

名古屋大学図書



20123221

鉄酸化細菌を利用したウランの酸化還元と分離プロセスへのその応用

(研究課題番号 16360472)

平成 16 ～ 17 年度文部科学省科学研究費補助金 (基盤研究(B) (2))
研究成果報告書

平成 18 年 3 月

研究代表者 山本 一良
(名古屋大学・大学院工学研究科教授)

はしがき

鉄酸化細菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)は鉱床などに広く分布し、実験室での培養も比較的容易に行うことができる。この鉄酸化細菌は、通常の酸化性雰囲気(大気雰囲気)においてはⅡ価の鉄をⅢ価の鉄に酸化することにより活動のエネルギーを得ているが、酸素の存在しない還元性雰囲気においては逆にⅢ価の鉄をⅡ価の鉄に還元する能力を有している。また、鉄酸化細菌は鉄以外にも硫黄やクロムなどに対しても酸化・還元能を有することが明らかにされている。本研究では、鉄酸化細菌とウランとの相互作用について調べ、鉄酸化細菌が直接的にウランを酸化や還元する能力を有するか、あるいは鉄や硫黄を酸化還元することで間接的な形でウランを酸化や還元する能力を有するかについて調べ、酸化還元の機構や速度を明らかにし、自然環境中において鉄酸化細菌がウランを酸化や還元するプロセスが起きうるかについて検討を行うことを目的とした。還元雰囲気における鉄酸化細菌—鉄—ウラン共存系における実験の結果、鉄がⅢ価の場合、鉄酸化細菌は鉄を還元する能力を有するものの、ウラン(VI)は直接的に還元されることはないことがわかった。

研究組織

研究代表者 : 山本一良 (名古屋大学大学院工学研究科教授)
 研究分担者 : 榎田洋一 (名古屋大学エコトピア科学研究所教授)
 研究分担者 : 津島 悟 (名古屋大学大学院工学研究科助教授・平成17年3月まで)
 研究分担者 : 澤田佳代 (名古屋大学大学院工学研究科助手)

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	9,300,000	0	9,300,000
平成17年度	5,400,000	0	5,400,000
総計	14,700,000	0	14,700,000

研究発表

(1) 学会誌等

Y. Suzuki et al., Biotransformation of Eu(III)-citrate complex by *Pseudomonas fluorescens*, *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, Vol. 266, pp. 199-204, 2005.

Y. Suzuki et al., Sorption of Eu(III) on *Pseudomonas fluorescens* affected by citric acid complex formation, *Journal of Nuclear and Radiochemical Sciences*, Vol. 6, No. 1, pp. 91-93, 2005.

(2) 口頭発表

Y. Suzuki et al., Redox behavior of uranium in the presence of organic ligands, *Proceedings of the 10th international Conference on Chemistry and Migration Behaviour of Actinides and Fission Products in the Geosphere*, September 18-23, 2005.

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

目次

1. 研究目的.....	1
2. 鉄酸化細菌(JCM.7811)とその培養手法について	3
2.1 鉄酸化細菌の性質	3
2.2 鉄酸化細菌の培養	6
3. 鉄酸化細菌へのウランの吸着について	14
3.1 鉄酸化細菌へのネオジムの吸着	14
3.2 鉄酸化細菌へのウランの吸着	22
4. 好気性条件下での鉄酸化細菌による U(IV)の酸化について.....	28
5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について.....	33
5.1 嫌気性条件下での鉄酸化細菌による Fe ³⁺ 還元実験.....	33
5.2 U(VI)存在下における Fe ³⁺ 還元実験.....	46
5.3 嫌気性条件下での鉄酸化細菌による U(VI)還元実験.....	52
6. 結言.....	74
参考文献.....	76
研究成果.....	78

1. 研究目的

日本では、高レベル放射性廃棄物の地層処分を検討している。その概念は、安定な状態にガラス固化した廃棄物を地下深部の安定した地質環境中に、人工的なバリアを施したうえで埋設し、長期にわたって人間の生活環境から隔離し、将来の世代にも廃棄物による影響が及ぼさないようにすることである[1]。地層処分の長期的な安全性を示すために、世界各国でウラン鉱床を利用したナチュラルアナログ研究が進められている[2]。日本においても、岐阜県の東濃ウラン鉱床における研究例がある。東濃ウラン鉱床はわが国最大の砂岩型ウラン鉱床であり、約1千万年前に形成されたとされている。ウラン鉱床は、花崗岩中のウランが表層の酸化性の水により溶解移行し、地下深部の還元性環境下で沈殿・凝集し、形成されたものであると推察されている[3]。この特性が、ウラン鉱床を長期的に保存させてきたと言える。

核燃料サイクル開発機構(現：日本原子力研究開発機構)は、東濃地域の堆積岩および花崗岩の地下水中に含まれる微生物について報告している[4]。全菌数はおおむね 10^7 cells · ml⁻¹ (堆積岩) ~ 10^6 cells · ml⁻¹ (花崗岩) で、地下水中の生菌数は 10^3 ~ 10^4 CFU · ml⁻¹ (CFU: Colony Forming Units) である。この数字は培養をおこなった好気性条件下で生存できる菌数を表したものであり、地下環境は一般に嫌気性条件であるため、嫌気性菌を考慮すると、地下環境で生育する微生物量はかなり大きなものであるとしている。鉄関連細菌(鉄の酸化または還元をおこなう細菌)および硫酸還元菌 (*Desulfovibrio desulfuricans*) の存在も認めている。地下環境に生息する微生物の生物代謝が、地下含有元素の酸化還元反応に何らかの影響を及ぼしてきた可能性を示唆している。

国内外において、微生物によるウランの酸化還元反応を研究した例は多く存在する。Lovleyら[5]は、嫌気性条件下で三価鉄を還元する能力を有する微生物 (*Geobacter metallireducens*, *Shewanella putrefaciens*) が、 UO_2^{2+} を還元することによって、成長のためのエネルギーを得て増殖することを見出した。また、Lovleyらは *Desulfovibrio desulfuricans* について UO_2^{2+} の還元能を調べている[6]。Francisら[7]は、嫌気性菌の一種である *Clostridium* sp. が UO_2^{2+} 還元能を有することを報告している。鈴木ら[8]は、 UO_2^{2+} 還元反応の初期段階で、nmスケールの UO_2 が細胞表面に形成されることを明らかにした。嫌気性菌が関与する UO_2^{2+} の還元反応は、ウラン鉱床の形成に重要な役割を果たす可能性があると考えられる。

1. 研究目的

Colmerら[9]によって発見された鉄酸化細菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) は、pH 1.5～4.5の酸性条件下で生育可能であり、 Fe^{2+} を Fe^{3+} に酸化し、そのエネルギーを代謝、増殖に利用する[10]。アメリカ、カナダにおいて、鉱石からの金属の溶出 (leaching) に、鉄酸化細菌の金属酸化能を利用してその溶出効果を高めようとする、バイオリーチングが実用化されている[11]。カナダのエリオット湖地域にあるウラン鉱山では、鉄酸化細菌を利用するバイオリーチング法によって、1ヶ月当たり、33,000 kg (1987年) にもおよぶウランが生産されている[12]。Holmesら[12]は、鉄酸化細菌による鉱石からのウランの溶出は次の2つの機構で起こるものと考えている。鉄酸化細菌は水に不溶性の4価ウラン(UO_2)を、直接的な酵素作用で可溶性の6価ウラン(UO_2^{2+})に酸化する能力を持っており、鉱石から直接ウランを溶出させる。鉄酸化細菌が鉱石からのウラン溶出に関与する主な働きとしては、 Fe^{3+} の生成反応である。生成した Fe^{3+} は、硫酸酸性下で鉱石中の UO_2 を UO_2^{2+} に酸化溶出する。

一方で、酸素の存在しない嫌気性条件下においては、鉄酸化細菌は Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元する能力を有している[13]。しかし、U(VI)還元能を有するか明らかにされていない。

本研究では、鉄酸化細菌とウランとの相互作用について調べ、嫌気性条件下で鉄酸化細菌が直接的にU(VI)を還元する能力を有するか否か明らかにすることを目的とする。本研究により期待される成果としては、嫌気性菌である鉄酸化細菌によるウランの酸化還元反応についての知見が得られることである。これは、地下深部において、嫌気性菌が高レベル放射性廃棄物に含まれる核種の移行挙動に与える影響を評価する上でも重要である。

さらに本研究では、鉄酸化細菌によるU(VI)の還元反応により、不溶性のU(IV)のみを選択的に沈殿、分離できる可能性について検討をおこなうことを目的とする。

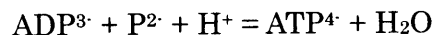
2. 鉄酸化細菌(JCM:7811)と その培養手法について

目的にそった微生物の培養条件を設定するために、その菌体の性質、増殖傾向を把握する必要がある。本章では鉄酸化細菌の性質、培養手法、増殖について述べた。

本研究では岩手県八幡平の松尾鉱山排水で単離され、理化学研究所より分譲された鉄酸化細菌：*Acidithiobacillus ferrooxidans* (JCM.7811) を用いた。

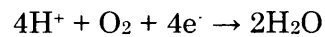
2.1 鉄酸化細菌の性質

鉄酸化細菌は、0.5~1.0 μ m 程度の大きさの短桿状であり、運動性を有し、細胞分裂によって増殖する[10]。図 2.1 に鉄酸化細菌の SEM 画像を示す。細胞膜の構造により、グラム陰性細菌に分類される。鉄酸化細菌は好気性条件下で Fe^{2+} を Fe^{3+} に酸化し、この際生じるエネルギーを ATP(アデノシン三リン酸)などの化学エネルギーに転換させ、炭酸固定を行う。鉄酸化細菌は代謝経路として、無機物を利用するエネルギー獲得系と二酸化炭素を還元固定する同化系とをもち、エネルギー源を無機物だけに依存する栄養形式から、化学合成独立栄養細菌に分類される。一般に ATP 合成は、チトクロムのような電子伝達系とキノンのように水素原子の授受をおこなう運搬体が交互に存在する膜タンパク質によりおこなわれる。この膜タンパク質は一般に、プロトンポンプと呼ばれる。プロトンポンプは、プロトンを膜の内外のプロトンの電気化学ポテンシャル($\Delta \mu H^+$)に逆らい能動輸送する。その際プロトンが ATP 合成酵素を経て、膜の外側から内部に流入する間に次の反応がおこなわれる。



ここでの P^{2-} はオルトリン酸基を表す。しかしながら、鉄酸化細菌は、電子伝達系として、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} の酸化還元反応の機能を営むヘム蛋白質の一種であるチトクロム a, b, c, c_1 を有することは確認されているが、キノンのような水素原子の授受をおこなう運搬体は存在しない。したがって、ATP 合成酵素を経て流入するプロトンを膜外に運搬することができず、細胞内は急速に強い酸性となるはずである。しかしながら、鉄酸化細菌の細胞内 pH は常に 6.0 付近で保たれている。これは、ATP 合成酵素を経て膜内流入したプロトンが、膜外で酸化される Fe^{2+} から膜内に運搬される電子、および酸素により H_2O になり、消去されるからである。

2. 鉄酸化細菌とその培養手法について



この作用により膜内外で $\Delta \mu \text{H}^+$ が生じ、プロトンの膜内流入のエネルギーを利用することで ATP を生成する。そして生成された ATP を消費して電子を逆行させ、還元型ピリジンヌクレオチドを生成し、これが二酸化炭素を還元すると考えられている[10]。

一方、嫌気性条件下において、鉄酸化細菌は Fe^{3+} を還元し、 Fe^{2+} を生成する能力を有する[13]。微生物が代謝および増殖するのに必要なエネルギーの多くは、電子供与体から電子受容体に電子が移動するときに得られる。鉄酸化細菌は、好気性条件下では電子供与体として Fe^{2+} 、電子受容体として O_2 を用いる。結果、 Fe^{2+} は酸化する。嫌気性条件下では電子供与体として H_2 、 S^0 を、電子受容体として Fe^{3+} を用いることが明らかにされている。結果、 Fe^{3+} は還元する。また、 Cr^{6+} 、 Mo^{6+} も電子受容体になりうることが明らかにされている[14][15]。嫌気性条件下での Fe^{3+} の還元反応には、電子伝達物質であるチトクロムが関与することが示唆されているが、詳細には明らかにされていない[13]。

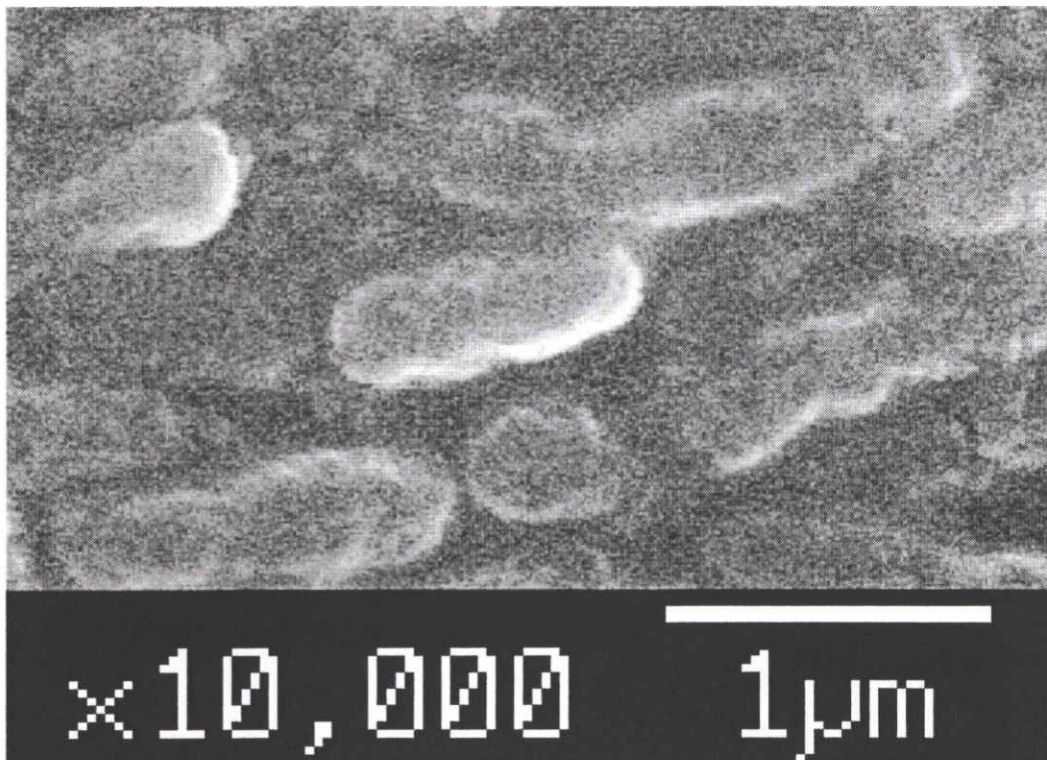


図 2.1 鉄酸化細菌の SEM 画像

2.2 鉄酸化細菌の培養

実験手順

① 培養

100 mL 三角フラスコに 9K 培地を 50 mL 加え、 H_2SO_4 溶液で培地の pH を 3.0 に調整した。表 2.1 に 9K 培地の成分を示す。その後、オートクレーブ（トミー精工社，ES-315）で滅菌処理した。無菌状態であるクリーンベンチ（日本エアーテック社，VG-1604L）内で、鉄酸化細菌を滅菌後の 9K 培地に植菌した。図 2.2 にクリーンベンチの写真を示す。この培地を振とう培養機（アズワン社，SI-300R/600R）に入れ、 30°C 、100 rpm で振とう培養した。図 2.3 に振とう培養機の写真を示す。

表 2.1 9K 培地成分 [g/L]

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40.00
K_2HPO_4	0.50
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.00
KCl	0.10
MgSO_4	0.24
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01

② 細胞増殖測定

一般に、培養液中の細胞濃度を測定する手段として、一定面積内の細胞数を直接数える方法、細胞の乾燥重量を測定する方法、培養液の濁度（吸光度）を測定する方法がある[16]。鉄酸化細菌の場合、菌体が小さいため光学顕微鏡で観察するのは困難であり、また乾燥重量、濁度測定には細胞の回収作業が必須であり、この回収作業には手間がかかり、細胞増殖の経時変化を調べるには不適である。そこで本実験では、鉄酸化細菌の細胞増殖に伴い、培地中の Fe^{2+} が酸化されることを利用し、培地中の Fe^{2+} 濃度をフェナントロリン法により定量分析することで間接的に細胞増殖を調べた。

2. 鉄酸化細菌とその培養手法について

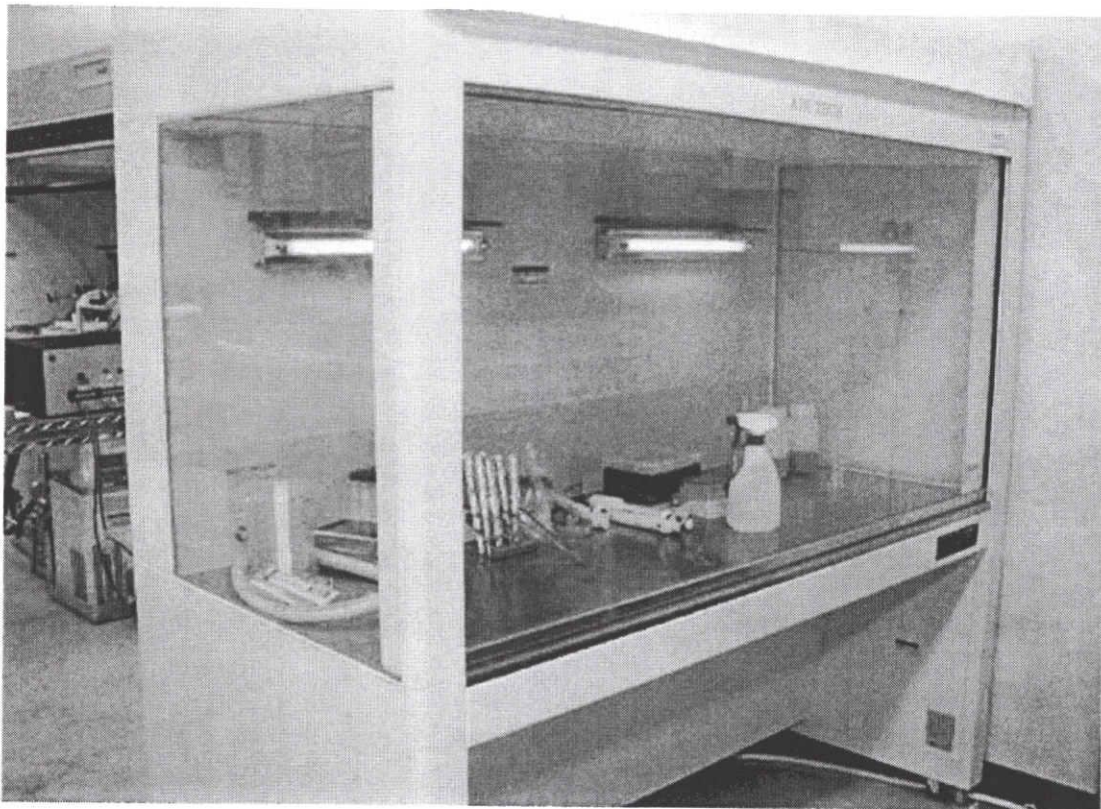


図 2.2 鉄酸化細菌の植菌をする際に使用したクリーンベンチ

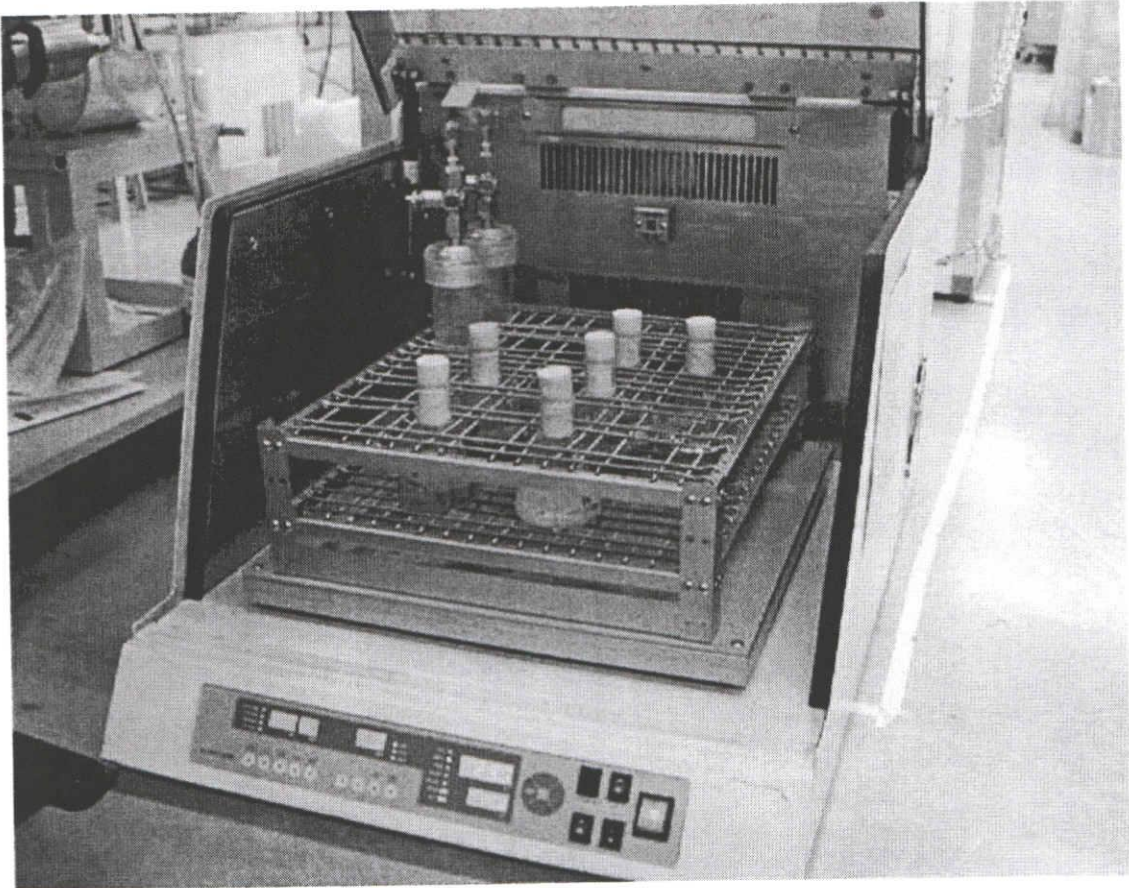


図 2.3 鉄酸化細菌の培養に使用した振とう培養機

③ フェナントロリン法[17]による Fe^{2+} 濃度測定

一定時間ごとに培養液を回収し、孔径 $0.1\ \mu\text{m}$ のフィルターでろ過滅菌した。滅菌した培養液 $20\ \mu\text{L}$ を容量 $20\ \text{mL}$ のバイアル瓶に滴下し、 $2.0\ \text{mL}$ の蒸留水で希釈し、 $3.0\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ の 1,10-フェナントロリン溶液 $1.6\ \text{mL}$ を加え、染色させた。1,10-フェナントロリン溶液は Fe^{2+} と錯体を形成し、色を呈する。染色 15 分後、 $10\ \text{mL}$ の蒸留水を加えた後、 $10\ \text{mL}$ 抜き出し、さらに $10\ \text{mL}$ の蒸留水を加え、希釈した。そして、この染色溶液の波長 $510\ \text{nm}$ における吸光度を紫外可視分光光度計 (UV2100, Shimadzu) で計測した。図 2.4 に分光光度計の写真を示す。濃度既知の FeSO_4 溶液を用いて上記と同様の染色操作をおこなった。紫外可視分光光度計で吸光度を測定し、その吸光度と Fe^{2+} 濃度の検量線を作成した。これを用いて実際の培養液中の Fe^{2+} 濃度を決定した。図 2.5 に Fe^{2+} -フェナントロリン錯体の吸収スペクトル、図 2.6 に検量線を示す。

結果と考察

培養液中の Fe^{2+} 濃度の経時変化を図 2.7 に示す。無菌状態の培養液中の Fe^{2+} 濃度の経時変化の結果も同様に示す。培養開始から約 24 時間は、鉄酸化細菌による Fe^{2+} の酸化がほとんど起こらないことから、誘導期であると考えられる。この誘導期は菌体が新たな培地で増殖するために適応する期間である。24 時間後から約 100 時間後までの期間は Fe^{2+} の酸化速度は著しく増加したことから、対数増殖期であると考えられる。この期間では菌体は生育している培地に適応して、バランスの取れた生育をするようになり、菌体数は指数関数的に増加する。100 時間以降は、9K 培地中の Fe^{2+} はすべて酸化され、定常期に入ったと考えられる。この期間では対数増殖期に増殖した菌体によって、培地中の栄養源の消費、培地中への毒性代謝産物の蓄積などが起き、細胞成分の合成のバランスが取れなくなり、増殖が停止し、菌体数がほぼ一定となる。一方、無菌状態での 9K 培地中の Fe^{2+} 濃度はほとんど変化せず、酸化は起きなかった。

