

芝浦工業大学

博士学位論文

希少金属セレンの浄化・再資源化を目指した

新規バイオプロセス開発

Development of New Bioprocesses

for Purification and Recycling of Selenium

令和 4年 3月

大塚 治

目次

第1章 序論	4
1.1 研究の背景	
1.2 研究の目的と構成	
第2章 セレン酸還元細菌とセレン含有廃水処理に関する既往研究	11
2.1 緒言	
2.2 日本におけるセレンの立ち位置	
2.3 高濃度セレン酸還元細菌についての既往研究	
2.4 本研究の方向性	
第3章 セレン酸還元細菌 <i>Pseudomonas stutzeri</i> NT-I 株のセレノオキシアニオン還元反応の特徴づけ	19
3.1 緒言	
3.2 方法	
3.3 結果と考察	
3.4 要約	
第4章 セレン酸還元細菌 NT-I 株の気化セレン合成反応の特徴づけ	30
4.1 緒言	
4.2 方法	
4.3 結果と考察	
4.4 要約	
第5章 固化セレン回収、資源化プロセス開発	35
5.1 緒言	
5.2 方法	
5.3 結果と考察	
5.4 要約	

第6章 気化セレン回収、資源化プロセス開発	53
6.1 緒言	
6.2 方法	
6.3 結果と考察	
6.4 要約	
第7章 セレン酸還元細菌 NT-I 株によるセレン含有廃棄物からのセレン回収	59
7.1 緒言	
7.2 方法	
7.3 結果と考察	
7.4 要約	
第8章 セレン酸還元細菌 NT-I 株の汚染土壌浄化への応用とプロセス開発	64
8.1 緒言	
8.2 方法	
8.3 結果と考察	
8.4 要約	
第9章 総論	78
参考文献	84
謝辞	97

第1章 序論

1.1 研究の背景

日本は技術大国として経済的発展を遂げた現在も、自動車や電子機器を中心とした製造分野で世界を牽引する存在であり、2020年の国内総生産が世界第三位という経済大国である。一方で、1997年の京都議定書の採択を転機として、化石燃料依存社会からの脱却や地球温室効果ガスの削減といった環境に配慮した循環型社会の形成が国際的に求められており、2015年9月に国連サミットで採択された持続可能な17項目の開発目標（SDGs：Sustainable Development Goals）にも批准している（図1-1）。これに伴い製造技術は単純な低コスト、高性能化だけではなく、省資源、省エネルギーを目的として発展してきた。2021年現在のSDGs進捗レポートでは再生エネルギー利用の推進（No.7：エネルギーをみんなにそしてクリーンに）やりサイクルを前提としたモノ作り（No.12：つくる責任つかう責任）が日本の重要な課題であると評価されている[1]。日本の中心産業である電子機器分野では携帯電話の発達や太陽電池の変換効率改善、高性能化に伴い、材料工学を基盤とした高度な技術が発展してきた。これらのハイテクノロジーや環境適合型技術を支えてきたのが、希少金属（レアメタル）である。



図 1-1 持続可能な開発目標（SDGs）の17目標

レアメタルとは総称名であり、「地球上の存在量が稀であるか、技術的・経済的な理由で抽出困難な金属」のうち、工業需要が現に存在する（今後見込まれる）ため、安定供給の確保が政策的に重要であるもの、つまり31種類の元素を工業審議会においてレアメタル（中でも希土類元素17種類をレアアースと呼称）と定義されている（図1-2）[2]、[3]。日本が

得意な電子機器分野の中でも再生エネルギー推進を担う技術として太陽光を電気に変換する太陽電池が注目されている。この太陽電池にもインジウム (In)、ガリウム (Ga)、セレン (Se)、テルル (Te) といったレアメタルが材料として使用されている[4], [5]。大量に用いられる鉄(Fe)や銅(Cu)、亜鉛(Zn)といったベースメタルとは異なり、レアメタルは少量添加することにより、性能を大きく向上させたり、特長的な性質を備えたりといった使われ方をすることが多く、電子機器分野では必須なことから産業のビタミンとも呼ばれる。

1 H																	2 He
3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
55 Cs	56 Ba	La	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
87 Fr	88 Ra	Ac	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Cn	113 Nh	114 Fl	115 Mc	116 Lv	117 Ts	118 Og
La	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu		
Ac	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr		

図 1-2 周期表 (黄色：レアメタル、灰色：レアアース)

先端技術産業において重大な意味を持つレアメタルが現在、供給不安定化による価格の高騰という大きな問題を抱えている[6]。レアメタルという名前から、希少さからくる枯渇が問題の原因であるようにみえるが、希少さだけが問題の本質ではない。希少度の指標として使われる、地殻表層部を構成する元素の割合を示したクラーク数を比較すると、代表的なベースメタルであり我々の身近にある鉄は 4.7%と高いが、銅は 0.006%であり、亜鉛は 0.007%と低い値である[7]。これらのベースメタルは長年の探鉱・開発・製錬技術の蓄積や、資源国からの供給ラインの確保などによって安定供給が確保されている。一方でレアメタルの一種であるチタンのクラーク数は 0.57%であり、ニッケルは 0.0075%と、存在量としてはベースメタルよりも多いレアメタルも存在する。しかし、レアメタルは偏在性が高いものや、抽出技術が未発達のものも多くある。このような理由から、偏在性の高い元素を保有する資源国の政策の影響により供給不安定化が起り、急激な価格の乱高下につながっている。特に中国による資源囲い込みや、鉱物資源そのものの枯渇から、レアメタルの価格が乱高下し、一時は 2、3年で 10 倍もの価格に跳ね上がった元素も存在した[2]。このようなレアメタルの価格の乱高下や、供給の不安定化は、多くのハイテク企業を抱える日本においては死活問題となっている。

こういった現状を踏まえ、近年、レアメタルの新たな供給源の確保が重要な課題となっている[8]。そこで特に注目されているのが、都市鉱山である。都市鉱山とは、ゴミとして大量に放置された携帯電話や家電に含まれる貴金属やレアメタルを鉱山に見立てた概念である[9]–[12]。資源が乏しい日本において、各種金属の埋蔵量という観点から見れば、都市鉱山

には世界有数の資源国に匹敵する資源が眠っている（表 1-1）。特に電子回路に使用される金や、銀といった貴金属を含む 2 鉱種における埋蔵量は世界トップであり、レアメタルもインジウムが 15.5%で 2 位、アンチモンが 19.1%で 3 位と、大量の資源が都市鉱山に含まれている。

表 1-1 日本の都市鉱山規模（2011 年）

金属	世界の埋蔵量に対する割合 (%)	埋蔵量の国別順位	都市鉱山の蓄積量 (t)	世界の埋蔵量 (t)
銀	22.4	1	60,000	270,000
アンチモン	19.1	3	340,000	1,800,000
金	16.4	1	6,800	42,000
インジウム	15.5	2	1,700	11,000
リチウム	3.8	6	150,000	4,100,000
タンタル	10.4	3	4,400	43,000

出典：独立行政法人物質・材料研究機構

実際に金や銀を含む貴金属に関しては、都市鉱山からのリサイクルが進んでいる。一方で、都市鉱山に豊富に含まれるレアメタルの回収は、ほとんど進んでいない。理由としては、まず値段が高騰したとはいえ貴金属類に比べれば安価であり、物理化学的処理では採算がとりにくいこと、そして多様な金属類が混在する中から、特定のレアメタルだけを特異的に回収する技術がないことなどが挙げられる。資源を持たない日本においては、このような未利用資源を活用した技術開発によるレアメタルの回収が重要であると考えられ、少なからずの研究者が生物機能を利用した新たな技術開発を試みている[13]。

また、レアメタル需要の増大に伴い、新たな問題も発生しつつある。これまでに偏在性が高く埋蔵されてきたレアメタルが多種多様なハイテク製品に利用されることで、製造工程や廃棄物などからこれまで自然界には存在しないほどの高濃度のレアメタルが環境中に放出され、レアメタル汚染のリスクが増してきている。そのため水質汚濁防止法や土壌汚染対策法、環境基本法などにより、環境へのレアメタルの放出に厳しい規制（基準値設定：Cr,Se,要監視項目：Mo, Sb,Ni）がかかっている[14], [15]。

レアメタルの一種であるセレンは日本と関わりが深く、薬毒の二面性を持つ興味深い元素である。セレンは動植物の必須微量元素のひとつであり成人男性にとっては $30\mu\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$ が推奨摂取量とされている。セレンの持つ抗酸化作用は人体にとって非常に有用であり、抗がん剤などの治療薬の原料として使用されている[16]。一方でセレンは過剰摂取による毒性があるため、人体にとって有害な元素でもある。成人男性でセレンを $400\mu\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$ 以上を慢性的に摂取すると胃腸障害や末梢神経障害を引き起こし、グラム単位で摂取すると重症の胃腸障害や呼吸困難など急性毒性を起こすことが知られている[17]–[19]。

自然環境中でセレンは火山堆積物に微量濃度含まれている。このため火山大国日本の国

土中には自然由来のセレンが広く分布している[20]–[23]。土に含まれるセレンは植物に吸収されるため、日本で生産される野菜や穀物にはセレンが豊富に含まれる。したがって国産の植物を摂取する日本国民はセレン欠乏症とは無縁となっている。一方でセレンは土壤汚染対策法や環境基本法によって環境中の残存濃度基準が定められているため、自然由来であっても基準を超過した場合には対策が義務付けられている。トンネル工事などの大量の土砂が発生する工事では土中にセレンが含まれる可能性が高く[24], [25]、その対策による工事費用の増加や工期の遅延に悩まされている。

先端産業にとってもセレンは重要な工業原料である。セレンは主に銅などの非鉄金属製錬の電解スライムから副産物として製錬される[26]。日本は銅鉱石のほぼ全量を他国からの輸入に頼っているが、銅の製錬に伴うセレンの生産量は世界第2位である。このため日本にとってセレンは自国で製造できる重要なレアメタル資源といえる。古くはセレンの整流効果を利用した半導体、近年では CIGS 系の太陽電池の原料として使用されている。太陽電池は製造コストの高く変換効率が 30%以上となるシリコン系と、製造コストが低い化合物系 (CIGS や GaAs) に大別されるが、変換効率の関係でシリコン系のシェアが大半を占めていた。2014 年には化合物系の変換効率が 22%を超え、シリコン系に並ぶと期待されていたが、2020 年までは 20%程で頭打ちになっていた[27], [28]。しかし最新の研究では変換効率 34%を超える CIGS 太陽電池が開発されたことから、低コスト低資源使用量でありながらも高変換効率の太陽電池の実用化が現実味を帯びてきた[29]。

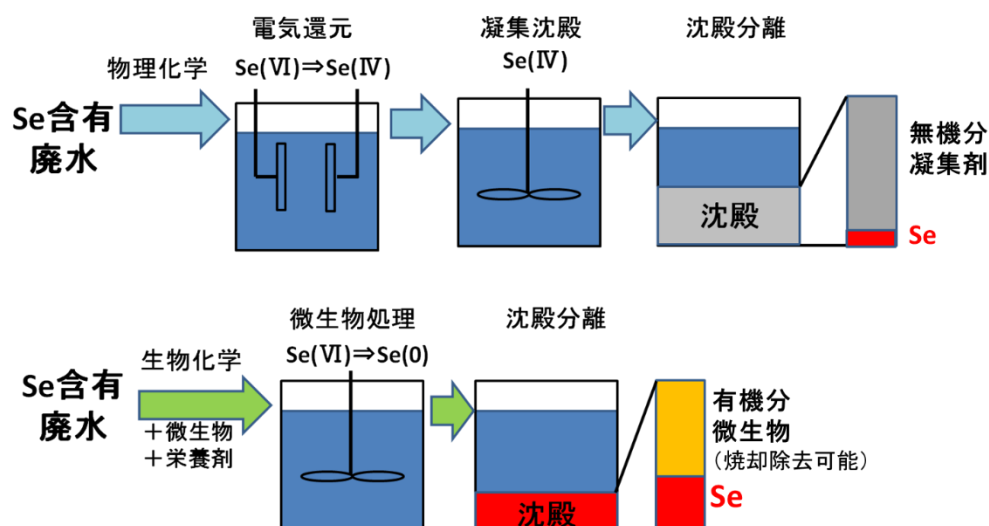


図 1-3 既存の物理化学処理と微生物処理の比較

このようにセレンは使用用途が多岐にわたり、今後の需要も見込まれる。セレンの生産・用途の拡大に伴い、自然界には存在しないほどの高濃度でセレンの一部が環境中に流出する可能性も高まっている。しかし工場廃水に含まれるセレンの浄化方法・回収再利用方法は確立しているとは言い難い。セレンは主にセレン酸[6 価, selenate, $Se(VI)$]または亜セレン

酸[4 価, selenite, Se(IV)]のオキサニオンの形態で廃水中に含有される。これらのイオンは低濃度で生物に有害であることが知られており、ラットの経口投与の半数致死量 (LD50) はセレン酸が 1.6 mg・kg⁻¹、亜セレン酸が 10 mg・kg⁻¹ であり、猛毒というイメージが広まっているヒ素の半数致死量と同程度である[30]–[32] (表 1-2)。したがって工業廃水中の全セレン濃度は水質汚濁防止法により 0.1 mg・L⁻¹ 以下にすることが義務付けられている[14]。これまでも一般的に電気還元や共沈といった物理化学的処理方法により[33]–[35]、廃水からのセレン除去が行われてきた (図 1-3)。具体的には、電気還元等によりセレン酸イオンを亜セレン酸イオンに還元した後、鉄系凝集沈殿剤を添加し、亜セレン酸を無機汚泥に吸着させ沈殿除去する方法である。しかし、セレン酸イオンは鉄凝集沈殿効率が非常に低く非特異的であり、大量の凝集沈殿剤を必要とする。このため、凝集沈殿剤コストおよび大量に発生した汚泥の処分コストなど非常に高コストであるという問題を抱えている。また大量の薬剤を使用するため、凝集沈殿した汚泥中のセレン濃度が低くなり、処理後のセレンを回収し再資源化することが困難である。このため日本では毎年約 50 トンに及ぶセレンを再利用せずに大気・公共用水域に排出している。廃水だけでなく廃製品からのセレン回収方法も確立されていないために、製品寿命が尽きた太陽光電池はそのまま都市鉱山として放置される可能性がある。そればかりか廃製品中のセレンが 1 mg・L⁻¹ を超える濃度で溶出し周囲に健康被害を拡大する危険性もある[36]。こうした実情を踏まえ、低コストでより特異的に処理ができる可能性を秘めた生物化学的手法を用いたプロセス (バイオプロセス) が研究されてきた[37]–[57] (表 1-3)。

表 1-2 セレン・ヒ素化合物のラット経口投与の半数致死量

物質名	化学式	価数	LD50(mg/kg)	備考
セレン酸ナトリウム	Na ₂ SeO ₄	VI	1.6	可溶性
亜セレン酸ナトリウム	Na ₂ SeO ₃	IV	10	可溶性
元素態セレン	Se	0	6700	不溶性
ジメチルセレン	CH ₃ SeCH ₃	-II	>1000	揮発性
ヒ酸ナトリウム	Na ₃ AsO ₄	V	112	可溶性
亜ヒ酸ナトリウム	Na ₃ AsO ₃	III	41	可溶性

表 1-3 セレノオキシアニオン還元微生物一覧

名前	最大還元濃度	条件	温度 (°C)	pH	塩濃度	6価セレン還元速度	4価セレン還元速度	場所	粒子径	参考文献
Se(VI) 還元 微生物	10mM	好気	10-42	6-9	0.1-50 g/L	5×10^{-6} nmol/h/cell	4.1×10^{-7} nmol/h/cell	細胞外	200nm	[37]
	48.1 mM	好気	30	7	—	93.16 nmol / ml/h	93.67 nmol / ml/h	—	—	[38]
	50mg/L	嫌気	30	7	16 g/L	50mg/L /100h	×	—	—	[39]
	1mM	嫌気	36	7.2	—	1.2mM/48h	—	—	—	[40],[41]
	1mM	嫌気	25-37	6.5-7.5	—	0.36mmol/15day	0.62mmol/15day	細胞外	500nm	[42]
	10mM	嫌気	28	—	—	10mmol/12day	×	細胞外	100-300nm	[43]
	10mM	嫌気	—	—	—	8 mM/58h	4mM/116h	—	—	[44]
	20mM	嫌気	30	8	—	1mM / 12h	0.9mM / 48h	細胞外	200-300nm	[45],[46]
	26mM	嫌気	28	7.4	—	18mM/90h	—	—	—	[47],[48]
	Se(IV) 還元 微生物	10mg/L	好気	30	4.5-7	—	×	4mg/L/12days	細胞内	30-400 nm
1mM		好気	35	7	—	×	0.028 mmol/(L-hr)	細胞内	80-200nm	[50]
1mM		好気	30	7	—	×	0.444 mmol /L/h	細胞外	100-500nm	[51]
2.5mM		好気	30	7.1	—	×	1.75mM/340h	細胞外	85-450nm	[52]
5mM		好気	30	7	—	×	5mM/42h	細胞外	100-400nm	[53]
60mg/L		好気	30	3.5	—	×	0.83 mg / L / h	細胞内	65-100 nm	[54]
100mg/L		好気	28	6	—	×	60mg/L/7day	細胞外	40-100nm	[55]
0.5-10mM		好気	15-42	5-11	7.5	×	2mM/24h	細胞外	150-200nm	[56]
10mM		好気	31-32	6.8-7	—	×	—	細胞外	50-100nm	[57]

微生物におけるセレン代謝は無機セレノオキシアニオンをセレノアミノ酸や有機セレン化合物に変換する同化型還元と、無機セレノオキシアニオンを無機元素態セレンまでに還元する異化型還元がある。これまでに報告されているセレン含有廃水の生物学的処理は主に嫌氣的にセレン酸を異化型還元する微生物を利用しており、ほとんどが農業廃水や自然環境中のセレン汚染水などの $0.01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度の低濃度の廃水処理を目的としたものである（表 1-3）。報告例の中には高濃度亜セレン酸を含む廃水を想定したものはあるが、高濃度セレン酸に対しては想定されておらず実用化には課題が山積している。さらにこれらは水溶液中からのセレン除去を目的としており、セレンの回収再資源化は実証されていない。また微生物代謝によってセレンを揮発化させ、水溶液もしくは土壌を浄化する報告もあるが、回収再資源化は考慮されていない[40], [58]–[64]。

セレン含有廃水のバイオプロセスに利用するために高濃度セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株が単離された[37]。NT-I 株は水溶性のセレン酸を亜セレン酸へ還元し、亜セレン酸から固体の元素態セレンまで異化型還元をおこなう（図 1-4）。さらに元素態セレンを還元、メチル化を経て Dimethyl diselenide[DMDSe, Se(-I)]まで還元することができる[65]。

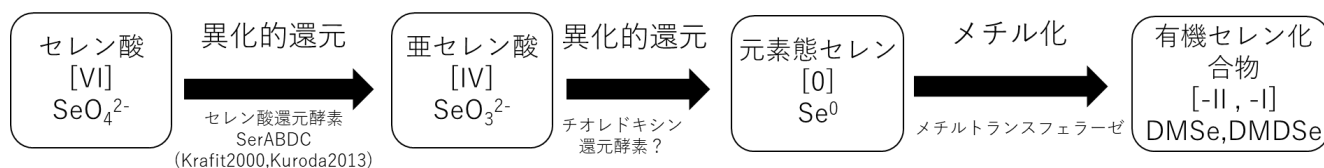


図 1-4 現在判明している NT-I 株によるセレン代謝概要

1.2 研究の目的と構成

本研究では、セレン含有廃水のバイオプロセスに利用可能な高濃度セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株のセレン代謝の特徴付けと、廃水廃棄物からのセレン回収プロセスの構築に寄与する知見を得ることを目的とした。

本論文は以下のような全 9 章で構成した。第 2 章では、高濃度のセレン酸を還元可能な細菌、及びセレン処理プロセスに関する既往研究を概説し、セレン含有廃水のバイオプロセスの開発に向けて不足している知見を整理した。第 3 章では NT-I 株のセレン酸還元、亜セレン酸還元能力を調べるため培養条件因子の検討を行い、最適還元条件を決定した。第 4 章では元素態セレン還元（DMDSe 合成）能力の培養条件因子の検討を行い、最適還元条件を決定した。第 5 章では廃水からのセレン固化回収方法の開発と回収物の再資源化を試みた。同様に第 6 章では廃水からのセレン気化回収方法の開発と回収物の再資源化を試みた。第 7 章では都市鉱山からの回収を想定し、廃製品からのセレン回収を試みた。第 8 章では NT-I 株のセレン代謝能力の適用範囲を拡大するために、セレン汚染土壌浄化を試みた。これらの研究で得られた成果と、そこから提案し得る新たなセレン回収再資源化プロセスの提案を、第 9 章総論で取りまとめた。

第2章 セレン酸還元細菌とセレン含有廃水処理に関する既往研究

2.1 緒言

第1章序論で述べたようにセレン含有廃水からバイオプロセスによるセレン回収方法の構築には、高濃度のセレン酸に対応できるセレン酸還元細菌が必要であると考えた。特に工業廃水では $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上の高濃度のセレン酸を含む廃水が発生することもあることから、これらの高濃度セレンに耐性があり、還元可能な菌株の分離と特徴を明らかにすることが望まれる。さらにセレン回収プロセスの実用化を視野に入れると、回収物からのセレン製錬方法の開発が必要となる。本章ではまず各種データから日本におけるセレンの立ち位置を明確にし、高濃度のセレン酸を還元可能な細菌、及びその処理プロセスに関する既往研究を概説し、セレン含有廃水のバイオプロセスの開発に向けて不足している知見を整理した。

2.2 日本におけるセレンの立ち位置

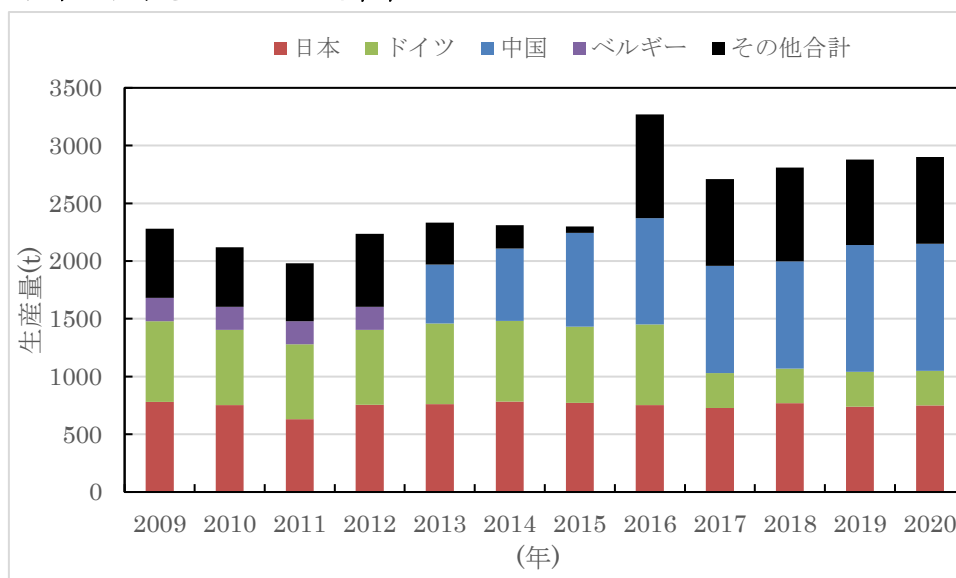


図 2-1 各年のセレン生産量推移 (USGS selenium report2009-2020)

アメリカ地質調査所 (USGS) 発表のデータによるとセレン総生産量は 2011 年から増加傾向にあったが、近年では年間 3,000t ほどで推移している (図 2-1)。セレンの生産量は 2014 年までは日本が 1 位を誇っており、中国のレアメタル禁輸政策や資源囲い込み政策に対抗できる元素であった。しかし 2013 年から中国での生産量が増加し、2015 年には生産量 1 位の座を中国に明け渡した。それ以降日本はセレン生産量 2 位である。しかし依然として全生産量の約 30%を日本で生産していることから、2020 年現在でも日本はセレン製錬大国と言える。日本では生産量の大部分を元素態セレンもしくは二酸化セレンとしてインドや香港、中国に輸出している (財務省貿易統計データ)。

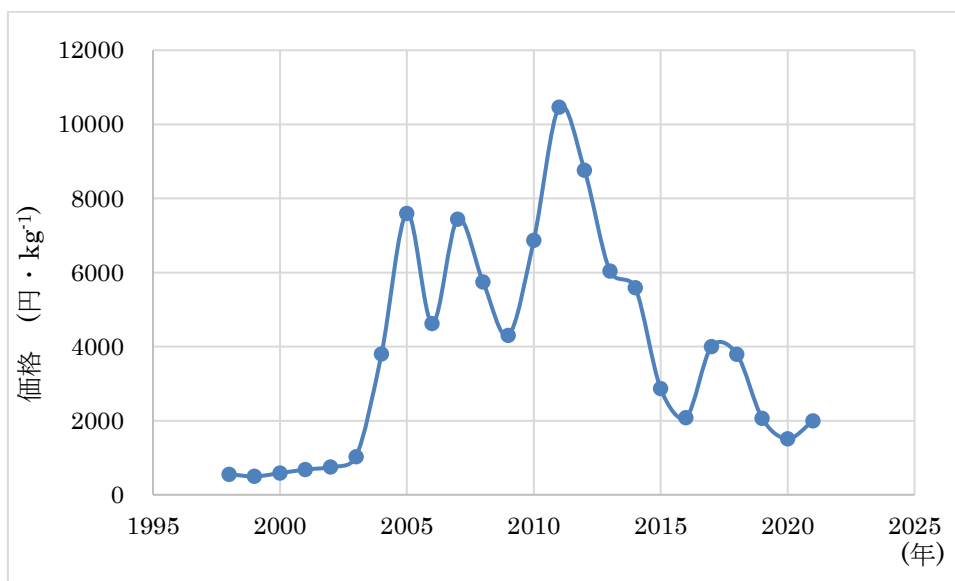


図 2-2 セレンの輸出価格推移 (財務省貿易統計データ)

総生産量の少ない年は輸出価格が最大 10,462 円・kg⁻¹ まで高騰したこともあったが、生産量が落ち着いている近年では 2,000 円・kg⁻¹ 程で推移している(図 2-2)。セレンの輸出価格は貴金属元素(銀: 84,000 円・kg⁻¹) と比べると見劣りするため、コストをかけた積極的な廃水廃棄物からの回収は行われていない。

表 2-1 日本におけるセレンを規制する法律と基準値

対象	法律	基準名	基準値
水	環境基本法	水質汚濁に係る環境基準	0.01 mg・L ⁻¹
		地下水の水質汚濁に係る環境基準	0.01 mg・L ⁻¹
	水道法	水質基準	0.01 mg・L ⁻¹
	下水道法	水質基準	0.01 mg・L ⁻¹
土壌	環境基本法	土壌汚染に係る環境基準	0.01 mg・L ⁻¹
	土壌汚染対策法	土壌溶出量基準	0.01 mg・L ⁻¹
		土壌含有量基準	150 mg・kg ⁻¹
大気	大気汚染防止法	特定物質	二酸化セレン
廃水 廃棄	水質汚濁防止法	排水基準	0.1 mg・L ⁻¹
		特別管理産業廃棄物	
	廃棄物処理法	判定基準(廃酸・廃塩基: 含有量)	1 mg・L ⁻¹
		判定基準(汚泥: 溶出量)	0.3 mg・L ⁻¹

日本政府はセレンが持つ毒性に注目し、水・土壌・大気に対して様々な法律によって基準

を設けている(表 2-1)。さらに廃水・廃棄物に対しても厳しい基準値が設定されている。現在セレンの精製工程や火力発電所では、可溶性のセレノオキシアニオンを高濃度で含む廃水が発生している[66]。Se 含有廃水の処理方法には物理化学的な処理(共沈、吸着、イオン交換など)が実施されており、溶液中のセレン濃度を $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下まで低減した後に排出されている。セレン(特にセレン酸)に対する物理化学的な処理方法に関して現在も研究は続いており、物理化学処理では難しい高濃度に対してもイオン交換法と沈殿法を併用した処理などが提案報告されている[67]–[71]。しかしこれらの処理方法はセレンを除去することが目的であり、除去後のセレンを回収再資源化したという報告は未だない。したがって既存の処理方法では廃水から除去されたセレンは回収再資源化されることなく、PRTR(Pollutant Release and Transfer Register)法レポートによると日本だけでも年間 50～70t 廃棄されている。これは日本の生産量の 10%に及ぶと見なされる。さらに 2000 年台から製造が活発化した太陽光パネルが近年製品寿命を迎え、CIGS 系太陽電池の太陽光パネルからレアメタル資源の再利用がおこなわれておらず[72]、都市鉱山として廃棄される可能性が懸念されている。

2.3 高濃度セレン酸還元細菌についての既往研究

効率的なセレン含有廃水からのセレン回収バイオプロセスの構築のためには、セレノオキシアニオン代謝能力の高い菌株の取得と特徴づけのみならず、回収プロセスの開発が重要となる。すなわち、培養の前段階でのセレン廃水の前処理の可能性あるいは、培養後に得られたセレンの回収方法や、回収したセレン含有物からセレンを製錬するための後処理の開発が必要となる。これまでに、限定された菌株において生物学的セレン処理プロセスにおいて発生した汚泥中に含有されるセレンに関する報告がいくつか行われている[34], [54], [67]–[71], [73]–[87] (表 2-2)。以下にそれらを概説し、セレン含有廃水からのセレン回収バイオプロセスの実現に向けて不足している知見を考察した。

セレン酸及び亜セレン酸還元微生物は複数報告がある(第 1 章,表 1-3)。調べた限りにおいて 9 例あるセレン酸還元微生物のうち 7 例が嫌気条件下でのセレン酸還元微生物であり、残り 2 例が好気条件下でのセレン酸還元微生物である。セレン酸還元微生物のうち 4 例が亜セレン酸還元に関しての記述がなく、亜セレン酸還元能を持たないもしくは亜セレン酸還元速度が非常に遅いと推測される。したがって好氣的にセレン酸および亜セレン酸を還元できる *Pseudomonas stutzeri* の 2 例はセレン含有廃水を高速で処理できる可能性があると考えられる。これまでに報告されているセレン酸還元細菌のうち、バイオプロセスへの活用やセレンの回収に言及されているものを下記に個別に概説する。

