

平成28年度

文部科学省 国家課題対応型研究開発推進事業

英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業

環境中放射性核種浄化のための新規な修復
材料の開発

成果報告書

平成29年3月

国立研究開発法人 日本原子力研究開発機構

本報告書は、文部科学省の英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業による委託業務として、国立研究開発法人 日本原子力研究開発機構が実施した平成26－28年度「環境中放射性核種浄化のための新規な修復材料の開発」の成果を取りまとめたものです。

表一覧

表 3.1-1	分離株の形態学的特徴と増殖特性	14
表 3.1-2	分離株の生理・生化学的特性	15
表 3.1-3	KW3b2 株ゲノム DNA 上のウレアーゼ関連遺伝子における ORF 領域検索	17
表 3.3-1	標準物質（化学状態：SrCl ₂ 、Sr-CaCO ₃ 及び SrCO ₃ ）を用いて得られた Sr のバイオカルサイト中におけるそれぞれの化学状態の存在割合の経時変化	53
表 3.3-2	標準物質（化学状態：Fe ₃ O ₄ 及び Fe ₂ O ₃ ）を用いて得られた磁性体付加試料中における Fe の存在割合	56
表 3.3-3	ゼオライト、マグネタイト及び KW3b が共存し反応時間 48 時間のサンプルの EDX の Sr-K 線と Ca-K 線を用いた定量分析から求めた炭酸塩中の Sr/Ca モル比	72
表 3.3-4	ゼオライト、マグネタイト及び KW3b が共存し反応時間 120 時間のサンプルの EDX の Sr-K 線と Ca-K 線を用いた定量分析から求めた炭酸塩中の Sr/Ca モル比	72

図一覧

図 1.2-1	日英協力を進めるための研究項目と担当する機関	3
図 2.1-1	全体計画図	4
図 3.1-1	分離用平板培地の赤色ハロー	8
図 3.1-2	候補株による Sr 除去試験結果	9
図 3.1-3	TK2d 株の Sr 除去試験における溶存 Sr 及び溶存 Ca 濃度の経時変化	10
図 3.1-4	ろ過済み MB を用いた TK2d 株の Sr 除去試験結果	11
図 3.1-5	鹿児島湾環境試料から分離したウレアーゼ産生微生物の培養時における溶存 Sr 濃度	12
図 3.1-6	TK2d 株、KW3b1 株及び KW3b2 株の培養時における溶存 Sr 濃度	12
図 3.1-7	<i>Bacillus</i> 属及び TK2d 株の 16S rRNA 遺伝子領域に基づいた系統樹	16
図 3.1-8	<i>Sporosarcina</i> 属及び KW3b1 株と KW3b2 株の 16S rRNA 遺伝子領域に基づいた系統樹	16
図 3.1-9	KW3b2 株が有するウレアーゼ関連遺伝子領域	18
図 3.1-10	Co 耐性微生物群の培養液中の溶存 Co 濃度	21
図 3.1-11	<i>Pseudoalteromonas</i> 属及び TK6-3 株の 16S rRNA 遺伝子領域に基づいた系統樹	22

図 3.1-12	100 L ベンチスケール培養装置の外観	27
図 3.1-13	NaCl 濃度における分離株の培養液中の生菌数 (a-c) 、 溶存 Sr 濃度 (d-f) 及びアンモニウムイオン濃度 (g-i)	28
図 3.1-14	KW3b 株を用いた 5 L リアクターへのスケールアップと 物理因子による Sr 除去能への影響	30
図 3.1-15	TK6-3 株による 5 L リアクターへのスケールアップ試験結果	31
図 3.1-16	KW3b 株を用いた Sr 除去試験の 100 L タンクへのスケールアップ	32
図 3.1-17	東京湾の海水を用いた KW3b 株の Sr 除去試験結果	32
図 3.1-18	異なる Sr 初発濃度 (5.0 mmol/L、1.0 mmol/L、0.1 mmol/L、0.02 mmol/L) における TK2d 株の溶存 Sr 及び溶存 Ca 濃度の経時変化	36
図 3.1-19	様々な Sr 初発濃度における KW3b2 株の Sr 除去能	37
図 3.1-20	TK2d 株、KW3b1 株及び KW3b2 株の培養時における 溶存 Sr 濃度の経時変化	38
図 3.1-21	Co 除去試験における TK6 菌群の培養液中の溶存 Co 濃度	39
図 3.1-22	Sr 除去試験における TK6 菌群の培養液中の溶存 Ca・Sr 濃度	39
図 3.1-23	KW3b 株と磁性体の混合培養による Sr・Co 除去試験における 各元素の経時変化	40
図 3.1-24	KW3b 株と磁性体の混合培養による Sr・Co・Cs 除去試験における 各元素の経時変化	42
図 3.2-1	ゼオライト分散水溶液 (1 時間静置後)	46
図 3.2-2	親水化処理ゼオライト分散水溶液 (a) 及び 親水化カルサイト分散水溶液 (b)	46
図 3.2-3	細粒化ゼオライト (a) 及びカルサイト (b) のサイズ分布	47
図 3.2-4	ゼオライトの (a) ストロチウムイオン、 (b) コバルトイオン除去率の経時変化	47
図 3.3-1	1mM の Sr を添加した培地で TK2d 株を 120 時間培養した際に生成した バイオカルサイトの XANES スペクトル	51
図 3.3-2	標準物質を用いて得られた、カルサイト構造、アラゴナイト構造 及びストロンチアナイト中の Sr の XANES スペクトル	51
図 3.3-3	0.1mM の Sr を添加した培地で KW3b1 株を 24 時間 (1 日)、 144 時間 (7 日) 培養した際に生成したカルサイト中の Sr の K 吸収端の XANES スペクトル	52
図 3.3-4	KW3株により生成したカルサイトに取り込まれたSrのEXAFSスペクトル	52
図 3.3-5	KW3b 株により生成したカルサイトに取り込まれた Co の XANES スペクトル	54
図 3-3-6	チャバサイト中の Fe の XANES スペクトル	55

図 3.3-7	チャバサイトを添加した Sr、Co 含有培地で KW3b 株を 8 時間培養した後の Fe の XANES スペクトル	55
図 3.3-8	チャバサイト及び磁性体を添加した Sr、Co 含有培地で KW3b 株を 24 時間培養した後の Fe の XANES スペクトル	55
図 3.3-9	磁性体を添加した Sr、Co 含有培地で KW3b 株を 24 時間培養した後の Fe の XANES スペクトル	56
図 3.3-10	無機的に合成されたカルサイトの BFTEM 像とその EDS スペクトル	59
図 3.3-11	Sr 初期濃度 1 mM で 65 時間培養した TK2d 株の HAADF-STEM 像と その元素マップ	60
図 3.3-12	Sr 初期濃度 5 mM で 93 時間培養した TK2d 株の HAADF-STEM 像と その元素マップ	61
図 3.3-13	Sr 初期濃度 1 mM の条件で 192 時間後の TK2 株の元素マップ (a) 及び (a) で見られた球状の微生物周りの拡大図 (b) の元素マップ及び EDS 面分析の結果	62
図 3.3-14	Sr 初期濃度 1 mM の条件で 192 時間後の TK2 株で生成した 沈殿物の拡大図	63
図 3.3-15	KW3b 試料の電子顕微鏡分析 (1)	64
図 3.3-16	KW3b 試料の電子顕微鏡分析 (2)	65
図 3.3-17	KW3b によって生成した Co 含有相の電子顕微鏡分析	66
図 3.3-18	アパタイト生成菌 TK6 株による Sr 収着プロセス	67
図 3.3-19	アパタイト生成菌 TK 6 株による Sr、Co 収着プロセス	67
図 3.3-20	アパタイト生成菌 A 株による Sr 収着プロセス	68
図 3.3-21	アパタイト生成菌 TK 6 株による Sr、Co 収着プロセス	69
図 3.3-22	ゼオライト、マグネタイト及び KW3b が共存しているサンプルの 元素マップ	70
図 3.3-23	ゼオライト、マグネタイト及び KW3b が共存し反応時間 8 時間の サンプルの EDX スペクトル	70
図 3.3-24	ゼオライト、マグネタイト及び KW3b が共存し反応時間 48 時間の サンプルの EDX スペクトル	71
図 3.3-25	ゼオライト、マグネタイト及び KW3b が共存し反応時間 120 時間の サンプルの EDX スペクトル	71

略語一覧

SEM : Scanning Electron Microscope (走査型電子顕微鏡)

EDS: Energy Dispersive X-ray Spectrometry (エネルギー分散型 X 線分析)

ICP-AES: ICP-OES: Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (誘導結合プラズマ発光分光分析装置)

MB : Marine Broth (海水養分培地)

DNA: deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)

RNA: ribonucleic acid (リボ核酸)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (DNA の塩基配列のシーケンスアラインメントを行うためのアルゴリズム)

NCBI: National Center for Biotechnology Information (国立生物工学情報センター)

PCR : Polymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

DLS: Dynamic light scattering (動的光散乱法)

KEK: High Energy Accelerator Research Organization (高エネルギー加速器研究機構)

XANES: X-ray Absorption Near-Edge spectroscopy (X 線吸収端近傍微細構造解析)

EXAFS: Extended X-ray absorption Fine Structure (広域 X 線吸収微細構造)

HRTEM: High Resolution Transmission Electron Microscope (高分解透過型電子顕微鏡)

STEM: Scanning Transmission Electron Microscope (走査型透過電子顕微鏡)

HAADF-STEM: High-Angle-Annular-Dark-Field (高角散乱環状暗視野走査透過顕微鏡法)

FIB : Focused ion beam system (集束イオンビーム加工装置)

SAED: Selected area electron diffraction (制限視野電子回折)

概略

福島第一原子力発電所では原子炉内の燃料の冷却を行うため、放射性核種を含むいわゆる汚染水を継続的に処理している。この処理にもかかわらず、僅かではあるが汚染水や処理した濃縮汚染水の一部が港湾内や地下水中に漏出した。漏出した汚染水や高塩濃度の濃縮汚染水を速やかに浄化し環境への影響を最小限に留めることは、国家的・社会的に極めて重要で緊急性の高い課題である。一方で、港湾内の海水中及び高塩濃度の濃縮汚染水が漏出した地下水中の放射性核種の浄化における問題点は、濃縮汚染水や海水などの塩濃度が高い水溶液に放射性核種が溶けていることである。高塩条件では、通常の地下水中で有効であるスメクタイトなどの吸着効率が非常に低下するため、従来の吸着材料を直接用いることは困難である。この問題を解決するためには、高塩濃度の環境中における放射性核種を浄化するための新規な修復材料の開発が必要となる。

そこで本研究では、日本と英国バーミンガム大学の研究者が協力し新規な修復材料の開発に取り組むこととした。具体的には、英国の有する微生物などによる磁性物質生成技術、多孔質性鉱物(ゼオライト)の孔径制御による吸着性能の高度化技術と、日本側研究者の有する金属イオンを微生物が生成する鉱物に取り込む間接的な固定菌を探索する技術、及び親水基を付加して鉱物の流動性を向上させる技術を用いて、海水や高塩環境からの放射性核種の除去及び土壌中の汚染箇所への吸着材の直接輸送を可能とする技術開発を行う。そのため、海水や高塩環境の底泥、排水などから好塩性微生物を集積培養した。培養した微生物から海水条件でバイオ鉱物を生成する菌種を探索する。さらに、探索した菌種あるいは菌種群による海水からの放射性核種の回収能を明らかにすることとした。この好塩性微生物を用いた技術では、汲み上げた海水等の中で微生物を培養することにより放射性核種を除去すること、あるいは港湾海水に投入して海水中で微生物が継続的に生産するバイオ鉱物に放射性核種を取り込ませることによって、放射性核種が港湾外に拡散することを防ぐことを想定している。生成したバイオ鉱物に放射性核種を取り込んだ微生物を回収する場合は、英国側が開発した磁性体微粒子を微生物に与えることで磁性体を細胞に付加させることによって、磁力による回収を図る。また、土壌中の汚染箇所に吸着材を直接輸送することで放射性核種を土壌中に固定するため、ゼオライト・カルサイト粒子などの吸着材の細粒化と、凝集による沈殿を阻害する性能向上のために細粒化した粒子に親水基を付加することによって、細粒化した吸着材の土壌間隙中における流動性向上を図った。この技術は、福島第一原子力発電所敷地と英国セラフィールド再処理施設敷地における広範囲な土壌汚染に用いることを対象としている。一方、取り込まれた放射性核種の化学状態を明らかにするため、放射光施設における X 線吸収微細構造分析や電子顕微鏡により分析を行い、取り込みによる化学状態の変化や存在位置及び存在形態の明確化を図ることとした。以上の結果をとりまとめ、港湾内の海水中及び高塩濃度の濃縮汚染水が漏出した地下水

の放射性核種を効率的に浄化するための材料を開発した。本研究の研究計画と分担の概要を図「全体概要」(xiv ページ)に示す。

1. バイオ鉱物を生成する微生物の特定

(業務計画書 1. ① バイオ鉱物生成好塩菌の特定)

微生物が生成する炭酸カルシウム鉱物(カルサイト)やリン酸カルシウム鉱物(アパタイト)は、バイオ鉱物(バイオカルサイト、バイオアパタイト)と称される。バイオ鉱物を用いた地下水や土壌中の放射性ストロンチウム(Sr)の共沈や吸着による浄化の研究などが進められている。一方、海水(塩濃度3%)など高塩濃度条件下における放射性Srの微生物の代謝物による浄化の研究はほとんど行われていない。

高塩濃度条件下においてバイオ鉱物を生成する微生物の獲得と、溶存Sr及びコバルト(Co)をバイオ鉱物中に固化する新規の放射性核種回収方法を確立するため、カルサイト及びアパタイトを生成する菌種あるいは菌種群の特定を図るとともに、高度にSrを濃集するカルサイト生成好塩菌を探索するため、海水や高塩環境から海水、底泥、排水などを採取し、好塩性微生物を集積培養した。微生物の分離源として、東京湾(TK、7ヶ所)、福島県-茨城県沖(FI、18ヶ所)の計25ヶ所から海水及び海底泥を採取してバイオ鉱物を生成する菌種あるいは菌種群を探索(スクリーニング)した結果、カルサイトを生成しSr除去能に優れた3株(TK2d株、KW3b1株、KW3b2株)を単離できた。さらに、アパタイトを生成し溶存Co除去能に優れた3株(TK6-3株、TK19-1株、TK19-2株)を単離できた。電子顕微鏡による元素分布から、カルサイト及びアパタイト生成菌であることを確認した。分子生物学的解析によりカルサイト生成菌は、TK2d株が*Bacillus* sp.であり、KW3b1株及びKW3b2株が*Sporosarcina*属に属し*S. soli* I80に近縁であることを明らかにした。アパタイト生成単離株の菌種を同定した結果、単離株のうち、TK6-3株は、*Pseudoalteromonas*属に分類される微生物であることを明らかにした。KW3b2株のゲノムDNA解析の結果、本株は7種のウレアーゼ関連遺伝子を持つことが分かった。これらの推定アミノ酸配列は、*Lysinibacillus sphaericus*や*Sporosarcina*属、*Bacillus*属の細菌由来のウレアーゼ関連遺伝子とアミノ酸レベルで60%以上の高い相同性を示した。

2. バイオ鉱物生成菌の育成条件の明確化

(業務計画書 1. ② 1) バイオ鉱物生成菌の育成条件の明確化)

バイオ鉱物生成菌の育成条件を明らかにするため、培地溶液中の塩濃度をNaClにより0.3、3.0、5.0、10%に調製した培地(Sr 1.0 mM含有)を用いて、TK2d株、KW3b1株及びKW3b2株の生育条件を評価した。その結果、TK2d株、KW3b1株及びKW3b2株の増殖の最適NaCl濃度は3.0%であることを明らかにした。さらに、アパタイト生成菌については0.06 mMのCoを含む海水と同じ塩濃度条件下で生育することを確認した。

バイオ鉱物生成菌を大量培養する可能性を明らかにするため、100mL フラスコ容器からスケールアップとして5Lリアクター及び100LタンクにおいてKW3b株を培養した。その結果、5Lリアクターでは、通気量及び攪拌速度の影響について調べた結果、通気・攪拌なしの条件においても培養24時間でCa濃度減少が95%を達成したことから、通気及び攪拌の影響は小さいことが分かった。さらに、100Lタンクでの培養から、溶存Caは培養24時間で90%以上の減少を示し、72時間でほぼ全てのCaが溶液から除かれた。さらに、通気量、攪拌速度が共に大きな、通気量3L/分、攪拌速度300rpmでNH₄⁺の生成量が最大であり、Sr濃度も1/10以下になることを明らかにした。したがって、大量培養は十分可能で、実際のサイトに適用するだけの菌体量を確保できることを明らかにした。

3. バイオ鉱物によるSr及びCoの回収能の評価

(業務計画書 1. ② 2) Sr及びCoの回収能の明確化)

バイオカルサイトのSr及びCoの回収能を評価するとともに、バイオアパタイトのSr及びCoの回収能を評価した。その結果、0.3% NaClの低塩濃度においては3株全て(TK2d株、KW3b1株、KW3b2株)がSr除去率99-100%を示し、KW3b1株及びKW3b2株は、塩濃度5%以下でSrの高い回収能を示すことを明らかにした。カルサイト生成菌株によるCo回収能を評価した結果、僅かではあるがバイオカルサイト中への濃集を明らかにした。バイオアパタイトによるSr及びCoの回収能を評価した結果、TK6菌群はグリセロール2りん酸(G2P)を分解し、培養30日までに64%の溶存Co、37%の溶存Srを溶存Caと共にリン酸塩として培養液中から除去することを明らかにした。

英国側が作製した磁性体¹を微生物に付加することに成功した。模擬海水中で培養生成した微生物-鉱物混合物に磁性体付加した混合培養試験では、添加した磁性体の種類または有無にかかわらず、KW3b株は培養24時間で溶存Sr及び溶存Caを98%減少した。Co除去能については、16時間で90.7%と高いCo除去率を示した。一方、マグネタイト(磁性体)だけ及び菌体だけを用いた条件では溶存Coを除去できなかった。この結果は、混合培養M(マグネタイト混合)及びCM(マグネタイトとチャバサイトの混合)では、微生物とマグネタイトは共存することで溶存Coを除去する新たな反応が関与している可能性を示した。バイオアパタイト生成時においてCo濃度が1mMから0.40mMに減少したことから、回収能はおおよそ0.5であることを明らかにした。さらに、磁性体としてナノサイズのマグネタイト及びマグネタイト添加ゼオライトを付加した微生物によりバイオ鉱物の生成時におけるSr及びCoの水溶液中濃度を調べた結果、両元素とも1/10以下になることを確認した。磁性

¹ 磁性体は、マグネタイト(Fe₃O₄;M)やマグネタイトを付与した3種のゼオライト(A型ゼオライト;A, チャバサイト;C, P型ゼオライト;P)を用いた。これらの磁性体は英国バーミンガム大学の研究チームが作製した。

体を附加した微生物-鉱物混合物の海水中での回収性を評価するため、磁石による移動を調べた結果、混合物が磁石付近に移動することを確認した。

以上の結果から、磁性体付加バイオ鉱物により Sr 及び Co の水溶液中濃度を 1/10 以下とするとともに、バイオ鉱物を磁力により回収するという目標を達成できた。

4. バイオ鉱物に取り込まれた Sr 及び Co の化学状態

(業務計画書 3. ①化学状態の変化の明確化)

海水に溶解した Sr 及び Co がバイオアパタイト及びバイオカルサイトにそれぞれ取り込まれることによる化学状態の変化の明確化を図るため、放射光施設における X 線吸収微細構造分析などにより解析した。その結果、バイオカルサイトに取り込まれた Sr の X 線吸収端近傍微細構造解析 (XANES) スペクトルの解析から、TK2d 株及び KW3b 株 (KW3b1 株及び KW3b2 株) により生成するカルサイト中で、Sr は時間の経過とともに Sr を含む固相が形成されていく可能性を明らかにした。一方、カルサイトに取り込まれた Co の XANES スペクトルから、カルサイト中のほとんどの Co の価数は変化せず II 価のままであり、一部が III 価になっている可能性があることを明らかにした。溶液中の Co 濃度の変化はほとんどなかったが、XANES スペクトルが検出されたことから、Co のごく一部がカルサイトに取り込まれていることを明らかにした。TK6 株により生成したアパタイトに取り込まれた Sr の XANES スペクトル及び広域 X 線吸収微細構造 (EXAFS) スペクトルから、アパタイト中の Sr は水溶液に溶けた Sr イオンと同じような化学状態であることを明らかにした。

磁性体を付加した場合の試料中の Fe の化学状態を明らかにした。KW3b 株にチャバサイトと磁性体を添加した試料中の Fe については、89%が Fe_3O_4 であり、11%が Fe_2O_3 であった。この結果から、一部の Fe が溶解し、再沈殿して 3 価の鉄鉱物が生成したことが示唆された。マグネタイトを付加した微生物によりバイオカルサイト及びバイオアパタイトを形成した混合物中の Fe について測定した XANES スペクトルから、同混合物中の Fe の化学状態はマグネタイトであることを明らかにした。

5. 海水からバイオ鉱物に取り込まれた Sr 及び Co の存在位置及び存在形態

(業務計画書 3. ②電子顕微鏡分析による Sr 及び Co の存在位置及び存在形態の明確化)

海水からバイオカルサイト及びバイオアパタイトにそれぞれ取り込まれた Sr 及び Co の存在位置及び存在形態の明確化を図るため、Sr 及び Co を取り込んだバイオカルサイト試料及び Sr を取り込んだバイオアパタイト試料を電子顕微鏡により観察するとともに、電子顕微鏡付属の元素分析装置により元素組成を分析した。

その結果、バイオカルサイトの場合、TK2d 株存在下では溶液中の Sr 濃度が急激に減少する前の固体試料には炭酸塩鉱物の生成は見られず、微生物の内部に Ca と Sr が蓄積されていく。蓄積される Sr の濃度は培地中の初期 Sr 濃度に対応して増減した。細胞溶解が起こった後に細胞構成元素、C、O、P はその場に残るが、Ca と Sr は放出されることが分かった。

このことから、炭酸塩は Sr 濃度を選択的に増大させていたことが分かった。構造はカルサイトやアラゴナイト²に近いもの両方が同定され、二つの構造が混在する可能性が示唆された。

TK2d 株より Sr 除去速度の速い KW3b 存在下では Sr の収着はアラゴナイトのナノ粒子結晶への取り込みが主プロセスとなるが、Co を添加した場合は炭酸塩の形成が起こらず、酸化物ナノ粒子として沈殿することが分かった。また KW3b とゼオライトが共存する条件において反応初期では Sr と Ca が共存した炭酸塩鉱物は沈殿せず、Sr は主にゼオライトに収着される。しかしながら、2 日以上経過すると Sr は Ca と共に楕円形の炭酸塩として共沈し始め、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX) の Sr-K 線と Ca-K 線を用いた定量分析から炭酸塩中の Sr/Ca モル比は時間の経過とともに高くなることが分かった。

以上より、微生物によって形成される Ca 炭酸塩はゼオライトよりも高い Sr 収着能を持っていることが分かった。

Co を取り込んだバイオカルサイト試料の元素組成分析の結果、カルサイト生成菌による Sr の収着はアラゴナイトのナノ粒子結晶への取り込みが主プロセスとなるが、Co を添加した場合は炭酸塩の形成が起こらず、酸化物ナノ粒子として沈殿するプロセスであることを明らかにした。さらに、Co を取り込んだバイオカルサイト試料の EDX 元素分析及び制限視野電子線解析 (SAED) から、Co 相は Co が均質に存在する Co_3O_4 のナノ結晶であることを明らかにした。

一方、Sr を取り込んだバイオアパタイト試料の元素組成分析の結果、アパタイト生成菌による Sr の収着では、細胞内外における非晶質リン酸塩ナノ粒子の形成時に Sr が取り込まれたことを明らかにした。

磁性体付加バイオカルサイト中の Sr 及び Co の存在位置及び存在形態を明確にするため、Sr 及び Co を取り込んだ磁性体を付加したバイオカルサイト試料を電子顕微鏡により観察するとともに、電子顕微鏡付属の元素分析装置により元素組成を分析した。その結果、磁性体 (マグネタイト) の有無に関わらず反応初期、8 時間までは Sr と Ca の共存した炭酸塩鉱物 (バイオカルサイト) は沈殿しておらず、Sr の一部と Cs はゼオライトに吸着していた。その後、2 日以上経過すると Sr は Ca と共に楕円形の炭酸塩として共沈し始める。一方、Co は Fe のピークとかぶるため検出できなかったが、Fe が検出されない部分には Co が存在しないことから、磁性体と共に存在している可能性が高いことを明らかにした。Sr の取り込みに関しては、反応初期において、Sr の一部はゼオライト及びアパタイトに吸着し、その後 2 日以上経過すると Ca と共に楕円形の炭酸塩として共沈することを明らかにした。一方、Co は鉄がない部分では検出されなかったことから、Co は磁性体と共に存在していることを明らかにした。以上より、微生物による Sr 及び Co 取り込み機構は、Sr が Ca 炭酸塩鉱物への濃集によること、及び Co が磁性体への濃集によることを明らかにした。

² カルサイト同様、炭酸塩鉱物の一種であり、化学組成は CaCO_3 (炭酸カルシウム) であるが、結晶構造が異なる。

6. ゼオライト粒子及びカルサイト粒子の土壌空隙中の流動性の評価

(業務計画書 2. ①ゼオライト粒子及びカルサイト粒子の土壌空隙中における流動性の向上)

ゼオライト粒子及びカルサイト粒子の土壌空隙中における流動性の向上を目的として、細粒化したゼオライト及びカルサイト粒子に親水基を付加する試験を行った。本試験では、カルサイトとして一般的なカルサイト鉱物を用いた。さらに、細粒化したゼオライト及びカルサイト粒子の流動性を評価するため、カラム試験を実施するとともに、親水基付加の吸着への影響を調べるため、親水基処理をしたゼオライト及びカルサイトに Sr 及び Co を吸着する試験を実施した。その結果、粉碎したゼオライト及びカルサイトに親水基処理をした試料は、1 時間以上沈殿せず、高い分散性を示した。さらに、カラムビーズを用いた透過試験では、親水基付加細粒化粒子はほぼ 100%カラムビーズを透過した。以上、ゼオライト粉末及びカルサイト粒子を微細化し、分散性及び流動性の向上を達成した。また、親水基処理をしたゼオライト及びカルサイトは、Sr 及び Co 溶液からほぼ 90%以上の Sr 及び Co を吸着したことから、高い吸着能を有することを明らかにした。カラムビーズを用いた透過試験では、親水化した粒子のほぼ 100%がカラムビーズを透過した。さらに、親水基を付加したゼオライト粉末及びカルサイト粉末へのストロンチウム及びコバルトの吸着率が 90%以上であることを確認した。

以上の結果をまとめると以下の通りである。

海水条件で単離できた高度に Sr を濃集するカルサイト生成好塩菌の中で、Sr の除去能が菌種 TK2d 株よりも高い KW3b1 株及び KW3b2 株を単離し、特定できた。さらに、アパタイト生成菌であり溶存 Co 除去能が優れている TK6-3 株を単離し、同定できた。TK2d 株、KW3b1 株及び KW3b2 株の増殖の最適 NaCl 濃度は 3.0%であることを明らかにした。大量培養の可能性を明らかにするため、5L リアクター及び 100L タンクにおいて KW3b 株を培養した結果、5L リアクターでは培養 24 時間で Ca 濃度減少 95%を達成した。さらに、100L タンクでの培養から、溶存 Ca は培養 24 時間で 90%以上の減少を示し、72 時間でほぼ全ての Ca が溶液から除かれた。したがって、大量培養は十分可能で、実際のサイトに適用するだけの菌体量を確保できることを明らかにした。

放射光施設における X 線吸収微細構造分析や電子顕微鏡による分析から、TK2d 株及び KW3b 株により生成するカルサイト中で、Sr は時間の経過とともに Sr を含む固相が形成されていく可能性を明らかにした。磁性体を付加した場合の試料中の Fe の化学状態を明らかにした。KW3b 株にチャバサイトと磁性体を添加した試料では、一部の Fe が溶解し、再沈殿して 3 価の鉄鉱物が生成する可能性を見出した。Co を取り込んだバイオカルサイト及び Sr を取り込んだバイオアパタイトの元素組成分析の結果、カルサイト生成菌による Sr の収着はアラゴナイトのナノ粒子結晶への取り込みが主プロセスであり、Co を添加した場合は酸

化物ナノ粒子として沈殿するプロセスであることを明らかにした。マグネタイトの有無に関わらず反応初期、8時間まではSrとCaの共存した炭酸塩鉱物は沈殿しておらず、Srの一部とCsはゼオライトに吸着していた。その後、2日以上経過するとSrはCaと共に楕円形の炭酸塩として共沈し始める。一方、Coは、Feが検出されない部分にはCoが存在しないことを見だし、磁性体と共に存在している可能性が高いことを明らかにした。マグネタイトを付加した微生物によりバイオカルサイト及びバイオアパタイトを形成した混合物中のFeについて測定したX線吸収微細構造スペクトルから、Feの化学状態はマグネタイトであることを明らかにした。この結果は微生物によるマグネタイトの溶解はほとんどないことを示しており、実用化に不可欠な磁性体の安定化が保証された。

粉碎したゼオライト及びカルサイトに親水基処理をした試料は1時間以上沈殿せず、高い分散性を示した。さらに、カラムビーズを用いた透過試験では、細粒化した粒子はほぼ100%カラムビーズを透過した。以上、ゼオライト粉末及びカルサイト粒子を微細化し、分散性及び流動性の向上を達成した。また、親水基処理をしたゼオライト及びカルサイトは、Sr及びCo溶液からほぼ90%以上のSr及びCoを吸着したことから、高い吸着能を有することを明らかにした。

まとめると次の通りである。

- ① Sr及びCoを90%以上回収できる磁性体付加バイオ鉱物を作製することができた。
- ② 化学状態の分析から、鉱物化過程におけるSr及びCoの取り込みが、高い回収率の原因であることを突き止めた。
- ③ 100L規模の大量培養が可能であることを明らかにした。
- ④ ゼオライト及びカルサイト粉末を破砕によりマイクロ化し、かつ親水基を付加することにより、高い分散性及び流動性を有するゼオライトあるいはカルサイトを用いた高効率で放射性核種を吸着する新規材料を開発できた。

本研究課題は基礎研究であるため、実用化に向けて次のような取り組みが必要である。

1. 好塩性微生物による放射性核種の除去

ここでは汲み上げた海水等の中で微生物を培養することにより放射性核種を除去することを想定している。大型タンクに海水、栄養源、微生物を入れ、微生物を培養する過程で、生成するバイオ鉱物に放射性核種を除去させる。磁性体を微生物に付加させることによって、微生物を磁力により放射性核種を除去した液相から分離回収する。

この方法においては、多様な微生物とイオン等を含む海水中でバイオ鉱物生成微生物を増殖させること、バイオ鉱物による放射性核種の除去に対する海水中のイオン等の影響が小さくなる条件を見出すこと、及びこのようなバイオリクター中で、バイオ鉱物生成微生物に磁性体を付加させること、の検討が必要である。

2. 海洋底又は海洋中の放射性核種の好塩性微生物による固定

ここでは港湾の海底又は海中にバイオ鉱物生成微生物を投入し、生成するバイオ鉱物に放射性核種を固定させる。このバイオ鉱物及びバイオ鉱物生成微生物は回収せず、原位置にとどめることにより、放射性核種が外洋に拡散することを防ぐ。

本方法においては、多様な微生物を含む海水中でバイオ鉱物生成微生物を増殖させること、実海水条件でバイオ鉱物に放射性核種が固定されることを検証すること、及び実海水条件でバイオ鉱物に固定された放射性核種の長期安定性の評価を行うことが必要である。

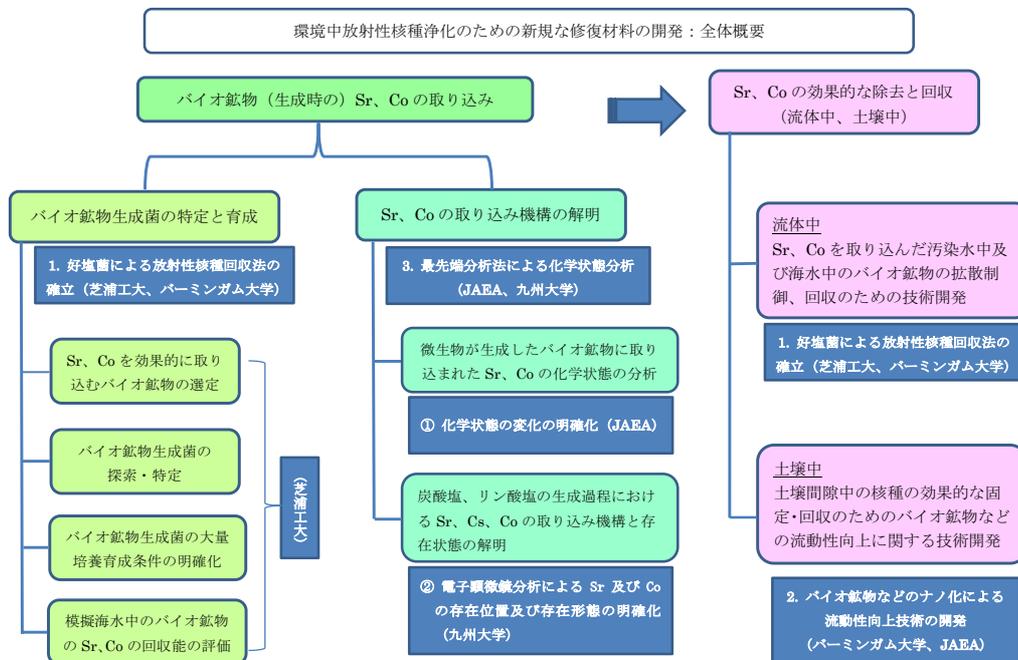
3. 汚染水処理へのバイオ鉱物の適用

汚染水には放射性ストロンチウムや放射性コバルトが含まれ、それらは汚染水処理施設の除去対象核種である。汚染水のイオン強度は希薄であるため、本研究で単離し実験に用いた好塩性微生物は汚染水処理環境では生息できない可能性が高いが、アパタイトなどのバイオ鉱物を生成し淡水で生息する微生物の存在が知られている。

