

廃電子基板のバイオリーチングに有用な

中等度好温性好酸性鉄酸化細菌の鉄酸化速度特性

東條ふゆみ¹, 渡邊陽祐¹, 大野谷成美¹, 梁瑞録², 福島淳³, 谷幸則⁴, 宮田直幸¹¹ 秋田県立大学生物資源科学部生物環境学科² 秋田県立大学システム科学技術学部経営システム工学科³ 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科⁴ 静岡県立大学食品栄養科学部環境生命科学科

好酸性鉄酸化微生物を利用した電子廃棄物からの金属のバイオリーチングにおいて、Fe (II) は微生物の生育に必要な基質であり、酸化反応によって金属を浸出する Fe (III) の供給源として重要な役割を果たしている。我々は本研究において、廃電子基板 (PCBs) からの金属バイオリーチングに有用な中等度好温性好酸性鉄酸化微生物群集の Fe (II) 酸化反応速度を調べた。細菌の群集構造解析により、*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* と *Acidithiobacillus* 属に近縁な細菌を含む好酸性の集積培養系であることを明らかにした。この集積培養系の生育至適温度は pH2 で 42-50°C であり、Fe 酸化速度によって推定された Fe 酸化物の最大比増殖速度は、7 mM 付近で最大になることがわかった。これは、既往研究で使用されている Fe 濃度 (50-270 mM) に比べてはるかに低い。この集積培養系を用いて 7 mM の Fe (II) 添加でバイオリーチングを行った結果、Cu, Zn, Ni の浸出率はそれぞれ 88%, 81%, 69% に達した。本研究結果は、この性質を有する微生物集積培養系が、低 Fe (II) 条件下での PCBs からのバイオリーチングに適していることを明らかにした。

キーワード: 好酸性鉄酸化細菌, バイオリーチング, 金属回収, 電子基板, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*

廃電気・電子機器類 (WEEE) は廃棄物区分のひとつであり、その処理とリサイクルは世界的に喫緊の課題である。特に、これら電子デバイスの基板 (PCBs) には、およそ 28-30% もの種々の金属類、Cu : 10-20%, Pb : 1-5%, Ni : 1-3% や、Ag, Pt や Au といった貴金属も約 0.3-0.4% 含まれる (環境省, 平成 25 年)。しかし、PCBs に含まれる金属類は、数種のみがリサイクルされ、ほとんどが埋め立て処理されている。その中に含まれる有害金属による環境汚染や健康被害が問題となってきたため、PCBs からの各種金属の浸出とリサイクル技術は、有用な金属回収と廃棄物処理の面で重要である。

バイオリーチングは、鉄および硫黄酸化細菌とい

った微生物を利用する技術であり、近年、金属浸出技術の一つとして、盛んに研究されている。好酸性鉄酸化微生物を用いたバイオリーチングのプロセスは、酸性条件下で Fe²⁺ イオンの微生物酸化により生成された Fe³⁺ イオンが酸化剤として作用し、金属を酸化的に浸出させるものである。Fe³⁺ イオンは、金属を酸化して浸出させた後、Fe²⁺ イオンに還元され、これが再び好酸性鉄酸化微生物によって酸化され、酸化剤 (Fe³⁺) として作用する、というサイクルが確立されている。これまでの研究では主に、増殖が Fe²⁺ 依存的で多量の Fe²⁺ イオンを必要とする *Acidithiobacillus ferrooxidans* が使用されている。*A. ferrooxidans* を用いたバイオリーチングでは、3-15

g/L の Fe^{2+} イオンを添加した有機塩培地を使用し、浸出時間約 1-3 週間で金属の最大浸出率を達成した (Ilyas et al., 2007; Yang et al., 2009; Wang et al., 2009; Zhu et al., 2011; Willner, 2013; Adhapure et al., 2013). しかし、 Fe^{3+} イオンはバイオリッチング中に容易に酸化鉄として沈殿するため、溶存した Fe イオンが枯渇し、バイオリッチングのサイクルが維持されないと考えられる。高濃度の Fe^{2+} イオン添加条件では酸化鉄が沈殿しやすく、浸出残渣を回収する際には酸化鉄が少ないことが望ましいため、低濃度の Fe^{2+} イオンでのバイオリッチングが必要である。さらに、浸出時間がより短いことが望ましい。そこで我々は、*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* のような従属栄養性の鉄酸化細菌を使用することで、少量の Fe^{2+} 添加におけるバイオリッチングが可能であり、酸化鉄沈殿物を減らすことができると考えた。