1. *Thauera selenatis*

これまでにセレン廃水処理後の汚泥を調べた結果では、嫌気性微生物 *Thauera*

*selenatis*による sludge-blanket reactor を用いたセレン廃水処理では、186 日間の運用で、回収された Se のうち 96%が元素態セレンとして回収された。このときの元素態セレンは汚泥中に $0.237 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ の濃度で含まれていた[88]。

2. *Sulfurospirillum barnesii*

アクリルアミドを用いて、*Sulfurospirillum barnesii* を固定した実験では、元素態セレンがアクリルアミドゲル中に濃縮され、58 日間培養で汚泥中の Se 濃度は最大で $1194 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (0.1194%)となった。しかしこの方法の場合、次にゲル中から Se を溶出させる工程が必要となる[89]。

3. *P. stutzeri* ATCC51152

Lortie らによって単離された *P. stutzeri* ATCC51152 株は、TSA 培地で培養した場合、好気培養条件下において、約 $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ のセレン酸を 14 時間で 98%以上を還元し、約 $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ の亜セレン酸を 20 時間でほぼ全量還元し、細胞内外は不明だが元素態セレンを生成した[38]。また、最高 $48.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ のセレン酸まで還元できることが示されており、セレン酸・亜セレン還元にあらず pH や温度、他のオキソアニオンの存在の影響についても調べられている。中でも亜セレン酸還元条件での pH 感受性が高く pH 5.5 以下または pH 9.5 以上では還元が起きないため、亜セレン酸塩還元の下限は pH 6.5、上限は pH 9.5 であると示されている。セレン酸還元微生物の中でも好気条件下でセレン酸を還元できる特異な微生物である。2021 年 Chen らは *P. stutzeri* ATCC51152 株を担体に固定し、嫌気条件によって $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ のセレン酸を亜セレン酸まで還元している[87]。次いで亜セレン酸は鉄系薬剤によって吸着処理された。Chen らは物理化学処理では処理が困難なセレン酸還元を微生物に任せ、微生物処理では多くの時間を要する亜セレン酸処理を物理化学的に処理した画期的な試みである。しかし処理後のセレンの再資源化は検討されていない。

表 2-2 セレノオキシアニオン処理技術一覧

処理方式	添加物	価数	論文内表記	濃度 (mM)	条件	温度 (°C)	pH	除去率 (%)	回収物	回収物のSe 純度	再資源化	参考文献
bacterial reduction	<i>Pseudomonas stutzeri</i> NT-1	Se(VI)	5mg/L	0.06	好気	28	8	90	Se(0)	30%	-	[73]
sequencing batch reactor	activated sludge	Se(VI)	1mg/L	0.01	嫌気-好気	30	7	97	Se(0)	-	-	[74]
batch	rice straw	Se(VI)	1mg/L	0.01	好気	21	6	95	Se(0)	-	-	[75]
membrane biofilm reactor	methane oxidizing consortium	Se(VI)	1.6mg/L	0.02	嫌気	29	7	90	Se(0)	-	-	[76]
membrane biofilm reactor	anaerobic biofilm	Se(VI)	2mg/L	0.03	嫌気	24-26	7.5	95	Se(0)	-	-	[77]
membrane biofilm reactor	methane oxidizing consortium	Se(VI)	20-60 μM	0.06	嫌気	22	7-8	92.4	Se(0)	-	-	[78]
Biotrickling filter	activated sludge	Se(VI)	7mg/L	0.09	嫌気	30	7.5-8	90	Se(0)	-	-	[79]
UASB	granularsludge	Se(VI)	10mg/L	0.13	嫌気	30	7	99.2	Se(0)	340mg/g	-	[80]
UASB	granularsludge	Se(VI)	12mg/L	0.15	嫌気	20	5	61	Se(0)	-	-	[81]
UASB	granularsludge	Se(IV)	12mg/L	0.15	嫌気	30	7.5	97	Se(0)	-	-	[82]
UASB	granular sludge	Se(IV)	40mg/L	0.51	嫌気	30	7(6-9)	100	Se(0)	-	-	[83]
fungal pelleted air lift bioreactor	<i>Aspergillus niger</i> KP	Se(IV)	60mg/L	0.76	好気	30	3.5	94.3	Se(0)	-	-	[54]
Upflow fungal pelleted reactor	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Se(IV)	50mg/L	0.63	好気	30	4.5	70	Se(0)	-	-	[84]
activated sludge reactor	activated sludge	Se(IV)	1mM	1.00	好気	30	7	86	Se(0)	-	-	[85]
sequencing batch reactor	activated sludge	Se(IV)	100mg/L	1.27	好気	30	7	98	Se(0)	-	-	[86]
Ion Exchange	exchange resin	Se(VI)	0.1mg/L	0.001	-	-	-	96	-	-	-	[67]
nanofiltration	-	Se(IV)	700 μg/L	0.01	-	-	-	98	x	-	-	[68]
nanofiltration	-	Se(VI)	4.5mg/L	0.06	-	-	-	95	x	-	-	[69]
adsorption and co-precipitation	nZVI, Fe3O4, GAC, FeCl3, BaSO4	Se(VI)	5mg/L	0.06	-	-	-	99	x	-	-	[70],[34]
Ion Exchange	Polyamine - type	Se(VI)	240mg/L	3.04	-	-	-	99	-	-	-	[71]
バイオ+ 物理化学 処理	Fixed Bed Biosystem column→Fixed Bed HAIX-NanoFe Column	Se(VI)	1mg/L	0.01	嫌気	23	4.5-5.0	99	x	-	-	[87]

4. *Pseudomonas stutzeri* NT-I

平成 19 年度 (2007 年) 地域新生コンソーシアム研究開発事業「微生物機能を用いた廃水からのセレン等レアメタル回収技術の開発」において、溶液中のセレンを元素態セレンまで還元できる微生物として金属リサイクル工場の廃水溝底汚水から *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株は単離された[37] (図 2-3)。複数の研究グループによって NT-I 株は研究対象となっており、調べた限りにおいて 2021 年 8 月現在で 16 報の報告がある。既に報告されている結果と課題をまとめた。

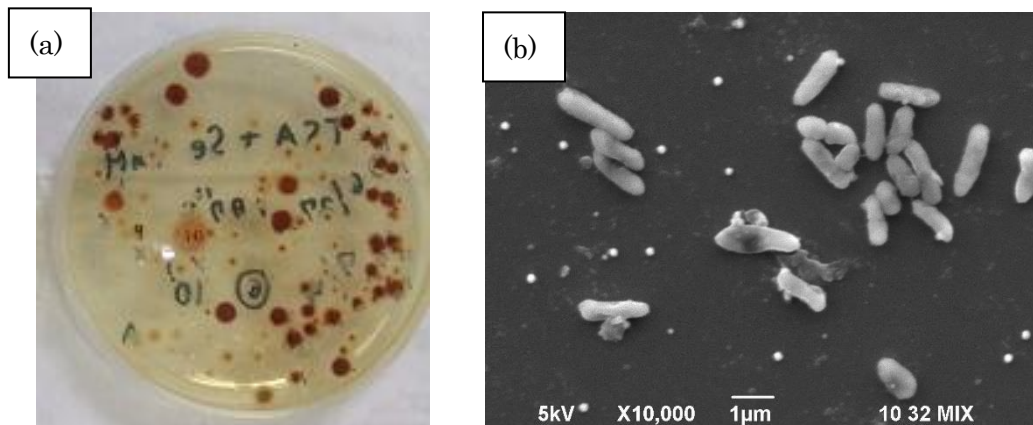


図 2-3 (a) NT-I 株のプレート写真と (b) 電子顕微鏡写真

2011 年に黒田らはフラスコレベルによるセレン酸および亜セレン酸還元の特性解析をおこなった[37]。NT-I 株は溶液中のセレン酸を亜セレン酸に、亜セレン酸を元素態セレンに還元できることを報告した。NT-I 株は高濃度のセレン酸 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、亜セレン酸 ($9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) を完全に還元した。また NT-I 株は桿菌のグラム陰性菌であり、カタラーゼ活性とオキシダーゼ活性を持つことがわかった。さらに培養温度 $10\text{-}42^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH}6\text{-}9$ 、塩濃度 $0.1\text{-}50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、好気条件で生育する。中でも 38°C 、 $\text{pH}7.0$ 、塩濃度 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ で最大の生育速度が得られた。セレン酸を基質として合成された元素態セレンは SEM-EDX での観察によって 200nm 程の粒子であり、細胞外に存在することが示唆された。さらに J.T. Tendnedzai らによって、亜セレン酸を基質として合成された元素態セレンも黒田らの結果と同様に細胞外で観察されることを報告している[90]。

表 2-3 セレノオキシアニオン還元速度比較 単位： $\mu \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 、×：報告なし

微生物名	基質			参考文献
	Se(VI)	Se(IV)	Se(0)	
<i>Pseudomonas stutzeri</i> NT-I	14	22.3	28	[65], [91]
<i>Corynebacterium</i> sp.	×	×	2	[92]
<i>Penicillium</i> sp.	×	0.8	×	[93]
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	0.05	×	×	[94]

鏡らによって NT-I 株は元素態セレンを DMDSe まで還元できることが報告された[65]。このことから NT-I 株は 6 価セレン酸から(-I)価の DMDSe 合成までを同一細胞でおこなうことができる稀有な微生物だと判明した。DMDSe は揮発性が高く、溶液中から容易に除去される。さらに鏡らはフラスコレベルで $7.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 、ジャーファーメンターレベルで $14 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ の速度で水溶液中のセレンを揮発化できることを報告した(表 2-3)。これらは他の微生物と比較してセレン還元速度が速い。気相解析によって NT-I 株培養中気相からは DMDSe の他に Dimethyl selenide (DMSe)、Dimethyl selenosulfide(DMSeS)、Dimethyl disulfide(DMDS)が含まれる事が示された。

セレン酸還元細菌の多くは嫌氣的にセレン酸還元をおこなっており、酸素がセレン酸還元を阻害している。しかし NT-I 株は好氣的にセレン酸還元をおこなうため、酸素がある状態でも大きな阻害を受けない。この特徴を応用して浄化回収処理開発が確立できると期待されている。黒田らの報告によると NT-I 株のセレン酸還元酵素 (SerABDC) は特別なものではなく既知の *T. selenatis* が保有するセレン酸還元酵素 (SerABDC) と相同性が高い[95]。一方で NT-I 株には特異的な特徴としてセレン酸還元遺伝子上流に好気条件下で転写制御に関与していると思われる ORF (open reading frame) が見つかっている[96]。微生物による亜セレン酸還元はチオレドキシ還元酵素による反応が示唆されているものの[97]、NT-I 株の亜セレン酸還元酵素も、遺伝子も明らかになっていない。同様に元素態セレンを細胞外へ排出するメカニズムも、細胞溶解時の放出や輸送タンパク質の関与が指摘されているが[98]、NT-I 株の元素態セレン排出メカニズムについて解明されていない。メチル化セレンの合成酵素として DMSe 合成酵素は報告があるが、DMDSe 合成酵素については未だ報告がない。DMDSe を主として合成する微生物は少ないため、反応経路も解明されていない。このように特異なセレン代謝能を持つ NT-I 株だが、セレン代謝について酵素学的知見および分子生物学的知見は少ない。

NT-I 株を使った排水処理に関して惣田らの研究グループが UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket; 上向流式嫌気性汚泥床) 方式のセレン処理について報告している[73], [96], [99]。セレン含有廃水を NT-I 株のセレン酸還元培養範囲にまで中和・希釈し炭素源を添加して繊維状担体に NT-I 株を濃縮させて処理をおこなった。セレン酸 $30 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ を 5 日、亜セレン酸 $60 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ も同様に 5 日程度で廃水基準 ($0.1 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 以下まで除去することに成功している。また下水汚泥焼却灰中のセレンを抽出し、その抽出液からのセレン除去を試みたとところ焼却灰から 90%以上のセレンを抽出に成功した。さらに UASB リアクターでの処理により抽出液から 90%以上セレンを除去することに成功している。しかし除去されたセレンは元素態セレンとして繊維状担体に蓄積されたが、再資源化には至っていない。

以上の報告を総合すると、NT-I 株のセレン還元特徴を調べ、廃水への適用がなされているものの、フラスコレベルなどの小スケールでの報告であり、生物処理実用化時の大量培養でも同様の挙動を示すかわかっていない。また浄化処理のみの報告であり、セレンの回収再資源化に関してはその可能性を示すにとどまっている。還元プロセスが複雑な亜セレン酸

還元速度や DMDSe 合成速度は定性定量分析が難しいために報告が少なく、詳細な還元メカニズムが明らかになっていないという課題がある。

2.4 本研究の方向性

これまでに報告されているセレン処理プロセスは浄化を目的としているため、回収も視野に入れて処理プロセスを構築するためには、(1) 対応できるセレン濃度が低い、(2) 元素態セレンの濃度が低い、(3) 製錬するための後処理の工程が必要である、(4) 時間とコストがかかるなどという課題が残されている。高濃度のセレン含有廃水を用いる事で、短時間で高濃縮のセレン沈殿を得る方法も考えられるが、既報の微生物は高濃度のセレン酸還元に対応できない事から、高濃度セレン含有廃水への適用は不可能である。*Pseudomonas stutzeri* NT-I 株のように高濃度のセレノオキシアニオンへの耐性と還元能を有する微生物が分離されたことによって、高濃度セレン含有廃水からの元素態セレンの高効率な回収プロセスを構築できる可能性が考えられる。NT-I 株は好氣的にセレン酸を還元することができるため、増殖も速く短時間でセレン回収できる可能性がある。しかし、これまでに好氣的セレン還元微生物を用いたバイオリクターによる大量培養の例はなく、セレン回収プロセス構築のための知見が不足していることが課題であると考えた。

第3章 セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株のセレノオキシアニオン還元反応の特徴づけ

3.1 緒言

第2章において NT-I 株はセレン酸を還元可能な好気性微生物の中でも高いセレン酸代謝能力を持つため、高濃度セレン含有廃水処理のバイオプロセスに適用する菌株として有望であると考えた。一方で、実用化のためには培養容量のスケールアップや温度、pH、攪拌速度などの培養条件因子の影響についての知見が必要である。そこで、本章では5Lジャーファーマンターを用いたセレノオキシアニオン還元試験によって、セレノオキシアニオン還元最適条件を決定するとともに、NT-I 株によって模擬廃水から回収したセレンの資源価値を調べることを目的として研究を行った。

3.2 方法

3.2.1 使用培地

NT-I 株の培養には、Bacto™ Trypticase Soy Broth (TSB) (Becton Dickinson) 培地を用いた。還元試験には Extra Pure Reagent のセレン酸ナトリウム (ナカライテスク) もしくは亜セレン酸ナトリウム (ナカライテスク) を添加した。その他の試薬には、市販の特級品を用いた。

3.2.2 ジャーファーマンターを用いたセレン酸・亜セレン酸還元試験

NT-I 株1白金耳量を100 mL容量バイアルに分注した50 mLのTSB培地に接種し、培養温度30°C、攪拌速度120rpmの条件に設定した回転振とう培養器で24時間培養した。この培養液を新しい50 mLのTSB培地を含む100 mL三角フラスコに0.5 mL添加し、再度12時間の前培養を行った。続いて、還元試験を行うために、遠心分離(15,000×g、5分、室温)により菌体を回収し、回収した菌体をオートクレーブ滅菌した0.9%塩化ナトリウム溶液に懸濁し、分光光度計(V-600、日本分光株式会社)を用いて、660nm(OD_{660})=1.0となるように調整した。培養菌体の細胞増殖は、分光光度計(V-600)を用いて、600 nmにおける光学密度(OD_{600})から計算された。菌体密度は以下の式(菌体密度($cells \cdot mL^{-1}$) = $OD_{600} \times 8.5 \times 10^8$)から計算した。この式は OD_{600} の値とカウンティングチャンバーを用いて顕微鏡による細胞直接計測によって決定した。 OD_{660} =1.0に調整した懸濁液30 mLを任意の濃度のセレン酸もしくは亜セレン酸を含んだTSB培地3 Lを分注した5 L容量ジャーファーマンター (Bioneer-C500N 型 5L(S)、株式会社丸菱バイオエンジ) に添加した。培養液の温度、攪拌速度、pHはそれぞれ任意の値に保った。pHは30%のNaOH溶液、2規定のHCl溶液で調整した。DOおよびpHは、それぞれDO electrode OX-2500およびpH combination electrode MPS-220 (株式会社丸菱バイオエンジ) で測定した。ジャーファーマンターからの排気はテフロンチューブ (内径5 mm、外径6 mm) を用いて、水蒸気に

よる溶液量の変化を緩和するために空の 250 mL の試薬瓶を通してから、250 mL 容量の試薬瓶に分注した 150 mL の濃硝酸を通過させた。培養液と濃硝酸を経時的に採取し、セレン酸、亜セレン酸、元素態セレン、全水溶性セレン、濃硝酸中のセレンは誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP - AES) (iCAP 6300 Duo, Thermo Fisher Scientific K.K.)によって定量分析した。

セレン酸および亜セレン酸の還元速度 ($\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$) は、セレン酸または亜セレン酸の減少量が最大になる時間における 1 時間当たりの減少速度 ($\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$) を OD_{660} から算出した菌体数 (cells) で割ることで算出した。

3.2.3 模擬廃水からのバイオセレン調製

前述の通りジャーファーメンターを準備し、終濃度 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ となるようにセレン酸を TSB 培地に添加して模擬廃水とした。 $\text{OD}_{660} = 1.0$ に調整した前培養液 30mL を模擬廃水に植菌し、培養温度 $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 9.0、攪拌速度 250 rpm、通気量 $1\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ の条件で 48 時間培養した。培養開始から 48 時間後に通気量を $1\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ から $0\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ に変更して、その後 24 時間培養を続けた。培養終了後の培養液を遠心分離(8,000rpm、20 分間、 4°C)により沈殿を回収した。回収した沈殿は超純水 600 mL を加えて沈殿を洗浄し、遠心分離(8,000rpm、20 分間、 4°C)により沈殿を回収した。繰り返し超純水による洗浄を行った後、70%エタノールを 600 mL 加え沈殿を洗浄し、遠心分離(15,000rpm、20 分間、 4°C)により沈殿を回収した。エタノール洗浄後の沈殿は乾燥機により、 40°C もしくは 60°C で 24 時間以上乾燥した。得られた乾燥物をバイオセレンとした。さらにバイオセレンを塩酸洗浄によって簡易に精製できるかを調べるために、回収した沈殿を超純水で洗浄した後に、12N 塩酸を加えて沈殿を洗浄し、遠心分離(8,000rpm、20 分間、 4°C)により沈殿を回収した。この操作を 3 回繰り返した後に、再度超純水による洗浄、70%エタノール洗浄の後に 40°C で 24 時間以上乾燥した。

3.2.4 元素分析方法

経時採取した培養液の 2 mL を遠心分離(15,000rpm、5 分間、 4°C)にて固液分離し、得られた上清を $0.2\text{ }\mu\text{m}$ のフィルター (Steradisc 13, KURABO) でろ過したものを検液サンプルとした。サンプル中のセレン酸および亜セレン酸イオンは、イオンクロマトグラフィー (ICS-1100、ダイオネクス社、検出器 DS6 HEATED CONDUCTIVITY CELL、カラム IonPac AS12A、ガードカラム AG12A、サブレッサーASRS300、溶離液 $3.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Na}_2\text{CO}_3$ 、流速 $1.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) で定性定量した。また、同サンプルの溶液は、ICP - AES (iCAP 6300) を用いて、上清中の総可溶性 Se 濃度を測定した。

沈澱物には洗浄のため超純水 2 mL を加え、ボルテックスにより混合した後、遠心分離 ($15,000\times g$ 、5 min、室温) により沈殿を回収した。2 回繰り返し、洗浄作業を行った後、沈澱試料に 1500 μl の濃硝酸と 50 μl の濃硫酸を添加し、ボルテックスにより混合し沈澱物

を溶解させた。溶解液は遠心分離（15,000×g、5 min、室温）をおこない、上清と沈殿物を分離した。上清は 10 mL メスフラスコに分取した。沈殿物を再度同条件で溶解操作を行い、得られた上清は、同じメスフラスコに分取した。10 mL メスフラスコに超純水を標線まで足し、定容したものを測定試料とした。測定試料を ICP-AES で定量し、セレンの測定値は元素態セレンとした。気体トラップの濃硝酸中の元素は ICP-AES で測定し、硝酸中の全存在元素と濃度を求めた。全試料を 3 回測定し、平均値を解析に用いた。

3.2.5 電子顕微鏡による菌体観察とエネルギー分散型 X 線解析装置による元素分析

経時採取した培養液を遠心分離（15,000×g、5 min、4°C）して上清を除き、沈殿物を 0.9% 生理食塩水適当量により 2 度洗浄した。沈殿物を再度適当量の生理食塩水で懸濁し、観察試料とした。この試料を顕微鏡観察用フィルターに滴下、吸引し、電子顕微鏡（SEM）観察を行った。観察は卓上型電子顕微鏡(TM3000：株式会社日立ハイテクノロジーズ)を用い、元素分析はエネルギー分散型 X 線解析装置(EDX) (SwiftED3000, オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社, 解析ソフト Quantax70,ブルカー・エイエックスエス株式会社)を用いた。

3.2.6 X 線回折分析

バイオセレンの結晶状態の評価には粉末 X 線回折装置（SmartLab（ $K\alpha 1$ ）、リガク）を用いた。バイオセレンは粉末に砕きペレット状に成型した後、乾燥してから測定した。測定条件は Mo target、出力 50 kV 300 mA、測定感度 sampling step 0.01°、測定速度 scan speed; 0.04°・min⁻¹にてスペクトルを測定した。

3.3 結果と考察

3.3.1. ジャーファーマンターを用いたセレン酸・亜セレン酸還元試験

NT-I 株のセレン酸還元および亜セレン酸還元にあつた各種因子の影響の検討を行うために、ジャーファーマンターを用い培養条件の検討を行った。様々な pH、温度、攪拌速度での還元速度を示した (図 3-1)。図の横軸はそれぞれの検討項目の値を、縦軸は還元速度を示している。黒田らが示した培養条件 (初期 pH7.0 (pH 調整なし)、38°C、120rpm、1 L・min⁻¹) を初期条件とした[37]。初期条件における還元速度はそれぞれセレン酸 3.1 × 10⁻¹⁶ mol・h⁻¹・cell⁻¹、亜セレン酸 8.8 × 10⁻¹⁸ mol・h⁻¹・cell⁻¹ だった。pH、温度の測定範囲はフラスコレベルでの増殖実験の結果から決定した。

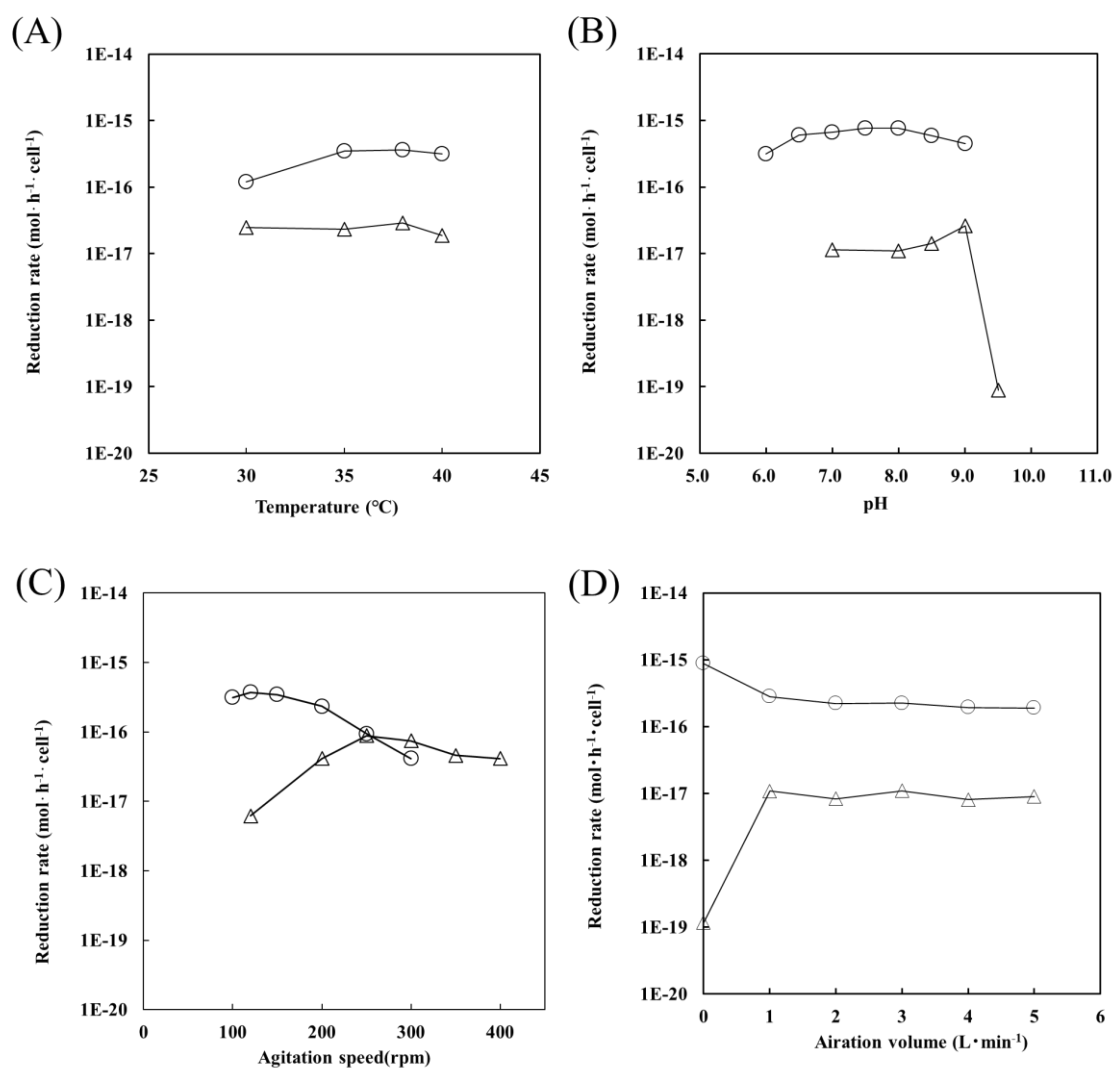


図 3-1 セレン酸と亜セレン酸の比還元速度 ○:セレン酸,△:亜セレン酸
(A) 培養温度の影響, (B) pH の影響, (C) 攪拌速度の影響, (D) 通気速度の影響

まず培養温度が還元に与える影響を調べるために、30~40°Cの範囲で還元試験をおこな

った。セレン酸と亜セレン酸の還元速度は 35°C~40°C、特に 38°C で高い傾向があった。セレン酸と亜セレン酸の 38°C での還元速度は、それぞれ $3.7 \times 10^{-16} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ と $2.9 \times 10^{-17} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ であった(図 3-1A)。成長細胞での最大減少速度が観察された温度は 38°C であり、休止細胞での 40°C と比較して低かった[37]。

次に pH が還元を与える影響を調べるために、6.0~9.5 の pH 範囲で還元試験をおこなひ、セレン酸と亜セレン酸の還元速度を求めた(図 3-1B)。セレン酸還元速度は pH 7.5 - 8.0 で平坦なピークを示したが、亜セレン酸塩還元の還元速度は pH 9.0 で鋭いピークを示した。増殖細胞におけるセレン酸および亜セレン酸の還元速度傾向は、休止細胞で観察されたものと同様であった[37]。

攪拌速度が還元を与える影響を調べるために、100~400rpm の攪拌速度範囲で還元試験をおこなった。120rpm でセレン酸の還元速度のピークが観察された。さらにセレン酸還元速度は攪拌速度が増加するに伴って低下した(図 3-1C)。対照的に、亜セレン酸の還元速度は 250rpm ($8.8 \times 10^{-17} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$) でピークを示し、初期培養条件下で観察された値の 10 倍の還元速度を示したことから、亜セレン酸還元はセレン酸還元よりも多くの酸素を必要とすることが示唆された。この結果はフラスコレベルでの還元実験で得られた結果と良好な一致を示した[37]。

最後に通気速度が還元を与える影響を調べるために、0~5 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ の範囲の通気速度を調べた。0 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ でセレン酸の比減少率のピーク ($8.8 \times 10^{-16} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$) が観察されたが、還元速度は $2.8 \times 10^{-16} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ で減少した(図 3-1D)。一方、亜セレン酸の還元速度は 1~5 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ で平らな線を示し、初期培養条件の還元速度と比較して増加を示した。しかし、通気なしでは、亜セレン酸の還元はほとんど認められず、通気はセレン酸の還元を阻害し、亜セレン酸の還元を促進することが示唆された。

以上まとめると、セレン酸還元は培養温度 38°C、pH 7.5、攪拌速度 120rpm、通気量 0 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ の培養条件において、亜セレン酸還元は培養温度 38°C、pH 9.0、攪拌速度 250rpm、通気量 1 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ の培養条件において最も高い還元速度が得られると示唆された。セレン酸および亜セレン酸の最大還元速度は、それぞれ $8.8 \times 10^{-16} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ および $8.8 \times 10^{-17} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ である。亜セレン酸還元速度はセレン酸還元速度に比べて 10 倍程度遅いため、NT-I 株のセレノオキシアニオン還元における律速反応だと考える。したがって NT-I 株のセレノオキシアニオン減少の最適培養条件は、亜セレン酸還元に重点を置いて培養温度 38°C、pH 9.0、攪拌速度 250rpm、通気量 1 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ と定義した。