本研究成果を汚染水処理に適用する場合は、淡水で生息するバイオ鉱物微生物を探索し、その特性を評価することが必要である。

4. 流動性を高めた吸着材の利用

ここでは、土壤が汚染している地域の地下水の上流側から吸着材を土壤に直接投入し、土壤中の汚染箇所へ吸着材を直接輸送することで放射性核種を土壤中に固定する。本方法においては、土壤への吸着材の投入方法の構築、吸着材の土壤中での到達地点を判断するために吸着材を標識する方法の開発、及び未攪乱土壤を充填した大型土壤カラムによる模擬試験を行うことが必要である。



1. はじめに

1.1 研究目的

福島第一原子力発電所では原子炉内の燃料の冷却を行うため、放射性核種を含むいわゆる汚染水を継続的に処理している。この処理にもかかわらず、僅かではあるが汚染水や処理した濃縮汚染水の一部が港湾内や地下水中に漏出した。漏出した汚染水や高塩濃度の濃縮汚染水を速やかに浄化し環境への影響を最小限に留めることは、国家的・社会的に極めて重要で緊急性の高い課題である。一方で、港湾内の海水中及び高塩濃度の濃縮汚染水が漏出した地下水中の放射性核種の浄化における問題点は、濃縮汚染水や海水などの塩濃度が高い水溶液に放射性核種が溶けていること、及び地下水に漏出した放射性核種が不均一に分布する可能性が高いことである。高塩条件では通常の地下水中で有効であるスメクタイトなどの吸着効率が非常に低下するため従来の吸着材料を直接用いることは困難である。この問題を解決するためには、高塩濃度の環境中における放射性核種を浄化するための新規な修復材料の開発が必要となる。汚染土壌の浄化では、除染材料を地下水下流領域に広く投入する、いわゆる待ち受け設置方法が検討されており、経済的に非効率的である。除染材料を直接汚染土壌に輸送できれば、汚染の拡大を最小限に留めることができ、投入材料の量も少ないことから、浄化効果が高く経済的な手法となる。

そこで本研究では、日本と英国バーミンガム大学の研究者が協力し、英国の有する微生物などによる磁性物質生成付加技術、ゼオライトの孔径制御による吸着性能の高度化技術と日本側研究者の有する金属イオンを微生物が生成する鉱物に取り込む間接的な固定菌を探索する技術、及び親水基を付加して鉱物の流動性を向上する技術を用いて、海水や高塩環境からの放射性核種の除去及び土壌中汚染箇所への吸着材の直接輸送を可能とする。そのため、微生物を直接港湾内に添加することにより、海水中の放射性核種濃度を低減させ、港湾底土中に長期間留めておく新たなバイオ手法の確立を目指して、海水中で放射性核種を除去できる菌の探索、磁性物質を付加することによる微生物及び鉱物の拡散性を抑える技術、及び土壌間隙中を流動しやすい除去材料を開発する。

具体的には、金属イオンを直接細胞上に固定する菌あるいは微生物の生成する鉱物に取り込む菌を探索する。探索した微生物から海水条件で鉱物を生成する菌種を選択する。さらに、探索した菌種あるいは菌種群による海水からの放射性核種の回収能を明らかにする。また、土壌間隙中の流動性向上のため、ゼオライト、カルサイト粒子などの細粒化と、凝集による沈殿を阻害する性能向上のために細粒化した粒子に親水基を付加する。さらに、取り込まれた放射性核種の化学状態を明らかにする。これらの結果から、港湾内の海水中及び高塩濃度の濃縮汚染水が漏出した地下水中の放射性核種を効率的に浄化する材料を開発する。

これら一連の研究・開発により安全かつ迅速な地下水や海水からの放射性核種の回収を実現することが本研究の最終的な目標であり、これは福島第一原子力発電所事故によ

る社会的・経済的な損失を低減させることにつながるものである。

1.2 研究概要

福島第一原子力発電所において港湾内や地下水中に漏出した汚染水は、速やかに浄化し環境への影響を最小限に留めなくてはならない。しかし、一方で、港湾内の放射性核種の浄化における問題点は、濃縮汚染水や海水などの塩濃度が高い水溶液に放射性核種が溶けていることである。高塩条件では通常の地下水中で有効であるスメクタイトなどの吸着効率が非常に低下する。このような問題については、高塩濃度の水溶液中で活性がある好塩菌を用いるバイオ手法による解決策が有効であると考えられるが、これまでのバイオ技術で用いる海水をくみ上げてバイオリアクターで処理する方法は、二次廃棄物の発生を排除できないため、現地での浄化に用いることは困難である。

そこで本研究では、海水や高塩環境からの放射性核種の除去を達成するため、金属イオンを微生物の生成する鉱物(バイオ鉱物)に取り込む間接的な固定菌を探索する技術を用いて、海水や高塩環境から海水、底泥、排水などからバイオ鉱物として炭酸塩鉱物(カルサイト)とリン酸塩鉱物(アパタイト)を生成する好塩性微生物をスクリーニングし、特定する。さらに、バイオ鉱物による Sr 及び Co の回収能を明確化する。土壤中汚染箇所へのバイオ鉱物やゼオライトの直接輸送を可能とするため、ゼオライト、カルサイト粒子などの細粒化と、凝集による沈殿を阻害するために細粒化した粒子に親水基を付加することによる、土壌間隙中の流動性を向上させた材料の開発を目指す。一方、取り込まれた放射性核種の化学状態を明らかにするため、放射光施設における X 線吸収微細構造分析や電子顕微鏡などの最先端分析法により分析を行い、取り込みによる化学状態の変化や存在位置及び存在形態の明確化を図る。以上の結果をとりまとめ、港湾内の海水中及び高塩濃度の濃縮汚染水が漏出した地下水中の放射性核種を効率的に浄化するための有効な浄化材料を開発する。

日英の機関が協力して行う研究項目と担当する機関を図 1.2-1 に示す。

カルサイト及びアパタイトを生成する菌種あるいは菌種群の特定を図るとともに、高度に Sr 及び Co を濃集するカルサイト生成好塩菌及びアパタイト生成好塩菌を探索した。そのため、海水や高塩環境から海水、底泥、排水などを採取し、好塩性微生物を集積培養した。培養した微生物から海水条件でアパタイト及びカルサイトを生成する菌種を探索し、特定した。バイオ鉱物生成時における Sr 及び Co の回収能の明確化のため、カルサイト生成菌種あるいは菌種群による海水からの Co の回収能の明確化及び高度に Sr を濃集するカルサイト生成好塩菌種あるいは菌種群による海水からの Sr の回収能の明確化並びにバイオアパタイトの Sr の回収能の明確化を図った。さらに、大量培養の可能性を明らかにするため、5L リアクター及び 100L タンクにおいて KW3b 株を培養した。バイオカルサイトの Co 及び Sr の回収能を評価するとともに、バイオアパタイトの Sr 及び Co の回収能を評価した。さらに、英国側が作製した磁性体を付加した条件で微生物を培養

し、Sr 及び Co の回収能を評価した。

流動性向上技術の確立では、ゼオライト粒子及びカルサイト粒子の土壤空隙中における流動性の向上を図るため、細粒化したゼオライト及びカルサイト粒子に親水基を付加する試験を実施した。さらに、細粒化したゼオライト及びカルサイト粒子の流動性を評価するため、カラム試験を実施した。また、親水基付加の吸着への影響を調べるため、Co 及び Sr を吸着する試験を実施した。最先端分析法による化学状態分析では、海水に溶解した Sr 及び Co がバイオアパタイト及びバイオカルサイトにそれぞれ取り込まれることによる化学状態の変化の明確化を図るため、放射光施設における X 線吸収微細構造分析などにより解析した。さらに、海水からバイオアパタイト及びバイオカルサイトにそれぞれ取り込まれた Sr 及び Co の存在位置及び存在形態の明確化を図るため、Sr 及び Co を取り込んだバイオカルサイト試料及びバイオアパタイト試料を電子顕微鏡により観察するとともに、電子顕微鏡付属の元素分析装置により元素組成を分析した。また、研究推進として英国、ロンドンで開催された「Japan-UK Nuclear Research Collaboration Symposium 2015」、Goldschmidt2015、「UK-Japan Technology Showcase For Fukushima Daiichi NPS」において進捗状況を報告するとともに英国バーミンガム大学研究員と研究の進捗について討議した。さらに、英国バーミンガム大学研究員を受け入れ、研究の推進に関する討議を行った。

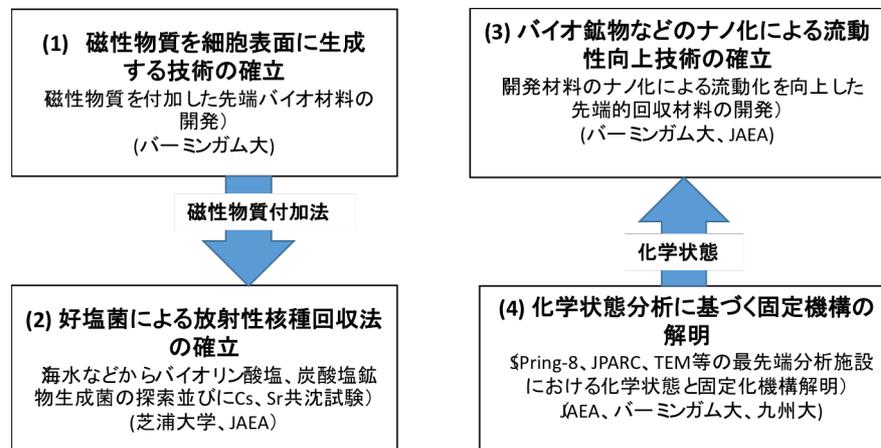


図 1.2-1 日英協力を進めるための研究項目と担当する機関

2. 業務計画

2.1 全体計画

本業務の全体計画図を図 2.1-1 に示す。

区分	26		27		28	
	前期	後期	前期	後期	前期	後期
(1)好塩菌による放射性核種回収法の確立						
①カルサイト生成好塩菌の特定 (芝浦工大)		←				→
②バイオカルサイト生成時におけるSr及びCoの回収能の明確化		←				→
1)バイオ鉱物生成菌の育成条件の明確化(芝浦工大)			←			→
2)Sr及びCoの回収能の明確化(原子力機構)		←				→
(2)バイオ鉱物などのナノ化による流動性向上技術の確立						
①ゼオライト粒子及びカルサイト粒子の土壌空隙中における流動性の向上(原子力機構)		←				→
(3)最先端分析法による化学状態分析						
①化学状態の変化の明確化(原子力機構)		←				→
②電子顕微鏡分析によるSr及びCoの存在位置及び存在形態の明確化(九州大学)		←				→
(4)研究推進		←				→

図 2.1-1 全体計画図

3. 業務の実施内容及び成果

3.1 好塩菌による放射性核種回収法の確立 (H26～H28)

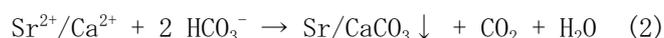
微生物が生成する炭酸カルシウム鉱物（カルサイト）やリン酸カルシウム鉱物（アパタイト）は、バイオ鉱物（バイオカルサイト、バイオアパタイト）と称される。バイオ鉱物を用いた地下水や土壌中の放射性 Sr の共沈や吸着による浄化の研究などが進められている [1-4]。一方、海水（塩濃度 3%）など高塩濃度条件下における放射性 Sr の微生物の代謝物による浄化の研究はほとんど行われていない。本研究の目的は、高塩濃度条件下においてバイオ鉱物を生成する微生物の獲得と、溶存ストロンチウム（Sr）をバイオ鉱物中に固化する新規の放射性核種回収方法を確立することである。

本業務では、福島における環境修復及び世界規模で問題になっている原子炉の廃炉や廃棄物処分に伴う環境浄化における問題点を解決するため、バイオ鉱物による Co 及び Sr の回収を可能にする新規の修復材料を開発する。そこで高塩濃度の水溶液中でバイオ鉱物（カルシウム炭酸塩鉱物、カルシウムリン酸塩鉱物）生成菌を探索、同定することを目的とする。以下に 3 ヶ年計画の 3 年間の業務実績を述べる。

3.1.1 耐塩性カルシウム炭酸塩鉱物生成菌の特定（再委託先：芝浦工業大学）

(1) 目的

バイオ鉱物の一種であるバイオカルシウム炭酸塩鉱物は、微生物が産生するウレアーゼによって尿素が加水分解されてできた炭酸イオンと溶液中の Ca イオンが結合することで生成される（反応式 1、2） [1、5]。カルシウム炭酸塩鉱物（以下カルサイト）生成の際に、溶存 Sr イオンは炭酸イオンと結合し、炭酸ストロンチウムとしてカルサイトと共沈し溶液中から除去される（反応式 2）。



本項では耐塩性カルサイト生成微生物を分離し、Sr 除去を可能にする新たな修復材料の開発を目指した。そのために Sr 除去能の高い微生物を分離同定した。

(2) 試験方法

a) 海洋性環境試料

カルサイトを生成する菌種あるいは菌種群の特定を図るため、微生物の分離源として、東京湾（7ヶ所）、鹿児島湾（4ヶ所）の計 11ヶ所から海底泥を採取した。環境試料を滅菌生理食塩水（NaCl 0.9% (w/v)）により 10% (w/v) に希釈し、ポルテックスにより混合した。これらの環境試料希釈液をスクリーニングに用いた。

b) 培地

カルサイトを生成する菌種あるいは菌種群の特定を図る実験では、微生物の分離には 10 倍に希釈した Marine Broth 2216 (MB ; 3.74 g/L) (Becton Dickinson and Company, MD, USA) をオートクレーブ滅菌 (121°C、15 分) した後に培地中に生じた不溶性成分を無菌的にフィルターろ過 (0.45 μ m pore size, Corning, NY, USA) で除去して、NaCl (30 g/L) 及び尿素 (20 g/L) を添加した培地 (pH 7.6) を基本培地として用いた。ウレアーゼ産生微生物の分離には、pH 指示薬の Phenol red (12 mg/L) を基本培地に添加した分離用平板培地を用いた。分離株の性状解析には、LB Miller (25 g/L、pH 7.6) (Becton Dickinson and Company) の液体培地 (LB) 及び平板培地 (LA) を用いた。各種平板培地は、寒天 (15 g/L) を添加して調製した。液体培地では 120 rpm で振とう培養を、平板培地では静置培養を共に 30°C で行った。

c) ウレアーゼ産生微生物の探索

高塩濃度下でウレアーゼ活性を示す微生物を分離するため、尿素的加水分解 (アンモニウムイオンの生成) による培地の pH 上昇 (反応式 1) を可視化できる分離用平板培地を用いてスクリーニングを行った。培地の pH 変化は Phenol red の呈色反応 (pH 6.6 で黄色、pH 8 以上で赤色) を利用して検出した。希釈された環境試料溶液 (20 μ L) を分離用平板培地に塗抹し、コロニーが出現するまで 30°C で静置培養した。分離用平板培地上のコロニー周辺に赤色ハローの有無により、その微生物のウレアーゼ活性の有無を判別した。出現したコロニーのうち、赤色ハローを形成した株を新しい分離用平板培地に継代培養した。継代培養を 2 回繰り返した後、赤色ハローの再現性が得られた株をウレアーゼ産生候補株とした。

d) ウレアーゼ活性試験

ウレアーゼ活性の評価では、反応生成物であるアンモニウムイオン (NH_4^+) 濃度の上昇の高い微生物をウレアーゼ高活性微生物とした。培地上清中の (NH_4^+ 濃度は、水質測定試薬セット (Kyoritsu Chemical-Check, Tokyo, Japan) を使用し、インドフェノールブルー吸光光度法により測定した。さらに、生菌数はコロニーカウント法により測定した。培養液の 10 倍希釈系列を作製し、寒天培地を用いた平板塗抹法により、30 °C で 3 日培養後の colony forming unit (cfu/mL) で評価した。

e) Sr 高度除去能菌株の探索

Sr 除去能の高い微生物の分離では、 SrCl_2 溶液を基本培地に添加して Sr 終濃度 1.0 mmol/L に調製した培地を用いた。候補株のコロニーを 20 mL ガラス試験管内の基本培地 (10 mL) に白金耳を用いて無菌的に植菌し、前培養 (30°C、120 rpm、12 時間) した。125 mL 三角フラスコ内の試験用培地 (50 mL) に光学濃度 (O.D. 660) = 0.04 となるように前培養液を植菌し、本培養 (30°C、120 rpm、Sr 1.0 mmol/L) した。本培養液を適時に採取し、遠心分離 (2、1000 $\times g$ 、4.0°C、15 分) により上清及び沈殿物に分画した。得られた上清をフィルター (0.2 μ m pore size, KURABO, Osaka,

Japan) を用いてろ過し、分析用試料とした。沈殿物を菌体観察及び固体分析の試料とした。候補株を接種していない基本培地を同条件下におけるコントロールとした。

f) 分離株の生化学的特徴試験

カルサイト生成好塩菌の生化学的特徴づけのため、LB 培地で一晚培養した各菌株を LA 平板培地に植え継ぎ、そのコロニーを用いて形態観察及び生理・生化学的性状試験を行った。光学顕微鏡を用いたコロニーの形態観察及びグラム染色ならびに生育温度試験を行い、Barrow 及び Feltham [6] の方法に従いカタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、及びグルコースからの酸産生/ガス産生、グルコースの酸化/発酵 (O/F) について試験した。細菌同定検査用キット API 50CHB (bioMérieux, Lyon, France) を使用し炭素源及び窒素源の資化性、糖の酸化/発酵性ならびに酵素活性などを試験した。The National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria, Ltd. (<http://www.ncimb.com/>) の手法に従い、嫌気培養及び高塩濃度 (7.0% NaCl) での培養ならびにカゼイン、でんぷん及び脂質の加水分解能を試験した。

g) 分子生物学試験

分離株の属種を同定するために、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。MB で 3 日培養された分離株を遠心分離 (21,000 ×g, 4.0°C, 5 分) により集菌し、0.9%滅菌生理食塩水を用いて 2 回洗浄した。分離株菌体からゲノム DNA を ISOPLANT (Nippon Gene, Tokyo, Japan) のプロトコルに従って抽出した。16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅は、抽出したゲノム DNA を鋳型に、9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') のプライマーセットと、GO Taq Green Master Mix (Promega, Tokyo, Japan) を用い 95°C で 5 分保持後、次の条件を 30 サイクルで行った；変性 (95°C, 1 分)、アニーリング (56°C, 1 分)、伸長 (72°C, 1 分)。この反応は PCR 増幅装置 Mastercycler (Eppendorf, Tokyo, Japan) を用いて行った。増幅された DNA を Wizard SV gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて PCR 反応液から精製した。16S rRNA 遺伝子塩基配列は、精製 DNA を鋳型として複数のプライマー (9F、515F (5'-GTGCCAGCAGCCGCGGT-3')、1115R (5'-AGGGTTGCCG-TCGTTG-3')、1541R) を用いて Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) により決定し、解析した。明らかにした塩基配列を DNA data bank of Japan (DDBJ) に登録した。

分離微生物の系統樹作成のため、NCBI の提供する BLAST [7] (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Bla-st.cgi>) を用いて分離株の 16S rRNA 遺伝子配列の相同性検索を行い、分離株の近縁種を推定した。高い相同性を示した菌種の塩基配列を基に、CLASTAL W 及び系統樹作成ソフト Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA5.0) を用いて neighbor-joining method [8] に従い系統樹を作成した。

ゲノム解析では、寒天培地上で培養した候補株のコロニーを、白金耳を用いて無

菌的に 5.0 mL の基本培地に植菌し、振とう培養 (30 °C、120 rpm、12 時間) した。培養液を遠心分離 (3,000 × g、4.0°C、5 分) して回収した菌体から ISOPLANT を用いてゲノム DNA を抽出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて精製した。Illumina HiSeq 2500 (Illumina, CA, USA) を用いたペアエンド法によりシーケンシングを行った。得られた配列はトリミングを行い、Velvet (<http://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet/>) を用いた *de novo* アセンブルからドラフト配列を得た。得られたゲノム情報から BLAST によりウレアーゼ関連遺伝子を検索し、アミノ酸レベルで相同性 60%以上、E 値 1E-4 以上、スコア 100 以上を目安として、候補株が有するアミノ酸配列を選出した。

(3) 結果及び考察

a) Sr 回収能を有するカルシウム炭酸塩鉱物生成微生物の分離

カルサイトを生成する菌種あるいは菌種群の特定を図る試験より、海底泥サンプルからウレアーゼ産生微生物の分離を試みた結果、分離用平板培地上で赤色ハロー (図 3.1-1) を形成した 8 個のコロニーを得た。これらのコロニーが継代培養の間に赤色ハローを繰り返し形成したことから安定してウレアーゼを産生する候補株と考えた。

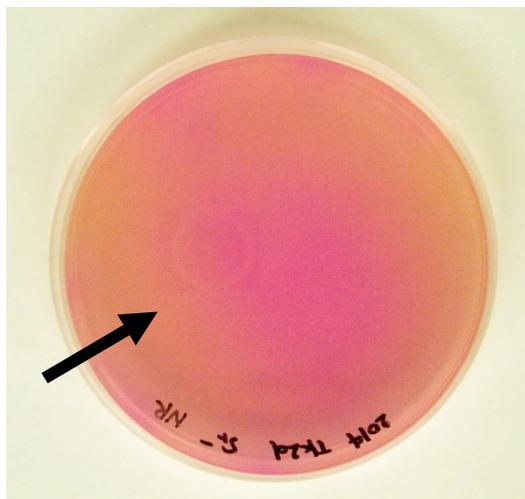


図 3.1-1 分離用平板培地の赤色ハロー

これらの微生物候補株が Sr 固化物を生成するかどうかを調べるために、候補 8 株の培養液中における溶存 Sr の濃度を経時的に測定した。培養 12 日の各培養液中の溶存 Sr の濃度は初発濃度の 1.0 mmol/L から、TK2a 株では 0.7 mmol/L、TK2b 株では 0.6 mmol/L、TK2d 株では 0.1 mmol/L、TK4c 株では 0.6 mmol/L、まで減少した (図 3.1-2)。その他の 4 株 (TK2c、TK4a、TK4b、TK4d) では、ネガティブコントロールと同様にほとんど溶存 Sr の減少が見られなかった。これら 4 株は分離用平板培地

では赤色ハロー（pH 上昇）を示したが、この pH 上昇は尿素分解反応によるものではなく、他の代謝反応により塩基性物質を生成したためではないかと考えられる。そして、尿素の分解が出来なかったために、この 4 株はカルサイトを生成せず溶存 Sr を減少しなかったと考えられる。溶存 Sr の減少を示した 4 株のうち、12 日で最も溶存 Sr の減少量が大きい TK2d 株に注目し、再現性試験を行った（図 3.1-3）。TK2d 株は、溶存 Sr を初発濃度の 1.0 mmol/L から培養 3 日に 0.03 mmol/L まで、培養 5 日に 0.01 mmol/L まで減少した。Sr 初発濃度を 100% と考えると、TK2d 株は 5 日で 99.3% の溶存 Sr を培養液から除去したことになる。また、MB 由来の溶存 Ca 濃度も、添加した溶存 Sr 濃度と同様の減少傾向を示した（図 3.1-3）。培養液の pH は、初期の pH 7.6 から培養 3 日に pH 7.8 にまで上昇し、培養 5 日まで同じ pH が保たれていた。

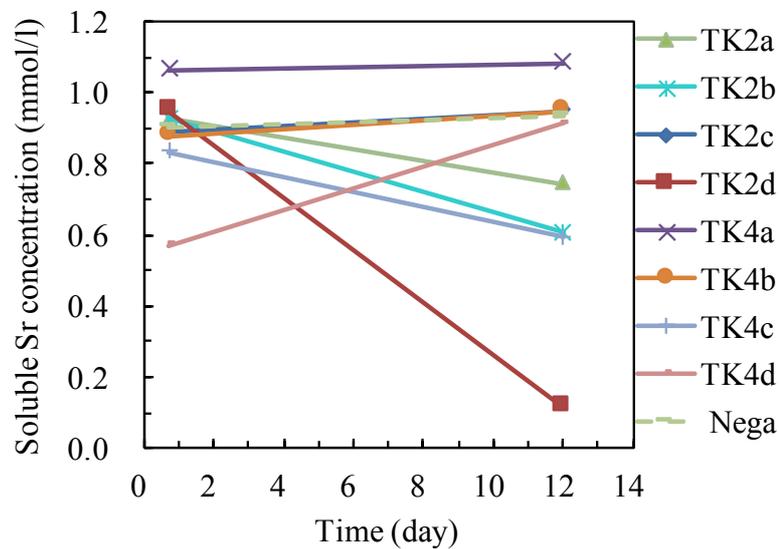


図 3.1-2 候補株による Sr 除去試験結果

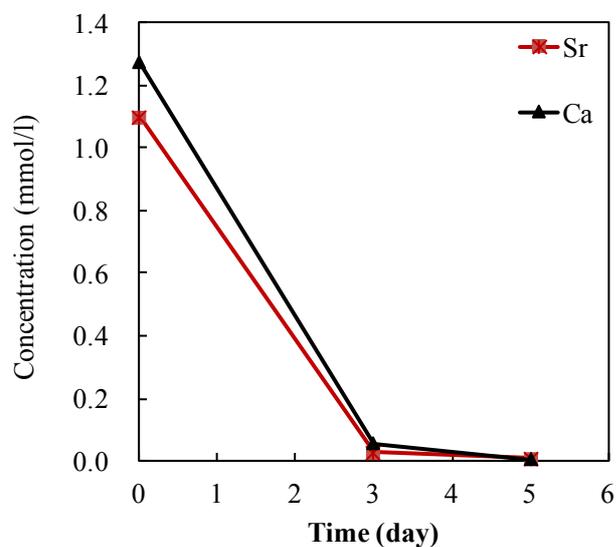


図 3.1-3 TK2d 株の Sr 除去試験における溶存 Sr 及び溶存 Ca 濃度の経時変化

以上の結果から、TK2d 株は NaCl 濃度 3 %の条件下において、Sr 初発濃度が 1.0 mmol/L の場合、培養 5 日で 99.3% (0.99mmol/L) の溶存 Sr を培養液中から除去し、biotic Sr-Ca coprecipitate として回収可能な株であることを見出した。

MB 培地中の不溶性成分が Sr の吸着に及ぼす影響を調べるため、オートクレーブ後に培地に生じる不溶性成分をフィルターにより除去した MB (ろ過済み MB) を用いて、TK2d 株の Sr 除去試験の再試験を行った。溶存 Sr 濃度は、初期濃度 1.2 mmol/L から培養 5 日に 1.0 mmol/L にまで緩やかに減少し、培養 6 日で 0.3 mmol/L にまで急速に減少し、培養 9 日までに 0.03 mmol/L にまで緩やかに減少し、その後溶存 Sr の減少は平衡に達した (図 3.1-4)。この結果から、TK2d 株は、ろ過済み MB において培養 9 日までに初発濃度の 97.6% (1.17 mmol/L) にあたる溶存 Sr を培養液中から除去した。MB 由来の溶存 Ca 濃度は溶存 Sr 濃度と同様の減少傾向を示し、培養 9 日までに 0.14 mmol/L に減少した。これは初発濃度の 94.6% (1.06 mmol/L) にあたる。フィルターろ過していない MB を用いた Sr 除去実験 (図 3.1-3) では、培養 3 日までに初発溶存 Sr の濃度の 99.3% 除去したことから、ろ過済み MB を用いた本実験では除去にかかる日数が 6 日も長かった。これは、MB 中の不溶化成分が TK2d 株の Sr 除去に大きく関与していることが考えられた。

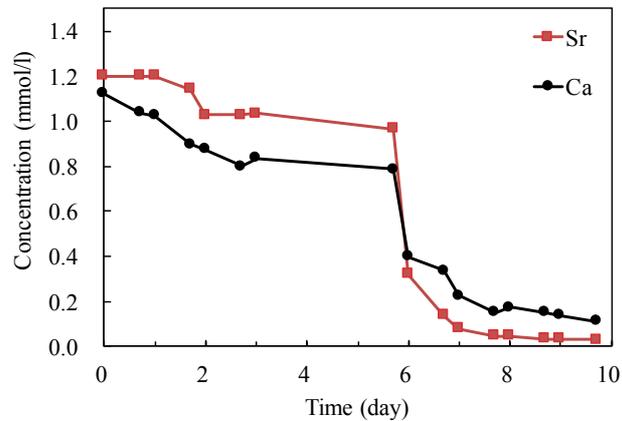


図 3.1-4 ろ過済み MB を用いた TK2d 株の Sr 除去試験結果

b) Sr 高度回収微生物の分離

先行研究で取得した TK2d 株よりも短い培養時間で溶存 Sr を除去するために新しい微生物の分離を新しい環境サンプル（鹿児島湾）を用いて試みた。まず、Phenol red で強く赤色に呈色する（ウレアーゼ活性を示す）微生物を分離用平板培地で分離したところ、7 種類の候補株を得た。次に、候補株を用いて溶存 Sr 除去試験を行った結果、5 株（KW1a、KW3b、KW7、KW8b、KW9a）が溶存 Sr 除去能を示した（図 3.1-5）。特に KW3b 株は培養 2 日で 93%の溶存 Sr を除去し、分離株のうち最も短い培養日数で高い Sr 除去能を示した。LA 上で培養した KW3b 株のコロニーの観察から、一方は乳白色、他方は淡黄色と形態の異なる 2 種類が見られたことにより、KW3b 株には 2 種類の菌株が混在していることがわかった。この 2 種類の菌株を平板培地から単離して、それぞれ KW3b1 株及び KW3b2 株とした。KW3b1 株及び KW3b1 株を用いて TK2d 株との溶存 Sr 除去能の比較試験を行った（図 3.1-6）。その結果、KW3b1 株及び KW3b2 株はともに溶存 Sr を培養 1 日で 98%除去したことから、TK2d 株（培養 2 日、88%）よりも優れた Sr 除去能を示す微生物であることがわかった。以上のことから、短時間の培養で 98%の溶存 Sr を固化沈殿により除去できる KW3b1 株と KW3b2 株を分離することに成功した。