本研究では、秋田県玉川温泉の下流域の河川水より、低 pH, 低 Fe^{2+} 条件で生育が速く、重金属耐性を有する集積培養系を選抜した。また、集積培養系の生育特性を調べるとともに、温度、pH、攪拌、曝気量を自動的に制御できるジャーファーマンターを用いて、バイオリッチング試験を行った。

材料と方法

微生物と培養条件

秋田県玉川温泉下流域から、好酸性鉄酸化細菌を含む集積培養系を採取した。培地は、硫酸酸性 TSB 培地 (以下 TSB 培地, 1 L あたりの組成: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1250 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500 mg, Tryptic Soy Broth (TSB) 250 mg, 微量金属塩溶液 2 ml) で、121°C, 15 分間、オートクレーブ滅菌した。これにフィルター滅菌した硫酸鉄溶液を終濃度 7 mM になるように添加し、さらに、オートクレーブ滅菌した KH_2PO_4 を 5 mg/L で添加した。溶液の pH は、硫酸で 1.9-2.5 に調整した。

生育特性調査

バイオリッチングに使用した集積培養系は、生育温度と重金属耐性により選抜した。生育温度は、25, 37, 45°C に設定し、フェナントロリン吸光光度法に

よる Fe^{2+} 濃度の測定により、細菌の生育を調べた。重金属耐性実験は、 Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} の混合溶液を調製し、終濃度 1 から 100 mM になるよう、上記の培地に添加して行い、鉄の酸化による培地の色の変化を観察した。

電子基板 (PCBs) と粉砕プロセス

パソコン由来の PCBs を使用した。粉砕は、カッティングミル SM200 (Retsch) と遠心破砕機 ZM200 (Retsch) を用い、 <1.0 , <0.71 , <0.5 , <0.25 mm でふるい分けした。これらの廃電子基板粉末試料を円錐状にしてから平らにしたものを 4 等分し、2 つの対角にある分を残してこれをさらに円錐状に積み、同じ作業をバイオリッチングに供する分量になるまで繰り返し、試料を均一化した。

バイオリッチング試験

鉄濃度条件変更.

初めに、鉄イオンの添加量がバイオリッチングに及ぼす影響について調べた。上記と同じ条件で 100 ml フラスコで前培養した鉄酸化細菌を、TSB 培地に終濃度 3, 7, 15, 30 mM で添加した培地が入ったジャーファーマンターに 1% 植菌し、45°C, 100 rpm, pH1.8-1.9 で 3 日間培養した。ジャーファーマンターで本培養した後、滅菌した <0.25 mm の PCBs 粉末試料を 10 g/L 加え、5 日間、バイオリッチングを行った。サンプリングは 12 時間毎に行った。サンプリングした溶液は、遠心分離後、上清を希釈し、4°C で保存した。希釈した試料はさらに適切な濃度に希釈し、ICP-OES (iCAP 6000 Series, Thermo Fisher Scientific) および ICP-MS (X-Series^{II}, Thermo Fisher Scientific) を用いて金属濃度を測定した。

温度条件変更.

次に、バイオリッチング温度の影響を調べた。100 ml フラスコを用いた前培養は上記と同じ条件であり、TSB 培地をジャーファーマンターに入れ、7 mM 濃度になるよう鉄イオンを加えて前培養液を 1% 植菌し、45°C, 100 rpm, pH1.8-1.9 で 3 日間培養した。上記と同様に PCBs 粉末試料を加え、25, 37, 45°C でバイオリッチングを開始した。上記と同様、バイオリッチング時間は 5 日間、サンプリングは 12 時間毎に行った。

DGGE による微生物群集構造解析

バイオリッチング中の微生物群集構造の変化を調べるため、12 時間毎にバイオリッチング溶液 5 ml を採取し、12,000 rpm で遠心分離し、残渣を得た。残渣は pH1.9 に調製した滅菌水で 2 回洗浄し、最後に滅菌水で洗浄した。この試料から、ISOIL for Beads Beating を用いて DNA を抽出し、DGGE に供試した。

集積培養系からの鉄酸化細菌の単離

0.3% ジェランガムおよび 1.5% 寒天を添加した TSB 平板培地に、段階希釈した集積培養系を塗布し、42°C で 1-2 週間培養した。出現したコロニーを採取し、TSB 液体培地で培養した。液体培地で増殖した株の DNA を ISOIL for Beads Beating を用いて抽出し、プライマー 27F/1492R を使用して PCR を行った。PCR 産物のシーケンスにより得られた塩基配列の相同性検索を行い、分子系統樹を作成した。