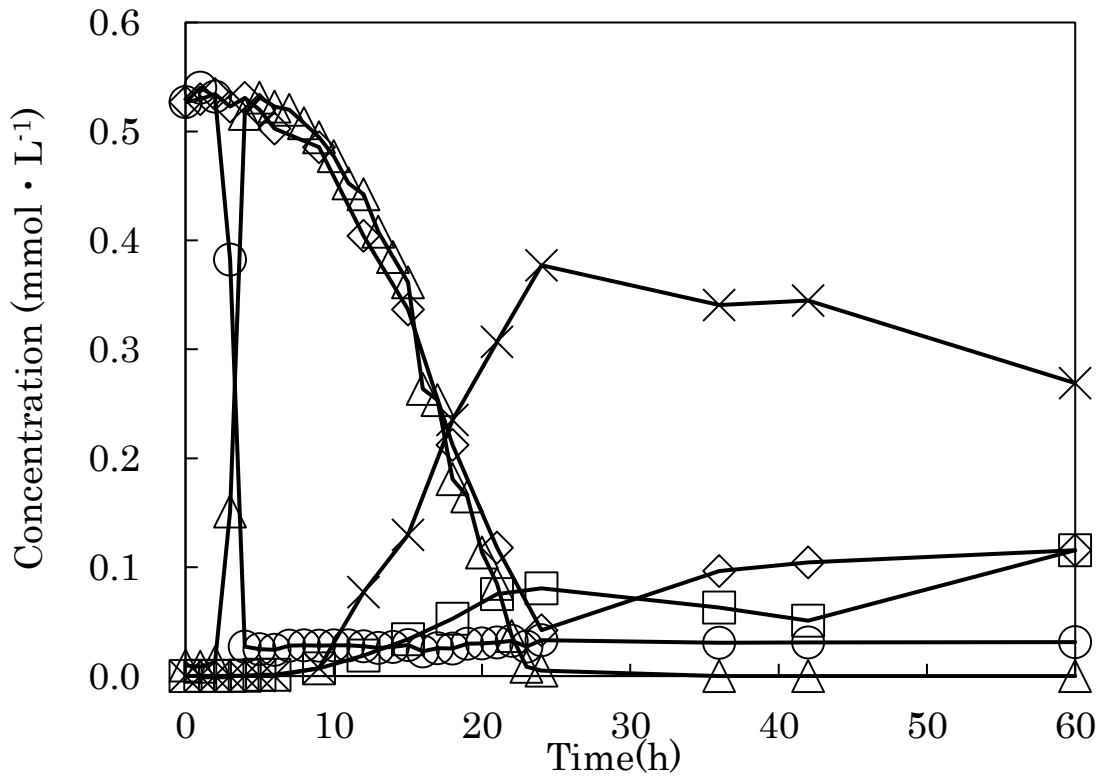


図 3-2 初期培養条件におけるセレン濃度経時変化

○ : セレン酸、△ : 亜セレン酸、◇ : 溶存セレン、× : 元素態セレン、□ : 気化セレン

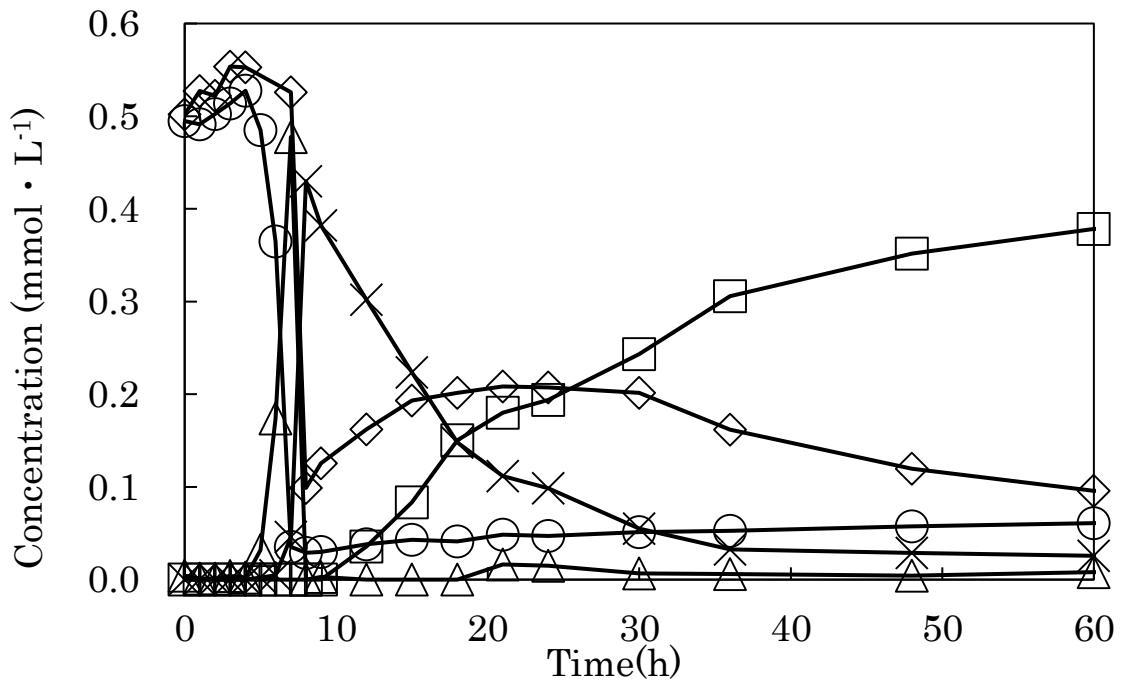


図 3-3 最適培養条件におけるセレン濃度経時変化

○ : セレン酸、△ : 亜セレン酸、◇ : 溶存セレン、× : 元素態セレン、□ : 気化セレン

3.3.2 最適条件でのセレン酸還元試験

黒田らが示した初期培養条件と最適培養条件におけるセレノオキシアニオン還元を比較するためにセレン酸還元試験をおこなった(図 3-2、図 3-3)。初期培養条件ではセレン酸が培養開始から 4 時間で完全に亜セレン酸に還元された(図 3-2)。培養開始から 5 時間目には亜セレン酸濃度が極大となった。亜セレン酸は培養開始から 23 時間(極大濃度から 19 時間)で元素態セレンまで還元された。元素態セレンは培養開始から 60 時間までに徐々に減少していった。

最適培養条件ではセレン酸が培養開始から 6 時間で完全に亜セレン酸に還元された(図 3-3)。セレン酸還元速度は攪拌速度を大きくするにつれて遅くなる傾向がある(図 3-1(c))。最適培養条件は初期培養条件に比べて攪拌速度を大きくしたため還元速度が遅くなり、セレン酸還元に必要な時間が増えたと推測された。最適培養条件では培養開始から 7 時間目には亜セレン酸濃度が極大となり、培養開始から 7 時間(極大濃度から 1 時間)で元素態セレンまで還元された。元素態セレンは極大濃度となってから速やかに減少し、DMDSe が検出された。最適培養条件を決定したことで、NT-I 株のセレノオキシアニオン還元に必要な時間は 23 時間から 7 時間となり、合計 16 時間も短縮することに成功した。

NT-I 株はセレン酸と亜セレン酸が共存している場合はセレン酸を優先的に還元する(図 3-2、図 3-3)。一部の微生物を除いて亜セレン酸よりもセレン酸の毒性が高いことが知られている[100], [101]。NT-I 株のセレン代謝が解毒を目的とした反応だと考えると、毒性が高いセレン酸を優先的に還元し、毒性の低い亜セレン酸へ解毒しているように思われる。

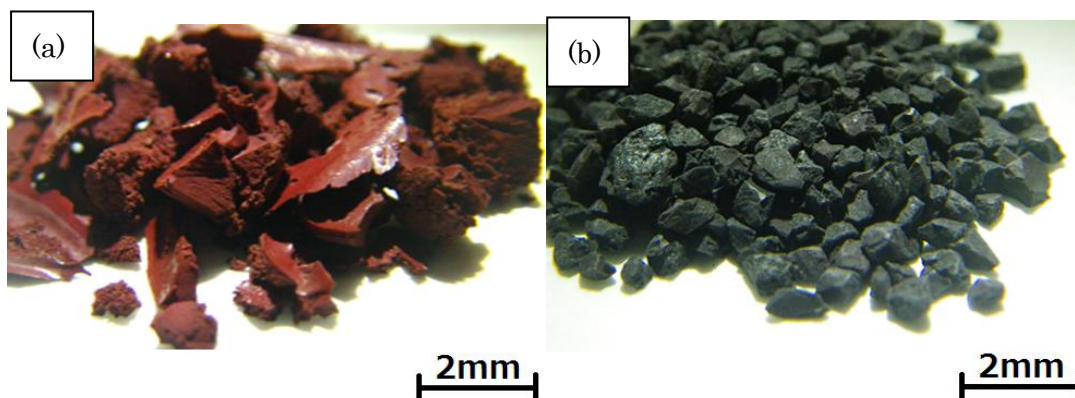


図 3-4 40°Cで乾燥させた赤色バイオセレン (a) と 60°Cで乾燥させた黒色バイオセレン (b) の写真

3.3.3 バイオセレンの特徴付け

模擬廃水から回収したバイオセレンは回収時には赤色を呈色している。しかもバイオセレンの乾燥温度によって色が異なることがわかった。定温乾燥器により 40°C もしくは 60°C で 24 時間以上保持して乾燥したバイオセレンを示す(図 3-4)。乾燥前のバイオセレンは赤色であり、40°C で乾燥して得られたバイオセレン(赤色バイオセレンと称する)は図

3-4(a)に示す赤色のまま、60°C で乾燥したバイオセレン(黒色バイオセレンと称する)は図3-4(b)に示すように黒色を呈した。これら 2 種類のバイオセレンの元素組成について ICP-AES を用いて定性定量分析を行った。分析の結果を表 3-1 に示す。

表 3-1 バイオセレン中の無機成分分析(単位：%)

	赤色 バイオセレン	黒色 バイオセレン
Ca	0.3 (±-)	0.4 (±-)
K	0.9 (±-)	1.1 (±-)
Mg	0.3 (±-)	0.4 (±-)
Na	0.9 (±-)	1.1 (±-)
P	1.9 (±-)	4.2 (±-)
S	1.8 (±-)	2.7 (±-)
Se	11 (±0.2)	14 (±0.4)

バイオセレン中の無機成分として、Se に加えてカルシウム(Ca)、カリウム (K)、マグネシウム(Mg)、ナトリウム(Na)、リン(P)、硫黄(S) の 6 元素が含有されていた。調製時にバイオセレンを純水で洗浄し、TSB 培地由来の夾雑物を取り除いているために、Ca, K, Mg, Na, P, S は微生物菌体由来であることが示唆される。赤色バイオセレンは平均 Se 含有率 11 % であり、黒色バイオセレンは平均 Se 含有率 14 %であった。赤色バイオセレンよりも黒色バイオセレンの Se 含有率が大きいことは、主に試料中の水分量に起因すると考える。またバイオセレンは大気中で吸湿して質量増加する傾向にあることから、表中の± (偏差) は主に吸湿による試料質量の変動誤差に相当すると考えた。

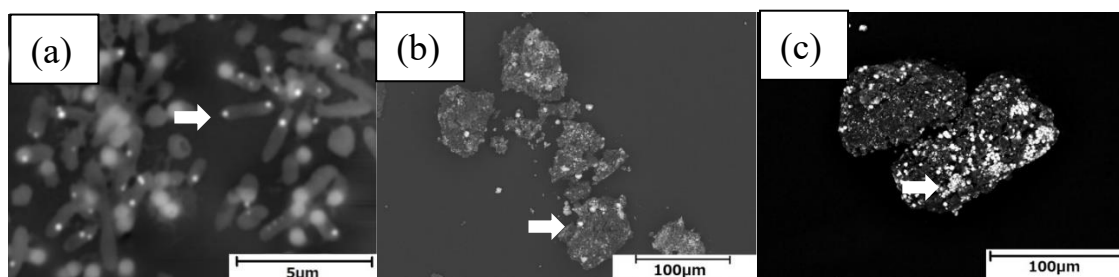


図 3-5 SEM 観察画像(a) 培養 48 時間後の NT - I 株 (b) 濃縮した赤色バイオセレンおよび (c) 黒色バイオセレン 白色の矢印は金属セレン粒子を示す

模擬廃水中のセレン酸を Se(0)に還元した直後の微生物と 2 種類のバイオセレンの電子顕微鏡観察結果を図 3-5 に示す。(a)~(c)に矢印で示した約 100~200 nm の白色の粒子が Se(0)であり、大部分は微生物の表面に存在していた。(b), (c)の赤色、黒色バイオセレン中

で Se(0) 粒子は偏在する傾向にあり、バイオセレン回収処理中に Se(0)が凝集したことが示唆される。

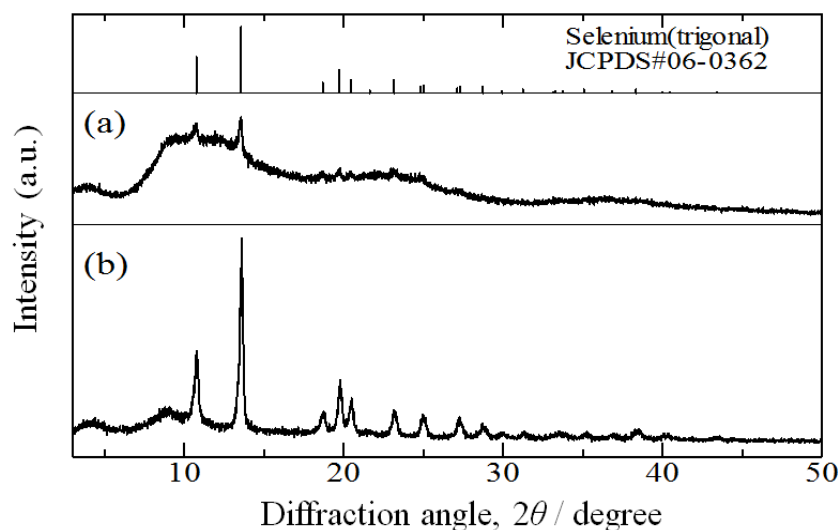


図 3-6 XRD 回折パターン (a)赤色バイオセレン(b)黒色バイオセレン

次に 2 種類のバイオセレンを X 線回折測定した結果を図 3-6 に示す。赤色バイオセレンはハローピークに加えて、三方晶 Se に帰属される微小な回折線を示した(図 3-6(a))。非晶質 Se の X 線回折測定による動径分布から、Se 中の第 1～第 3 近接原子間距離として 0.113, 0.173, 0.342 nm が報告されている。これらの原子間距離は、Mo-K α 線での Bragg 回折の $2\theta=36.6^\circ, 23.8^\circ, 11.9^\circ$ に相当し、ハローピークの中心近傍にあたる。よって、赤色バイオセレンは主に非晶質であり、一部が三方晶へ結晶化が進行していることが示唆された。黒色バイオセレンは複数の回折線を示し、三方晶 Se と同定した。非晶質の Se(0)は 50°C を超えると三方晶 Se の結晶へ相転移することが報告されている[102]。このことから NT-I 株が還元した直後の Se(0)は非晶質であり、 60°C の乾燥中に非晶質から三方晶へと相転移したと推定する。

最後に洗浄によってバイオセレンの精製を試みた。どの溶媒を使った洗浄工程でも 40°C で乾燥した場合にはバイオセレンは非晶質の赤色を呈した (図 3-7)。各洗浄工程で乾燥したバイオセレンの元素分析結果を示す (表 3-2)。ICP-AES で測定できる元素の重量をバイオセレン重量から差し引いた値を「上記以外の元素」と表記した。これは主に ICP-AES で測定できない微生物由来の有機成分や残存する水分だと推測される。「上記以外の元素」の値は洗浄工程が進むごとに徐々に減少していき、塩酸洗浄後には顕著に減少した。これは塩酸によって NT-I 株細胞が破壊され細胞内部の有機成分や水分が塩酸液中に移動し、エタノール洗浄によって除去されたためだと考える。バイオセレン中のセレンは洗浄工程が進むにつれて濃度が高くなり、塩酸洗浄後には最大 90%までセレンを濃縮できた。しかし塩酸

洗浄後でもバイオセレン中には主に ICP-AES で測定できない成分が夾雑元素として含まれ、完全に除去できなかった。元素態セレンは結晶質の違いによって販売の末端価格はさほど変わらないが（参考価格：アモルファス元素態セレン 50g: 25,800 円、結晶元素態セレン 50g: 25,500 円）、高純度になるにつれて高価格になる（参考価格：元素態セレン 99.5% 100g: 27,200 円、元素態セレン 99.99% 100g: 51,000 円）。市販の元素態セレンの純度は最低でも 99%以上であるため、再資源化するためには 99%以上に純度を高めることが必要である。バイオセレンは大部分を微生物由来の有機物が占めている。有機物は酸素下で完全燃焼させることで水と二酸化炭素になるため、簡単にバイオセレンから有機物を除去し、セレンの高純度化が期待できる。このことからバイオセレン自体には資源価値が少ないと思われるが、バイオセレンからセレンを揮発分離し高純度に抽出精製できれば、再資源化の可能性が高いと推測される。

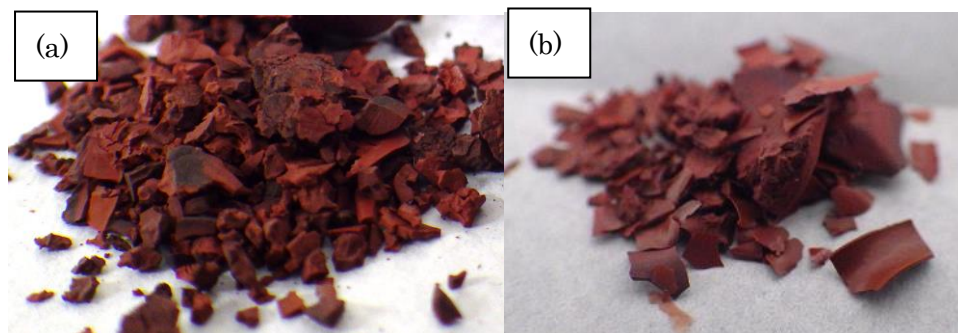


図 3-7 バイオセレン写真 (a) 水洗浄 (b) 塩酸洗浄後

表 3-2 洗浄による精製効果測定（単位：wt%、N.D.:Not Determined）

	洗浄なし	水洗浄	エタノール洗浄	塩酸洗浄×3後 エタノール洗浄×3
Ca	0.1	0.1	0.1	N.D.
K	0.5	0.1	0.1	N.D.
Mg	0.1	0.1	0.1	N.D.
Na	1	0.2	0.1	N.D.
P	0.9	1.1	0.6	0.3
S	0.3	0.4	0.3	1
Se	13	15	16	90
上記以外の元素	84.1	83.0	82.7	8.7

3.4 要約

本章ではNT-I株のセレノオキシアニオン還元の影響因子の影響についての知見を得るために、5 L ジャーファーメンターによるセレノオキシアニオン還元試験をおこなった。

このセレノオキシアニオン還元試験によって NT-I 株は温度 30~42°C、pH6.0~9.0、攪拌速度 100~300rpm、通気量 0~5 L·min⁻¹ という幅広い培養条件で廃水中のセレノオキシアニオンを還元可能なことが明らかになった。そして通気条件がセレノオキシアニオン還元に大きな影響を及ぼすことが示唆された。通気はセレン酸の還元を阻害し亜セレン酸の還元を活性化すること、通気なしでは亜セレン酸の還元はほとんど認められず阻害されることが示唆された。

また本試験結果によってセレン酸最大還元速度および亜セレン酸最大還元速度は $8.8 \times 10^{-16} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ (38°C、pH 7.5、120rpm、0 L·min⁻¹) および $8.8 \times 10^{-17} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ (38°C、pH 9.0、250rpm、1 L·min⁻¹) と算出できた。この最大還元速度は初期培養条件と比較してセレン酸還元速度は 2.8 倍、亜セレン酸還元速度は 10 倍に増大した。亜セレン酸還元速度はセレン酸還元速度に比べて 10 倍程度遅いため、NT-I 株のセレノオキシアニオン還元における律速反応だと考える。したがって NT-I 株のセレノオキシアニオン還元の最適培養条件は、亜セレン酸還元に重点を置いて培養温度 38°C、pH 9.0、および攪拌速度 250rpm、通気量 1L·min⁻¹ と定義した。セレノオキシアニオン還元最適培養条件にてセレン酸還元試験をおこなったところ、初期培養条件と比較してセレノオキシアニオン還元所要時間を 16 時間短縮することに成功した。

次いで模擬廃水から回収した微生物を含むセレン (バイオセレン) の資源価値を調べるために、バイオセレンを回収し定性定量した。非晶質の赤色バイオセレンは平均 Se 含有率 11% であり、三方晶である黒色バイオセレンは平均 Se 含有率 14% であった。塩酸による洗浄によってバイオセレン中のセレンを 90% まで濃縮できたが、有機物を完全に除去することができなかった。バイオセレンのままでは資源価値は少ないが、バイオセレン中の有機物を焼却することで簡単にセレンを製錬し資源価値を向上できると推測される。

本章の試験結果から幅広い培養条件でセレノオキシアニオン還元が可能なることから、精密な培養制御は不要であり処理装置も簡便なものになると推察される。また回収物からセレン再資源化も実現可能性が高いことが明らかになった。本研究は微生物処理によるセレン処理実用化を考える上での重要な知見となると考えた。

第4章 セレン酸還元細菌 NT-I 株の気化セレン合成反応の特徴づけ

4.1 緒言

第2章において、NT-I 株はセレン揮発化生物の中でも高い能力を持ち、セレン含有廃水からの揮発化回収プロセスに適用する菌株として有望であると考えた。一方で、揮発化回収プロセス実用化のためには培養容量のスケールアップや温度、pH、攪拌速度などの培養条件因子の影響についての知見が必要である。そこで、本章では5L ジャーファーマンターを用いたセレン還元試験によって、セレン揮発化還元最適条件を決定することを目的として研究を行った。

4.2 方法

4.2.1 メチル化セレン定性試験方法

NT-I 株のプレート培地から1白金耳コロニーをかきとり、100 mL 容量のフラスコ中の50 mL の TSB 培地に植菌し 37°C、24 時間好氣的に振盪培養した。この培養液を、同様の TSB 培地に 1 mL 植菌し、同条件で 12 時間培養し、前培養液とした。前培養液から遠心分離(5,000 rpm, 20 分間, 4 °C) にて菌体を得た。菌体をオートクレーブ滅菌した生理食塩水適当量で 2 回洗浄し、OD₆₆₀= 1 になるように菌体を生理食塩水で再懸濁した。100 mL 容量バイアル瓶中に 10mL の TSB 培地を加え、セレン濃度換算で終濃度 0.5mM となるように基質として赤色バイオセレンもしくはセレン酸を添加した。そこに再懸濁溶液を 100 μ L 添加してブチルゴムで栓をし、37°C、12 時間振盪培養した。培養 12 時間後にマイクログリンジを用いて気相試料を 250 μ L 採取し GC-MS で気相成分の定性分析を行った。

4.2.2 ジャーファーマンターを用いた DMDS_e 合成最適条件の決定

バイオセレン (赤色、黒色) と市販の非晶質元素態セレン(Alfa Aesar, Massachusetts, U.S.A.)および結晶質元素態セレン(ナカライテスク)を DMDS_e 合成基質として用いた。前培養液をジャーファーマンター中の TSB に植菌し、その後培養温度 38°C、pH 9.0、攪拌速度 250rpm、通気量 1 L \cdot min⁻¹ で培養を開始した。12 時間の培養後、最終 Se 濃度が 0.5mM になるように基質を添加し、温度、pH、攪拌速度、通気速度などの様々な培養因子制御を行った。NT-I 株により合成された DMDS_e を回収するために、ジャーファーマンターの排気口を HNO₃ 液を含む 250mL 培地瓶に接続した。DMDS_e は HNO₃ ではメチルセレン酸に変換されるため[103]、HNO₃ にて捕捉できる装置を作製した。HNO₃ 液中の Se 濃度から DMDS_e 合成速度(mol \cdot h⁻¹ \cdot cell⁻¹)を算出した。

4.2.3 GC-MS による気相中セレン種の定性

気相の定性分析にはガスクロマトグラフ質量分析装置(GC-MS) (FocusGC DSQ II : サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社)を使用した。GC カラムは DB-624(アジレ

ントテクノロジー株式会社)を用いた。カラムの長さは 30 m、内径は 0.25 mm、樹脂肉厚は 1.4 μm である。測定はスプリットレスモードで測定した。ヘリウムガスの流量は 1.0 mL \cdot min $^{-1}$ とした。昇温プログラムは 40 $^{\circ}\text{C}$ を 5 分間保持し、10 $^{\circ}\text{C}\cdot$ min $^{-1}$ の速度で 130 $^{\circ}\text{C}$ まで、130 $^{\circ}\text{C}$ から 240 $^{\circ}\text{C}$ まで 20 $^{\circ}\text{C}\cdot$ min $^{-1}$ で昇温させ、240 $^{\circ}\text{C}$ で 1.5 分間保持させた。試料注入は 250 μL とした。DMSe, DMDS, DMDS の標準液は東京化成工業株式会社の製品を用いた。

4.3 結果と考察

4.3.1 メチル化セレン定性

バイオセレンを試験の基質として使用する前に、赤色バイオセレンのみを反応系に添加して揮発化セレンが合成されるどうかを調べた。鏡らの報告同様に NT-I 株はセレン酸、亜セレン酸から DMSe, DMDS を合成した (図 4-1) [65]。赤色バイオセレンを NT-I 株と同時に培養した場合も同様に DMDS、少量 DMSe の存在が見られた。一方で NT-I 株を添加しない条件で赤色バイオセレンのみを TSB 培地に添加した場合、DMDS は検出されなかった。この試験結果から赤色バイオセレンに含まれる NT-I 株は死滅しており、DMDS 合成に影響を及ぼさないことが示唆された。したがってこれ以降の実験基質として赤色バイオセレンを引き続き用いた。

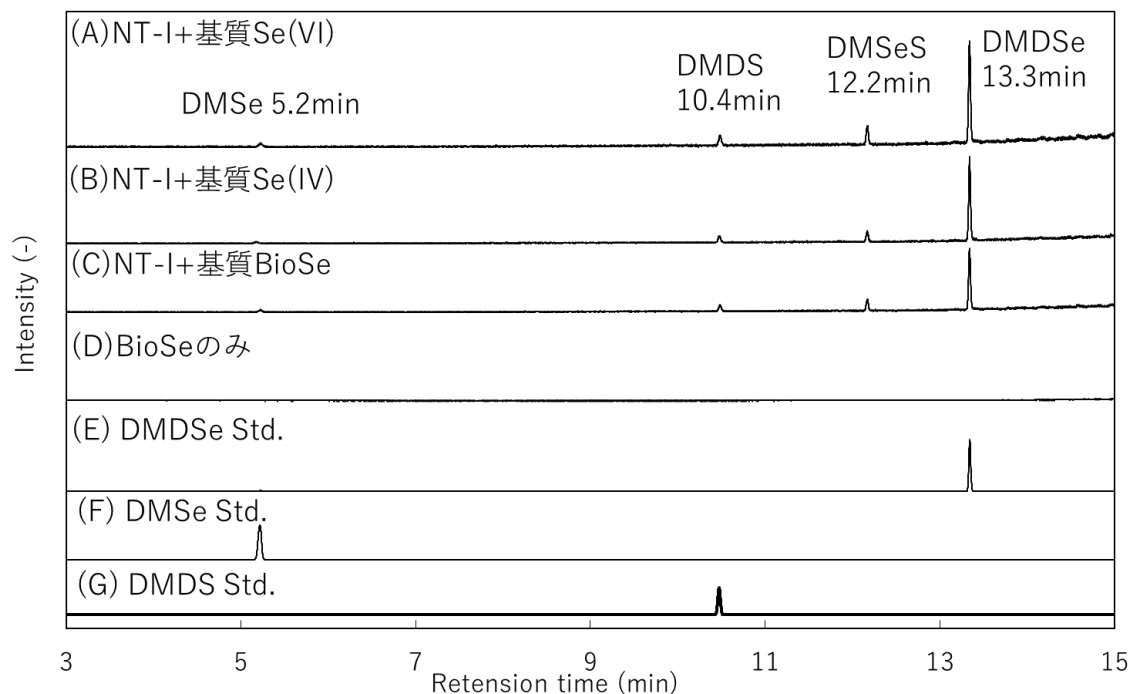


図 4-1 GC-MS スペクトル(A)NT-I 株+Se(VI), (B)NT-I+Se(IV), (C)NT-I+赤色バイオセレン, (D)赤色バイオセレンのみ, (E)DMDS 標準液, (F)DMSe 標準液, (G)DMDS 標準液

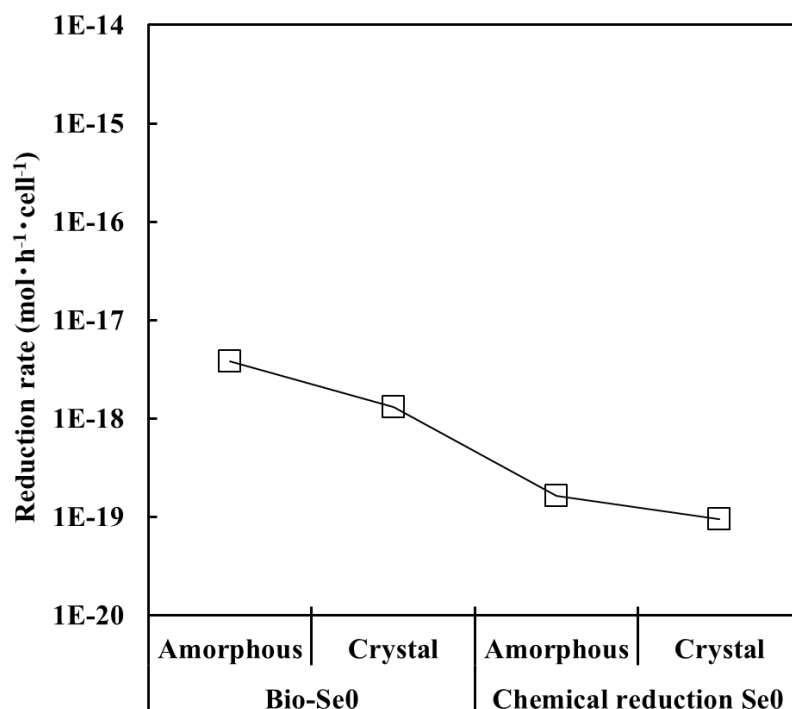


図 4-2 セレン結晶構造の違いにおける DMDSe 合成速度の比較

4.3.2 ジャーフェーマンターを用いた DMDSe 合成最適条件の決定

元素態セレンは結晶と非晶質が存在し、その結晶構造は生成時の温度によって異なる [102]。非晶質元素態セレンは温度が 50°C を超えると三方 Se の結晶を形成する相転移を起こすことが報告されている。バイオセレンは 50°C 以下の微生物培養から得られるので、主として非晶質である。回収したバイオセレンを 60°C で乾燥することで、非晶質から三方晶系への相転移が観察された。今までにセレンの結晶構造と揮発化セレン合成速度に関する知見がなかったため、Se (0) の結晶構造の違いが DMDSe の合成速度に及ぼす影響を調べた(図 4-2)。