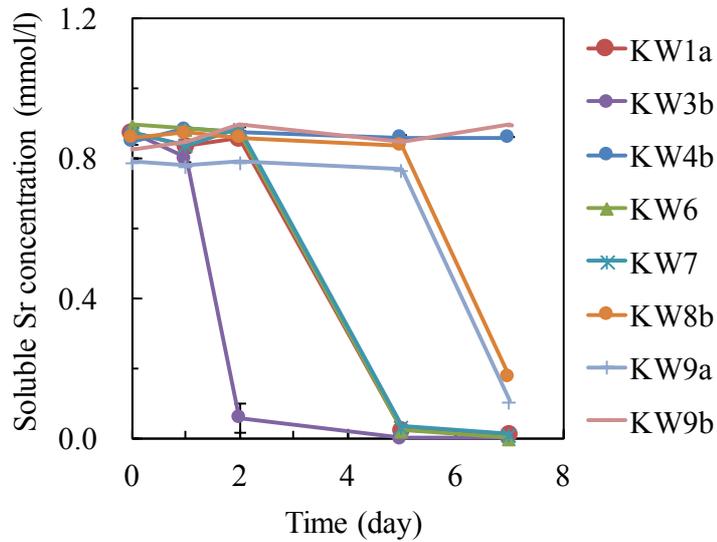


図 3.1-5 鹿兒島湾環境試料から分離したウレアーゼ産生微生物の培養時における溶存 Sr 濃度

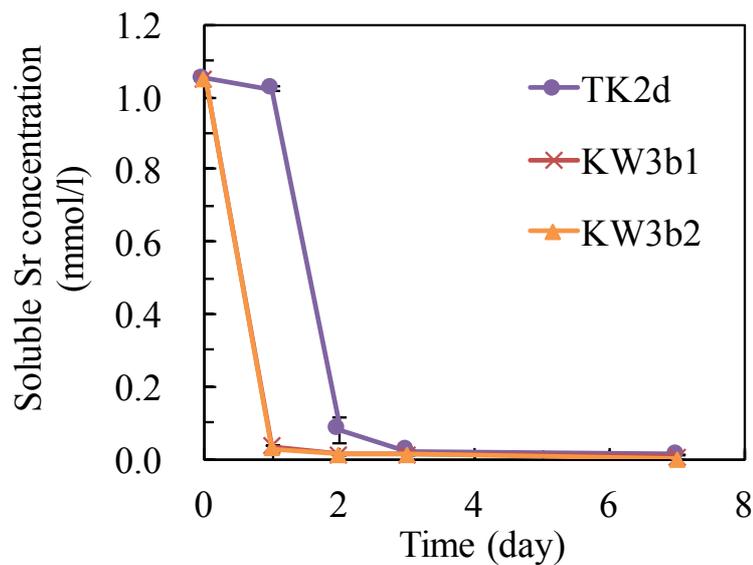


図 3.1-6 TK2d 株、KW3b1 株及び KW3b2 株の培養時における溶存 Sr 濃度

c) 分子生物学的解析

3 株の分離株の分類と同定を以下の様に行った。TK2d 株の詳細な細胞形態を観察した。TK2d 株の細胞は、桿状で長径 1.5–2.5 μm 、短径 0.9–1.0 μm 、グラム染色陰性、芽胞を形成し、運動性が見られた。表 3.1-1 に形態学的特徴と増殖特性をまとめた。TK2d 株の 16S rRNA 遺伝子のうち 1463 残基の部分配列を明らかにした (DDBJ 登録番号: LC034238)。TK2d 株の塩基配列を BLAST 検索したところ、*Bacillus humi* LMG 22168 の 16S rRNA 遺伝子と 96.3%、*Bacillus luteolus* YIM 93174 と 93.9%、*Bacillus*

galliciensis BFLP-1 と 93.1%の相同性を見出した。系統樹解析の結果、TK2d 株が *Bacillus* 属に属し *B. humi* に近縁であることを明らかにした (図 3.1-7)。生理学試験の結果、TK2d 株はアルブチン、エスクリン及びサリシンを発酵せず、 β -ガラクトシダーゼ及びウレアーゼ活性を持ち、硝酸塩を還元しなかったが (表 3.1-2)、これらの項目について TK2d 株と *B. humi* の異なることが見られた [14, 15]。最も相同性の高かった *B. humi* LMG 22168 は、長径が 4.0-7.0 μm 、短径が 0.7-0.9 μm の桿菌で、オランダの Drentse A 農業研究エリアの土から分離され、温度 30°C・pH 7.0-9.0・NaCl 濃度 7.0%で増殖が可能であり、ウレアーゼ活性が陰性であった [14]。以上の結果、TK2d 株を *Bacillus* sp. TK2d と命名した。

分離株のうち最も優れた Sr 除去能を示した KW3b2 株の細胞形態の解析を行った (表 3.1-1)。KW3b2 株の細胞は、桿状で大きさが長径 1.5-2.5 μm 、短径 0.7-0.8 μm 、グラム染色陰性、芽胞を形成し、運動性が見られた (表 3.1-1)。LB 培地上の KW3b2 株のコロニーは、円形で直径 2.0-3.0mm、淡黄色、半球状に隆起し、粘性があった (表 3.1-1)。KW3b2 株の 16S rRNA 遺伝子のうち 1431 残基の部分配列を明らかにした (DDBJ 登録番号: LC129221)。KW3b2 株の塩基配列を BLAST 検索したところ、*Sporosarcina soli* I80 の 16S rRNA 遺伝子と 99.3%、*Sporosarcina contaminans* CCUG 53915 及び *Sporosarcina ginsengisoli* Gsoil 1433 と 99.0%の相同性を認めた。KW3b2 株と同一環境試料から分離された KW3b1 株の 16S rRNA 遺伝子のうち 1423 残基を明らかにした (DDBJ 登録番号: LC129220)。KW3b1 株及び KW3b2 株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を比較したところ、100%の相同性を見出したことから両株は同一種であると推定した。系統樹解析の結果 (図 3.1-8)、KW3b1 株及び KW3b2 株が *Sporosarcina* 属に属し *S. soli* I80 に近縁であることを明らかにした。生理学試験の結果、グルコース及び D-マンニトールを酸化し、ゼラチン、カゼイン及び脂質を加水分解するなどの KW3b2 株の特性が *S. soli* やその他の *Sporosarcina* 属の細菌の特性と異なることが見られた (表 3.1-2) [15-18]。以上の結果、KW3b1 株及び KW3b2 株をそれぞれ *Sporosarcina* sp. KW3b1 及び *Sporosarcina* sp. KW3b2 と命名した。

表 3. 1-1 分離株の形態学的特徴と増殖特性

試験項目	TK2d	KW3b2
細胞		
形状	桿状	桿状
大きさ (μm)	0.9-1.0×1.5-2.5	0.7-0.8×1.5-2.5
グラム染色	—	—
芽胞の有無	+	+
運動性	+	+
コロニー		
直径 (mm)	2.0-3.0	2.0-3.0
色調	淡黄色	淡黄色
形	円形	円形
隆起状態	レンズ状	半球状
周縁	全縁	全縁
表面形状	なめらか	なめらか
透明度	不透明	不透明
粘稠度	バター様	バター様
増殖温度		
30℃	+	+
37℃	+	+w
45℃	—	—
増殖NaCl濃度		
0.3% (w/v)	+	+
3.0% (w/v)	+	+
10.0% (w/v)	+	+w
嫌気培養	+w	—
+ : 陽性、+w : 弱陽性、— : 陰性		

表 3.1-2 分離株の生理・生化学的特性

試験項目	TK2d	KW3b2	試験項目	TK2d	KW3b2
酸化性試験			酸化性試験		
グリセロール	-	-	キシリトール	-	+
エリスリトール	+	-	ゲンチオビオース	-	-
D-アラビノース	-	-	ツラノース	-	-
L-アラビノース	+	-	D-リキソース	-	-
リボース	+	+	D-タガトース	-	-
D-キシロース	+	-	D-フコース	-	-
L-キシロース	-	-	L-フコース	-	-
アドニドール	-	-	D-アラビトール	-	+
β-メチル-D-キシロース	+	-	L-アラビトール	-	-
ガラクトース	-	-	グルコネート	-	-
グルコース	+	+	2-ケトルグルコネート	-	-
フラクトース	+	+	5-ケトルグルコネート	+	+
マンノース	-	-	生化学試験		
ソルボース	-	-	β-ガラクトシダーゼ	+	-
ラムノース	-	-	アルギニンジヒドロゲナーゼ	-	-
ズルシトール	-	-	リシンデカルボキシラーゼ	-	-
イノシトール	-	-	オルニチンデカルボキシラーゼ	-	-
マンニトール	+	+	クエン酸利用	-	-
ソルビトール	-	-	硫化水素産生	-	-
α-メチル-D-マンノシド	-	-	ウレアーゼ	+	+
α-メチル-D-グルコシド	+	-	トリプトファンデアミナーゼ	-	-
N-アセチルグルコサミン	+	-	インドール産生	-	-
アミグダリン	-	-	アセトイン産生	-	-
アルブチン	-	-	ゼラチナーゼ	-	+
エスクリン	-	-	硝酸塩還元	-	-
サリシン	-	-	カタラーゼ反応	+	+
セロビオース	-	-	オキシダーゼ反応	+	+
マルトース	+	-	カゼイン加水分解	-	+
ラクトース	+	-	でんぷん加水分解	-	-
メリビオース	-	+	脂質 (Tween 80) 加水分解	+	+
スクロース	+	-	酸/ガス産生試験		
トレハロース	+	-	グルコース	-/-	-/-
イヌリン	+	-	酸化/発酵試験		
メレチトース	-	-	グルコース	-/-	-/-
ラフィノース	-	-			
でんぷん	+	-			
グリコーゲン	-	-			

+: 陽性、-: 陰性

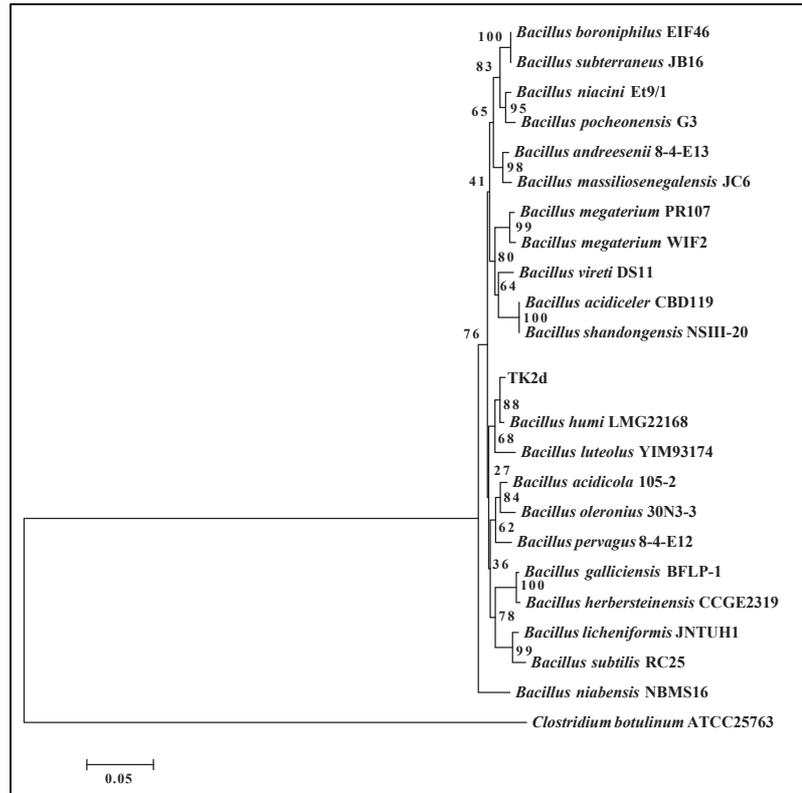


図 3.1-7 *Bacillus* 属及び TK2d 株の 16S rRNA 遺伝子領域に基づいた系統樹

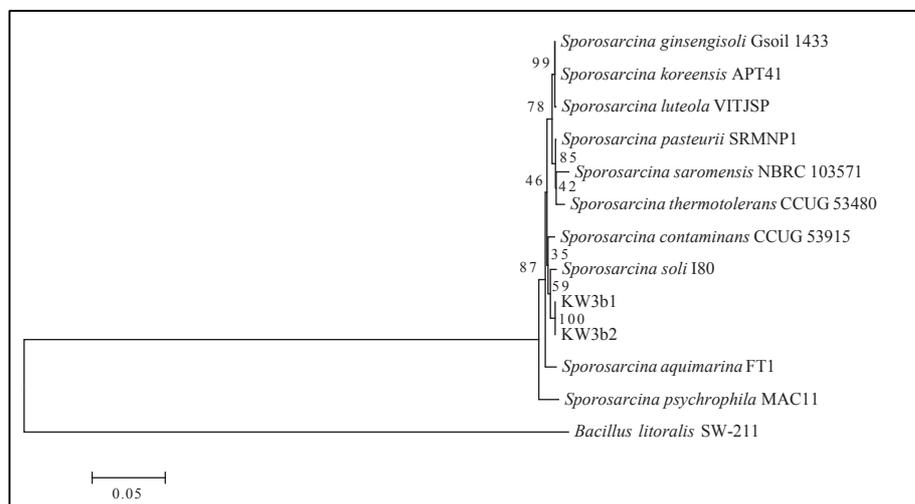


図 3.1-8 *Sporosarcina* 属及び KW3b1 株と KW3b2 株の 16S rRNA 遺伝子領域に基づいた系統樹

次世代シーケンサーを用いたペアエンド法により KW3b2 株のゲノム DNA 塩基配列を決定・解析した結果、合計 23,428,306 bp のリードデータを得た。このリードデータをトリミングし、アセンブルを行ったところ、53 のコンティグからなる 3、

901、425 bp のゲノムコンティグ配列を得た。BLAST 検索を用いて得られたゲノム配列から既知のウレアーゼ関連遺伝子と相同性を示す配列を調べた結果、相同性 60% 以上、E 値 1E-4 以下及びスコア 100 以上の値を示した配列群は 20 群であった。このうち 12 群は同じコンティグ内の 6,000 bp 程度の遺伝子領域に存在していたことから、同遺伝子領域の Open reading frame (ORF) を検索した。その結果、7 領域の ORF が存在し、それぞれ 7 種のウレアーゼ関連タンパク質のアミノ酸配列と高い相同性を示した (表 3.1-3)。各 ORF は *Lysinibacillus sphaericus* 由来のウレアーゼ関連タンパク質のアミノ酸配列と最も高い相同性を示し、その他に *Lysinibacillus fusiformis* や *S. koreensis*、*S. pasteurii*、*Bacillus shacheensis* 由来の同タンパク質のアミノ酸配列とも高い相同性を示した。これにより各 ORF の遺伝子領域をそれぞれウレアーゼ関連遺伝子のうち 3 つの構造遺伝子 (*ureA*、*ureB*、*ureC*) 及び 4 つのアクセサリ遺伝子 (*ureD*、*ureE*、*ureF*、*ureG*) であると推定した (表 3.1-3)。ウレアーゼ関連遺伝子と推定される KW3b2 株の 7 領域の ORF が 5,384 bp の遺伝子配列上に連続して存在していることを明らかにした (図 3.1-9)。KW3b2 株の近縁種である *S. pasteurii* のウレアーゼ関連遺伝子はウレアーゼオペロンを構築しており、その完全長が決定されている [19]。KW3b2 株のウレアーゼ関連遺伝子群は、*S. pasteurii* のウレアーゼオペロンの構造遺伝子 (*ureA*、*ureB*、*ureC*) 及びアクセサリ遺伝子 (*ureD*、*ureE*、*ureF*、*ureG*) と同じ構成であり、さらに遺伝子領域の上流から下流までの順番も同じであることから、ウレアーゼオペロンを構築していると強く示唆される。以上の結果、KW3b2 株が既知の *Sporosarcina* 属の細菌と類似したウレアーゼ産生能を持つと考えられる。KW3b2 株はウレアーゼにより尿素を分解し、この反応で生成した炭酸イオンにより培養液中の溶存 Sr や溶存 Ca を固化沈殿していると推察できる。

表 3.1-3 KW3b2 株ゲノム DNA 上のウレアーゼ関連遺伝子における ORF 領域検索

ORF	length (bp)	putative gene	BLAST hit [Accession]	identity (%)
1	173	<i>ureA</i>	urease subunit gamma, <i>Lysinibacillus sphaericus</i> [WP010859212]	93.0
2	302	<i>ureB</i>	urease subunit beta, <i>Lysinibacillus sphaericus</i> [WP010859213]	84.4
3	1715	<i>ureC</i>	urease subunit alpha, <i>Lysinibacillus sphaericus</i> [WP010859214]	91.1
4	491	<i>ureE</i>	urease accessory protein, <i>Lysinibacillus sphaericus</i> [WP010859215]	65.9
5	689	<i>ureF</i>	urease accessory protein UreF, <i>Lysinibacillus sphaericus</i> [WP054549251]	72.3
6	601	<i>ureG</i>	urease accessory protein UreG, <i>Lysinibacillus sphaericus</i> [WP010859217]	86.5
7	767	<i>ureD</i>	urease accessory protein, <i>Lysinibacillus sphaericus</i> [WP010859218]	62.3

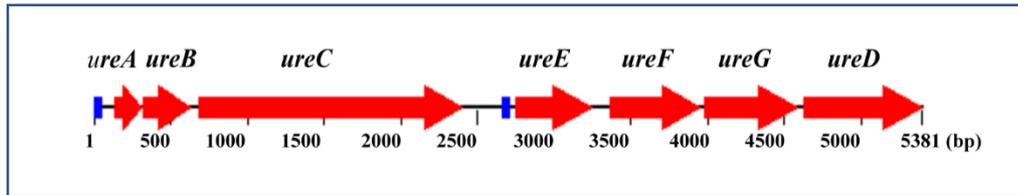


図 3.1-9 KW3b2 株が有するウレアーゼ関連遺伝子領域
赤矢印：ウレアーゼ関連遺伝子領域、青部分：プロモーター予測領域

(4) まとめ

本研究により得られた成果は以下の通りである。

海水と同塩濃度下で尿素を分解して炭酸カルシウム CaCO_3 を生成し、Sr 除去能を有する候補菌群を環境試料から分離した。H25 年度³には *Bacillus* sp. TK2d 株を、H26 年度には Sr の高い除去能を有する候補菌群 KW3b を選別した。さらに、KW3b から Sr 除去能を有する 2 株、KW3b1 株及び KW3b2 株の単離に成功した。これらの微生物は海水中の Sr 除去に有望な株である。

分子生物学的解析と形態学的解析の結果から、TK2d 株が *Bacillus* sp. であることを明らかにした。さらに、KW3b1 株及び KW3b2 株をそれぞれ *Sporosarcina* sp. KW3b1 株と、*Sporosarcina* sp. KW3b2 株に命名した。

KW3b2 株のゲノム DNA 解析の結果、本株は 7 種のウレアーゼ関連遺伝子を持つことが分かった。これらの推定アミノ酸配列は、*Lysinibacillus sphaericus* や *Sporosarcina* 属、*Bacillus* 属の細菌由来のウレアーゼ関連遺伝子とアミノ酸レベルで 60%以上の高い相同性を示した。

³ 本研究の前に実施された関連研究からの成果。

3.1.2 耐塩性カルシウムリン酸塩鉱物生成菌の特定 (再委託先：芝浦工業大学) (H27-H28)

(1) 目的

先行研究で分離したカルサイト生成細菌 (TK2d 株、KW3b1 株及び KW3b2 株) は溶存 Co 除去能を持たず、溶存 Co による増殖阻害も見られた。微生物由来のバイオ鉱物による重金属の吸着除去の報告は数多く存在するが、それらの大部分が培地中または地下水や湖沼などの淡水中での検討であり、海水のような高塩濃度下における検討は少ない。これらの理由から、Co の回収を高塩濃度下で可能にする新規なバイオ鉱物材料を創製するために、本研究ではスクリーニングの第一歩として海水または海底泥から好塩性あるいは耐塩性かつコバルト耐性を持つ微生物の分離を目指した。

カルサイト以外の鉱物を利用した放射性核種の除去手段として、燐灰石 (アパタイト) の利用が挙げられる [20]。燐灰石は構成元素の違いによってヒドロキシアパタイト $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$ やフロロアパタイト $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}]$ 、クロロアパタイト $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}]$ などがある。これらのアパタイトは結晶表面への吸着や構成元素の置換などにより、溶液中の重金属や放射性核種を除去すると報告されている [20]。また、微生物はリン酸化合物を酵素 (フォスファターゼ) を用いて加水分解してリン酸イオン (HPO_4^{2-}) を遊離させ (反応式 3)、培養液中の Ca と HPO_4^{2-} との反応によりアモルファス様のアパタイトを生成する (反応式 4) [4, 21]。この微生物由来アパタイト (バイオアパタイト) は、化学的に合成したアパタイトよりも溶存 Sr や Co の除去能が高いと報告されている [22]。しかし、これまでに高塩濃度下において微生物そのものやバイオアパタイトによる Co 浄化の報告はない。



本研究では高塩濃度条件において放射性 Co の浄化を可能にするバイオ鉱物による新規の修復材料の開発を目指す。Co は高い毒性があるので、Co 耐性微生物を分離する。次に、Co 耐性微生物のうち、リン酸化合物を加水分解してバイオアパタイトを生成し Co を沈殿 (アパタイトに吸着またはアパタイト構成元素と置換) する微生物を単離する。

(2) 試験方法

微生物の分離源として、東京湾 (TK、7 ヶ所)、福島県-茨城県沖 (FI、18 ヶ所) の計 25 ヶ所から海水及び海底泥を採取した。各環境試料を滅菌生理食塩水 (NaCl 0.9% (w/v)) により 10% (w/v または v/v) に希釈し、ボルテックスにより混合した環境試料希釈液をスクリーニングに用いた。

微生物の分離には、Marine Broth 2216 (MB; 37.4g/L) をオートクレーブ滅菌 (121°C、15 分) 後に培地中に生じた不溶性成分を無菌的にフィルターろ過 (0.45 μm pore

size) で除去して、CoCl₂ 溶液を添加して Co 終濃度 0.05 mmol/L に調製して分離用培地として用いた。分離用培地に寒天 (15 g/L) を加えたものを分離用平板培地とした。各種試験には、10 倍に希釈した MB をオートクレーブ滅菌 (121°C、15 分) 後に無菌的にフィルター (0.45 μm pore size) で濾過し NaCl (30 g/L) を加えて基本培地として用いた。

Co 除去試験には、基本培地に CoCl₂ 溶液 (終濃度 0.1 mmol/L)、SrCl₂ 溶液 (終濃度 1.0 mmol/L) となるように調製した培地を用いた。Sr 除去試験には、基本培地に SrCl₂ 溶液 (終濃度 1.0 mmol/L) となるように調製した培地を用いた。Co 除去微生物の分離には、Phenolphthalein Phosphate Agar Fluka 68879 (PPP; 28 g/L, pH 7.4, Sigma-Aldrich, USA) を人工海水 (Daigo' s artificial seawater SP, Nihon Pharmaceutical, Tokyo, Japan) に溶解した培地 (PPP 培地) を用いた。平板培地は各培地に寒天 (15 g/L) を添加して調製した。

a) Co 耐性微生物の分離

環境試料希釈液 (50 μL) を 20 mL ガラス試験管内の分離用培地 (5.0 mL) に接種し、振とう培養 (120 rpm、30°C) した。培養 5 日後の培養液 (50 μL) を新たな分離用培地 (5.0 mL) に接種し、継代培養した。その後、5-7 日ごとに継代培養を 5 回繰り返した。5 回目の継代培養液を分離用平板培地に塗抹し、形成されたコロニーを Co 耐性微生物の候補株とした。

寒天培地上でアルカリフォスファターゼ (ALP) 産生微生物が培地中の PPP を分解することで、そのコロニーやコロニー周辺の培地に Phenolphthalein が遊離する。そこにアンモニアガスを暴露すると、遊離した Phenolphthalein を含むコロニーや培地が赤色に呈色する。この呈色反応を利用して ALP 産生菌の検出及び単離を試みた。Co 除去能を有する候補株の培養液を PPP 培地に塗抹し静置培養 (30°C、5 日) した。培養後の PPP 培地をアンモニアガスに暴露し、赤色に呈色したコロニーを釣菌して新たな PPP 培地に塗布し継代培養した。継代培養後も再現良く赤色に呈色したコロニーを単離株として基本平板培地で培養し、使用するまで 4°C で保存した。

b) 分子生物学的解析

16S rRNA 遺伝子の塩基配列の決定及び系統樹の作成は、カルシウム炭酸塩鉱物生成菌の場合と同一方法で行った。

(3) 結果及び考察

a) 海洋環境試料からの Co 耐性微生物の分離と Co 高除去能微生物の探索

分離用平板培地 (Co 0.05 mmol/L) を用いたスクリーニングの結果、Co 耐性能を示した 73 の候補菌群を分離した。これらの候補菌群を用いて Co 除去試験で除去能

を調べたところ、7 菌群が再現性よく溶存 Co を減少した。この 7 菌群の溶存 Co 0.1 mmol/L 下における Co 除去能を評価した。その結果、すべての候補菌群が培養 21 日で溶存 Co を 0.06 mmol/L 以下にまで減少した (図 3.1-10)。TK6、TK18、TK19 及び FI72 は、培養 7 日で溶存 Co を 0.05 mmol/L 程度にまで減少し、候補菌群の中で優れた Co 除去能を示した。以上の結果から、海洋環境試料から 7 菌群の Co 除去微生物の分離に成功した。

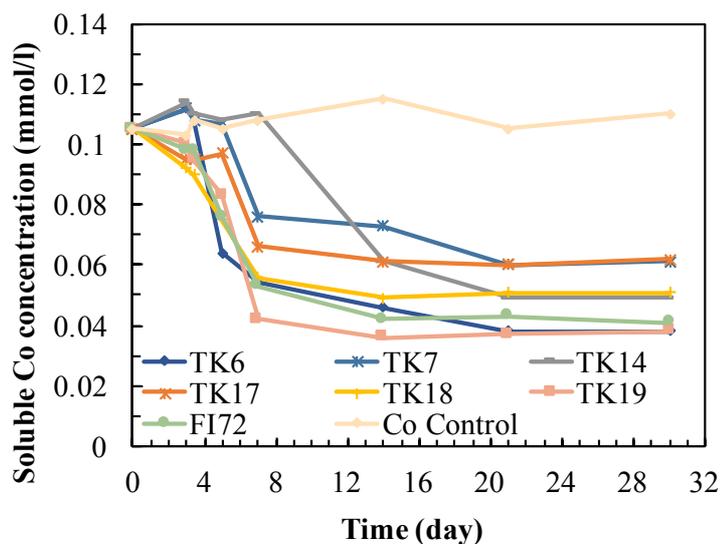


図 3.1-10 Co 耐性微生物群の培養液中の溶存 Co 濃度

b) 分子生物学的解析

分子生物学的解析により Co 除去能を示した単離株の菌種の同定を試みた。単離株のうち、TK6-3 株の 16S rRNA 遺伝子の 1051 残基を明らかにした (DDBJ 登録番号：登録申請中)。この塩基配列を BLAST 検索したところ、*Pseudoalteromonas issachenkonii* 及び *Pseudoalteromonas elyakovii* の 16S rRNA 遺伝子とそれぞれ 92.0%の相同性を示した。系統樹解析の結果から、TK6-3 株は、*Pseudoalteromonas* 属に分類される微生物であることを明らかにした (図 3.1-11)。*Pseudoalteromonas* 属には ALP 産生能をもつ微生物が報告されている⁴ [23]。

⁴ ALP 産生能については、既出 (前ページ) の「a) Co 耐性微生物の分離」を参照。

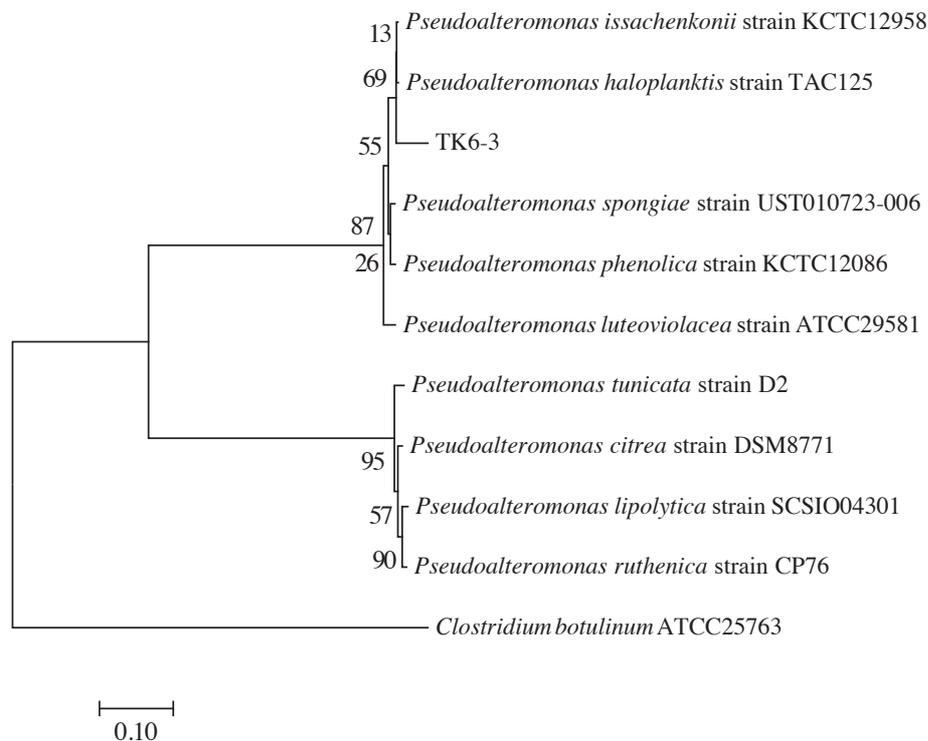


図 3.1-11 *Pseudoalteromonas* 属及び TK6-3 株の 16S rRNA 遺伝子領域に基づいた系統樹

(4) まとめ

本研究により得られた成果は以下の通りである。

アパタイトを生成する微生物を分離するため、海洋環境試料から好塩性または耐塩性の Co 耐性微生物を集積培養した。その結果、3.0%NaCl 下において溶液中から Co 除去能を示す 7 菌群の分離に成功した。

Co 除去試験により、単離株のうち TK6-3 株が培養 5 日で 50%程度の溶存 Co を培養液上清から除去できることを明らかにした。分子生物学的解析により、この TK6-3 株を *Pseudoalteromonas* 属に分類した。

参考文献

- [1] Y. Fujita, J. L. Taylor, T. L. T. Gresham, M. E. Delwiche, F. S. Colwell, T. L. Mcling, L. M. Petzke, R. W. Smith, “Stimulation of microbial urea hydrolysis in groundwater to enhance calcite precipitation,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, no. 8, pp. 3025-3032, 2008.
- [2] Y. Fujita, J. L. Taylor, L. M. Wendt, D. W. Reed, R. W. Smith, “Evaluating the potential of native ureolytic microbes to remediate a ⁹⁰Sr contaminated

- environment,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, no. 19, pp. 7652-7658, 2010.
- [3] V. Achal, X. Pan, D. Zhang, “Bioremediation of strontium (Sr) contaminated aquifer quartz sand based on carbonate precipitation induced by Sr resistant *Halomonas* sp.,” *Chemosphere*, vol. 89, no. 6, pp. 764-768, 2012.
- [4] S. Handley-Sidhu, J. A. Hriljac, M. O. Cuthbert, J. C. Renshaw, R. A. D. Pattrick, J. M. Charnock, B. Stolpe, J. R. Lead, S. Baker, L. E. Macaskie, “Bacterially Produced Calcium Phosphate Nanobiominerals: Sorption Capacity, Site Preferences, and Stability of Captured Radionuclides,” 2014.
- [5] Y. Fujita, G. D. Redden, J. C. Ingram, M. M. Cortez, F. G. Ferris, R. W. Smith, “Strontium incorporation into calcite generated by bacterial ureolysis,” *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 68, no. 15, pp. 3261-3270, 2004.
- [6] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, “Basic local alignment search tool,” *J. Mol. Biol.*, vol. 215, no. 3, pp. 403-410, 1990.
- [7] N. Saitou, M. Nei, “The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 4, no. 4, pp. 406-425, 1987.
- [8] Yoon JH, Lee KC, Weiss N, Kho YH, Kang KH, Park YH. *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of the genus *Sporosarcina*. *Int J Syst Evol Microbiol* vol. 51, pp. 1079-1086, 2001.
- [9] Kwon S-W, Kim B-Y, Song J, Weon H-Y, Schumann P, Tindall BJ, Stackebrandt E, Fritze D. *Sporosarcina koreensis* sp. nov. and *Sporosarcina soli* sp. nov., isolated from soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* vol. 57, pp. 1694-8, 2007.
- [10] Tominaga T, An S-Y, Oyaizu H, Yokota A. *Sporosarcina luteola* sp. nov. isolated from soy sauce production equipment in Japan. *J Gen Appl Microbiol* vol 55, pp. 225-232, 2009.
- [11] J. Heyrman, M. Rodríguez-Díaz, J. Devos, A. Felske, N. a. Logan, P. De Vos, “*Bacillus arenosi* sp. nov., *Bacillus arvi* sp. nov. and *Bacillus humi* sp. nov., isolated from soil,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 55, no. Pt 1, pp. 111-117, 2005.
- [12] Shi R, Yin M, Tang S-K, Lee J-C, Park D-J, Zhang Y-J, Kim C-J, Li W-J. *Bacillus luteolus* sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from a salt field. *Int*

J Syst Evol Microbiol vol. 61, pp. 1344-1349, 2011.

- [13] Bozal N, Tudela E, Rosselló-Mora R, Lalucat J, Guinea J. *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov., isolated from an Antarctic coastal environment. *Int J Syst Bacteriol* vol. 47, pp. 345-51, 1997.