単離株の培養特性

培養温度特性試験として、50-100 ml フラスコに、TSB 培地を分注し、7 mM Fe²⁺、pH1.9、重金属濃度 10 mM に調製した。ここに単離株の培養液を 1% 植菌し、45°C で 2-3 日間培養した。これを 28, 35, 45, 52, 60°C で培養した。さらに、重金属耐性試験として、7 mM Fe²⁺ の TSB 培地 (pH2.2) をマイクロプレートに分注し、Al³⁺ を含む重金属混合液および Al³⁺ を含まない重金属混合液を、各終濃度が 1-100 mM になるよう添加した。ここでは、単離株を 10% 植菌し、42°C で培養した。さらに、単離株の Fe²⁺ 酸化速度を測るため、3 日間前培養した単離株を、50 ml の TSB 培地 (7 mM Fe²⁺、pH1.9、重金属 10 mM) に 1% 植菌し、45°C、100 rpm で培養した。培養液の 0-48 時間における Fe²⁺ 酸化速度は、過マンガン酸カリウムを用いた酸化還元滴定により検出した。

集積培養系と単離株のバイオリッチング効率の比較

100 ml フラスコに 50 ml の TSB 培地 (7 mM Fe²⁺、pH1.9、重金属 1 mM) を入れ、集積培養系および単離株をそれぞれ 1% 植菌し、45°C で 3 日間前培養した。2 L 容量のジャーファーマンターに 1 L の TSB

培地を調製し、Fe²⁺ が 7 mM になるよう添加した。ここに、前培養した集積培養系および単離株を 1% 植菌し、pH1.8-1.9、45°C、100 rpm、曝気攪拌を自動調整して培養を行った。また、同様の条件で植菌していないものを用意した。これらに、乾熱滅菌した廃電子基板粉末サンプル (<0.25 mm) を入れ、バイオリッチングを開始した。12 時間毎にサンプリングを行い、ICP-OES および ICP-MS を用いて金属濃度を測定した。

結果と考察

集積培養系の培養特性

各 pH の TSB 培地を用い、様々な温度条件下で好酸性鉄酸化細菌集積培養系を培養して Fe²⁺ 酸化速度を調べ、Fe²⁺ 酸化速度が速い集積培養系を、25°C で 2 系列、37°C で 4 系列、45°C で 6 系列選抜した。これら 12 系列を Al³⁺ を含むまたは含まない金属混合液を添加して培養した結果、集積培養系の 1 つは、Al³⁺ を含む重金属混合液では 20 mM、Al³⁺ を含まない重金属混合液では 50 mM の濃度で生育がみられた。これにより、高い重金属耐性を有する集積培養系が選抜された。これを、集積培養系 NE とした。集積培養系 NE は、低 pH 条件下で速い Fe²⁺ 酸化速度を示し、高い重金属耐性を有することから、バイオリッチングに適していると考えられた。

集積培養系 NE を用いたバイオリッチング

バイオリッチング時の Fe²⁺ 濃度を変えた結果、7 mM および 15 mM のとき、金属浸出速度が最も速かった。集積培養系 NE を用いて 96 時間バイオリッチングを行った場合の金属浸出率は、Fe²⁺ 7 mM のとき、Cu : 92%、Zn : 83%、Ni : 72%、Mn : 74% であった。また、15 mM Fe²⁺ のとき、Cu : 97%、Zn : 88%、Ni : 78%、Mn : 81% であった。また、鉄酸化速度は Fe²⁺ 濃度 7 mM のときに最大であると示唆され、多くの金属種のバイオリッチングに適していると考えられる。

異なる温度条件下におけるバイオリッチングでは、45°C、96 時間後の金属浸出率が Cu : 94%、Zn : 87%、Ni : 74%、Mn : 78% で、最も高い金属浸出率を示し

た。この温度は、集積培養系 NE の至適生育温度と同じであった。

集積培養系 NE の群集構造解析

集積培養系 NE では、*S. thermosulfidooxidans* が優占しており、継時的な群集構造の変化は見られなかった。

単離株の培養特性

0.3%ジェランガムを含む TSB 培地ではコロニーが形成されたが、1.5%寒天を含む TSB 培地ではコロニー形成は確認されなかった。ゲル強度や寒天に含まれる成分が細菌の増殖を抑制することが示唆されるが、既往研究より、一般的にジェランガム培地の方がコロニー形成しやすい傾向があることも知られている (Bassi and Benson, 2007; Tamaki et al., 2009)。

