



微生物機能を活用した有用金属（Cu, Zn, Pd, Pt, Rh, Au）の湿式分離・回収に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2020-07-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 齋藤, 範三 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24729/00016967">https://doi.org/10.24729/00016967</a>

大阪府立大学博士論文

微生物機能を活用した有用金属  
(Cu, Zn, Pd, Pt, Rh, Au) の湿式分離・回収  
に関する研究

2020年2月

齋藤 範三

## 目 次

### 第1章 序論

1.1 緒言	1
1.1.1 ベースメタルの供給状況と分離・回収技術の必要性	1
1.1.2 貴金属・レアメタルの供給現状と分離・回収技術の必要性	3
1.2 既往の研究	8
1.2.1 バイオリーチング（バイオ浸出）	8
1.2.2 バイオソープション（バイオ吸着）	11
1.2.3 バイオミネラリゼーション（バイオ還元・析出）	16
1.3 本論文の目的と構成	22
References	25

### 第2章 好熱性・鉄/硫黄酸化古細菌 *Acidianus brierleyi* によるベースメタル (Cu、Zn) の浸出

2.1 緒言	33
2.2 実験方法	34
2.2.1 試料	34
2.2.2 浸出実験	36
2.3 実験結果および考察	39
2.3.1 海底熱水鉱石のバイオ浸出	39
(1) 銅および亜鉛の浸出挙動	39
(2) 鉛の浸出挙動	40
(3) ガリウムおよび金の浸出残渣への濃縮	41
(4) 銅および亜鉛の浸出速度に及ぼす操作因子の影響	42
(5) 陸上硫化鉱物のバイオ浸出との比較	44
2.3.2 低品位一次硫化鉱石のバイオ浸出	54
(1) 低品位一次硫化鉱石からの銅の選択的浸出	54
(2) 黄銅鉱の浸出機構	54
(3) カラム型固定層における銅のバイオ浸出	55
2.4 結言	60
References	62

### 第3章 還元細菌 *Shewanella oneidensis* による Pd(II)イオンの還元・析出

3.1 緒言	63
3.2 実験方法	65

3.2.1	微生物の培養	65
3.2.2	Pd(II)イオンのバイオ還元実験	65
3.2.3	分析方法	66
3.2.4	Pd 触媒の調製および触媒活性評価	67
3.3	実験結果および考察	68
3.3.1	<i>S. oneidensis</i> による Pd(II)イオンの還元・析出	68
3.3.2	Pd ナノ粒子のキャラクタリゼーション	73
3.3.3	バイオ調製 Pd 触媒の触媒活性評価	80
3.4	結言	85
	References	86
<b>第4章 還元細菌 <i>Shewanella algae</i> による Pt(IV)イオンの還元・析出</b>		
4.1	緒言	88
4.2	実験方法	89
4.2.1	微生物の培養	89
4.2.2	Pt(IV)イオンのバイオ還元実験	89
4.2.3	分析方法	90
4.3	実験結果および考察	91
4.3.1	<i>S. algae</i> による Pt(IV)イオンの還元・析出	91
4.3.2	Pt ナノ粒子のキャラクタリゼーション	93
4.4	結言	98
	References	99
<b>第5章 還元細菌 <i>Shewanella algae</i> および <i>Shewanella oneidensis</i> による Au(III)イオンの還元・析出</b>		
5.1	緒言	100
5.2	実験方法	101
5.2.1	微生物の培養	101
5.2.2	Au(III)イオンのバイオ還元実験	101
5.2.3	分析方法	102
5.3	実験結果および考察	103
5.3.1	<i>S. algae</i> による Au(III)イオンの還元・析出	103
5.3.2	<i>S. oneidensis</i> による Au(III)イオンの還元・析出	108
5.3.3	Au ナノ粒子のキャラクタリゼーション	110
5.4	結言	126
	References	128

## 第6章 パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* による Au(III)イオンの吸着および還元・析出

6.1 緒言	129
6.2 実験方法	130
6.2.1 微生物の培養	130
6.2.2 実験操作	130
(1) バイオ還元実験	130
(2) バイオ吸着実験	130
6.2.3 分析方法	131
6.3 実験結果および考察	131
6.3.1 <i>S. cerevisiae</i> による Au(III)イオンの還元・析出	131
6.3.2 <i>S. cerevisiae</i> による Au(III)イオンの吸着	135
6.4 結言	137
References	138

## 第7章 使用済み製品溶解液からの金・白金族金属のバイオ分離・回収

7.1 緒言	139
7.2 実験方法	140
7.2.1 微生物の培養	140
7.2.2 酸浸出液の調製	140
7.2.3 実験操作	142
(1) <i>S. cerevisiae</i> による Au(III)イオンの吸着	142
(2) <i>S. algae</i> による白金族金属イオンの還元・析出	142
(3) 連続操作によるバイオ還元・析出	143
7.2.4 分析方法	143
7.3 実験結果および考察	143
7.3.1 使用済み電子部品の酸浸出液からの Au(III)イオンのバイオ分離・回収	143
7.3.2 使用済み自動車触媒からの白金族金属イオンのバイオ分離・回収	146
7.4 微生物機能を利用した貴金属・レアメタルのリサイクルフロー	154
7.5 結言	156
References	157

## 第8章 結論

謝辞	164
----	-----

# 第1章 序論

## 1.1 緒言

金属資源は、我が国の国富を生み出す産業基盤の維持に不可欠であり、特に近年においては省エネルギー・再生可能エネルギー分野での活用も期待される。一方、世界的な資源ナショナリズムの台頭や資源確保競争の激化など、金属資源を巡る国際情勢は益々厳しさを増しており、金属資源の大半を海外に依存している我が国にとって、その安定的かつ安価な供給の確保は、日本の産業基盤の維持および経済の持続的な発展のためにより一層重要となっている。

### 1.1.1 ベースメタルの供給状況と分離・回収技術の必要性

産業の基礎資材として利用される、銅、鉛、亜鉛、アルミニウム、スズ等のベースメタルは、製造業のみならず住宅建築やインフラ整備にも必要不可欠であり、我々の生活の様々な場面で活用されている。ベースメタルは代替性が低く、昨今では中国および新興国の経済成長により需要が増大している。一方、銅、鉛、亜鉛等非鉄金属の鉱山開発は、資源メジャー（欧米等の大規模な資源会社）による寡占化が進展しており、我が国の非鉄製錬事業者や商社もオペレーターとして諸外国における鉱山の開発・生産に参画しているが、資本規模が小さいため、新規の鉱山開発による資源確保競争において厳しい立場に置かれている[1]。また、鉱山開発は不純物が少なく目的鉱物の品位が高い鉱床から開発を進めていくため、世界的な鉱山開発の進展により優良鉱床が減少している[2]。したがって、我が国の企業が新規の鉱山開発に参入する場合には、不純物が多く目的鉱物の品位が低い低品位鉱床に対応していく必要がある。一方、日本の排他的経済水域（EEZ）および大陸棚には、有用金属を含有する海底熱水鉱床等の有望海域が多数発見されており[3]、このような海底鉱物資源は我が国固有の金属資源として期待されている。海底熱水鉱床が産する鉱石は銅、鉛、亜鉛の硫化鉱物を主体とする複雑な組成を持ち、採鉱に際してはこれを海水と混合したスラリーとして揚鉱するため[4]、これに適した分離・回収技術を開発することが望ましい。

このように、我が国の将来的なベースメタルの安定的な供給には、低品位鉱床や海底熱水鉱床が産する複雑な組成を持つ鉱石から効率良く経済的に有

用金属を分離・回収する製錬技術の開発が必要である。金属製錬において現在主流である乾式法では鉱石を精製（選鉱）した精鉱を珪酸等の溶剤（フラックス）と混合し、加熱・熔融（溶錬）することで不純物を溶剤側に分離し（スラグ）、目的金属に富む合金（マット）を得る。乾式法は大規模製錬が可能であり、金属回収率が高い利点があるが、複雑な組成を持つ低品位鉱石に対しては選鉱・溶錬コストが嵩み経済的ではない。加えて鉱石が硫化物の場合、溶錬工程において鉱石中の硫黄成分から発生する有害な硫黄酸化物を回収する必要がある。これに対し、湿式法は複雑な組成を持つ低品位鉱石を処理でき、硫化物鉱石を処理しても硫黄酸化物が発生しないため、将来的に主要な製錬方法となることが見込まれる。湿式法においては、鉱石中に酸化鉱物・硫化鉱物として存在する金属成分を水溶液中に浸出させて分離する工程（リーチング工程）が必須であるが、目的金属の浸出効率は鉱物の種類に依存するため、主要な銅鉱石である黄銅鉱（ $\text{CuFeS}_2$ ）等、経済的に適用できない鉱石が存在することが課題となっている[5-8]。さらに銅資源の主要産出国においては黄銅鉱を主体とした「一次硫化鉱」鉱石の低品位化に加え、鉱帯上部に分布する輝銅鉱（ $\text{Cu}_2\text{S}$ ）・銅藍（ $\text{CuS}$ ）等を主体とする「二次硫化鉱」および酸化銅鉱も採掘の進展による低品位化に直面している[9]。このため、埋蔵量が豊富な未利用資源である「低品位一次硫化鉱」に対する湿式製錬技術の開発が期待される。

このような状況における湿式製錬技術の一つの選択肢であるバイオリーチングは、微生物の代謝活性や代謝生産物を利用し、各種鉱物から金属成分を浸出させる技術である。バイオリーチングは、低環境負荷であると同時に経済的にメリットがある浸出操作であり、海外諸国で銅、金の商業生産に実用化されている[10-12]。しかし、銅の主要鉱石である黄銅鉱に対するバイオリーチングは、化学的な浸出と同様に浸出速度が低く、商業生産には至っていない。バイオリーチングにおける浸出効率を改善し、黄銅鉱を含む低品位硫化鉱や海底熱水鉱床鉱石に対して適用を広げていくことは、現行の製錬技術では経済的理由で未利用となっている金属資源に対する高効率で経済的な分離・回収技術の確立につながり、延いては将来的なベースメタルの安定的な供給に資すると考えられる。また、世界的に温室効果ガス排出量の削減が求められているなか、温室効果ガス低排出型技術であるバイオリーチングは、

来たるべき低炭素社会に適した浸出技術と言えるであろう。

### 1.1.2 貴金属・レアメタルの供給現状と分離・回収技術の必要性

我が国の主要な産業基盤である自動車やエレクトロニクス、再生可能エネルギーやそれらを支える部素材といった主要製造業において、環境性能の向上や省電力化、小型・軽量化、高機能化、耐久性向上等の付加価値を高める技術は、我が国の製造業における国際競争力の維持・強化に欠かせない。これらの技術において、貴金属・レアメタルは高い導電性と耐腐食性から電子材料、燃料電池触媒、光触媒等幅広く需要がある。例えば、現在我が国の基幹産業である自動車製造業においては排気ガス浄化用の触媒として白金・パラジウム・ロジウムが使われており、電機・電子機器産業においては金も電子材料として欠かせない金属である。将来的には、白金・パラジウムについては燃料電池触媒や水素収蔵合金、金については金ナノ粒子を脱CO触媒[13]やセンサー素材[14]として応用する研究も進んでおり、金属素材としての貴金属は一層重要になると予想される。

有用金属には埋蔵量や生産量が偏在している鉱種があり、鉱石ベースで見た場合に、上位3か国の生産量が世界の生産量の9割を超えるなど、偏在性が極めて高い鉱種も存在する。金属資源の消費大国である我が国において、供給の偏在性は深刻なリスクであり、上位産出国のなかには政治的・経済的に不安定な国々も存在する。貴金属においては、Table 1.1 が示すように白金・パラジウムの産出国は南アフリカとロシアに大きく偏っているため、その供給は両国の内政および鉱山企業の経営状況に左右される。さらに、近年では投機的な資金の流入により、貴金属・レアメタルについて大きな価格変動が生ずるリスクも高い。

こうした貴金属・レアメタルの供給リスクに対して、代替材料開発・使用量削減技術開発と並んでリサイクルの推進は極めて重要である。近年では国内で発生する使用済み製品等を循環資源、いわゆる「都市鉱山」と捉え、有用金属を分離濃縮・回収するリサイクル技術に期待が高まっている。例えば使用済み電子部品については、部品の種類により有用金属の含有率には大きな幅があるものの、その多くは平均的な金鉱山の鉱石(品位10 ppm以下[15])と比較して良質な金資源と考えられる (Table 1.2)。2009年時点において国内の都市鉱山に蓄積されている金は6800 tと推定され、これは全世界の金埋

蔵量の 16%に相当する[16]。白金・パラジウムについても 2006 年時点において其々 1400 t・1100 t が蓄積されており、何れも 1996 年からの 10 年間で概ね 1.5 倍に増加している[16]。これらの豊富な循環資源の蓄積に着目し、「第四次循環型社会形成推進基本計画」(平成 30 年閣議決定)において、「製錬システム等の革新につながる研究開発等により、都市鉱山を有効に活用するための戦略的な資源循環システムの構築を行う」ことが明記されている。金のリサイクルについても、「資源の有効な利用の促進に関する法律」により、業務用パソコンだけでなく、家庭用パソコンの回収と再資源化がパソコンメーカーに義務付けられ (パソコンリサイクル法)、加えて「使用済小型電子機器等の再資源化の促進に関する法律」(小型家電リサイクル法)により、各自治体および認定事業者に対して携帯電話端末を始めとする小型電子機器の金属リサイクルが促されている。さらに「未来投資戦略 2018」(平成 30 年閣議決定)では、2020 年に予定されている東京オリンピック・パラリンピックにおける入賞メダルの製作等を通じ、都市鉱山を活用した電子機器(小型家電等)の回収システムを強化することが明記され、金を始めとする我が国の金属リサイクル技術を国際的にアピールすることも求められている。しかし 2017 年現在、金・白金・パラジウムのリサイクル率は 30-40%に留まっており (Table 1.3)、有用金属のなかでも特に新規リサイクル技術の開発が期待される金属と言える。

貴金属・レアメタルのリサイクル技術は、固体物を対象に溶煉処理をする乾式法と、各種溶液を対象に化学的処理をする湿式法に大別できる。乾式法は品位が一定で多量の廃棄物を継続的に処理する場合に適しており、前述のベースメタルの乾式製錬と同様の工程を経るため既存設備を利用できる点、銅・鉛・鉄をコレクターとして利用し、金・白金族金属を高収率で抽出できる利点がある[17, 18]。しかし、全国各地から分散して排出される金属廃棄物を限られた処理施設に集積する必要があることに加え、金属廃棄物の組成も様々であるため、乾式法ですべての都市鉱山から経済的に有用金属を回収することは難しい。また、パソコンや携帯電話端末の基盤の焼却には多くのエネルギーを要し、CO<sub>2</sub> ガスの排出による環境負荷も懸念される。これに対し湿式法は小ロット処理に適しており、廃棄物中の有用金属を個別に分離回収する場合に有利となる。湿式法による回収プロセスでは、都市鉱山等の有用

金属含有固形物から有用金属を液相(主に水溶液)に溶出させる浸出操作と、浸出液からの有用金属の分離濃縮・回収操作が主要な操作となる。湿式リサイクルにおける各種溶液からの有用金属の湿式回収技術は、溶媒抽出法を中心に従来から開発されてきたが、使用済み製品に含まれる有用金属が微量であるほど、これを経済的に回収することは難しくなる[19-22]。例えば、金の主要な廃棄物である使用済み電子部品の場合、これを酸浸出処理した浸出液の金イオン濃度は、概ね 1 - 2000 ppm とされている[23, 24]。白金族金属においても、主要な用途である自動車触媒における白金・パラジウム・ロジウムの含有率は 0.1 - 0.5% [25]と低いため、浸出液の白金族金属イオン濃度は概ね 100 - 500 ppm となる。したがって金・白金族金属のリサイクル率の向上には、これらを希薄溶液から効率よく経済的に回収できるリサイクル技術の開発が課題であり、その有効な解決策として、微生物を用いた回収方法が考えられる。

微生物の多様な金属代謝は従来から知られており、前述のバイオリーチングはその代表的な応用例であるが、代謝機能以外の金属-微生物作用として、水溶液中の金属イオン等を微生物細胞表面の官能基に吸着・保持するバイオソープション、また水溶液中の金属イオンから細胞内外に無機化合物を析出するバイオミネラリゼーション(還元・析出)が知られている。バイオソープションやバイオミネラリゼーションを利用した金属イオンの分離・回収法は、常温・常圧下において微生物機能を活用するもので、目的金属の希薄溶液に対して効果的である。特に貴金属イオンのバイオ分離・回収法は、都市鉱山を原料とした金属の混合溶液から貴金属を選択的に分離・濃縮でき、さらにバイオミネラリゼーションにおいてはワンステップで貴金属ナノ粒子を生産することで回収する金属に触媒等の付加価値を与えることも可能である。ただし、貴金属イオンのバイオ還元・析出に用いる細菌類は嫌気性条件下で培養する必要があるとする報告もあり[26, 27]、必要な菌体量を商業的な規模で準備することが容易でない場合も考えられる。バイオソープションは回収する金属に付加価値を与えることはできないが、金属イオンの還元を要しないために嫌気培養の必要がなく、パン酵母等すでに商業的培養技術が確立されている微生物や、醸造用酵母等の食品工業廃棄物、農業廃棄物を利用できる場合もある。Kapoor *et al.* [28]によれば、バイオソープションのために新た

にバイオマス（吸着材としての微生物細胞）を製造する場合のコストは 1 kg あたり 1\$ - 5\$であり、食品工業の二次的生産物から得られる場合にはさらに安価になる可能性がある。バイオマスは再利用性が低い欠点があるが、活性炭（2\$ - 5.5\$）・イオン交換樹脂（13\$ - 30\$）[28]に対して経済的優位性があると考えられる。このようにバイオソープション・バイオミネラリゼーションはそれぞれの長所短所を補完できるため、バイオ回収法によるリサイクルプロセスは、従来の物理・化学的プロセスにおいて課題となっている省エネルギー性や経済性の改善に寄与できると考えられる。また一般的な微生物反応とは異なり、貴金属イオンのバイオ回収法は回収速度が高く、小型の反応装置を用いて高効率で目的金属を回収できる特長もある。したがって、微生物機能を活用した貴金属の分離・回収技術は、都市鉱山の集積地ごとにオンサイトで導入が可能な地域分散型リサイクル方法として、貴金属資源循環システムの構築に貢献できると期待される。

**Table 1.1** Uneven distribution of rare metal resources.\*

金属資源	上位産出国および各国のシェア (%)			産出上位三カ国の シェア (%)
レアアース	中国 (81)	オーストラリア (15)	ロシア (2)	98
ニオブ	ブラジル (89)	カナダ (9)	その他 (2)	98
ストロンチウム	スペイン (45)	メキシコ (28)	中国 (25)	98
タングステン	中国 (83)	ベトナム (8)	ロシア (3)	94
バナジウム	中国 (54)	ロシア (20)	南アフリカ (16)	90
リチウム	オーストラリア (43)	チリ (33)	アルゼンチン (13)	89
白金	南アフリカ (70)	ロシア (11)	ジンバブエ (8)	88
アンチモン	中国 (73)	タジキスタン (9)	ロシア (5)	88
レニウム	チリ (52)	ポーランド (17)	アメリカ (16)	86
パラジウム	ロシア (39)	南アフリカ (37)	カナダ (9)	85

\* U.S. Geological Survey, 2018, Mineral commodity summaries 2018 [29]より抜粋

**Table 1.2** Weight composition of metals for different electronic scrap samples. [30]

Electronic waste	Value-share (%)								Sum of precious metals
	Fe	Cu	Al	Pb	Ni	Ag	Au	Pd	
Prices <sup>a</sup> (\$/tonne)	300	7736	2475	3580	31150	430000	24490000	11660000	
TV board scrap	4	39	13	2	5	6	25	6	37
PC board scrap	0	16	1	1	3	4	62	13	79
Mobile phone scrap	0	8	0	0	0	5	67	19	91
Portable audio scrap	3	78	1	0	0	3	12	2	17
DVD player scrap	17	35	4	1	1	4	33	4	42
Calculator scrap	1	12	6	0	8	6	64	3	73
PC mainboard scrap	0	6	0	0	2	2	81	8	91
Printed circuit boards scrap	1	19	4	1	6	3	66	-	69
TV scrap (CRTs removed)	-	82	9	2	4	3	-	-	3
Electronic scrap	1	38	1	6	36	1	17	0	18
PC scrap	3	28	18	11	14	4	20	2	26
Typical electronic scrap	0	5	0	0	2	3	87	2	92
E-scrap sample 1	5	60	20	2	-	-	13	-	13
E-scrap sample 2	1	22	5	1	-	2	65	4	70
Printed circuit boards	0	37	1	-	3	25	35	0	60
E-scrap (1972 sample)	1	19	-	-	-	9	66	5	80

<sup>a</sup> The metal price data are from London Metal Exchange (LME) official prices for cash seller and settlement on the 24th October, 2007.

**Table 1.3** Industrial recycling of gold, platinum and palladium in Japan.

金		白金		パラジウム (単位:t)	
加工業者	14.0	加工業者	3.2	加工業者	5.2
消費財	4.9	消費財	3.7	消費財	4.2
再生金合計	19.0	再生白金合計	6.9	再生パラジウム合計	9.5
電気通信機・機械部品用	28.4	自動車触媒用	5.3	自動車触媒用	7.9
歯科・医療用	7.5	電気・電子機器用	9.7	歯科・医療用	10.8
メッキ用	2.2	その他	6.3	電気・電子機器用	5.5
その他	7.2			その他	10.2
金消費合計	45.4	白金消費合計	21.2	パラジウム消費合計	34.4
リサイクル率	<b>41.9%</b>	リサイクル率	<b>32.5%</b>	リサイクル率	<b>27.5%</b>

再生：貴金属商が加工業者、消費財からの作業屑、スクラップおよび製品等を精製した地金の数量。

消費：一般的な工業消費に用いられる消費の数量。準消費退蔵(宝飾品用、指輪、装身具等)は含めない。

リサイクル率：再生金合計／金消費合計。白金、パラジウムも同様。

資源エネルギー庁、平成 29 年度貴金属流通統計調査[31]より計算

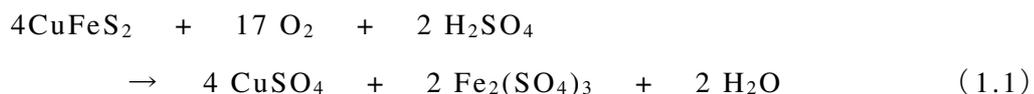
## 1.2 既往の研究

自然界に存在する微生物の金属イオンに対する各種機能（酸化、吸着、還元）を積極的に活用する分離・回収方法は、バイオリーチング（バイオ浸出）、バイオソープション（バイオ吸着）、バイオミネラリゼーション（バイオ還元・析出）に大別される。以下、各々について既往の知見と研究を概観する。

### 1.2.1 バイオリーチング（バイオ浸出）

硫化鉱物を含む土壌の硫酸酸性化は古くから問題となっていたが、これは硫化鉱物の風化作用における化学的な酸化によるものと考えられていた。これに対し、1922年に Rudolfs [32]は土壌中の硫化鉄（黄鉄鉱,  $\text{FeS}_2$ ）の酸化が微生物によって促進されていることを明らかにした。さらに、酸性土壌中から元素硫黄を基質とする硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* が単離され[33, 34]、鉄イオン酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* が炭鉱排水から単離されると[35]、これらの独立栄養微生物の代謝活性や代謝生産物を積極的に利用して硫化物鉱石から金属成分を浸出させるバイオリーチングが研究されるようになった。

既往の研究成果[36-40]より、硫化鉱物のバイオリーチング機構は、直接浸出機構（direct mechanism または contact mechanism）、および間接浸出機構（indirect mechanism または non-contact mechanism）に大別される。直接浸出機構では細胞外ポリマー（Extracellular polymeric substances（EPS））を介して硫化鉱物に付着したリーチング微生物の作用によって硫化鉱物が酸化され、金属イオンおよび硫酸が液相に浸出される。この浸出過程において、リーチング微生物は中間生成物であるチオ硫酸イオン・多硫化物イオンを基質として増殖する。硫化鉱物中に第一鉄イオンが存在する場合にはこれも基質となり、リーチング微生物により第二鉄イオンに酸化される。一例として黄銅鉱の場合、直接浸出機構は反応（1.1）で表せる。



間接浸出機構では、液相中の第二鉄イオンにより硫化鉱物が化学的に酸化され（反応（1.2））、還元された第一鉄イオンは液相中に遊離するリーチング微

生物により第二鉄イオンに再度酸化される（反応（1.3））。化学的浸出で硫化鉱物表面に生成した元素硫黄（S(0)）はリーチング微生物により硫酸に酸化される（反応（1.4））。



*A. thiooxidans* や *A. ferrooxidans* は増殖に必要な炭素源を空気中の二酸化炭素から摂取できる独立栄養細菌であり、硫化鉱物の他にはリン酸塩、アンモニウム塩等の無機塩類と空気増殖できるため、バイオリーチングが開始されるとリーチング微生物は自発的に増殖し、硫化鉱物の酸化は加速的に進行する。バイオリーチングは、黄鉄鉱（FeS<sub>2</sub>）[36-42]、黄銅鉱（CuFeS<sub>2</sub>）[43, 44]、閃亜鉛鉱（ZnS）[45, 46]、ペントランド鉱（Fe,Ni<sub>9</sub>S<sub>8</sub>）[47]等、様々な陸上硫化鉱物に対して適用性が研究されてきた。しかし、中温性細菌（生育温度 20-40℃）を使用した既往の研究では浸出期間が数十日から数か月におよび、商業的利用においては浸出速度の低さが課題であった。これに対し、1966年に米国イエローストーン国立公園の酸性熱水泉（pH2.61, 71 - 73.5℃）から好酸性・好熱性古細菌 *Acidianus brierleyi* が発見され[48]、硫化鉱物（黄銅鉱、閃亜鉛鉱、黄鉄鉱、輝水鉛鉱（MoS<sub>2</sub>））に対して非常に優れた浸出能力を発揮することが明らかになった[49-56]。以来、生育温度 60 - 80℃の好熱性古細菌・好熱性細菌および生育温度 40 - 60℃の中度好熱性細菌を用いたバイオリーチングも研究されている[57, 58]。

商業的な硫化鉱物のバイオリーチングは主に、反応槽、鉱石堆積層（ヒープまたはダンプ）において行われる。反応槽を用いたバイオリーチング（タンク・バイオリーチング）は、一般的に浸出条件の管理が容易で浸出速度が高いが、操業コストも高い。最も普及しているものは Gencor 社（現 Gold Fields 社）の BIOX<sup>®</sup>法で、主に自然金を回収するための前処理として共存する硫化

鉱物を溶解・除去するものである。連続式攪拌槽を用い、代表的な運転条件は 40 - 45℃、pH 1.2 - 1.6、溶存酸素は 2 mg/l に制御され、パルプ濃度は 20 - 30% (w/w) で平均滞留時間は 4 - 6 d である [59]。BIOX®法で、20%の硫化物を含む鉱石を 100 t/d (平均滞留時間 4 d) で処理した場合、硫化物の酸化率 (浸出率) は約 87%である [60]。2017 年現在、13 か所の BIOX®プラントが操業しており、金の生産実績は通算 680 t に上る [59]。反面、銅精錬における黄銅鉱のタンク・バイオリーチングは実用試験レベルに留まっている。BHP Billiton 社の BioCop™プロセスは、1260 m<sup>3</sup>の連続式攪拌槽 6 器を用いて好酸性・好熱性古細菌による黄銅鉱のバイオリーチングを行ったが、実操業には至っていない [61]。ヒープおよびダンプ・バイオリーチングは、前述の「二次硫化鉱」および酸化銅鉱からの銅の浸出に広く用いられている。ヒープ・バイオリーチングでは鉱石は粉碎または団粒化され、不透水層 (シート) の上に高さ 4 - 10 m に堆積される。ダンプ・バイオリーチングでは鉱石のまま斜面や法面に堆積され、高さは 18 m 以上に達する [62]。堆積層上面からは硫酸酸性の浸出液が散布され、ヒープ・バイオリーチングでは底面から通気する場合もある。鉱石が硫化鉱と酸化鉱を含む場合、微生物の直接浸出機構により硫化鉱から硫酸が生成されるとともに、その反応熱により堆積層内部の温度が上昇するため、酸化鉱の化学的溶解も促進される。堆積層内部の温度は堆積層の高さや、硫化鉱物の含有率、浸出液散布量、通気量等に依存するが、60℃以上になる例もある [63]。堆積層内部の微生物相は、堆積層内部の温度に応じて中温性細菌を中心とした菌叢から中度好熱性細菌や好熱性 (古) 細菌優位の菌叢に変化する [64]。ヒープ・ダンプバイオリーチングは多量の鉱石を低コストで処理できる反面、堆積層内部の通気、浸出液の流路や温度分布が不均一となるため、浸出速度はタンク・バイオリーチングより低くなる。ヒープ・バイオリーチングでは多くの場合、250 - 350 日で 80 - 90%の銅が浸出される [65]。銅その他の有用金属は堆積層より流出した浸出貴液から溶媒抽出法で分離され、電解採取により回収される。2008 年時点のバイオリーチングによる銅生産量は 1,130,000 t/y (酸化鉱含む) に上り、同年の世界銅生産量の約 7%を占めている [9]。しかし、前述のように二次硫化鉱および酸化鉱は今後の低品位化が懸念され、低品位一次硫化鉱に対するヒープ・ダンプバイオリーチング技術の開発が望まれている。黄銅鉱に対するヒープ・

バイオリーチングは、未だカラム試験やパイロットスケール試験に留まっているが、近年は浸出液散布量と通気量をコントロールして堆積層内部に効率よく蓄熱する技術[66-68]が開発されつつあり、中度好熱性細菌や好熱性（古）細菌を積極的に利用するバイオリーチング技術の進展が期待される。

都市鉱山に対するリサイクルプロセス開発の一環として、固形廃棄物からの有用金属のバイオリーチングに関する研究も行われている[69, 70]。例えば、廃電子部品については鉄イオン酸化細菌にしたがって生成した第二鉄イオンを使った間接浸出機構（前述）を利用することにより、銅・ニッケルの酸化・浸出が促進されることが確認されている[71-73]。その他、石油精製における脱硫触媒の廃棄物である硫化モリブデン（輝水鉛鉱（ $\text{MoS}_2$ ））からのモリブデンの浸出にバイオリーチングを適用した研究例もある[74]。輝水鉛鉱に対しては好酸性・好熱性古細菌 *A. brierleyi* が優れた浸出能力を発揮することが明らかになっており[51]、廃脱硫触媒への応用が期待される。

### 1.2.2 バイオソープション（バイオ吸着）

微生物の細胞表面は多糖類、タンパク質、複合脂質で構成されており、このなかにはカルボキシ基、ヒドロキシ基、チオール基、スルホ基、リン酸基、アミノ基等、金属イオンとの結合に関わる官能基が多数存在する。Dhankhar *et al.* [75]は、真菌類のバイオソープションの優位な点として、①細胞壁に多様な官能基が存在するために金属吸着容量が大きいこと、②植物や藻類に比べて倍加時間が短く、安価な培養液で大量培養が容易でしかも増殖収率が高いこと、③バイオマスが工業廃棄物から簡単に得られ、他のバイオマスより経済的に有利であること、④真菌類の大部分は毒性が無く、安全で、公共的に受け入れられ易いことを挙げているが、これらは一部の病原性細菌を除く多くの好気性・通性嫌気性細菌にも当てはまる。そのため、微生物による有用金属イオンのバイオソープションは、今日まで様々な微生物細胞を用いて研究されてきた。広義のバイオソープション（biosorption）は生物的（bio-）な吸収（-absorption）と吸着（-adsorption）を含む場合があるが、多くの研究者は代謝活性の有無や生死に無関係な吸着現象としてバイオソープションを取り扱っている[76-80]。しかし、滅菌操作を経ない細胞懸濁液や乾燥細胞を用いたバイオソープションにおいて、細胞による能動的吸収やイオンチャネルを介した細胞内部への金属イオンの受動的拡散を完全に除外することはで

きないことにも留意する必要がある。本論文では微生物のバイオソープション（バイオ吸着）を、液相中のイオンが固体化合物を成すことなく微生物細胞に移行する現象として定義する。ただし、リサイクルプロセスにおけるバイオソープションにおいては高い回収速度が求められるため、細胞表面へのイオンの吸着が細胞によるイオンの吸収（代謝・拡散）より十分に速い場合が多く、現実的にはバイオソープションを吸着現象として捉えることができるものと考えられる。したがって、以下に既往の研究を概観するのに際しては、” biosorption ” = 「細胞表面へのイオンの吸着」として引用する。

貴金属イオンのバイオソープションに用いられる微生物は、細菌類、古細菌類、真菌類に大別され、金属イオンの吸着部位は各々異なっているが、これは細胞壁、細胞表面の構造の差異に起因する。細菌類は細胞膜の外側にアミノ糖である N-アセチルグルコサミンと N-アセチルムラミン酸にしたがって構成されるペプチドグリカン層を持つ。グラム陽性細菌は厚いペプチドグリカンの細胞壁にタイコ酸とリポタイコ酸なる多価アルコールを内包しており、リポタイコ酸が細胞膜に共有結合することで疎水性の細胞膜と親水性の細胞壁を結合している。細胞表面のタンパク質としては、細胞表面のタンパク質単分子層である S 層、細胞膜結合タンパク質、細胞壁結合タンパク質が存在し、細菌内外の物質輸送や環境の感知、酵素の生成を司る [81]。グラム陽性細菌は、タイコ酸に含まれるホスホジエステル基により中性領域では負に帯電し [80]、細胞壁内のタイコ酸・リポタイコ酸に結合したアニオン性官能基により、金属カチオンを吸着する [82]。グラム陰性細菌は、細胞内膜の外側に薄いペプチドグリカン層を持ち、さらにその外側にリン脂質二重層から成る外膜を持つ。ペプチドグリカン層と外膜の間はペリプラズム空間と呼ばれる。外膜にはリポ多糖類が多糖鎖を外側に突き出す形で結合した EPS が存在する。細胞表面のタンパク質としては、S 層、外膜結合タンパク質に加え、イオンチャネルとしてポリンタンパク質が存在し、イオンまたは低分子化合物 (<600 Da) を選択的にペリプラズム空間に拡散させることができる [83]。グラム陰性細菌は、EPS のリポ多糖類の帯電特性により中性領域では負に帯電し [80]、EPS およびペプチドグリカン、リン脂質に存在するアニオン性官能基が金属カチオンを吸着する [82]。古細菌類の細胞表面は菌種によって異なるが、シュードムレイン（細菌のペプチドグリカンに相当）、硫酸化

多糖類、糖タンパク質がカルボキシ基やスルホ基を含んでおり、これらが金属カチオンの吸着に関与する[84]。真菌類の細胞壁は乾燥質量の約 30%を占め、主に多糖類から構成される。その組成は種によって異なるが、線維状の $\beta$ -グルカン(セルロース等)とキチンによる骨格にキトサン、糖タンパク質、脂質を含有する[75]。例えばパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の細胞壁は $\beta$ -グルカンに富み、その外側はマンノースにより修飾されたマンナンタンパク質層に覆われている。*S. cerevisiae* は中性領域では負に帯電するが、pH 2 - 4 に等電点があり、酸性条件下では正帯電となる[85, 86]。真菌類による金属カチオンの吸着には、細胞壁内の多糖類に存在するヒドロキシ基、タンパク質のアミノ酸に含まれるカルボキシ基、およびタンパク質やキトサンに含まれるアミノ基が関与する[87]。

微生物細胞表面への金属イオンの吸着は、官能基とイオンの間の静電相互作用、イオン交換反応、錯体形成等の物理化学的相互作用によるものである。一般的に、貴金属錯イオンを除く多くの金属カチオンについては弱酸性条件で最大のバイオ吸着量となるが、これは、カルボキシ基 (pKa 1.7 - 4.7) [88] を始めとする官能基がプロトンを解離して金属カチオンと結合することに関係する[80]。pH 2 以下の酸性条件下では、カルボキシ基等の酸性官能基がプロトンと結合して無帯電となるため、アミノ基 (pKa 8 - 11) [88]等の塩基性官能基により細胞表面は正帯電となる。湿式リサイクルプロセスにおける貴金属含有酸浸出液や酸性メッキ廃液において、貴金属イオンは主に負帯電のハロゲン錯イオンとして存在するため、静電的に細胞表面への接近が促される。さらに強酸性条件下では、貴金属-ハロゲン錯イオンと余剰のハロゲンイオンの競合が生ずるため、バイオ吸着量は減少する傾向となる[80, 89]。したがって、溶液の pH を調整することにより、貴金属錯イオンを選択的に微生物細胞表面へ吸着させられる可能性がある。

金属イオンのバイオソープションに関する応用研究は、従来は重金属汚染地下水や鉱廃水の処理に重点が置かれていたが、近年、これらの研究の焦点は、使用済み電気電子部品 (Waste electrical and electronic equipment, WEEE) を始めとする固体廃棄物の浸出液からの有用金属の回収にシフトしている。これは、バイオ回収法が、希薄溶液からの有用金属の回収において省エネルギー性や経済性に優れた一つの選択肢となりつつあることを示しているが、

現状ではバイオ回収法の商業的な利用は行われていない。バイオ回収法の課題としては、細胞・バイオマスの再利用性の低さに加え、反応槽によるプロセスではバイオ回収処理後の微生物と液相の分離の困難さ、カラムによるプロセスでは閉塞やバイオマスの膨張の問題がある。これらの問題はどれも微生物細胞の脆弱性や取り扱いの困難に起因しており、解決策として微生物固定担体を用いた研究も行われている。主な担体物質としてはアルギン酸[90]、ポリアクリルアミド[90]、ポリスルホン[91]、およびポリウレタン[92]が挙げられる。担体以外の解決策としては、安価で細胞サイズが比較的大きい酵母類の利用や、微生物封入カプセルの利用も有効と考えられる。

微生物細胞による貴金属イオンのバイオソープションに関する研究例を概観すると (Table 1.4)、上記の理由から多くが pH2 - 5 で行われている。Au(III)イオンについては真菌類が細菌類より高い吸着能力を示しており、その最大吸着量はイオン交換樹脂 (19.0 - 19.7mg/g) [93]と同等以上の吸着能を示す例もある。これらのなかには他の金属イオンが共存する模擬廃液[94]や、実際のメッキ廃液 (非シアン系[94]、シアン系[95]) から Au(III)イオンを選択的に回収している例もあるが、シアン系メッキ廃液に対する微生物の吸着能は著しく低い。細菌類では硫酸還元細菌 (*Desulfovibrio* 属)、大腸菌 (*Escherichia coli*) による Pt(IV), Pd(II)イオンの吸着が確認されており、特に Pd(II)イオンに対しては、概ね高い吸着能力が示されている。真菌類と細菌類の吸着特性の違いは、前述した細胞表面構造の違いに基づく帯電特性や塩基性官能基の量および種類の差異に起因すると考えられるが、細胞表面の複雑さから吸着メカニズムの詳細は明らかではない。また、複雑な組成を持つ実廃液に対するデータも現状では不足しており、今後の研究においては、実廃液からの貴金属イオンの吸着量や選択性を増大させるための操作条件 (温度・pH 等) および操作方法 (多段操作・向流操作等) について、踏み込んだ研究が課題となろう。また、近年では細胞表面を化学的に処理し、特定の官能基やイオン性ポリマーを付加・修飾して吸着容量を増加させる研究もあるが、こうした化学的処理はバイオ回収プロセスのコストの増加を招く恐れがあり、本論文の趣旨と異なるため詳細は割愛する。

**Table 1.4** Biosorption of precious metals by various biosorbents.

真菌類	金属	pH	最大吸着量 (mg/g-dry cells)	引用文献
<i>Aspergillus niger</i>	Au(III)	2.5	175	[77]
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Au(III)	2.5	165	[77]
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Au(III)	4.0	36-101	[94, 100]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Au(III)	5.0	5.55	[99]
<i>Fomitopsi carnea</i>	Au(III)	不明	94.34	[101]
<i>Aspergillus terreus</i>	Au(III)	1.5-5.5	149	[102]
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Au(I)	2	0.0072	[95]
<i>S. cerevisiae</i>	Pt(IV)	1.8-2.2	0.0008	[103]
<i>S. cerevisiae</i>	Pd(II)	1.4-1.6	0.012	[103]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Pd(II)	1.5-1.6	0.0067	[103]
<i>Penicillium canescens</i>	Pd(II)	3.5	21	[104]

細菌類	金属	pH	最大吸着量 (mg/g-dry cells)	引用文献
<i>Streptomyces erythraeus</i>	Au(III)	4.0	6.00	[99]
<i>Spirulina. platensis</i>	Au(III)	4.0	5.55	[99]
<i>Bacillus subtilis</i>	Au(I)	2	0.008	[95]
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Pt(IV)	2.0	62.5	[105]
<i>Desulfovibrio fructosivorans</i>	Pt(IV)	2.0	32.3	[105]
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Pt(IV)	2.0	40.1	[105]
<i>Escherichia coli</i>	Pt(IV)	1.2	45.65	[106]
<i>Escherichia coli</i> (BL21)	Pt(IV)	3.0	173.2	[107]
<i>D. desulfuricans</i>	Pd(II)	2.0	128.2	[105]
<i>D. fructosivorans</i>	Pd(II)	2.0	119.8	[105]
<i>D. vulgaris</i>	Pd(II)	2.0	106.3	[105]
<i>E. coli</i>	Pd(II)	1.2	38.87	[106]
<i>D. desulfuricans</i>	Pd(II)	2	190	[108]

注) バイオミネラリゼーションを伴うものは Table 1.6, Table 1.7 に記載した。

### 1.2.3 バイオミネラリゼーション（バイオ還元・析出）

生物由来物質による貴金属イオンの還元作用は、その省エネルギー性のみならず、生物由来物質がキャッピング剤や分散剤の役割を果たすために添加剤のコストを削減できる利点があり[109]、ナノ粒子の合成方法として物理的・化学的および生物的な興味を持たれている。貴金属イオンの還元を使用される生物由来物質は、植物・海藻からの抽出物と、微生物および微生物由来物質とに大別される。植物からの抽出物によるバイオミネラリゼーションは比較的簡単で反応が速い利点があるが、抽出物に様々な植物性化合物（フェノール、フラボノイド、テルペノイド等）が含まれるために多分散粒子となる傾向がある[110]。微生物を用いたバイオミネラリゼーションは微生物が季節変動無しに容易に大量培養できること、生成したナノ粒子が比較的単分散で生体適合性があることから、ナノ粒子の合成方法としてより興味深い。以下に微生物を用いた貴金属イオンのバイオミネラリゼーションについて概観する。

微生物を用いた貴金属イオンのバイオミネラリゼーションでは、貴金属イオンの還元は細胞外で行われるものと細胞内で行われるものがある。細胞外での貴金属イオンの還元では酸化還元酵素（補酵素）であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH, 酸化還元電位  $E_o' = -0.320V$ [111]）、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸（NADPH,  $E_o' = -0.324V$ [111]）が電子伝達物質として重要な役割を果たす他、いくつかの真菌が生成する酵素（アセチルキシランエステラーゼ、セロビオヒドロラーゼ、グルコシダーゼ）も細胞外の貴金属イオンの還元に関与することが知られている[112]。細胞内で行われる貴金属イオンの還元には、細胞に存在する正帯電した官能基が、負帯電のハロゲン錯イオンとして存在する貴金属イオンを静電的に細胞表面に接近させる[113]。多くの貴金属ナノ粒子は細胞質や細胞壁およびペリプラズム空間に認められることから、貴金属イオンが細胞壁や細胞膜を透過すると考えられるが、これが能動的吸収か受動的拡散かは明らかではない[114]。細胞に到達した貴金属イオンは、細胞膜の電子伝達系を形成するヒドロゲナーゼ（ $E_o' = -0.21V$ [111]）やシトクロム c3（ $E_o' = -0.226V$ [111]）等の酸化還元酵素、細胞内の NADH・NADPH 等の補酵素および細胞壁の多糖類から生ずる還元糖のアルデヒド基により還元される[115]。例えば、パン

酵母 *S. cerevisiae* は前述の Au(III)イオンのバイオソープションに加え、細胞壁の還元糖に存在するアルデヒド基によって Au(III)イオンを金属 Au(Au(0))に還元することができる[116]。一方、電子伝達系の酸化還元酵素を用いた貴金属イオンの還元には電子を供給する物質（電子供与体）が必要であるが、利用可能な電子供与体は微生物と電子受容体である貴金属イオンに依存する。これは微生物の電子伝達系が生育環境に基づいて発現する各種固有のものであり、イオン種によって電子伝達系のなかで電子の授受が可能な部位が限定されているためと考えられる。例えば有機物が存在する水圏の底泥に分布している Fe(III)イオン還元細菌である *Shewanella* 属細菌は、嫌氣的環境下では有機酸イオンを電子供与体とし、Fe(III)イオンを電子受容体とする鉄呼吸 ( $E_o' = -0.77V$ [111]) にしたがって生育しているが、その一種である *Shewanella oneidensis* は、水素、ギ酸、乳酸、ピルビン酸、およびエタノールを電子供与体を用いて嫌氣的環境下で Pd(II)イオン ( $PdCl_4^{2-}$ ) を Pd ナノ粒子に還元できる[117]。また、多くの Fe(III)イオン還元細菌は水素を電子供与体として Au(III)イオン ( $AuCl_4^-$ ) を還元できる[118]。

微生物細胞による Au(III)イオンのバイオミネラリゼーションの主な研究例を Table 1.6 に示す。真菌類を用いた場合、電子供与体を添加せずに Au(III)イオンを還元できるが[116], [119-125]、いずれも数時間から数日を要しており工業的な利用には課題がある。ただし、真菌類は凝集性が高く生産性が良い点では細菌類より優位である[112]。細菌類による Au(III)イオンの還元においては電子供与体を添加していない報告があるが[126-131]、これらの実験の反応時間は何れも 12 h 以上である。これに対し細菌細胞に電子供与体を添加した場合、反応時間は概ね 120 min 以内である[27, 132-134]。大腸菌 (*E. coli*) においては、電子供与体を添加しない報告では  $1 \text{ mol/m}^3$  の Au(III)イオンの還元には 120 h を要するのに対し[131]、電子供与体に水素を用いた報告では  $2 \text{ mol/m}^3$  の Au(III)イオンの還元が 140 min で完了しており[27]、電子供与体を添加する効果は大きい。

Table 1.7 に細菌細胞による Pt(IV), Pd(II)イオンのバイオミネラリゼーションの主な研究例を示す。Yong *et al.*[135]は、バイオミネラリゼーションにより金属パラジウムナノ粒子に覆われた硫酸還元菌 *Desulfovibrio desulfuricans* の乾燥細胞粉末（バイオ調製 Pd 触媒）を次亜リン酸塩の酸化触媒（水素発

生触媒)として用い、その触媒性能を示した(2002年)。これ以降、細菌細胞に担持された貴金属ナノ粒子の調製と、その触媒としての応用が試みられている。パラジウムに関しては、*D. desulfuricans*によりバイオ調製触媒が調整され、メチレンコハク酸[136]、2-ペンチンの水素化反応[137]、ポリ塩化ビフェニル塩素やベンゼンヘキサクロリド等の化芳香族化合物の脱ハロゲン化反応[138-144]、鈴木・宮浦カップリング反応や溝呂木・ヘック反応[145]について検討されている。その結果、バイオ調製 Pd 触媒が化学的に作成された Pd 触媒(化学調製 Pd 触媒)より高活性を持つことが示された。さらに *D. desulfuricans* によるバイオ調製触媒を燃料電池触媒[146]および環境浄化用のクロム酸還元触媒[147]に利用することも試みられた。しかし、*D. desulfuricans* によるバイオ調製触媒の調製は細胞内のヒドロゲナーゼ活性が低いと開始できず、さらに調製を完了するには溶存 Pd(II)イオンの化学的還元を進めるための電子供与体(水素、ギ酸等)を過剰に添加する必要がある[119, 147]。また、偏性嫌気性菌である *D. desulfuricans* の生育には脱酸素条件を維持することが求められ、さらに硫酸還元菌である *D. desulfuricans* が生成する硫化水素は用途によっては触媒能を低下させるので入念に除去する必要がある。したがって、硫酸還元菌以外の方法で触媒を調整することが望ましい。これに対し、Fe(III)イオン還元細菌である *S. oneidensis* によるバイオ調製触媒の研究例もある[117, 140, 142, 144]が、報告は芳香族化合物の脱ハロゲン化触媒に限定されており、データの蓄積は未だ十分ではない。白金に関しては白金イオンのバイオミネラリゼーションの研究自体が少なく、バイオ調製 Pt ナノ粒子に対し燃料電池用の触媒として性能評価を行った研究[146, 148]があるが、データは僅少である。貴金属イオンのバイオミネラリゼーションによる触媒の調製については、より効率的な貴金属ナノ粒子の調製とともに、貴金属ナノ粒子の再担持等による触媒としての応用範囲の拡大、貴金属ナノ粒子の触媒素材としての品質向上(細粒化、単分散性の向上)が課題と考えられる。また、燃料電池触媒等、微生物細胞が担体として好ましくない場合は、より有効な担体へ貴金属ナノ粒子を担持しなおすことも考慮すべきであろう。

実際のリサイクルを念頭に置いた貴金属イオンのバイオミネラリゼーションについては幾つかの研究がある。WEEEの酸浸出液からの Au(III)イオン、Pd(II)イオンのバイオミネラリゼーションとしては、*D. desulfuricans* バイオ

マスおよび Pd ナノ粒子に覆われたバイオ調製触媒を用いた研究がある[132]が、定量的なデータは示されていない。廃自動車触媒の王水浸出液からの *D. desulfuricans* による Pd(II), Pt(IV), Rh(III)イオンのバイオミネラル化の研究例[108]では、Pd 回収率は 15%に留まっており、Pt(IV), Rh(III)イオンの還元は認められない。同様の実廃液（500 倍希釈液 Pd(II): 2.5 mol/m<sup>3</sup>, Pt(IV): 1.9 mol/m<sup>3</sup>, Rh(III): 0.14 mol/m<sup>3</sup>）においては、*D. desulfuricans* により各成分 80%以上の回収に成功しているが、3 成分共存下における Pt(IV), Rh(III)イオンの還元は明らかでない[119]。Deplanche *et al.*[27]は、大腸菌 (*E. coli*) と *D. desulfuricans* を用いて宝飾品工程廃棄物の王水浸出液（pH 2.1 に調整）からの Au(III)イオンのバイオミネラル化に成功しているが、他の金属が含まれないリサイクルプロセスであるためバイオミネラル化の選択性が生かされているとは言えない。このように、工業廃液やリサイクルプロセス中の酸浸出液を用いたバイオミネラル化の研究は実施例が少ない上に定量的なデータは殆どなく、今後の研究課題と言える。また、実際の食品廃棄物を利用したバイオ回収の研究例としては醸造用酵母の廃棄物による Au(III)イオンのバイオミネラル化[116]があるが、更なるデータの蓄積が必要であり、実廃液や酸浸出液と組み合わせた検討も必要であろう。

**Table 1.5** Redox potential related to biomineralization of precious metal ions.

反応式	酸化還元電位 (V) [111, 149] (標準電極電位(Eo), 式量電位(Eo'))
ヒドロゲナーゼ(Ox) + H <sub>2</sub> = ヒドロゲナーゼ(Red) + 2H <sup>+</sup>	Eo' = -0.2210 (4Fe center)
シトクロム c3 (Fe <sup>3+</sup> ) + e- = シトクロム c3 (Fe <sup>2+</sup> )	Eo' = -0.226 ( <i>Desulfovibrio vulgaris</i> )
NAD <sup>+</sup> + 2H <sup>+</sup> + 2e- = NADH + H <sup>+</sup>	Eo' = -0.320
NADP <sup>+</sup> + 2H <sup>+</sup> + 2e- = NADPH + H <sup>+</sup>	Eo' = -0.324
ピルビン酸(C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ) + 2H <sup>+</sup> + 2e- = 乳酸(C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> )	Eo' = -0.185
CO <sub>2</sub> + 2H <sup>+</sup> + 2e- = ギ酸(HCOOH)	Eo' = -0.432
Fe <sup>3+</sup> + e- = Fe <sup>2+</sup>	Eo = 0.771
AuCl <sub>4</sub> <sup>-</sup> + 3e- = Au + 4Cl <sup>-</sup>	Eo = 1.002
PtCl <sub>6</sub> <sup>3-</sup> + 4e- = Pt + 6Cl <sup>-</sup>	Eo = 0.744
PtCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + 2e- = Pt + 4Cl <sup>-</sup>	Eo = 0.758
PdCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + 2e- = Pd + 4Cl <sup>-</sup>	Eo = 0.64
RhCl <sub>6</sub> <sup>3-</sup> + 3e- = Rh + 6Cl <sup>-</sup>	Eo = 0.44

**Table 1.6** Biomineralization of Au(III) ion by various microorganisms.

真菌類	pH	電子供与体	粒子生成場	引用文献
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.0	無添加	細胞壁	[116]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	5-7	無添加	細胞外	[119]
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	無添加	細胞外	[120]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	2-9	無添加	細胞表面	[121]
<i>Verticillium sp.</i>	5.5-6.0	無添加	細胞壁、細胞膜	[122]
<i>Verticillum luteoalbum</i>	3-9	無添加	細胞質	[123]
<i>Candida utilis</i>	3-9	無添加	細胞質	[123]
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	無添加	-	[124]
<i>Aspergillus niger</i>	-	無添加	-	[125]
細菌類・古細菌類	pH	電子供与体	粒子生成場	引用文献
<i>Halomonas salina</i>	2-10	無添加	細胞外	[126]
<i>Thermomonospora sp.</i>	9	無添加	細胞外	[127]
<i>Plectonema boryanum</i>	<3	無添加	細胞壁	[128]
<i>Lactobacillus kimchicus</i>	-	無添加	細胞表面	[129]
<i>Caldicellulosiruptor changbaiensis</i>	-	(水素)*	細胞壁	[130]

\*) 水素生成菌による実験

Table 1.6 続き

細菌類・古細菌類	pH	電子供与体	粒子生成場	引用文献
<i>Escherichia coli</i> (DH5a)	-	無添加	細胞表面	[131]
<i>E. coli</i>	2-9	水素	ペリプラズム 細胞質	[27]
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	2-9	水素	ペリプラズム 細胞質	[27, 132]
<i>Geobacter ferrireducens</i>	7.0	水素	ペリプラズム	[133]
<i>Pyrobaculum islandicum</i>	6.0-6.2	水素	細胞表面	[133]
<i>Pyrococcus furiosus</i>	7.0	水素	細胞表面	[133]
<i>Thermotoga maritima</i>	7.0	水素	細胞表面	[133]
<i>Shewanella algae</i>	7.0	水素、乳酸	細胞表面	[133]
<i>Shewanella loihica</i>	7-9	乳酸	細胞外	[134]

**Table 1.7** Biomineralization of Pd(II) ion and Pt(IV) ion by various bacteria.

	金属	pH	電子供与体	粒子生成場	引用文献
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Pd(II)	-	水素、有機酸**	細胞表面	[118]
<i>D. desulfuricans</i>	Pd(II)	3-7	ギ酸	ペリプラズム 細胞表面	[108, 136, 143]
<i>D. desulfuricans</i>	Pd(II)	2.0	水素	細胞表面	[132, 137-139, 141, 146]
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Pd(II)	2.0	水素	細胞表面	[138]
<i>Bacillus sphaericus</i>	Pd(II)	-	水素	ペリプラズム	[136]
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Pd(II)	7	水素	ペリプラズム	[143]
<i>Shewanella loihica</i>	Pd(II)	7-9	乳酸	細胞外	[134]
<i>Shewanella oneidensis</i>	Pd(II)	7.1	水素、EtOH 有機酸**	ペリプラズム	[117, 140, 142, 144]
<i>Cupriavidus necator</i>	Pd(II)	-	ギ酸	細胞表面	[145]
<i>Pseudomonas putida</i>	Pd(II)	-	ギ酸	細胞表面	[145]
<i>S. loihica</i>	Pt(IV)	7-9	乳酸	細胞外	[134]
<i>D. desulfuricans</i>	Pt(IV)	2	水素	細胞表面	[146]
<i>Escherichia. coli</i>	Pt(II)	2.3	水素	細胞表面	[148]

\*\*) ギ酸、乳酸、ピルビン酸

### 1.3 本論文の目的と構成

金属資源の大半を海外に依存している我が国にとって、有用金属の安定的な供給の確保は、産業基盤の維持および経済の持続的な発展のためにより一層重要となっている。我が国の将来的なベースメタルの安定的な供給には、未利用資源である低品位鉱床や海底熱水鉱床が産する一次硫化鉱（黄銅鉱）を主体とする複雑な組成を持つ鉱石から効率良く経済的に有用金属を分離・回収する湿式製錬技術の開発が必要である。また、貴金属の生産・供給リスクに対しては、国内で発生する使用済み製品等を循環資源、所謂“都市鉱山”と捉え、有用金属を分離濃縮・回収するリサイクル技術に期待が高まっている。しかし、代表的な貴金属である金・白金・パラジウムのリサイクル率は30 - 40% (Table 1.3) に留まっており、有用金属のなかでも特に新規リサイクル技術の開発が期待される。このように、我が国の将来的な有用金属の安定的な供給を確保するために、経済的なベースメタルの新規湿式製錬技術および貴金属・レアメタルの新規リサイクル技術の開発という技術的課題に取り組む必要がある。加えて昨今の地球環境問題を踏まえ、新規技術の開発には省エネルギー・低環境負荷であることにも十分配慮する必要がある。

本論文は、従来型の化学的方法や物理的方法に比べて低コスト・低エネルギー・低炭素型の微生物的方法に着目し、有用金属のバイオフィン・回収について工学的観点から基礎的知見を収集した成果をまとめたものである。まず、無機硫黄/鉄イオン酸化古細菌を用いる低品位硫化鉱石からのベースメタル (Cu, Zn) 等の浸出挙動について明らかにした。次に、Fe(III)イオン還元細菌が貴金属・レアメタル (Au, Pd, Pt, Rh) イオンを還元・析出できることを見出し、この微生物機能をベースにした都市鉱山からの貴金属・レアメタル分離・回収について考察した。さらに、パン酵母が貴金属 (Au) イオンを吸着または還元・析出できることも見出し、この微生物機能を利用する都市鉱山からの貴金属リサイクルについても考察を加えた。本論文は8章で構成される。以下に各章の概要を記す。

第1章では、本論文の研究背景をまとめるとともに、研究目的と本論文の構成について述べた。

第2章では、将来的に有望な金属資源である海底熱水鉱床および酸化鉄型銅金鉱床の複雑硫化鉱に対して、好熱性・鉄/硫黄酸化古細菌 *A. brierleyi* に

よるバイオリーチングの適用性について検討した。具体的には、海底熱水鉱床鉱石に対して *A. brierleyi* によるバイオリーチング実験を各種操作条件下で行い、ベースメタル (Cu, Zn, Pb) の浸出挙動とともに、貴金属 (Au) ならびにレアメタル (Ga) の浸出残渣へ濃縮について検討した。低品位黄銅鉱 ( $\text{CuFeS}_2$ ) 鉱石に対しては、通気攪拌槽およびカラム型固定層浸出装置を用いて、*A. brierleyi* によるバイオリーチング実験を各種操作条件下で行い、Cu の浸出挙動に対する共存鉱物 (磁鉄鉱  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) の影響を検討した。

第 3 章では、温和な条件下 (温度  $25^\circ\text{C}$ 、溶液 pH 7.0) において、淡水性 Fe(III)イオン還元細菌 *S. oneidesnis* 静止細胞による液相 Pd(II)イオン還元・析出挙動に及ぼす各種操作条件 (初期液相 Pd(II)イオン濃度、細胞濃度、電子供与体の種類とその初期濃度) の影響について系統的な実験を行って検討した。さらに、バイオ調製粒子の性状と生成場を評価するとともに、その不均一 Pd 触媒としての応用可能性について検討を加えた。

第 4 章では、海洋性 Fe(III)イオン還元細菌 *S. algae* 静止細胞が液相 Pt(IV)イオンを還元・析出する操作条件とともに、バイオ調製粒子の性状と生成場について検討した。

第 5 章では、海洋性 Fe(III)イオン還元細菌 *S. algae* 静止細胞による液相 Au(III)イオンの還元・析出挙動ならびにバイオ調製粒子の性状・生成場に及ぼす各種操作条件 (溶液 pH、初期液相 Au(III)イオン濃度、細胞濃度、電子供与体の種類とその初期濃度、操作時間) の影響について系統的に検討した。また、淡水性 Fe(III)イオン還元細菌 *S. oneidensis* 静止細胞による液相 Au(III)イオンの還元・析出挙動ならびにバイオ合成粒子の性状・生成場についても検討した。

第 6 章では、バイオ分離剤として低コストで大量入手できるパン酵母 (食品分野の普及品) に着目し、酵母 *S. cerevisiae* 静止細胞による酸性溶液 (pH 1.0) 中 Au(III)イオンの吸着挙動とともに、中性溶液中 Au(III)イオンの還元・析出挙動ならびにバイオ調製粒子の性状・生成場について検討した。

第 7 章では、3 章～6 章の結果を踏まえ、使用済み製品 (電子部品、自動車用触媒) 溶解液からの貴金属・レアメタル (Au, Pd, Pt, Rh) のバイオ分離・回収について検討した。具体的には、使用済み電子部品の王水溶解液を対象に、パン酵母 *S. cerevisiae* による強酸性条件下における Au(III)イオンの選択

的な吸着挙動について検討した。さらに、Fe(III)イオン還元細菌 *S. algae* 静止細胞による使用済み触媒溶解液からの白金族金属イオン (Pd(II), Pt(IV), Rh(III)) の還元・析出挙動について、槽型反応器を回分式および連続式で操作して検討した。さらに、*S. algae* 細胞に濃縮された白金族金属の回収方法についても検討を加えた。

第 8 章では、本論文における各章の研究成果を総括したうえで、今後の研究展望を示した。

## References

- [1] K. Hirai, *Hyomen Kagaku* **35** (2014) 114-115.
- [2] M. Taniguchi, *J. MMIJ* **131** (2015) 588-591.
- [3] S. Ueda, N. Okamoto, *J. MMIJ* **131** (2015) 610-613.
- [4] T. Yamazaki, *J. MMIJ* **131** (2015) 592-59.
- [5] M. Kobayashi, *Shigen-to-Sozai* **116** (2000) 1-6.
- [6] K. Goto, T. Shibue, K. Murakami, *J. MMIJ* **131** (2015) 553-558.
- [7] H. R. Watling, *Hydrometallurgy* **140** (2013) 163-180.
- [8] H. R. Watling, *Hydrometallurgy* **146** (2014) 96-110.
- [9] 三浦 彰, バイオマイニング技術を用いた低品位硫化銅鉱の湿式製錬プロセス, 小西康裕 監修, バイオベース資源確保戦略, シーエムシー出版, 2015, 9-17.
- [10] D. E. Rawlings, *Annu. Rev. Microbiol.* **56** (2002) 65-91.
- [11] E. R. Donnati, W. Sand, *Microbial Processing of Metal Sulfides*, Springer, Heiderberg, 2007.
- [12] Y. Konishi, *Kinzoku*, **78** (2008) 707-714.
- [13] M. Haruta, N. Yamada, T. Kobayashi, S. Iijima, *J. Catal.* **115** (1989) 301-309.
- [14] S.-F. Cheng, L.-K. Chau, *Anal. Chem.* **75** (2003) 16-21.
- [15] N. Masuda, T. Adachi, J. Yamatomi, *Shigen-to-Sozai* **117** (2001) 591-598.
- [16] K. Halada, K. Ijima, M. Shimada, N. Katagiri, *J. Japan Inst. Met. Mater.* **73** (2009) 151-160.
- [17] T. H. Okabe, H. Nakada, K. Morita, *Hyomen Kagaku* **29** (2008) 592-600.
- [18] F. Crundwell, M. Moats, V. Ramachandran, T. Robinson, W. G. Davenport, *Extractive Metallurgy of Nickel, Cobalt and Platinum Group Metals* 1st ed., Elsevier, Amsterdam, 2011.
- [19] M. Tanaka, K. Koyama, H. Narita, T. Oishi, *Materia Japan* **50** (2011) 161-167.
- [20] J. P. H. Perez, K. Folens, K. Leus, F. Vanhaecke, P. Van Der Voort, G. Du Laing, *Res. Conserv. Recycl.* (2019) 177-188.
- [21] S. Bao, Y. Tang, Y. Zhang, L. Liang, *Chem. Eng. Technol.* **39** (2016) 1377-1392.