3.1.3 バイオ鉱物生成時における Sr 及び Co の回収能の明確化

カルシウム炭酸塩鉱物生成菌種あるいは菌種群による海水からの Sr 及び Co の回収能の明確化を図る。そのため、バイオ鉱物生成菌の育成条件の明確化並びに Sr 及び Co の回収能の明確化を図る。

3.1.3.1 バイオ鉱物生成菌の育成条件の明確化（再委託先：芝浦工業大学） (H27-H28)

(1) 目的

Sr あるいは Co を含む模擬海水中でカルシウム炭酸塩鉱物（カルサイト）生成菌及び 3.1.2 で得た菌種あるいは菌種群をそれぞれ育成して、バイオカルサイト及びバイオアパタイトへの Sr あるいは Co の濃集の高い育成条件を評価する。さらに、大量培養を可能とするため、5L リアクター及び 100L タンクにおける培養条件を明らかにする。

(2) 実験手法

a) 塩濃度の育成への影響試験

カルサイト生成菌の育成条件の明確化を図るため、培地溶液中の塩濃度を変えた試験を行った。10 倍に希釈した Marine Broth 2216 培地（Sr 1.0 mM 含有）に NaCl を加えて塩濃度（0.3、3.0、5.0、10%）を調製した培地溶液を用いて、30°C、120 rpm、12 時間前培養した菌株溶液を添加して培養を行った。培養液を予め決めた時間にサンプリングして、生育を調べた。さらに、NaCl 濃度の尿素分解における影響を調べた。尿素分解によるウレアーゼ活性は市販の水質測定試薬セット（Kyoritsu Chemical-Check、Tokyo、Japan）を使用し、インドフェノールブルー吸光光度法による上清中の溶存アンモニウムイオン（ NH_4^+ ）濃度より評価した。

アパタイト生成菌の育成条件の明確化を図るため、海水成分である Marine Broth 2216（MB；37.4g/L）をオートクレーブ滅菌（121°C、15 分）、0.06mM の Co を含む培地中で育成した。

生育の指標として生菌数を、コロニーカウント法により測定した。培養液の 10 倍希釈系列を作製し、寒天培地を用いた平板塗抹法により、30 °C で 3 日間培養後の colony forming unit（cfu/mL）で評価した。

b) 5 L リアクターへのスケールアップ培養試験

分離微生物の大量培養を測るため、培養のスケールアップを行った。5L リアクターへのスケールアップでは、ミニスケール培養装置 Bioneer-C500N 型（株式会社丸菱バイオエンジニアリング、以降 5 L リアクターと称す。）を用いた。培地量は 100 mL フラスコスケールの 60 倍量の 3 L とした。グリセロールストックされた分離株を 50 mL の基本培地に植菌して前培養（120 rpm、30 °C、12 時間）した。この前培養液を 3 L の Sr 除去試験用培地に O.D. 660 = 0.05 となるように植菌した。基本培養条件は、

通気量 1.0 L/分、攪拌速度 120 rpm、温度 30 °C とした。通気量、攪拌速度及び培養温度による分離株の Sr 除去能への影響を調べるために、各項目を以下の条件に設定して Sr 除去試験を行った。

- ・ 通気量 (L/分) : ①0.0 (通気なし)、②1.0、③3.0
- ・ 攪拌速度 (rpm) : ①0.0 (攪拌なし)、②120、③300
- ・ 通気量 (L/分) 及び攪拌速度 (rpm) : ①共に 0.0、②1.0・120、③3.0・300
- ・ 温度 (°C) : ①15、②25、③30、④35

培養液を継時的に採取し、遠心分離 (15,000 × g、4.0°C、10 分) により上清及び沈殿に分画した。上清はフィルター (0.2 μm pore size) で濾過し、4.0°C で保存した。また、備え付けの pH 電極 (InPro3030、Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) を用いて培養液の pH を常時測定した。

バイオアパタイト生成菌の培養のスケールアップにはカルシウム炭酸塩鉱物生成菌と同じ 5 L リアクターを用いた。培地量は 100 mL フラスコスケールの 60 倍量の 3 L とした。グリセロールストックされた分離株を 50 mL の基本培地に植菌して前培養 (120 rpm、30 °C、18 時間) した。この前培養液を 3 L の Sr 除去試験用培地に 1.0 % (w/v) となるように植菌した。培養条件は通気量 1.0 L/分、攪拌速度 120 rpm、温度 30 °C とした。培養液を経時的に採取し、遠心分離 (15,000 × g、4.0°C、10 分) により上清及び沈殿に分画した。上清はフィルター (0.2 μm pore size) で濾過し、4.0°C で保存した。また、備え付けの pH 電極 (InPro3030) を用いて培養液の pH を常時測定した。

c) 100 L タンクへのスケールアップ培養試験

100L タンクへのスケールアップでは、MSJ-U2W 型 100 L ベンチスケール培養装置 (株式会社丸菱バイオエンジニアリング、以降 100 L タンクと称す。) を用いた (図 3.1-12)。培地量は 5 L リアクターの 20 倍量の 60 L とした。基本培地及び Sr 除去試験用培地は水道水で調製した。グリセロールストックされた分離株を 1 L の基本培地に植菌して前培養 (120 rpm、30 °C、12 時間) した。この前培養液を 60 L の Sr 除去試験用培地に O.D. 660 = 0.05 となるように植菌し、通気量 20 L/分、攪拌速度 100 rpm、温度 30 °C の条件で培養した。培養液を継時的に採取し、遠心分離 (15,000 × g、4.0 °C、10 分) により上清及び沈殿に分画した。上清はフィルター (0.2 μm pore size) で濾過し、4.0°C で保存した。また、備え付けの pH 電極 (InPro3253G, Mettler Toledo) を用いて培養液の pH を常時測定した。



図 3.1-12 100 L ベンチスケール培養装置の外観

(3) 結果と考察

a) 塩濃度の育成への影響試験

NaCl 濃度 (0.3、3.0、5.0、10%) の培地で育成した TK2d 株、KW3b1 株及び KW3b2 株の生菌数を図 3.1-13a-c に示す。3.0%、5.0% NaCl 下において、3 株全てがよく増殖し、培養 1 日で 1.0×10^7 cfu/mL 程度の定常期に達し、その後 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^5$ cfu/mL 程度までゆるやかに減少した。一方、0.3% NaCl 下において 3 株全てが培養 1 日で $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ cfu/mL 程度に増殖したが、その後生菌数は急速に減少して培養 4-5 日で死滅した。10.0% NaCl 下においては、TK2d 株は培養 2 日で 1.0×10^2 cfu/mL 程度の定常期に達し、その後も 5 日までは生菌数に変化は無かった (図 3.1-13a)。KW3b1 株及び KW3b2 株は培養 1 日で 1.0×10^4 cfu/mL に達し、その後急速に減少し培養 3 日で死滅した (図 3.1-13b, c)。以上の結果から、3 株とも増殖において最適 NaCl 濃度が 3.0-5.0% であり、10% の NaCl 濃度の耐塩性を示したことから、この 3 株が同等の増殖能を有することを明らかにした。

次に、これら 3 株の培養液中の溶存 Sr 濃度の経時変化を図 3.1-13d-f に示す。TK2d 株は、0.3% NaCl 下において培養 1 日で 99% の溶存 Sr を除去し、3.0% NaCl よりも高い Sr 除去能を示したが、5.0% 及び 10.0% NaCl 下において溶存 Sr をほとんど除去できなかった (図 3.1-13d)。KW3b1 株と KW3b2 株は、0.3% 及び 3.0% NaCl 下において培養 1-2 日で 100% の溶存 Sr を除去し、高い Sr 除去能を示した。5.0% NaCl 下においては培養 2 日で 93% の溶存 Sr を除去したが、10.0% NaCl 下においては溶存 Sr をほとんど除去できなかった (図 3-1-13e, f)。以上の結果から、3 株全てが 0.3% NaCl の低塩濃度において培養 1 日という短時間で高い溶存 Sr 除去能 (Sr 除去率 99-100%) を示し、KW3b1 株及び KW3b2 株は、3.0% NaCl 下において 0.3% NaCl 下と同程

度の溶存 Sr を除去するだけでなく、5.0% NaCl 下においても培養 2 日で高い溶存 Sr 除去能 (Sr 除去率 92–93%) を示すことを明らかにした。しかし、分離した 3 株は 10%NaCl の高塩濃度下において増殖しているにもかかわらず Sr 除去能をほとんど示さなかった。

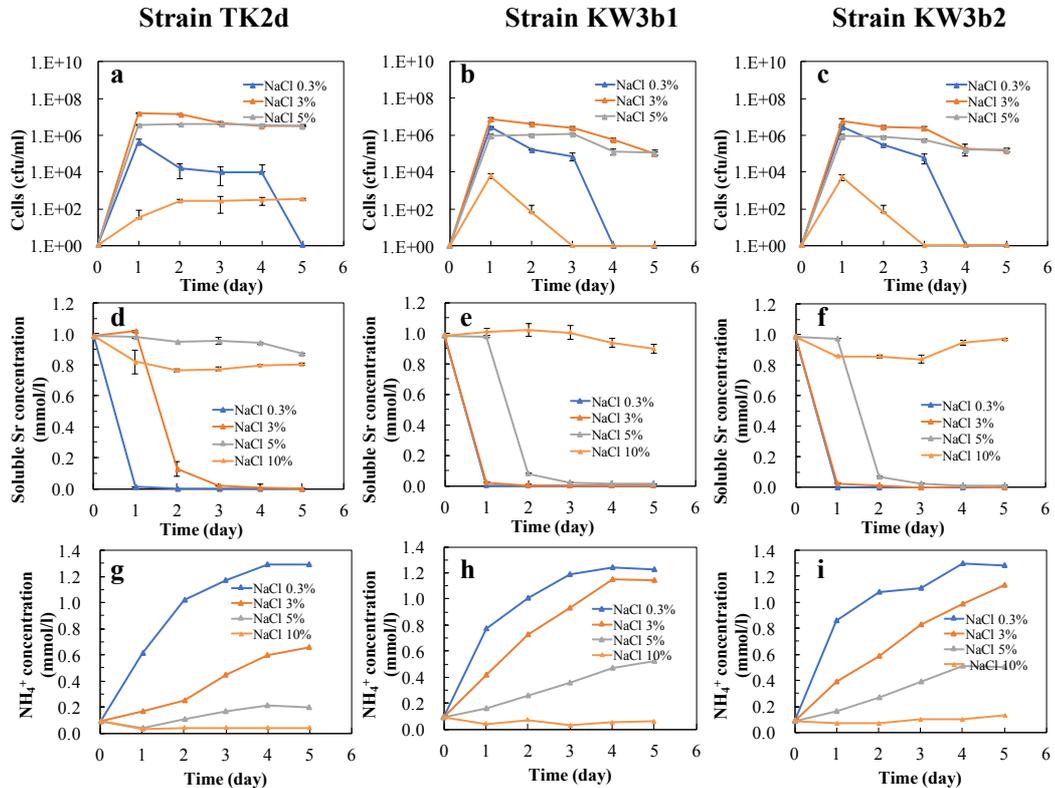


図 3.1-13 NaCl 濃度における分離株の培養液中の生菌数 (a-c)、溶存 Sr 濃度 (d-f) 及びアンモニウムイオン濃度 (g-i)

次に NaCl 濃度の尿素分解における影響を調べた。3 株全てにおいて、培養液中の NaCl 濃度が低いほど NH₄⁺濃度が高く (図 3.1-13g-i)、NH₄⁺濃度が高いほど溶存 Sr 除去能が高かった。これらのことから、3 株は尿素を加水分解して NH₄⁺を生じ、同時に生じた炭酸イオンが Sr²⁺や Ca²⁺を取り込んでバイオ鉱物を合成したと強く示唆された。さらに、NaCl 濃度が高いほど NH₄⁺濃度が低く (図 3.1-13g-i)、Sr 除去能も低かったことから、NaCl が微生物のウレアーゼ遺伝子制御やウレアーゼの酵素活性を阻害すると考えられる。

b) 5 L リアクターへのスケールアップ培養

KW3b 株を用いた 5 L リアクターでの培養実験以降では、KW3b2 株を KW3b 株として実験に用いた。まず通気量を検討した結果を図 3.1.14-a, b に示す。通気量 3.0 L/分の条件において培養 14 時間で溶存 Sr 及び溶存 Ca を 95%以上減少したが、その他

の条件においても培養 16 時間で同等の減少率を達成した(図 3.1-14a)。NH₄⁺濃度の推移も溶存 Sr 減少率と同様に条件による大きな差は見られなかった。pH は、通気量 1.0 L/分と通気量 3.0 L/分においてほとんど差が見られなかったが(それぞれ pH 9.41、pH 9.47; 培養 24 時間)、通気なしの pH は他の条件と比べて低い値で推移した(pH 9.18; 培養 24 時間、図 3.1-14b)。次に、攪拌速度を検討した結果を図 3.1-14c、d に示す。攪拌速度 120 rpm 及び 300 rpm において、溶存 Sr 及び溶存 Ca 減少率は培養 16 時間で 95%以上に達した。攪拌なしの条件において、培養 20 時間には各元素を 95%以上減少した。NH₄⁺濃度は、培養開始から 20 時間まではすべての条件において同じ増加傾向を示した(攪拌なし、120 rpm、300 rpm; 20 時間)。pH は、培養 6 時間までは 120 rpm の条件が高い値を示し(pH 9.17)、培養 6-12 時間までは 120 rpm と 300 rpm がともに高い値を示し(それぞれ pH 9.43、pH 9.47; 培養 12 時間)、培養 12 時間以降は 300 rpm が高い値を示した(pH 9.64; 培養 24 時間、図 3.1-14d)。次に、通気量及び攪拌速度の条件を複合的に検討した結果を図 3.1-14e、f に示す。この試験においても各元素の減少率に明確な差は見られなかった。通気量 3 L/分・攪拌速度 300 rpm 及び通気量 1 L/分・攪拌速度 120 rpm の条件において培養 16 時間で溶存 Sr の除去率 95%を達成し、通気・攪拌なしの条件においても培養 24 時間で 95%を達成した。NH₄⁺濃度は、各条件において若干の差が見られ、通気量・攪拌速度の値が大きくなるほど濃度の上昇も大きくなった。pH は、通気・攪拌ありの条件における差はほとんど見られず、通気・攪拌なしの条件において通気・攪拌ありの条件よりも低い値を示した。これらの結果から、通気及び攪拌は溶存 Sr 及び溶存 Ca の減少に大きく影響しないことが明らかとなった。最後に、培養温度の条件(15、25、30、35 °C)を検討した結果を図 3.1-14g、h に示す。培養温度が高くなるにしたがって溶存 Sr 及び溶存 Ca の減少は早くなり、各元素の減少率 95%を達成した培養時間は、35 °C において 14 時間、30 °C において 16 時間、25 °C において 20 時間、15 °C において 72 時間であった。NH₄⁺濃度は、各元素の減少率と同様に培養温度が高くなるにつれて大きく上昇した。pH は、培養温度 25-35 °C において顕著な差は見られなかったが、培養 15 °C において上昇する速度が遅くなり、pH 値も低かった。これらの結果から、溶存 Sr の減少には培養温度が影響することが明らかとなった。また、通気攪拌を行わなくても溶存 Sr を除去できることから、KW3b 株を用いた Sr 除去技術が港湾などの海水が滞留しやすい環境においても有効な手段になると考えられる。

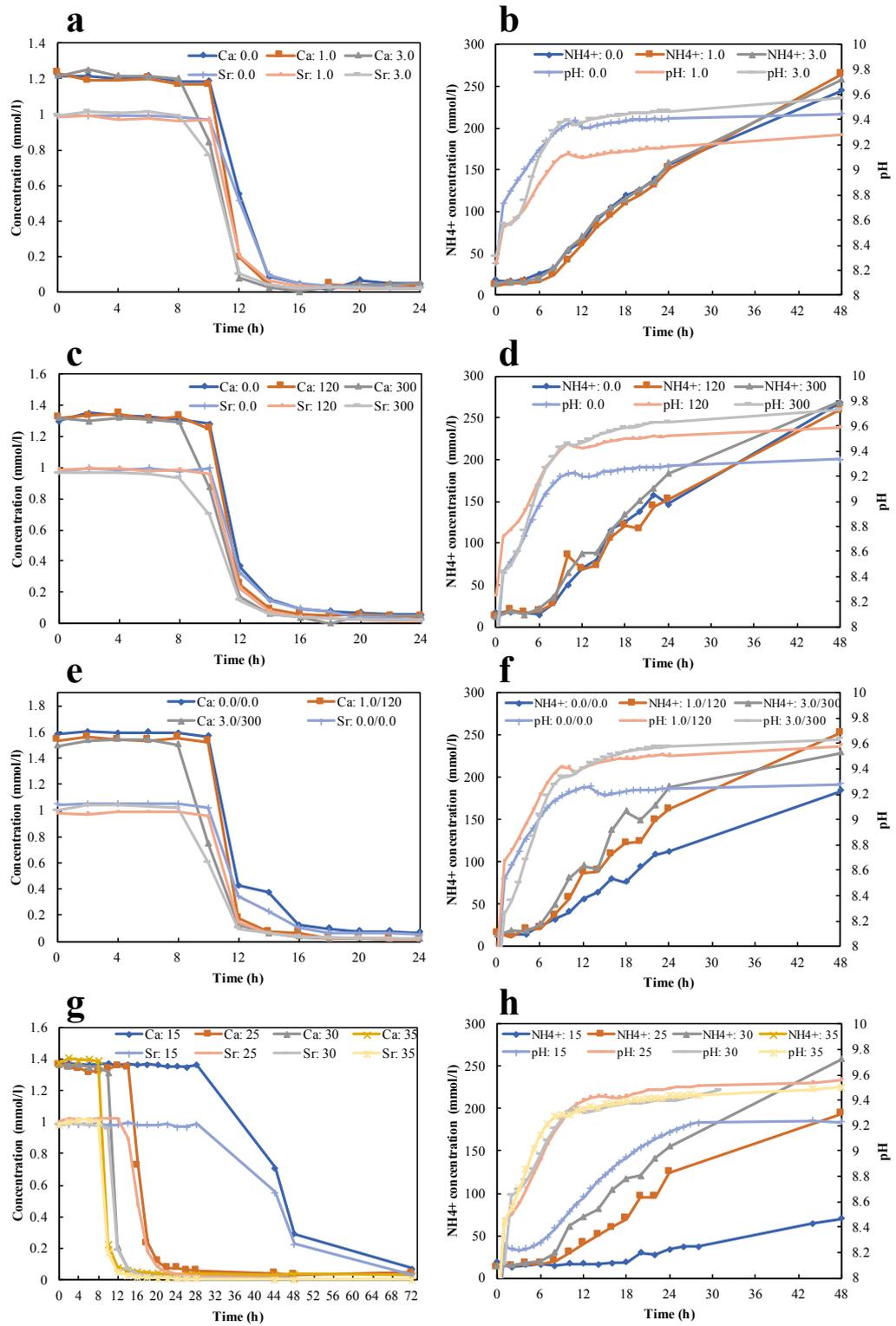


図 3. 1-14 KW3b 株を用いた 5 L リアクターへのスケールアップと物理因子による Sr 除去能への影響 培養条件: a, b、通気量; c, d、攪拌速度; e, f、通気量及び攪拌速度; g, h、温度

TK6-3株を用いて5Lリアクター中で培養した場合、培養1日における各元素のSr及びCo等の減少率は、溶存Sr: 76.3%、溶存Co: 64.8%、溶存Ca: 69.7%、溶存P: 67.5%、溶存Mg: 9.1%であった(図3.1-15)。培養1日における減少率はフラスコ培養における値よりも若干向上した。しかし、2日以降に溶存するSr、Ca及びCoの濃度は上昇に転じた。一方でMgは減少を続けていることから、沈殿除去されたSr、CaならびにCoが固化物Mgと置換しているのではないかと考えられた。このSrやCoなどの再溶解はフラスコスケールでは見られなかった現象であることから、さらなる原因究明が必要である。

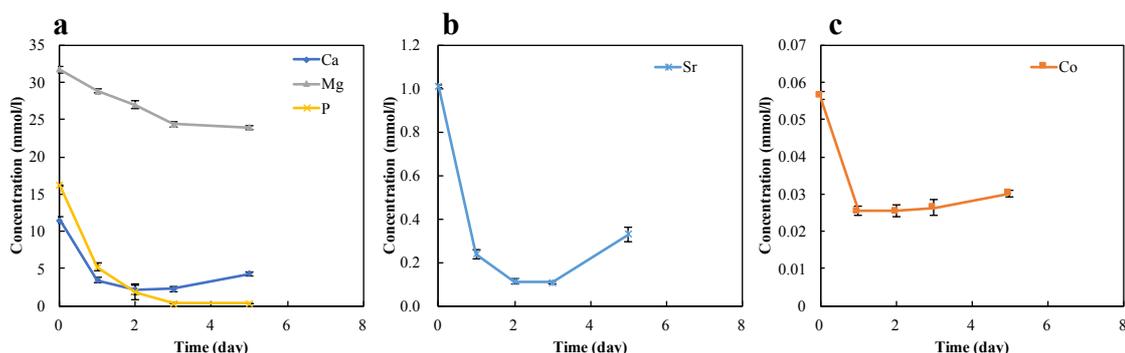


図 3.1-15 TK6-3 株による 5 L リアクターへのスケールアップ試験結果

c) 100 L タンクへのスケールアップ培養

KW3b株を用いた100Lタンクへのスケールアップ試験として100LタンクでSr除去試験を行った結果、溶存Sr及び溶存Caは培養14時間で減少を始め、培養18時間で減少率90%以上を示し、培養24時間ではそれぞれ98.4%及び94.3%であった(図3.1-16)。その後も緩やかに減少が見られ、培養72時間でSrは検出下限値以下(0.005 mmol/L)を達成した。これらのことから、100Lタンクのベンチスケールにおいても短い培養時間で溶存Srを除去可能であることを明らかにした。

海水を用いたKW3b株のSr除去能を調べる試験では、培養16時間から溶存Sr及び溶存Caの減少が始まり、培養24時間における両元素の減少率はそれぞれ53.2%及び43.4%だった(図3.1-17)。24時間後以降も緩やかな減少が見られ、培養168時間(7日)で溶存Srは検出下限値を達成した。また、初発濃度38 mmol/Lあった溶存Mgは培養48時間以降に減少が見られ、培養7日における減少率は47.7%だった。

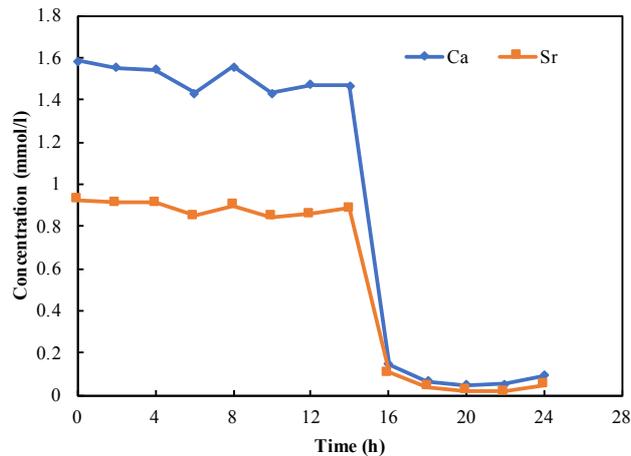


図 3.1-16 KW3b 株を用いた Sr 除去試験の 100 L タンクへのスケールアップ

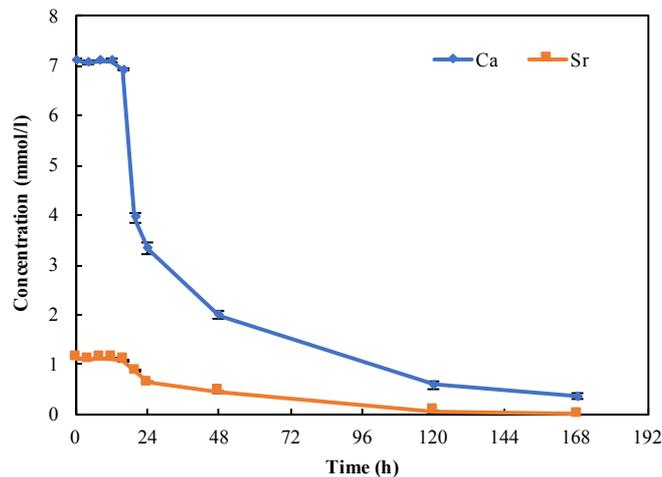


図 3.1-17 東京湾の海水を用いた KW3b 株の Sr 除去試験結果

(4) まとめ

バイオ鉱物生成菌の育成条件を明らかにするため、培地溶液中の塩濃度を NaCl により 0.3、3.0、5.0、10%に調製した培地 (Sr 1.0 mM 含有) を用いて、TK2d 株、KW3b1 株及び KW3b2 株の生育条件を評価した。その結果、TK2d 株、KW3b1 株及び KW3b2 株の増殖の最適 NaCl 濃度は 3.0%であることを明らかにした。さらに、アパタイト生成菌については 0.06 mM の Co を含む海水と同じ塩濃度条件で生育することを確認した。

大量培養の可能性及びその条件を明らかにするため、5L リアクター及び 100L タンクにおいて KW3b 株を培養した。5L リアクターでは、通気量及び攪拌速度の影響について調べた結果、通気・攪拌なしの条件においても培養 24 時間で Ca 濃度減少が 95%を達成したことから、大量培養への通気及び攪拌の影響は小さいことが分かった。一方、溶存 Sr 及び溶存 Ca の減少の培養温度依存性については、培養温度が高くなるにした

がって溶液からの減少が早くなることが明らかとなった。さらに、100L タンクでの培養では、溶存 Ca は培養 24 時間で 90%以上の減少を示し、72 時間でほぼ全ての Ca が溶液から除かれた。先述したように、培養液中の炭酸イオンが Sr^{2+} や Ca^{2+} を取り込んでバイオ鉱物を合成したことが強く示唆されたことと合わせると、大量培養は十分可能で、実際のサイトに適用するだけの菌体量を確保できる見通しを得た。

3.1.3.2 Sr 及び Co の回収能の明確化 (H26-H28)

(1) 目的

模擬海中における Sr 及び Co の濃度の変化を調べ、バイオカルサイト及びバイオアパタイトの Sr 及び Co の回収能を評価する。さらに、磁性体付加バイオ鉱物により Sr 及び Co の水溶液中濃度が 1/10 以下となる目標を達成するため、模擬海中における Sr 及び Co の濃度の変化を調べる。TK2d 株あるいは KW3b 株による海水からの Sr 及び Co の回収能の明確化を図る。

(2) 実験手法

a) バイオカルシウム炭酸塩鉱物による回収

バイオカルサイトによる Sr 及び Co の回収能を評価する実験では、TK2d 株、KW3b1 株及び KW3b2 株のコロニーを 20 mL ガラス試験管内の基本培地 (10 mL) に白金耳を用いて無菌的に植菌し、前培養 (30°C、120 rpm、12 時間) した。125 mL 三角フラスコ内の試験用培地 (50 mL) に O. D. 660 = 0.04 となるように前培養液を植菌し、7 日間本培養 (30°C、120 rpm、Sr 1.0 mM) した。本培養液を適時にサンプリングし、遠心分離 (21,000 × g、15 分、4°C) により上清及び沈殿物に分画した。得られた上清をフィルター (0.2 μm pore size、KURABO、Osaka、Japan) を用いてろ過し、分析用試料とした。沈殿物を菌体観察及び固体分析の試料とした。候補株を接種していない基本培地を同条件下におけるコントロールとした。培地溶液は NaCl 濃度を 0.3、3.0、5.0、10% に調製した、10 倍に希釈した Marine Broth 2216 培地 (MB 培地、Sr 1.0 mM 含有) を用いた。

b) バイオカルシウムリン酸塩鉱物による回収

バイオアパタイトによる Sr 及び Co の回収能を評価する実験では、Marine Broth 2216 に SrCl_2 溶液を加えて濃度を 1.0 mM に調整した培地溶液及び CoCl_2 溶液を加えて濃度を 0.1 mM に調整した培地溶液を用いた。回収能評価試験では、前出したバイオカルシウム炭酸塩鉱物による Sr 及び Co の回収と同条件で候補株の前培養及び本培養を行った。本培養液を適時にサンプリングして、その後の処理も Sr 回収能評価試験と同じ方法で行った。

各分析用試料の原液を超純水 (Barnstead NANOpure DIamond、Thermo Fisher

Scientific、Rockford、IL、USA) で適宜希釈し、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) により元素の定量を行った。検量線は検量線用標準溶液 (XSTC-622 : SPEX CetriPrep、NJ、USA) を用いて作成した。1 サンプルにつき 3 回繰り返し測定を行い、偏差が 5% 以内の値の平均値を測定結果とした。

c) 磁性体付加培養による Sr、Co、Cs 除去試験

微生物が生成したバイオ鉱物の回収は実験室レベルで行う閉鎖的な環境下では可能なものの、浄化対象となる港湾など開放的な環境では困難であると想定される。そこで、カルシウム炭酸塩生成菌に磁性付加バイオ鉱物を生成させることで磁力によるバイオ鉱物の回収を試みるとともに、磁性付加バイオ鉱物生成による Sr、Co、Cs 除去効果を調べた。磁性体はマグネタイト (Fe_3O_4 ; M) やマグネタイトを付与した 3 種のゼオライト (A 型ゼオライト; A、チャバサイト; C、P 型ゼオライト; P) を用い、これらの磁性体は英国バーミンガム大学の研究チームが作製した。磁性付加バイオ鉱物は、カルシウム炭酸塩生成微生物と磁性体との混合培養により合成した。Sr、Co、Cs 除去試験は以下の条件で行った。

・ Sr 除去試験

試験用培地として、各磁性体 (A、C、P、M) ごとに 2.0 g/L ずつ添加した基本培地を用意し、 SrCl_2 の濃度が 1.0 mmol/L となるように添加した。

・ Sr・Co 除去試験

試験用培地として、各磁性体 (A、C、P、M) ごとに 2.0 g/L ずつ添加した基本培地を用意し、 SrCl_2 の濃度が 1.0 mmol/L、 CoCl_2 の濃度が 0.05 mmol/L となるよう調製した。

・ Sr・Co・Cs 除去試験

試験用培地として、各磁性体 (A、C、P、M) あるいはチャバサイトとマグネタイトの混合物 (CM; 混合比率 3:2) を 10 g/L ずつ添加した基本培地を用意し、 SrCl_2 及び CsCl の濃度が 1.0 mmol/L、 CoCl_2 の濃度が 0.05 mmol/L となるよう調製した。

各試験における培養条件は次の通りに統一した。グリセロールストックされた分離株を 5.0 ml の基本培地に植菌して前培養 (120 rpm、30 °C、12 時間) した。この前培養液を 50 ml の各試験用培地に 0. D. 660 = 0.05 となるように植菌した。微生物を添加した条件を、試験培地に含まれる磁性体の種類ごとにそれぞれ A、C、P、M、CM とした。磁性体を加えずに微生物のみを加えた条件を OB とした。微生物を添加しない系として、前培養液の代わりに基本培地を添加した条件をそれぞれの試験用培地に含まれる磁性体ごとに NA、NC、NP、NM、NCM とし、磁性体も含まない条件を NOB とした。培養液を継時的に採取し、遠心分離 (15,000 × g、4.0 °C、10 分) により上清及び沈殿に分画した。上清はフィルター (0.2 μm pore size) で濾過し、4.0

°C で保存した。

(3) 結果と考察

a) バイオカルシウム炭酸塩鉱物による回収

バイオカルサイトによる Sr 及び Co の回収能の評価では、TK2d 株培養条件下で、溶存 Sr 濃度は初発濃度の 1.0 mmol/L から培養 3 日に 0.03 mmol/L まで、培養 5 日に 0.01 mmol/L まで減少した。TK2d 株は 5 日で 99.3% の溶存 Sr を培養液から除去したことになる。また、MB 由来の溶存 Ca 濃度も、添加した溶存 Sr 濃度と同様の減少傾向を示した (図 3.1-18)。培養液の pH は、初期の pH 7.6 から培養 3 日に pH 7.8 にまで上昇し、培養 5 日まで同じ pH が保たれていた。Sr 初発濃度を 5.0 mmol/L、1.0 mmol/L、0.1 mmol/L、0.02 mmol/L に設定して、TK2d 株による Sr 固化能を評価した。初発濃度 0.02 mmol/L は、SrCl₂ 溶液を添加せず、MB 培地由来の Sr 濃度で調製した。試験には、ろ過済み MB を用いた。すべての条件において培養液の pH は培養 1 日で約 pH 9.0 まで上昇し、それ以降変化しなかった。TK2d 株における培養 9 日の溶存 Sr は 5 mmol/L から 0.06 mmol/L に、1.0 mmol/L から 0.03 mmol/L に、0.1 mmol/L から 0.06 mmol/L に、0.02 mmol/L から 0.01 mmol/L に減少した (図 3.1-18A)。TK2d 株は初発濃度にかかわらず実験した条件では溶存 Sr を 0.06 mmol/L 以下に減少させた。また、溶存 Sr は、Sr 初発濃度 5.0 mmol/L 及び 0.1 mmol/L の場合は培養 5 日から 7 日にかけて、初発濃度 1.0 mmol/L の場合は培養 7 日から 9 日にかけて急激に減少し、Sr 初発濃度 0.02 mmol/L の場合は 9 日まで緩やかに減少した。MB 培地由来の溶存 Ca は初発濃度が約 2.5 mmol/L であり、Sr 初発濃度に関係なく、培養 9 日までに 0.4 mmol/L 以下に減少した (図 3.1-18B)。つまり溶存 Ca は Sr 初発濃度に関わらずどの条件においても同様の減少傾向であった。このことから、TK2d 株は溶存 Sr/溶存 Ca 比に影響されずに 5.0 mmol/L から 0.02 mmol/L までの幅広い濃度の溶存 Sr を 0.06 mmol/L 以下にまで減少させ固化除去できるということが示された。