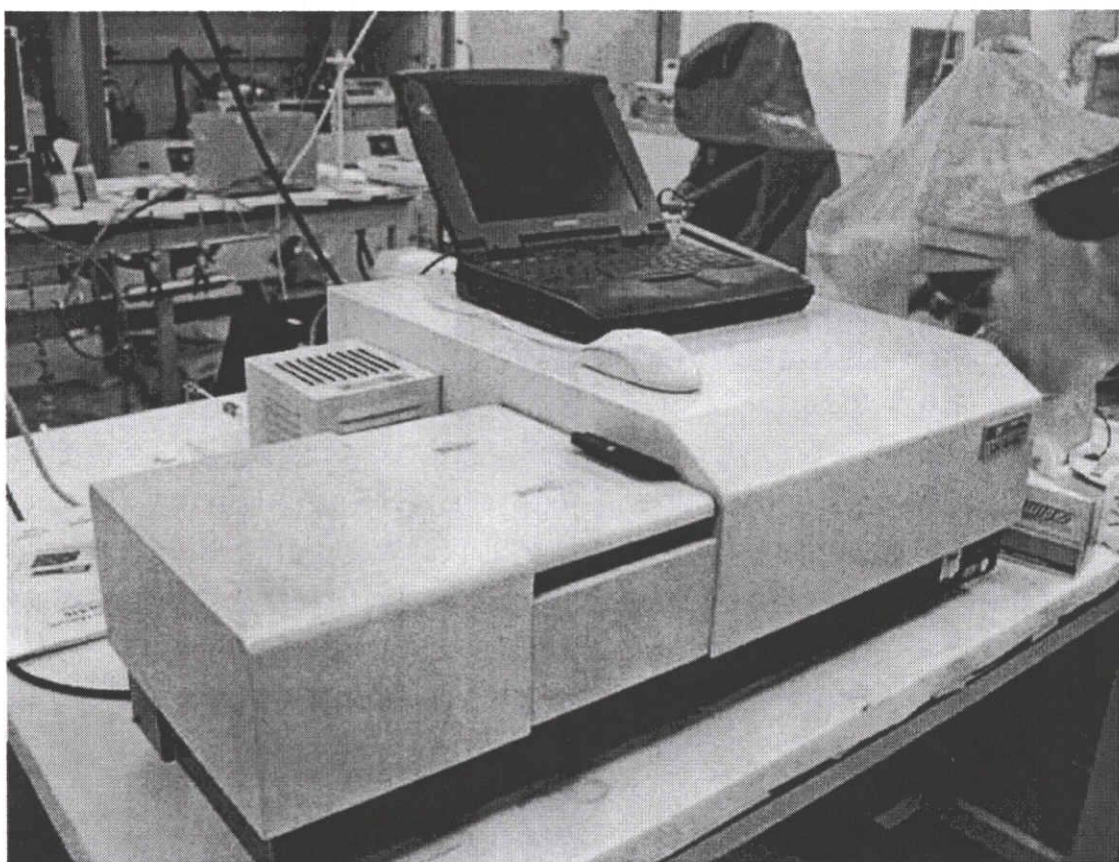


図 2.4 本実験で使用した紫外可視分光光度計

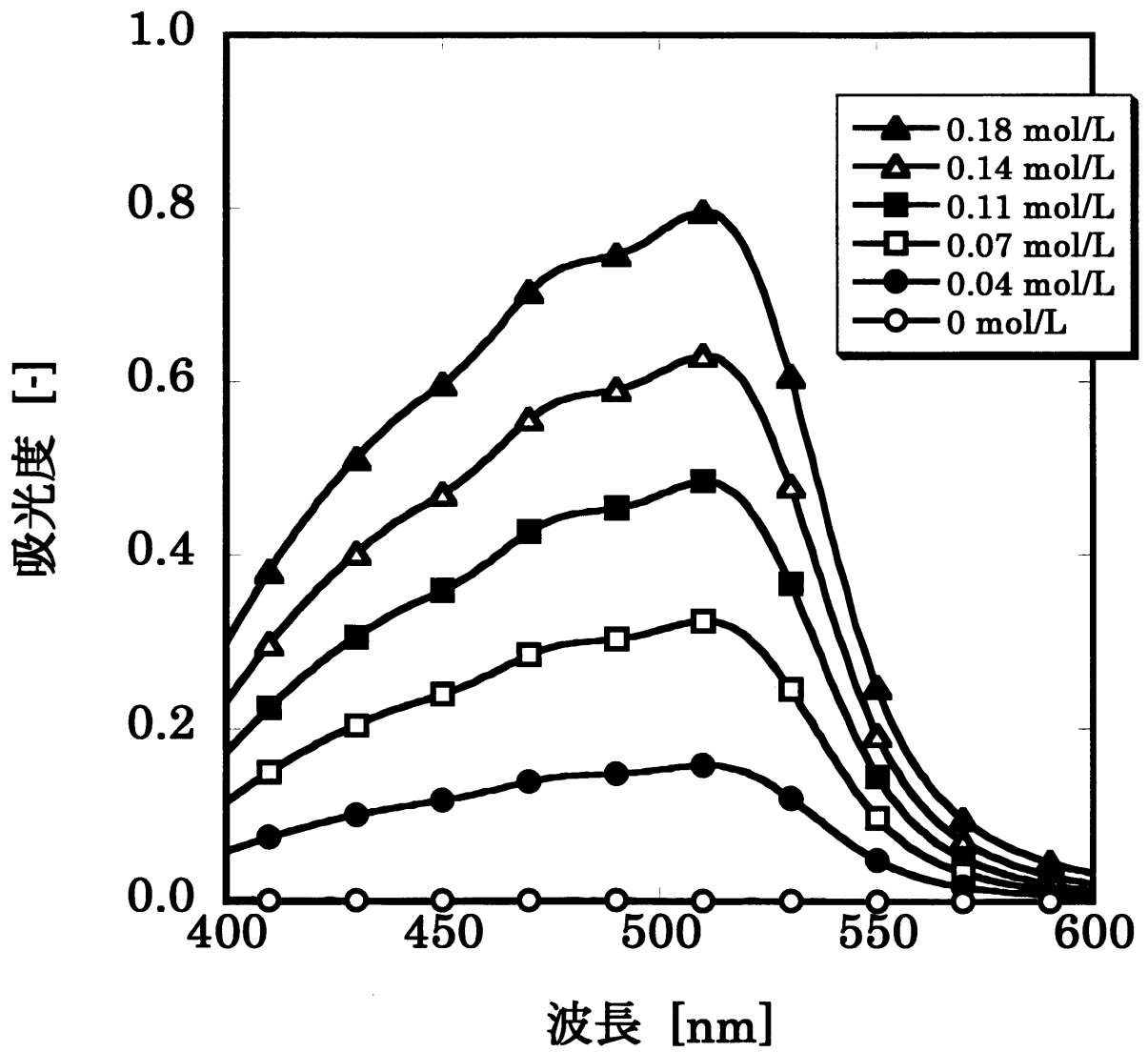


図 2.5 Fe²⁺-フェナントロリン錯体吸収スペクトル

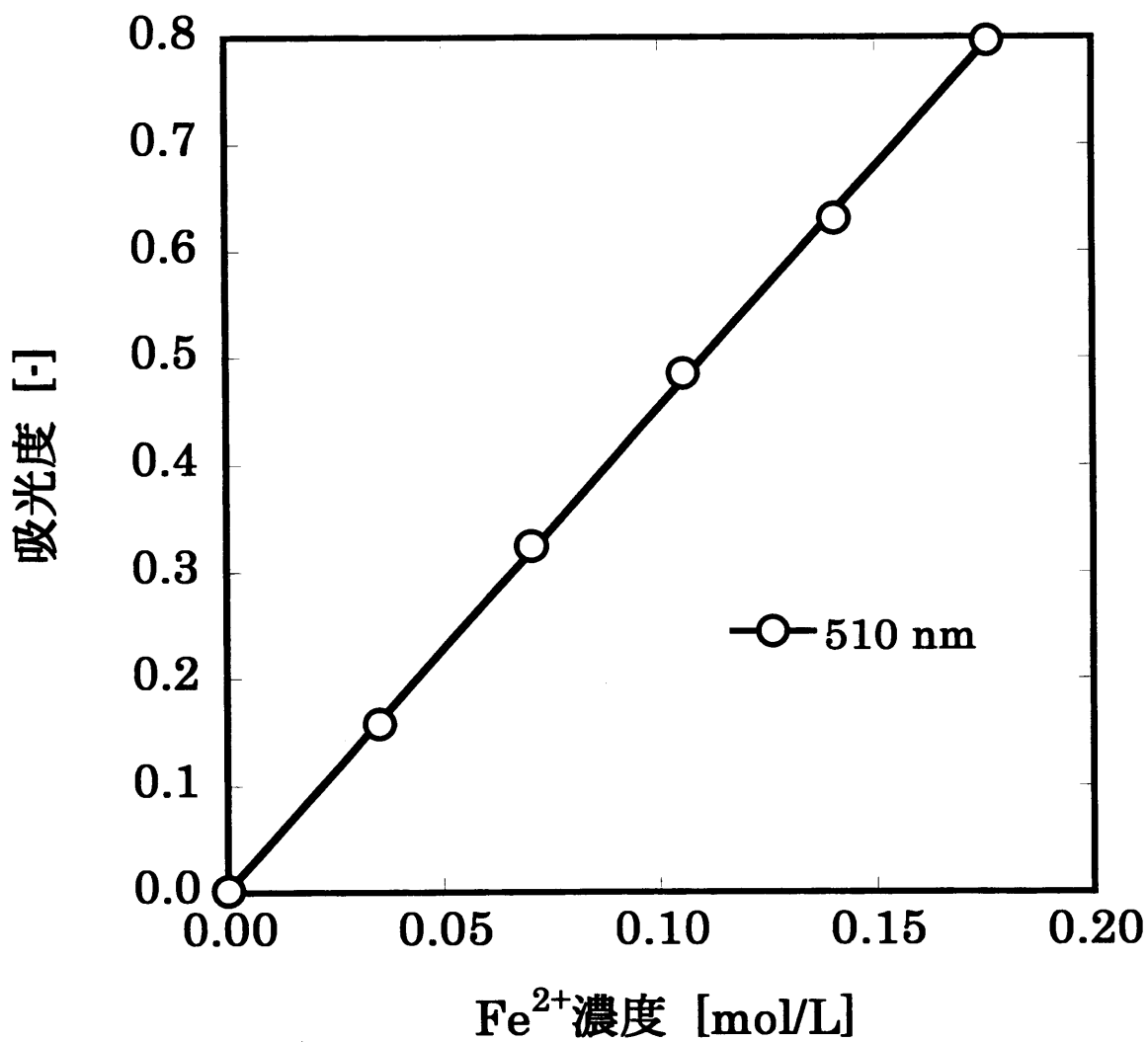


図 2.6 Fe^{2+} 濃度の検量線

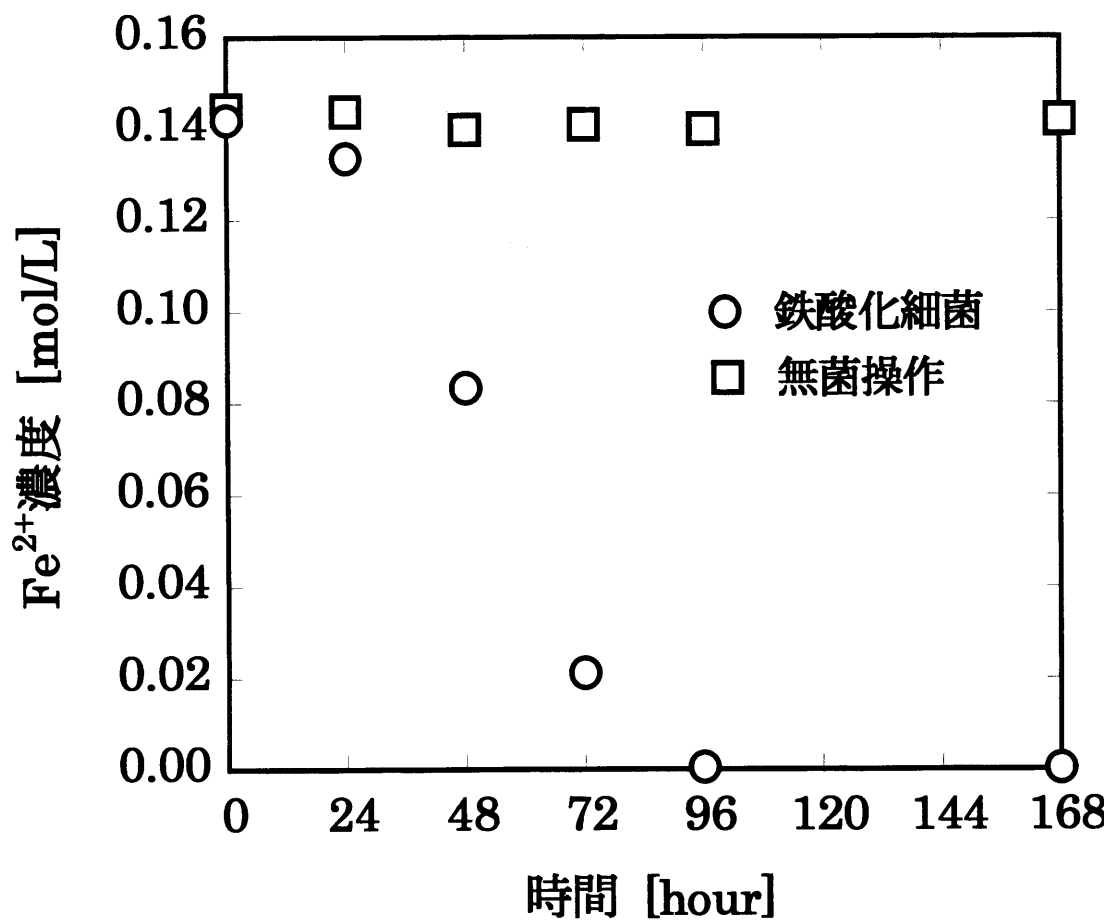


図 2.7 培養液中の Fe²⁺濃度経時変化

3. 鉄酸化細菌への ウランの吸着について

微生物は細胞表面に豊富な官能基を有し、種々の金属イオンを吸着することが報告されている[18]。微生物への金属イオンの吸着は、廃水中に低濃度で含まれる金属の回収への応用が期待される。また、放射性核種の微生物への吸着は、核種の生活圏への移行に影響を与える可能性を有するため、地層処分安全評価をおこなう上でも重要な研究課題である。本実験では、ランタノイドとして Nd (III)、アクチノイドとして U(VI)を用い、鉄酸化細菌との吸着が起こりうるか調べた。

3.1 鉄酸化細菌へのネオジムの吸着

実験手順

① 培養

9K 培地 500 mL を容積 1000 mL の三角フラスコにいれ、オートクレーブ滅菌した。この培地に鉄酸化細菌を植菌し、対数増殖期に達したところで培養液を 3000 rpm で 30 分間遠心分離し、細胞を回収した。回収した細胞を 0.01 M H_2SO_4 溶液で 3 回洗浄した後、同濃度の H_2SO_4 溶液に懸濁した（以下細胞懸濁液とする）。

② 細胞の乾燥重量

①で作製した細胞懸濁液を 100℃のマッフル炉（デンケン社、KDF S80/S80G）内で 5 時間乾燥させた。電子天秤で細胞の乾燥重量を測定し、0.01 M の H_2SO_4 溶液で再懸濁し、0.55 mg/mL の細胞懸濁液を作製した。

③ 鉄酸化細菌とネオジムとの接触実験

10, 50 mg/L のネオジム溶液を作製した。個々の溶液について、 H_2SO_4 溶液、KOH 溶液を用いて、それぞれ pH を 2.0, 4.0 に調整した。ネオジム溶液 9 mL に対し、②で作製した細胞懸濁液を 1 mL 加え、30℃, 100 rpm で振とうした。また、10 mg/L (pH 2.0, 4.0) のネオジム溶液 9 mL に無細胞溶液を 1 mL 加えた試料を用意し、細胞による効果を評価した。一定時間ごとに溶液 1.5 mL を採取し、採取試料を孔径 0.1 μm のフィルターでろ過し、細胞を除去した後、ろ液中のネオジム濃度をアルセナゾⅢ法により定量した。

3. 鉄酸化細菌へのウランの吸着について

④ アルセナゾⅢ法によるネオジムの定量方法

まず、60 mL の CH_3COOH 溶液に 4.8 g の CH_3COONa 粉末を加え、続いて蒸留水を 4.8 mL 加え、緩衝液を作製した。緩衝液 5 mL に、試料から採取した溶液を 1 mL 加え、続いて 0.01 g/L のアルセナゾⅢ溶液を 1 mL 加え、染色させた。染色溶液の波長 655 nm における吸光度を紫外可視分光光度計で測定した。濃度既知のネオジム溶液を用いて上記と同様の操作を行い、紫外可視分光光度計で測定し、その吸光度とネオジム濃度の検量線を作成した。これを用いて実際の溶液中のネオジム濃度を決定した。図 3.1 にネオジム-アルセナゾⅢ錯体吸収スペクトル、図 3.2 に検量線を示す。

結果と考察

溶液中のネオジム濃度の減少量を次の (3.1) 式で定義した。

$$C_t = C_0 - C_m \quad (3.1)$$

C_t : ネオジム濃度の減少量 [mg/L]

C_0 : ネオジム濃度の初期値 [mg/L]

C_m : 一定時間経過後のネオジム濃度 [mg/L]

この式から得られたネオジム濃度の減少量の経時変化を図 3.3, 図 3.4 に示す。なお、図 3.3 は pH 2.0, 図 3.4 は pH 4.0 のネオジム濃度の減少量を示す。鉄酸化細菌の単位質量あたりのネオジムの吸着量を、(3.2) 式で定義した。

$$C_{\text{bio}} = \frac{C_t}{M_{\text{bio}}} \quad (3.2)$$

C_{bio} = 鉄酸化細菌へのネオジムの吸着量 [mg of Nd / g of biomass]

C_t = ネオジムの減少量 [mg/L]

M_{bio} = 鉄酸化細菌の濃度 [g/L]

(3.2) 式で評価した吸着量の経時変化を図 3.5 に示す。また、ネオジム濃度の誤差は吸光度の測定を 3 回行い、その標準偏差をもとに、誤差伝播より評価した。

図 3.3, 3.4 から、鉄酸化細菌を接種したネオジム溶液では、溶液中のネオジム濃度が時間とともに減少しているのに対し、鉄酸化細菌を接種していないものでは溶液中のネオジム濃度の減少がみられなかった。このことから、ネオジムは鉄酸化細菌に吸着されたと考えられる。溶液中のネオジムの減少量は、ネオジム濃度が 10 mg/L のもの比べて 50 mg/L の方が大きかった。これはネオジム濃度が大きくなることで、ネオジ

3. 鉄酸化細菌へのウランの吸着について

ムと鉄酸化細菌との接触頻度が大きくなり、吸着が起こりやすくなったためだと考えられる。また、pHが2.0より4.0のときの方がネオジムの減少量は大きかった。鉄酸化細菌の細胞表面は、カルボキシル基、アミノ基、リン酸ジエステル基などの官能基により構成されている[19]。そのため、溶液中では細胞表面の電荷は負に帯電している。pHが低くなることで溶液中のH⁺濃度が増加し、結果、細胞表面の官能基がH⁺と作用し、ネオジムの吸着を阻害した可能性が高い。図3.5から、鉄酸化細菌の単位質量あたりの吸着量に換算した場合も、同様の傾向を示すことがわかった。本実験における鉄酸化細菌の単位質量あたりのネオジム吸着量を表3.1に示す。これは、吸着が飽和状態となり、ネオジム濃度が平衡となったときの平均値である。

表 3.1 鉄酸化細菌の単位質量あたりのネオジム吸着量

pH	ネオジム濃度	吸着量
	[mg/L]	[mg of Nd / g of biomass]
2	10	6.8 ± 9.5
2	50	62 ± 24
4	10	36 ± 12
4	50	169 ± 21

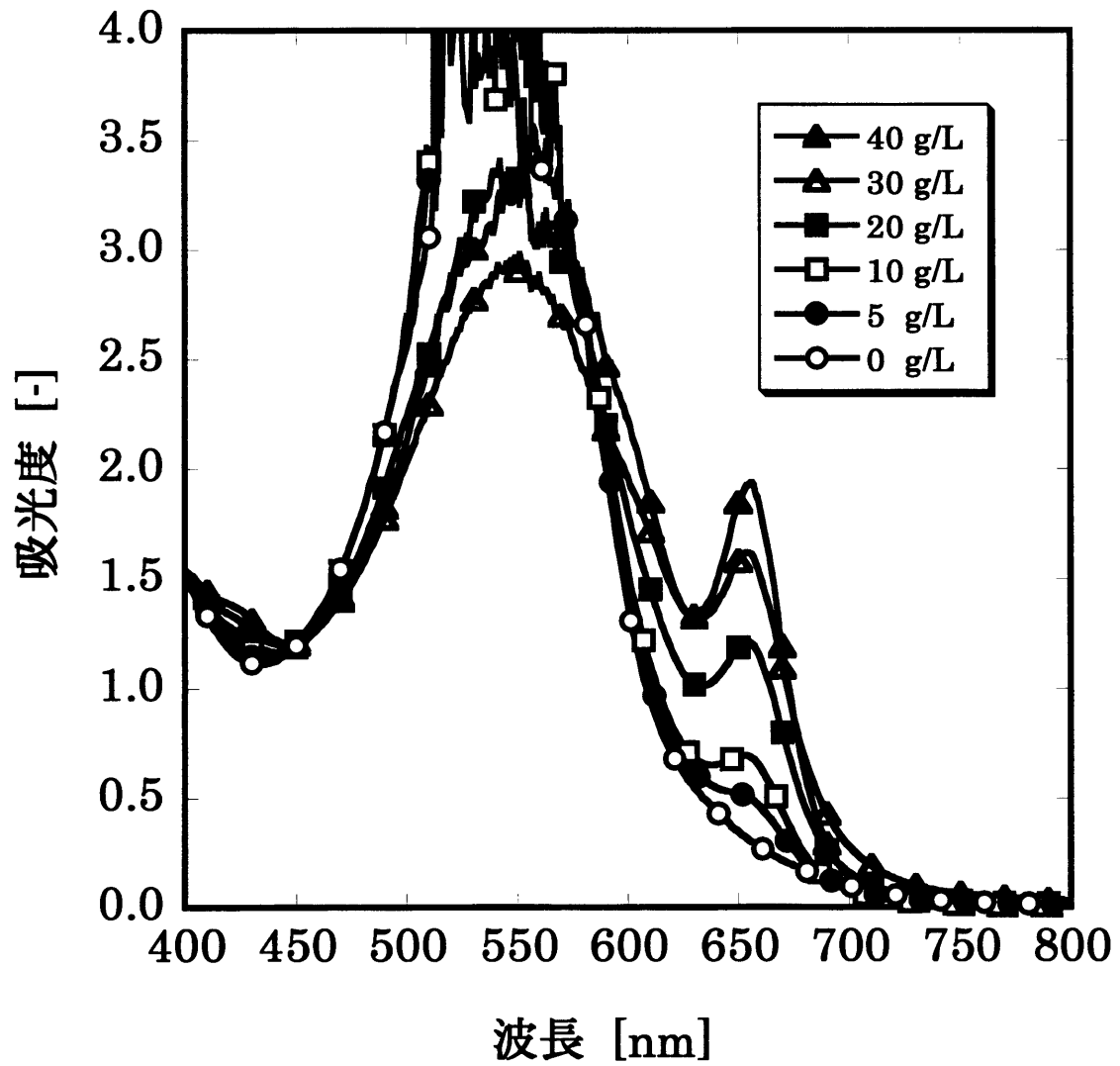


図 3.1 ネオジウム-アルセナゾⅢ錯体吸収スペクトル

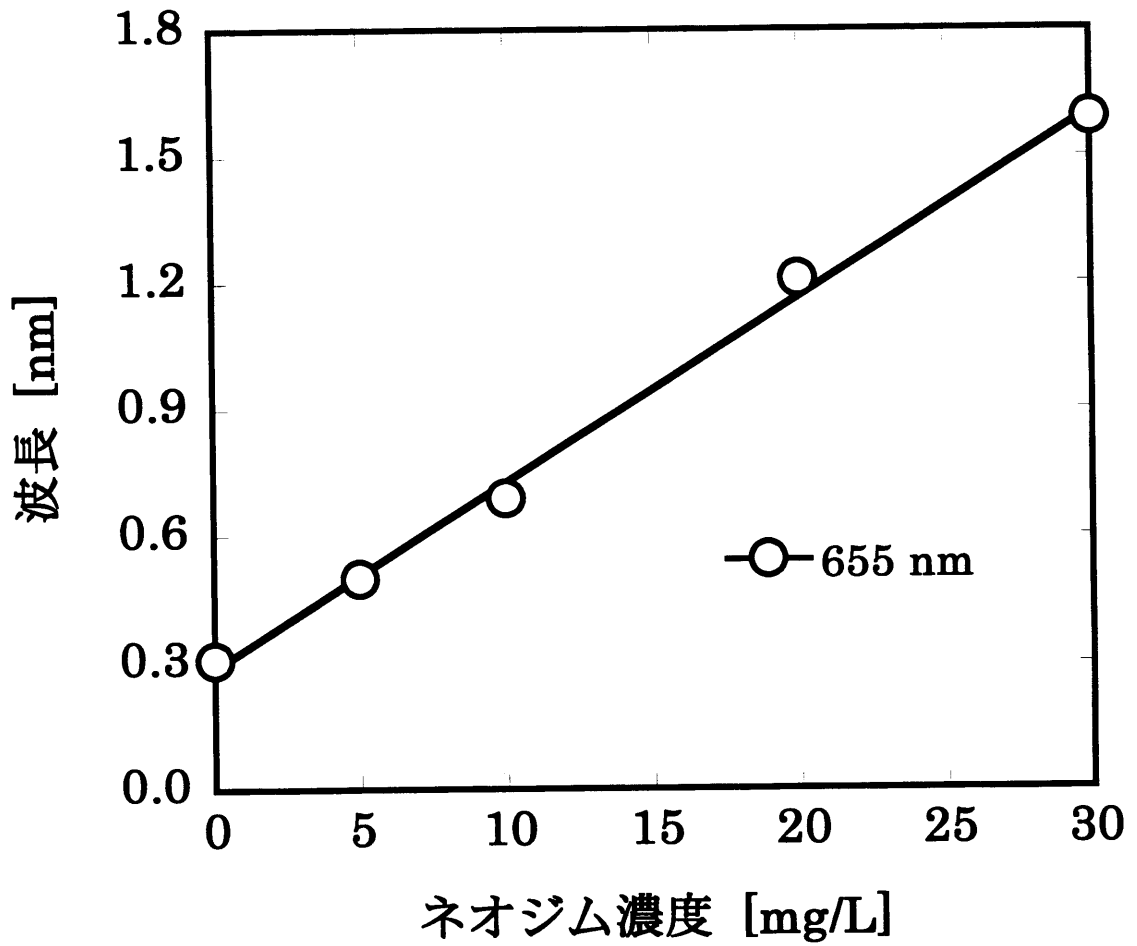


図 3.2 ネオジム濃度の検量線

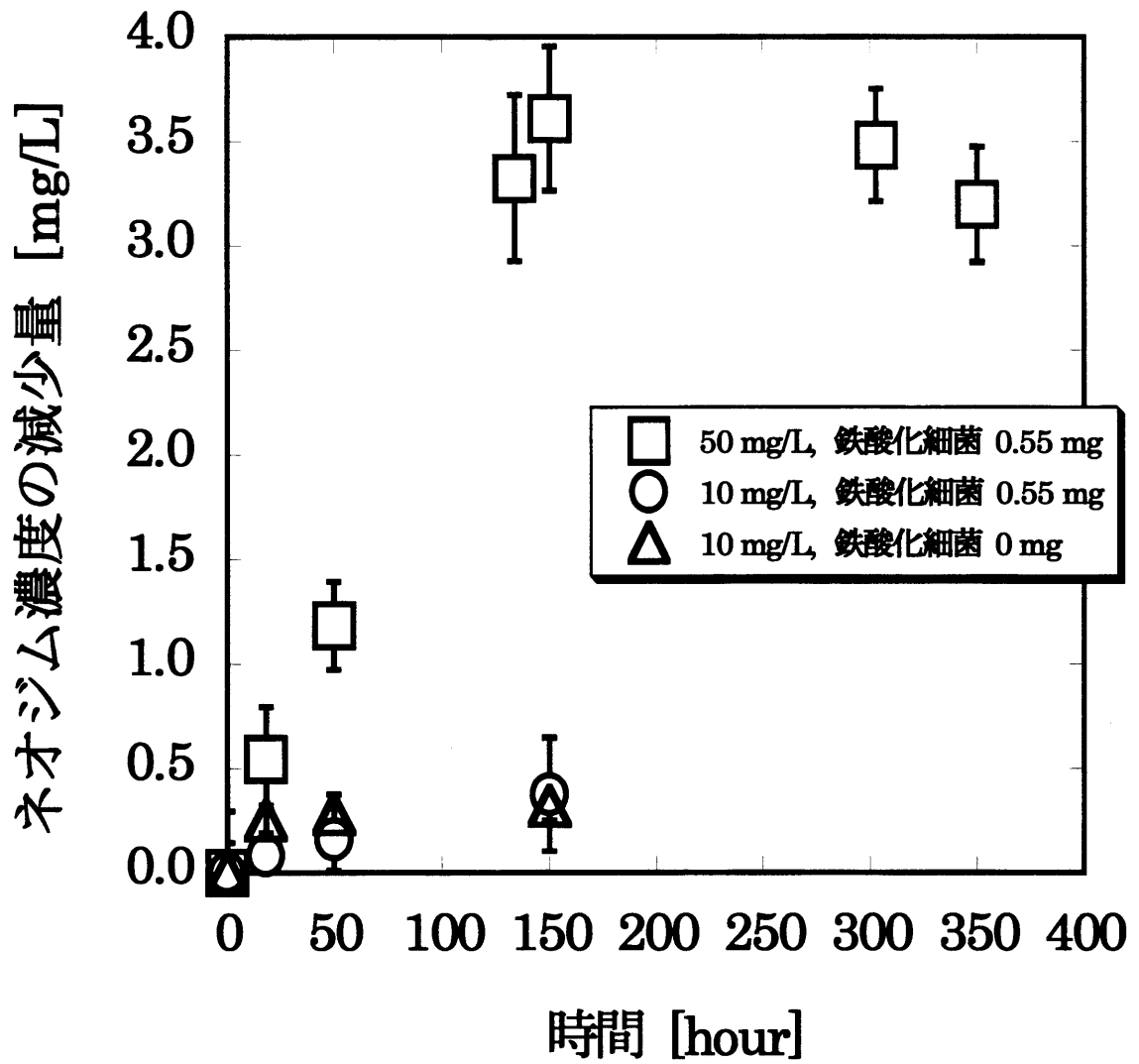


図 3.3 ネオジム濃度減少量の経時変化 (pH 2.0)

3. 鉄酸化細菌へのウランの吸着について

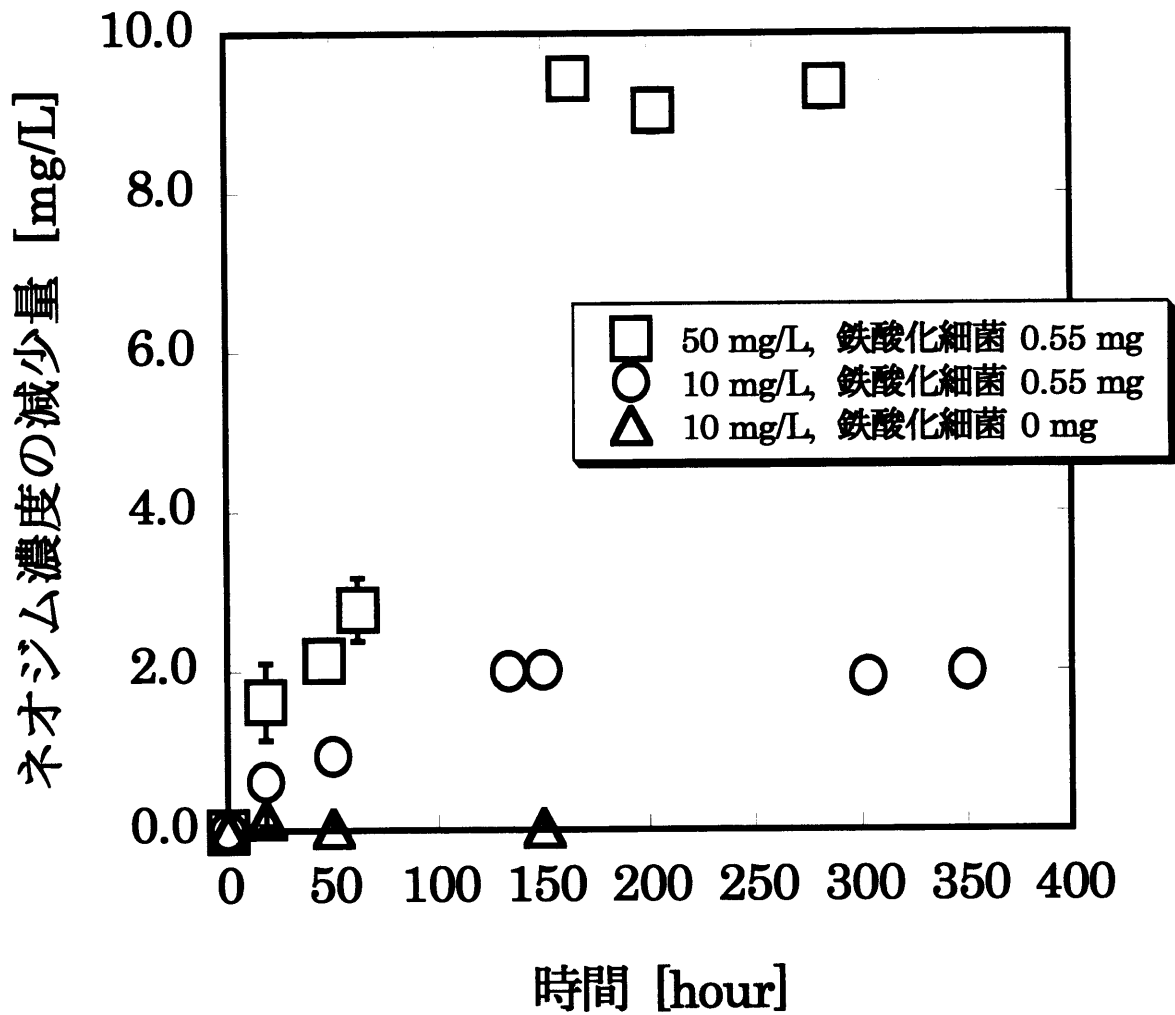


図 3.4 ネオジム濃度減少量の経時変化 (pH 4.0)