- [22] M. K. Jha, J.-C. Lee, M.-S. Kim, J. Jeong, B.-S. Kim, V. Kumar, *Hydrometallurgy* **133** (2013) 23-32.
- [23] J. D. Miller, R. Y. Wan, J. R. Parga, *Hydrometallurgy* **24** (1990) 373-392.
- [24] C. Flores, T. J. O'Keefe, Gold recovery from organic solvents using galvanic stripping. In: Misra, M. (Ed.), *Separation Processes - Heavy Metals, Ions and Minerals -*. The Minerals, Metals and Materials Society, Warrendale, 1995, 187-201.
- [25] H. Dong, J. Zhao, J. Chen, Y. Wu, B. Li, *Int. J. Miner. Process.* **145** (2015) 108-113.
- [26] F. Caccavo Jr., R. P. Blakemore, D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (1992) 3211-3216.
- [27] K. Deplanche, L. E. Macaskie, *Biotechnol. Bioeng.* **99** (2008) 1055-1064.
- [28] A. Kapoor, T. Viraraghavan, *Bioresour. Technol.* **53** (1995) 195-206.
- [29] U.S. Geological Survey, Mineral commodity summaries 2018, U.S. Geological Survey <https://doi.org/10.3133/70194932>. (2018).
- [30] J. Cui, L. Zhang, *J. Hazardous Mater.* **158** (2008) 228-256.
- [31] 資源エネルギー庁, 平成 29 年度貴金属流通統計調査, 資源エネルギー庁 [http://www.enecho.meti.go.jp/statistics/coal\\_and\\_minerals/cm005/results.html#headline2](http://www.enecho.meti.go.jp/statistics/coal_and_minerals/cm005/results.html#headline2) (2017).
- [32] W. Rudolfs, *Soil Sci.* **14** (1922) 135-147.
- [33] J. G. Lipman, S. A. Waksman, J.S. Joffe, *Soil Sci.* **12** (1921) 475-489.
- [34] S. A. Waksman, J. S. Joffe, *J. Bacteriol.* **7** (1922) 239-256.
- [35] R. Colmer, M. E. Hinkle, *Science* **106** (1947) 253-256.
- [36] M. P. Silverman, *J. Bacteriol.* **94** (1967) 1046-1051.
- [37] A. Schippers, T. Rohwerder, W. Sand, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52** (1999) 104-110.
- [38] W. Sand, T. Gehrke, P. G. Jozsa, A. Schippers, *Hydrometallurgy* **59** (2001) 159-175.
- [39] D. E. Rawlings, *Pure Appl. Chem.* **76** (2004) 847-859.
- [40] M. Vera, A. Schippers, W. Sand, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97** (2013) 7529-7541.
- [41] K. L. Temple, A. R. Colmer, *J. Bacteriol.* **62** (1951) 605-611.

- [42] S. Asai, Y. Konishi, K. Yoshida, *Chem. Eng. Sci.* **47** (1992) 133-139.
- [43] W. E. Razzell, P. C. Trusell, *J. Bacteriol.* **85** (1963) 595-603.
- [44] A. Pinches, F. O. Al-Jaid, D. J. A. Williams, B. Atkinson, *Hydrometallurgy* **2** (1976) 87-103.
- [45] L. S. Gormely, D. W. Duncan, R. M. R. Branion, K. L. Pinder, *Biotechnol. Bioeng.* **17** (1975) 31-49.
- [46] A. E. Torma, C. C. Walden, R. M. R. Branion, *Biotechnol. Bioeng.* **12** (1970) 501-517.
- [47] L. J. Mason, N. M. Rice, *Minerals Eng.* **15** (2002) 795-808.
- [48] J. A. Brierley, Ph.D. Thesis, Montana State University, Bozeman, Montana. 1966
- [49] C. L. Brierley, L. E. Murr, *Science* **179** (1973) 488-490.
- [50] J. A. Brierley, *Appl. Environ. Microbiol.* **36** (1978) 523-525.
- [51] J. A. Brierley, *FEMS Microbiol. Rev.* **75** (1990) 287-292.
- [52] Y. Konishi, S. Yoshida, S. Asai, *Biotechnol. Bioeng.* **48** (1995) 592-600.
- [53] Y. Konishi, H. Nishimura, S. Asai, *Hydrometallurgy* **47** (1998) 339-352.
- [54] Y. Konishi, S. Asai, M. Tokushige, T. Suzuki, *Shigen to Sozai* **115** (1999) 585-590.
- [55] Y. Konishi, S. Asai, M. Tokushige, T. Suzuki, *Biotechnol. Prog.* **15** (1999) 681-688.
- [56] Y. Konishi, M. Tokushige, S. Asai, T. Suzuki, *Hydrometallurgy* **59** (2001) 271-282.
- [57] G. Wheaton, J. Counts, A. Mukherjee, J. Kruh, R. Kelly, *Minerals* **5** (2015) 397-451.
- [58] J. A. Brierley, *Hydrometallurgy* **94** (2008) 2-7.
- [59] A. H. Kaksonen, N. J. Boxall, Y. Gumulya, H. N. Khaleque, C. Morris, T. Bohu, K. Y. Cheng, K. M. Usher, A. M. Lakaniemi. *Hydrometallurgy* **180** (2018) 7-25.
- [60] P. C. van Aswegen, J. van Niekerk, W. Olivier, The BIOX™ Process for the Treatment of Refractory Gold Concentrates. In: D. E. Rawlings, D. B. Johnson (Ed.), *Biomining*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007, 1-33.
- [61] J. D. Batty, G. V. Rorke, *Hydrometallurgy* **83** (2006) 83-89.
- [62] C. A. du Plessis, J. D. Batty, D. W. Dew, Commercial Applications of Thermophile Bioleaching. In: D. E. Rawlings, D. B. Johnson (Ed.), *Biomining*, Springer-Verlag, Berlin

Heidelberg, 2007, 57-80.

- [63] K. A. Natarajan, *Biotechnology of Metals*. 1st ed., Elsevier, Amsterdam, 2018.
- [64] J. J. Plumb, R. B. Hawkes, P. D. Franzmann, *The Microbiology of Moderately Thermophilic and Transiently Thermophilic Ore Heaps*. In: D. E. Rawlings, D. B. Johnson (Ed.), *Biomining*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007, 217-235.
- [65] C. L. Brierley, *Trans. Nonferrous Metals Soc. China* **18** (2008) 1302-1310.
- [66] J. Petersen, D. G. Dixon, *Modeling and Optimization of Heap Bioleach Processes*. In: D. E. Rawlings, D. B. Johnson (Ed.), *Biomining*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007, 153-176.
- [67] S.W. Robertson, P.J. van Staden, A. Seyedbagheri, *J. Southern African Inst. Min. Metall.* **112** (2012) 1045-1050.
- [68] W. Liu, G. Granata, *Hydrometallurgy* **176** (2018) 26-32.
- [69] C. Erüst, A. Akcil, C. S. Gahan, A. Tuncuka, H. Deveci, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **88** (2013) 2115-2132.
- [70] J. Willner, J. Kadukova, A. Fornalczyk, M. Saternus, *Metalurgija* **54** (2015) 255-258.
- [71] S. Wu, H. Nakazawa, W. Hareyama, Y. Kudo, *J. MMIJ* **125** (2009) 43-48.
- [72] J. Willner, A. Fornalczyk, *Environ. Protect. Eng.* **39** (2013) 197-208.
- [73] A. Işıldar, E. D. van Hullebusch, M. Lenz, G. Du Laing, A. Marra, A. Cesaro, S. Panda., A. Akcil, M. Ali Kucuker, K. Kuchta, *J. Hazard. Mater.* **362** (2019) 467-481.
- [74] I. Asghari, S. M. Mousavi, F. Amiri, S. Tavassoli, *J. Ind. Eng. Chem.* **19** (2013) 1069-1081.
- [75] R. Dhankhar, A. Hooda, *Environ. Technol.* **32** (2011) 467-491.
- [76] B. Volesky, *Trends in Biotechnol.* **5** (1987) 96-101.
- [77] N. Kuyucak, B. Volesky, *Biotechnol. Lett.* **10** (1988) 137-142.
- [78] F. Veglio, F. Beolchini, *Hydrometallurgy* **44** (1997) 301-316.
- [79] G. M. Gadd, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84** (2009) 13-28.
- [80] T. Viraraghavan, Y. S. Yun, *Biotechnol. Adv.* **26** (2008) 266-291.

- [81] M. Desvaux, E. Dumas, I. Chafsey, M. Hebraud, *FEMS Microbiol. Lett.* **256** (2006) 1-15.
- [82] G. V. Sherbet, *The biophysical characterization of the cell surface.*, Academic press, London 1978.
- [83] S. Galdiero, A. Falanga, M. Cantisani, R. Tarallo, M. E. Della Pepa, V. D’Oriano, M. Galdiero, *Curr. Prot. Pept. Sci.* **13** (2012) 843-854.
- [84] M. Fomina, G.M. Gadd, *Bioresour. Technol.* **160** (2014) 3-14.
- [85] B. P. Dengis, L. R. Nelissen, P. G. Rouxhet, *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (1995) 718-728.
- [86] K. Tálos, T. Pernyeszi, C. Majdik, A. Hegedusova, C. Páger, *J. Serb. Chem. Soc.* **77** (2012) 549-561.
- [87] D. Brady, J. R. Duncan, *Enzyme Microb. Technol.* **16** (1994) 633-638.
- [88] B. Volesky, *Water Res.* **41** (2007) 4017- 4029.
- [89] U. Dziwulska, A. Bajguz, B. Godlewska-Zytkiewicz<sup>1</sup>, *Anal. Lett.* **37** (2004) 2189-2203.
- [90] R. S. Bai, T. E. Abraham, *Bioresour. Technol.* **87** (2003) 17-26.
- [91] K. Vijayaraghavan, Y. S. Yun, *Ind. Eng. Chem. Res.* **46** (2007) 608-617.
- [92] M. Z. C. Hu, M. Reeves, *Biotechnol. Prog.* **13** (1997) 60-70.
- [93] P. Cyganowski, K. Garbera, A. Leśniewicz, J. Wolska, P. Pohl, D. Jermakowicz-Bartkowiak, *J. Saudi Chem. Soc.* **21** (2017) 741-750.
- [94] A. V. Pethkar, K. M. Paknikar, *J. Biotechnol.* **63** (1998) 121-136.
- [95] H. Niu, B. Volesky, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74** (1999) 778-784.
- [96] S. Ilyas, J. C. Lee, *Chem. BioEng. Rev.* **1** (2014) 180-189.
- [97] S. W. Won, P. Kotte, W. Wei, A. Lim, Y. S. Yun, *Bioresour. Technol.* **160** (2014) 203-212.
- [98] N. Das, *Hydrometallurgy* **103** (2010) 301-316
- [99] I. Savvaidis, *BioMetals* **11** (1998) 145-151.
- [100] A. V. Pethkar, S. K. Kulkarni, K. M. Paknikar, *Biores. Technol.* **80** (2001) 211-215.
- [101] K. H. Khoo, Y. P. Ting, *Biotechnol. Bioeng. J.* **8** (2001) 51-59.

- [102] K. R. Shah, S. M. Duggirala, D. R. Tipre, S. R. Dave, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **80** (2017) 46-51.
- [103] B. Godlewska-Zylkiewicz, *Spectrochim. Acta Part B* **58** (2003) 1531-1540.
- [104] L. M. Pavlova, E. V. Nekrasovb, V. I. Radomskayaa, L. P. Shumilovaa, N. A. Borodinaa, P. Sorokina, *Doklady Earth Sci.* **483** (2018) 1442-1444.
- [105] I. de Vargas, L. E. Macaskie, E. Guibal. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79** (2004) 49-56.
- [106] S. Kim, M. H. Song, W. Wei, Y. S. Yun, *J. Hazardous Materials* **283** (2015) 657-662.
- [107] L. Tan, H. Cui, Y. Xiao, H. Xu, M. Xu, H. Wu, H. Dong, G. Qiu, X. Liu, J. Xie, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **169** (2019) 103-111.
- [108] P. Yong, N. A. Rowson, J. P. G. Farr, I. R. Harris, L. E. Macaskie, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77** (2002) 593-601.
- [109] L. Sintubin, W. Verstraete, N. Boon, *Biotechnol. Bioeng.* **109** (2012) 2422-2436.
- [110] M. Ovais, A. T. Khalil, M. Ayaz, I. Ahmad, S. K. Nethi, S. Mukherjee, *Int. J. Mol. Sci.* **19** (2018) <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19124100>.
- [111] 日本化学会 編, 化学便覧 基礎編 改訂 5 版, 丸善出版, (2004).
- [112] M. Ovais, A. T. Khalil, N. Ul Islamm, M. Ayaz, I. Ahmad, M. Saravanan, Z. K. Shinwar, S. Mukherjee, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102** (2018) 6799-6814.
- [113] N. Kaushik, M. S. Thakkar, S. Snehit, M. S. Mhatre, Y. Rasesh, M. S. Parikh, *Nanotechnology* **6** (2010) 257-262.
- [114] F. Ahmad, N. Ashraf, T. Ashraf, R. B. Zhou<sup>1</sup>, D. C. Yin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103** (2019) 2913-2935.
- [115] J. R. Lloyd, *FEMS Microbiol. Rev.* **27** (2003) 411-425.
- [116] Z. Lin, J. Wu, R. Xue, Y. Yang, *Spectrochim. Acta Part A* **61** (2005) 761-765.
- [117] W. De Windt, P. Aelterman, W. Verstraete, *Environ. Microbiol.* **7** (2005) 314-325.
- [118] J. R. Lloyd, P. Yong, L. E. Macaskie, *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (1998) 4607-4609.
- [119] E. B. Domany, T. M. Essam, A. E. Ahmed, A. A. Farghali, *J. Appl. Pharmaceutical Sci.* **8** (2018) 119-128.

- [120] M. M. Hulikere, C. G. Joshi, A. Danagoudar, J. Poyya, A. K. Kudva, B. L. Dhananjaya, *Process Biochem.* **63** (2017) 137-144.
- [121] M. Agnihotri, S. Joshi, A. R. Kumar, S. Zinjarde, S. Kulkarni, *Mater. Lett.* **63** (2009) 1231-1234.
- [122] P. Mukherjee, S. Senapati, D. Mandal, A. Ahmad, M. I. Khan, R. Kumar, M. Sastry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (2001) 3585-3588.
- [123] M. Gericke, A. Pinches, *Hydrometallurgy* **83** (2006) 132-140.
- [124] P. Mukherjee, S. Senapati, D. Mandal, A. Ahmad, M. I. Khan, R. Kumar, M. Sastry, *Chem. BioChem.* **3** (2002) 461-463.
- [125] R. Bhambure, M. Bule, N. Shaligram, M. Kamat, R. Singhal, *Chem. Eng. Technol.* **32** (2009) 1036-1041.
- [126] R. Shah, G. Oza, S. Pandey, M. Sharon, *J. Microbiol. Biotech. Res.* **2** (2012) 485-492.
- [127] M. Sastry, A. Ahmad, M. I. Khan, R. Kumar, *Curr. Sci.* **85** (2003) 162-170.
- [128] M. F. Lengke, B. Ravel, M. E. Fleet, G. Wanger, R. A. Gordon, G. Southam, *Environ. Sci. Technol.* **40** (2006) 6304-6309.
- [129] J. Markus, R. Mathiyalagan, Y. J. Kim, R. Abbai, P. Singh, S. Ahn, Z. E. Jimenez, P. J. Hurha, D. C. Yang, *Enzyme Microb. Technol.* **95** (2016) 85-93.
- [130] W. Bing, H. Sun, F. Wang, Y. Song, J. Ren, *J. Mater. Chem. Part B* **6** (2018) 4602-4609.
- [131] L. Du, H. Jiang, X. Liu, E. Wang, *Electrochem. Commun.* **9** (2007) 1165-1170.
- [132] N. J. Creamer, V. S. Baxter-Plant, J. Henderson, M. Potte, L. E. Macaskie, *Biotechnol. Lett.* **28** (2006) 1475-1484.
- [133] K. Kashefi, J. M. Tor, K. P. Nevin, and D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (2001) 3275-3279.
- [134] E. Ahmed, S. Kalathil, L. Shi, O. Alharbi, P. Wang, *J. Saudi Chem. Soc.* **22** (2018) 919-929.
- [135] P. Yong, N. A. Rowson, J. P. G. Farr, I. R. Harris, L. E. Macaskie, *Biotechnol. Bioeng.* **80** (2002) 369-379.
- [136] N. J. Creamer, I. P. Mikheenko, P. Yong, K. Deplanche, D. Sanyahumbi, J. Wood, K. Pollmann,

- M. Merroun, S. Selenska-Pobell, L. E. Macaskie, *Catal. Today* **128** (2007), 80-87.
- [137] J. A. Bennett, N. J. Creamer, K. Deplanche, L. E. Macaskie, I. J. Shannon, J. Wood, *Chem. Eng. Sci.* **65** (2010) 282-290.
- [138] V. S. Baxter-Plant, I. P. Mikheenko, L. E. Macaskie, *Biodegradation* **14** (2003) 83-90.
- [139] V. S. Baxter-Plant, I. P. Mikheenko, M. Robson, S. J. Harrad, L. E. Macaskie, *Biotechnol. Lett.* **26** (2004) 1885-1890.
- [140] W. De Windt, N. Boon, J. Van den Bulcke, L. Rubberecht, F. Prata, J. Mast, T. Hennebel, W. Verstraete, A. Van Leeuwenhoek, *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **90** (2006) 377-389.
- [141] S. Harrad, M. Robson, S. Hazrati, V. S. Baxter-Plant, K. Deplanche, M. D. Redwood, L. E. Macaskie, *J. Environ. Monit.* **9** (2007) 314-318.
- [142] B. Mertens, C. Blothe, K. Windey, W. De Windt, W. Verstraete, *Chemosphere* **66** (2007) 99-105.
- [143] M. D. Redwood, K. Deplanche, V. S. Baxter-Plant, L. E. Macaskie, *Biotechnol. Bioeng.* **99** (2008) 1045-1054.
- [144] T. Hennebel, H. Simoen, W. De Windt, M. Verloo, N. Boon, W. Verstraete, *Biotechnol. Bioeng.* **102** (2009) 995-1002.
- [145] L. S. Søbjerg, D. Gauthier, A. T. Lindhardt, M. Bunge, K. Finster, R.L. Meyer, T. Skrydstrup, *Green Chem.* **11** (2009) 2041-2046.
- [146] P. Yong, M. Paterson-Beedle, I. P. Mikheenko, L. E. Macaskie, *Biotechnol. Lett.* **29** (2007) 539-544.
- [147] A. N. Mabbett, D. Sanyahumbi, P. Yong, L. E. Macaskie, *Environ. Sci. Technol.*, **40** (2006) 1015-1021.
- [148] G. Attard, M. Casadesús, L. E. Macaskie, K. Deplanche, *Langmuir* **28** (2012) 5267-5274.
- [149] D. Dobos, *Electrochemical data: a handbook for electrochemists in industry and universities.*, Elsevier Scientific Pub. Co., Amsterdam, 1975.

## 第2章 好熱性・鉄/硫黄酸化古細菌 *Acidianus brierleyi* による ベースメタル (Cu、Zn) の浸出

### 2.1 緒言

2013年7月に公表された「海底熱水鉱床開発計画 第1期最終報告書」においては、海底熱水鉱床が複雑な鉱物組成をもつ鉱石であることが確認され、その選鉱・製錬方法として、既存の黒鉱処理で使われていた方法の有効性はさらに検証が必要であると述べられている。このことを踏まえ、製錬技術の一つの選択肢として低コスト・環境調和型の湿式製錬技術であるバイオリーチングに着目し、このバイオ技術を海底熱水鉱床からの有用金属の浸出・回収に適用することを検討することは意義深いことである。他方、重要なベースメタルである銅(Cu)については、多様な銅製品の急速な消費拡大の結果、銅資源の主要産出国において黄銅鉱( $\text{CuFeS}_2$ )を主体とした「一次硫化鉱」鉱石の低品位化に直面している[1]。そのなかで将来的に有望な硫化物鉱床の一つとして、酸化鉄型銅金鉱床(Iron oxide-copper-gold deposits (IOCG 鉱床))が挙げられる。IOCG 鉱床は主要な銅産出国であるチリ、豪州を始め6大陸に遍く分布している。主な有価金属としては一次硫化鉱中の銅と金(Au)であるが、通常、20%以上の酸化鉄を含んでいることが特徴である[2]。2003年時点での、IOCG 鉱床からのCu, Auの生産量は世界全体の各々5%以下・1%以下であるが、今後の発見の可能性から探鉱ターゲットとなっている[3]。現在、粗鉱の鉱石堆積層(ヒープまたはダンプ)において行われるバイオリーチングは選鉱処理を簡略化できるため、低環境負荷であると同時に鉱石の低品位化に対して経済的に有効であるが、黄銅鉱に対するバイオリーチングは化学的な浸出と同様に浸出速度が低く、埋蔵量が豊富な未利用資源である低品位一次硫化鉱の商業生産には至っていない。したがって、有望なCu資源である低品位IOCG 鉱床の粗鉱に対するバイオリーチングは未利用資源の湿式製錬技術として興味深い。

既往の研究において、好酸性・好熱性古細菌 *A. brierleyi* は、硫化鉱物に対して非常に優れた浸出能力を発揮することが明らかになっている[4-11]。Konishi *et al.*[12]は、*A. brierleyi*による海底熱水鉱床鉱石(38 - 53  $\mu\text{m}$ )のバイオリーチング実験を液回分式攪拌槽において行い、亜鉛(Zn)浸出率およ

び液相菌体濃度の経時変化を測定した。具体的には、浸出液に *A. brierleyi* を接種することにより Zn 浸出率は著しく増大し、最適操作条件（65°C、溶液 pH 1.5、初期全菌体濃度  $1 \times 10^{13}$  cells/m<sup>3</sup>、初期鉱石試料-溶液混合比 5 kg/m<sup>3</sup>）では 6 d の回分操作で Zn 浸出率が 90% に達することを明らかにした。また、海底熱水鉱床鉱石からの Zn 浸出速度は陸上閃亜鉛鉱（精鉱）の場合と同程度になり、*A. brierleyi* が海底熱水鉱床鉱石に対しても優れた浸出能を発揮することが示されたが、使用された海底熱水鉱床鉱石は閃亜鉛鉱が主成分であったことから、Zn 以外の有用金属の浸出に関する知見を得ることができなかった。また、低品位一次硫化鉱の主要鉱石である黄銅鉱に対しては、好酸性・好熱性古細菌が好酸性・中温性細菌に比べて非常に優れた浸出能力を発揮することが報告されている [6, 13]。既往の研究において、*A. brierleyi* による黄銅鉱精鉱（38 - 53 μm）のバイオリーチングにおいては、10 d で 90% 以上の Cu の浸出が認められたが [6, 10]、低品位一次硫化鉱においては黄銅鉱に対して酸化鉄や珪酸塩鉱物等の多量の共存鉱物が存在するため、これらが Cu の浸出に及ぼす影響について更なる知見が求められる。

本章では、将来的に有望な有価金属資源である海底熱水鉱床鉱石および低品位一次硫化鉱粗鉱に対して、好酸性・好熱性古細菌 *A. brierleyi* によるバイオリーチングにおける各種の有価金属の浸出挙動について検討した。具体的には、海底熱水鉱床鉱石に対しては、先行研究とは異なる鉱石を対象に *A. brierleyi* によるバイオリーチング実験を各種操作条件下で行い、ベースメタル（Cu, Zn, Pb）、貴金属（Au）ならびにレアメタル（Ga）の浸出挙動を明らかにすることを研究目的とした。また低品位一次硫化鉱粗鉱に対しては、*A. brierleyi* によるバイオリーチング実験を各種操作条件下で行い、Cu の浸出挙動に対する共存鉱物の影響を検討した。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 試料

リーチング微生物である好酸性・好熱性古細菌 *A. brierleyi* は、ドイツ微生物寄託機関 DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) から分譲された DSMZ 1651 株である。植え継ぎ培養では、DSMZ 指定の *A. brierleyi* 培地から元素硫黄を除いたものに、5 kg/m<sup>3</sup> の海底熱水鉱床鉱石若し

くは IOCG 低品位一次硫化鉱石を添加した培地 (pH 1.5) を用いた。この改変 *A. brierleyi* 培地の液相組成は、9K 液体培地[14]の  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  を除いて、0.05 w/v%の酵母エキスを補足したものと同一である ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3.0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{KCl}$ , 0.1;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.01; 酵母エキス, 0.5 ( $\text{kg}/\text{m}^3\text{-water}$ ))。酵母エキスの補足は、*A. brierleyi* の細胞分裂を促進する効果がある[15]。回転式振とう機 (回転数 100 rpm) を用いて 65°C で植え継ぎ培養 (約 7 日の間隔) を繰り返した結果、8 回目以降の植え継ぎ培養実験で各硫化鉱石試料の浸出速度がほぼ等しくなったことから、*A. brierleyi* が各鉱石試料に馴化したと見なし、対数増殖期末期の細胞を浸出実験に用いた。

海底熱水鉱床鉱石の試料は、日本近海で採取された鉱石試料を自動乳鉢 (FRITSCH, P-2) により粉砕し、超音波ふるい機を用いて粒子径 38 - 53  $\mu\text{m}$  に篩分け、蒸留水による洗浄を 2 度繰り返した後、室温で乾燥させたものである。本鉱石試料の粉末 X 線回折分析 (Cu-K $\alpha$  線、40KV, 80 mA) から、閃亜鉛鉱 ( $\text{ZnS}$ )、黄銅鉱 ( $\text{CuFeS}_2$ )、方鉛鉱 ( $\text{PbS}$ )、モンモリロナイト ( $(\text{Na,Ca})_{0.33}(\text{Al,Mg})_2 \text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) が含まれていることがわかった。海底熱水鉱床鉱石試料の化学組成を Table 2.1 に示す。ヒ素 (As) 含有率については、試料 A が 5240 mg/kg と最も高く、試料 B が 267 mg/kg と最も低い。低品位一次硫化鉱石はチリ国アタカマ鉱山の IOCG 粗鉱を用いた。粉末 X 線回折分析による主な鉱物組成は、硫化鉱物として黄銅鉱、共存鉱物として多量の磁鉄鉱 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )、母岩鉱物として石英 ( $\text{SiO}_2$ ) と粘土鉱物である。この粗鉱を粉砕し、53 - 75  $\mu\text{m}$ , 25 - 38  $\mu\text{m}$ , 13 - 25  $\mu\text{m}$ . に分級した。13 - 25  $\mu\text{m}$  に分級された粗鉱の化学組成は、Cu: 1.15 wt%, Fe: 20.4 wt%, S: 2.63 wt%, Si: 46.3 wt% であり、鉱物組成は、黄銅鉱 2.5 wt % , 磁鉄鉱 19 wt % , 石英 76 wt % である。低品位一次硫化鉱石試料の化学組成を Table 2.2 に示す。

**Table 2.1** Chemical composition of deep-sea hydrothermal ore deposits.

Sample	Zn wt%	Cu wt%	Fe wt%	Pb wt%	S wt%	SiO <sub>2</sub> wt%	As mg/kg	Ga mg/kg	Au mg/kg
A	21.2	0.96	3.93	2.20	13.8	45.4	5240	46.7	11.5
B	40.3	3.26	5.52	4.10	28.1	0.04	267	-	0.38
C	20.1	3.49	8.85	2.60	20.4	35.3	1400	46.0	16.0

**Table 2.2** Chemical composition of ore samples with different size ranges.

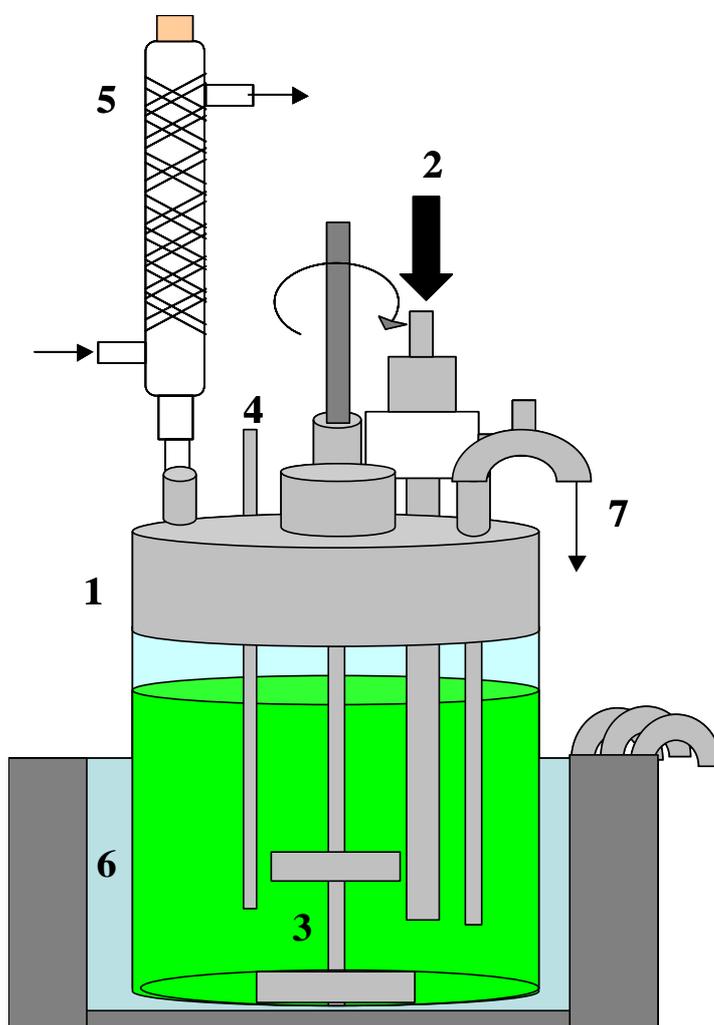
Particle size range ( $\mu\text{m}$ )	Chemical composition	
	Cu (wt%)	Fe (wt%)
+ 13 - 25	1.24	23.3
+ 25 - 38	1.29	20.6
+ 38 - 53	1.44	23.7
+ 53 - 75	1.11	20.6

### 2.2.2 浸出実験

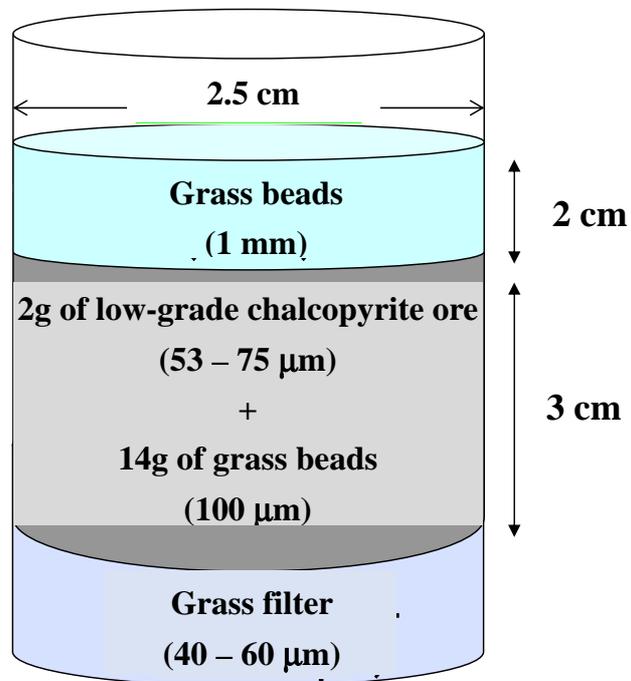
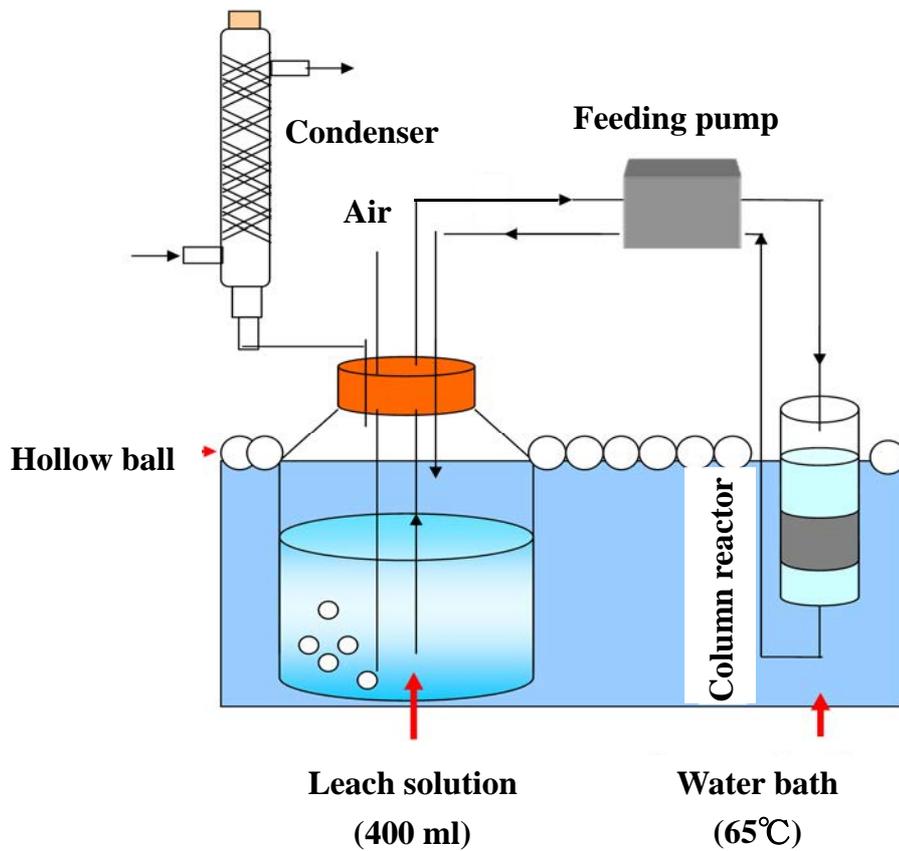
海底熱水鉱床鉱石の浸出用反応器としては、恒温室内に設置したバッフル付き三角フラスコ（ガラス製）を用いた。浸出実験では、容量  $500 \text{ cm}^3$  のバッフル付き三角フラスコに、 $200 \text{ cm}^3$  の浸出液と所定量の鉱石試料を仕込み、固液混合物を振とう攪拌（回転数  $100 \text{ rpm}$ ）することにより、回分操作にしたがって浸出実験を行った。また、一部の実験では、容量  $500 \text{ cm}^3$  の通気攪拌槽[12]（攪拌回転数  $500 \text{ rpm}$ ）を用いた。浸出液の初期組成は、上記の改変 *A. brierleyi* 培地の液相組成と同一である。浸出実験の操作条件としては、温度  $65^\circ\text{C}$  の一定条件下で、初期菌体濃度を  $1.0 \times 10^{13} \text{ cells/m}^3$  または  $1.0 \times 10^{14} \text{ cells/m}^3$ 、初期溶液 pH を 1.2 - 2.0、初期鉱石-溶液混合比を  $5.0 - 40 \text{ kg/m}^3$  の範囲で変化させた。一部の浸出実験では、海水のミネラル主成分である NaCl を  $0.05 - 0.3 \text{ kmol/m}^3$  の濃度範囲で添加した。

低品位一次硫化鉄鉱石の浸出実験には、容量  $1000 \text{ cm}^3$  の通気攪拌槽[10, 11] およびカラム型固定層浸出装置を用いた。通気攪拌槽を用いた浸出実験の操作条件としては、初期菌体濃度  $1.2 \times 10^{14} \text{ cells/m}^3$ 、初期鉱石-溶液混合比  $5.0 \text{ kg/m}^3$  の一定条件下で、初期溶液 pH を 1.2 - 2.0 の範囲で変化させた。また、一部の実験では、Fe(III)イオンとして  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  を初期濃度  $0.5 \text{ g/l}$  または  $1.0 \text{ g/l}$  で添加した。浸出実験中は浸出温度  $65^\circ\text{C}$ 、攪拌回転数  $250 \text{ rpm}$ 、通気量（空気） $1000 \text{ cm}^3/\text{min}$  に保持した。カラム型固定層浸出装置は、長さ  $22 \text{ cm}$ 、直径  $2.5 \text{ cm}$  ガラス製カラムに  $53 - 75 \mu\text{m}$  の低品位一次硫化鉄  $2.0 \text{ g}$  と直径  $100 \mu\text{m}$  のガラスビーズ  $2.0 \text{ g}$  を充填した。カラム型浸出装置は、容量  $400 \text{ cm}^3$  の貯留槽に接続し、ここで空気を通気した。改変 *A. brierleyi* 培地と同一組成の浸出液を、ペリスタリックポンプを用いて  $0.3 - 2.0 \text{ cm}^3/\text{min}$  で循環させた。カラム型装置と貯留槽は恒温水槽に浸漬し、 $65^\circ\text{C}$  に保持した。

浸出実験を開始した後、ほぼ1日ごとに浸出液のpHを測定するとともに、適当な時間間隔で約1 cm<sup>3</sup>の液試料を採取し、液相菌体濃度および各種金属の液相濃度の経時変化を測定した。カラム型反応槽を用いた実験では貯留槽から試料を採取した。液相菌体濃度は、細菌計算盤を用いてビデオ装置付き光学顕微鏡下（1000倍）で計測した。液相金属濃度の測定には、誘導結合プラズマ（ICP）発光分析装置（ICPE-9000、島津製作所）、原子吸光光度計（AA-6650、島津製作所）を使用した。各金属の浸出率は、液相金属濃度の実測値と鉱石試料の初期金属含有率から求めた。



**Figure 2.1** Overview of stirred reactor. 1 Glass stirred vessel, 2 Air inlet, 3 Impeller, 4 Thermometer, 5 Condenser, 6 Thermobath, 7 Sampling port.



**Figure 2.2** Schematic of column reactor.

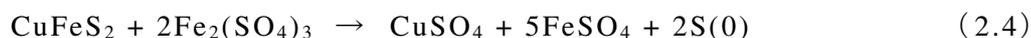
## 2.3 実験結果および考察

### 2.3.1 海底熱水鉱石のバイオ浸出

#### (1) 銅および亜鉛の浸出挙動

*A. brierleyi* による海底熱水鉱床鉱石（試料 A）のバイオリーチングの実験結果を Figure 2.3 に示す。主な操作条件は、溶液 pH  $1.8 \pm 0.3$ 、初期鉱石-溶液混合比  $5 \text{ kg/m}^3$  である。無菌対照（化学浸出）実験では、10 d で Zn 浸出率は 20%、Cu 浸出率は 4% 程度である。一方、*A. brierleyi* を接種した場合には、操作時間の経過に伴って、液相菌体濃度が増加するとともに、ベースメタル（Zn, Cu）の浸出率が著しく増大した。10 d の回分操作において、Zn 浸出率は 80%、Cu 浸出率は 85% となった。これらベースメタルの浸出に伴い、液相菌体濃度が著しく増加したことから、好熱性・鉄/硫黄酸化古細菌 *A. brierleyi* が鉱石試料中の硫化物を基質（栄養源）として増殖したことがわかる。

Fe を含む硫化鉱石のバイオリーチングでは、化学浸出剤となる Fe(III)イオンが黄銅鉱など硫化鉱物の溶解にしたがって供給される。このような硫化鉱石のバイオリーチングでは、鉱物に付着した細菌による微生物的浸出である直接浸出機構[8, 9, 16]（反応 (2.1), (2.2)）と Fe(III)イオンによる化学的浸出である間接浸出機構[17]（反応 (2.3), (2.4)）が関与する可能性がある。



さらに、反応 (2.3), (2.4) の生成物である Fe(II)イオンおよび S(0)は、*A. brierleyi* の触媒作用にしたがって酸化される。



ただし、鉱石試料 A の鉄含有率が 3.93 %と低いうえに、このバイオリーチング実験の 10 d において、液相 Fe(III)濃度の実測値は  $0.064 \text{ kg/m}^3$  と希薄であり、Fe 浸出率は 32%であった。したがって、間接浸出機構の寄与は直接浸出機構と比較して小さいと考えられる。Cu および Zn の浸出率に比べて Fe 浸出率が低い理由は、溶液 pH  $1.8 \pm 0.3$  であるために、浸出された Fe(III)イオンのうち 60 %程度は酸性条件下でも加水分解されてジャロサイト ( $\text{K,Na,}(\text{NH}_4)\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ ) として浸出液から沈殿・除去されたためと考えられる。

両鉱石試料の As 含有率 (Table 2.1) は試料 A が  $5240 \text{ mg/kg}$ 、試料 B が  $267 \text{ mg/kg}$  と著しく異なっているが、Figure 2.3 において鉱石試料 A および鉱石試料 B に対する Zn 浸出率を比較すると、両試料の Zn 浸出率には大差がなく、8 - 10 d のバイオリーチングにおいて Zn 浸出率が 80%を超えた。本実験条件下において、浸出液 As 濃度の実測値は  $10 \text{ g/m}^3$  以下と希薄であったことから、As 成分による *A. brierleyi* 生育阻害ならびにベースメタル浸出抑制は起こらなかったと推測される。したがって、好熱性・鉄/硫黄酸化古細菌 *A. brierleyi* による海底熱水鉱床鉱石のバイオリーチングは、Zn とともに Cu に対しても有効な浸出方法であることが明らかになった。

## (2) 鉛の浸出挙動

本鉱石試料には硫化鉱物として方鉛鉱 ( $\text{PbS}$ ) も含まれているが、バイオリーチング実験において浸出液中の鉛濃度は ICP 発光分光分析の検出限界 ( $0.1 \text{ g/m}^3$ ) 以下であった。Pb の浸出挙動を明確にするために、浸出実験前の鉱石試料 A、試料 A の化学浸出実験後およびバイオリーチング実験後の残渣について、粉末 X 線回折 (XRD) 分析を行った。浸出実験前の試料 A には、閃亜鉛鉱、黄銅鉱、方鉛鉱、モンモリロナイトが存在する (Figure 2.4 (A))。無菌対照の化学浸出では Zn および Cu の浸出率が 20 %以下と低いこともあり、化学浸出残渣は浸出前試料と同様の XRD パターンを示した (Figure 2.4 (B))。一方、バイオリーチング残渣の XRD パターンにおいては、浸出されなかった硫化鉱物の XRD ピークが検出されるが、浸出実験前の鉱石試料には存在しなかった硫酸鉛 ( $\text{PbSO}_4$ ) の XRD ピークが顕著に現れた (Figure 2.4 (C))。これは、他の硫化鉱物と同様に方鉛鉱も *A. brierleyi* の作用により酸

化・溶解したと推測されるが、溶出した Pb イオンは硫化鉱物の酸化によって生成する硫酸イオンと液相反応を起こし、難溶解性化合物である硫酸鉛として二次的に沈殿したためと考えられる。

### (3) ガリウムおよび金の浸出残渣への濃縮

海底熱水鉱床鉱石（試料 A、試料 C）には、微量成分としてレアメタルである Ga、貴金属である Au が存在する。A. brierleyi による鉱石試料 A のバイオリーチングにおいて、浸出液中の Ga 濃度を測定し、Ga 浸出率の経時変化を求めた。Figure 2.5(A)に示すように、初期鉱石-溶液混合比が  $5 \text{ kg/m}^3$  の場合には、10 d の回分操作における Ga 浸出率は 41% となり、Zn・Cu の浸出率（80%・85%）に比べて約半分であった。初期鉱石-溶液混合比が増加するに伴い、Ga 浸出率は減少した。とくに初期鉱石-溶液混合比が  $40 \text{ kg/m}^3$  の場合には、Ga 浸出率は 5% 以下にまで低下した。ただし、浸出操作後 15 d における液相 Ga 濃度の測定値は初期鉱石-溶液混合比に関係なく  $116 \pm 20 \text{ g/m}^3$  でほぼ一定となった。これは、バイオリーチング実験において溶液 pH が 2.0 - 2.8 の範囲にあったことから、鉱石試料から液相に浸出された Ga(III) が水酸化ガリウムとして再沈殿したことに起因すると推測される。すなわち、液相ガリウム濃度が飽和値（水酸化ガリウムの溶解度積）に達したことが、初期鉱石-溶液混合比の増加に伴う Ga 浸出率の減少につながったと考えられる。一方で浸出液中の金濃度は ICP 発光分光分析の検出限界（ $0.1 \text{ g/m}^3$ ）以下であったことから、A. brierleyi によるバイオリーチングにおいて鉱石試料中の Au は浸出されないことがわかった。

鉱石試料の微量成分である Ga, Au の浸出挙動を再確認するために、バイオリーチング残渣中の Ga, Au の定量分析を行った。初期固液混合比が 20、40  $\text{kg/m}^3$  の場合、鉱石試料 A（浸出前）と浸出残渣の Ga 濃度を比較すると、46.7  $\text{mg/kg}$  から 83 - 84  $\text{mg/kg}$  に増加した。すなわち、バイオリーチング前後における Ga 濃縮倍率は 1.8 倍になり、バイオリーチングにしたがってガリウムは浸出残渣中に濃縮されることがわかる。Au については、初期固液混合比とは無関係に鉱石試料 A（浸出前）と浸出残渣の Au 濃度は 11.5  $\text{mg/kg}$  から 22  $\text{mg/kg}$  に増加し、バイオリーチング残渣中への Au の濃縮倍率は 1.9 倍となった。したがって、好酸性・好熱性古細菌 A. brierleyi による海底熱水鉱床鉱石のバイオリーチングにおいては、ベースメタル（Zn, Cu）の大半を液相に

浸出させることができるが、一方では希薄成分であるレアメタル (Ga) および貴金属 (Au) を浸出残渣に濃縮できることが明らかになった。本研究で使用した鉱石試料 A には、好酸性・好熱性古細菌 *A. brierleyi* によるバイオリーチングにおいて酸化・溶解されないケイ酸塩鉱物が  $\text{SiO}_2$  として 45.4 % も存在する。このため、硫化鉱物の浸出率が 80% 以上の高レベルに達した場合であっても、海底熱水鉱床鉱石中の希薄成分である Ga, Au が溶存成分としてバイオリーチング残渣中に濃縮される倍率は本実験条件下では 1.8 - 1.9 倍に留まった。しかしながら、バイオリーチングの実用的な前処理として海底熱水鉱床鉱石の粉碎・選鉱を行い、無用なケイ酸塩鉱物を分離・除去した後の硫化鉱精鉱に対してバイオリーチングを行えば、Zn, Cu の 80% 以上が浸出されることから、Ga, Au のバイオリーチング残渣への濃縮倍率はさらに増大することになる。例えば、鉱物 (試料 A) 中のケイ酸塩 ( $\text{SiO}_2$ ) 含有率が 45.4% から 1% に低下すると仮定すると、浸出残渣への Ga, Au 濃縮倍率は現状の 1.8 - 1.9 倍から 5.1 - 6.7 倍に増加すると試算できる。この場合、バイオリーチング残渣は Au : 61 mg/kg、Ga : 315 mg/kg を含むことになり、浸出残渣は少なくとも貴金属鉱石として有価物になると考えられる。

#### (4) 銅および亜鉛の浸出速度に及ぼす操作因子の影響

*A. brierleyi* による海底熱水鉱床鉱石 (試料 A、試料 C) のバイオリーチングにおいて、ベースメタル (Zn, Cu) の浸出速度 (金属浸出率の経時変化) に及ぼす各種操作因子の影響を実験的に検討した。ただし、好気性・独立栄養微生物である *A. brierleyi* をバイオリーチングに用いることから、空気吹き込み (通気) により浸出液に酸素、二酸化炭素を溶解・供給する必要がある。本研究では空気の供給速度を  $1000 \text{ cm}^3/\text{min}$  と  $0 \text{ cm}^3/\text{min}$  (巡回水平振とうによる液相攪拌のみ) に変化させて浸出実験を行ったが、両実験において *A. brierleyi* の増殖速度および Zn 浸出速度に顕著な違いは認められなかった (データ省略)。すなわち、本実験条件下では、浸出液に通気をせずに振とう攪拌だけでも、酸素および二酸化炭素の溶解・供給速度が硫化鉱物バイオリーチングの律速段階でないことが確認された。したがって、本研究では、操作因子として初期鉱石-溶液混合比 (パルプ濃度)、初期 pH、初期菌体濃度の影響について検討することにした。また、浸出液の無機塩濃度についても着目し、*A. brierleyi* の生育に必要な基礎無機塩濃度の影響、また海水ミネラル主成分

NaCl の添加濃度の影響についても検討した。

**【初期鉱石-溶液混合比の影響】** Zn, Cu の浸出速度に及ぼす初期鉱石-溶液混合比の影響を Figure 2.5(B,C)に示す。鉱石試料の初期添加量を 5 - 40 kg/m<sup>3</sup> の範囲で増加させるに伴い、*A. brierleyi* による浸出が顕著に起こるまでの誘導期が長くなる傾向があるが、誘導期以降では Zn, Cu の浸出速度（浸出率の経時変化）は鉱物添加量の影響をあまり受けなかった。15 d の回分操作で、Zn, Cu の浸出率は 80%程度に達したことから、初期固液混合比 40 kg/m<sup>3</sup> に高めた場合でも海底熱水鉱床鉱石からベースメタルを効率よく浸出できることがわかった。

**【溶液 pH の影響】** 好酸性・好熱性古細菌 *A. brierleyi* の生育至適 pH 値が 1.5 - 2.0 であることから、浸出液の初期 pH 値を酸性条件下で変化させて浸出速度への影響を調べた。なお、浸出液の初期 pH 値が pH 1.2 - 2.0 の範囲内では、バイオリーチング過程における浸出液 pH 値の変動幅は、初期値から ± 0.1 の範囲内と小さかった。Figure 2.6 に示すように、Zn, Cu 浸出率の経時変化には大差がなく、10 d の回分操作で 80%を超える高い浸出率が得られた。したがって、*A. brierleyi* による海底熱水鉱床鉱石のバイオリーチング操作では、浸出液の初期 pH 値については pH 1.2 - 2.0 の範囲内に設定しておけば、浸出過程において pH 調整を行う必要がないことがわかった。

**【初期菌体濃度の影響】** ベースメタル浸出率に及ぼす初期菌体濃度  $X_0$  の影響を Figure 2.7 に示す。*A. brierleyi* 細胞の接種量を  $1.0 \times 10^{13}$  cells/m<sup>3</sup> から  $1.0 \times 10^{14}$  cells/m<sup>3</sup> まで 10 倍に増加させた場合でも、液相菌体濃度の増加量は 2 d 以降では大差がなくなり、Zn, Cu の浸出速度には顕著な変化は認められないことがわかった。効果的な浸出操作を行うためには、*A. brierleyi* 細胞の初期接種量は  $1.0 \times 10^{13}$  cells/m<sup>3</sup> の濃度レベル以上であれば十分であることが明らかになった。

**【液体培地の基礎無機塩濃度の影響】** 化学薬品の使用量の低減を図るために、浸出液に用いる改変 *A. brierleyi* 培地の基礎無機塩濃度が Zn, Cu 浸出速度に与える影響について調べた。改変 *A. brierleyi* 培地およびその無機塩濃度を 1/10 に低下させた希釈培地の両者を浸出液として用いて、鉱石試料 A のバイオリーチング実験を行い、Zn, Cu の浸出率と液相菌体濃度の経時変化を測定した。Figure 2.8 に示すように、基礎無機塩濃度を 1/10 に低減した液

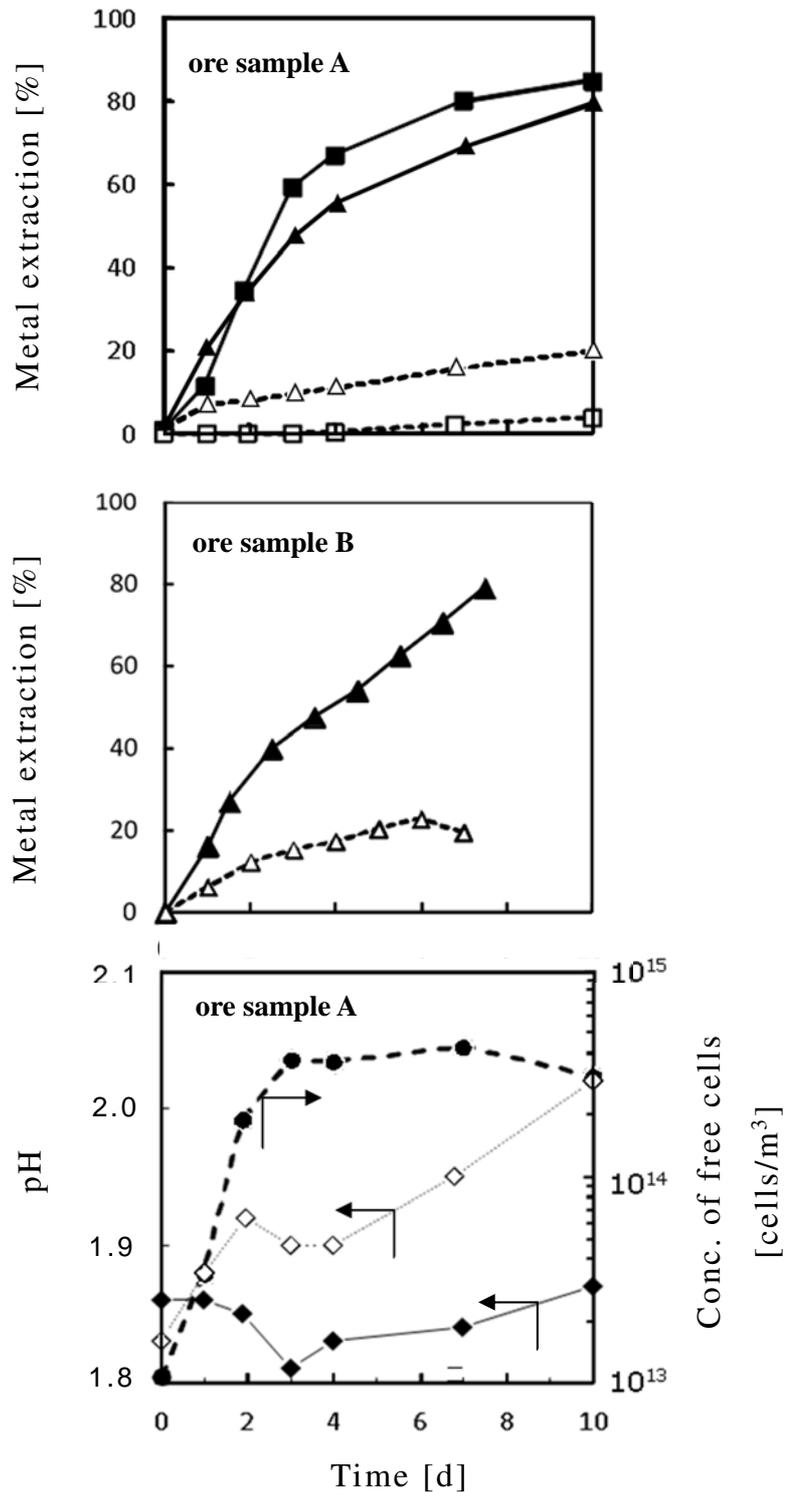
体培地を用いても、*A. brierleyi* の増殖ならびにベースメタル浸出に悪影響が現れないことがわかった。

**【NaCl 濃度の影響】** 海底より採掘する熱水鉱床鉱石には、海水成分が付着することが想定されることから、Zn, Cu の浸出率に及ぼす NaCl (海水に  $0.47 \text{ kmol/m}^3$  含まれる主要な塩) 濃度の影響について調べた。改変 *A. brierleyi* 培地に NaCl を液相濃度が  $0.05 - 0.3 \text{ kmol/m}^3$  となるように添加し、鉱石試料 C に対するバイオリーチング実験を行った結果を Figure 2.9 に示す。無菌・化学対照実験では、NaCl 濃度が  $0.3 \text{ kmol/m}^3$  まで増加するのに伴い、Zn, Cu の浸出率が増加する傾向にあり、Cu に比べて Zn の浸出率が NaCl 濃度の影響を大きく受けた。とくに NaCl 濃度が  $0.3 \text{ kmol/m}^3$  の場合、17 d の回分操作で Cu 浸出率が 14%であるのに対し、Zn 浸出率は 29%に達した。*A. brierleyi* によるバイオリーチングでは、Zn の浸出速度は見かけ上 NaCl 濃度の影響を受けなかった。しかしながら、NaCl 濃度の増加に伴い、Zn の化学浸出速度が増加することから、*A. brierleyi* の触媒作用による Zn の浸出速度は低下すると考えられる。一方、Cu のバイオリーチングは、NaCl 濃度が  $0.05 \text{ kmol/m}^3$  の場合にはその影響を受けなかったが、NaCl 濃度が  $0.1 - 0.3 \text{ kmol/m}^3$  に高まった場合には浸出速度が低下することがわかった。Zn, Cu の浸出速度が低下した場合には液相菌体濃度の増加速度も低下したことから、塩化物イオン濃度の増加が *A. brierleyi* の生育阻害を引き起こしたと考えられる。実用的な観点から、浸出液への海水混入の許容範囲は、浸出液中の NaCl 濃度が  $0.05 \text{ kmol/m}^3$  以下であることが明らかになった。

