

## 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25年6月7日現在

機関番号：14401  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22310047  
 研究課題名（和文） バイオボラタリゼーションを利用した排水・廃棄物からのレアメタル回収技術の開発  
 研究課題名（英文） Development of minor-metal recovery technology using biovolatilization from waste and wastewater  
 研究代表者  
 池 道彦（IKE MICHHIKO）  
 大阪大学大学院・工学研究科・教授  
 研究者番号：40222856

研究成果の概要（和文）：微生物によるレアメタルのバイオボラタリゼーション作用を利用した排水・廃棄物からのレアメタル回収技術の開発を行った。レアメタルの一種であるセレンを高効率で気化させる NT-I 株を用いてバイオリクターを作製し、水相に含まれるセレンの66%を除去するとともに、純度の高いセレン溶液として回収することに成功した。また、亜テルル酸耐性細菌3株を単離し、それらの持つテルル気化能力を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The technology for minor-metal removal and recovery from waste and wastewater using minor-metal volatilizations by microbe was developed. Bioreactor using strain NT-I, capable of an efficient volatilization of selenium, successfully removed 66 % of initial selenium in water phase, and recovered it as selenium solution of high purity. Three tellurite-tolerant bacterial strains were isolated, and their capabilities of tellurium volatilization were revealed.

### 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,320,000	1,920,000	10,240,000
2011年度	6,890,000	1,590,000	8,480,000
2012年度	3,120,000	720,000	3,840,000
年度			
年度			
総計	18,330,000	4,230,000	22,560,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：リサイクル技術、レアメタル回収、バイオボラタリゼーション

### 1. 研究開始当初の背景

近年の先端科学産業では多様なレアメタルが利用されており、産業のビタミンと呼ばれるように、必須の材料となってきた。一方、レアメタルはその名の示す通り、地殻中の存在量が比較的少なく、ほとんどの元素がベースメタルの鉱石に微量に含まれた状態で存在していることから、採掘や精錬、分離精製が技術的に困難であり、資源としての枯渇が懸念されている。さらに、ほとんどの

レアメタルは中国、アフリカ、ロシア、南北アメリカなどの特定の国に偏在しており、これらの国々を含め、世界各国で資源の自国内への囲い込み（資源ナショナリズム）の動きも出てきていることから、世界でも有数の各種レアメタル消費大国である我が国において、その安定供給に向けた対策が必要とされている。

このような世界的な流れを受けて、我が国では2007年度から経済産業省や文部科学省、

科学技術振興機構などが、希少・有害金属の使用量を極限まで減少させるとともに、より豊富で無害な金属類で機能を代替したり、その循環利用・再生を促進する技術を駆使することによって、金属類資源の永続的利用、および環境の保全・再生や豊かな社会構築への寄与を目指す『元素戦略』を打ち出し、その実現に向けた体系的な取り組みが始まったところである。

このうち、循環利用については、1980年代より、都市ごみとして大量に投棄、廃棄される家電製品などの中に存在する資源に着目した都市鉱山という概念のもと、主に製品等からの回収技術の開発が進められてきたが、多様なマトリクスを持つ排水や焼却灰等を含めた無分別廃棄物からの回収は、主に経済性の制約から、これら既存の物理化学的技術では困難、もしくは不可能とされている。結果として、PRTR データに基づくと、レアメタル生産・消費・廃棄の工程で採掘量の10%以上が失われていると試算される。持続的な資源利用を行うためには、排水や無分別廃棄物からもレアメタルを回収することのできる、実用的な効率と経済性を有する技術の開発が求められる。

我々の研究チームは、レアメタルが比較的低濃度で他の多様な物質と混在して存在している排水・廃棄物からの回収を可能とする技術として、特殊微生物の金属代謝作用を利用するメタルバイオテクノロジーを提案している。生物の選択的なレアメタル代謝作用を利用することで、排水・廃棄物からの経済的な回収技術になり得るものとのコンセプトに基づいた新たな環境・資源技術である。