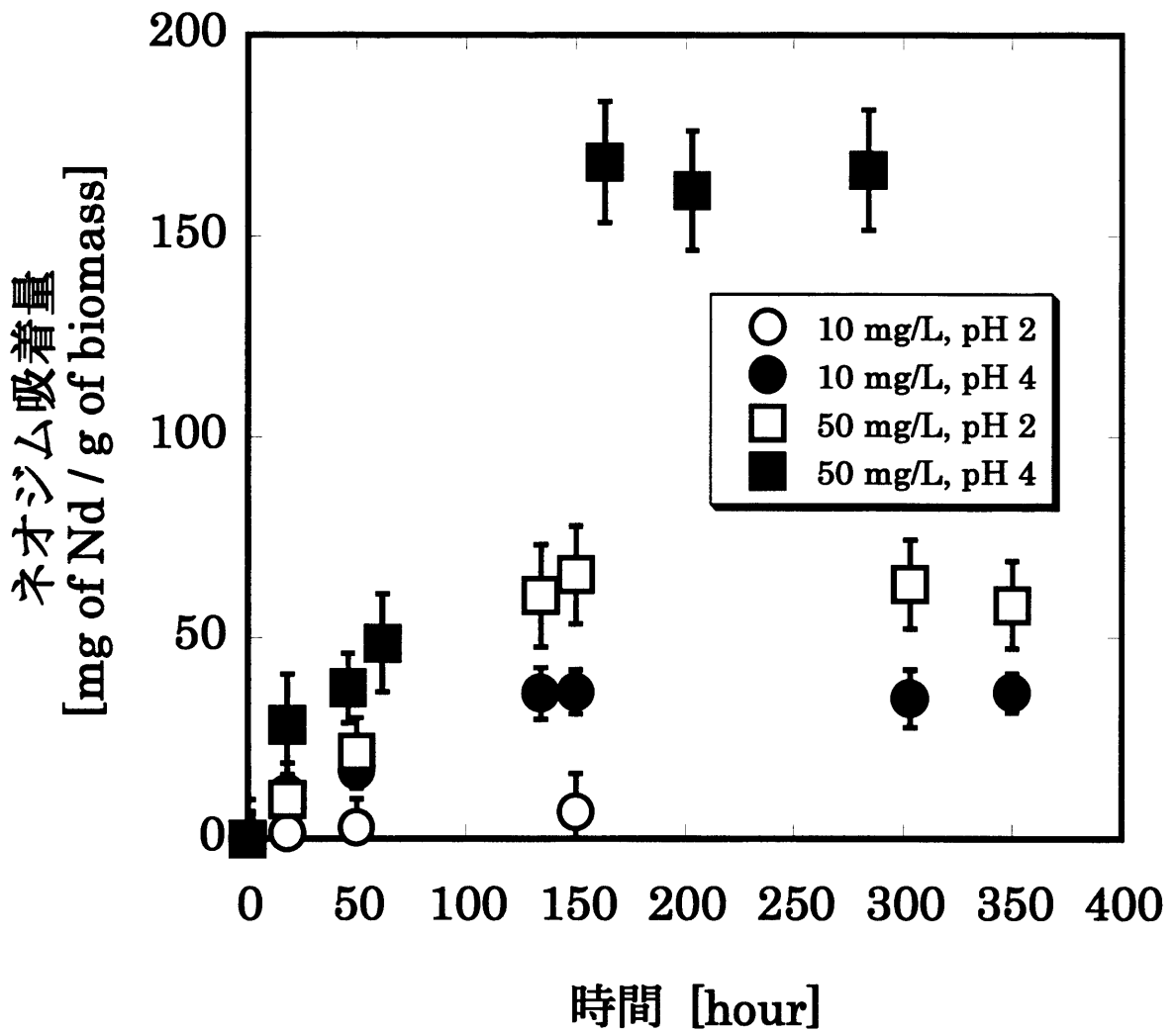


図 3.5 鉄酸化細菌の単位質量あたりの
ネオジム吸着量の経時変化

3.2 鉄酸化細菌へのウランの吸着

実験手順

① ウラン溶液の作製

UO₂粉末を 15 M の HNO₃ 溶液に加え、攪拌しながら熱し、溶解した。水分を蒸発させ、UO₂(NO₃)₂を得た。これを蒸留水で溶かし、ウラン溶液とした。

② 細胞の乾燥重量

3.1 と同手順で鉄酸化細菌を培養、回収し、0.54 mg/mL の細胞懸濁液を作製した。

③ 鉄酸化細菌とウランとの接触実験

①で作製したウラン溶液を pH 4.0 の H₂SO₄ 溶液で希釈し、10 mg/L のウラン溶液を作製した。ウラン溶液 18 mL に対して、②で作製した細胞懸濁液を 2 mL 加え、30℃、100 rpm で振とうした。また、10 mg/L のウラン溶液 18 mL に無細胞溶液を 2 mL 加えた試料を用意し、細胞による効果を評価した。一定時間ごとに溶液 1.5 mL を採取し、採取試料を孔径 0.1 μm のフィルターでろ過し、細胞を除去した後、ろ液中のウラン濃度をアルセナゾⅢ法により定量した。

④ アルセナゾⅢによるウランの定量方法

容積 10 mL のメスフラスコに 8 M HCl 溶液を 2 mL 加えた。試料から採取した溶液を 0.5 mL 加え、さらに 8 M HCl 溶液を 2.5 mL 加えた。アルセナゾⅢは U⁴⁺と錯体を形成し、染色する。本実験で用いたウラン溶液中のウランはすべて 6 価として存在するため、還元剤として亜鉛粉末をメスフラスコに 0.2 g 加えた。15 分間静置し、0.1 g/L のアルセナゾⅢ溶液を 0.4 mL 加え、染色させた。8 M HCl 溶液で、メスフラスコ内の溶液の全量が 10 mL になるようメスアップした。紫外可視分光光度計で波長 665 nm の吸光度を測定した。濃度既知のウラン溶液を用いて上記と同様の染色操作を行い、紫外可視分光光度計で吸光度を測定し、その吸光度とウラン濃度の検量線を作成した。これを用いて実際の溶液中のウラン濃度を決定した。図 3.6 にウラン-アルセナゾⅢ錯体吸収スペクトル、図 3.7 に検量線を示す。図 3.6 から、ウラン濃度が増加すると、波長 665 nm のピークが増大し、波長 540 nm のピークが減少することがわかる。波長 665 nm のピークがウラン-アルセナゾⅢ錯体の吸収ピークを示し、波長 540 nm のピークが、ウランと錯体を形成したために減少したアルセナゾⅢの吸収ピークであることを示している。

結果と考察

ウランの減少量をネオジムのときと同様に次の (3.3) 式で評価した。

3. 鉄酸化細菌へのウランの吸着について

$$C_t = C_0 - C_m \quad (3.3)$$

C_t : ウラン濃度の減少量 [mg/L]

C_0 : ウラン濃度の初期値 [mg/L]

C_m : 一定時間経過後ウラン濃度 [mg/L]

この式から得られたウラン濃度の減少量の経時変化を図 3.8 に示す。鉄酸化細菌の単位質量あたりのウランの吸着量もネオジムのときと同様に、次の (3.4) 式で評価した。

$$C_{\text{bio}} = \frac{C_t}{M_{\text{bio}}} \quad (3.4)$$

C_{bio} = 鉄酸化細菌へのウランの吸着量 [mg of U/g of biomass]

C_t = ウランの減少量 [mg/L]

M_{bio} = 鉄酸化細菌の濃度 [g/L]

(3.4) 式で評価した吸着量の経時変化を図 3.9 に示す。また、ウラン濃度の誤差は吸光度の測定を 3 回行い、その標準偏差をもとに、誤差伝播より評価した。

図 3.8 から、鉄酸化細菌を接種したものでは溶液中のウラン濃度は減少しているが、接種していないものでは溶液中のウラン濃度の減少は見られなかった。このことから、ウランは鉄酸化細菌へ吸着したと考えられる。また、図 3.9 から、鉄酸化細菌の単位質量あたりに吸着したウラン濃度は、振とう開始から 96 時間の時点で飽和状態に達したと判断できる。pH 4.0 における鉄酸化細菌の単位質量あたりのウラン吸着量は 58.6 ± 8.5 mg of U/g of biomass であった。この値は 96, 168, 214 時間における平均から求めた。

ウランでもネオジムと同様に、吸着量が pH、ウラン濃度に依存するか明らかにすることが今後の研究課題である。

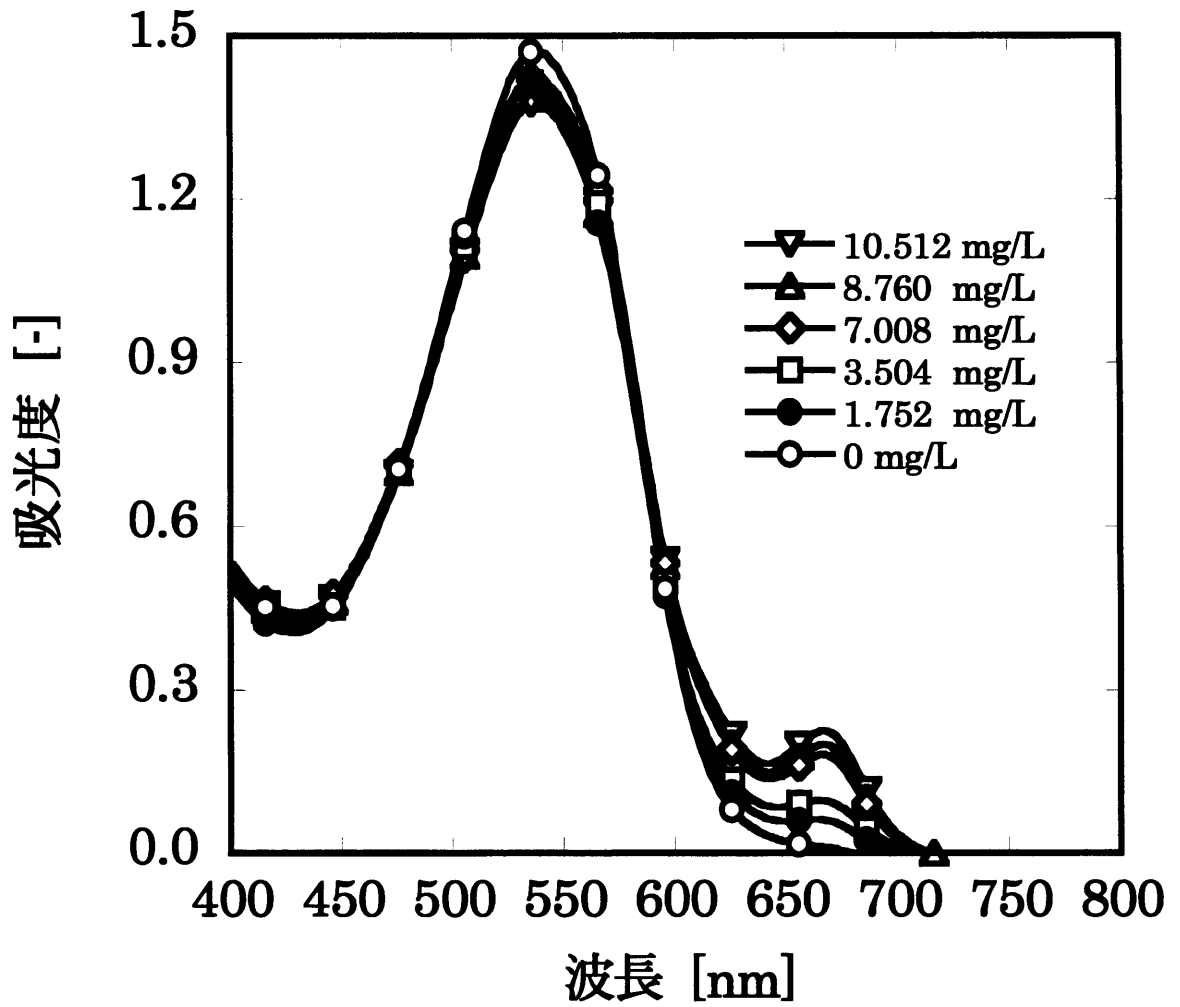


図 3.6 ウラン-アルセナゾⅢ錯体吸収スペクトル

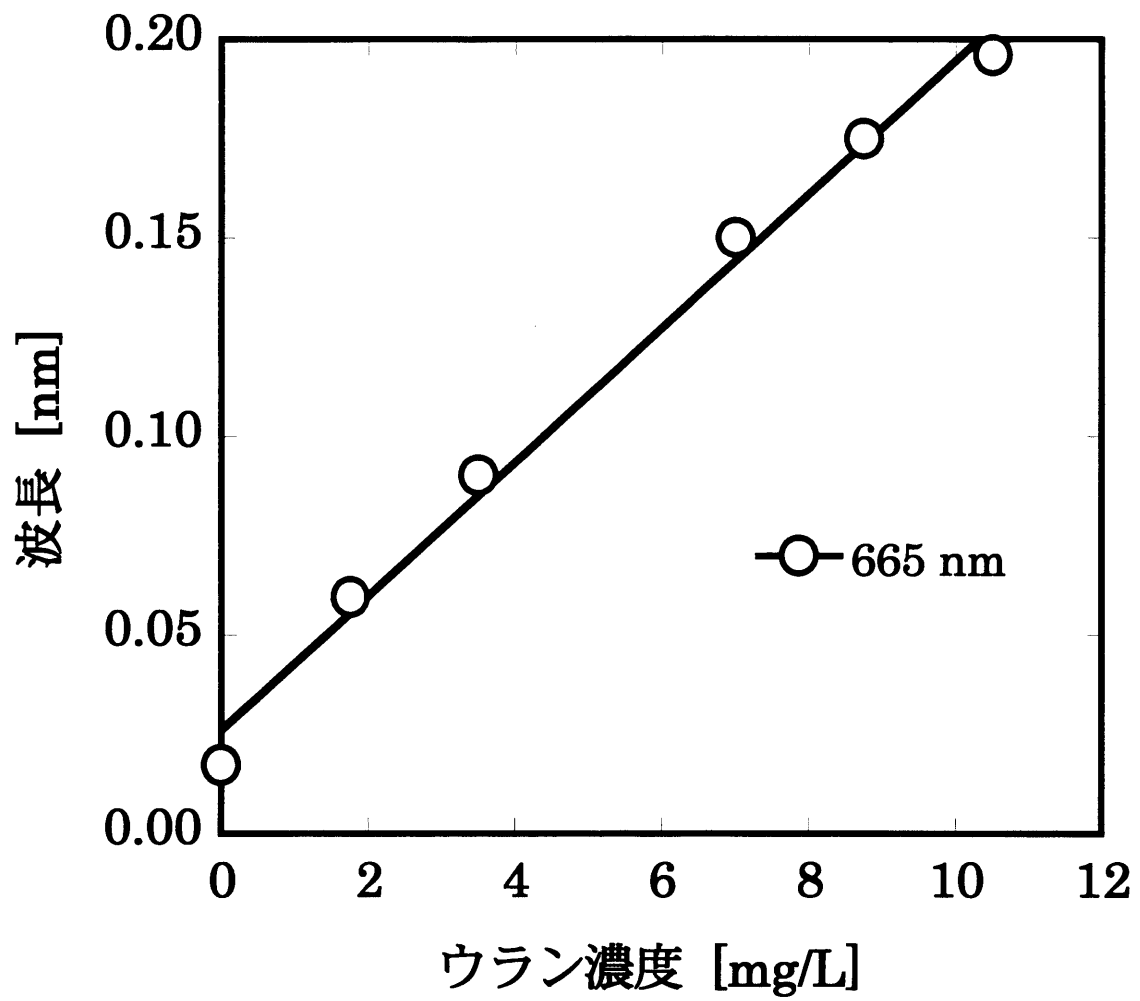


図 3.7 ウラン濃度の検量線

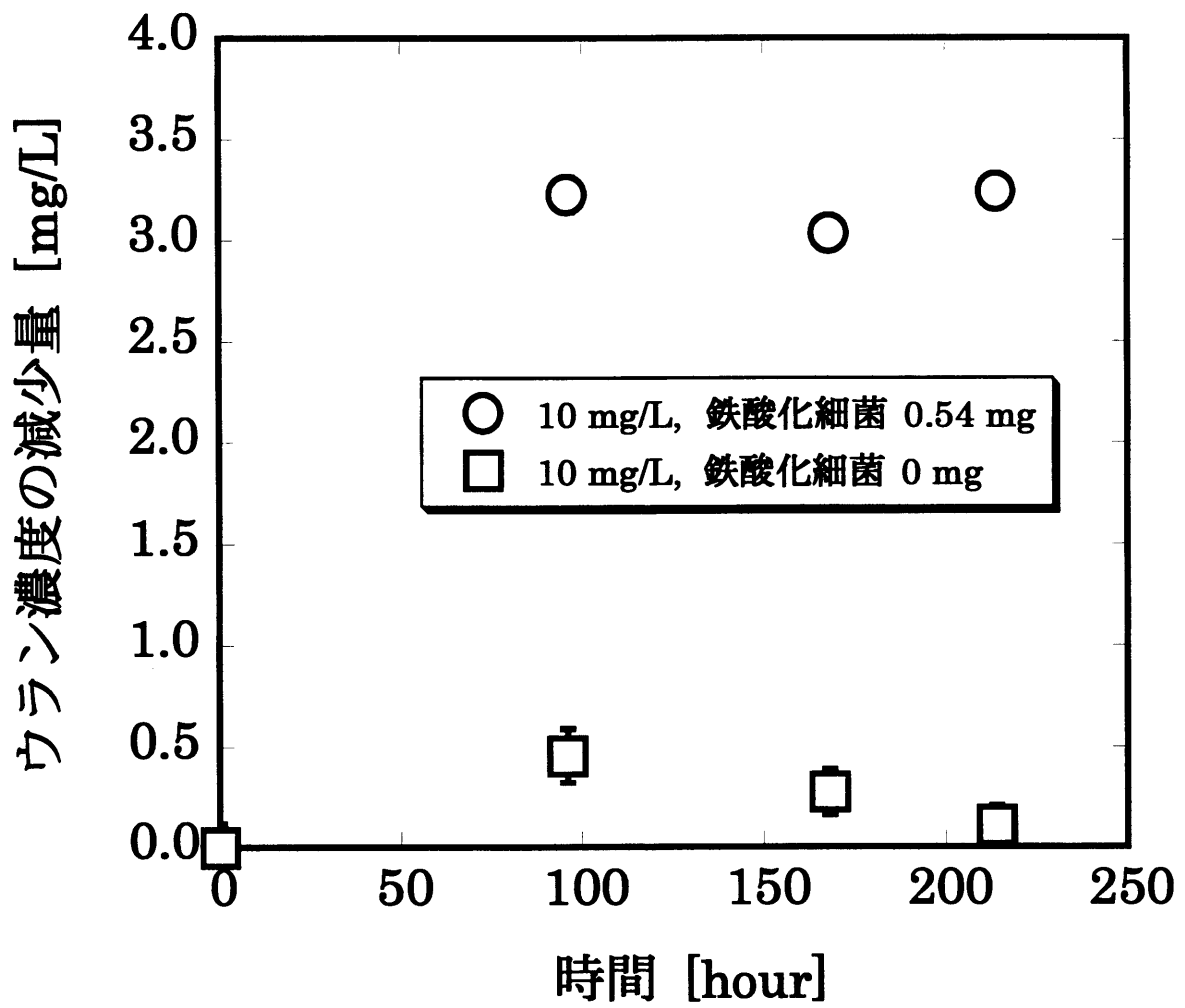


図 3.8 ウラン濃度減少量の経時変化

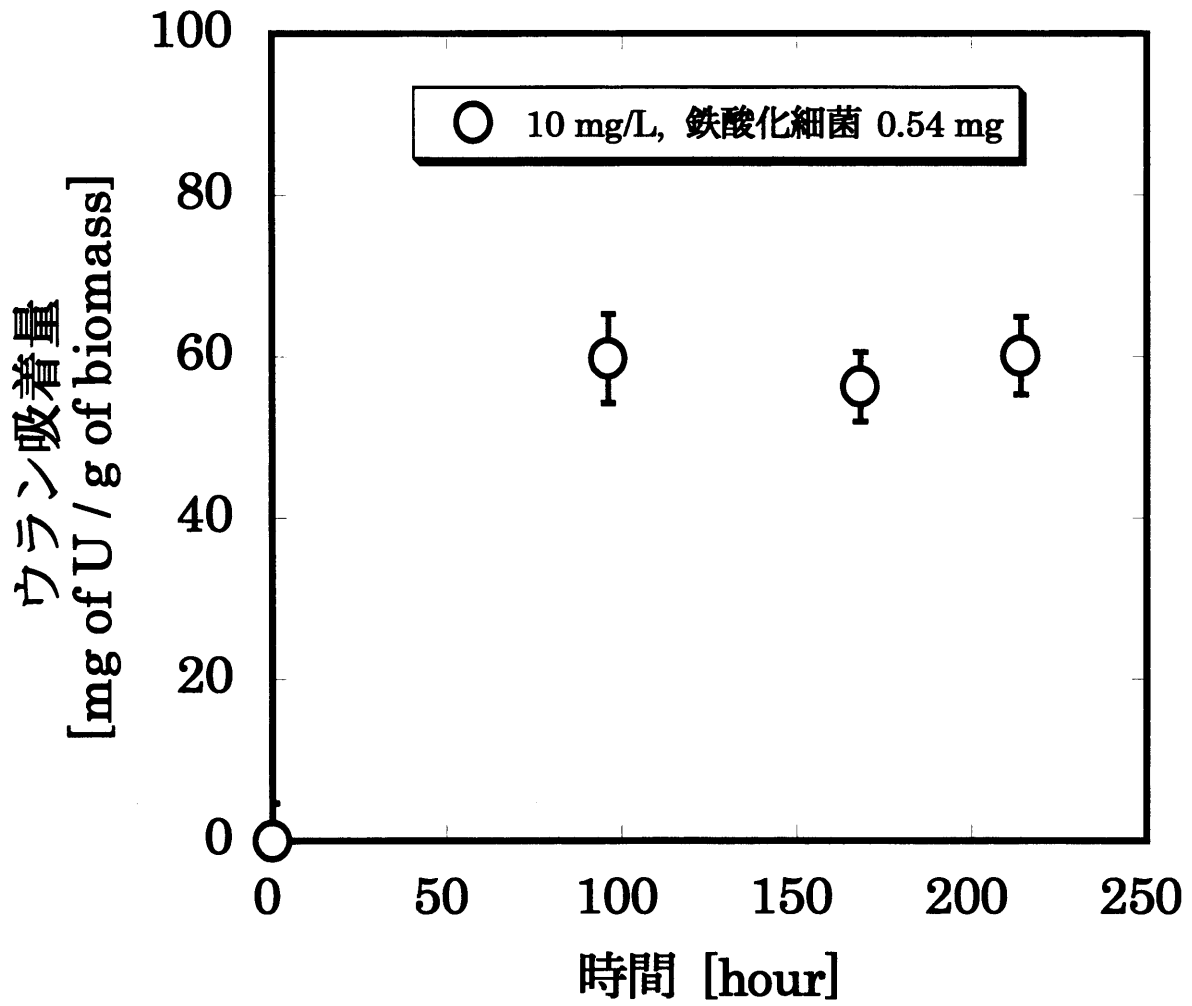


図 3.9 鉄酸化細菌の単位質量あたりの

ウラン吸着量の経時変化

4. 好気性条件下での 鉄酸化細菌による U(IV)の酸化について

好気性条件下で、鉄酸化細菌は細胞表面で不溶性の UO_2 を可溶性の UO_2^{2+} に、酵素反応により直接的に酸化する能力を有する[11]。また、 Fe^{2+} が存在する系において、鉄酸化細菌が生成する Fe^{3+} によっても間接的に酸化される。この鉄酸化細菌による UO_2 の酸化、溶出反応は、アメリカ、カナダのウラン鉱山では鉱業技術として実際に利用されている[10]。

本研究で用いた株菌に関しては UO_2 を酸化するという報告例がなかったため、酸化能力を有するか否か調べた。本株菌が UO_2 に対して、直接的な酸化作用を及ぼすか調べるため、実験は無鉄の条件下でおこなった。

実験手順

① 培養

9K 培地 250 mL を容積 500 mL の三角フラスコにいれ、オートクレーブ滅菌した。この培地に鉄酸化細菌を植菌し、対数増殖期に達したところで培養液を 3000 rpm で 30 分間遠心分離し、細胞を回収した。回収した細胞を 0.01 M H_2SO_4 溶液で 3 回洗浄した後、同濃度の H_2SO_4 溶液に懸濁し、0.37 mg/mL の細胞懸濁液を作製した。

② 鉄酸化細菌による UO_2 酸化実験

容積 500 mL の三角フラスコに、250 mL の無機培地を加え、 H_2SO_4 溶液で pH を 2.8 に調整した。表 4.1 に無機培地の成分を示す。その後、無機培地と UO_2 粉末を個別にオートクレーブ滅菌した。無菌状態のクリーンベンチ内で、無機培地に UO_2 粉末を 0.135 g 加えた。①で作製した細胞懸濁液を 1 mL 加え、30°C、100 rpm で振とう培養した。また、同溶液 250 mL に無細胞溶液を 1 mL 加えた試料を用意し、細胞による効果を評価した。一定時間ごとに溶液 1 mL を採取し、採取試料を孔径 0.1 μm のフィルターでろ過し、細胞を除去した後、ろ液中のウラン濃度をアルセナゾⅢ法により定量した。定量方法は 3.2 ④と同様である。また、実験終了後の培養液を孔径 0.1 μm のフィルターでろ過し、細胞を除去した後、ろ液の吸光スペクトルを紫外可視分光光度計で測定した。

4. 好気性条件下での鉄酸化細菌による U(IV)の酸化について

表 4.1 無機培地成分 [g/L]

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.00
KCl	0.10
MgSO_4	0.24
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01

結果と考察

溶液中のウラン濃度の経時変化を図 4.1 に示す。鉄酸化細菌を植菌した培地では時間とともに溶液中にウランが溶出した。培養開始からおよそ 200 時間後には、ほぼ全量のウランが溶出した。UO₂からウランが溶出する様子を図 4.2 に示す。一方、無細胞培地では一部ウランの溶出は認められたものの、鉄酸化細菌を植菌した培地に比べ溶出速度は遅かった。実験終了後の培養液の吸収スペクトルを図 4.3 に示す。培養液中の波長 410~450 nm 付近に吸収が観測された。これは U(VI)特有のピークである[20]。UO₂を加えなかった培地では、吸収ピークは認められなかった。これらの結果から、本研究で用いた株菌は U(IV)を U(VI)に直接酸化する能力を有すると考えられる。