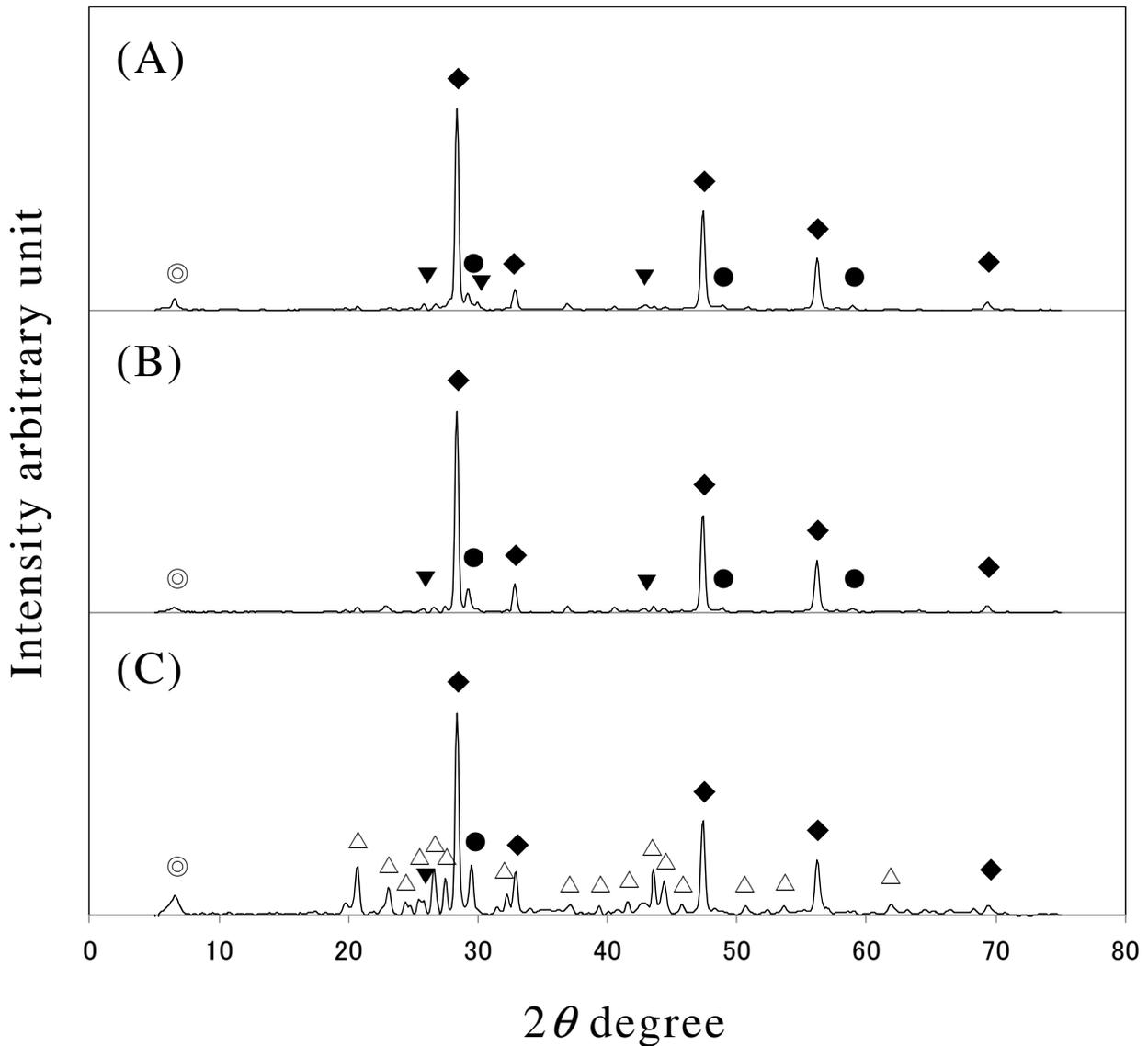
#### (5) 陸上硫化鉱物のバイオリーチングとの比較

海底熱水鉱床鉱石と陸上硫化鉱物との浸出挙動を比較するために、花岡鉱山産 (秋田県) の高品位精鉱のバイオリーチングに関する既往の実験データ [8, 10]) に着目した。この既往データは、*A. brierleyi* による高品位精鉱 (閃亜鉛鉱、黄銅鉱) のバイオリーチング実験を液回分式攪拌槽において行い、Zn 浸出率および Cu 浸出率の経時変化を測定したものである。なお、両精鉱の浸出条件は、温度  $65^\circ\text{C}$ 、初期精鉱粒子径  $38 - 53 \mu\text{m}$ 、初期菌体濃度  $1.0 \times 10^{13} \text{ cells/m}^3$ 、初期鉱石-溶液混合比  $5, 10 \text{ kg/m}^3$  である。ただし、閃亜鉛鉱は pH 2.0、黄銅鉱は pH 1.2 の条件下でバイオリーチング実験が行われた。Figure 2.10 は、海底熱水鉱床鉱石に対するバイオリーチング実験データ (図中のシンボル

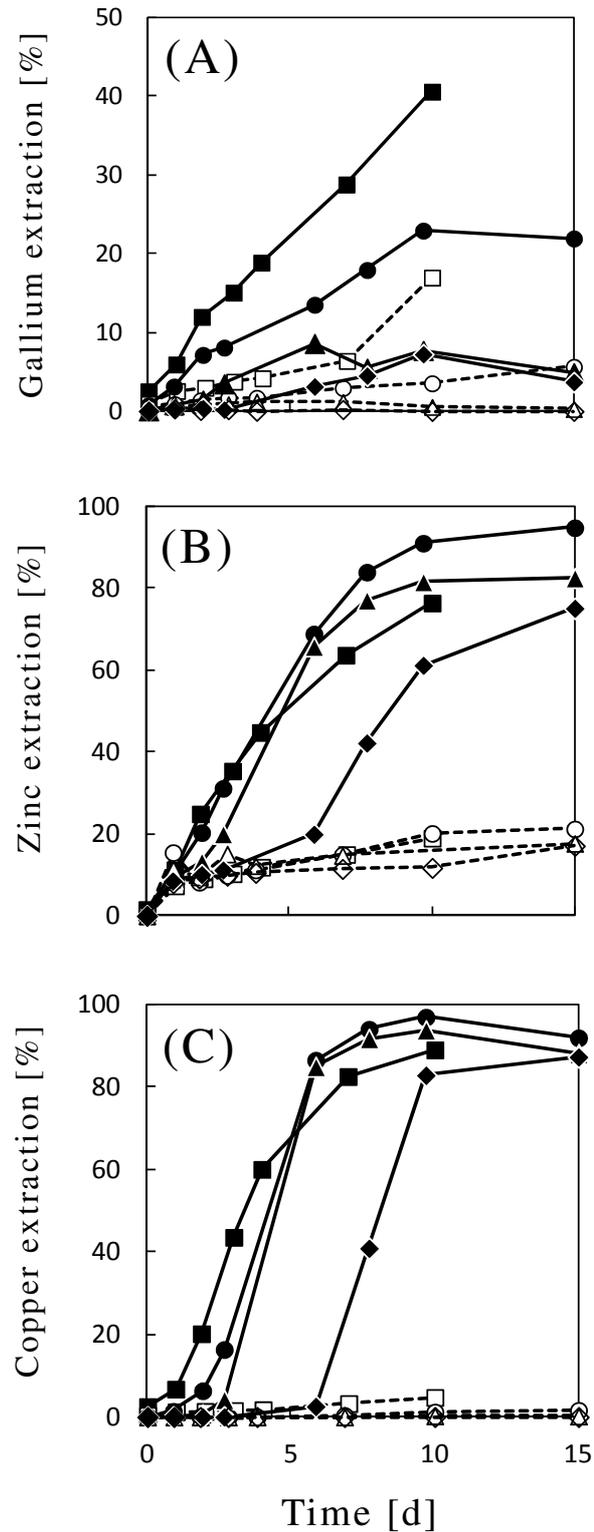
●, ■, ◆) を、陸上精鉱試料に対する既往データ (図中のシンボル ○, ◎, □, ◇) と比較したものである。両鉱石試料のバイオリーチング実験条件が可能な限り同一となるように、海底熱水鉱床鉱石の浸出データを選定して図示した。ただし、Cu 浸出率の一部データ (初期鉱石試料-溶液混合比 10 kg/m<sup>3</sup>) は異なる pH 値での比較になるが、上述の通り pH 1.2 - 2.0 の範囲内では海底熱水鉱床鉱石からの Cu 浸出率の経時変化には大差がないことがわかっている。Figure 2.10 に示すように、両鉱石試料に対する Zn, Cu 浸出率の経時変化は完全に一致したわけではないが、回分操作によるバイオリーチング初期には誘導期が現れることを考慮すると、海底熱水鉱床鉱石からのベースメタル浸出速度 (浸出率の経時変化) は陸上硫化鉱物 (精鉱) の場合と同程度になると判断できる。したがって、陸上硫化鉱物に対して有効なリーチング用微生物である *A. brierleyi* が、海底熱水鉱床鉱石を対象にしても優れたベースメタル浸出能を発揮することが明らかになった。



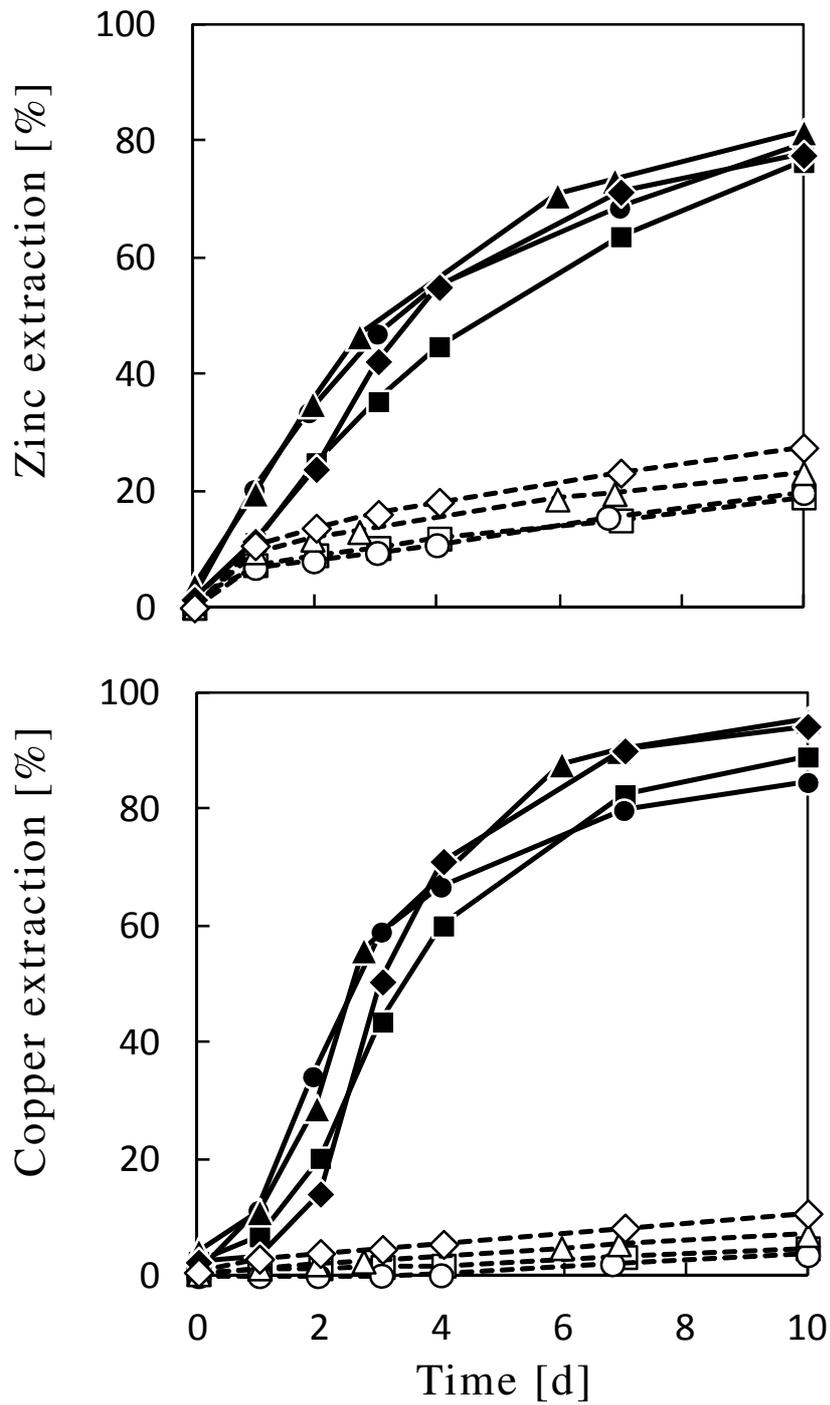
**Figure 2.3** Bioleaching of deep-sea hydrothermal sulfide by the thermophilic archaea on *A. brierleyi* at 65°C, an initial pH 1.8, an initial cell concentration  $X_0$  of  $1.0 \times 10^{13}$  cells/m<sup>3</sup>, and an initial ore-liquid loading ratio  $W_0/V$  of 5 kg/m<sup>3</sup>: (■) copper extraction; (▲) zinc extraction; (●) ore sample A, free cell concentration; (◆) pH of leaching solution; (□, △, ◇) leaching without *A. brierleyi* (sterile control).



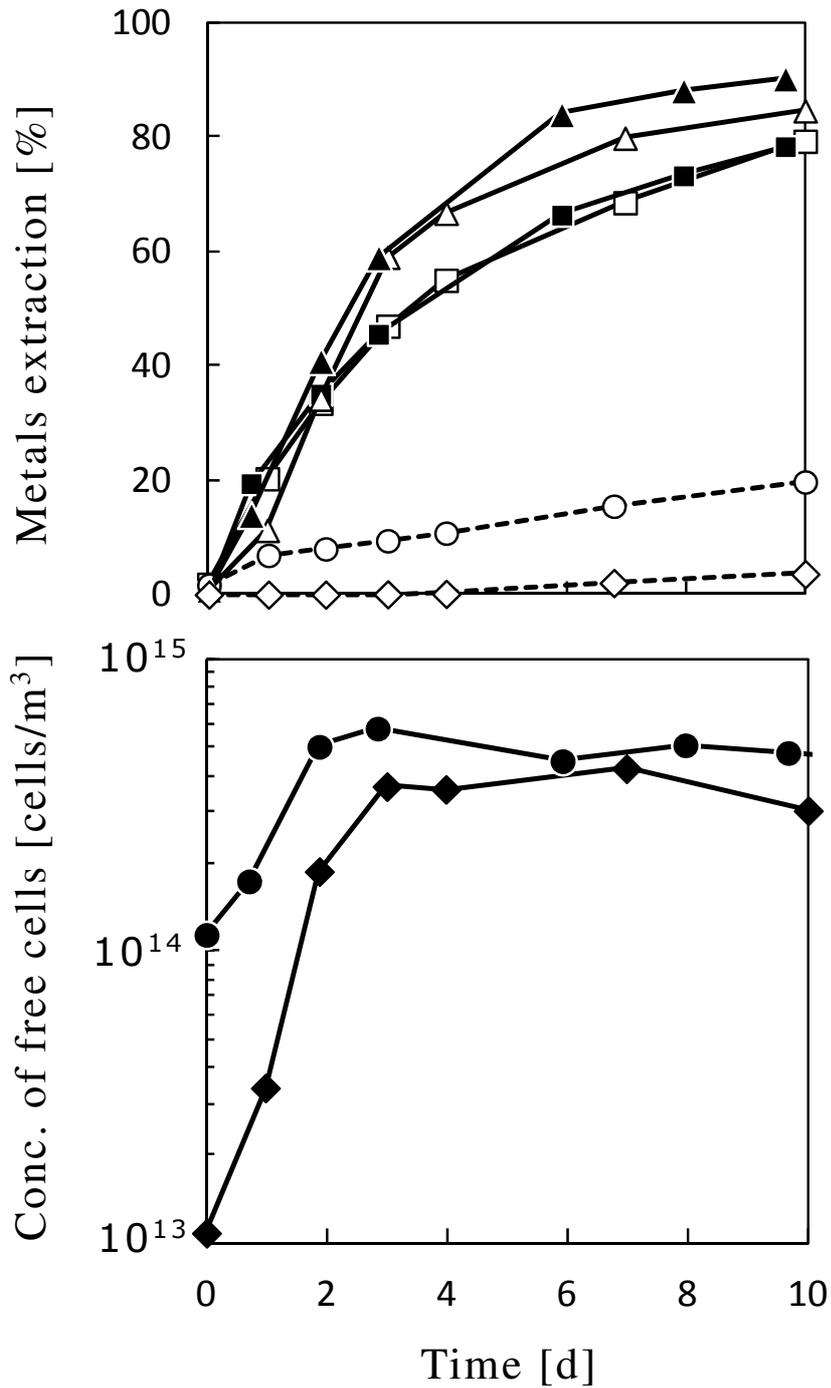
**Figure 2.4** X-ray diffraction patterns of (A) before leaching, (B) ore sample A after leaching without *A. brierleyi* at 65°C, an initial pH 1.2, and an initial ore-liquid loading ratio  $W_0/V$  of 5 kg/m<sup>3</sup>; (C) ore sample A after bioleaching with *A. brierleyi* at 65°C, an initial pH 1.2, an initial cell concentration  $X_0$  of  $1.0 \times 10^{13}$  cells/m<sup>3</sup>, and an initial ore-liquid loading ratio  $W_0/V$  of 5 kg/m<sup>3</sup>: (◆) sphalerite; (●) chalcopyrite; (▼) galena; (⊙) montmorillonite; (△) anglesite.



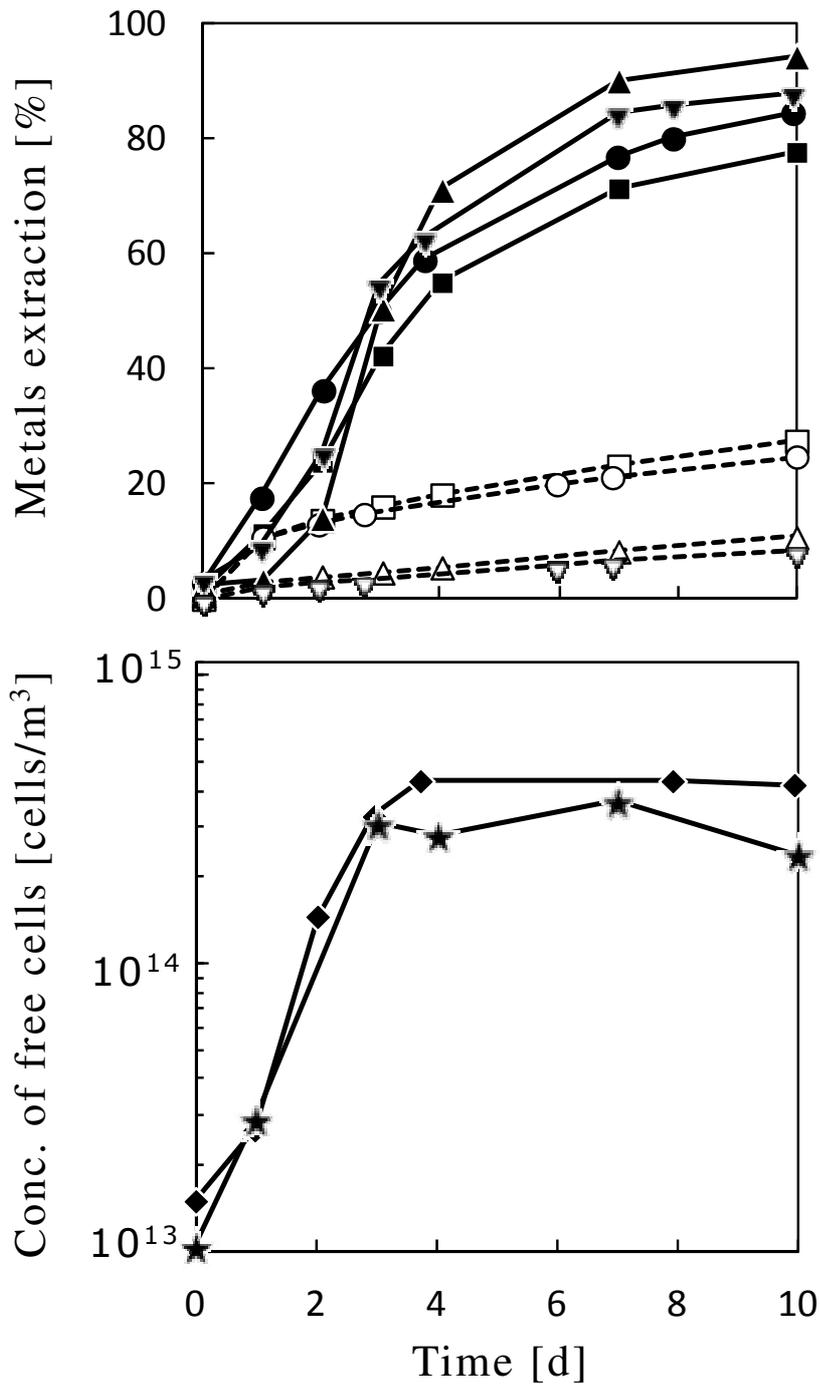
**Figure 2.5** Effect of initial ore-liquid loading ratio  $W_0/V$  on bioleaching rates of (A) gallium, (B) zinc and (C) copper from ore sample A at an initial pH 2.0 and an initial cell concentration  $X_0$  of  $1.0 \times 10^{13}$  cells/m<sup>3</sup>: (■)  $W_0/V = 5 \text{ kg/m}^3$ ; (●)  $W_0/V = 10 \text{ kg/m}^3$ ; (▲)  $W_0/V = 20 \text{ kg/m}^3$ ; (◆)  $W_0/V = 40 \text{ kg/m}^3$ ; (□, ○, △, ◇) sterile control.



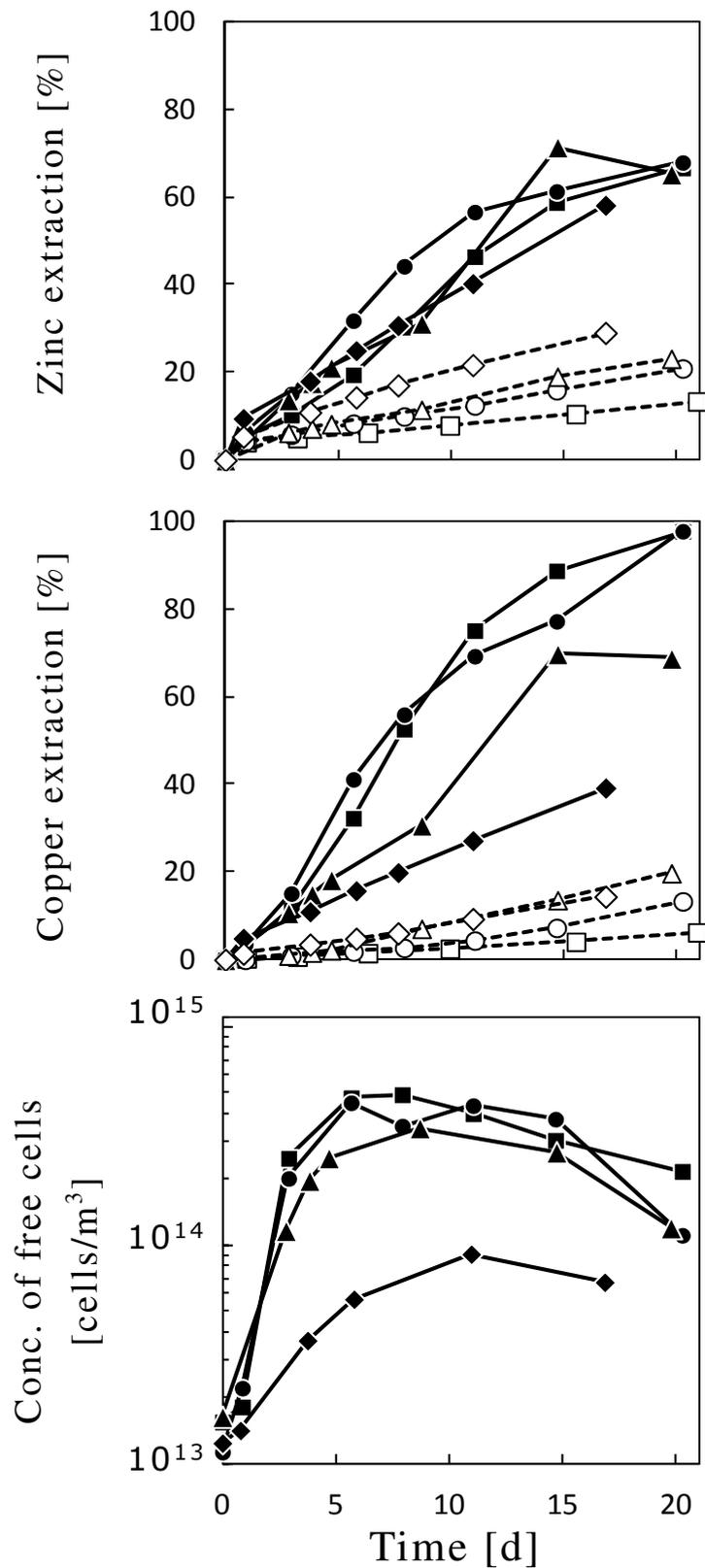
**Figure 2.6** Effect of solution pH on bioleaching rates of zinc and copper from ore sample A at an initial ore-liquid loading ratio  $W_0/V$  of  $5 \text{ kg/m}^3$  and an initial cell concentration  $X_0$  of  $1.0 \times 10^{13} \text{ cells/m}^3$ : (■) pH 2.0; (●) pH 1.8; (▲) pH 1.5; (◆) pH 1.2; (□, ○, △, ◇) sterile control.



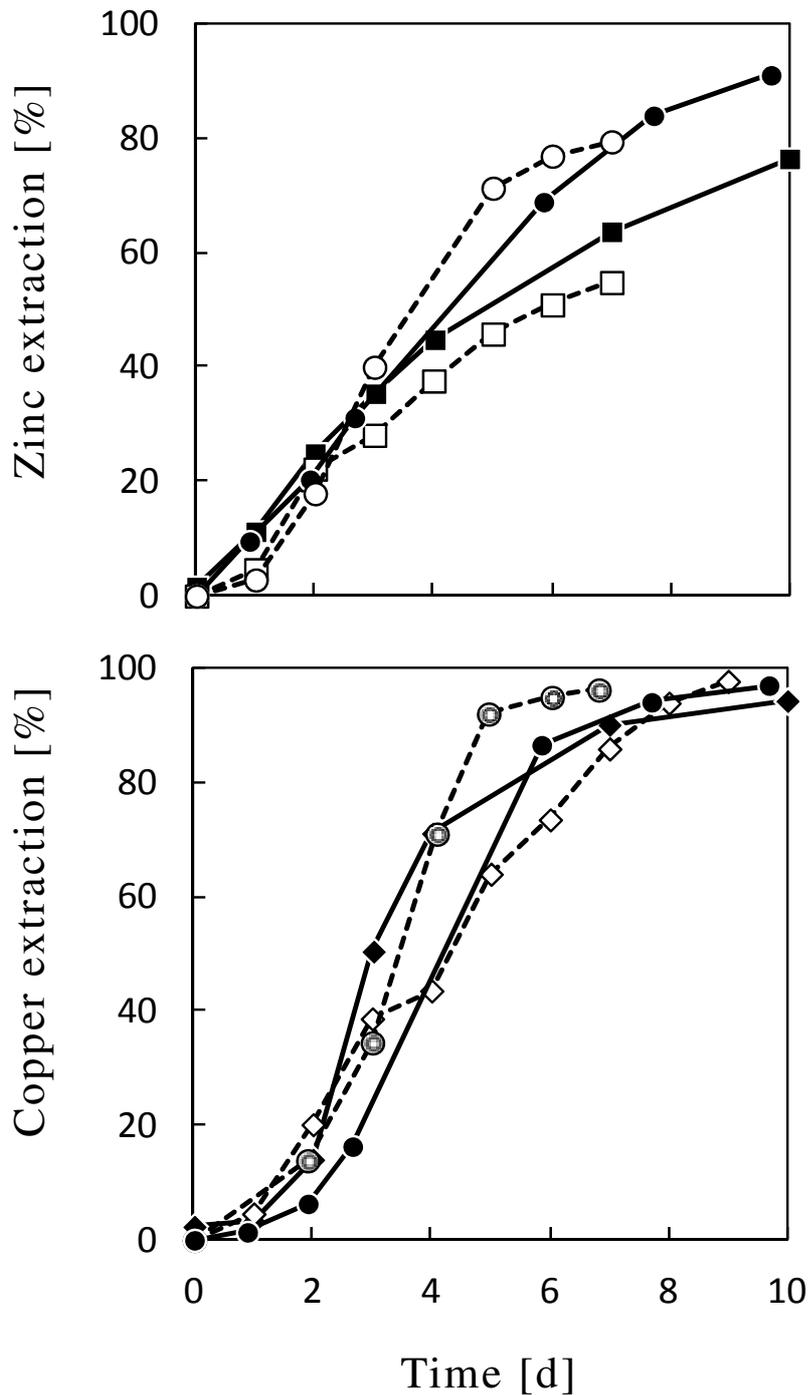
**Figure 2.7** Effect of initial cell concentration  $X_0$  on microbial growth rates and bioleaching rates of zinc and copper from ore sample A at an initial pH 1.8 and an initial ore-liquid loading ratio  $W_0/V$  of  $5 \text{ kg/m}^3$ : (■) zinc,  $X_0 = 1.0 \times 10^{14} \text{ cells/m}^3$ ; (□) zinc,  $X_0 = 1.0 \times 10^{13} \text{ cells/m}^3$ ; (▲) copper,  $X_0 = 1.0 \times 10^{14} \text{ cells/m}^3$ ; (△) copper,  $X_0 = 1.0 \times 10^{13} \text{ cells/m}^3$ ; (○) zinc, sterile control; (◇) copper, sterile control, (●) free cell concentration,  $X_0 = 1.0 \times 10^{14} \text{ cells/m}^3$ ; (◆) free cell concentration,  $X_0 = 1.0 \times 10^{13} \text{ cells/m}^3$ .



**Figure 2.8** Effect of basal inorganic salts concentration on microbial growth rates and bioleaching rates of zinc and copper from ore sample A at an initial pH 1.2, an initial cell concentration  $X_0$  of  $1.0 \times 10^{13}$  cells/m<sup>3</sup>, and an initial ore-liquid loading ratio  $W_0/V$  of 5 kg/m<sup>3</sup>: (■) zinc extraction, *A. brierleyi* medium; (●) zinc extraction, diluted *A. brierleyi* medium with water in the ratio of 1:9 (a 10-fold dilution); (▲) copper extraction, *A. brierleyi* medium; (▼) copper extraction, diluted *A. brierleyi* medium with water in the ratio of 1:9 (a 10-fold dilution); (◆) free cell concentration, *A. brierleyi* medium; (★) free cell concentration, diluted *A. brierleyi* medium with water in the ratio of 1:9 (a 10-fold dilution), (□, ○, △, ▽) sterile control.



**Figure 2.9** Effect of NaCl concentration in *A. brierleyi* medium on microbial growth rates and bioleaching rates of zinc and copper from ore sample C at an initial pH 2.0, an initial ore-liquid loading ratio  $W_0/V$  of  $5 \text{ kg/m}^3$  and an initial cell concentration  $X_0$  of  $1.0 \times 10^{13} \text{ cells/m}^3$ : (■)  $0.00 \text{ kg/m}^3 \text{ NaCl}$ ; (●)  $0.05 \text{ kg/m}^3 \text{ NaCl}$ ; (▲)  $0.10 \text{ kg/m}^3 \text{ NaCl}$ ; (◆)  $0.30 \text{ kg/m}^3 \text{ NaCl}$ ; (□, ○, △, ◇) sterile control.



**Figure 2.10** Bioleaching of deep-sea hydrothermal sulfide (ore sample A) and terrestrial sulfide concentrates (sphalerite and chalcopyrite) by the thermophilic archaeon *A. brierleyi* at 65°C, an initial particle size of 38-53  $\mu\text{m}$  and an initial cell concentration  $X_0$  of  $1.0 \times 10^{13}$  cells/m<sup>3</sup>. Deep-sea hydrothermal sulfide: (■)  $W_0/V = 5$  kg/m<sup>3</sup>, pH 2.0; (●)  $W_0/V = 10$  kg/m<sup>3</sup>, pH 2.0; (◆)  $W_0/V = 5$  kg/m<sup>3</sup>, pH 1.2. Terrestrial concentrate: (□)  $W_0/V = 5$  kg/m<sup>3</sup>, pH 2.0; (○)  $W_0/V = 10$  kg/m<sup>3</sup>, pH 2.0; (◇)  $W_0/V = 5$  kg/m<sup>3</sup>, pH 1.2; (⊙)  $W_0/V = 10$  kg/m<sup>3</sup>, pH 1.2.

### 2.3.2 低品位一次硫化鉱石のバイオ浸出

#### (1) *A. brierleyi* による低品位一次硫化鉱石からの銅の選択的浸出

Figure 2.11 は、通気攪拌槽における低品位一次硫化鉱石のバイオリーチングの実験結果を示したものである。低品位一次硫化鉱石（IOCG 鉱石）は、黄銅鉱の他に共存鉱物として多量の磁鉄鉱（ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ）、石英（ $\text{SiO}_2$ ）等を含有している。*A. brierleyi* を接種した場合には、Cu 浸出は大きく促進されて、Cu 浸出率は 10 d で 70%以上に達した。これに対し Fe 浸出は遅く起こり、16 d の Fe 浸出率は 5%以下であった。*A. brierleyi* を接種した場合の Fe 浸出速度は化学浸出による Fe 浸出速度と概ね同等であり、鉱石中の Fe の微生物による浸出は黄銅鉱からのみ行われ、磁鉄鉱からは行われなかったと言える。これは、硫黄酸化古細菌である *A. brierleyi* が酸化物である磁鉄鉱を溶解できなかったためと考えられる。加えて浸出液は pH 2 付近に保たれており、珪酸塩鉱物からの浸出も妨げられる。この結果として、磁鉄鉱と珪酸塩鉱物からの浸出は無視できる量となり、*A. brierleyi* による低品位一次硫化鉱石からの銅の選択的な浸出が達成された。

IOCG 鉱石からの Cu のバイオリーチングに対する共存鉱物の影響を検討するため、同じチリ国アタカマ鉱山の黄銅鉱精鉱と低品位一次硫化鉱石（粗鉱）の浸出挙動を比較した。Figure 2.12 は、黄銅鉱精鉱と粗鉱の浸出速度が同等であることを示している。この結果から、磁鉄鉱や珪酸塩鉱物等の共存鉱物は *A. brierleyi* による黄銅鉱のバイオリーチングに対して殆ど影響しないことが確認された。

Figure 2.13 に各粒径に分級した低品位一次硫化鉱石のバイオリーチングにおける Cu の浸出挙動を示す。予想どおり、処理鉱石の粒径範囲が 53 - 75  $\mu\text{m}$  から 13 - 25  $\mu\text{m}$  に減少した場合には、鉱石の比表面積が増加するに伴い、バイオリーチングによる Cu 浸出速度は約 3 倍に増加した。

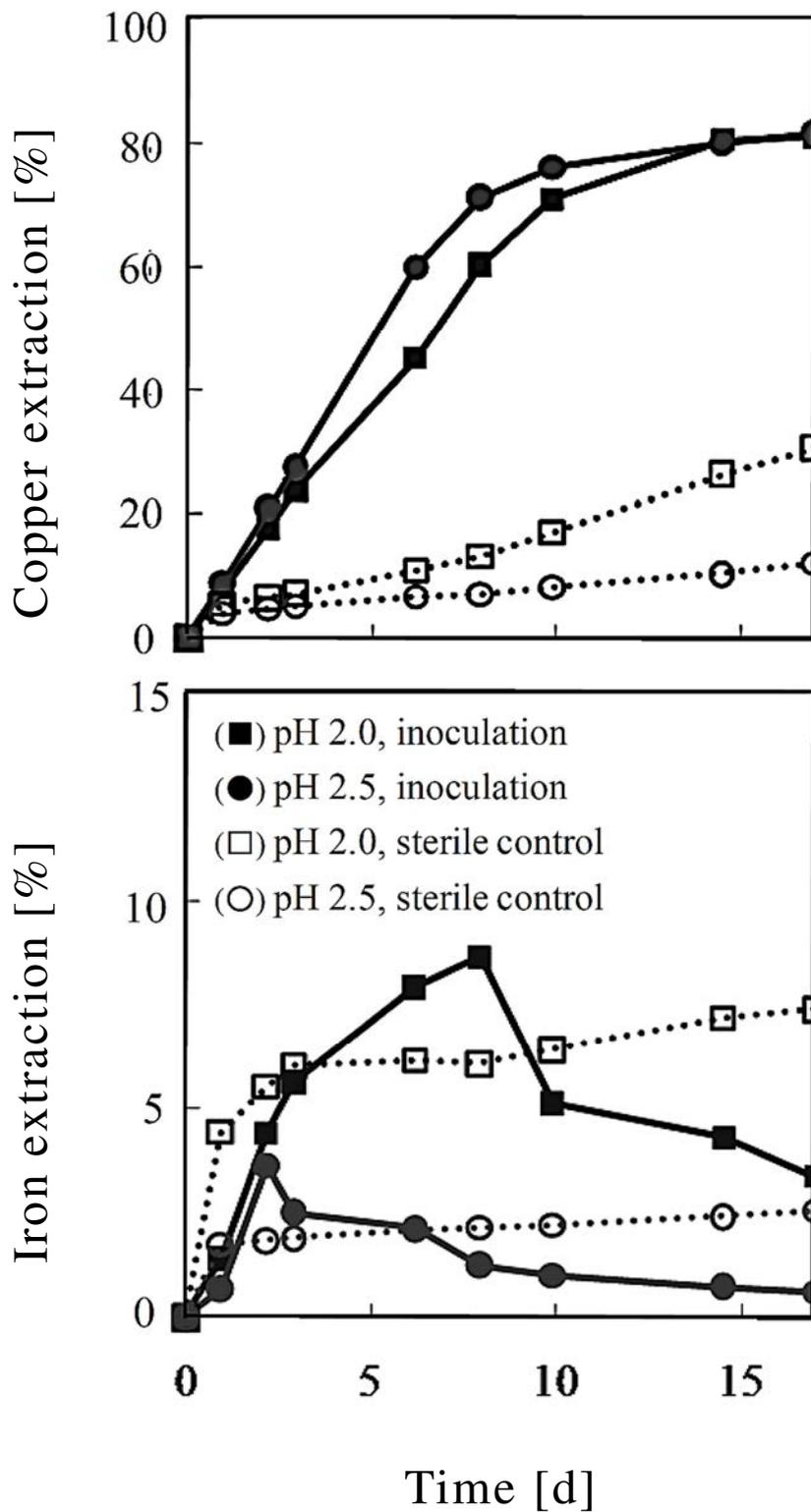
#### (2) *A. brierleyi* による黄銅鉱の浸出機構

*A. brierleyi* による黄銅鉱のバイオリーチングにおいて、酸化される金属部分（Fe(II)）と硫化物部分は別の酵素により同時に攻撃されると考えられており [18]、その浸出は反応 (2.2) で表される（直接浸出機構）。浸出液中に Fe(III) イオンが存在する場合、反応 (2.3) で示されるように、黄銅鉱は Fe(III) イオンにより化学的に酸化される（間接浸出機構）。生成物である Fe(II) イオンお

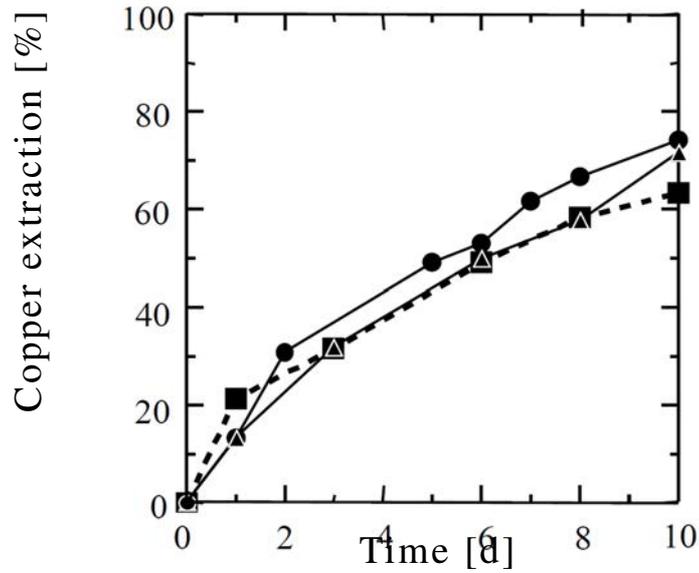
よび S(0)は、*A. brierleyi* の触媒作用にしたがって Fe(III)イオンおよび硫酸に酸化される（反応 (2.5) , (2.6)）。Fe(II)イオンは黄銅鉱の溶解により自ら供給されるため、黄銅鉱のバイオリーチングは直接浸出機構と間接浸出機構が同時に機能する。Fe(III)イオンによる化学的酸化が Cu の浸出に及ぼす影響を検討するため、異なった初期 Fe(III)イオン濃度のバイオリーチングを行った。化学的浸出速度は Fe(III)イオン濃度に対して 1/2 次であるため[11]、Fe(III)イオンが黄銅鉱の化学的溶解に十分に寄与していれば初期 Fe(III)イオン濃度がバイオリーチングにおける Cu の浸出速度に影響すると考えられる。しかし、Figure 2.14 は浸出液中の初期 Fe(III)イオン濃度の違いが Cu の浸出速度にも *A. brierleyi* の増殖にも影響しないことを示している。したがって、IOCG 鉱石のバイオリーチングにおいて、Fe(III)イオンによる間接浸出機構は無視し得るものであり、黄銅鉱の溶解は主として *A. brierleyi* による直接浸出機構によるものと考えられる。

### (3) カラム型固定層における銅のバイオ浸出

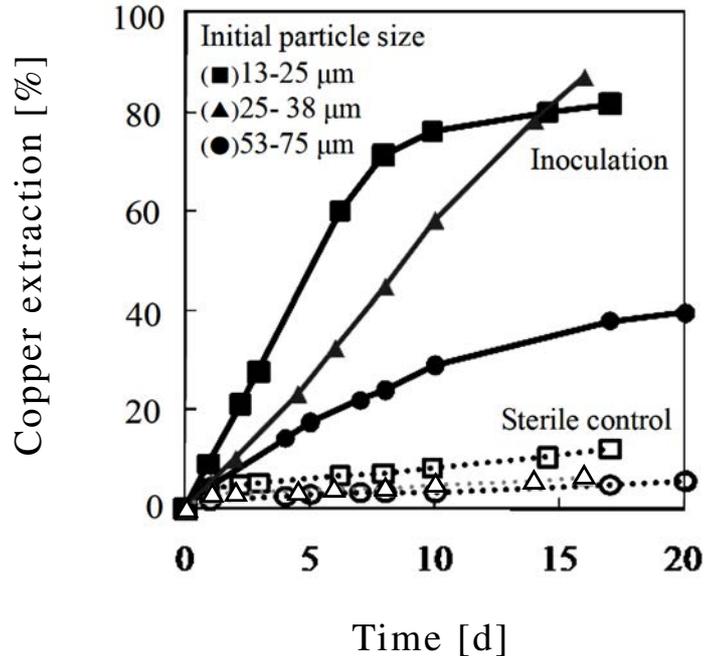
低品位一次硫化鉱石に対するバイオリーチングにおいて、選鉱処理を簡略化できる鉱石堆積層（ヒープ）を用いることは技術的なオプションの一つである。カラム型装置に処理鉱石を充填した固定層におけるバイオリーチングは、実験室スケールにおけるヒープバイオリーチングの一般的な評価手法である。Figure 2.15 は、カラム型固定層における *A. brierleyi* による Cu 浸出挙動を示したものである。浸出液（改変 *A. brierleyi* 培地と同一組成）の通液・循環速度が 1 - 2 cm<sup>3</sup>/min（空塔速度 0.2 - 0.4 cm/min）の場合、20 d 間のバイオリーチングによる Cu 浸出率は 55%に達し、通気攪拌槽におけるバイオリーチングと同様に良好な Cu 浸出率が得られた。このことから、黄銅鉱表面における *A. brierleyi* の増殖に対して十分量の空気が、鉱石固定層中の浸出液に溶存していたと考えられる。実験室規模におけるカラム型固定層におけるバイオリーチングの実験結果は、工業的規模のヒープバイオリーチングの操作条件を検討する一助となると期待される。



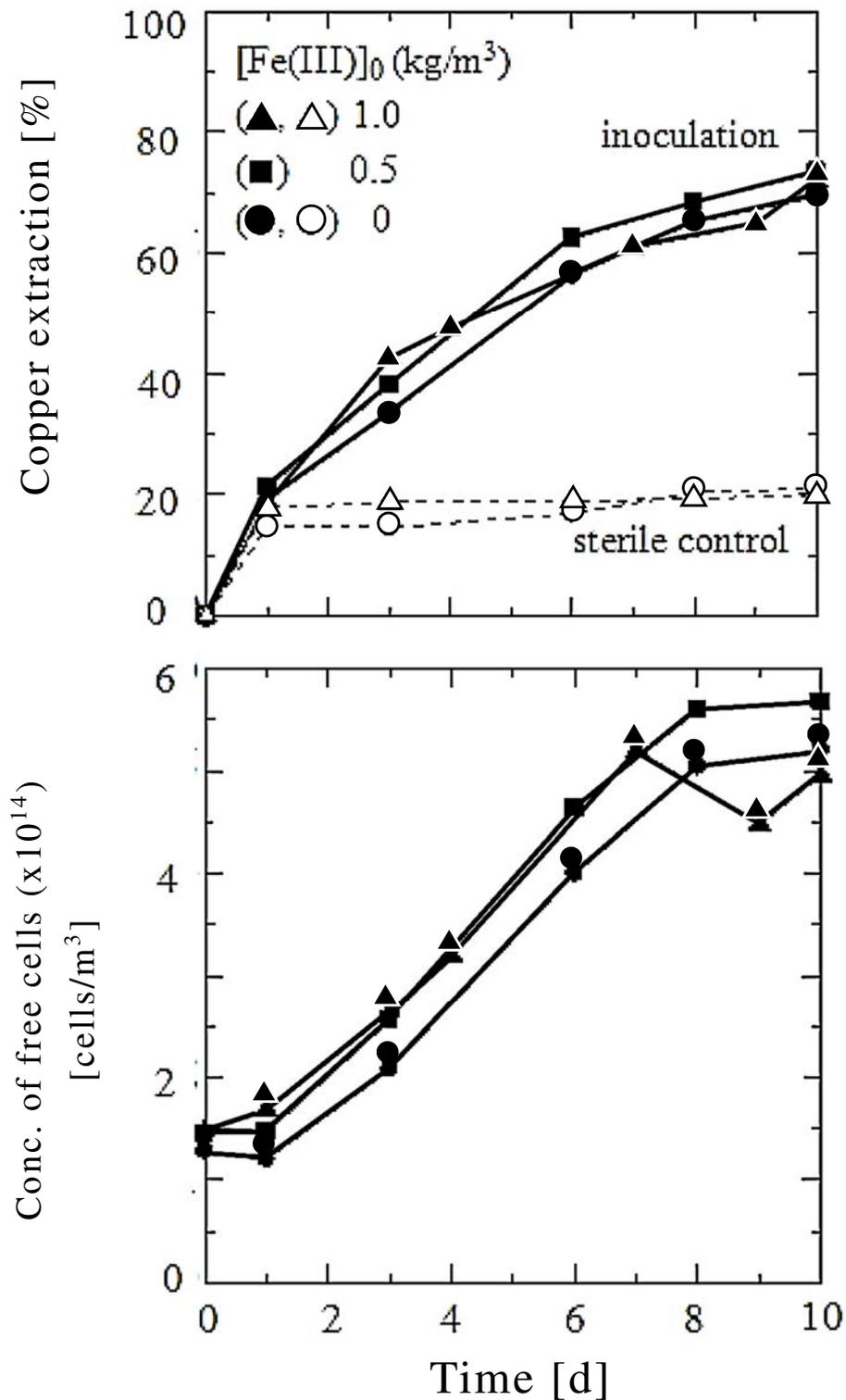
**Figure 2.11** Kinetic data for the copper leaching and iron leaching with *A. brierleyi* at 65°C using a batch stirred reactor containing low-grade ore in an initial particle size of 25-38µm; (■) Initial pH 2.0, inoculation; (●) Initial pH 2.5, inoculation; (□,○) sterile control.



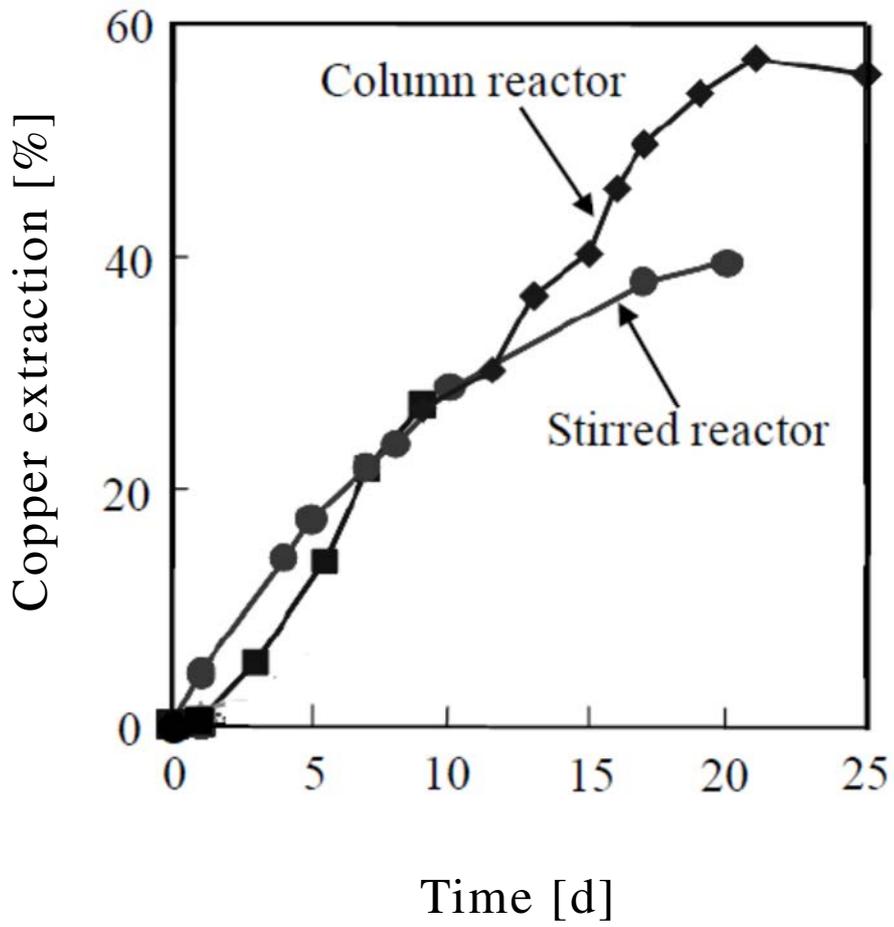
**Figure 2.12** Kinetic data for the copper leaching with *A. brierleyi* at an initial pH of 1.8, an initial particle size of 13-25  $\mu\text{m}$  and 65°C using a batch stirred reactor containing different mineral samples: (■) 5.0 kg/m<sup>3</sup> natural low-grade ore; (▲) 0.17 kg/m<sup>3</sup> chalcopyrite concentrate; (●) 5.0 kg/m<sup>3</sup> artificial low-grade ore (0.17 kg/m<sup>3</sup> chalcopyrite concentrate and 4.8 kg/m<sup>3</sup> glass beads).



**Figure 2.13** Kinetic data for the copper leaching with *A. brierleyi* at an initial pH of 1.8 and 65°C using a batch stirred reactor containing low-grade ores at different initial particle sizes; (■) 13-25  $\mu\text{m}$ , inoculation; (▲) 25-38  $\mu\text{m}$ , inoculation; (●) 53-75  $\mu\text{m}$ , inoculation; (□, △, ○) sterile control.



**Figure 2.14** Effect of initial ferric iron concentration  $[\text{Fe(III)}]_0$  on the rates of microbial growth and copper leaching with *A. brierleyi* at an initial pH of 1.8 and 65°C using a batch stirred reactor containing low-grade chalcopyrite ore in an initial particle size of 25-38  $\mu\text{m}$ ; (●)  $\text{Fe(III)}_0 = 0 \text{ kg/m}^3$ , inoculation; (■)  $\text{Fe(III)}_0 = 0.5 \text{ kg/m}^3$ , inoculation; (▲)  $\text{Fe(III)}_0 = 1.0 \text{ kg/m}^3$ , inoculation; (□, ○, △) sterile control.



**Figure 2.15** Kinetic data for the copper leaching with *A. brierleyi* at an initial pH of 2.0, an initial particle size of 53-75  $\mu\text{m}$  and 65°C using; (◆) column reactor and (●) stirred reactor.

## 2.4 結言

将来的に有望な有価金属資源でもある海底熱水鉱床鉱石および低品位一次硫化鉱粗鉱に対して、好熱性鉄/硫黄酸化古細菌 *A. brierleyi* によるバイオリーチングにおけるベースメタル (Zn, Cu) の浸出挙動について以下の知見を得た。

- (1) *A. brierleyi* による海底熱水鉱床鉱石のバイオリーチングが、Zn, Cu に対して有効な浸出方法であることを明らかにした。具体的には、10 d 間の回分操作で Zn 浸出率 80%、Cu 浸出率 85% を達成することができた。これに対し、Fe 浸出率は 32% と低レベルであり、Pb イオンは硫酸鉛として二次的に沈殿したため、見かけ上の浸出は起こらなかった。浸出残渣の分析結果から、ベースメタルの大半を液相に浸出させることができる一方、希薄成分であるレアメタル (Ga) および貴金属 (Au) を浸出残渣に濃縮できることがわかった。
- (2) *A. brierleyi* による海底熱水鉱床鉱石のバイオリーチングにおける各種操作条件の影響を実験的に検討した。その結果、最適な浸出条件としては、浸出液の初期 pH 1.2 - 2.0、*A. brierleyi* 細胞の初期接種量  $1.0 \times 10^{13}$  cells/m<sup>3</sup> 以上、初期固液混合比 40 kg/m<sup>3</sup> 以下であることを見出した。実用的な観点から、浸出液として基礎無機塩濃度を 1/10 に低減した液体培地を用いても、*A. brierleyi* の増殖ならびにベースメタル浸出には悪影響がないことがわかった。また、海水混入の許容範囲は、浸出液中の NaCl 濃度が 0.05 kmol/m<sup>3</sup> 以下であることがわかった。
- (3) *A. brierleyi* による低品位一次硫化鉱石 (IOCG 鉱石) に対するバイオリーチングにおいて、脈石 (磁鉄鉱) の溶解を抑制して黄銅鉱を選択的に溶解できることが明らかになった。すなわち、10 d の回分操作で、Cu 浸出率は 70% に達したのに対し、鉱石中に Cu の約 20 倍存在する Fe 浸出率は 16 d で 5% 以下であった。浸出液中 Fe 濃度が低いことから、黄銅鉱の溶解は主として *A. brierleyi* による直接浸出機構によるものと考えられる。
- (4) カラム型固定層浸出装置における *A. brierleyi* によるバイオリーチングにおいて、浸出液の通液・循環速度を 1 - 2 cm<sup>3</sup>/min (空塔速度 0.2 - 0.4 cm/min) に設定した場合、20 d 後の Cu 浸出率は 55% に達し、通気攪拌槽を用いたバイオリーチングと同様に良好な Cu 浸出率が得られた。この実験結果は、

工業的規模のヒープバイオリーチングの操作条件を検討する一助となると期待される。

## References

- [1] 三浦 彰, バイオマイニング技術を用いた低品位硫化銅鉱の湿式製錬プロセス, 小西康裕 監修, バイオベース資源確保戦略, シーエムシー出版, 2015, 9-17.
- [2] S. Liu, S. Fu, *Acta Geologica Sinica* **90** (2016) 1341-1352.
- [3] R. H. Sillitoe, *Mineralium Deposita* **38** (2003) 787-812.
- [4] C. L. Brierley, L. E. Murr, *Science* **179** (1973) 488-490.
- [5] J. A. Brierley, *Appl. Environ. Microbiol.* **36** (1978) 523-525.
- [6] J. A. Brierley, *FEMS Microbiol. Rev.* **75** (1990) 287-292.
- [7] Y. Konishi, S. Yoshida, S. Asai, *Biotechnol. Bioeng.* **48** (1995) 592-600.
- [8] Y. Konishi, H. Nishimura, S. Asai, *Hydrometallurgy* **47** (1998) 339-352.
- [9] Y. Konishi, S. Asai, M. Tokushige, T. Suzuki, *Shigen to Sozai* **115** (1999) 585-590.
- [10] Y. Konishi, S. Asai, M. Tokushige, T. Suzuki, *Biotechnol. Prog.* **15** (1999) 681-688.
- [11] Y. Konishi, M. Tokushige, S. Asai, T. Suzuki, *Hydrometallurgy* **59** (2001) 271-282.
- [12] Y. Konishi, H. Nishimura, H. Seki: *Resour. Process.* **49** (2002) 141-145.
- [13] J. A. Brierley, C.L. Brierley, Microbial mining using thermophilic microorganisms, in: T.D. Brock (Ed.), *Thermophiles*, John Wiley & Sons, New York, 1986, pp. 279-305.
- [14] M. P. Silverman, D. G. Lundgren, *J. Bacteriol.* **77** (1959) 642-647.
- [15] C. L. Brierley, *J. Less-Common Met.* **36** (1974) 237-247.
- [16] H. L. Ehrlich: *Geomicrobiology*, 4th ed., Marcel Dekker, New York, 2002, pp. 631-642.
- [17] A. Schippers, W. Sand, *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (1999) 319-321.
- [18] P. B. Munoz, J. D. Miller, M. E. Wadsworth, *Metall. Trans. Part B* **10B** (1979) 149-158.