0.3%ジェランガム培地では、集積培養系 NE を 10^1 - 10^3 に希釈したものでコロニーが確認され、 10^2 および 10^3 希釈のプレートから 12 個のコロニーを選抜した。12 株から、28℃培養におけるフロックサイズの違いにより 4 株を選抜した。

選抜した 4 株の 16S rRNA 遺伝子の解析結果、4 つの菌株は同一の塩基配列であり、*S. thermosulfidooxidans* と 99%の相同性を示した。これを NE106G 株とし、今後の実験に供した。また、集積培養系 NE から得たクローンのほとんどの塩基配列と NE106G の塩基配列がほぼ一致していることから、この株は集積培養系 NE を構成する主要な細菌であると推測される (図 1)。

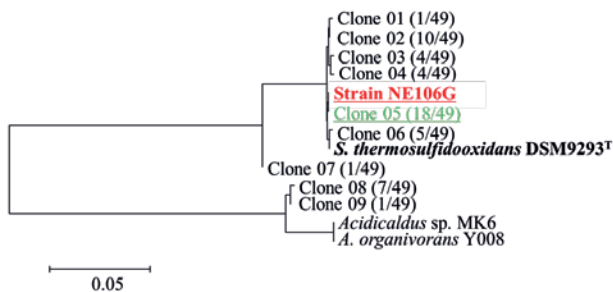


図 1 集積培養系 NE の群集構造解析結果と単離株 NE106G の分子系統樹

TSB 培地を用いて、28-60℃で振とう培養した結果、35-60℃で、生物反応により生成された酸化鉄によっ

て培養液が黄色になることが確認された。28℃培養では、植菌していないものと比較しても色の変化がなかったことから、NE106G 株は生育していないものと考えられた。また、45, 52℃で最も生育が速く、35-60℃のときに培地が黄色く変色したことから、集積培養系 NE と同様に中等度好温性であると考えられた。

NE106G 株の重金属耐性実験の結果、 Al^{3+} を含まない 100 mM 重金属添加において、酸化鉄の沈殿が見られた。一方、 Al^{3+} を含まないものでは、 <20 mM 濃度のものでのみ沈殿が確認された。従って、NE106G 株は集積培養系 NE よりも重金属耐性が高いことが示唆された。

NE106G 株の培養液中の Fe^{2+} 残量を調べた結果、 Fe^{2+} 濃度は 0-8 時間で急速に減少し、24 時間後にはほとんど存在していないと考えられた。 Fe^{2+} 残存量から 0-24 時間における Fe^{2+} 酸化速度を求めた結果、0.26 mM/h であった。

集積培養系と単離株のバイオリーチング効率の比較

Fe^{2+} 7 mM, PCBs サイズ <0.25 mm, 45℃, 96 時間後の集積培養系 NE における金属浸出率は、Cu : 100%, Zn : 95%, Ni : 77%, Mn : 94%であった。NE106G 株では、Cu : 80%, Zn : 92%, Ni : 81%, Mn : 100%であった。以上より、集積培養系 NE と NE106G 株では、低い Fe^{2+} 添加濃度かつ短時間で、

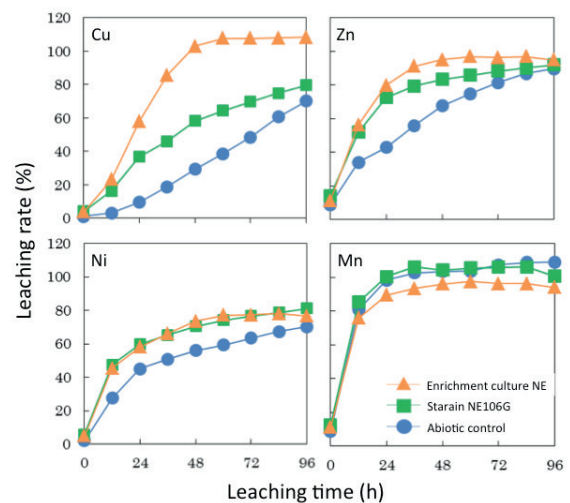


図 2 集積培養系 NE と単離株 NE106G のバイオリーチング効率の比較

既往研究と同程度の金属浸出率を得ることができた(図2)。

一方、集積培養系 NE は Cu および Zn における初期金属浸出速度が速いことが明らかになった。この要因として、集積培養系 NE において、NE106G 株よりも生育速度が速い細菌の存在、または、NE106G 株の働きを促進する細菌が存在する可能性が考えられた。

謝辞

本研究は、平成 25 年度環境研究総合推進費補助金(課題番号 3K133012) および秋田県立大学平成 27 年度学長プロジェクト研究費[若手・スタートアップ奨励研究]の助成を受けて行った。ここに記して謝意を表する。

文献

Bassi, C.A. and Benson, D.R. (2007). Growth characteristics of the slow-growing actinobacterium *Frankia* sp. strain Cc13 on solid media. *Physiologia Plantarum*, 130 (3), 391-399.

