

Mn(II)酸化活性バイオマンガン酸化物による海水からの希少金属回収

谷 幸則¹, 宮田直之²

¹ 静岡県立大学食品栄養科学部環境生命科学科, ² 秋田県立大学生物資源科学部生物環境科学科

概要

Mn(II)酸化真菌 *Acremonium strictum* KR21-2 が形成するバイオ Mn 酸化物 (BMO) は, Mn(II)酸化酵素活性を保持し, 連続的に Mn^{2+} を酸化除去できる。本研究では, Mn(II)酸化活性 BMO を用いて人工海水における金属イオン (Mn(II), Co(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II)) 除去回収を評価した。また, BMO による Cr(III) の収着能と Cr(VI) への酸化能について調べた。A. *strictum* KR21-2 により新規形成させた BMO を Mn^{2+} を含む 3.6% 人工海水 (100 mM HEPES, pH 7.0) で 24 時間毎 3 回処理したところ, 各回 24 時間後には添加した溶存 Mn^{2+} の 90% 以上が溶液中から除去され, 人工海水においても BMO の Mn(II)酸化能による溶存 Mn(II)の除去回収が可能であった。しかしながら, 人工海水中での繰り返し Mn(II)処理における Mn(II)除去速度は, 非人工海水系と比較して低下した。NaCl 溶液, NaNO₃ 溶液, Na₂SO₄ 溶液中での BMO による Mn(II)処理実験から, NaCl 溶液系のみでその濃度に依存した Mn(II)酸化速度の低下が認められ, 人工海水中の Cl⁻ が BMO の Mn(II)酸化活性の低下に関与していることが示唆された。新規形成 BMO を用いた人工海水中における Mn(II), Co(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II)の混合溶液からの除去回収試験から, Mn(II)がほぼ全量 (>99%), Co(II), Zn(II), Ni(II)が 85% 以上の効率で除去回収することができた。一方, 人工海水系での Cd(II)の除去回収率は 55.6% と小さく, 陰イオン型錯体 ([CdCl₃]⁻ 及び [CdCl₄]²⁻) の形成が原因であると推察された。酵素活性を失活させた場合, 人工海水系, 非人工海水系ともに Mn(II)の酸化除去は進行せず, また, Cd(II), Zn(II), Ni(II)に対する除去能が大幅に低下し, BMO に保持された Mn(II)酸化活性がこれらの金属イオンの効率的な除去回収に重要であることが示された。また, BMO は, Mn(II)再酸化によって Cr(III)を効率よく Cr(VI)へと酸化できる一方, Mn(II)再酸化が起こらない条件では, Cr(III)を多核錯体として吸着することが明らかとなった。

1. 研究目的

世界的な産業発展に伴う需要拡大からさまざまな元素類が大量に利用されている⁽¹⁾。これらの元素類は, 不適切にリサイクルされている場合⁽²⁾も多く, 環境中への有害元素類の負荷⁽³⁾は, 河川や海洋における水資源の利用を通じて重篤な健康問題を引き起こす可能性が指摘^(3,4)されている。国連開発計画 (UNIP) が持続可能な開発目標 (SDGs) として掲げた 17 の目標のうち「6. 安全な水とトイレを世界中に」「14. 海の豊かさを守ろう」では, 水の効率利用化, 廃水処理, リサイクル, 海洋の汚染防止等が挙げられており⁽⁵⁾, 水の有効利用を持続可能にするために環境

負荷の少ない低コスト・低エネルギー型の水処理方法が必要とされている。しかしながら, 現状では, 海水などの電解質濃度が高い媒体に対する有害元素処理や有用元素資源回収は, 高コスト・高エネルギーを必要としている。

海洋環境に注目すると, 深海マンガングジュール・マンガングラスト等の Mn 酸化物相に, Ni, Co, Zn などの希少金属が高濃度で濃縮されている^(6,7)。つまり, Mn 酸化物相は, 海水中においても, これらの希少金属への親和性が極めて高いことを意味している。河川や湖沼など自然環境中に存在する Mn 酸化物の大部分は, 細菌や真菌を含む Mn 酸化微生物の触媒作用 (酵素反応) を介して形成され

(8,9), 特にバイオジェニック Mn 酸化物 (Biogenic Manganese oxides: BMO, 以下バイオ Mn 酸化物, BMO と表記)と呼ばれ, その反応性の高さから水処理等への応用が期待されている(9,10)。我々は, Mn 酸化真菌 *Acremonium strictum* KR21-2 株(以下 KR21-2 株と表記)を単離し, 形成される BMO には Mn(II)酸化酵素が安定的に保持され, その活性により溶存 Mn^{2+} を連続的に酸化できること(11), また, BMO が Co(II), Zn(II), Ni(II)イオンに対し, 高い吸着親和性を有することを明らかにしてきた(9,11-16)。本研究は, 海水からの重金属除去・レアメタル回収方法の確立を目標とし, Mn(II)酸化真菌 *A. strictum* KR21-2 株が形成した酵素活性 BMO の人工海中における Mn(II)酸化能と重金属イオン (Co(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II)) 除去回収能の評価を目的とした。

さらに本研究では, BMO による Cr(III/VI)の除去処理, 変換処理の基礎知見を得るために, BMO による Cr(III)処理実験をおこなった。環境中において Mn 酸化物は, Cr(III)を Cr(VI)へと酸化できる唯一の酸化剤であるため, 環境中の Cr の動態を決定する因子となる。しかし, 化学合成 MnO_2 に比較して BMO の高い Cr(III)酸化効率を示す反応機構は, 未解明なままである。そこで BMO による Cr(III)の酸化および吸着に対する Mn(II)酸化酵素活性の影響について調べた。

2. 研究方法

2.1 真菌由来 BMO の調製(11,17,18)

Mn(II)酸化真菌 *Acremonium strictum* KR21-2 を本研究に用いた。A. *strictum* KR21-2 による BMO の調製は, 既報に従った。形成させた菌体と BMO の混合物を, 100 μ m ナイロンセルストレーナー (BD Falcon) で回収し, Milli-Q 水で洗浄した後, 実験に用いた。

2.2 新規形成 BMO による人工海水からの溶存態 Mn^{2+} 酸化回収

新規調製した BMO を 0.5 mM $MnSO_4$ を含む 0.45%, 0.9%, 1.8%, 3.6% ダイゴ人工海水 50 mL (100 mM HEPES pH7.0) に入れ, 25°C で 24 時間往復振とう (NR-10, TAITEC) (106 strokes/min) し, 経時的 (0, 1, 2, 4, 6, 24 h) に上清を採取した。この処理を 3 回行い, 計 72 時間継続した。0.2 mM, 1.0 mM の $MnSO_4$ 濃度でも同様の実験を行った。採取したすべての上清は 2% 硝酸で希釈し, 溶存

