

**補助事業名** 環境研究総合推進費補助金循環型社会形成推進研究事業（平成 25 年度～平成 27 年度）

**所管** 環境省

**研究課題名** バイオリアクターによる廃二次電池溶解処理液からの Mn, Ni, Co 同時回収

**課題番号** 3K133004

**研究代表者名** 大橋晶良（国立大学法人広島大学）

**国庫補助金** 41,056,000 円（うち平成 27 年度：12,597,000 円）

**研究期間** 平成 25 年 5 月 15 日～平成 28 年 3 月 31 日

**本研究のキーワード** レアメタル、資源回収、リサイクル、廃二次電池、マンガン酸化細菌、Mn 酸化物  
Ni、Co

**研究分担者** 金田一智規（広島大学）  
青井 議輝（広島大学サステナブルディベロップメント実践研究センター）

## 研究概要

### 1. はじめに（研究背景等）

自動車のトレンドとして、内燃機関エンジンの生産は 2025 年ころをピークに減少し、電気自動車に代わると予測されている。特に蓄電池を搭載した二次電池式電気自動車が普及すると考えられている。従って、二次電池の生産と共に廃棄あるいはリサイクルが重要な課題になる。リチウムイオン二次電池のコストは正極材料に使われるコバルトがその 7 割を占めているため、大幅な低コストを目指して正極材料にマンガン、ニッケルなどを使うもの（ $\text{Li}(\text{Li}_x\text{Ni}_y\text{Mn}_z\text{Co}_z)\text{O}_2$  など）に代替されている。劣化したリチウムイオン二次電池のリサイクルは、無機化学的にレアメタルを溶解処理および電解処理して金属原料に再生しようとしている。しかし、現状の一般的な無機化学的手法では経済性が成立しにくい。このような背景から、新たなレアメタル特に価格の高いコバルト、マンガン、ニッケルの回収技術の開発が希求されている。

マンガン酸化物はレアメタルを含む金属を吸着することが知られている。しかし、マンガン酸化物による金属回収技術は確立されていない。マンガン酸化物によるレアメタル回収技術が確立されれば、日本国内でのレアメタルリサイクルが可能となり、海外からの輸入リスクの減少、レアメタルの安定確保につながると考えられる。また、工業的に生産されるマンガン酸化物より生物学的に生成されるマンガン酸化物は金属吸着能力が優れていることが知られており、コバルト、ニッケル等の金属吸着が可能であるためマンガン酸化細菌をリアクター内に高密度に集積培養することができれば、これら金属の同時除去が可能となる。申請者らは、マンガン酸化細菌をメタン酸化細菌あるいはアンモニア酸化細菌と共生させることで培養することに成功しており、本方法を適用してレアメタルを回収する技術を確立することを目的としている。

### 2. 研究開発目的

マンガン酸化細菌の純菌培養は昔から確立されているが、純菌培養では高コストになると考えられ現実的ではない。そのため本研究では複合微生物系でマンガン酸化細菌の集積培養を目指す。しかしながら、開放系でマンガン酸化細菌を優占的に培養するのは簡単ではなく、バイオ Mn 酸化物を継続的に生成することは困難である。これは、マンガン酸化細菌は従属栄養細菌であり、実用を想定すると排水を無菌にすることは容易でなく、このためマンガン酸化細菌は他の雑菌との生存競争に負けてしまい、バイオリアクターに生息するこ

とができない。すなわち、バイオリアクターにマンガン酸化細菌を定着させて、連続的にマンガン酸化物を生産することができない。従って、単純な培養ではなく、マンガン酸化細菌の特性を生かした集積培養方法が必要である。

マンガン酸化細菌は自然や上水処理のろ過池などの貧栄養環境で検出されており、おそらく有機物濃度に対して親和性の高い種であると考えられ、極低濃度の有機物排水を供給すれば、開放系においてもマンガン酸化細菌を培養することが可能と考えられた。そこで、マンガン酸化細菌と硝化細菌の共存微生物生態を構築することを考えた。アンモニア性窒素のみの排水処理において、一般的に硝化細菌だけで構成されていることはなく、全細菌の半分程度に留まる。これは硝化細菌の代謝有機物（低濃度）を利用する好気性細菌が繁殖するためである。この機構を利用して、アンモニア性窒素含有排水に Mn(II)が含まれていれば、硝化細菌と共存したマンガン酸化細菌の集積培養が可能ではないかと考えた。そして、これまでに硝化細菌との共培養によるマンガン酸化細菌の培養を達成し、Mn(II)を酸化してバイオ MnO<sub>2</sub>を生成することに成功している。しかし、技術を適用した廃二次電池溶解処理液からのレアメタル回収の実用化には、①Mn(II)酸化速度は高くない、②スタートアップが遅い、③実際に実二次電池溶解液に適用できるか不明である、などの課題がある。そこで本研究では、これらの課題を解決することを目的として、7つの研究課題を設定した。

### 3. 研究方法

本研究ではマンガン酸化細菌による金属回収リアクターを実装化に向けて、以下の7つの研究課題に取り組んだ。

#### (1) 硝化細菌との共培養でのバイオ Mn 酸化物の生成

マンガン酸化細菌の集積培養と MnO<sub>2</sub>生成・回収の原理による DHS リアクターを用いた連続排水処理実験により、MnO<sub>2</sub>生成の性能を評価した。DHS リアクター（高さ1m、スポンジ担体2cm角）に活性汚泥を植種し、NH<sub>4</sub>Clと MnCl<sub>2</sub>を含む人工排水を連続供給して、マンガン酸化細菌の培養を開始する。硝化反応を確認して、アンモニア性窒素負荷を上げながら運転を継続して、マンガン酸化速度の推移を評価する。

#### (2) メタン酸化細菌との共培養でのバイオ Mn 酸化物の生成

メタンを唯一の有機炭素源としてメタン酸化細菌を培養しても、硝化細菌と同様に代謝産物を利用する他の細菌群と共存した微生物生態系が構築される。このため、この系においても Mn(II)が供給されれば、マンガン酸化細菌を集積培養が可能であった。そこで、メタンの供給負荷を高めることでバイオ Mn 酸化物生成速度が高まるかの連続生成実験を実施した。

#### (3) 活性汚泥を唯一の基質としたマンガン酸化細菌の集積培養

マンガン酸化細菌の集積培養は硝化細菌あるいはメタン酸化細菌との共存による方法以外にも、活性汚泥を基質として供給することにより可能であることが示唆された。そこで、マンガン酸化細菌を植種した DHS リアクターに上部より活性汚泥を基質として供給してマンガン酸化細菌の集積培養を行った。

#### (4) マンガン酸化物の好気性微生物への活性阻害実験

マンガン酸化細菌の Mn 酸化機構をはじめとする基礎生態特性に関する知見はほとんど得られていない。メタン酸化細菌との共培養において MnO<sub>2</sub>がメタン酸化活性を阻害していること示唆された。これより MnO<sub>2</sub>は従属栄養細菌にも活性阻害することが推測される。すなわち、マンガン酸化細菌は Mn 酸化し MnO<sub>2</sub>を生成して従属栄養細菌の活性を阻害することで、有機性の基質を優位に利用するための戦略を取っているという仮説を立てた。そこで、これを実証するために、回分試験にて下水処理施設から採取した活性汚泥の有機物消費活性に対する MnO<sub>2</sub>濃度の影響を調査した。

#### (5) マンガン酸化細菌の分離・培養

マンガン酸化速度を高めるには、マンガン酸化細菌を同定して生理学的特性を把握し、特性に適した運転をする必要がある。そこで、MnO<sub>2</sub>が従属栄養細菌を活性阻害することを利用した新規の方法でマンガン酸化細菌の分離・培養を実施した。

#### (6) DHS リアクターを用いた MnO<sub>2</sub>の有無による Mn(II)酸化のスタートアップ比較

MnO<sub>2</sub>が従属栄養細菌を活性阻害するのであれば、あらかじめ DHS リアクターのスポンジ担体に MnO<sub>2</sub>が塗布されていれば、一般的な有機性の培地でもマンガン酸化細菌が培養でき、しかも早期に Mn(II)酸化が起きると考えられる。そこで、20 mm 各のスポンジ担体 20 個をリアクター上部より直列に懸下させた 2 基の DHS リアクターを用いて、1 基は活性汚泥を植種したもの、もう 1 基はさらに MnO<sub>2</sub>を塗布させ、それぞれに有機性培地を連続供給して、マンガン酸化細菌の集積培養の速度を比較検討した。

#### (7) 実二次電池廃液からの金属回収

実二次電池溶解処理液を用いて、マンガン酸化がこれまでの実験の通りに実証できるかを実施する。数種類のリチウム電池を解体し、強酸の液に溶かしたリチウム、コバルト、マンガンを含む溶液を用いて実験を行う。この溶液を希釈した後、マンガン酸化細菌を培養した DHS リアクターに供給し、実際に金属回収が可能かどうか調査する。

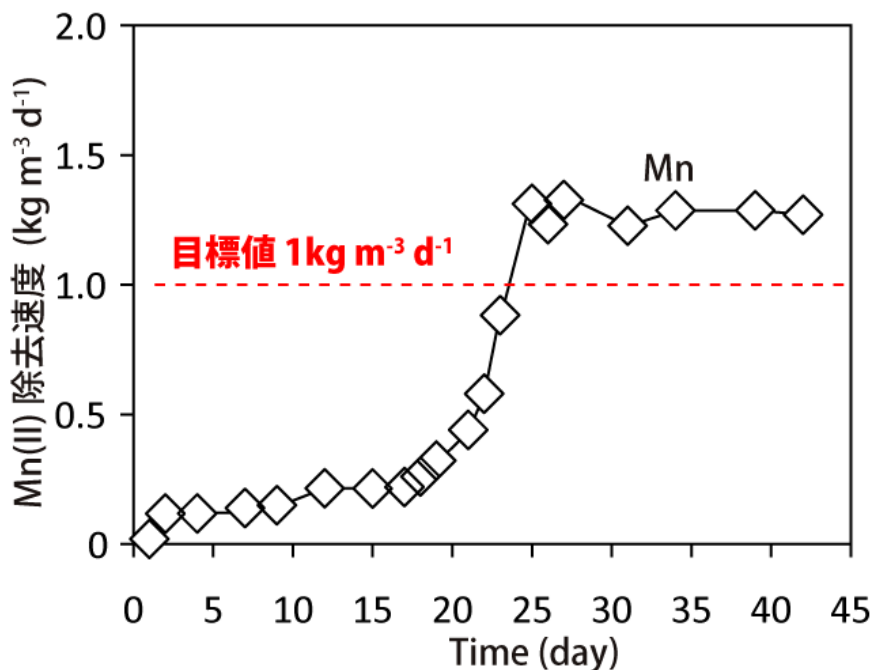
## 4. 結果及び考察

マンガン酸化細菌は貧栄養環境で検出されることから、基質親和性の高い種で極低濃度の有機物排水を供給すれば、開放系においても培養できるのではと考えられた。そこで、マンガン酸化細菌と硝化細菌との共存微生物生態を構築することを考えた。研究(1)の結果、アンモニア酸化細菌と共生培養において、最大マンガン酸化速度は 0.6 kg Mn/m<sup>3</sup> d を達成したが、硝化反応によって生じた pH 低下によりマンガン酸化反応は安定しない結果であった。そこで、アンモニアの次に目を付けたのがメタンである。メタン酸化細菌も硝化細菌同様に代謝産物を生成する事が知られている。研究(2)のメタンを単一の基質としてリアクターに供給した結果、マンガン酸化反応が確認され、pH 低下はなかったが、マンガン酸化速度は 0.35 kg Mn/m<sup>3</sup> d であり目標のマンガン酸化速度 1 kg Mn/m<sup>3</sup> d に到達しなかった。一方で、これらの実験中に興味深い知見が得られた。一つ目は、どちらのリアクターともアンモニアやメタンの供給基質を突然停止しても、そこから長期間マンガン酸化反応が確認された事である。この結果から、マンガン酸化細菌は代謝産物のみならず細菌の死骸も利用できる事が示唆された。次に、リアクターのスポンジ担体にマンガン酸化物が形成されていくにつれて共存細菌であるメタン酸化細菌の活性が著しく低下する傾向が得られた。実際に研究(4)では、活性汚泥やメタン酸化細菌を用いたバッチ実験で確認を行ったが、マンガン酸化物が他の従属栄養細菌を阻害している事を発見した。他にも、負荷を上げる目的で供給マンガン濃度を上げた結果、急激にマンガン酸化速度が低下した事から、マンガン酸化細菌はマンガンイオンに阻害を受ける事が示された。

我々はここで、基質を供給しなくともマンガン酸化細菌が継続的に観測された事に着目した。マンガン酸化細菌は他の細菌を分解して増殖できる、すなわち活性汚泥を基質として供給する事でマンガン酸化細菌を培養できるのではないかと考えた。そこで、研究(3)では、活性汚泥を唯一の基質として連続処理を行った結果、マンガン酸化は最大 1.69 kg Mn/m<sup>3</sup> d と微生物による世界最速のマンガン除去速度を達成した。ただし、硝化細菌及びメタン酸化細菌との共培養実験も同様であるが、リアクターのマンガン除去のスタートアップには 2 年以上と長期間を要した。ここまで時間がかかってしまえば、実用化は不可能である。そこで、マンガン酸化のスタートアップさせるアイデアが必要となってくる。そこで次に着目したのがマンガン酸化物の従属栄養細菌への活性阻害である。マンガン酸化物に従属栄養細菌が阻害を受けるのであればリアクターにマンガン酸化物を塗布することで、競合する他の従属栄養細菌の増殖を抑制、マンガン酸化反応のスタートアップ期間を短縮できるのではないかと考えた。研究(6)では、リアクター担体にマンガン酸化物を塗布し、スタートアップ期間への影響を観察した。その結果、リアクターにマンガン酸化細菌の優占的な培養に成功し、マンガン酸化細菌の培養を 2 週間程度に短縮することができた。このように、マンガン酸化物は他従属栄養細菌の増殖を抑制できる事が示された。そこで、微生物を培養するプレート培地にマンガン酸化物を添加する事で、マンガン酸化物耐性細菌、マンガン酸化細菌に選別できるのではないかと考えた。その結果、活性汚泥から微生物群を分離する事ができた。さらに、活性汚泥中に存在するマンガン耐性菌は全体の 2%である事、マンガン酸化細菌は全体の 0.2%程度であった。

これら(1)~(6)の実験結果より、廃二次電池から金属回収する知見がそろったので、実際に実二次電池の溶解処理液を用いたニッケル、コバルト、マンガンの連続リアクター運転を行った。その結果、3 週間のスタ

ートアップでそれぞれ  $1.69 \text{ kg Mn/m}^3/\text{d}$ 、 $0.17 \text{ kg Co /m}^3/\text{d}$ 、 $0.12 \text{ kg Ni/m}^3/\text{d}$  の除去速度に到達し、最終的に本研究の目標を達成した。



実廃二次電池溶解液の連続処理におけるマンガン除去速度の推移

## 5. 本研究により得られた主な成果

### (1) 科学的意義

リチウムイオン二次電池のリサイクルは、無機化学的にレアメタルを溶解処理および電解処理して金属原料に再生しようとしている。しかし、現状の一般的な無機化学的手法では経済的に採算が合わない。一方、生物学的手法は一般的に化学的手法よりも低コストであることから、有機性排水処理においては主流である。レアメタルの回収に対しても生物学的手法はランニングコストが低く、費用面での課題はないと言える。

