

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：32692

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760719

研究課題名(和文)放射性核種の除去・回収のためのバイオフィーム修飾カラム電極電解法の開発

研究課題名(英文)Development of column electrolysis with biofilm for removal and recovery of radionuclides

研究代表者

鈴木 義規 (SUZUKI, Yoshinori)

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号：20455281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：放射性核種の一つであるSe-79の迅速な除去・回収を目的として、様々な金属イオンを還元回収することのできる微生物*Shewanella putrefaciens*を修飾したカラム電極電解法の開発を行った。はじめに、*S. putrefaciens*のバイオフィームを作製し、これが亜セレン酸を還元し、元素セレンとしてバイオフィームに固定化することを見出した。次に、このバイオフィームをカラム電極の作用電極であるグラッシ-カーボン繊維電極上に作製する手法を確立した。このカラム電極を用いて、亜セレン酸のフロー還元実験を行ったところ、元素セレンの赤色沈殿が生じ、セレンを迅速に還元回収できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We developed biofilm-modified column electrolysis for rapid removal of radioactive selenium-79. We found that biofilms of *Shewanella putrefaciens*, which is an iron-reducing microorganism, can reduce selenite to elemental selenium and immobilize it on the biofilms. We established a method for making biofilms of *S. putrefaciens* on GC fiber electrodes of a column electrolysis cell. Flow electrolysis of a selenite solution with the biofilm-modified GC fiber electrodes was conducted. As the results, selenite was removed from the solution as elemental selenium. The results indicating a possibility of the rapid removal of selenium.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学・原子力学

キーワード：バイオフィーム 亜セレン酸 カラム電極

1. 研究開始当初の背景

微生物の中には、有機物を酸化して受け取った電子を水溶液中の金属イオンに渡し、還元させるものがある。このような微生物の金属還元能を利用した、有害または有用金属の回収法が世界的に広く研究されている。この手法はイオン交換樹脂や抽出剤を用いた手法より経済的である。また、汚染サイトに従来生存している微生物を用いれば、金属除去後の水を環境に戻した場合の環境負荷を少なくできるため、有害金属で汚染された水系の修復技術として注目されている。しかし、放射性核種で汚染された環境水など、迅速な処理が求められるケースでは、微生物の代謝による還元除去では時間がかかることが問題点としてあげられる。また、有用金属の回収として用いる場合には、還元して生じた金属は、微生物表面あるいは微生物内に固体として存在するため、その後の再利用には微生物から金属を分離する必要がある、これには煩雑な工程を要する。これらの問題点は微生物還元による有害・有用金属除去・回収の適用範囲を大きく制限する要因になっている。

一方、電気化学的還元による金属の回収では、これらの微生物のもつ金属還元酵素を電極表面に修飾し、還元速度を高める研究が行われてきた。しかし、電極上に修飾されたタンパク質はわずかな溶液条件の変化によっても容易に失活してしまい、その利用は限定的である。

そこで本研究では、高い金属還元能を有する微生物をバイオフィームという形態で電極に固定化し、フロー電解法と組み合わせることにより、これらの問題点を克服できると考えた。バイオフィームは、環境中における微生物の存在形態の一種であり、微生物が固体表面にフィルム上に高濃度で吸着し、微生物と微生物の間の空間が細胞外高分子物質 (extracellular polymeric substances: EPS) によって埋められている状態である。具体的には、フロー式電解法の一つであるカラム電解法の繊維電極上に微生物のバイオフィームを形成させ、バイオフィーム修飾電極による金属の還元回収法を開発する。

2. 研究の目的

本研究では、様々な金属還元能を有する微生物のバイオフィームとフロー電解法であるカラム電極電解法を組み合わせた新規な放射性核種の回収法を開発することを目的とした。これにより、従来の微生物代謝を利用した金属の回収法の欠点である処理速度の遅さと、酵素修飾電極を用いた電解による金属の回収法の欠点である酵素活性の不安定さを同時に克服し、その適用範囲を広げることが可能になる。