4. 好気性条件下での鉄酸化細菌による U(IV)の酸化について

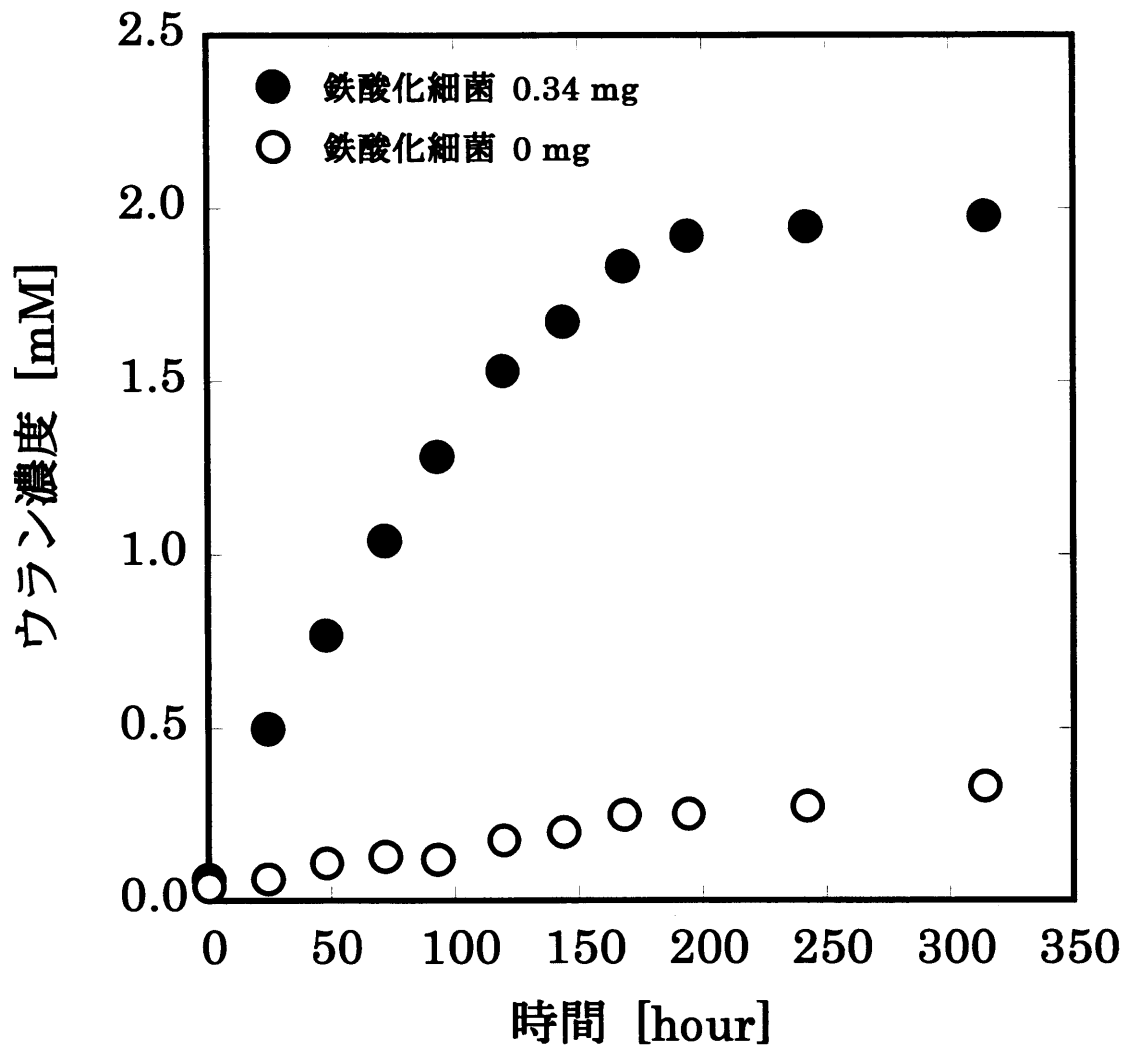


図 4.1 溶液中のウラン濃度経時変化

4. 好気性条件下での鉄酸化細菌による U(IV)の酸化について

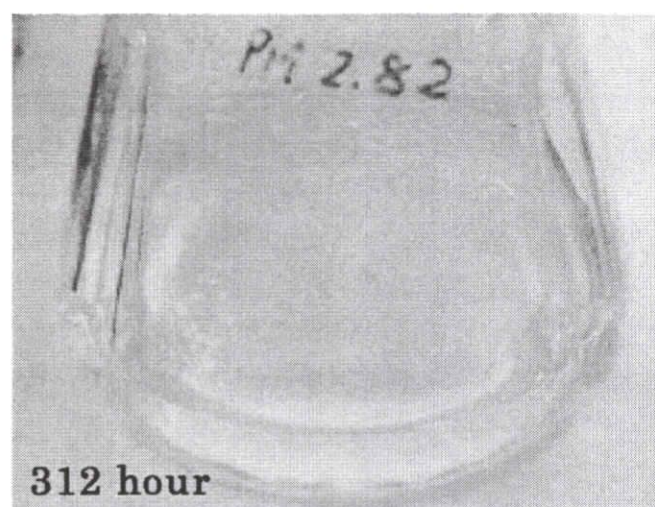
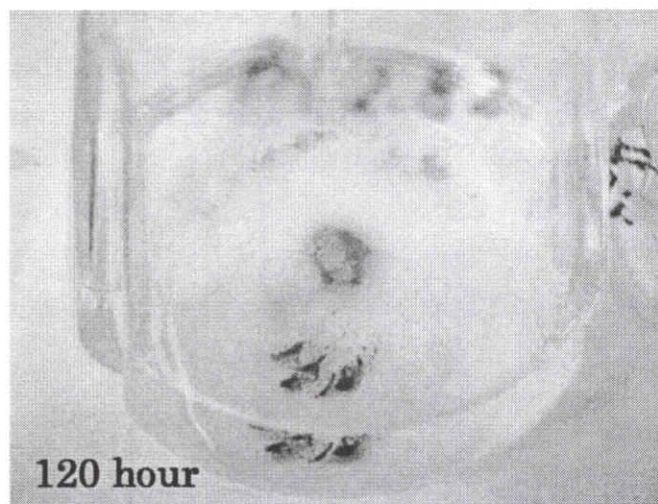
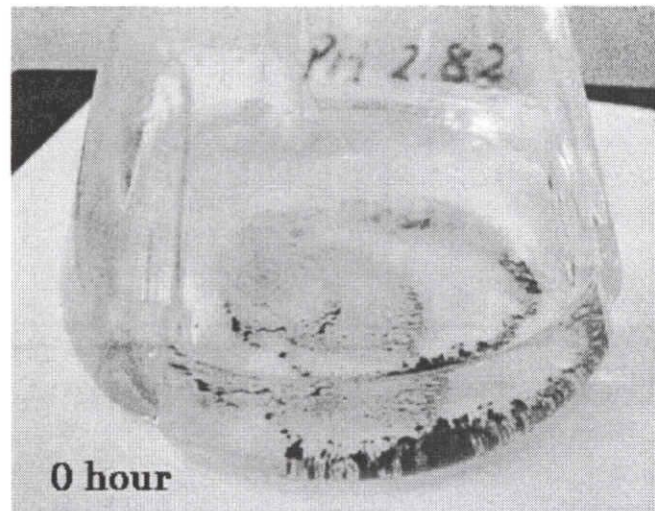


図 4.2 UO₂粉末からのウラン溶出の様子

4. 好気性条件下での鉄酸化細菌によるU(IV)の酸化について

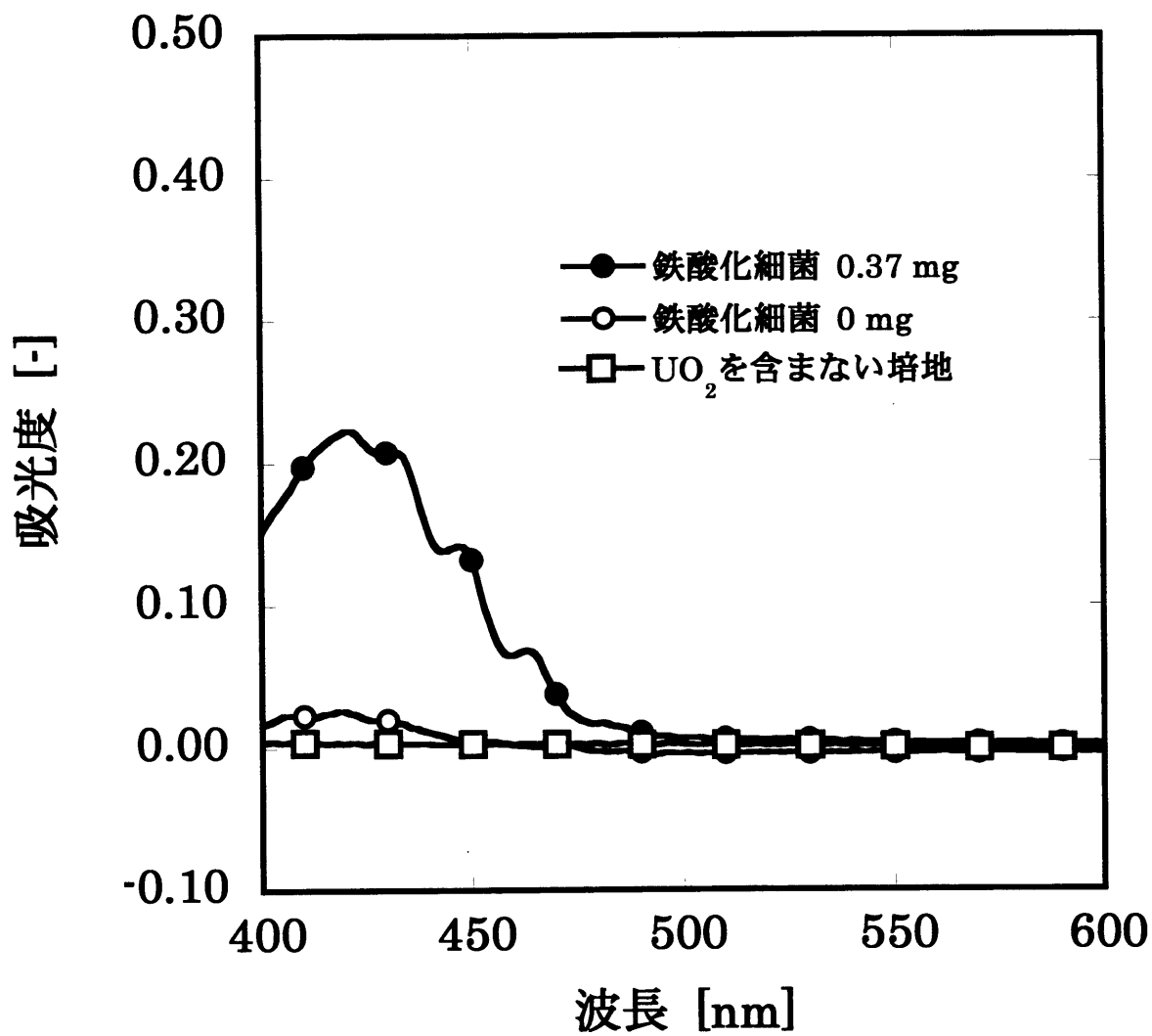


図 4.3 培養液の吸収スペクトル

5. 嫌気性条件下での 鉄酸化細菌と U(VI) との 相互作用について

これまでに、嫌気性条件下において鉄酸化細菌は Fe^{3+} 、 Cr^{6+} 、 Mo^{6+} に対して還元能を示すことが明らかにされている[13][14][15]。またその還元反応は S^0 もしくは H_2 を電子供与体とすることで可能となる。しかし、鉄酸化細菌が U(VI) に対して還元能を示すか否かは明らかにされていない。

本章では、嫌気性条件下での鉄酸化細菌による U(VI) の還元実験について報告する。はじめに、本実験で用いた鉄酸化細菌(JCM.7811)の Fe^{3+} の還元能を調べた。電子供与体として S^0 、 H_2 を用いた。続いて、U(VI) が嫌気性条件下での鉄酸化細菌の Fe^{3+} の還元能に与える影響を調べた。電子供与体として H_2 を用いた。そして、嫌気性条件下で U(VI) を含む培地で鉄酸化細菌を培養し、U(VI) を直接還元する能力を有するか否かを調べた。電子供与体として H_2 を用いた。そして、培地中に存在する配位子が、U(VI)、U(IV) とどのような錯体を形成するか、溶液中の平衡反応および実験結果から推測した。最後に、鉄酸化細菌による U(VI) の還元反応により、U(IV) のみを選択的に沈殿、分離できる可能性について検討をおこなった。

5.1 嫌気性条件下での鉄酸化細菌による Fe^{3+} 還元実験

嫌気性条件下において、鉄酸化細菌は Fe^{3+} を還元し、 Fe^{2+} を生成する能力を有する。その際、電子供与体として H_2 、 S^0 を用いることが明らかにされている。本株菌 (JCM.7811) についても同様の還元能を有することが明らかにされている。 H_2 、 S^0 を電子供与体とし、鉄酸化細菌は Fe^{3+} を還元し得るか確認することを本実験の目的とした。

図 5.1 に $\text{Fe}-\text{CO}_2-\text{H}_2\text{O}$ の系における Eh-pH ダイアグラム ($[\text{Fe}]=0.1 [\text{M}]$, $P_{\text{CO}_2}=10^{-0.3} [\text{atm}]$) を示す。pH が 2.0 より大きい領域では、 Fe^{3+} は不溶性の Fe_2O_3 として存在しやすくなることが予想される。そこで、実験には pH 2.0 の Fe^{3+} を含む培養液を用いた。

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

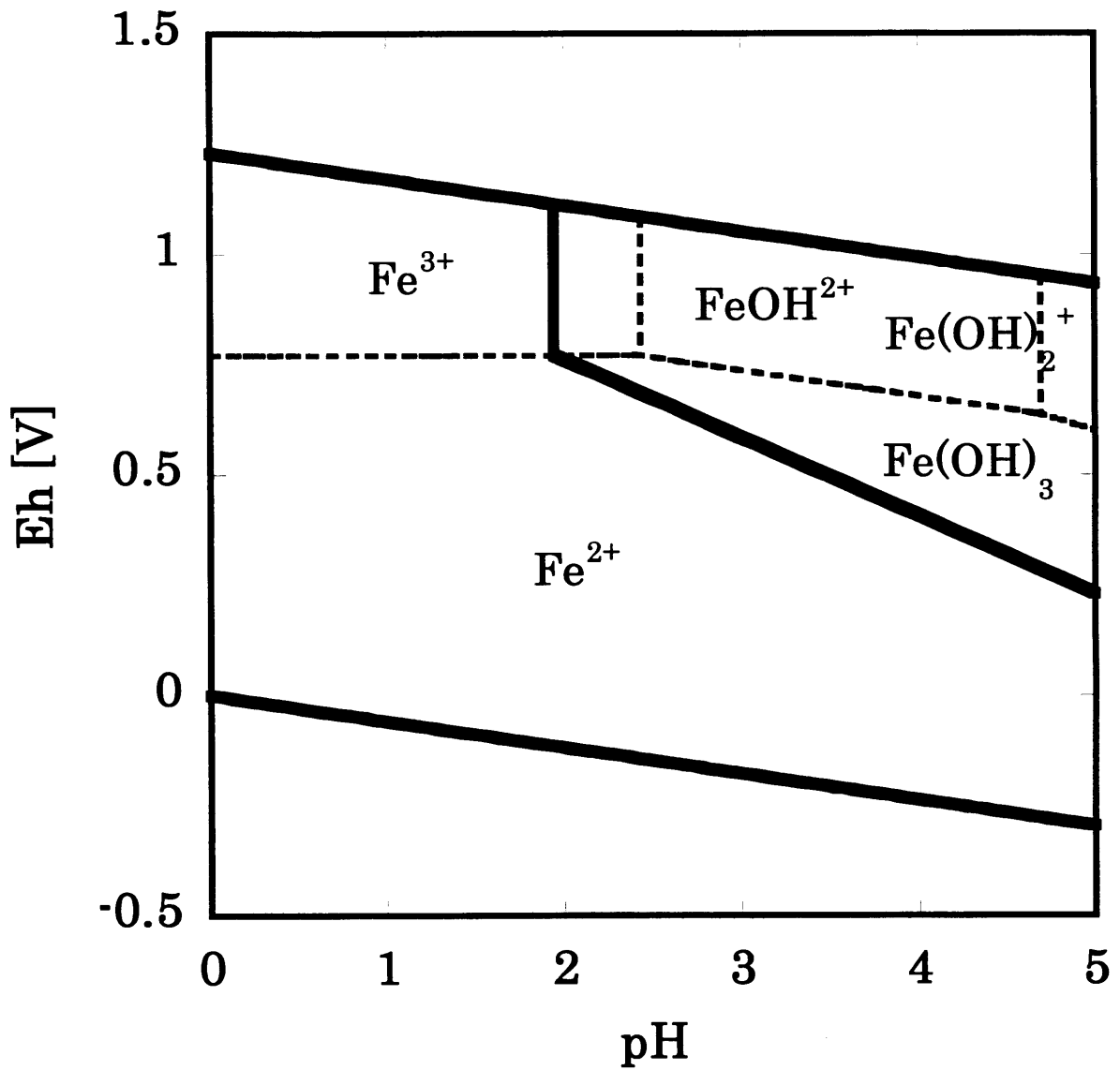


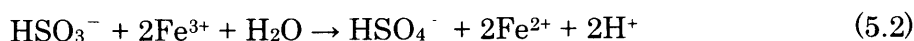
図 5.1 Eh-pH ダイアグラム

($[\text{Fe}] = 0.1 \text{ M}$, $P_{\text{CO}_2} = 10^{-0.3} \text{ atm}$)

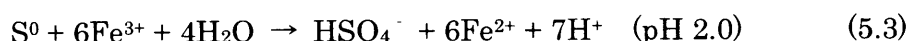
5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

5.1.1 S⁰を電子供与体として用いた Fe³⁺の還元

鉄酸化細菌は S⁰を電子供与体として、以下に示す反応式にしたがって Fe³⁺を還元し得る[13]。



全反応は以下の式にまとめられる。



S⁰を電子供与体とし、鉄酸化細菌は Fe³⁺を還元し得るか確認することを本実験の目的とした。

実験手順

① 培養

容積 500 mL の三角フラスコに 9K 培地 250 mL をいれ、オートクレーブ滅菌した。この培地に鉄酸化細菌を植菌し、対数増殖期に達したところで培養液を 3000 rpm で 30 分間遠心分離し、細胞を回収した。回収した細胞を 0.01 M H₂SO₄ 溶液で 3 回洗浄した後、同濃度の H₂SO₄ 溶液に懸濁し、0.42 mg/mL の細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を Ar ガスで脱気したものを実験で使用した。

② 鉄酸化細菌による Fe³⁺の還元実験

容積 100 mL の耐圧ガラス容器に 50 mL の培地を加え、H₂SO₄ 溶液で pH を 2.0 に調整した。表 5.1 に本実験で用いた培地の成分を示す。図 5.2 に本実験で用いた耐圧ガラス容器の写真を示す。培地と S⁰ 粉末を個別にオートクレーブ滅菌した。無菌状態のクリーンベンチ内で S⁰ 粉末を乳鉢で粉碎し、粒径 45~100 μm のものを篩い分けし、培地に 0.16 g 加えた。Ar 雰囲気グローブボックス内で、まず培地を Ar ガスで脱気し、その後、①で作製した細胞懸濁液を 1 mL 加え、耐圧ガラス容器を密封した。図 5.3 にグローブボックスの写真を示す。気相部を Ar-CO₂ 混合ガス (8 : 2)、250 kPa で置換し、30℃で恒温培養した。また、無細胞溶液を用意し、細胞による効果を評価した。一定時間ごとにグローブボックス内で溶液 1 mL を採取し、採取試料を孔径 0.1 μm のフィルターでろ過し、細胞を除去した後、ろ液中の Fe²⁺濃度をフェナントロリン法により定量した。定量方法は 2.2 ③と同様である。また、同グローブボックス内で溶液中の pH, Eh を測定した。

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

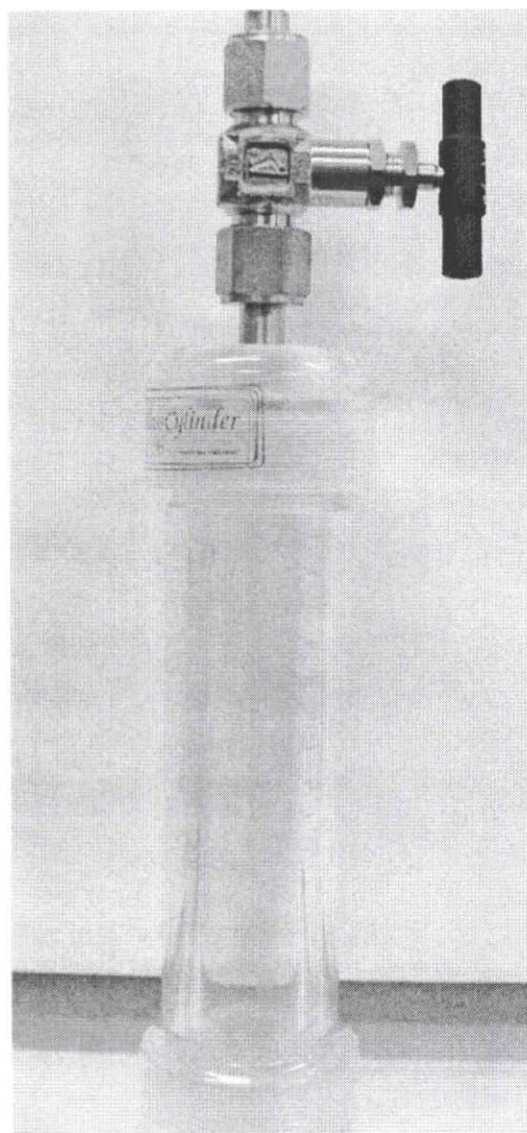


図 5.2 嫌気性雰囲気実験に使用した耐圧ガラス容器

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

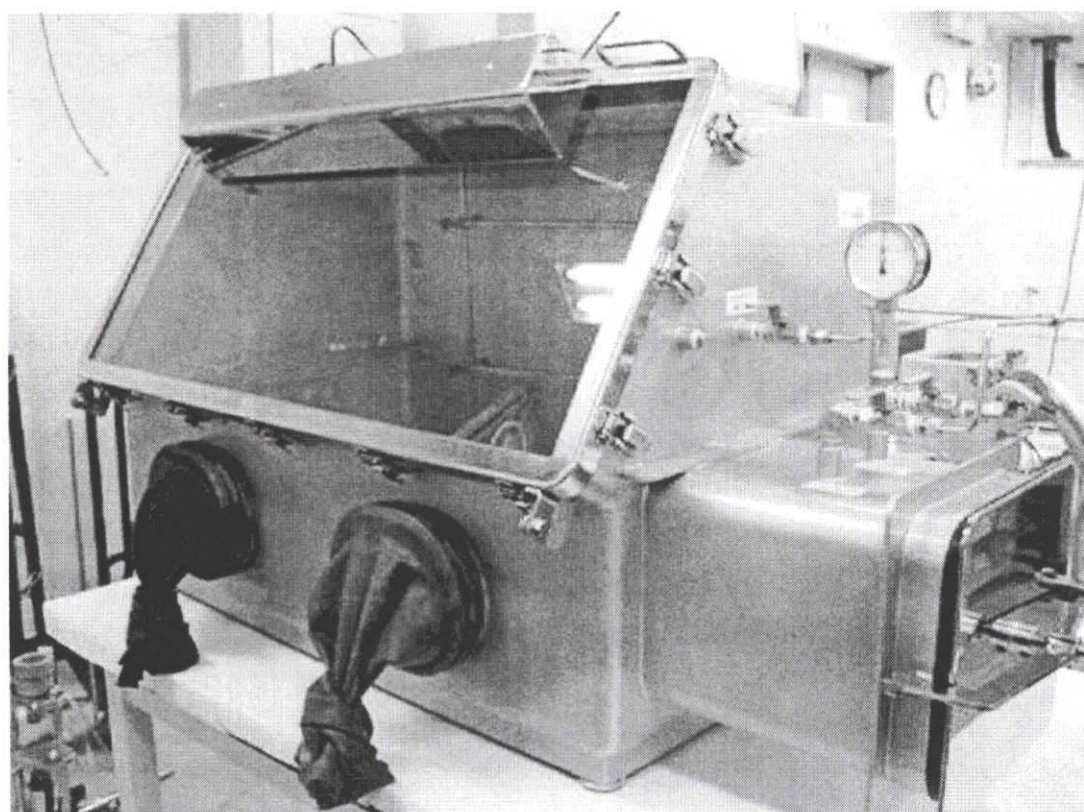


図 5.3 嫌気性雰囲気実験に使用したグローブボックス

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

表 5.1 培地成分 [g/L]

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	8.00
K_2HPO_4	0.50
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.00
KCl	0.10
MgSO_4	0.24
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01

結果と考察

図 5.4 に溶液中の Fe^{2+} 濃度経時変化を示す。図中の Fe_i は全 Fe 濃度を表す。鉄酸化細菌を植菌しなかった培地では Fe^{2+} が生成しなかったのに対し、鉄酸化細菌を植菌した培地では Fe^{2+} は生成した。よって、鉄酸化細菌は S^0 を電子供与体として、 Fe^{3+} を還元したと考えられる。図 5.5 に溶液中の pH 経時変化、図 5.6 に溶液中の Eh 経時変化を示す。鉄酸化細菌を植菌した培地、しなかった培地中の pH に有意な変化は見られなかった。(5.3)式に示す反応が実際に起こるとすると、溶液中には H^+ が生成し pH は減少すると考えられる。本実験においては、 H^+ の生成量が pH 測定器の検出下限以下であった可能性が高い。一方で、鉄酸化細菌を植菌した培地では時間とともに Eh が減少した。図 5.1 の Eh-pH ダイアグラムと比較すると、時間とともに Fe^{3+} の安定領域から Fe^{2+} の安定領域へと変化したのがわかる。これらの結果から、本株菌は S^0 を電子供与体として、 Fe^{3+} の Fe^{2+} への還元能を有することが確認された。