マンガン酸化細菌は、開放系の混合微生物群集では培養しづらい。これは基質親和性の高い細菌であり、貧栄養環境において検出される。すなわち、極低濃度の有機物排水を供給すれば培養できる。硝化細菌あるいはメタン酸化細菌を培養して、その代謝物である低濃度の有機物を供給する方法を考案して、マンガン酸化細菌は開放系でも共培養できることを明らかにした。また、マンガン酸化細菌は細菌の死骸を資化できることを発見し、DHS リアクターを用い、活性汚泥を基質にして集積培養できることを示した。そのマンガン酸化速度は目標の  $1.0 \text{ kgMn/m}^3 \text{ d}$  を超える能力である。さらに、多くの従属栄養細菌は Mn 酸化物に活性阻害を受けることを発見した。この現象を利用し、予め Mn 酸化物を DHS リアクターに塗布することで、マンガン酸化のスタートアップを早くすることに成功した。

これらの知見を基に、実廃二次電池溶解液に適用して、3週間のスタートアップでバイオ  $\text{MnO}_2$  の高速生成  $1.0 \text{ kgMn/m}^3 \text{ d}$  が可能であり、Mn、Ni、Co の同時回収できることを実証した。

### (2) 環境政策への貢献

約 200kg の蓄電池を搭載している二次電池式電気自動車は、今後、普及することが予測されている。蓄電池は使用に伴い劣化し、廃車の時に廃棄されることになるが、この廃棄量は膨大になってくることが懸念されている。従って、蓄電池を経済的かつ環境にやさしく再生する技術の開発が希求されている。この鍵を握っているのが、溶解処理した液からの主成分であるマンガン、ニッケル、コバルトの回収であり、本研究ではこの回収技術として貢献できる。

本研究のバイオ Mn 酸化物生成技術はコバルト、ニッケルに止まらず他のレアメタル回収にも適用できる。メッキ工場などのレアメタル・レアアースを含有する各種産業排水や鉱山排水（鉱山が閉鎖された後も金属を含む浸出水は環境基準をクリアーする処理が行われている）の低コスト型生物処理（回収）技術として提供でき、重金属の水環境汚染対策にも貢献できる。また、温泉やガス田といった環境にはレアメタルが溶存している。海水には低濃度ではあるが、リチウムなど金属資源が豊富である。これらを資源として捉え、レアメタル等の金属回収にも活用できる。

## 6. 研究成果の主な発表状況

### (1) 主な誌上発表

#### <査読付論文>

- 1) L. T. T. Cao and H. Kodera, K. Abe, H. Imachi, Y. Aoi, T. Kindaichi, N. Ozaki and A. Ohashi: Water Research, 68, 1, (vol. issue) 545-553 (2015)  
"Biological oxidation of Mn(II) coupled with nitrification for removal and recovery of minor metals by downflow hanging sponge reactor"

#### <査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) D. Komizo, L. T. T. Cao, T. Kindaichi, N. Ozaki and A. Ohashi :The 12<sup>th</sup> International Conference on Civil and Environmental Engineering, 155-159 (2013) "Biological manganese oxidation using a down-flow hanging sponge reactor supplied with methane"
- 2) 大橋晶良：シーエムシー出版, 179-189 (2013)  
「リサイクルバイオテクノロジーとの最前線（細菌を使った排水からのレアメタル回収システム）」
- 3) 大橋晶良：日本水環境学会, 37, 2 (巻, 号), 56-60 (2014)  
「廃水からの生物学的レアメタル回収技術の開発動向」

### (2) 主な口頭発表（学会等）

- 1) 小溝大輔, L. T. T. Cao, 金田一智規, 尾崎則篤, 大橋晶良：第 48 回日本水環境学会年会(2014)「共生を利用したレアメタル吸着性 Bio-MnO<sub>2</sub> の高速生成」
- 2) L. T. T. Cao and D. Komizo, H. Imachi, Y. Aoi, T. Kindaichi, N. Ozaki and A. Ohashi: Conference of Japan Society on Water Environment, 2014 "Biological Mn Oxidation Under Low pH Condition For Rare Metals Recovery From Industrial Wastewater"
- 3) T. Hiroe and L. T. T. Cao, and H. Kodera, T. Kindaichi, N. Ozaki and A. Ohashi, International Society for Microbial Ecology, 2014 "Cocultivation of Manganese (II) oxidizing bacteria with methane oxidizing bacteria for rare metals recovery"
- 4) T. Hiroe and L. T. T. Cao, H. Kodera, T. Kindaichi, N. Ozaki and A. Ohashi: The 13<sup>th</sup> International Conference on Civil and Environmental Engineering, (2014) "Cocultivation of Manganese (II) oxidizing bacteria with Methane Oxidizing Bacteria"
- 5) 廣江 貴史, L. T. T. Cao, 小寺 博也, 金田一 智規, 尾崎 則篤, 大橋 晶良：第 49 回日本水環境学会年会 (2014)  
「マンガン酸化細菌の微生物群集内における MnO<sub>2</sub> 生成の意義」
- 6) 廣江 貴史, L. T. T. Cao, 小寺 博也, 金田一 智規, 尾崎 則篤, 大橋 晶良：第 50 回日本水環境学会年会 (2014)

## 7. 研究者略歴

研究代表者：大橋 晶良

- 1984.3 長岡技術科学大学大学院工学研究科建設工学専攻修士課程修了
- 1984.4 呉工業高等専門学校土木工学科助手
- 1995.4 長岡技術科学大学工学部環境・建設系助教授

2007.4 広島大学大学院工学研究院教授 現在に至る

研究分担者

1) 金田一 智規

2004.3 北海道大学大学院工学研究科都市環境工学専攻博士課程修了

2004.4 広島大学大学院工学研究科助教 現在に至る

2) 青井 議輝

2003.3 早稲田大学大学院理工学研究科応用化学専攻博士課程修了

2003.4 日本学術振興会特別研究員 (PD)

2007.4 早稲田大学高等研究所助教

2010.4 Northeastern University Visiting Scholar

2012.4 広島大学サステナブルディベロップメント実践研究センター講師 現在に至る

## 3K133004

## バイオリアクターによる廃二次電池溶解処理液からの Mn, Ni, Co 同時回収

## 〔要旨〕

自動車のトレンドとして、電気自動車が主流になると予測されている。特に蓄電池を搭載した二次電池式電気自動車が普及すると考えられている。従って、二次電池の生産と共に廃棄あるいはリサイクルが重要な課題になる。劣化したリチウムイオン二次電池のリサイクルは、無機化学的にレアメタルを溶解処理および電解処理して金属原料に再生しようとしている。しかし、現状の一般的な無機化学的手法では経済性が成立しにくい。このような背景から、新たなコバルト、マンガン、ニッケルの回収技術の開発が希求されている。マンガン酸化細菌によって生成される Mn 酸化物はコバルト、ニッケル等の金属吸着が可能であるためマンガン酸化細菌をリアクター内に高密度に集積培養することができれば、これら金属の同時除去が可能となる。申請者らは、マンガン酸化細菌をメタン酸化細菌あるいはアンモニア酸化細菌と共生させることで培養することに成功しており、本方法を適用してレアメタルを回収する技術を確立することを目的としている。

研究の結果、メタン酸化細菌あるいはアンモニア酸化細菌と共生培養において、最大マンガン酸化速度はそれぞれ  $0.6 \text{ kg Mn/m}^3/\text{d}$ 、 $0.35 \text{ kg Mn/m}^3/\text{d}$  であり、目標のマンガン酸化速度  $1 \text{ kg Mn/m}^3/\text{d}$  に到達しなかった。しかし、これらの実験において①マンガン酸化細菌が細菌の死骸も利用できること、②マンガン酸化物が他の従属栄養細菌を阻害している事を発見した。そこで、①より活性汚泥を基質して連続処理を行った結果、マンガン酸化は最大  $1.69 \text{ kg Mn/m}^3/\text{d}$  と微生物による世界最速のマンガン除去速度を達成した。ただしマンガン除去のスタートアップには 2 年以上と長期間を要した。そこで、②よりリアクターにマンガン酸化物を塗布することで、マンガン酸化細菌の優占的な培養に成功し、マンガン酸化細菌の培養を 2 週間程度に短縮することができた。これらの知見を基に実廃二次電池の溶解処理液を用いたニッケル、コバルト、マンガンの連続リアクター運転を行った結果、3 週間のスタートアップでそれぞれ  $1.69 \text{ kg Mn/m}^3/\text{d}$ 、 $0.17 \text{ kg Co/m}^3/\text{d}$ 、 $0.12 \text{ kg Ni/m}^3/\text{d}$  の除去速度に到達し、最終的に本研究の目標を達成した。

## 1. はじめに

今日の生活において多くのハイテク製品が利用されている。ハイテク製品には多種多様な希少金属であるレアメタルが用いられている。日本にはレアメタルはほとんど存在せずそのすべてを輸入でまかなっている<sup>1)</sup>。レアメタルの特徴として偏在性があり、その特性から特定の国からの輸入に依存せざるを得ないレアメタルが多く存在する。このような特徴から輸出を抑制する動きや、資源を外交カードとして利用しようとする資源ナショナリズムの動きが目立ってきている<sup>2)</sup>。最近の例としては 2010 年 9 月 7 日に起きた尖閣諸島中国漁船衝突事件において中国が日本へのレアアース（31 鉱種あるレアメタルの中の 1 鉱種）輸出を事実上止めた事例がある<sup>3)</sup>。この事件から日本が資源貧弱国であることが再認識され、レアメタルの多様な供給源を確保することの必要性が浮き彫りになった。このような背景からレアメタルを日本国内で再利用しレアメタルを安定確保する技術の開発が日本の重要な課題となっている。一方で、自動車のトレンドとして、内燃機関エンジンの生産は 2025 年ころをピークに減少し、電気自動車に代わると予測されている。特に蓄電池を搭載した二次電池式電気自動車が普及すると考えられている。従って、二次電池の生産と共に廃棄あるいはリサイクルが重要な課題になる。リチウムイオン二次電池のコストは正極材料に使われる

コバルトがその 7 割を占めているため、大幅な低コストを目指して正極材料にマンガン、ニッケルなどを使うもの ( $\text{Li(Li}_x\text{Ni}_x\text{Mn}_y\text{Co}_z\text{)}\text{O}_2$  など) に代替されている。劣化したリチウムイオン二次電池のリサイクルは、無機化学的にレアメタルを溶解処理および電解処理して金属原料に再生しようとしている。しかし、現状の一般的な無機化学的手法では経済性が成立しにくい。このような背景から、新たなレアメタル特に価格の高いコバルト、マンガン、ニッケルの回収技術の開発が希求されている。

マンガン酸化物はレアメタルを含む金属を吸着することが知られている<sup>4)</sup>。しかし、マンガン酸化物による金属回収技術は確立されていない。マンガン酸化物によるレアメタル回収技術が確立されれば、日本国内でのレアメタルリサイクルが可能となり、海外からの輸入リスクの減少、レアメタルの安定確保につながると思われる。また、工業的に生産されるマンガン酸化物より生物学的に生成されるマンガン酸化物は金属吸着能力が優れていることが知られており、微生物を利用したレアメタル回収技術の開発は日本の課題を解決する鍵になると考えられる。

自然環境に見いだされるマンガン酸化物の金属イオン含有率から<sup>5)</sup>、Mn 酸化物が金属イオンに対して高い吸着性を持つことがわかっている。特にマンガン酸化物に親和性の高い金属イオンとしては Co、Ni、Zn、Cu、Pb、Cd が挙げられる。さらに自然環境中では様々な微生物がマンガン酸化能を有していることからマンガン酸化能を有する微生物による生物学的マンガン酸化物の継続的生成と生物学的マンガン酸化物を吸着媒体とした重金属イオンの吸着回収は非常に理にかなっている。1986 年には Ghiorse によってこのようなマンガン酸化細菌が微量金属イオンの除去・回収に利用可能であることが初めて提案された<sup>6)</sup>。

Mn 酸化物は  $\text{MnO}_6$  八面体を単位とした鎖からなり、結晶中に欠損が形成されやすいことなどから様々な多孔性結晶構造をとる。 $\text{MnO}_6$  八面体の配列によって大きく 3 つのグループ (パイロルーサイト・ラムスデライト型、ホランダイト・ロマネカイト型、トドロカイト型) に分けられる。鎖の幅によってトンネルの大きさが異なる構造となり、長くなると層状構造となる。トンネル内あるいは層間には一般に水と陽イオンで満たされている。このグループに属さないマンガン酸化物結晶もいくつか知られている。微生物によって生成されるマンガン酸化物の多くがトドロカイトグループのブゼライト型であり、層状構造をしていて、構造中のマンガンの結晶欠損が高密度に存在している特徴がある(図 1.1)。結晶欠損は 10 数%におよび、これに由来する高い負電荷密度により、金属イオンに対して極めて高い吸着収容力があると考えられている。特に Co、Ni、Zn、Cu、Cd、Pb に高い吸着親和性を示し、マンガンに対してモル比で数 10%の吸着能力をバイオ Mn 酸化物は有している(図 1.2)。バイオ Mn 酸化物は金属イオンに対する吸着能力だけでなく、酸化能も有している。As、Cr はバイオ Mn 酸化物の形成過程で間接的に酸化され、As(V)、Cr(VI)としてマンガン酸化物に吸着する<sup>7)</sup>。

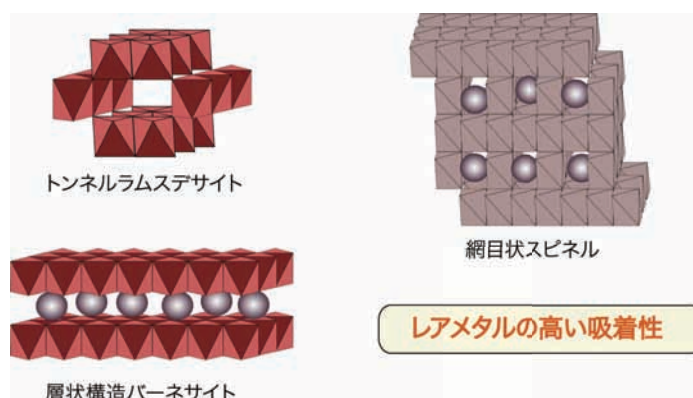


図 1.1 マンガン酸化物の構造<sup>8)</sup>



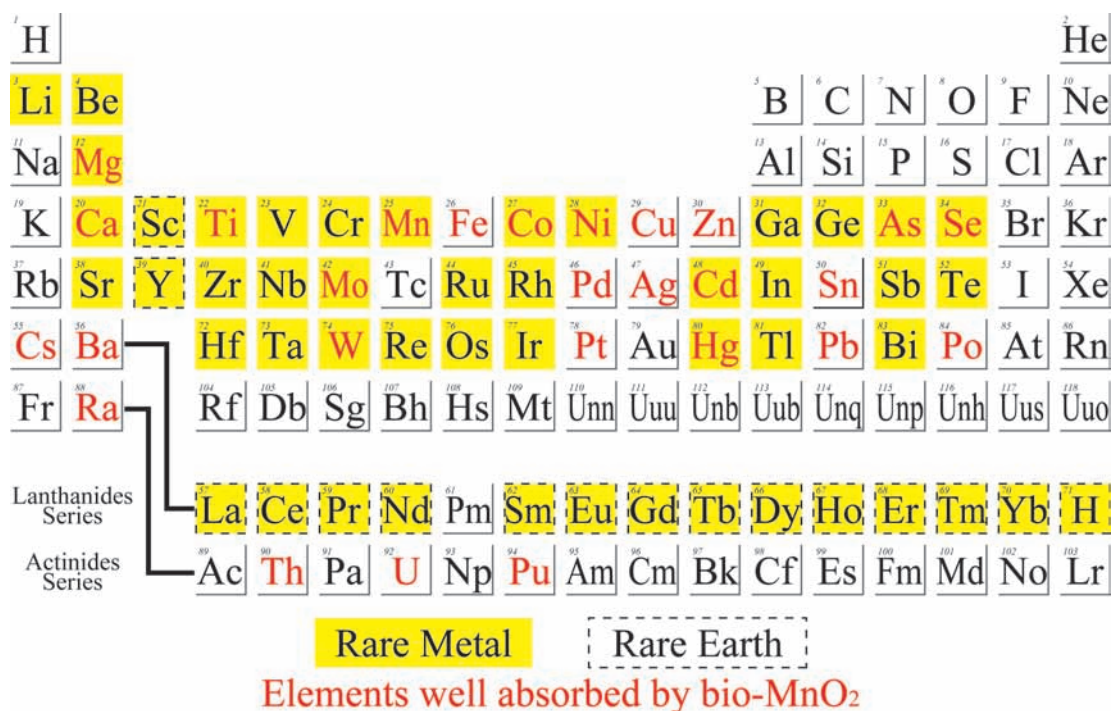


図 1.2 周期表におけるレアアース、レアメタル(赤字はマンガン酸化物が吸着可能な金属)

