

B-47

嫌気性消化における溶解性ニッケルのスペシエーション

福井工業大学工学部建設工学科 高島正信

福井工業大学大学院工学研究科 ○島田康司

1. はじめに

嫌気性細菌はFe、Ni、Co等の微量金属を必須としているが、嫌気下では硫化水素等と沈殿形成しやすく、その分微生物に利用されにくい。その一方で、微生物の溶存代謝産物 (Soluble microbial products, SMP) は微量金属と錯形成し、溶存状態に保つことが指摘されている^{1), 2)}。いずれにせよ、嫌気性リアクター内における微量金属の水質学的解析はこれまで定量的に行われてこなかったのが実状である。

本研究では、メタン生成細菌特有の補酵素 F₄₃₀ に含まれ、活性促進作用が報告されているニッケルを対象とし、ボルタメトリーの手法を用いたNi-SMP間の錯形成の測定と、化学平衡計算プログラムMINEQL+³⁾を用いた嫌気性リアクター内におけるNiのスペシエーションを試みてみた。

2. 実験方法

2. 1 嫌気性リアクターとサンプリング方法

対象とした嫌気性リアクターは有効容積 5.0L のアクリル樹脂製で、温度 35℃、HRT15 日、pH 約 7.2 の fill and draw モードで運転した。基質は、グルコースをエネルギー・炭素源として CODcr10g/L に調整したものである (表1)。リアクター混合液は引き抜き後遠心 (15000rpm、15 分) し、酸洗浄した 0.45 μm メンブレンフィルター (アドバンテック 045A047A) でろ過した。ろ液は分析までポリエチレン容器中に窒素ガスを充填し 4℃で保存した。

2. 2 CLE-CSV 測定

本法は、Competitive ligand exchange-cathodic stripping voltammetry (CLE-CSV) と呼ばれ、Ni については van den Berg and Nimmo⁴⁾によって海水に適用されたのが最初である。天然の錯化物質 (この場合 SMP) と Ni が存在する溶液に人工的な錯化物質 Dimethylglyoxime (DMG) を加えて新たな競合平衡を作らせ、CSV は Ni-DMG 錯体にしか応答しないことを利用して天然錯化物質の錯化能を測定するものである。

今回は、ろ液中の Ni は本法の直線応答範囲 (～約 10 μg/L) より多量に存在していたため、0.1M NaCl でまずろ液を 10 倍希釈した。また、ろ液は CO₂、H₂S、揮発性有機酸 (VFA) を含むが、これらが測定中に pH 変動等の弊害をもたらすため、pH を約 4 に低下させ N₂ パージを 15～20 分行うことにより予め除去した。このろ液に 0.01M MOPS バッファー (pH7.2) を加え、次いで 50mL ポリエチレン容器に 10mL ずつ分注し、段階的な濃度の Ni とその 1～2 時間後に 10⁻⁶ または 2×10⁻⁶M の DMG を加え、35℃で約 1 日間の平衡時間をとってから CSV (METROHM 757VA Computrace) に供した。CSV 測定の手順は、N₂ で 5 分間パージし、-0.7V で 60 秒間吸着させ、平衡時間 15 秒の後、負の方向へパルス高さ 50mV、スキャン速度 20mV/秒で -0.7 から -1.1V までスキャンした。微分パルスモードで測定し、攪拌速度 1000rpm、水銀滴のサイズ約 0.49mm²、pH7.2 における還元電流 i_p のピークは -0.84V 付近であった。なお、分析時の温度を 35℃に保つため、CSV 用容器を小さなウオーターバスの中に入れて測定した。

計算に必要な Ni と DMG の錯化安定度定数は報告が少なく、また、温度やイオン強度等の影響を受ける。

表1 基質の組成

成分	濃度(g/L)
グルコース	9.4
NH ₄ Cl	1.3
KCl	0.4
KH ₂ PO ₄	0.28
Na ₂ S · 9H ₂ O	0.25
NaSO ₄	0.12
L-システイン	0.036
ミネラル溶液 ^a	20 mL
NaHCO ₃	4.0

a) CaCl₂·2H₂O:4.8, MgCl₂·6H₂O:1.5, FeCl₂·4H₂O:0.82, NiCl₂·6H₂O:0.16, CoCl₂·6H₂O:0.12, ZnCl₂:0.42, AlCl₃·6H₂O:0.05, CuCl₂·2H₂O:0.05, MnCl₂·2H₂O:0.05, NaMoO₄·2H₂O:0.05, NaSeO₃:0.05, NaWO₄·2H₂O:0.05, H₃BO₃:0.05, NH₄VO₃:0.05, KI:1.0 (g/L)