A: Sr concentration

B: Ca concentration

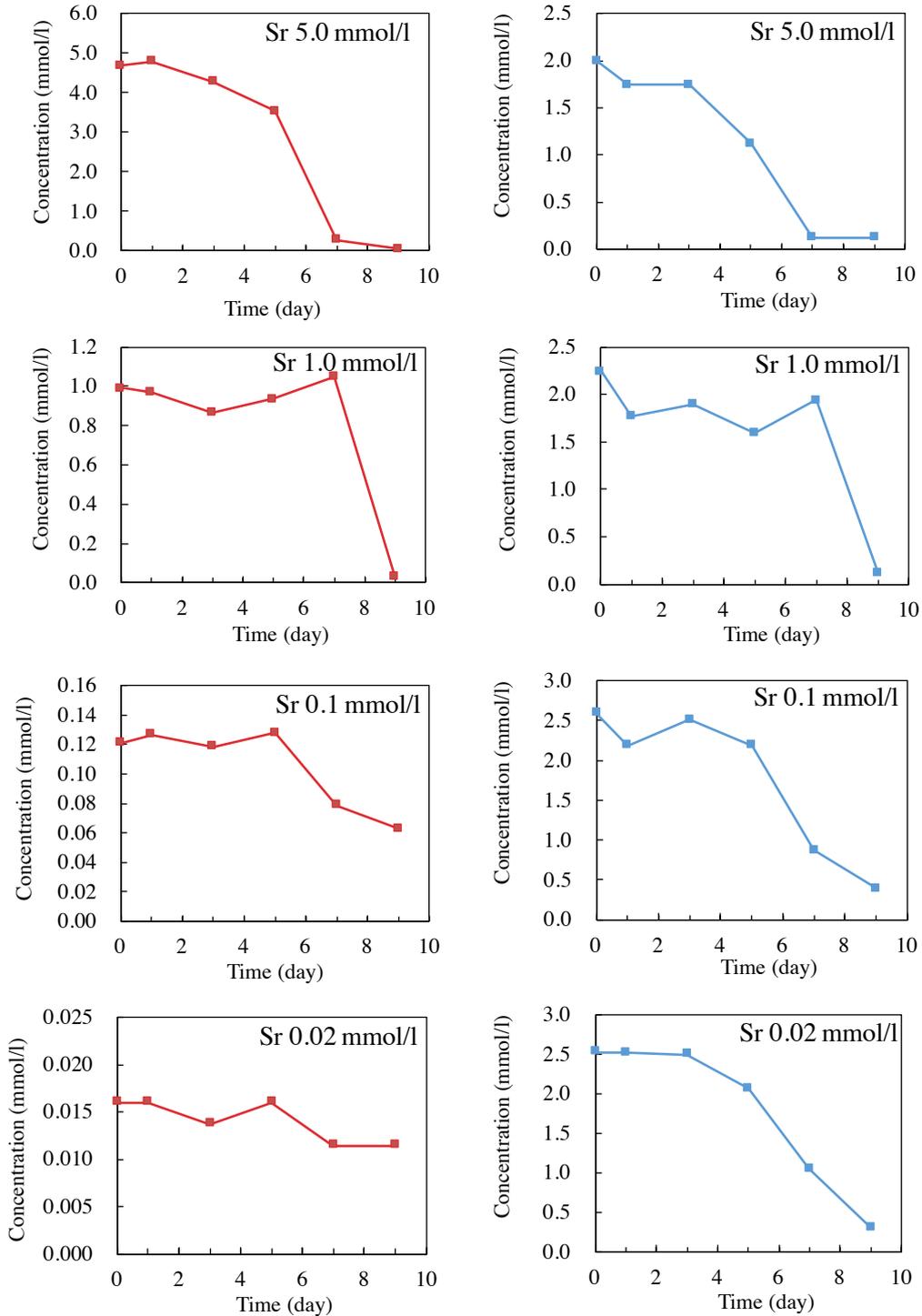


図 3.1-18 異なる Sr 初発濃度 (5.0 mmol/L、1.0 mmol/L、0.1 mmol/L、0.02 mmol/L) における TK2d 株の溶存 Sr 及び溶存 Ca 濃度の経時変化

さらに、長期間培養による沈殿の Sr 保持能力などに関する報告はほとんど無いことから、TK2d 株の長期間培養を行い、培養液中の溶存 Sr 濃度から沈殿の Sr 保持能力の評価を行った。培養 1 日で全ての Sr 濃度において Ca ならびに Sr の減少が見られ、減少率 (Ca、Sr) はそれぞれ 0.0 mmol/L で 94.5%、100%、0.1 mmol/L で 94.2%、96.3%、1 mmol/L で 97.2%、98.5%、2 mmol/L で 97.3%、99.2%及び 5 mmol/L で 100%、99.8%となった。また、培養 3 日で全ての濃度で Sr は検出下限値を下回った。その後、培養 45 日まで培養液中の溶存 Sr 及び溶存 Ca 濃度の上昇は見られなかった。このことから、Sr をバイオ鉱物に取り込むことで鉱物中に少なくとも 1 ヶ月以上安定的に封じ込めることに成功した。

KW3b2 株を用いて Sr 初発濃度を変えた Sr 除去試験を行った結果を図 3.1-19 に示す。培養 1 日で実験した Sr 濃度において Ca ならびに Sr の減少が見られ、減少率 (Ca、Sr) はそれぞれ 0.07 mmol/L で 94.5%、100%、0.1 mmol/L で 94.2%、96.3%、1.0 mmol/L で 97.2%、98.5%、2.0 mmol/L で 97.3%、99.2%及び 5.0 mmol/L で 100%、99.8%となった。また、培養 3 日で実験した濃度で Sr は検出下限値を下回った。

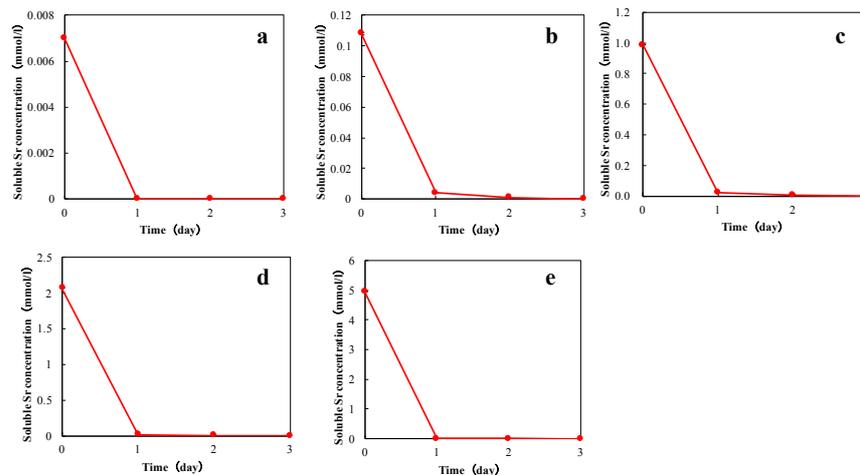


図 3.1-19 様々な Sr 初発濃度における KW3b2 株の Sr 除去能

KW3b1 株及び KW3b2 株を用いて TK2d 株との溶存 Sr 除去能の比較試験を行った (図 3.1-20)。その結果、KW3b1 株及び KW3b2 株はともに溶存 Sr を培養 1 日で 98%除去したことから、TK2d 株 (培養 2 日、88%) よりも優れた Sr 除去能を示す微生物であることがわかった。

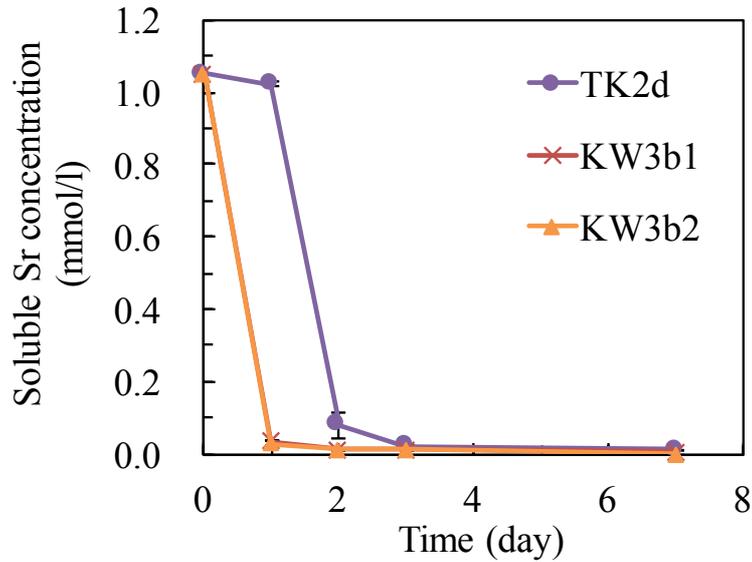


図 3.1-20 TK2d 株、KW3b1 株及び KW3b2 株の培養時における溶存 Sr 濃度の経時変化

b) バイオカルシウムリン酸塩鉱物による回収

Co 除去能を示した TK6 菌群の Co 除去試験における培養液中の主要元素の濃度変化を図 3.1-21 に示す。グリセロール 2 リン酸 (G2P) を添加した培養 3 日以降から培養 7 日までに、溶存 Co 濃度は急激に減少し、0.054 mmol/L になった。その後も溶存 Co 濃度は緩やかに減少し続け、最終的に培養 30 日に 0.038 mmol/L となった (図 3.1-21a)。溶存 Ca 及び溶存 Sr 濃度は、G2P 添加後から緩やかに減少しはじめ、培養 30 日にそれぞれ 0.68 mmol/L 及び 0.63 mmol/L となった (図 3.1-21b)。溶存 P 濃度は、G2P 添加直後に 4.0 mmol/L にまで急激に増加し、その後培養 30 日までに 2.48 mmol/L にまで緩やかに減少した (図 3.1-21c)。これらの溶存元素の減少が G2P 添加後に始まっていることから、TK6 菌群は G2P を分解しリン酸イオンを培養液中に生成し (反応式 3)、培養 30 日までに 64% の溶存 Co、37% の溶存 Sr を溶存 Ca と共にリン酸塩として培養液中から除去したと考えられた。

次に、TK6 菌群の Sr 除去試験における培養液中の主要元素の濃度変化を図 3.1-22 に示す。溶存 Ca 及び溶存 Sr は、G2P を添加した培養 3 日から減少しはじめ、培養 14 日までにそれぞれ 0.73 mmol/L 及び 0.74 mmol/L にまで緩やかに減少した (図 3.1-22a)。溶存 P 濃度は G2P 添加直後に 4.5 mmol/L にまで増加し、その後培養 14 日までに 2.5 mmol/L にまで緩やかに減少した (図 3.1-22b)。このことから、TK6 菌群は、先述した Co 除去と同様に G2P を分解し、培養 14 日までに 35% の溶存 Sr を溶存 Ca と共にリン酸塩として培養液中から除去したと考えられた。以上の結果より、塩濃度 3% 程度の海洋環境下において、Co 耐性微生物群である TK6 菌群が溶存 Co 及び溶存 Sr をそれぞれ除去できることを明らかにした。

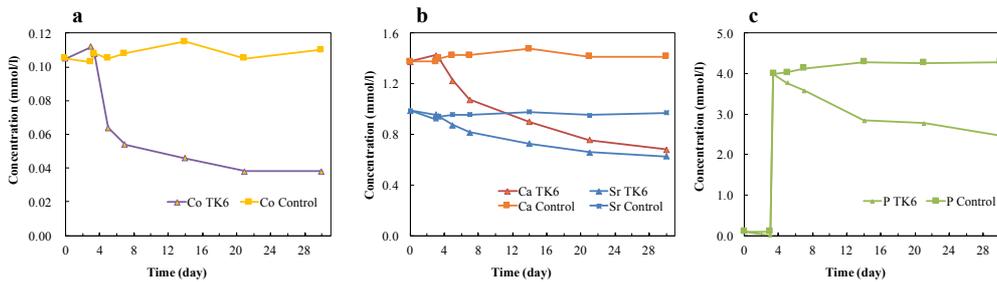


図 3.1-21 Co 除去試験における TK6 菌群の培養液中の溶存 Co 濃度 (a)、溶存 Ca・Sr 濃度 (b)、及び溶存 P 濃度 (c) の経時変化

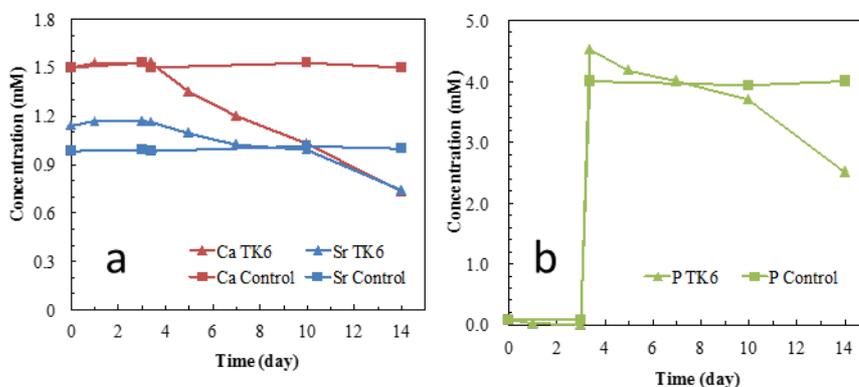


図 3.1-22 Sr 除去試験における TK6 菌群の培養液中の溶存 Ca・Sr 濃度 (a) 及び溶存 P 濃度 (b) の経時変化

c) 磁性体付加培養による Sr、Co、Cs 除去

混合培養試験では、磁性体の添加の種類または有無にかかわらず、KW3b 株は培養 24 時間で溶存 Sr 及び溶存 Ca を 99%減少した。一方、培地と磁性体の反応試験において、ゼオライト A は溶存 Sr 及び溶存 Ca を、ゼオライト C は Sr のみを減少した。この時、溶存 Sr の除去能は A の方が高かった。このことから、混合培養試験において、KW3b 株の Sr 除去能が維持されていることが分かった。

混合培養試験では添加した磁性体の種類または有無にかかわらず、KW3b 株は培養 24 時間で溶存 Sr 及び溶存 Ca を 98%減少した (図 3.1-23a, b)。Co 除去能は、混合培養 M が最も高く、培養 8 時間で最大となり、除去率は 73.8%であった (図 3.1-23c)。混合培養 A、C 及び P では KW3b 株のみの条件と比べて培養 16 時間までは減少量に少差が見られたものの、24 時間ではほぼ同等の値であった。

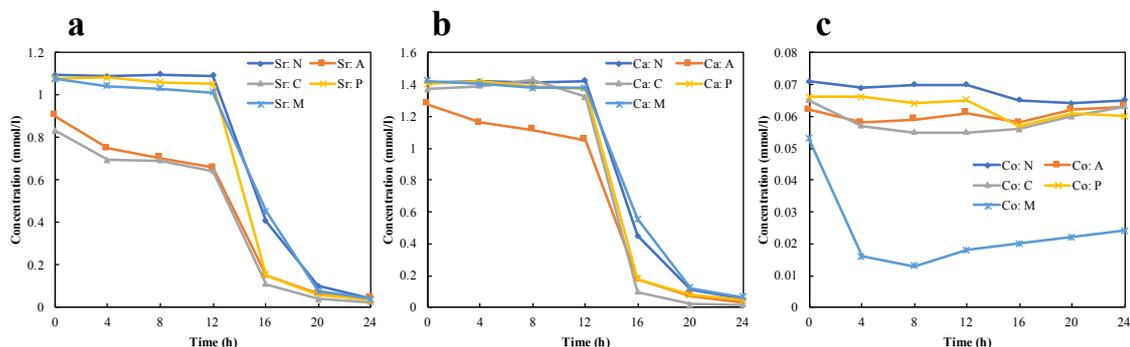


図 3.1-23 KW3b 株と磁性体の混合培養による Sr・Co 除去試験における各元素の経時変化

前述の Sr 及び Co 除去試験で、KW3b 株と磁性体の混合培養により Sr 以外の元素も同時に除去できる可能性が示された。そこで本実験では、Sr、Co 及び Cs 除去能を調べた。また、本実験で用いた磁性体は前述の試験の 5 倍量 (10 g/L) となるように添加した。KW3b 株と磁性体との混合培養の結果を図 3.1-24-a, c, e, g に、磁性体のみ条件の結果を図 3.1-24b, d, f, h に示した。まず、溶存 Sr の除去能について述べる。KW3b 株のみの培養条件では培養 4 時間まで各主要元素濃度は変化が見られなかったが、培養 8 時間以降に溶存 Sr 及び溶存 Ca が大幅に減少し始め、培養 24 時間の減少率はそれぞれ 96.8%及び 98.3%であった (図 3.1-24a, c)。

混合培養 A、C 及び CM では、溶存 Sr を培養 4 時間という早い培養時間でそれぞれ 91.6%、92.6%、80.0%まで除去し、その後緩やかに除去を続けて、24 時間までに 94.7%、97.9%、96.8%まで除去した。混合培養 P では、実験した 3 本のフラスコ間の結果にばらつきが見られ、最も除去したフラスコ P2 では培養 16 時間以降に大幅な Sr 除去が始まり、20 時間までに 93.7%を除去した (図 3.1-24a ; P2)。フラスコの平均値では 24 時間で 94.7%まで除去した (図 3.1-24a ; P)。混合培養 M においても混合培養 P と同様にばらつきが見られ、3 本中 1 本のフラスコのみ Sr を除去した (フラスコ M1)。フラスコ M1 では培養 20 時間以降に大幅に Sr を除去し、24 時間で 83%まで (図 3.1-24a ; M1)、168 時間で 98.9%にまで除去したことから、時間はかかるものの他の混合培養条件と遜色ない Sr 除去能を示した。

混合培養 A、C、CM では、培養 4 時間と他の条件よりも早い時間に Sr 除去された。同じ磁性体のみを用いた実験 (NA、NC、NCM) でも、培養 4 時間までにそれぞれ 80.0%、87.4%、68.4%と混合培養と遜色ない Sr 除去率を示した。このことから混合培養における培養初期の Sr 除去反応は磁性体による Sr 吸着除去ではないかと考えられる。次に、溶存 Ca の除去はほとんどの条件で溶存 Sr の除去と同様の傾向を示したが混合培養 C 及び CM では溶存 Sr の除去に比べると遅くなった。これは、実験に用いた

ゼオライト CHA に Ca の吸着能がなかったためと考えられ、実際に磁性体だけの結果ではゼオライト CHA は溶存 Ca を除去できなかった (図 3.1-24d ; NC、NCM)。このことから、KW3b 株は磁性体との混合培養においても、Sr 及び Ca の除去能を示すことが明らかとなった。

次に、Co 除去能について述べる。実験したすべての混合培養条件で溶存 Co の除去能を示し、特に混合培養 CM は培養 8 時間で 87%と顕著な Co 除去を示した。さらに混合培養 M のうち Sr を除去できたフラスコ M1 では Co も培養 8 時間までに 88.9%まで除去し、平均しても 16 時間で 90.7%と高い Co 除去率を示した。興味深いことに、これらのマグネタイトを用いた磁性体だけの条件では溶存 Co を除去できなかった (図 3.1-24f ; NM、NCM)。さらに KW3b 株のみの条件でも溶存 Co を除去できなかったことから、混合培養 M 及び CM では微生物とマグネタイトは共存することで溶存 Co を除去する新たな反応を生成したと考えられる。その他の混合培養 A、C、P では培養 4 時間までに溶存 Co をそれぞれ 50.0%、48.1%、27.8%まで除去したが (図 3.1-24f)、それ以降の溶存 Co 濃度は上昇に転じ 168 時間ではそれぞれ 10%程度の除去率となった。これらの磁性体だけの条件では 4 時間で混合培養と同定程度の Co を除去して、その後は安定していた。このことから混合培養では、何らかの微生物反応によりゼオライトに吸着した Co が水溶液中に再び溶出してしまったと考えられる。

最後に溶存 Cs の除去能について述べる。KW3b 株のみの条件では Cs を全く除去できなかったが、混合培養では全ての条件で Cs を除去した。特に、混合培養 C、P、CM では培養 4 時間で 80.2%、60.6%、74.3%を除去した。これらの磁性体のみでも同様の除去率であったことから (図 3.1-24h ; NC、NP、NCM)、微生物と磁性体を混合培養しても、磁性体の Cs 吸着能が保持されていることが分かった。以上の結果をまとめると、実験したすべての混合培養条件で溶存 Sr だけでなく溶存 Co 及び溶存 Cs を除去できることを明らかにした。特に混合培養 CM の条件で、溶存 Sr を 90%以上、溶存 Co を 90%程度、溶存 Cs を 74%と高い除去能を有しており、これら 3 元素を同時に除去できる新たな方法を見出した。

各実験条件における溶液 pH (初発 pH 7.22) の変化を比較したところ、KW3b 株のみ及び混合培養 A 及び C は同様の推移が見られ、培養 24 時間でそれぞれ pH 8.80、pH8.96、pH8.92 であった (結果不掲載)。混合培養 CM は培養 8 時間までの pH 変化の上がり方が前者に比べて緩やかだったが (pH8.36 ; 培養 8 時間)、12 時間以降は KW3b 株のみと同様の pH 8.95 (24 時間) であった。混合培養 P 及び M ではフラスコごとに大きく値が異なっていたが、混合培養 P は A や C と同様の傾向が見られ、M は CM よりも pH の上昇がさらに遅く、培養 24 時間の pH 値も低かった。

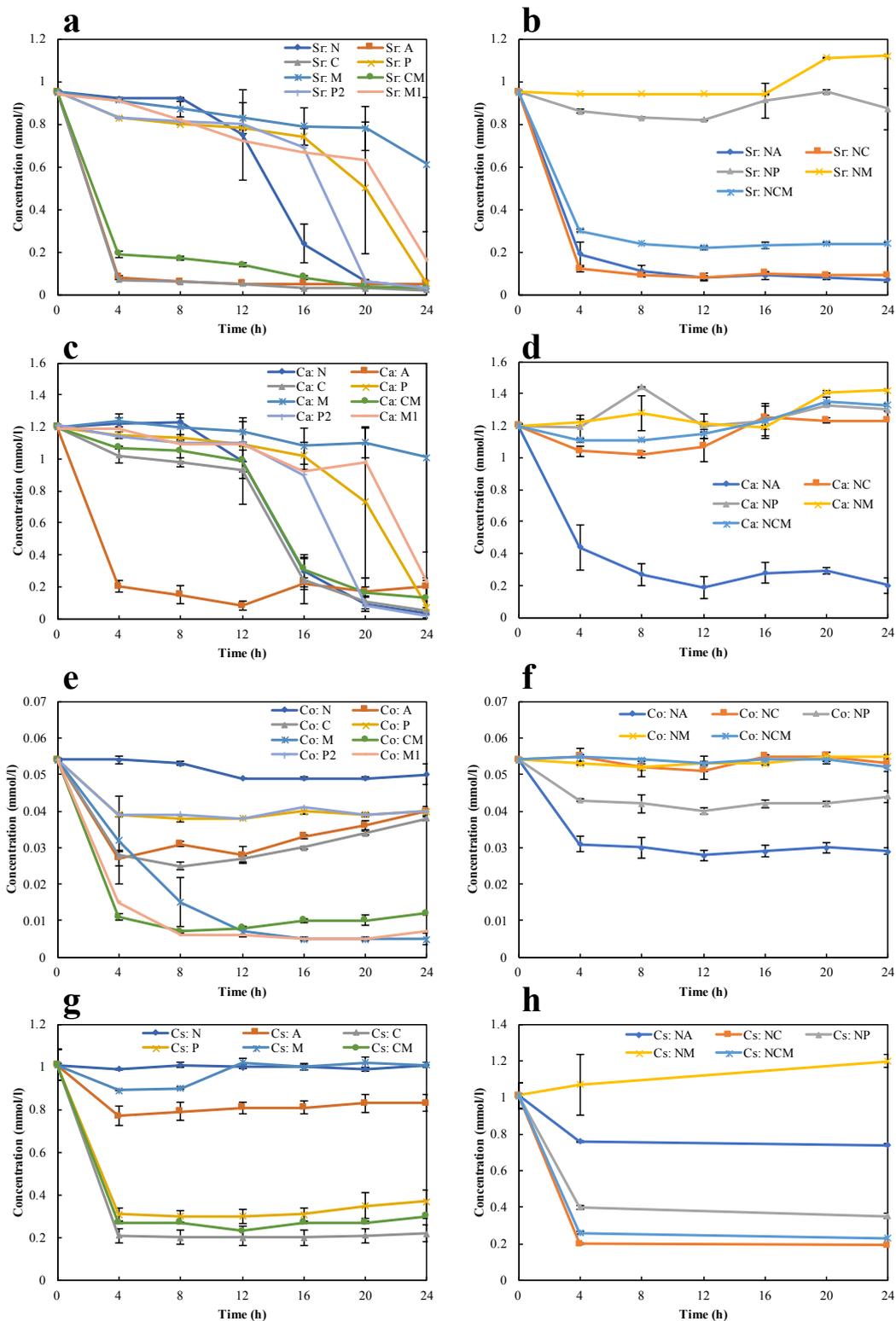


図 3. 1-24 KW3b 株と磁性体の混合培養による Sr・Co・Cs 除去試験における各元素の経時変化

(4) まとめ

バイオカルサイトの Co 及び Sr の回収能を評価するとともに、バイオアパタイトの Sr 及び Co の回収能を評価した。その結果、0.3% NaCl の低塩濃度においては3株全てが Sr 除去率 99-100%を示し、KW3b1 株及び KW3b2 株は、塩濃度 5%以下で Sr の高い回収能を示すことを明らかにした。カルサイト生成菌株による Co 回収能を評価した結果、僅かではあるがバイオカルサイト中への濃集を明らかにした。バイオアパタイトによる Sr 及び Co の回収能を評価した結果、TK6 菌群は G2P を分解し、培養 30 日までに 64% の溶存 Co、37%の溶存 Sr を溶存 Ca と共にリン酸塩として培養液中から除去することを明らかにした。

磁性体を付加した場合、混合培養試験では添加した磁性体の種類または有無にかかわらず、KW3b 株は培養 24 時間で溶存 Sr 及び溶存 Ca を 98%減少した。Co 除去能については、16 時間で 90.7%と高い Co 除去率を示した。一方、マグネタイトだけ及び菌体だけを用いた条件では溶存 Co を除去できなかった。この結果は、混合培養 M 及び CM では微生物とマグネタイトは共存することで溶存 Co を除去する新たな反応が関与している可能性を示した。

以上の結果から、磁性体付加バイオ鉱物により Sr 及び Co の水溶液中濃度が 1/10 以下となる目標を達成できた。

3.2 バイオ鉱物などのナノ化による流動性向上技術の確立

3.2.1 ゼオライト粒子の土壤空隙中における流動性の向上 (H26-H28)

(1) 目的

ゼオライト粒子及びカルサイト粒子の土壤空隙中における流動性の向上を図る。そのため、細粒化したゼオライト及びカルサイト粒子に親水基を付加する試験を実施する。さらに、細粒化したゼオライト及びカルサイト粒子の流動性を評価するため、カラム試験を実施する。また、Sr 及び Co の水溶液中濃度が 1/10 以下になる目標を達成するため、親水基付加細粒化ゼオライトに Sr 及び Co を吸着する試験を実施し、水溶液中における Sr 及び Co 濃度を測定する。

(2) 実験手法

自転・公転ナノ粉砕機を用いてゼオライト粉末及びカルサイト粒子を粉砕した。ゼオライト粉末及びカルサイト粒子 8 g、ジルコニア粒子 40 g、水 15 mL を混合し、高速で回転させた。操作は 2 回行った。得られた混合体を乾燥機で乾燥させた後に水に分散させ、分散性の評価を行った。また、動的光散乱法(DLS)により、粉砕したゼオライト及びカルサイトの粒径を評価した。さらに 15 μm の空隙を有するカラムビーズ層に透過させ、前後の濁度を測定することによりそれぞれの粉末の流動性を評価した。

流動性を評価するカラム試験では、細粒化したゼオライト粉末及びカルサイト粉末 30 mg、カルボキシメチルセルロース 10 mg、水 5 mL を混合した後、超音波洗浄機を用いて 25°C 下で 15 分間超音波を照射した。得られた親水化処理ゼオライトの分散性の評価を行った。また、15 μm の空隙を有するカラムビーズ層に透過させ、操作前後の濁度を測定することによりそれぞれの粉末の流動性を評価した。

Sr 及び Co を吸着する試験では、親水基を付加したゼオライト粉末及びカルサイト粉末をそれぞれ 0.01mM の塩化ストロンチウム、塩化コバルトを含む 7 mL の水に分散させて攪拌した。添加後、0.25、0.5、1、2、5、24 時間後の水溶液をそれぞれ採取し、10,000rpm で 5 分間遠心分離して粉末を沈殿させ、0.22 μm のフィルターに通した。上精に含まれるストロンチウムイオン及びコバルトイオンの量を誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)で測定し、粉末のストロンチウムイオン及びコバルトイオンの吸着量を評価した。

親水基を付加したゼオライト粉末及びカルサイト粉末への Sr 及び Co の吸着を調べる試験では、粉末試料をそれぞれ 0.01mM の塩化ストロンチウム、塩化コバルトを含む 7 mL の水に分散させて攪拌した。添加後、0.25、0.5、1、2、5、24 時間後の水溶液をそれぞれ採取し、10,000rpm で 5 分間遠心分離して粉末を沈殿させ、0.22 μm のフィルターに通した。上精に含まれる Sr イオン及び Co イオンの量を誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)で測定し、粉末の Sr 及び Co の吸着量を評価した。

(3) 結果と考察

粉碎したゼオライト粉末及びカルサイト粉末 30 mg をそれぞれ水 5 mL と混合して水への分散性を評価した。図 3.2-1 に示すように、粉碎したゼオライトは1時間以上沈殿せず、高い分散性を示した。粉碎したカルサイトについても同様の結果を得た。一方、未処理のゼオライト、カルサイトは水に混合後直ちに沈殿した。

図 3.2-2 に親水化処理を行ったゼオライト及びカルサイト分散水溶液を2時間静置した後の様子を示す。図に見られるように、親水化処理したゼオライト及びカルサイトはほとんど沈殿しなかった。DLSにより、粉碎したゼオライトを粒度分析から、ゼオライト粒子及びカルサイト粒子の粒径は $2.5 \pm 0.05 \mu\text{m}$ 、 $2.2 \pm 0.02 \mu\text{m}$ であり（図 3.2-3）、細粒化していることが明らかとなった。さらに、カラムビーズを用いた透過試験では、親水化した粒子のほぼ 100%がカラムビーズを透過した。以上の結果より、ナノ化したゼオライトにカルボキシメチルセルロースを添加することによりゼオライト及びカルサイトの分散性の向上を達成した。

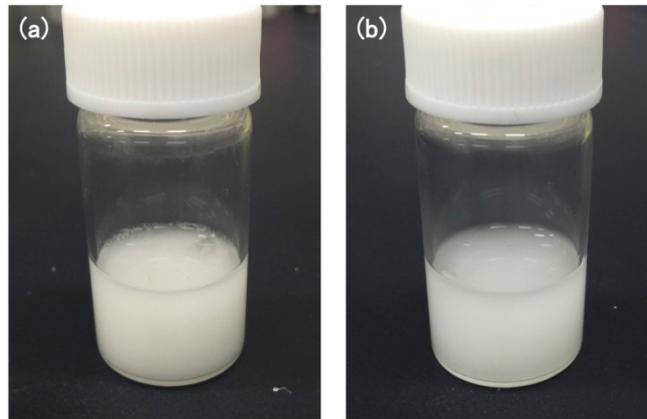


図 3.2-1 ゼオライト分散水溶液（1時間静置後）（(a)ナノ化ゼオライト、(b)親水化処理ゼオライト。（b）の方がより白濁しており分散性に優れていることが分かる。

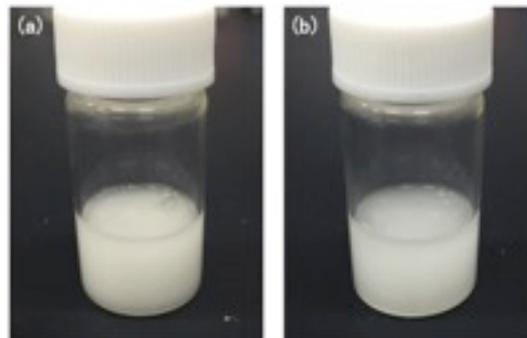


図 3.2-2 親水化処理ゼオライト分散水溶液及び（b）親水化カルサイト分散水溶液（2時間静置後）

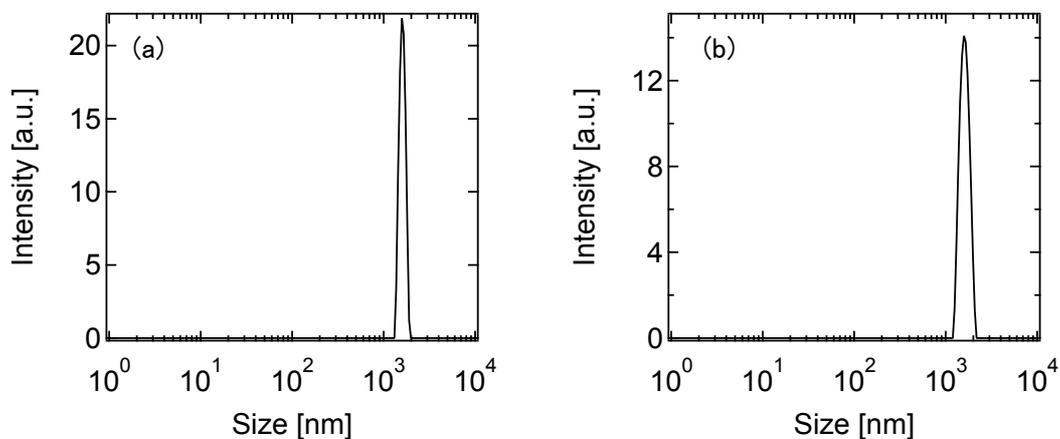


図 3.2-3 細粒化ゼオライト (a) 及びカルサイト (b) のサイズ分布

図 3.2-4 に反応時間に伴う親水基付加ゼオライト溶液中の (a) ストロンチウムイオン、及び (b) コバルトイオンの除去率 (吸着率) を示す。図に見られるように、親水基付加したゼオライトは添加直後にほぼ 100% のストロンチウムイオン、コバルトイオンを除去した。一方、普通のゼオライトは親水基付加したゼオライトよりも低い除去率を示した。親水基付加したカルサイトについても同様に 90% 以上の高い除去率を示した。以上の結果より、親水基付加したゼオライト、カルサイトは高いストロンチウム、コバルトイオン除去能を有することが示された。

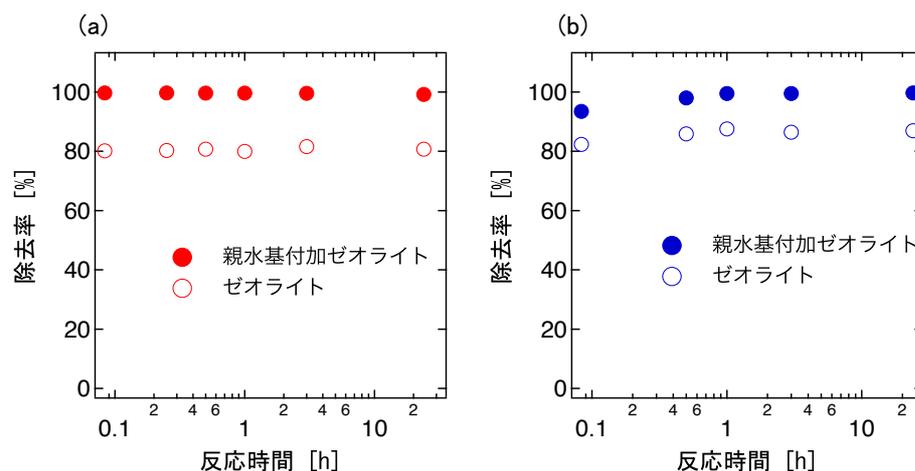


図 3.2-4 ゼオライトの (a) ストロンチウムイオン、(b) コバルトイオン除去率の経時変化

(4) まとめ

土壌間隙あるいは亀裂中に存在する Sr を取り込み、沈着させるためには、ゼオライトやカルサイトがより広範囲に行き渡るように流動性を高める必要がある。

本試験の結果より、粉碎したゼオライト及びカルサイトは1時間以上沈殿せず、高い分散性を示した。さらに、カラムビーズを用いた透過試験では、細粒化した粒子のほぼ100%がカラムビーズを透過した。以上、ゼオライト粉末及びカルサイト粒子を微細化し、分散性及び流動性の向上を達成した。また、親水基処理をしたゼオライト及びカルサイトは、Sr 及び Co 溶液からほぼ90%以上の Sr 及び Co を除去したことから、高い除去能を有することを明らかにした。

参考文献

- [1] T. Ohnuki, N. Kozai, Adsorption behavior of radioactive cesium by non-mica minerals, *J. Nuclear Science & Technology*, vol. 50, pp. 369-375, 2013.