セレノオキシアニオン還元(pH 9.0、38°C、250rpm、1 L·min⁻¹)の最適培養条件下での赤色バイオセレン(非晶質)からの DMDSe の合成速度は $3.8 \times 10^{-18} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ であった。黒色バイオセレン(結晶)からの DMDSe の合成速度は $1.3 \times 10^{-18} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ であり赤色バイオセレンを基質として使用した場合よりも合成速度は減少した。一方で非晶質赤色バイオセレンと非晶質の市販元素態セレンとを比較すると、非晶質の市販元素態セレンの DMDSe 合成速度は $1.6 \times 10^{-19} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ であり、非晶質バイオセレンと比較して減少した。つまり結晶セレンと比較して、非晶質セレンは DMDSe の合成速度に好影響を及ぼすことが示唆された。さらに、バイオセレンは市販の元素態セレンと比較して DMDSe の合成速度が速かったことから、バイオセレンは DMDSe の合成速度を活性化する化合物を含む可能性が示唆された。GC-MS 分析によって合成された気化セレンを定性したところ、

どの基質を使用しても主に DMDS_{Se} が合成されることが示された(data not shown)。

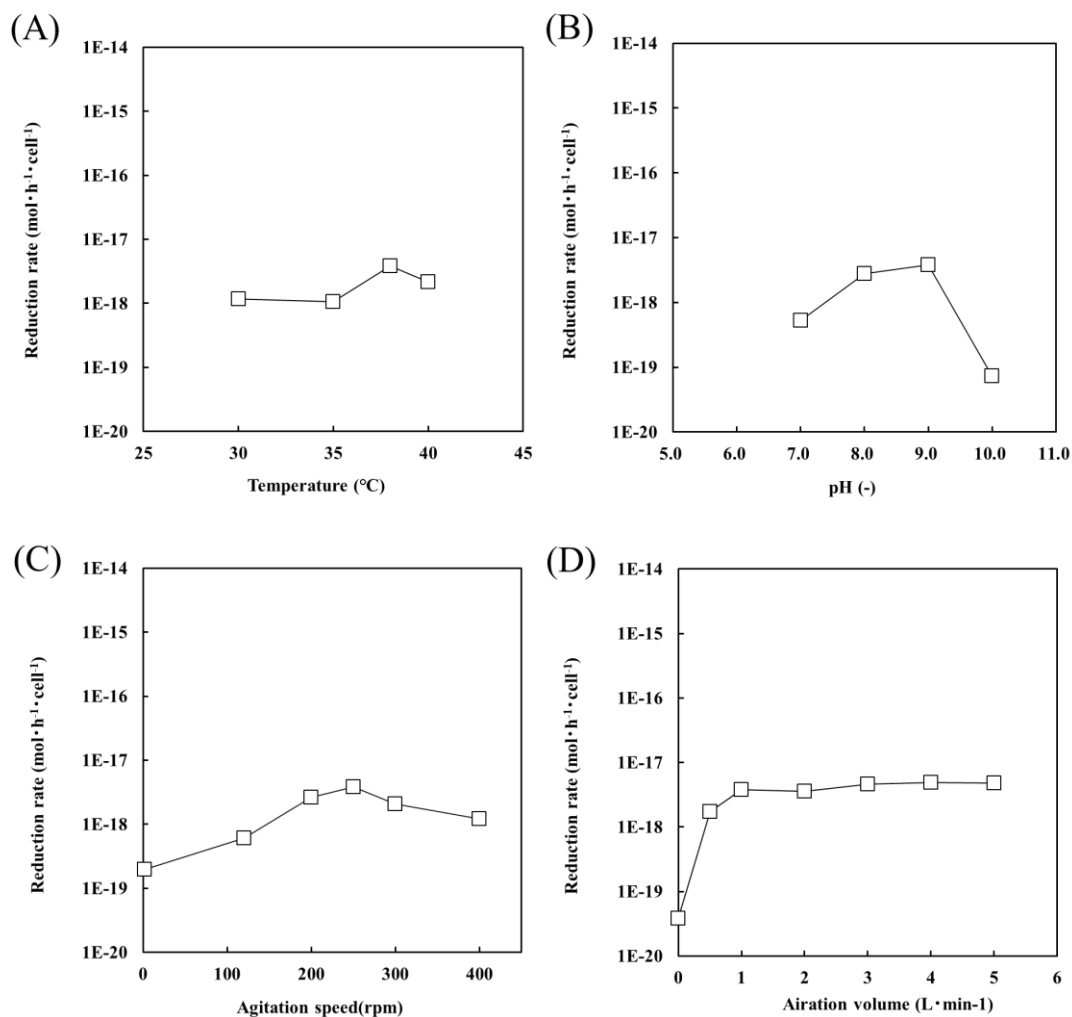


図 4-3 赤色バイオセレンを基質として DMDS_{Se} 合成速度比較

(A) 温度の影響(B) pH の影響 (C) 攪拌速度の影響(D)通気量の影響

次に NT-I 株の DMDS_{Se} 合成の最適条件を決定するために、非晶質の赤色バイオセレンを基質として使用し、様々な温度、pH、攪拌速度、および通気速度を制御して還元試験をおこなった (図 4-3)。セレノオキシアニオン還元($3.8 \times 10^{-18} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$)の最適培養条件下で DMDS_{Se} の基本合成速度を計算した。DMDS_{Se} の合成速度は 38°C(図 4-3A)、pH 9.0(図 4-3B)、250rpm (図 4-3C)で最高のピーク値を示した。0~5 L·min⁻¹の通気速度を調べたところ、DMDS_{Se} の合成速度は 0 L·min⁻¹($3.8 \times 10^{-20} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$)で最小であったが、1~5 L·min⁻¹で平らなピークとなり、特に 4 L·min⁻¹で $4.9 \times 10^{-18} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ の最大速度に達した(図 4-3D)。これらの結果が示すように、亜セレン酸還元と同様に、DMDS_{Se} の合成は嫌気条件下で阻害された。したがって NT-I 株の揮発化還元の最適培養条件は、亜セレン酸還元重点を置いて培養温度 38°C、pH 9.0、および攪拌速度 250rpm、通気量 1L·min⁻¹

と決定した。

NT-I 株の DMDSe 合成は通気がないと阻害される。つまり NT-I 株のセレン気化量は通気によって制御可能であり、廃水からセレンを回収する際に固化回収と気化回収を通気の有無によって制御できることが示唆された。DMDSe の合成が嫌気条件で阻害される原因として合成酵素の遺伝子発現の抑制などが考えられるが、知見は得られていない。鏡らの報告では、NT-I 株は最大のセレン気化速度を有していることが分かったが、今回ジャーファーマンターを利用した培養条件の最適化を試験することにより、 $4.9 \times 10^{-18} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ という最大速度に達することができた。

4.4 要約

本章では NT-I 株のセレン揮発化の培養条件因子の影響についての知見を得るためにジャーファーマンターによる還元試験を行った。

NT-I 株はセレンの結晶構造に関係なく揮発化できることを世界で初めて明らかにした。中でも非晶質のバイオセレンを基質にしたとき、揮発化速度が高いことを発見した。さらに 5L ジャーを使用した培養条件検討試験によって NT-I 株は温度 $30 \sim 42^\circ\text{C}$ 、pH $6.0 \sim 9.0$ 、攪拌速度 $100 \sim 300\text{rpm}$ 、通気量 $1 \sim 5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ という幅広い培養条件で廃水中のセレンを揮発化可能なことが明らかになった。さらにセレン揮発化最大還元速度 $8.8 \times 10^{-17} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ (38°C 、pH 9.0 、 50rpm 、 $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) と算出できた。NT-I 株の揮発化還元の最適培養条件は、亜セレン酸還元に重点を置いて培養温度 38°C 、pH 9.0 、および攪拌速度 250rpm 、通気量 $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ と決定した。本章の試験結果からセレン揮発化速度は知りうる限り、NT-I 株は報告されているどの生物よりも速いことが明らかになった。さらにセレン揮発化を通気によって制御できる可能性が示されたことから、セレン固化回収・気化回収装置は培養装置を転用することができる。

本研究結果は微生物処理によるセレン回収実用化を考える上での重要な知見となると考えた。

第5章 固化セレン回収、資源化プロセス開発

5.1 緒言

第4章においてセレン気化反応は通気を止めると阻害されることを明らかにした。本結果から、廃水からのセレン固化回収に通気制御することを着想した(図5-1)。すなわち予めNT-I株を培養したところで通気を止め、そこに濃縮廃水を添加して処理する方法である(図5-2)。廃水からバイオセレンを回収した後に、バイオセレンからセレンを抽出製錬することで再資源化可能なプロセスを考案した。そこで本章では通気制御による廃水からのセレン固化回収と、回収物の再資源化を試みた。

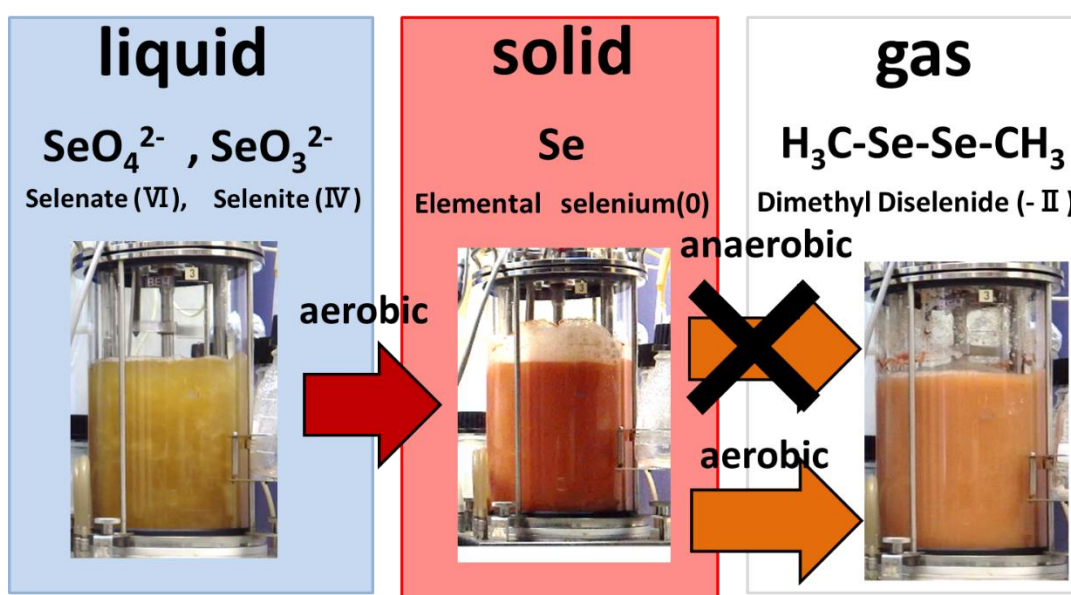


図5-1 通気制御によるセレン気化阻害

5.2 方法

5.2.1 模擬廃水および実廃水からのセレン固化回収

前章同様の操作にてジャーファーメンターを用意した。次いで、30mLの細胞懸濁液をジャーファーメンターに植菌し培養温度 38°C 、pH9.0、攪拌速度 120rpm、通気量 $1\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ で12時間培養をおこなった。培養開始から12時間後に通気量を $0\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ に変更し、セレン酸もしくは実廃水を終濃度 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ となるように添加し培養を継続した。培養終了後は遠心分離によってバイオセレンを回収した。対照試験は通気量を $1\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ のままセレン酸を終濃度 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ となるように添加し培養を継続した。

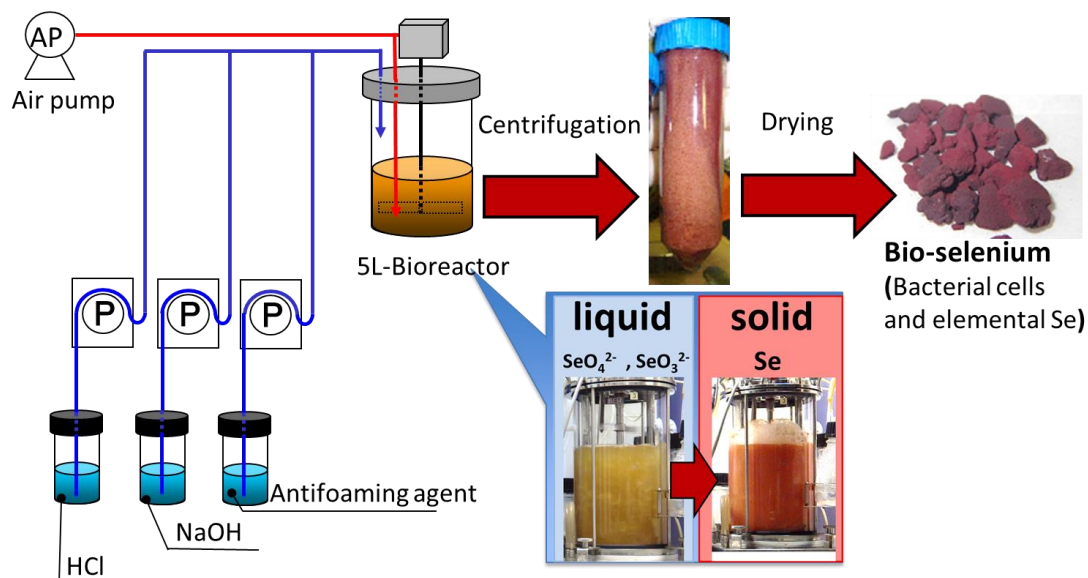


図 5-2 微生物処理リアクター概説

5.2.2 バイオセレンの酸化焙焼

バイオセレンの酸化焙焼には石英反応管を炉心管としたカンタル炉(ARF-30KC, (株)アサヒ理化製作所)を用いた。炉心管の上部は、横穴を設けた丸底の石英管が炉心管内部まで突き出た形になっており、上方より丸底部に落下させた試料が焙焼ガスと効率的に反応するようにした。流量 $50\sim 200\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ の焙焼ガスの炉心管胴部の反応容積での滞留時間が 1 分以上となるように炉心管内容積をとってあり、また石英ウールを充填することで焙焼反応ガスの偏流を防いだ。炉内温度は、炉心管の中央の高さに熱電対を横から設置し、制御した。炉心管大径部の上下端の温度は、中央の熱電対の指示温度より $15\sim 20^\circ\text{C}$ 低温であった。焙焼ガスの流量はマスフローメーターで制御した。炉心管の下小径部は 15 cm の長さであり、固体 SeO_2 の凝縮を促すためにリボンヒーターで 50°C 以上に加熱した。気体の SeO_2 の捕集液として、炉心管から下流側にケラミフィルターを備えた希硝酸溶液 30 mL を入れたガス洗浄瓶を 2 個配置した。炉心管とガス洗浄瓶の間はテフロンチューブで接続した。酸化焙焼用の試料はバイオセレンを粉砕して十分に攪拌して得た粉末約 10 mg を直径 3 mm のペレット状に成形したものをを用いた。酸化焙焼は $500\sim 700^\circ\text{C}$ に制御した炉心管内に焙焼ガスとして純酸素もしくは乾燥空気を $50\sim 200\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ の流量で流通しながら、ペレット試料を 1 分置きに 10 個炉内に落下させることで行った。酸化焙焼条件を表 5-1 に示す。所定量の試料が落下してからそのまま 5 分保持した後に、焙焼ガスを流通したまま炉を冷却した。冷却後、炉心管下部を切断して管内の凝縮物を純水に溶解した溶液(HT precipitation)、テフロンチューブ内に繰り返し純水を通してチューブ内の凝縮物を溶解した溶液(LT precipitation)、1 個目、2 個目の捕集液(Absorption liquid 1, 2)中の Se 濃度を ICP-AES を用いて定量分析した。

表 5-1 酸化焙焼条件と二酸化セレンの回収率

Experimental No.	Bio-selenium Color	Roasting Gas	Flow Rate, $V / \text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$	Roasting Temperature, $T / ^\circ\text{C}$	Selectivity of recovery of SeO_2 , %
No.1	Red	Oxygen	50	700	95.6
No.2	Red	Oxygen	100	700	91.1
No.3	Red	Oxygen	200	700	78.2
No.4	Red	Dried air	50	700	72
No.5	Red	Dried air	100	700	88.5
No.6	Red	Dried air	200	700	84.9
No.7	Red	Oxygen	100	500	91.6
No.8	Red	Oxygen	100	600	91.6
No.9	Red	Dried air	100	500	54.4
No.10	Black	Oxygen	50	700	96.7
No.11	Black	Oxygen	100	700	87.7
No.12	Black	Oxygen	200	700	81.8

5.3 結果と考察

5.3.1 通気量 $0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ でのセレン酸還元試験

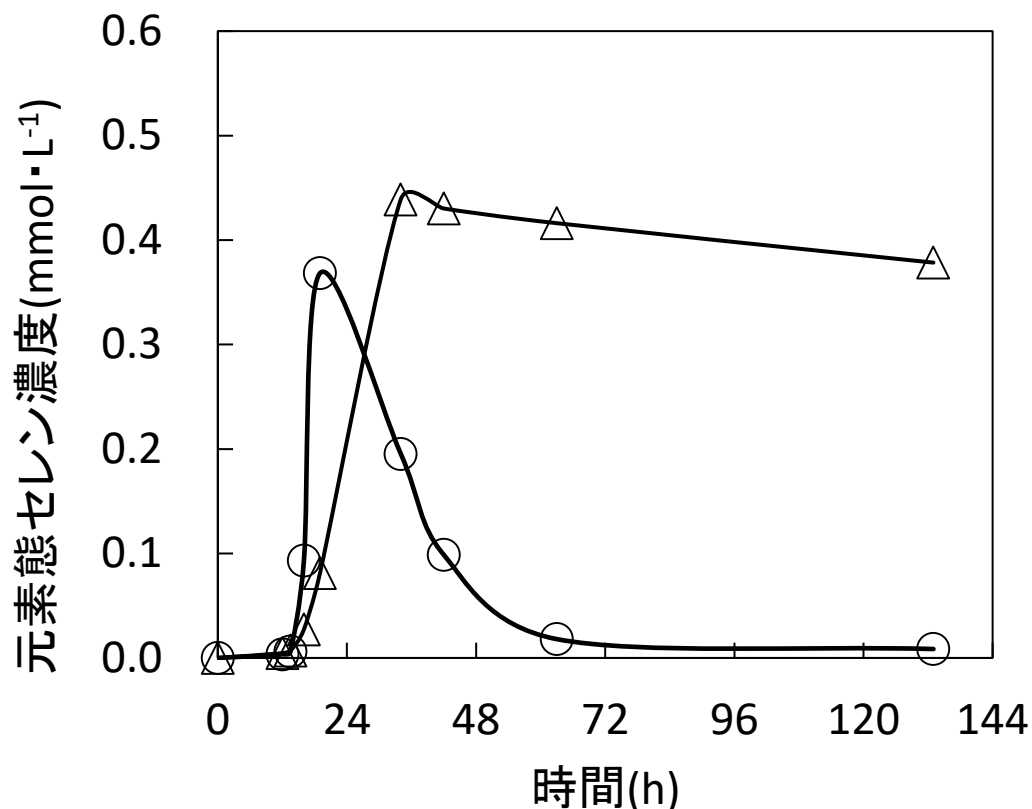


図 5-3 元素態セレン減少速度における通気の影響 ○：通気継続、△：通気 $0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$

セレノオキシアニオン還元最適条件で培養をおこなうと生産された元素態セレンは速やかに DMDSe に還元される。セレンを固化回収するために、セレノオキシアニオンを元素態セレンまでは還元するが、元素態セレンの還元は阻止できる培養条件を検討した。

培養温度 38°C 、 $\text{pH}9.0$ 、攪拌速度 120rpm 、通気量 $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ の培養条件で 12 h 培養を行った後、つまり NT-I 株を完全増殖させた後、セレン酸を添加した。通気下で培養を続けた場合と、通気を停止して培養を続けた場合の元素態セレンの濃度を経時的に調べた (図 5-3)。図の横軸はセレン添加後の時間を、縦軸は元素態セレン濃度を示している。通気継続の培養では、セレン酸添加後から元素態セレンが急激に合成され、7 時間目で $0.37 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ の元素態セレンが生成した。その後、元素態セレンは急激に減少し、50 時間目ではほぼゼロになった。一方、セレン酸添加後に通気を停止した場合は、添加後 22 時間目で $0.44 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ の元素態セレンが生成した。その後元素態セレン濃度は 100 時間目まで $0.40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ とほぼ一定であった。元素態セレンの最大減少速度は、通気条件下で $1.2 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{h}^{-1}$ 、通気停止条件下で $1.1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{h}^{-1}$ であり、通気継続下では通気停止条件下の約 11 倍速かった。元素態セレンは、通気停止条件下で培養 22 時間目に $0.44 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ と最も濃度が高くな

り、この時点で回収作業をおこなうと 87.8%を固体として回収できる。以上の結果を利用してセレンの固化回収方法を考案した。セレンオキシアニオン還元培養条件で培養して NT-I 株菌体を十分に増殖させ、培養開始から 12 時間目に通気を止めた時点でセレン酸を添加し、元素態セレンに変換する方法をセレン固化回収方法とした。セレン固化回収条件は培養温度 38℃、pH9.0、攪拌速度 250rpm、培養開始から 12 時間後に通気量を 1 L・min⁻¹ から 0 L・min⁻¹に変更することとした。培養初め通気を停止した場合、菌体生育への影響が大きいこと、さらに亜セレン酸の還元も阻害されることが懸念されることから還元最適条件において菌体を 12 時間培養後、基質を添加することで固体セレン回収を行うこととした。

5.3.2 模擬廃水からのセレン固化回収

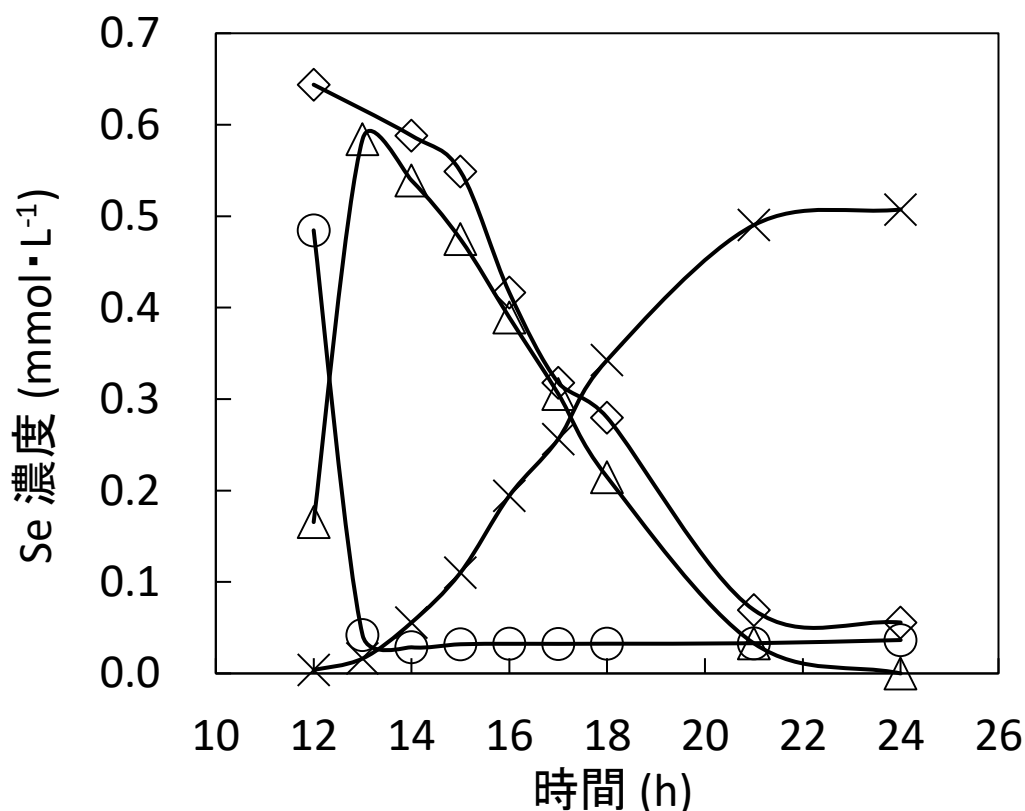


図 5-4 模擬廃水からのセレン固化回収法によるセレン濃度経時変化
○：セレン酸、△：亜セレン酸、◇：溶存セレン、×：元素態セレン

模擬廃水を用いたセレン固化回収実験での各セレンの経時変化を示した (図 5-4)。培養開始 12 時間目にセレン酸を添加すると 13 時間目には初期添加濃度のほぼ 100%のセレン酸が亜セレン酸へと還元された。15 時間目までに初期添加濃度の約 90%の亜セレン酸が元素態セレンに還元された。そして 22 時間目に元素態セレン量が最大となった。初期セレン濃度の 87.8%にあたる元素態セレンを汚泥として回収できた (表 5-2)。

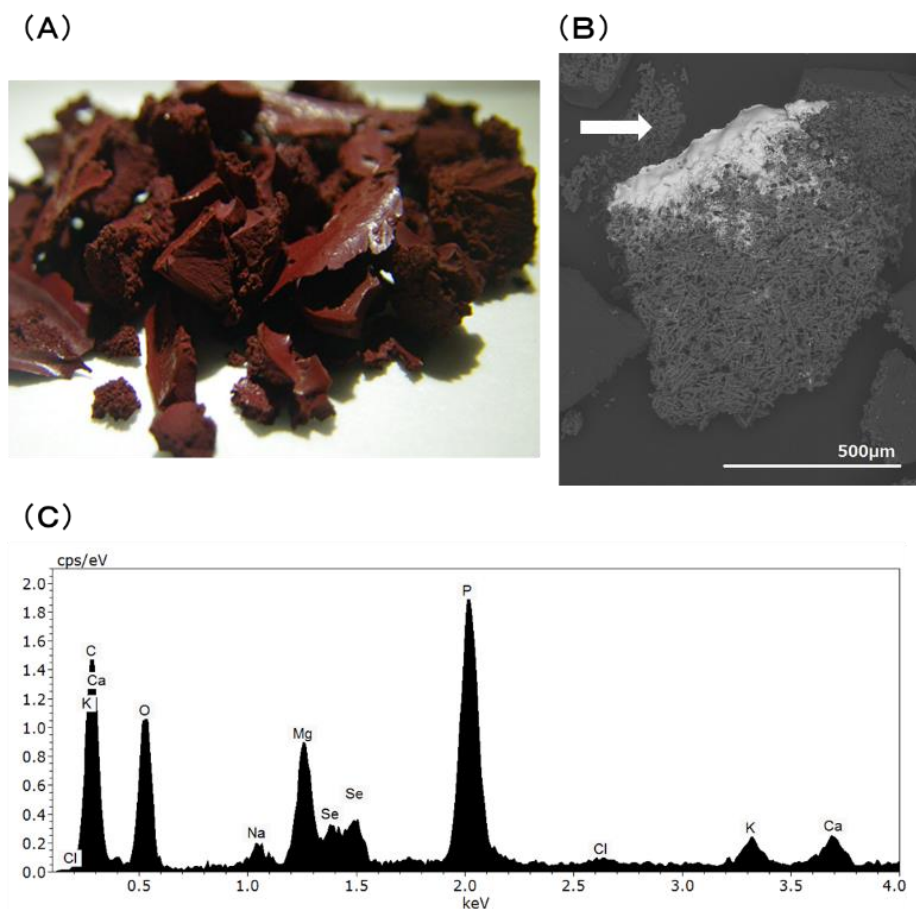


図 5-5 赤色元素態セレンの(A)写真、(B) SEM 観察画像、
(C) (B)の矢印部分における EDX スペクトル

汚泥を洗浄した後 ICP-AES によって構成元素の定性定量分析をおこなった。分析の結果、セレンが 2%、マグネシウムが 4%、カルシウムが 2%含まれていることがわかった (data not shown)。ICP-AES では測定できない炭素、酸素、窒素等の低元素分析のためエネルギー分散型 X 線分析で半定量分析をおこなった。本研究で得られた電子顕微鏡写真、元素分析の結果、EDX 元素スペクトルを示した (図 5-5(C))。バイオセレン全体にセレンが検出され、とくに白い部分にセレンが濃縮されていた (図 5-5(B))。EDX の半定量分析も ICP-AES による分析結果と一致しており、バイオセレンには平均 2%のセレンが含まれていた。模擬廃水の初期セレン濃度は 0.004%であるので、回収されたバイオセレンは約 500 倍濃縮したセレンであり、資源化の可能性が示唆された。

5.3.3 実廃水からの固化回収

次にセレン含有実廃水からのセレン気化回収、固化回収実験の結果を示す。可溶性セレンを $5.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 含む実廃水の提供を受けた。イオンクロマトグラフィーで定性定量分析をおこなったところ、セレン酸が約 85%、亜セレン酸が 15%の割合で混在していた。セレン以外にもケイ素やカルシウム、カリウムが含まれていた。実廃水を培地で希釈して、模擬廃水のセレン濃度に合わせて回収試験をおこなった。