## 第3章 還元細菌 *Shewanella oneidensis* による

### Pd(II)イオンの還元・析出

#### 3.1 緒言

パラジウム (Pd) は、現在我が国の基幹産業である化学産業、自動車製造業において触媒として欠かせない金属であり、将来的にも燃料電池触媒や水素収蔵合金等の金属素材としての需要が見込まれる。しかし、白金やニッケルの副産物である Pd は需要に応じた生産調整が難しい上、産出国はロシアと南アフリカに大きく偏っているため、その供給や価格変動に対するリスクは非常に高い。実際、2016年3月に1トロイオンス 500 \$であった Pd 価格は、世界各国における排ガス規制強化による自動車用触媒需要の拡大とロシアの供給不安から 2020年1月には 2200 \$を超えている。Pd 資源の安定的な確保にはリサイクルが重要であるが、現在のリサイクル率は 30%程度にとどまっている (1.1.2 項)。Pd リサイクル率の向上には工場廃液や含 Pd 廃棄物の酸浸出液等の希薄な含 Pd 水溶液から経済的に Pd を回収する必要があるが、回収した Pd に触媒活性等の付加価値を付与することも、リサイクルの経済性に対する一助となり得る。

白金族 (PGMs) 触媒は、マイクロ波照射法[1-3]、化学気相成長法[4]、含浸・還元法[5, 6]、コロイド法[7, 8]およびマイクロエマルジョン法[9, 10]等の物理・化学的合成法で生産されている。一般的にこれらの合成法では、PGM イオンの効果的な還元のために加熱が必要である。また、ナノ粒子同士の凝集を防ぐために界面活性剤等の保護材が必要であり、有害な有機溶媒が用いられることもある。さらに、保護材を最終的に触媒表面から除くためにも加熱・焼成が必要となる。したがって、有害な薬品を使用せず、加熱を要さない PGMs 触媒の合成法の開発が望まれる。PGMs イオンの生物的な還元・析出 (バイオミネラリゼーション) は室温で実施できるためエネルギー消費が少なく、安全性の高い中性水溶液を利用するため環境負荷が少ない、いわゆる「グリーンケミストリー」としての特徴があり、従来物理・化学的合成法の課題に対する有効な解決策の一つと考えられる。希薄な含 Pd 水溶液から経済的に Pd をナノ粒子として回収し、なおかつその Pd ナノ粒子に触媒として十分な性能を付与できれば、Pd リサイクルの課題と従来型の Pd 触媒

合成法の課題に対し、同時に対処できる可能性がある。

Pd(II)イオンはバイオミネラリゼーションにより Pd(0)に還元されることが知られている。硫酸還元菌 *Desulfovibrio desulfuricans* [11, 12]は、ギ酸塩、乳酸塩、ピルビン酸塩および水素を電子供与体として、Pd(II)イオンを金属 Pd ナノ粒子に還元することが確認されており、嫌気雰囲気下における実廃液からの Pd(II)イオンの回収も試みられている[12]。Pd ナノ粒子の触媒への応用としては、バイオミネラリゼーションにより Pd ナノ粒子に覆われた硫酸還元菌 *D. desulfuricans* を調製し、その乾燥細胞粉末（バイオ調製 Pd 触媒）を触媒とした次亜リン酸酸化反応[12, 13]、ポリ塩化ビフェニル塩素やベンゼンヘキサクロリド等の化芳香族化合物の脱ハロゲン化反応[14-16]、メチレンコハク酸、2-ペンチンの水素化反応[17, 18]について検討されている。その結果、バイオ調製 Pd 触媒が化学的に作成された乾燥粉末（化学調製 Pd 触媒）より高活性を持つことが示された。また、グラム陰性細菌 *Cupriavidus necator* によるバイオ調製 Pd 触媒を用いた鈴木・宮浦カップリング反応や溝呂木・ヘック反応についても検討されている[19]。次世代電力分野においては、*D. desulfuricans* によるバイオ調製 Pd 触媒を燃料電池触媒に利用することも試みられた[20]。環境浄化用途では、毒性の強い Cr(VI)イオンを毒性が低く水酸化物として沈殿し易い Cr(III)イオンに還元する触媒としても検討されている[21]。しかし、*D. desulfuricans* による Pd(II)イオンの還元は細胞内のヒドロゲナーゼ活性が低いと開始できず、溶存 Pd(II)イオンの完全な還元には化学的還元を進めるための電子供与体（水素、ギ酸等）を過剰に添加する必要がある[12]。また、偏性嫌気性菌である *D. desulfuricans* の生育には脱酸素条件を維持することが求められ、かつ硫酸還元菌である *D. desulfuricans* が生成する硫化水素は触媒能を低下させるので入念に除去する必要がある。したがって、硫酸還元菌以外の方法でバイオ Pd 触媒を調製することが望ましい。硫化水素を発生しない Fe(III)イオン還元細菌 *Shewanella oneidensis* は、ギ酸塩、乳酸塩、ピルビン酸塩およびエタノールを電子供与体として、Pd(II)イオンを金属 Pd ナノ粒子に還元することが確認されている[22]。*S. oneidensis* によるバイオ調製 Pd 触媒の応用例もあるが[22-25]、データの蓄積は未だ十分ではない。

本章では、*S. oneidensis* による希薄水溶液からの Pd(II)イオンの還元・析出

と、Pd ナノ粒子の合成における操作条件および Pd ナノ粒子触媒活性の評価について記述する。Pd ナノ粒子は *S. oneidensis* により、25°C, pH 7 においてギ酸塩または乳酸塩を電子供与体として Pd(II)イオンを還元・析出して細胞上に調製した。実験終了後の *S. oneidensis* 細胞およびナノ粒子に対しては、走査型透過電子顕微鏡 (STEM) で観察するとともに、エネルギー分散型 X線分析 (EDX) によりナノ粒子の元素を同定し、X線近吸収端構造 (XANES) より細胞上の Pd の酸化状態を分析した。*S. oneidensis* によるバイオ調製 Pd 触媒は Cr(VI)イオンの化学還元反応、および固体高分子形燃料電池 (PEFC) の水素極における室温での水素酸化反応について触媒活性を評価した。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 微生物の培養

本論文で用いた微生物は American Type Culture Collection (ATCC) から分譲された *S. oneidensis* MR-1 株 (ATCC700550) である。*S. oneidensis* は、TSB 液体培地 (Trypticase Soy Broth, pH 7.2) を用い 33°C で好氣的に培養した。

### 3.2.2 Pd(II)イオンのバイオ還元実験

実験操作は O<sub>2</sub> 濃度 2.5% 以下の嫌氣的雰囲気中に保たれたグローブボックス内で行った。静止細胞懸濁液は、対数増殖期末期の微生物細胞を、遠心分離により集菌し、リン酸 (Na-K) 緩衝液 (100 mol/m<sup>3</sup>, pH 7.0) による洗浄を 2 回行い、洗浄細胞を同緩衝液に再懸濁することで調製し、直ちに実験に使用した。懸濁液の細胞濃度は、Petroff-Hausser 細菌計算盤を用いてビデオ装置付き光学顕微鏡下で計測し、緩衝液で所定の濃度に適宜希釈して調整した。テトラクロロパラジウム酸ナトリウム (Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>) 水溶液は、リン酸 (Na-K) 緩衝液 (100 mol/m<sup>3</sup>, pH 7.0) で希釈して所定の濃度とし、使用前に N<sub>2</sub> ガスを流通させて嫌氣状態とした。実験は、静止細胞懸濁液に所定濃度となるように電子供与体 (ギ酸ナトリウム, 乳酸ナトリウム) および塩化白金酸水溶液を添加・混合して開始し、N<sub>2</sub> ガスを反応容器に流通させ嫌氣状態を保持した。実験の初期条件は、溶液体積 15 cm<sup>3</sup>、液相 Pd(II)イオン濃度 1 - 20 mol/m<sup>3</sup>、細胞濃度 1 - 10 × 10<sup>15</sup> cells/m<sup>3</sup>、電子供与体濃度 20 - 200 mol/m<sup>3</sup>、pH 7.0 である。実験開始後、サンプルの採取を一定の時間間隔で行い、採取した懸濁液は直ちにフィルター (孔径 0.2 μm、セルロース混合エステル製) でろ過して、

液相の Pd 濃度を測定した。実験終了後の細胞は遠心分離により集菌・洗浄した後に王水で溶解し、細胞に回収した Pd 量を定量した。

### 3.2.3 分析方法

液相 Pd イオン濃度および細胞の王水浸出液の Pd 濃度の測定には、誘導結合プラズマ発光分析装置 (ICP-AES) (ICPE-9000、島津製作所)、原子吸光光度計 (AA-6650、島津製作所) を使用した。

実験に使用した細胞は、透過型電子顕微鏡 (TEM, JEOL model JEM-2000FX) を用いて観察し、TEM 観察用試料は、実験後、所定の時間で採取した細胞懸濁液をエラスチックカーボン支持膜 Cu グリッドに滴下後、乾燥し、イオン交換水で洗浄後、再び乾燥して調製した。一部の試料については、走査型透過電子顕微鏡 (STEM, JEOL model JEM2100FX) により Pd ナノ粒子の生成場を確認し、付属するエネルギー分散型 X 線分析装置 (EDX, JED-2300T) およびナノビーム電子回折 (n-ED) により、生成した粒子を分析した。さらに、Pd ナノ粒子の生成場を詳細に確認するため、細胞薄切片試料を作成した。まず、実験終了後の細胞を 2 w/v% のグルタルアルデヒドを含む 0.1 mol/m<sup>3</sup> カコジル酸塩緩衝液に懸濁し、4°C で 3 h 保持した。この細胞を集菌・洗浄後、2 w/v% 四酸化オスミウム水溶液に懸濁して 4°C で 3h 保持し導電染色した。導電染色した細胞を 50%, 70%, 80%, 90%, 100% のエタノールを用いて段階的に脱水し、置換剤である酸化プロピレンに 30 min 浸漬した後、酸化プロピレン-エポキシ混合液に 1 h 浸漬した。包埋は、エポキシ樹脂 (Epon 812) と硬化剤 (無水ドデセニールコハク酸と無水メチルナディック酸) および硬化促進剤 (2,4,6-トリス (ジメチルアミノメチル) フェノール) の混合液を包埋剤として 60°C に保持し、2 d で硬化させた。薄切片はウルトラミクロトームを用いて厚さ 60 - 80 nm に切り出し、エラスチックカーボン支持膜付き Cu グリッドに載せた。作成した細胞薄切片試料は 2 w/v% の酢酸ウラニル水溶液と酢酸鉛水溶液で電子染色し、TEM 観察・EDX 分析に供した。

細胞上の Pd の酸化状態を明らかにするため、X 線近吸収端構造 (XANES) スペクトルを解析した。採取した懸濁液を直ちにフィルターでろ過し、嫌気雰囲気下において回収した細胞を炭酸ナトリウム緩衝液で 2 回洗浄・再懸濁した。洗浄した細胞の懸濁液 2 ml をポリエチレン窓付きの長さ 5 cm のガラス管に封入し、日本高輝度光科学研究センター (JASRI) の BL14B2 ビームラ

インにおいて、XANES スペクトルを測定した。測定は、PdK 吸収端 (24.347 keV) 付近の X 線吸収スペクトルを透過法にて測定した。X 線は、8 GeV, 100 mA の蓄積リングから偏向電磁石で発生させた X 線光源より、Si (311) 二結晶分光器を経て単色化し、1 mm の入射スリットを通過させた。X 線強度は Ar-Kr (75:25, v/v) 混合ガスを流したガスフロー型イオンチェンバーで測定し、入射 X 線と透過 X 線の強度比から吸光度を求めた。Pd K 吸収端付近の XANES スペクトルの計測は 0.27 eV ステップで行い、1 ステップの計測時間は 0.15s とした。標準試料は Pd(0)薄膜と 1 mol/m<sup>3</sup> の Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> 水溶液を用いた。

### 3.2.4 Pd 触媒の調製および触媒活性評価

バイオ調製 Pd 触媒に用いるため、3.2.2 項の方法で Pd(II)イオンから Pd ナノ粒子を細胞上に還元析出させた *S. oneidensis* 細胞を、遠心分離により集菌した。Cr(VI)イオンの還元反応に使用する細胞は、遠心分離により集菌し、リン酸 (Na-K) 緩衝液 (100 mol/m<sup>3</sup>, pH 7.0) およびアセトンで洗浄した。燃料電池電極に使用する細胞は同様に超純水で洗浄した。洗浄した細胞は 50°C で 6 h 以上乾燥し、乳鉢で粉碎して粉末状のバイオ調製 Pd 触媒とした。初期 Pd(II)イオン濃度を調整することにより、細胞 (乾燥質量) 当たりの Pd ナノ粒子担持量を調整した。例えば、「バイオ調製 Pd 触媒 (1:3) lactate」は、電子供与体に乳酸塩を用いて調製された、細胞 (乾燥質量) 3 g 当たり Pd ナノ粒子 1 g を含むバイオ調製 Pd 触媒を指す。Cr(VI)の還元反応には、比較対象として Pd(II)イオン濃度 25 mol/m<sup>3</sup> の水溶液から 500 mol/m<sup>3</sup> のギ酸塩を用いて調製した化学調製 Pd 触媒を用いた。

バイオ調製 Pd 触媒の触媒活性を評価するため、ギ酸塩を還元剤とし、Cr(VI)を Cr(III)に還元するクロム酸還元反応において、バイオ調製 Pd 触媒と化学調製 Pd 触媒を比較した。Cr(VI)の還元実験は、クエン酸緩衝液により pH 4.0 に調整された 0.5 mol/m<sup>3</sup> のクロム酸ナトリウム (Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>)、ギ酸ナトリウム 25 mol/m<sup>3</sup> の混合水溶液 50 ml を振とうフラスコに入れて 30°C とし、バイオ調製 Pd 触媒または化学調製 Pd 触媒を Pd 質量として 40 mg 添加して開始した。実験中フラスコは 30°C に保持し、150 rpm で旋回振とうした。継続的に 0.5 ml をフラスコから採取し、ジフェニルカルバチド法を用いて Cr(VI)を定量した。総 Cr の定量には原子吸光光度計 (AA-6650、島津製作所)

を使用した。

燃料電池の試験にはプロトン交換膜型燃料電池キット (Techno Xpress 製) を用いた。水素極の電極に使用する Pd-カーボンインクは、バイオ調製 Pd 触媒とカーボン粉末を 10%ナフィオン水溶液と超純水の混合溶液 (2.5:1) に分散させて調製した。バイオ調製 Pd 触媒は Pd(II)イオン濃度を 2.5 - 20 mol/m<sup>3</sup> の間で変化させたものを 4 種調整した。例えば、「Bio-PdX」は初期 Pd(II)イオン濃度 X mol/m<sup>3</sup> の水溶液から調製したバイオ調製 Pd 触媒であることを示す。比較対象として市販の Pd/C 触媒 (和光純薬製) を使用して、同様に Pd-カーボンインクを調製した。酸素極用には市販の Pt 触媒 (Chemix.製) を用いて Pt-カーボンインクを調製した。これらの電極用インクを、面積当たりの水素極側の Pd 質量 1.28 mg/cm<sup>2</sup>、酸素極側の Pt 質量 0.16 mg/cm<sup>2</sup> となるようにナフィオン膜に塗布して乾燥させ、両側にガス拡散層としてテフロン処理カーボンペーパー (ElectroChem 製) を取り付けてプロトン交換膜 (MEA) を作成した。電極面積は 6.25 cm<sup>2</sup> とした。PEFC 試験は、水素極に水素ガスを 300 ml/min. で供給し、酸素極側は解放した。抵抗 (R) を 0.1 - 200 Ω に変化させ、所定の R に対する電流 (I) と電圧 (V) を測定した。すべての測定は 3 回ずつ行った。

### 3.3 実験結果および考察

#### 3.3.1 *S. oneidensis* による Pd(II)イオンの還元・析出

Figure 3.1 に *S. oneidensis* 静止細胞による Pd(II)イオンの還元実験における液相 Pd(II)イオンの経時変化を示す。実験条件は溶液 pH 7、温度 25°C である。Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> 水溶液に *S. oneidensis* 細胞と電子供与体として乳酸塩またはギ酸塩 50 mol/m<sup>3</sup> を添加した場合、液相 Pd(II)イオン濃度は初期濃度 5 mol/m<sup>3</sup> から急激に減少し、120 min 後にはほぼゼロとなった。同時に、実験中の懸濁液の色は、薄黄色から黒褐色に変化した。これは、*S. oneidensis* による Pd ナノ粒子の生成を視覚的に示唆している。したがって、観測された液相 Pd(II)イオン濃度の減少は、Pd(II)イオンの還元により不溶性の Pd ナノ粒子が生成したことによると考えられる。一方、いずれの電子供与体も添加しなかった場合、液相 Pd(II)イオン濃度は初期濃度 5 mol/m<sup>3</sup> から 120 min で 3.8 mol/m<sup>3</sup> に減少したが、懸濁液の色は変化がなかった。この液相 Pd(II)イオン濃度の減少は

*S. oneidensis* 細胞によるバイオ吸着によるものと考えられる。また、*S. oneidensis* を添加しない乳酸塩およびギ酸塩による無菌化学対照実験においても Pd(II)イオンの還元は認められなかった。このことから、*S. oneidensis* は電子供与体として乳酸塩またはギ酸塩を用いて Pd(II)イオンを迅速に還元・析出し、細胞に回収できることが解る。特に、ギ酸塩を電子供与体とした場合、5 mol/m<sup>3</sup> の Pd(II)イオン水溶液から 15 min 以内にすべての Pd(II)イオンを回収できた。Figure 3.2 に *S. oneidensis* による Pd(II)イオンのバイオミネラル化に及ぼす菌体濃度の影響を示す。実験条件は初期液相 Pd(II)イオン濃度 5 mol/m<sup>3</sup>、溶液 pH 7、温度 25 °C である。菌体濃度が 1.1×10<sup>15</sup> cells/m<sup>3</sup> から 1.1×10<sup>16</sup> cells/m<sup>3</sup> に増加するのに伴い、Pd(II)イオンの還元が促進された。菌体濃度 1.1×10<sup>15</sup> cells/m<sup>3</sup> においては 120 min で Pd 回収率が 20% であったのに対し、菌体濃度 1.1×10<sup>16</sup> cells/m<sup>3</sup> においては 60 min で Pd(II)イオンがほぼ完全に回収された。

Figure 3.3 に初期液相 Pd(II)イオン濃度 5 mol/m<sup>3</sup> および 10 mol/m<sup>3</sup> における *S. oneidensis* による Pd(II)イオンの還元挙動を示す。実験条件は菌体濃度 1.1×10<sup>16</sup> cells/m<sup>3</sup>、溶液 pH 7、温度 25 °C である。初期液相 Pd(II)イオン濃度が 5 mol/m<sup>3</sup> の場合は 60 min で液相 Pd(II)イオンがほぼ完全に回収されたのに対し、10 mol/m<sup>3</sup> の場合は 120 min で 65%の回収率にとどまった。10 mol/m<sup>3</sup> の Pd(II)イオン水溶液から Pd を完全に回収するためには *S. oneidensis* を 1.1×10<sup>16</sup> cells/m<sup>3</sup> 以上の菌体濃度で添加する必要がある。

Figure 3.4 に *S. oneidensis* による Pd(II)イオンの還元に関与する初期ギ酸塩濃度の影響を示す。菌体濃度 6.7×10<sup>15</sup> cells/m<sup>3</sup>、溶液 pH 7、温度 25 °C である。初期ギ酸塩濃度 200 mol/m<sup>3</sup> の場合、液相 Pd(II)イオン濃度は初期濃度 1.0 mol/m<sup>3</sup> から急激に減少し、10 min 後にはほぼゼロとなった。同時に、実験中の懸濁液の色は実験開始から 5 min で薄黄色から黒褐色に変化しており、Pd(II)イオンの還元反応が急激に進行したことを示唆している。初期ギ酸塩濃度の減少に伴い、Pd(II)イオンの回収速度と Pd 回収率は明らかに低下し、初期ギ酸塩濃度 20 mol/m<sup>3</sup> の場合では 60 min 後の Pd 回収率は 50%にとどまった。電子供与体にギ酸塩を利用できることから、この還元反応について *S. oneidensis* 細胞が持つ脱水素酵素であるギ酸デヒドロゲナーゼとそれに付随する電子伝達系の関与が考えられる [26],[27]。この脱水素酵素は *S. oneidensis*

の内膜に存在し、ペリプラズム空間内のギ酸イオンを二酸化炭素に酸化する反応を触媒する。



ギ酸塩を電子供与体とする場合、*S. oneidensis* 細胞が持つギ酸デヒドロゲナーゼによる 1 mol のギ酸塩の酸化反応により 2 mol の電子が電子伝達系に供給されるため、反応 (3.2) の様に 1 mol の Pd(II)イオンを Pd(0)に還元するために必要なギ酸塩は 1 mol である。

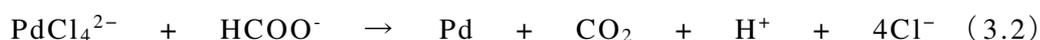
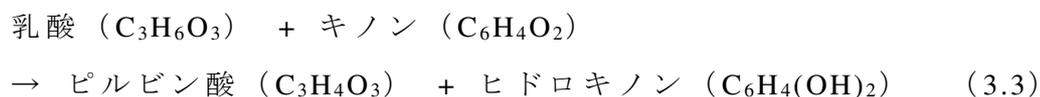


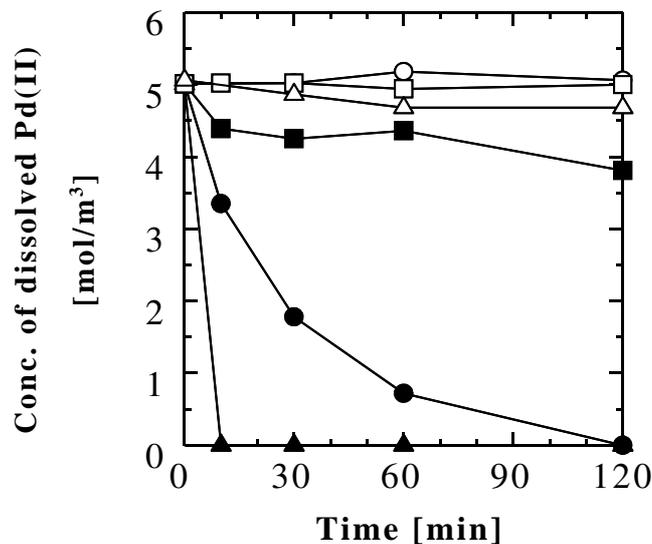
Figure 3.4 は、溶存 Pd(II)イオンの完全な還元には電子供与体を過剰に添加する必要があることを示しており、*D. desulfuricans* による Pd(II)イオンの還元についての先行研究[12]と同様である。電子供与体の利用効率が低い原因は明らかではないが、実験開始後 10 min から 30 min で反応が停止していることから、電子伝達系の酵素が急速に失活している可能性や、細胞から還元阻害物質が放出されている可能性等が考えられる。

電子供与体に乳酸塩を用いた場合は乳酸デヒドロゲナーゼとそれに付随する電子伝達系の関与が考えられる。乳酸デヒドロゲナーゼは乳酸とピルビン酸との酸化還元反応を触媒する酵素であるが、*S. oneidensis* においては細胞膜に結合したキノンを補酵素とした乳酸酸化（脱水素）反応 (3.3) が知られている[28, 29]。

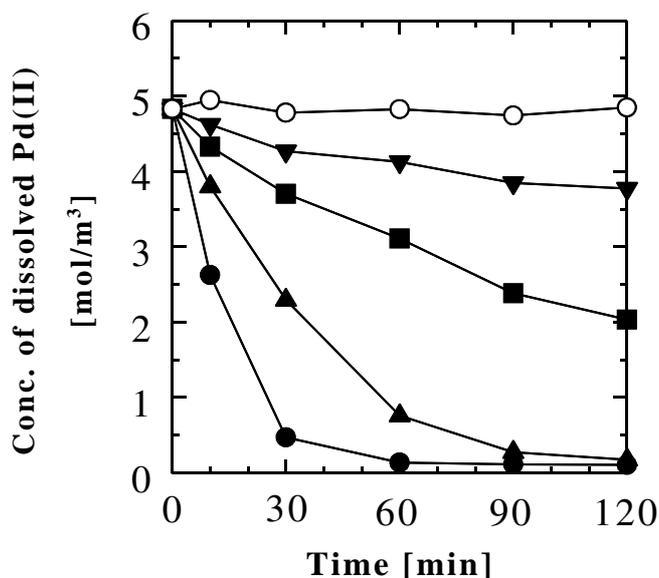


生成したヒドロキノンは膜内およびペリプラズム空間に存在するシトクロム等の酸化還元酵素に電子を与え、電子伝達系を介して Pd(II)イオンを還元すると考えられる。電子供与体に乳酸塩またはギ酸塩を用いた場合の Pd(II)イオンの還元速度の差異 (Figure 3.1) は、*S. oneidensis* が電子供与体により異

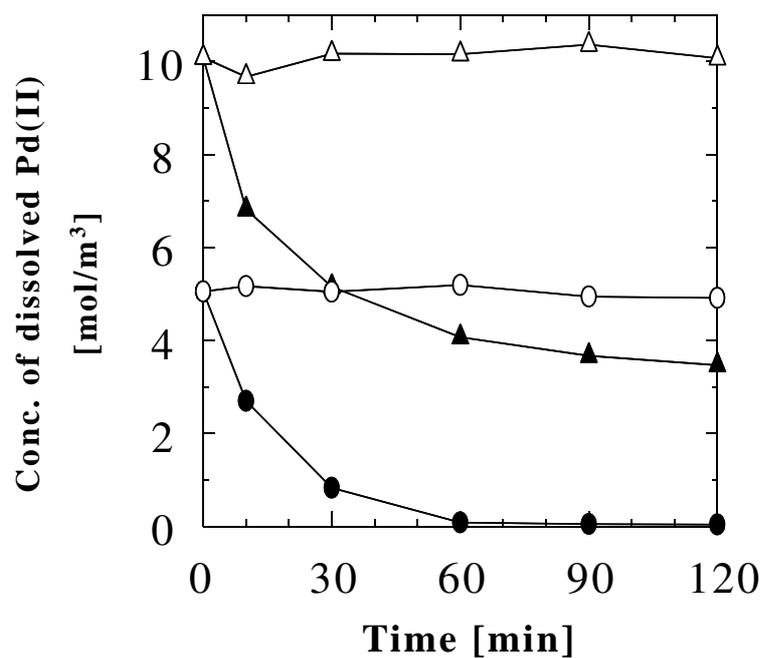
なる電子伝達経路で Pd(II)イオンを還元するためと推察される。



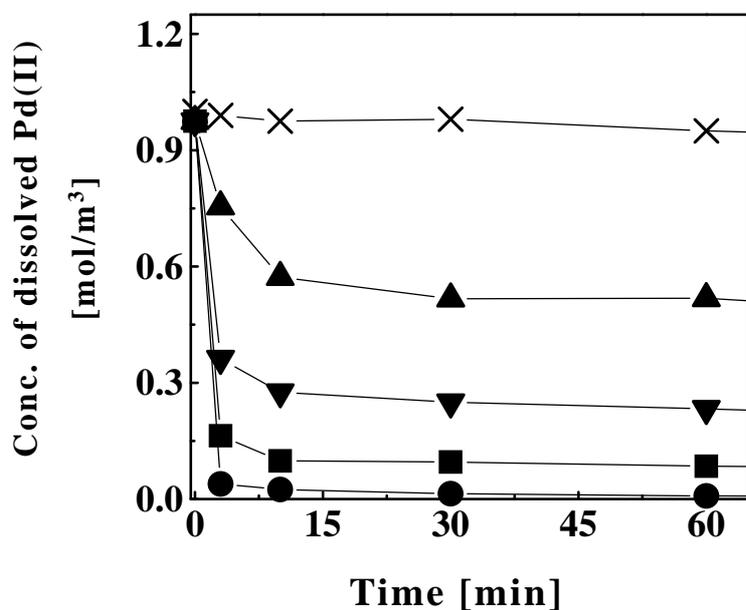
**Figure 3.1** Time course of soluble Pd(II) reduction by *S. oneidensis* cells at 25°C and pH 7; (▲)  $5.6 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> *S. oneidensis* in the presence of formate; (●)  $5.6 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> *S. oneidensis* in the presence of lactate; (■)  $5.6 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> *S. oneidensis* in the absence of lactate and formate; (○) sterile control containing no *S. oneidensis* cells in the presence of lactate; (△) sterile control containing no *S. oneidensis* cells in the presence of formate; (□) sterile control containing no *S. oneidensis* cells in the absence of lactate and formate.



**Figure 3.2** Effect of *S. oneidensis* cell concentration on the time course of soluble Pd(II) reduction in the presence of lactate ( $50 \text{ mol/m}^3$ ) at 25°C and pH 7; (●)  $1.1 \times 10^{16}$  cells/m<sup>3</sup>; (▲)  $4.4 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup>; (■)  $2.3 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup>; (▼)  $1.1 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup>; (○) sterile control containing no *S. oneidensis* cells.



**Figure 3.3** Effect of initial Pd(II) concentration on the time course of soluble Pd(II) reduction in the presence of lactate ( $50 \text{ mol/m}^3$ ) at  $25^\circ\text{C}$  and pH 7; ( $\bullet$ ,  $\blacktriangle$ )  $1.0 \times 10^{16} \text{ cells/m}^3$  *S. oneidensis*; ( $\circ$ ,  $\triangle$ ) sterile control containing no *S. oneidensis* cells.



**Figure 3.4** Time course of soluble Pd(II) reduction by *S. oneidensis* cells at  $25^\circ\text{C}$  using different formate concentrations: ( $\blacktriangle$ )  $20 \text{ mol/m}^3$ , ( $\blacktriangledown$ )  $50 \text{ mol/m}^3$ , ( $\blacksquare$ )  $100 \text{ mol/m}^3$ , ( $\bullet$ )  $200 \text{ mol/m}^3$ , and ( $\times$ ) sterile control containing no *S. oneidensis* cells in the presence of  $200 \text{ mol/m}^3$  formate.

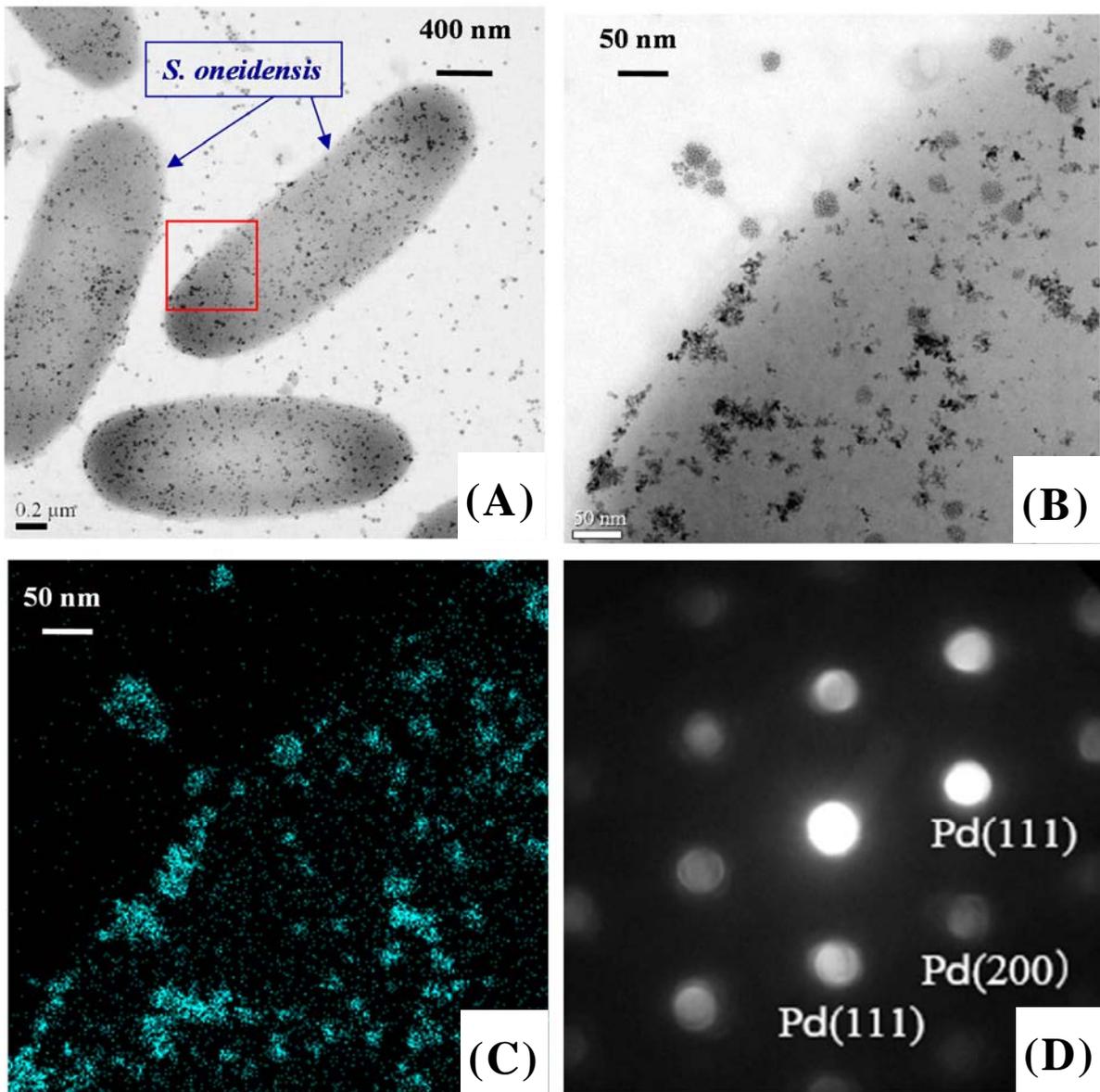
### 3.3.2 Pd ナノ粒子のキャラクタリゼーション

Figure 3.5 に初期 Pd(II)イオン濃度  $1 \text{ mol/m}^3$  のバイオ還元実験後の *S. oneidensis* 細胞の TEM 像を示す。長さ  $2 \mu\text{m}$ 、幅  $0.5 \mu\text{m}$  の短棒状の *S. oneidensis* 細胞に多数のナノ粒子が認められる (Figure 3.5(A))。高倍率の像からナノ粒子の一次粒子径が約  $10 \text{ nm}$  であることが解る (Figure 3.5(B))。 *S. oneidensis* 細胞における Pd の EDX マッピング像 (Figure 3.5(C)) は Figure 3.5(B) のナノ粒子と一致しており、これが Pd ナノ粒子と同定できる。粒子に対するナノビーム電子回折パターン (Figure 3.5(D)) は、Pd ナノ粒子が FCC 構造を持つ単結晶であることを示している。 Figure 3.6 にバイオ調製 Pd ナノ粒子の生成状態に及ぼす初期ギ酸塩濃度の影響を示す。初期ギ酸塩濃度の増加に伴い、細胞上の Pd 粒子数も増加した (Figure 3.6(A-C))。これは、初期ギ酸塩濃度の増加に伴って 60 min 後の Pd(II)イオンの回収率が増加したことを反映している。初期ギ酸塩濃度  $20 - 50 \text{ mol/m}^3$  の場合、細胞表面に均一に Pd ナノ粒子が生成している (Figure 3.6(A',B'))。初期ギ酸塩濃度  $200 \text{ mol/m}^3$  の場合、Pd ナノ粒子同士の凝集が認められ、二次粒子径は約  $30 \text{ nm}$  であった (Figure 3.6(C'))。さらに、バイオ調製 Pd ナノ粒子の生成状態に及ぼす初期液相 Pd(II)イオン濃度の影響を検討するため、初期液相 Pd(II)イオン濃度  $2.5 - 20 \text{ mol/m}^3$  におけるバイオ還元実験後の *S. oneidensis* 細胞の TEM 像を観察した。初期ギ酸塩濃度は  $50 \text{ mol/m}^3$  とした。TEM 像上で計測した Pd ナノ粒子の一次粒子径は、初期液相 Pd(II)イオン濃度の増加に伴って  $4 \text{ nm}$  から  $7 \text{ nm}$  に増大した (Figure 3.7)。一方、初期液相 Pd(II)イオン濃度  $2.5 - 5.0 \text{ mol/m}^3$  では Pd ナノ粒子の凝集が認められたのに対し (Figure 3.7(A,B))、 $10 - 20 \text{ mol/m}^3$  では単分散の Pd ナノ粒子が均一に生成した (Figure 3.7(C,D))。初期液相 Pd(II)イオン濃度  $10 \text{ mol/m}^3$  および  $20 \text{ mol/m}^3$  で生成した Pd ナノ粒子径の幾何学的標準偏差は、それぞれ  $1.35 \text{ nm}$  および  $1.38 \text{ nm}$  であった。液相 Pd(II)イオン濃度が Pd ナノ粒子の生成に影響を及ぼす原因は、Pd(II)イオンの還元速度と不均質核生成に関係すると考えられる。初期液相 Pd(II)イオン濃度が低い ( $2.5 - 5.0 \text{ mol/m}^3$ ) 場合、Pd(II)イオンの還元速度は比較的遅く粒子成長が遅い反面、粒子同士の凝集が進み易い。初期液相 Pd(II)イオン濃度が高い ( $10 - 20 \text{ mol/m}^3$ ) 場合、細胞に十分な Pd(II)イオンが供給されるため核生成速度が高く、多くの結晶核が生成するため粒子の分布が高分散になり易いと推察される。この

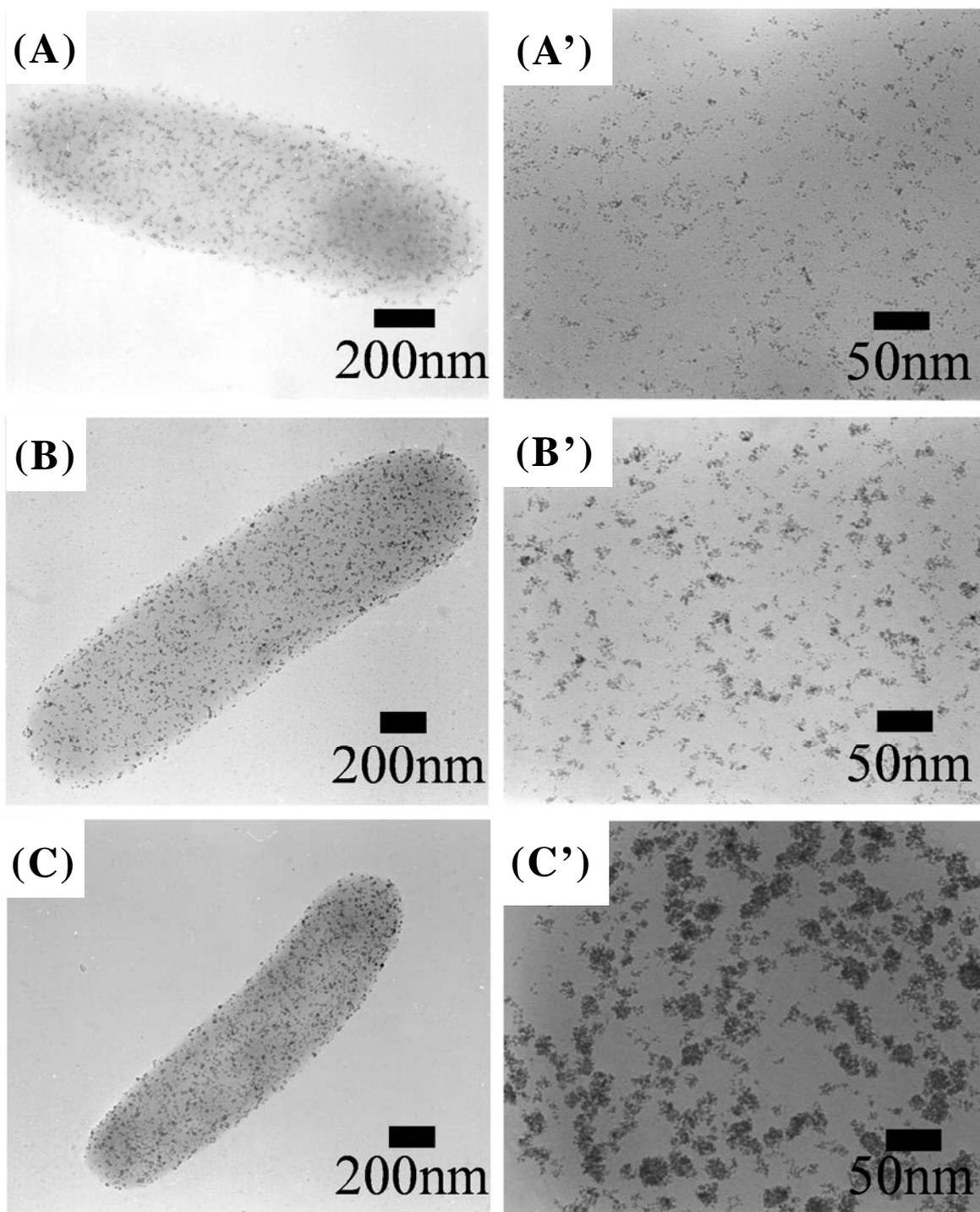
ように、初期液相 Pd(II)イオン濃度は Pd 触媒のバイオ調製における重要な操作因子であることが明らかとなった。

バイオ調製 Pd ナノ粒子の生成場を特定するため、バイオ還元実験後の *S. oneidensis* 細胞の細胞薄切片の STEM 像を観察した。Figure 3.8(A,B)が示すように、ナノ粒子の多くは内膜と外膜の間にあるペリプラズム空間に認められたが (Position (2))、細胞外膜表面にも二次粒子径 30 - 40 nm のナノ粒子凝集体が認められた (Position (1))。ペリプラズム空間のナノ粒子に対する EDX スペクトルでは、強い Pd, C の特性 X 線および比較的弱い O, Cu, Pb, Os, U の特性 X 線が計測された (Figure 3.8(C,D))。一方、細胞内部の領域では (Position (3))、Pd の特性 X 線は認められず、強い C の特性 X 線および比較的弱い O, Cu, Pb, U の特性 X 線が計測された (Figure 3.8(E))。C, O は細胞膜周辺に存在するタンパク質等の微生物由来物質およびエラスチックカーボン支持膜に由来する。Cu, Pb, Os, U の特性 X 線はや薄切片試料を載せたグリッドおよび染色時に使用された元素に由来する。このように、Pd(II)イオンのバイオ還元・析出において、Pd ナノ粒子は *S. oneidensis* 細胞のペリプラズム空間と細胞外膜表面に析出することが明らかとなった。Pd ナノ粒子が、水溶液中のイオンがアクセスしやすい細胞表面近傍に析出することは、Pd ナノ粒子を担持した細胞を触媒等に利用する際に有利であると考えられる。

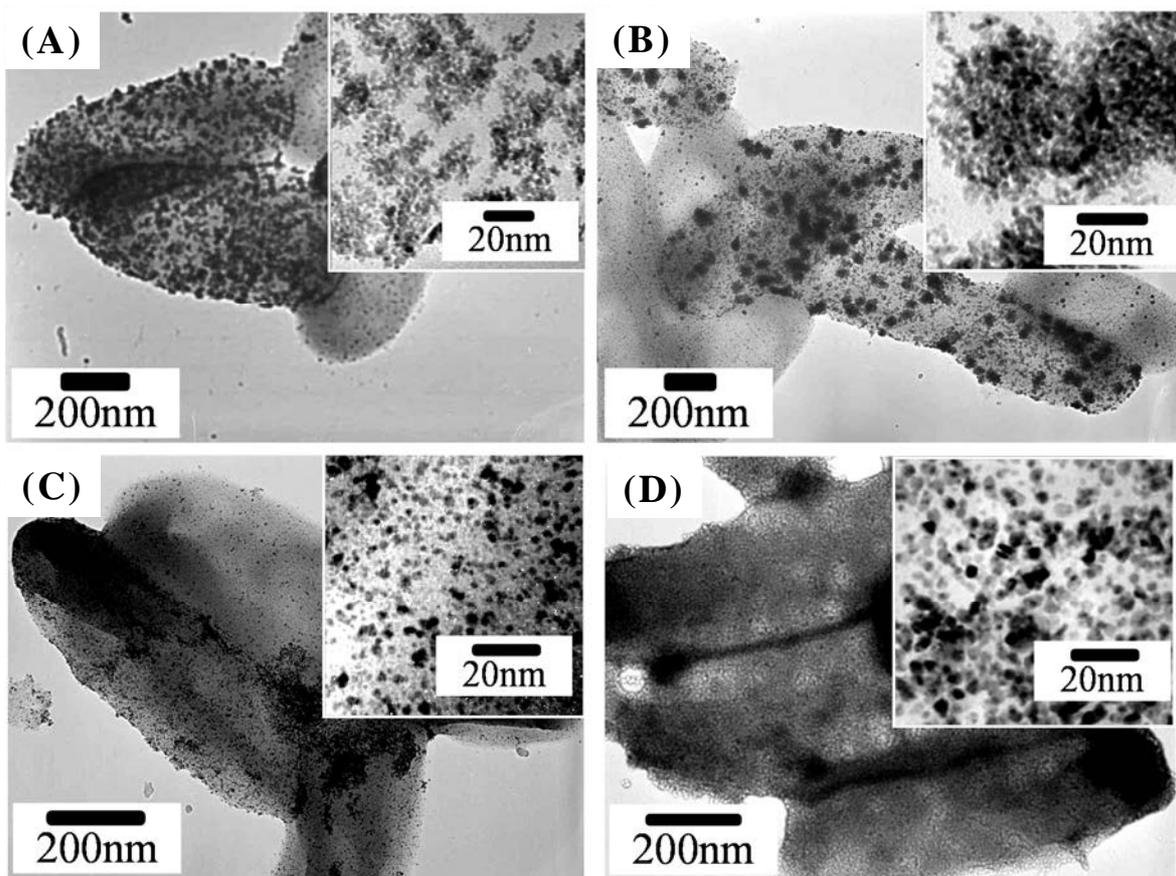
*S. oneidensis* によるバイオ還元実験 (pH 7.0) において、細胞内の Pd の酸化状態を明らかにするため、X 線近吸収端構造 (XANES) スペクトルを解析した。Figure 3.9 は初期液相 Pd(II)イオン濃度  $1.0 \text{ mol/m}^3$ 、初期ギ酸ナトリウム濃度  $50 \text{ mol/m}^3$  のバイオ還元実験における 120 min 後の *S. oneidensis* 細胞の XANES スペクトルである。標準試料として Pd(0)薄膜と  $1 \text{ mol/m}^3$  の  $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  水溶液の XANES スペクトルも併せて示す。実験後の *S. oneidensis* 細胞の XANES スペクトルには  $\text{PdCl}_4^{2-}$  イオンに特徴的な 24.37 keV 付近の吸収ピークが殆ど認められず、Pd(0)薄膜の XANES スペクトルに類似している。これは、*S. oneidensis* 細胞が Pd(II)イオンを Pd(0)に還元した上で細胞上に保持していることを示している。



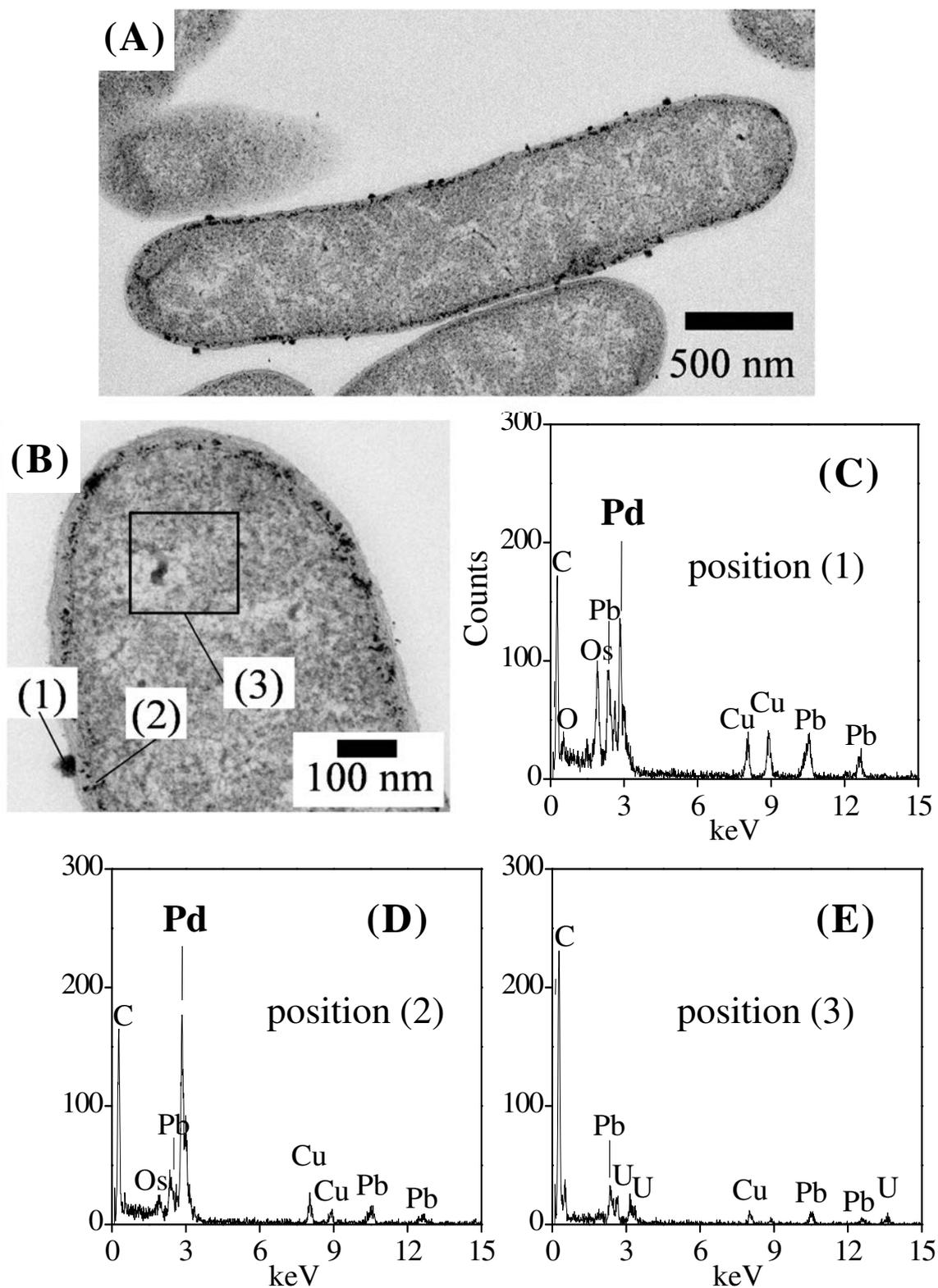
**Figure 3.5** (A) and (B) TEM images of *S. oneidensis* cells after exposure to  $1 \text{ mol/m}^3$   $\text{Na}_2\text{PdCl}_4$  solution with  $50 \text{ mol/m}^3$  sodium lactate at  $25^\circ\text{C}$  and pH 7 for 120 min. (C) X-ray map of palladium afforded by EDX analysis. (D) n-ED spots of the biogenic particle shown in Figure 3.5(B) cells/ $\text{m}^3$ .



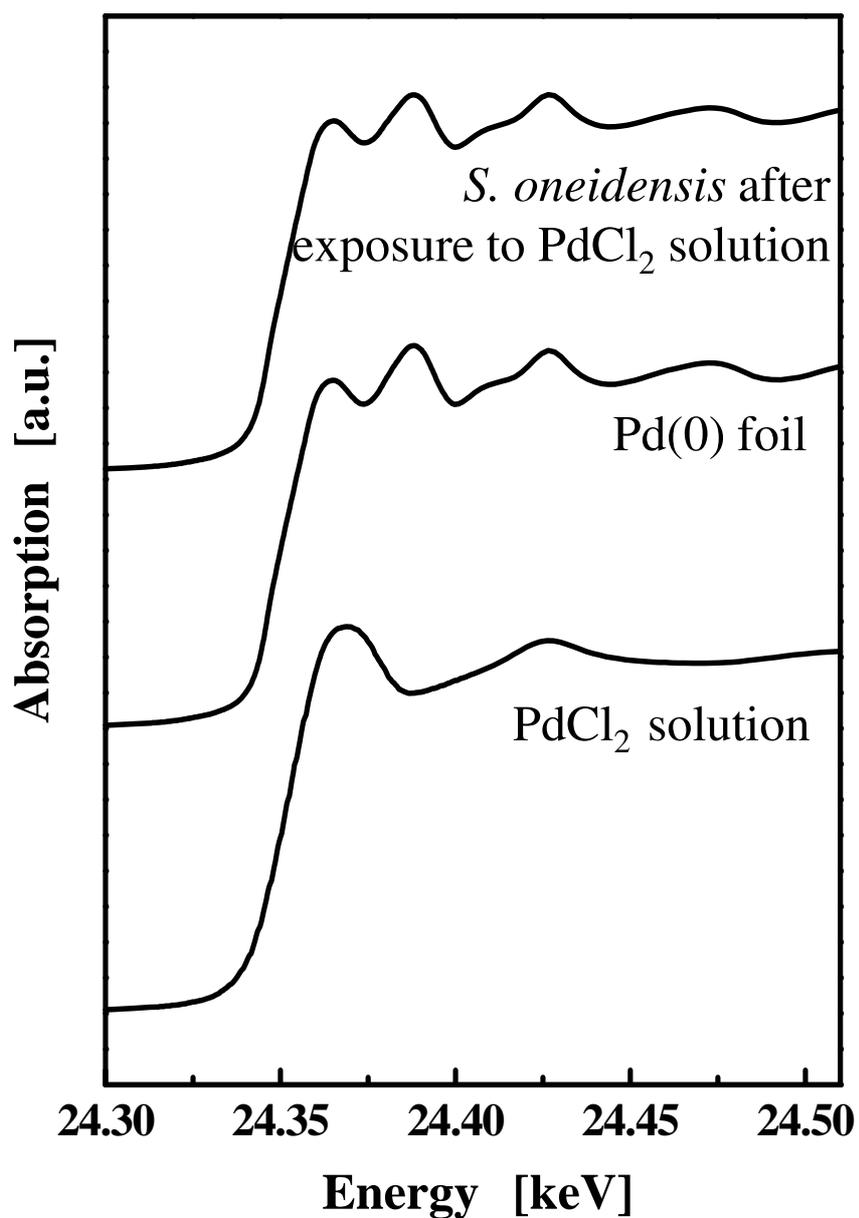
**Figure 3.6** Low (A-C) and high (A'-C') magnification TEM images of Pd nanoparticles prepared by *S. oneidensis* cells at 25°C using different formate concentrations; A, A') 20 mol/m<sup>3</sup>, B, B') 50 mol/m<sup>3</sup>, and C, C') 200 mol/m<sup>3</sup>.



**Figure 3.7** TEM images of Pd nanoparticles prepared with  $50 \text{ mol/m}^3$  sodium formate at different initial Pd(II) concentrations using *S. oneidensis* cells at 120 min; (A)  $2.5 \text{ mol/m}^3$ , (B)  $5 \text{ mol/m}^3$ , (C)  $10 \text{ mol/m}^3$ , and (D)  $20 \text{ mol/m}^3$ .



**Figure 3.8** STEM analysis of a thin section of *S. oneidensis* cells after exposure to the PdCl<sub>2</sub> solution for 120 min; (A) low magnification STEM image, (B) high magnification STEM image, and (C-E) EDX analysis of positions 1-3 indicated in Fig. 3.8(B). Other conditions: initial Pd(II) concentration, 1 mol/m<sup>3</sup>; formate concentration, 50 mol/m<sup>3</sup>.



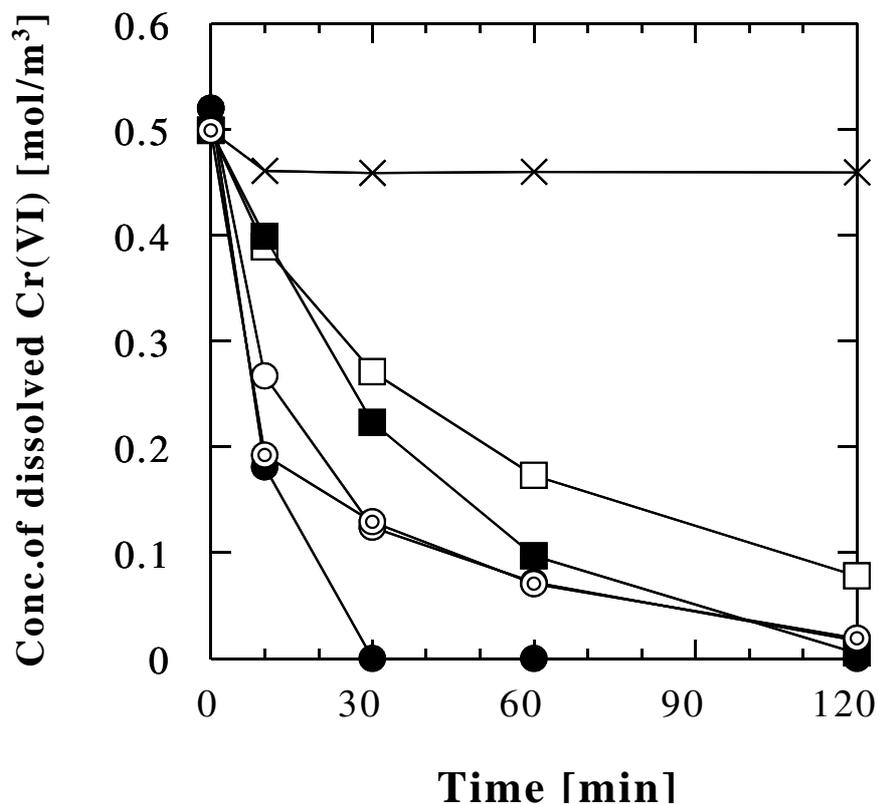
**Figure 3.9** XANES spectra of Pd in the *S. oneidensis* cells after exposure to 1.0 mol/m<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> solution with 50 mol/m<sup>3</sup> sodium formate at 25°C and pH 7 for 120 min., metallic Pd(0) foil, and a 10 mol/m<sup>3</sup> aqueous PdCl<sub>4</sub><sup>2-</sup> solution.

### 3.3.3 バイオ調製 Pd 触媒の触媒活性評価

Figure 3.10 に pH 4.0, 30°Cにおけるギ酸塩による Cr(VI)イオンの還元挙動を示す。Pd 触媒を添加せず、クロム酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{CrO}_4$ ) 水溶液に対して初期ギ酸塩濃度  $25 \text{ mol/m}^3$  で還元を行った場合、120 min で Cr(VI)イオンの還元率は 10%であった。同じ Cr(VI)イオン水溶液 50 ml に対して化学調製 Pd 触媒 40 mg を添加した場合、 $0.5 \text{ mol/m}^3$  の Cr(VI)イオンは 120 min でほぼ完全に還元された。一方、40 mg のバイオ調製 Pd 触媒 (1:3) lactate (乳酸塩を電子供与体として用いてバイオ還元・析出した乾燥細胞 3g 当たり Pd 1g を含むバイオ調製 Pd 触媒) は Pd ナノ粒子の含有量が化学調製 Pd 触媒の 1/4 であるにもかかわらず、実験開始後 10 min で還元率が 50%に達し、120 min 後にはほぼ完全に Cr(VI)イオンを還元した。さらに、バイオ調製 Pd 触媒 (1:3) formate は実験開始後 30 min でほぼ完全に Cr(VI)イオンを還元しており、Cr(VI)イオンの還元に対してバイオ調製 Pd 触媒が化学調製 Pd 触媒より高い触媒活性を持つことが明らかとなった。電子供与体としてギ酸塩を用いて調製した場合、乳酸塩を用いた場合より高活性のバイオ調製 Pd 触媒が得られた。TEM による観察では両者の Pd ナノ粒子に明確な差異は認められないが、3.3.1 項で述べたように両者は異なった電子伝達系により還元・析出したと考えられ、還元速度も異なるため、Pd ナノ粒子の凝集傾向や粒径分布が僅かに異なる可能性も考えられる。さらに詳細な分析・検討が必要である。

固体高分子形燃料電池 (PEFC) の水素極における室温での水素酸化反応について触媒活性を評価するため、初期 Pd(II)イオン濃度  $2.5 - 20 \text{ mol/m}^3$  の水溶液から、バイオ還元により 4 種の Pd 触媒を調製した (Table 3.1(A))。TEM 像上で計測した Pd ナノ粒子の幾何平均径からこれらのバイオ調製 Pd ナノ粒子の比表面積を算出した。前述の通り Pd ナノ粒子の一次粒子径は、初期液相 Pd(II)イオン濃度の増加に伴って 4 nm から 7 nm に増大したが、初期 Pd(II)イオン濃度  $2.5 - 5 \text{ mol/m}^3$  では Pd ナノ粒子が凝集しており (Figure 3.7(A,B))、幾何平均径が増大した結果  $5 \text{ mol/m}^3$  で最小の比表面積となった。これに対し初期 Pd(II)イオン濃度  $10 - 20 \text{ mol/m}^3$  では細胞に高分散で Pd ナノ粒子が析出した (Figure 3.7(C,D))。この結果、4 種のバイオ調製 Pd 触媒のうち最も大きな Pd 比表面積を得られたのは初期 Pd(II)イオン濃度  $10 \text{ mol/m}^3$  の水溶液から調製した Bio-Pd10 で、 $75.7 \text{ m}^2/\text{g}$  であった。

Figure 3.11(A)に室温における PEFC による電流－電力曲線を示す。Bio-Pd5.0 が最大電力密度  $0.63 \text{ mW/cm}^2$  であったのに対し、Bio-Pd10 は  $4.78 \text{ mW/cm}^2$  と 7.5 倍の発電力を示した。Table 3.1B から明らかなように、最大電力密度は Pd ナノ粒子の比表面積に相関するため、大きな発電力を得るためにはより小さいナノ粒子をより高分散に細胞上に生成させる必要がある。比較対照として、市販の化学調製 Pd 触媒 (Com-Pd) の TEM 像を Figure 3.11(B) に示す。約 5 nm の Pd ナノ粒子が 1  $\mu\text{m}$  ほどの炭素担体に担持されている。この化学調製 Pd 触媒を用いて同様に発電した最大電力密度を基準とすると、Bio-Pd10 の発電力は化学調製 Pd 触媒の約 90%であった (Figure 3.11(A))。この結果は、バイオ調製 Pd 触媒は室温における PEFC 水素極の触媒としても利用できる可能性があることを示唆している。今後は、バイオ調製 Pd ナノ粒子の比表面積の増大に加え、燃料電池用担体への担持や膜/電極接合体 (Membrane Electrode Assembly, MEA) の作製方法も検討する必要がある。



**Figure 3.10** Chemical reduction of 50 cm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>Cr(VI)O<sub>4</sub> solution using 25 mol/m<sup>3</sup> sodium formate at 30 °C and pH 4.0. (●) 40 mg Biogenic-Pd(0)- (1:3) formate powder; (○) 40 mg Biogenic-Pd(0)- (1:19) lactate powder; (■) 40 mg Biogenic-Pd(0)- (1:3) lactate powder; (◻) 40 mg Biogenic-Pd(0)- (1:19) lactate powder; (⊙) 40 mg Chemical-Pd(0) powder; (×) control in the absence of Pd(0) catalysts.