3.3 最先端分析法による化学状態分析

3.3.1 化学状態の変化の明確化 (H26-H28)

海水に溶解したSr及びCoがバイオアパタイト及びバイオカルサイトにそれぞれ取り込まれることによるSr及びCoの化学状態の変化の明確化を図る。そのため、放射光施設におけるX線吸収微細構造分析などにより解析する。

(1) 試験方法

微生物が生成したバイオ鉱物に取り込まれたSr及びCoの化学状態を分析する手法として、X線の吸収端付近の吸収スペクトルを解析するX線吸収端近傍微細構造解析(X-ray Absorption Near-Edge spectroscopy; XANES)及び高エネルギー側でのX線吸収の振動を解析する広域X線吸収微細構造解析(Extended X-ray Absorption Fine Structure; EXAFS)を用いた。XAFSは原子のX線吸収によって生じた光電子波と近傍原子によって散乱された光電子波の干渉によるもので、吸収端のエネルギーは元素固有の値をとるので、元素選択的な情報を引き出すことができる。XAFS スペクトル解析から得られる構造因子として、X線を吸収した原子近傍の原子種、配位数、原子間距離等の情報が得られる。XAFSは試料の短距離的な秩序構造を反映しているため、一次的な構造情報が得られる。

SrのX線吸収端としてはエネルギーが高いK吸収端(16.10keV)と低いL吸収端(L_{III}吸収端: 1.9396 keV)がある。CoのK吸収端は7.710keVである。高エネルギー加速器研究機構(KEK)のフォトンファクトリー(PF)ではK吸収端の測定が可能である。本研究では、XANES及びEXAFSの解析が可能なSr及びCoのK吸収端を対象として、放射光施設であるKEK、PFのビームラインBL-27Bにおいて、XANES及びEXAFS解析を行った。

Sr及びCoのK吸収端XAFS測定用には、標準試料については窒化ホウ素(BN)と粉末試料の所定量を乳鉢で30分間混合した後、金型中で直径10mm、厚さ1mm程度のペレットに圧縮成形したものを試料とした。入射X線及び透過X線の測定にはイオンチャンバーを用いた。モノクロメーターは、Sr及びCoのK吸収端XAFS測定にはSi(111)を用いた。微生物により生成した沈殿物の測定では、微生物培養溶液を遠心分離した後沈殿物を0.2 μ mのフィルターによりろ過回収し、1cm \times 1cmのポリビニル製の袋に2重に封入した。XAFSスペクトルの測定は、蛍光法で行った。測定では、7素子半導体検出器により蛍光X線の測定を行った。

EXAFSスペクトルのデータ解析、モデル構造から波数kの関数であるEXAFS振動 $\chi(k)$ 及びカーブフィッティング(モデル構造のEXAFSスペクトルへの合わせ込み)には、XAFS用解析ソフトREX2000(Rigaku, Japan)を用いた。

Sr及びCoの回収能が高いKW3b株についての結果、及び、磁性体を付加したバイオ鉱物の混合物中のFe、Sr、Coについての解析結果を述べる。

(2) 試験結果及び考察

図 3.3-1に、1mMのSrを添加した培地でTK2d株を120時間培養した際に生成したカルサイト（バイオカルサイト）のXANESスペクトルを示す。図にはSrの標準試料スペクトルとして、 SrCO_3 、 SrCl_2 及びSrを CaCO_3 と無機的に共沈させて生成したSr- CaCO_3 のスペクトルを示す。バイオカルサイト中のSrのXANESスペクトルでは、16110eV付近に最初のピーク（第一ピーク）が現れ、16140eV付近に第二のピークが認められる。一方、標準試料のスペクトルでは、 SrCO_3 では第一ピークのエネルギーは16110eV付近で第二ピークのエネルギーは16150eVであった。 SrCl_2 では、第一ピークのエネルギーは16110eV付近であり、第二ピークのエネルギーは16145eV付近であった。Sr- CaCO_3 では第一ピークのエネルギーは16110eV付近であり、第二ピークのエネルギーは16150eV付近であった。このように、第一ピークが現れるエネルギーはすべての試料でほぼ同じであったが、第二ピークのエネルギーは試料により異なった。そこで、3種類の標準試料のXANESスペクトルをベースとして、バイオカルサイト中のSrのXANESスペクトルのフィッティングを行った。図3.3-1中に破線で示すスペクトルは、 SrCl_2 :34%、Sr- CaCO_3 :61%及び SrCO_3 :5%として得たものであり、バイオカルサイト中のSrは半分以上が CaCO_3 との共沈物中のSrと同じ化学状態であった。

我々の結果と先行研究[1]で標準物質を用いて得られた、カルサイト構造、アラゴナイト構造及びストロンチアナイト中のSrのXANESスペクトル(図 3.3-2)と比較した。3つのスペクトルにおいて第一ピークが現れるエネルギーは16110eVであり、本研究と同じであった。一方、第二ピークについてはカルサイト中のSrの場合には16160eV付近であるが、アラゴナイト及びストロンチアナイトでは16150eV付近でありカルサイト中のSrよりも低いエネルギーである。この結果とバイオカルサイト中のスペクトルの比較から、バイオカルサイト中ではカルサイト構造中のSrとは異なる化学状態の可能性がある。

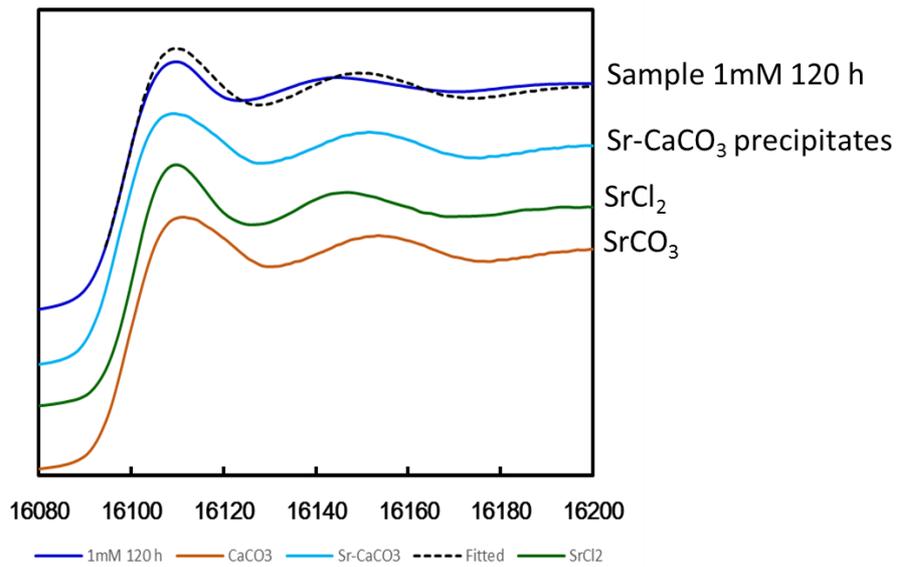


図 3.3-1 1mMのSrを添加した培地でTK2d株を120時間培養した際に生成したバイオカルサイトのXANESスペクトル

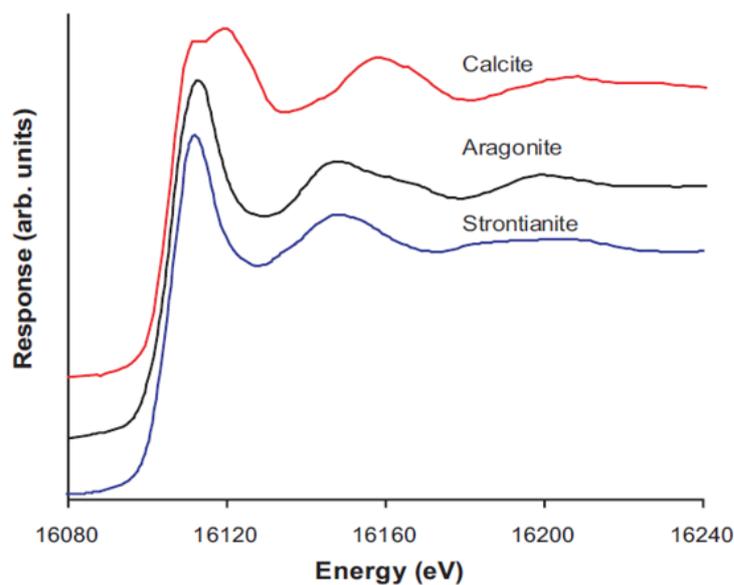


図 3.3-2 標準物質を用いて得られた、カルサイト構造、アラゴナイト構造及びストロンチアナイト中のSrのXANESスペクトル (Singer et al. 2008)

図 3.3-3に、0.1mMのSrを添加した培地でKW3b1株を24、144時間培養した際に生成したカルサイト（バイオカルサイト）のSrのK吸収端のXANESスペクトルを示す。図中に実線で示すスペクトルは、標準物質であるSrCl₂、Sr-CaCO₃及びSrCO₃のスペクトルを用いてフィッティングした結果である。それぞれの化学状態の割合を表3.3-1に示す。表

3.3-1から、Srの大部分が SrCO_3 と同じ化学状態が存在し、20%以下が SrCl_2 と同じ化学状態で存在し、残りが Sr-CaCO_3 と同じ状態であることが分かる。時間の経過に着目すると、 Sr-CaCO_3 の化学状態で存在する部分が時間の経過とともに増加した。この結果は、時間の経過とともにSrがカルサイト内に取り込まれていくことを示唆している。

KW3b1株により生成したカルサイトに取り込まれたSrのEXAFSスペクトルを図3.3-4に示す。EXAFSスペクトルの解析で得られたSrの近傍の元素解析から、酸素の外側にC及びSrが検出できたことから、結晶のような構造であることが分かり、XANESの解析結果と調和的である。

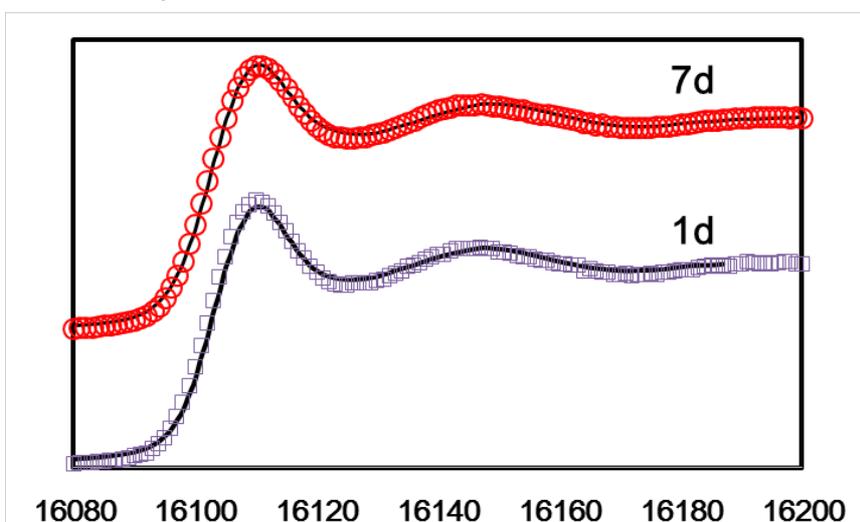


図 3.3-3 0.1mMのSrを添加した培地でKW3b1株を24時間(1日)、144時間(7日)培養した際に生成したカルサイト中のSrのK吸収端のXANESスペクトル

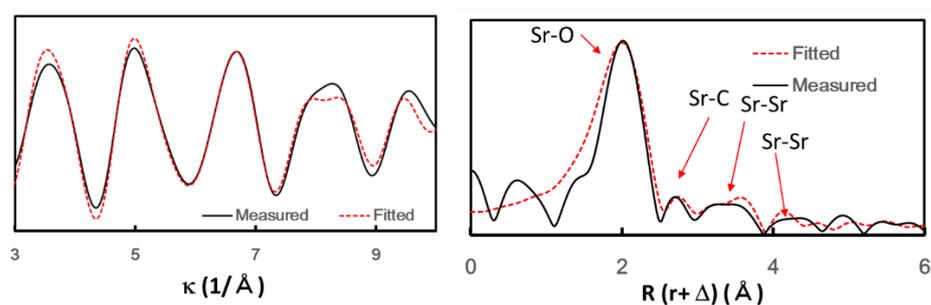


図 3.3-4 KW3株により生成したカルサイトに取り込まれたSrのEXAFSスペクトル
黒線は測定データ、赤線はフィッティングにより得られたスペクトル

表 3.3-1 標準物質（化学状態：SrCl₂、Sr-CaCO₃及びSrCO₃）を用いて得られたSrのバイオカルサイト中におけるそれぞれの化学状態の存在割合の経時変化

Day	1	2	3	7
SrCl ₂	20	13	13	13
SrCO ₃	80	82	66	65
Sr-CaCO ₃ -Coprep	0	5	21	22

図 3.3-5 には KW3b 株により生成したカルサイトに取り込まれた Co の XANES スペクトルを示す。標準物質としては Co(II)Cl₂ と Co(III)OOH のスペクトルを併せて示す。Co の価数の違いによりピークの現れるエネルギーが異なる。カルサイト中の Co の価数は変化せず、II 価のままであることを示している。ただ、Co のピークよりも高いエネルギー領域の強度が CoCl₂ よりも高いことから、一部の Co が III 価になっている可能性がある。溶液中の Co 濃度の変化はほとんどなかったが、XANES スペクトルが検出されたことは、Co のごく一部がカルサイトに取り込まれていることを示す。図中の、赤線は培養開始時に Co を添加した場合であり、水色線はある程度培養した後に Co を加えた場合に得られた XANES スペクトルである。XANES スペクトルの強度は Co を後から添加した場合が高かった。Co は微生物に毒性が強いことが知られている。このことは、カルサイトの生成が毒性元素からの防御として働いていることを示唆している。

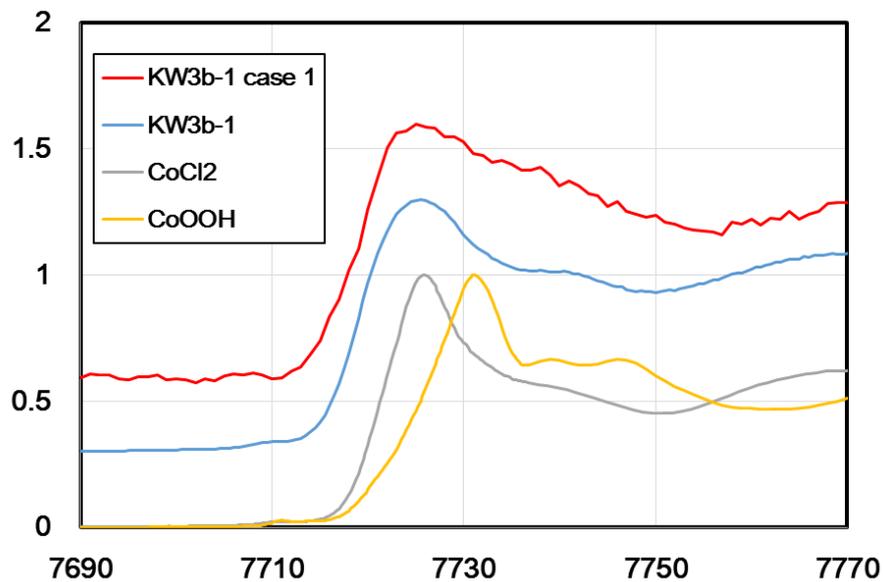


図 3.3-5 KW3b株により生成したカルサイトに取り込まれたCoのXANESスペクトル

磁性体(ナノマグネタイト)添加試料中のFeのXANES解析を行った。チャバサイト、KW3b株にチャバサイトを添加した試料、KW3b株にチャバサイトと磁性体を添加した試料、及びKW3b株に磁性体を添加した試料のXANESスペクトルを図3.3-6～3.3-9に示す。図では、緑色の線が測定値であり、赤線がLinear combination fittingにより、マグネタイト (Fe_3O_4) とヘマタイト (Fe_2O_3) のXANESスペクトルによりフィッティングした結果である。フィッティングにより得られた Fe_3O_4 と Fe_2O_3 の割合を表3.3-2に示す。

チャバサイトはFeを含んでおり一部(約20%)が Fe_3O_4 であることから、2価鉄を含むことが分かる。チャバサイトを微生物に添加することによる Fe_3O_4 と Fe_2O_3 の割合はほとんど変化しない。このことは、チャバサイト中のFeの状態は微生物と接触してもほとんど変化しないと考えられる。KW3b株に磁性体を添加した場合でも、そのほとんどが Fe_3O_4 であることから、磁性体中のFeの化学状態は変化しないと考えられる。

一方、KW3b株にチャバサイトと磁性体を添加した試料中のFeについては、89%が Fe_3O_4 であり、11%が Fe_2O_3 であった。磁性体とチャバサイトの混合率は2:3であることから、混合試料中には Fe_3O_4 含有量が圧倒的に高い。ゼオライトの鉄含有量は1%程度であることから、混合試料中には98%以上が Fe_3O_4 として存在するはずである。微生物と接触後に、89%に減少したことから、一部のFeが溶解した可能性がある。溶解したFeが沈殿して3価の鉄鉱物が生成した可能性が高い。KW3bに磁性体を添加しただけでは、磁性体中のFeの化学状態変化は起きていないことから、チャバサイトの存在が影響している可能性が高い。

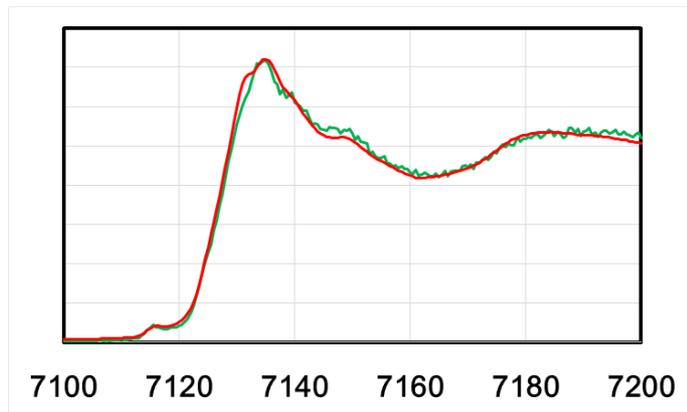


図 3.3-6 チャバサイト中のFeのXANESスペクトル

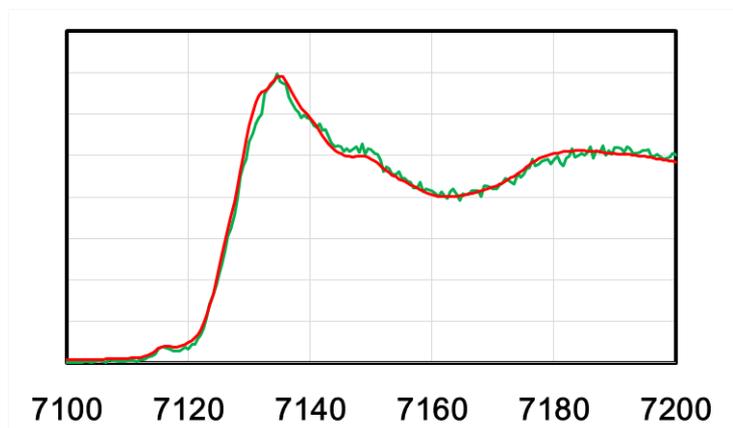


図 3.3-7 チャバサイトを添加したSr、Co含有培地でKW3b株を8時間培養した後のFeのXANESスペクトル

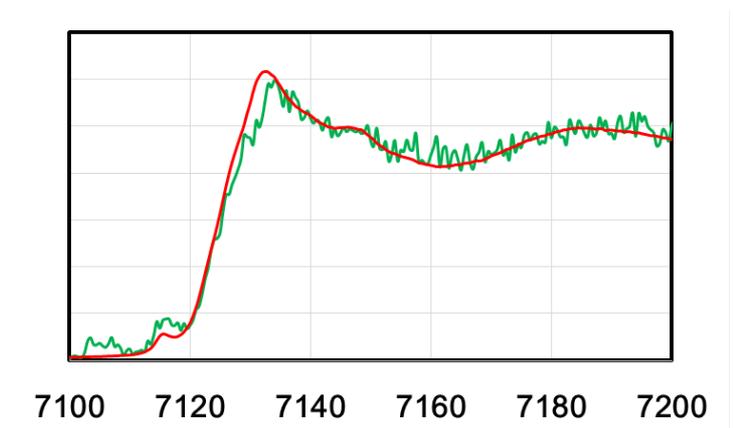


図 3.3-8 チャバサイト及び磁性体を添加したSr、Co含有培地でKW3b株を24時間培養した後のFeのXANESスペクトル

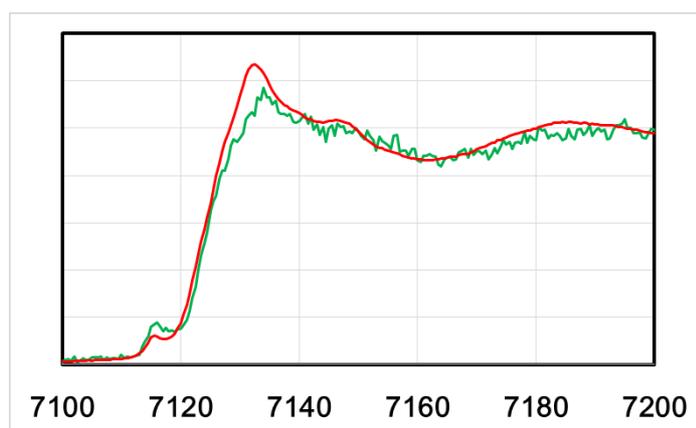


図3.3-9 磁性体を添加したSr、Co含有培地でKW3b株を24時間培養した後のFeのXANESスペクトル

表3.3-2 標準物質（化学状態：Fe₃O₄ 及び Fe₂O₃）を用いて得られた磁性体付加試料中におけるFeの存在割合

	Fe ₃ O ₄	Fe ₂ O ₃
チャバサイトのみ	20	80
KW3b 株とチャバサイト 8 時間培養後	18	82
KW3b 株と磁性体 24 時間培養後	100	0
KW3b 株、チャバサイト、磁性体 24 時間培養後	89	11

(4) まとめ

バイオカルサイトに取り込まれた Sr の XANES スペクトルの解析から、TK2d 株及び KW3b 株により生成するカルサイト中で、Sr は時間の経過とともに Sr を含む固相が形成されていく可能性を明らかにした。一方、カルサイトに取り込まれた Co の XANES スペクトルから、カルサイト中のほとんどの Co の価数は変化せず II 価のままであり、一部が III 価になっている可能性があることを明らかにした。溶液中の Co 濃度の変化はほとんどなかったが、XANES スペクトルが検出されたことから、Co のごく一部がカルサイトに取り込まれていることを明らかにした。TK6 株により生成したアパタイトに取り込まれた Sr の XANES スペクトル及び EXAFS スペクトルから、アパタイト中の Sr は水溶液に溶けた Sr イオンと同じような化学状態であることを明らかにした。

磁性体を付加した場合の試料中の Fe の化学状態を明らかにした。KW3b 株にチ

ヤバサイトと磁性体を添加した試料中のFeについては、89%が Fe_3O_4 であり、11%が Fe_2O_3 であった。この結果から、一部のFeが溶解し、再沈殿して3価の鉄鉱物の生成が示唆された。

3.3.2 電子顕微鏡分析による Sr 及び Co の存在位置及び存在形態の明確化 (再委託先：九州大学) (H26-H28)

(1) 目的

好塩菌による炭酸塩、リン酸塩の生成、収着過程を最先端の電子顕微鏡を用いて解明するとともに、Sr、Cs、Co などの取り込み機構、その存在状態を明らかにすることを目的とした。また、新規開発された磁鉄鉱ナノ粒子で表面を修飾させた各種ゼオライトとその他の鉱物の組み合わせによって吸着された各元素の存在状態をミクロスケールで解明することも目標とした。

(2) 分析方法

計測には九州大学超顕微解析センター所管のダブル球面収差補正走査透過型電子顕微鏡、JEOL ARM200F を用いた。加速電圧は 200kV、最高分解能は 0.11 nm である。照射レンズ系、結像レンズ系のそれぞれに収差補正機能を装備しており、最高感度の SDD 型 X 線検出器 (立体角 0.8sr) を搭載したエネルギー分散型 X 線分析装置 (EDS, JEOL JED-2200) を装備し、Analysis Station ソフトウェアを用いて元素マッピング、点分析、スタンダードレス半定量を行った。EDS 分析における検出限界はおよそ 0.1 wt% である。結像には走査透過電子顕微鏡 (STEM) モードの高角環状暗視野像と透過電子顕微鏡 (TEM) モードの高分解能像 (HRTEM) を適宜用いた。STEM モードでも電子線プローブの径は約 0.1 nm である。

試料は芝浦工大より冷蔵のまま輸送され、到着後すぐに冷蔵庫で 4℃ にて保存した。微生物試料は NaCl 溶液組成の懸濁液として遠心用チューブに入っており、観察日の前日に脱塩処理 (超純水でゆすぎ、遠心分離後上澄みのみを捨てる操作を 3 回繰り返した) を行った。超純水で適量に濃縮した微生物懸濁液をスポイトでとり、holey carbon コーティング Cu メッシュグリッド上に滴下して、TEM 観察試料を作製した。また、カルサイト生成菌の KW3b に関しては、粗粒 (数十ミクロン) かつ特徴的な塊状粒子を形成していたので、集束イオンビーム装置を用いて中心部の断面を切断し超薄切片化 (~200 nm 以下) して TEM 用試料とした。また磁性を持つ物質が含まれる試料の懸濁液はカーボンテープ上にのせて自然乾燥させた。カーボンテープをアルミ板に乗せ、カーボンコータ SC-701C を用いて試料表面に 9 nm のカーボンコーティングを施し SEM 用試料とした。

(3) 結果及び考察

無機的に沈殿したカルサイトの大部分は図 3.3-10 に示されるような自形の結晶を成していた。大きさは数マイクロから数十マイクロ程度まで比較的大きく成長していることが分かった。図 3.3-10 の EDS スペクトルのように Sr の濃度は非常に低いことが分かった。

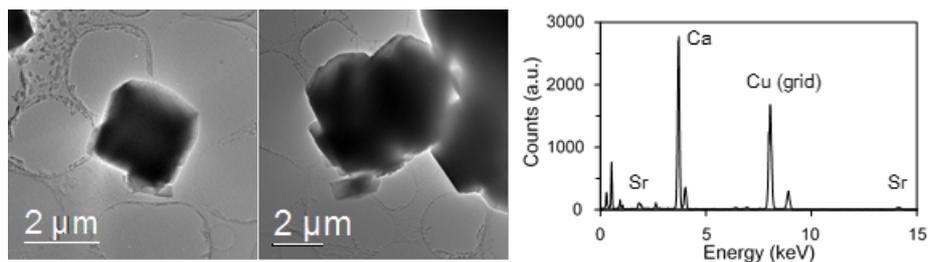


図 3.3-10 無機的に合成されたカルサイトの BFTEM 像とその EDS スペクトル

図 3.3-11 に Sr 初期濃度 1 mM で 65 時間培養した TK2d 株の HAADF-STEM 画像とその画像領域全体の元素マップ及び地点 001、002 の EDS 点分析の結果を示す。HAADF-STEM 画像であるので重い元素の存在部分または厚みのある部分のコントラストが高くなる。像中の白い筋状の物は holey carbon である。0.5 μm 程度の球状の微生物が存在していることが分かるとともに、元素マップから微生物部分が C、O、P、Ca、Sr を含んでいることが分かる。また、Ca と Sr の分布はほぼ一致しているが P 等のマップとは一致せず、球形を保った微生物のなかには Ca、Sr を含まないものも存在する。培養の際に Ca と Sr が個々の微生物に選択的に取り込まれたとは考えられないため、一回取り込まれた Ca と Sr が細胞溶解によって外部に放出され、細胞膜等が残り C、P が検出されたと考えられる。また、地点 001、002 の EDS 点分析の結果から Sr の濃度は定性的に微量であることが分かった。

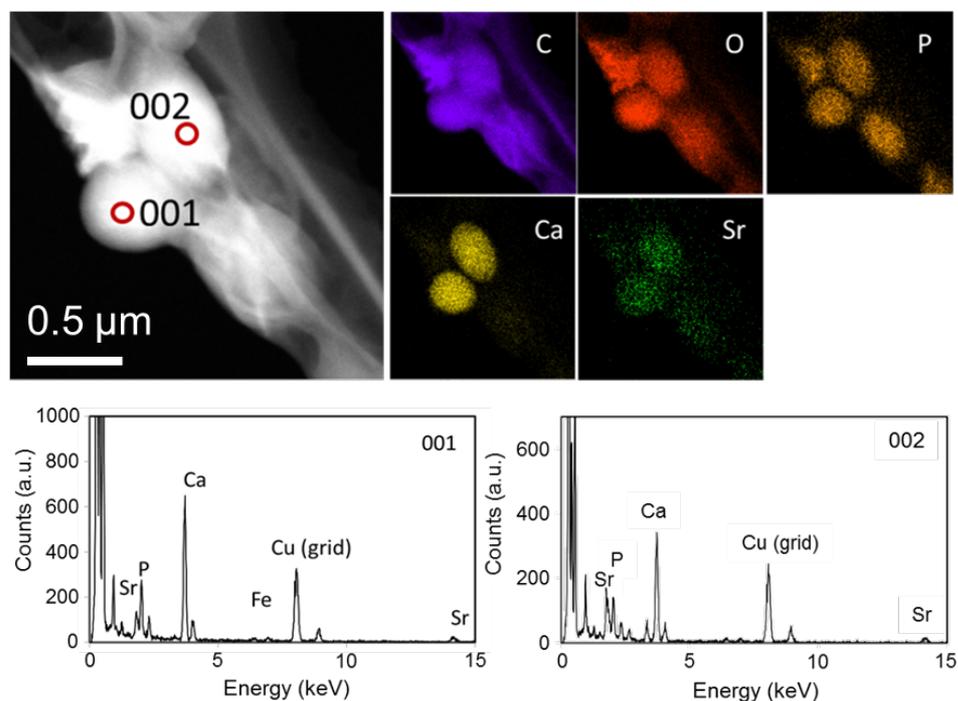


図 3.3-11 Sr 初期濃度 1 mM で 65 時間培養した TK2d 株の HAADF-STEM 像とその元素マップ
点分析は HAADF-STEM 像内の地点 001、002 に対応している。