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

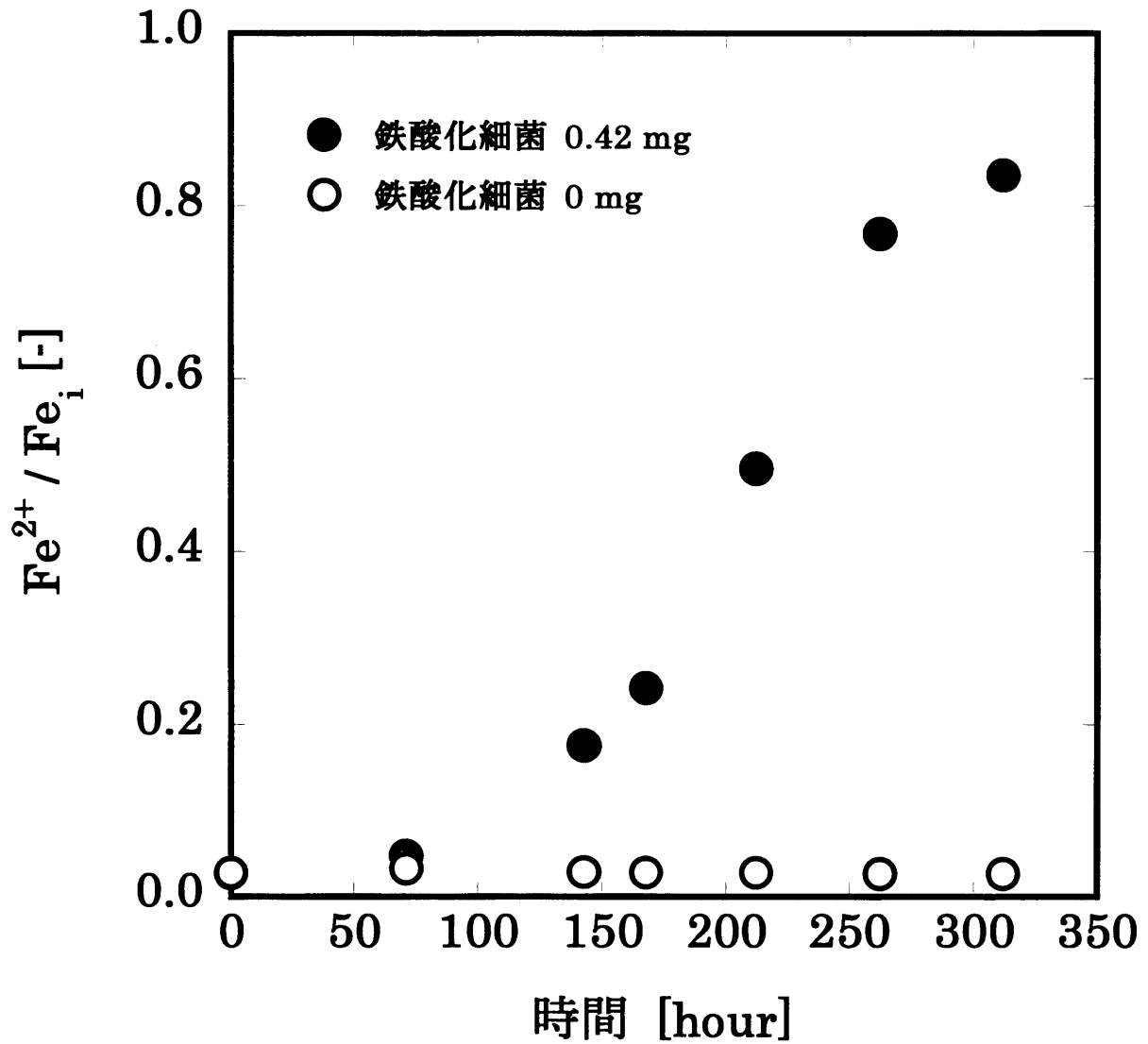


図 5.4 溶液中の Fe^{2+} 濃度経時変化

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

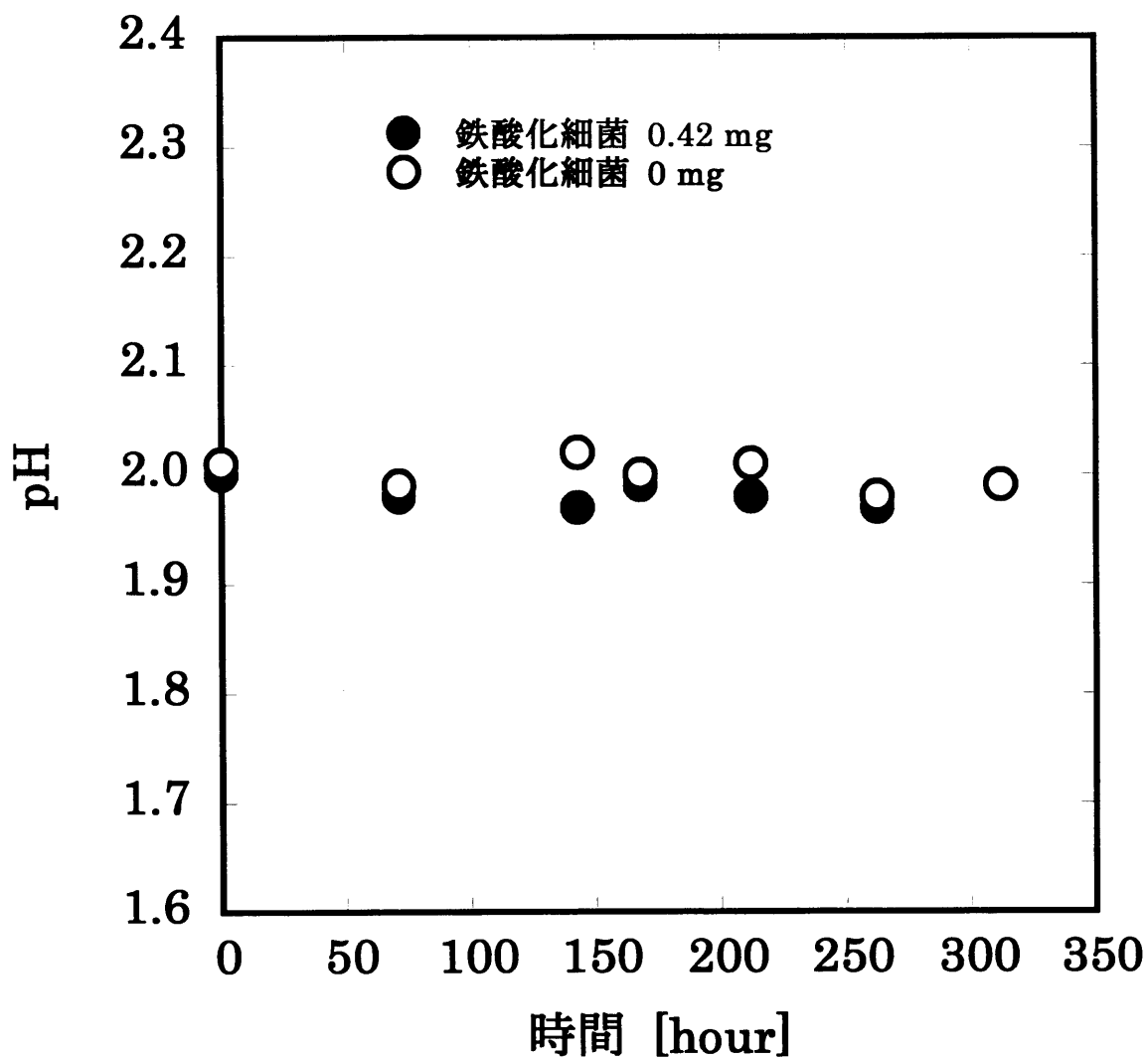


図 5.5 溶液中の pH 経時変化

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌とU(VI)との相互作用について

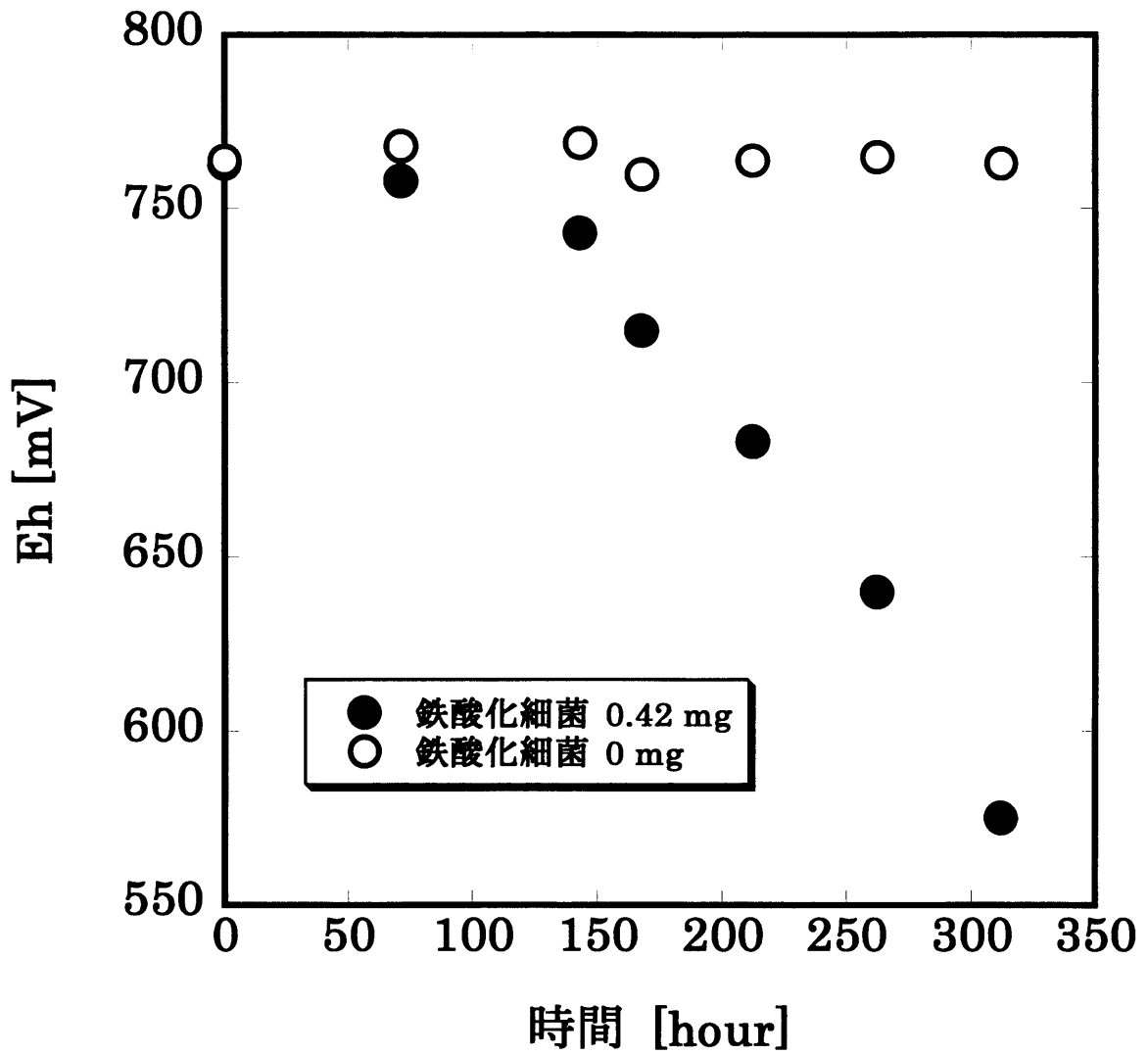
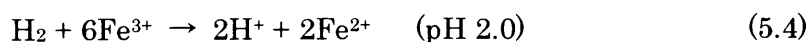


図 5.6 溶液中の Eh 経時変化

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

5.1.2 H₂を電子供与体として用いた Fe³⁺の還元

鉄酸化細菌は H₂を電子供与体として、以下に示す反応式にしたがって Fe³⁺を還元し得る[13]。



H₂を電子供与体とし、鉄酸化細菌は Fe³⁺を還元し得るか確認することを本実験の目的とした。

実験手順

① 培養

5.1.1①と同手順で鉄酸化細菌を培養、回収し、0.33 mg/mLの細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を Ar ガスで脱気したものを実験で使用した。

② 鉄酸化細菌による Fe³⁺の還元実験

容積 100 mL の耐圧ガラス容器に 50 mL の培地を加え、H₂SO₄溶液で pH を 2.0 に調整した。本実験では、5.1.1 で用いた培地と同様の培地を使用した。培地をオートクレーブ滅菌した。Ar 雰囲気グローブボックス内で、まず培地を Ar ガスで脱気し、その後、①で作製した細胞懸濁液を 1 mL 加え、耐圧ガラス容器を密封した。気相部を H₂-CO₂混合ガス (8 : 2)、250 kPa で置換し、30℃で恒温培養した。また、無細胞溶液を用意し、細胞による効果を評価した。一定時間ごとにグローブボックス内で溶液 1 mL を採取し、採取試料を孔径 0.1 μm のフィルターでろ過し、細胞を除去した後、ろ液中の Fe²⁺濃度をフェナントロリン法により定量した。定量方法は 2.2 ③と同様である。また、同グローブボックス内で溶液中の pH, Eh を測定した。

結果と考察

図 5.7 に溶液中の Fe²⁺濃度経時変化を示す。図中の Fe_i は全 Fe 濃度を表す。鉄酸化細菌を植菌しなかった培地では Fe²⁺が生成しなかったのに対し、鉄酸化細菌を植菌した培地では Fe²⁺は生成した。よって、鉄酸化細菌は H₂を電子供与体として、Fe³⁺を還元したと考えられる。図 5.8 に溶液中の pH 経時変化、図 5.9 に溶液中の Eh 経時変化を示す。鉄酸化細菌を植菌した培地、しなかった培地中の pH に有意な変化は見られなかった。一方で、鉄酸化細菌を植菌した培地では時間とともに Eh が減少した。図 5.1 の Eh-pH ダイアグラムと比較すると、時間とともに Fe³⁺の安定領域から Fe²⁺の安定領域へと変化したのがわかる。これらの結果から、本株菌は H₂を電子供与体として、Fe³⁺の Fe²⁺への還元能を有することが確認された。

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

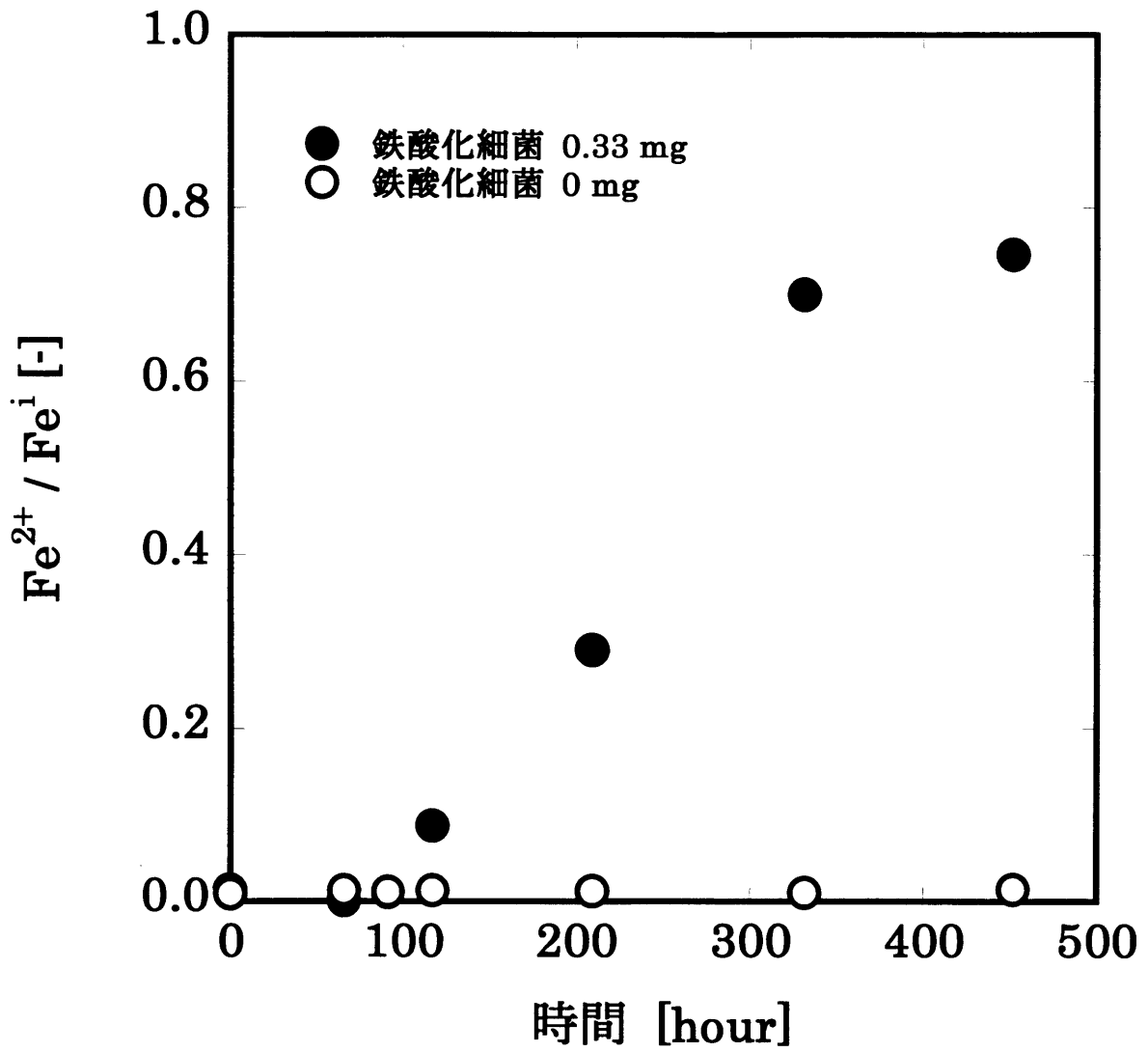


図 5.7 溶液中の Fe^{2+} 経時変化

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

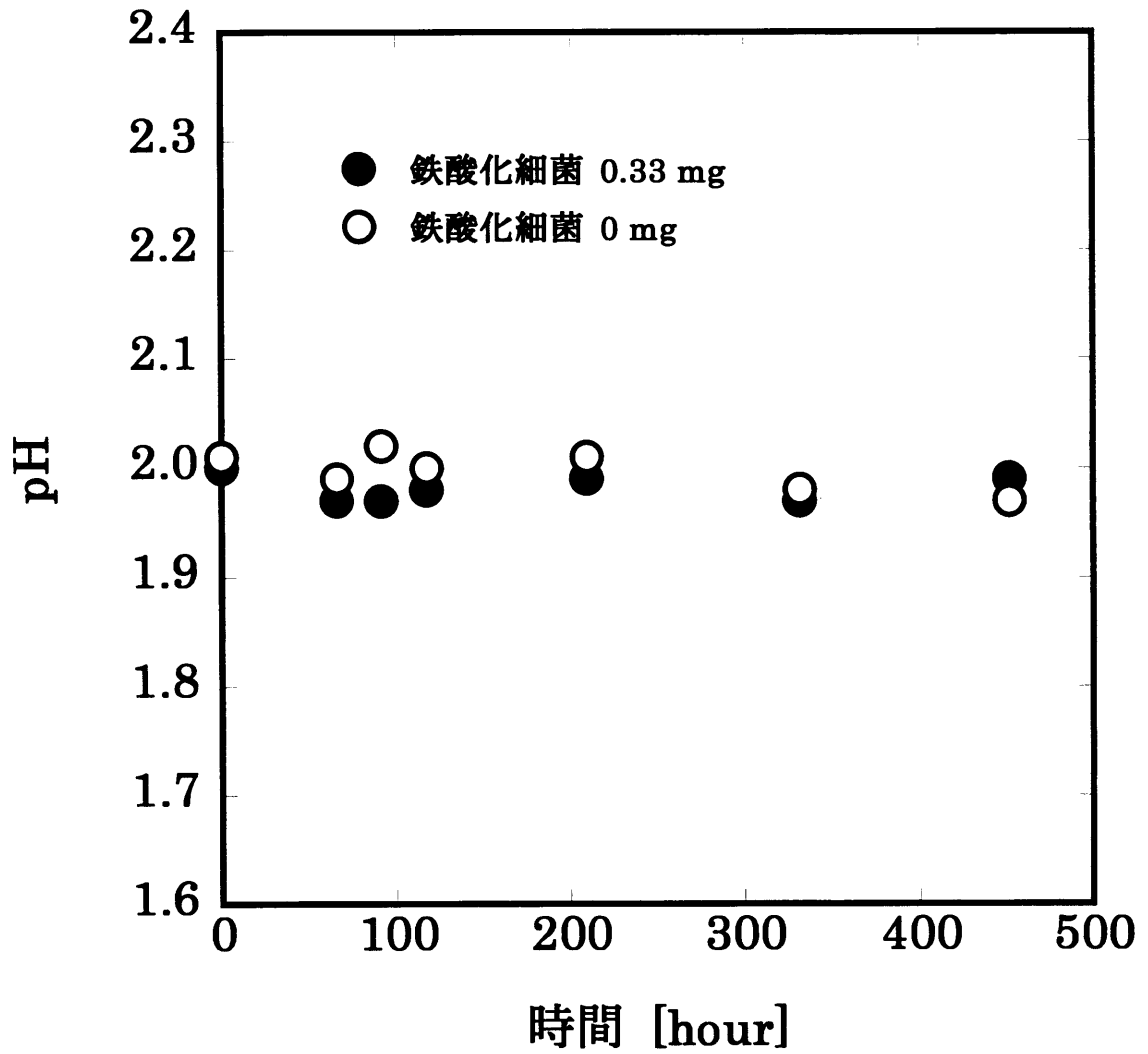


図 5.8 溶液中の pH 経時変化

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

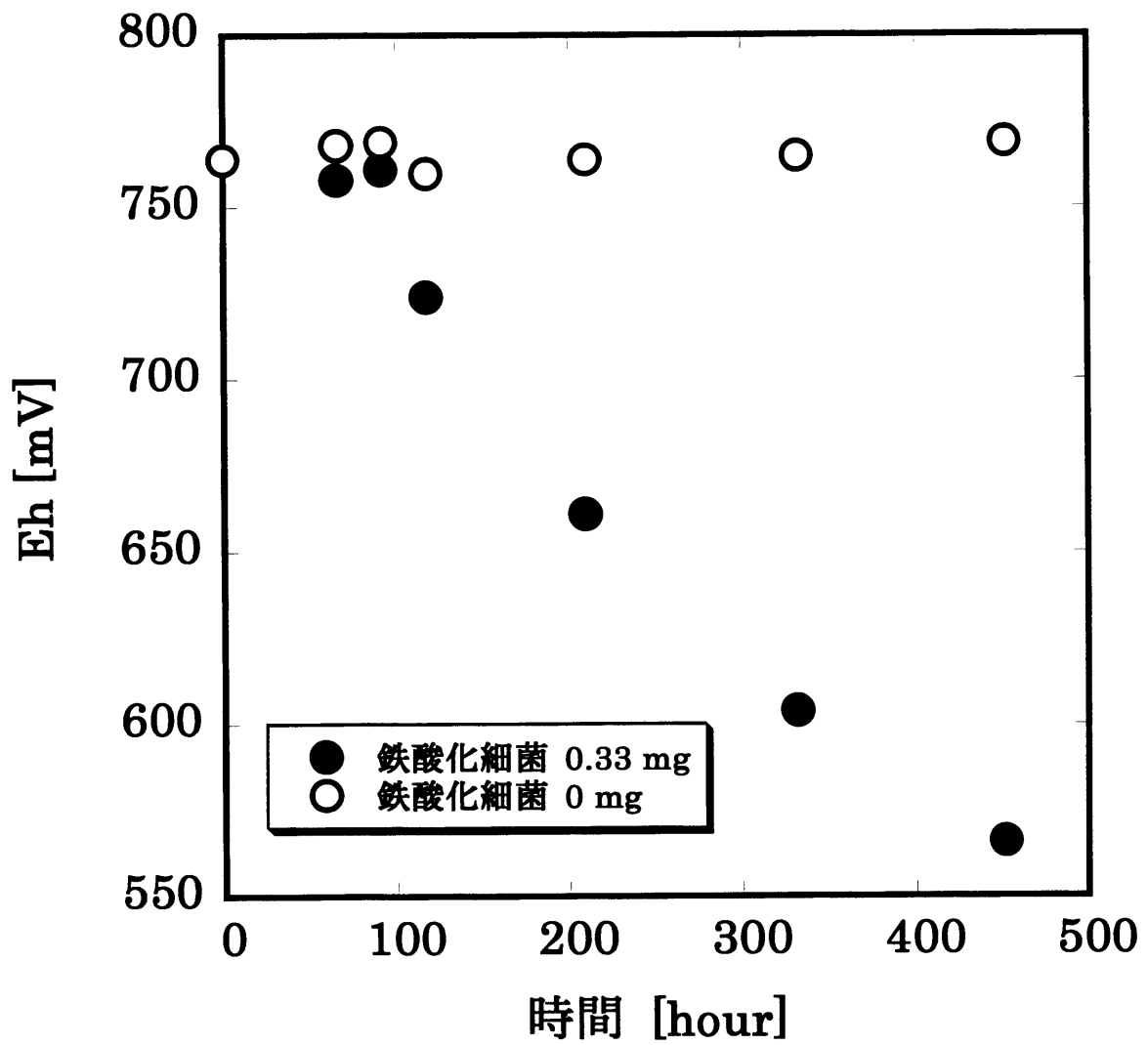


図 5.9 溶液中の Eh 経時変化

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

5.2 U(VI)存在下における Fe³⁺還元実験

Leduc ら[21]によると, Cu や Ni などの重金属に比べて, U は鉄酸化細菌への毒性がより強いとされている。株菌によって U に対する耐性は異なるが, 1 mM 以上の U(VI) 溶液中ではほとんどの鉄酸化細菌の Fe²⁺酸化反応は阻害されることを明らかにしている。本株菌の U(VI)耐性に関しては報告されておらず, また嫌気性条件下での鉄酸化細菌の重金属耐性を調べた例はない。本実験では, 1 mM U(VI)溶液中での鉄酸化細菌の Fe³⁺還元能について調べた。実験では, 電子供与体として H₂を用いた。

実験手順

① 培養

5.1.1①と同手順で鉄酸化細菌を培養, 回収し, 0.34 mg/mL の細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を Ar ガスで脱気したものを実験で用いた。

② 鉄酸化細菌による Fe³⁺還元実験

容積 100 mL の耐圧ガラス容器に 50 mL の培地を加え, H₂SO₄ 溶液で pH を 2.0 に調整した。表 5.2 に本実験で使用した培地成分を示す。培地を孔径 0.1 μm のフィルターでろ過滅菌した。培地を Ar ガスで脱気した。Ar 雰囲気グローブボックス内で, ①で作製した細胞懸濁液を 1 mL 加え, 耐圧ガラス容器を密封した。気相部を H₂-CO₂ 混合ガス (8:2), 250 kPa で置換し, 30℃で恒温培養した。また, 無細胞溶液を用意し, 細胞による効果を評価した。一定時間ごとにグローブボックス内で溶液 1.5 mL を採取した。採取試料を容積 1.5 mL の遠沈管に分取し, 6000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清液中の Fe²⁺濃度をフェナントロリン法により定量した。定量方法は 2.2 ③と同様である。また, 同グローブボックス内で溶液中の pH, Eh を測定した。

表 5.2 培地成分 [g/L]

UO ₂ (NO ₃) ₂	0.40
Fe ₂ (SO ₄) ₃	1.60
K ₂ HPO ₄	0.50
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.00
KCl	0.10
MgSO ₄	0.24
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.01

5. 嫌気条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

結果と考察

図 5.10 に溶液中の Fe^{2+} 濃度経時変化を示す。図中の Fe_i は全 Fe 濃度を表す。鉄酸化細菌を植菌しなかった培地では Fe^{2+} が生成しなかったのに対し、鉄酸化細菌を植菌した培地では Fe^{2+} は生成した。よって、鉄酸化細菌は 1 mM U(VI)存在下で Fe^{3+} を還元し得ると考えられる。図 5.11 に溶液中の pH 経時変化，図 5.12 に溶液中の Eh 経時変化を示す。図 5.1 の Eh-pH ダイアグラムと比較すると，時間とともに Fe^{3+} の安定領域から Fe^{2+} の安定領域へと変化したのがわかる。U(VI)を含まない培養液中の Fe^{2+} 濃度変化との比較を図 5.13 に示す。1 mM U(VI)を含む溶液では，含まない溶液に比べ Fe^{3+} の還元速度は遅かった。鉄酸化細菌の細胞濃度が異なるため，厳密な定量評価はできないが，U(VI)は嫌気条件下での鉄酸化細菌の代謝活動に対して，阻害剤となり得ると考えられる。今後，U(VI)濃度を変え， Fe^{3+} の還元に対して影響し始める，いわゆる阻害濃度を決定する必要がある。また，本章の 5.1 でおこなった Fe^{3+} 還元実験とは異なり，本実験で用いた培地には硝酸塩が多量に含まれている。鉄酸化細菌に対して硝酸塩が阻害剤となりうる可能性を今後検討する必要がある。