自然界でマンガン酸化物形成に関わる微生物（主に細菌と菌類）はマンガンの鉱物化を鉱物表面での嫌気触媒反応と比べ桁違いに加速させることが知られている<sup>9)</sup>。マンガン酸化物が陸上や海中で豊富なことからこのマンガン酸化細菌の働きが注目されている。

マンガン酸化細菌は自然環境中で至る所に存在していることが明らかになっている（表 1.1）。二価マンガンの十分な供給がある場合はあらゆる環境試料からマンガン酸化細菌が検出される。

表 1.1 マンガン酸化細菌の生息場所

|                        |
|------------------------|
| 玄武岩                    |
| 熱水噴出孔                  |
| 熱水噴出孔堆積物               |
| 鉱山堆積物                  |
| マンガン団塊                 |
| 好気嫌気遷移領域（黒海、堆積物、フィヨルド） |
| 水道管                    |

マンガン酸化細菌の研究が進んでいるモデル細菌にはモデル細菌であるスポアを形成する *Bacillus* sp. Strain SG1<sup>10)</sup>、ガンマプロテオバクテリア門の *Pseudomonas putida* MnB1 と GB-1<sup>11)</sup>、ベータプロテオバクテリア門の *Leptothrix discophora* strain SS-1<sup>12)</sup>などが知られている。



図 1.3 マンガン酸化細菌の系統学的多様性<sup>4)</sup>

マンガン酸化細菌は細菌ドメインで多様に確認されている (図 1.3)。例えば *Firmicutes*、*Proteobacteria*、*Actinobacteria* 門などが代表的である。この系統学的な多様性はマンガン酸化細菌の生理的な多様性を反映しており、これは前述のモデル細菌によって立証されている。武田らは高分子化合物分解好熱性ベータプロテオバクテリアのマンガン酸化細菌を報告している<sup>13)</sup>。アルファプロテオバクテリア門に属する好気非酸素発生型光養性 *Erythrobacter* 属に近縁な SD-21 株は有光または無光にかかわらず二価マンガンが存在すれば成長するにつれ細胞密度が上昇する<sup>14)</sup>。16S rRNA に基づいた解析では、*Pseudomonas putida* 種はガンマプロテオバクテリア門の最も一般的な分離株である。アルファプロテオバクテリアの *Roseobacter* グループは多くが分離されている。また、細菌に加え菌類もマンガン酸化に関与していると報告されている<sup>15, 16)</sup>。

マンガン酸化細菌の多様性は上述したとおりであるが、マンガン酸化する理由は全くわかっていない。金属酸化は進化の過程で持ち越された能力であり、生理的関連性がない可能性が挙げられている<sup>17)</sup>。しかし、多種多様なマンガン酸化細菌が存在することや、多くのマンガン細菌がマンガン酸化物に覆われることからマンガン酸化する能力を進化の過程で持ち越す理由があると考えられる。マンガン酸化の潜在的メ

リットは数多くあると言われている。電子の受容体になる<sup>18)</sup>ことや、化学合成独立栄養細菌がエネルギーを獲得できることである。二価マンガンから三、四価のマンガンへの酸化は熱力学的には有意であるが、二価マンガン酸化とエネルギー獲得の間には明確な証拠はない。マンガン酸化物により自らを覆うことで、マンガン酸化細菌は紫外線、捕食者、ウイルスや有害金属から自らを守っている可能性がある。2005年にはParikhらが、*Pseudomonas putida*の純菌株でマンガン酸化物がある系の方がいない系と比較して増殖が早いと報告をしている<sup>19)</sup>。さらに四価の生物学的マンガン酸化物はフミン酸などの難分解性有機物を分解し、微生物が利用できるよう低分子化することが知られている<sup>20)</sup>。

微生物によるマンガン酸化の機構はよくわかっていない。その理由としてはマンガン酸化酵素である銅酸化酵素(Mnlicopper oxidase)の精製と異種発現に成功していないことである。銅酸化酵素はマンガン酸化において重要な役割を担っており、遺伝学研究により栄養細胞でのマンガン酸化が細胞表面で発生していることが明らかになった。2013年にはKati Geszvainらが*Pseudomonas Putida* GB-1株を用いた研究を行い、銅酸化酵素遺伝子を除去された系ではマンガン酸化が起きないことが確認された。さらに、2つの銅酸化酵素遺伝子のうち片方を除去することでマンガン酸化がどのように変化するかを調べたところ、液体または個体でマンガン除去の速度に顕著な変化が見られたと報告している<sup>19)</sup>。以上のように生物作用によるマンガン酸化には銅酸化酵素が関与しており、その機構が明らかになってきている。

## 2. 研究目的

マンガン酸化細菌をリアクターに集積培養し、コバルト、マンガン、ニッケルの吸着性に優れたバイオMn酸化物を生産することができれば、排水からコバルト、マンガン、ニッケルを同時回収することができる。これは、廃リチウムイオン二次電池からのレアメタル回収に適用でき、省エネで薬品を使わない環境にやさしい方法であるため普及が期待できる。マンガン酸化物によるレアメタルの回収技術の開発においてまずはマンガン酸化細菌の集積培養が必要となる。培養には純菌培養と複合微生物系での培養の2種類が考えられる。マンガン酸化細菌の純菌培養は昔から確立されているが、純菌培養ではレアメタル含有水を滅菌してから流さなければならないことや管理が難しいことから高コストになると考えられ現実的ではない。そのため本研究では複合微生物系でマンガン酸化細菌の集積培養を目指す。しかしながら、開放の環境中でマンガン酸化菌を優占的に培養するのは簡単ではなく、バイオMn酸化物を継続的に生成することは困難である。

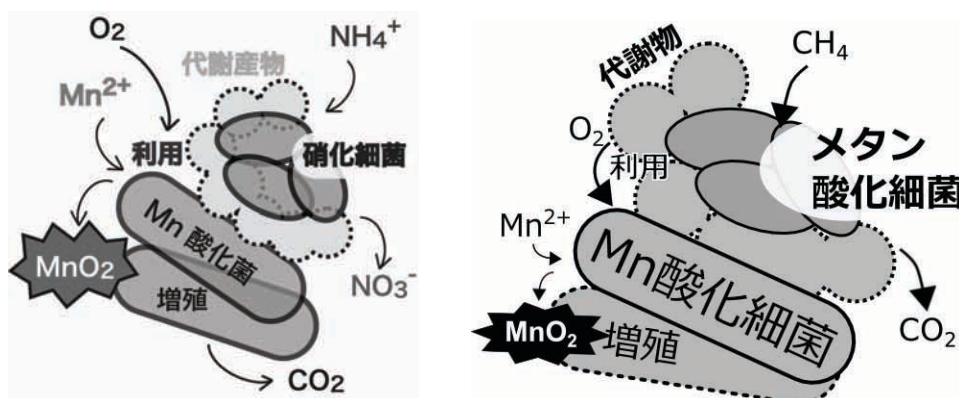


図 2.1 共培養細菌の代謝物を有機物源としたマンガン酸化細菌の集積培養

Mn を酸化する微生物は数多く報告されており、この能力を有している細菌をマンガン酸化細菌と称して、すべて有機物を必要とする従属栄養細菌である。このマンガン酸化細菌を培養することでバイオ MnO<sub>2</sub> を容易に生産することができ、この MnO<sub>2</sub> を利用してレアメタルの吸着・回収は可能である。しかしながら、レアメタルを含有している排水等からの回収は容易ではない。それはマンガン酸化細菌の培養が困難なためである。実用を想定すると排水を無菌にすることは容易でなく、このためマンガン酸化細菌は他の雑菌との生存競争に負けてしまい、バイオリアクターに生息することができない。すなわち、バイオリアクターにマンガン酸化細菌を定着させて、連続的に MnO<sub>2</sub> を生産することができない。従って、単純な培養ではなく、マンガン酸化細菌の特性を生かした集積培養方法が必要である。

マンガン酸化細菌は自然や上水処理のろ過池などの貧栄養環境で検出されており、おそらく有機物濃度に対して親和性の高い種であると考えられ、極低濃度の有機物排水を供給すれば、開放系においてもマンガン酸化細菌を培養することが可能と考えられた。そこで、マンガン酸化細菌と硝化細菌との共存微生物生態を構築することを考えた(図 2.1)。アンモニア性窒素のみの排水処理において、一般的に硝化細菌だけで構成されていることはなく、全細菌の半分程度に留まる。これは硝化細菌の代謝有機物(低濃度)を利用する好気性細菌が繁殖するためである。この機構を利用して、アンモニア性窒素含有排水に Mn(II)が含まれていれば、硝化細菌と共存したマンガン酸化細菌の集積培養が可能ではないかと考えた。その結果、これまでにアンモニア性窒素を唯一の基質とした硝化細菌とマンガン酸化細菌との共培養に成功している。この培養技術を適用した廃二次電池溶解処理液からのレアメタル回収の実用化に向けたバイオ Mn 酸化物の高速生成技術の開発を本研究では目的としている。

バイオリアクター内にマンガン酸化細菌を高濃度に保持できなければ、MnO<sub>2</sub> の高速生成、ひいてはレアメタル回収の実用化には至らない。好気性の細菌を高濃度に保持できるバイオリアクターとして、DHS (Downflow Hanging Sponge) 装置は有望である。装置内に生物保持のためのスポンジ担体(あるいは布担体)が投入されていて、水で満たさず、上部より排水を散水し、下部から排出される単純な構造である。エアレーションなしに、気相から酸素がスポンジ・布に供給されて好気状態に保たれる(図 2.2)。マンガン酸化細菌によって生産された MnO<sub>2</sub> は、比重が大きく、担体表面から滑落し、装置下部に収集されるため、容易に回収できる。



図 2.2 共培養細菌の代謝物を有機物源としたマンガン酸化細菌の集積培養

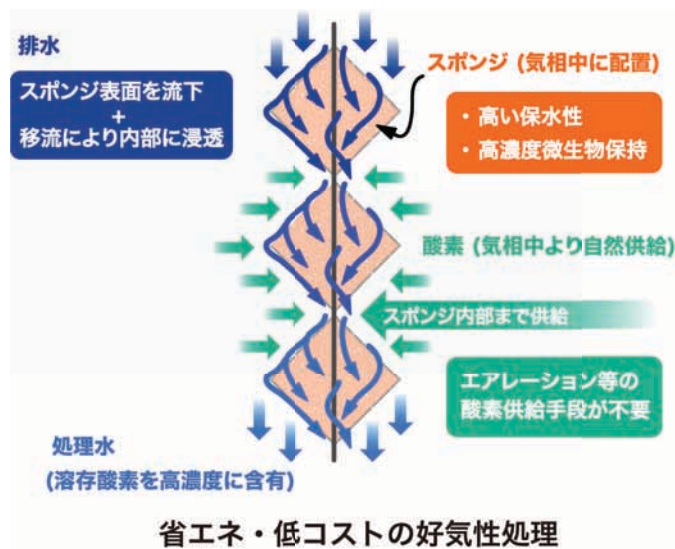
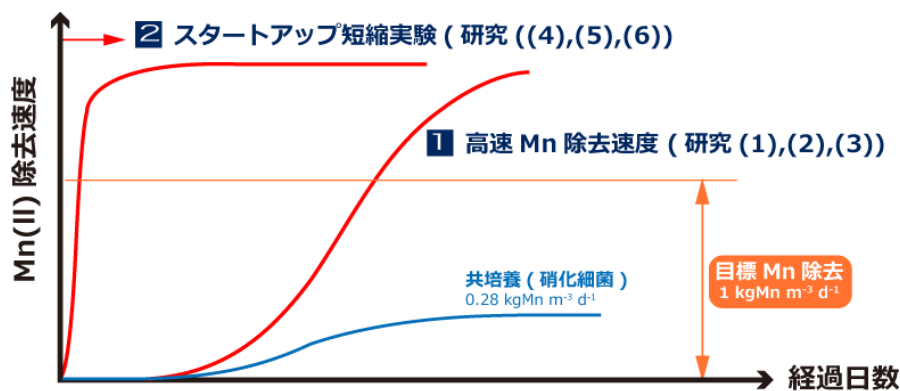


図 2.3 DHS リアクター原理

マンガン酸化細菌は硝化細菌との共培養により培養可能であり、 $\text{Mn(II)}$ を酸化してバイオ $\text{MnO}_2$ を生成することに成功している。しかし、技術を適用した廃二次電池溶解処理液からのレアメタル回収の実用化には、① $\text{Mn(II)}$ 酸化速度は高くない、②スタートアップが遅い、③実際に実二次電池溶解液に適用できるか不明である、などの課題がある(図2.4)。そこで本研究では、これらの課題を解決することを目的として、次章に示す7つの研究課題を設定した。



- 1 バイオMn酸化物の生成速度をさらに高める技術の確立  
マンガン酸化速度  $1\text{ kg Mn/m}^3/\text{d}$
- 2 バイオリアクターのスタートアップ短縮化方法の確立
- 3 実廃バッテリー液からマンガン酸化細菌を培養,  
 $\text{Mn}$ ,  $\text{Ni}$ ,  $\text{Co}$  除去の実証 (研究(7))

図 2.4 研究テーマと課題

### 3. 研究方法

本研究では、バイオ Mn 酸化物の生成速度を高める技術の確立、そのためのマンガン酸化菌の同定・分離・培養、レアメタル吸着回収量評価、実バッテリー溶解処理液による実証を目的として、以下の 7 つの実験を実施した。

#### (1) 硝化細菌との共培養でのバイオ Mn 酸化物の生成

##### 1) 目的

マンガン酸化細菌は有機物を必要とする従属栄養細菌である。このため、有機物の基質を供給すれば簡単に培養できそうである。しかし、開放系では廃水を無菌にすることはできず、マンガン酸化細菌は他の雑菌との生存競争に負けて培養できない。一方で、マンガン酸化細菌は貧栄養環境で検出されることから、基質親和性の高い種で、極低濃度の有機物排水を供給すれば、開放系においても培養できるのではと考えられた。

##### 2) 仮説

マンガン酸化細菌は貧栄養環境で検出されることから、基質親和性の高い種で、極低濃度の有機物排水を供給すれば、開放系においても培養できるのではと考えられた。マンガン酸化細菌を培養するための有機基質源を供給するために硝化細菌との共存微生物生態を構築することを考えた(図 2.1、2.2)。アンモニア性窒素のみを含んだ排水処理において、硝化細菌だけで構成されていることはなく、硝化細菌の代謝有機物(低濃度)を利用する好気性細菌が共存する。この機構を利用して、Mn(II)とアンモニア性窒素の含有排水処理リアクターでマンガン酸化細菌の集積培養を試みる。