そのため、マイクロウェーブ処理（100℃で2分、165℃で10分；0・I ANALYTICAL MODEL7195）したろ液を用い、よく知られたキレート物質 EDTA（濃度 10^{-6} ～ 10^{-5} M）を対照とするキャリブレーションを行い、Ni-DMG の錯化安定度定数を算出した。

2. 3 分析方法

CODcr は Standard Methods 5220D⁵⁾に従った。陽イオン（Na、K、 NH_4 、Ca、Mg）はイオンクロマトグラフ（SHIMADZU LC-6A、カラム IC-C3）、陰イオン（Cl、 PO_4 ）はイオンクロマトグラフ（DIONEX DX-120、カラム AS14）、VFA は液体クロマトグラフ（SHIMADZU LC-6A、カラム SCR-102H）、ガス成分（ CH_4 、 CO_2 、 H_2 ）はガスクロマトグラフ（SHIMADZU GC-9A、カラム Parapak Q）によって分析した。生成ガス中の H_2S の測定には、検知管（GASTEC No. 4H）を用いた。また、Ni および Co の溶解性濃度は、ろ液のマイクロウェーブ処理後、2. 2 と同じ CSV 法による標準添加法で測定した。

3. 実験結果および考察

3. 1 DMG の錯化安定度定数

Ni-DMG 錯体の安定度定数 $\beta'_{\text{Ni(DMG)}_2}$ は、EDTA を添加していないときの電流値 $i_{p,0}$ に対する 10^{-6} 、 4×10^{-6} または 10^{-5} M の EDTA を添加したときの電流値 i_p の比 $X = i_p / i_{p,0}$ をまず算出し、その比を与える値を MINEQL+ でトライ・アンド・エラー計算して求めた。平均すると $\beta'_{\text{Ni(DMG)}_2}$ は 21.0 ($T=35^\circ\text{C}$ 、 $I=0.1\text{M}$ 、 $\text{pH}=7.2$) となった。なお、MINEQL+ のデータベースに含まれていない Co(DMG)_2 の安定度定数として 16.98⁶⁾ を使用した。報告されている $\beta'_{\text{Ni(DMG)}_2}$ 値は 17.0 ($T=20^\circ\text{C}$ 、塩分濃度=32.5%)⁴⁾ から 22.9 ($T=22^\circ\text{C}$ 、 $I=0\text{M}$)⁷⁾ とかなり広く分布しており、本研究では得られた値をそのまま使用した。

3. 2 SMP の錯化安定度定数

本実験では、二つのサンプルについて測定し、サンプル1 は3日間のろ液を混合したコンボジット、サンプル2 は1日のサンプルから作成したろ液である。例として、サンプル1 の滴定曲線とそれを直線化したものを図1 および図2 に示す。平衡関係と物質収支から滴定曲線は次のように直線化される⁹⁾。

$$[\text{Ni}^{2+}] / [\text{NiSMP}] = [\text{Ni}^{2+}] / C_{\text{SMP}} + 1 / (K'_{\text{NiSMP}} \cdot C_{\text{SMP}})$$

ここで、 K'_{NiSMP} は Ni-SMP 錯体の条件付き安定度定数、 C_{SMP} は錯形成に関与する SMP 濃度である。これらは直線の傾きと切片から求めることができ、得られた結果を表2 にまとめる。

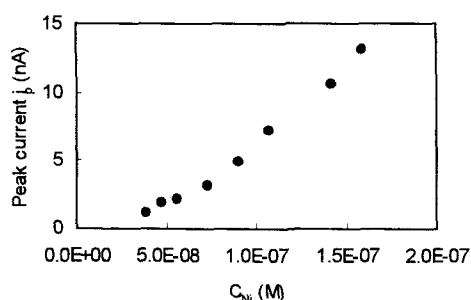


図1 滴定曲線(サンプル1)

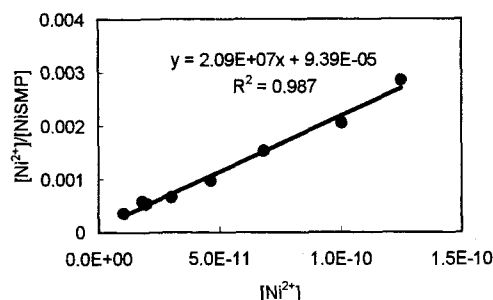


図2 滴定曲線の直線化(サンプル1)

表2 CLE-CSV による Ni-SMP 錯体の条件付き安定度定数と錯化 SMP 濃度 ($T=35^\circ\text{C}$ 、 $I=0.1\text{M}$ 、 $\text{pH}=7.2$)