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

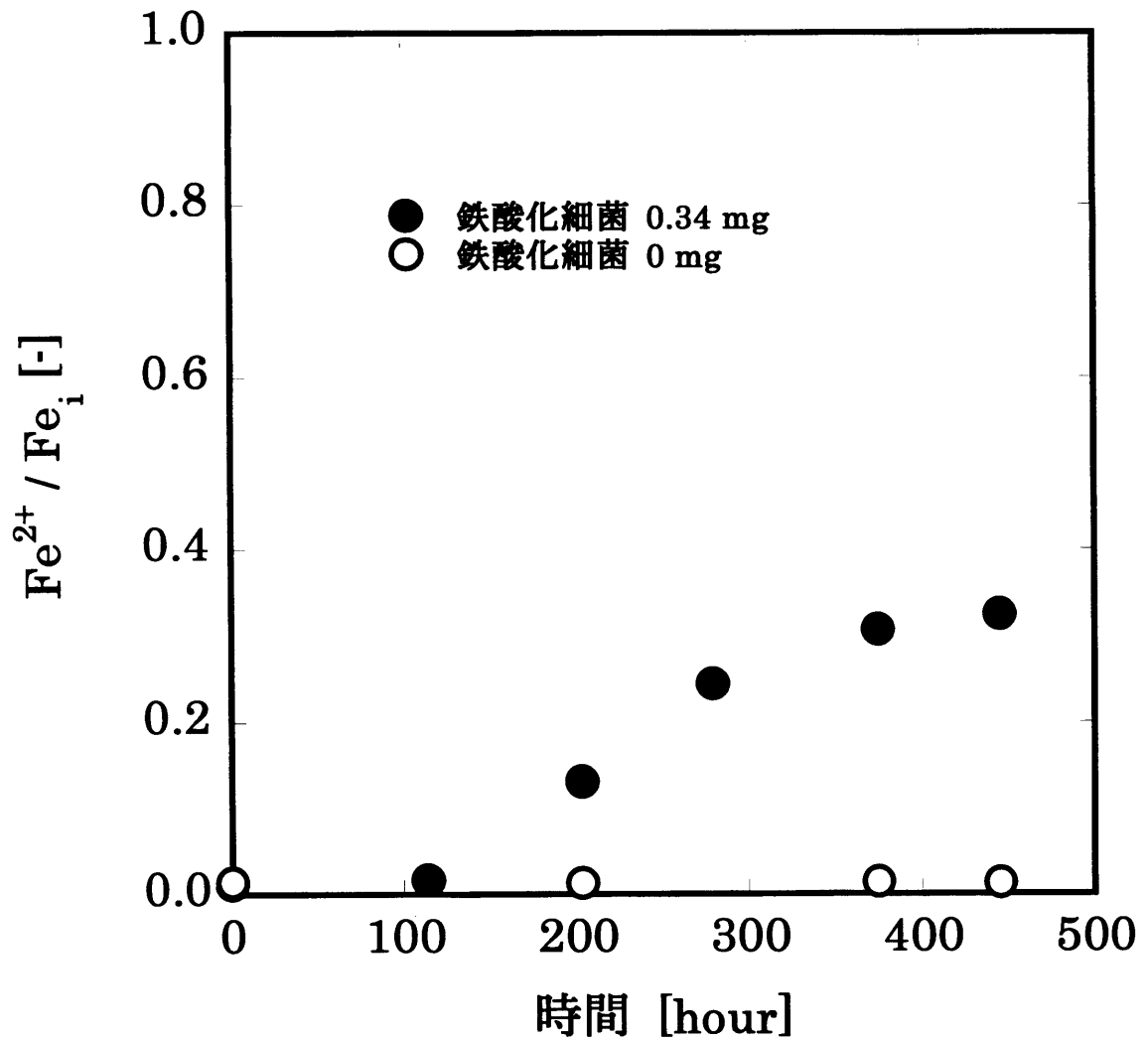


図 5.10 溶液中の Fe^{2+} 濃度経時変化

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

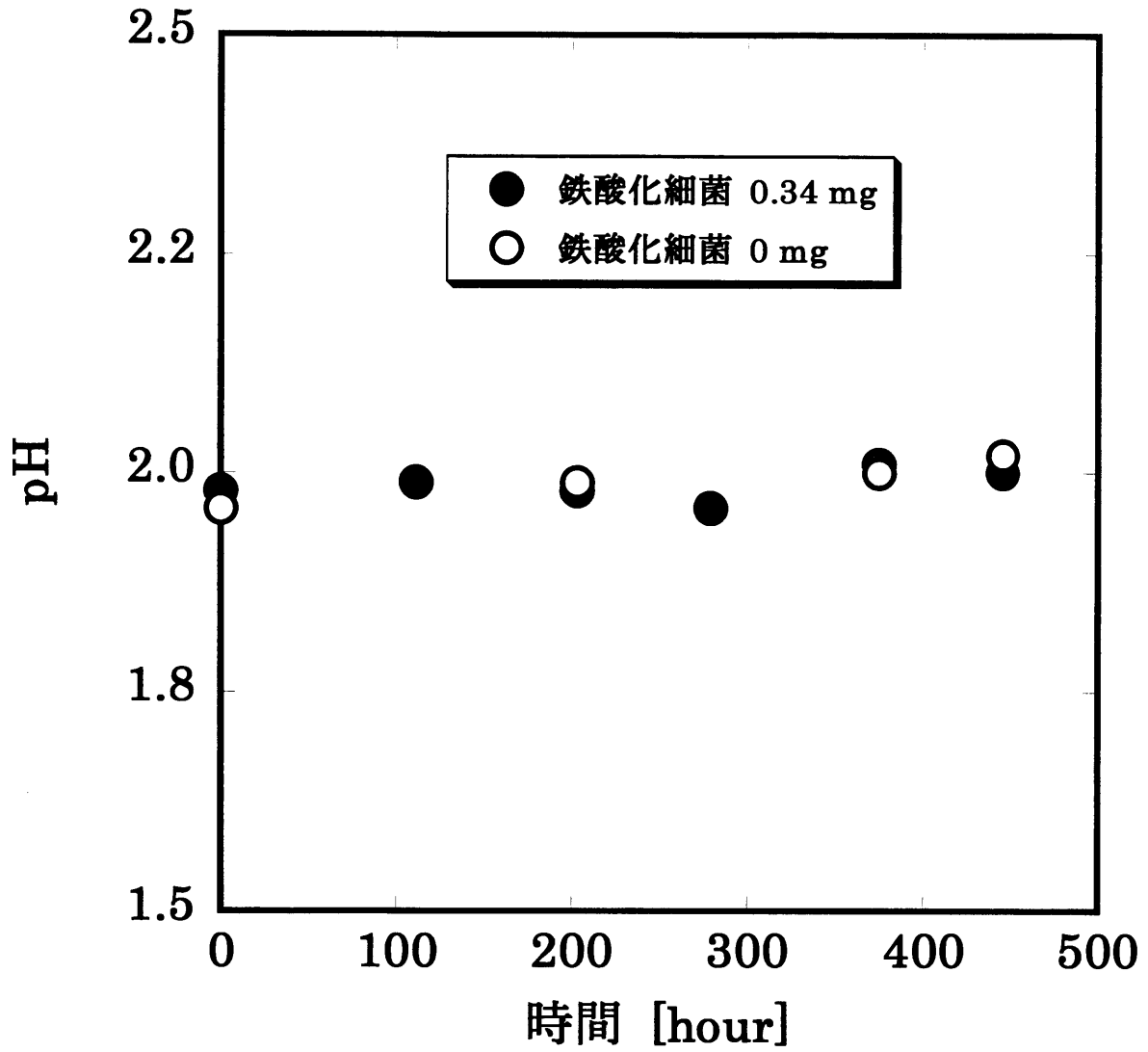


図 5.11 溶液中の pH 経時変化

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

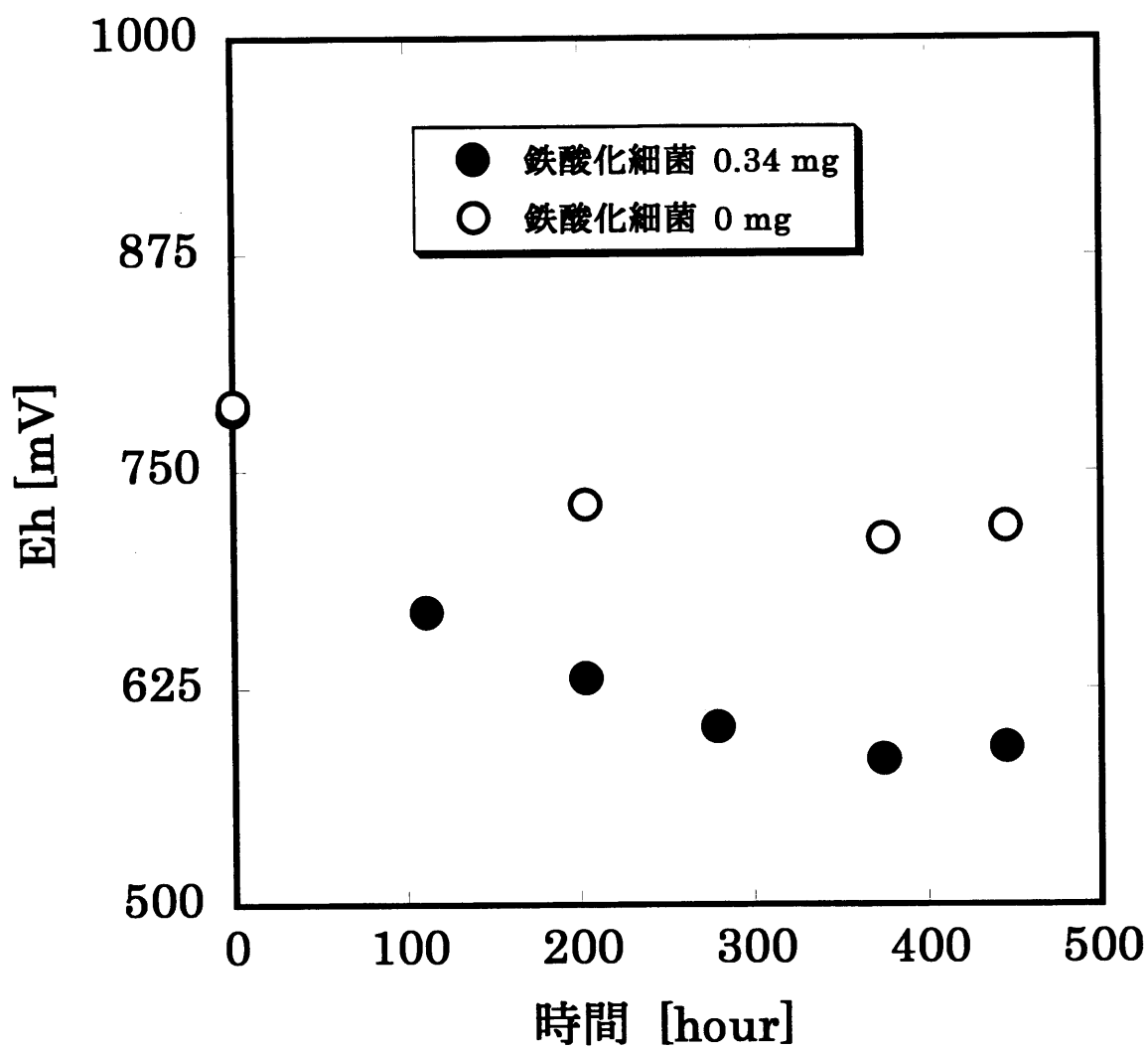


図 5.12 溶液中の Eh 経時変化

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

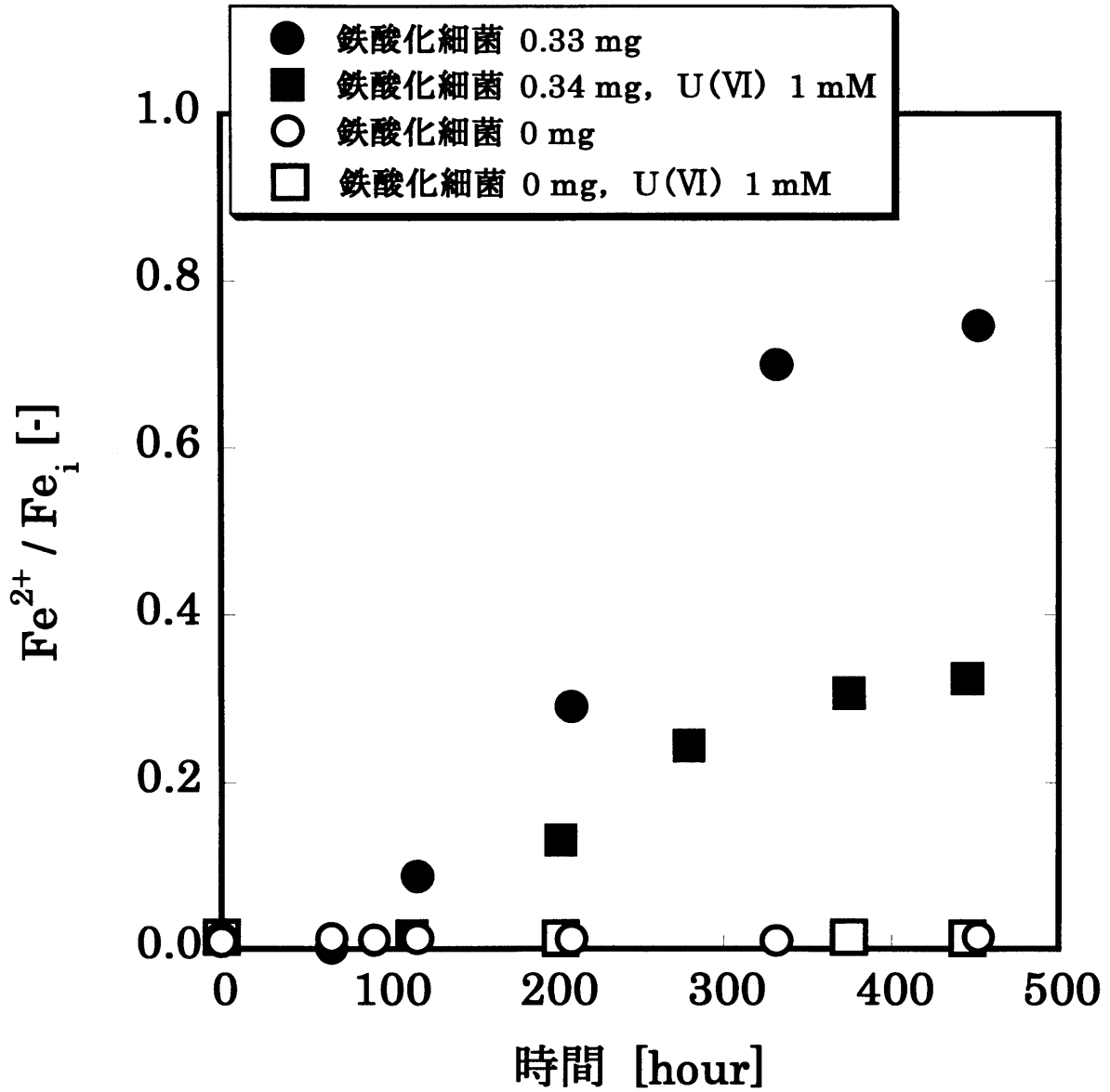


図 5.13 溶液中の Fe^{2+} 濃度経時変化

5.3 嫌気性条件下での鉄酸化細菌による U(VI)還元実験

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

本実験では、嫌気性条件下での鉄酸化細菌の U(VI)還元能について調べた。電子供与体として H₂を用い、U(VI)を含む培地中で培養した。溶液中のウラン濃度の経時変化、pH, Eh 経時変化、培養中に生成した沈殿物中の元素分析、培養後の溶液中の吸収スペクトルを測定することで、U(IV)の有無を調べた。培地中に存在する配位子が、U(VI)、U(IV)とどのような錯体を形成するか、溶液中の平衡反応および実験結果から推測した。

実験手順

① 培養

5.2.①で作製した細胞懸濁液を実験で使用した。

② 鉄酸化細菌による U(VI)還元実験

容積 100 mL の耐圧ガラス容器に 50 mL の培地を加え、H₂SO₄溶液で pH を 2.0 に調整した。表 5.3 に本実験で使用した培地成分を示す。培地を孔径 0.1 μm のフィルターでろ過滅菌した。培地を Ar ガスで脱気した。Ar 雰囲気グローブボックス内で、①で作製した細胞懸濁液を 1 mL 加え、耐圧ガラス容器を密封した。気相部を H₂-CO₂混合ガス (8:2)、250 kPa で置換し、30℃で恒温培養した。また、無細胞溶液を用意し、細胞による効果を評価した。

③ 分析

一定時間ごとにグローブボックス内で溶液 1 mL を採取した。採取試料を容積 1.5 mL の遠沈管に分取し、6200 rpm で 10 分間遠心分離した。上清液中のウラン濃度を ICP-AES (ICPS-7000, Shimadzu) により定量分析した。図 5.14 に ICP-AES の写真を示す。また、同グローブボックス内で溶液中の pH, Eh を測定した。実験終了後、グローブボックス内で培養液を 4 mL 採取し、6200 rpm で 10 分間遠心分離した。上清液を密栓キュベットに分取し、吸収スペクトルを紫外可視分光光度計で測定した。

表 5.3 培地成分 [g/L]

UO ₂ (NO ₃) ₂	0.40
K ₂ HPO ₄	0.50
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.00
KCl	0.10
MgSO ₄	0.24
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.01

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

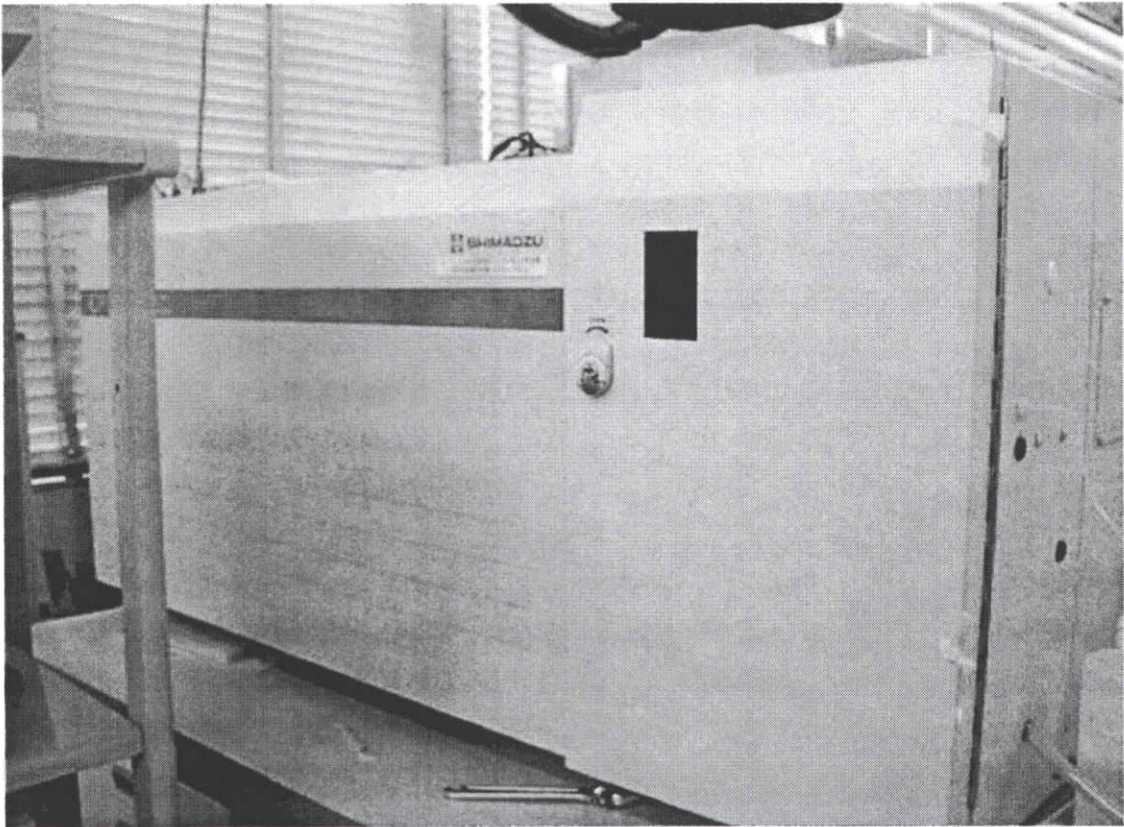


図 5.14 ウランの定量分析に使用した ICP-AES

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

結果と考察

① 実験結果

培養液中のウラン濃度の経時変化を図 5.15 に示す。鉄酸化細菌を植菌した培地、しなかった培地にかかわらず溶液中のウラン濃度の減少が見られた。減少に伴い、溶液中では沈殿の形成が観察された。ウラン濃度はおよそ 400 時間で平衡に達した。

培養後の溶液の吸収スペクトルを図 5.16 に示す。溶液中には U(VI)に特有の吸収ピーク[20]が観測されたが、波長 420, 490, 540, 640 nm 付近に現れる U(IV)の吸収ピーク[22]は観測されなかった。溶液中では U(VI)の化学種が支配的に存在すると考えられる。

溶液中の pH, Eh の経時変化をそれぞれ図 5.17, 5.18 に示す。図 5.19 に U-CO₂-H₂O の系における Eh-pH ダイアグラム ([U]=1 mM, P_{CO₂}=10^{-0.3} atm) を示す。鉄酸化細菌を植菌した培地、しなかった培地にかかわらず pH には有意な変化は見られなかった。一方で、Eh の大幅な減少が見られた。鉄酸化細菌を植菌しなかった培地でも Eh の減少が見られたことから、この減少は鉄酸化細菌による U 化学種の価数変化に起因するものではないと考えられる。H₂ の供給により、系が還元雰囲気に変化した可能性が高い。Eh-pH 図と比較すると、この雰囲気では UO₂が安定に存在しうる領域であることがわかる。作成した Eh-pH 図は無限時間後の平衡を表したものであり、実際には U(OH)₄ で沈殿し、UO₂(am), UO₂(cr)へと熱力学的に安定な化学種へと変化する。また、作成した Eh-pH 図は加水分解種、炭酸錯体種のみを想定したものであり、培地成分であり、かつ UO₂²⁺と錯形成するであろう SO₄²⁻, PO₄³⁻については考慮していない。これらの影響を考慮したうえで、より詳細に U の錯体化学種を調べ、溶液中および固相の生成化学種を把握する必要がある。

培養液中に生成した沈殿をグローブボックス内で回収し、洗浄後、乾燥させた。1 N の HCl 溶液で溶解した後、沈殿中の金属含有量を ICP-AES により定量分析した。結果を表 5.4 に示す。

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

表 5.4 沈殿中の金属含有量

元素	含有量 [wt%]	
	鉄酸化細菌 0.34 mg	鉄酸化細菌 0 mg
U	55.12	53.08
P	6.60	6.57
K	0.83	0.80
Mg	*	*

* 測定下限以下

沈殿中には、U, P, K がそれぞれ含まれていることがわかった。Mg に関しては測定下限以下であった。沈殿にはウランが含まれていたため、溶液中のウラン濃度の減少の原因は沈殿生成によるものであることが確認できた。ICP-AES による測定結果および培地成分を考慮すると、沈殿は、ウランの加水分解による水酸化物沈殿、炭酸、硫酸、リン酸との錯形成により生じたものであると予想される。本実験では、このウラン沈殿物の価数の決定には至らなかった。大貫ら[23]は、1 : 1 H₃PO₄ 溶液を用いて、細胞に吸着した U, Pu を、価数を変化させず抽出し、その液相中の吸収スペクトルを測定することで、価数ごとの定量分析をおこなっている。この手法を用いて、今後、沈殿中のウランの価数分析をおこなう予定である。