Mn^{2+} 濃度を誘導結合プラズマ原子発光分光分析法 (ICP-AES) (730-ES, Varian) を用いて測定した。対照実験として, ダイゴ人工海水を含まない 100 mM HEPES 溶液 (pH7.0) を用いて同様に実験を行った。また, NaCl 水溶液 (およそ 44 mM, 89 mM, 178 mM, 355 mM), $NaNO_3$ 水溶液 (355 mM in 100 mM HEPES pH7.0) および Na_2SO_4 水溶液 (178 mM in 100 mM HEPES pH7.0) を $MnSO_4$ 濃度が 0.5 mM となるよう調製し, 人口海水系に対する比較実験を行った。 Mn^{2+} 連続処理後の BMO 相における吸着態 Mn(II)および酸化物態 Mn(III,IV)を測定するために, 硫酸銅(II)水溶液 (イオン交換態 Mn^{2+}) と塩酸ヒドロキシルアミン水溶液 (酸化物態 Mn) おける二段階抽出を既報(11,19,20)に従っておこなった。

2.3 人工海水における BMO による金属イオン (Co(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II)) の除去回収

新規形成した BMO (Mn として 1 mM) を 0.02 mM $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.02 mM $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0.02 mM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ および 0.02 mM $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ を含む 3.6% ダイゴ人工海水 (100 mM HEPES pH7.0) に入れ, 25°C で 24 時間往復振とう (NR-10, TAITEC) (106 strokes/min) し, 経時的 (0, 1, 2, 5, 24 h) に上清を採取した。この処理を 3 回繰り返し, 計 72 時間継続した。処理後に二段階抽出を行い, 採取したすべての上清は 2% 硝酸で希釈し, 溶存 Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} 濃度を誘導結合プラズマ原子発光分光分析法 (ICP-AES) (730-ES, Varian) を用いて測定した。対照実験として, 非人口海水系 (100 mM HEPES 溶液, pH7.0) での実験, また, 形成した BMO を 85°C で 2 時間加熱して Mn(II)酸化酵素を失活させた酵素失活 BMO を用いた実験をおこなった。また, 溶存 Mn^{2+} 共存下におけるこれらのイオンの除去回収率を調べるために, 0.2 mM $MnSO_4$ を共存させた系での実験をおこなった。

2.4 BMO による Cr(III)の吸着と Cr(IV)への酸化変換

新規形成した BMO (Mn として 1 mM) は, 0.5 mM $Cr(III)(NO_3)_3$ を含む 50 mL の 100 mM MES 緩衝溶液中 (pH 6.0) に添加し, 振とうした。上清を経時的に採取し, 溶存総 Cr 濃度および溶存総 Mn 濃度は ICP-AES, 溶存 Cr(VI)濃度はジフェニルカルバジド吸光光度法で測定した。大気平衡溶液 (大気平衡系) 及び窒素ガスパージによる脱酸素溶液 (脱酸素系) (11,13) を用いて, Mn(II)酵素活性

の影響を評価した。また、加熱して BMO 中の Mn(II)酸化酵素を失活させた条件(加熱系, 大気平衡条件)についても同様な実験を行った。

3. 研究結果と考察

3.1 人口海水中における BMO の Mn(II)酸化能

A. *strictum* KR21-2 によって新規に形成させた BMO (Mnとして 1 mM)を, 大気平衡条件下, 0.45 ~ 3.6%人工海水溶液(100 mM HEPES pH 7.0)または人工海水を含まない 100 mM HEPES 溶液(pH 7.0, 非人工海水系と表記)を含む 0.5 mM Mn²⁺水溶液で 3 回繰り返し処理し, 溶存 Mn²⁺濃度の変化を経時的に測定した。対照試験である非人工海水系では, 1 回目処理において 24 時間ではほぼ全量(99.8%)の溶存 Mn²⁺が減少した。新規な溶液に変えながら, 繰り返し処理しても, 各処理開始 6 時間までに添加した Mn²⁺の 90%以上が減少した(図 1A)。3 回処理終了後, BMO を含む固体相を回収し, 二段階抽出したところ, 固体相 Mn は, 15.2%のイオン交換態と 84.8 ± 0.8%の還元抽出態(酸化物態)からなることが明らかとなった。実際の沿岸海水と同等な塩分濃度である 3.6%の人工海水系における 24 時間毎の繰り返し処理での溶存 Mn²⁺減少率(初期濃度 0.5 mM)は, 1 回目~3 回目でそれぞれ 98.3%, 93.2%, 91.3%であり, 最終的な積算 Mn 回収率は, 94.3%であった(図 1B)。3 回目処理後に回収した二段階抽出の結果から, 固体相 Mn の 87.1 ± 1.8%が酸化物態 Mn として検出され, 3.6%人工海水溶液でも, A. *strictum* KR21-2 由来の BMO による Mn²⁺の酸化による不溶化は進行することが示された。0.45%, 0.9%, 1.8%人工海水溶液(100 mM HEPES pH 7.0)中で 0.5 mM Mn²⁺と反応させた場合, 24 時間毎の溶存 Mn²⁺減少率は 97%以上であり, 積算 Mn 回収率は, それぞれ 98.0%, 98.5%, 97.3%と高い値を維持した(図 1B)。非海水系および人口海水系における溶存 Mn 濃度の減少速度に注目する(図 1A, 1B)と, 1 回目はすべての系で素早い Mn²⁺の減少速度が認められたが, 2 回目処理, 3 回目処理において, 人口海水濃度に依存した Mn²⁺減少速度の低下が認められた。2 回目処理の 6 時間後における溶存 Mn²⁺減少率は, 0.45%, 0.9%, 1.8%, 3.6%人工海水濃度でそれぞれ 89.6%, 66.9%, 66.2%, 41.4%であり, 人口海水濃度が高まるほど 6 時間後における溶存 Mn²⁺減少率が低く, Mn²⁺減少速度(つま

り主として Mn²⁺酸化速度)がより減少した(図 1A, 1B)。一方, 3 回目処理の 6 時間後では, 低濃度人口海水濃度でも溶存 Mn²⁺減少率が低く, すべての人口海水濃度で同様な溶存 Mn²⁺減少速度を示した(図 1B)。非人口海水系でも, 3 回目処理における溶存 Mn²⁺減少速度は, 若干低下する傾向にあるが, 人口海水系は明らかに Mn²⁺減少速度の低下の影響を受けていることが明らかとなった。