#### 3) 実験方法

##### a 実験装置及び実験条件

実験には樹脂製の円筒形カラム(内径 7 cm、全長: 110 cm、容積約 4.2 L)の中に微生物保持担体として 2 cm 角のスポンジ 32 個(全容積: 0.256 L)を直列に吊るした DHS リアクターを用いた。スポンジ担体には活性汚泥とマンガン酸化汚泥を植種し、25 °C で運転を行った。MnCl<sub>2</sub> を 5~25 mg-Mn/L に、NH<sub>4</sub>Cl を 5~15 mg-N/L にそれぞれ調整した無機模擬排水を各リアクターの上部から供給した(表 3.1.1)。DHS リアクターの運転開始時は、リアクターにメタンと空気の混合ガスを送った。リアクターは 1000 日運転を行った。その運転条件を表 3.1.2 に示す。

表 3.1.1 基質組成

| 微量元素   | mg L <sup>-1</sup> |
|--|--------------------|
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                 | 18~144             |
| NH <sub>4</sub> Cl                                   | 19.1~57.3          |
| NaNO <sub>3</sub>                                    | 30.36              |
| KHCO <sub>3</sub>                                    | 100                |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   | 100                |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 20                 |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                 | 5                  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 20                 |
| Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O   | 0.1                |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                 | 0.0025             |
| NaSeO <sub>4</sub>                                   | 0.005              |
| NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                 | 0.019              |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                 | 0.024              |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O  | 0.022              |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 0.001              |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 0.043              |

表 3.1.2 運転条件

| Phase | Day     | Interval of day | Mn <sup>2+</sup> | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | HRT <sup>a</sup> | GRT <sup>b</sup> | O <sub>2</sub> |
|-------|---------|-----------------|------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------|------------------|----------------|
|       |         | day             | (mg/L)           | (mg-N/L)                     | (mg-N/L)                     | (mg-N/L)                     | (hour)           | (day)            | (%)            |
| 1     | 0-48    | 49              | 5                | 5                            | 0                            | 5                            | 3                | 4                | 21             |
| 2     | 49-98   | 50              | 5                | 0                            | 0                            | 5                            | 3                | 4                | 21             |
| 3     | 99-215  | 117             | 10~20            | 0                            | 0                            | 5                            | 3                | 4                | 21             |
| 4     | 216-314 | 99              | 20~15            | 5                            | 0                            | 5                            | 1.5              | 4~2              | 21             |
| 5     | 315-407 | 93              | 15~25            | 0                            | 0                            | 5                            | 1.5              | 2                | 21             |
| 6     | 408-448 | 41              | 10~15            | 0                            | 0                            | 5                            | 1.5              | 2                | 21             |
| 7     | 449-476 | 28              | 15               | 5                            | 0                            | 5                            | 1.5              | 2                | 21             |
| 8     | 477-545 | 69              | 7                | 5                            | 0                            | 5                            | 0.8              | 2~1              | 40             |
| 9     | 546-655 | 110             | 7~20             | 10                           | 0                            | 5                            | 0.8              | 0.6              | 40             |
| 10    | 656-776 | 121             | 20               | 10~15                        | 0                            | 5                            | 0.5~0.2          | 0.3              | 40~50          |
| 11    | 777-811 | 35              | 20               | 10                           | 5                            | 5                            | 0.2              | 0.3              | 50             |
| 12    | 812-883 | 72              | 20~15            | 10                           | 0                            | 5                            | 0.3~0.5          | 0.3              | 50             |

<sup>a</sup> HRT: hydraulic retention time

<sup>b</sup> GRT: gas retention time

## b 測定項目及び測定方法

Mn 除去性能はリアクター流入・流出時の溶存 Mn 濃度を水質分析器 DR-2800(HACK)を用いて測定することで評価した。各イオン態窒素濃度はイオンクロマトグラフ (HPLC10Avp: 島津社製) を用いて測定した。流出・流入水の pH を Horiba Benchtop multi-parameter waters quality meter を用いて測定した。

マンガン酸化に関わる細菌を調査するため汚泥のサンプリングを運転 189 日目に行った。採取はスポンジ表面に付着しているバイオマスを手で搾り取ることで行う。絞りとしたスポンジは全 20 個のうち上・中・下から 3 個ずつである。なお、各リアクターの運転においてバイオマスの過剰な増加は運転管理に支障をきたすため適宜採取を行った。

## c 微生物解析

運転 206 日目の採取バイオマスに対し、16S rRNA 遺伝子を標的としたクローニング解析を行った。DNA 抽出にはフェノール・クロロホルム法を用いた。PCR 増幅は全細菌を対象とした EUB338Fmix-BAC1389Rm のプライマーセットを用いた。適切なサイクル数を求め、94°C/30sec、52°C/30sec、72°C/1min 30sec の PCR 反応を 23 サイクル行い、最後に伸長反応を 72°C/5min で行った。

## (2) メタン酸化細菌との共培養でのバイオ Mn 酸化物の生成

### 1) 目的

硝化菌との共生系によるマンガン酸化細菌の集積培養は成功したが過度の硝化反応による pH の低下によりマンガン酸化能力が低下するという問題が明らかになった。そこでメタンを唯一の有機炭素源としてメタン酸化細菌を培養しても、硝化細菌と同様に代謝産物を利用する他の細菌群と共存した微生物生態系が構築されるのではないかと考えた。本研究ではメタン酸化細菌との共生系によりマンガン酸化細菌の集積培養が可能であるかどうかを調査しマンガン酸化に関与する細菌の調査を目的とした。メタン酸化細菌との共生系では pH の変動がなく、リアクターの運転管理が容易である。また、処理場等から排出されるメタンを有効利用できることが期待できる。

## 2) 実験方法

### a 実験装置及び実験条件

実験には樹脂製の円筒形カラム（内径 40 mm、全長：850 mm、容積約 1 L）の中に微生物保持担体として 2 cm 角のスポンジ 20 個（全容積：0.16 L）を直列に吊るした DHS リアクターを用いた（図 3.2.1）。スポンジ担体には活性汚泥とマンガン酸化汚泥を植種し、25 °C で運転を行った。MnCl<sub>2</sub> を 5～50 mg-Mn/L に、窒素源として NaNO<sub>3</sub> を 5 mg-N/L にそれぞれ調整した無機模擬排水を各リアクターの上部から供給した（表 3.2.2）。DHS リアクターの運転開始時は、リアクターにメタンと空気の混合ガスを送った。リアクターは 1000 日運転を行った。その運転条件を表 3.2.3 に示す。

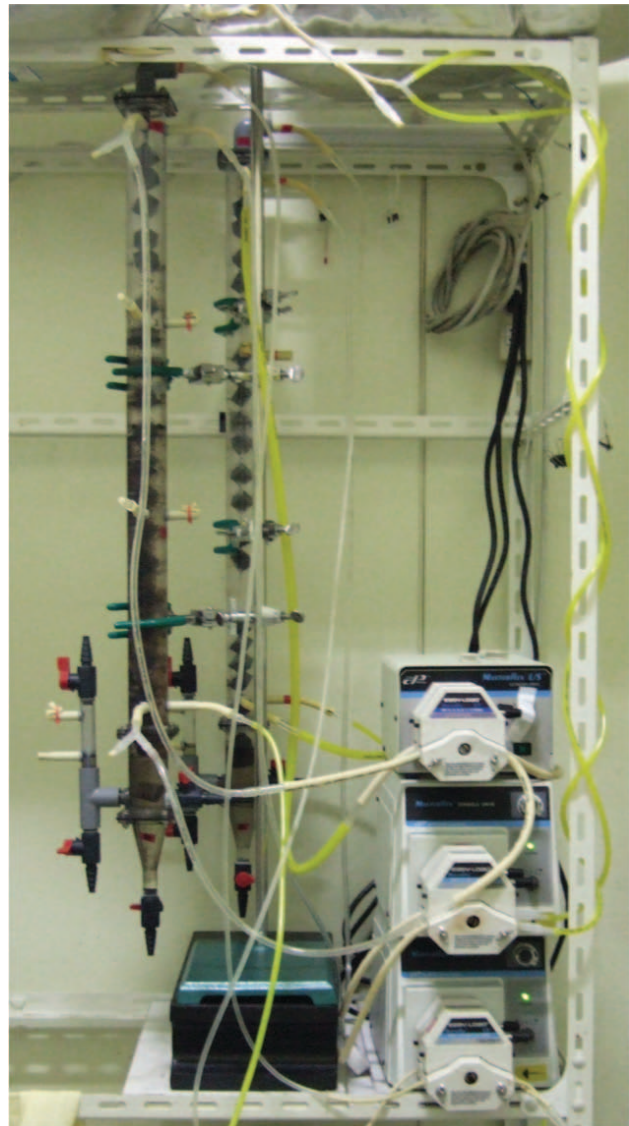
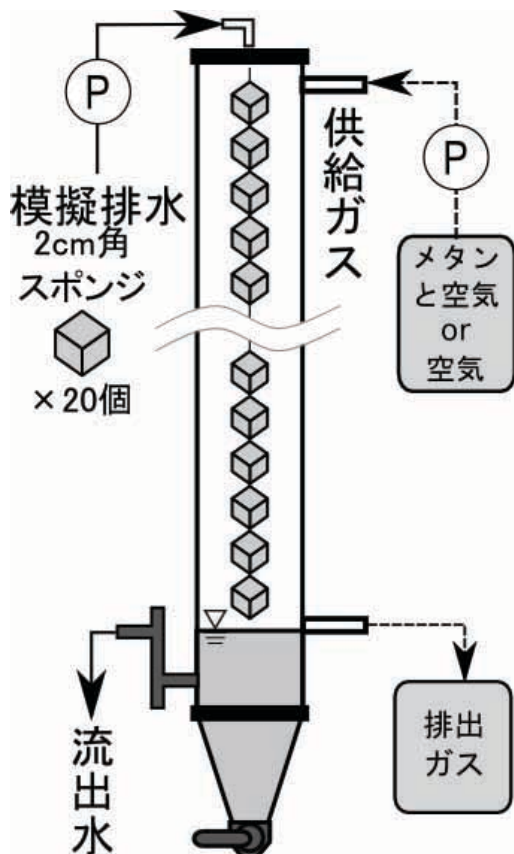


図 3.2.1 リアクター概要図とリアクター全体写真



表 3.2.1 リアクター基質組成

| compound   | (mg/L) | compound  | (mg/L) |
|--|--------|---|--------|
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                 | 18-180 | NaNO <sub>3</sub>                                   | 30.36  |
| KHCO <sub>3</sub>                                    | 25     | CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                | 0.025  |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   | 81.5   | Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>                    | 0.005  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 11     | NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 0.019  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 20     | CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 0.024  |
| CaCl <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O                | 5      | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.022  |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 0.1    | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 0.001  |
|  |        | ZnSO <sub>4</sub>                                   | 0.043  |

表 3.2.2 リアクター運転条件

| Phase | day | 日付         | Mn <sup>2+</sup><br>(mg/L) | CH <sub>4</sub><br>(%) | HRT<br>(hour) | GRT<br>(hour) | ガス<br>循環 | 基質<br>循環 |
|-------|-----|------------|----------------------------|------------------------|---------------|---------------|----------|----------|
| 1     | 0   | 2011/04/27 | 5                          | 1→2→4                  | 4             | 18            | ×        | ×        |
|       | 65  | 2011/07/01 | 5                          | 4                      | 4             | 18            | ○*1      | ×        |
| 2     | 76  | 2011/07/12 | 5                          | 4                      | 4             | <u>3</u>      | ○        | ×        |
|       | 97  | 2011/08/02 | 5                          | 4                      | <u>2</u>      | 3             | ○        | ×        |
|       | 106 | 2011/08/11 | <u>10</u>                  | 4                      | 2             | 3             | ○        | ×        |
|       | 133 | 2011/09/07 | <u>15</u>                  | 4                      | 2             | 3             | ○        | ×        |
| 3     | 155 | 2011/09/29 | 15                         | <u>0</u>               | 2             | 3             | ○        | ×        |
| 4     | 196 | 2011/11/09 | 15                         | <u>4</u>               | 2             | 3             | ○        | ×        |
|       | 234 | 2011/12/17 | <u>5</u>                   | 4                      | <u>2</u>      | 3             | ○        | ×        |
|       | 301 | 2012/02/22 | 5                          | 4                      | <u>1</u>      | 3             | ○        | ×        |
|       | 343 | 2012/04/04 | <u>10</u>                  | 4                      | <u>1.5</u>    | 3             | ○        | ○*2      |
|       | 390 | 2012/05/21 | 10                         | 4                      | 1.5           | <u>2</u>      | ○        | ○        |
|       | 420 | 2012/06/20 | <u>30</u>                  | 4                      | 1.5           | 2             | ○        | ○        |
| 5     | 512 | 2012/09/20 | <u>50</u>                  | 4                      | 1.5           | 2             | ○        | ○        |
|       | 562 | 2012/11/09 | 50                         | <u>0</u>               | 1.5           | 2             | ○        | ○        |
| 6     | 632 | 2013/01/18 | 50                         | <u>4</u>               | 1.5           | 2             | ○        | ○        |
|       | 693 | 2013/03/20 | <u>5</u>                   | 4                      | 1.5           | 2             | ○        | ○        |
|       | 722 | 2013/04/18 | <u>50</u>                  | 4                      | 1.5           | 2             | ○        | ○        |
|       | 751 | 2013/05/17 | <u>5</u>                   | 4                      | 1.5           | 2             | ○        | ○        |
| 7     | 951 | 2013/12/03 | <u>*3</u>                  | 4                      | 1.5           | 2             | ○        | ○        |

1：リアクター内の気相を循環、\*2：リアクター内の基質を循環、\*3：流出マンガン濃度（≒リアクター内マンガン濃度）を出来るだけ低くなるように適宜変更

## b 測定項目及び測定方法

Mn 酸化性能はリアクター流入・流出時の溶存 Mn 濃度を水質分析器 DR-2800(HACK)を用いて測定することで評価した。各イオン態窒素濃度はイオンクロマトグラフ (HPLC10Avp: 島津社製) を用いて測定した。酸素とメタン濃度はガスクロマトグラフ (GC-TCD 8A: 島津社製) を用いて測定した。流出・流入水の pH を Horiba Benchtop multi-parameter waters quality meter を用いて測定した。

マンガン酸化に関わる細菌を調査するため汚泥のサンプリングを運転 189 日目に行った。採取はスポンジ表面に付着しているバイオマスを手で搾り取ることで行う。絞りとしたスポンジは全 20 個のうち上・中・下から 3 個ずつである。なお、各リアクターの運転においてバイオマスの過剰な増加は運転管理に支障をきたすため適宜採取を行った。

レアメタル除去性能を調査するため運転 950 日目からニッケルとコバルトを 10 mg/L で添加した。金属の濃度は発光分光分析装置(ICPE9000:島津社製)を用いて測定した。

## c 微生物解析

運転 189 日目の採取バイオマスに対し、16S rRNA 遺伝子を標的としたクローニング解析を行った。DNA 抽出にはフェノール・クロロホルム法を用いた。PCR 増幅は全細菌を対象とした EUB338Fmix-BAC1389Rm17mer のプライマーセットを用いた。適切なサイクル数を求め、94°C/30sec、52°C/30sec、72°C/1min 30sec の PCR 反応を 23 サイクル行い、最後に伸長反応を 72°C/5min で行った。

### (3) 活性汚泥を唯一の基質としたマンガン酸化細菌の集積培養

#### 1) 目的

硝化細菌やメタン酸化細菌との共生系により Mn 酸化細菌の培養は可能であったが、Mn 酸化速度は目標値に達しなかった。一方で、Mn 酸化細菌の集積培養は硝化細菌あるいはメタン酸化細菌との共培養による方法以外にも、活性汚泥を基質として供給することにより可能であることが示唆された。そこで、Mn 酸化細菌を植種した DHS リアクターに上部より活性汚泥を基質として供給して Mn 酸化細菌の集積培養を行った。