	DMG 濃度(M)	$\log K'_{\text{NiSMP}}$ (M^{-1})	C_{SMP} (M)	C_{SMP} (無希釈) (M)
サンプル1	2×10^{-6}	11.3	4.77×10^{-8}	4.77×10^{-7}
サンプル2	10^{-6}	11.0	4.41×10^{-8}	4.41×10^{-7}

Ni に対する SMP の安定度定数 (log 値で 11.0~11.3) は、NTA (同 11.4)⁸⁾ やシステイン (同 9.65)⁸⁾ に近く、かなり強い錯形成能があるとみなされる。これまで嫌気性処理について唯一報告されている Kuo and Parkin⁹⁾ の値は、Ni 選択性のイオン電極を用いたもので、log 表示で 3.62 と小さい。SMP 中の錯化能のある物質または場所は多岐に富むのでこのように大幅に異なったと思われ、本研究では最も強いものが検出されたと考えられる。

3. 3 嫌気性リアクター内におけるスペシエーション

3. 2 で求めた Ni-SMP 錯体のデータを入力し、MINEQL+によって化学平衡計算を行った結果を表 3 に示す。ここでは、Ni と HS⁻ の錯体も考慮することとし、三つの報告^{10), 11), 12)} から錯化安定度定数の平均をとり、log 表示で NiHS⁺ については 5.6、Ni(HS)₂ については 11.3 を温度補正なしで使用した (ただし、I=0M での値)。表 3 より、最も存在割合が高い Ni の形態は SMP との錯体で、70.1~85.2% を占めている。次いで、Ni(HS)₂ が残りのほとんどを占めた。一般に、バイオアベイラブルな微量元素の形態はフリー、ひいては無機錯体とみなされているので¹³⁾、溶解性 Ni の約 15~30% は直接的な利用が可能であると考えられた。

表 3 MINEQL+による嫌気性リアクター内溶解性 Ni のスペシエーション結果 (T=35°C、I=約 0.1M、pH=7.2)

順位	形態	サンプル 1		サンプル 2	
		log 濃度 (M)	全 Ni に対する%	log 濃度 (M)	全 Ni に対する%
1	NiSMP	-6.47	85.2	-6.50	70.1
2	Ni(HS) ₂	-7.24	14.7	-6.87	29.6
3	NiHS ⁺	-9.27	0.14	-8.91	0.27
4	NiHCO ₃ ⁺	-10.3	0.013	-9.92	0.026
5	Ni ²⁺	-11.0	0.0027	-10.6	0.0054
6	NiCO ₃	-11.1	0.0023	-10.7	0.0046
7	NiCl ⁺	-12.5	0.00007	-12.2	0.00014
8	NiNH ₃ ²⁺	-12.7	0.00005	-12.3	0.00010

4. まとめ

本研究では、微量栄養素として重要な Ni について、嫌気性リアクター内の溶解性液中におけるスペシエーションを試みた。ボルタメトリーの応用である CLE-CSV 法と化学平衡計算プログラム MINEQL+を用い検討した結果、Ni に対して強固な錯体を形成する SMP が存在し、溶解性 Ni の 70~85% が SMP との錯体として存在することが示唆された。

参考文献

- 1) Callander I. J. and Barford J. P. (1983) *Biotechnol. Bioeng.* 25, 1959-1972.
- 2) Barker D. J. and Stuckey D. C. (1999) *Wat. Res.* 33, 3063-3082.
- 3) Schecher W. D. and McAvoy D. C. (2001) Environmental Research Software, Hallowell, ME.
- 4) van den Berg C. M. G. and Nimmo M. (1987) *The Science of the Total Environment*. 60, 185-195.
- 5) APHA (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed.
- 6) Sillen L. G. and Martell A. E. (1971) *Stability Constants of Metal-Ion Complexes*. Special publication No. 25. The Chemical Society, London.
- 7) Xue H. B., Jansen S., Prasch A. and Sigg L. (2001) *Environ. Sci. Technol.* 35, 539-546.
- 8) Smith R. M., Martell A. E. and Motekaitis R. J. (2003) *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database*. U.S. Dept. of Commerce, Gaithersburg, MD.
- 9) Kuo W.-C., Parkin G. F. (1996) *Wat. Res.* 30, 915-922.
- 10) Al-Farawati R. and van den Berg C. M. G. (1999) *Mar. Chem.* 63, 331-352.
- 11) Zhang J.-Z. and Millero F. J. (1994) *Anal. Chim. Acta.* 284, 497-504.
- 12) Luther G. W., Rickard D. T., Theberge S. and Olroyd, A. (1996) *Environ. Sci. Technol.* 30, 671-679.
- 13) Tessier A. and Turner D. R. (1995) *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley and Sons, New York.