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

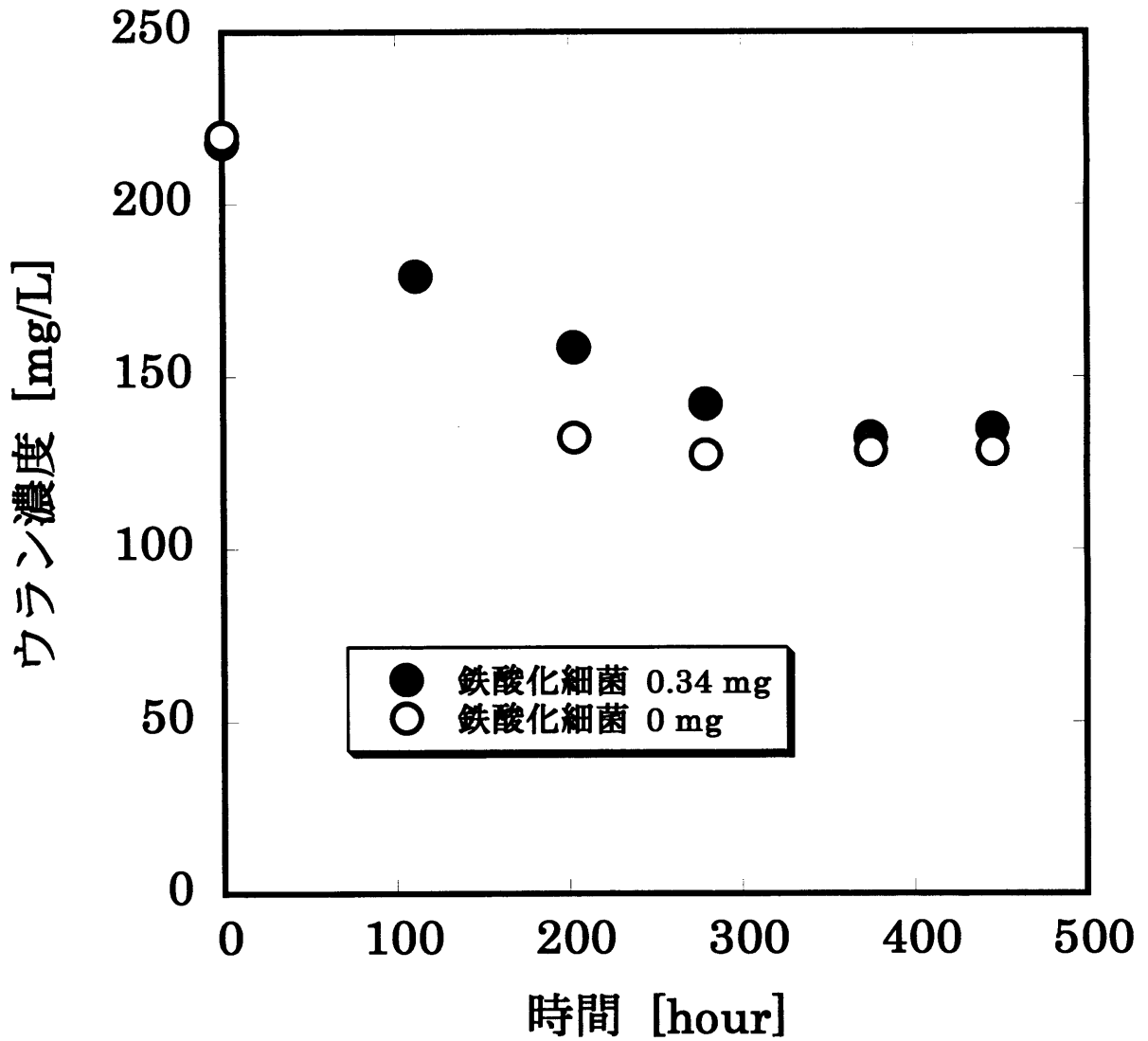


図 5.15 溶液中のウラン濃度経時変化

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

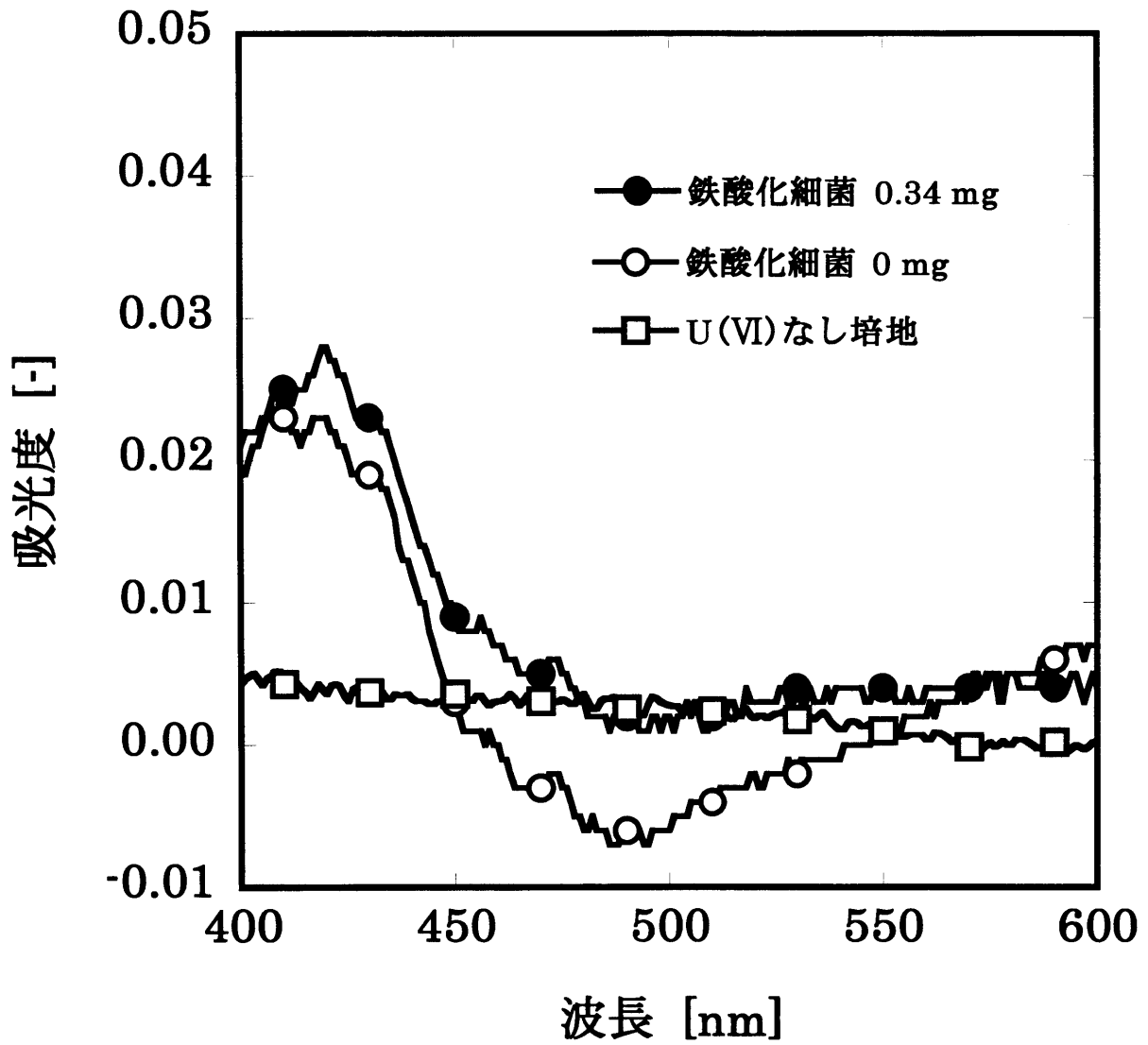


図 5.16 培養後の溶液中の吸収スペクトル

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

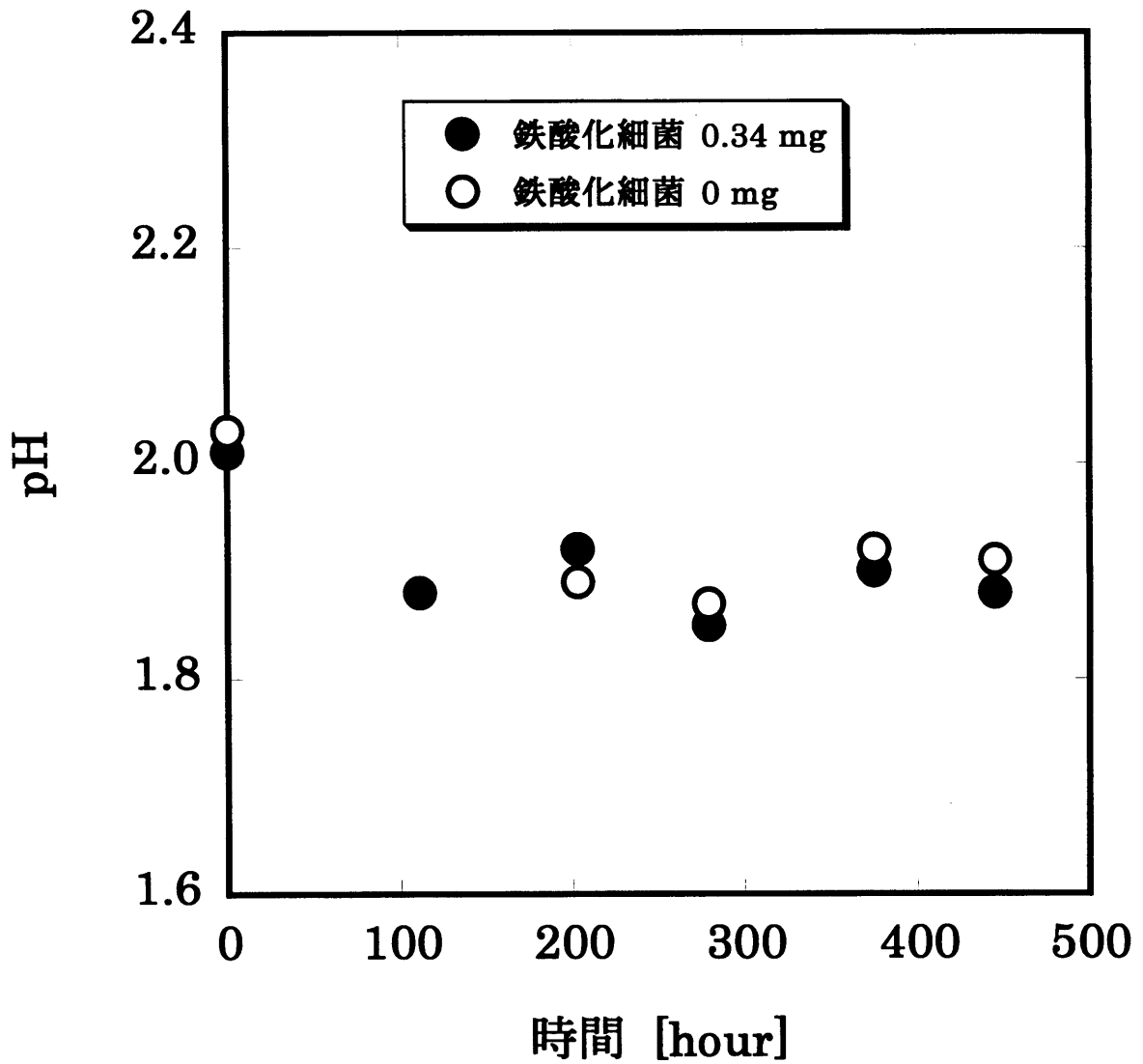


図 5.17 溶液中の pH 経時変化

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

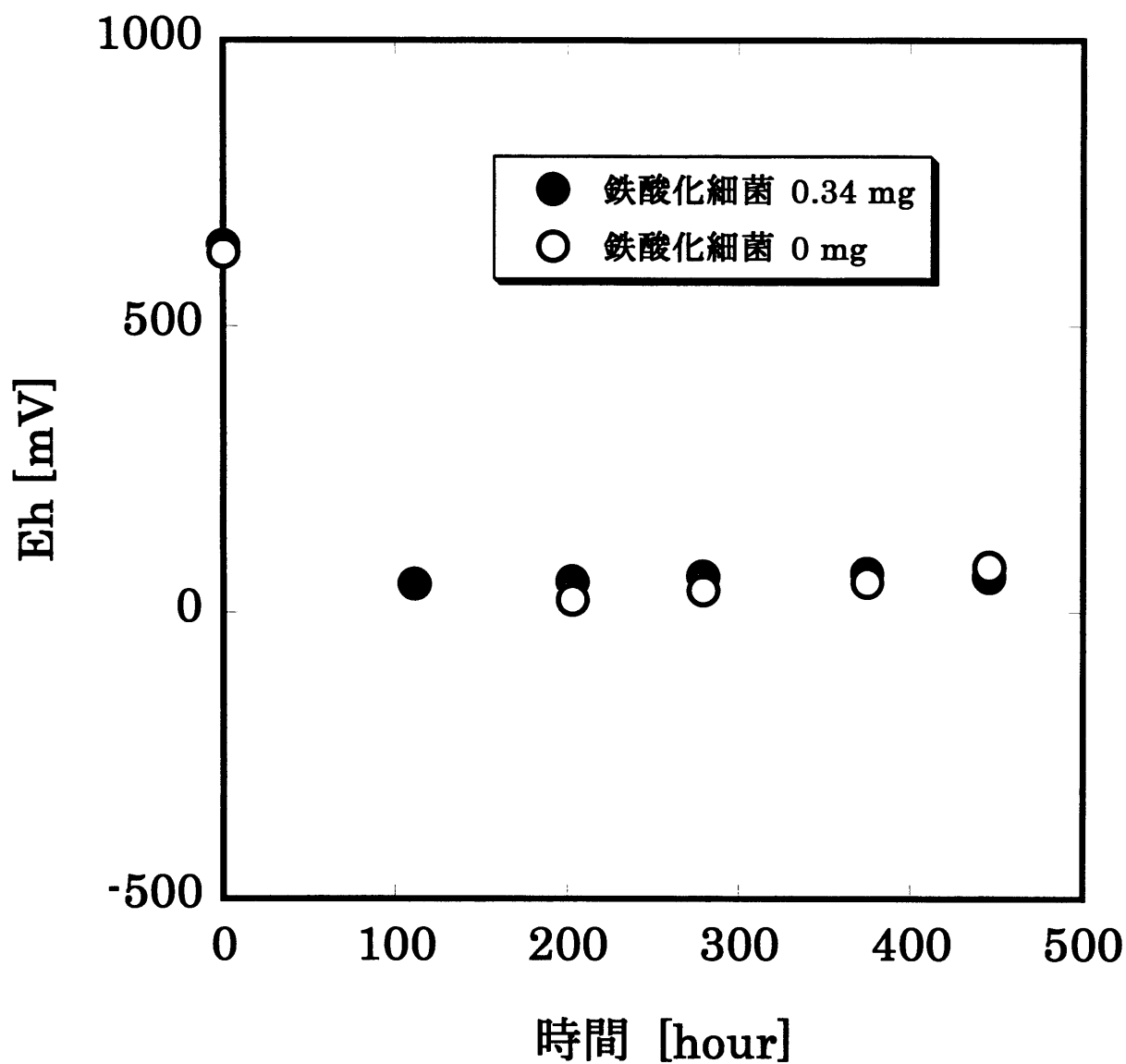


図 5.18 溶液中の Eh 経時変化

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

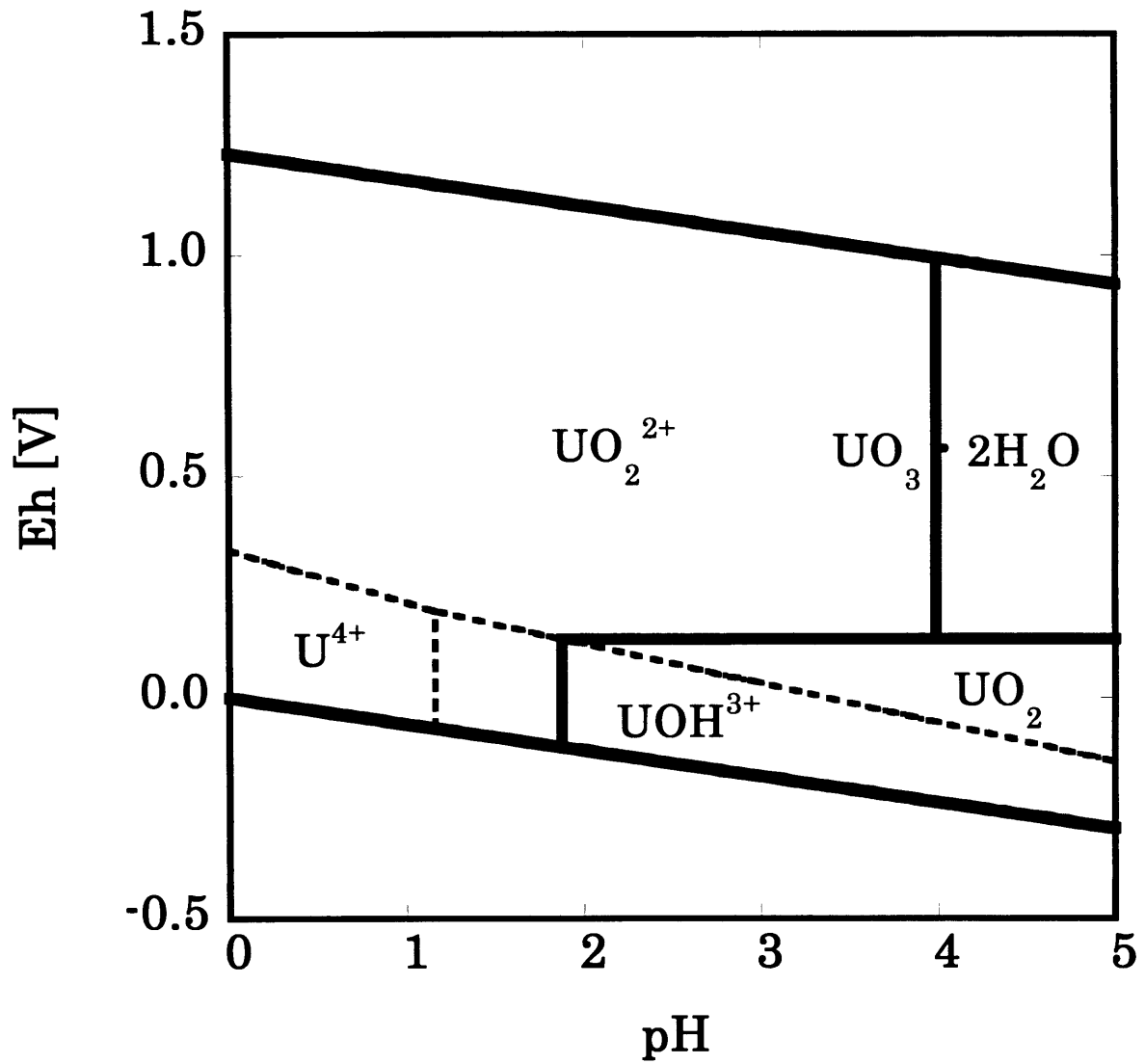


図 5.19 Eh-pH ダイアグラム

($[U]=1 \text{ mM}$, $P_{CO_2}=10^{-0.3} \text{ atm}$)

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

② U の錯体化学種の予測

培地中に存在する配位子が、ウランとどのような錯体を形成するか、U(VI), U(IV) について、溶液中の平衡反応および実験結果から推測した。ここで用いた平衡定数は OECD/NEA のデータバンク[24]によるものであり、25℃、イオン強度ゼロのものを用いた。平衡定数は温度、イオン強度により変化する[25]ため、本実験条件下では厳密には適用できない。温度変化およびイオン強度の変化による平衡定数の資料が不十分であり、詳細を論じることはできないことを念頭に、大まかな予測をおこなった。

本実験で用いた培地成分であり、かつウランとの溶液反応に影響を及ぼす可能性のある配位子として、OH⁻、CO₃²⁻、SO₄²⁻、PO₄³⁻が挙げられる。それら配位子との錯形成について、ウランの価数ごとに以下にまとめた。

1. U(VI)との錯形成について

UO₂²⁺の加水分解反応とその平衡定数を表 5.5 に、UO₂²⁺-CO₃²⁻錯体生成反応とその平衡定数を表 5.6 に、UO₂²⁺-SO₄²⁻錯体生成反応とその平衡定数を表 5.7 に、UO₂²⁺-H₃PO₄錯体生成反応とその平衡定数を表 5.8 にそれぞれ示す。なお、OH⁻と CO₃²⁻が同時に配位したヒドロキシ炭酸錯体については考慮していない。

表 5.5 UO₂²⁺の加水分解反応とその平衡定数

反応式	log K
UO ₂ ²⁺ + H ₂ O → UO ₂ OH ⁺ + H ⁺	-5.25
UO ₂ ²⁺ + 2H ₂ O → UO ₂ (OH) ₂ (aq) + 2H ⁺	-12.15
UO ₂ ²⁺ + 3H ₂ O → UO ₂ (OH) ₃ ⁻ + 3H ⁺	-20.25
UO ₂ ²⁺ + 4H ₂ O → UO ₂ (OH) ₄ ²⁻ + 4H ⁺	-32.40
2UO ₂ ²⁺ + H ₂ O → (UO ₂) ₂ OH ³⁺ + H ⁺	-2.70
2UO ₂ ²⁺ + 2H ₂ O → (UO ₂) ₂ (OH) ₂ ²⁺ + 2H ⁺	-5.62
3UO ₂ ²⁺ + 4H ₂ O → (UO ₂) ₃ (OH) ₄ ²⁺ + 4H ⁺	-11.90
3UO ₂ ²⁺ + 5H ₂ O → (UO ₂) ₃ (OH) ₅ ⁺ + 5H ⁺	-15.55
3UO ₂ ²⁺ + 7H ₂ O → (UO ₂) ₃ (OH) ₇ ⁻ + 7H ⁺	-32.20
4UO ₂ ²⁺ + 7H ₂ O → (UO ₂) ₄ (OH) ₇ ⁺ + 7H ⁺	-21.90

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

表 5.6 UO_2^{2+} - CO_3^{2-} 錯体生成反応とその平衡定数

反応式	log K
$\text{UO}_2^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{UO}_2\text{CO}_3(\text{aq})$	9.94
$\text{UO}_2^{2+} + 2\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$	16.61
$\text{UO}_2^{2+} + 3\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$	21.84
$\text{CO}_2(\text{g}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$	-1.47
$\text{CO}_2(\text{g}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	-7.82
$\text{CO}_2(\text{g}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}^+$	-18.15

表 5.7 UO_2^{2+} - SO_4^{2-} 錯体生成反応とその平衡定数

反応式	log K
$\text{UO}_2^{2+} + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{UO}_2\text{SO}_4(\text{aq})$	3.15
$\text{UO}_2^{2+} + 2\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{UO}_2(\text{SO}_4)_2^{2-}$	4.14
$\text{UO}_2^{2+} + 3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{UO}_2(\text{SO}_4)_3^{4-}$	3.02
$\text{HSO}_4^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+$	-1.91

表 5.8 UO_2^{2+} - H_3PO_4 錯体生成反応とその平衡定数

反応式	log K
$\text{UO}_2^{2+} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{UO}_2\text{H}_3\text{PO}_4^{2+}$	0.76
$\text{UO}_2^{2+} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{UO}_2\text{H}_2\text{PO}_4^+ + \text{H}^+$	1.12
$\text{UO}_2^{2+} + 2\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{UO}_2(\text{H}_3\text{PO}_4)(\text{H}_2\text{PO}_4)^+ + \text{H}^+$	1.65
$\text{UO}_2^{2+} + 2\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{UO}_2(\text{H}_2\text{PO}_4)_2(\text{aq}) + 2\text{H}^+$	0.64
$\text{UO}_2^{2+} + \text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{UO}_2\text{HPO}_4(\text{aq})$	7.24
$\text{UO}_2^{2+} + \text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{UO}_2\text{PO}_4^-$	13.23
$\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{H}^+$	-2.14
$\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightarrow \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+$	-7.21
$\text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{PO}_4^{3-} + \text{H}^+$	-12.35

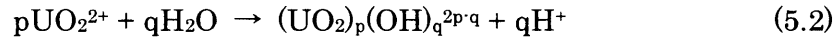
5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

一般に、平衡定数 K は以下の形で与えられる。



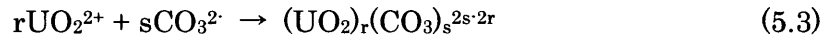
$$K = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad K = \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{RT}\right)$$

(5.1)を上記 UO_2^{2+} の加水分解反応に適用すると、平衡定数は以下の形で与えられる[22][26]。



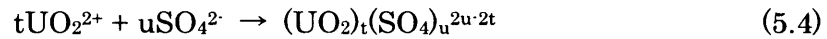
$$K_{p,q} = \frac{[(UO_2)_p(OH)_q^{2p-q}][H^+]^q}{[UO_2^{2+}]^p}$$

(5.1)を上記 UO_2^{2+} の炭酸錯体生成反応に適用すると、平衡定数は以下の形で与えられる。



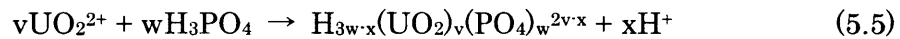
$$K_{r,s} = \frac{[(UO_2)_r(CO_3)_s^{2s-2r}]}{[UO_2^{2+}]^r [CO_3^{2-}]^s}$$

(5.1)を上記 UO_2^{2+} の硫酸錯体生成反応に適用すると、平衡定数は以下の形で与えられる。



$$K_{t,u} = \frac{[(UO_2)_t(SO_4)_u^{2u-2t}]}{[UO_2^{2+}]^t [SO_4^{2-}]^u}$$

(5.1)を上記 UO_2^{2+} のリン酸錯体生成反応に適用すると、平衡定数は以下の形で与えられる[27][28][29]。



5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

$$K_{v,w} = \frac{[H_{3w-x}(UO_2)_v(PO_4)_w^{2v-x}][H^+]^x}{[UO_2^{2+}]_v[H_3PO_4]_w}$$

(5.2)～(5.5)の平衡反応から、pH ごとの各種錯体濃度を導くことができる。
今回の計算で想定した沈殿生成反応を表 5.9 に示す。

表 5.9 UO_2^{2+} - 各種錯体の沈殿生成反応とその平衡定数

反応式	log K
$UO_2^{2+} + 2H_2O \rightarrow UO_2(OH)_2(S) + 2H^+$	-4.93
$UO_2^{2+} + CO_3^{2-} \rightarrow UO_2CO_3(S)$	14.76
$UO_2^{2+} + SO_4^{2-} + 3H_2O \rightarrow UO_2SO_4 \cdot 3H_2O(S)$	-0.83
$3UO_2^{2+} + 2H_3PO_4 + 4H_2O \rightarrow (UO_2)_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O(S) + 6H^+$	5.96

実験条件下 ($[UO_2^{2+}] = 10^{-3}$ M, $\log P_{CO_2} = -0.3$, $[SO_4^{2-}] = 0.1$ M, $[PO_4^{3-}] = 2.8 \times 10^{-3}$ M) において、 $(UO_2)(OH)_2(S)$ が生成し、表 5.5, 5.6, 5.7, 5.8 に示す溶存錯体種が存在する系での対数濃度分布を、図 5.20 に示す。図中の灰色線は溶存錯体種の総濃度を表す。pH 0 から pH 5 の範囲では総濃度の変化が見られなかったことから、沈殿はすべて溶解しているといえる。また、溶液中には硫酸錯体種が支配的に存在することがわかる。 $UO_2CO_3(S)$, $UO_2SO_4 \cdot 3H_2O(S)$ に関しても、 $(UO_2)(OH)_2(S)$ と同様の対数濃度分布を示し、溶存錯体種の総濃度に変化は見られなかった。これらの沈殿物は、本実験条件下では生成しないことが予測された。

一方で、 $(UO_2)_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O(S)$ が生成すると仮定した系での溶存錯体種の対数濃度分布を図 5.21 に示す。pH 1.4 から $(UO_2)_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O(S)$ が生じ、pH 4.5 以上では再び沈殿が溶解することが予想される。この $(UO_2)_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O(S)$ の溶解度を決めるのは、低 pH 側では $UO_2SO_4(aq)$ であり、高 pH 側では $UO_2(SO_4)_3^{4-}$ である。実験では、pH は 1.9 で平衡に達した。また、溶液中のウラン濃度は、鉄酸化細菌を植菌した培地では 5.67×10^{-4} [M] で平衡に達し、植菌しなかった培地では 5.41×10^{-4} [M] で平衡に達した。図 5.21 より、pH 1.9 では溶存錯体種の総濃度は 5.01×10^{-4} [M] であった。温度、イオン強度の影響を考慮すると厳密な評価はできないが、実験系と近い類似性を示したと言える。U(VI)は、 $(UO_2)_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O(S)$ として沈殿する可能性が高い。図 5.22 に溶存錯体種のモル分率-pH 図を示す。pH 1.9 では、 $UO_2(SO_4)_2(aq)$ と $UO_2(SO_4)_2^{2-}$ がおよそ 1:1 の割合で支配的に溶液中に存在すると予想される。

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

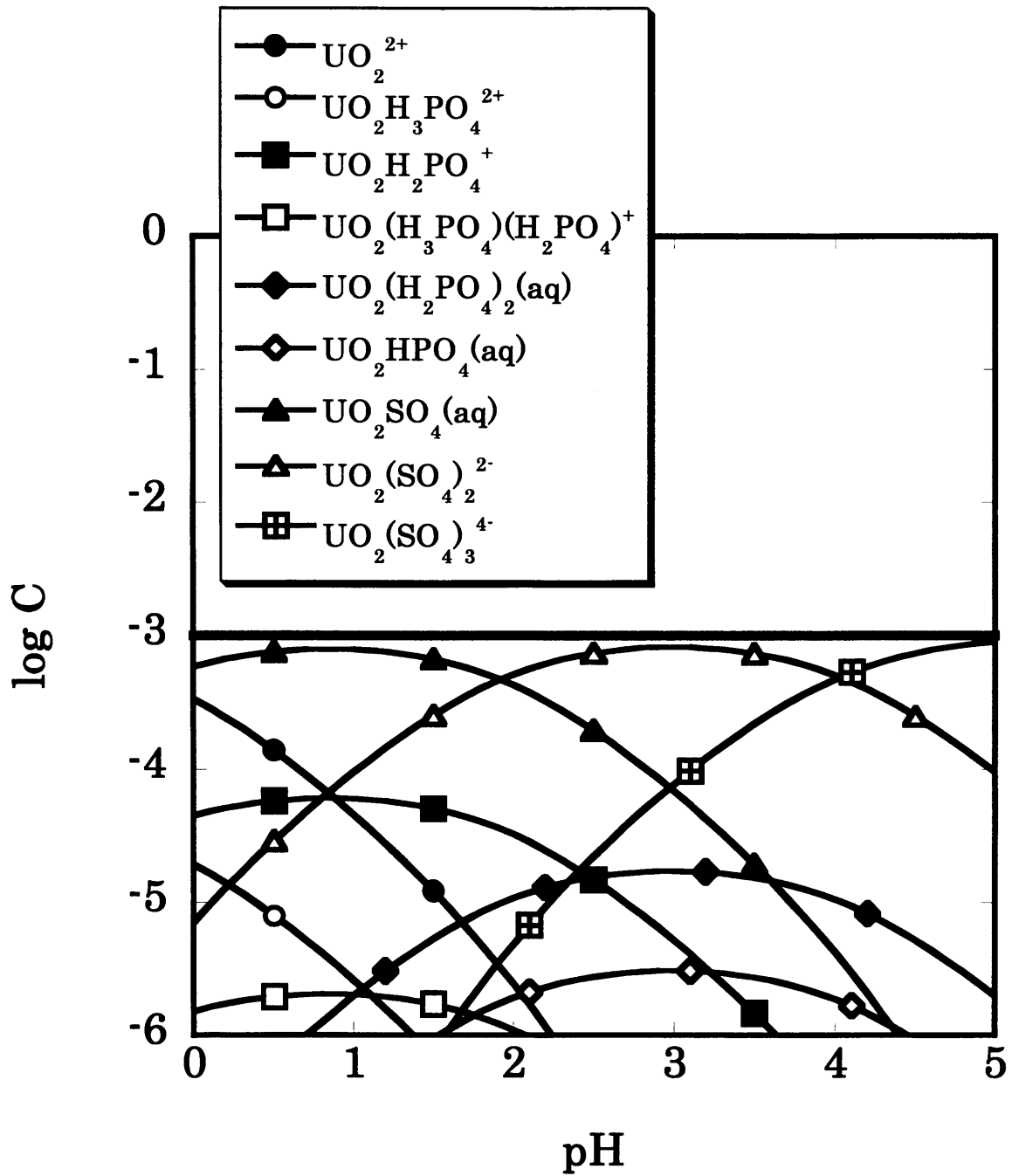


図 5.20 溶存錯体種の対数濃度分布 ($\text{UO}_2(\text{OH})_2(\text{s})$)

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

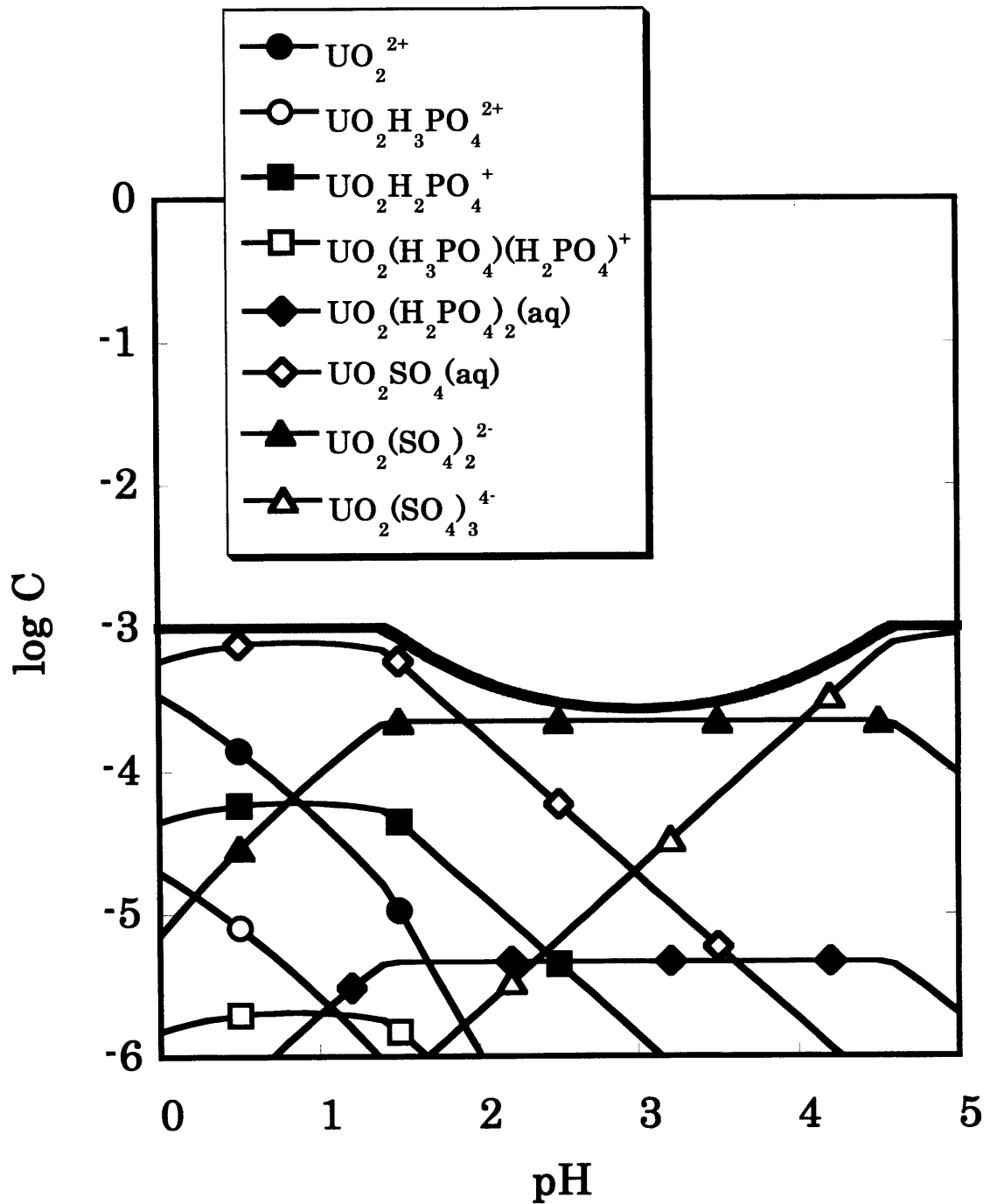


図 5.21 溶存錯体種の対数濃度分布 ($(\text{UO}_2)_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}(\text{S})$)

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

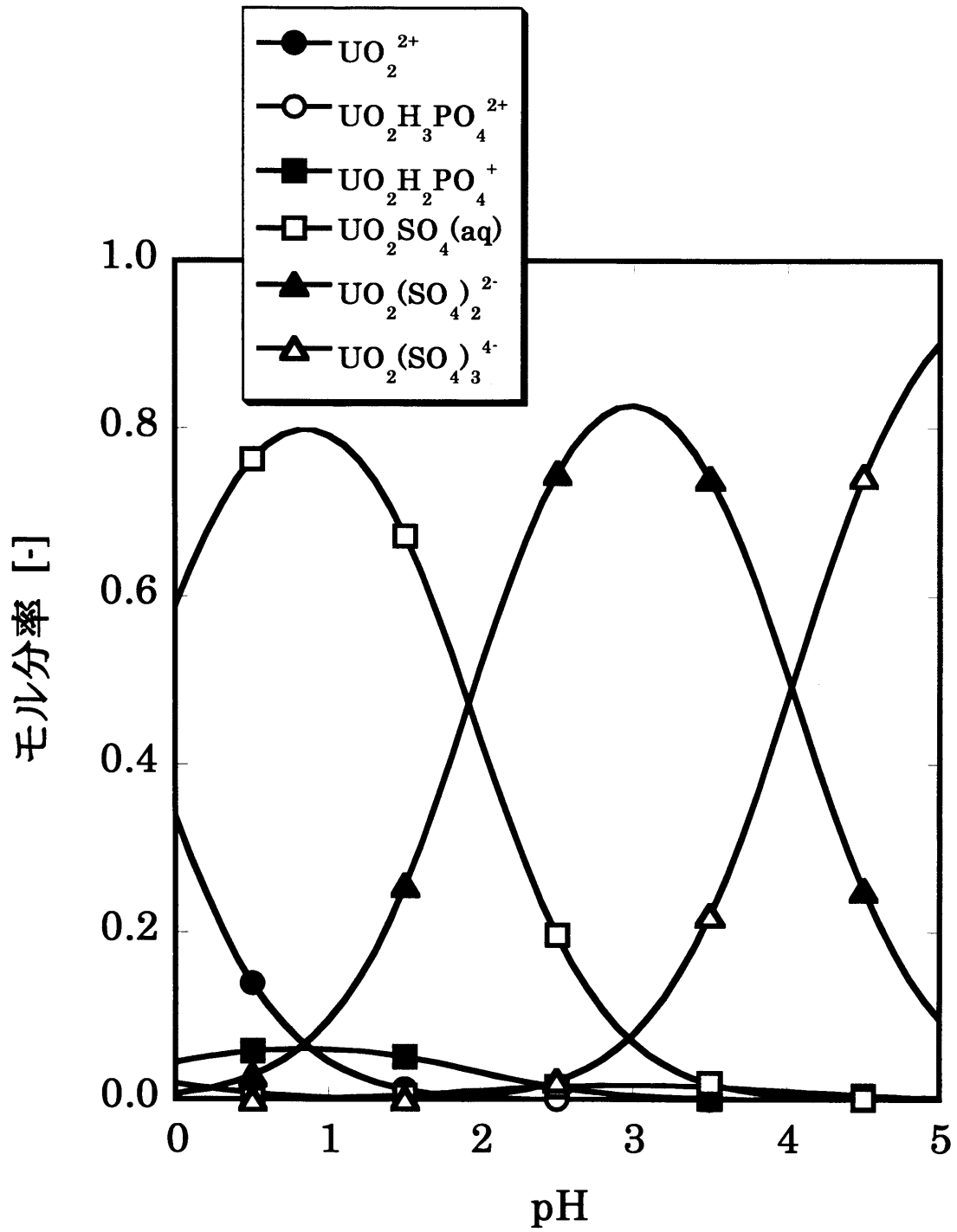
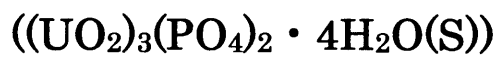


図 5.22 溶存錯体種のモル分率-pH 図



5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

2. U(IV)との錯形成について

U⁴⁺の加水分解反応とその平衡定数, U⁴⁺-CO₃²⁻錯体生成反応とその平衡定数, U⁴⁺-SO₄²⁻錯体生成反応とその平衡定数, U⁴⁺-H₃PO₄錯体生成反応とその平衡定数を表 5.10 に合わせて示す。なお, OH⁻と CO₃²⁻が同時に配位したヒドロキシ炭酸錯体については, 今回の系でも U(VI)と同様に考慮していない。U(IV)の複合種の錯形成に関しても OECD/NEA のデータバンクに掲載されていないことから考慮していない。各種沈殿の生成反応とその平衡定数を表 5.11 に示す。U(IV)と炭酸による沈殿形成については, OECD/NEA のデータバンクに掲載されていないことから考慮していない。

表 5.10 U⁴⁺-各種錯体の生成反応とその平衡定数

反応式	log K
$U^{4+} + H_2O \rightarrow UOH^{3+} + H^+$	-0.54
$U^{4+} + 4H_2O \rightarrow U(OH)_4(aq) + 4H^+$	-5.39
$U^{4+} + SO_4^{2-} \rightarrow USO_4^{2+}$	6.58
$U^{4+} + 2SO_4^{2-} \rightarrow U(SO_4)_2(aq)$	10.51
$U^{4+} + 4CO_3^{2-} \rightarrow U(CO_3)_4^{4-}$	1.12
$U^{4+} + 5CO_3^{2-} \rightarrow U(CO_3)_5^{6-}$	34.00

表 5.11 U⁴⁺-各種沈殿の生成反応とその平衡定数

反応式	log K
$U^{4+} + 2H_2O \rightarrow UO_2(S) + 4H^+$	4.85
$U^{4+} + 2H_3PO_4 + 4H_2O \rightarrow U(HPO_4)_2 \cdot 4H_2O(S) + 4H^+$	11.79
$U^{4+} + SO_4^{2-} + 2OH^- \rightarrow U(OH)_2SO_4(S)$	31.17