**Table 3.1** (A) Specific surface area of biomass-supported Pd particles prepared at different initial Pd(II) concentrations. (B) the amount of Pd attached in the MEA ( $W_{Pd}$ ) and resulting power density of the PEFC.

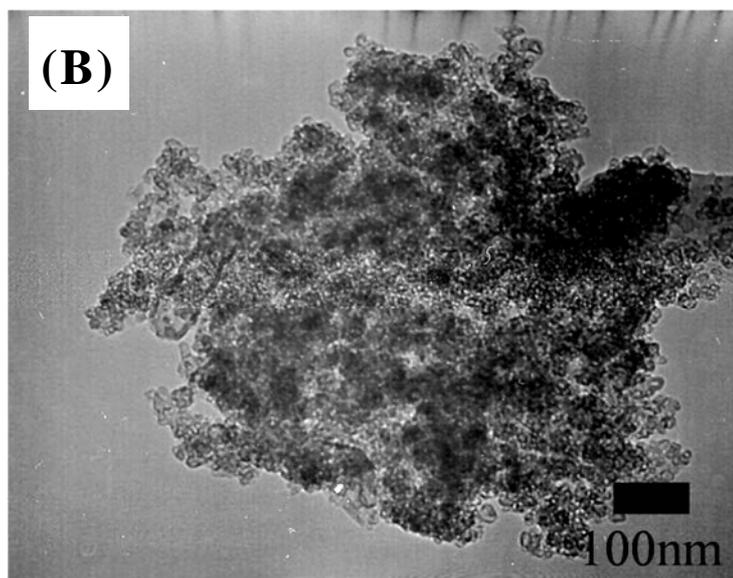
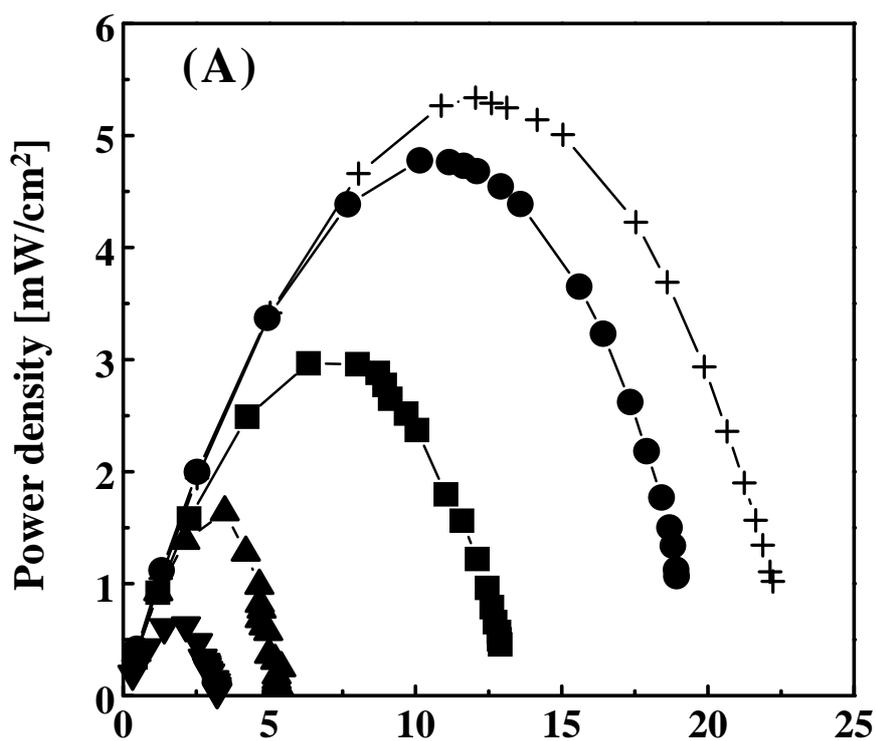
(A)

Initial Pd(II) [mol/m <sup>3</sup> ]	specific surface area of biomass-supported Pd [m <sup>2</sup> /g]
2.5	28.3
5	6.47
10	75.7
20	53.7

(B)

Sample name for fuel cell test	Pd loading [wt%] <sup>a</sup>	$W_{Pd-catalyst}$ [mg] <sup>b</sup>	$w_C$ [mg] <sup>c</sup>	$W_{Pd}$ [mg/cm <sup>2</sup> ] <sup>d</sup>	power density [mW/cm <sup>2</sup> ]
Bio-Pd <sub>2.5</sub>	8	100	72	1.28	1.64
Bio-Pd <sub>5.0</sub>	12	66.7	72	1.28	0.63
Bio-Pd <sub>10</sub>	21	38.1	72	1.28	4.78
Bio-Pd <sub>20</sub>	30	26.7	72	1.28	3.27
Com-Pd	20	40	32	1.28	5.33

- a) Pd-weight percent in Pd/cell or Pd/C catalyst
- b) Amount of Pd-catalyst in the catalyst ink
- c) Amount of carbon in the catalyst ink
- d) Amount of Pd attached in the MEA.



**Figure 3.11** (A) I-P curves of PEFC using different types of Pd anode catalyst; (▲) bio-Pd2.5, (▼) bio-Pd5.0, (●) bio-Pd10, (■) bio-Pd20, and (+) Com-Pd. Bio-PdX denotes the dried biomass-supported Pd catalysts prepared at an initial Pd(II)concentration of X mol/m<sup>3</sup>. Com-Pd denotes the commercial Pd catalyst. (B) TEM image of the commercial carbonsupported Pd nanoparticles.

### 3.4 結言

Fe(III)イオン還元細菌 *S. oneidensis* による希薄水溶液からの Pd(II)イオンの還元・析出と、Pd ナノ粒子の調製における操作条件および Pd ナノ粒子触媒活性について以下の知見を得た。

- (1) *S. oneidensis* は電子供与体として乳酸塩またはギ酸塩を用いて Pd(II)イオンを迅速に還元・回収できることが明らかとなった。特に、ギ酸塩を電子供与体とした場合、 $5 \text{ mol/m}^3$  の Pd(II)イオン水溶液から 15 min 以内にすべての Pd(II)イオンを還元・回収できた ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7.0)。
- (2) 細胞薄切片の STEM による観察により、*S. oneidensis* を用いた Pd(II)イオンのバイオ還元・析出では、一次粒子径 4 - 10 nm の Pd ナノ粒子が *S. oneidensis* 細胞のペリプラズム空間(細胞外膜と内膜に挟まれたナノ空間)に析出することが明らかとなった。Pd ナノ粒子が水溶液中のイオンがアクセスしやすい細胞表面近傍に析出することは、Pd ナノ粒子を担持した細胞を触媒等に利用する際に有利であると考えられる。
- (3) 初期液相 Pd(II)イオン濃度は Pd 触媒のバイオ調製における重要な操作因子であることが明らかとなった。初期液相 Pd(II)イオン濃度  $20 \text{ mol/m}^3$  において平均一次粒子径 7 nm、幾何学的標準偏差 1.4 nm の均一に分散した Pd ナノ粒子を合成することができた。
- (4) pH 4.0,  $30^\circ\text{C}$ におけるギ酸塩による Cr(VI)イオンの還元反応において、バイオ調製 Pd 触媒が市販の化学調製 Pd 触媒より高い触媒活性を持つことが明らかとなった。
- (5) バイオ調製 Pd 触媒は、PEFC の水素極における室温での水素酸化反応において、市販 Pd 触媒 (炭素担持) に対して約 90 %の発電力 (最大電力密度を基準)を示した。この結果は、バイオ調製 Pd 触媒は室温における PEFC 水素極の触媒としても利用できる可能性があることを示唆している。

## References

- [1] G. Glaspell, L. Fuoco, M. S. El-Shall, *J. Phys. Chem. B* **109** (2005) 350-355.
- [2] G. Glaspell, H. M. A. Hassan, A. Elzatahry, V. Abdalsayed, M. S. El-Shall, *Topics in Catal.* **47** (2008) 22-31.
- [3] J. M. Campelo, T. D. Conesa, M. J. Gracia, M. J. Jurado, R. Luque, J. M. Marinas, A. A. Romero, *Green Chem.* **10** (2008) 853-858.
- [4] M. Okumura, S. Nakamura, S. Tsubota, T. Nakamura, M. Azuma, M. Haruta, *Catal. Lett.* **51** (1998) 53-58.
- [5] M. Watanabe, M. Uchida, S. Motoo, *J. Electroanal. Chem.* **229** (1987) 395-406.
- [6] A. Barau, V. Budarin, A. Caragheorghopol, R. Luque, D. J. Macquarrie, A. Prella, V. S. Teodorescu, M. Zaharescu, *Catal. Lett.* **124** (2008) 204-214.
- [7] C. H. Liang, W. Xia, H. Soltani-Ahmadi, O. Schluter, R. A. Fischer, M. Muhler, *Chem. Commun.* (2005) 282-284.
- [8] Z. H. Zhou, S. L. Wang, W. J. Zhou, G.X. Wang, L. H. Jiang, W. Z. Li, S. Q. Song, J. G. Liu, G. Q. Sun, Q. Xin, *Chem. Commun.* (2003) 394-395.
- [9] Z. L. Liu, J. Y. Lee, M. Han, W. X. Chen, L. M. Gan, *J. Mat. Chem.* **12** (2002) 2453-2458.
- [10] X. Zhang, K. Y. Chan, *Chem. Mat.* **15** (2003) 451-459.
- [11] J. R. Lloyd, P. Yong, L. E. Macaskie, *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (1998) 4607-4609.
- [12] P. Yong, N. A. Rowson, J. P. G. Farr, I. R. Harris, L. E. Macaskie, *Biotechnol. Bioeng.* **80** (2002) 369-379.
- [13] M. D. Redwood, K. Deplanche, V. S. Baxter-Plant, and L. E. Macaskie, *Biotechnol. Bioeng.* **99** (2008) 1045-1054.
- [14] V. S. Baxter-Plant, I. P. Mikheenko, L. E. Macaskie, *Biodegradation* **14** (2003) 83-90.
- [15] V. S. Baxter-Plant, I. P. Mikheenko, M. Robson, S. J. Harrad, L. E. Macaskie, *Biotechnol. Lett.* **26** (2004) 1885-1890.
- [16] S. Harrad, M. Robson, S. Hazrati, V. S. Baxter-Plant, K. Deplanche, M. D. Redwood, L. E. Macaskie, *J. Environ. Monit.* **9** (2007) 314-318.
- [17] N. J. Creamer, I. P. Mikheenko, P. Yong, K. Deplanche, D. Sanyahumbi, J. Wood, K. Pollmann, M. Merroun, S. Selenska-Pobell, L. E. Macaskie, *Catal. Today* **128** (2007) 80-87.
- [18] J. A. Bennett, N. J. Creamer, K. Deplanche, L. E. Macaskie, I. J. Shannon, J. Wood, *Chem.*

- Eng. Sci.* **65** (2010) 282-290.
- [19] L. S. Søjberg, D. Gauthier, A. T. Lindhardt, M. Bunge, K. Finster, R. L. Meyer, T. Skrydstrup, *Green Chem.* **11** (2009) 2041-2046.
- [20] P. Yong, M. Paterson-Beedle, I. P. Mikheenko, L. E. Macaskie, *Biotechnol. Lett.* **29** (2007) 539-544.
- [21] A. N. Mabbett, D. Sanyahumbi, P. Yong, L. E. Macaskie, *Environ. Sci. Technol.* **40** (2006) 1015-1021.
- [22] W. De Windt, P. Aelterman, W. Verstraete, *Environ. Microbiol.* **7** (2005) 314-325.
- [23] W. De Windt, N. Boon, J. Van den Bulcke, L. Rubberecht, F. Prata, J. Mast, T. Hennebel, W. Verstraete, A. Van Leeuwenhoek, *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **90** (2006) 377-389.
- [24] B. Mertens, C. Blothe, K. Windey, W. De Windt, W. Verstraete, *Chemosphere* **66** (2007) 99-105.
- [25] T. Hennebel, H. Simoen, W. De Windt, M. Verloo, N. Boon, W. Verstraete, *Biotechnol. Bioeng.* **102** (2009) 995-1002.
- [26] J. F. Heidelberg, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, E. J. Gaidos, W. C. Nelson, T. D. Read, J. A. Eisen, R. Seshadri, N. Ward, B. Methe, R. A. Clayton, T. Meyer, A. Tsapin, J. Scott, M. Beanan, L. Brinkac, S. Daugherty, R. T. DeBoy, R. J. Dodson, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. F. Kolonay, R. Madupu, J. D. Peterson, L. A. Umayam, O. White, A. M. Wolf, J. Vamathevan, J. Weidman, M. Impraim, K. Lee, K. Berry, C. Lee, J. Mueller, H. Khouri, J. Gill, T. R. Utterback, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, H. O. Smith, J. C. Venter, K. H. Nealson, C. M. Frase, *Nat. Biotechnol.* **20** (2002) 1118-1123.
- [27] A. L. Kane, E. D. Brutinel, H. Joo, R. Maysonet, C. M. VanDrisse, N. J. Kotloski, J. A. Gralnick, *J. Bacteriol.* **38** (2016) 1337-1346.
- [28] G. E. Pinchuk, D. A. Rodionov, C. Yang, X. Li, A. L. Osterman, E. Dervyn, O. V. Geydebekht, S. B. Reed, M. F. Romine, F. R. Collart, J. H. Scott, J. K. Fredrickson, A. S. Beliaev, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106** (2009) 2874-2879.
- [29] T. Kasai, A. Kouzuma, K. Watanabe, *Front. Microbiol.* **8** (2017)  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00869>.

## 第4章 還元細菌 *Shewanella algae* による Pt(IV)イオンの還元・析出

### 4.1 緒言

白金 (Pt) は、現在我が国の基幹産業である自動車製造業において排気ガス浄化用の触媒として欠かせない金属であり、将来的にも燃料電池触媒等の金属素材としての需要が見込まれる。Pt の産出国は南アフリカとロシアに大きく偏っているため、その供給や価格変動に対するリスクが高い。資源の安定的な確保には Pt のリサイクルが重要であるが、現在のリサイクル率は 30 % 程度にとどまっている (1.1.2 項)。Pt リサイクル率の向上には工場廃液や Pt 廃棄物の酸浸出液等の希薄な含 Pt 水溶液から効率的に Pt を回収する必要がある。

水溶液からの Pt 回収法の一つである還元析出法は、ナノ粒子や薄膜の合成にも欠かせない不均一反応である。今日まで、さまざまな還元剤を用いた水溶液からの白金族金属 (PGMs) イオンの化学的な還元方法が開発されてきた [1]。化学還元法では PGMs イオンの効果的な還元のために加熱を要する場合が多く、例えば、0.5 wt% の重酒石酸塩を還元剤とした Pt ナノ粒子の還元では 100°C に加熱する必要がある [2]。電析は HCl 溶液中での PGMs イオンの標準酸化還元電位が 0.44 - 0.73V と高いことから有効な方法であるが [3]、効率的な PGMs の析出には電極の比表面積を大きくする必要がある。PGMs イオンの生物学的な還元 (バイオミネラリゼーション) は、室温で実施できるためエネルギー消費が少なく、安全性の高い中性水溶液を利用するため環境負荷が少ない、いわゆる「グリーンケミストリー」としての特徴があり、従来の物理・化学的な還元方法の課題に対する有効な解決策の一つと考えられる。

Pt イオンのバイオミネラリゼーションの研究においては既往の研究が少なく、Yong *et al.* が *Ddesulfovibrio desulfuricans* による Pt(IV)イオンと Rh(III)イオンの吸着には成功しているが [4]、バイオ還元は出来ないことを指摘している [5]。*D. desulfuricans* に吸着した Pt(IV)イオンを水素により還元して Pt ナノ粒子を合成し、燃料電池用の触媒として性能評価を行った研究 [6, 7] があるが、データは僅少である。

本章では、Fe(III)イオン還元細菌 *Shewanella algae* の静止細胞による Pt(IV)

イオンの還元・析出について述べる。具体的には、電子供与体としてギ酸塩および乳酸塩を用いて pH 7, 25°Cにおいてヘキサクロロ白金酸イオン( $\text{PtCl}_6^{2-}$ )のバイオ還元実験を行い、Pt(IV)イオンの還元挙動ならびに析出粒子の性状に及ぼす各種操作因子(溶液 pH、初期 Pt(IV)イオン濃度、菌体濃度、電子供与体の種類とその濃度、反応時間)の影響について系統的に検討した。実験終了後の *S. algae* 細胞およびナノ粒子に対しては、走査型透過電子顕微鏡(STEM)で観察するとともに、エネルギー分散型 X 線分析(EDX)によりナノ粒子の元素を同定した。さらに、X 線近吸収端構造(XANES)より細胞内の Pt の酸化状態を分析した。

## 4.2 実験方法

### 4.2.1 微生物の培養

本論文で用いた微生物は American Type Culture Collection (ATCC) から分譲された *S. algae* ATCC 51181 株である。*S. algae* の培養には、電子供与体として乳酸ナトリウムを、電子受容体としてクエン酸鉄(III)を含む ATCC medium 2 液体培地を用いた。培養は、500 cm<sup>3</sup> のねじ口瓶に 200 cm<sup>3</sup> の液体培地を入れ、N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80:20, v/v) 混合ガスを 30 分通気した後、25°C で嫌氣的に培養した。

### 4.2.2 Pt(IV)イオンのバイオ還元実験

実験操作は O<sub>2</sub> 濃度 2.5% 以下の嫌氣的雰囲気中に保たれたグローブボックス内で行った。静止細胞懸濁液は、対数増殖期末期の微生物細胞を、遠心分離により集菌し、炭酸ナトリウム緩衝液 (35 mol/m<sup>3</sup>, pH 7.0) による洗浄を 2 回行い、3.2.2 項と同様に調整した。塩化白金酸 (H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>) 水溶液は、炭酸ナトリウム緩衝液 (35 mol/m<sup>3</sup>, pH 7.0) で希釈して所定の濃度とし、使用前に N<sub>2</sub> ガスを流通させて嫌気状態とした。実験は、静止細胞懸濁液に所定濃度となるように電子供与体(乳酸ナトリウム)および塩化白金酸水溶液を添加・混合して開始し、N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80:20, v/v) の混合ガスを反応容器に流通させ嫌気状態を保持した。実験の主な初期条件は、溶液体積 15 cm<sup>3</sup>、液相 Pt(IV)イオン濃度 1.0 mol/m<sup>3</sup>、細胞濃度 1×10<sup>15</sup> cells/m<sup>3</sup>、電子供与体濃度 30 mol/m<sup>3</sup>、pH 7.0 である。実験開始後、サンプルの採取を一定の時間間隔で行い、採取した懸濁液は直ちにフィルター(孔径 0.2 μm、セルロース混合エステル製)で

ろ過して、液相の Pt 濃度を測定した。実験終了後の細胞は遠心分離により集菌・洗浄した後に王水で溶解し、細胞に回収した Pt 量を定量した。

#### 4.2.3 分析方法

液相 Pt イオン濃度および細胞の王水浸出液の Pt 濃度の測定には、誘導結合プラズマ発光分析装置 (ICP-AES) (ICPE-9000、島津製作所)、原子吸光光度計 (AA-6650、島津製作所) を使用した。

実験終了後の細胞は、透過型電子顕微鏡 (TEM, JEOL model JEM-2000FX) を用いて観察し、制限視野電子回折 (SAED) により生成粒子の結晶構造を同定した。さらに一部の試料については、走査型透過電子顕微鏡 (STEM, Hitachi HF-2210) により観察し、付属するエネルギー分散型 X 線分析装置 (EDX, Noran Voyager EDX) およびナノビーム電子回折 (n-ED) により、生成した粒子を分析した。STEM 観察用試料は、3.2.3 項と同様に細胞薄切片試料を作成し、Pt ナノ粒子の生成場を確認した。

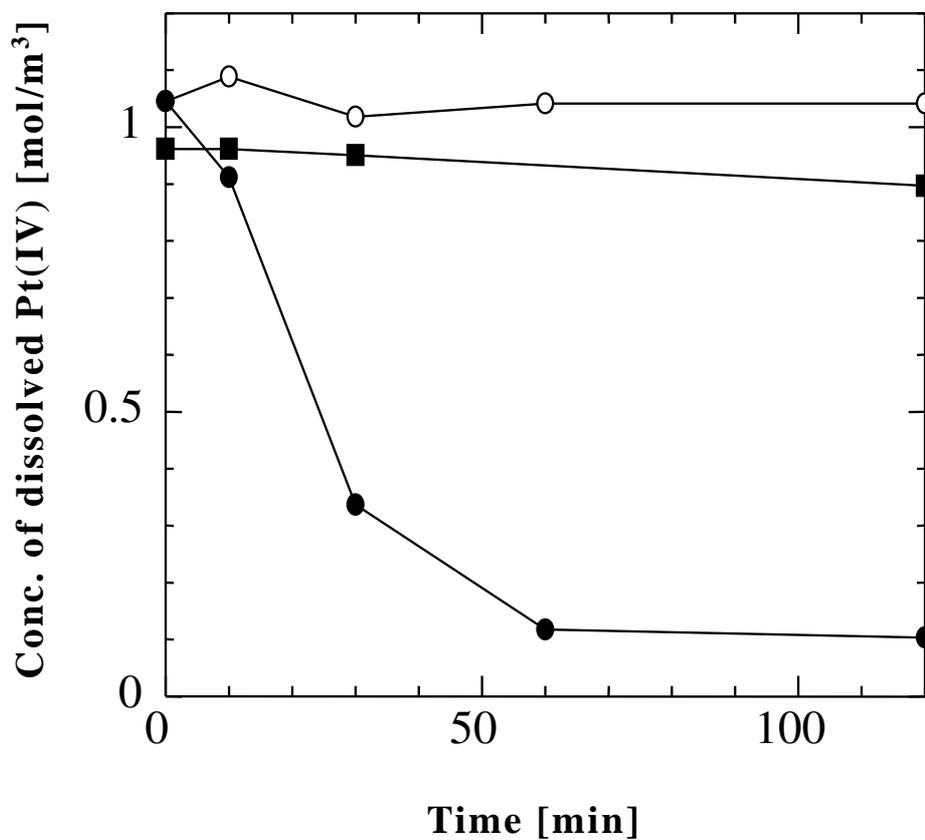
細胞上の Pt の酸化状態を明らかにするため、X 線近吸収端構造 (XANES) スペクトルを解析した。採取した懸濁液を直ちにフィルター (孔径 0.2  $\mu\text{m}$ 、セルロース混合エステル製) でろ過し、嫌気雰囲気下において回収した細胞を炭酸塩緩衝液で 2 回洗浄・再懸濁した。洗浄した細胞の懸濁液 2 ml をポリエチレンバッグに封入し、日本高輝度光科学研究センター (JASRI) の BL01B1 ビームラインにおいて、XANES スペクトルを測定した。測定は、Pt  $L_{III}$  吸収端 (11.559 keV) 付近の X 線吸収スペクトルを蛍光法にて測定した。X 線は、8 GeV, 100 mA の蓄積リングから偏向電磁石で発生させた X 線光源より、Si(111) 二結晶分光器を経て単色化し、1 mm の入射スリットを通過させた。入射 X 線強度は  $\text{N}_2\text{-Ar}$  (85:15, v/v) 混合ガスを流したガスフロー型イオンチェンバーで測定し、試料からの蛍光 X 線強度は 19 素子 Ge 検出器で測定した。検出器からの信号はシングルチャンネルアナライザーおよびマルチチャンネルアナライザーで計測し、19 素子 Ge 検出器の各素子からの信号は平均化した。Pt  $L_{III}$  吸収端付近の XANES スペクトルの計測は 0.5 eV ステップで行い、1 ステップの計測時間は 1 s とした。標準試料は Pt(0) 薄膜と Pt(II)Cl<sub>2</sub> 粉末および 1 mol/m<sup>3</sup> の H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> 水溶液を用いた。

## 4.3 実験結果および考察

### 4.3.1 *S. algae* による Pt(IV)イオンの還元・析出

Figure 4.1 に *S. algae* 静止細胞による Pt(IV)イオンのバイオ還元実験における液相 Pt(IV)イオンの経時変化を示す。実験条件は溶液 pH 7、温度 25°C である。塩化白金酸水溶液に *S. algae* 細胞と電子供与体として乳酸ナトリウムを添加した場合、液相 Pt(IV)イオン濃度は初期濃度  $1.05 \text{ mol/m}^3$  から急激に減少し、60 min 後には  $0.1 \text{ mol/m}^3$  となった。同時に、実験中の懸濁液の色は、薄黄色から黒色に変化した。懸濁液の黒色化は、*S. algae* による Pt ナノ粒子の生成を視覚的に示唆している。したがって、観測された液相 Pt(IV)イオン濃度の減少は、Pt(IV)イオンの還元により不溶性の Pt ナノ粒子が析出したことによると考えられる。一方、乳酸塩を添加しなかった場合懸濁液の色は変化せず、*S. algae* は Pt(IV)イオンを還元できなかった。また、*S. algae* を添加しない乳酸塩による無菌化学対照実験においても Pt(IV)イオンの還元は認められなかった。このことから、*S. algae* による Pt(IV)イオンの還元には電子供与体として乳酸塩が必要であるといえる。既往の研究において、*D. desulfuricans* は  $2 \text{ mol/m}^3$  の塩化白金酸水溶液から、12%の Pt(IV)イオンを吸着している[4]。これに対し、本論文においては *S. algae* に Pt(IV)イオンの吸着能は認められない (Figure 4.1、電子供与体を添加しない場合) にもかかわらず、電子供与体として乳酸塩を添加することにより、*S. algae* は Pt(IV)イオンに対する還元能を発揮している。*D. desulfuricans* とは異なり、*S. algae* においては *Shewanella* 属細菌が持つ乳酸デヒドロゲナーゼ (3.3.1 項) とそれに付随する電子伝達系が Pt(IV)イオンの還元を触媒していると推察される。

微生物による Pt ナノ粒子の合成方法としては硫酸還元菌 *D. desulfuricans* による方法が報告されているが[6, 7]、Pt(IV)イオンの吸着と水素を用いた還元による 2 ステップの工程であり、硫酸還元菌が生成する硫化水素が触媒能を低下させる可能性もある。これに対し *S. algae* による Pt(IV)イオンのバイオ還元・析出は、取り扱いが容易な乳酸塩を電子供与体とした 1 ステップ工程で硫化水素も発生しないことから、より実用的な Pt 粒子の合成方法と言える。



**Figure 4.1** Time course of  $\text{PtCl}_6^{2-}$  ion reduction by *Shewanella algae* cells at 25°C and pH 7; (●)  $1 \times 10^{15}$  cells/ $\text{m}^3$  *S. algae* cells in the presence of 30 mol/ $\text{m}^3$  lactate; (■)  $1 \times 10^{15}$  cells/ $\text{m}^3$  *S. algae* cells in the absence of lactate; (○) sterile control containing no *S. algae* cells in the presence of 30 mol/ $\text{m}^3$  lactate.

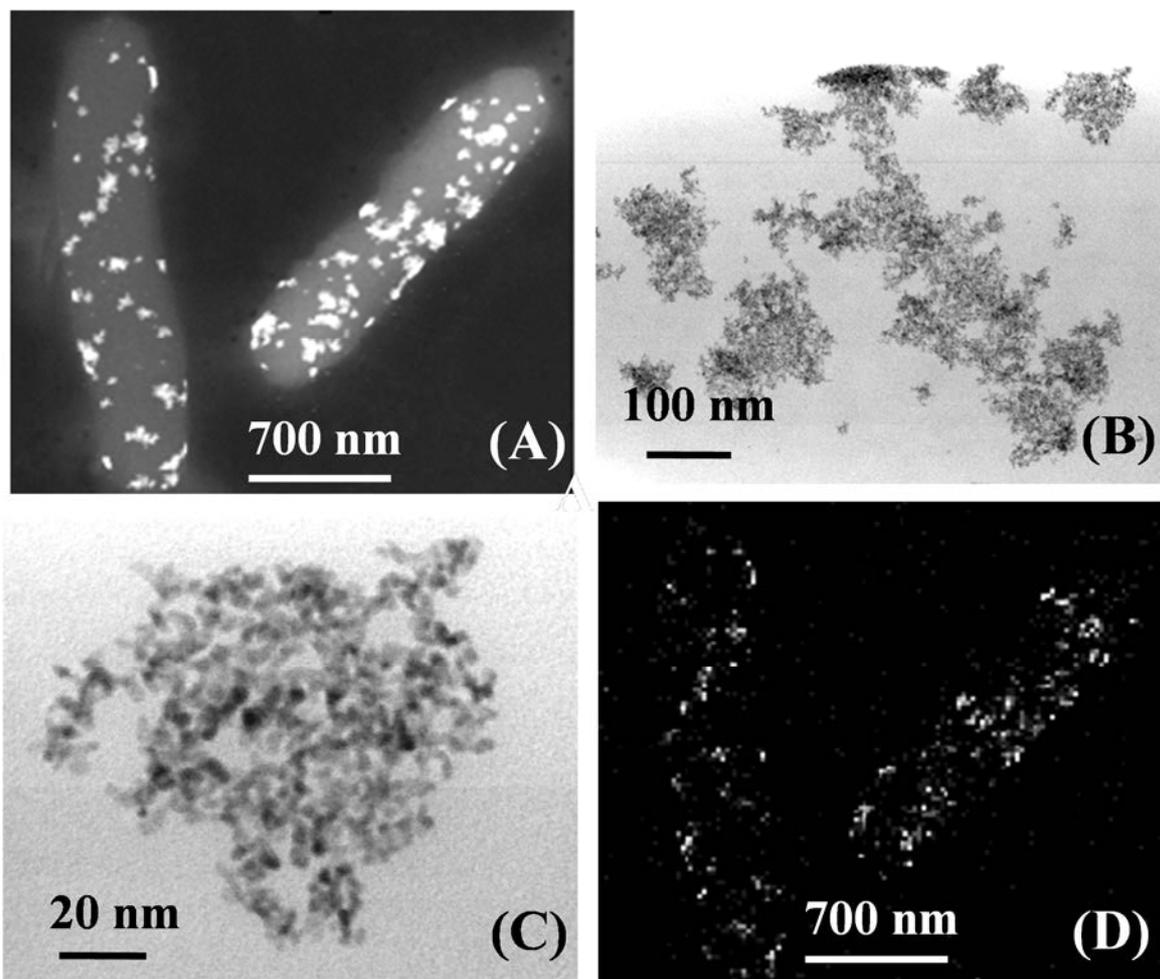
### 4.3.2 Pt ナノ粒子のキャラクタリゼーション

Figure 4.2 にバイオ還元実験後の *S. algae* 細胞の STEM 像を示す。暗視野像では、長さ 2  $\mu\text{m}$ 、幅 0.5  $\mu\text{m}$  の短棒状の *S. algae* 細胞に多数のナノ粒子（白色部分）が認められる（Figure 4.2(A)）。高倍率の明視野像からナノ粒子の一次粒子径が約 5 nm であることが解る（Figure 4.2(B,C)）。*S. algae* 細胞における Pt の EDX マッピング像（Figure 4.2(D)）は Figure 4.2(A) のナノ粒子と一致しており、観察されたナノ粒子は Pt ナノ粒子と同定される。Figure 4.3 にバイオ還元実験後の *S. algae* 細胞の細胞薄切片の STEM 像を示す。ナノ粒子は内膜と外膜の間にあるペリプラズム空間に認められた（Figure 4.3 (A)-1）。ペリプラズム空間のナノ粒子に対する EDX スペクトルでは、強い Pt の特性 X 線および比較的弱い C, Cu, Pb の特性 X 線が計測された（Figure 4.3(B)）。C, Cu および Pb の特性 X 線は細胞膜周辺に存在するタンパク質等の微生物由来物質や薄切片試料を載せたエラスチックカーボン支持膜および染色時に使用された元素に由来する。ペリプラズム空間のナノ粒子に対する EDX スペクトルから Cl は観測されず、ナノ粒子に含まれる Cl はこの装置の検出限界である 0.4 wt.% 以下と確認された。一方、細胞質（Figure 4.3 (A)-2）では、Pt の特性 X 線は認められず、強い C の特性 X 線および比較的弱い O, Pb, U の特性 X 線が計測された（Figure 4.3(C)）。C と O の特性 X 線は細胞膜周辺に存在するタンパク質等の微生物由来物質や薄切片試料を載せたエラスチックカーボン支持膜に由来し、Pb と U の特性 X 線染色時に使用された元素に由来する。なお、Figure 4.3(C) の EDX スペクトルにおける Cl のピークは Pb の特性 X 線  $\text{PbM}\beta$  (2.44 keV) である可能性があり、Cl の存在を確定するものではないと考えられる。このように、Pt(IV)イオンのバイオ還元において、Pt ナノ粒子は *S. algae* 細胞のペリプラズム空間に生成することが明らかとなった。Pt ナノ粒子が水溶液中のイオンがアクセスしやすい細胞表面近傍に析出することは、Pt ナノ粒子を担持した細胞を触媒等に利用する際に有利であると考えられる。

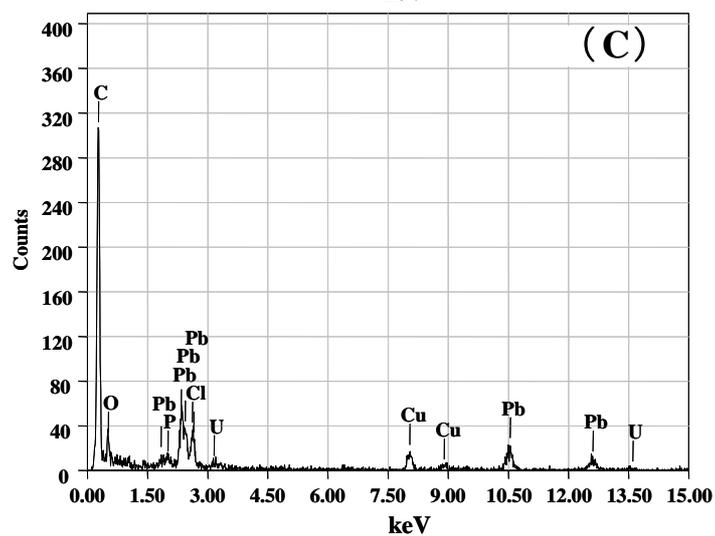
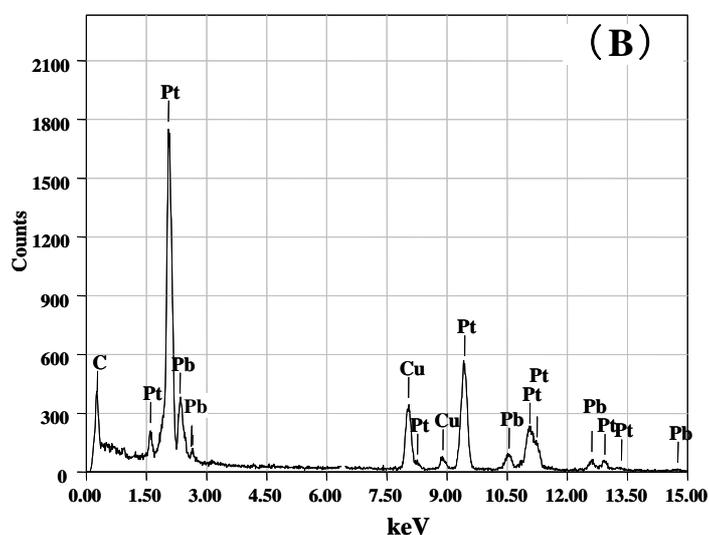
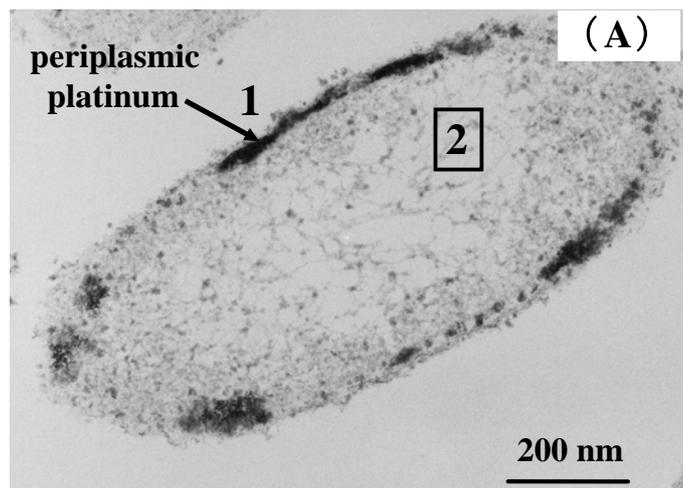
*S. algae* によるバイオミネラリゼーション実験 (pH 7.0) において、細胞内の Pt の酸化状態を明らかにするため、X 線近吸収端構造 (XANES) スペクトルを解析した。Figure 4.4 はバイオミネラリゼーション実験における 60 min の *S. algae* 細胞の XANES スペクトルである。標準試料として Pt(0)薄膜と  $\text{PtCl}_2$

粉末および  $1 \text{ mol/m}^3$  の  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  水溶液の XANES スペクトルも併せて示す。実験後の *S. algae* 細胞の XANES スペクトルには  $\text{PtCl}_6^{2-}$  イオンに特徴的な  $11.565 \text{ keV}$  付近の吸収ピークが殆ど認められない。また、実験後の *S. algae* 細胞の XANES スペクトルのピーク位置(実線)は  $\text{PtCl}_2$  粉末のピーク位置(点線)とは異なっており、 $\text{Pt(0)}$  薄膜の XANES スペクトルに類似している。これは、*S. algae* 細胞が  $\text{Pt(IV)}$  イオンを  $\text{Pt(0)}$  に還元した上で細胞に保持していることを示している。

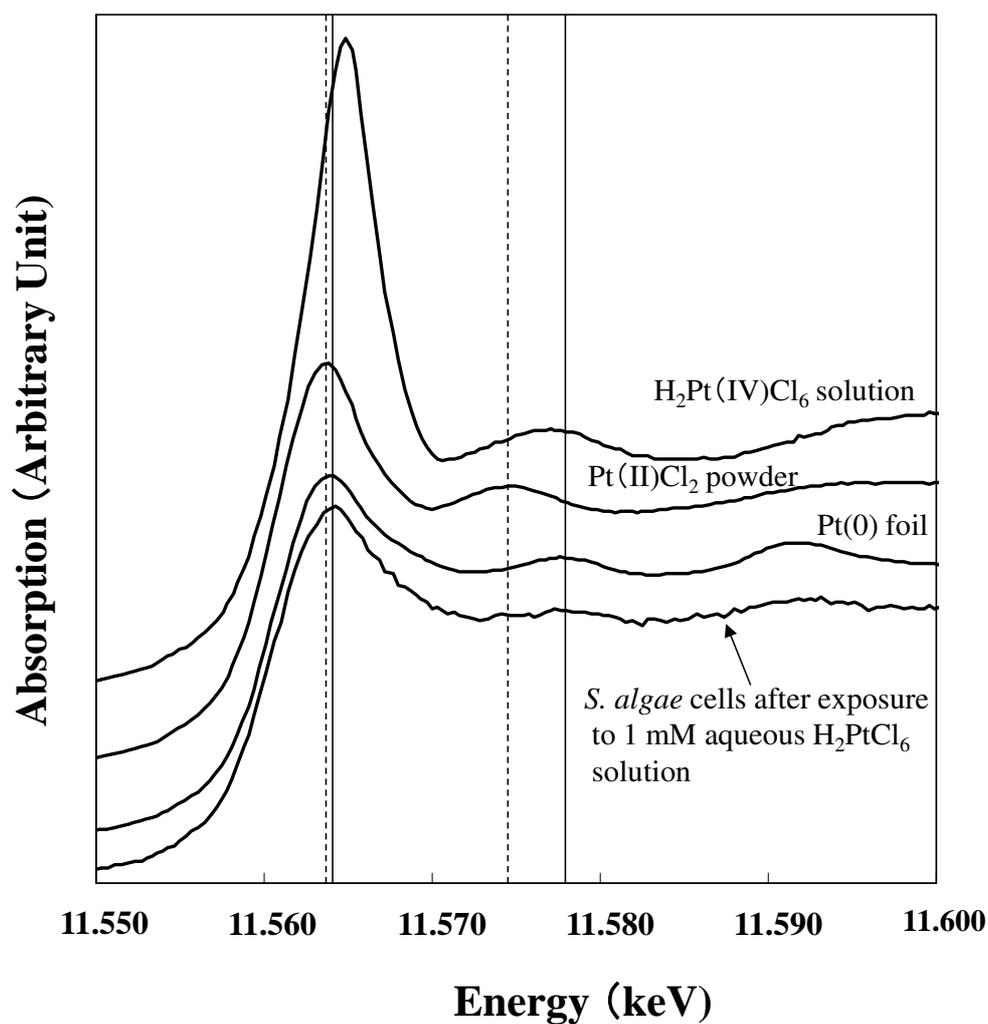
$\text{Pt}$  ナノ粒子が液相(バルク)ではなく *S. algae* 細胞のペリプラズム空間に析出することから、 $\text{Pt(IV)}$  イオンの還元反応を触媒している酵素はペリプラズム空間に存在すると考えられる。*S. algae* による  $\text{Pt(IV)}$  イオンのバイオ還元は(1) ペリプラズム空間内の酸化還元酵素への  $\text{Pt(IV)}$  イオンの吸着、(2) 乳酸塩を電子供与体とした  $\text{Pt(IV)}$  イオンの微生物的還元、の 2 ステップに分けられる。ペリプラズム空間のナノ粒子に対する EDX スペクトルから  $\text{Cl}$  が観測されなかったことと、実験後の *S. algae* 細胞の XANES スペクトルが  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  水溶液および  $\text{PtCl}_2$  粉末の XANES スペクトルとは大きく異なることから、60 min 後の細胞のペリプラズム空間における  $\text{Pt(II)}$  イオンおよび  $\text{Pt(IV)}$  イオンの蓄積は考え難い。律速過程を含めた反応機構の詳細な検討には実験中の XANES スペクトルの経時的な測定等、更なるデータの蓄積が必要である。



**Figure 4.2** (A) Dark-field STEM image of *S. algae* cells after exposure to a 1 mol/m<sup>3</sup> aqueous H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> solution with 30 mol/m<sup>3</sup> lactate. (B and C) Bright-field STEM image of biogenic nanoparticles at different magnifications. (D) X-ray map of platinum afforded by EDX analysis.



**Figure 4.3** (A) STEM image of a thin section of a *S. algae* cell after exposure to a 1 mol/m<sup>3</sup> aqueous H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> solution with 30 mol/m<sup>3</sup> lactate. (B) Spot-profile EDX spectrum recorded from position 1 (indicated by an arrow). (C) Spot profile EDX spectrum recorded from region 2 (indicated by black square) .



**Figure 4.4** XANES spectra of platinum in *S. algae* cells after exposure to 1 mol/m<sup>3</sup> aqueous H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> solution with 30 mol/m<sup>3</sup> lactate, metallic platinum foil, PtCl<sub>2</sub> powder, and an 1 mol/m<sup>3</sup> aqueous H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> solution.

#### 4.4 緒言

還元細菌 *S. algae* の静止細胞を用いた Pt(IV)イオンのバイオ還元・析出について以下の知見を得た。

- (1) *S. algae* は、電子供与体として乳酸塩を用い、Pt(IV)イオンを還元できることが明らかになった。具体的には 25°C, pH 7.0 において、塩化白金酸水溶液に *S. algae* 細胞と電子供与体として乳酸塩を添加した場合、液相 Pt(IV)イオン濃度は 1.1 mol/m<sup>3</sup> から 60 min 後には 0.1 mol/m<sup>3</sup> となり、90 % の Pt(IV)イオンを *S. algae* 細胞に回収できた。
- (2) 細胞薄切片の STEM による観察により、*S. algae* を用いた Pt(IV)イオンのバイオ還元では、一次粒子径約 5 nm の Pt ナノ粒子が *S. algae* 細胞のペリプラズム空間に析出することが明らかとなった。Pt ナノ粒子が水溶液中のイオンがアクセスしやすい細胞表面近傍に析出することは、Pt ナノ粒子を担持した細胞を触媒等に利用する際に有利であると考えられる。
- (3) バイオミネラリゼーション実験後の *S. algae* 細胞の XANES スペクトルおよび EDX 分析結果から *S. algae* 細胞への Pt(IV)イオンおよび Pt(II)イオンの蓄積は認められず、*S. algae* は Pt(IV)イオンを短時間で Pt(0)に還元・析出することが確認された。律速過程を含めた反応機構の詳細な検討には実験中の XANES スペクトルの経時的な測定等、更なるデータの蓄積が必要である。

## References

- [1] O. Masala, R. Seshadri, *Annu. Rev. Mater. Res.* **34** (2004) 41-81.
- [2] Y. Tan, X. Dai, Y. Li, D. Zhua, *J. Mater. Chem.* **13** (2003) 1069-1075.
- [3] J. A. Dean, (Ed.) Lange's Handbook of Chemistry, 12th ed. McGraw-Hill Inc., New York, (1979) 6-2 - 6-19.
- [4] P. Yong, N. A. Rowson, J. P. G. Farr, I. R. Harris, L. E. Macaskie, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77** (2002) 593-601.
- [5] P. Yong, N. A. Rowson, J. P. G. Farr, I. R. Harris, L. E. Macaskie, *Biotechnol. Bioeng.* **80** (2002) 369-379.
- [6] P. Yong, M. Paterson-Beedle, I. P. Mikheenko, L. E. Macaskie, *Biotechnol. Lett.* **29** (2007) 539-544.
- [7] G. Attard, M. Casadesús, L. E. Macaskie, K. Deplanche, *Langmuir* **28** (2012) 5267-5274.

## 第5章 還元細菌 *Shewanella algae* および *Shewanella oneidensis* による Au(III)イオンの還元・析出

### 5.1 緒言

電子部品と触媒産業の過大な需要のため、1次資源からのみならず2次資源からの金 (Au) の回収も重要である。メッキ廃液や工業廃液、Au 吸着材からの溶離液および使用済み電気電子部品 (WEEE) の酸浸出液等の様々な溶液からの Au の分離・精製には、沈殿・析出、加水分解、溶媒抽出および還元析出等の化学的な湿式回収法が用いられてきた。一般的に、Au の主要な用途である廃電子部品を浸出処理した場合の浸出液の Au イオン濃度は概ね 1 - 2000 ppm とされている [1, 2]。バイオソープションやバイオミネラルリゼーションを利用した金属イオンの回収法 (バイオ回収法) は、常温・常圧下での微生物反応を利用して目的金属を選択的に分離濃縮・回収するもので、このような希薄溶液に対して効果的である。

Au ナノ粒子は脱 CO 触媒 [3] やセンサー素材 [4] として応用する研究も進んでおり、将来的な需要が見込まれる。しかし、化学的な還元による Au ナノ粒子の合成においては Au イオンの還元に加熱を要する場合がある [5]。Au イオンのバイオミネラルリゼーションで溶存 Au イオンの回収から Au ナノ粒子の合成までを常温下・ワンステップで行い、Au に付加価値を与えて回収することは経済的に有意なオプションであり、さらに低環境負荷型のナノ粒子触媒合成プロセスとしての可能性を秘めている。

Fe(III)イオン還元細菌の一種である *Shewanella* 属細菌は、水素や乳酸を電子供与体として用いて 25 - 30°C で Au(III)イオンを還元できることが知られている [6, 7]。Kashefi *et al.* は、0.7 - 2.0 mol/m<sup>3</sup> の H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 水溶液から 30 分以内にほぼ全量を回収できることを報告している [6]。

本章では Fe(III)イオン還元細菌である海洋性細菌 *Shewanella algae* および淡水性細菌 *Shewanella oneidensis* の静止細胞を用いた 25 - 33°C における Au(III)イオンのバイオミネラルリゼーション (還元・析出) について述べる。具体的には、Au(III)イオンの還元挙動ならびに生成粒子の性状に及ぼす各種操作因子 (溶液 pH、初期 Au(III)イオン濃度、菌体濃度、電子供与体の種類とその濃度、反応時間) の影響について系統的に検討した。*S. algae* の還元

能力は化学的還元剤であるクエン酸と比較した。バイオ還元で析出したナノ粒子に対しては、透過電子顕微鏡 (TEM) および走査型透過電子顕微鏡 (STEM) で観察するとともに、制限視野電子線回折 (SAED) およびナノビーム電子線回折 (n-ED) によりナノ粒子の結晶構造を、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX) によりナノ粒子の元素を同定した。ナノ粒子を含む細胞全体に対しては、X 線回折分析 (XRD) で結晶構造を同定し、X 線近吸収端構造 (XANES) より細胞内の Au の酸化状態を分析した。

## 5.2 実験方法

### 5.2.1 微生物の培養

本論文で用いた微生物は American Type Culture Collection (ATCC) から分譲された *S. algae* ATCC 51181 株、*S. oneidensis* ATCC700550 株である。*S. algae* の培養には、電子供与体として乳酸ナトリウムを、電子受容体としてクエン酸鉄(III)を含む ATCC medium 2 液体培地を用い 4.2.1 項と同様に嫌氣的に培養した。*S. oneidensis* は、TSB 液体培地 (Trypticase Soy Broth, pH 7.2) を用いて、33°C で好氣的に培養した。

### 5.2.2 Au(III)イオンのバイオ還元実験

実験操作は O<sub>2</sub> 濃度 2.5% 以下の嫌氣的雰囲気中に保たれたグローブボックス内で行った。静止細胞懸濁液は、対数増殖期末期の微生物細胞を、遠心分離により集菌し、リン酸 (Na-K) 緩衝液 (50 mol/m<sup>3</sup>, pH 7.0) もしくは炭酸ナトリウム緩衝液 (35 mol/m<sup>3</sup>, pH 7.0) による洗浄を 2 回行い、3.2.2 項と同様に調整した。緩衝液、塩化金酸 (HAuCl<sub>4</sub>) 水溶液は、1 kmol/m<sup>3</sup> の塩酸または 10 kmol/m<sup>3</sup> の水酸化ナトリウム水溶液により適宜 pH を調整し、使用前に N<sub>2</sub> ガスを流通させて嫌氣状態とした。実験は、静止細胞懸濁液に所定濃度となるように電子供与体 (乳酸ナトリウムまたはギ酸ナトリウム) および塩化金酸水溶液を添加・混合して開始した。電子供与体に H<sub>2</sub> を用いる場合は、H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80:20, v/v) の混合ガスを反応容器に流通させることで供給した。電子供与体に乳酸塩・ギ酸塩を用いる場合は、N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80:20, v/v) の混合ガスを反応容器に流通させ嫌氣状態とした。実験の主な初期条件は、溶液体積 15 cm<sup>3</sup>、液相 Au(III)イオン濃度 0.1 - 1.0 mol/m<sup>3</sup>、電子供与体濃度 0 - 200 mol/m<sup>3</sup>、pH 1.0 - 7.0 である。細胞濃度は、*S. algae* (0.3 - 4.0) × 10<sup>15</sup> cells/m<sup>3</sup>、*S. oneidensis*

(5.2 - 6.1)  $\times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> である。実験開始後、サンプルの採取を一定の時間間隔で行い、採取した懸濁液は直ちにフィルター（孔径 0.2  $\mu\text{m}$ 、セルロース混合エステル製）でろ過して、液相の Au 濃度を測定した。

### 5.2.3 分析方法

液相 Au イオン濃度の測定には、誘導結合プラズマ発光分析装置 (ICP-AES) (ICPE-9000、島津製作所)、原子吸光光度計 (AA-6650、島津製作所) を使用した。

実験に使用した細胞は、透過型電子顕微鏡 (TEM, JEOL model JEM-2000FX) を用いて観察し、制限視野電子回折 (SAED) により生成粒子の結晶構造を同定した。さらに一部の試料については、走査型透過電子顕微鏡 (STEM) (JEOL model JEM2100F, Hitachi HF-2210) により観察し、付属するエネルギー分散型 X 線分析装置 (EDX) (JED-2300T, Noran Voyager EDX) およびナノビーム電子回折 (n-ED) により、生成した粒子を分析した。さらに一部の試料については、細胞薄切片試料を作成し、Au ナノ粒子の生成場を確認した。TEM 観察用試料、細胞薄切片試料は 3.2.3 項と同様に作成した。細胞表面で生成した粒子の平均粒子径、比表面積は、TEM 像において 300 個以上の粒子の直径を測定して求めた。

生成した粒子の結晶性は X 線回折法により分析した。試料は、バイオ還元実験後に採取した *S. oneidensis* 細胞を 50°C で 12 h 乾燥させ、メノウ乳鉢を用いて粉末状に粉碎して調製した。

*S. algae* によるバイオ還元実験 (pH 7.0) において、細胞内の Au の酸化状態を明らかにするため、X 線近吸収端構造 (XANES) スペクトルを解析した。採取した懸濁液を直ちにフィルター（孔径 0.2  $\mu\text{m}$ 、セルロース混合エステル製）でろ過し、N<sub>2</sub> 雰囲気下において回収した細胞を炭酸ナトリウム緩衝液で 2 回洗浄・再懸濁した。洗浄した細胞の懸濁液 2 ml をポリエチレンバッグに封入し、XANES スペクトルを測定した。測定は、日本高輝度光科学研究センター (JASRI) の BL01B1 ビームラインにおいて、Au L<sub>III</sub> 吸収端 (11.918 keV) 付近の X 線吸収スペクトルを蛍光法にて 4.2.3 項と同様に測定した。標準試料は Au(0) 薄膜と 1 mol/m<sup>3</sup> の HAuCl<sub>4</sub> 水溶液を用いた。

## 5.3 実験結果および考察

### 5.3.1 *S. algae* による Au(III)イオンの還元・析出

Figure 5.1 に *S. algae* によるバイオ還元実験 (25°C、pH 7) における Au(III)イオンの経時変化を示す。Au(III)イオン濃度 1 mol/m<sup>3</sup> の塩化金酸水溶液に *S. algae* 細胞と H<sub>2</sub> ガスを添加した場合、液相 Au(III)イオン濃度は急激に減少し、30 min 後にはほぼ 0 となった。同時に、実験中の懸濁液の色は、薄黄色から鮮やかな紫に変化した。鮮やかな紫は Au ナノ粒子の表面プラズモン吸収に起因する色調と考えられ、*S. algae* による Au ナノ粒子の生成を視覚的に示唆している。したがって、観測された液相 Au(III)イオン濃度の減少は、Au(III)イオンの還元により不溶性の Au ナノ粒子が析出したことによると考えられる。一方、H<sub>2</sub> ガスを添加せず、電子供与体として乳酸を添加した場合 Au ナノ粒子の表面プラズモン吸収は認められず、*S. algae* は Au(III)イオンを還元できなかったと考えられる。また、*S. algae* を添加しない H<sub>2</sub> ガスによる無菌化学対照実験においても Au(III)イオンの還元は認められなかった。このことから、*S. algae* による Au(III)イオンの還元には電子供与体として H<sub>2</sub> が必要であるといえる。これは、*S. algae* が持っているヒドロゲナーゼ等の水素酸化酵素を含む電子伝達系が、Au(III)イオンの H<sub>2</sub> による還元反応を触媒しているためと考えられ、既往の研究とも一致する[6]。ヒドロゲナーゼによる水素酸化を用いた他の元素のバイオ還元に関しては、*Micrococcus lactilyticus* による U(VI)の還元[8]と *Clostridium pasteurianum* による Se(VI)の還元[9]について、同酵素の関与が報告されており、硫酸還元菌においても H<sub>2</sub> の存在下で行われる Tc(VII)イオン、Cr(VI)イオンの還元ヒドロゲナーゼによる水素酸化が関与することも報告されている[10, 11]。さらに、光合成細菌から抽出されたヒドロゲナーゼによる水素酸化により、Ni(II)イオンを Ni(0)に還元できることが示されている[12]。ヒドロゲナーゼが触媒する水素酸化反応は反応 (5.1) のように考えられる。



生じた電子は *S. algae* 細胞の電子伝達系を通して、最終的に Au(III)イオンに与えられ、これを Au(0)に還元する。



したがって、*S. algae* による Au(III)イオンの還元反応は以下の反応式で表せる。

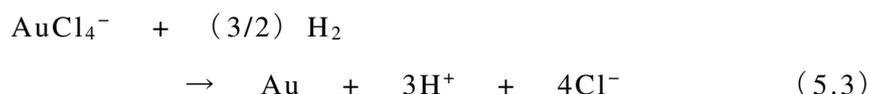
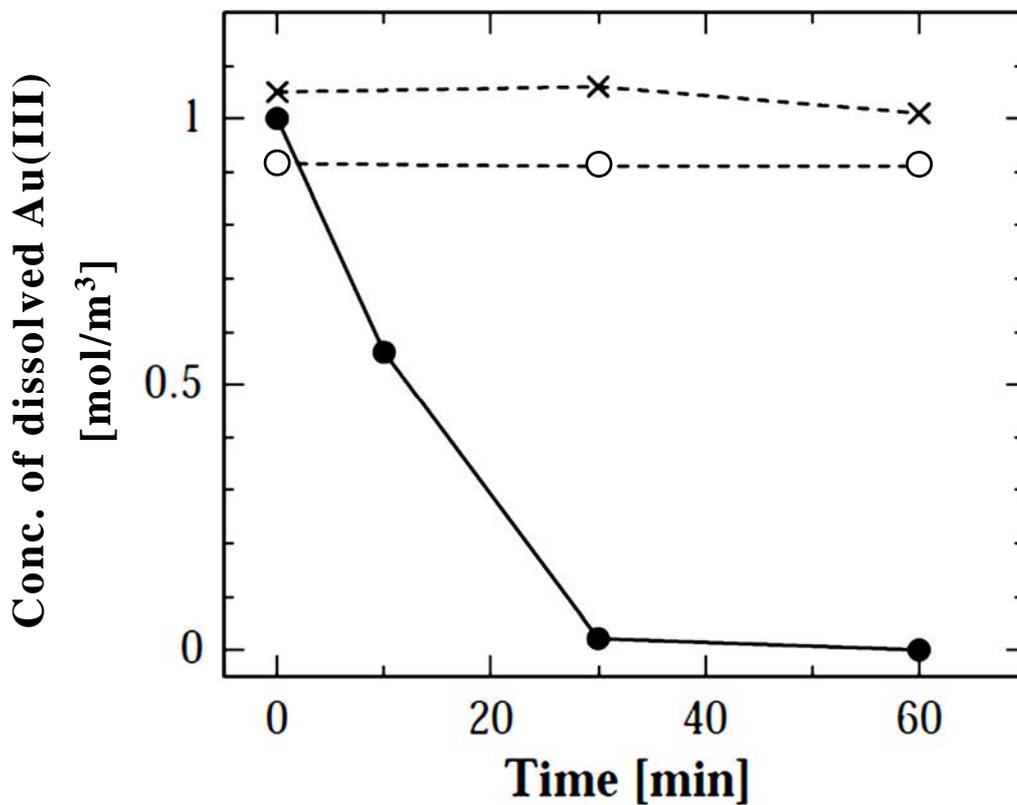


