

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21651040

研究課題名（和文）

微生物機能を利用した廃水からの金属回収とそれを用いた金属ナノ粒子の合成

研究課題名（英文）Synthesis of nano particles of metals removed from wastewater by microorganisms

研究代表者

惣田 訓 (SOUA SATOSHI)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30322176

研究成果の概要（和文）：

亜セレン酸とカドミウムイオンからセレン化カドミウム（CdSe）を合成する微生物 *Pseudomonas aeuginosa* RB-R の特徴を明らかとした。透過型電子顕微鏡により、RB-R 株の菌体内もしくはその表面に 10-20nm のセレン化カドミウム粒子が形成された。生成粒子は粒径が約 200 nm であり、粒子が凝集していることが示唆された。極性の高い官能基を持つ有機分子で修飾すれば、CdSe をナノ粒子にできると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A bacterium *Pseudomonas aeuginosa* RB-R was isolated for synthesizing cadmium selenide (CdSe) from selenite and cadmium ion. TEM-EDX observation indicated that 10-20 nm CdSe particles were formed inside and surface of the bacterial cells. The extracted particles from the bacterial culture showed 200 nm in diameter. Production of nano-scale CdSe particles will be possible if polar organic chemicals are added to the synthetic process for preventing coagulation.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 900,000 | 0 | 900,000 |
| 2010 年度 | 900,000 | 0 | 900,000 |
| 2011 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 360,000 | 3,360,000 |

研究分野：環境材料学

科研費の分科・細目：環境学 環境技術・環境材料

キーワード：微生物、金属ナノ粒子、セレン化カドミウム

1. 研究開始当初の背景

セレン (Se) のオキソアニオンには毒性があり、セレンは平成 5 年に排水基準 (0.1 mg/L) が定められたが、効果的な処理方法が確立していないため、セレン精錬事業所には、現在まで暫定基準 (0.3 mg/L) が適用されている。現状では、電気還元・凝集などの高コストな処理方法が適用されており、それによって生じる無機汚泥は、埋立処分場されるた

め、環境汚染は防止できても、資源浪費であるともいえる。資源に乏しい我が国では、希少元素や有害元素を浪費することなく、高機能物質・材料を開発する”元素戦略”の重要性が認識されつつあり、廃水中のセレンの新たな処理・リサイクル技術の確立が望まれている。研究代表者は、それらの化合物を水中から除去する微生物を検索し、比較的安価な生物学的排水処理プロセスの開発を行って

きた。それを通じ、様々な金属イオンを代謝する微生物が存在することがわかり、廃水中のセレン、テルルを回収した後、さらに微生物機能を用いて半導体ナノ粒子の合成方法の開発を試みる発想に至った。例えば、CdSe（セレン化カドミウム）は、粒子の大きさによって発光波長を制御でき、新タイプの発光材料として情報家電やバイオマーカーなどへの応用が期待されている。

2. 研究の目的

金属工場廃水に含まれるオキソアニオン形態のセレンをカドミウムイオン共存下で微生物機能を用いて還元し、金属ナノ粒子であるセレン化カドミウム (CdSe) に変換することを最終目標とし、セレン化カドミウム・テルル化カドミウム合成微生物のスクリーニング、および微生物によって合成された金属ナノ粒子の評価を目的とした。

3. 研究の方法

(1) セレン化カドミウム合成微生物のスクリーニング

亜セレン酸ナトリウムと塩化カドミウムを 1 mM ずつ添加した、乳酸塩を炭素源として含む無機塩培地 (100 ml) に金属汚染の疑われる土壌を接種して静置条件で培養を開始し、継代培養 (5% 植替) を繰り返すことでセレン化カドミウムを合成する微生物群の集積培養を行った。

亜セレン酸の濃度は、イオンクロマトグラフィ (HIC-20A SUPER システム, Shimadzu) を使用して測定した。水溶性カドミウムの濃度は、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES; SPS7800, SII Nanotechnology) にて測定した。

(2) セレン化カドミウム合成微生物の特徴づけ

集積系の培養液を段階希釈して平板培地に塗布し、集積系の優占種として、培養液と同じ赤褐色のコロニーを形成する細菌 RB-R 株の純粋分離した。この RB-R 株を用い、静置、嫌気、好気条件での亜セレン酸還元試験を行った。透過型電子顕微鏡ならびに元素分析は EDX 付属の H-7650 (HITACH) を用い、加速電圧 100kV 100kV にて行った。

(3) RB-R 株が合成するセレン化カドミウム粒子の特徴付け

RB-R 株を好気条件で培養し、固相を遠心分離にて回収した。培養液 1 ml を超音波処理後、固形分を遠心分離により沈降させ、得られたペレットを洗浄した。その後、ドデシル硫酸ナトリウム存在下でタンパク質分解酵素を添加し、55°C で溶菌した。溶菌処理を施した後、X線回折 (XRD; Ultima IV, RIGAKU) 分析に供した。動的光散乱 (DLS) による粒度分布の測定は、NanoPhox,