微生物による各種レアメタル代謝作用の中でも、生物気化（バイオボラタリゼーション）は、メタルバイオでの利用が期待されている作用の一つであり、セレン（Se）、テルル（Te）、アンチモン（Sb）、ビスマス（Bi）等のレアメタルを微生物によりメチル化や水素化することで気化し、水相・固相から分離・回収する技術に応用することができる。

我々は、平成19年度に実施した近畿経済産業局地域新生コンソーシアム研究開発事業（地域コンソ）で、水中に存在するSeの酸化物イオンを好気条件下で還元し、元素態Seとして不溶化する微生物（*Pseudomonas stutzeri* NT-I株）を取得し、実工場排水を対象として、元素態Seを微生物体内に30%以上の高含量で回収する（バイオSe）ことに成功したが、このバイオSeを資源として再利用するためには、焙焼によって純度の高い亜セレン酸液とした上で、亜硫酸ナトリウムなどの還元剤によって金属Seとする工程が必要となった。ここでバイオSeを焙焼すると、その分解によるタール成分が生成し、得られる金属Seの純度が低下することが問題であ

った。一方、NT-I株はその後の検討で、元素態Seをメチル化し気化する能力を有することが示された。この反応を利用すれば、焙焼工程を経ずに極めて純度の高いメチル化Seが得られ、単純な酸化反応で高純度亜セレン酸液を得られることから、上述の焙焼工程における問題を解決でき、排水・廃棄物から短い工程で金属Seを得られるものとして、本研究を着想した。なお、文献検索では、地科学研究より、Se以外にも、Te、Sb、Biなどのレアメタルも気化作用を受けることが知られている。これらの反応を触媒する微生物の分離に成功すれば、レアメタルの金属としての回収プロセスそのものは同一であることから、適用範囲は大きく拡大される。

## 2. 研究の目的

本研究は、バイオボラタリゼーションを利用して、現状では回収されていない排水中・廃棄物中のレアメタルを回収する現実的な技術の開発を目指すものである。具体的な目標として、

(1) すでに液相・固相のSeをメチル化し気化できることを明らかにしているNT-I株をモデルとして、その気化のメカニズムや培養特性の検討に基づき、多様な排水・廃棄物からSeを気化させるためのバイオリクター、および気化されたSeガスを回収するガスフィルターユニットをラボスケールで構築しその性能を確認する、

(2) Se以外にも気化回収の可能性がある、Te、Sb、Bi等のレアメタルのボラタリゼーションを触媒できる有用金属代謝微生物を検索し、ライブラリ化して、多様な鉱種に本技術を展開するための広範な微生物触媒の採取を試みる。また、本技術を適用可能な排水・廃棄物の選定を行う、ことを掲げる。

## 3. 研究の方法

(1) NT-I株のSe気化作用を活用したSe気化回収バイオリクターの構築

### ① NT-I株のSe気化特性

NT-I株の前培養液5 mLを300 mL容の三角フラスコに分注した100 mLのTSB培地（セレン酸(Se(+VI))、亜セレン酸(Se(+IV))、または元素態Seを終濃度1 mMとなるように添加）に植種し、好気条件下、28°C、120 rpmで培養した。培養液中のSe(+VI)、Se(+IV)、元素態Se、全水溶性Seを経時的に測定した。

### ② 揮発性Se化合物の同定

1 mMのSe(+VI)を含む50 mLのTSB培地を密封した500 mL容ロットビンに分注し、NT-I株を28°C、120 rpmで培養した。経時

的に気相部をシリンジで抜き出し、速やかに GC/MS 分析を行った。

### ③ Se 気化回収バイオリアクターの作製と試行

Se 気化回収バイオリアクターの概略図を図 1 に示す。5 L 容ジャーフェーマンターに 3 L の TSB 培地を分注して、NT-I 株の菌体懸濁液 30 mL および Se(+VI) を終濃度 0.5 mM となるように添加し、38°C、pH9.0、攪拌速度 250 rpm、通気量 1 L/min の条件で培養を行った。排気に含まれる揮発性 Se 化合物は、Winkel et al. (2009) の方法を一部改変して捕捉した。すなわち、排気に含まれる水蒸気の影響を緩和するためにジャーフェーマンターからの排気を空の 250 mL 容ボトルに通した後、250 mL 容ガラス製ボトルに分注した 150 mL の 70%硝酸にエアーストーンを通して通気した。