3.2 BMO の Mn(II)酸化に影響を及ぼす海水成分

人工海水の主成分は塩化ナトリウム(NaCl, 約 60%)である。A. *strictum* KR21-2 由来 BMO の Mn²⁺酸化速度に対する NaCl の影響を調べるため, 人工海水濃度 0.45, 0.9, 1.8, 3.6%に含まれる NaCl 濃度に対応させ, 44, 89, 178, 355 mM NaCl 水溶液(100 mM HEPES buffer, pH 7.0)を調製した。これを用いて, 新規形成 BMO による初期濃度 0.5 mM Mn²⁺の繰り返し処理実験を行った。図 1C に大気平衡条件下で新規形成 BMO(1 mM Mn)を 44, 89, 178, 355 mM NaCl 溶液(100 mM HEPES pH7.0)中で 0.5 mM Mn²⁺と反応させたときの溶存 Mn²⁺濃度の減少を示す。人工海水系での実験(図 1B)同様, 処理 1 回目では NaCl 濃度による溶存 Mn²⁺減少速度に差は認められなかった(図 1C)。一方, 処理 2 回目では, NaCl 濃度が高くなるほど Mn(II)酸化速度が減少し, 特に, 355 mM NaCl 水溶液において 24 時間後の Mn(II)減少率は 80.2%にとどまった(図 1C)。この値は, 対応する人工海水(3.6%)よりも Mn(II)酸化能が低下したことを示唆した。3 回目処理では, すべての NaCl 濃度で Mn²⁺濃度減少速度が 2 回目減少速度よりも減少した。355 mM NaCl 水溶液中では, 3 回目処理 24 時間後の Mn(II)減少率は 65.5%まで低下し, その他の濃度でも有意な Mn(II)酸化能の低下が認められた。

次に, NaCl の Na⁺か Cl⁻のどちらのイオンによる影響かを調べるために, Na⁺イオン濃度を一定として NaCl, 硝酸ナトリウム(NaNO₃), 硫酸ナトリウム(Na₂SO₄)溶液を調製し, Mn(II)繰り返し処理実験を行った。NaNO₃, Na₂SO₄ 溶液中においては, 処理 1 回目から 3 回目までで非人工海水系とほぼ同等な Mn(II)酸化速度を示した(図 1D)。これらの結果から, 人口海水成分中の Cl⁻は, 少なくとも新規形成 BMO の Mn(II)酸化速度を低下させる効果があることが明らかとなった。一方, NO₃⁻や SO₄²⁻は, 比較的高濃度

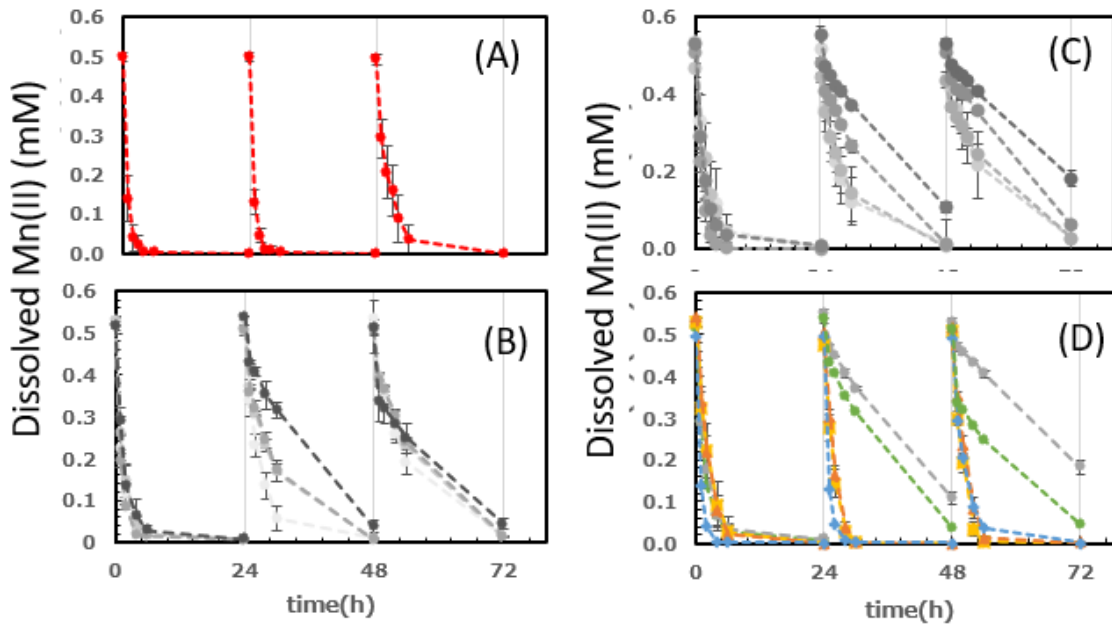


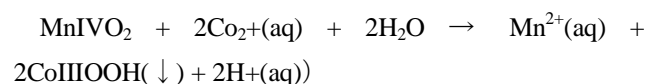
図1 新規形成 BMO(Mnとして 1 mM)による 0.5 mM Mn²⁺繰り返し処理実験(100 mM HEPES pH 7.0, 大気平衡条件)における溶存 Mn(II)濃度の経時変化。(A)100 mM HEPES(pH 7.0)のみ, (B)人工海水溶液(+100 mM HEPES, pH 7.0) (人工海水濃度は 0.45, 0.90, 1.8, 3.6%。凡例の色が濃いほど, 人工海水濃度が高い), (C)NaCl(+100 mM HEPES, pH 7.0)(NaCl 濃度は 44, 89, 178, 355 mM。凡例の色が濃いほど, NaCl 濃度が高い), (D)種々の電解質溶液(灰色 355 mM NaCl, 黄緑 3.6% 人口海水, 黄色 355 mM NaNO₃, 橙色 178 mM Na₂SO₄, 水色 コントロール(すべての系で 100 mM HEPES (pH 7.0)を含む)。

でも Mn(II)酸化速度へは, ほとんど影響しないことが明らかとなった。

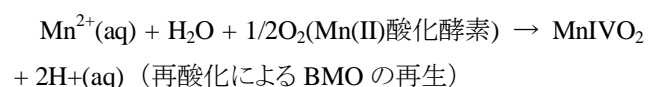
3.2 人工海水中における BMO による金属イオン除去

人工海水系での重金属イオン除去効率の比較対照として, 非人工海水系における Co(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II) 混合溶液からの除去効率を繰り返し処理で調べた結果, Co(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II)の溶存濃度は, すべての処理回数で減少した(図未掲載)。その積算除去効率は, それぞれ 99.2%, 90.5%, 86.9%, 86.3%であり, すべてのイオンの対して高い除去効率を示した。この時, 新規形成 BMO (Mn(II)酸化活性を保持した BMO)からの Mn の溶出は検出されなかった。一方, 加熱処理 BMO (Mn(II)酸化活性を不活化 BMO)の場合, Co(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II)の積算除去率は, それぞれ 92.8%, 57.8%, 51.0%, 42.3%であり, 新規形成 BMO に比較して低い回収効率となり, また, 有意な溶解 Mn が検出された。これらの結果か