#### 2) 仮説

上記の共培養の結果では、硝化細菌と Mn 酸化細菌との共培養において、アンモニアの供給を停止しても Mn 酸化が 1 ヶ月ほど起こるといふおもしろい現象が起きた。さらにメタン細菌との共培養においても基質のメタンを停止しても Mn 酸化が起きることを確認した。これは硝化細菌やメタン酸化細菌の代謝産物だけでなく細菌の死骸等も Mn 酸化細菌は基質として利用できることを示唆しており(図 3.3.1)、廃棄物である下水処理場から発生する余剰活性汚泥がマンガン酸化細菌の培養に適していれば、より環境にやさしいレアメタル回収が可能である。

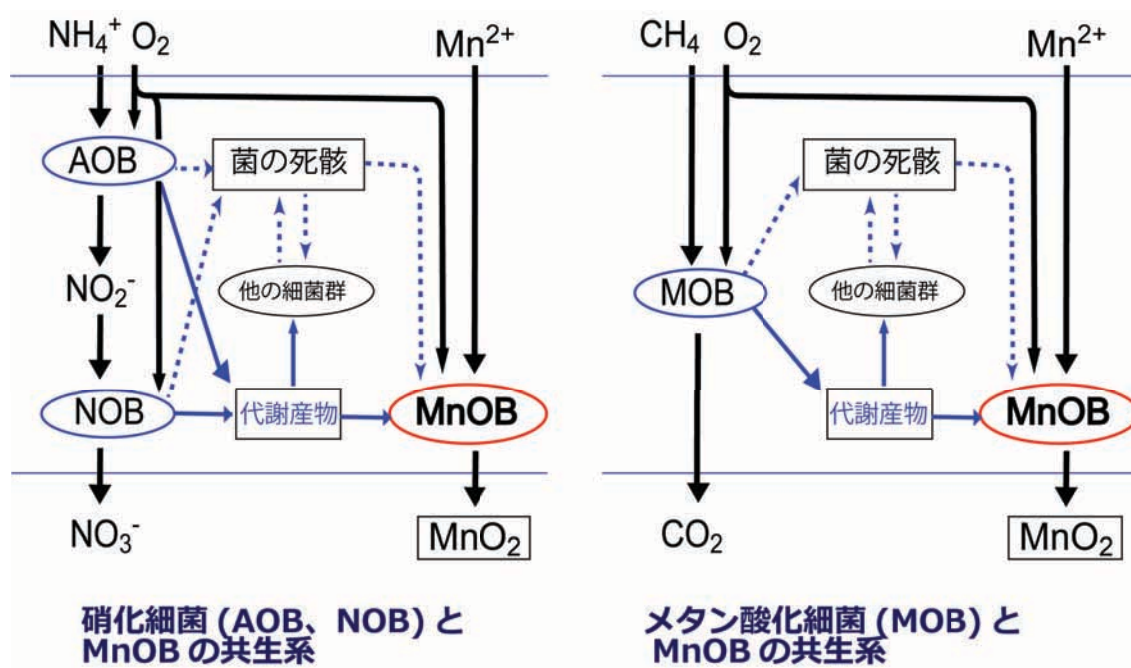


図 3.3.1 マンガン酸化細菌の基質利用特性(仮説)

### 3) 実験方法

#### a 実験装置及び実験条件

リアクターには透明アクリル製円筒形カラム(内径 40 mm、外径 50 mm、体積約 1.1 L)の中に、微生物保持担体として 2 cm 角のスポンジ 20 個(全容積 0.16 L)を直列に吊るした DHS リアクターを使用した。スポンジには硝化細菌共生系を利用した Mn 酸化バイオリアクターのバイオマスを用いた(図 3.3.2)。200 ml のバイオマス(汚泥濃度約 4000 mgSS L<sup>-1</sup>)の中にスポンジを浸漬させ、しぼる事でバイオマスを植種した。

基質を 0.9 L day<sup>-1</sup>(水理学的滞留時間 HRT では 2 時間)の流量で一定流量にて供給可能なポンプを使用して供給した。また同様のポンプを用いて、リアクターカラム内に空気を供給した。リアクターは 25°C の恒温室内に設置した。

運転開始時において Mn(II)濃度が 5 mg L<sup>-1</sup> となるように 10 L の基質をポリタンク内に作成した。基質には純水を使用し、微生物の代謝活動に必須な微量元素を添加して供給した(表 3.3.1)。

Mn (II)除去能力が低下する毎に有機基質として活性汚泥を適宜添加した。具体的には 210 日目、292 日、384 日、414 日、444 日、522 日にそれぞれ 164 mgCOD、164 mgCOD、132 mgCOD、95.5 mgCOD、94 mgCOD、569 mgCOD 相当の活性汚泥をリアクター上部から添加する事で供給した。

供給 Mn(II)負荷をリアクターの Mn (II)除去能力に応じて変更した(表 3.3.1)。リアクター流出の Mn (II)濃度が完全に除去されるようになった時点で HRT を短くし、流入基質の Mn(II)濃度を徐々に増やした。

#### b 測定項目及び測定方法

両実験系の流入水並びに流出水の水質を経時的に測定した。測定項目を pH、有機物(COD)濃度、Mn(II)濃度として観察を行った。pH は Benchtop multi-parameter waters quality meter(HORIBA 社製)、COD 濃度並びに Mn(II)濃度は吸光光度式水質分析器 DR-2800(HACH 社製)にて定量した。リアクター流入水並びに流出水

から採取したサンプルは全て 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルター(ADVANTEC 社製)を用いて濾過処理を施した。酸素濃度はガスクロマトグラフ (GC-TCD 8A: 島津社製) を用いて測定した。

### c 微生物解析

運転 657 日目にリアクター上部、中部、下部よりスポンジを絞ってバイオマスを採取した。PBS で洗浄後 Fast DNA spin kit for soil (MP Biomedicals、Irvine、CA、USA)を用いて DNA 抽出を行い、3 種類の DNA を同じ濃度で混合した。得られた DNA に対して 27F-519R のプライマーセットを用いて PCR 増幅を行った。16S rRNA 遺伝子を標的としたクローニング解析を行った。昇温 95°C/5min で 95°C/30sec、58°C/30sec、72°C/1min 30sec の PCR 反応を 30 サイクル行い、最後に伸長反応を 72°C/5min で行った。適当な処理を施した DNA 増幅サンプル(全細菌対象プライマー341F-805R で PCR 済)を北海道システム・サイエンス株式会社に次世代シーケンサー454 (Roche 社製)を用いた微生物群集解析を外注した。得られた塩基配列情報をもとに、微生物群集解析が行われた。解析は概して、得られた配列データから遺伝子情報を OTU 抽出し 16S rDNA データベース上に登録された系統種ごとの遺伝子情報に 97%の相同性を有する OTU ごとに分類分けを行った。このデータベースは、QUIIME Resource サイトよりダウンロードされた Greengenes データベースの配列情報および分類情報を使用した。

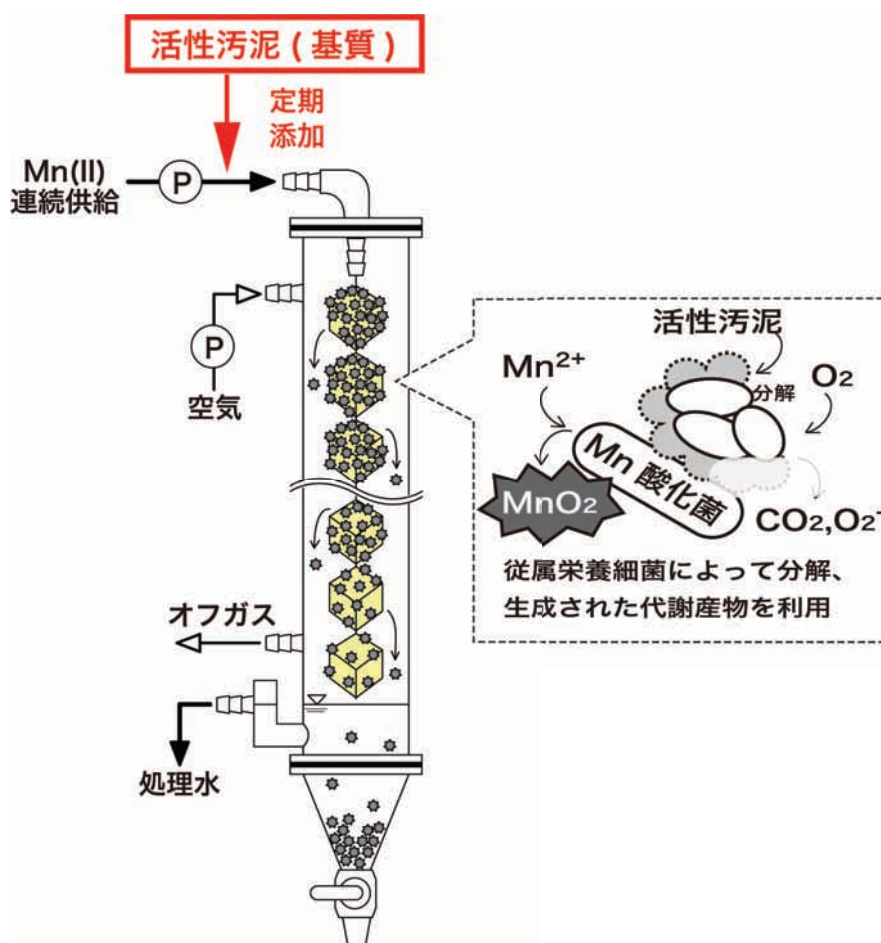


図 3.3.2 活性汚泥基質による Mn 酸化リアクター

表 3.3.1 培養条件

| Phase | Day     | Period of Time<br>(day) | Mn <sup>2+</sup> | COD             | HRT <sup>a</sup> | ART <sup>b</sup> |
|-------|---------|-------------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|
|       |         |                         | (mg/L)           | (mg)            | (hour)           | (hour)           |
| 1     | 0-46    | 46                      | 5                | ND <sup>c</sup> | 12~8             | 20               |
| 2     | 47-209  | 162                     | 5                | ND <sup>c</sup> | 8~6              | 4                |
| 3     | 210-291 | 81                      | 5                | 164             | 6~2              | 4                |
| 4     | 292-383 | 91                      | 5~10             | 164             | 2~0.8            | 3~2.3            |
| 5     | 384-412 | 28                      | 10~15            | 132             | 0.8              | 2.3              |
| 6     | 413-444 | 31                      | 15~7             | 95.5            | 0.8              | 2.3              |
| 7     | 445-521 | 76                      | 7~10             | 94              | 0.8~0.6          | 2.3~1.2          |
| 8     | 522-841 | 319                     | 10~40            | 569             | 0.6              | 1.2              |
| 9     | 842-911 | 69                      | 40~20            | 574.5           | 0.6~1.2          | 1.2              |
| 10    | 912-938 | 26                      | 20~30            | 911             | 1.2~0.4          | 1.2~0.4          |
| 11    | 939-974 | 35                      | 25               | 1070.5          | 0.4              | 0.4              |

<sup>a</sup> HRT: hydraulic retention time; <sup>b</sup> ART: air retention time

<sup>c</sup> ND: not determined

#### (4) マンガン酸化物の好気性微生物への活性阻害実験

##### 1) 研究背景と目的

硝化菌やメタン酸化細菌との共生系、活性汚泥でも Mn 酸化細菌を集積培養することが可能であることが明らかになった。Mn 酸化細菌の培養にはメタン酸化細菌の代謝物が重要であり、代謝物量が多いほど Mn 除去速度が高くなることがわかった。しかし、メタン消費速度は純粋なメタン酸化リアクターと比較すると 1/6 程度の能力しかなく、メタン酸化細菌が MnO<sub>2</sub> に阻害されていること示唆された。阻害されていることがわかった。そこで本章ではメタン酸化細菌が何によって阻害されているのかを調査することを目的とした。本実験系では活性汚泥に有機基質を添加し MnO<sub>2</sub> 存在環境下において培養を行い、回分試験方式にて阻害の有無を検証する目的として実験を行った。獲得した知見より、環境中でのマンガン酸化細菌の Mn(II)酸化意義について新たな考察が得られると考えた。MnO<sub>2</sub> は高い化学反応性を有する物質であるが、生物活性阻害に関する知見は未知で、MnO<sub>2</sub> の化学的物性についても新たな知見を獲得できると考えた。

##### 2) 仮説

マンガン酸化細菌の環境中における Mn(II)酸化意義には諸説あり、概してマンガン酸化細菌は自身を保護し生存戦略的に Mn(II)酸化をすることが強く示唆されている(図 3.4.1)。同時に先行研究で観察された MnO<sub>2</sub> の活性阻害作用を踏まえ、以下のような仮説を立てた。

1. MnO<sub>2</sub> は従属栄養細菌に対して活性阻害を及ぼし、彼らの有機物分解能力を低下させる。
2. MnO<sub>2</sub> の影響を全く受けないあるいは影響が少ない耐性菌が存在する。
3. MnO<sub>2</sub> は直接的に微生物細胞に阻害作用を及ぼし、MnO<sub>2</sub> による生育必須元素等の吸着収容作用に起因した間接的な影響ではない。

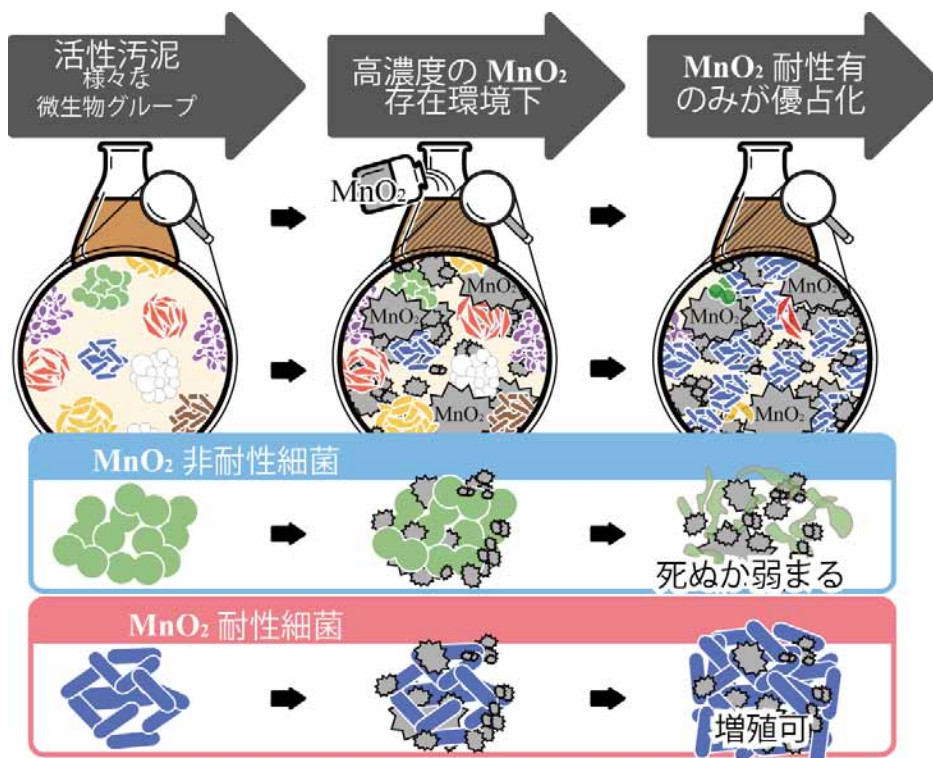


図 3.4.1 Mn 耐性菌の選別

### 3) 実験方法

#### a メタン酸化細菌のマンガン酸化物阻害実験

マンガン酸化物がメタン酸化細菌に与える影響を調査するため、回分試験方式にて従属栄養細菌の活性阻害作用の有無やその詳細な知見の獲得を目的に実験を行った。実験に適用される従属栄養細菌は下水処理施設より採取した活性汚泥を用いた。またその活性阻害の有無については、活性汚泥に添加した有機基質消費量の経時的挙動の観察結果と  $MnO_2$  の添加量とを比較して評価した。実験に際し阻害影響の検証に使用する微生物サンプルは東広島浄化センター(広島県東広島市西条町田口 100-1)より採取した。汚泥は処理場内最終沈殿池の最上流部より採取した。これは、下水処理施設への流入下水が含む種々の物質等の汚泥への影響を最小限に抑え、実験に使用できると考え適用した。また阻害作用の検証に用いた  $Mn(IV)$  酸化物は化学合成粉末  $Mn(IV)O_2$ (キシダ化学)を使用した。実験手順は以下の通りである。