Sympatec により行った。

4. 研究成果

(1) セレン化カドミウム合成微生物のスクリーニング

10 回以上の継代培養を繰り返すことで、次第に集積系の水相部から亜セレン酸およびカドミウムが安定して除去されるようになり (図 1)、培養液がセレン化カドミウム特有の赤褐色に呈色するようになった。培養液から抽出した固形分を表面元素分析に供したところ、セレンとカドミウムの主要なピーク

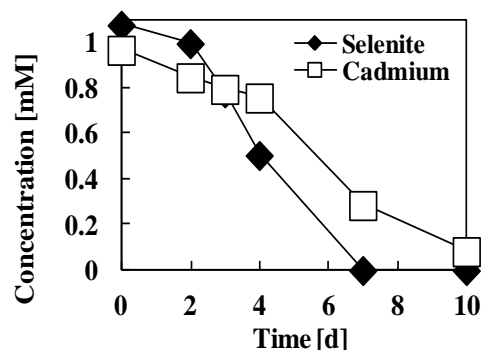


図 1 39 回植え継いだ集積培養系における水相からの亜セレン酸とカドミウムの除去

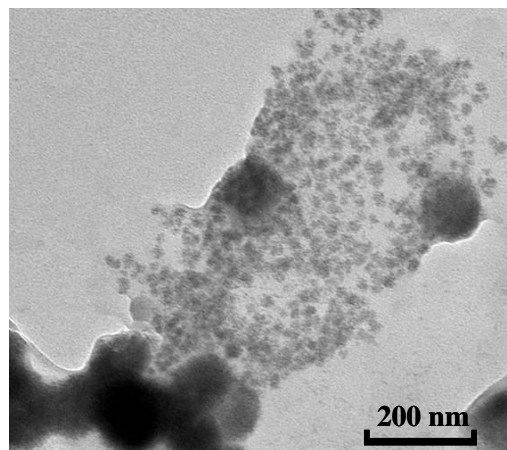


図 2 セレン化カドミウムを合成した 45 回目の植え継をした集積培養系の電子顕微鏡写真

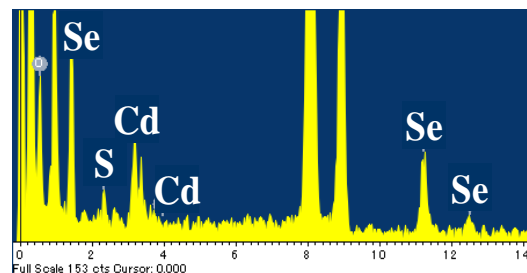


図 3 セレン化カドミウムを合成した 45 回目の植え継をした集積培養系の EDX スペクトル

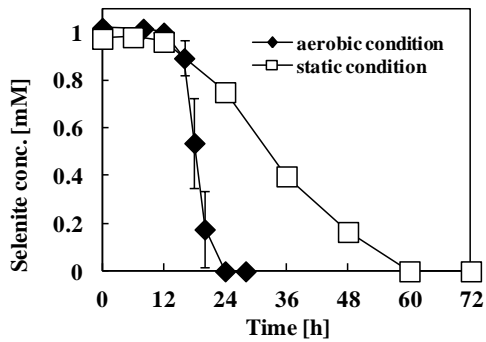


図 4 RB-R 株による好気条件ならびに静置条件における亜セレン酸の還元

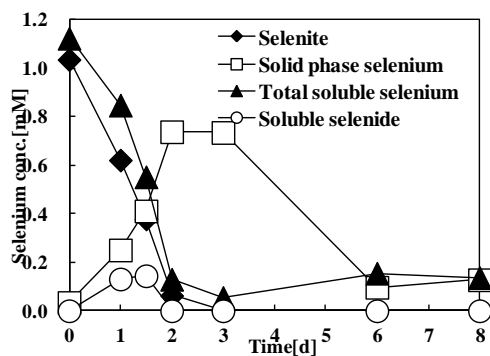


図 5 RB-R 株による静置条件におけるセレンの化学形態の変化

が確認された。また、透過型電子顕微鏡観察により、細胞の内部または表面に 10-20 nm の微粒子が蓄積していることが観察された (図 2)。抽出した微粒子の元素分析では Se/Cd 比が 1.22 と良好な値を示したことから (図 3)、集積系 A はセレン化カドミウムを合成できる微生物集積系であることが示唆された。