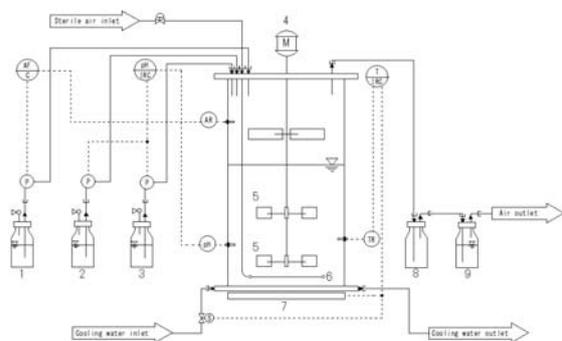


図 1 Se 気化回収バイオリアクターの概略図。

### (2) Te 気化微生物の取得と特徴付け

① 亜テルル酸耐性微生物による Te 気化特性  
亜テルル酸(Te(+IV))耐性細菌である TI-1 株、TI-2 株、及び TI-3 株をそれぞれ、300 mL 容三角フラスコに分注した 100 mL の TSB 培地(1 mM の Te(+IV)を含む)に OD<sub>600</sub> が 0.02 となるように懸濁し、好気条件下、28°C、120 rpm で培養した。経時的に培養液を採取し、培養液中の Te(+IV)、元素態 Te、および全水溶性 Te を測定し、培養系内での Te のマスバランスを取ることで、Te の揮発化能を評価した。

### ② 揮発性 Te 化合物の同定

1 mM の Te(+IV)を含む 20 mL の TSB 培地を密封した 500 mL 容ロットビンに分注し、TI-1 株、TI-2 株、及び TI-3 株を 28°C、120 rpm で 24 時間培養した。気相部をシリンジで抜き出し、速やかに GC/MS 分析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) NT-I 株の Se 気化作用を活用した Se 気化回収バイオリアクターの構築

#### ① NT-I 株の Se 気化特性

排水や廃棄物抽出液中において、Se は主に Se(+VI)や Se(+IV)の形態で存在する。そこで、NT-I 株によるこれらイオンからの Se 気化能力を調べた (図 2A, B)。その結果、NT-I 株は、Se(+VI)、Se(+IV)のいずれについても速やかに還元することで水相から固相へ Se を移行させた。その後、固相及び水相に存在する Se は徐々に減少し、Se(+VI)初期添加量に対して 88%、また Se(+IV)初期添加量に対して 86%が培養系内から消失したことから、著量の Se が気化したものと考えられた。さらに、廃棄物中の固相 Se の直接回収を想定して、元素態 Se からの Se 気化能力を調べた(図 2C)。その結果、144 時間の反応を経て、初期に添加した元素態 Se の 75%が、気化反応により培養系内から消失した。以上の結果より、NT-I 株は排水や廃棄物抽出液、さらには固形廃棄物に含まれる Se を気化させるポテンシャルを持つことが示唆された。

#### ② 揮発性 Se 化合物の同定

気化した Se を回収するためには、気化 Se がどのような特性を持つ分子種であるかを特定することが必要である。そこで、NT-I 株が Se (+VI)を添加した NT-I 株培養液の気相部に存在する揮発性 Se 化合物を GC/MS 分析によって分離同定した結果、主な含 Se 化合物として Dimethyl selenide (DMSe)、Dimethyl diselenide (DMDS)、また、含硫化合物として methane thiol (MeSH)、Dimethyl disulfide (DMDS)、さらには、Se 及び硫黄を共に含む Dimethyl selenyl sulfide (DMSeS)が検出された。また、定量分析の結果、気相部における主要な揮発性 Se 化合物は DMDS であることが示された。これより、Se の気化産物はいずれもメチル化物であり、特に DMDS をターゲットとして Se 回収方法を設計すべきであることが明らかとなった。

