ti-3株のテルル酸還元能を特徴付けしたところ、Ti-1株は基準株に比べ増殖能が高く、テルル酸還元最適NaCl濃度は4%で、最適温度は30°Cから37°Cである。Ti-2、Ti-3株はどちらも基準株を上回るテルル酸還元能を有していた。特に37°Cでは基準株の2倍近い速度で還元していた。Ti-2、Ti-3株は塩濃度が低い方が、テルル酸還元が進行する傾向があった。新たに海洋性テルル酸還元微生物の選別を行った。東京湾内や日本海側の海底底泥や海水から元素態テルルの合成を示唆する黒色に呈する細菌を18株分離した。分子生物学的に分類したところ、9属に分類できた。その内6属はテルル酸化物の還元報告がない菌であった。

新規REE代謝微生物の取得を試みた。まずはREEを含む廃棄物からREEを特異的に溶出する微生物の選別を行ったところ、REE溶出微生物群を3菌群得た。このうちS20菌群は培養1日目でREE含有廃棄物からDyを約70%、Ndを約55%、Prを約65%抽出し、不純物としてのFeはほとんど抽出しなかった。REE含有廃棄物から選択的にREEを抽出し

ている微生物群であると示唆された。次に、REE 特に、Dy を効率よく蓄積する微生物の選別を行った。数日で初発濃度の約 50%以下まで固化濃縮可能な微生物を分離し、分子生物学に分類したところ、*Penidiella* sp. T9 と命名した。本属には REE を代謝する微生物の報告はなく新しい発見である。リン酸を添加することにより固化濃縮率は約 90%に向上した。培養液を固液分離後に得た固化物を焙焼してジスプロシウムを得ることができた。

福島県原子力発電所の事故で問題となっている浄化対象の放射性核種の 1 つにストロンチウム (Sr) がある。Sr はカルシウム (Ca) と置換しやすいことから、Sr と置換できる炭酸カルシウムを合成する微生物を選別したところ、*Bacillus* sp. TK2d 株を分離した。TK2d 株は 1mM の Sr を 5 日間で約 99.3%可溶性画分から除去する能力があった。

## (2) 他の金属・元素への展開

廃水や廃棄物等からのレアメタル回収技術は、標的金属の反応を触媒する有効な微生物が得られれば、他の元素にも水平展開できる。水溶性の有価金属を固形や吸着性の高い形へと還元・変換する多様な微生物作用が知られている。テルルについては、生物固化（バイオミネラリゼーション）を触媒する細菌を取得し、回収プロセスに見合うかどうかを評価すると共に、耐塩性の新規なテルル酸還元細菌の分離に成功している。実際に、レアアースエレメント (REE) の溶出、固化濃縮する微生物や、放射性核種を捕集するバイオ鉱物を合成する微生物の分離にも成功した。金属代謝能を有する微生物の取得は必ずしも一筋縄ではいかないが、まずは試行することであろう。ヒ素の酸化・還元、マンガン酸化、クロム還元、パラジウムや白金の還元、水銀イオンの気化、焼却灰からの金属類溶出等、多岐にわたる作用を担う微生物が取得されている。また、急速に発展してきたバイオインフォマティクスを駆使し、世界中の微生物バンクや遺伝子バンクを検索すれば、有望な資源が案外隠れており容易に見つけられるかもしれない。

## (3) おわりに

廃水・廃棄物等からのレアメタル回収プロセスを実用化するためには、解決しなければならない課題も多くある。重要な問題は、物理化学的反応と比較して反応速度が遅いことや、廃水・廃棄物中にレアメタルと共存している有害物質により微生物の増殖や代謝阻害を受け不安定になりやすいことである。これら問題は工業プロセスとして利用する場合に致命的ともいえるし、生物・生体を利用する以上は不可避であり、完全に取り去ることはできない。しかし、前処理工程の改良、高性能バイオリアクターの開発や、実用化を見据えて微生物を分離・育種することによって、かなりの程度は克服できるのではないかと期待している。

高効率型バイオリアクターの例としては、メンブレンバイオリアクター (MBR) の利用



やポリエチレングリコール等のゲルへの固定化により、微生物濃度を高く保つことがあげられる。また、センサー類と計算機シミュレーションを駆使した反応条件の適正制御を行うことにより、廃水中の組成や負荷の変動に対応した微生物反応の安定化を図ることができる。一方、有用なレアメタル代謝遺伝子をクローニングし、適正な宿主-ベクター系を利用して高発現させた組換え微生物は、触媒としての反応速度を向上させることができる。野生型の微生物の活性は、実廃水で見られる典型的な高塩濃度や低 pH 域では大幅に低下してしまうが、好塩性菌や耐酸性菌を宿主として目的遺伝子を導入した組換え体を育種すれば、機能することも不可能ではない。このような研究開発によって、レアメタル代謝微生物がレアメタルの回収資源化に大いに貢献することを期待している。

実用化に向けたプロセスの構築を考えた場合、コストの低減化を避けて通ることはできない。REE バイオリッチングはタンクや微生物の培養条件を一定に維持することで、スケールアップが可能であることが分かった。今後、パイロットスケール(2 m<sup>3</sup>タンク)での REE バイオリッチングを検討すると共に、廉価型タンク(滅菌しない培地に適用)を用いたスケールアップを検討する事で、ランニングコストだけでなく、初期コストも抑えられ、低コスト、省エネルギーのレアメタル回収技術を開発することが可能となる。

#### 4. 謝辞

本研究に適切かつ有用なご助言等をいただきました、大阪大学大学院工学研究科 惣田訓准教授、黒田真史助教、東京海洋大学大学院 今田千秋教授、寺原猛助教、東京大学生産技術研究所 吉川健准教授、(株)丸菱バイオエンジ 佐久間英雄専務、岩崎靖彦氏に感謝いたします。

本研究を遂行にあたってご協力いただきました芝浦工業大学 SIT 総合研究所レアメタルバイオリサーチセンター研究員 堀池巧博士、大塚治氏、土津田雄馬氏、芝浦工業大学工学部応用化学科生命化学研究室の学生諸氏に感謝いたします。

実験に際し、環境サンプル等をご提供していただきました、企業関係者の皆様に感謝いたします。