(2) セレン化カドミウム合成微生物の特徴づけ

嫌気条件では、初期菌体濃度を高く設定した場合でも、亜セレン酸はほとんど還元されなかった。また、好気条件では、静置条件よりも還元速度が 1 オーダー高く、RB-R 株による亜セレン酸の還元は酸素によって促進されることが示唆された (図 4)。そこで、1mM ずつの亜セレン酸とカドミウムを添加した培地で RB-R 株を好気培養したところ、72 時間後には、亜セレン酸が完全に除去され、カドミウムも 73% が水相から除去された。一方、亜セレン酸を添加しない培地では、水相のカドミウム濃度は減少しなかった。このことから亜セレン酸の好氣的な微生物還元において中間体として生成される有機態セレン化合物 (Se^2) が、カドミウムと反応する

ことでセレン化カドミウムが合成されたと考えられた。

また、RB-R 株による亜セレン酸還元に伴うセレンの挙動を調査したところ、亜セレン酸の還元における中間物質と考えられる水溶性セレン化物 (Se^2) が培養 1-2 日目に検出された。元素態セレン (Se^0) 濃度は、3 日目まで増加した後に減少したことから、元素態セレンはガス態であるメチル化セレンへ還元され、8 日目には初期亜セレン酸濃度の約 74-76% が気相に移動していたことが示唆された (図 5)。以上のように、亜セレン酸の好気還元と微好気条件下での元素態セレンの還元・気化が集積系におけるセレン化カドミウム合成の要因であったことが推察された。

(3) RB-R 株が合成するセレン化カドミウム粒子の特徴付け

溶菌処理を施した粒子の XRD 分析の結果、セレン化カドミウム、もしくは元素態セレンに特有の 3 つの主要なピークが見られたが、ブロードであったため、生成粒子が元素態セレンであるか、あるいはセレン化カドミウムであるか、判別がつかなかった (図 6)。セレン化カドミウム膜は 400°C、4 時間、空気雰囲気の中でアニール処理を施すことで、セレン化カドミウムに特有の六方晶ウルツ鉱型構造に由来するシャープな回折ピークが得られることが報告されている。

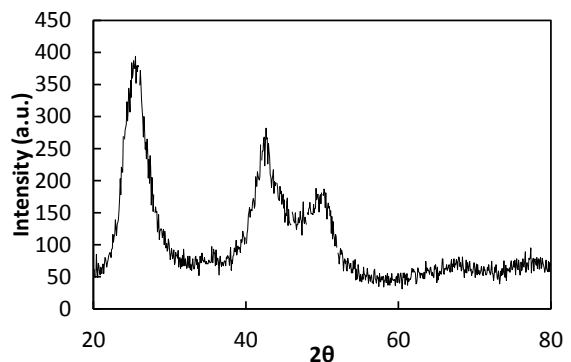


図 6 RB-R 株が合成する粒子の XRD 分析

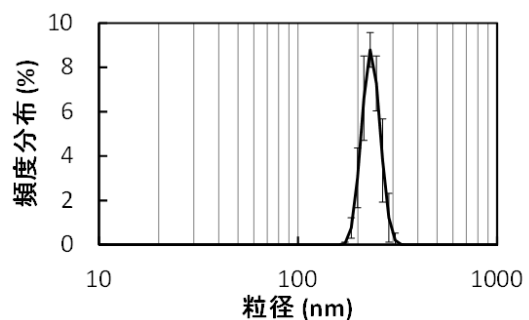


図 7 RB-R 株によって生成された粒子の粒度分布

粒度分布測定の結果、RB-R 株によって生成された粒子は粒径が約 200 nm 程度であった。溶菌処理を施した粒子は、図 7 のように微小粒子が凝集しやすく、200 nm 程度の大きな塊として存在していることが示唆された。ただし、理想的な相関がとれず、測定精度はよくなかった。測定に用いた試料濃度が小さかったこと、あるいは粒径にばらつきが多かったことなどが原因として考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① Soda, S., Miyake, M., Sakaguchi, T., and Ike, M. Enrichment of and characterization of bacteria for cadmium selenide. Synthesis. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011 年 9 月 7 日, 札幌コンベンションセンター(北海道)
- ② 三宅将貴, 寺澤加奈子, 清和成, 惣田訓, 池道彦. セレン化カドミウム合成微生物の土壌試料からの集積培養. 第 62 回日本生物工学会大会, 2010 年 10 月 28 日, 宮崎シーガイア(宮崎市)
- ③ Miyake, M., Terasawa, K., Sei, K., Soda, S., and Ike, M. Enrichment of bacteria from soil samples for biosynthesis of CdSe nanoparticles. The 2nd International Conference. Research Frontiers in Chalcogen Cycle Science and Technology, 2010 年 5 月 25 日, UNESCO-IHE (デルフト・オランダ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

惣田 訓 (SOUDA SATOSHI)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：30322176

(2) 研究分担者

池 道彦 (IKE MICHIIKO)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：40222856

清 和成 (SEI KAZUNARI)
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号：80324177
平成 22 年度まで研究分担者

(3) 連携研究者

()

研究者番号：