### ③ Se 気化回収バイオリアクターの作製と試行

各種培養条件を厳密に制御することが可能なジャーフェーマンターと、DMDS を酸化することにより回収可能であることが報告されている濃硝酸トラップシステムを組み合わせ、ラボスケールの Se 気化回収バイオリアクターを作製した。このリアクターを用いた Se 気化回収試験の結果を図 3 に示す。Se(+VI)として培養液に添加した水溶性 Se は、培養開始 8 時間で固相 Se に変換された。

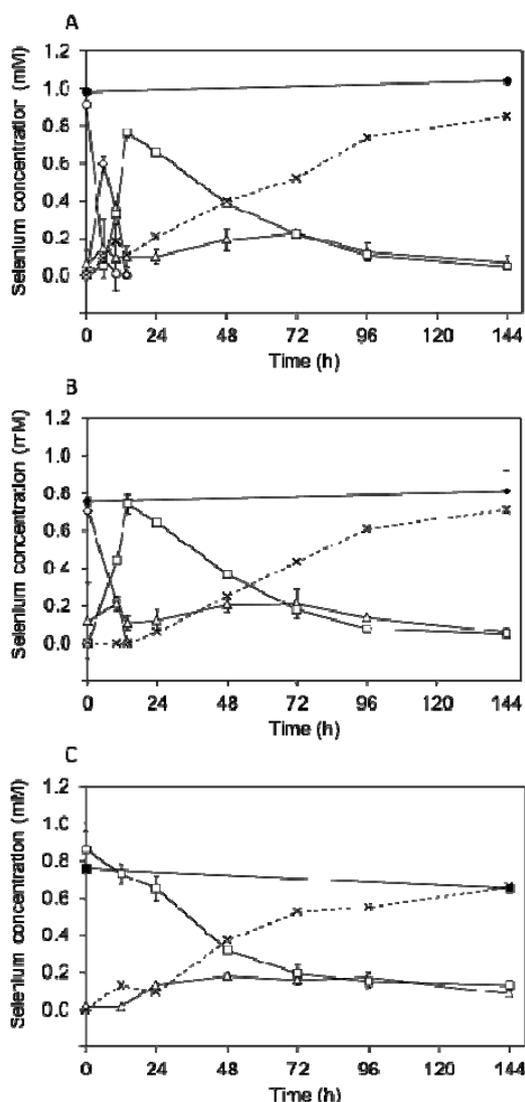


図2 NT-I株によるSe気化. A, Se(+VI); B, Se(+IV); C, 元素態Se. ○, Se(+VI); ◇, Se(+IV); △, 未知水溶性Se; □, 固相Se; ×, 系内から消失したSe.

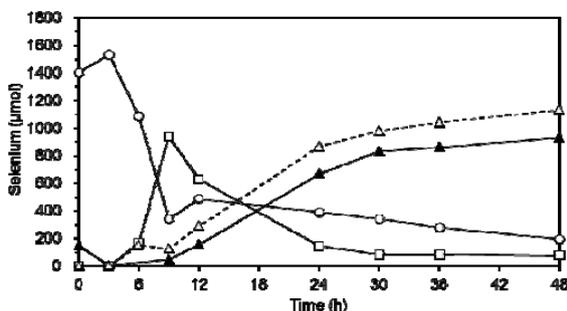


図3 バイオリアクターによるSe気化回収試験. ○, 水溶性Se; □, 固相Se; △, ジャーフェーマンターから消失したSe; ▲, 濃硝酸中にトラップされたSe.

その後、培養開始48時間後までにSeは徐々にジャーフェーマンター系内から消失し、それに伴って濃硝酸中にSeはトラップされた。この時の気化速度は、フラスコでの培養結果(図1)と比較して2倍以上速く、培養条件の制御によってNT-I株が高い性能を発揮したものとと言える。

培養開始48時間後におけるSeのマスバランスを図3に示す。培養開始時に水相に添加したSeのうち19%は固相及び液相に残留し、15%はリアクター系外に失われたものの、66%は気化した後に濃硝酸にトラップされたことから、大部分のSeが気化除去・回収できたものとと言える。さらなる回収率の向上のためには、培養条件の検討により固相及び液相への残留を低減すること、及びトラップ装置の改善によりリアクター系外への消失を低減することが必要と考えられた。