Figure 5.2 に *S. algae* による Au(III)イオンのバイオ還元・析出に及ぼす初期 Au(III)イオン濃度および菌体濃度の影響を示す。菌体濃度が  $0.4 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> から  $3.2 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> に増加するのに伴い、Au(III)イオンの還元が促進された。Figure 5.2(A)が示すように、菌体濃度  $0.4 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> において、 $0.1 \text{ mol/m}^3$  の Au(III)イオンが 30 分でほぼ完全に還元された。Figure 5.2(B)より  $0.45 \text{ mol/m}^3$  の Au(III)イオンの完全な還元には、より高い菌体濃度 ( $1.4 - 1.6$ )  $\times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> が必要であることが解る。さらに、 $1 \text{ mol/m}^3$  の Au(III)イオンの完全な還元には、 $3.2 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> の菌体濃度が必要である (Figure 5.2(C))。菌体濃度の違いに基づくバイオ還元実験のデータから *S. algae* の細胞当たりの還元能力を検討することができる。*S. algae* は Au(III)イオンを電子受容体として増殖できないため、細胞当たりの還元能力は、実験において 60 min の間に還元した Au(III)イオン量を菌体量で除したものに相当する。したがって、Figure 5.2(B)の菌体濃度  $(0.4, 0.86) \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup>、および Figure 5.2(C)の菌体濃度  $1.6 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> の実験における液相 Au(III)イオンの減少量から、*S. algae* の細胞当たりの還元能力は、 $(2.1 - 3.3) \times 10^{-16}$  mol-gold/cell と求められる。

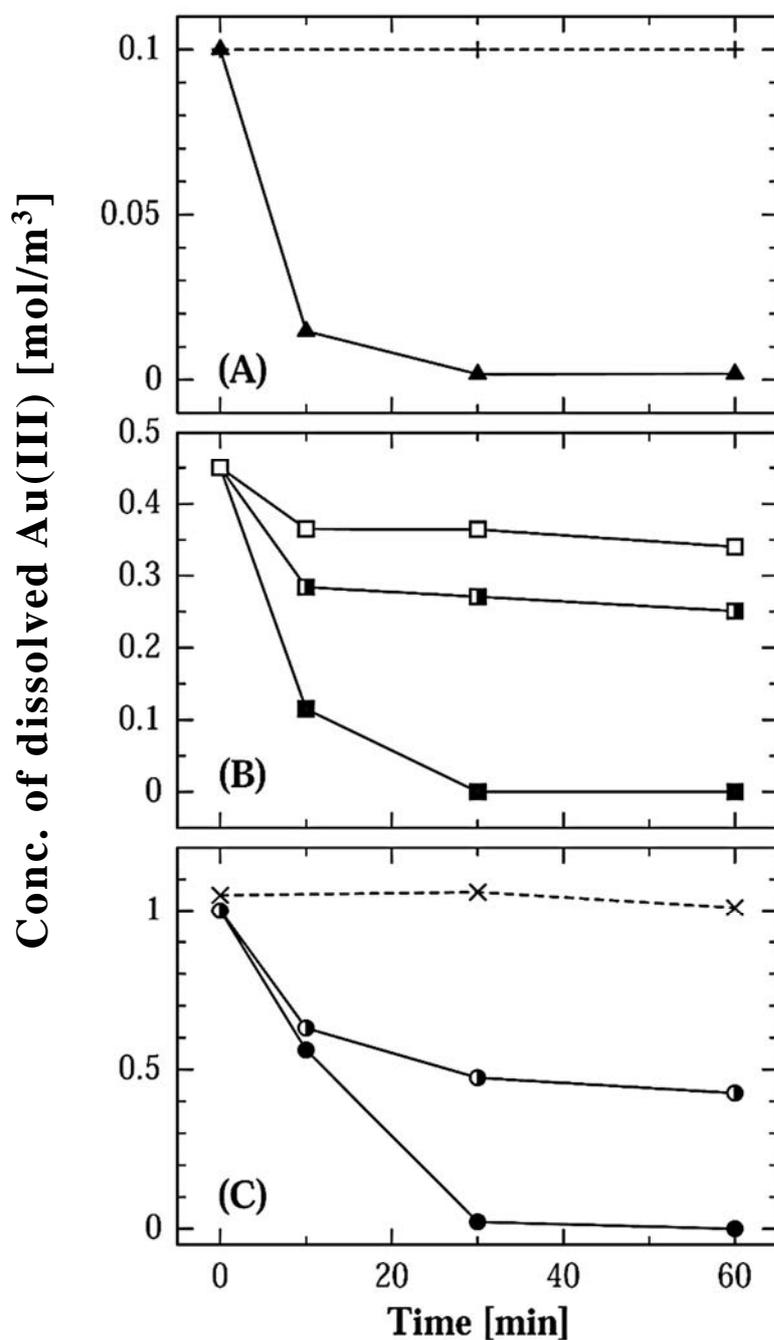
Figure 5.3 に Au(III)イオンのクエン酸による化学的還元と *S. algae* によるバイオ還元を比較した。 $20 \text{ mol/m}^3$  のクエン酸水溶液中において、25°C では Au(III)イオンの還元は認められず、 $1.35 \text{ mol/m}^3$  の Au(III)イオンの完全な還元には、水溶液を 50°C に 60 min 保つことが必要であった。一方、*S. algae* は菌体濃度  $3.2 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> において、 $1 \text{ mol/m}^3$  の Au(III)イオンを 25°C, 30 min で還元できた。したがって、25°C における  $3.2 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> の *S. algae* は、50°C における  $20 \text{ mol/m}^3$  のクエン酸と同等の還元能力を持っているといえる。これは、既存の化学的方法と比較して環境への負荷がより低いというバイオ還

元・析出の特徴を示している。

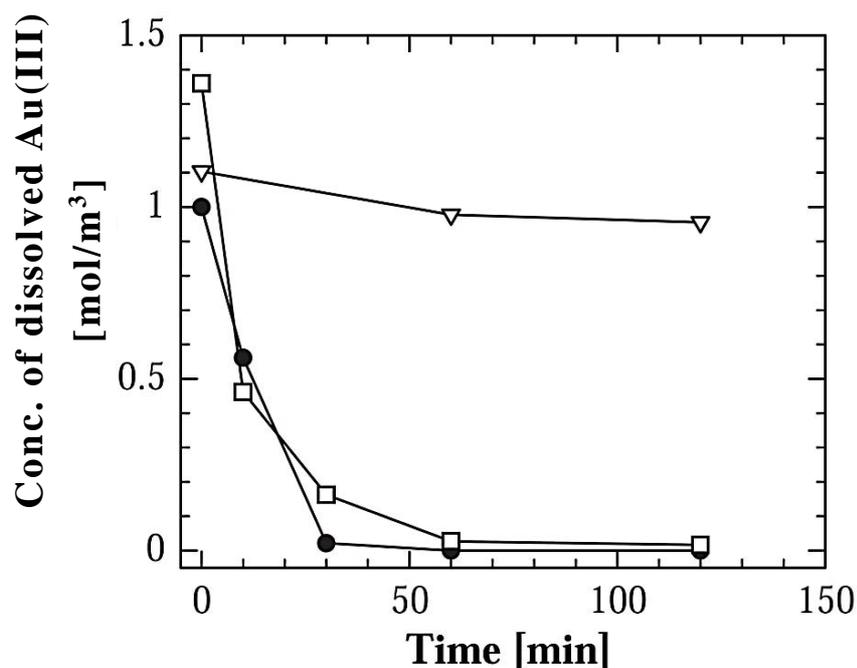
Figure 5.4 に pH 2.0 - 7.0 におけるバイオ還元実験での Au(III)イオンの経時変化を示す。酸性水溶液中においても電子供与体である水素の存在下では 10 min で 90 %の液相 Au(III)イオン濃度の低下が認められた。これに対し、H<sub>2</sub>ガスによる無菌化学対照実験においては Au(III)イオンの還元は認められなかった。したがって、*S. algae* は pH 2.0 の酸性水溶液中においても Au(III)イオンの還元能力を保っているといえる。



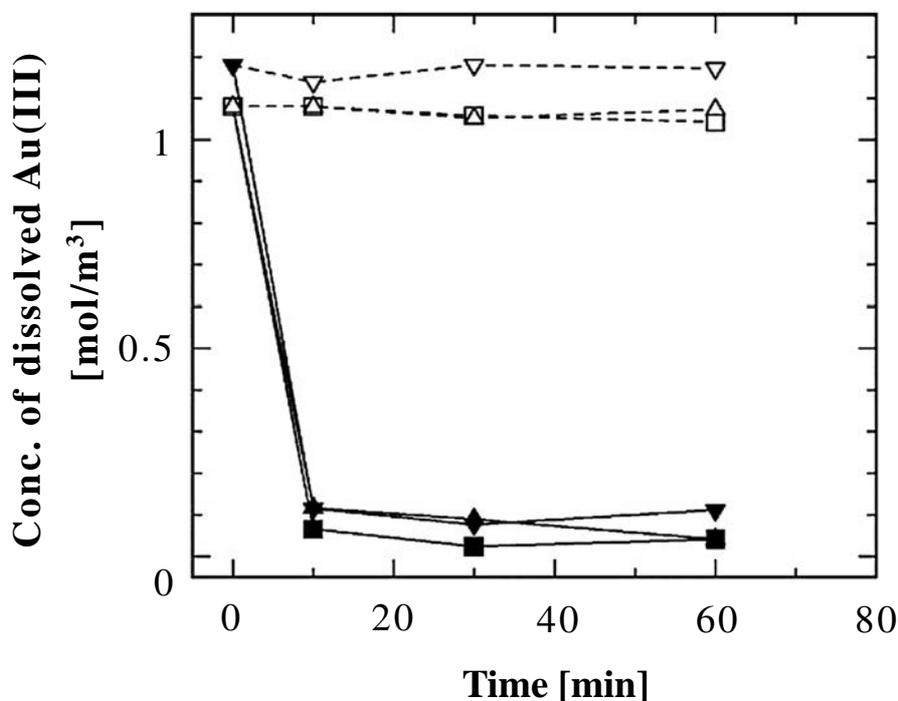
**Figure 5.1** Time course of AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> ions' reduction by *S. algae* cells at 25°C and pH 7. (●) 4×10<sup>15</sup> cells/m<sup>3</sup> in the presence of H<sub>2</sub> gas; (○) 4×10<sup>15</sup> cells/m<sup>3</sup> in the presence of lactate; (×) sterile control containing no *S. algae* cells in the presence of H<sub>2</sub> gas.



**Figure 5.2** Time course of  $\text{AuCl}_4^-$  ions reduction by *S. algae* cells with  $\text{H}_2$  gas at  $25^\circ\text{C}$  and pH 7 under different initial conditions. (+)  $0.1 \text{ mol/m}^3$   $\text{HAuCl}_4$  solution and sterile control containing no *S. algae* cells; ( $\blacktriangle$ )  $0.1 \text{ mol/m}^3$   $\text{HAuCl}_4$  solution and  $0.4 \times 10^{15}$  cells/ $\text{m}^3$ ; ( $\square$ )  $0.45 \text{ mol/m}^3$   $\text{HAuCl}_4$  solution and  $0.4 \times 10^{15}$  cells/ $\text{m}^3$ ; ( $\blacksquare$ )  $0.45 \text{ mol/m}^3$   $\text{HAuCl}_4$  solution and  $0.86 \times 10^{15}$  cells/ $\text{m}^3$ ; ( $\blacksquare$ )  $0.45 \text{ mol/m}^3$   $\text{HAuCl}_4$  solution and  $1.4 \times 10^{15}$  cells/ $\text{m}^3$ ; ( $\times$ )  $1.05 \text{ mol/m}^3$   $\text{HAuCl}_4$  solution and sterile control containing no *S. algae* cells; ( $\odot$ )  $1.05 \text{ mol/m}^3$   $\text{HAuCl}_4$  solution and  $1.6 \times 10^{15}$  cells/ $\text{m}^3$ ; ( $\bullet$ )  $1.0 \text{ mol/m}^3$   $\text{HAuCl}_4$  solution and  $3.2 \times 10^{15}$  cells/ $\text{m}^3$ .



**Figure 5.3** Comparison of aqueous  $\text{AuCl}_4^-$  ions reduction between *S. algae* cells and chemical reductant. (●) microbial reduction at  $3.2 \times 10^{15}$  cells/ $\text{m}^3$  and  $25^\circ\text{C}$ ; (▽) chemical reduction with  $20 \text{ mol/m}^3$  citric acid at  $25^\circ\text{C}$ ; (□) chemical reduction with  $20 \text{ mol/m}^3$  citric acid at  $50^\circ\text{C}$ .



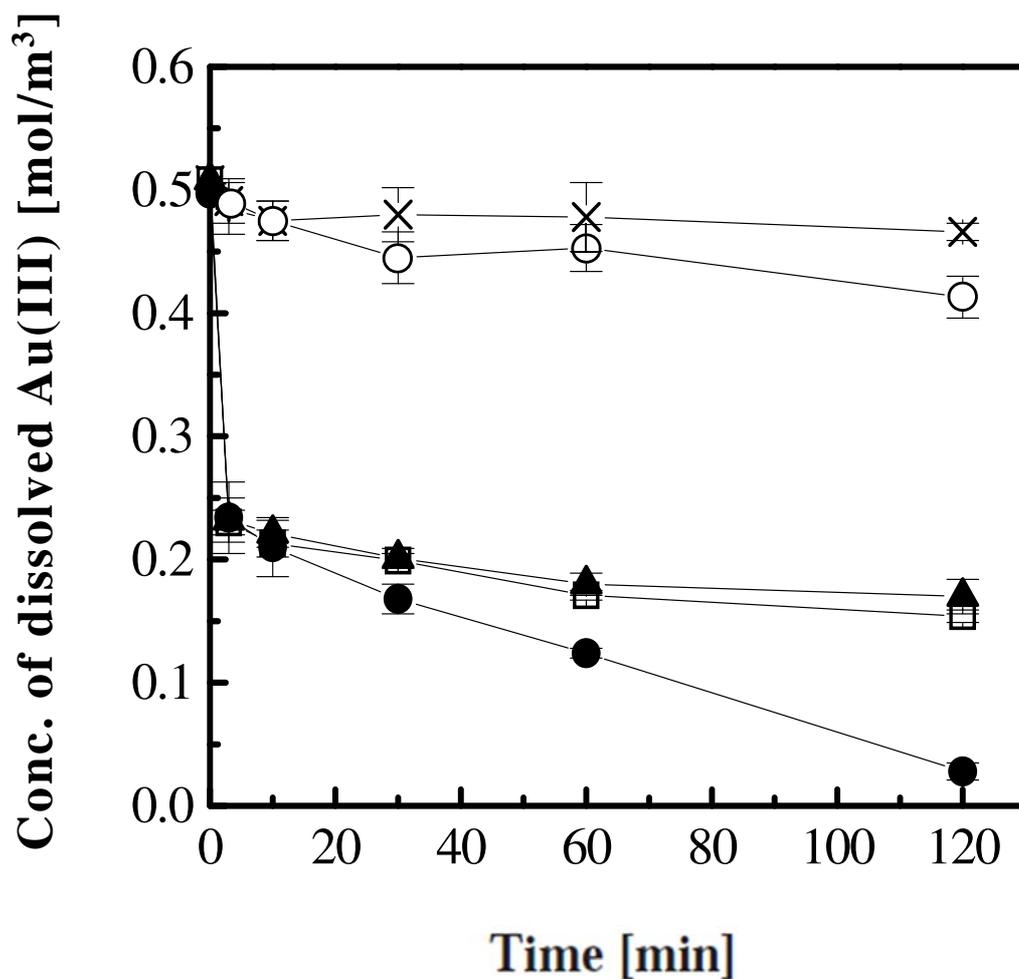
**Figure 5.4** Time course of soluble  $\text{Au(III)}$  reduction by *S. algae* cells at  $25^\circ\text{C}$  under different pH conditions: (■) pH 7.0 at  $3 \times 10^{15}$  cells/ $\text{m}^3$ ; (▲) pH 2.8 at  $3 \times 10^{15}$  cells/ $\text{m}^3$ ; (▼) pH 2.0 at  $3 \times 10^{15}$  cells/ $\text{m}^3$ ; (□, △, ▽) sterile control containing no *S. algae* cells in the presence of  $\text{H}_2$  gas.

### 5.3.2 *S. oneidensis* による Au(III)イオンの還元・析出

*S. oneidensis* による Au(III)イオンのバイオ還元実験における Au(III)イオンの経時変化を Figure 5.5 に示す。実験は同条件で 3 回実施した。温度 25°C, pH 7.0 において、塩化金酸水溶液に電子供与体（ギ酸塩）および *S. oneidensis* が共存する場合には、液相 Au(III)イオン濃度が 120 min で初期濃度（0.49 mol/m<sup>3</sup>）から 94 %減少した。この実験中、懸濁液の色は塩化金酸水溶液の示す薄黄色から 120 分後に薄いピンク色になり、5 時間後には薄紫色に変化した。前述のように、これは Au ナノ粒子の生成を示唆している。したがって、観測された液相 Au(III)イオン濃度の減少は、Au(III)イオンの還元により不溶性の Au ナノ粒子が生成したことによると考えられる。これに対して、*S. oneidensis* のみを添加した場合および電子供与体として H<sub>2</sub> ガスを *S. oneidensis* と共存させた場合には、液相 Au(III)イオン濃度の減少率は 120 min で 70%以下に留まった。これらの場合には出発溶液の色は変化しなかったことから、Au(III)イオンは液相から細菌細胞に吸着されただけで、Au(III)イオンの還元は生じていないと考えられる。したがって *S. oneidensis* は、ギ酸塩を電子供与体として用いることで Au(III)イオンを還元できることが明らかになった。電子供与体にギ酸塩を利用できることから、この還元反応について *S. oneidensis* 細胞が持つギ酸デヒドロゲナーゼの関与が考えられる（3.3.1 項、反応 (3.1)）。これにしたがって電子を Au(III)イオンに与え、これを Au(0) に還元すると、*S. oneidensis* による Au(III)イオンの還元反応は以下で表せる。



このように Au(III)イオンの還元に際して *S. oneidensis* が電子供与体として H<sub>2</sub> を利用できずギ酸塩を必要とすることから、*S. oneidensis* による Au(III)イオンの還元反応は *S. algae* とは異なり、ギ酸デヒドロゲナーゼを含む電子伝達系により触媒されている可能性が考えられる。



**Figure 5.5** Time course of soluble Au(III) reduction by *S. oneidensis* cells at pH 7.0 and 25°C : (●)  $6.1 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> *S. oneidensis* in the presence of 200 mol/m<sup>3</sup> formate as the electron donor; (▲)  $6.1 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> *S. oneidensis* in the presence of H<sub>2</sub> gas; (□)  $6.1 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup> *S. oneidensis* in the absence of formate and H<sub>2</sub> gas; (○, ×) sterile control containing no *S. oneidensis* cells in the presence of formate and H<sub>2</sub> gas, respectively.

### 5.3.3 Au ナノ粒子のキャラクタリゼーション

*S. algae* 細胞の TEM 像を Figure 5.6(A) に示す。*S. algae* 細胞は概ね長さ 2  $\mu\text{m}$ 、幅 0.5  $\mu\text{m}$  の短棒状である。pH 7.0 におけるバイオ還元実験後の *S. algae* 細胞には、粒子径 10–20 nm の多数のナノ粒子が認められる (Figure 5.6(B,C))。SAED による回折リング (Figure 5.6(D)) は Au(0) 結晶と矛盾しないことから、観察されたナノ粒子は結晶性を持つ Au ナノ粒子と同定できる。Figure 5.7(A,B) に pH 7.0 におけるバイオ還元実験の 90 min 後の *S. algae* 細胞薄切片の STEM 像を示す。低倍率の像 (Figure 5.7(A)) では、全ての *S. algae* 細胞が細胞に Au ナノ粒子を保持している。高倍率の像 (Figure 5.7(B)) では、内膜と外膜の間にあるペリプラズム空間にナノ粒子が認められる。ペリプラズム空間における粒子の暗視野像 (Figure 5.7(E)) が Au の EDX マッピング像 (Figure 5.7(F)) と一致していることから、ペリプラズム空間に Au ナノ粒子が生成していることが確認された。これは、Au(III) イオンの還元に関与する酵素がペリプラズム空間に存在することを示唆している。一方、Kashefi *et al.* は、細胞表面にナノ粒子が存在する *S. algae* 細胞薄切片の TEM 像を示した上で、*S. algae* が細胞外に Au ナノ粒子を析出させたとしている [6]。しかし、この TEM 像は倍率が低く不鮮明であり、細胞膜間の詳細な観察は難しい。本論文で示した高倍率の STEM 像 (Figure 5.7(B)) には細胞の膜構造が明確に表れており、より正確な情報が得られる。このように、*S. algae* 静止細胞を用いた pH 7.0 における Au(III) イオンのバイオ還元・析出では、Au ナノ粒子は *S. algae* 細胞のペリプラズム空間に生成することが明らかとなった。Figure 5.7(C) にペリプラズム空間に存在するナノ粒子の EDX スペクトルを示す。強い Au と C の特性 X 線および比較的弱い O の特性 X 線が計測された。C と O の特性 X 線は細胞膜周辺に存在するタンパク質等の微生物由来物質や薄切片試料を載せたエラスチックカーボン支持膜に由来する。Figure 5.7(D) は Figure 5.7(B) における領域 1 に対する EDX スペクトルである。ここでは Au の特性 X 線は認められず、染色時に使用された元素の弱い特性 X 線が認められた。その他の番号の測定箇所でも、Au の特性 X 線は認められず (データ省略)。*S. algae* 細胞への Au(III) イオンの収着量は EDX 分析の検出限界以下であるといえる。したがって、pH 7.0 において *S. algae* 細胞は Au(III) イオンを極めて短時間で還元すると考えられる。

*S. algae* によるバイオ還元実験において、細胞内の Au 酸化状態を明らかにするため、X 線近吸収端構造 (XANES) スペクトルを解析した。Figure 5.8 にバイオ還元実験 (pH 7.0) における 10 - 120 min の *S. algae* 細胞の XANES スペクトルと、標準試料として Au(0)薄膜と 1 mol/m<sup>3</sup> の H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 水溶液の XANES スペクトルを併せて示す。*S. algae* 細胞の XANES スペクトルには AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>イオンに特徴的な 11920 keV 付近の吸収ピークが殆ど認められず、Au(0)薄膜のスペクトルに類似している。これは、*S. algae* 細胞が AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>イオンを Au(0)に還元したことを示している。実験開始から僅か 10 min 後の *S. algae* 細胞においても Au(0)薄膜に類似した XANES スペクトルが測定されたことは、*S. algae* 細胞への Au(III)イオンの収着量が痕跡量であるとした EDX 分析結果と合致しており、このことから pH 7.0 において *S. algae* 細胞は Au(III)イオンを 10 min 以内の極めて短時間で還元すると考えられる。

Figure 5.9 に pH 2.8 におけるバイオ還元実験後の *S. algae* 細胞の STEM 像を示す。pH 7.0 におけるバイオ還元実験では、*S. algae* 細胞に多くのナノ粒子が認められたのに対し (Figure 5.6(B))、pH 2.8 における STEM 像では細胞外にも多くの粒子が認められる (Figure 5.9(A,B))。また、pH 7.0 における粒子径は概ね 10 - 20 nm の範囲に分布したのに対し、pH 2.8 においては粒子径 15 - 200 nm の広い分布幅となった。粒子の形体については、pH 2.8 におけるバイオ還元では三角形や六角形等の様々な形体の粒子が析出した。三角形や六角形の粒子は 100 - 200 nm の大きさで、他の形体の粒子より大型であった。高倍率の STEM 像 (Figure 5.9(C)) と EDX マッピング像 (Figure 5.9(D)) から、三角形の Au ナノ粒子およびその他の形の Au ナノ粒子が細胞上に析出していることが確認された。さらに、三角形 Au ナノ粒子のナノビーム電子回折パターン (Figure 5.9(B) 図中) は、三角形の Au ナノ粒子が (hkl) = (1 1 1) 面を向けた Au 単結晶であることを示している。三角形 Au ナノ粒子の生物的合成では、レモングラス (*Cymbopogon flexuosus*) からの抽出物を用いた研究例 [13] とアロエベラからの抽出物を用いた研究例がある [14]。これらの先行研究は、カルボニル基を持つアルデヒド化合物やケトン化合物が三角形 Au ナノ粒子の生物的合成に関与していると指摘している。金属ナノ粒子の光学的・電子的性質は粒子径と粒子形体に大きく関係するため、微生物による三角形 Au ナノ粒子の生成は興味深い。塩化金酸水溶液の pH が pH 2.0 に低下

した場合、Figure 5.10(A)に示すように粒子径 20 - 350 nm の粒子が生成した。粒子径 20 nm の粒子は *S. algae* 細胞上に生成しており (Figure 5.10(B))、粒子の STEM 像は Au の EDX マッピング像 (Figure 5.10(D)) と一致した。一方、約 350 nm の大型粒子は細胞外に認められた (Figure 5.10(A))。細胞外における Au 粒子の生成は、pH 2.0 において Au(III)イオンの還元を触媒する水溶性の酵素が液中に浸出したことを示唆している。その結果、水溶液中で核生成と凝集が生じ、350 nm の大型粒子が生成したと考えられる。このように、塩化金酸水溶液の pH (pH 2.0 - 7.0) は、Au ナノ粒子の生成場と形体に大きく影響することが明らかとなった。

Figure 5.11 に pH 7.0 におけるバイオ還元実験後の *S. oneidensis* 細胞の TEM 像を示す。電子供与体としてギ酸塩を用いた場合、長さ 2  $\mu\text{m}$ 、幅 0.5  $\mu\text{m}$  の細胞全体にナノ粒子が分散した状態で析出していることが TEM 観察できた (Figure 5.11(A))。一方、電子供与体として水素ガスを共存させた場合は、粒子の生成は確認できなかった (Figure 5.11(B))。電子供与体としてギ酸塩を用いた場合の生成粒子の粒度分布を測定した結果、平均粒子径は 11.6 nm、幾何標準偏差が 1.42 nm であった (Figure 5.12)。また、細胞外にはナノ粒子が生成していないことから、*S. oneidensis* 細胞による Au(III)イオンの還元が細胞で起こっていると考えられる。Figure 5.13 に電子供与体としてギ酸塩を用いたバイオ還元実験後の *S. oneidensis* 細胞の STEM 像と EDX スペクトルを示す。ナノ粒子部分 (Figure 5.13(B)) のスペクトルでは強い Au の特性 X 線が観測され、Au ナノ粒子が生成していることが確認できた。なお、Cu のピークは TEM 観察用のグリットから検出されたものであり、C および O のピークは細胞のタンパク質等の生体物質から由来したと考えられる。さらに *S. oneidensis* 細胞で Au ナノ粒子が存在しない部分 (Figure 5.13(C)) のスペクトルにおいても弱い Au のピークが観察された。これは、液相中に存在する Au(III)イオンがバイオソープションによって細胞に吸着しているためであると考えられる。*S. oneidensis* 細胞による Au(III)イオンのバイオ還元・析出では、まず、液相中の Au(III)イオンが細胞に収着し、引き続き微生物の触媒作用によって Au(III)イオンが還元されナノ粒子が析出すると考えられ、この点においても、Au(III)イオンを極めて短時間に還元する *S. algae* 細胞による Au(III)イオンのバイオ還元・析出とは異なっている。細胞に取り込まれた Au

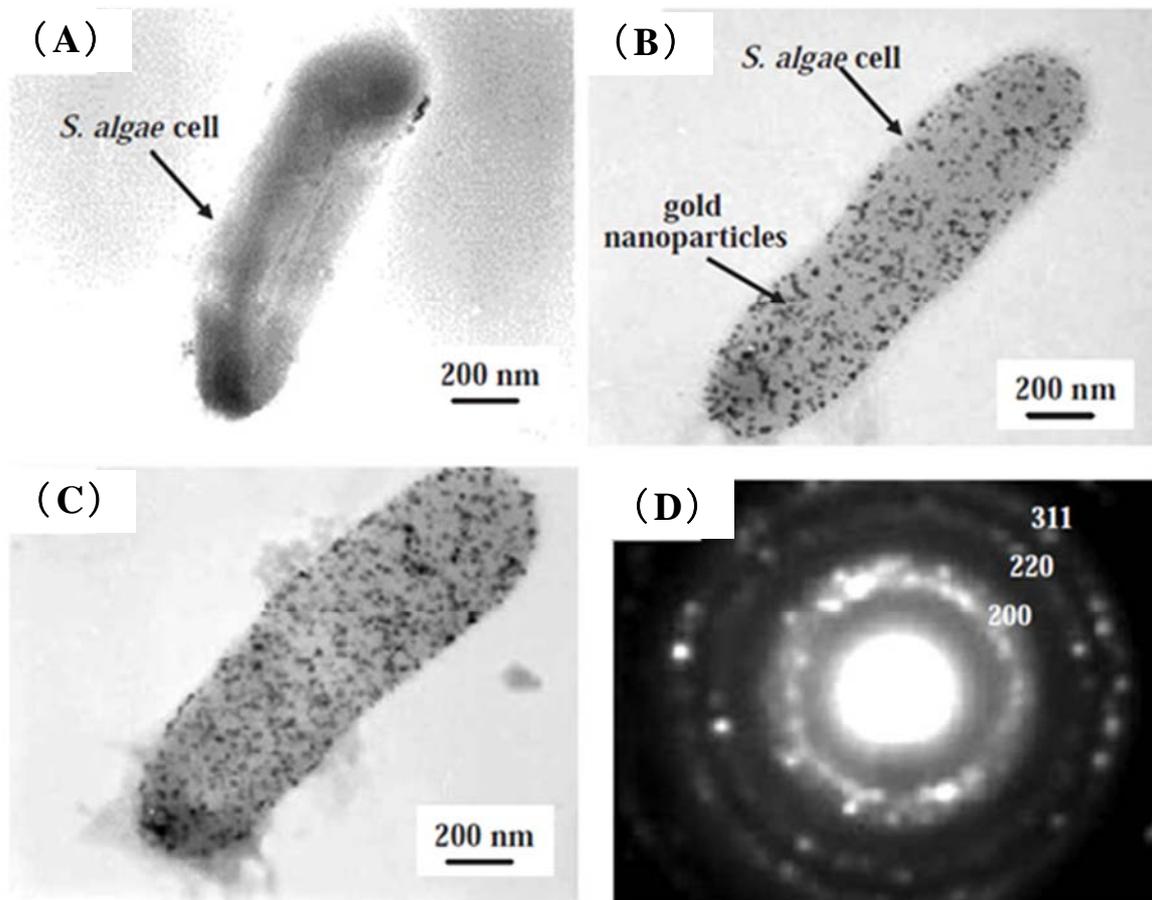
量は、液相 Au(III)イオン濃度の減少量 (Figure 5.5 に示す実験データの平均値) に基づいて、全細胞に均一に Au が存在すると仮定すると、単位細胞当たりの Au 量は  $7.69 \times 10^{-14}$  mmol/cell となる。さらに、Figure 5.12 に示す Au ナノ粒子の粒度分布より、細胞に取り込まれた Au のうち粒子化している Au の量を概算した。具体的には、Figure 5.11 の高倍率 TEM 像に示されたエリアの粒子数および粒子径を測定し、単位面積当たりの Au ナノ粒子の生成量を求めた。この値に細胞全体に粒子が同様に析出していると仮定した上で、Figure 5.11 の低倍率 TEM 像の細胞面積を乗じることで単位細胞当たりの Au 粒子の量を算出した。その結果、単位細胞当たりの粒子化している Au 量は  $8.48 \times 10^{-14}$  mmol/cell となった。すなわち、粒子が析出している *S. oneidensis* 細胞においては、取り込まれた Au のうち、約 91% が粒子化していると考えられる。*S. oneidensis* 細胞によって還元された粒子の結晶構造を確認するために XRD 分析を実施した。Figure 5.14 に示すように、生成粒子が Au(0) の結晶構造を有することが確認された。Scherrer 式に基づいて算出した結晶子径は 10.2 nm であり、上述の観察結果から得られた平均粒子径 (11.6 nm) とほぼ等しくなったことから、バイオ還元により析出した Au ナノ粒子が結晶性の高い粒子であることが確認された。

電子供与体であるギ酸塩の初期濃度を  $50 \text{ mol/m}^3$  から  $200 \text{ mol/m}^3$  に変化させた Au(III)イオンのバイオ還元実験における 120 min 後の *S. oneidensis* 細胞の TEM 像および液相 Au(III)イオン濃度の減少率を Figure 5.15 に示す。TEM 像よりギ酸塩の初期濃度が増加するのに伴い、生成した金ナノ粒子の個数が増加していることがわかる (Figure 5.15(A-C))。特に初期ギ酸塩濃度  $200 \text{ mol/m}^3$  の場合には、120 min の操作時間において、液相中の Au(III)イオン濃度がほぼ 100% 減少していることが確認された (Figure 5.15(D))。これらの結果と、無菌の化学対照実験では液相中の Au(III)イオンの減少が観察されなかったことから、初期ギ酸塩濃度を  $50 \text{ mol/m}^3$  から  $200 \text{ mol/m}^3$  の範囲において、電子供与体濃度の増加に伴って *S. oneidensis* 細胞によるバイオ還元が促進されることが明らかになった。

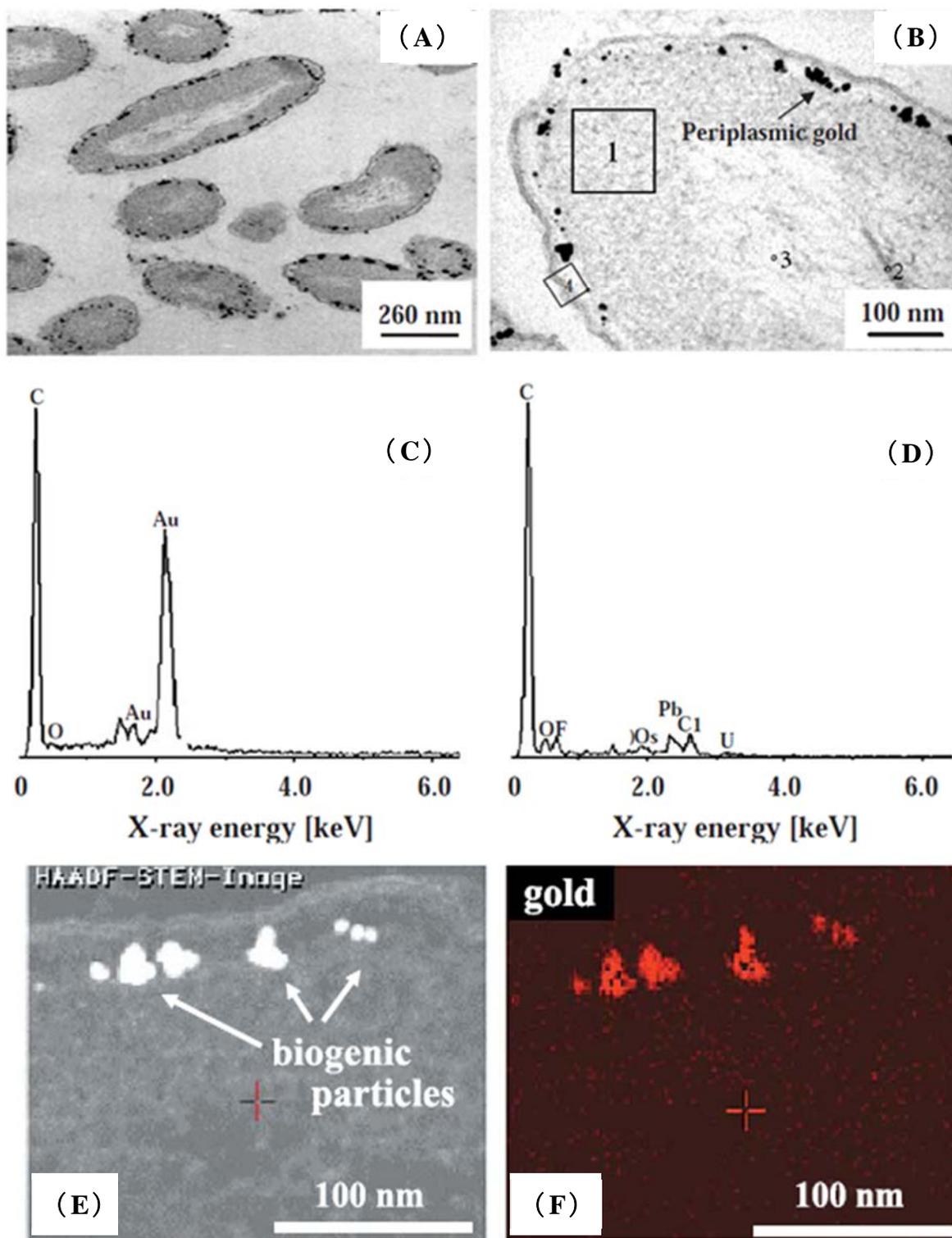
120 min 以上の操作時間で生成した Au ナノ粒子の TEM 像を Figure 5.16 に示す。実験条件は、初期 Au(III)イオン濃度  $1 \text{ mol/m}^3$ 、初期ギ酸塩濃度  $100 \text{ mol/m}^3$  である。原料溶液に *S. oneidensis* 細胞を添加して 2, 24, 48 h 経過した

場合でも、Au ナノ粒子は細胞全体に高密度かつ分散された状態で分布しており、粒子性状にほとんど影響がないことがわかる。これは、操作時間が 2 h 以降では *S. oneidensis* 細胞による還元反応によって液相 Au(III)イオンが 94% 減少したこと (Figure 5.5) に一致する。

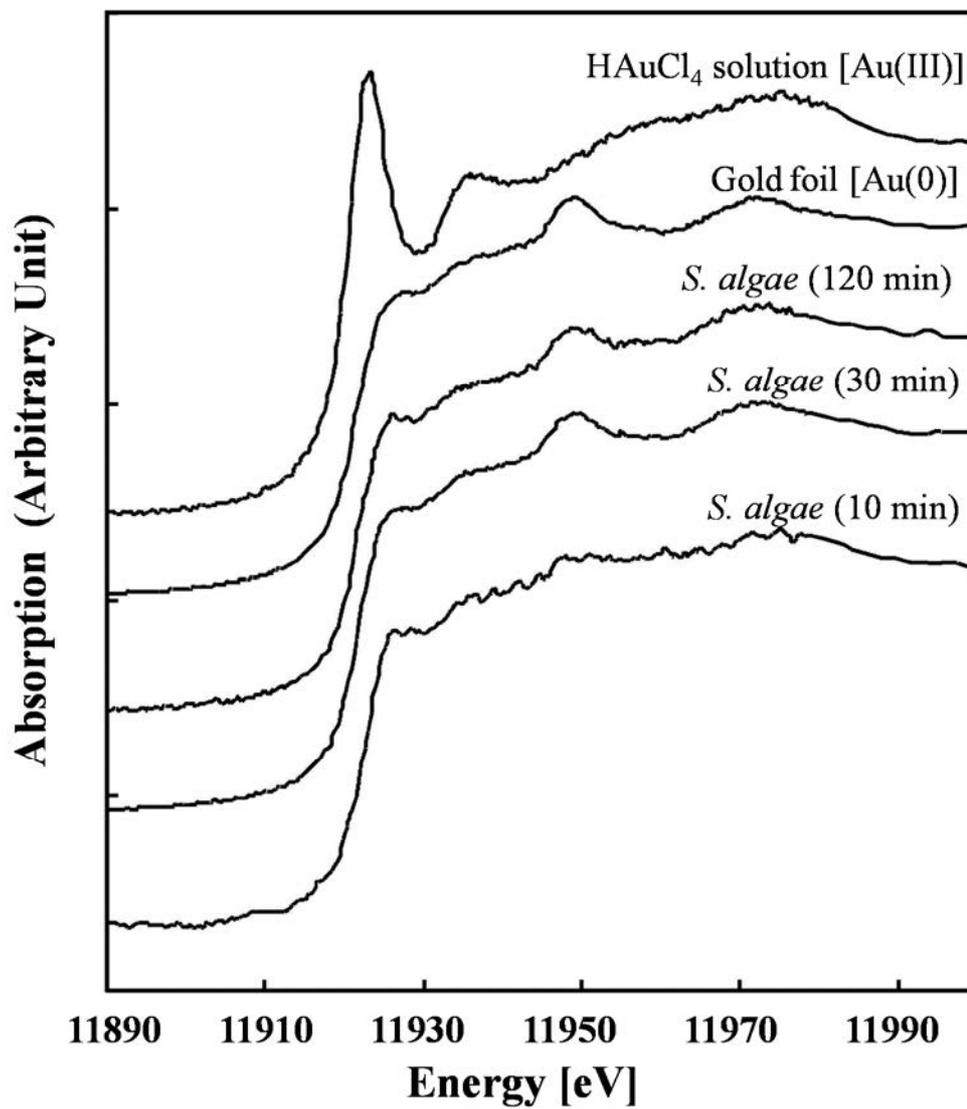
*S. oneidensis* による Au(III)イオンのバイオ還元実験で、操作時間 3 min から 120 min において生成した Au ナノ粒子の TEM 像を Figure 5.17 に示す。実験条件は、初期 Au(III)イオン濃度  $0.5 \text{ mol/m}^3$ 、初期ギ酸塩濃度  $200 \text{ mol/m}^3$  である。操作時間の経過とともに、細胞での Au ナノ粒子の粒子径が増加した。また、時間経過による粒子の凝集は観察されず、分散状態を保ったまま細胞全体に Au ナノ粒子が析出していた。細胞に析出した Au ナノ粒子の平均粒子径および比表面積に及ぼす操作時間の影響を Figure 5.18 に示す。操作時間を 120 min から 3 min まで短縮することにより、Au ナノ粒子の平均粒子径を 11.6 nm から 3.8 nm まで縮小し、比表面積を  $20.9 \text{ m}^2/\text{g}$  から  $69 \text{ m}^2/\text{g}$  まで増大させることができた。この比表面積は、CO 酸化触媒の Au ナノ粒子 ( $20 \text{ m}^2/\text{g}$ ) [15] と比較しても十分に高く、不均一触媒としての応用が期待できる。



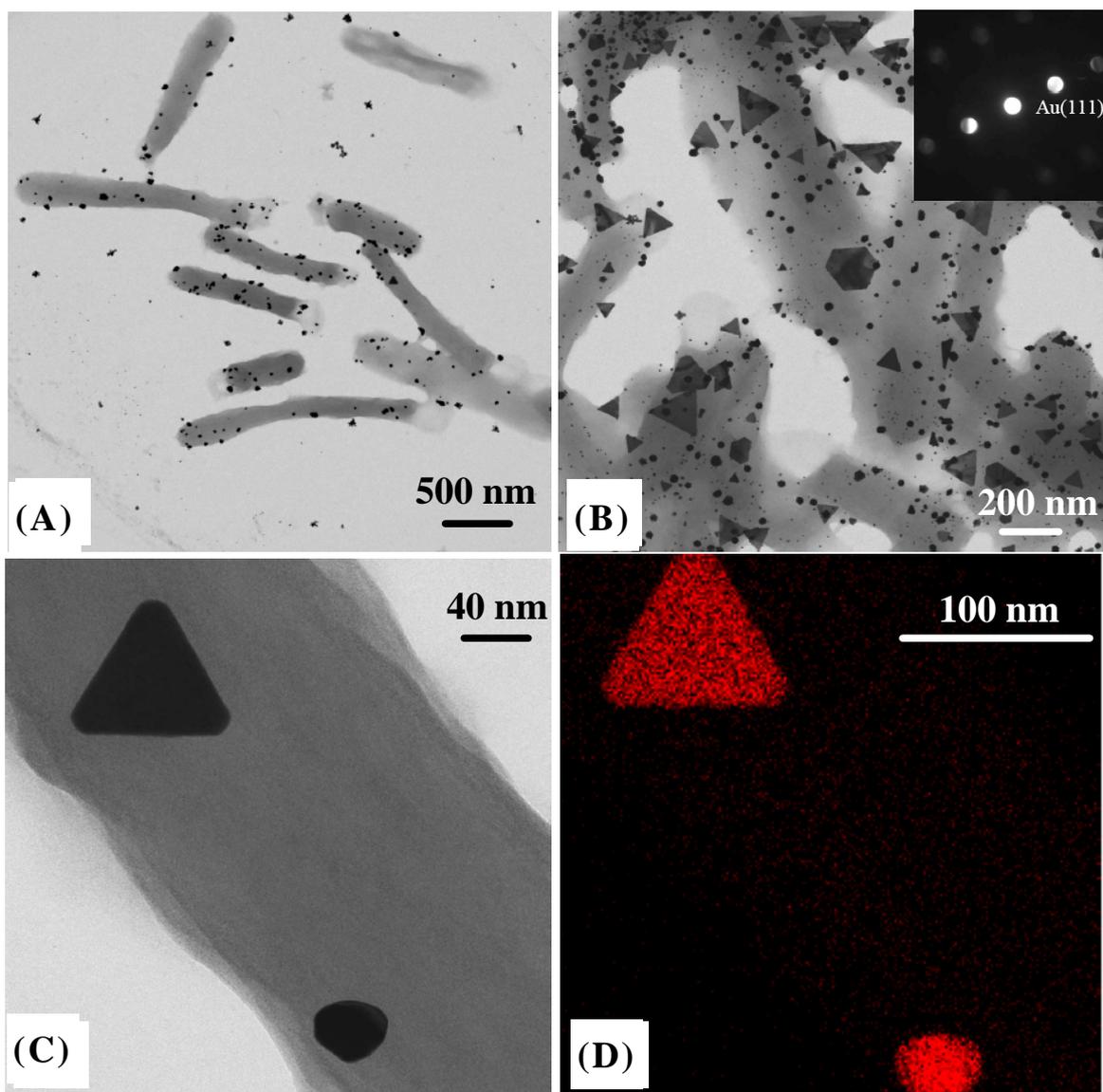
**Figure 5.6** (A) TEM image of the *S. algae* cell before exposure to HAuCl<sub>4</sub> solution with H<sub>2</sub> gas. (B) TEM images of the *S. algae* cell after exposure to 1 mol/m<sup>3</sup> HAuCl<sub>4</sub> solution for 90 min. (C) TEM images of the *S. algae* cell after exposure to 0.1 mol/m<sup>3</sup> HAuCl<sub>4</sub> solution for 90 min. (D) SAED pattern obtained from the gold nanoparticles shown in Figure 5.6(B).



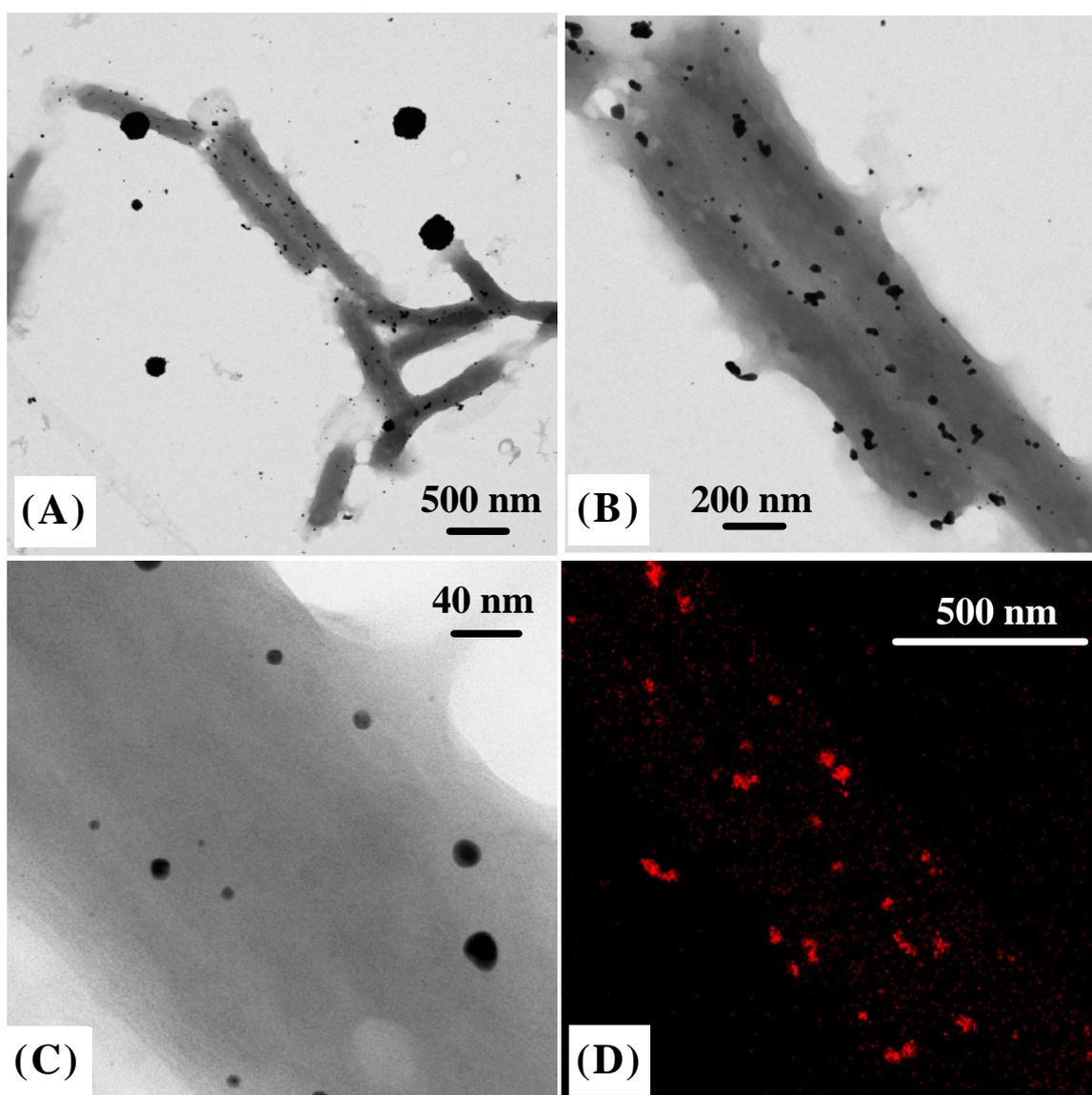
**Figure 5.7** (A) and (B) STEM images of thin section of *S. algae* cells after exposure to  $1 \text{ mol/m}^3$  aqueous  $\text{HAuCl}_4$  solution with  $\text{H}_2$  gas for 90 min at different magnifications. (C) EDX spectrum of the gold nanoparticle in the bacterial cell. (D) EDX spectrum of square 1 in the bacterial cell in Figure 5.7B. (E) Dark-field STEM image of *S. algae* cell after exposure to  $1 \text{ mol/m}^3$  aqueous  $\text{HAuCl}_4$  solution for 90 min. (F) X-ray maps of gold obtained by EDX analysis.



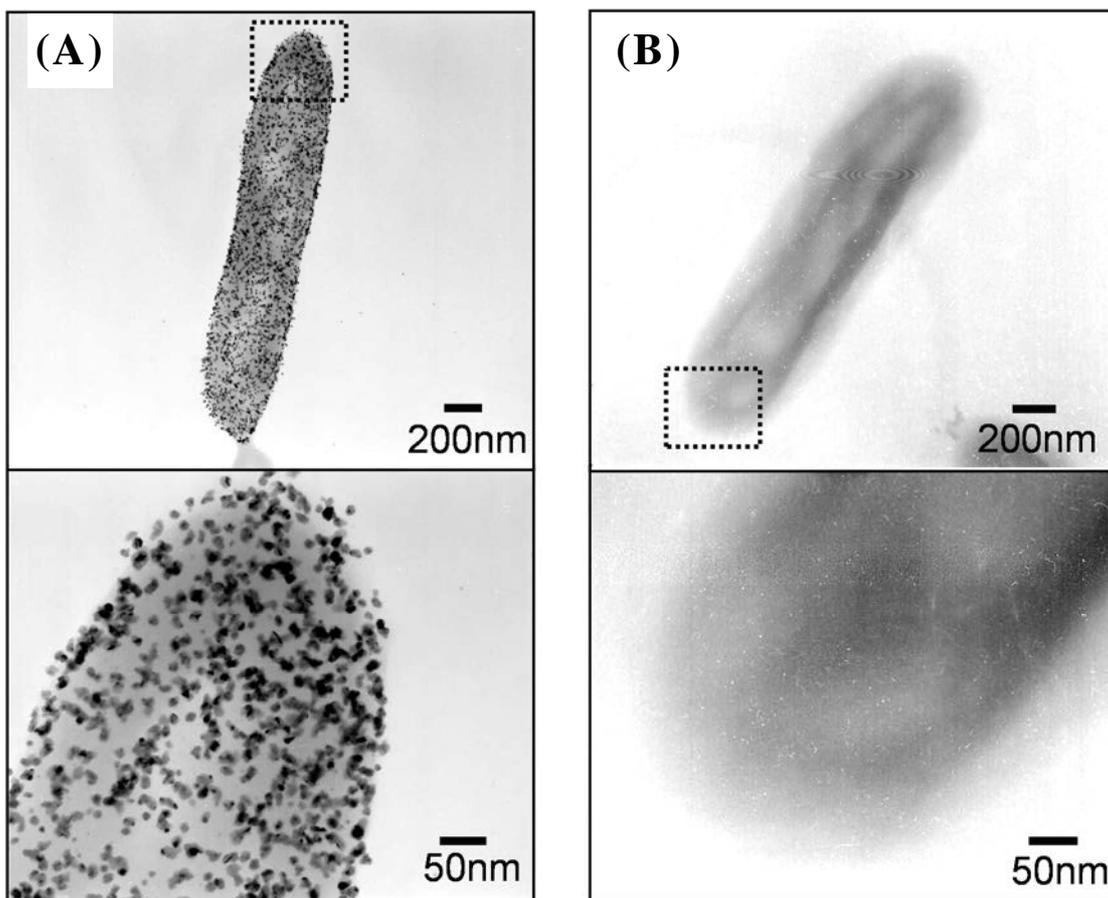
**Figure 5.8** XANES spectra of gold in *S. algae* cells after exposure to an aqueous HAuCl<sub>4</sub> solution with H<sub>2</sub> gas for 10-120 min, metallic gold foil, and 1 mol/m<sup>3</sup> aqueous HAuCl<sub>4</sub> solution.



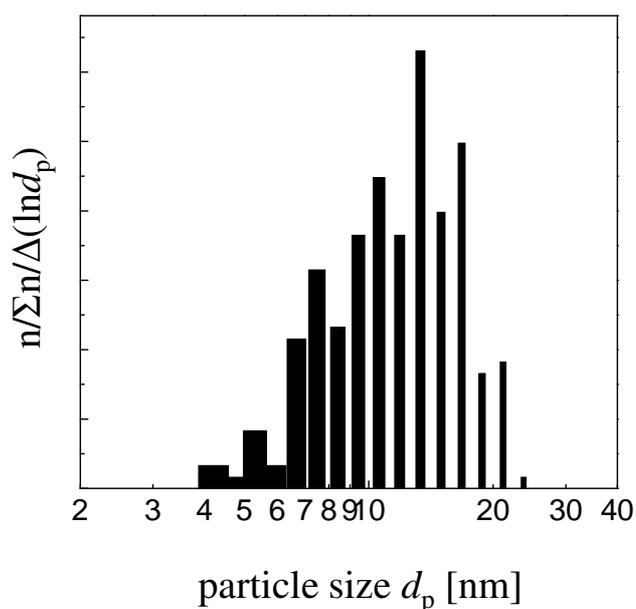
**Figure 5.9** STEM analyses of *S. algae* cells and biogenic gold nanoparticles exposure to  $\text{HAuCl}_4$  solution with  $\text{H}_2$  gas at pH 2.8: (A-C) Bright-field STEM images at different magnifications (the inset in (B) shows n-ED spots of the biogenic particle) ; (D) X-ray map of gold afforded by EDX analysis.



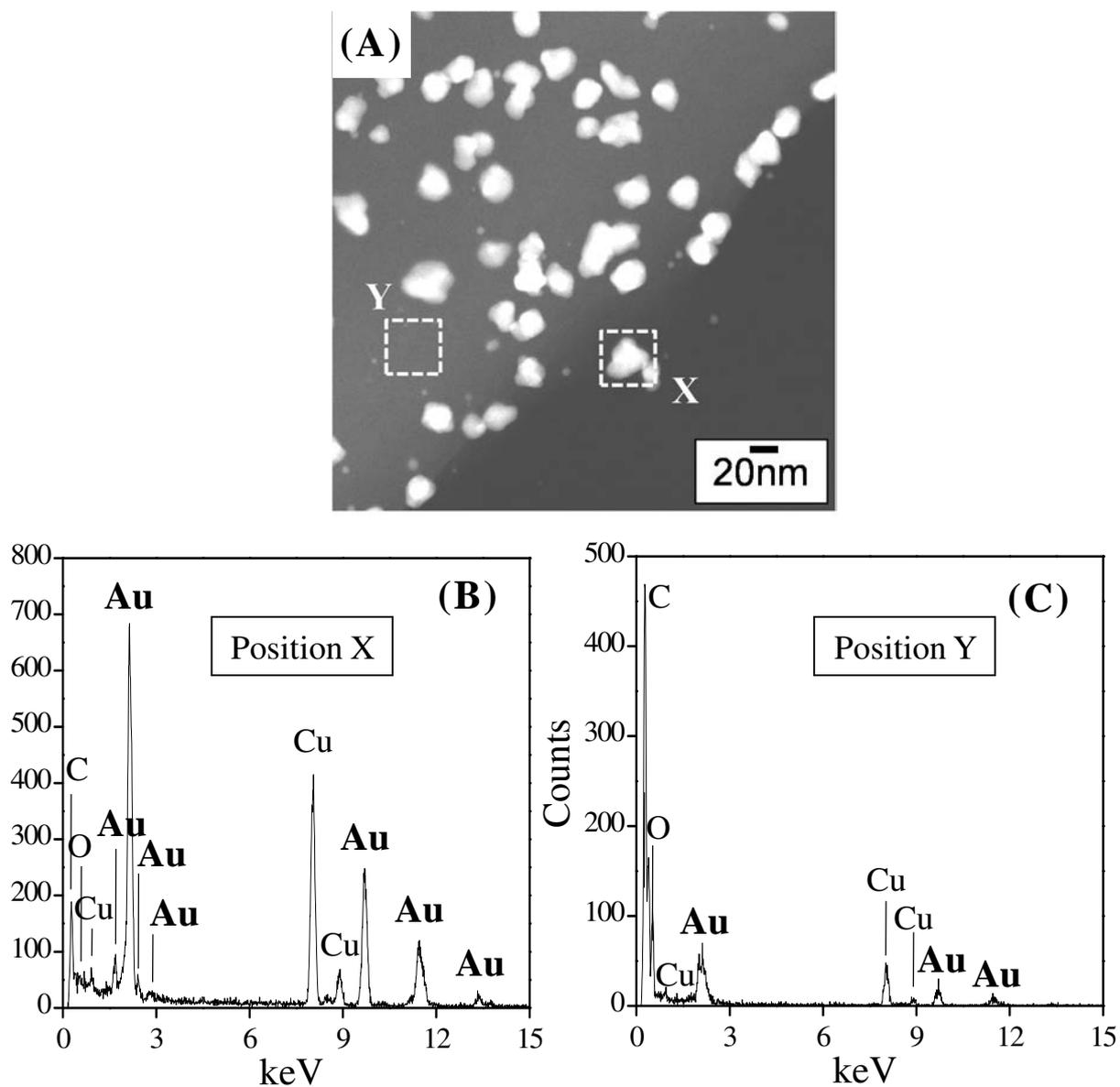
**Figure 5.10** STEM analyses of *S. algae* cells and biogenic gold nanoparticles exposure to  $\text{HAuCl}_4$  solution with  $\text{H}_2$  gas at pH 2.0: (A-C) Bright-field STEM images at different magnifications; (D) X-ray map of gold afforded by EDX analysis.



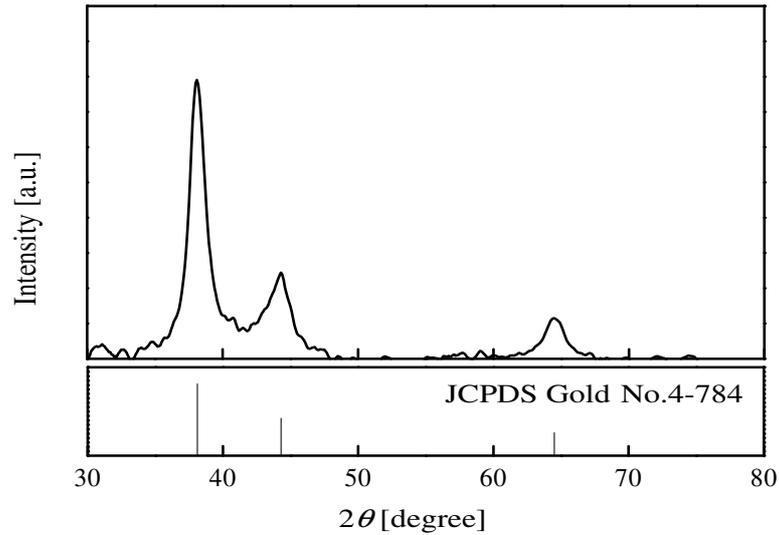
**Figure 5.11** TEM images of *S. oneidensis* cells and biogenic gold nanoparticles after exposure to  $0.5 \text{ mol/m}^3$   $\text{HAuCl}_4$  solution at pH 7.0 and  $25^\circ\text{C}$  for 120 min: (A)  $200 \text{ mol/m}^3$  formate as the electron donor; (B)  $\text{H}_2$  gas as the electron donor.