- ① 東広島下水処理場から採取した活性汚泥(2000 mgSS/L)を 25°C 恒温室内のビン(1L)に入れる。
- ② 4%濃度のメタンをビンに 0.1L/h で供給し続ける。
- ③ 3日、7日目に上澄み 0.5 L を捨て、表 3.4.1 の基質を等量入れる。
- ④ 7日間馴養を行い、十分にメタン酸化細菌を増やす。
- ⑤ 122mL バイアルビンにマンガン酸化物(市販品パウダー)を 0、1.5、6、12、18、24、30 g/L となるよう 7系を用意する。
- ⑥ 汚泥を 7つのバイアルビンに 40 mL ずつ入れる。
- ⑦ バイアルビンのフタを閉め、タン濃度を 4%に調整する。

- ⑧ メタン濃度を0、2、4、6、8時間ごとに計測する。計測の間は振とう機にて25°Cで振とうする。

表 3.4.1 メタン酸化細菌回分試験基質

| compound   | (mg/L) | compound  | (mg/L) |
|--|--------|---|--------|
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                 | 18-180 | NaNO <sub>3</sub>                                   | 30.36  |
| KHCO <sub>3</sub>                                    | 25     | CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                | 0.025  |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   | 81.5   | Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>                    | 0.005  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 11     | NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 0.019  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 20     | CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 0.024  |
| CaCl <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O                | 5      | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.022  |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 0.1    | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 0.001  |
|  |        | ZnSO <sub>4</sub>                                   | 0.043  |

#### b 従属栄養細菌のマンガン酸化物阻害実験

採取した活性汚泥を実験室内で、回分試験で使用する上記基質と汚泥との馴致を行った。本実験系で使用する培地には K-medium を適用した。本培地の主たる構成成分である Peptone ならびに Yeast Extract は多くの従属栄養細菌が基質として利用可能な基質である。これより広義的に従属栄養細菌の有機物の消費量評価への本培地の適用は適切であると考えた。加えて、本培地を使用した多種多様なマンガン酸化細菌の培養が報告されていることから、MnO<sub>2</sub>による活性阻害影響を受けにくい耐性菌の存在証明を検証するに鑑みて適切な培地とした(表 3.4.2)。また阻害作用の検証に用いた Mn(IV)酸化物は化学合成粉末 Mn(IV)O<sub>2</sub>(キシダ化学)を使用した。実験の手順は以下の通りである。

実験に使用する Mn 酸化物もバイオ Mn(IV)酸化物同様に金属元素に対する吸着収容性を有している。そのため、MnO<sub>2</sub>と基質が混合させた際に表 3.4.2 に記載した必須栄養元素の MnO<sub>2</sub>への吸着が考えられる。そこで、MnO<sub>2</sub>(50 g)を孔径 0.22 μm のろ紙中に封入しフラスコ内で有機質を添加した活性汚泥(馴致済)の培養を行った。培地ならびに汚泥の体積や、曝気量等の培養条件は回分試験と等しく行った。この場合 活性汚泥と MnO<sub>2</sub>との直接的な接触は無く、培養液内の化学基質と MnO<sub>2</sub>の接触は可能である。活性汚泥の培養を有機基質添加条件下(K-medium: 600 mgCOD/L)で行い、MnO<sub>2</sub>添加系ならびに非添加系の2系列にて25°Cで15時間培養した。これにより MnO<sub>2</sub>の微生物活性阻害の機構について検証を行った。

- ① 東広島下水処理場で採取した活性汚泥をしばらく静置し上澄み液を捨てる。
- ② K-medium をそれぞれ加え、全体で 300mgCOD/L にする。
- ③ 汚泥 10 L を 25°C の恒温室内でエアレーション(Air: 0.3 L/min)しつつ一日放置し順応させ、従属栄養細菌を増やす。
- ④ 500 mL フラスコを 3 つ準備する。
- ⑤ 24 グラムの Mn 酸化物(市販品、パウダー)を 2 つ量り取る。
- ⑥ フラスコに 0~100 g/L の Mn 酸化物を入れる。
- ⑦ Mn 酸化物が接触しない系では円筒形ろ紙にマンガン酸化物 50 g を入れフラスコに固定する(図 4.4)。
- ⑧ 培養液の上澄みを捨て汚泥 100 mL、基質 400 mL、計 500 mL に調整する。

- ⑨ 25°Cで培養し、時間経過毎に測定する。計測の間はエアレーションしておく。

表 3.4.2 従属栄養細菌回分試験基質

| K-medium   | mg·L <sup>-1</sup> |  |                    |
|--|--------------------|--|--------------------|
| Yeast extract                                      | 60                 |  |                    |
| Peptone  | 240                |  |                    |
| Nutrient elements                                  |                    | Trance Element                                     | mg·L <sup>-1</sup> |
|  | mg·L <sup>-1</sup> |  |                    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    | 29.9               | CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O                | 0.0025             |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O | 223.23             | NaSeO <sub>4</sub>                                 | 0.005              |
| CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O                | 5                  | NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O                | 0.019              |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 20                 | CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O                | 0.024              |
| Ferrum Sol.  |                    | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O | 0.022              |
|  | mg·L <sup>-1</sup> | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                     | 0.001              |
| Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O  | 0.1                | ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 0.043              |



図 3.4.2 活性汚泥の馴養



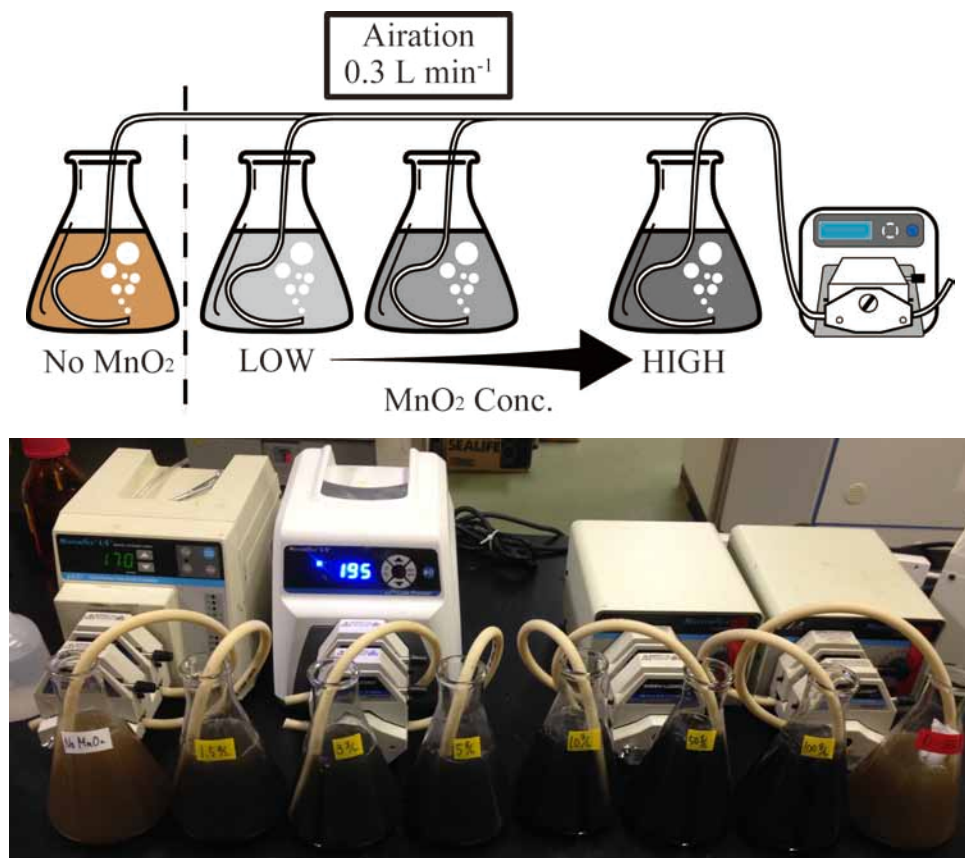


图 3.4.3 活性污泥阻害实验

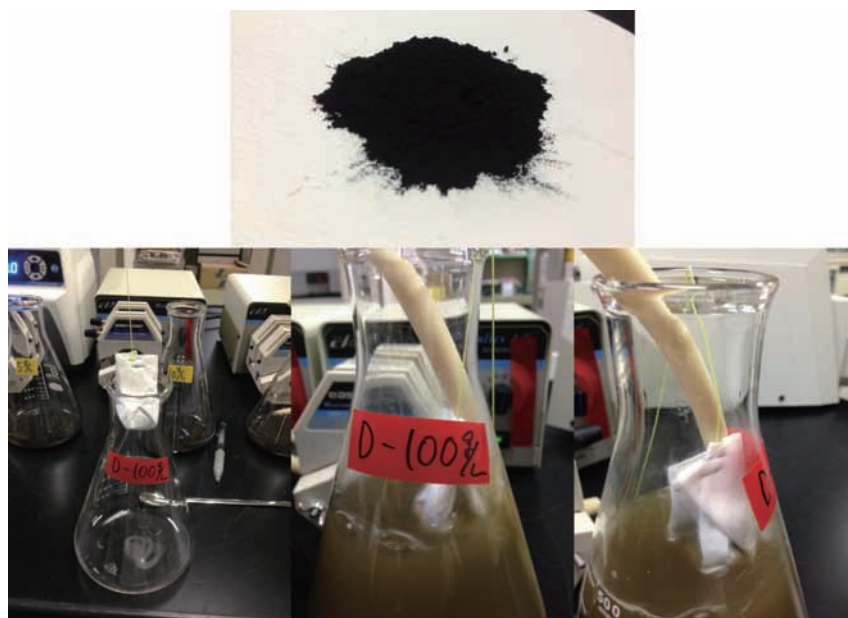


图 3.4.4 Mn 氧化物非接触系实验

### c 測定方法ならびにサンプル処理について

回分試験サンプルは全て孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルター(ADVANTEC 社製)を用いてろ過処理を施した。メタン濃度はガスクロマトグラフ (GC-TCD 8A: 島津社製) を用いて測定した。従属栄養細菌阻害実験条件では全炭素濃度(TOC)を TOC-V CSH/CSN(SHIMADZU 社製)にて測定した。

## (5) マンガン酸化細菌の分離・培養

### 1) 背景と目的

マンガン酸化速度を高めるには、マンガン酸化細菌を同定して生理学的特性を把握し、特性に適した運転をする必要がある。そこで、 $\text{MnO}_2$  が従属栄養細菌を活性阻害することを利用した新規の方法でマンガン酸化細菌の分離・培養の実験を開始した。生物学的 Mn 酸化において、上記の研究成果より Mn 酸化物耐性菌ならびに非耐性菌に分類が出来ると考えた。Mn 酸化物耐性菌の培養を行うにあたり、固形培地上での高濃度  $\text{MnO}_2$  環境を作成するため、固形培地に  $\text{MnO}_2$  を添加し固化させることで  $\text{MnO}_2$  プレートを作成した。これと Blank プレート ( $\text{MnO}_2$  非含有プレート)の培養から獲得した培養結果から、環境微生物中のマンガン酸化細菌あるいは Mn 酸化物耐性菌ならびに非耐性菌の分類が可能かどうかを調査した。

### 2) 仮説

有機基質の主組成として K-medium として添加した 2 種類の固形培地を作成し活性汚泥の培養を行った(図 3.5.1)。一つは高濃度  $\text{MnO}_2$  を添加した  $\text{MnO}_2$  プレートと、非添加系の Blank プレートを使用した。もし Mn 酸化物が Mn 酸化細菌以外の微生物の成長を阻害するのであれば、下記のように Mn 酸化細菌のみが増殖できると考えた。また  $\text{MnO}_2$  プレートで発現したコロニーの一部は Mn(II)酸化能を有している。生物学的 Mn(II)酸化では微生物にとってエネルギーの獲得可能な代謝経路ではないことが示唆されていることから、Mn(II)酸化微生物は環境中に多く存在していることが考えにくいためである。

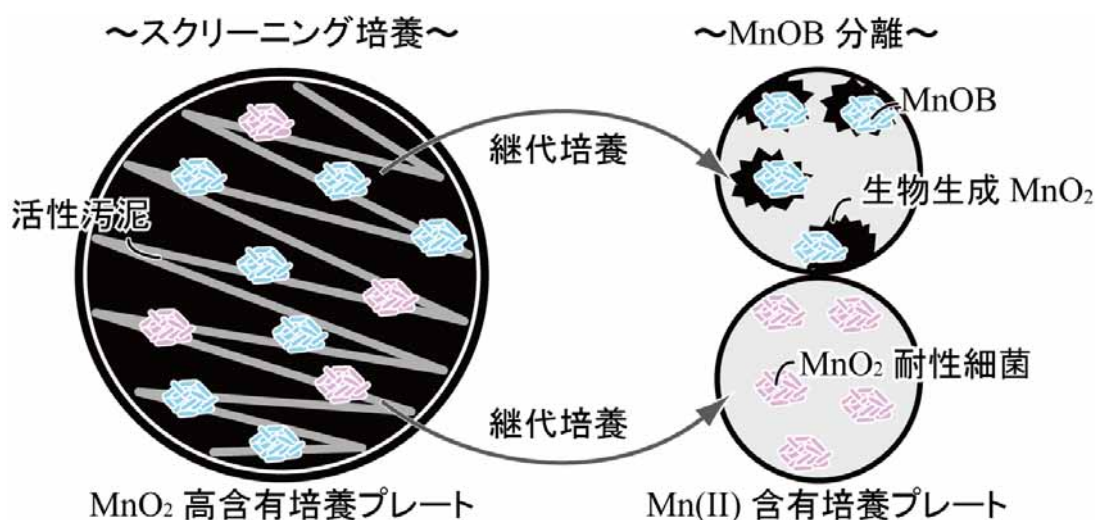


図 3.5.1  $\text{MnO}_2$  プレートによる Mn 酸化物耐性菌及び Mn 酸化細菌培養

### 3) 実験方法

#### a 植種源

本実験系で培養を行う培養微生物は全て東広島浄化センター(広島県東広島市西条町田口 100 - 1)より採取した活性汚泥を使用した。

採取した微生物サンプルは汚泥中のフロックを分散させ、微生物菌体をシングルセル状に均一化を行った。これには物理的に分散させるガラス製ホモジナイザーで処理を施した後、超音波ホモジナイザーにてフロックの超音波破碎を施した。未処理の活性汚泥と処理後の活性汚泥に DAPI 染色を行った(図 3.5.2)。処理を行った活性汚泥を  $MnO_2$  プレートと Blank プレート上に植種し、培養を行った。