培養開始48時間後の濃硝酸中に存在する元素を測定したところ、Se(1,130 μmol)の他に硫黄(3,180 μmol)及びケイ素(110 μmol)が検出され、その他の元素は検出限界以下だった。硫黄は、NT-I株培養系の気相部から検出された含硫化合物由来であると考えられる。また、ケイ素については実験装置のガラスから溶出したものであると考えられ、装置の改善により除去可能であると考えられる。硝酸中からのセレンの精製は今後の課題であるが、メチル化Se、硝酸、メチル化硫黄の単純な化合物から成る溶液からのセレンの精製は、以前に我々が検討したバイオSeからの金属Seの精製と比較して容易であるものと推測される。

以上より、本研究によりレアメタルの一種であるSeを排水・廃棄物系から気化回収可能なバイオリアクターの基礎が完成したものとと言える。

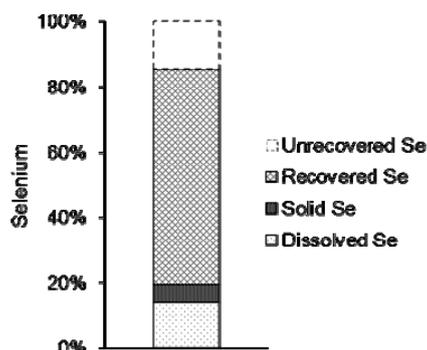


図4 バイオリアクター試験終了時におけるSeのマスバランス.

## (2) Te気化微生物の取得と特徴付け

### ① Te気化微生物の取得と気化特性

金属精錬工場排水溝から採取した底泥水

より作製した集積培養系から、Te(+IV)に耐性を持つ菌株として、TI-1 株、TI-2 株、及び TI-3 株を単離した。1 mM の Te(+IV)を含む培地でこれら 3 菌株を培養した結果を図 4 に示す。全ての系で、24 時間以内にほぼ全ての Te(+IV)が液相から除去され、元素態 Te として固相に移行した。その後、TI-1 株では元素態 Te が酸化され、再び Te(+IV)が生じた。培養終了後に液相及び固相に残留した Te は 97%、81%、及び 76%であったことから、それぞれ 3.1%、19%、及び 24%の Te が気化により水相から除去されたことが示唆された。これら 3 菌株の Te 気化能力は十分に高くはないものの、ある程度の気化は確認されたことから、培養条件の検討等により気化速度・気化効率改善することができれば、工業的な Te 気化除去回収バイオリアクターに応用できる可能性があると考えられる。

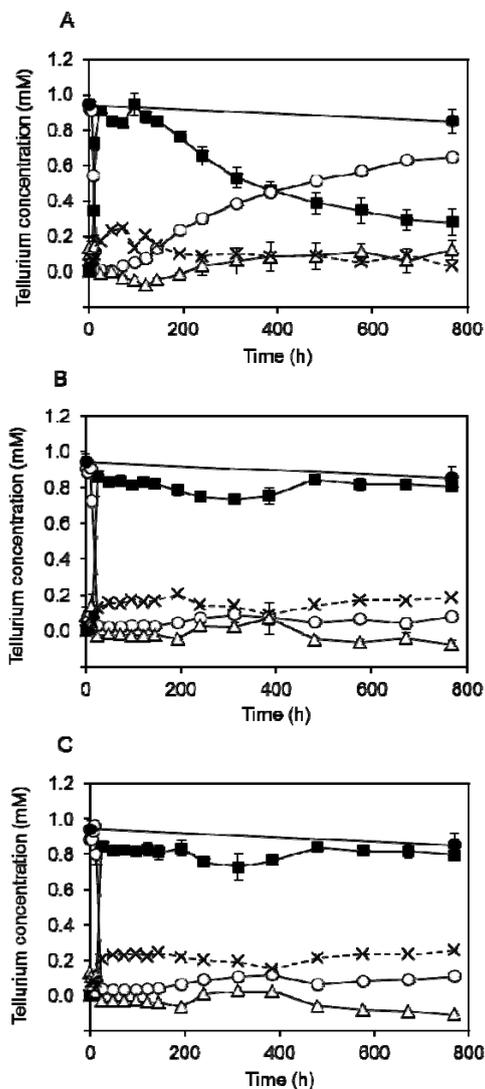


図 4 TI-1 株(A), TI-2 株(B), 及び TI-3 株による Te(+IV)還元と Te 気化. ○, Te(+IV); △, 未知水溶性 Te; □, 固相 Te, ×, 系内から消失した Te.