図 3.3-12 に Sr の初期濃度を図 3.3-11 の 5 倍に濃くした条件で 93 時間培養した TK2d 株の HAADF-STEM 画像とその画像領域全体の元素マップ及び面分析の結果を示す。

図 3.3-12 から 1 mM の条件と同様に球形の微生物が見られた。元素マップから分かるように微細の Fe 粒子が少量存在していた。鉄粒子の組成は地点 003 のスペクトルに見られるように P、Fe が主成分であることが分かる。スペクトル 005、006 は微生物の組成を表しているが、図 3.3-11 の初期 Sr 濃度 1 mM の場合と比較すると、Sr の濃度が Sr/Ca 比換算で大幅に増加していることが定性的に分かる。つまり、溶液中の Sr の割合に応じて微生物内部に取り込む Sr の割合が変化することを示唆している。

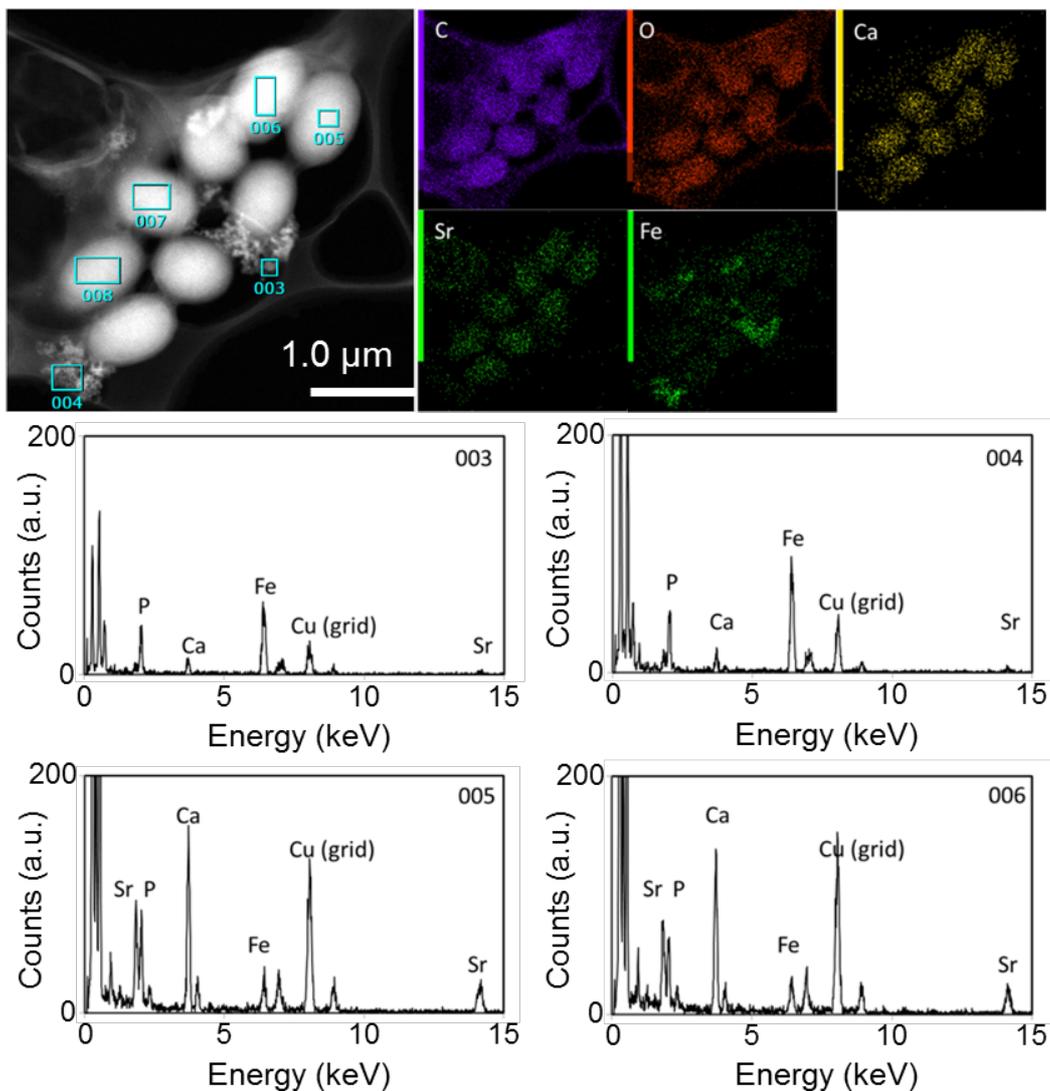


図 3.3-12 Sr 初期濃度 5 mM で 93 時間培養した TK2d 株の HAADF-STEM 像とその元素マップ
画像中の数字は EDS スペクトルの番号に対応している。

図 3.3-13 に Sr の初期濃度が図 3.3-11 と同じ 1 mM の条件で溶液中から Sr 濃度が急激に減少した 192 時間培養後の TK2d 株の HAADF-STEM 画像とその画像領域全体の元素マップ及び面分析の結果を示す。図 3.3-13 (a) で見られるように塊状の二次沈殿物が大量に存在し、その中に低コントラストの球状の微生物が点在しているのが観察された。元素マップを見ると微生物の部分の C 濃度は比較的高いことが分かる。Ca と Sr は同様の分布をみせ、定性的ではあるが Sr の濃度が 65 時間培養の条件でみられた Sr の濃度と比較すると高い。図 3.3-13 (b) で微生物周りを拡大すると元素分布から微生物部分の C 濃度が比較的高いことと、Ca、Sr の濃度、特に Sr の濃度が低いことが分かり、実際これらの点分析の結果を見ると、微生物のスペクトルは前項の観察結果で見られた微生物内部の組成に類似していたが、沈殿物の組成は Sr のピークが Ca よりも高くなっていた。

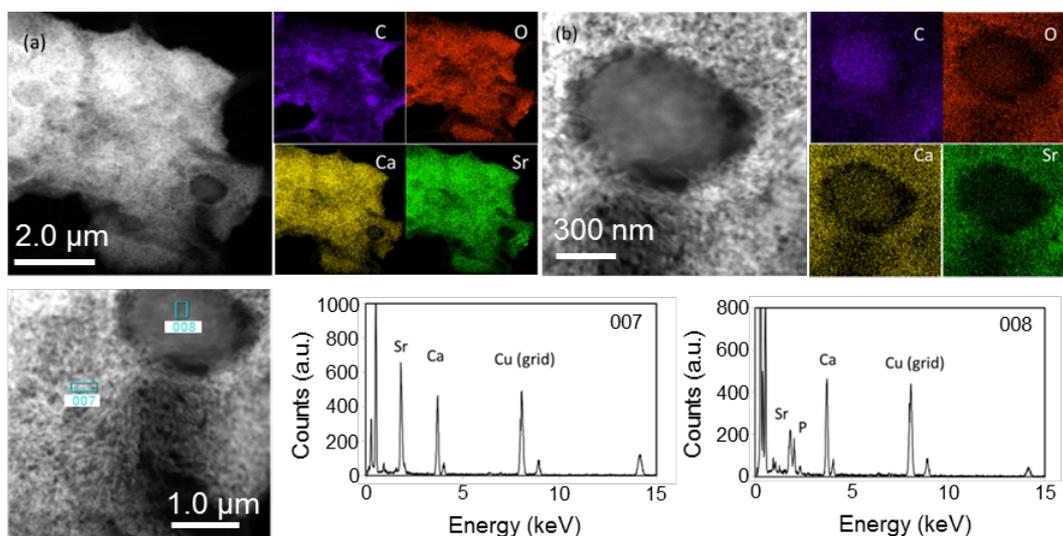


図 3.3-13 Sr 初期濃度 1 mM の条件で 192 時間後の TK2 株の元素マップ(a) 及び(a)で見られた球状の微生物周りの拡大図(b)の元素マップ及び EDS 面分析の結果

図 3.3-14 には沈殿物を拡大して図とマップを示している。これから沈殿物は微細な数 10 nm 程度の大きさの粒子の集まりであることがわかり、マップから粒子内部において組成の偏在がないことがわかり、Ca、Sr 両元素が均質に固溶していることが示唆された。通常の TEM 画像 (b), (c) から同様のナノ粒子の存在が確認され、(d) から結晶質であることが分かるとともに、(e) の SAED から格子面間隔値 (d 値) を求めると 3.41、2.81、2.58、2.42、2.03、1.81 Å 程度となった。これらの d 値はアラゴナイトの様な炭酸塩の構造に一致した。

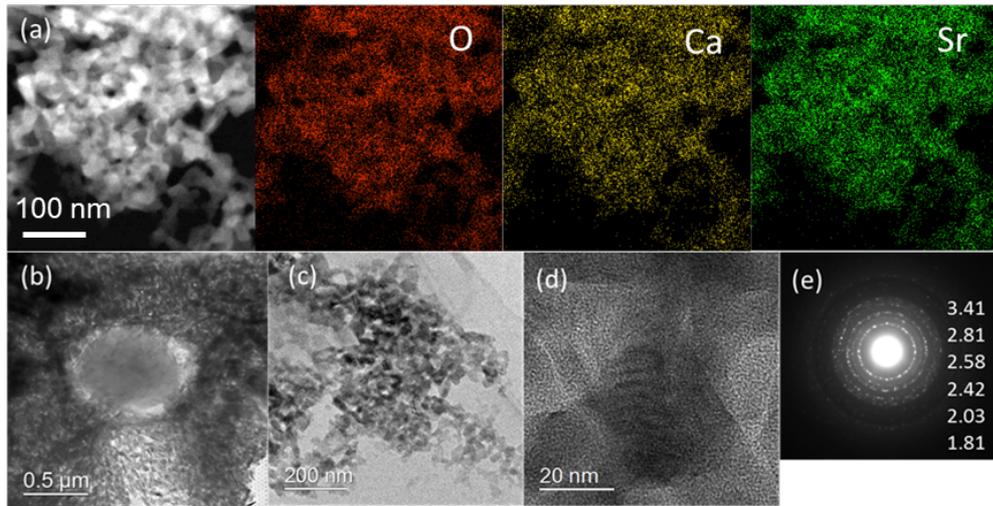


図 3.3-14 Sr 初期濃度 1 mM の条件で 192 時間後の TK2 株で生成した沈殿物の拡大図

(a) HAADF-STEM 像と元素マップ、(b) と (c) は TEM 明視野像、(d) は (c) で見られた多結晶の高分解能 TEM 像、(e) SAED 図、数値は測定した d 値 (Å)。

これよりもさらに培養時間の長い 233 時間後の二次沈殿物の HAADF-STEM 像と元素マップ及びスタンダードレスの半定量から算出した Sr/Ca モル比のまとめ、針状結晶の拡大図を図 3.3-15 に示す。培養時間 233 時間では 196 時間で見られた塊状炭酸塩以外に針状結晶が花状に生成しているものが見られ、中心を核として結晶が成長している様子が分かる (a)。また Ca と Sr の分布は培養時間 196 時間の条件と同様に結晶に高濃度かつ均質に濃集していることが分かる (a)。Sr 濃度は前項の条件で見られたものと同様に、微生物内部よりも高く (b)、スタンダードレスの半定量を行ったところ Sr/Ca モル比は (c) のように平均で 0.62 であることが分かった。(d) には針状結晶の拡大図を示しているが、幅 50~100 nm 程度の針状に見られた結晶はより小さな結晶の集合体であることが分かる。この小さな結晶は (e) の高分解能像で見られる様に ~10 nm 程度のナノ結晶であった。ただ、結晶のサイズにばらつきが見られ、数 10 nm 程度まで成長しているものもあり、これらの SAED パターンを (f) と (g) に示した。これから分かるよう

にこれらナノ結晶のサイズにばらつきがあるにも関わらず、d 値から考えられる結晶構造は、ほぼ同じカルサイト様の炭酸塩鉱物であった。

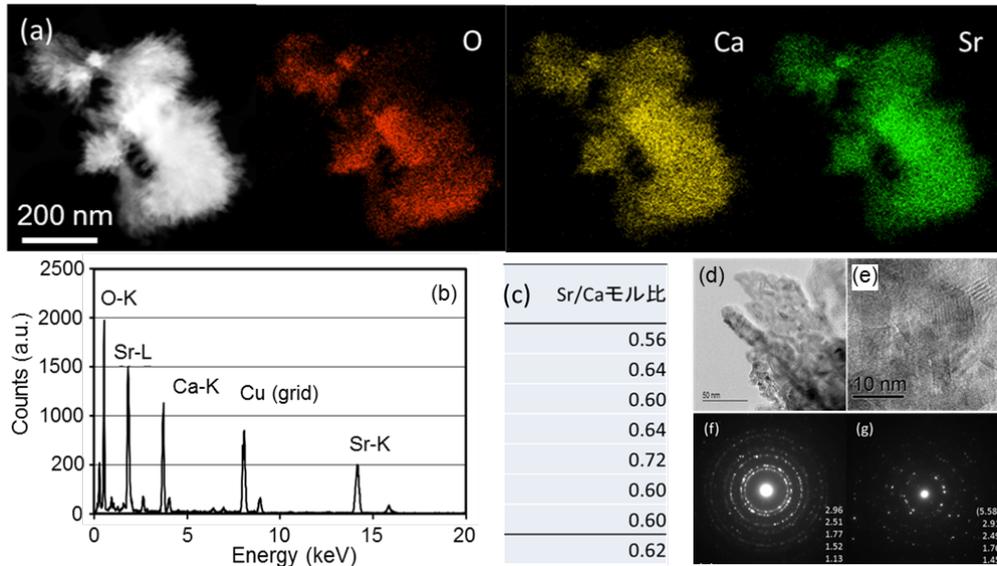


図 3.3-15 KW3b 試料の電子顕微鏡分析 (1)

(a)、(b) FIB 試料 KW3b の SEM 画像。(c) KW3b の FIB 断面 HAADF-STEM 像。(d)-(f) 画像(c)の各点における SAED パターン。(g)-(i) SAED1 地点における BFTEM 像と HRTEM 像。(j) 画像(c)右部の HAADF 像とその edx 点分析。(k) 画像(j)の右部分の STEM-EDX 元素マッピング。(l) 画像(j)の点分析 EDX スペクトル。

カルサイト生成菌 (KW3b) を Sr 含有培地で 168 時間後、 $20\ \mu\text{m}$ 程度の円盤形のカルサイト微粒子が形成していた (図 3.3-16a, b)。そのためこれらカルサイト微粒子の内部組織構造を明らかにするために FIB を用いて図 3.3-16b の赤枠の部分を取り出し断面の薄片試料を作成した後、TEM 観察を行った。図 3.3-16c に示した試料断面の HAADF-STEM 像からは、コントラストの明るいバンドのゾーニングが内部にいくつか存在することが分かった。また、下面には数 100 nm の厚さの明るいコントラスト部分が存在した。これら組成的に特徴のある部分の SAED パターンを 3ヶ所解析したところ、すべてアラゴナイト構造を持つことが分かった。図 3.3-16j に示した EDX スペクトルを図 3.3-16l に示す。このスペクトルから明るいコントラストのゾーンには Sr と Ca がより濃集していることが分かる。EDX スペクトルの定量結果から Sr/Ca モル比を計算したところ外縁部は 2.3、内部の明るいコントラストゾーンは 1.5、暗いコントラストゾーンは 1.3 であった。図 3.3-16g, h, i には外縁部の拡大図を三画像載せている。これからゾーニングに垂直に放射状に中心部から外側に向かって $3\ \mu\text{m}$ 長、30 nm 幅の針

状結晶が放射状に成長していることが分かる。これらより、Sr の濃集が均質におこるのではなく、収着濃度を変化させながらアラゴナイトのナノ結晶として取り込んでいくことが示唆された。

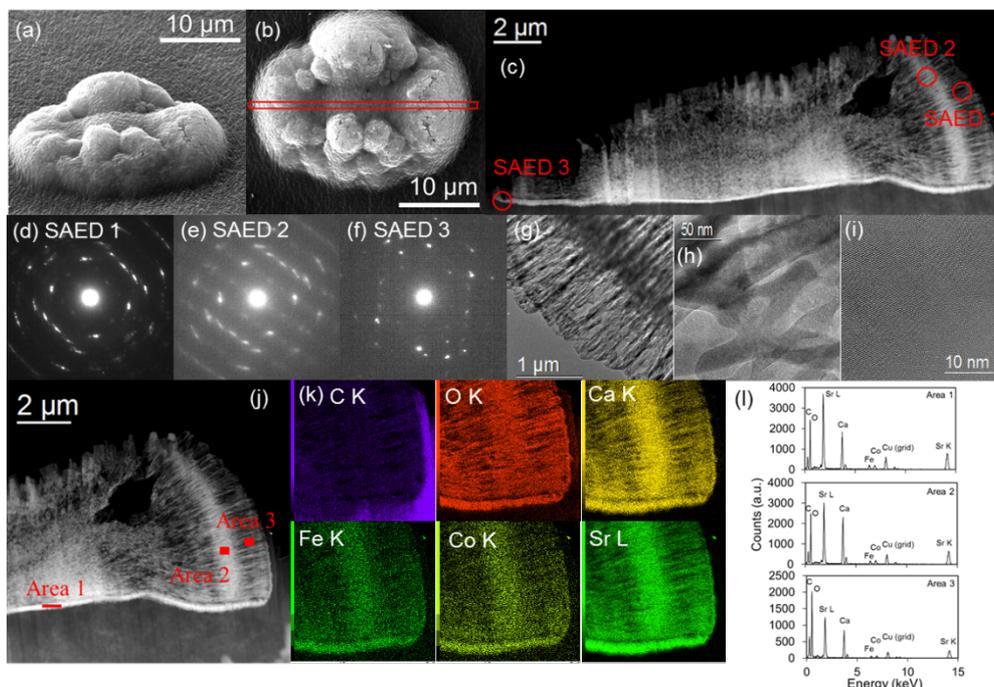


図 3.3-16 KW3b 試料の電子顕微鏡分析 (2)

(a)、(b) FIB 試料 KW3b の SEM 画像、(c) KW3b の FIB 断面 HAADF-STEM 像、(d)-(f) 画像(c)の各点における SAED パターン、(g)-(i) SAED1 地点における BFTEM 像と HRTEM 像、(j) 画像(c)右部の HAADF 像とその edx 点分析、(k) 画像(j)の右部分の STEM-EDX 元素マッピング。(l) 画像(j)の点分析 EDX スペクトル。

一方、KW3b を Co 添加培地で 72 時間培養し、Co 収着相を TEM で観察した結果を図 3.3-17 に示す。明瞭な微生物の形状は判別できなかったが、Co 含有相はおよそ 2 パターンの組織を呈していた。一つは塊状になってほぼ球状のような形をしているもので(図 3.3-17a)、もう一つは幅~10 nm、長さ~100 nm 程度の針状ナノ結晶の集合体(図 3.3-17b)であった。SAED パターンから両方の存在形態とも同じ結晶構造をとることが分かった。SAED パターン解析(図 3.3-17c)からこれらの結晶は Co_3O_4 と同定され、またこの微粒子は針状のナノ粒子であることが分かった(図 3.3-17f)。これら Co_3O_4 のナノ結晶は均質に存在する一方で、Ca が全く含まれず、Co の酸化物であることが示唆された(図 3.3-17e)。これらの結果から、KW3b は Co の炭酸塩を形成することはできないことが分かった。酸化物の析出は KW3b が関与した微生物起源生成物というよりは KW3b の関与しない無機的な沈殿形成プロセスの可能性がある。

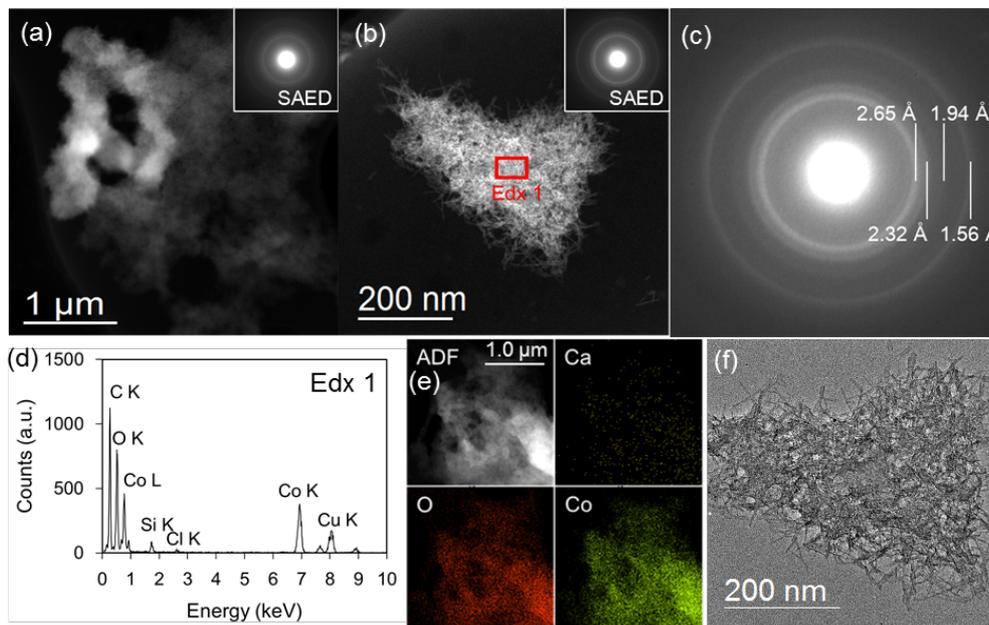


図 3.3-17 KW3b によって生成した Co 含有相の電子顕微鏡分析

(a)、(b) HAADF-STEM 像と SAED パターン、(c) SAED パターンの解析結果、(d) (b) の EDX スペクトル、(e) HAADF 画像と STEM-EDX 元素マップ、(f) 凝集体の BFTEM 像。

アパタイトを生成する微生物 TK6 株に対して Sr 添加培地で 14 日間培養したものを TEM 観察した。HAADF-STEM 画像では長径 $1\text{--}2\ \mu\text{m}$ の楕円形の形状が見られ、微生物の細胞の形状を保っていることが分かった(図 3.3-18a)。図 3.3-18a の拡大図を図 3.3-18b に示す。細胞内は $100\ \text{nm}$ 以下の塊状粒子が充填していたが、細胞外でも同様の粒子が存在した。これらの塊状物質は針状のナノ粒子の塊であることが分かるとともに、これら塊状針状ナノ粒子の以外にさらに微小の数 nm 程度の球状粒子が存在していることが分かったが、これらのナノ粒子を同定することは難しかった(図 3.3-18c)。細胞外部にも同様の塊状凝集粒子が存在した(図 3.3-18d)。これらの塊状粒子の SAED はハローパターンを示し、非晶質であることが示唆された(図 3.3-18e)。EDX 面分析より化学組成は CaO 20.2、MgO 8.0、 P_2O_5 43.2、SrO 28.5 wt%と高濃度の Sr を取り込んでいた(図 3.3-18f)。これらの結果より TK6 株は Sr を非晶質 Ca リン酸塩ナノ粒子として収着することが分かった。

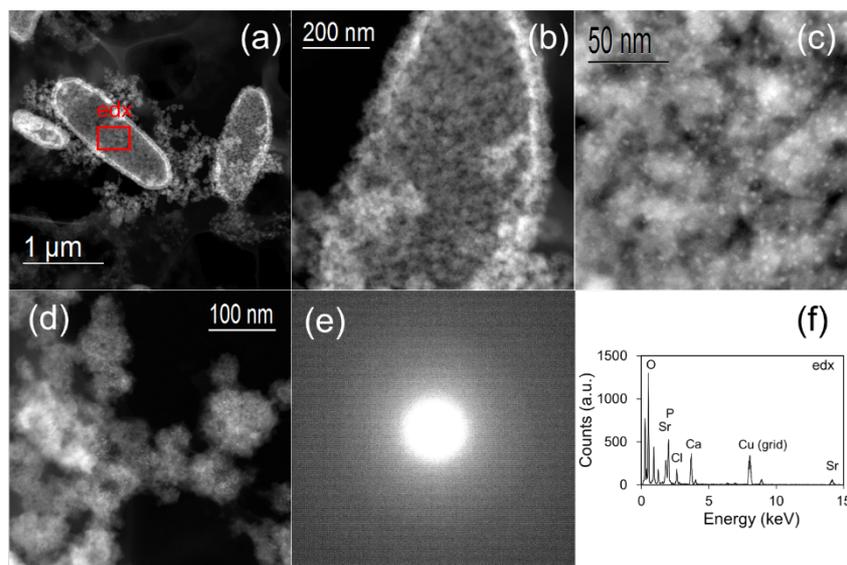


図 3.3-18 アパタイト生成菌 TK6 株による Sr 収着プロセス

(a) 全体の HAADF 像、(b)、(c) 像 (a) 中の拡大図、(d) 細胞外に存在する凝集体、(e) 凝集体の SAED パターン、(f) edx の EDX スペクトル。

TK6 株に対して Sr と Co 添加培地で 30 日間培養したものを TEM 観察した。Co が含まれていない条件と同様に長径 1-2 μm の楕円形の微生物の細胞様集合体が存在しており、細胞内外に非晶質ナノ粒子集合体である 100 nm 以下の塊状粒子が存在した (図 3.3-19a, b, c)。EDX 分析より化学組成は CaO 19.22、MgO 7.58、 P_2O_5 39.61、SrO 29.26、CoO 4.33 wt% のリン酸塩であった (図 3.3-19d)。この結果、TK6 株による Co、Sr 共存下での Co の収着は Sr と同様のプロセスでおこり、Ca、P を主成分とするリン酸塩ナノ粒子形成によるものであり、その際の Co の収着量は Sr よりも低くなることが分かった。

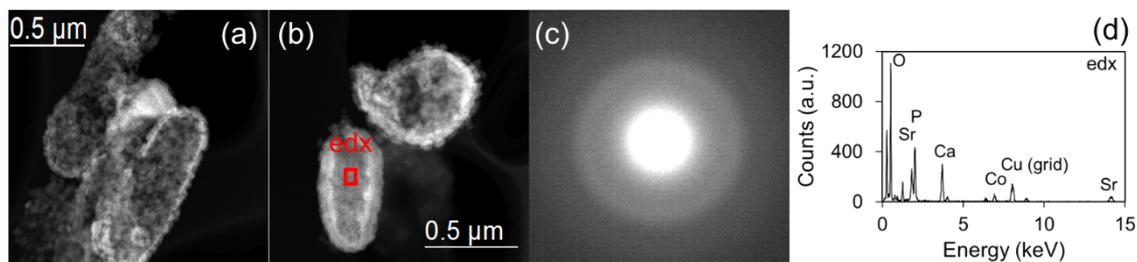


図 3.3-19 アパタイト生成菌 TK6 株による Sr、Co 収着プロセス

(a)、(b) 微生物部分の HAADF 像、(c) 凝集体の SAED パターン、(d)、(b) 中の EDX スペクトル。

ここでは、TK6 株と同様に深海海底から単離されアパタイトを生成することが知られているバクテリア A 株に対して Sr 添加培地で 14 日間培養したものを TEM 観察し、TK6 株による Sr、Co 収着プロセスと比較した。TK6 株と同様に楕円形の形状を呈するものとそれよりも小さい塊状の粒子が混在していた(図 3.3-20a, b)。楕円形の形状のものは微生物と考えられ、その内部には 100 nm 以下の大きさの塊状粒子が充填されており(図 3.3-20c)細胞外に出ている塊状粒子と同様であったことから、外部にある塊状粒子は細胞の破裂とともに放出されたと考えられる。これらの化学組成は細胞の内外ともに CaO 21.88、MgO 8.16、P₂O₅ 39.83、SrO 30.13 wt%と計算され(図 3.3-20e)、リン酸塩を形成することが分かった。この塊状粒子も数ナノメートルの微ナノ粒子から成り立っていることが分かった。これらの塊状粒子構成ナノ粒子は SAED より非晶質であることが分かる(図 3.3-20d)。この結果、A 株においてもリン酸塩ナノ粒子形成の際の Sr の取り込みが主要なプロセスであることが分かった。

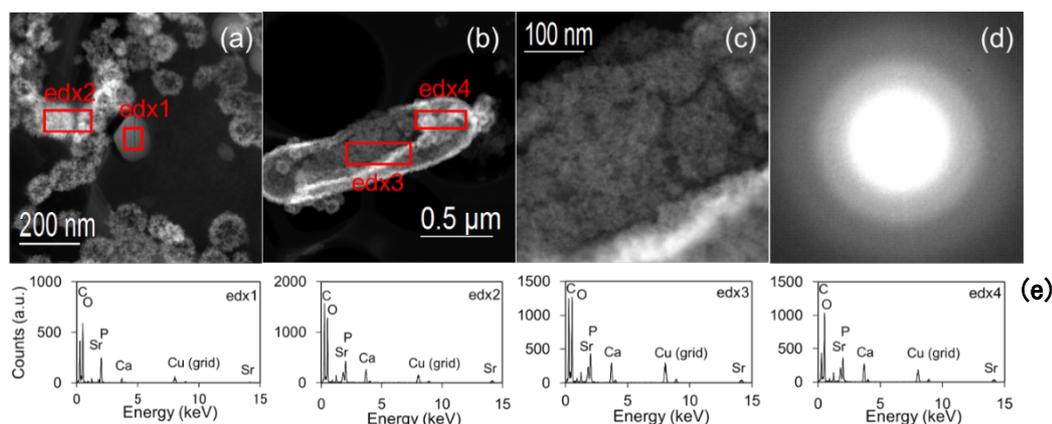


図 3.3-20 アパタイト生成菌 A 株による Sr 収着プロセス

- (a) 塊状粒子凝集体の HAADF 像、(b) 細胞と球状凝集体の集合体の HAADF 像、
 (c) 細胞内部の HAADF 像、(d) 球状凝集体の SAED パターン、
 (e) 点分析、edx1~4 の EDX スペクトル。

アパタイトを生成する A 株に対して Co、Sr 添加培地で 30 日間培養したサンプルを TEM 観察した。図 3.3-21a に全体的像を示すが、凝集が進行して前項で少数であるが見られた楕円形の細胞の形状は観察されなかった。この凝集体全体の EDX 分析から、CaO 19.57、MgO 7.07、P₂O₅ 38.74、CoO 4.88、SrO 29.74 wt%のリン酸塩 Ca、Mg、Co、Sr を含むリン酸塩凝集体を形成していることが分かった(図 3.3-21b)。STEM-EDX 元素マップから Ca、Co、Sr、P、O は同様の分布を示しすべての元素が均質に分布していること、ほぼ単一相から構成されていることが分かった(図 3.3-21c)。内部に存在する粒子は数百 nm 程度の球形塊状粒子として存在し、SAED パターンから非晶質であることが確認された(図 3.3-21d)。これらの結果、A 株による Sr、Co の収着も非晶質リン酸塩

ナノ粒子形成が主要プロセスであることが分かった。

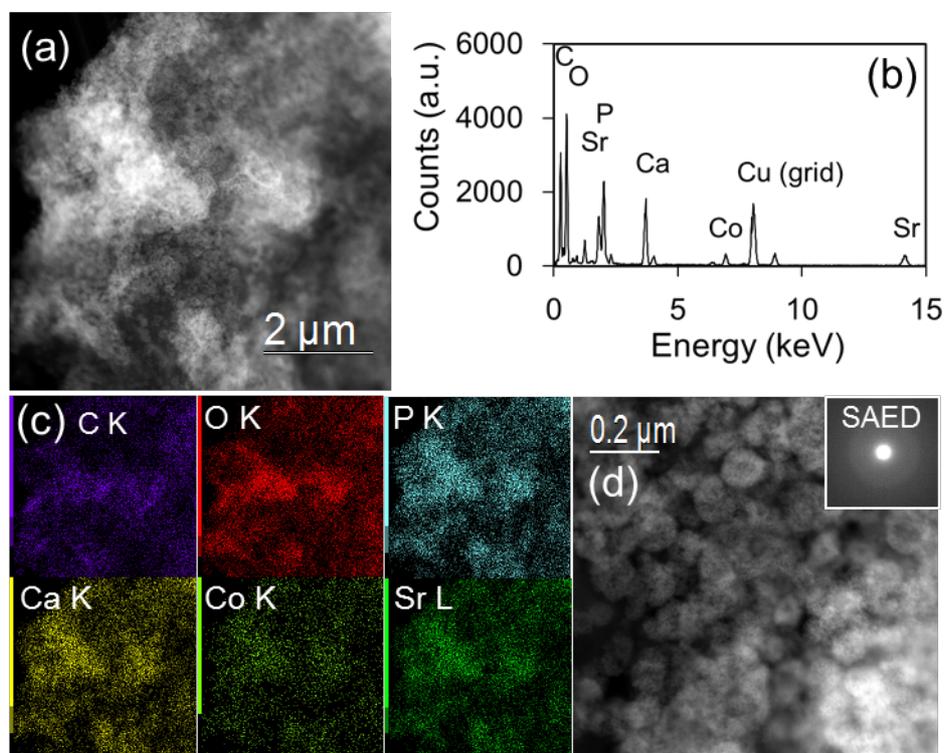


図 3.3-21 アパタイト生成菌 TK6 株による Sr、Co 収着プロセス
 (a)全体の HAADF 像、(b)全体の EDX スペクトル、(c)領域(a)の STEM-EDX 元素マップ、(d)集合体内部の球状凝集体及び SAED パターン。