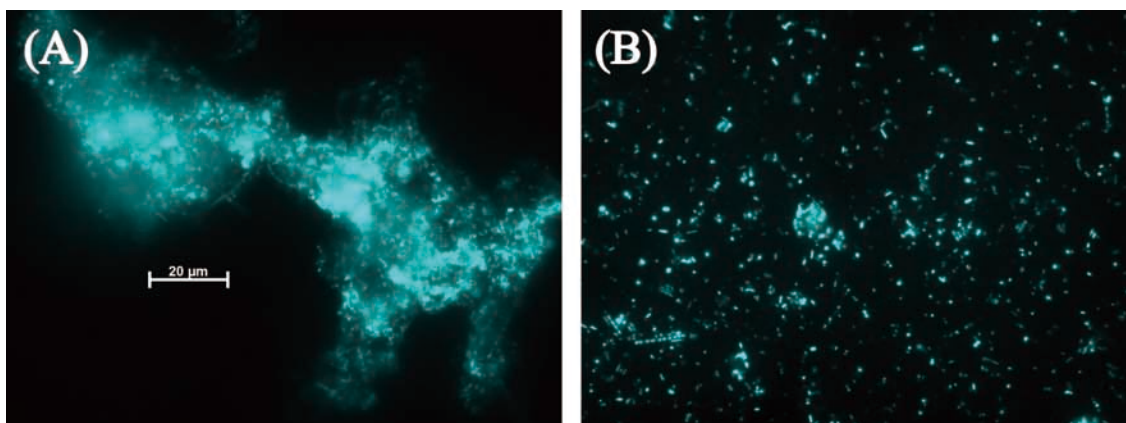


図 3.5.2 DAPI 染色による活性汚泥観察((A)未処理、(B)超音波及びホモジナイザー処理後)

#### b プレート作成方法ならびに培養

上記処理を行った活性汚泥の培養は固形培地を用いて培養を行った(表 3.5.1)。固形培地の主要構成成分として Agar ならびに Gellungum を使用した。pH 調整としてリン酸バッファーならびに HEPES バッファーを使用した。これらの成分の培養への影響は適正実験の結果にて記述した。有機物源としてこれまでの実験同様に K-medium を使用し 溶存 COD 濃度が 300 mgCOD/L となるように添加した。また植種後のプレートは恒温室内暗所にて 30 °C の温度条件にて培養を行った。さらに  $MnO_2$  プレート作成時には培地内に 100 g/L となるように化学合成  $MnO_2$ (キシダ化学)を添加した。

固形培地の作成方法は以下の手順で行った。

- ① 超純水ならびに基質等を添加し、全量が 300 mL となった溶液に固形培地成分を Agar 8 g/Gellungum 7g を添加し、オートクレーブ(高圧蒸気滅菌)処理を施す。
- ② オートクレーブ中に包装ビニールへのエタノール消毒を行ったプラスチック製培養プレート(シャーレ)をクリーンベンチ(無菌実験台)上で殺菌灯(紫外線殺菌)にて滅菌処理を施す。
- ③ オートクレーブ後の培地(60~70°Cで保温)は適当な回転数で攪拌し、容器内の基質が均一化を行う。
- ④ そのプレートに 15~20 mL ずつ培地を添加し、クリーンベンチ内で遊離水の乾燥、培地の冷却を行う。

発現したコロニーに対して、Mn(II)酸化能力の有無について検証する目的で液体培養を行った。培養基質には、これまで通り K-medium を使用し有機物濃度を 300 mgCOD/L とした。Mn(II)濃度を添加した培地では Mn(II)濃度を 10 mgMn(II)/L となるように添加した。発現したコロニーをそれぞれの培地に同じ菌体量で、Mn(II)添加 K-medium 系ならびに非添加系に植種し 96 well plate で培養を行った。培養 24 時間後全 well に

Mn(IV)に反応して青色に呈色する Leuco Berbelin Blue (LBB)染色液を添加した。これにより、発現したコロニーの Mn(II)酸化能力の有無を検証した。

プレート上での培養後、プレート上の発現コロニーをコンラージ棒で集積し微生物サンプルを採取した。集積したサンプルは回収し、遠心分離処理を行った。

表 3.5.1 培養条件及び基質組成

| Cultivation conditions    |   | Substrates(mg L <sup>-1</sup> )                    |       |
|---------------------------|---|--|-------|
| Main solid comp.          | Agar → Gellum Gum (7 g 300 mL <sup>-1</sup> )             | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    | 0.4   |
| pH Buffer (pH 7.8)        | Phosphate Buffer (P conc. 0.02 mM)<br>→HEPES Buffer 20 mM | CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O                | 0.1   |
| Organic Conc.             | 300 mgCOD L <sup>-1</sup>                                 | MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 0.4   |
| Conc. of MnO <sub>2</sub> | 100 g L <sup>-1</sup>                                     | CuCO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O                | 0.005 |
| Organic Compounds         | K-medium(Peptone, Yeast Extract)                          | NaSeO <sub>4</sub>                                 | 0.01  |
| Temp.                     | 30 °C   | NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O                | 0.038 |
| Inocula                   | Activated Sludge, Reactor samples                         | CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O                | 0.048 |
|                           |   | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O | 0.044 |
|                           |   | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                     | 0.002 |
|                           |   | ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 0.083 |
|                           |   | Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O  | 0.2   |

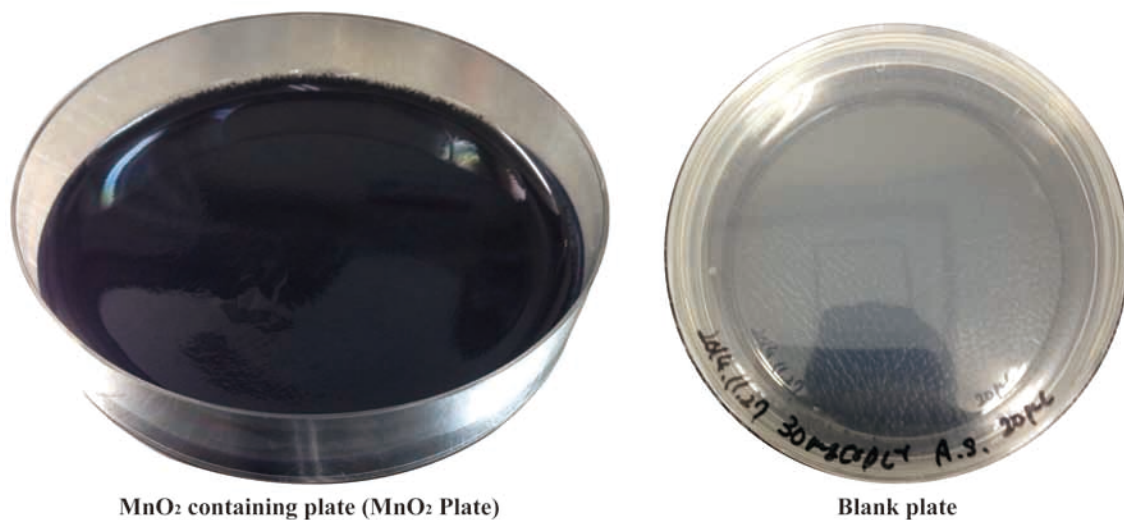


図 3.5.3 MnO<sub>2</sub>プレートと Blank プレート

## (6) DHS リアクターを用いた MnO<sub>2</sub>の有無による Mn(II)酸化のスタートアップ比較

### 1) 研究背景と目的

Mn 酸化物が環境中に存在すると多くの微生物の活性を低下させる結果が得られた。そして、Mn 酸化細菌は Mn 酸化物を生成することで他の微生物の代謝活性を阻害することで、環境中で優占的に増殖するという仮説を立てた。一方、人工模擬排水からの生物学的 Mn(II)除去を活性汚泥基質や硝化細菌及びメタン酸化細菌との共培養にて試みたが、Mn 除去が観察されるまで長期間（1年以上）を要した。ここで先の実験で示した MnO<sub>2</sub>による従属栄養細菌の活性阻害作用を利用する事で短縮できるのではないかと考えた。すなわち、微生物培養担体への MnO<sub>2</sub>塗布を施すことで優先的に Mn 酸化に寄与する微生物群のみを培養させて、

スタートアップの短縮が可能となると考えた。そこで、本研究ではリアクターに  $\text{MnO}_2$  塗布した系としない系を用意し、 $\text{Mn}$  除去のスタートアップにどのような差が見られるか調査した。さらに培養した微生物群を分子生物学的手法により明らかにした。

## 2) 仮説

$\text{MnO}_2$  による従属栄養細菌への活性阻害作用を微生物培養担体への  $\text{MnO}_2$  塗布により、人為的に生じる環境下での培養を行った。3系列の詳細な運転初期条件は表 3.6.1 に示す。

1) RUN 1 では多種多様な従属栄養細菌が、RUN 2 では  $\text{MnO}_2$  耐性菌およびマンガン酸化細菌、RUN 3 では  $\text{MnO}_2$  耐性菌が優先的に培養される(図 3.6.1)。

2) 一定期間 RUN 3 を初期条件下で培養した後  $\text{Mn(II)}$  供給を開始すると、直ちに生物的  $\text{Mn(II)}$  除去が観察される。

3) RUN1、2 とともにマンガン酸化細菌が培養可能な条件であるが、RUN2 では生物的  $\text{Mn(II)}$  除去の早期発現が観察され、RUN 1 で短期間で発現は見込まれない。これは  $\text{MnO}_2$  耐性菌の優占化に伴うものである(図 6.2)。

4)  $\text{MnO}_2$  塗布と非塗布系の微生物群集を系統的に明らかにすることで  $\text{MnO}_2$  耐性菌あるいは非耐性菌の菌叢同定が可能になる。

5) リアクターで培養した微生物群の生態特性を明らかにすることにより、未だ示唆されたことのない新たな微生物の分類群の提案が可能となる(図 3.6.3)。

表 3.6.1 初期運転条件

|       | $\text{MnO}_2$ 塗布 | $\text{Mn(II)}$ 供給 | 有機物      |
|-------|-------------------|--------------------|----------|
| RUN 1 | 無し                | 有り                 | K-medium |
| RUN 2 | 有り                | 無し                 | K-medium |
| RUN 3 | 有り                | 有り                 | K-medium |



図 3.6.1 Mn 酸化物塗布による優占種の変化(仮説)

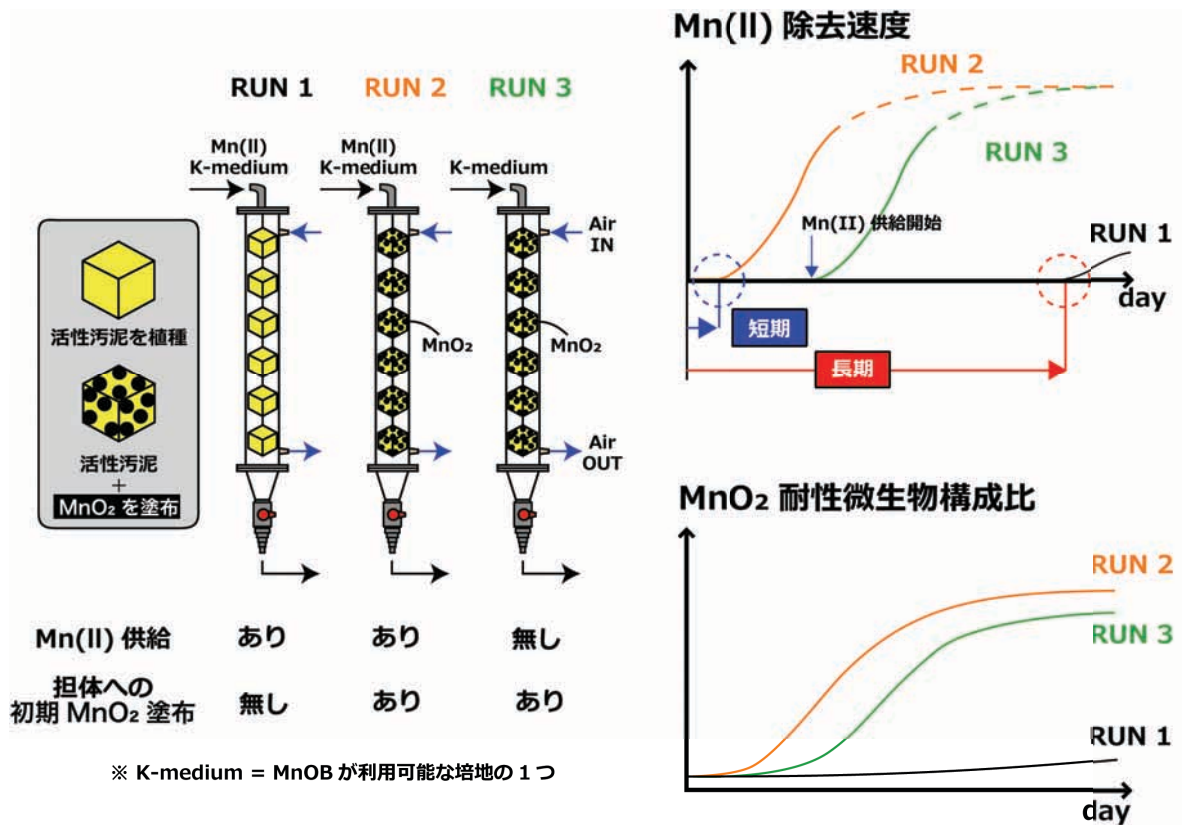


図 3.6.2 Mn 酸化物塗布によるスタートアップ、MnO<sub>2</sub> 耐性細菌の変化(仮説)

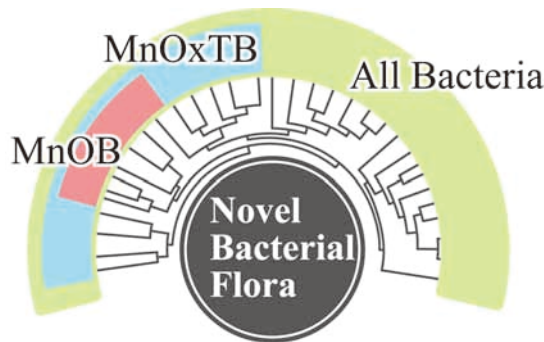


図 3.6.3 Mn 酸化物耐性菌グループと Mn 酸化細菌グループ

### 3) 実験方法

#### a 実験装置

リアクターには透明アクリル製円筒形カラム(内径 50 mm、外径 60 mm、体積約 1.6 L)の中に、微生物保持担体として 2 cm 角のスポンジ 20 個(全容積 0.16 L)を直列に吊るした DHS リアクターを使用した。リアクターで培養を行う微生物の植種源として、東広島浄化センター(東広島市西条町田口 100-1)の活性汚泥反応槽より採取した活性汚泥を使用した。

リアクターは 3 台同時に運転し、RUN 2、3 の系には化学合成された MnO<sub>2</sub> (キシダ化学 010-47295、1 級、500 g) をリアクターに塗布した。粒径は mesh100 で、150 μm のふるいを使用されたものである。MnO<sub>2</sub>

は金属元素の吸着能力に優れており Mn(II)も吸着されるものの1つである。予め塗布する MnO<sub>2</sub>に吸着しうる Mn(II)を吸着させてなければ、リアクターで観察を行う Mn(II)の動態が生物的なものか、あるいは塗布した MnO<sub>2</sub>への吸着であるのか判断が不可能となる。MnO<sub>2</sub>の塗布は 100 g L<sup>-1</sup>の濃度で行う。つまり担体中には 16 g の MnO<sub>2</sub>が存在することになる。また MnO<sub>2</sub>への Mn(II)の吸着は 5 mg/g [Mn(II)/MnO<sub>2</sub>]で生じることを実験的に確認した。これより、16 g の MnO<sub>2</sub>に吸着し得る Mn(II)量は 80 mg と算出できた。