3. 研究の方法

(1) *Shewanella putrefaciens* のバイオフィームによる亜セレン酸およびセレン酸の還元

金属還元菌の一種である *Shewanella putrefaciens* のバイオフィームをカバーガラス上に作製し、セレン酸および亜セレン酸の還元能を調べた。24 ウェル型のマイクロプレートに丸型カバーガラスを入れた後、好気性培地 1 mL を入れ、*S. putrefaciens* の培養液を 0.1 mL 加え、ふたをした。これを 30 °C で静置培養した。1 週間程度培養し、顕微鏡でバイオフィームが形成されたのを確認したのち、培地を取り除き、1 mM の亜セレン酸溶液、またはセレン酸溶液を加えた。マイクロプレートを酸素吸収材と一緒に酸素不透過性プラスチックバッグに入れ、還元雰囲気にし、30 °C で静置培養した。元素セレンの沈殿の有無を確認し、沈殿が確認されたところで、バイオフィームの顕微鏡観察を行った。

(2) バイオフィーム修飾電極の作製

カラム電極の作用電極であるグラッシーカーボン (GC) 繊維電極上に *S. putrefaciens* のバイオフィームの作製を行った。次亜塩素酸溶液を流してカラム電極セル内を滅菌し、その後滅菌水を流し、洗浄した。乳酸ナトリウムを電子供与体とした培地に *S. putrefaciens* の培養液を加えたものを流した。このとき GC 繊維電極の電位を +0.5 V (Ag/AgCl) に保ち、電極を電子受容体とした。3 日後、GC 繊維電極を取り出し、クリスタルバイオレット (CV) で染色した後、顕微鏡で観察した。

(3) バイオフィーム修飾電極による亜セレン酸の電気化学測定

作製したバイオフィーム修飾電極を用いて、亜セレン酸および乳酸ナトリウムの混合溶液中におけるサイクリックボルタンメトリー (CV) 測定を行った。また溶液を流しながら電位を掃引するフロー電解法を行った。

4. 研究成果

(1) *S. putrefaciens* のバイオフィームによる亜セレン酸およびセレン酸の還元

カバーガラス上に作製したバイオフィームを CV で染色し、顕微鏡で観察したところ、フィラメント状の細胞外ポリマー (EPS) によって、細胞がカバーガラス表面に密に固定化されていることが明らかになった。

このバイオフィームと亜セレン酸溶液およびセレン酸溶液とを嫌気条件で反応させたところ、亜セレン酸ではバイオフィーム上に赤色沈殿が生じたが、セレン酸では沈殿の生成はみられなかった。亜セレン酸溶液で生じた赤色沈殿を顕微鏡で観察した結果、沈殿は、バイオフィーム上に固定化されていることがわかった。また、X 線吸収端スペクトルで解析した結果、赤色沈殿は元素セレンであることがわかった。以上のことから、*S. putrefaciens* のバイオフィームは、亜セレン酸

を還元し、元素セレンとしてバイオフィルム上に固定化するが、セレン酸は固定化できないことがわかった。

(2) バイオフィルム修飾電極の作製

カラム電極の作用電極である GC 繊維電極の電位を +0.5 V に保ち、乳酸ナトリウムを含む *S. putrefaciens* の培養液を流した。培養液を流してからしばらくすると、徐々に微生物活動に由来する電流が増加し、バイオフィルムの形成が示唆された。3 日後に、GC 電極を取り出し、CV で染色後、顕微鏡で観察したところ、電極表面に紫色の膜が観察された。以上の結果から、GC 繊維電極上にバイオフィルムが形成され、そこで酸化還元反応が行われている可能性が示唆された。

(3) バイオフィルム修飾電極による亜セレン酸の電気化学測定

作製したバイオフィルム修飾電極を用いて、亜セレン酸水溶液中におけるサイクリックボルタモグラムの測定を行った。バイオフィルム中の微生物が触媒として働き、亜セレン酸の還元電流が観測されるかを試したが、還元電流は観測されなかった。また、亜セレン酸水溶液をカラム電極に流しながら電位を掃引させるフロー電解を行ったが、同様に還元電流は観測されなかった。しかし、カラム電極から出てきた亜セレン酸水溶液を再びカラム電極へ導入し、循環させたところ、数時間後にカラム電極中に赤色沈殿が見られるようになった。これは、GC 繊維電極上のバイオフィルムにより亜セレン酸が還元された可能性を示唆しており、今後、電極電位や流速などを最適化することにより、迅速な亜セレン酸の回収ができる可能性が示唆された。