磁性体付加バイオカルサイト中の Sr 及び Co の存在位置及び存在形態の明確化を図った。そのため、Sr 及び Co を取り込んだ磁性体を付加したバイオカルサイト試料を電子顕微鏡により観察するとともに、電子顕微鏡付属の元素分析装置により元素組成を分析した。

その結果、図 3.3-22a の元素マップ及び図 3.3-23 の EDX スペクトルより反応初期、8 時間までは Sr と Ca の共存した炭酸塩鉱物は沈殿していなかった。EDX による組成分析から、反応初期において、Sr の一部と Cs はゼオライトに吸着していることが分かった。この傾向はマグネタイトの有無に関わらずゼオライト共存下では普遍的に見られた。しかしながら、図 3.3-22b の元素マップ及び図 3.3-24、3.3-25 の EDX スペクトルより 2 日以上経過すると Sr は Ca と共に楕円形の炭酸塩として共沈し始めることがわかった。

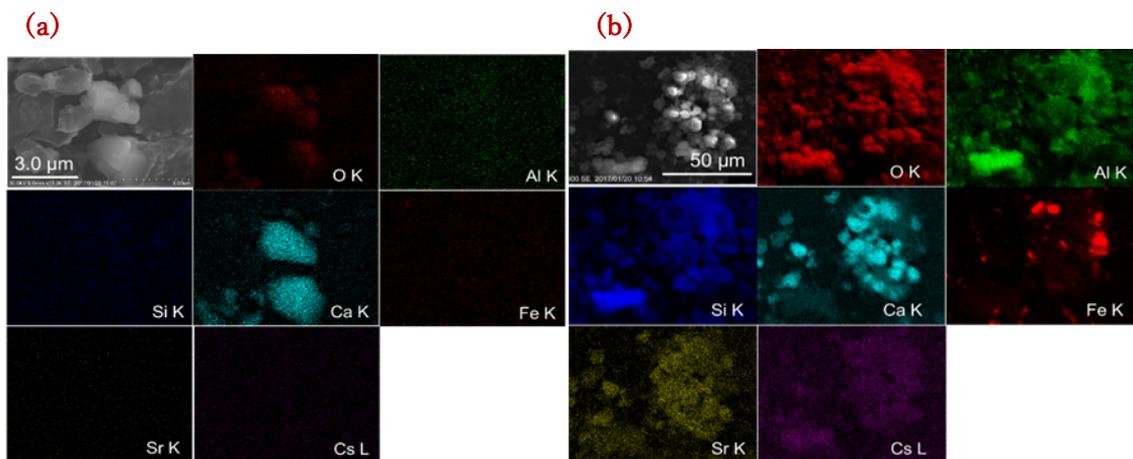


図 3.3-22 ゼオライト、マグネタイト及び KW3b が共存しているサンプルの元素マップ
 (a) 反応時間 8 時間。(b) 反応時間 48 時間

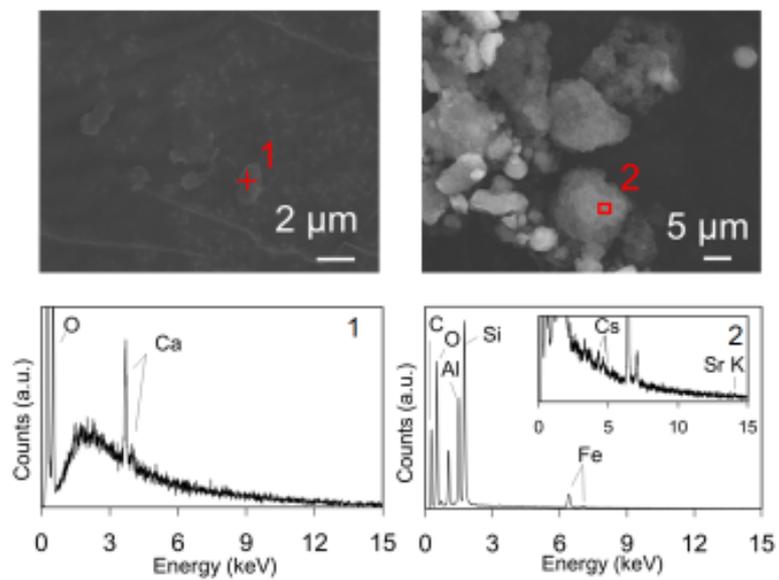


図 3.3-23 ゼオライト、マグネタイト及び KW3b が共存し反応時間 8 時間のサンプルの EDX スペクトル

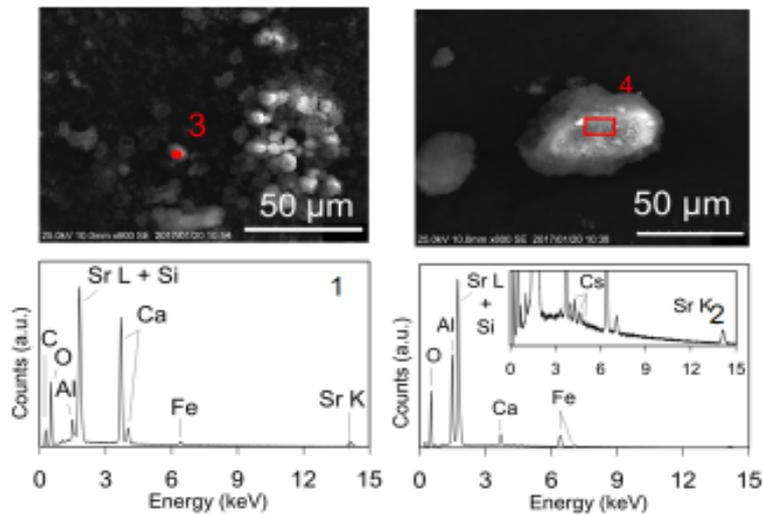


図 3.3-24 ゼオライト、マグネタイト及び KW3b が共存し反応時間 48 時間のサンプルの EDX スペクトル

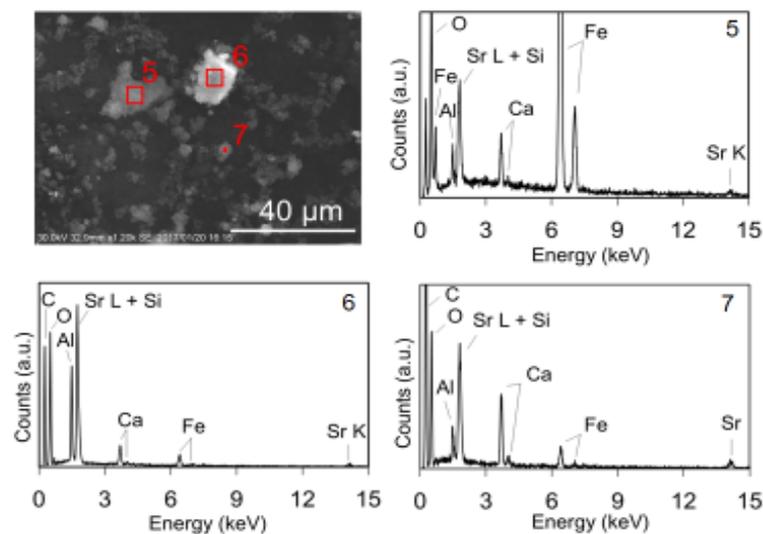


図 3.3-25 ゼオライト、マグネタイト及び KW3b が共存し反応時間 120 時間のサンプルの EDX スペクトル

EDX の Sr-K 線と Ca-K 線を用いた定量分析からを表 3.3-3、3.3-4 にまとめた。表 3.3-3 より 48 時間経過時点での炭酸塩中の Sr/Ca モル比は 0.46-0.64 であったが、表 3.3-4 より 120 時間経過すると Sr/Ca モル比が 0.79-1.09 となっていた。同様の Sr 吸着媒体の変遷過程がゼオライトやマグネタイトのすべての組み合わせで見られた。Co は全てのサンプルで検出限界以下であり吸着量が 0.1 w%以下であることが示唆された。以上より、微生物によって形成される Ca 炭酸塩はゼオライトよりも高い収着能を持つ

ていることが分かった。

一方、Co は Fe のピークとかぶるため検出できなかったが、Fe が検出されない部分には Co が存在しないことから、磁性体と共に存在している可能性が高いことを明らかにした。

表 3.3-3 ゼオライト、マグネタイト及び KW3b が共存し反応時間 48 時間のサンプルの EDX の Sr-K 線と Ca-K 線を用いた定量分析から求めた炭酸塩中の Sr/Ca モル比

サンプル	分析点	モル比 Sr/Ca
KW3B	カルサイト 1	0.46
KW3B	カルサイト 2	0.58
KW3B	カルサイト 3	0.50
KW3B	カルサイト 4	0.64
KW3B	カルサイト 5	0.57
CHA	カルサイト 1	0.48
CHA+M	カルサイト 1	0.61
CHA+M	カルサイト 2	1.19
M	カルサイト 1	0.54
M	カルサイト 2	0.63

CHA：チャバサイト

M：磁性体

表 3.3-4 ゼオライト、マグネタイト及び KW3b が共存し反応時間 120 時間のサンプルの EDX の Sr-K 線と Ca-K 線を用いた定量分析から求めた炭酸塩中の Sr/Ca モル比

サンプル	分析点	モル比 Sr/Ca
KW3B	カルサイト 1	0.79
KW3B	カルサイト 2	0.97
KW3B	カルサイト 3	0.99
KW3B	カルサイト 4	0.97
KW3B	カルサイト 5	0.95
CHA	カルサイト 1	0.83
CHA	カルサイト 2	0.97
CHA	カルサイト 3	0.91
CHA+M	カルサイト 1	1.09
CHA+M	カルサイト 2	0.98
M	カルサイト 1	0.88

CHA：チャバサイト

M：磁性体

(4) まとめ

これらの結果をまとめると、TK2d 株存在下では溶液中の Sr 濃度が急激に減少する前の固体試料には炭酸塩鉱物の生成は見られず、微生物の内部に Ca と Sr が蓄積された。蓄積される Sr の濃度は培地中の初期 Sr 濃度に対応して増減した。細胞溶解が起こった後に細胞構成元素、C、O、P はその場に残るが Ca と Sr は放出されることが分かった。炭酸塩は Sr 濃度を選択的に増大させていた。構造はカルサイト、アラゴナイトに近いもの両方が同定され、二つの構造が混在する可能性が示唆された

TK2d 株より Sr 除去速度の速い KW3b 存在下では Sr の収着はアラゴナイトのナノ粒子結晶への取り込みが主プロセスとなるが、Co を添加した場合は炭酸塩の形成が起こらず、酸化物ナノ粒子として沈殿することが分かった。また KW3b とゼオライトが共存する条件において反応初期では Sr と Ca が共存した炭酸塩鉱物は沈殿せず、Sr は主にゼオライトに収着される。しかしながら、2 日以上経過すると Sr は Ca と共に楕円形の炭酸塩として共沈し始め、EDX の Sr-K 線と Ca-K 線を用いた定量分析から求めた炭酸塩中の Sr/Ca モル比は時間の経過とともに高くなった。同様の Sr 吸着媒体の変遷過程がゼオライトやマグネタイトのすべての組み合わせで見られた。以上より、微生物によって形成される Ca 炭酸塩はゼオライトよりも高い Sr 収着能を持っていることが分かった。

アパタイト生成菌 TK6 及び A による Sr 及び Co の収着機構は、どちらの微生物でも細胞内外における非晶質リン酸塩ナノ粒子の形成によることが分かった。

Co を取り込んだバイオカルサイト試料及び Sr を取り込んだバイオアパタイト試料を電子顕微鏡により観察するとともに、電子顕微鏡付属の元素分析装置により元素組成を分析した結果、カルサイト生成菌による Sr の収着はアラゴナイトのナノ粒子結晶への取り込みが主プロセスとなるが、Co を添加した場合は炭酸塩の形成が起こらず、酸化物ナノ粒子として沈殿するプロセスであることを明らかにした。さらに、Co を取り込んだバイオカルサイト試料の EDX 元素分析及び SAED 解析から、Co 相は Co が均質に存在する Co_3O_4 のナノ結晶であることを明らかにした。また、アパタイト生成菌では、細胞内外における非晶質リン酸塩ナノ粒子の形成時に Sr が取り込まれたことを明らかにした。

磁性体付加バイオカルサイト中の Sr 及び Co の存在位置及び存在形態を明確にするため、Sr 及び Co を取り込んだ磁性体を付加したバイオカルサイト試料を電子顕微鏡により観察するとともに、電子顕微鏡付属の元素分析装置により元素組成を分析した。その結果、マグネタイトの有無に関わらず反応初期、8 時間までは Sr と Ca の共存した炭酸塩鉱物は沈殿しておらず、Sr の一部と Cs はゼオライトに吸着していた。その後、2 日以上経過すると Sr は Ca と共に楕円形の炭酸塩として共沈し始める。一方、Co は Fe のピークとかぶるため検出できなかったが、Fe が検出されない部分には Co が存在しないことから、磁性体と共に存在している可能性が高いことを明らかにした。

3.4 英国側の成果

放射性廃液などの保存タンクからの漏洩や原子炉事故により環境中に漏出する放射性核種の回収を目的として、バイオアパタイトを用いる回収材を開発した。放射性核種汚染地域の環境条件の多様性を考慮して、SrC 及び o を回収核種として広 pH 領域、イオン濃度領域及び共存イオン濃度における回収の可能性を調べた。その結果、これまでに用いられてきたゼオライトなどの鉱物に比べて、調べた試験条件範囲内で高い吸着能を示した。さらに、高イオン強度領域でゼオライトに比べて高い吸着能を示した。バイオアパタイトの高い吸着能は、広い比表面積及び非晶質リン酸カルシウムの存在が原因と考えられた。したがって、イオン強度が高い、例えば海水からの放射性 Sr の回収に有効であると考えられる。

ナノマグネタイトの作製では、数 nm サイズのマグネタイトの作製に成功し、ゼオライトに付加することに成功した。具体的には、非水溶液系のゾルーゲル反応を採用して、Benzyl アルコールと 1-hexanol を用いる方法により、平均粒径がそれぞれ 12-25nm と 5-9nm の Fe_3O_4 を作製することに成功した。これらの試料は、日本側が行った磁性体付加バイオカルサイトの作製に用いた。次に、人工的に作製した Zeolite-A, P 及びチャバサイトにナノサイズの Fe_3O_4 を付加させて磁性体付加ゼオライトの作製に成功した。これら、磁性体付加ゼオライトの磁性特性及び透過電子顕微鏡による解析を行い、磁性が備わったゼオライトが作製できたことを確認した。

3.5 研究推進

研究推進では、研究代表者の下で各研究項目間における連携を密にして研究を進めるとともに、研究実施計画等を協議するため委員会を毎年開催した。さらに、日英相互の研究機関を訪問し、情報交換を行った。さらに、2015 年 9 月 10-11 日にロンドンの日本大使館で開催された日英ワークショップ、及び 2017 年 3 月 26 日に東京で開催された日英ワークショップにおいて成果を発表した。2017 年度には研究実施計画等を協議するため委員会を開催すると共に、アメリカ地質学会議における成果の発表及び調査、及び英国バーミンガム大学における最終報告書に関する打ち合わせを行った。

4. 結言

4.1 好塩菌による放射性核種回収方法の確立

高塩濃度条件においてバイオ鉱物を生成する微生物の獲得と、溶存 Sr 及び Co をバイオ鉱物中に固化する新規の放射性核種回収方法を確立するため、カルサイト及びアパタイトを生成する菌種あるいは菌種群の特定を図るとともに、高度に Sr を濃集するカルサイト生成好塩菌を探索するため、海水や高塩環境から海水、底泥、排水などを採取し、好塩性微生物を集積培養した。微生物の分離源として、東京湾 (TK、7 ヶ所)、福島県-茨城県沖 (FI、18 ヶ所) の計 25 ヶ所から海水及び海底泥を採取してバイオ鉱物を生成する菌種あるいは菌種群を探索(スクリーニング)した結果、カルサイトを生成し Sr 除去能に優れた 3 株 (TK2 d、KW3b1、KW3b2) を単離できた。さらに、アパタイトを生成し溶存 Co 除去能に優れた 3 株 (TK6-3 株、TK19-1 株、TK19-2 株) を単離できた。電子顕微鏡による元素分布から、カルサイト及びアパタイト生成菌であることを確認した。分子生物学的解析によりカルサイト生成菌は、TK2d 株が *Bacillus* sp. であり、KW3b1 株及び KW3b2 株が *Sporosarcina* 属に属し *S. soli* I80 に近縁であることを明らかにした。アパタイト生成単離株の菌種を同定した結果、単離株のうち、TK6-3 株は、*Pseudoalteromonas* 属に分類される微生物であることを明らかにした。KW3b2 株のゲノム DNA 解析の結果、本株は 7 種のウレアーゼ関連遺伝子を持つことが分かった。これらの推定アミノ酸配列は、*Lysinibacillus sphaericus* や *Sporosarcina* 属、*Bacillus* 属の細菌由来のウレアーゼ関連遺伝子とアミノ酸レベルで 60%以上の高い相同性を示した。

バイオ鉱物生成菌の育成条件を明らかにするため、培地溶液中の塩濃度を NaCl により 0.3、3.0、5.0、10%に調製した培地 (Sr 1.0 mM 含有) を用いて、TK2d 株、KW3b1 株及び KW3b2 株の生育条件を評価した。その結果、TK2d 株、KW3b1 株及び KW3b2 株の増殖の最適 NaCl 濃度は 3.0%であることを明らかにした。さらに、アパタイト生成菌については 0.06 mM の Co を含む海水と同じ塩濃度条件で生育することを確認した。

大量培養の可能性を明らかにするため、5L リアクター及び 100L タンクにおいて KW3b 株を培養した。その結果、5L リアクターでは、通気量及び攪拌速度の影響について調べた結果、通気・攪拌なしの条件においても培養 24 時間で 95%の Ca 濃度減少を達成したことから、通気及び攪拌の影響は小さいことが分かった。さらに、100L タンクでの培養から、溶存 Ca は培養 24 時間で 90%以上の減少を示し、72 時間でほぼ全ての Ca が溶液から除かれた。したがって、大量培養は十分可能で、実際のサイトに適用するだけの菌体量を確保できることを明らかにした。

バイオカルサイトの Sr 及び Co の回収能を評価するとともに、バイオアパタイトの Sr 及び Co の回収能を評価した。その結果、0.3% NaCl の低塩濃度においては 3 株全てが Sr 除去率 99-100%を示し、KW3b1 株及び KW3b2 株は、塩濃度 5%以下で Sr の高い回収能を示すことを明らかにした。カルサイト生成菌株による Co 回収能を評価した結果、僅かではあるがバイオカルサイト中への濃集を明らかにした。バイオアパタイトによる Sr 及び Co

の回収能を評価した結果、TK6 菌群は G2P を分解し、培養 30 日までに 64%の溶存 Co、37%の溶存 Sr を溶存 Ca と共にリン酸塩として培養液中から除去することを明らかにした。

英国側が作製した磁性体を付加した場合、混合培養試験では添加した磁性体の種類または有無にかかわらず、KW3b 株は培養 24 時間で溶存 Sr 及び溶存 Ca を 98%減少した。Co 除去能については、16 時間で 90.7%と高い Co 除去率を示した。一方、マグネタイトだけ及び菌体だけを用いた条件では溶存 Co を除去できなかった。この結果は、混合培養 M 及び CM では微生物とマグネタイトは共存することで溶存 Co を除去する新たな反応が関与している可能性を示した。

以上の結果から、磁性体付加バイオ鉱物により Sr 及び Co の水溶液中濃度が 1/10 以下となる目標を達成できた。

4.2 バイオ鉱物などのナノ化による流動性向上技術の確立

ゼオライト粒子及びカルサイト粒子の土壤空隙中における流動性の向上を目的として、細粒化したゼオライト及びカルサイト粒子に親水基を付加する試験を行った。さらに、細粒化したゼオライト及びカルサイト粒子の流動性を評価するため、カラム試験を実施するとともに、親水基付加の吸着への影響を調べるため、親水基処理をしたゼオライト及びカルサイトに Sr 及び Co を吸着する試験を実施した。

その結果、粉碎したゼオライト及びカルサイトに親水基処理をした試料は、1 時間以上沈殿せず、高い分散性を示した。さらに、カラムビーズを用いた透過試験では、親水基付加細粒化粒子のほぼ 100%がカラムビーズを透過した。このように、ゼオライト粉末及びカルサイト粒子を微細化し、分散性及び流動性の向上を達成した。また、親水基処理をしたゼオライト及びカルサイトは、Sr 及び Co 溶液からほぼ 90%以上の Sr 及び Co を吸着したことから、高い吸着能を有することを明らかにした。

4.3 最先端分析法による化学状態分析

海水に溶解した Sr 及び Co のバイオアパタイト及びバイオカルサイトにそれぞれ取り込まれることによる化学状態の変化の明確化を図るため、放射光施設における X 線吸収微細構造分析などにより解析した。バイオ鉱物に取り込まれた Sr 及び Co の化学状態を分析する手法として、X 線の吸収端付近の X 線の吸収スペクトルを解析する X 線吸収端近傍微細構造解析 (X-ray Absorption Near-Edge spectroscopy; XANES) 及び高エネルギー側での X 線吸収の振動を解析する広域 X 線吸収微細構造解析 (Extended X-ray Absorption Fine Structure; EXAFS) を用いた。

バイオカルサイトに取り込まれた Sr の XANES スペクトルの解析から、TK2d 株及び KW3b 株により生成するカルサイト中で、Sr は時間の経過とともに Sr を含む固相が形成されていく可能性を明らかにした。一方、カルサイトに取り込まれた Co の XANES スペクトルから、カルサイト中のほとんどの Co の価数は変化せず II 価のままであり、一部が III 価にな

っている可能性があることを明らかにした。溶液中の Co 濃度の変化はほとんどなかったが、XANES スペクトルが検出されたことから、Co のごく一部がカルサイトに取り込まれていることを明らかにした。TK6 株により生成したアパタイトに取り込まれた Sr の XANES スペクトル及び EXAFS スペクトルから、アパタイト中の Sr は水溶液に溶けた Sr イオンと同じような化学状態であることを明らかにした。

磁性体を付加した場合の試料中の Fe の化学状態を明らかにした。KW3b 株にチャバサイトと磁性体を添加した試料中の Fe については、89%が Fe_3O_4 であり、11%が Fe_2O_3 であった。この結果から、一部の Fe が溶解し、再沈殿して3価の鉄鉱物の生成が示唆された。

海水からバイオアパタイト及びバイオカルサイトにそれぞれ取り込まれた Sr 及び Co の存在位置及び存在形態の明確化を図るため、Sr 及び Co を取り込んだバイオカルサイト試料及び Sr を取り込んだバイオアパタイト試料を電子顕微鏡により観察するとともに、電子顕微鏡付属の元素分析装置により元素組成を分析した。その結果、TK2d 株存在下では溶液中の Sr 濃度が急激に減少する前の固体試料には炭酸塩鉱物の生成は見られず、微生物の内部に Ca と Sr が蓄積されていく。蓄積される Sr の濃度は培地中の初期 Sr 濃度に対応して増減した。細胞溶解が起こった後に細胞構成元素、C、O、P はその場に残るが Ca と Sr は放出されることが分かった。炭酸塩は Sr 濃度を選択的に増大させていた。構造はカルサイト、アラゴナイトに近いもの両方が同定され、二つの構造が混在する可能性が示唆された

TK2d 株より Sr 除去速度の速い KW3b 存在下では Sr の収着はアラゴナイトのナノ粒子結晶への取り込みが主プロセスとなるが、Co を添加した場合は炭酸塩の形成が起こらず、酸化物ナノ粒子として沈殿することが分かった。また KW3b とゼオライトが共存する条件において反応初期では Sr と Ca が共存した炭酸塩鉱物は沈殿せず、Sr は主にゼオライトに収着される。しかしながら、2 日以上経過すると Sr は Ca と共に楕円形の炭酸塩として共沈し始め、EDX の Sr-K 線と Ca-K 線を用いた定量分析から炭酸塩中の Sr/Ca モル比は時間の経過とともに高くなる。同様の Sr 吸着媒体の変遷過程がゼオライトやマグネタイトのすべての組み合わせで見られた。以上より、微生物によって形成される Ca 炭酸塩はゼオライトよりも高い Sr 収着能を持っていることが分かった。

アパタイト生成菌 TK6 及び A による Sr、Co の収着機構は、どちらの微生物でも細胞内外における非晶質リン酸塩ナノ粒子の形成によることが分かった。

Co を取り込んだバイオカルサイト試料及び Sr を取り込んだバイオアパタイト試料を電子顕微鏡により観察するとともに、電子顕微鏡付属の元素分析装置により元素組成を分析した結果、カルサイト生成菌による Sr の収着はアラゴナイトのナノ粒子結晶への取り込みが主プロセスとなるが、Co を添加した場合は炭酸塩の形成が起こらず、酸化物ナノ粒子として沈殿するプロセスであることを明らかにした。さらに、Co を取り込んだバイオカルサイト試料の EDX 元素分析及び SAED 解析から、Co 相は Co が均質に存在する Co_3O_4 のナノ結晶であることを明らかにした。また、アパタイト生成菌では、細胞内外にお

る非晶質リン酸塩ナノ粒子の形成時に Sr が取り込まれることを明らかにした。

磁性体付加バイオカルサイト中の Sr 及び Co の存在位置及び存在形態を明確にするため、Sr 及び Co を取り込んだ磁性体を付加したバイオカルサイト試料を電子顕微鏡により観察するとともに、電子顕微鏡付属の元素分析装置により元素組成を分析した。その結果、マグネタイトの有無に関わらず反応初期、8 時間までは Sr と Ca の共存した炭酸塩鉱物は沈殿しておらず、Sr の一部と Cs はゼオライトに吸着していた。その後、2 日以上経過すると Sr は Ca と共に楕円形の炭酸塩として共沈し始めた。一方、Co は Fe のピークとかぶるため検出できなかったが、Fe が検出されない部分には Co が存在しないことから、磁性体と共に存在している可能性が高いことを明らかにした。

以上の結果から、海水条件で単離できた高度に Sr を濃集するカルサイト生成好塩菌の中で、Sr の除去能が菌種 TK2d 株よりも高い KW3b1 株及び KW3b2 株を単離し、特定できた。さらに、アパタイト生成菌であり溶存 Co 除去能が優れている TK6-3 株を単離し、同定できた。TK2d 株、KW3b1 株及び KW3b2 株の増殖の最適 NaCl 濃度は 3.0%であることを明らかにした。大量培養の可能性を明らかにするため、5L リアクター及び 100L タンクにおいて KW3b 株を培養した結果、5L リアクターでは培養 24 時間で Ca 濃度減少が 95%を達成した。さらに、100L タンクでの培養から、溶存 Ca は培養 24 時間で 90%以上の減少を示し、72 時間でほぼ全ての Ca が溶液から除かれた。したがって、大量培養は十分可能で、実際のサイトに適用するだけの菌体量を確保できる見通しを得た。

粉碎したゼオライト及びカルサイトに親水基処理をした試料は 1 時間以上沈殿せず、高い分散性を示した。さらに、カラムビーズを用いた透過試験では、細粒化した粒子はほぼ 100%カラムビーズを透過した。以上、ゼオライト粉末及びカルサイト粒子を微細化し、分散性及び流動性の向上を達成した。また、親水基処理をしたゼオライト及びカルサイトは、Sr 及び Co 溶液からほぼ 90%以上の Sr 及び Co を吸着したことから、高い吸着能を有することを明らかにした。

放射光施設における X 線吸収微細構造分析や電子顕微鏡による分析から、TK2d 株及び KW3b 株により生成するカルサイト中で、Sr は時間の経過とともに Sr を含む固相が形成されていく可能性を明らかにした。磁性体を付加した場合の試料中の Fe の化学状態を明らかにした。KW3B 株にチャバサイトと磁性体を添加した試料では、一部の Fe が溶解し、再沈殿して 3 価の鉄鉱物が生成する可能性を見出した。Co を取り込んだバイオカルサイト試料及び Sr を取り込んだバイオアパタイト試料を電子顕微鏡により観察するとともに、電子顕微鏡付属の元素分析装置により元素組成を分析した結果、カルサイト生成菌による Sr の収着はアラゴナイトのナノ粒子結晶への取り込みが主プロセスとなるが、Co を添加した場合は炭酸塩の形成が起こらず、酸化物ナノ粒子として沈殿するプロセスであることを明らかにした。マグネタイトの有無に関わらず反応初期、8 時間までは Sr と Ca の共存した炭酸塩鉱物は沈殿しておらず、Sr の一部と Cs はゼオライトに吸着していた。そ

の後、2日以上経過すると Sr は Ca と共に楕円形の炭酸塩として共沈し始める。一方、Co は Fe のピークとかぶるため検出できなかったが、Fe が検出されない部分には Co が存在しないことから、磁性体と共に存在している可能性が高いことを明らかにした。

これらの結果から、Sr 及び Co を 90%以上回収できる磁性体付加バイオ鉱物を作製することができた。化学状態の分析から、鉱物化過程における取り込みが高い回収率と原因であることを突き止めた。さらに、100L 規模の大量培養が可能であることを明らかにした。また、ゼオライト粉末を破砕によりマイクロ化し、かつ親水基を付加することにより、高い分散性及び流動性を有するゼオライトあるいはカルサイトをを用いた高効率で放射性核種を吸着する新規材料を開発できた。

4.4 実用化に向けての課題

本研究課題は基礎研究であるため、実用化に向けて次のような取り組みが必要である。

1. 好塩性微生物による放射性核種の除去

ここでは汲み上げた海水等の中で微生物を培養することにより放射性核種を除去することを想定している。大型タンクに海水、栄養源、微生物を入れ、微生物を培養する過程で生成するバイオ鉱物に放射性核種を除去させる。培養時にナノ磁性体を導入し磁性体を微生物に付加させる。放射性核種を除去した液相から磁力により微生物を分離回収する。

この方法においては下記の検討課題が必要と考えている。

- ①多様な微生物とイオン等を含む海水中でバイオ鉱物生成微生物を増殖させること、及び、バイオ鉱物による放射性核種の除去に対する海水中のイオン等の影響が小さくなる条件を見いだすこと。
- ②このようなバイオリクター中で、バイオ鉱物生成微生物に磁性体を付加させること。

2. 海洋底又は海洋中の放射性核種の好塩性微生物による固定

ここでは港湾の海底又は海中にバイオ鉱物生成微生物を投入し、生成するバイオ鉱物に放射性核種を固定させる。このバイオ鉱物及びバイオ鉱物生成微生物は回収せず、原位置にとどめる。つまり、本技術では、放射性核種が外洋に拡散することを防ぐことを目的としている。福島第一原子力発電所の港湾には多量の放射性核種が流出した。海底に沈着した放射性核種の拡散を防ぐため、東京電力では、海底土の上にベントナイト（一層目）と山砂スラリー（二層目）を敷設した。しかし、ベントナイトと山砂への放射性核種の吸着はイオン交換であるため、高濃度のイオンを含む海水中での放射性核種吸着の効果は限定的であると考えられる。

本方法においては下記の検討課題が必要と考えている。

- ①多様な微生物を含む海水中でバイオ鉱物生成微生物を増殖させること、あるいは増殖速度等の評価、が可能であることを検証する。小規模な模擬システムを作製し、バイオ鉱物生成微生物の投入方法、栄養源投入の必要性及び投入方法の検討を行う必要がある。
- ②実海水条件でバイオ鉱物に放射性核種が固定されることを検証する。
- ③実海水条件でバイオ鉱物に固定された放射性核種の長期安定性の評価を行う。

3. 汚染水処理へのバイオ鉱物の適用

汚染水には放射性ストロンチウムや放射性コバルトが含まれ、それらは汚染水処理施設の除去対象核種である。汚染水のイオン強度は希薄であるため、本研究で単離し実験に用いた好塩性微生物は汚染水処理環境では生息できない可能性が高い。しかし、アパタイトなどのバイオ鉱物を生成し淡水で生息する微生物の存在が知られており、かつ、バイオ鉱物による放射性核種除去機構は本研究で明らかにした機構と同じであると考えられる。

本研究成果を汚染水処理に適用する場合は、淡水で生息するバイオ鉱物微生物を探索し、その特性を評価することが必要である。

4. 流動性を高めた吸着材の利用

ここでは、土壤が汚染している地域の地下水の上流側から吸着材を土壤に直接投入し、土壤中の汚染箇所へ吸着材を直接輸送することで放射性核種を土壤中に固定する。福島第一原子力発電所の敷地土壤は広範囲に放射性核種で汚染している。放射性核種は地下水流によりやがて海へと移行すると考えられている。このような海洋への放射性核種の移行を防ぐことが目的である。

本方法においては下記の検討課題が必要と考えている。

①土壤への吸着材投入方法

吸着材を地下水流に乗せて土壤空隙中を拡散させるが、地下水の流速は遅いので、どのように吸着材を土壤に投入させるかが課題である。

②吸着材到達地点の評価方法

拡散した吸着材は希薄であるので、吸着材の到達地点を判断するためには、吸着材の識別が可能となるように標識を付ける必要がある。

③大型土壤カラム試験

未攪乱土壤を充填した大型土壤カラムによる模擬試験を行い、吸着材の拡散と拡散した吸着材による放射性核種の固定を検討する。