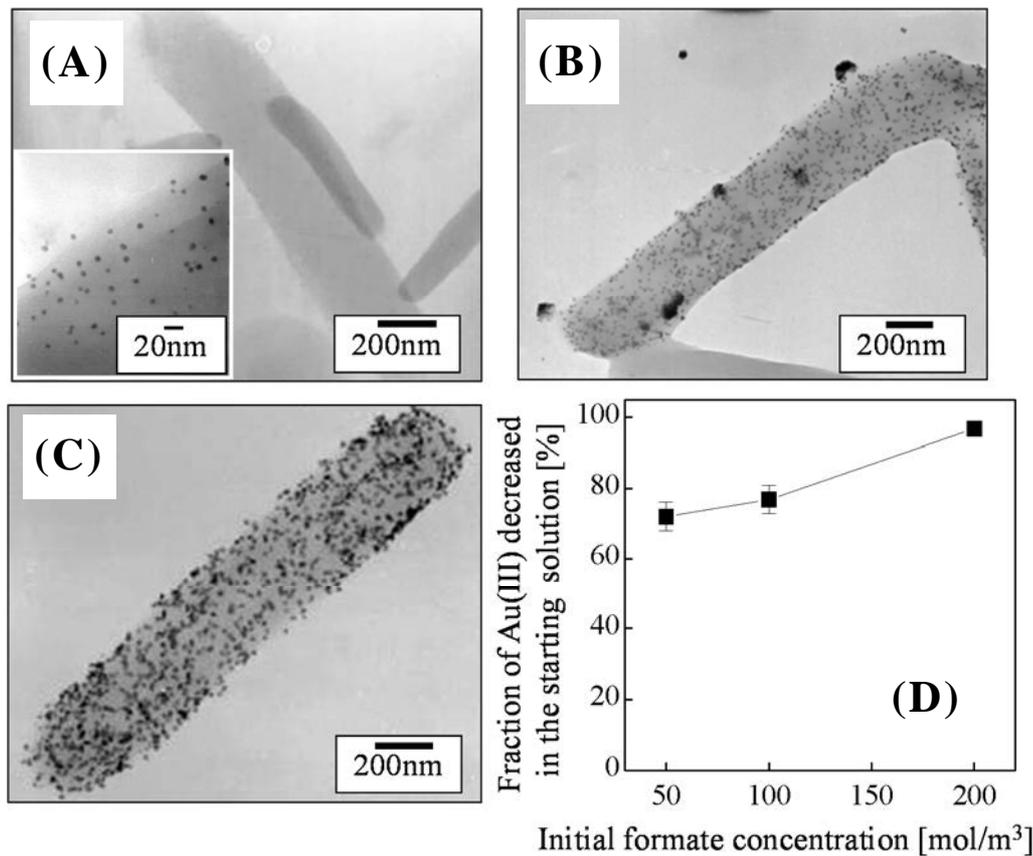
**Figure 5.12** Particle size distribution of Au nanoparticles prepared by *S. oneidensis* cells using  $0.5 \text{ mol/m}^3$   $\text{HAuCl}_4$  solution with  $200 \text{ mol/m}^3$  formate after 120 min.



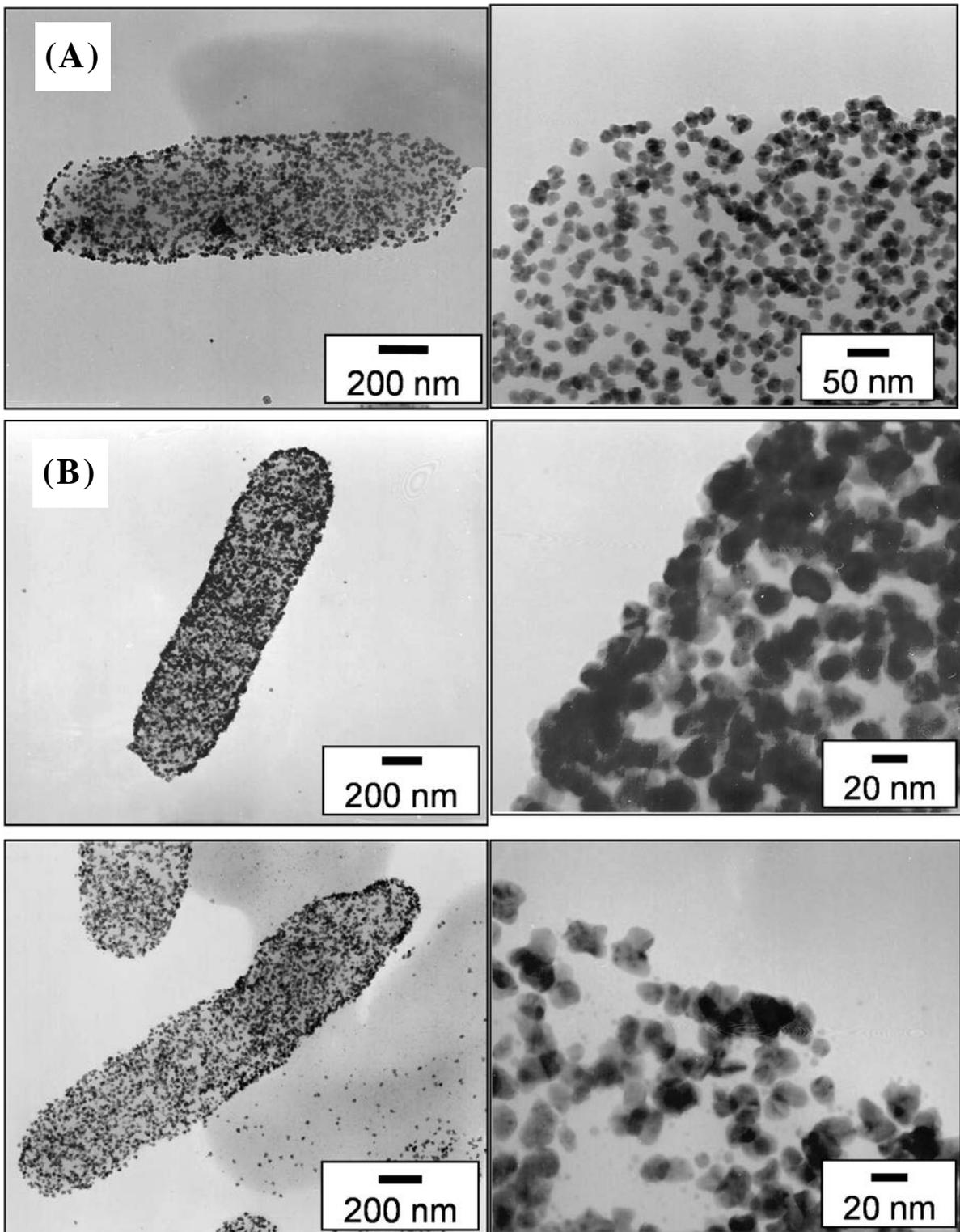
**Figure 5.13** STEM-EDX analyses of biogenic nanoparticles in *S. oneidensis* cells after exposure to  $0.5 \text{ mol/m}^3$   $\text{HAuCl}_4$  solution in the presence of  $200 \text{ mol/m}^3$  formate at  $25^\circ\text{C}$  and pH 7 for 120 min; (A) STEM image; (B) EDX spectrum recorded from the position X in Figure 5.13 (A); (C) EDX spectrum recorded from the position Y in Figure 5.13 (A).



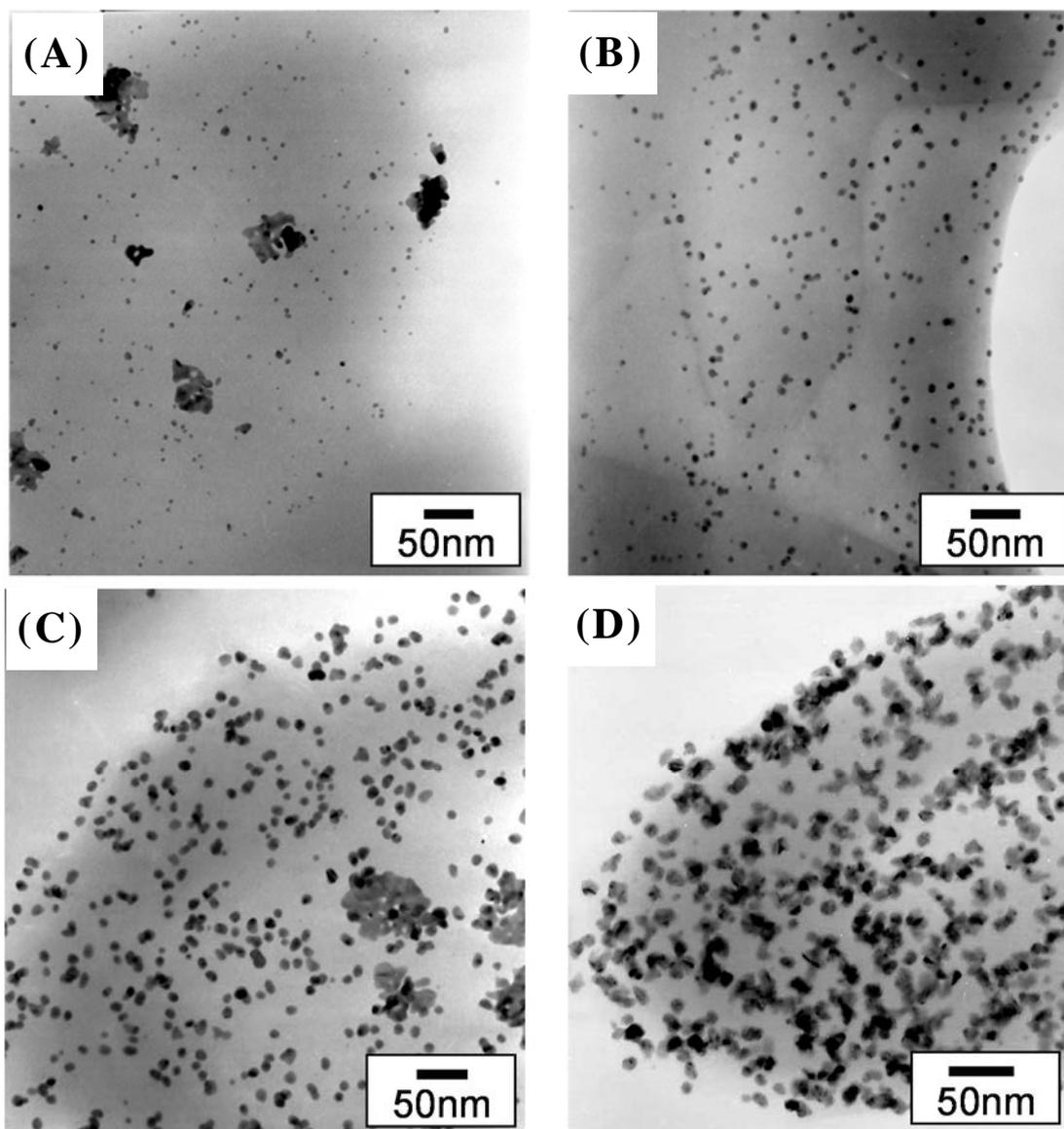
**Figure 5.14** XRD pattern of biogenic nanoparticles in *S. oneidensis* cells after exposure to  $0.5 \text{ mol/m}^3$   $\text{HAuCl}_4$  solution in the presence of  $200 \text{ mol/m}^3$  formate at  $25^\circ\text{C}$  and pH 7 for 120 min.



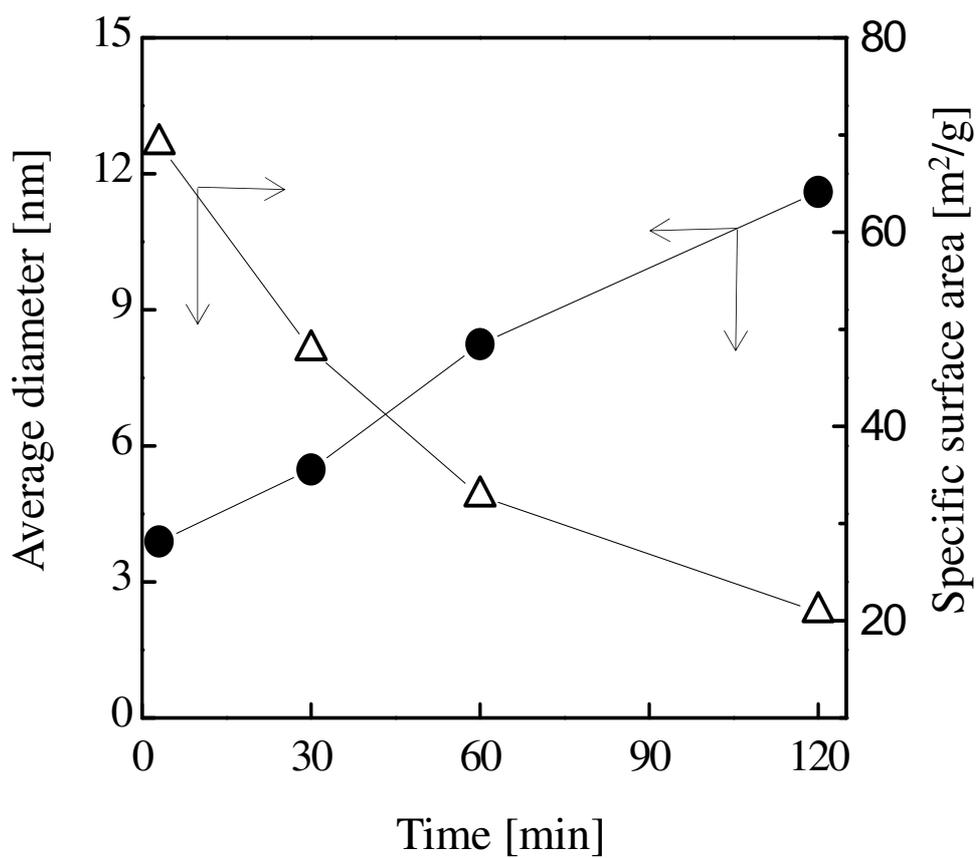
**Figure 5.15** TEM images of Au nanoparticles and *S. oneidensis* cells at pH 7.0 and  $25^\circ\text{C}$  for 120 min at different formate concentrations; (A)  $50 \text{ mol/m}^3$ , (B)  $100 \text{ mol/m}^3$ , (C)  $200 \text{ mol/m}^3$ ; (D) Fraction of soluble Au(III) ions decreased in the starting solution at pH 7.0 and  $25^\circ\text{C}$  for 120 min as function of initial formate concentration, initial Au concentration of  $0.45 \text{ mol/m}^3$  and cell concentration of  $5.9 \times 10^{15} \text{ cells/m}^3$ .



**Figure 5.16** TEM images of Au nanoparticles prepared by *S. oneidensis* cells; (A) after 2 h, (B) after 24 h, and (C) after 48 h. Cell concentration:  $5.2 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup>, initial Au concentration: 1.0 mol/m<sup>3</sup>, initial formate concentration: 100 mol/m<sup>3</sup>.



**Figure 5.17** TEM images of Au nanoparticles prepared by *S. oneidensis* cells; (A) after 3 min, (B) after 30 min, (C) after 60 min, and (D) after 120 min. Cell concentration:  $6.1 \times 10^{15}$  cells/m<sup>3</sup>, initial Au concentration: 0.5 mol/m<sup>3</sup>, Initial formate concentration: 200 mol/m<sup>3</sup>.



**Figure 5.18** The effect of operating time on the average particles size and the specific surface area of biogenic gold nanoparticles.

## 5.4 緒言

海洋性 Fe(III)イオン還元細菌 *Shewanella algae* および淡水性還元細菌 *Shewanella oneidensis* の静止細胞を用いた 25 - 33°Cにおける Au(III)イオンの還元・析出について以下の知見を得た。

- (1) *S. algae* は、電子供与体として水素を用い、Au(III)イオン還元できることが明らかとなった。このバイオ還元・析出によって、25°C, pH 7.0 において Au(III)イオン濃度 0.1 - 1 mol/m<sup>3</sup> の塩化金酸水溶液から 30 min でほぼ 100%の Au(III)イオンを回収できた。さらに、*S. algae* は pH 2.0 - 2.8 の酸性水溶液中においても Au(III)イオンの還元能力を保有していることが明らかとなった。*S. algae* による Au(III)イオンの還元反応は *S. algae* 細胞が持つヒドロゲナーゼを含む電子伝達系により触媒されていると考えられる。
- (2) *S. algae* を用いた pH 7.0 における Au(III)イオンのバイオ還元では、粒子径 10 - 20 nm の Au ナノ粒子が *S. algae* 細胞のペリプラズム空間に析出することが明らかとなった。一方、pH 2.8 においては 100 - 200 nm の三角形や六角形等の Au 単結晶が細胞外に析出した。pH 7.0 から pH 2.8 および pH 2.0 への塩化金酸水溶液の pH の変化は、Au ナノ粒子の生成場と形体に大きく影響することが明らかとなった。
- (3) *S. oneidensis* は、電子供与体としてギ酸塩を用い、Au(III)イオンを還元できることが明らかになった。具体的には 25°C, pH 7.0 において、液相 Au(III)イオン濃度 0.49 mol/m<sup>3</sup> の塩化金酸水溶液から 120 min で 94 %の Au(III)イオンを回収できた。この還元反応には *S. oneidensis* 細胞が持つギ酸デヒドロゲナーゼの関与が考えられる
- (4) *S. oneidensis* を用いた pH 7.0 における Au(III)イオンのバイオ還元・析出では、操作時間 3 min から 120 min において操作時間の経過に伴って Au ナノ粒子の粒子径が増加した。操作時間を 3 min まで短縮することにより、Au ナノ粒子の平均粒子径 3.8 nm、比表面積を 69 m<sup>2</sup>/g の Au ナノ粒子を得られた。
- (5) バイオ還元実験 (pH 7.0) における *S. algae* 細胞の XANES スペクトルおよび EDX 分析結果から *S. algae* 細胞への Au(III)イオンの吸着は認められず、*S. algae* 細胞は Au(III)イオンを 10 min 以内の極めて短時間で還元すると考えられる。これに対し *S. oneidensis* 細胞では、EDX 分析結果から

Au(III)イオンの細胞への吸着が認められ、*S. oneidensis* 細胞による Au(III)イオンのバイオ還元・析出は、吸着から還元へと逐次的に進行すると考えられる。

## References

- [1] J. D. Miller, R. Y. Wan, J. R. Parga, *Hydrometallurgy* **24** (1990) 373-392.
- [2] C. Flores, T. J. O'Keefe, Gold recovery from organic solvents using galvanic stripping. In: Misra, M. (Ed.) *Separation Processes - Heavy Metals, Ions and Minerals* -. The Minerals, Metals and Materials Society, Warrendale, 1995, 187-201.
- [3] M. Haruta, N. Yamada, T. Kobayashi, S. Iijima, *J. Catal.* **115** (1989) 301-309.
- [4] S. F. Cheng, L.-K. Chau, *Anal. Chem.* **75** (2003) 16-21.
- [5] Y. Tan, X. Dai, Y. Li, D. Zhua, *J. Mater. Chem.* **13** (2003) 1069-1075.
- [6] K. Kashefi, J. M. Tor, K. P. Nevin, and D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (2001) 3275-3279.
- [7] E. Ahmed, S. Kalathil, L. Shi, O. Alharbi, P. Wang, *J. Saudi Chem. Soc.* **22** (2018) 919-929.
- [8] C. A. Woolfolk, H. R. Whiteley, *J. Bacteriol.* **84** (1962) 647-658.
- [9] L. J. Yanke, R. D. Bryant, E. J. Laishley, *Anaerobe* **1** (1995) 61-67.
- [10] G. De Luca, P. De Philip, Z. Dermoun, M. Rousset, A. Vermeglio, *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (2001) 4583-4587.
- [11] C. Michel, M. Brugna, C. Aubert, A. Bernadac, M. Bruschi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55** (2001) 95-100.
- [12] O. A. Zadvorny, N. A. Zorin, I. N. Gogotov, *Arch. Microbiol.* **184** (2006) 279-285.
- [13] S. S. Shankar, A. Rai, B. Ankamwar, A. Singh, A. Ahmad, M. Sastry, *Nat. Mater.* **3** (2004) 482-488.
- [14] S. P. Chandran, M. Chauddhary, R. Pasricha, A. Ahmad, M. Sastry, *Biotechnol. Prog.* **22** (2006) 577-583.
- [15] S. A. C. Carabineiro, A. M. T. Silva, G. Dražić, P. B. Tavares, J. L. Figueiredo, *Catal. Today* **154** (2010) 21-30.

## 第6章 パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* による

### Au(III)イオンの吸着および還元・析出

#### 6.1 緒言

第5章では *Shewanella* 属細菌によるバイオミネラリゼーションを利用した Au(III)イオンの還元・析出の基本的な操作条件について述べ、都市鉱山等の2次資源からの Au の回収に対してバイオ回収法が適用できる可能性を示した。*Shewanella* 属細菌は好氣的にも培養でき、病原性を持たないため商業利用に適した細菌であるが、現時点ではバイオ回収以外に用途が無く、必要な菌体量を商業的な規模で準備することが容易でない場合も考えられる。パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は食品添加物として工業的に利用され、すでに商業的生産手段が確立されており、大量の細胞を容易に準備できる利点がある。*S. cerevisiae* による Au(III)イオンの還元は既に報告されているが[1]、廃棄パン酵母を使用しているため詳細は不明である。

一方、Au イオンのバイオソープションは回収する Au に付加価値を与えることはできないが、電子供与体が不要である経済的利点に加え、酵素が変性するような強酸性水溶液に適用できる利点がある。Au(III)イオンのバイオソープションは細菌類、藻類および酵母等の真菌類で多くの報告[2-4]があるが、吸着速度や操作条件の詳細についてはデータが不足している。Savvaidis は、パン酵母 *S. cerevisiae* による Au(I)チオ尿素錯イオン ( $\text{Au}[\text{CS}(\text{NH}_2)_2]^{2+}$ ) の吸着を報告しているが[5]、より一般的な Au の浸出方法である  $\text{AuCl}_4^-$  イオンの吸着については触れられていない。

本章ではパン酵母 *S. cerevisiae* の静止細胞を用いた 25 - 33°C における Au(III)イオンの回収において、バイオ還元・析出による回収とバイオ吸着による回収について述べる。バイオ還元・析出による回収に関しては、電子供与体としてギ酸ナトリウムを用い、Au(III)イオンの還元挙動ならびに生成粒子の性状について検討した。バイオ還元で析出したナノ粒子に対しては、透過電子顕微鏡 (TEM) および走査型透過電子顕微鏡 (STEM) で観察するとともに、制限視野電子線回折 (SAED) およびナノビーム電子線回折 (n-ED) によりナノ粒子の結晶構造を同定した。さらにエネルギー分散型 X 線分析 (EDX) によりナノ粒子の元素を同定した。バイオ吸着を利用した回収に関

しては、*S. cerevisiae* による Au(III)イオンの吸着挙動について、溶液 pH および初期菌体濃度による影響を検討した。

## 6.2 実験方法

### 6.2.1 微生物の培養

本論文で用いた微生物は独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）から分譲された *S. cerevisiae* NBRC 2044 株である。実験に用いる *S. cerevisiae* は、GYP 液体培地（Glucose-yeast-peptone medium, pH 7.0）を用いて、33℃で好氣的に培養した。

### 6.2.2 実験操作

#### (1) バイオ還元実験

実験操作は酸素濃度 2.5%以下の嫌氣的雰囲気中に保たれたグローブボックス内で行った。静止細胞懸濁液は、対数増殖期末期の微生物細胞を、遠心分離により集菌し、リン酸（Na-K）緩衝液（50 mol/m<sup>3</sup>, pH 7.0）による洗浄を2回行い、洗浄細胞を緩衝液に再懸濁することで調製し、直ちに実験に使用した。懸濁液の細胞濃度は、Petroff-Hausser 細菌計算盤を用いてビデオ装置付き光学顕微鏡下で計測し、緩衝液で所定の濃度に適宜希釈して調整した。緩衝液、塩化金酸（HAuCl<sub>4</sub>）水溶液は、1 kmol/m<sup>3</sup>の塩酸または 10 kmol/m<sup>3</sup>の水酸化ナトリウム水溶液により適宜 pH を調整し、使用前に N<sub>2</sub> ガスを流通させて嫌気状態とした。実験は、静止細胞懸濁液に所定濃度となるように電子供与体（ギ酸ナトリウム）および塩化金酸水溶液を添加・混合して開始した。実験の初期条件は、溶液体積 15 cm<sup>3</sup>、液相 Au(III)イオン濃度 1.25 ± 0.10 mol/m<sup>3</sup>、電子供与体濃度 50 mol/m<sup>3</sup>、細胞濃度 5.0 × 10<sup>14</sup> cells/m<sup>3</sup>、pH 7.0 である。実験開始後、サンプルの採取を一定の時間間隔で行い、採取した懸濁液は直ちにフィルター（孔径 0.2 μm、セルロース混合エステル製）でろ過して、液相の Au 濃度を測定した。

#### (2) バイオ吸着実験

実験操作は大気雰囲気下で行った。静止細胞懸濁液は、対数増殖期末期の *S. cerevisiae* 細胞を、(1)と同様に集菌・洗浄して超純水に再懸濁することで所定の細胞濃度に調製し、酸性条件に馴化させることなく直ちに実験に使用した。塩化金酸水溶液は、1 kmol/m<sup>3</sup>の塩酸により pH 1.0 に調整した。実験

の主な初期条件は、溶液体積  $15 \text{ cm}^3$ 、液相 Au(III)イオン濃度  $1.1 \text{ mol/m}^3$ 、細胞濃度  $(0.5-5.0) \times 10^{14} \text{ cells/m}^3$ 、pH 1.0 - 7.0、温度  $33^\circ\text{C}$  である。実験開始後、サンプルの採取を一定の時間間隔で行い、採取した懸濁液は直ちにフィルターでろ過して、液相の Au 濃度を測定した。

### 6.2.3 分析方法

液相 Au イオン濃度の測定には、誘導結合プラズマ発光分析装置 (ICP-AES) (ICPE-9000、島津製作所)、原子吸光光度計 (AA-6650、島津製作所) を使用した。

バイオミネラリゼーション実験に使用した細胞は、走査型透過電子顕微鏡 (STEM) (JEOL model JEM2100F) により観察し、付属するエネルギー分散型 X 線分析装置 (EDX) (JED-2300T) およびナノビーム電子回折 (n-ED) により、生成した粒子を分析した。TEM 観察用試料は、実験後、所定の時間で採取した細胞懸濁液をエラスチックカーボン支持膜 Cu グリッドに滴下後、乾燥し、イオン交換水で洗浄後、再び乾燥して調製した。

## 6.3 実験結果および考察

### 6.3.1 *S. cerevisiae* による Au(III)イオンの還元・析出

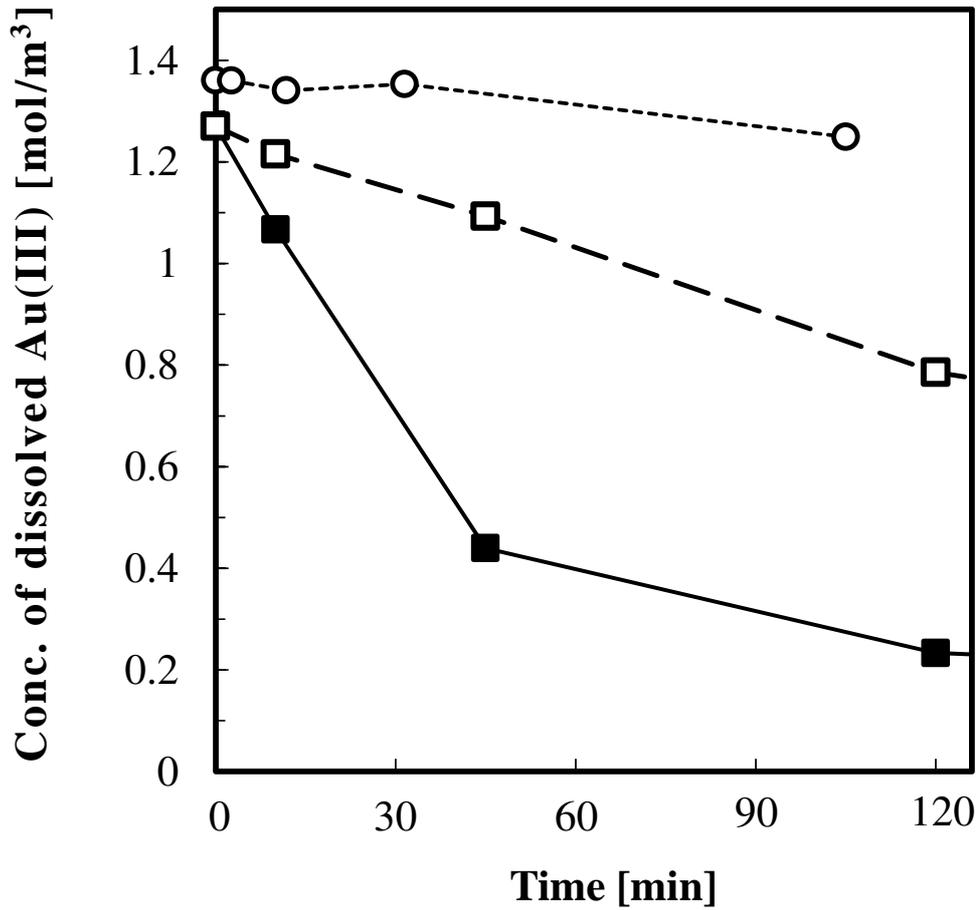
Figure 6.1 にパン酵母 *S. cerevisiae* による Au(III)イオンのバイオ還元における液相 Au(III)イオン濃度の経時変化を示す。実験条件は溶液 pH 7、温度  $33^\circ\text{C}$ 、嫌気雰囲気である。*S. cerevisiae* 静止細胞と電子供与体であるギ酸塩が共存した場合、液相 Au(III)イオン濃度は 120 min で  $1.3 \text{ mol/m}^3$  から  $0.2 \text{ mol/m}^3$  に急速に減少し、85%の液相 Au(III)イオンが *S. cerevisiae* 細胞に回収された。同時に、実験中の懸濁液の色は、薄黄色から鮮やかな紫に変化し、Au ナノ粒子の生成が視覚的に示唆される。したがって、観測された液相 Au(III)イオン濃度の減少は、Au(III)イオンの還元により不溶性の Au ナノ粒子が生成したことによると考えられる。一方、ギ酸塩を添加しない場合、液相 Au(III)イオン濃度の減少は  $1.3 \text{ mol/m}^3$  から  $0.8 \text{ mol/m}^3$  に留まった。この時、懸濁液の色に変化がなかったことから、この液相 Au(III)イオン濃度の減少は *S. cerevisiae* 細胞による Au(III)イオンの吸着によると考えられる。また、*S. cerevisiae* 細胞を添加しないギ酸塩による無菌化学対照実験においても Au(III)イオンの還元は認められなかった。Lin *et al.* は廃棄された醸造用パン酵母を用いて電

子供与体を添加せずに Au(III)イオンの還元を報告しているが、TEMにおいて粒子が確認されるのは 4 h 以後である[1]。このことから、*S. cerevisiae* 細胞による Au(III)イオンのバイオミネラリゼーションにおいては、120 min 以内の実用的な還元操作を行う上で電子子供与体（ギ酸塩）が必要であるといえる。

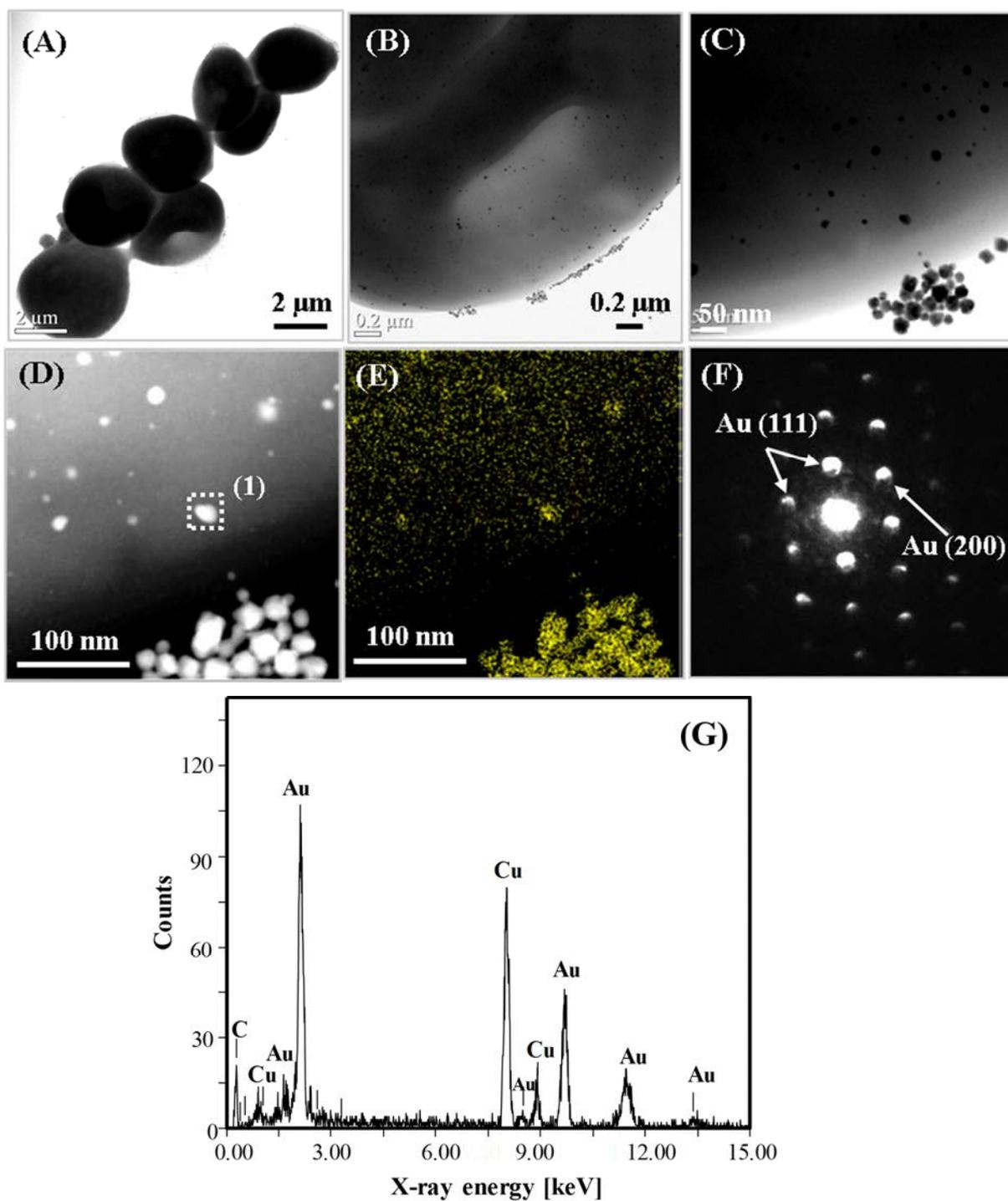
Au の還元・析出を確認するため、上記と同じ条件のバイオミネラリゼーション実験における 120 min 後の細胞を STEM により観察した。Figure 6.2(A) に示すように *S. cerevisiae* 細胞は概ね直径 5  $\mu\text{m}$  の球形である。低倍率の STEM 像 (Figure 6.2(B,C)) から、*S. cerevisiae* 細胞表面に多くのナノ粒子が存在していることが確認された。高倍率の STEM 暗視野像 (Figure 6.2(D)) から、これらのナノ粒子の一次粒子径は 10 - 20 nm であることがわかった。Figure 6.2(D)内の領域 1 における EDX 分析 (Figure 6.2(G)) では強い Au の特性 X 線が Cu と C の特性 X 線とともに計測された。Cu のピークは TEM 観察用のグリッドから検出されたものであり、C および O のピークは細胞のタンパク質等の生体物質から由来したと考えられる。細胞表面における粒子の暗視野像と Au の EDX マッピング像 (Figure 6.2(E)) が一致していることから、細胞表面に Au ナノ粒子が析出していることが確認された。さらに、ナノビーム電子回折パターン (Figure 6.2(F)) は、このナノ粒子が FCC 構造の結晶性を有することを示しており、EDX 分析結果 (Figure 6.2(G)) と合わせてこのナノ粒子が Au(0)単結晶であると言える。以上より、ギ酸塩を電子子供与体とした *S. cerevisiae* によるバイオミネラリゼーションにより Au(III)イオンが還元され、細胞表面に結晶性を有する Au ナノ粒子が析出することが明らかとなった。

*S. cerevisiae* による Au(III)イオンのバイオミネラリゼーションは (1) *S. cerevisiae* 細胞への Au(III)イオンの吸着、(2) ギ酸塩を電子子供与体とした微生物的還元、の 2 ステップに分けられる。ギ酸塩を電子子供与体とした微生物的還元は前述の *S. oneidensis* の例があり、ギ酸デヒドロゲナーゼの関与が考えられる。グルコースを制限基質として培養した *S. cerevisiae* においても NAD の還元に関連したギ酸デヒドロゲナーゼが確認されており [6]、*S. oneidensis* と同様の還元機構が働いている可能性も考えられるが、*S. cerevisiae* のギ酸デヒドロゲナーゼが増殖に関与しない例も報告されており [7, 8]、菌株によってはその発現や機能が異なる可能性もある。*S. cerevisiae*

による Au(III)イオンの還元機構の詳細については更なる知見が必要である。



**Figure 6.1** Microbial reduction and adsorption of Au(III) ions in an aqueous  $\text{HAuCl}_4$  solution at pH 7.0 and 33°C under anaerobic conditions. (■)  $5.0 \times 10^{14}$  cells/  $\text{m}^3$  *S. cerevisiae* cells in the presence of 50 mol/  $\text{m}^3$  formate; (□)  $5.0 \times 10^{14}$  cells/  $\text{m}^3$  *S. cerevisiae* cells in the absence of formate; (○) sterile control containing no *S. cerevisiae* cells in the presence of 50 mol/  $\text{m}^3$  formate.

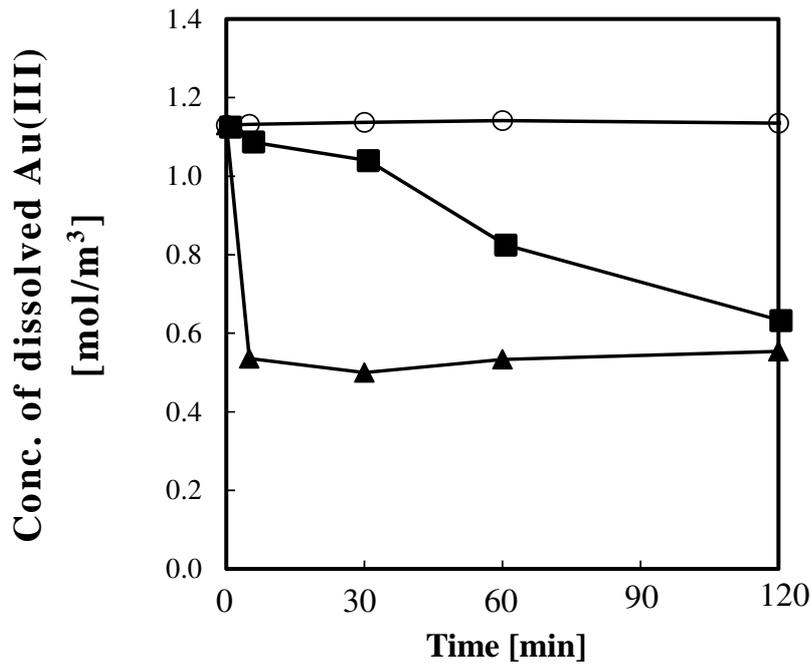


**Figure 6.2** (A) , (B) and (C) Bright-field STEM images for biogenic nanoparticles deposited in *S. cerevisiae* cells after exposure to an aqueous  $1.3 \text{ mol/m}^3$   $\text{HAuCl}_4$  solution with  $50 \text{ mol/m}^3$  formate at pH 7.0 and  $33^\circ\text{C}$  under anaerobic conditions. (D) Dark-field STEM image for biogenic nanoparticles at high magnification. (E) EDX analysis X-ray map for gold. (F) n-ED spots for biogenic nanoparticles. (G) Spot-profile EDX spectrum recorded from region 1 (boxed area) .

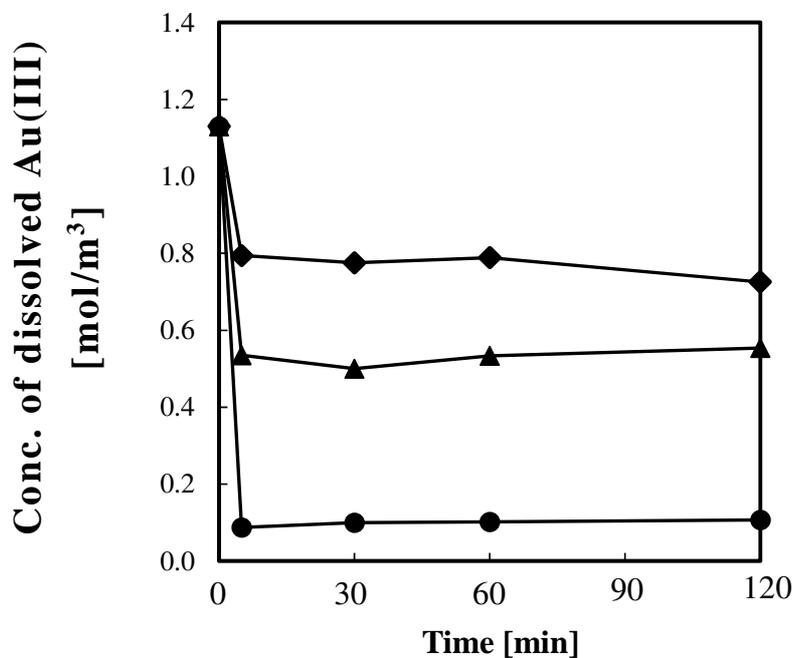
### 6.3.2 *S. cerevisiae* による Au(III)イオンの吸着

Figure 6.3に *S. cerevisiae* による Au(III)イオンのバイオソープションにおける液相 Au(III)イオン濃度の経時変化を示す。実験条件は菌体濃度  $1.0 \times 10^{14}$  cells/m<sup>3</sup>、初期 Au(III)イオン濃度 1.1 mol/m<sup>3</sup>、温度 33°Cで、電子供与体は無添加である。*S. cerevisiae* を添加した場合、pH 1.0の酸性条件下においても液相 Au(III)イオン濃度は 1.1 mol/m<sup>3</sup> から 0.55 mol/m<sup>3</sup> に急速に減少したが、実験懸濁液の色には変化が認められなかった。pH 1.0における Au(III)イオンのバイオ回収速度は pH 7.0と比較して明らかに速かったが、120 min 後においては両者の液相 Au(III)イオン濃度はほぼ同じであった。これは、Au(III)イオンの吸着に関与する *S. cerevisiae* 細胞表面の官能基の状態が pH 1.0と pH 7.0では異なるためと考えられる。既往の研究より、*S. cerevisiae* 細胞の電荷ゼロ点 (PZC) は概ね pH 4.0であり [9]、pH 4.0以下では *S. cerevisiae* 細胞表面は正に帯電していると考えられる。一方、pH 1.0の酸性塩化金酸水溶液において Au(III)イオンはテトラクロロ錯イオン (AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>) として存在する。この結果、正帯電の *S. cerevisiae* 細胞とアニオンであるテトラクロロ Au(III)イオンの間に静電的な吸引力が働き、*S. cerevisiae* による Au(III)イオンのバイオソープションを促進したと考えられる。

次に、初期 Au(III)イオン濃度 1.1 mol/m<sup>3</sup> において異なる細胞濃度でバイオソープション実験を行い、*S. cerevisiae* によるバイオソープションに及ぼす細胞濃度の影響を調べた (Figure 6.4)。*S. cerevisiae* 細胞濃度  $0.5 \times 10^{14}$  cells/m<sup>3</sup> では、10 min で約 25% の Au(III)イオンが *S. cerevisiae* 細胞に回収されたが、*S. cerevisiae* 細胞濃度を  $5.0 \times 10^{14}$  cells/m<sup>3</sup> に増加させることにより、10 min における Au(III)イオンの回収率を 90%まで高めることができた。このように *S. cerevisiae* は、中性水溶液においてはバイオミネラリゼーションにより迅速に Au(III)イオンを回収できるのに加え、pH 1.0の酸性水溶液においてもバイオソープションにより Au(III)イオンを迅速に吸着し、高効率で回収できることが明らかとなった。



**Figure 6.3** Microbial adsorption of Au(III) ions in an aqueous HAuCl<sub>4</sub> solution at 33 °C. (▲)  $1.0 \times 10^{14}$  cells/m<sup>3</sup> *S. cerevisiae* cells at pH 1.0; (■)  $1.0 \times 10^{14}$  cells/m<sup>3</sup> *S. cerevisiae* cells at pH 7.0; (○) sterile control containing no *S. cerevisiae* cells at pH 1.0.



**Figure 6.4** Microbial adsorption of Au(III) ions in an aqueous HAuCl<sub>4</sub> solution at pH 1.0 and 33°C. (●)  $5.0 \times 10^{14}$  cells/m<sup>3</sup> *S. cerevisiae* cells; (▲)  $1.0 \times 10^{14}$  cells/m<sup>3</sup> *S. cerevisiae* cells; (◆)  $0.5 \times 10^{14}$  cells/m<sup>3</sup> *S. cerevisiae* cells.

## 6.4 緒言

パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の静止細胞を用いた 25 - 33°C における Au(III)イオンの吸着および還元・析出について以下の知見を得た。

- (1) *S. cerevisiae* は、電子供与体としてギ酸塩を用い、Au(III)イオンを還元できることが明らかになった。具体的には 33°C, pH 7.0 において、液相 Au(III)イオン濃度  $1.3 \text{ mol/m}^3$  の塩化金酸水溶液から 120 min で 85% の Au(III)イオンを回収できた。このバイオミネラルリゼーションにより、*S. cerevisiae* 細胞表面に一次粒子径 10 - 20 nm の Au ナノ粒子が析出することが明らかとなった。
- (2) *S. cerevisiae* は、バイオソープションにより pH 1.0 の酸性水溶液においても Au(III)イオンを回収できることが明らかとなった。具体的には初期 Au(III)イオン濃度  $1.1 \text{ mol/m}^3$ 、温度 33°C で、*S. cerevisiae* 細胞を  $5.0 \times 10^{14} \text{ cells/m}^3$  添加することにより、10 min の回収操作で 90% の Au(III)イオンを回収することができた。

## References

- [1] Z. Lin, J. Wu, R. Xue, Y. Yang, *Spectrochim. Acta Part A* **61** (2005) 761-765.
- [2] N. Das, *Hydrometallurgy* **103** (2010) 301-316.
- [3] S. Ilyas, J. C. Lee, *Chem. BioEng. Rev.* **1** (2014) 180-189.
- [4] S. Ilyas, N. Ilyas, J. C. Lee, Microbial cyanidation of gold. In: Ilyas, S. (Ed.) *Gold Metallurgy and the Environment*. CRC Press, Boca Raton, (2018) 168–172.
- [5] I. Savvaidis, *BioMetals* **11** (1998) 145-151.
- [6] K. M. Overkamp, P. Kotter, R. van der Hoek, S. Schoondermark-Stolk, M. A. H. Luttik, J. P. van Dijken, J. T. Pronk, *Yeast* **19** (2002) 509-520.
- [7] W. Babel, R. H. Miiller, K. D. Markuske, *Arch. Microbiol.* **136** (1983) 203-208.
- [8] P. M. Bruinenberg, R. Jonker, J. P. van Dijken, W. A. Scheffers, *Arch. Microbiol.* **142** (1985) 302-306.
- [9] P. B. Dengis, L. R. Nelissen, P. G. Rouxhet, *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (1995) 718-728.

## 第7章 使用済み製品溶解液からの 金・白金族金属のバイオ分離・回収

### 7.1 緒言

有価金属のリサイクルにおいて、湿式法は小ロット処理に適しており、廃棄物中の有価金属を個別に分離回収できる点で注目されている。湿式法による回収プロセスでは、都市鉱山等の有価金属含有固形物から有価金属を液相（主に水溶液）に溶出させる浸出操作と、浸出液からの有価金属の分離濃縮・回収操作が主要な操作となるが、使用済み製品に含まれる有価金属が微量であるほど、これを経済的に回収することは難しくなる。したがって金（Au）・白金族金属（PGMs）のリサイクル率の向上には、これらを希薄溶液から効率よく経済的に回収できるリサイクル技術の開発が課題である。しかし、希薄溶液中の Au や PGMs 三元素（Pt, Pd, Rh）を効率良く、低コストで分離・回収できる技術は確立されておらず、使用済み電気電子部品（Waste electrical and electronic equipment, WEEE）や使用済み貴金属触媒を処理対象にした湿式リサイクルプロセスは実用化されていないのが現状である。これに対し第3章から第6章では、希薄溶液からの Pd(II)イオン、Pt(IV)イオンおよび Au(III)イオンの新しい分離・回収方法として、Fe(III)イオン還元細菌およびパン酵母による還元および吸着を利用したバイオ回収法について述べ、湿式リサイクルプロセスにおける省エネルギー性や経済性に優れた一つの選択肢となり得ることを指摘した。

貴金属イオンのバイオ回収の実用化に向けて、実際の WEEE や使用済み触媒の酸浸出液や同等の組成を持つ模擬廃液による研究例は少ない。Au(III)イオンのバイオ吸着については Creamer *et al.*が、pH 2 - 4 に調整した WEEE の酸浸出液から、硫酸還元菌 *Desulfovibrio desulfuricans* による Au(III)イオンの回収を報告しているが、pH 2 以下の強酸性浸出液については触れられていない[1]。同論文では *D. desulfuricans* のバイオマスおよび Pd ナノ粒子に覆われた乾燥細胞粉末(バイオ調製 Pd 触媒)を用いた WEEE の酸浸出液からの Pd(II)イオンのバイオ還元についての報告もあるが、これも定量的なデータは示されていない。使用済み自動車触媒の王水浸出液からの *D. desulfuricans* による Pd(II), Pt(IV), Rh(III)イオンのバイオ還元の研究例では、Pd 回収率は 15%

に留まっており、Pt(IV), Rh(III)イオンの還元は認められない[2]。同研究グループでは、同様の実廃液(500倍希釈液 Pd(II): 2.5 mM, Pt(IV): 1.9 mM, Rh(III): 0.14 mM)においては、*D. desulfuricans*により各成分80%以上の回収に成功しているが[3]、3成分共存下におけるPt(IV), Rh(III)イオンの還元は明らかでない。このように、工業廃液やリサイクルプロセス中の酸浸出液を用いたバイオ還元・析出の研究においては実施例が少ない上に定量的なデータは殆どない。

本章では、使用済み製品溶解液からの貴金属・レアメタル(Au, Pd, Pt, Rh)のバイオ分離・回収について実用化の観点から述べる。具体的には使用済み中央演算ユニット(廃CPU)を王水浸出処理することにより酸浸出液を作成し、パン酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)によるバイオ吸着を利用した強酸性条件下におけるAu(III)イオンの回収について検討した。使用済み自動車触媒については王水浸出処理による酸浸出液作成し、Fe(III)イオン還元細菌*Shewanella algae*によるバイオ還元・析出を利用したPGMsイオンの液回分式回収および連続式回収について検討した。さらに、バイオ回収プロセスの後処理として、PGMs回収後の細胞を焼成処理し、金属PGMsを回収するプロセスを検討した。

## 7.2 実験方法

### 7.2.1 微生物の培養

本論文で用いた微生物はAmerican Type Culture Collection(ATCC)から分譲された*S. algae* ATCC 51181株および独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)から分譲された*S. cerevisiae* NBRC 2044株である。*S. algae*の培養には、電子供与体として乳酸ナトリウムを、電子受容体としてクエン酸鉄(III)を含むATCC medium 2液体培地を用い5.2.1項と同様に嫌氣的に培養した。*S. cerevisiae*は、GYP液体培地(Glucose-yeast-peptone medium, pH 7.0)を用いて、33°Cで好氣的に培養した。

### 7.2.2 酸浸出液の調製

WEEEとして、使用済み中央演算ユニット(廃CPU)を使用した。Table 7.1に示したその他の元素としては、ICチップ基盤である金属シリコンと、筐体であるセラミックスが大部分を占める。廃CPUの浸出に用いる50%王水は、

12 kmol/m<sup>3</sup> の HCl と 13 kmol/m<sup>3</sup> の HNO<sub>3</sub> を体積比 3:1 の割合で混合して純水で 2 倍に希釈して作成した。ビーカーに入れた 50% 王水に 2 - 4 mm に破砕した廃 CPU を固-液混合比 20 w/v% となるように加え、時計皿で覆い 70°C に設定したホットプレート上で浸出させた。2 h 後、時計皿を外してさらに 4 h 保持し、余剰の酸を揮発させた。その後ホットプレートからビーカーを降ろし、室温まで冷却した後、定量濾紙でろ過して酸浸出液を得た。浸出残渣の分析により Au, Cu, Ni, Fe の浸出率が 99 %であることを確認した。Ag, W の浸出は痕跡量であった。続いて、10 kmol/m<sup>3</sup> の NaOH 水溶液を滴下して酸浸出液の pH 1.0 に調整し、実験に供した。得られた廃 CPU の酸浸出液の組成を Table 7.2 に示す。

**Table 7.1** Chemical composition of the WEEE (spent central processing units) [wt%]

Au	Ag	Cu	Ni	W	Fe	Others
0.272	0.628	0.421	2.17	8.76	3.18	84.6

**Table 7.2** Concentrations of metals in the acidic leachate [mol/m<sup>3</sup>]

	Au	Cu	Ni	Fe
pH 1.0	1.88	7.40	33.8	53.4

使用済み自動車触媒として、セラミックハニカム触媒を基材ごと 30 μm 以下に粉砕したものをを用いた。代表的な組成を Table 7.3 に示す。粉砕された使用済み自動車触媒は機材であるコーディエライト ((Mg, Fe)<sub>2</sub>Al<sub>4</sub>Si<sub>5</sub>O<sub>18</sub>) を多量に含んでいる。浸出に用いる王水は、12 kmol/m<sup>3</sup> の HCl と 13 kmol/m<sup>3</sup> の HNO<sub>3</sub> を体積比 3:1 の割合で混合して純水で 2 倍に希釈した。ビーカーに入れた 50% 王水に粉砕したセラミックハニカム触媒を固-液混合比 20% となるように加え、時計皿で覆い、ホットプレートにより液温を 60°C に保ち 24 h 浸出させた。浸出操作後、室温まで冷却し、細孔径 0.20 μm のメンブレンフィルターでろ過して酸浸出液を得た。浸出残渣の分析により Pd, Pt, Rh の浸出率が 95% であることを確認した。続いて、10 kmol/m<sup>3</sup> の NaOH 水溶液を滴下して酸浸出液の pH を調整した。この際 PGM イオンが金属水酸化物と

共沈することを防ぐため、あらかじめ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  粉末を添加した。 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  の添加量は酸浸出液の全金属含有量の 5 倍量とした。pH 調整前の使用済み自動車触媒の酸浸出液と pH 調整後に得られた酸浸出液の組成を Table 7.4 に示す。

**Table 7.3** Metal contents in the spent automotive catalysts [wt%]

Al	Ce	Fe	La	Mg	Si	Pd	Pt	Rh
20.9	41.0	18.9	6.5	46.9	12.1	0.12	0.088	0.026

**Table 7.4** Chemical composition of the automotive catalyst leachate [ $\text{mol}/\text{m}^3$ ]

	Al	Fe	Ce	La	Mg	Pd	Pt	Rh
pH <0	64.6	51.8	6.16	5.37	82.8	2.16	0.77	0.44
pH 6	0	0	0	0	37.3	2.10	0.70	0.40

### 7.2.3 実験操作

#### (1) *S. cerevisiae* による Au(III)イオンの吸着

実験操作は大気雰囲気下で行った。静止細胞懸濁液は、対数増殖期末期の *S. cerevisiae* 細胞を、6.2.2 項 (1) と同様に集菌・洗浄して超純水に再懸濁することで所定の細胞濃度に調製し、酸性条件に馴化させることなく直ちに実験に使用した。バイオ吸着実験は、細胞懸濁液と pH 1.0 に調整した酸浸出液を 1 : 2 の割合で混合して開始した。実験の主な初期条件は、溶液体積  $15 \text{ cm}^3$ 、液相 Au(III)イオン濃度  $1.25 \text{ mol}/\text{m}^3$ 、細胞濃度  $(0.5 - 5.0) \times 10^{14} \text{ cells}/\text{m}^3$ 、pH 1.2、温度  $33^\circ\text{C}$  である。実験開始後、サンプルの採取を一定の時間間隔で行い、採取した懸濁液は直ちにフィルターでろ過して、液相の Au 濃度を測定した。

#### (2) *S. algae* による白金族金属イオンの還元・析出

実験操作は酸素濃度 2.5% 以下の嫌氣的雰囲気に保たれたグローブボックス内で行った。静止細胞懸濁液は、対数増殖期末期の *S. algae* 細胞を遠心分離により集菌し、リン酸 (Na-K) 緩衝液 ( $100 \text{ mol}/\text{m}^3$ , pH 7.0) による洗浄を 2 回行い、洗浄細胞を緩衝液に再懸濁することで調製し、直ちに実験に使用した。懸濁液の細胞濃度は、Petroff-Hausser 細菌計算盤を用いてビデオ装

置付き光学顕微鏡下で計測し、緩衝液で所定の濃度に適宜希釈して調整した。実験は、静止細胞懸濁液に所定濃度となるように電子供与体（ギ酸ナトリウム）および pH 調整後の使用済み自動車触媒の酸浸出液を添加・混合して開始し、N<sub>2</sub> ガスを反応容器に流通させ嫌気状態を保持した。実験の初期条件は、溶液体積 15 cm<sup>3</sup>、細胞濃度 5.0×10<sup>15</sup> cells/m<sup>3</sup>、電子供与体濃度 200 mol/m<sup>3</sup>、pH 6.0 である。初期液相 PGMs イオン濃度は、Pd(II) 0.96 mol/m<sup>3</sup>、Pt(IV) 0.27, Rh(III) 0.14 mol/m<sup>3</sup> であった。実験開始後、サンプルの採取を一定の時間間隔で行い、採取した懸濁液は直ちにフィルター（孔径 0.2 μm、セルロース混合エステル製）でろ過して、液相の Pt 濃度を測定した。

### (3) 連続操作によるバイオ還元・析出

反応器は、連続式攪拌槽型反応器（CSTR）を用いた。イオン交換水を用いて、十分に定常状態とした反応器に pH 調整後の使用済み自動車触媒の酸浸出液、ギ酸塩水溶液、および前項と同様に準備した *S. algae* 静止細胞懸濁液を嫌气的条件下で連続的に供給し、反応器内で完全に混合することで、反応を開始した。操作条件は、室温、溶液 pH 6.0、供給細胞濃度 5.0×10<sup>15</sup> cells/m<sup>3</sup>、供給 PGM イオン濃度 1.4 mol/m<sup>3</sup>、供給ギ酸塩濃度 100 mol/m<sup>3</sup> とし、供給速度を調整することにより平均滞留時間を 0.5 - 10 min まで変化させた。反応器内の状態を評価するため、反応器出口で連続的に排出される懸濁液の濁度（OD<sub>1100</sub>）を測定した。反応器出口で採取したサンプルは、直ちに細孔径 0.20 μm のセルロースエステル製フィルターでろ過し、ろ液中の PGMs イオン濃度を測定した。

#### 7.2.4 分析方法

液相 Pt イオン濃度および細胞の王水浸出液の Pt 濃度の測定には、誘導結合プラズマ発光分析装置（ICP-AES）（ICPE-9000、島津製作所を使用した）。

実験に使用した細胞は、走査型透過電子顕微鏡（STEM, JEOL model JEM2100FX）により観察し、付属するエネルギー分散型 X 線分析装置（EDX, JED-2300T）により、生成した粒子を分析した。

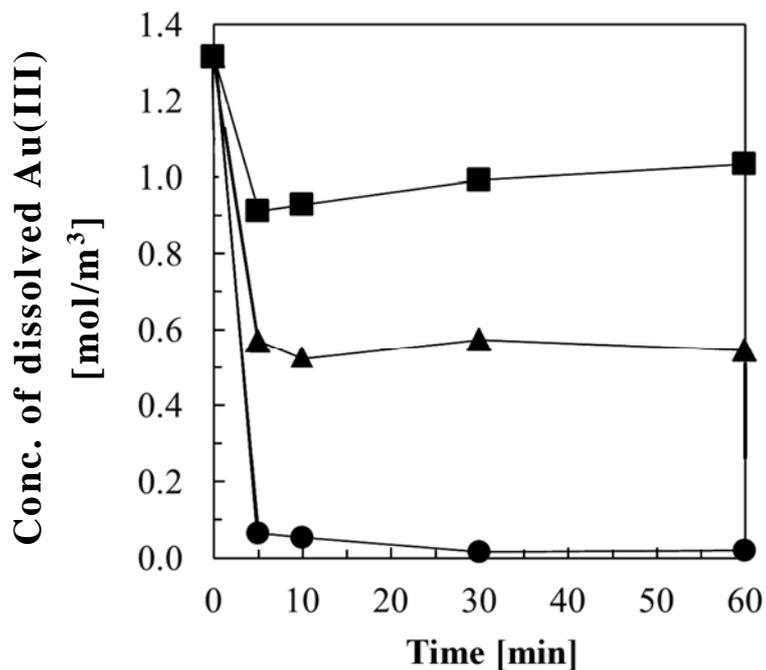
## 7.3 実験結果および考察

### 7.3.1 使用済み電子部品の酸浸出液からの Au(III)イオンのバイオ分離・回収

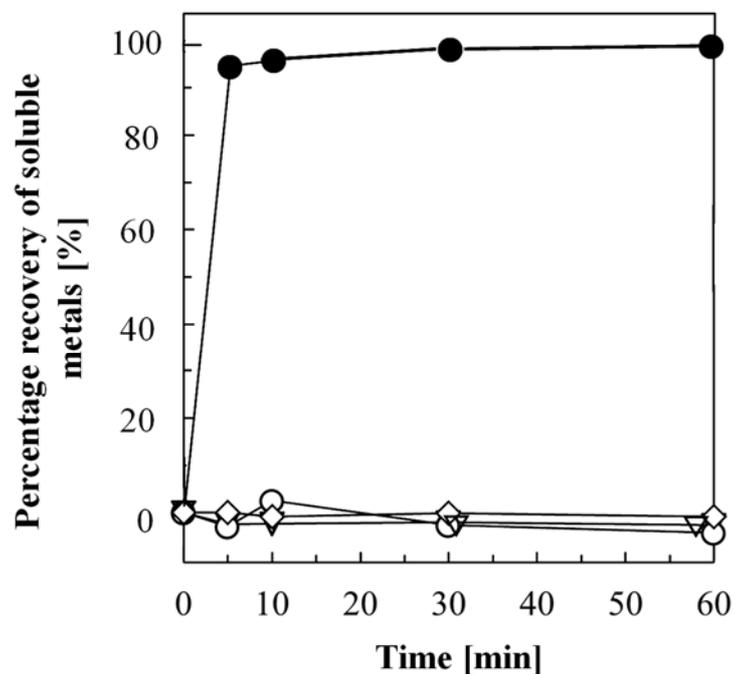
Figure 7.1 に *S. cerevisiae* 静止細胞による WEEE（廃 CPU）の酸浸出液から

の Au(III)イオンのバイオ吸着における液相 Au(III)イオン濃度の経時変化を示す。実験条件は初期 Au(III)イオン濃度  $1.25 \text{ mol/m}^3$ 、pH 1.2、温度  $33^\circ\text{C}$  で、電子供与体は無添加である。*S. cerevisiae* は pH 1.2 に調整された高塩濃度の強酸性浸出液中においても Au(III)イオンを回収できることが明らかとなった。細胞濃度を  $1.0 \times 10^{14} \text{ cells/m}^3$  から  $5.0 \times 10^{14} \text{ cells/m}^3$  に増加することにより、液相 Au(III)イオンの減少が顕著となった。*S. cerevisiae* の乾燥細胞質量当たりの細胞数は  $3.1 \times 10^{10} \text{ cells/g-drycells}$  であるため、*S. cerevisiae* 乾燥細胞当たりの Au(III)イオンの回収量は 16.0 - 23.6 mg-Au/g-drycells と求められる。この値は、陰イオン交換樹脂による電子部品の王水浸出液からの Au(III)イオンの回収量 19.0 - 19.7 mg-Au/g [4] に匹敵する。

Figure 7.2 に *S. cerevisiae* による WEEE の酸浸出液からの Au(III)イオンの選択的な回収挙動を示す。pH 1.2 において  $5.0 \times 10^{14} \text{ cells/m}^3$  の *S. cerevisiae* 細胞を添加することにより、初期濃度  $1.25 \text{ mol/m}^3$  の Au(III)イオンの 98% を 10 min で回収することができたのに対し、Cu(II), Ni(II), Fe(III)イオン (Cu  $4.93 \text{ mol/m}^3$ , Ni  $22.5 \text{ mol/m}^3$ , Fe  $35.6 \text{ mol/m}^3$ ) の吸着は認められなかった。既往の研究より、*S. cerevisiae* 細胞の電荷ゼロ点 (PZC) は概ね pH 4.0 であり [5]、pH 1.2 では *S. cerevisiae* 細胞表面は正に帯電していると考えられる。WEEE の酸浸出液において Au(III)イオンはテトラクロロ錯イオン ( $\text{AuCl}_4^-$ ) として存在するため、正帯電の *S. cerevisiae* 細胞とアニオンであるテトラクロロ Au(III)イオンの間に静電的な吸引力が働き、*S. cerevisiae* による Au(III)イオンのバイオ吸着を促進したと考えられる。これに対し、Cu(II), Ni(II), Fe(III)イオンは、強酸性水溶液中では主に正帯電のカチオンとして存在するために静電的な斥力によりバイオ吸着が妨げられ、Au(III)イオンの選択的な回収に繋がったと考えられる。強酸性の酸浸出液における迅速な Au(III)イオンの選択的回収は、WEEE からの Au の商業的なバイオ回収プロセスとしての可能性を示していると考えられる。



**Figure 7.1** Microbial adsorption of Au(III) ions in an aqua regia leachate of CPU with pH 1.2 at 33°C; (●)  $5.0 \times 10^{14}$  cells/m<sup>3</sup> *S. cerevisiae* cells; (▲)  $1.0 \times 10^{14}$  cells/m<sup>3</sup> *S. cerevisiae* cells; (■)  $0.5 \times 10^{14}$  cells/m<sup>3</sup> *S. cerevisiae* cells.