ら, 非人工海水系において, BMO への Co(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II)イオンの除去効率に, BMO 中の Mn(II)酸化活性が重要な役割を果たしていることが示唆された。3 回処理終了後の固体相に収着された重金属イオンの二段階抽出結果から, Co(II)は還元抽出態の割合が高く, これは Co(II)から Co(III)への酸化反応が Co 収着の主要因であるため⁽¹³⁾と考えられる。BMOによる Co²⁺の酸化は, 水に不溶性 CoIIIIOOH (heterogenite)を形成すること⁽¹³⁾が知られている。



BMO 中の Mn(II)酸化酵素が活性を有する場合, Co²⁺の酸化により還元溶出した Mn²⁺は, 速やかに再酸化される。



この再酸化反応の進行がすすむため、酵素活性 BMO では有意な溶存 Mn(II)が検出されない⁽¹³⁾。また、還元溶解した Mn(II)は、BMO 表面上で重金属イオンとの吸着競合を引き起こすため、加熱処理 BMO 上への Cd(II), Zn(II), Ni(II)の収着量が新規形成 BMO よりも少ない⁽¹⁴⁻¹⁶⁾と考えられた。

3.6%人工海水溶液中における新規形成 BMO の Co(II)除去効率を見ると、繰り返し処理実験を通して高い除去率を維持した(図 2A)。二段階抽出結果から、3.6%人工海水系中での繰り返し処理後も、Co(II)は、主として還元抽出態として BMO 固体相に収着しており、不溶性の Co(II)OH₂として存在していると考えられた⁽¹³⁾。人工海水系中でも、この Co(II)の酸化反応による Mn(II)の還元溶出は見かけ上検出されず(図 2A)、人工海水系中でも Mn(II)の再酸化が進行することが示唆された。Zn(II)及び Ni(II)の除去効率(積算除去率 85.4%と 85.3%)は、非人工海水系とほぼ同じ(それぞれ 86.9%と 86.3%, 図 2A)で、3.6%人工海水系中でもこれらのイオンに対する高い除去回収率が示された。一方、Cd(II)についての積算除去率は、30.4 ± 2.0%であり(図 2A)、非人工海水系(90.5 ± 4.2%)と比較して極めて小さいことが明らかとなった。Koschinsky and Halbach⁽²¹⁾によると、海水中で陽イオンの MnO₂相への吸着濃縮は、海水中での化学形態(特に電荷)によって決定されるとされており、陰イオン型錯体の形態を有するイオンは、負電荷を有する MnO₂相へは吸着されにくいと考えられている。3.6%人工海水系溶液の塩化物イオン総濃度 0.474 M における、各金属イオンの塩化物錯体の割合(%)を塩化物イオンとの錯形成定数により算出した⁽²²⁾。Cd(II)の場合は、[Cd²⁺] = 0.00002%, [CdCl⁺] = 0.0003%, [CdCl₂] = 0.24%, [CdCl₃⁻] = 75.8% (主成分), [CdCl₄²⁻] = 24.0% (副成分)となり、人工海水の Cl⁻濃度では、Cd(II)は、[CdCl₃⁻]及び[CdCl₄²⁻]の陰イオンとして大部分が存在する。同様に Co(II), Zn(II), Ni(II), Mn(II)でそれぞれの錯体の割合算出すると、Co では、[Co²⁺] = 67.84% (主成分), [CoCl⁺] = 32.16% (副成分), [CoCl₂] = 0%, [CoCl₃⁻] = 0%, [CoCl₄²⁻] = 0%, Zn(II)では、[Zn²⁺] = 67.84% (主成分), [ZnCl⁺] = 32.16% (副成分), [ZnCl₂] = 0%, [ZnCl₃⁻] = 0%, [ZnCl₄²⁻] = 0%, Ni(II)では、[Ni²⁺] = 55.25% (主成分), [NiCl⁺] = 16.91% (副成分), [NiCl₂] = 0%, [NiCl₃⁻] = 1.65%, [NiCl₄²⁻] = 26.18% (副成分)で

あった。さらに、Mn(II)では、[Mn²⁺] = 76.98% (主成分), [MnCl⁺] = 23.02% (副成分), [MnCl₂] = 0%, [MnCl₃⁻] = 0%, [MnCl₄²⁻] = 0%となる。Co(II)以外のイオンでは、[M²⁺]が主成分、[MCl⁺]が副成分(Ni では、[NiCl₄²⁻]も副成分)となり、3.6%人工海水系溶液中でも、陽イオン形態が主である。一方、人工海水系中で BMO への吸着率が大幅に低下した Cd(II)は、陽イオン形態での存在量は極めて少なく、BMO 表面上の Mn(IV)結晶欠陥などの負電荷を帯びている結合サイトへの収着は Co(II), Zn(II), Ni(II)と比較して極めて不利になると考えられた。加熱処理 BMO の場合、還元溶解 Mn(II)及び人工海水成分の存在により、Cd(II)は第一回目からほとんど収着せず、吸着競合の影響を大きく受けていると考えた(図 2B)。Zn(II)や Ni(II)の除去効率も、新規形成 BMO に比較して低く(図 2B)、還元溶解 Mn(II)の吸着競合の影響を受けていると考えられた。これらの結果から、人工海水系の高い金属イオン除去効率には、Mn 酸化酵素活性が重要な役割を果たすことが示された。

3.3 Mn(II)が共存する人工海水系における Co(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II)混合溶液からの除去効率

大気平衡条件下で新規形成 BMO(1 mM Mn)を 0.2 mM MnSO₄, 0.02 mM CoCl₂·6H₂O, 0.02 mM Cd(NO₃)₂·4H₂O, 0.02 mM ZnSO₄·7H₂O および 0.02 mM NiCl₂·6H₂O を含む非人工海水溶液及び 3.6%人工海水溶液(100 mM HEPES pH7.0)で 24 時間 3 回処理した場合、非人工海水溶液、人工海水溶液ともに 3 回の処理で 99%以上の Mn₂₊が減少した(図 3A に人工海水系中のデータを掲載。非人工海水系中のデータは未掲載)。二段階抽出結果から、両条件ともに Mn の酸化による不溶化が、溶存 Mn 濃度減少の主たる原因であることが明らかとなった。一方、加熱処理 BMO(1 mM Mn)の場合、3.6%人工海水溶液、非人工海水溶液ともに Mn²⁺濃度はほとんど減少せず(図 3B)、算出された積算 Mn(II)減少率はそれぞれ 6.8%, 14.7%であった。特に人工海水系では、繰り返し処理後に測定した溶存 Mn²⁺濃度が初期添加 Mn²⁺濃度よりも高く検出され(図 3B)、BMO から Mn²⁺が溶出したことを意味した。これは、人工海水系中のイオン成分によるイオン交換反応によって吸着 Mn(II)(Mn(II)酸化酵素不活性化により再酸化されない)が溶出したと推察された。これらの結果から、BMO の Mn(II)酸化酵素活性により、人工海水系系の金属