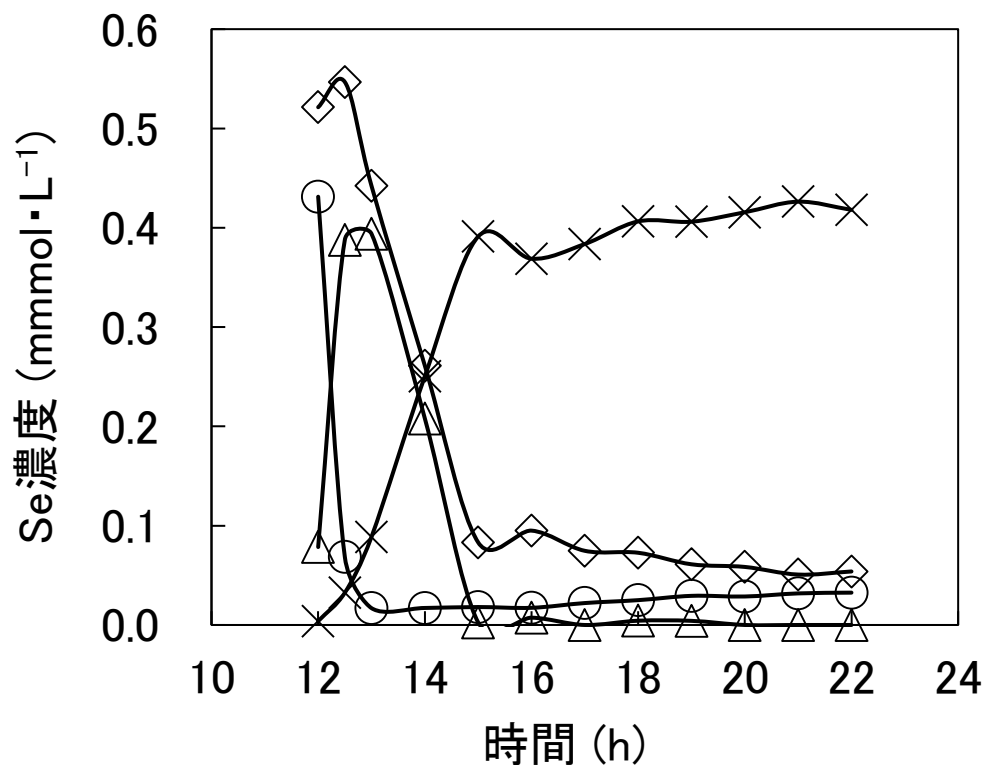


図 5-6 実廃水からのセレン固化回収法によるセレン濃度経時変化
○：セレン酸、△：亜セレン酸、◇：溶存セレン、×：元素態セレン

表 5-2 セレン固化回収時の各相割合 (N.D.: Not Determined)

サンプル	未回収		回収可能				回収物合計
	溶存セレン		元素態セレン		気化セレン		
	mM	%	mM	%	mM	%	
TSB培地	0.04	8.7	0.44	87.8	N.D.	N.D.	87.8
実廃水	0.06	8.6	0.51	78.8	N.D.	N.D.	78.8

実廃水からの固化回収試験の各セレンの経時変化を図 5-6 に示した。培養開始から 24 時

間で初期セレン濃度の 78.8%を元素態セレンとして回収することに成功した。模擬廃水では 22 時間で 87.8%の回収率が得られている。模擬廃水と比較すると回収率が若干低下したものの、実廃水を用いても高い回収率が得られた (表 5-2)。

実廃水では培養開始から 24 時間目には可溶性セレンが 8.6%も存在している。可溶性セレン、元素態セレン以外の 12.5%は NT-I 株が元素態セレンを還元して DMDSe を合成し、酸化したものと考えられる。実廃水はセレン酸と亜セレン酸が混在しているので各還元反応速度が異なり、単純に通気を止めるだけでは元素態セレンの還元を完全に抑制できていない。セレノオキシアニオンの混合比によって培養条件を変える等の工夫が必要だと推測される。

セレンの回収では、沈殿中の元素態セレン濃度が高いほどその後の製錬工程において有利である。本研究で回収された沈殿に対する元素態セレンの含有率は、今回の実験系では 3-4%になる。元素態セレンは遠心分離で溶液中から簡単に分離することができ、共沈などの物理化学的処理は必要ない。これまでに、好気性セレン酸還元微生物を用いて元素態セレンの回収を試みた報告はない。また、嫌気性セレン酸還元微生物を用いたセレン廃水処理が多く検討されているが、汚泥中の元素態セレン濃度を調べた例は少ない。嫌気性セレン酸還元微生物 *Thauera selenatis* による sludge-blanket reactor を用いたセレン廃水処理では、186 日間の運用で $0.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ で元素態セレンを含む汚泥が回収できる[104]。また、アクリルアミドゲルを用いて、嫌気性セレン酸還元細菌 *Sulfurospirillum barnesii* を固定した実験では、元素態セレンがゲル中に濃縮され 58 日間の培養で、汚泥中の Se 濃度は最大 0.11%であった[105]。単純に比較して、これらの元素態セレン濃度と比べ、NT-I 株により回収したバイオセレンは濃縮率が 12 倍以上高く資源価値も高いと推測される。

5.3.4 バイオセレンの酸化焙焼の熱力学計算

NT-I 株を利用して模擬廃水中の Se の浄化と濃縮分離を試み、廃水中の Se 濃度を低減するとともに有機物を主成分とし Se(0)を含有するバイオセレンを回収することに成功した。バイオセレンは Se(0)と微生物菌体由来の有機成分と Ca, K, Mg, Na, P, S 等の無機成分から構成される。バイオセレンを洗浄するだけでは十分に夾雑物を分離することができない (3 章 表 3-2)。そこでバイオセレンを酸化焙焼に供すると有機成分とともに Se は酸化揮発し、低温凝縮部にて焙焼後の反応ガスから固体の SeO_2 を凝縮分離できると考えられた。また、酸化揮発傾向や焙焼生成物の水溶解性や還元性の相違から無機成分の分離も期待できる。一方で有機成分と Se は競合酸化し、Se の酸化が不十分な場合には Se(0)が凝縮することが予想される。この場合 Se(0)として回収できる利点はあるが、有機成分も Se 同様に酸化不良によって黒鉛として凝縮するため Se(0)との分離が困難となることが予想される。バイオセレンからの Se 精製が達成できれば現在廃棄されている廃水中の Se を再資源化する一連のプロセスが構築できる。そこでバイオセレンの酸化焙焼による Se の分離回収の

基礎検討を行った。熱力学計算によってバイオセレンの焙焼条件を検討し、その結果を踏まえてバイオセレンの酸化焙焼を試み、Se の酸化挙動を調査した。加えて酸化焙焼と生成物の溶解・化学還元による Se の精製効果を確認した。

バイオセレンを酸化焙焼する際に有機成分と Se を十分に酸化揮発し、焙焼後の反応ガスから固体 SeO_2 を低温域の凝縮部にて凝縮分離可能とする条件を検討するため、熱力学計算ソフトウェア(FactSage6.4)を用いて相平衡計算を行った。ここでは、酸化焙焼温度 $500\sim 700^\circ\text{C}$ における焙焼条件と、焙焼ガス下流の低温域における SeO_2 の凝縮条件を検討した。本研究の酸化焙焼では固体 SeO_2 の凝縮は $150\sim 180^\circ\text{C}$ の温度帯で生じていたため凝縮部の相平衡計算温度を 150°C と設定した。酸化焙焼実験時には純酸素もしくは乾燥空気を焙焼ガスとして流通させて 10 mg のバイオセレンを 1 分ごとに焙焼反応に供した。炉内に 1 分の間に導入される焙焼ガスとバイオセレンが反応して平衡状態となることを仮定し、バイオセレンに対する適切な焙焼ガスの流量を予測するために 10 mg のバイオセレンと 25°C の $20\sim 200\text{ mL}$ の純酸素もしくは乾燥空気を投入物質とした 101.33 kPa における相平衡計算を行った。ここでは赤色バイオセレンの組成を参考とし、バイオセレン中の無機成分を除いた 84% の菌体由来の有機物(モル比 $\text{C}:\text{H}:\text{O}:\text{N}=5:7:2:1$ は経験的な値)そして 11% の Se と 1.8% の S で構成されるとし、Se, S 以外の無機成分は燃焼に寄与しないとした。酸化焙焼後の反応ガス組成の推算結果を図 5-7 に示す。ここで Se の蒸発成分の多数の多量体のうちで、蒸気圧の高い Se_2 と Se_5 のみを図示している。 700°C におけるバイオセレンと純酸素との反応では設定範囲の純酸素量で Se の蒸気種はほぼ SeO_2 のみであり、有機分・Se とともに酸化状態となることが予想された。純酸素量の増加に伴い、希釈効果で他の成分の蒸気圧は減少している。焙焼温度 700°C と 500°C では傾向は一致したため、図示を省略した。一方で乾燥空気の場合、乾燥空気量が 50 mL より小さい際には炭素・水素が優先的に酸化し、Se はセレン化水素 H_2Se と金属セレン Se_2 , Se_5 の還元状態で揮発することが予想された。乾燥空気量が 75 mL より大きい場合には有機分・Se とともに酸化揮発することが予想された。焙焼温度 500°C と 700°C では蒸気種の挙動は概ね一致しているが、 500°C の場合には乾燥空気量が 35 mL 以下で黒鉛の凝縮が予想された。実際に酸化焙焼の予備実験で乾燥空気量がこれに近い条件では黒鉛の発生が見られた。

次に焙焼温度 700°C の酸化焙焼後の反応ガスを $150^\circ\text{C}, 101.33\text{ kPa}$ にて平衡状態とした場合のガス組成と、生成凝縮相の推算結果を図 5-8 に示す。焙焼温度 700°C で酸化が十分に進行する純酸素を焙焼ガスとした場合には固体 SeO_2 と硫酸溶液の凝縮が予想された。一方、乾燥空気の場合には焙焼時に不十分な酸化が予想された 50 mL 以下では黒鉛と $\text{Se}(0)$ の凝縮が予測され、 75 mL 以上では固体 SeO_2 の凝縮が予想された。また固体 SeO_2 が焙焼ガスと平衡共存する場合、焙焼後の反応ガス中の SeO_2 分圧は飽和蒸気圧で一定となるため、導入した焙焼ガスの量が大きいほど Se の収率は低下する。例えば、 150°C で平衡反応に到達した後にそれ以下の温度帯では SeO_2 が凝縮しないことを仮定すると、純酸素量 $50, 100, 200\text{ mL}$ の際の Se の収率はそれぞれ約 $98, 97, 94\%$ となる。よって過剰な焙焼ガスに

よる収率低下も留意する必要がある。以上、相平衡計算では 10 mg のバイオセレンに対し乾燥空気 50 mL と 75 mL の間で酸化挙動が大きく異なることが予想された。

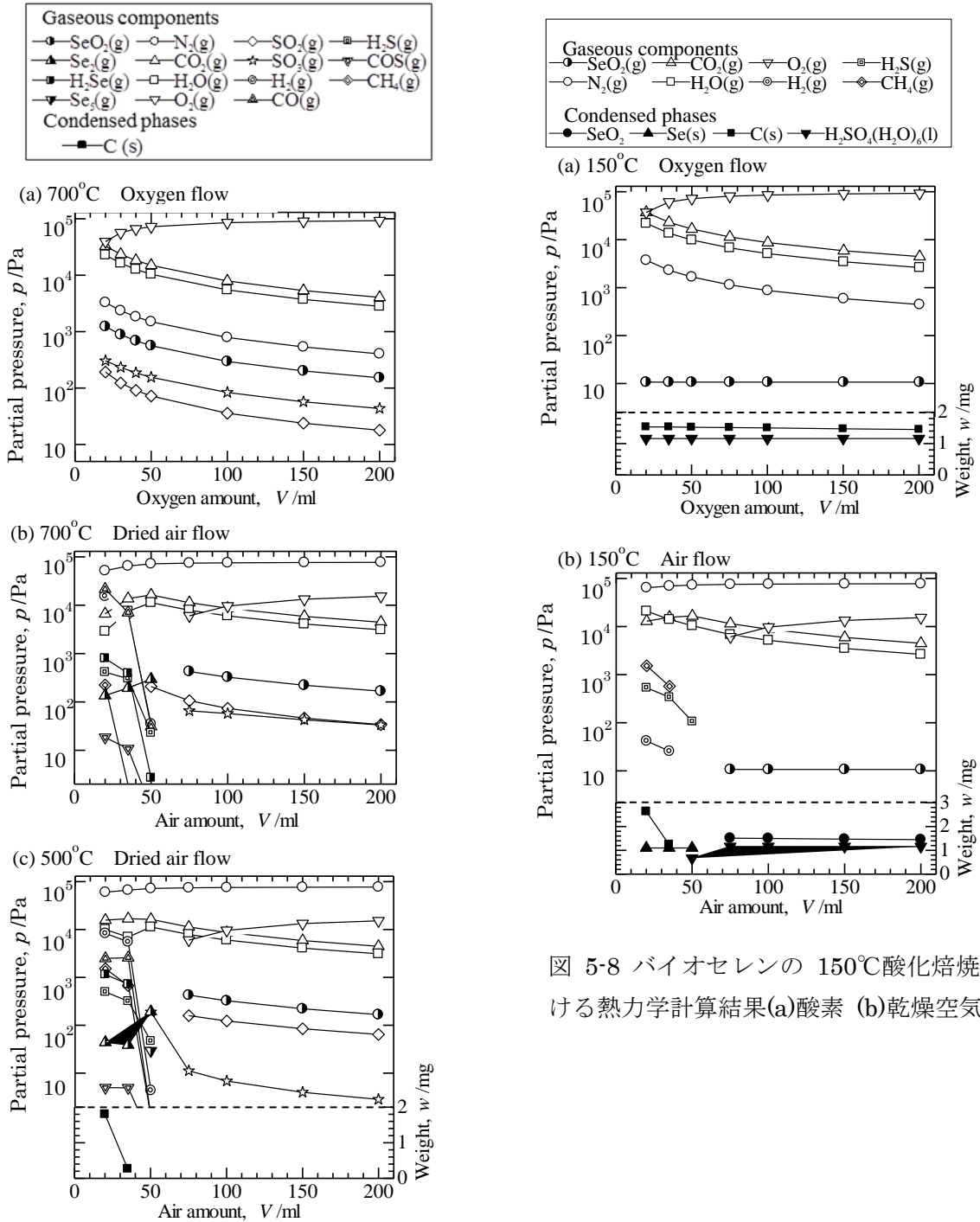


図 5-8 バイオセレンの 150°C酸化焙焼における熱力学計算結果(a)酸素 (b)乾燥空気

図 5-7 バイオセレンの酸化焙焼熱力学計算結果(a) 酸素 700° C (b) 乾燥空気 700° C 酸化焙焼 (c) 乾燥空気 500° C での酸化焙焼

5.3.5 焙焼ガス流量の影響

焙焼ガス流量がバイオセレンの燃焼挙動に及ぼす影響を調べるために、乾燥空気もしくは純酸素を $50\sim 200\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ で流通させて 700°C で図 5-9 に示す酸化焙焼試験機によって酸化焙焼を行った。図 5-10 に炉心管下部の凝縮状況を示す。乾燥空気 $100\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ では図 5-10(a)に示すような白色の針状結晶が $150\sim 180^\circ\text{C}$ の温度域で凝縮した。この白色針状結晶は潮解性が高く、HTprecipitation から高濃度で Se が検出されたことから固体 SeO_2 であると同定した。乾燥空気量 $200\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ の場合と純酸素を用いたいずれの条件でも、白色結晶の凝縮挙動は同様であった。一方で乾燥空気量 $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ の場合には $180\sim 200^\circ\text{C}$ の温度域では黒色の膜状物質が、 $150\sim 180^\circ\text{C}$ の温度域にて図 5-10 に示すような赤色の膜状物質と白色の物質が凝縮した。 $180\sim 200^\circ\text{C}$ の温度域で凝縮した黒色膜は酸に難溶であることから有機物由来の炭素であると推測された(図 5-10(b))。 $150\sim 180^\circ\text{C}$ で凝縮した白色の結晶は純水に容易に溶解し、赤色の凝縮膜は沸騰希硝酸に溶解し、ともに溶解液に Se が高濃度で検出されたことから、それぞれ固体の SeO_2 と $\text{Se}(0)$ であると同定した。よって、乾燥空気量 $100\sim 200\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ と純酸素量 $50\sim 200\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ で焙焼した場合には、バイオセレンの酸化揮発が十分に進行したと考えられる。赤色バイオセレン試料が落下した炉心管上部の丸底部には、試料質量に対して約 $2\sim 4\%$ の残渣があった。

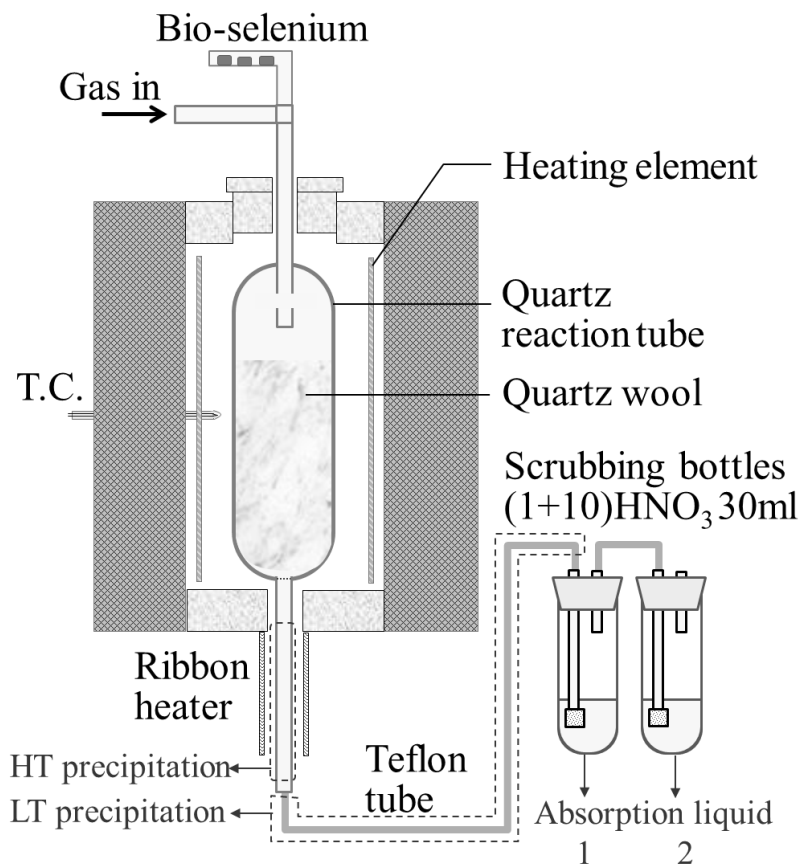


図 5-9 酸化焙焼試験機器 (T.C.は thermocouple を示す)

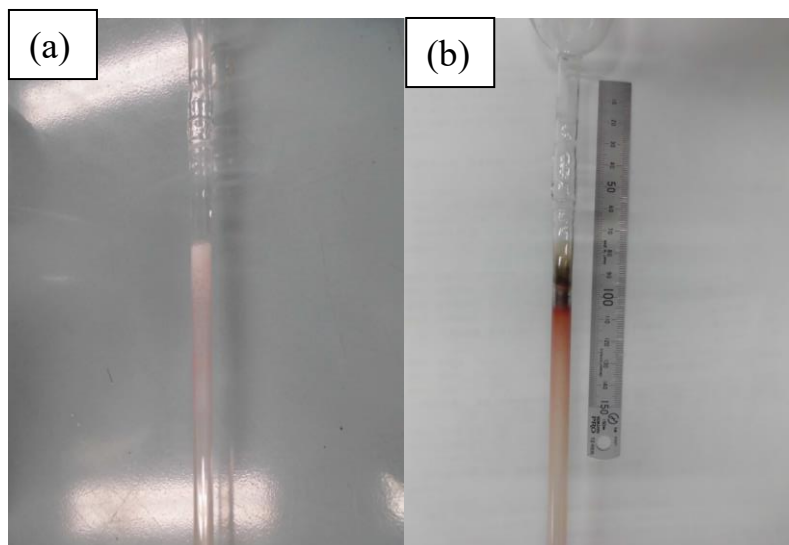


図 5-10 バイオセレンの 700°Cでの酸化焙焼後の写真
 (a)乾燥空気 100 mL・min⁻¹、(b) 乾燥空気 50 mL・min⁻¹.

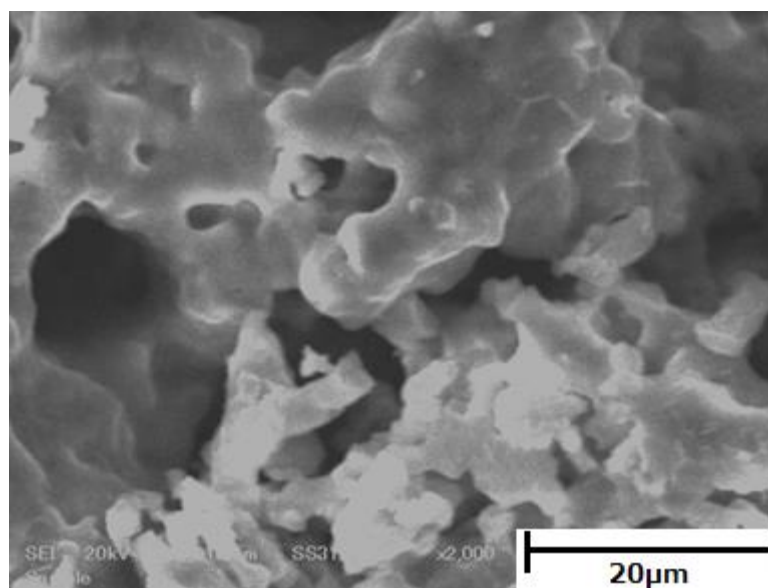


図 5-11 酸化焙焼機器のガス注入口底の残渣 SEM 画像

SEM 観察により残渣は 5 mm 以下の不定形粒子と一部それらが熔融相で覆われた性状であった(図 5-11)。EDX 分析により Na: 15~20, K: 3~10, P: 14~30, O: 40~60 mol%の組成であり、また Mg, Ca が 1~2 mol%検出された。さらに X 線回折測定により NaPO₄ や NaCaPO₄ の回折線と非晶質相に起因するブロードピークが見られた。したがってバイオセレン中の微生物菌体由来の P, アルカリ金属 Na, K, アルカリ土類金属 Ca が酸化焙焼時にリン酸化物の残渣として、Se と分離されることが示唆された。

赤色バイオセレンの酸化焙焼後の HT precipitation, LTprecipitation, と Absorption liquid 1 中の Se 収量の、酸化焙焼に供したバイオセレン試料質量に対する質量比を図 5-12 に示す。いずれの条件においても Absorption liquid 2 中の Se 収量は 0.1%以下であったため、図中では省略した。純酸素を焙焼ガスとした場合(図 5-12)、Se の総収量はほぼ一定でありバイオセレン中の Se 質量と概ね一致したことから、Se をほぼすべて凝縮物と Absorption liquid 1 で捕集できたことが分かった。焙焼ガス量が増加するにつれて 150~180°C の凝縮域での固体 SeO_2 の収量が減少し、捕集液での捕集量が増加した。これは 5.3 で予測したとおり、ガス流量が増加することでガス中の SeO_2 が下流に輸送されたことによると推測する。焙焼ガスを乾燥空気とした場合(図 5-12)、100, 200 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ の流量では、Se 収量はバイオセレン中の Se 質量と一致した。50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ の場合には予測されたとおり $\text{Se}(0)$ の凝縮が見られたため、凝縮物を硝酸で溶解し、その Se 収量を図 5-12 中に白色で示している。この実験では炉心管上部の小径部に赤色の凝縮物が生じており、焙焼ガス流量と焙焼ガス中の酸素量ともに不十分であったためにバイオセレンから Se_2 が揮発し、炉心管の下流のみならず上流にも輸送されて凝縮した結果、Se の総収量が著しく小さくなったと考えられる。赤色バイオセレンを酸化焙焼に供した実験の中で、純酸素 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ で焙焼した際に、Se の総収量のうちの固体 SeO_2 としての収率が最も大きく、96%であった(表 5-1)。5.3 の熱力学計算では 1 分間で炉内に投入されるバイオセレンに対して所定量の乾燥空気もしくは純酸素との閉鎖系での平衡反応を考えた。乾燥空気を 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ の流量で流通した場合に $\text{Se}(0)$ が凝縮したことから、700°C の平衡計算による乾燥空気 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ の反応での気体の Se_2 , H_2Se の生成が予測されたことが一致した。焙焼ガス中の酸素量がより大きい条件では Se の十分な酸化が進行したことから、相平衡計算結果で焙焼ガス中の Se 主成分が SeO_2 であることもよく一致した。よって、焙焼温度 700°C でのバイオセレン焙焼傾向を平衡計算により概ね予測可能であることが分かった。また同温度ではバイオセレンが平衡に近い状況で酸化すると考えられた。

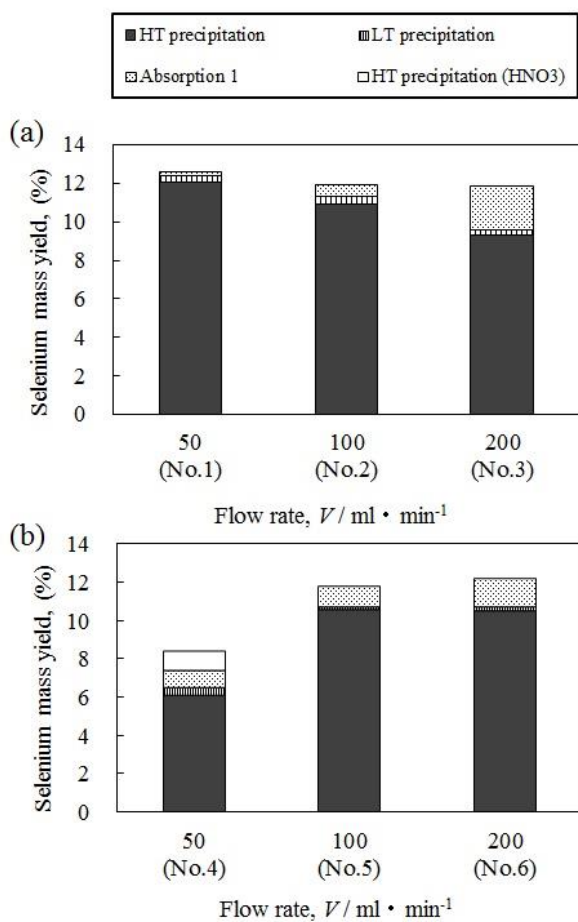


図 5-12 700 °C で酸化焙焼した際の赤色バイオセレン添加量における収量
(a) 酸素 (b) 乾燥空気

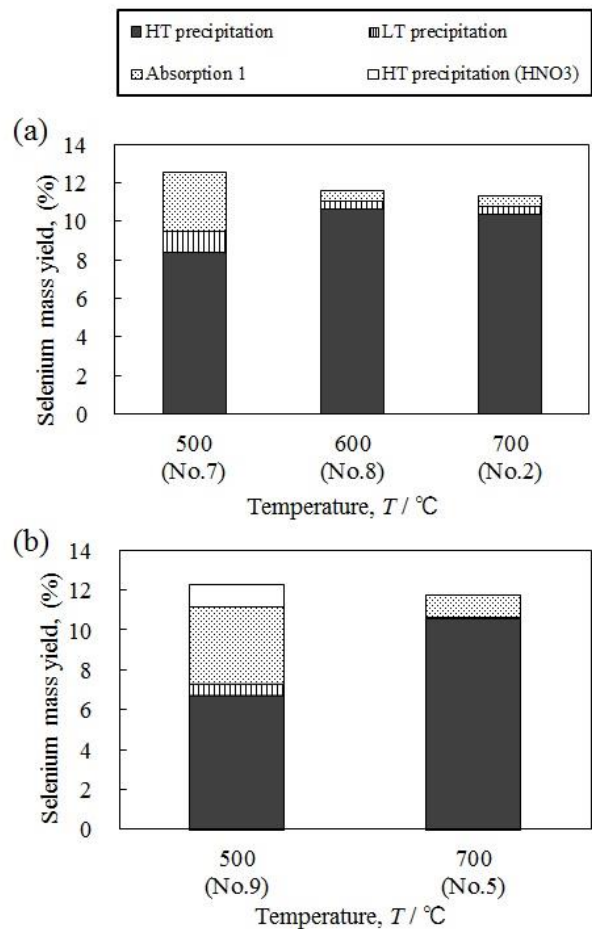


図 5-13 500-700 °C で酸化焙焼した際の赤色バイオセレン添加量における収量
(a) 酸素 (b) 乾燥空気

5.3.6 焙焼温度の影響

焙焼温度がバイオセレンの酸化焙焼に与える影響を調べるために純酸素もしくは乾燥空気を流量 $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ として、焙焼温度 $500 \sim 700^\circ\text{C}$ にて赤色バイオセレンの酸化焙焼を行った。酸化焙焼後の Se 収量を図 5-13 に示す。純酸素流通下では、いずれの温度でも Se をほぼすべて HT precipitation と Absorption liquid 1 で捕集できた。焙焼温度 500°C では $600, 700^\circ\text{C}$ に比べて固体 SeO_2 としての収量が低かった。 500°C では炉心管下部の凝縮物が僅かに赤色であり、焙焼温度が低いために十分な酸化に至らず、 SeO_2 以外のガス成分が生じ、下流の Absorption liquid1 で捕集されたと考えられる。乾燥空気を流通した場合には焙焼温度 500°C では固体 SeO_2 としての収量が著しく低く、また $\text{Se}(0)$ の凝縮物も見られた。 500°C でのバイオセレンの酸化焙焼は相平衡計算結果によると乾燥空気 $75 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 以上では Se と有機物が酸化揮発することが予想されたのに対し、実際の酸化焙焼