Jingwei Wang, Jianfeng Bai, Jinqiu Xu and Bo Liang. (2009). Bioremediation of metals from printed wire boards by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* and their mixture. *Journal of Hazardous Materials*, 172.

J. Willner. (2013). Influence of physical and chemical factors on biological leaching process of copper from printed circuit boards. *Metalurgija*, 52 (2), 189-192.

環境省、平成 24 年度 環境・循環型社会・生物多様性白書 第 1 部 第 4 章 第 3 節 我が国に眠る地上資源の発掘・活用

N. N. Adhapure, S. S. Waghmare, V. S. Hamde and A. M. Deshmukh. (2013). Metal solubilization from powdered printed circuit boards by microbial consortium from bauxite and pyrite ores. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49 (3), 256-262.

Nengwu Zhu, Yun Xiang, Ting Zhang, Pingxiao Wu, Zhi

Dang, Ping Li and Jinhua Wu. (2011). Bioremediation of metal concentrates of waste printed circuit boards by mixed culture of acidophilic bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 192, 614-619.

Sadia Ilyas, Munir. A, Shahida B. Niazi and M. Afzal Ghauri. (2007). Bioremediation of metals from electronic scrap by moderately thermophilic acidophilic bacteria. *Hydrometallurgy*, 88, 180-188.

Tao Yang, Zheng Xu, Jiankang Wen and Limei Yang. (2009). Factors influencing bioremediation of copper from waste printed circuit boards by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 97, 29-32.

Tamaki, H., Hanada, S., Sekiguchi, Y., Tanaka, Y. and Kamagata, Y. (2009). Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. *Environmental Microbiology*, 11 (7), 1827-1834.

〔平成 30 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 30 年 7 月 10 日受理〕

Iron(II) oxidation kinetics of moderately thermophilic acidophilic consortia useful to bioleaching from printed circuit boards.

Fuyumi Tojo¹, Yosuke Watanabe¹, Narumi Oonoya¹, Ruilu Liang²,
Jun Fukushima³, Yukinori Tani⁴ and Naoyuki Miyata¹

¹ Department of Biological Environment, Faculty of Bioresource Science, Akita Prefectural University

² Department of Management Science and Engineering, Faculty of Systems Science and technology, Akita Prefectural University

³ Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Science, Akita Prefectural University

⁴ Department of Environmental and Life Sciences, School of Food and Nutritional Science, University of Shizuoka

Fe(II) plays a pivotal role as the growth substrate and as the source of the oxidant Fe(III) that leaches metals through oxidation reaction in the bioleaching of metals with acidophilic iron (Fe) oxidizers in electronic waste. We examined the Fe(II) oxidation kinetics of moderately thermophilic acidophilic consortia useful to metal bioleaching from printed circuit boards (PCBs). The analysis of bacterial community structures revealed that the acidophilic consortium included *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* and *Acidicoccus*-related bacteria. The optimal temperature for Fe oxidation by the consortium was around 42–50°C at pH 2, and the oxidation rates showed half-saturation constant of 10 mM Fe(II). Further, the maximum specific growth rates of Fe oxidizer estimated by the Fe oxidation kinetics were found to be fully extended at around 7 mM. The addition of higher concentrations of Fe(II) lowered the specific growth rate. These kinetic data suggest that excess Fe(II) in the cultures is not effective in bioleaching, for which appropriate concentrations may be much lower than those routinely used elsewhere (50–270 mM). The results demonstrated that the bioleaching of copper, zinc, and nickel from powdered PCBs by the consortium reached 88%, 81%, and 69% at 7 mM Fe(II), and increasing the Fe concentration did not substantially raise the leaching efficiency. The results of this study showed that the microbial consortium with kinetic properties is feasible for the bioleaching of metals from PCBs under low Fe(II) conditions.

Keywords: acidophilic iron-oxidizing bacterium, Bioleaching, metal recovery, printed circuit boards, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*