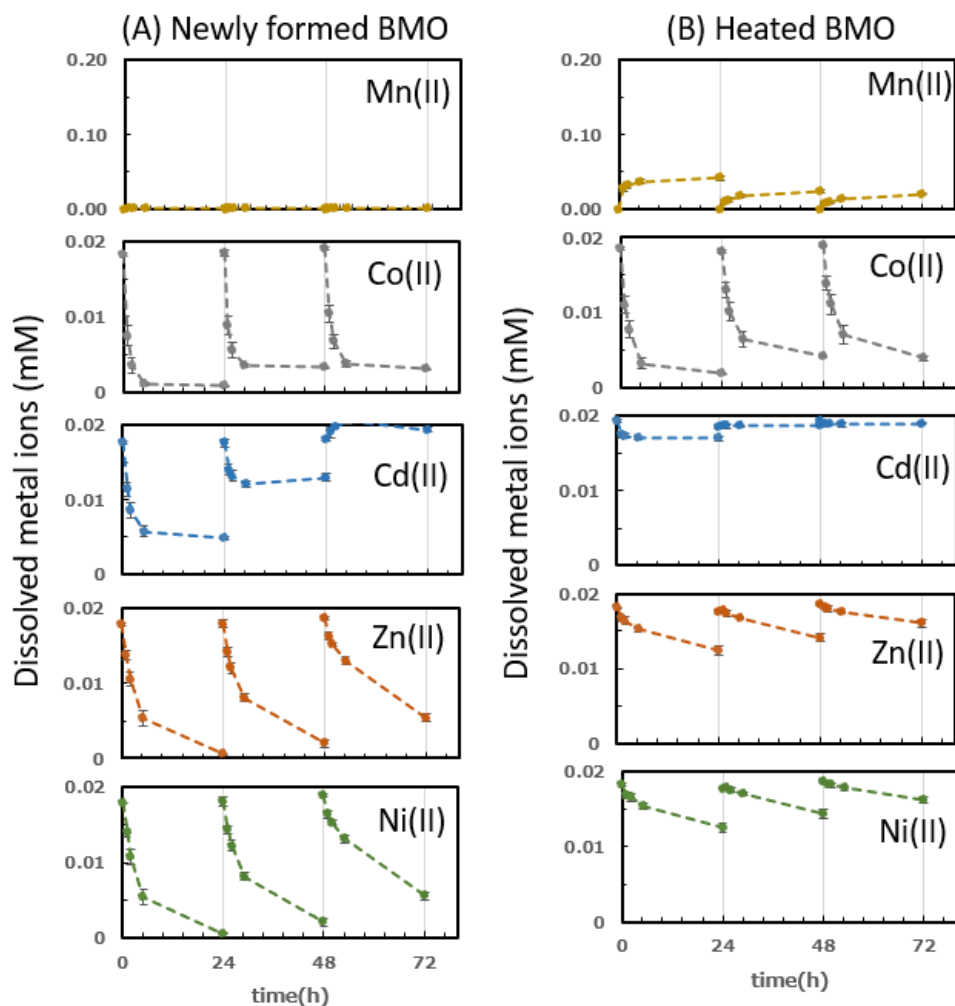


図 2 (A)新規形成 BMO 及び(B)加熱 BMO による 3.6% 人工海水溶液 (100 mM HEPES pH 7.0, 大気平衡条件, BMO 濃度は Mn として 1 mM) 中における Co(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II)同時処理実験 (3 回繰り返す) における溶存金属イオン濃度の経時変化。

イオン混合溶液においても, Mn(II)の定量的な除去回収に重要な役割を果たすことが示された。新規 BMO による Co(II)積算除去率については, 非人工海水系, 人工海水系ともに 90%以上 (図 3A, 3B)であった。二段階抽出結果から Co(II)は還元抽出態が主であり, Co(III)への酸化変換による不溶化が主たる収着反応であると考えられた。加熱処理 BMO の Co(II)の積算除去率は, 3.6%人工海水溶液, 非人工海水系でそれぞれ $79.9 \pm 3.2\%$, $88.0 \pm 3.4\%$ であった。この値は, 新規形成 BMO よりも低く, Co(II)の除去回収にも Mn(II)酵素活性が影響していることが示された。しかしながら, Mn(II)酸化活性不活化後も, Co(II)の積算回収率は他の金属イオンよりも高く, BMO 相による化学

的 (Mn(II)酸化酵素活性が寄与しない) Co(III)への酸化反応と不溶化による除去回収が容易に進行することが示された。Cd(II), Zn(II), Ni(II)においては, 3.6%人工海水溶液での積算除去率 (積算値) で 55.6%, 85.1%, 84.5%であり (図 3A), Zn(II), Ni(II)については高い除去回収率を維持した。しかしながら, これらの値は, 非人口海水系に比較してそれぞれ 43.9%, 13.8%, 13.1%減少しており, Mn(II)共存系においても, 特に Cd(II)が人口海水系で回収率が大きく減少する結果が得られた。

加熱処理 BMO を用いた場合, 3.6%人工海水溶液における積算除去率はそれぞれ 5.3%, 11.7%, 11.7%であり, 新規形成 BMO に比較して, これらのイオンの除去回収率