では酸化不良を生じ、特に乾燥空気の場合には $\text{Se}(0)$ の凝縮を生じるなど顕著に相違が見られた。

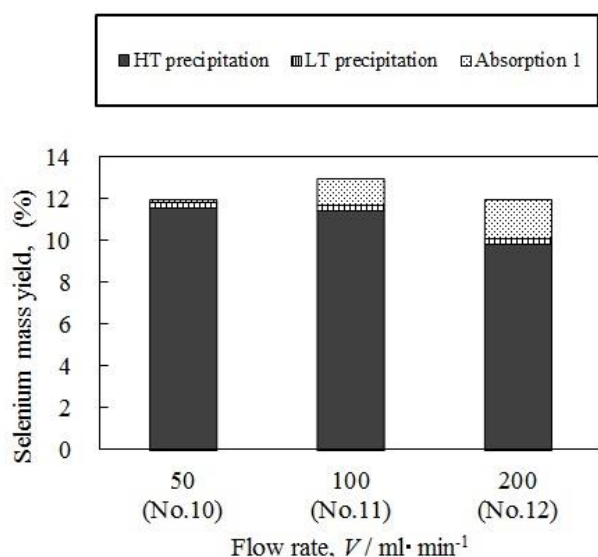


図 5-14 700 °C で酸化焙焼した際の黒色バイオセレン添加量における収量

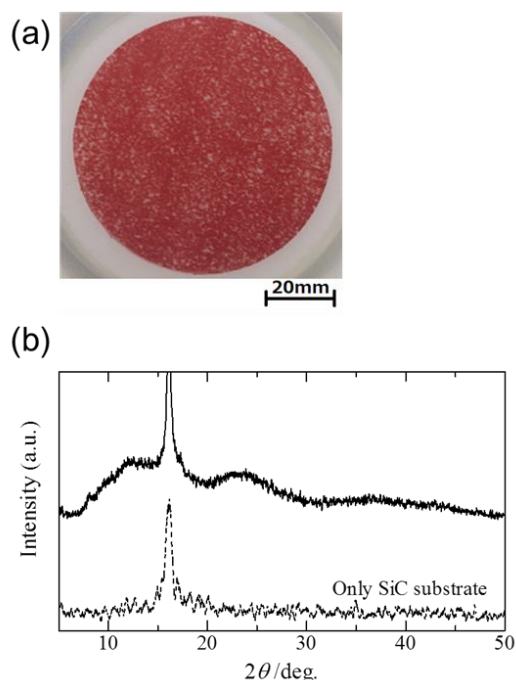


図 5-15 (a)二酸化セレンを還元して得られた元素態セレン写真 (b)その元素態セレンの XRD パターン

5.3.7 バイオセレン中セレンの相状態の酸化焙焼への影響

バイオセレンの乾燥温度の相違により、バイオセレン中の $\text{Se}(0)$ は異なる相をとる。この相の違いがバイオセレンの酸化焙焼時の Se の挙動に及ぼす影響を調査するために、黒色バイオセレンの酸素 $50\sim 200\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流通下における酸化焙焼を行った。酸化焙焼後の Se 収量を図 5-14 に示す。赤色バイオセレンと同様に酸化焙焼で SeO_2 の白色針状の凝縮物が生成した。赤色バイオセレンと同様に Se の総収量は概ね一定で、酸素流量の増加に伴い Absorption liquid 1 での Se 量が大きくなる傾向が見られた。さらにバイオセレンを酸化焙焼に供した一連の実験の中で黒色バイオセレンを純酸素 $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ で焙焼した際に、 Se の総収量のうちの固体 SeO_2 としての収率が最も大きく、97%であった。以上より、バイオセレン中の $\text{Se}(0)$ 相の違いは、酸化焙焼においては大きな影響を与えないことが分かった。

5.3.8 酸化焙焼と化学還元による Se の精製効果の検討

バイオセレンの酸化焙焼時の各成分の挙動を調査するため、HT precipitation と Absorption liquid 1 中のバイオセレンの構成成分の濃度を定量分析した。固体の SeO_2 の収率が高かった No. 1 と No. 10, 酸化が不十分で収率が低い No. 9 の各溶液内の成分濃度と、測定成分の濃度分率を表 5-3 に示す。No. 9 については凝縮物の硝酸溶解液内の成分濃度も示している。

表 5-3 各部位での無機成分濃度

	No.1				No.9						No.10			
	HT precipitation		Absorption liquid 1		HT precipitation		Precipitation (HNO ₃ dissolved)		Absorption liquid 1		HT precipitation		Absorption liquid 1	
	C/mg·L-1	(%)	C/mg·L-1	(%)	C/mg·L-1	(%)	C/mg·L-1	(%)	C/mg·L-1	(%)	C/mg·L-1	(%)	C/mg·L-1	(%)
Ca	0.08	0.1	0.03	0.4	0.06	0.1	0.05	0.4	0.02	<0.1	N.D.		0.01	0.2
K	0.25	0.2	0.04	0.6	0.33	0.4	0.14	1	0.03	<0.1	0.07	0.1	0.03	0.3
Mg	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
Na	0.27	0.3	0.11	1.3	0.26	0.3	0.23	1.7	0.07	0.1	0.06	<0.1	0.05	0.6
P	N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.		N.D.	
S	0.71	0.7	3.86	49	1.52	2	0.03	0.2	1.54	1.7	1.18	0.8	5.78	63
Se	107	99	3.91	49	75	97	12.9	97	90.4	98	147	99	3.26	36

表 5-4 精製した元素態セレン中の金属元素濃度

	No.1		No.9		No.10	
	C/mg·L-1	(%)	C/mg·L-1	(%)	C/mg·L-1	(%)
Ca	N.D.		0.01	<0.1	N.D.	
K	N.D.		0.02	<0.1	N.D.	
Mg	N.D.		N.D.		N.D.	
Na	0.02	<0.1	0.02	<0.1	0.04	<0.1
P	N.D.		N.D.		N.D.	
S	N.D.		N.D.		0.01	<0.1
Se	85.5	99	52.1	99	130	99

酸化が十分に進行した No. 1, No. 10 では、固体の SeO_2 は金属成分の総和に対する Se 分率が 99%以上であり、酸化が不十分であった No. 9 では 97%とやや低かった。P はバイオセレン中で比較的高濃度であったものの、HTprecipitation ならびに下流の Absorption liquid からは検出されず、バイオセレンの焙焼過程でリン酸化物として残存したと考えられる。HT precipitation と Absorption liquid 1 からは Na, Ca, K が検出されたが、いずれもその全量はバイオセレン中質量より小さかったことから、揮発時に Se との分離が進んだと考えられた。また HT precipitation に比べて Absorption liquid 1 中の Na,

Ca, K 含有率が著しく高いことから、 SeO_2 の凝縮時にも分離が進行したと推察された。S も同様に Absorption liquid 1 で高い収率であったが、HT precipitation 中でも 1%前後の含有率があった。よって、酸化焙焼と SeO_2 の凝縮過程でほとんどの成分の除去が可能であり、Se と同族の S が微量混入するのみであった。

次いで HT precipitation に化学還元処理を施して $\text{Se}(0)$ を生成させ、その不純物濃度を測定することで、化学還元処理による Se の精製効果を検討した。No. 1, No. 9, No. 10 の HT precipitation 10 mL を採取し、塩酸を終濃度 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ となるように添加した後に亜硫酸ナトリウムを終濃度 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ となるように添加することで溶液中の Se(IV) を $\text{Se}(0)$ へ化学還元し図 5-15 に示す赤色の沈殿を得た。赤色の沈殿を孔径 0.2 mm のろ紙でろ別し、 40°C で乾燥した後に SiC 単結晶上に塗布して斜入射 X 線回折測定を行ったところ(図 5-15)、SiC 単結晶由来のシャープピーク以外で、第 3 章図 3-4 と同様に非晶質 Se の原子間距離に相当するハローピークが確認された。また SEM-EDX によって沈殿物が Se のみで構成されることも確認している。よって、還元生成した沈殿は非晶質 Se であると同定した。HT precipitation を化学還元して得られた非晶質 Se を酸溶解し、バイオセレンの構成元素を定量分析した。各成分の濃度と測定成分の分率を表 5-4 に示す。すべての条件で Se 純度は 99 %以上であり、Ca, K, Na, S を極微量検出したのみであった。以上のことからバイオセレンを酸化焙焼に供し、生成した SeO_2 を溶解して化学還元することで、純度 99 %以上の $\text{Se}(0)$ を得られることが分かった。

5.4 要約

本章では NT-I 株を利用した固化回収方法を考案し、模擬廃水・実廃水に適用して Se 回収を試みた。

NT-I 株の培養中に通気を停止することにより、 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ の高濃度セレン酸を含む模擬廃水から、セレン酸添加後 22 時間で元素態セレンを約 90% の高効率で固化回収できた。この結果からセレノオキシアニオン還元培養条件で培養して NT-I 株菌体を十分に増殖させ、培養開始から 12 時間目に通気を止めた時点でセレン酸を添加し、元素態セレンに変換する方法をセレン固化回収方法と決定した。セレン固化回収方法によって模擬廃水から 22 時間で 87.8%、実廃水から 22 時間で 78.8% のセレンをバイオセレンとして回収することに成功した。

次に回収したバイオセレンの再資源化を試み、酸化焙焼によるバイオセレンからのセレン精製を検討した。バイオセレンを 700°C で酸化焙焼したところ、酸素量が大きい場合には Se は十分に酸化され、固体の SeO_2 が得られた。生成した SeO_2 は純度が 97% 以上であり、バイオセレンに含まれる Mg, Ca, P, S の含有率が Se より小さかったことから、酸化焙焼による精製効果が認められた。酸化焙焼で得られた SeO_2 溶液に化学還元処理を施すことで、市販品同等の純度 99% 以上の $\text{Se}(0)$ が得られた。以上の結果より、バイオセレンを酸化焙焼に供した後に、回収した SeO_2 を溶解して化学還元処理を施すことで純度 99% 以上の $\text{Se}(0)$ が得られることを示した。

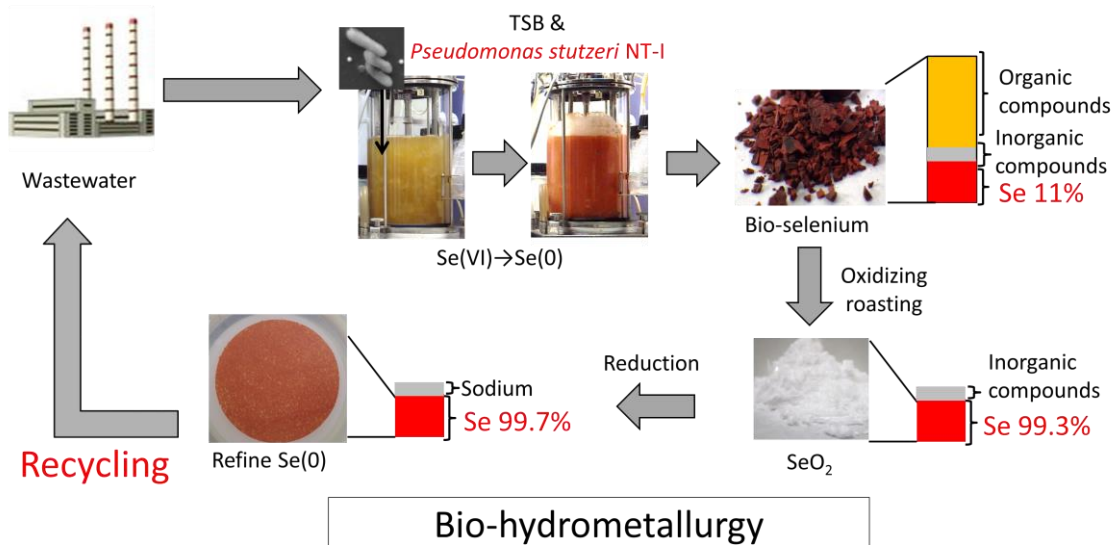


図 5-16 廃水からのセレン回収再資源化概要

本章の試験結果から NT-I 株を用いて廃水からセレンを固体として回収し、再資源化できることを示した (図 5-16)。

第6章 気化セレン回収、資源化プロセス開発

6.1 緒言

第2章においてNT-I株によるセレン気化反応は他微生物よりも速いためにセレン回収に応用できることが明らかとなり、セレン気化反応を廃水からのセレン回収に利用することを着想した。セレンを含有する溶液でNT-I株を培養し溶液中のセレンを気化させ、リアクターの排気口に繋いだ硝酸によって気化セレンを回収する方法である(図6-1)。硝酸で気化セレンを回収した後に、硝酸溶液からセレンを抽出精製することで再資源化可能なプロセスを考案した。そこで本章では廃水からのセレン気化回収と、回収物の再資源化を試みた。

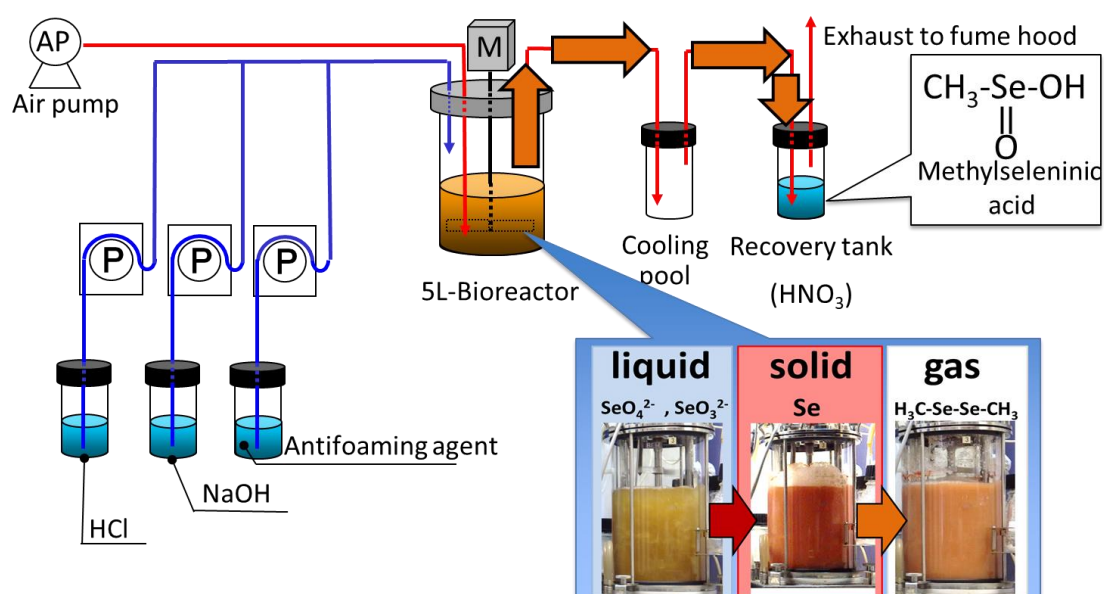


図 6-1 セレン気化回収リアクター概略図

6.2 方法

6.2.1 DMDSe の気化回収

前培養液を 3L の TSB 培地に接種し、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ のセレン酸塩または廃水を添加し培養温度 38°C 、pH 9.0、攪拌速度 250rpm、通気量 $1\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ で常時制御した条件下で回分培養を行った。NT-I 株により合成された DMDSe を回収するために、HNO₃ 液を含む 250mL ガラス瓶にジャーファーマンターの排気口を接続した。HNO₃ 液中では DMDSe はメチルセレンニン酸に変換される[103]。メチルセレンニン酸は酸化 - 還元反応で元素態セレンまでに精製させた。具体的には NaOH を終濃度 48%、H₂O₂ を 35% になるように HNO₃ 溶液に追加した。メチルセレンニン酸を 70°C で 60 分間インキュベートすることによりセレン酸に酸化した。終濃度 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ で HCl を混液中に添加し、終濃度 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ になるように Na₂SO₄ を添加した後、 70°C で 60 分間加温し、亜セレン酸へ還元した。続いて、終濃度 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ になるようにアスコルビン酸ナトリウムを混合物に加え、混合物を 40°C で 30 分間加温した。亜セレン酸塩を元素態セレンまで還元した。

6.3 結果と考察

6.3.1 模擬廃水からのセレン気化回収

完全培地にセレン酸を終濃度 $0.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ となるように添加した模擬廃水からのセレン気化回収試験の結果を示す。温度 38°C ， $\text{pH}9.0$ ，攪拌速度 250rpm ，通気量 $1\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ の条件でセレン気化回収試験を行った。セレン酸，亜セレン酸，可溶性セレン，元素態セレン，気化セレンの経時変化を示した（図 6-2）。

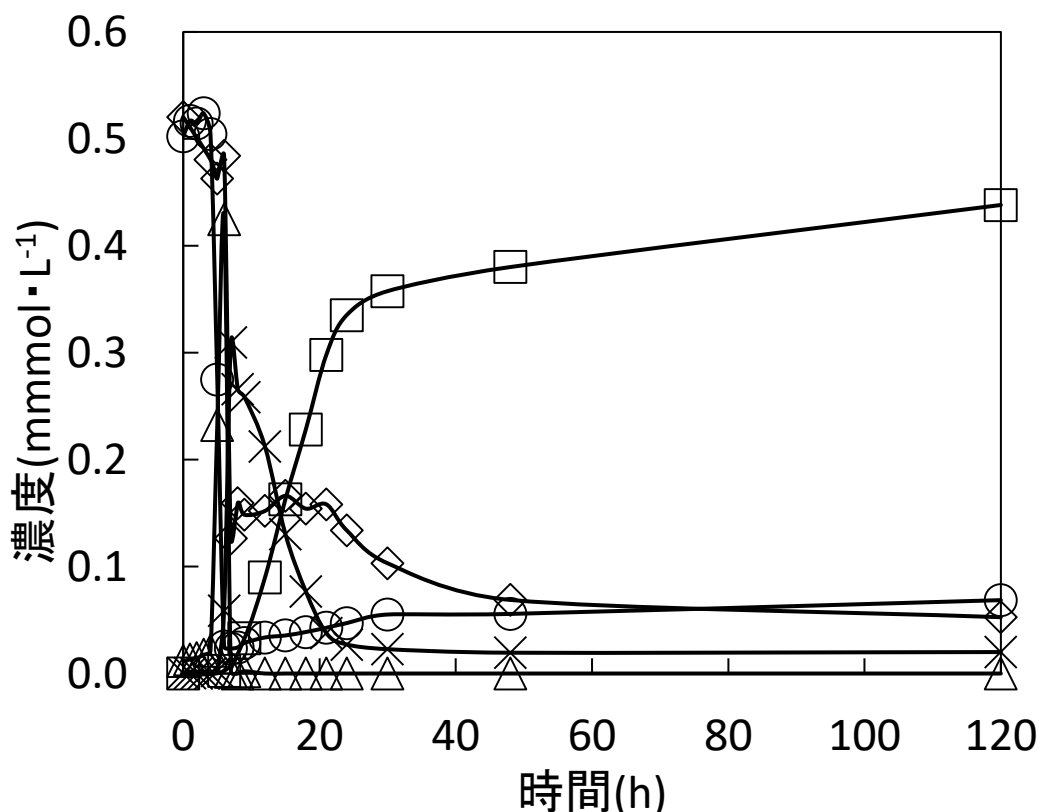


図 6-2 模擬廃水からのセレン気化回収

○：セレン酸、△：亜セレン酸、◇：溶存セレン、×：元素態セレン、□：気化セレン

NT-I 株によって培養開始から 6 時間で初期セレン濃度のほぼ 100%のセレン酸が亜セレン酸に還元され、7 時間目には約 95%の亜セレン酸が元素態セレンに還元された。元素態セレンの減少と同時に DMDSe が合成され、120 時間目には初期セレン濃度の 71.2%のセレンを硝酸で回収することができた（表 6-1）。硝酸による DMDSe の捕集効率(81%)を考慮すると、気化回収率は 87.9%となる[103]。セレン酸および亜セレン酸を含まない可溶性セレンの濃度は、元素態セレンの増加とともに増加したが、 DMDSe の減少とともに減少した。さらに培養開始から 120 時間目の培養液上清をジエチルエーテル抽出し、GC-MS にて定性した（図 6-3）。その結果、セレン種として DMDSe 、 DMSe 、 DMSeS が検出された。セレン酸塩および亜セレン酸塩を含まない溶存セレンには、揮発していない DMDSe 、 DMSe 、

DMS₂Se が残存している可能性が示唆された。

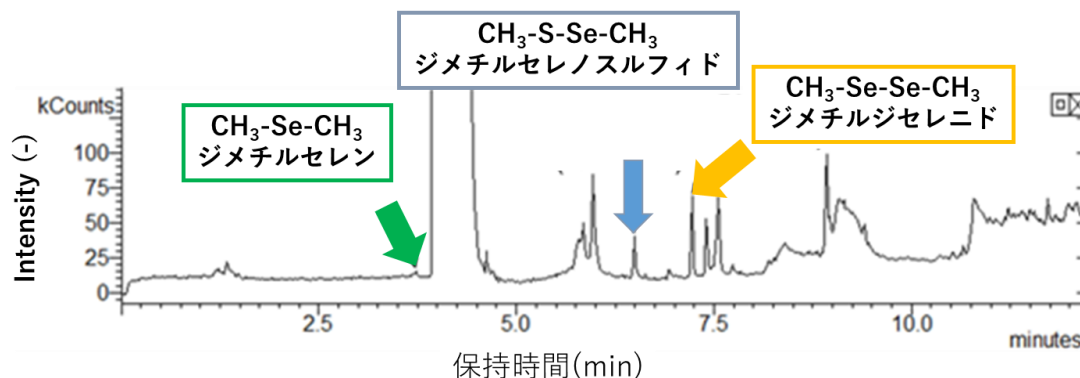


図 6-3 ジエチルエーテル抽出物の GC-MS による定性

DMDSe 回収液中のセレン濃度は $7.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ であり、模擬廃水中の初期セレン濃度 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ よりも 14 倍濃縮して回収できた。硝酸中に検出できた夾雑物は硫黄 $12.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ のみである。硝酸中では硫黄はメチルスルホン酸として存在していると推定される。メチルセレン酸は試薬による酸化還元反応でセレンを分離、精製できる可能性がある。以上のことにより、微生物を利用し、模擬廃水中から高純度で付加価値の高いセレンをセレン酸として回収することに成功した。

6.3.2 実廃水からのセレン気化回収

可溶性セレンを $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 含む実廃水からのセレン気化回収実験を行った。イオンクロマトグラフィーで定性定量分析を行ったところ、セレン酸が約 85%、亜セレン酸が約 15%の割合で混在していた。セレン以外にもケイ素やカルシウム、カリウムが含まれていた。この実廃水を培地で希釈して、模擬廃水のセレン濃度と同濃度 ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) になるように調製してセレン気化回収試験を行った。

実廃水を用いた気化回収試験での各セレンの経時変化を示した (図 6-4)。廃水中のセレン酸化物イオンは NT-I 株によって DMDSe に合成変換され、培養開始から 120 時間目で初期セレン濃度の 38.9%のセレンを硝酸で回収できた (表 6-1)。実廃水での回収率は、模擬廃水での回収率と比較すると約半分まで減少した。セレン酸や亜セレン酸の還元は模擬廃水と同様に、12 時間で元素態セレンに還元した。120 時間目の元素態セレン量は 3.8%であり、模擬廃水の 4.0%と同等であった。元素態セレンも固液分離によって回収すれば、系全体のセレン回収率は 42.7%となる (表 6-1)。培養 120 時間目の実廃水での可溶性セレンの割合は 35.9%で、模擬廃水の 10.5%に比べてかなり多かった。可溶性セレン中のセレン酸と亜セレン酸濃度は各々 5%であることから、未知セレンが培養液中に 25.9%含まれていることになる。ジエチルエーテル抽出物を分析した結果、培養液中の未知セレンは主に DMDSe であることが分かった。

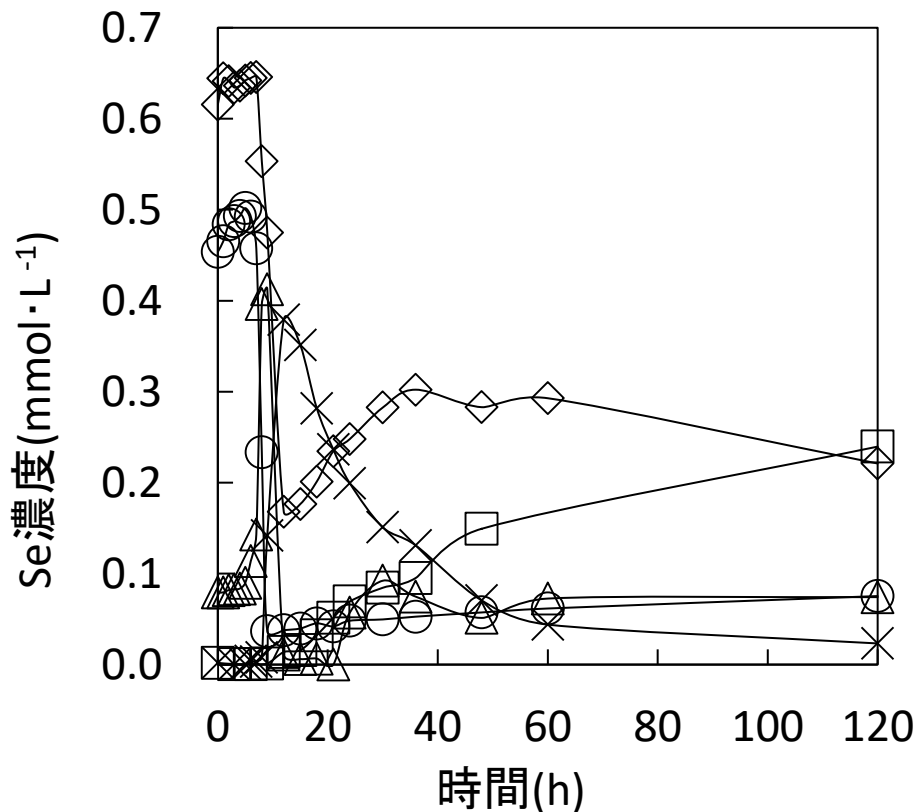


図 6-4 実廃水からのセレン気化回収

○：セレン酸、△：亜セレン酸、◇：溶存セレン、×：元素態セレン、□気化セレン

以上の結果から、実廃水を用いた時の気体回収率の低下は **DMDS_e** が可溶性セレンとして残存していることが原因だと考えられる。回収時に可溶性セレンに含まれる **DMDS_e** が全て気体として硝酸で回収できたと仮定すると、気化回収率は初期セレン濃度の **74.8%** (気体回収率 **38.9%**+可溶性セレンに含まれる **DMDS_e** 含量 **35.9%**) となる。これは模擬廃水を用いた時の **71.2%** とほぼ同等の回収率である。**DMDS_e** が培養液中に残存する要因は検討中であるが、模擬廃水には存在しない元素等により、揮発化が阻害されたと考えられる。鉛などの 2 価金属はセレニドと反応して溶液中に残存することが知られている[106]。これら 2 価金属を完全に除去することで、**NT-I** 株によるセレン気化回収の回収率が高くなる可能性がある。

表 6-1 回収時のセレン各相割合

サンプル	未回収		回収可能				回収物合計
	溶存セレン		元素態セレン		気化セレン		
	mM	%	mM	%	mM	%	
TSB培地	0.05	10.5	0.02	4.0	0.36	71.2	75.2
実廃水	0.22	35.9	0.02	3.8	0.24	38.9	42.7

表 6-2 気化回収物と精製元素態セレンの金属元素濃度 (N.D.:Not detected)

	Recover compound (%)	Refinery Se ⁰ (%)
Ca	N.D.	N.D.
Fe	N.D.	N.D.
K	N.D.	N.D.
Mg	N.D.	N.D.
Na	N.D.	0.4
P	N.D.	N.D.
S	0.03	N.D.
Se	0.04	99.6

模擬廃水、実廃水ともに回収した硝酸トラップ中に検出された金属元素はセレンと硫黄のみであった (表 6-2)。夾雑物は少ないがセレン純度が低いため、硝酸中からセレンの抽出を試みた。回収できた Se(0)は 99%以上の純度だった (表 6-2)。精製した Se(0)には微量 Na が含まれているが、これは還元操作に使用した亜硫酸ナトリウムとアスコルビン酸ナトリウムからの汚染である可能性があった。廃水からセレン気化能を利用してセレンを回収し、回収物の精製を通して再資源化プロセスの開発に成功した。

6.4 要約

本章では NT-I 株を利用した気化回収方法を模擬廃水・実廃水に適用して Se 回収を試みた。

模擬廃水から 120 時間で 71.2%、実廃水からは 120 時間で 38.9%のセレンを回収することに成功した。回収した硝酸トラップ内にはセレン以外の夾雑物としては硫黄のみしか検出されおらず、夾雑物の少ないセレンが回収できた。さらに硝酸で回収したセレンは酸化還元反応によって抽出・精製することで、市販品と同等の純度をもつ元素態セレンを得ることに成功した。