**Figure 7.2** Selective recovery of Au(III) ions in an aqua regia leachate of CPU with pH 1.2 at 33°C and  $5.0 \times 10^{14}$  cells/m<sup>3</sup> *S. cerevisiae* cells; (●) gold; (○) copper; (▽) nickel; (◇) iron.

### 7.3.2 使用済み自動車触媒からの白金族金属イオンのバイオ分離・回収

PGMs イオンバイオ回収の前処理として使用済み自動車触媒から PGMs を水溶液中に抽出するため、純水で 50% に希釈した王水を用いた酸浸出処理を行った。この方法により大気圧下において 60°C, 24 h で Pd, Pt, Rh の 95% 以上が浸出された (Figure 7.3(A))。一方、この処理において、Fe の浸出率は 80%、希土類 (Ce, La) と Mg の浸出率は 50% 以下にとどまった (Figure 7.3(B))。使用済み自動車触媒に最も多く含まれる Al の浸出率は 5% で Si の浸出は認められなかった。この酸浸出液にリン酸ナトリウムを添加後、水酸化ナトリウム水溶液により pH 6 に調整した。この pH 調整において、酸浸出液中の Ce, La, Al, Fe はリン酸塩として沈殿・除去されたが、Mg イオンは PGMs イオンと共に酸浸出液中に残留した。pH 調整・ろ過後の酸浸出液に *S. algae* 静止細胞懸濁液と電子供与体 (ギ酸ナトリウム) を添加してバイオ還元による PGMs イオンの回収実験を行った。その結果、この酸浸出液 (初期液相 PGMs イオン濃度、Pd(II) 0.96 mol/m<sup>3</sup>, Pt(IV) 0.27, Rh(III) 0.14 mol/m<sup>3</sup>) から、30 min 以内に PGMs イオンの 95% 以上を回収できた (Figure 7.4)。同時に、実験中の懸濁液の色は橙色から黒色に変化し、PGMs ナノ粒子の生成が示唆された。一方、*S. algae* を添加しないギ酸塩による無菌化学対照実験において PGMs イオンの還元は認められなかった。したがって、観測された液相 PGMs イオンの迅速な回収は、ギ酸塩による PGMs イオンの還元を *S. algae* が触媒することによると考えられる。また、pH 調整後の酸浸出液には PGMs に対して大過剰 (37.3 mol/m<sup>3</sup>) の Mg(II) イオンが含まれるが、*S. algae* による Mg(II) イオンの回収は認められなかった。このように、酸浸出、pH 調整、バイオ回収の一連の操作により、使用済み自動車触媒から PGMs を選択的に回収できた。

Figure 7.5 に使用済み自動車触媒の酸浸出液におけるバイオ回収実験後の *S. algae* 細胞の STEM 像を示す。*S. algae* 細胞にはナノ粒子が均一に析出しており (Figure 7.5(A))、高倍率の像からナノ粒子の一次粒子径が約 10 nm であることが判る (Figure 7.5(B))。*S. algae* 細胞における Pd, Pt, Rh の EDX マッピング像 (Figure 7.5(D-F)) は暗視野像 (Figure 7.5(C)) のナノ粒子 (白色部分) と一致しており、ナノ粒子は Pd, Pt, Rh の 3 元素からなると同定できる。このことから、高塩濃度の酸浸出液においても *S. algae* 静止細胞が PGMs イ

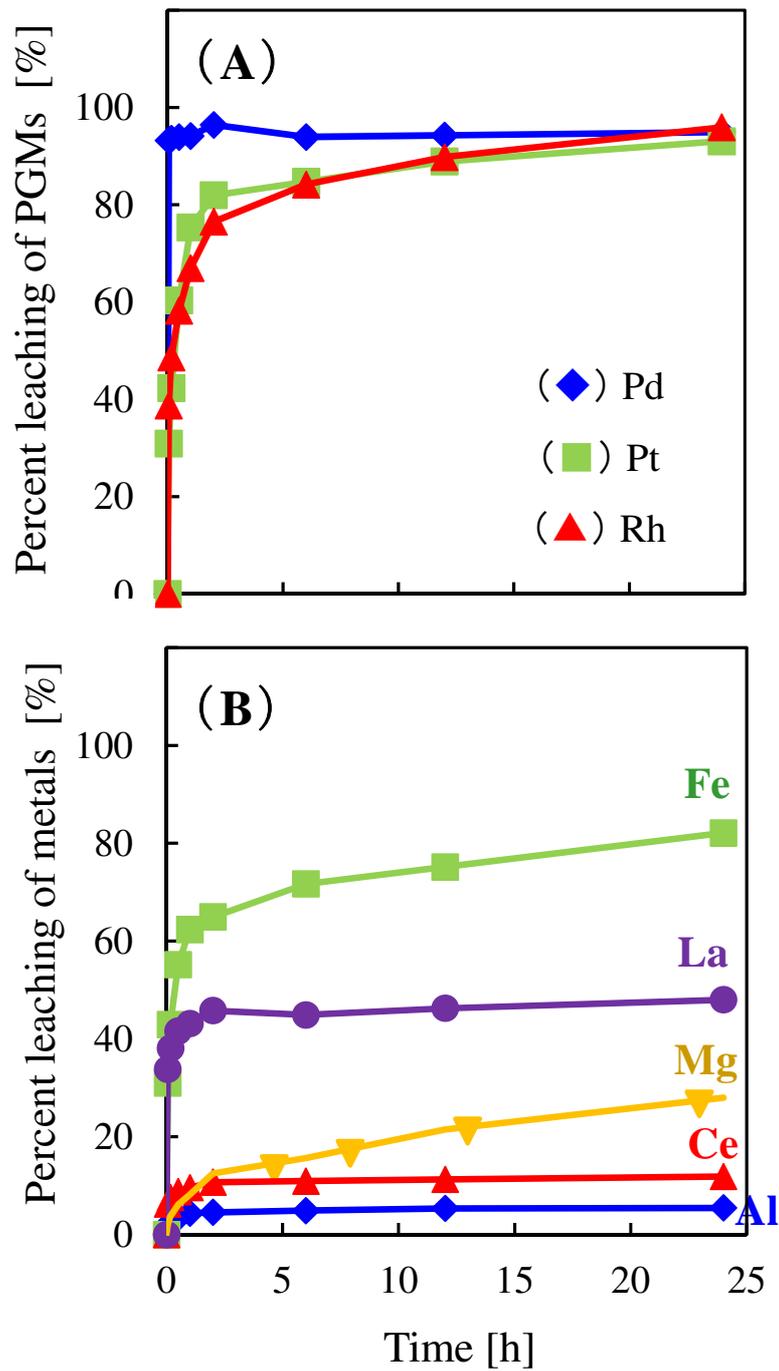
オンを還元し、細胞上にナノ粒子として回収できることが明らかとなった。*Tamaoki et al.*は *S. algae* 静止細胞によるヘキサクロロロジウム酸水溶液からの Rh(III)イオンのバイオ還元を報告しているが、90 min における Rh(III)イオンの還元率は約 50%に留まっている [6]。PGMs の 3 成分混合系である酸浸出液におけるバイオ還元実験の結果は、単独系では不完全である Rh(III)イオンのバイオ還元が、Pd(II)イオン、Pt(IV)イオンと共存することにより迅速に進行する可能性を示唆しており、バイオ還元メカニズムを考察する上で興味深い。

多量の酸浸出液を処理するため、連続式攪拌槽型反応器 (CSTR) を用いたバイオ回収実験を行った。実験は pH 調整後の使用済み自動車触媒の酸浸出液、ギ酸塩溶液、*S. algae* 静止細胞懸濁液を嫌氣的条件下で連続的に供給し、PGM を回収した *S. algae* 細胞は処理済液と共に CSTR から連続的に排出し、ろ過により回収した。この条件で PGMs イオン濃度  $1.4 \text{ mol/m}^3$  の酸浸出液を処理したところ、平均滞留時間を 5 min まで短縮しても 95%以上の PGMs イオンを回収できた (Figure 7.6)。さらに、平均滞留時間 1 min では PGMs イオンの回収速度は  $3.5 \text{ kg/h/m}^3$  まで増大した。この最大回収速度で  $1 \text{ m}^3$  の CSTR を 1 年間運転したと仮定すると、PGMs イオンの回収量は 21 t となる。2017 年の PGM 消費量が 126 t [7]であることから、バイオ分離剤を用いて使用済み触媒溶解液中の PGMs を実用化レベルの高速・高効率で回収できると考えられる。

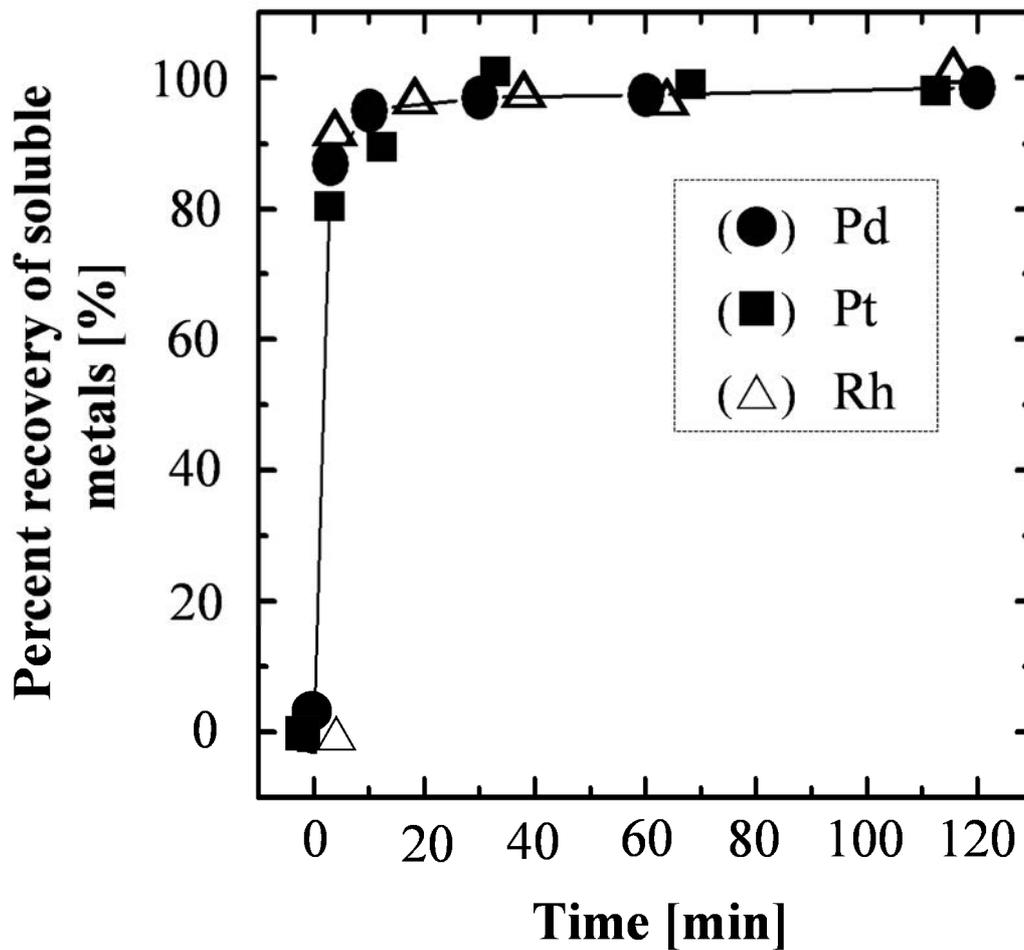
バイオ回収プロセスの後処理として、PGMs 回収後の *S. algae* 細胞を焼成処理し、バルク金属 PGMs としての回収を試みた (Figure 7.7)。使用済み自動車触媒の酸浸出液におけるバイオ還元実験後の *S. algae* 細胞を恒温乾燥機により  $50^\circ\text{C}$  で 20 h 乾燥したところ、この乾燥細胞の PGM の含有率は最大 10%であり、酸浸出液の PGMs 含有率 (500 ppm) に対し、200 倍に濃縮された。さらに、これを焼成処理 ( $1000^\circ\text{C}$ , 3 h) し、 $1 \text{ kmol/m}^3$  の HCl で洗浄することにより、PGMs 含有率 99%の金属塊を得た。PGMs 回収後の *S. algae* 細胞の焼成処理はエネルギーコストが嵩む短所があるが、既往の設備を利用して簡便に PGMs を濃縮できる長所があり、バイオ回収プロセスの後処理として実用的なプロセスの一つと考えられる。

使用済み自動車触媒 1 kg に対し、上記の酸浸出、バッチ法によるバイオ分

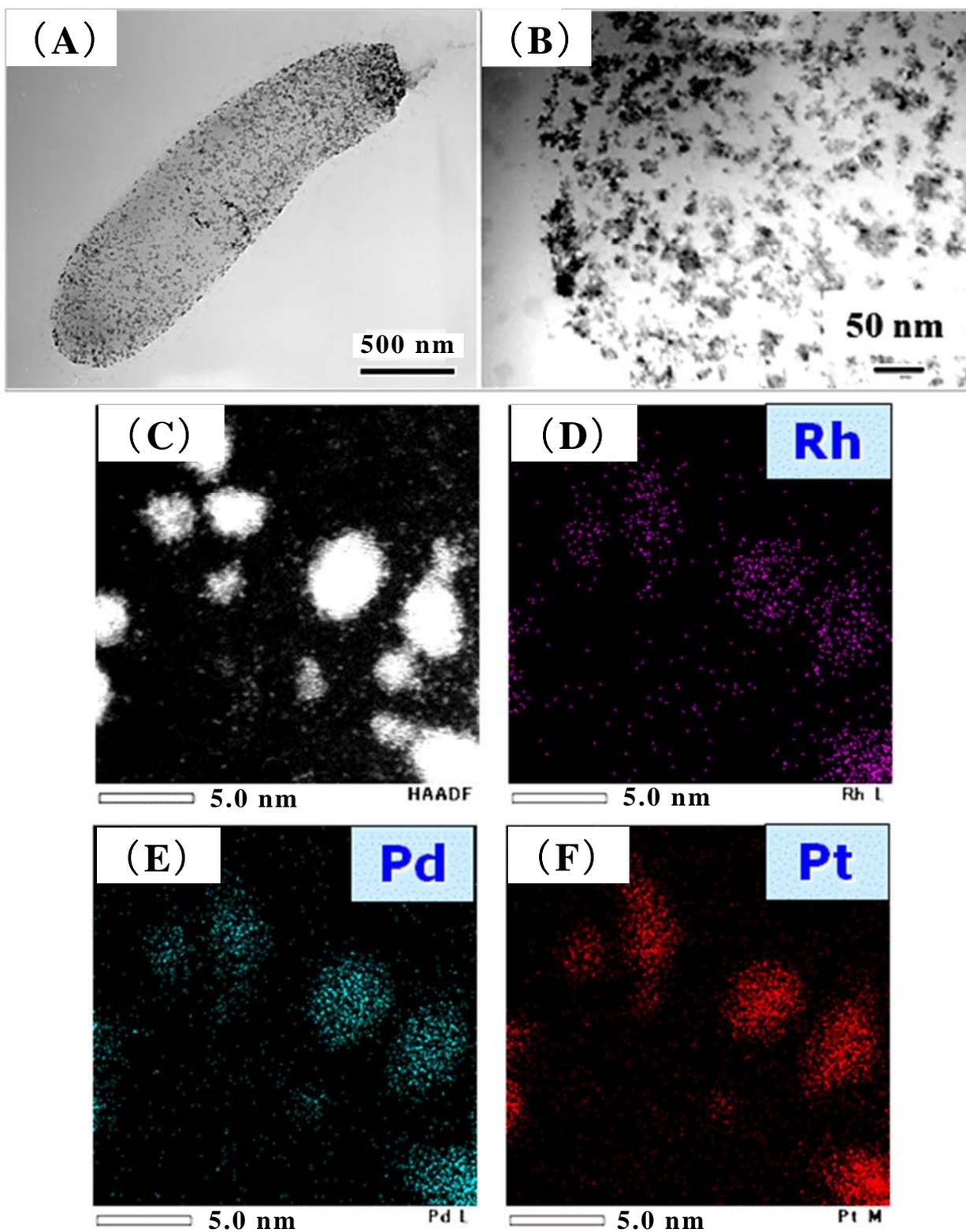
離・回収および PGMs 回収後の焼成の各工程に掛かるコストを概算し、回収される PGMs の価格から採算性を検討した (Table 7.5)。 *S. algae* 細胞は一般的には流通していないため、業者に培養を委託する場合を想定した。計算は実験室スケールであり、人件費、廃液・廃棄物処理費、設備の減価償却は考慮していないが、使用済み自動車触媒 1 kg に対し回収コストは約 500 円である。回収物は PGMs 合金ではあるが、回収率を 100%と仮定すると 2019 年 11 月の各 PGMs の売却想定価格の合計は 16000 円余りであり、概略的な計算においてバイオ回収法の採算性は十分にあると考えられる。



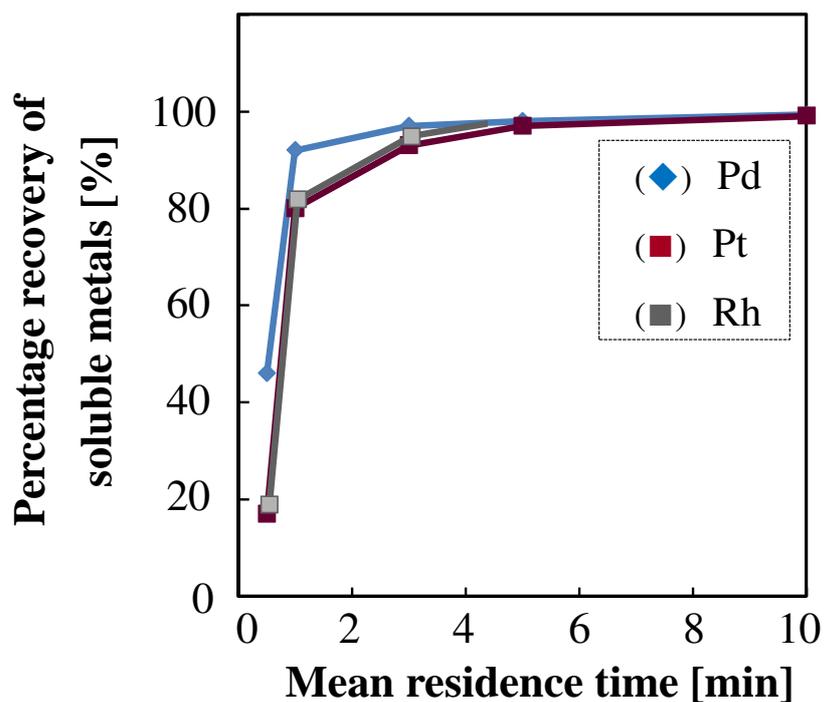
**Figure 7.3** Chemical leaching of ceramic substrate catalyst with a 50% aqua regia at 60 °C and atmospheric pressure; (A) PGMs (Pd, Pt and Rh), (B) Other metals (Al, Ce, Fe, La and Mg).



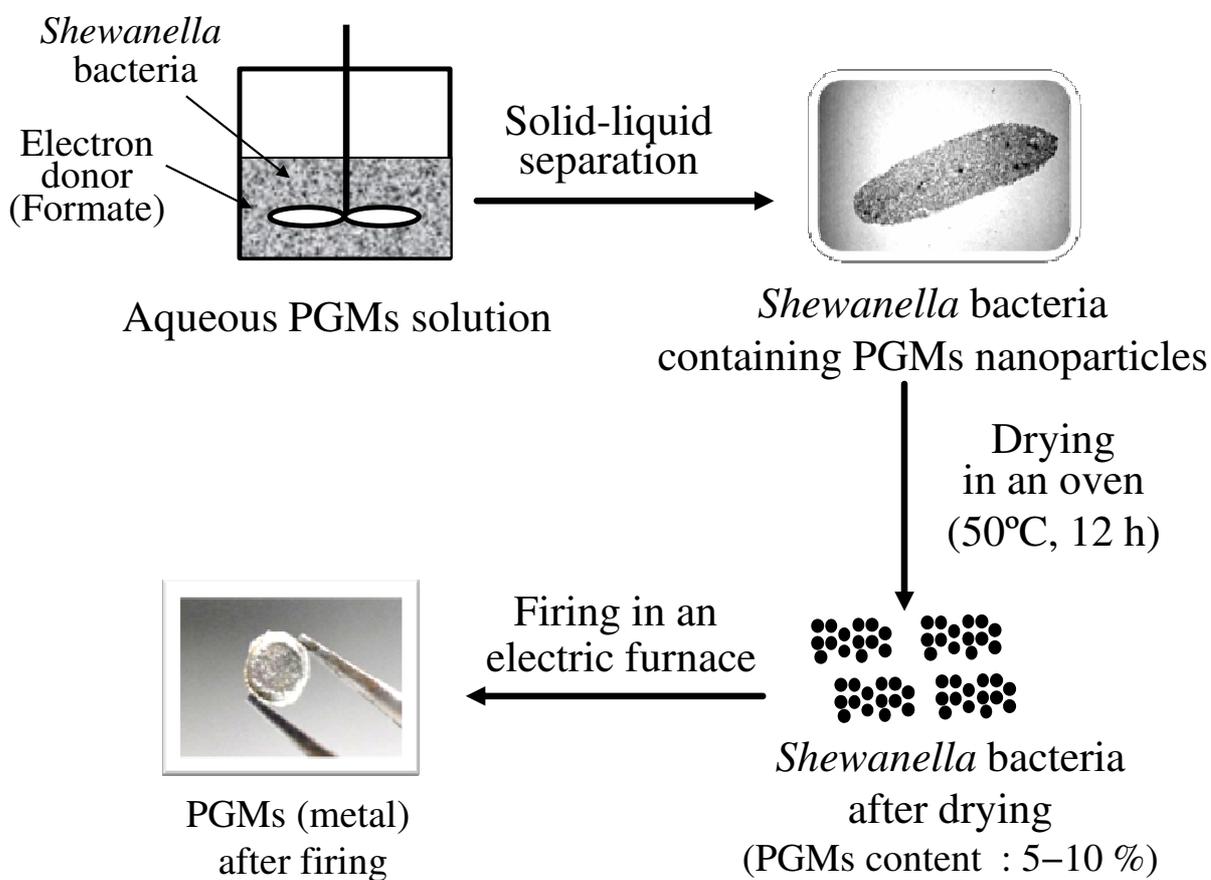
**Figure 7.4** Microbial recovery of PGMs (palladium, platinum and rhodium) from aqua regia leachate of spent automotive catalysts at 25°C, pH 6, an initial formate concentration of 200 mol/m<sup>3</sup>, and 5.0 × 10<sup>15</sup> cells/m<sup>3</sup> *S. algae* cells



**Figure 7.5** (A) and (B) STEM images of an *S. algae* cell after exposure to automotive catalysts leachate for 120 min. (C) Dark-field STEM image of *S. algae* cell after exposure to automotive catalysts leachate for 120 min. (D) – (F) X-ray map of PGMs afforded by EDX analysis.



**Figure 7.6** Microbial recovery of PGMs (Pd, Pt, and Rh) from leaching solution of automotive catalysts in a CSTR at a metal solution feed concentration of  $1.4 \text{ mol/m}^3$ .



**Figure 7.7** Flow diagram of method for concentrating PGMs collected in bacterial cells.

**Table 7.5** Preliminary feasibility study for microbial recovery of PGMs from 1 kg of automotive catalysts in a laboratory scale.

回収コスト				
工程	マテリアル	マテリアルコスト <sup>1)</sup> (円)	エネルギーコスト <sup>2)</sup> (円)	合計
50% 王水浸出, 60°C, 6h, パルプ濃度 20wt%	50%王水 5000 ml	130	25	154
酸性ガス排気装置の稼働			108	108
pH 調整	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1 kg	9		9
	10 kmol/m <sup>3</sup> NaOH 溶液 1120 ml	12		12
バイオ還元	<i>S. algae</i> 乾燥細胞 <sup>3)</sup> 1.5 g	75		75
	5 kmol/m <sup>3</sup> ギ酸 Na 溶液 108 ml	2		2
微生物の遠心分離			32	32
乾燥			37	37
焼成			24	24
合計		228	226	454

1) 工業用グレードの薬剤単価または試薬グレードの薬剤の 1/30 の単価に基づいて計算。

2) 定格消費電力(kW)×電力利用率×使用時間(h)×24 円/kwh (電気代単価: 2016 年主要電力会社 10 社平均単価) [8]

電力利用率 = 各工程における設定温度・回転数・排気風量 / 各機器の最高使用温度・回転数・排気風量

3) *S. algae* 乾燥細胞単価: 50 円/g (培養業者見積り価格より推定)

#### PGMs の売却想定価格

PGMs 含有量 (g)	平均単価 <sup>4)</sup> (円/g)	売却想定価格 (円)
Pd 1.37	6279	8602
Pt 0.81	3222	2610
Rh 0.24	21390	5134
合計		16346

4) 2019 年 11 月の業者間取引参考価格 (田中貴金属工業) <https://tanaka-preciousmetals.com/jp/library/rate/>

#### 7.4 微生物機能を利用した貴金属・レアメタルのリサイクルフロー

Figure 7.8 に貴金属における従来の湿式回収技術と本章のバイオ回収技術の処理フローを比較して示す。従来の湿式回収技術では、浸出液からイオン交換樹脂または溶媒抽出法により貴金属を分離し、続いて分離した貴金属を脱着または逆抽出により別の水溶液（貴液）に濃縮して戻す工程が必要である。これは一般的にイオン交換樹脂や抽出試薬が高価であり、経済的理由からこれらを繰り返し使用する必要があることによる。従来技術ではさらに、貴液から電解採取または化学還元法により貴金属を回収するため工程は複雑となり、エネルギーコスト・試薬コストが嵩むことが商業的リサイクルの妨げとなっている。これに対してバイオ吸着を用いた Au の回収では、浸出液に *S. cerevisiae* 細胞を添加するだけで選択的に Au を *S. cerevisiae* 細胞に吸着できる。*S. cerevisiae* は陰イオン交換樹脂と同等の Au 吸着能を持つ（7.3.1 項）ことに加え、パン酵母として一般に流通しており、食品工場や醸造所で広く扱われているため、安価に大量に入手することが可能である。このため、*S. cerevisiae* による Au のバイオ回収においては細胞を繰り返し使用する必要がなく、Au を吸着した細胞を焼成することで容易に金属 Au を回収できる。このように、*S. cerevisiae* による Au のバイオ吸着を用いた回収技術は従来の湿式回収技術の工程を簡略化し、Au の商業的リサイクルにおける一つの有望な基礎技術であると考えられる。また、現在は需要が少ない Au ナノ粒子であるが、将来的な触媒用途としての需要に対し、*S. cerevisiae* や *S. algae* のバイオ還元・析出を利用して Au をナノ粒子として回収するバイオ回収法も興味深い。

貴金属におけるリサイクル率の向上について回収物に付加価値を付けることは重要である。PGMs 三元素（Pt, Pd, Rh）は触媒用途としての需要が大きいため、これらをナノ粒子として回収する意義は大きい。現在、PGMs 触媒は物理・化学的合成法で生産されているが、従来の湿式回収技術により PGMs を回収して触媒としてリサイクルする場合、回収した PGMs をナノ粒子化する工程がさらに必要となる。Figure 7.8 では省略しているが一般的にこれらの合成法は複数の工程が必要であり、ナノ粒子同士の凝集を防ぐ保護材の添加に加え、PGMs イオンの還元や粒子表面の清浄化のために加熱が必要である。一方、Fe(III)イオン還元細菌のバイオ還元・析出を利用するバイオ回収法は、

浸出液の pH 調整と電子供与体の添加が必要になるが、希薄溶液からの PGMs の分離・濃縮工程からナノ粒子調製工程に至る多段階工程をワンステップで達成できる統合プロセスである。バイオ還元・析出は常温・常圧下での微生物反応であるため、バイオ回収処理に投入されるエネルギー量や化学物質量は従来法に比べて少なく、必然的に副生する廃熱や廃棄物も少ない特徴をもつ。さらに、Fe(III)イオン還元細菌による PGMs イオンの還元速度は室温においても十分に速く、7.3.2 項で述べたように国内の PGMs 需要に対して十分な生産性を確保できると考えられる。このように、バイオ還元・析出を用いた回収技術は貴金属の商業的リサイクルにおける一つの有望な基礎技術であるのみならず、環境調和型のナノ粒子合成法としても、貴金属の持続的サプライチェーンの構築に寄与できると考えられる。

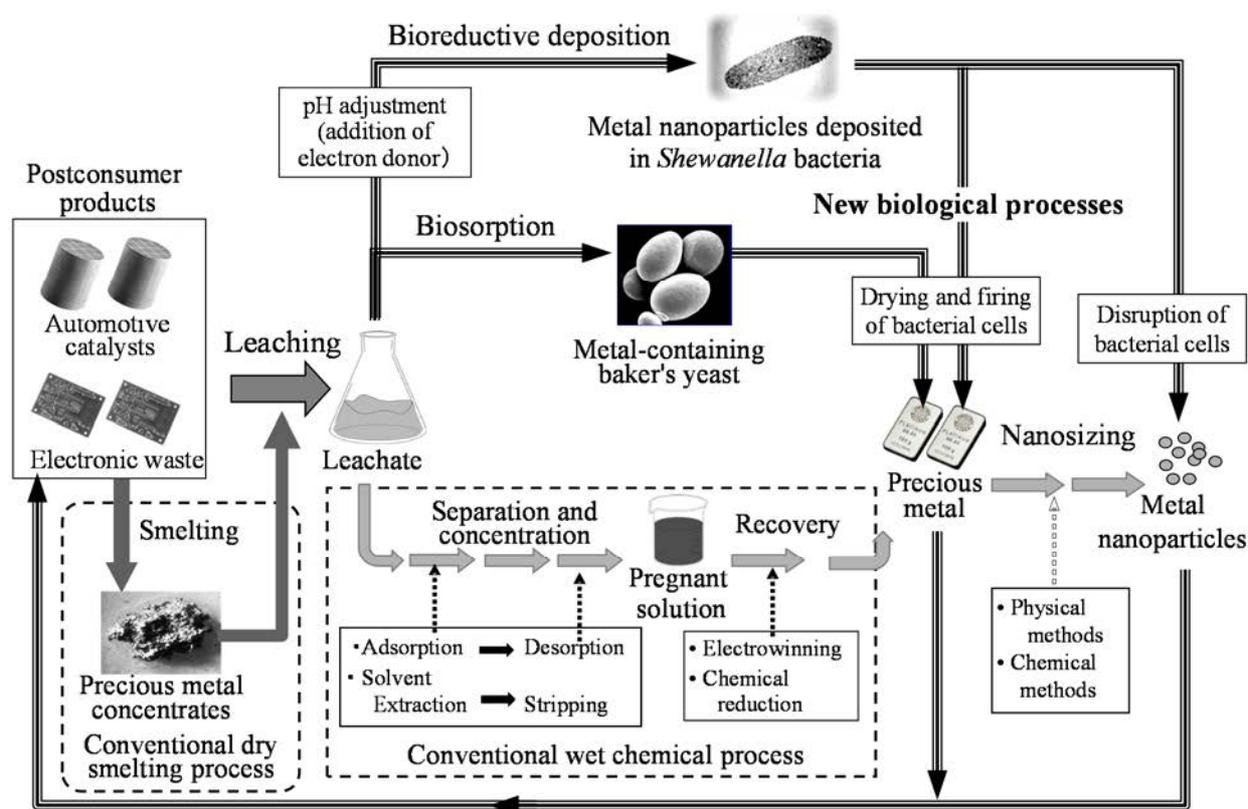


Figure 7.8 Recycling flows of precious metals using the new and conventional technologies.

## 7.5 結言

パン酵母によるバイオ回収法を用いた WEEE からの Au のリサイクルおよび還元細菌 *S. algae* によるバイオ回収法を用いた使用済み自動車触媒からの PGMs (Pd, Pt, Rh) のリサイクルについて以下の知見を得た。

- (1) *S. cerevisiae* 静止細胞は、使用済み電子部品の王水溶解液 (pH 1.2 に調整、Au 濃度  $1.25 \text{ mol/m}^3$ 、Cu 濃度  $4.93 \text{ mol/m}^3$ 、Ni 濃度  $22.5 \text{ mol/m}^3$ 、Fe 濃度  $35.6 \text{ mol/m}^3$ ) に対し、10 min 以内の回分操作で 98% の Au(III)イオンを選択的に回収できることが明らかとなった。*S. cerevisiae* 乾燥細胞当たりの Au(III)イオンの回収量は 16.0 - 23.6 mg-Au/g-dry cells であり、陰イオン交換樹脂に匹敵する吸着容量することも明らかにした。
- (2) WEEE の酸浸出液中に多量に存在する Cu(II), Ni(II), Fe(III)イオンについて、*S. cerevisiae* 細胞による吸着は認められなかった。強酸性の酸浸出液における迅速な Au(III)イオンの選択的回収は、バイオ回収法の実用化に向けて好材料となる。
- (3) *S. algae* 静止細胞は pH 6.0 に調整された高塩濃度の使用済み自動車触媒の溶解液においても、バイオ還元・析出により PGMs イオンを回収できることが明らかとなった。具体的には、初期液相 PGMs イオン濃度、Pd(II)  $0.96 \text{ mol/m}^3$ 、Pt(IV)  $0.27$ 、Rh(III)  $0.14 \text{ mol/m}^3$  の酸浸出液から、30 min 以内に PGMs イオンの 95%以上を回収できた。酸浸出、pH 調整、バイオ回収の一連の操作により、使用済み自動車触媒から PGMs を選択的に回収できた。
- (4) pH 調整後の使用済み自動車触媒の酸浸出液に対して連続式攪拌槽型反応器 (CSTR) を用いたバイオ回収実験において、PGM イオンの最大回収速度は  $3.5 \text{ kg/h/m}^3$  に達した。この結果と国内 PGMs 年間需要量と比較検討することにより、バイオ分離剤を用いて使用済み触媒溶解液中の PGMs を実用化レベルの高速・高効率で回収できることを明らかにした。
- (5) バイオ回収プロセスの後処理として、PGMs 回収後の *S. algae* 細胞を焼成処理し、PGMs 含有率 99% の PGM 金属塊を得た。PGMs 回収後の *S. algae* 細胞の焼成処理はバイオ回収プロセスの後処理として実用的なプロセスの一つと考えられる。

## References

- [1] N. J. Creamer, V. S. Baxter-Plant, J. Henderson, M. Potte, L. E. Macaskie, *Biotechnol. Lett.* **28** (2006) 1475-1484.
- [2] P. Yong, N. A. Rowson, J. P. G. Farr, I. R. Harris, L. E. Macaskie, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77** (2002) 593-601.
- [3] P. Yong, N. A. Rowson, J. P. G. Farr, I. R. Harris, L. E. Macaskie, *Biotechnol. Bioeng.* **80** (2002) 369-379.
- [4] P. Cyganowski, K. Garbera, A. Les´niewicz, J. Wolska, P. Pohl, D. Jermakowicz-Bartkowiak, *J. Saudi Chem. Soc.* **21** (2017) 741-750.
- [5] P. B. Dengis, L. R. Nelissen, P. G. Rouxhet, *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (1995) 718-728.
- [6] K. Tamaoki, N. Saito, T. Nomura, Y. Konishi, *Hydrometallurgy* **139** (2013) 26-29.
- [7] 鉍物資源マテリアルフロー 2018, 独立行政法人石油天然ガス・金属鉍物資源機構  
[http://mric.jogmec.go.jp/wp-content/uploads/2019/03/material\\_flow2018\\_PGM.pdf](http://mric.jogmec.go.jp/wp-content/uploads/2019/03/material_flow2018_PGM.pdf).  
(2018) .
- [8] 電気事業便覧 2017 年版, 経済産業省 資源エネルギー庁  
[https://www.enecho.meti.go.jp/category/electricity\\_and\\_gas/electric/denkijigyobinran/zip/2017\\_dl.zip](https://www.enecho.meti.go.jp/category/electricity_and_gas/electric/denkijigyobinran/zip/2017_dl.zip) (2018) .

## 第8章 結論

有用金属の安定的な供給の確保は、日本の産業基盤の維持および経済の持続的な発展のためにより一層重要となっている。バイオ浸出において有用金属の浸出効率を改善し、黄銅鉱 ( $\text{CuFeS}_2$ ) を含む低品位硫化鉱や海底熱水鉱床鉱石に対して適用を広げていくことは、経済的理由で未利用となっている金属資源に対する高効率で経済的なバイオ分離・回収技術の確立に繋がり、将来的なベースメタルの安定的な供給に資すると考えられる。貴金属・レアメタルの供給リスクや価格変動リスクを払拭するために新規リサイクル技術への期待が高まっているが、微生物機能を活用したバイオ分離・回収法は希薄溶液に対して効果的であるため、都市鉱山からの貴金属の湿式リサイクルに貢献できると期待される。さらに、貴金属イオンのバイオ還元・析出においてはワンステップで貴金属ナノ粒子を生産することで回収する金属に触媒等の付加価値を与えることも可能であり、商業的に貴金属のリサイクルを進めるには有効と考えられる。

本論文は、従来型の化学的方法や物理的方法に比べて低コスト・低エネルギー・低炭素型である微生物的方法に着目し、微生物機能を活用した有用金属 ( $\text{Cu}$ ,  $\text{Zn}$ ,  $\text{Pd}$ ,  $\text{Pt}$ ,  $\text{Rh}$ ,  $\text{Au}$ ) の湿式分離・回収について工学的観点から基礎的知見を収集した成果をまとめたものである。まず、無機硫黄/鉄イオン酸化古細菌を用いる低品位硫化鉱石からのベースメタル ( $\text{Cu}$ ,  $\text{Zn}$ ) 等の浸出挙動について明らかにした。次に、 $\text{Fe(III)}$ イオン還元細菌が貴金属・レアメタル ( $\text{Au}$ ,  $\text{Pd}$ ,  $\text{Pt}$ ,  $\text{Rh}$ ) イオンを還元・析出できることを見出し、この微生物機能をベースにした都市鉱山からの貴金属・レアメタル分離・回収について考察した。さらに、パン酵母が貴金属 ( $\text{Au}$ ) イオンを吸着または還元・析出できることも見出し、この微生物機能を利用する都市鉱山からの貴金属リサイクルについても考察を加えた。本論文の各章の研究成果は以下のとおりである。

第1章では、有用金属の世界的な供給事情と国内の貴金属需給状況から有用金属の安定供給における課題を明らかにし、これに対する微生物機能を利用した未利用有用金属資源に対する分離・回収技術、および都市鉱山からのリサイクル技術の可能性を指摘するとともに、既往の研究を概観して関連分野における研究課題を明らかにした。

第 2 章では、将来的に有望な有用金属資源である低品位黄銅鉱 ( $\text{CuFeS}_2$ ) 鉱石 (海底熱水鉱床鉱石、酸化鉄型銅金鉱床鉱石) に対して、好熱性・鉄/硫黄酸化古細菌 *Acidianus brierleyi* による有用金属の浸出挙動を明らかにし、効率的な浸出条件について検討した。海底熱水鉱床鉱石 (粉碎試料 38 - 53  $\mu\text{m}$ ) に対しては、*A. brierleyi* の代謝作用によってベースメタル ( $\text{Cu}$ ,  $\text{Zn}$ ) の浸出が著しく促進され、気泡攪拌槽における 10 d の回分操作 (65°C、溶液 pH 1.2 - 2.0、初期鉱石 - 溶液混合比 5 - 40  $\text{kg}/\text{m}^3$ ) において両金属浸出率は 80% を超えることを明らかにした。なお、共存物である  $\text{Au}$  ならびに脈石 ( $\text{SiO}_2$ ) は溶出せずに浸出残渣に濃縮されることを示した。実用的な浸出条件として、浸出液の基礎無機塩濃度を 1/10 に低減した場合でも、*A. brierleyi* の増殖ならびにベースメタル浸出に悪影響は無いが、浸出液中の  $\text{NaCl}$  濃度を 0.05  $\text{kmol}/\text{m}^3$  以下とする必要があることがわかった。

磁鉄鉱 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) を主体とする酸化鉄型銅金鉱床鉱石 (粉碎試料 53 - 75  $\mu\text{m}$ ) に対しては、*A. brierleyi* による直接浸出機構が有効に機能し、 $\text{Cu}$  が選択的に浸出されることが明らかになった。さらに、鉱石堆積層 (ヒープ) を模したカラム型固定層浸出装置を用いた実験においても良好な  $\text{Cu}$  の選択的浸出結果を得たことから、工業的規模の低品位一次硫化鉄のヒープに対して *A. brierleyi* を浸出用微生物として適用できることが示唆された。

第 3 章では、淡水性  $\text{Fe(III)}$  イオン還元細菌 *Shewanella oneidensis* 静止細胞による  $\text{Pd(II)}$  イオンの還元・析出と、 $\text{Pd}$  ナノ粒子の調製における操作条件および  $\text{Pd}$  ナノ粒子の触媒活性について検討した。その結果、*S. oneidensis* は、温和な条件下 (温度 25°C、溶液 pH 7.0) で乳酸塩またはギ酸塩を電子供与体として用いて液相  $\text{Pd(II)}$  イオンを迅速に還元し、一次粒子径 4 - 10 nm の  $\text{Pd}$  ナノ粒子をペリプラズム空間 (細胞外膜と内膜に挟まれたナノ空間) に合成できることを明らかにした。特に、電子供与体として 50  $\text{mol}/\text{m}^3$  ギ酸塩を添加した場合、5.0  $\text{mol}/\text{m}^3$   $\text{Pd(II)}$  イオンのバイオ還元・析出が 15 min 以内に完了した。また、初期液相  $\text{Pd(II)}$  濃度はバイオ合成  $\text{Pd}$  ナノ粒子の粒子径および分散性に影響を及ぼす重要な操作因子であり、初期液相  $\text{Pd(II)}$  イオン濃度 20  $\text{mol}/\text{m}^3$  の場合には  $\text{Pd}$  ナノ粒子 (中位径 7.0 nm、幾何標準偏差 1.4 nm) を合成することができた。次に、このバイオ合成  $\text{Pd}$  ナノ粒子を乾燥 *S. oneidensis* 細胞に担持した状態で燃料電池の電極触媒として利用した。バイオ調製  $\text{Pd}$

触媒は、固体高分子形燃料電池（PEFC）の水素極における H<sub>2</sub> 酸化反応において、市販 Pd 触媒（炭素担持）に対して約 90%の発電力を示した。また、*S. oneidensis* 細胞に担持した Pd ナノ粒子は、モデル化学反応（Cr(VI)イオン液相還元）において市販 Pd 触媒（炭素担持）に比べて高い触媒活性を示し、不均一触媒としても応用できることがわかった。

第 4 章では、海洋性 Fe(III)イオン還元細菌 *Shewanella algae* 静止細胞による Pt(IV)イオンの還元・析出について述べた。*S. algae* は、温和な条件下（温度 25°C、溶液 pH 7.0）において、乳酸塩を電子供与体として用いて 1.1 mol/m<sup>3</sup> Pt(IV)イオンの 90%を 60 min の短時間で還元し、細菌細胞ペリプラズム空間に Pt ナノ粒子を合成することを発見した。

第 5 章では、海洋性 Fe(III)イオン還元細菌 *S. algae* 静止細胞と電子供与体 H<sub>2</sub> が共存する中性溶液の場合には、温度 25°C で 30 min 以内に 0.1 - 1.0 mol/m<sup>3</sup> Au(III)イオンがほぼ完全に還元され、細菌細胞ペリプラズムに Au ナノ粒子を析出することを明らかにした。また酸性溶液（pH 2.0 - 2.8）の場合には、10 min 以内に *S. algae* 静止細胞は Au(III)イオンを還元して Au ナノ粒子凝集体または三角板状 Au 単結晶を細胞外に合成したことから、溶液 pH が Au ナノ粒子の生成場と形体に大きく影響を与えることがわかった。さらに、淡水性 Fe(III)イオン還元細菌 *S. oneidensis* 静止細胞は、電子供与体にギ酸塩を用いて中性溶液中の 0.49 mol/m<sup>3</sup> Au(III)イオンを効率よく還元し、細胞に Au ナノ粒子を析出することがわかった。また、Au ナノ粒子の粒子径は初期ギ酸塩濃度および操作時間の影響を受けて変化し、その平均粒子径が 3.8 nm - 14.2 nm の範囲内で変化した。*Shewanella* 属細菌による Au(III)イオンの還元機構については、*S. algae* がヒドロゲナーゼの触媒作用により Au(III)イオンを 10 min 以内の極めて短時間で還元するのに対し、*S. oneidensis* では吸着からギ酸デヒドロゲナーゼが触媒する還元へと逐次的に反応が進行することが示唆された。

第 6 章では、バイオ分離剤として低コストで大量入手できるパン酵母（食品分野の普及品）に着目し、パン酵母による Au(III)イオンの吸着および還元・析出について検討した。温度 33°C においてパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 静止細胞には、酸性溶液（pH 1.0）中の 1.1 mol/m<sup>3</sup> Au(III)イオンを吸着する機能とともに、中性溶液中の 1.3 mol/m<sup>3</sup> Au(III)イオンを電子供与体

にギ酸塩を用いて還元し Au ナノ粒子 (10 - 20 nm) を細胞表面に析出する機能が備わっていることを見出した。

第7章では、3章～6章の研究結果を踏まえ、使用済み製品溶解液からの貴金属・レアメタル (Au, Pd, Pt, Rh) のバイオフィン・回収について実用化の観点から検討した。その結果、使用済み電子部品の王水溶解液 (pH 1.2 に調整、Au 濃度 1.25 mol/m<sup>3</sup>、Cu 濃度 4.93 mol/m<sup>3</sup>、Ni 濃度 22.5 mol/m<sup>3</sup>、Fe 濃度 35.6 mol/m<sup>3</sup>) を対象に、10 min 以内の回分操作で、パン酵母 *S. cerevisiae* 静止細胞を用いて酸性溶解液中の Au(III)イオンの98%を選択的に吸着分離できることを示した。これに加えて *S. cerevisiae* 乾燥細胞あたりの Au(III)イオン回収量は陰イオン交換樹脂の吸着容量に匹敵することも明らかにした。このように強酸性実液中の Au(III)イオンを迅速・高効率かつ選択的に回収できる点は、バイオフィン回収法の実用化に向けて好材料となる。

また、使用済み自動車用触媒の溶解液 (pH 6.0 に調整、Pd 濃度 0.96 mol/m<sup>3</sup>、Pt 濃度 0.27 mol/m<sup>3</sup>、Rh 濃度 0.14 mol/m<sup>3</sup>) を対象に、連続操作における平均滞留時間が 5 min の場合でも、還元細菌 *S. algae* 静止細胞を用いて供給液中の白金族金属 (PGMs) イオン (Pd(II), Pt(IV), Rh(III)) の95%以上を還元・析出できることを明らかにした。貴金属・レアメタルのバイオフィン速度 (3.5 kg-PGMs/(h·m<sup>3</sup>)) を国内 PGMs 年間需要量と比較検討した結果、使用済み触媒溶解液からの PGMs のバイオフィン操作は実用化レベルの高速・高効率に実施できることがわかった。さらに、微生物細胞に分離濃縮された PGMs は、処理液から固液分離した湿潤細胞を乾燥・焼成することにより、金属塊として回収することができた。以上の研究成果をまとめ、Table 8.1 に示す。

以上のように、微生物機能を利用した未利用鉱物資源や都市鉱山からの有用金属 (Cu, Zn, Pd, Pt, Rh, Au) の分離回収方法に関して、基礎的な操作因子 (初期鉱石-溶液混合比、初期菌体濃度、溶液 pH、初期金属イオン濃度、電子供与体の種類とその濃度、反応時間等) を明らかにし、実用的な回収プロセスとしての可能性を示した。今後の研究課題として、未利用資源からの有用金属のバイオフィンについては実験室レベルからパイロットプラントレベルへのスケールアップが必要となる。これまでの低品位一次硫化鉱石の実用化の試みにおいて、パイロットプラントでの浸出率の低さと運用コストが一つのネックとなっている。ヒープバイオフィンにおいてはヒープ内

の温度管理やエアレーション、および浸出液のチャネリング対策について費用対効果を詳細に検討する必要がある。また、海底熱水鉱床鉱石についてはパイロットプラントの運用実績が無いため、今後の取り組みが期待される。

貴金属・レアメタルのバイオ回収については、基礎的な研究課題として貴金属の相互分離が挙げられる。使用済み電気電子部品の酸浸出液は Au/Pd、使用済み自動車用触媒の酸浸出液は Pd/Pt/Rh の混合水溶液であり、各金属を相互分離して回収することが望ましい。7.3.2 項で示した *S. algae* のバイオミネラルゼーションでは 30 min 以内にすべての PGMs イオンを回収しているが、電子供与体の種類や濃度および操作温度による各元素の還元・回収挙動を詳細に検討することにより、回収速度の差を利用した分離・回収の可能性を検討すべきである。また、3.3.3 項で示した PGMs ナノ粒子の触媒としての可能性について、より比表面積の大きいナノ粒子を合成して触媒性能の向上を図ると共に、触媒反応の適用範囲を広げることも重要である。有機合成等の高温プロセスでは細胞を担体にはできないため、PGMs ナノ粒子を細胞から簡便に分離し、実用的な担体に担持させるための基礎的知見も求められる。これはバイオ合成ナノ粒子を燃料電池の電極触媒に利用する際にも導電性の向上に繋がるため、興味深い課題である。実用的な研究課題としてはスケールアップがあるが、これについては貴金属回収後のダウンストリームプロセスにおける微生物細胞の取り扱いが重要な課題である。実験室スケールでは浸出液と細胞の固液分離は比較的簡単であるが、10 m<sup>3</sup> 以上の培養槽を伴う工業的スケールにおいて、特に細菌細胞についてはフィルター濾過による分離は困難であり、連続式遠心分離では運転コストの問題がある。対応策としてはバイオ回収後の細胞を濃縮して凝集沈降を即す方法、細菌細胞をカプセル等に封入する方法が考えられる。

**Table 8.1** The summary of the results of this thesis.

章	処理対象	使用菌種	微生物作用	目的金属	浸出率 回収率	備考
2	海底熱水鉱床鉱石	<i>A. brierleyi</i>	浸出	Cu, Zn	>80%	Ga および Au を浸出残渣に濃縮。 NaCl として 0.05 kmol/m <sup>3</sup> までの海水の混入を許容。
	IOCG 低品位鉱石			Cu	70%	脈石（磁鉄鉱）からの Fe 浸出率は 5% 以下。 カラム型固定層浸出装置においても同様の Cu 浸出率を確認。
3	PdCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup> 水溶液	<i>S. oneidensis</i>	還元	Pd	>99%	Cr(VI)イオン還元触媒として、市販触媒より高い触媒活性。 PEFC の H <sub>2</sub> 還元触媒として、市販触媒の約 90 % の触媒活性。
4	PtCl <sub>6</sub> <sup>2-</sup> 水溶液	<i>S. algae</i>	還元	Pt	90%	有機酸を電子供与体とした Pt イオンのバイオ還元。
5	AuCl <sub>4</sub> <sup>-</sup> 水溶液	<i>S. algae</i>	還元	Au	>99%	溶液 pH によりナノ粒子または三角形ナノプレートとして回収。
		<i>S. oneidensis</i>			94%	初期ギ酸塩濃度、操作時間により粒子径が 3.8-14.6 nm に変化。
6	AuCl <sub>4</sub> <sup>-</sup> 水溶液	<i>S. cerevisiae</i>	還元	Au	85%	低コストで大量入手できるパン酵母を利用。
			吸着		90%	強酸性溶液からも Au イオンを回収。
7	使用済み電子部品の 王水浸出液	<i>S. cerevisiae</i>	吸着	Au	98%	陰イオン交換樹脂に匹敵する回収量（19.0 - 19.7 mg-Au/g）。 共存イオン（Cu, Ni, Fe）存在下での Au の選択的回収。
	使用済み自動車触媒の 王水浸出液		還元	Pd, Pt, Rh	>95%	PGMs 最大回収速度（3.5 kg-PGMs/(h·m <sup>3</sup> ））。 回収後の細胞を焼成し、PGMs 含有率 99 % の金属塊を回収。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、17年の長きに亘り、微生物実験の基礎から発表、企業との共同研究の進め方、論文の執筆まで研究のあらゆることに幅広くご指導賜りました大阪府立大学大学院工学研究科物質・化学系専攻の小西康裕教授に心から感謝の意を表します。

本論文を執筆するにあたり、貴重なご示唆とご助言を賜りました同専攻の荻野博康教授、安田昌弘教授、野村俊之准教授に厚く御礼申し上げます。

還元細菌 *S. oneidensis* による Pd(II)イオンのバイオ還元と燃料電池触媒としての活性評価、および Au(III)イオンのバイオ還元につきまして、研究の基礎からご指導して頂いた現広島大学大学院工学研究科化学工学講座の荻崇准教授に深く御礼申し上げます。

微粒子工学グループにおきまして、研究のみならず実験室において様々なご指導、お取り計らいを頂いた現京都大学大学院工学研究科化学工学専攻の長嶺信輔准教授に深く感謝申し上げます。

また、客員教授として貴重なご助言を頂きました横田勝先生、研究を進めていく上で切磋琢磨し、議論した微粒子工学グループの学生の皆さまに厚く感謝申し上げます。