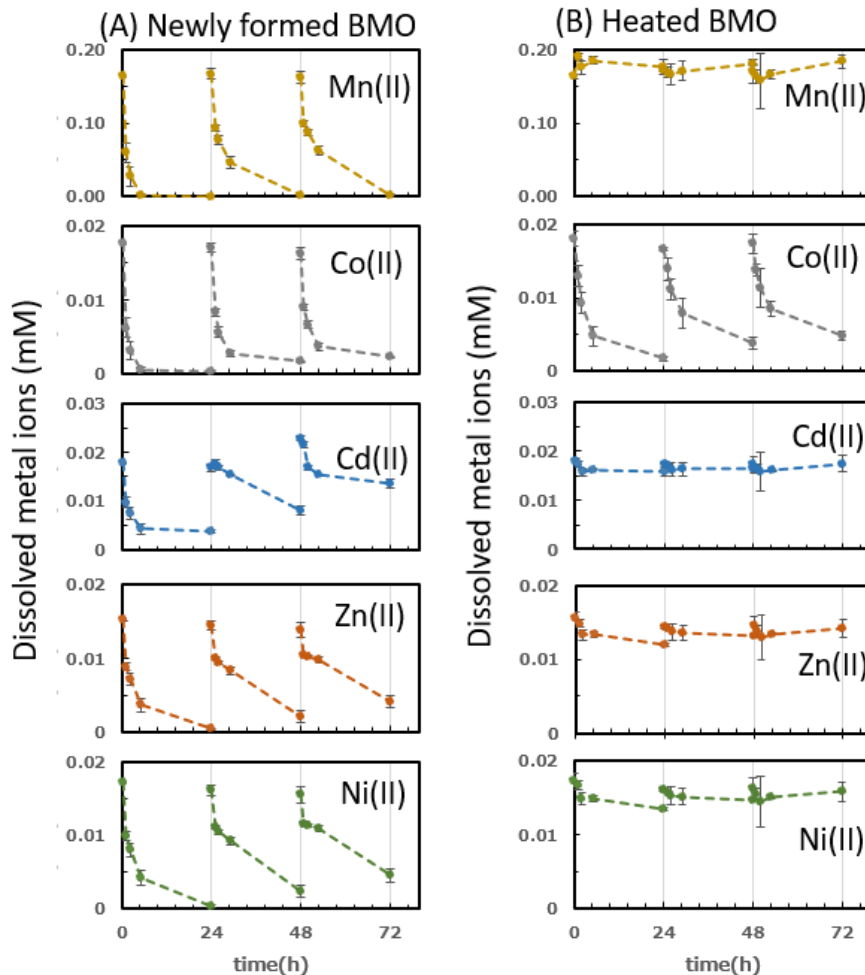


図 3 (A)新規形成 BMO 及び(B)加熱 BMO による 3.6% 人工海水溶液(100 mM HEPES pH 7.0, 大気平衡条件, BMO 濃度は Mn として 1 mM) 中における Mn(II), Co(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II)同時処理実験(3 回繰り返し)における溶存金属イオン濃度の経時変化。

は大幅に減少した(図 3B)。加熱処理 BMO による非人工海水溶液中の Cd(II), Zn(II)及び Ni(II)の積算除去率は 50.7%, 46.3%, 29.6%であり, 海水成分による除去回収率の低下とともに, 共存 Mn(II)による吸着競合がこれらイオンの低い積算除去率に影響したと考えられた。

3. 4 BMO による Cr(III)の収着と Cr(VI)への酸化

大気平衡系で BMO を処理した場合, 反応開始直後から Cr(III)酸化が進行し, 24 時間までに初期 Cr(III)濃度 0.5 mM の時, $86 \pm 2\%$ が Cr(VI)に酸化された(図 4D, E, F)。この時, BMO からの還元 Mn(II)の溶出は, 見かけ上ほとんど観測されず, Mn(II)酸化活性によって速やかに再酸化されたと判断した。ほかの初期 Cr(III)濃度でも同様な傾向であった(図 4A, B, C)。24 時間毎の Cr(III)溶液を繰り返し

返し交換した場合, 最低でも 18 日間は Cr(III)酸化が継続できた。この時, 用いた BMO(Mn として 1 mM)量に対して, 2.3 倍の化学量論比の Cr(III)を酸化することができ, Mn(II)酸化酵素活性による Mn の再酸化(BMO の再生)が効率的に進行していることが示された。一方, Mn(II)酸化酵素反応を阻害した脱酸素系(窒素置換条件)では, 反応初期段階でのみわずかな Cr(VI)への酸化(Cr(VI)濃度: 0.05 ± 0.01 , 0.03 ± 0.00 mM)が認められ, その後 Cr(III)酸化反応は抑制された(図 5A ~ D)。反応初期段階での Cr(III)酸化に伴い, BMO からの Mn(II)の還元溶解(Mn(II)濃度: 0.02 ± 0.00 , 0.03 ± 0.00 mM)が認められた。

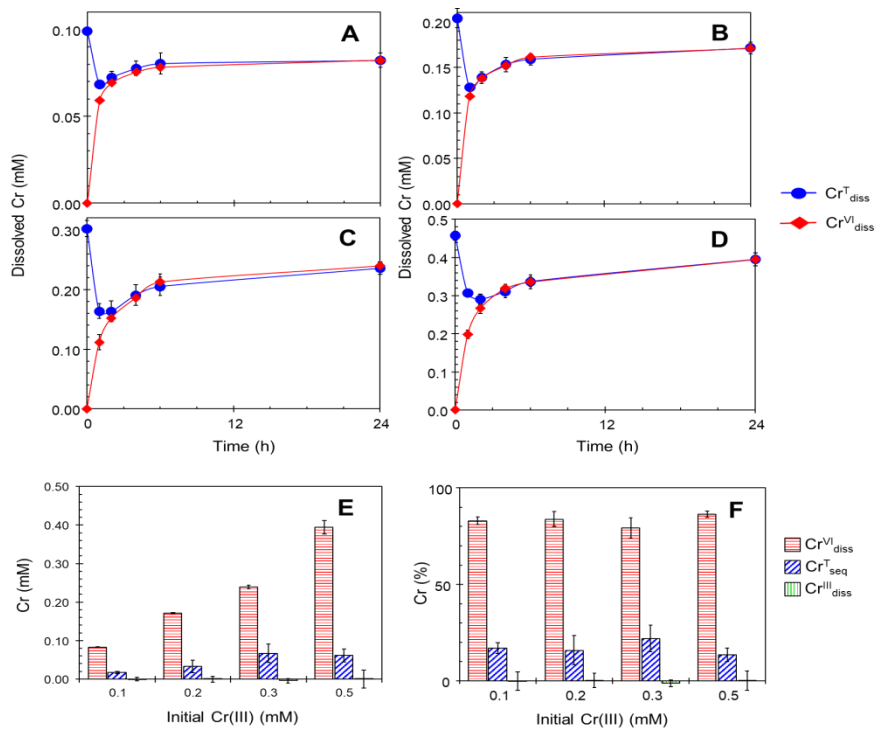


図4 新規形成 BMO(Mnとして 1 mM)による Cr(III)処理実験(100 mM MES pH 6.0, 大気平衡条件)。A ~ D 溶存総 Cr 濃度(Cr^T_{diss}), 溶存 Cr(VI)濃度(Cr^{VI}_{diss})の経時変化。初期 Cr(III)濃度, (A) 0.1 mM, (B) 0.2 mM, (C) 0.3 mM, (D) 0.5 mM。 (E) 反応 24 時間後の Cr の形態別濃度と(F)その相対割合。溶存 Cr(VI)(Cr^{VI}_{diss}), 収着総 Cr(Cr^T_{seq}), 溶存 Cr(III)(Cr^{III}_{diss})。