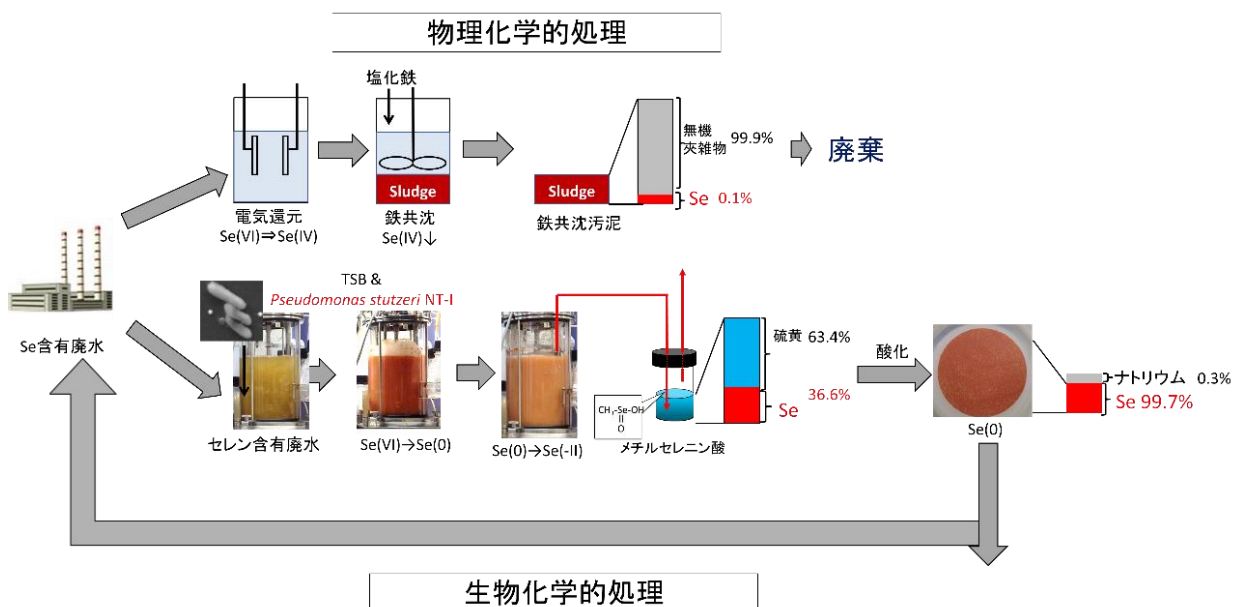


図 6-5 廃水からのセレン気化回収・再資源化概要

本章の結果から NT-I 株を使用することで廃水からのセレン回収・再資源化が可能なが示唆された (図 6-5)。また 5 章と本章の結果から NT-I 株は通気制御によって回収方法を選択できることが示唆された。

第7章 セレン還元細菌 NT-I 株によるセレン含有廃棄物からのセレン回収

7.1 緒言

太陽光発電は、シリコン半導体などに光が当たると電気が発生する現象を利用し、太陽の光エネルギーを太陽電池（半導体素子）により直接電気に変換する発電方法である。我が国の導入量は着実に伸びており、2019年には全世界で760GW、日本は世界3位の71GWの導入量となっている。太陽電池の中でも特に近年、CIGS系の太陽光パネルが注目されている。CIGSとは、銅（Cu）とインジウム（In）、ガリウム（Ga）、セレン（Se）の化合物を材料とする薄膜状態の物質のことである。CIGSは高純度（99.9999～99.999999999%）シリコン（Si）を使用していないため、基板の厚みを抑えることができる。さらに使用する材料の純度は99.99%レベルで良いため、低コストで製造が可能である。CIGSは近年、発電効率も高くなり[29]、耐用年数も長いことから、最高クラスのパフォーマンスを持つとされている。太陽光発電に用いられるパネルの耐用年数は約20年であり、将来的に廃棄物として排出されることが見込まれる[27], [107]。今後、太陽光パネルからレアメタルをはじめとした有価物を分離・回収する需要が高まると思われるが、検討されているのはガラス材料だけである。そこで本章では、実際の太陽光パネルから、セレンを溶出し、これまでの研究で決定した条件を用いて固化セレンおよび気化セレンを回収することを目的とし研究を行った。

7.2 方法

CIGS系の太陽光パネルを破砕した粉末を入手した。この太陽光パネル破砕粉末からのセレン回収を目的として試験を行った。

7.2.1 粉末試料の分析方法

マイクロウェーブ試料分解装置により、分解溶液を用いて試料溶液化を行った。分解溶液は濃硝酸4mL、濃フッ化水素酸4mLを用いた。また、レアアースの溶解を行うために、分解操作後、ホウ酸1gを添加し、再度分解操作を行った。測定は、各試料の液性を整えたのち、原液測定試料、1/1000、1/100000希釈測定溶液を調製し、ICP-MS（iCAP 6300 Duo、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）により測定を行った。測定回数はn=3で行った。

7.2.2 CIGS溶解試料および中和試料の作製

粉末試料を1g、電子天秤により秤量し、50mLコーニングチューブに分取した。粉末試料に濃塩酸を4mL、濃硝酸を1mL分注し、超音波で30分間試料を溶解した。更に10mLピペッターにより95mLの超純水を加え、全量100mLとした。遠心分離を15,000rpm、5分

間の条件で行い、得られた上澄み溶液をディスクフィルター (0.2 μm 孔) によりろ過した。ここで得られた溶液を CIGS 溶解試料とし、遠心分離にて得られた沈澱物を酸溶解残渣として、ICP-AES で測定をした。

CIGS 溶解試料に 5N 水酸化ナトリウム溶液を 10 mL 加え、遠心分離を行い、上清と沈澱に分けた。ここで得られた上清を中和溶液試料、沈澱を中和沈澱物として、ICP-AES で測定をした。

7.2.3. セレン含有廃棄物からの気体セレンおよび元素態セレン回収試験

セレン回収実験は、太陽光パネル粉末から抽出した溶液を終濃度 0.5 mmol・L⁻¹になるように添加し、各最適条件下で培養を行った。前培養後、太陽光パネル粉末から抽出した溶液を終濃度 0.5 mmol・L⁻¹になるように添加し。添加後、固体 Se 回収実験は通気を停止することにより開始した。培養は 120 時間目まで行った。

7.3 結果と考察

7.3.1. 太陽光パネル粉末試料およびセレン抽出溶液試料の分析結果

粉末試料の組成を表 7-1 に CIGS 溶解試料と中和後の可溶性画分の組成結果を表 7-2、表 7-3 に示した。粉末試料中には主にセレン、銅、インジウム、ガリウムが含まれており、CIGS 太陽光発電セルの光吸収層に使用されているものと推測される。また微量に検出された亜鉛はバッファ層 (CdSZnO) もしくは透明電極 (ZnO) 由来だと推測される。

表 7-1 粉末試料の多元素分析結果

元素	ave	±	std	CV
	[mmol/kg]			[%]
Se	4520	±	139	(4)
Cu	2030	±	80	(4)
In	1570	±	40	(3)
Ga	570	±	23	(4)
Zn	29	±	1	(4)
Fe	2	±	0	(11)
Cr	2	±	0	(8)

表 7-2 CIGS 溶解試料の多元素分析結果

元素	ave	±	std	CV
	[mmol/L]			[%]
Se	43.5	±	0.3	(0)
Cu	29.8	±	1.6	(0)
In	26.7	±	0.0	(0)
Ga	7.6	±	0.0	(0)

表 7-3 中和溶液試料の多元素分析結果

元素	ave	±	std	CV
	[mmol/L]			[%]
Se	38.4	±	1.2	(0)
Cu	0.4	±	0.1	(0)
In	0.0	±	0.0	(0)
Ga	5.8	±	0.0	(0)

次に微生物と反応させるため、粉末試料を少量の硝酸で溶解した試料中のセレンについて、イオンクロマトグラフィーによる定性定量を行った。溶解した試料中にはセレン酸は検

出されず、亜セレン酸が $45.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ であった。この値は、ICP-AES で定量した値 $43.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ とほぼ一致した (表 7-2)。さらに中和処理と遠心分離により、Se、Ga は上清に、In、Cu は沈殿に分離された (表 7-3)。これは急激な pH 変化によって水酸化銅、水酸化インジウムとして沈殿したと推測された。一部セレンとガリウムの濃度が減少しているのは水酸化銅と共沈したためだと考えられる。沈殿に分離された Cu と In の分離回収方法と再資源化方法は既に確立されている。具体的には沈殿を塩酸酸性下で溶解して pH0.5 に調製した後に NaHS を添加すると CuS が沈殿する [108]。固液分離によって CuS を分離した後に、ろ液を pH2.0 に再調整し NaHS を添加することで In_2S_3 を分離できる。回収した CuS は電気製錬により高純度の銅として再資源化できる。また回収した In_2S_3 は CIGS 太陽電池セルのバッファ層にも使用される物質であり、そのまま資源価値を持つ。

7.3.2 中和溶液試料からの元素態セレン固化回収試験

NT-I 株がセレン酸を還元できる pH 範囲まで CIGS 溶解試料を中和し、中和溶液試料を用いて培養を行った。中和試料からの固体回収条件における培養の結果を図 7-1 に示した。固化回収条件において、中和溶液試料から 22 時間で 60.0% が固体 Se として回収された。

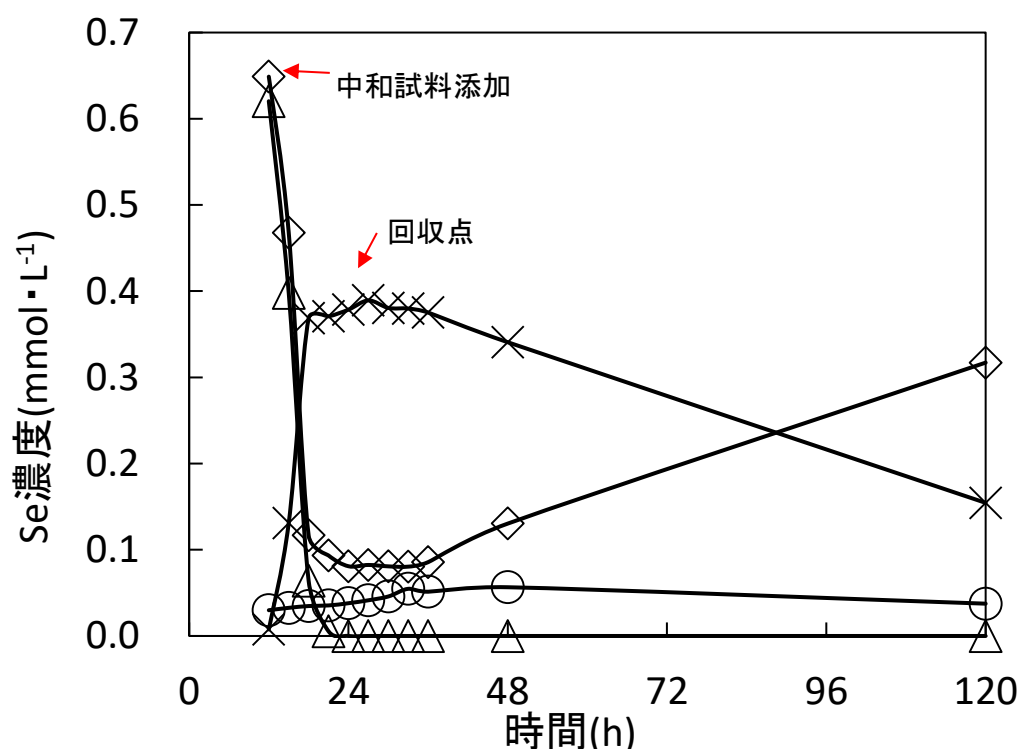


図 7-1 中和溶液試料からの固体回収

○ : セレン酸、△ : 亜セレン酸、◇ : 溶存セレン、× : 元素態セレン

今回、中和試料からの回収において、元素態セレンの最大濃度 $0.39 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ は、添加濃度の 60.0% であり、その後元素態セレンは減少し 120 時間では $0.15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ となり、添

加濃度の 23.8%にまで減少した。模擬廃水における元素態セレンの回収率は最大で 87.8%で、133 時間でも 75.7%であり、CIGS 溶解試料からの回収では模擬廃水に比べ元素態セレンの減少量が大きく DMDSe 合成が進行している可能性が考えられた。

7.3.3 中和溶液試料からのセレン気化回収の検討

中和溶液試料からの気体回収条件における培養の結果を図 7-2 に示した。気体回収条件において、中和溶液試料から 44.3%が DMDSe として回収された。模擬廃水の回収率 (71.1%) に比べ、回収率は低い。DMDSe の揮発阻害だと思われる二価金属元素を除去することで、回収率はさらに向上するものと考えられる。

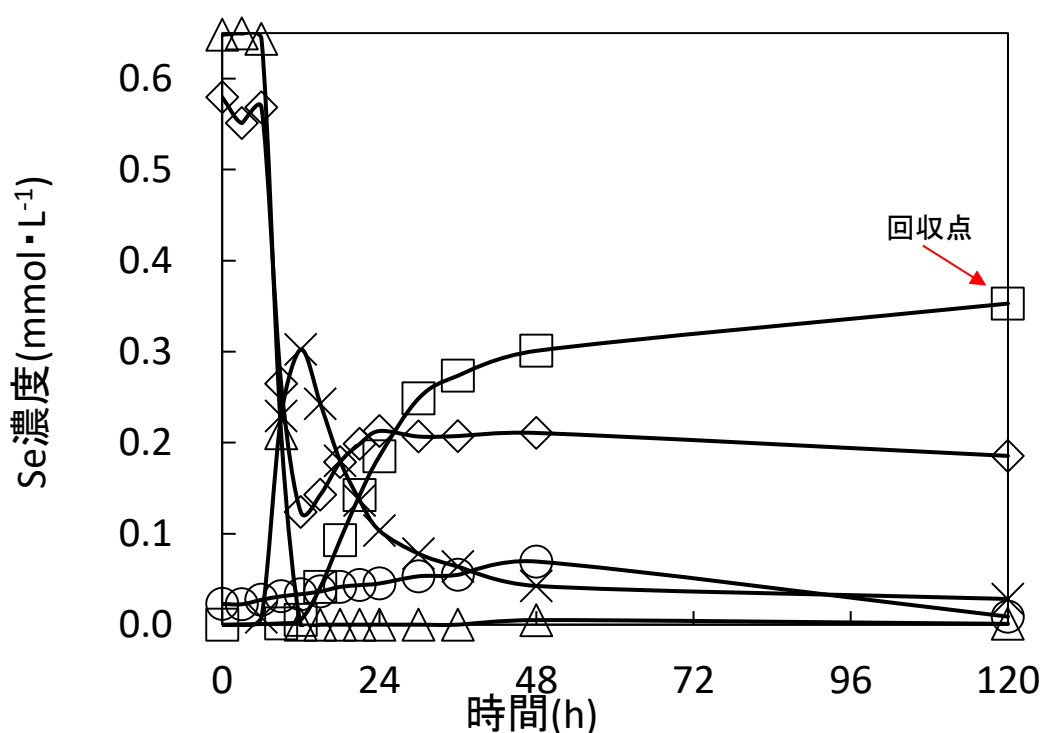


図 7-2 中和溶液試料からの気体回収

○：セレン酸、△：亜セレン酸、◇：溶存セレン、×：元素態セレン、□気化セレン

NT-I 株によって太陽光パネル溶解中和液中のセレンを分離回収できた (図 7-3)。培養液中にはガリウムが溶存している。このガリウムは培養液中に硫化水素を通して硫化ガリウムとして沈殿させた後に、熔融塩電解にて金属ガリウムとして精製・再資源化できる。以上の結果から CIGS 太陽光パネルから主要な銅、インジウム、セレン、ガリウムを分離回収に成功した。

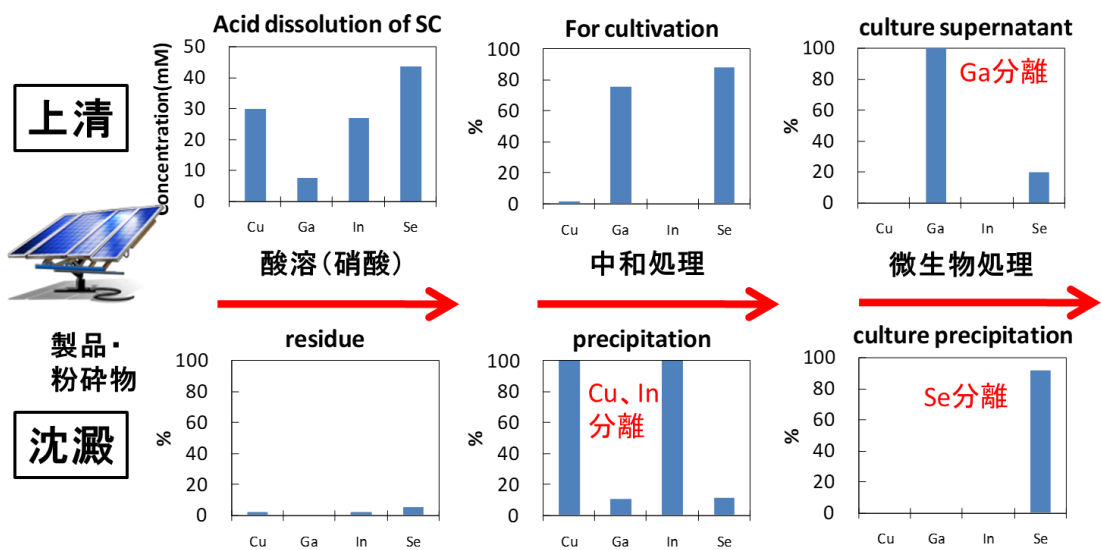


図 7-3 CIGS からの主要元素分離概要

7.4 要約

本章では CIGS 系製品の粉末を入手し、酸溶解後、中和した試料液を混在させた培養液からセレンの回収を試みた。固化回収では 22 時間で 60%、気化回収では 133 時間で 44.3% を回収できた。この結果は模擬廃水と比べると低いため、さらなる改良が期待される。またセレン以外の元素に注目すると、銅とインジウムは中和時に沈澱に分離され、セレンはバイオプロセスによって分離、ガリウムはバイオプロセス終了時に溶液中に残存した。これらの元素は既に精製方法が確立しているために、バイオプロセスを介することによって CIGS の各主要元素が再資源化できるという知見を得た。

第8章 セレン酸還元細菌 NT-I 株の汚染土壌浄化への応用とプロセス開発

第7章までに NT-I 株のセレン酸還元能を利用した廃水廃棄物からのセレン除去再資源化を検討した。本章では NT-I 株のセレン酸還元能を土壌浄化へ応用するために検討をおこなった。

8.1 緒言

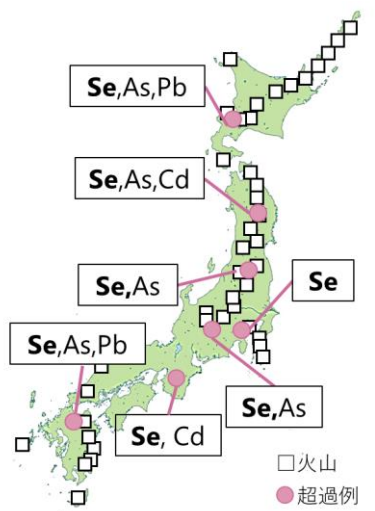


図 8-1 環境基準を超えたセレンの例

セレンは主に硫化銅鉱物の夾雑物質として発掘され、セレンを主体とする鉱物はない。セレンは主に火山性堆積物に含まれている(図 8-1)。日本は多くの火山を持つため、日本の土壌には自然由来のセレンが低濃度で含まれている[20]。土壌中でセレンは毒性が高い可溶性のセレン酸、亜セレン酸として存在している[109]。

表 8-1 土壌に関する基準と試験方法比較

環境省告示	想定	名称	基準値	単位	攪拌溶出時間(時間)	溶媒	液固比
18号	地下水への溶解	溶出量	0.01	mg/L (測定値をそのまま利用)	6	純水	10:1
19号	胃酸での溶解	含有量	150	mg/kg (土壌重量1kg当りに換算)	2	1M塩酸	10:0.3

セレン含有土壌による健康被害を防止するために日本では土壌中のセレンおよびセレン化合物量の環境基準値が定められている。具体的には地下水経由の健康被害拡大防止(環境省告示 18号 土壌溶出量基準)と、経口摂取による健康被害の防止(環境省告示 19号 土壌含有量基準)である。土壌溶出量基準は70年間、1日2Lの地下水を飲用することを想

定し、一生涯にわたりその地下水を飲用しても健康に対する有害な影響がない濃度としてセレンは基準値 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ を設定されている。一方で土壌含有量基準は砂場遊びや屋外で活動をした際に土壌が手に付着し、それを摂食する場合が想定されている。基準値は一生涯（70年）汚染土壌のある土地に居住した場合の想定で算出され、セレンは基準値 $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ を設定されている。これらの値は土呂久鉱山において公害を引き起こしたヒ素の基準値と同じ値である[110], [111]。また想定されるリスクが異なるために、その試験方法も異なる（表 8-1）。

平成 22 年の土壌汚染対策法の改正により、自然由来の汚染であっても基準値を超えた土壌の対策処理が必要となった。セレン含有する土壌は環境基準を達成するために、主に遮水工法封じ込めがおこなわれてきた[112]。遮水工法封じ込めとは汚染土壌を遮水シート等で囲い込む工法である。遮水シートによって雨水と汚染土壌との接触を物理的に断つことで、汚染土壌中の重金属の溶出を防いでいる。近年、遮水工法封じ込めによる処理コストが高いため、低コストの不溶化処理[113]–[116]や吸着層工法[117], [118]が検討されている。しかし、土壌中であっても廃水中と同様にセレン酸は鉄系薬剤との反応性が低いことから、日本の基準を満たすためには大量の薬剤が必要であり、やはりセレン酸で汚染された土壌の処理には費用が高くなる。また不溶化処理は汚染土壌からのセレンの溶脱を防ぐことができる一方で、セレン自体は土壌中にとどまるためセレンの再溶出のリスクが生じる。そのためセレンで汚染された土壌は不溶化処理後であっても、健康被害防止のため、再利用されることはない。セレン酸汚染土壌を不溶化する新たなアプローチとして、植物の代謝（ファイトレメディエーション）や微生物（バイオレメディエーション）を利用した浄化が試みられている[119]–[121]。NT-I 株は水溶液中の可溶性セレノオキシアニオンを無毒で不溶性元素態セレンまで還元する。さらに培養を続けると元素態セレンから DMDSe を合成する[65]。 DMDSe は溶解度が低く揮発性が高いため、廃水から容易に揮発し、大気中に拡散する。

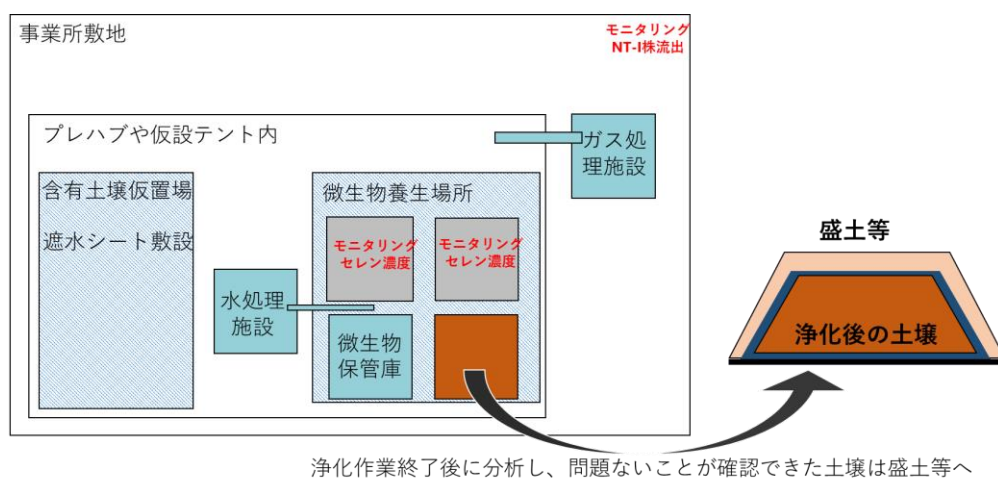


図 8-2 NT-I 株による土壌浄化方法案

NT-I 株のセレン代謝により、土壤中の可溶性セレン酸を不溶性元素態セレンまで還元することができれば、環境基準を満たすことができる。また元素態セレンをさらに DMDSe まで還元することができれば揮発性が高く大気中へ揮発するために、土壤中からセレンを除去することができると推察する。したがって NT-I 株のセレノオキシアニオン代謝を利用した土壌処理は新たな土壌浄化処理技術の開発につながると考えた。そこで不溶化工法の薬剤の代わりに NT-I を土壌に混合する処理方法を考案し遂行した(図 8-2)。

8.2 方法

8.2.1 微生物培養方法

微生物の培養は 3.2.1~3.2.2 を参考にした。NT-I 株を TSB 培地で 24 時間培養し、微生物数は OD₆₆₀ の数値を用いて調製した。

8.2.2 模擬汚染土壌の調製

トンネル掘削ずりを日本の 4 県から採取し、模擬汚染土壌作製に用いた。採取した掘削ずりを乳鉢と乳棒を用いて破碎し、直径 1 mm~2 mm となるよう篩い分けをおこなった。そこにセレン酸ナトリウム溶液を土壌溶出量 0.03-0.1 mg・L⁻¹ となるように添加した。添加後に乾燥したものを模擬汚染土壌として試験に使用した。

表 8-2 模擬汚染土壌中の各元素土壌溶出量 (単位:mg・L⁻¹、N.D.:Not detected)

模擬汚染土壌	As	Cd	Cr	Pb	Se
CB	0.07	N.D.	0.01	0.06	0.03
FK	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.03
NI	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	0.05
YM	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.09

8.2.3 土壌中のセレン酸不溶化最適培養条件の検討

模擬汚染土壌に滅菌水、TSB 培地およびコーンステープリカー (CSL) (三和澱粉工業株式会社、奈良)2.0%を添加し、対照試験として土着の常在微生物によるセレン酸還元能を調べた。NT-I 株による土壌中のセレン酸還元能を調べるために模擬汚染土壌に OD₆₆₀ = 1.0 の NT-I 株培養液を土壌重量の 10%添加し、培養温度 20°C 静置することを試験の基本条件とした。次いで土壌中セレン酸還元の最適培養条件を検討するために、OD₆₆₀ = 0.1 から 10、培養液量を土壌重量の 5%から 100%、培養温度を 20°C から 38°C、および培養液 pH を 5.0 から 9.0 まで変化させた。土壌に NT-I 株培養液を添加してから 72 時間後に採取し、土壌溶出試験によって土壌中の可溶性セレン濃度を測定した。培養液添加前の可溶性セレン濃度を C₀、培養液添加から 72 時間後の可溶性セレン濃度を C₇₂ として、72 時間後のセレン不溶化率を次式(1)で算出した。

$$\frac{C0 - C72}{C0} \times 100 \dots (1)$$

8.2.4 異なる産地の模擬セレン酸汚染土壌不溶化試験

初期 pH7.0 に調整した OD₆₆₀=1.0 の NT-I 株培養液を土壌重量の 40%を異なる産地で作製した模擬汚染土壌に添加し、培養温度 20℃で静置した。また 24 時間毎に土壌を採取し、土壌溶出量を測定した。

同様に微生物処理中の模擬汚染土壌セレン相変化を調べるために初期 pH7.0 に調整した OD₆₆₀=1.0 の NT-I 株培養液を土壌重量の 100%を模擬汚染土壌 YM に添加し、培養温度 38℃で静置した。24 時間毎に土壌を採取し、土壌溶出量試験と土壌中の不溶性セレンを測定した。

8.2.5 土壌溶出量試験（環境省告示 18 号試験）

本報告では環境省指定の水抽出試験[JIS K 102(2013)]を改変して実施した。具体的には、採取した試験土 5.0 g に希塩酸を加えて pH 5.0~6.0 に調整した純水 50mL を加え、20℃で 6 時間振盪機によって溶出した。溶出液をろ過フィルター(0.2µm、Steradisc、Kurabo)を通して土壌を除去し、ろ液を試験液とした。試験溶液中のセレン濃度を誘導結合プラズマ原子発光分析計 ICP - AES(iCAP6300)で定量的に測定した。解析は 3 回行い、平均値を用いた。

8.2.6 土壌中の不溶性セレンの分析

8.2.5 でろ過によって除去した土壌に純水 50 mL を加え、遠心分離(8000 rpm、10 分、20℃)により上清を除去し、試験土を純水で洗浄した。その後、沈殿した土壌に濃硝酸 10 mL を加え、土壌中の不溶性セレンを可溶化した。これに純水を加えて 50 mL とし、遠心分離(8000rpm、10 分、20℃)し、上澄み液を同ろ過フィルターを通して、ろ液を検液とした。試験液中のセレン濃度は ICP - AES により定量的に測定した。解析は 3 回行い、平均値を用いた。

8.2.7 土壌含有量試験（環境省告示 19 号試験）

本報告では環境省指定の水抽出試験[JIS K 102(2013)]を改変して実施した。具体的には、採取した試験土 6.0 g に 1 N 塩酸 200mL を加えて、20℃で 2 時間振盪機によって溶出した。溶出液をろ過フィルター(0.2 µm、Steradisc)を通して土壌を除去し、ろ液を試験液とした。試験溶液中のセレン濃度を誘導結合プラズマ原子発光分析計 ICP - AES(iCAP6300)で定量的に測定した。解析は 3 回行い、平均値を用いた。測定値から土壌含有量(mg・kg⁻¹)を算出した。

8.3 結果と考察

8.3.1 NT-I 株による土壤中セレン酸不溶化試験

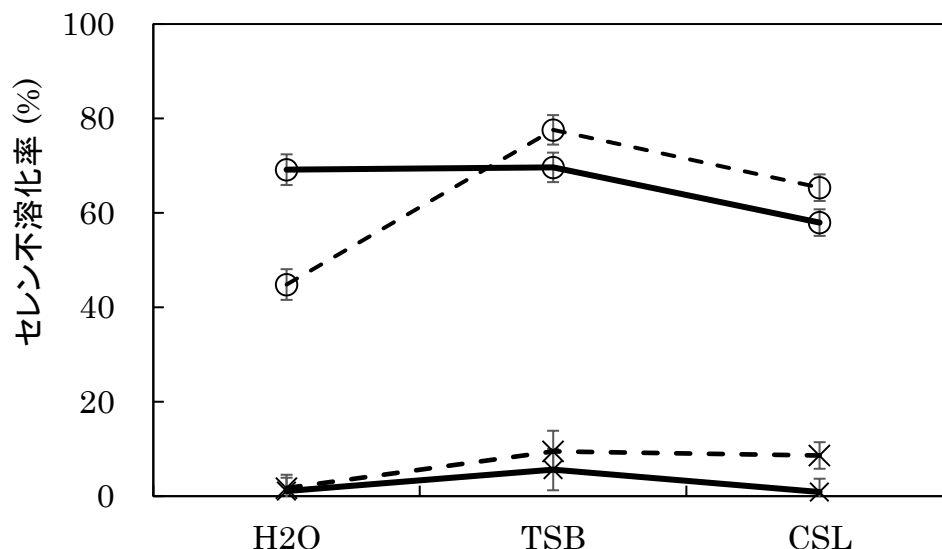


図 8-3 模擬汚染土壌 YM および NI のセレン不溶化試験

実線：土壌 YM、点線：土壌 NI、 ×：NT-I 株未添加、○：NT-I 株添加

日本の 4 県から採取してきた掘削ずりを破碎し土壌溶出量試験をおこなったところ、これら掘削ずりには環境基準を超過するセレンが検出されなかった (data not shown)。それらを用いて模擬セレン酸汚染土壌を調製した。環境省によると、自然由来と判定する基準の 1 つとして土壌溶出量が環境基準値の概ね 10 倍を超えないことが挙げられている。そこで本研究では模擬セレン酸汚染土壌の濃度をセレンの環境基準 ($0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) の 10 倍未満となる $0.03\sim 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ に調製した(表 8-2)。