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 3 件)

Y. Suzuki, Y. Sakama, H. Saiki, A. Kitamura, H. Yoshikawa, K. Tanaka, "Immobilization of selenium by biofilm of *Shewanella putrefaciens* with and without Fe(III)-citrate complex", 査読有, J. Nucl. Sci. Technol. 51(1), 108-115 (2014).

Y. Suzuki, T. Nankawa, T. Ohnuki, "Redox behavior of U(VI) adsorbed onto a phosphate-modified indium tin oxide electrode", 査読有, Chem. Lett., 42(8), 888-890 (2013).

Y. Suzuki, M. Kuchida, Y. Sakama, H. Saiki, I. Karube, N. Tsubaki, "Promotion effect of the addition of Eu to Co/silica catalyst for Fischer-Tropsch synthesis", 査読有, Catal. Commun., 36, 75-78 (2013).

[学会発表](計 11 件)

Y. Suzuki, Y. Sakama, H. Saiki, A. Kitamura, H. Yoshikawa, "Reductive immobilization of selenite by biofilm", The 15th ASRC International Workshop, Fukushima, Japan, November 12-13 (2013). (Invited)

Y. Suzuki, N. Kozai, T. Ohnuki, 5th Asia-Pacific Symposium on Radiochemistry, "Biomining of uraninite and uranyl phosphate controlled by organic acids", Kanazawa, Japan, September 22-27, 2013.

Y. Suzuki, H. Saiki, A. Kitamura, H. Yoshikawa, "Reduction of selenite by biofilms of an iron-reducing bacterium", Migration 2013, Brighton, UK, September 8-13, 2013.

Y. Suzuki, H. Saiki, A. Kitamura, H. Yoshikawa, "Immobilization of selenium by biofilms of *Shewanella putrefaciens*", Goldschmidt 2013, Florence, Italy, August 25-30, 2013.

坂間洋介, 新沼綱騎, 鈴木義規, 齋木博, 北村暁, 吉川英樹, 「幌延地下坑道より採取したバイオフィルムによる亜セレン酸の還元」, 日本原子力学会「2013 年秋の大会」, 2013 年 9 月 3 - 5 日, 八戸工業大学 (青森県).

鈴木義規, 北村暁, 吉川英樹, 齋木博, 「鉄還元菌バイオフィルムによるセレンの化学状態変化」, 第 47 回日本水環境学会年会 2013 年 3 月 11 - 13 日, 大阪工業大学 (大阪府).

水沼環, 田中崇之, 鈴木義規, 齋木博, 「鉄呼吸微生物による不溶性鉄酸化物の還元」, 2012 年度日本地球化学会第 59 回年会, 2012 年 9 月 11 - 13 日, 九州大学 (福岡県).

鈴木義規, 北村暁, 吉川英樹, 齋木博, 「鉄還元菌のバイオフィルムにおける亜セレン酸の還元」, 日本原子力学会「2012 年秋の大会」2012 年 9 月 19 - 21 日, 広島大学 (広島県).

青木俊太郎, 笹沼拓史, 齋木博, 鈴木義規, 「海洋性微生物によるパラジウムの還元」, 第 64 回日本生物工学会大会, 2012 年 10 月 23 - 25 日, 神戸国際会議場 (兵庫県).

鈴木義規, 陳志華, 齋木博, 「固定化微生物を用いた亜硝酸還元触媒の作製」, 第 64 回日本生物工学会大会 2012 年 10 月 23 - 25 日, 神戸国際会議場 (兵庫県).

Y. Suzuki, T. Ohnuki, "Reduction of uranium and selenium by *Shewanella putrefaciens*", The 14th ASRC International Workshop, Tokai, Japan, March 12-13 (2012). (Invited)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 義規 (SUZUKI, Yoshinori)

東京工科大学・応用生物学部・助教

研究者番号：20455281