これらの結果から, BMO 上の酸化還元に関与する反応点を還元 Mn(II)や Mn(III)がブロックし, 不動態化(passivation)が生じたと推察された。この不動態化によって Cr(III)酸化反応が進行せず, Cr(III)収着反応が優位に進行することが XANES 分析によって明らかになった。脱酸素系で 3 回繰り返し処理した場合, BMO 中の Mn に対する収着 Cr の積算モル比は 1.18 ± 0.02 であり, 通常のリチウムイオン(最大モル比で 0.2 ~ 0.3)と比較して, 高い収着量を示した。Cr(III)は, pH 6.0 では $[\text{Cr}_2(\text{OH})_2]^{4+}$, $[\text{Cr}_3(\text{OH})_4]^{5+}$, $[\text{Cr}_4(\text{OH})_6]^{6+}$ などの化学形態で主に存在しており, これらの多核錯体として BMO 上へ収着することで高い Cr(III)収着量を示すと推察された。本研究結果から, BMO の Mn(II)酸化酵素活性は, Cr(III)酸化反応と Cr(III)収着反応に大きく影響することが明らかとなった。

4. 今後の課題

酵素活性 BMO は, 人工海水中においても Mn(II)酸化能を示し, BMO の連続形成が可能であることが明らかと

なった。しかしながら, 非人工海水系と比較すると, 処理回数を重ねるごとに Mn(II)酸化速度および Mn(II)酸化率が減少し, これは人工海水の主成分である塩化ナトリウム(NaCl)が影響していることが示された。しかしながら, BMO の Mn(II)酸化速度への Cl⁻の影響の機構は, 解明していない。また, 加熱処理 BMO を用いた比較実験から, BMO 中の Mn(II)酸化活性による Mn(II)の(再)酸化は, 金属イオンの除去回収率を高く維持するために重要であることが示された。これらを総合すると, 人工海水中で高い Mn(II)酸化活性が維持できる Mn(II)酸化酵素系が入手できれば, 複数の金属イオン類を海水中からより高い効率で回収することを示唆している。本研究では, Mn(II)酸化微生物として, *A. strictum* KR21-2 を用いたが, ほかの微生物の Mn(II)酸化酵素に対する Cl⁻の影響はほとんど知られていない。これらを明らかにすることも今後の大きな課題である。

酵素活性 BMO の人工海水における重金属イオン(Co(II), Cd(II), Zn(II), Ni(II))除去能の評価から, 特に

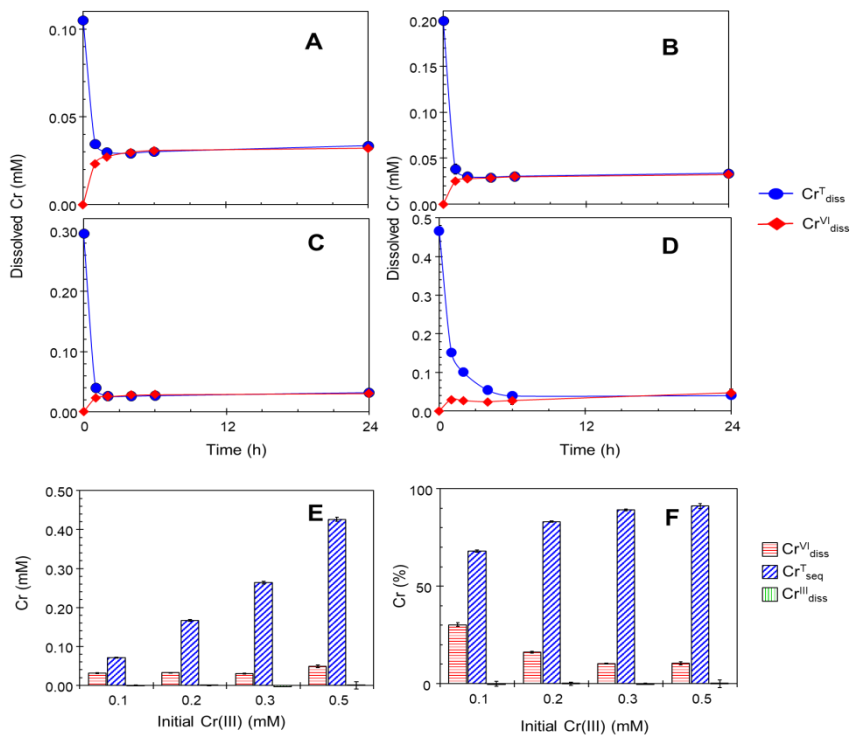


図5 新規形成 BMO (Mn として 1 mM) による Cr(III) 処理実験 (100 mM MES pH 6.0, 室温置換条件)。A ~ D 溶存総 Cr 濃度 (Cr^T_{diss}), 溶存 Cr(VI) 濃度 (Cr^{VI}_{diss}) の経時変化。初期 Cr(III) 濃度, (A) 0.1 mM, (B) 0.2 mM, (C) 0.3 mM, (D) 0.5 mM。 (E) 反応 24 時間後の Cr の形態別濃度と (F) その相対割合。溶存 Cr(VI) (Cr^{VI}_{diss}), 収着総 Cr (Cr^T_{seq}), 溶存 Cr(III) (Cr^{III}_{diss})。

Cd(II)のみが人工海水成分に大きく影響されること, 一方, Co(II)に関しては, 人工海水成分もならず, Mn(II)酸化酵素活性がなくても, 高い収着効率で回収できることが明らかとなった。これらの処理条件による回収選択性の変化は, 混合金属イオン含有排水中から BMO を用いた選択的な回収の可能性を示している。今後の大きな課題である。

Cr(III)の収着については, 人工海水成分を含まない基礎実験系で高い収着効率 (Mn(II)酸化酵素活性を失活させたとき) と高い Cr(VI) への酸化 (Mn(II)酸化酵素活性を保持させたとき) が示された。今後は, 人工海水系で同じ相互作用が生じるかどうかを検討する必要がある。環境中で還元的な堆積物 (汚染が進んだ海洋底泥など) では, Cr は Cr(III)として堆積物に強く保持されることが知られている。BMO による効率的な Cr(IV)への酸化変換は, このような堆積物から Cr の浄化 (リーチング) に応用できる可能性も考えられ, 今後の大きな課題としてあげられた。

5. 文献

- [1] 馬場研二. 地上資源が地球を救う, 技報堂出版 (2008).
- [2] 鈴木剛. E-waste リサイクルに伴う有害化学物質のゆくえ. 国立環境研究所 資源循環・廃棄物センターオンラインマガジン 循環・廃棄物のけんきゅう[環境 KannKann] 1月号 (2015).
- [3] 藤森崇. E-waste リサイクル現場の土とダストを調べる. 国立環境研究所 資源循環・廃棄物センターオンラインマガジン 循環・廃棄物のけんきゅう[環境 KannKann] 12月号, (2011)
- [4] 寺園淳. 製品の資源性・有害性物質の適正な管理をめざす. 国立環境研究所 資源循環・廃棄物センターオンラインマガジン 循環・廃棄物のけんきゅう [環境 KannKann] 8月号, (2011)