## ② 揮発性 Te 化合物の同定

TI-1 株、TI-2 株、及び TI-3 株の培養液の気相部に存在する揮発性 Te 化合物を GC/MS 分析によって分離同定した結果、いずれの株の培養液気相部からも主な含 Te 化合物として Dimethyl telluride (DMTe)、Dimethyl ditelluride (DMDTe)が検出された。また、含硫化合物として MeSH、DMDS が検出された。さらには、TI-2 株及び TI-3 株の気相部からは Te 及び硫黄を共に含む Dimethyl tellurenyl sulfide (DMTeS)が検出された。以上より、NT-I 株による Se 気化と同様に、Te もこれら 3 菌株によるメチル化反応により気化することが明らかとなり、メチル化反応は微生物によるレアメタルバイオポラタリゼーションにおいて大きな役割を果たしているものと考えられた。

## 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 4 件)

① Kagami, T., Narita, T., Kuroda, M., Notaguchi, E., Yamashita, M., Sei, K., Soda, S., Ike, M. Effective selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from the aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. *Water Research* 47: 1361-1368 (2013) 査読有

② Kagami, T., Fudemoto, A., Fujimoto, N., Notaguchi, E., Kanzaki, M., Kuroda, M., Soda, S., Yamashita, M., Ike, M. Isolation and characterization of bacteria capable of reducing tellurium oxyanions to insoluble elemental tellurium for tellurium recovery from wastewater. *Waste and Biomass Valorization* 3: 409-418 (2012) 査読有

③ Soda, S., Takahashi, H., Kagami, T., Miyake, M., Notaguchi, E., Sei, K., Iwasaki, N., Ike, M. Biotreatment of selenium refinery wastewater using pilot-scale granular sludge and swim-bed bioreactors augmented with a selenium-reducing bacterium *Pseudomonas stutzeri* NT-I. *Japanese Journal of Water Treatment Biology* 48: 63-71 (2012) 査読有

④ Kuroda, M., Notaguchi, E., Sato, A., Yoshioka, M., Hasegawa, A., Kagami, T., Narita, T., Yamashita, M., Sei, K., Soda, S., Ike, M. Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **112**: 259-264 (2011) 査読有

〔学会発表〕(計11件)

① 樋口靖典、三輪恵美子、黒田真史、惣田訓、池道彦、*Pseudomonas stutzeri* NT-Iによる亜セレン酸還元および揮発性セレン生成に及ぼす通気条件および培地成分の影響、2012.11.25、北里大学

② 黒田真史、成田尚宣、三輪恵美子、鏡つばさ、惣田訓、山下光雄、池道彦、*Pseudomonas stutzeri* NT-Iを用いた水相からのセレン揮発化除去・回収プロセスの試行、2012.10.25、神戸国際会議場

③ Kagami, T., Fudemoto, A., Fujimoto, N., Notaguchi, E., Kanzaki, M., Soda, S., Yamashita, M., Ike, M. Isolation and characterization of bacteria capable of reducing tellurium oxyanions to insoluble elemental tellurium, Eco-mates 2011, 2011.11.28, ホテル阪急エキスポパーク

④ Miwa, E., Kuroda, M., Notaguchi, E., Sato, A., Yoshioka, M., Hasegawa, A., Kagami, T., Sei, K., Soda, S., Yamashita, M., Ike, M. *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of reducing selenate/selenite into elemental selenium and volatilizing them as methylated selenium; a versatile microbial agent for biotreatment/bioremediation of selenium contamination, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011.9.7, 札幌市産業振興センター

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

清和成 (SEI KAZUNARI)  
大阪大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：80324177  
(H22まで分担者として参画)

### (3) 連携研究者

山下光雄 (YAMASHITA MITSUO)  
芝浦工業大学・工学部・教授  
研究者番号：40220347