MnO<sub>2</sub>への Mn(II)への吸着は、1 L の超純水に MnO<sub>2</sub>を 100 g を添加し攪拌した完全混合液を使用する。完全混合液(1 L)に Mn(II)を 100 mg 添加させ、10 分程度攪拌させる。上記の算出量よりも多めに Mn(II)を添加させた理由は完全に MnO<sub>2</sub>への Mn(II)吸着を完了させるためである。攪拌後、リアクター運転で採用する Mn(II)供給濃度 5 mg/L となるように作成した Mn(II)水溶液 1 L に完全混合液から遠心分離処理によって分離した MnO<sub>2</sub> 100 g を添加し、10 分程度攪拌した。これにより Mn(II)濃度変化に伴う Mn(II)の漏出ならびに活性汚泥添加に際する Mn(II)の活性阻害等の影響を未然に防ぐものとした。Mn(II)水溶液(5 mgMn(II)/L)への添加作業を 3 度繰り返し、遠心分離処理を行い MnO<sub>2</sub> 100 g を採取した。

Mn(II)の吸着完了後の MnO<sub>2</sub>を活性汚泥(1 L)に 100 g/L の濃度になるように添加した。添加に際し活性汚泥は完全混合する様に適当な回転数にて攪拌した(図 3.6.4)。

RUN 1 のスポンジ担体には MnO<sub>2</sub>の塗布は行わない。攪拌により完全混合となった状態で RUN 1 のスポンジ担体を 1 個ずつスポンジの空隙全てが活性汚泥で満たされるように手で揉むようにして植種した。

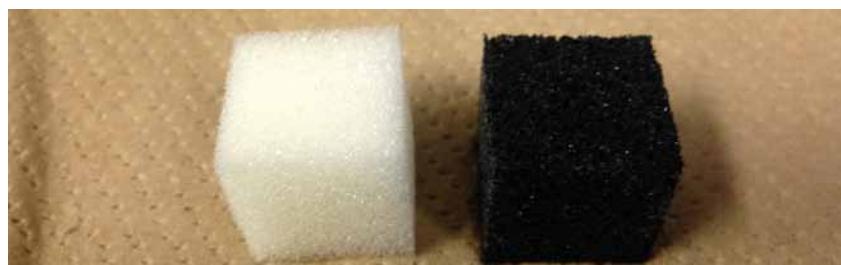
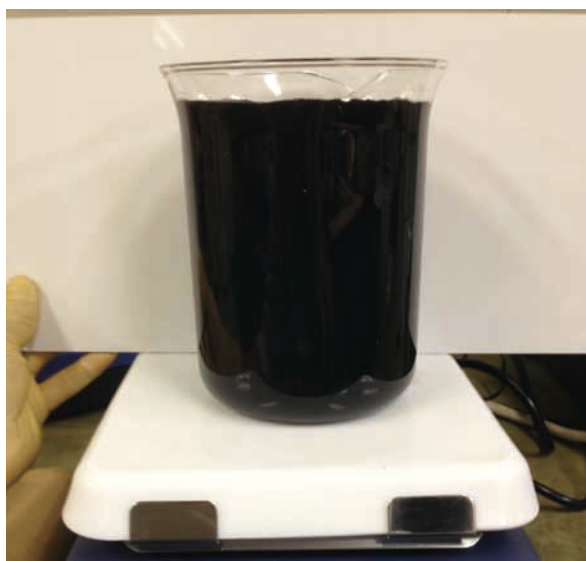





図 3.6.4 スポンジへの Mn 酸化物塗布表

表 3.6.2 リアクターの運転条件

| K-medium              | RUN 1  | RUN 2  | RUN 3  |
|-----------------------|--|--|--|
| MnO <sub>2</sub> 担体塗布 |  無し |  塗布 |  塗布 |
| Mn(II) 供給濃度           | 5 mg L <sup>-1</sup>   | 5→10 mg L <sup>-1</sup>  | 0→10 mg L <sup>-1</sup>  |
| 供給 COD 濃度             | 50 mgCOD L <sup>-1</sup> (Peptone, Yeast Extract)                                    |  |  |
| pH                    | 7.8 (リン酸バッファー (0.2mMP) により調整)  |  |  |
| 担体全体積                 | 0.16 L   |  |  |
| HRT & GRT             | 4.3 h, 0.3 h   |  |  |

### b リアクター運転方法

基質を 0.9 L/day (水理的滞留時間 HRT では 4.25 時間)の流量で一定流量にて供給可能なポンプを使用し供給した。また同様のポンプを用いて、リアクターカラム内に 0.5 L/min の速度で空気を供給した。

有機物濃度が 50 mg/L、Mn(II)濃度が 5 mg/L となるように 10 L の基質をポリタンク内に作成した(表 3.6.3)。基質には純水を使用し、微生物の代謝活動に必須な微量元素を添加して供給した。さらに、リン源としてまたは pH 緩衝液としてリン酸バッファー液(リン最終濃度 0.2 mM)を溶解させた。これにより基質の pH を 7.8 に保持させた。上記の基質を溶解させた水溶液は全て窒素ガスによる曝気を行って 40 分を行うことで、水溶液中に含まれる溶存酸素による基質性状の変化を防いだ。

RUN 1 の運転条件並びに基質組成は一貫して変更を行わなかった。RUN 2 において Mn 除去性能に応じて供給 Mn(II)濃度を変更した。RUN 3 は運転 90 日以降 Mn(II)添加を行い Mn 除去性能のスタートアップの再現性を確認した。

表 3.6.3 K-medium 基質組成

|  |                    |
|--|--------------------|
| <b>Organic Substrates</b>                          | mg L <sup>-1</sup> |
| Yeast extract                                      | 40                 |
| Peptone  | 10                 |
| <b>Ferrum Sol.</b>                                 | mg L <sup>-1</sup> |
| Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O  | 0.1                |
| <b>Trace Element</b>                               | mg L <sup>-1</sup> |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                    | 29.9               |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O | 223.23             |
| CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O                | 0.05               |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 0.2                |
| CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O                | 0.0025             |
| NaSeO <sub>4</sub>                                 | 0.005              |
| NiCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O                | 0.019              |
| CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O                | 0.024              |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O | 0.022              |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                     | 0.001              |
| ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 0.043              |





図 3.6.5 リアクター写真(左から RUN1、RUN2、RUN3)

#### c リアクター運転方法

両実験系の流入水並びに流出水の水質を経時的に測定した。測定項目を pH、有機物(COD)濃度、Mn(II)濃度として観察を行った。pH は Benchtop multi-parameter waters quality meter(HORIBA 社製)、COD 濃度並びに Mn(II)濃度は吸光光度式水質分析器 DR-2800(HACH 社製)にて定量した。リアクター流入水並びに流出水から採取したサンプルは全て 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルター(ADVANTEC 社製)を用いて濾過処理を施した。

#### d 微生物群集解析

リアクターより採取した微生物サンプルは適当な処理を施して培養サンプルとして保存した。このサンプルは DNA 抽出用サンプルならびに顕微鏡観察用サンプルに分けてそれぞれ処理を施した。前者はエタノール PBS 溶液に培養サンプル中の液相を置換し-20 $^{\circ}\text{C}$ で冷蔵保存した。後者では細胞の固定を行うため、パラホルムアルデヒド(PFA)での浸漬処理を施した後、エタノール PBS 溶液にて液相を置換し-20 $^{\circ}\text{C}$ で冷蔵保存した。

DNA 抽出用サンプルを FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit For Soil(Qbiogene 社製)を用いて行った。その後、2 ng/L に調整した抽出 DNA 精製液を DNA Template として以下の組成で PCR 反応液を作成した。それぞれのリアクタ

一からバイオマスを回収して、微生物群集解析を行った。RUN 1、RUN 2からは運転 43 日目、RUN 3からは運転 43 日目と 74 日目にバイオマスを回収した。以降、それぞれのサンプルを RUN 3.1、RUN 3.2 とする。

抽出 DNA 増幅プライマーとして全細菌対象プライマーである 341F-805R を使用した。PCR にて 95°C/3 min の後、95°C/30sec、55°C/30sec、72°C/30sec の PCR 反応を 35 サイクル行い、最後に伸長反応を 72°C/5min で行った。

上記条件で PCR を行い、PCR 精製液を AMPure XP による精製を行った。これより獲得した PCR 精製産物は濃度測定、電気泳動、クローニング、冷凍保存が可能となる。増幅の有無を確認するために電気泳動実験を行った。これは電気泳動装置(Mupix-ex: Advance 社製)を使用した。

リアクター培養サンプルから上記手法にて得た DNA 抽出液を全真菌対象プライマー(EF4-EF3 & EF4-fung5)ならびに全古細菌対象プライマー(arc109F-915R)を用いて PCR を行った。EF4-EF3 & EF4-fung5 は 94°C/3 min の後、94°C/90sec、48°C/1 min、2°C/3 min の PCR 反応を 40 サイクル行い、最後に伸長反応を 72°C/5min で行った。arc109F-915R は 95°C/2 min の後、95°C/30sec、52°C/30sec、72°C/90 sec の PCR 反応を 25 サイクル行い、最後に伸長反応を 72°C/3min で行った。

適当な処理を施した DNA 増幅サンプル(全細菌対象プライマー341F-805R で PCR 済)を北海道システム・サイエンス株式会社に次世代シーケンサーIllumina MiSeq (Illumina 社製)を用いた微生物群集解析を外注した。得られた塩基配列情報をもとに、微生物群集解析が行われた。解析は概して、得られた配列データから遺伝子情報を OTU 抽出し 16S rDNA データベース上に登録された系統種ごとの遺伝子情報に 97%の相同性を有する OTU ごとに分類分けを行った。このデータベースは、QUIIME Resource サイトよりダウンロードされた Greengenes データベースの配列情報および分類情報を使用した。

## (7) 実二次電池廃液からの金属回収

### 1) 研究背景と目的

人工模擬排水からの生物的 Mn(II)除去について、様々な知見を得る事が出来た。実廃二次電池溶解処理液を用いて実際に最終目標である金属回収、マンガン酸化がこれまでの実験の通りに実証できるかを実施する。数種類のリチウム電池を解体し、強酸の液に溶かしたリチウム、ニッケル、コバルト、マンガンを含む溶液を用いて実験を行う(図 3.7.1)。この溶液を希釈した後、マンガン酸化細菌を培養した DHS リアクターに供給する。

### 2) 仮説

これまでの研究成果をもとに実廃二次電池溶解処理液からの金属回収を実証する。(1)Mn 除去の早期スタートアップ、(2)高速 Mn 除去実証 (3)ニッケル・コバルト回収をについて同時に達成する。

### 3) 実験方法

#### a 実験装置

リアクターには透明アクリル製円筒形カラム(内径 50 mm、外径 60 mm、体積約 1.6 L)の中に、微生物保持担体として 2 cm 角のスポンジ 20 個(全容積 0.16 L)を直列に吊るした DHS リアクターを使用した。リアクターで培養を行う微生物の植種源として、東広島浄化センター(東広島市西条町田口 100-1)の活性汚泥反応槽より採取した活性汚泥を使用した。

リアクターには  $\text{MnO}_2$ (キシダ化学 010-47295、1 級、500 g)をリアクターに塗布した。 $\text{MnO}_2$  への  $\text{Mn(II)}$  への吸着は、1 L の超純水に  $\text{MnO}_2$  を 100 g を添加し攪拌した完全混合液を使用する。完全混合液(1 L)に  $\text{Mn(II)}$  を 100 mg 添加させ、10 分程度攪拌させる。上記の算出量よりも多めに  $\text{Mn(II)}$  を添加させた理由は完全に  $\text{MnO}_2$  への  $\text{Mn(II)}$  吸着を完了させるためである。攪拌後、リアクター運転で採用する  $\text{Mn(II)}$  供給濃度 5 mg/L となるように作成した  $\text{Mn(II)}$  水溶液 1 L に完全混合液から遠心分離処理によって分離した  $\text{MnO}_2$  100 g を添加し、10 分程度攪拌した。これにより  $\text{Mn(II)}$  濃度変化に伴う  $\text{Mn(II)}$  の漏出ならびに活性汚泥添加に際する  $\text{Mn(II)}$  の活性阻害等の影響を未然に防ぐものとした。 $\text{Mn(II)}$  水溶液(5 mg $\text{Mn(II)}$ /L)への添加作業を 3 度繰り返し、遠心分離処理を行い  $\text{MnO}_2$  100 g を採取した。 $\text{Mn(II)}$  の吸着完了後の  $\text{MnO}_2$  を活性汚泥(1 L)に 100 g/L の濃度になるように添加した。攪拌により完全混合となった状態でスポンジ担体を 1 個ずつスポンジの空隙全てが活性汚泥で満たされるように手で揉むようにして植種した。

数種類の二次電池を解体し 硝酸と塩酸で溶解させ、の溶液から固形物を回収した。その後、固形物に濃硫酸を加え熱処理した後に溶液を回収し、硝酸と塩酸で処理した液と混合した。回収された溶解液を 10000 倍希釈した液に HEPES バッファー及び K-medium を供給負荷が 0.5 gCOD/m<sup>3</sup>/d になるように加えた液を本装置の基質とした。基質の供給速度は最初 HRT4.2 時間に設定し、マンガンが完全に除去される毎に供給負荷を上げた。

## b 測定項目及び測定方法

Mn 酸化性能および金属除去速度はリアクター流入・流出時の溶存金属濃度は発光分光分析装置(ICPE9000:島津社製)を用いて測定した。流出・流入水の pH を Horiba Benchtop multi-parameter waters quality meter を用いて測定した。

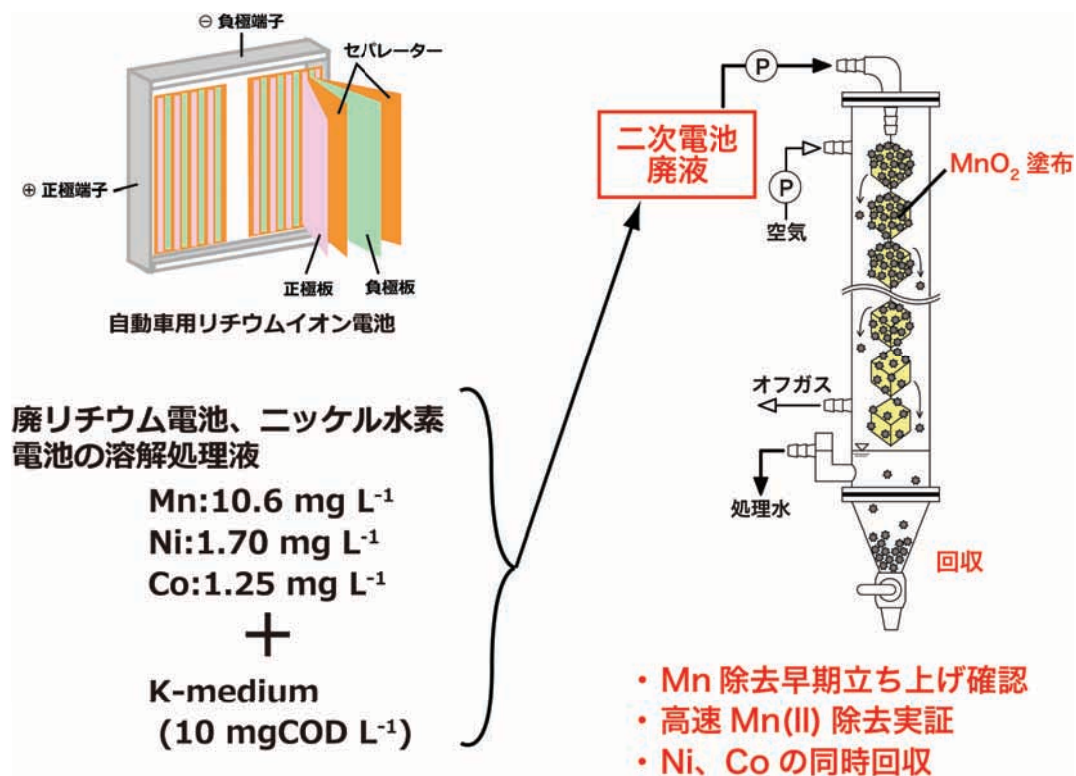


図 3.7.1 実二次電池廃液からの金属回収実験概要