- [5] 外務省; 我々の世界を変革する: 持続可能な開発のための 2030 アジェンダ <https://www.mofa.go.jp/mofaj/files/000101402.pdf>
- [6] 白井朗. 海底鉱物資源. 株式会社オーム社(2010).
- [7] 白井朗, 高橋嘉夫, 伊藤孝, 丸山明彦, 鈴木勝彦. 海底マンガン鉱床の地球科学. 東京大学出版会(2015).
- [8] Tebo, B.M., Bargar, J.R., Clement, B.G., Dick, G.J., Murray, K.J., Parker, D., Verity, R., Webb, S.M., Biogenic manganese oxides: Properties and mechanisms of formation. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 32, 287–328 (2004).
- [9] Miyata, N., Tani, Y., Sakata, M., Iwahori, K. Microbial manganese oxide formation and interaction with toxic metal ions. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 1–8 (2007).
- [10] Villalobos, M., Bargar, J., Sposito, G., Trace metal retention on biogenic manganese oxide nanoparticles. *Elements* 1(4), 223–226 (2005).
- [11] Chang, J., Tani, Y., Naitou, H., Miyata, N., Seyama, H., Fungal Mn oxides supporting Mn(II) oxidase activity as effective Mn(II) sequestering materials., *Environ. Technol.* 34(17-20), 2781–2787 (2013).
- [12] Tani, Y., Miyata, N., Iwahori, K., Soma M., Tokuda, S., Seyama, H., Theng, B.K.G., Biogeochemistry of manganese oxide coatings on pebble surfaces in the Kikukawa river system, Shizuoka, Japan. *Appl. Geochem.* 18(10), 1541–1554 (2003).
- [13] Chang, J., Tani, Y., Naitou, H., Miyata, N., Seyama, H., Tanaka, K., Cobalt(II) sequestration on fungal biogenic manganese oxide enhanced by manganese(II) oxidase activity. *Appl. Geochem.* 37, 170–178 (2013).
- [14] Inthorn, D., Tani, Y., Chang, J., Naitou, H., Miyata, N. Magnetically modified fungal Mn oxides with high sequestration efficiency for simultaneously removing multiple heavy metal ions from wastewater. *J. Environ. Chem. Eng.* 2, 1635–1641 (2014).
- [15] Chang, J., Tani, Y., Naitou, H., Miyata, M., Tojo, F., Seyama, H., Zn(II) sequestration by fungal biogenic manganese oxide through enzymatic and abiotic processes. *Chem. Geol.* 383, 155–163 (2014).
- [16] Chang, J., Tani, Y., Naitou, H., Miyata, N., Seyama, H., Tanaka, K. Sequestration of Cd(II) and Ni(II) ions on fungal manganese oxides associated with Mn(II) oxidase activity. *Appl. Geochem.* 47, 198–208 (2014).
- [17] Miyata, N., Tani, Y., Iwahori, K., Soma, M., Enzymatic formation of manganese oxides by an acremonium-like hyphomycete fungus, strain KR21-2. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47(1), 101–109 (2004).
- [18] Miyata, N., Maruo, K., Tani, Y., Tsuno, H., Seyama, H., Soma, M., Iwahori, K., Production of biogenic manganese oxides by anamorphic ascomycete fungi isolated from streambed pebbles. *Geomicrobiol. J.* 23(2), 63–73 (2006).
- [19] Nelson, Y. M., Lion, L. W., Shuler, M. L., Ghiorse, W. C., Effect of oxide formation mechanisms on lead adsorption by biogenic manganese (hydr)oxides, iron (hydr)oxides, and their mixtures., *Environ. Sci. Technol.* 36(3), 421–425 (2002).
- [20] Nelson, Y., M., Lion, L. W., Ghiorse, W. C., Shuler, M. L., Production of biogenic Mn oxides by *Leptothrix discophora* SS-1 in a chemically defined growth medium and evaluation of their Pb adsorption characteristics, *Appl. Environ. Microbiol.* 65(1), 175–180. (1999)
- [21] Koschinsky A., Halbach P., Sequential leaching of marine ferromanganese precipitates: genetic implications. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 59, 5113–5132 (1995).
- [22] 今泉洋, 上田一正, 澤田清, 田口茂, 永長幸雄, 長谷川淳, 本浄高治, 山田明文 基礎分析化学, 化学同人, (1998)

Recovery of Rare Metals from Contaminated Seawaters by Biogenic Manganese Oxides with a Mn(II) Oxidizing Enzyme Activity.

Yukinori Tani¹, Naoyuki Miyata²

¹Department of Environmental and Life Sciences, University of Shizuoka

²Department of Biological Environment, Akita Prefectural University

Summary

In this study, we examined the oxidation of Mn(II) and sequestration of Co(II), Cd(II), Ni(II) and Zn(II) by biogenic manganese oxides (BMOs), formed by the Mn(II)-oxidizing fungus *Acremonium strictum* KR21-2 in artificial seawaters (ASWs) at pH 7.0. In ASWs, Mn(II) was readily oxidized to insoluble Mn oxides by newly formed BMOs with the conversion efficiency of > 90% during the repeated treatment experiments. The kinetics of Mn(II) oxidation in ASWs slightly slowed with the treating times probably due to the inhibitory effect by chloride ions while Na⁺, SO₄⁻, and NO₃⁻ did not affect the Mn(II) oxidation kinetics. Sequestration efficiencies of newly formed BMOs were >99% for Mn(II) and >85% for Co(II), Zn(II), and Ni(II) while only 55.6% of Cd(II) was sequestered in ASWs probably because of predomination of anionic complexes of Cd(II) with Cl⁻ ions such as [CdCl₃]⁻ and [CdCl₄]²⁻ in ASWs. Inactivation of Mn(II) oxidizing enzyme(s) in BMOs (by heating or deaeration) caused less Mn(II) oxidation as well as lower sequestration efficiencies for Cd(II), Zn(II), and Ni(II), suggesting the important role of Mn(II) oxidizing activity on metal sequestrations. High sequestration efficiency for Co(II) by BMOs was maintained even after inactivation of Mn(II) oxidizing activity, indicating that abiotic Co(II) oxidation to insoluble Co(III) is the main path for Co(II) sequestration. Cr(III) was readily oxidized to Cr(VI) by newly formed BMOs at pH 6.0, indicating the indirect oxidation of Cr(III) through Mn(II/IV) redox cycles on BMOs. In anaerobic condition, most of Cr(III) was sequestered on BMOs without the oxidative transformation to Cr(VI).