実験条件下 ([UO₂²⁺] = 10⁻³ M, log P_{CO2} = -0.3, [SO₄²⁻] = 0.1 M, [PO₄³⁻] = 2.8 × 10⁻³ M) において, 表 5.10 に示す溶存錯体種が存在する系で, UO₂(S), U(HPO₄)₂ · 4H₂O(S), U(OH)₂SO₄(S)が生成すると仮定したときの溶存錯体種の対数濃度分布をそれぞれ図 5.23, 5.24, 5.25 に示す。実験条件下(pH 1.9) では, UO₂(S), U(HPO₄)₂ ·

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

$4\text{H}_2\text{O}(\text{S})$ は沈殿生成すると予測される。pH 1.9における溶存錯体種の総濃度はそれぞれ $1.10 \times 10^{-4} \text{ M}$, $1.26 \times 10^{-7} \text{ M}$ であった。 $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4(\text{S})$ は、pH 0から pH 5 の範囲では溶存錯体種の総濃度に変化が見られなかったことから、沈殿はすべて溶解しているといえる。培養後の溶液中の吸収スペクトル(図 5.16)では、U(IV)に起因するピークは見られなかったことから、溶液中に U(IV)はほとんど存在しないと言える。よって、 $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4(\text{S})$ は生成しないと考えられる。また、pH 1.9で溶解度が $1.10 \times 10^{-4} \text{ M}$ である $\text{UO}_2(\text{S})$ が形成される可能性は低い。U(IV)は、 $\text{U}(\text{HPO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}(\text{S})$ として沈殿する可能性が高いと言える。

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

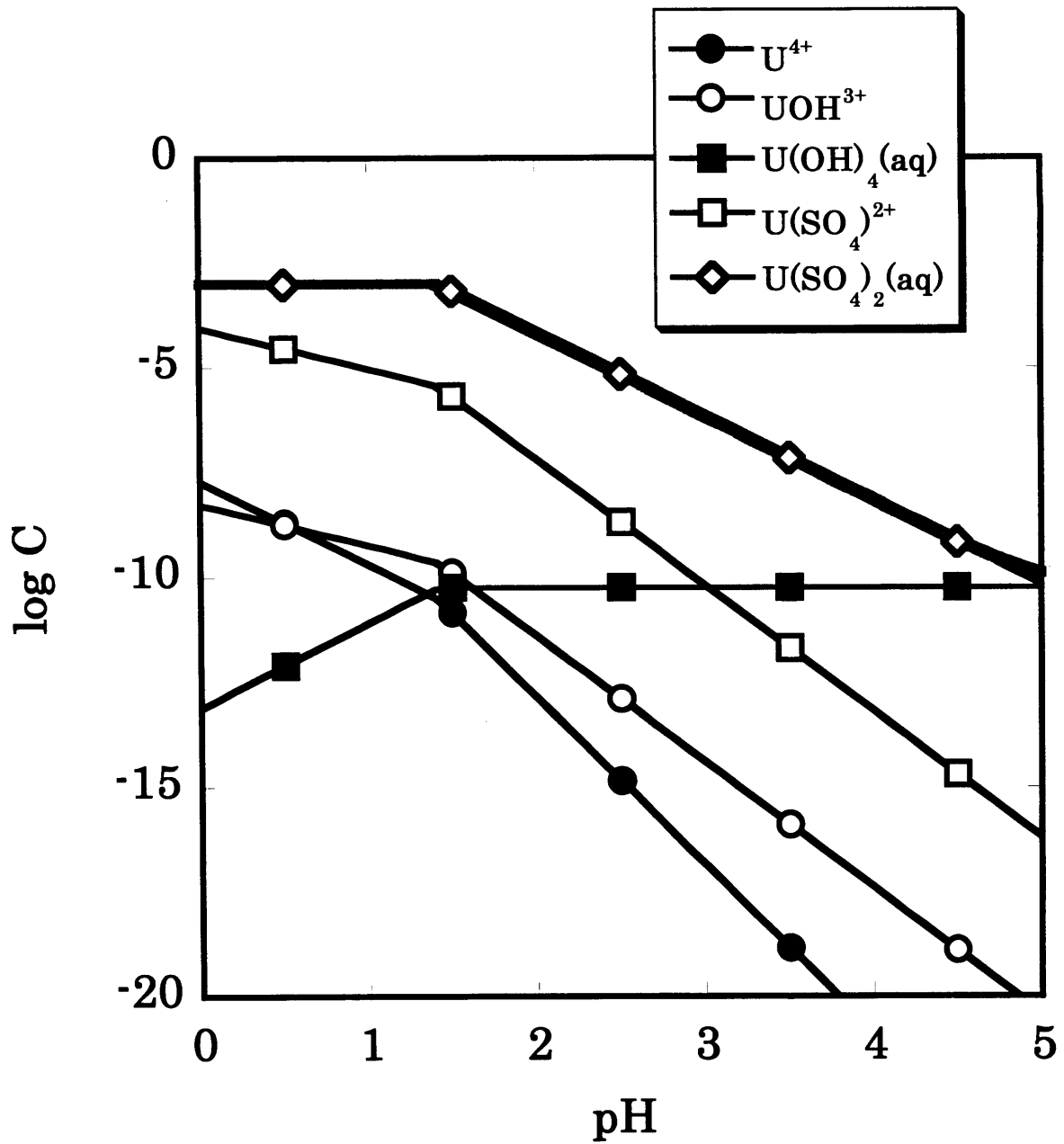


図 5.23 溶存錯体種の対数濃度分布 ($UO_2(S)$)

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

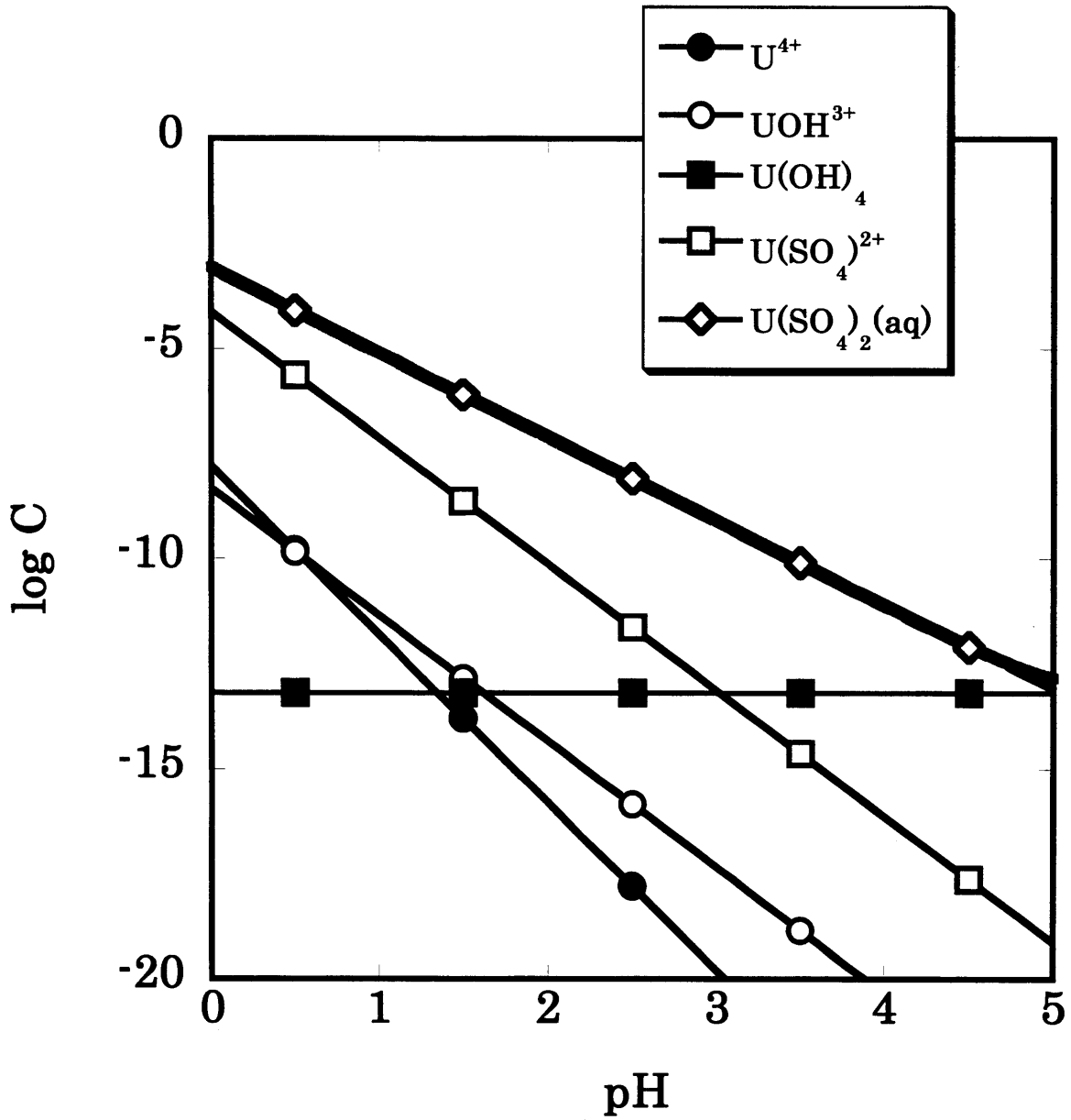


図 5.24 溶存錯体種の大数濃度分布 ($U(HPO_4)_2 \cdot 4H_2O$)

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

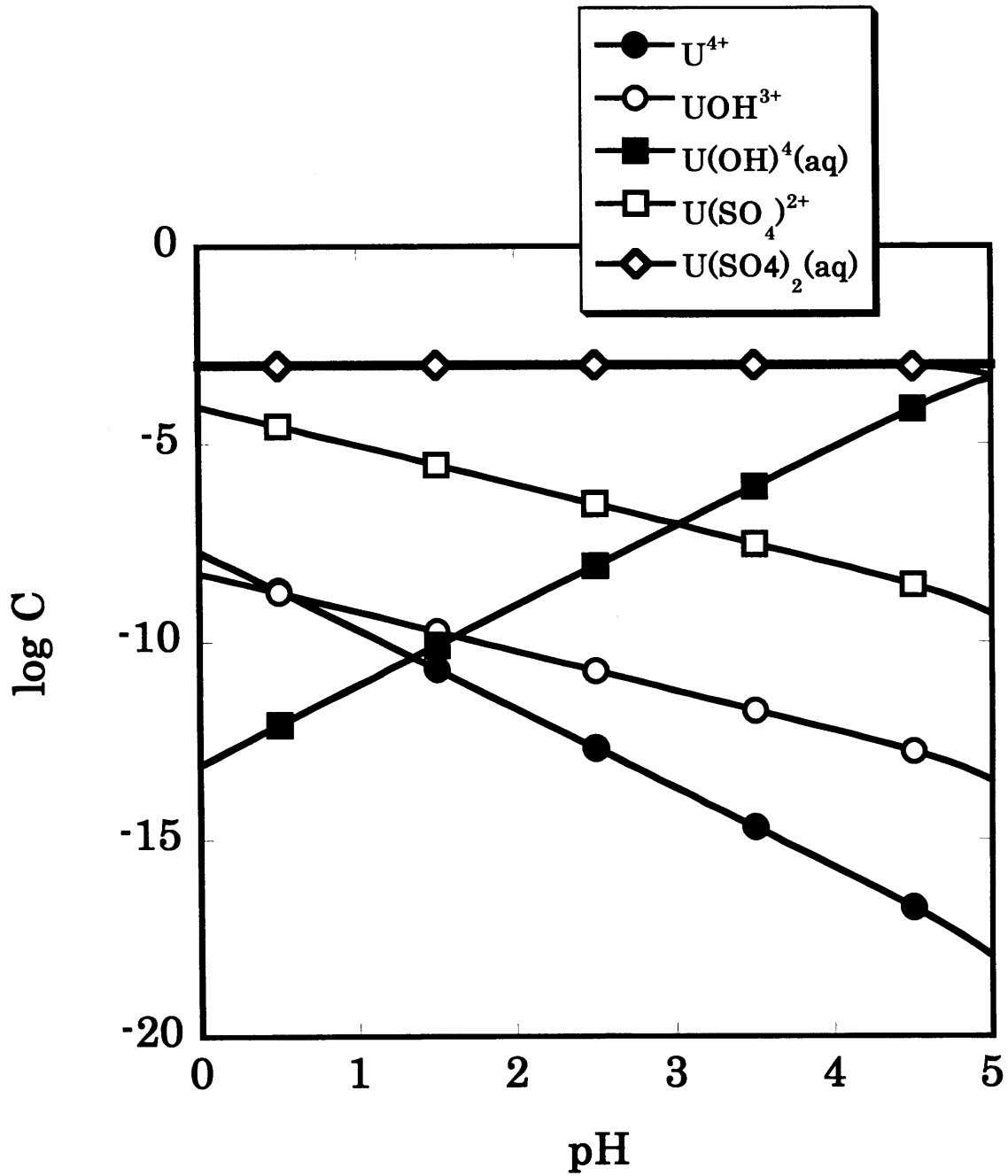


図 5.25 溶存錯体種の対数濃度分布($U(OH)_2SO_4(S)$)

5. 嫌気性条件下での鉄酸化細菌と U(VI)との相互作用について

③ まとめ

培養過程で、鉄酸化細菌を植菌した培地、しなかつた培地に関わらず、溶液中のウラン濃度の減少が見られた。時間変化とともに培地中には沈殿の形成が観察され、ICP-AES による沈殿中の元素分析により、沈殿中にウランが含まれていることが確認された。ウラン濃度の減少は沈殿形成に起因することがわかった。実験では、この沈殿が U(IV)、U(VI)で形成されているか決定できなかった。実験条件における溶液中の平衡反応を計算により予測した結果、溶液中では不溶性の U(VI)として $(\text{UO}_2)_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}(\text{C})$ が形成され、不溶性の U(IV)として $\text{U}(\text{HPO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ が形成されやすいことが推察された。生成された沈殿物から 1:1 リン酸溶液により U(VI)、U(IV)を価数を変化させず抽出し、その液相の吸光分析により、価数の分別評価をおこなう必要がある。再実験により、これをおこなう。そして、U(IV)の生成量を比較することで、鉄酸化細菌による U(VI)の還元反応を明らかにする。

本実験では、鉄酸化細菌による U(VI)の還元反応は確認できなかった。U(VI)が還元されることを今後、実験により明らかにし、U(IV)のみを選択的に沈殿、分離できる可能性について検討をおこなう。

6. 結言

本研究では、鉄酸化細菌とウランとの相互作用について調べ、嫌気性条件下で鉄酸化細菌が直接的にU(VI)を還元する能力を有するか否か明らかにすることを目的とした。さらに、鉄酸化細菌によるU(VI)の還元反応により、不溶性のU(IV)のみを選択的に沈殿、分離できる可能性について検討した。

ネオジム溶液およびウラン溶液に鉄酸化細菌を懸濁すると、細胞表面にネオジムおよびウランが吸着した。鉄酸化細菌の単位質量あたりのネオジム吸着量は、溶液のpHが2よりも4の方が多かった。溶液中の H^+ が多くなると、酸解離していない状態の細胞表面の官能基の割合が増え、負の帯電が減少するために金属吸着量が減少したと考えられた。また、溶液中のネオジム濃度が増加すると、吸着量は増加することがわかった。pH 4、ウラン濃度 10 mg/mL の溶液中での鉄酸化細菌の単位質量あたりのウラン吸着量は、 58.6 ± 8.5 mg of U/ g of biomass であった。ウランが鉄酸化細菌の細胞表面に吸着することで、地下深部でのウランの生活圏への移行が遅延される可能性がある。ただし、吸着反応はpH、ウラン濃度に依存することが予想されるため、鉄酸化細菌によりウランの移行がどの程度遅延されるかは、地下深部の化学条件に合わせ調べる必要がある。

好気性条件下において、本株菌(JCM.7811)を UO_2 粉末を含む培地で培養したところ、時間とともに溶液中にU(VI)が溶出した。本株菌がU(IV)に対して直接的な酸化作用を及ぼすことを明らかにした。

嫌気性条件下において、本株菌が Fe^{3+} に対して還元作用を及ぼすことを確認した。電位供与体として、 S^0 、 H_2 を用いた。

1 mM U(VI)を含む培地では、U(VI)を含まない培地と比べて、 Fe^{3+} の還元速度は遅かった。U(VI)は嫌気性条件下での鉄酸化細菌の代謝活動に対して、阻害剤となり得ると考えられる。今後、U(VI)濃度を変え、 Fe^{3+} の還元に対して影響し始める、阻害濃度を調べる必要がある。

嫌気性条件下で、鉄酸化細菌がU(VI)を直接還元する能力を有するか否か調べた。培養過程で、鉄酸化細菌を植菌した培地、しなかった培地に関わらず、溶液中のウラン濃度の減少が見られた。時間変化とともに培地中には沈殿の形成が観察され、ICP-AESによる沈殿中の元素分析により、沈殿中にウランが含まれていることが確認された。ウラン濃度の減少は沈殿形成に起因することがわかった。実験では、この沈殿がU(IV)、U(VI)で形成されているか決定できなかった。

6. 結言

実験条件における溶液中の平衡反応を計算により予測した結果、溶液中では不溶性の U(VI)として $(\text{UO}_2)_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}(\text{C})$ が形成され、不溶性の U(IV)として $\text{U}(\text{HPO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ が形成されやすいことが推察された。生成された沈殿物から 1:1 リン酸溶液により U(VI), U(IV)を価数を変化させず抽出し、その液相の吸光分析により、価数の分別評価をおこなう必要がある。再実験により、これをおこなう。そして、U(IV)の生成量を比較することで、鉄酸化細菌による U(VI)の還元反応を明らかにする。

また、地下深部でのウランの酸化還元状態に及ぼす鉄酸化細菌の影響を調べるうえで、嫌気性条件下での U(IV)と鉄酸化細菌との相互作用も調べることも重要となる。今後、この点についても検討する。

本研究では、鉄酸化細菌による U(VI)の還元反応は確認できなかった。U(VI)が還元されるか否か、今後、再実験により明らかにし、U(IV)のみを選択的に沈殿、分離できる可能性について検討をおこなう。

参考文献

1. 原子力発電環境整備機構：「地層処分，その安全性」，立地広報部広報グループ（2003）
2. J. M. West, I. G. Mckinley, S. S. Gascoyne, : *Interaction of Microorganism with Radionuclides*, Elsevier Science Ltd., 255（2002）
3. 石原舜三，鈴木淑夫：「東濃地方ウラン鉱床の基盤花崗岩類，地質調査」，232, 113（1969）
4. 日本原子力研究開発機構：「わが国における高レベル放射性廃棄物地層処分の技術的信頼性－地層処分研究開発第2次取りまとめ－」，JNC TN 1410 99-020～024（1999）
5. D. R. Lovly, E. J. P. Philips, Y. A. Gorby, E. R. Landa : *Nature*, 350, 413（1991）
6. D. R. Lovly, E. J. P. Philips : *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 850（1992）
7. A. J. Francis, C. J. Dodge, F. Lu, G. P. Halada, C. R. Clayton : *Environmental Science and Technology*, 28, 636（1992）
8. Y. Suzuki, S. D. Kelly, K. M. Kemmer, J. F. Banfield : *Nature*, 419, 134（2002）
9. Colmer. A. R., Hinkle. M. E., : *Science*, 106, 253（1947）
10. 今井和民：「独立栄養細菌」，東京化学同人（1984）
11. 坂口孝司：「ウランの生体濃縮」，九州大学出版（1996）
12. D. S. Holms, K. A. Debus : 「Mineral Bioprocessing」, The minerals, Metals & Materials Society（1991）
13. N. Ohmura, K. Sasaki, N. Matsumoto, H. Saiki, : *Journal of Bacteriology*, 184, 2081（2002）
14. M. QuiIntana, G. Curutchet, E. Donati : *Biochemical Engineering Journal*, 9, 11（2001）
15. T. Sugio, Y. Tsujita, T. Katagiri, K. Inagaki, T. Tano : *Journal of Bacteriology*, 170, 5956（1988）
16. Kathy Barker : *At the Bench－A Laboratory Navigator－*, Medical Science Ltd, 275（2000）
17. A. R. Manriquez, P. I. Magana, V. Lopez, R. Guzman, : *Bioprocess Engineering*, 18, 113（1997）
18. R. J. C. Mclean, D. Fortin, D. A. Brown : *Environmental Science and Technology*, 34, 2311（2000）
19. F. Baldi : Microbial Transformation of Metals in Relation to the Biogeochemical

- Cycle, Chemistry of Aquatic Systems Ltd., 5, 121, 1993
20. 日本分析化学会編：「分析化学便覧」，丸善（1991）
21. L. G. Leduc, G. D. Ferroni, T. Trevors : *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 453 (1997)
22. K. Fujiwara, H. Yamana, T. Fujii, H. Moriyama : *Radiochim. Acta*, 91, 345 (2003)
23. T. Ohnuki, T. Ozaki, T. Yoshida, A. J. Francis : *Parent Status of Research Activities Conducted by Research Group for Heavy Elements Microbiology in JAERI*, 270, (2005)
24. <http://www.nea.fr>
25. 今井 弘：「金属錯体の化学」，培風館（1993）
26. K. Fujiwara, H. Yamana, T. Fujii, K. Kawamoto, T. Sasaki, H. Moriyama : *Radiochim. Acta*, 93, 347 (2005)
27. G. Dongarra, D. Langumuir : *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 44, 1747 (1980)
28. A. Sandino, J. Bruno : *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56, 4135 (1992)
29. J. L. Jerdan Jr, A. K. Sinha, *Applied Geochemistry*, 18, 823 (2003)

鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* への Nd, U の吸着 Adsorption of Nd and U on iron oxidation bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*

名大 ○高橋 和也 鈴木 通仁 澤田 佳代
 KAZUYA TAKAHASHI MICHIHITO SUZUKI KAYO SAWADA
 津島 悟 榎田 洋一 山本 一良
 SATORU TSUSHIMA YOUICHI ENOKIDA ICHIRO YAMAMOTO

Nd 溶液および U 溶液に鉄酸化細菌 *A. ferrooxidans* を懸濁させることで、微生物細胞への Nd および U の吸着量を調べた。また吸着量に対する溶液の pH や初期金属濃度依存性について検討した。

キーワード: 鉄酸化細菌, ネオジム, ウラン, 吸着

1. 緒言 鉄酸化細菌は Fe(II)を Fe(III)に酸化することでエネルギーを得て、酸性溶液中で分裂して増殖する微生物である。鉄酸化細菌の酸化力を利用して、鉱石中の難溶性 U(IV)を、U(VI)として溶出する方法が報告されている。また、微生物には細胞に金属を吸着するものが存在し、鉄酸化細菌への Cr, Zn, Cu 等の吸着が報告されている。これらの性質を利用して廃水中に低濃度で含まれる金属の回収への応用が期待される。そこで本研究では、鉄酸化細菌が金属を吸着する性質に着目し、廃水や廃棄物中のアクチノイドの回収を目的として、Nd や U 溶液中での鉄酸化細菌への金属の吸着を調べた。

2. 培養 *A. ferrooxidans* (ATCC13598) を、オートクレーブ滅菌した 9K 培地 (K_2HPO_4 , 0.5 g/dm³; $(NH_4)_2SO_4$, 3.0 g/dm³; KCl, 0.1 g/dm³; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g/dm³; $Ca(NO_3)_2$, 0.01 g/dm³; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 40 g/dm³) に植菌し、100 rpm で振とうして、30℃で 120 ~ 150 時間培養した。その後培地を孔径 3 μm のフィルターで吸引濾過し、*A. ferrooxidans* と培地中の沈殿を分離した。この濾液を遠心分離することで *A. ferrooxidans* を回収し、吸着実験に用いた。

3. 吸着実験 0.01 mol/dm³ 硫酸で微生物濃度 0.55 g/dm³ の懸濁液とし、これを用いて表 1 に示す溶液に調整し、30℃, 100 rpm で振とうした状態で微生物に金属を吸着させた。一定時間ごとに溶液 1.5 cm³ を回収し、孔径 0.1 μm のフィルターで濾過して、アルセナゾⅢによる吸光度法によって濾液に含まれている金属濃度を求めた。なお、吸着量は次式で定義した。

$$\text{吸着量 [mg of metal/g of biomass]} = \frac{(\text{初期金属量 [mg]} - (\text{一定時間経過後の金属量 [mg]})}{\text{A. ferrooxidans 量 [g]}}$$

4. 結果と考察 Nd および U の吸着量時間変化を図 1 に示す。図 1 より、どの条件でも時間経過とともに金属の吸着量は増加しており、少なくとも 150 時間までには吸着が平衡に達していることがわかる。Nd の吸着量は、pH4, Nd 初期濃度 50 mg/dm³ の条件では 170 ± 30 mg of Nd/g of biomass となった。また、U 吸着量は 59 ± 9 mg of U/g of biomass であった。Nd 溶液に関して初期濃度が同じサンプルを比較すると、pH は 2 よりも 4 の溶液の方が吸着量が多くなっている。既往の研究¹⁾より、微生物細胞表面は官能基からの H⁺ の解離の結果、負に帯電しており、そのために金属の吸着が起こることが示されている。このことから溶液中の H⁺ が多くなると解離していない状態の官能基の割合が増え、細胞表面の官能基による負の帯電が減少するために金属吸着量が減少するのだと考えられる。また、同じ pH のサンプル同士を比較すると、初期 Nd 濃度が 10 mg/dm³ よりも 50 mg/dm³ の溶液の方が吸着量が多くなっている。吸着量の金属初期濃度依存性は、既往の研究²⁾でも他の金属を用いて示されているが、Nd でも同様に金属濃度が増加すれば吸着量が増加することがわかった。

表 1 吸着条件

サンプル No.	使用金属	金属濃度 [mg/dm ³]	pH	<i>A. ferrooxidans</i> [mg]
1	Nd	50	2	0.55
2	Nd	10	2	0.55
3	Nd	50	4	0.57
4	Nd	10	4	0.55
5	U	10	4	0.54

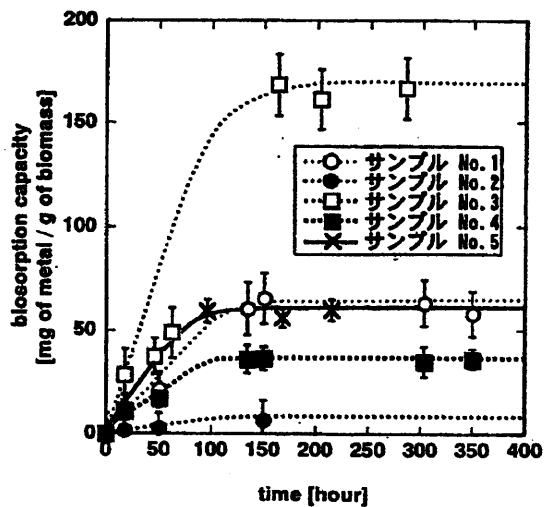


図 1 Nd, U 吸着量時間変化

1) F. Baldi, *Khawer Academic publishers*, 5, 121-152, 1993.
 2) A. Ruiz-manriquez et al., *Bioprocess Engineering*, 18, 113-118, 1997.

Degradation of n-dodecane by *Acidithiobacillus Ferrooxidans*

Satoru Akasaka¹⁾, Satoru Tsushima^{2*)}, Youichi Enokida³⁾, Ichiro Yamamoto²⁾

1) Department of Physics, Faculty of Engineering, Nagoya University, Japan

2) Department of Materials, Physics, and Energy Engineering, School of Engineering, Nagoya University, Japan

3) EcoTopia Science Institute, Nagoya University, Japan

* Corresponding author, E-mail address: s-tsunami@nucl.nagoya-u.ac.jp

Acidithiobacillus Ferrooxidans is capable to grow under low pH condition (between 1.5 and 4.5), and can be utilized for bioremediation of contaminated acidic soil. Sulfate pitch, for instance, is a waste that is produced from an illegal production of gas oil, and is quite often dumped into the environment without any special care. Soil contaminated by sulfate pitch contains sulfuric acid, oil, and tar, and its remediation is an urgent problem.

We studied biodegradation of n-dodecane by *A.Ferrooxidans*. *A.Ferrooxidans* showed high n-dodecane tolerance and it can incubate in 9K culture (with FeSO₄) containing n-dodecane as much as 30% in volume. Its growth was little affected by the presence of n-dodecane. This high tolerance can be ascribed to low solubility of n-dodecane to the culture. Figure 1 shows time dependence of Fe(II) concentration in the culture with and without n-dodecane. The decrease of Fe(II) concentration is proportional to the amount of *A.Ferrooxidans* grown. Oxidized iron is partly precipitated in the flask. The precipitate had dark orange color in the experiments without n-dodecane, while the one with n-dodecane had dark green precipitate. From the XRD measurements, it was confirmed that the former precipitate is potassium or ammonium jarosite, XFe₃(OH)₆(SO₄)₂(X=K or NH₄), while the latter precipitate also mainly consists of jarosite, but contains amorphous iron complex which could not be identified at present. We will study this point further. The pH of the culture has slightly decreased and the Eh has increased as *A.Ferrooxidans* has grown. The decrease of pH is due to Fe(III) hydroxide precipitate which consumes OH⁻ ions during its formation.

We also studied if *A.Ferrooxidans* is capable to degrade n-dodecane or not. From gas chromatography analysis using Shimadzu GC2010 equipped with FID detector, we did not see clear evidence of the degradation of n-dodecane. Further detailed analysis is planned and will be presented at the symposium.

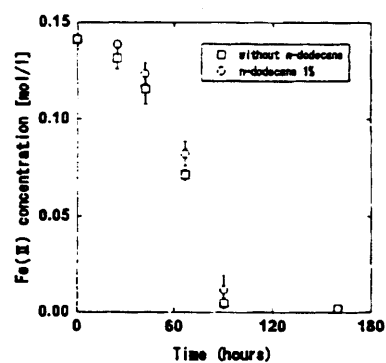


Figure 1. Time dependence of Fe(II) concentration in culture without and with (1%) n-dodecane. Initial Fe(II) concentration is 0.14mol/l.