まず土着微生物のセレン酸還元能を評価するために模擬汚染土壌 YM に滅菌水、TSB 培地、CSL 培地を加えて 72 時間後の土壤中セレン不溶化率 (可溶性セレン除去率) を算出した。NT-I 株非存在下(未添加)では、土壌中のセレン溶出量は試験開始後 0~72 時間で変化せず、セレン不溶化率はほぼゼロであった(図 8-3)。したがって模擬汚染土壌中にはセレン酸を還元できる微生物は存在していないことが示唆された。次に NT-I 株による土壤中セレン酸の不溶化能を検討するため、NT-I 株を滅菌水、TSB 培地および CSL の 2%培地を用いて $\text{OD}_{660}=1.0$ となるように希釈し、これら 3 種類の NT-I 株懸濁液を模擬汚染土壌 YM に添加した。その結果 NT-I 株懸濁液を添加した土壌全てにおいて、試験開始から 72 時間後の不溶化率は 50%を超えた。つまり NT-I 株によって土壌中のセレン酸が不溶性の元素態セレンまで還元され、土壌中の可溶性セレン量を減少させたことが示唆された。同様の試験を模擬汚染土壌 NI でも行ったところ、NT-I 株 TSB 培地および CSL では模擬汚染土壌 YM の時と同様に可溶性セレン量が減少した。しかし NT-I 株水懸濁では不溶化率が 45%であった。NT-I 株水懸濁でセレンを不溶化できる要因は前培養液からの栄養分の持ち込みだと

考えられる。NT-I 株の洗浄度合いによって、前培養液からの栄養分が変わり、セレン不溶化率が安定しないと考える。検討した結果、TSB 培地に懸濁した NT-I 株のセレン不溶化率が最も高かったことから、以降の浄化試験に際しては TSB 培地を用いた。

8.3.2 土壤中のセレン酸不溶化最適培養条件の検討

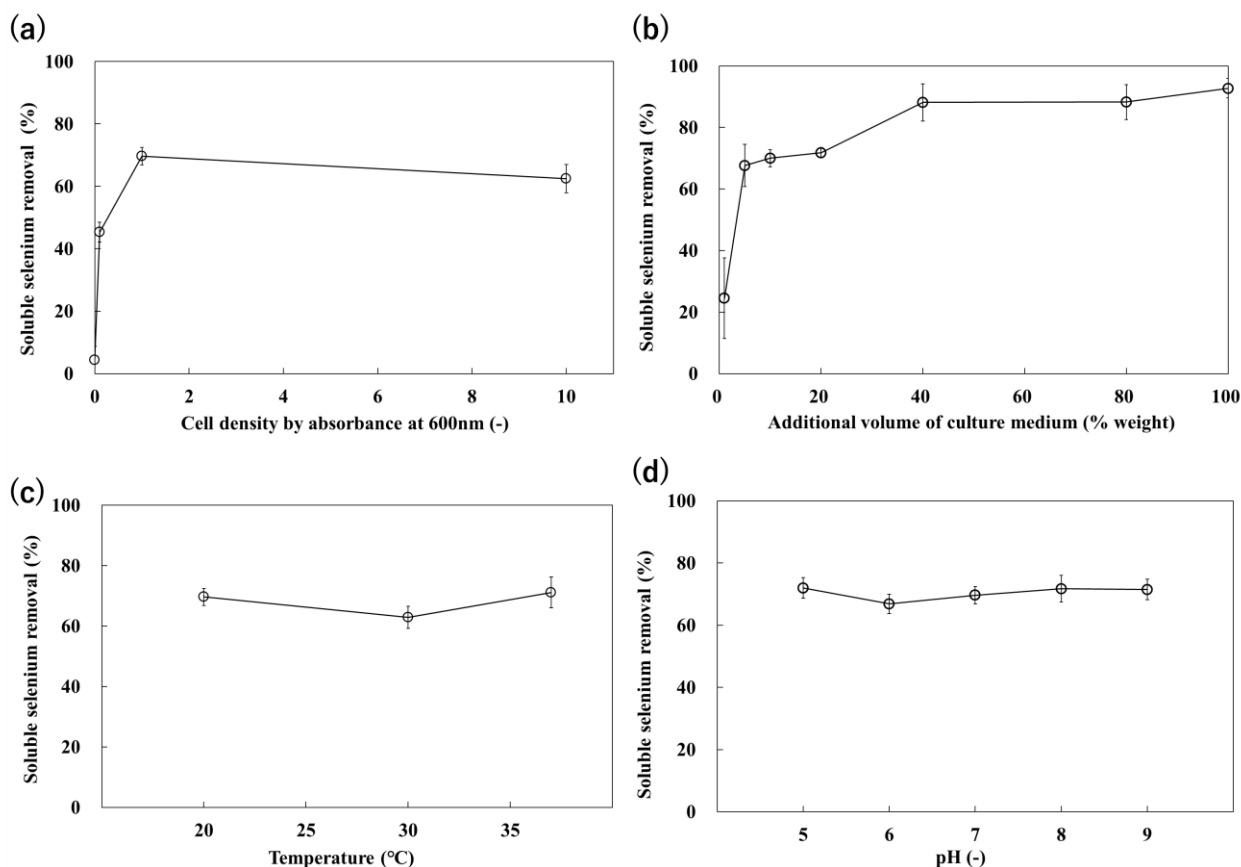


図 8-4 各試験条件におけるセレン不溶化能比較 (a) 懸濁液中の NT-I 株濃度、(b) NT-I 株懸濁液の添加量、(c) 培養温度、(d) 懸濁液の初期 pH

懸濁液中の NT-I 株濃度、懸濁液の添加量、培養温度および懸濁液の初期 pH がセレン不溶化率に及ぼす影響を調べるため、これらの条件を変化させながら模擬汚染土壤のセレン不溶化試験をおこなった。

まず、懸濁液中の NT-I 株濃度がセレン不溶化率に与える影響を調べるために NT-I 株の濃度を OD₆₆₀ = 0, 0.1, 1.0, 10 に調整し、模擬汚染土壤の不溶化試験をおこなった(図 8-4(a))。懸濁液中の NT-I 株を OD₆₆₀ = 1.0, 10 とした場合には試験開始後 72 時間でセレン不溶化率は 60%以上となった。特に OD₆₆₀=1.0 でセレン不溶化率は最大で 70%だった。以上の結果から、懸濁液中の NT-I 株濃度はセレン不溶化率に大きく影響を及ぼすことが示唆された。OD₆₆₀=0.1 のように微生物量が少ないと微生物とセレン酸が接触する度合いが少ないため不

溶化率が低く、 $OD_{660}=10$ のように微生物量が大きい場合には微生物飽和となる。ある一定値の微生物量 ($OD_{660}=1.0$) を超えるとセレン不溶化率が一定になると推測される。

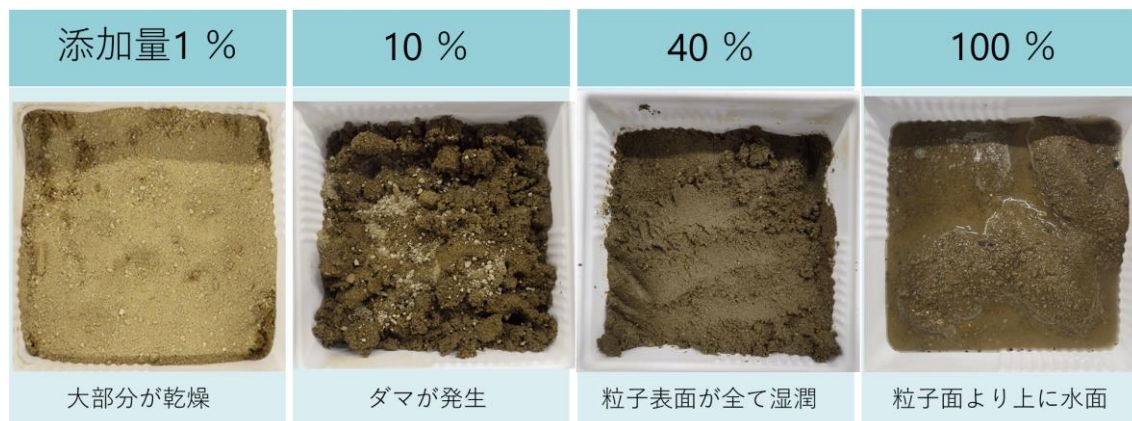


図 8-5 添加量を変化させた NT-I 株懸濁液添加後の模擬汚染土壌

次に $OD_{660}=1.0$ に調製した NT-I 株懸濁液の添加量を土壤重量の 1%から 100%の間で変動し、セレン不溶化率を測定した(図 8-4(b))。セレン不溶化率は、添加した NT-I 株懸濁液が増加するにつれて増加する傾向があり、土壤重量に対して 5%以上の NT-I 株懸濁液を添加するとセレン不溶化率は 65%以上であり、添加量を 40%以上にすると不溶化率は 80%以上に上昇した。特に NT-I 株懸濁液添加量を土壤重量に対して 100%、つまり土壤と同重量添加するとセレン不溶化率は 93%だった。NT-I 株懸濁液添加量が増加するとともにセレン不溶化率が上昇し、添加量 40%程で不溶化率が飽和しているように見えるのは添加量 40%で全ての粒子表面を濡らしたためだと推察する(図 8-5)。粒子径 1 mm~2 mm の模擬汚染土壌の表面を NT-I 株懸濁液で濡らすために 40%の添加が必要であるとすると、実際の掘削ずり処理するために必要な NT-I 株懸濁液はもう少し少量で良いと思われる。今回の試験では条件を合わせるために、掘削ずりを 1 mm~2 mm に整粒してから模擬汚染土壌を作製したが、元来の掘削ずりは小さくても数 cm オーダーの大きさであり、表面積は粒子径 1 mm~2 mm の 1/100 程になる。表面積が小さくなれば、全粒子を NT-I 株懸濁液で濡らすために必要な量が減るためコスト削減に繋がる。さらに掘削ずりを 1 mm~2 mm に整粒するには大きな労力が必要であり、元来の掘削ずりの大きさに NT-I 株によるセレン不溶化が生じればより一層のコスト削減に繋がる。大粒径ずりのセレン不溶化に必要な NT-I 株懸濁液について今後検討することが望まれる。

次いで培養温度がセレン不溶化率に与える影響を調べた。培養温度を 20°C、30°C、38°C に設定してセレン不溶化試験をおこなった。培養温度を 20~38°C に変えても、セレン不溶化率には有意な差はなく、試験をおこなった 3 つの条件でセレン不溶化率は 60%以上であった(図 8-4(c))。培養温度 38°C でセレン不溶化率は最大 75%と算出された。2020 年の東京の最高気温は 8 月の 37.3°C であり、NT-I 株であればこの気温でも死滅せずに土壤中のセレン

ンを不溶化できると推察される。しかし今回の試験のように土壌を恒温とするにはビニールハウス等で覆いヒーターを使う必要があるため、これらが必須となると処理コストの増加が懸念される。今後、昼夜や夏冬の気温を考慮したサイクル試験検討することが望まれる。

最後に NT-I 株懸濁液の初期 pH を 5.0 から 9.0 に変化させて、初期 pH がセレン不溶化率に及ぼす影響を調べた(図 8-4(d))。pH を 5.0 から 9.0 まで変化させてもセレン不溶化率は大きく変化することなく、試験をおこなった全ての条件で 65%以上だった。初期 pH9.0 のときにセレン不溶化率は最大 75%だった。現在、土壌中重金属の不溶化処理に多く使用されている鉄系不溶化剤の不溶化能力は pH によって大きく影響を受けるため、不溶化の前処理として pH 調整がおこなう必要が考えられる。本試験によって NT-I 株によるセレン不溶化は pH によって大きな影響を受けないという特長があることが示された。

これらの実験の結果から、セレン不溶化率が最も高い培養条件は、OD₆₆₀ = 1.0 の NT-I 株懸濁液を土壌重量の 100%添加し、培養温度 38°C で静置した場合であった。さらに NT-I 株は懸濁液中の NT-I 株濃度 OD₆₆₀=1.0 以上、培養液添加量 5%以上、培養温度 20~38°C、初期 pH5~9 の幅広い条件で土壌中のセレンを不溶化できることが示された。

8.3.3 異なる産地の模擬セレン酸汚染土壌不溶化試験

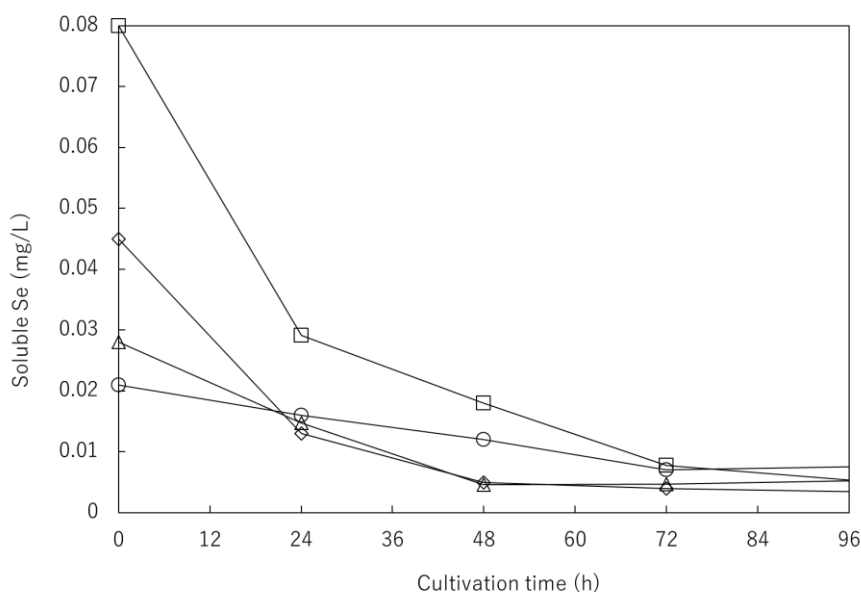


図 8-6 異なる産地の模擬セレン酸汚染土壌不溶化試験 □ : YM、◇ : NI、△ : FK、○ : CB

日本ではセレンとともに自然由来のヒ素や鉛が含有していることが多い。そこで掘削ざり採取場所の違いがセレン不溶化率に与える影響を調べるために、異なる産地で採取した掘削ざりで作製した模擬汚染土壌でセレン不溶化試験をおこなった。

まずはセレン酸を 0.09 mg・L⁻¹ 含まれる模擬汚染土壌 YM の不溶化試験をおこなった。模擬汚染土壌 YM に NT-I 株を添加すると、土壌溶出量が徐々に減少し、試験開始から 72

時間で環境基準以下となった(図 8-6)。模擬汚染土壌 YM の不溶化率は 93%と計算された。

次にセレン酸濃度が異なる模擬汚染土壌 FK のセレン不溶化試験をおこなった。 $0.03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ のセレン酸を含む模擬汚染土壌 FK に NT-I 株を添加すると土壌溶出量が徐々に減少し、48 時間で環境基準以下となった(図 8-6)。模擬汚染土壌 FK の不溶化率は 79%と計算された。不溶化剤の有効性は低セレン濃度で有意に低下する可能性があるが、NT-I 株の不溶化は低濃度でも可能であることが示唆された。

続いて自然由来のヒ素が含まれる模擬汚染土壌 NI のセレン不溶化試験をおこなった。 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ のヒ素と $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ のセレンを含む模擬汚染土壌 NI に NT-I 株を添加すると、土壌溶出量は徐々に減少し、48 時間で環境基準以下となった(図 8-6)。模擬汚染土壌 NI の不溶化率は 93%と計算された。この結果は、土壌中のセレンとヒ素の共存が NT-I によるセレンの不溶化に影響しないことが示唆された。

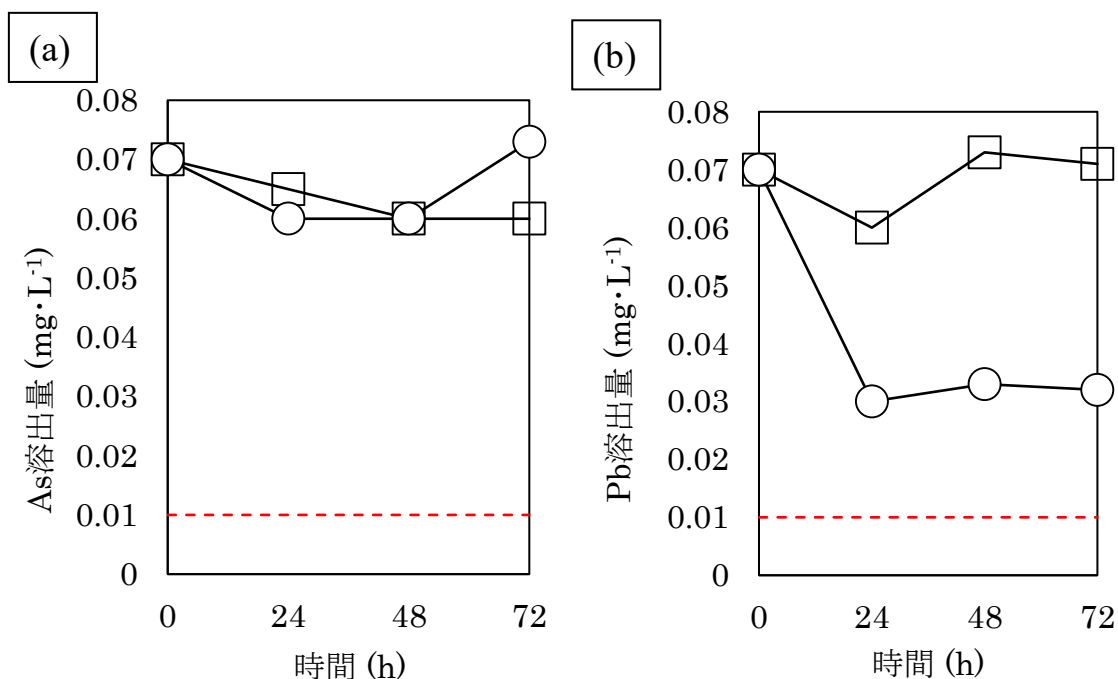


図 8-7 模擬セレン酸汚染土壌不溶化試験時のヒ素溶出量(a)、鉛溶出量(b)

□ : NT-I 株未添加、○ : NT-I 株添加

最後に自然由来のヒ素、クロム、鉛が含まれる模擬汚染土壌 CB のセレン不溶化試験をおこなった。 $0.07 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ のヒ素、 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ のクロム、 $0.06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ の鉛、 $0.03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ のセレンを含む模擬汚染土壌 CB (表 8-2) に NT-I 株を添加すると、土壌溶出量は徐々に減少し、72 時間で環境基準以下となった(図 8-6)。模擬汚染土壌 CB の不溶化率は 62%と計算された。土壌中のセレン、クロム及び鉛の共存は NT-I 株によるセレンの不溶化に影響しないことを示唆された。一方でセレン以外の元素に着目すると、無菌の TSB 培地を添加した対照実験では 72 時間後、ヒ素、鉛の溶出量は環境基準値 ($0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) を下回ることはなか

った (図 8-7)。しかし NT-I 株培養液を添加すると鉛溶出量は環境基準値に達しなかったものの初発時の約 60%まで低減した (図 8-7(b))。これは NT-I 株の代謝産物と鉛が反応し不溶性となったと推測される。4 県の土壤を用いた本セレン浄化試験では、NT-I 株培養液を添加することによってセレン溶出量は環境基準値以下になった。

8.3.4 処理土壤のスケールアップ

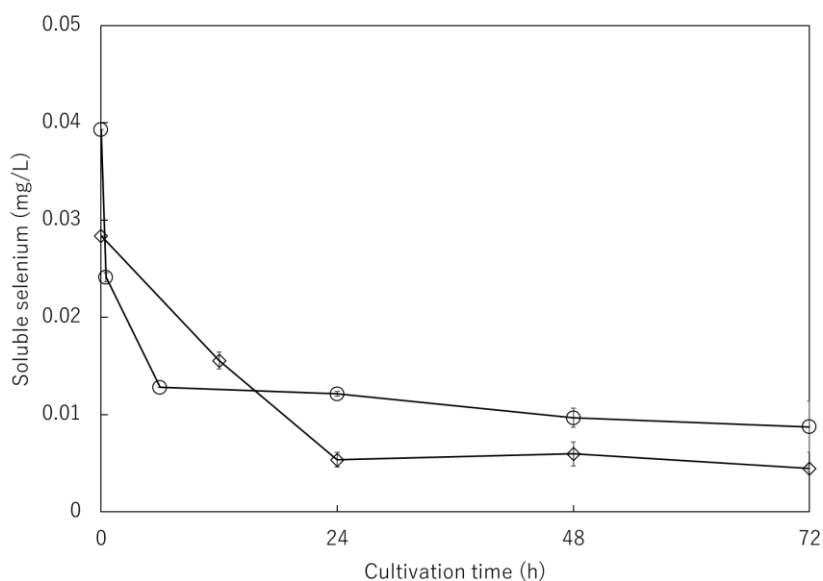


図 8-8 模擬汚染土壤 FK の処理スケール比較 ◇ : 1kg、○ : 100kg

これまで 100 g の少量土壤についてセレン不溶化効果を検討した (図 8-6)。実際に処理が必要な掘削ずりは数 ton 単位である。NT-I 株によるセレン不溶化処理の実用化を目指し、スケールアップ時のセレン不溶化効果を検討した。不溶化試験は模擬汚染土壤 FU を使用し、1 kg と 100 kg の土壤量を用いて試験した。模擬汚染土壤 FK 100 g に NT-I 株を添加すると土壤溶出量が徐々に減少し、48 時間で環境基準以下となった (図 8-6)。模擬汚染土壤 FK の不溶化率は 79% と計算された。次に 1 kg に NT-I 株を添加すると 24 時間以内に土壤溶出量は環境基準以下まで減少した (図 8-8)。不溶化率は 78% と算出された。模擬汚染土壤 100 kg に NT-I 株を添加しても同様の結果であり (図 8-8)、不溶化率は 78% と算出された。これらの結果から、100 kg での所要時間と不溶化速度は 100 g と同様の傾向が見られた。NT-I 株を用いた土壤中のセレン不溶化処理は土壤重量に影響を及ぼさないことが示唆された。

7.3.5 処理土壌のスケールアップ

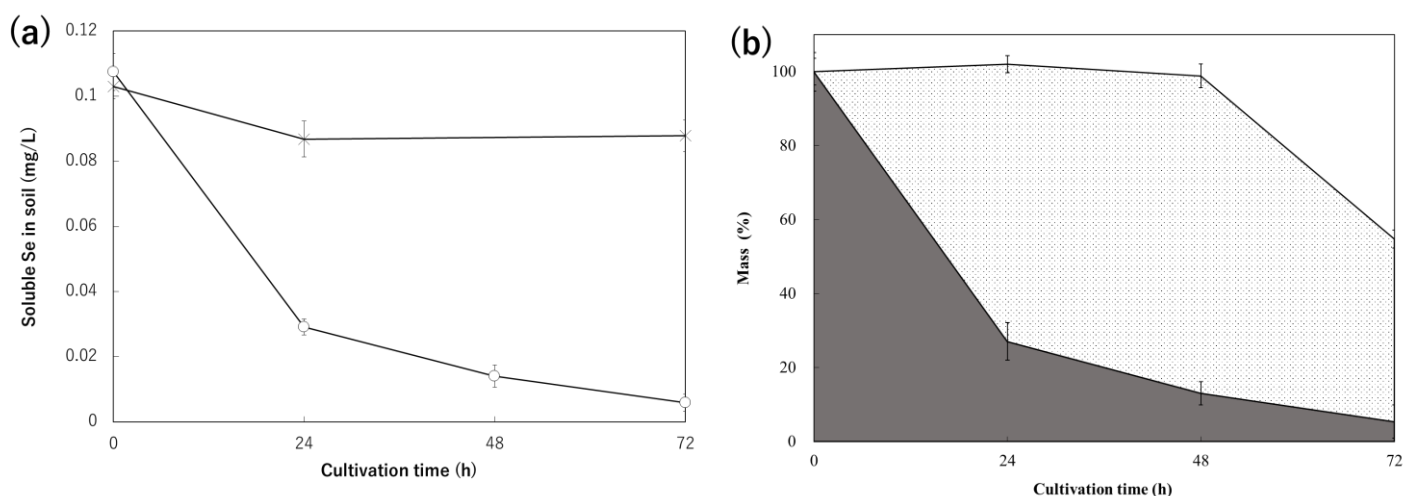


図 8-9 模擬汚染土壌 YM の土壌浄化試験 (a) 土壌溶出量の時間推移○：NT-I 株添加、×：滅菌培地添加 (NT-I 株未添加) (b) マスバランス 黒色：可溶性セレン、網掛け：不溶性セレン

NT-I 株は水溶液中ではセレン酸を不溶性の元素態セレンへ還元し、さらに元素態セレンを DMDSe まで還元する。NT-I 株は土壌中の土壌溶出量を低減しているため、土壌中のセレン酸を少なくとも元素態セレンまで還元していることが示唆された。土壌中のセレンも同様な還元プロセスをたどるのかを調べるためにエネルギー分散型 EDX 分析により土壌中で合成されたセレン元素の観察を試みたが、元素態セレンは観察できなかった。その理由としては、試験に用いた土壌に添加したセレン濃度が低く、EDX の検出限界以下であったのではないと思われる。そこで、土壌中の可溶性セレンの相変化を調べるため、NT-I 株添加後の模擬汚染土壌中のセレン相変化を経時的に調べた (図 8-9)。これまでの試験結果から、 $\text{OD}_{660} = 1.0$ の初期 pH9.0 の NT-I 株懸濁液を土壌重量の 100% 添加し、培養温度 38°C で保温すると、セレン不溶化効果が最大になることを明らかにした。日本の地下水環境基準は pH 6.5~8.5 であり、環境汚染につながる可能性があるため土壌浄化に pH 9.0 の培地を使用することは難しいと考え、pH 7.0 の菌懸濁液を用いてセレンの化学変化を調べた。

模擬汚染土壌 YM に NT-I 株を添加すると 72 時間で環境基準値を達成した。一方で滅菌培地を添加した場合にはセレン濃度にはほぼ変化がなかった (図 8-9(a))。NT-I 株を添加した土壌中の可溶性および不溶性セレン濃度を経時的に測定した (図 8-9(b))。NT-I 株の添加により 24 時間後の可溶性セレン濃度が著しく低下し、不溶性セレン濃度が増大した。NT-I 株添加後 72 時間までに、94% の可溶性セレンが除去された。この除去率はこれまで試験した条件の中で最高値であった。また模擬汚染土壌 YM に NT-I 株を添加後 48~72 時間の間に、不溶性ならびに可溶性セレンの両方の量の有意な減少が認められた。72 時間後には初期濃度の約 5% が可溶性セレンとして検出され、49% が不溶性セレンとして検出された。したがって、初期土壌中の可溶性セレンの約 46% はおそらく土壌から除去されたものと思

われる。試験土壌の気相を分析したが、気相中のセレン濃度が GC-MS の検出限界以下であったため DMDSe は検出できなかった。しかしこれまでの知見から NT-I 株は水溶液中で初期セレン濃度の 82% を 48 時間で DMDSe として揮発させることができるほどセレン気化能力が高いため、土壌から除去されたセレンは元素態セレンを経て DMDSe まで還元され揮発したものと推測される。NT - I 株の DMDSe 合成能は通気量に強く影響され、通気なしのフラスコ試験の DMDSe 回収率は 76% であるが、ジャーファーメンターによる強制通気にした場合、回収率は 82% に増加した。したがって土壌に空気をポンプによって送ることで、NT-I 株による土壌中セレン除去を促進できる可能性がある。

自然に存在する日本のセレン汚染土壌中の可溶性セレン濃度は低く、多くても $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ である [20], [22], [109]。 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ セレンで汚染された土壌については、初期セレン濃度の 50% 以上を不溶化できれば、環境基準の $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下を満たせる。本試験の試験条件下では、培養温度や初期 pH にかかわらず、土壌重量に対して 10% の $\text{OD}_{660} = 1.0$ の NT-I 懸濁液を加えることで、セレン不溶化率は 60% 以上だったため環境基準値を達成できると推測される。このように NT-I 株は日本における自然発生セレン汚染土壌の浄化のための最も有効な細菌である。

セレン汚染土壌の鉄系薬剤による不溶化処理は、土壌中のセレンの溶解度を低下させるために健康被害を軽減できるが、生じた不溶化物を土壌からは除去できない。不溶化処理以外には、洗浄液によって土壌からセレンを除去する洗浄処理という方法もある [122], [123]。洗浄処理にとってセレンを除去した土壌は再利用できる。しかし、低濃度のセレンを含む廃水が大量に発生する可能性があり、生じた廃液を大規模に浄化する必要が生じる。また、洗浄液にキレート剤や溶剤を使用すると、廃水中の可溶性セレンを除去することがさらに困難になる。NT - I 株の散布によるセレン汚染土壌の生物学的処理は、土壌中の可溶性セレンを不溶性元素セレンに還元し、汚染土壌からのセレン溶脱を防ぐことができる。さらに、セレンを揮発性 DMDSe に還元することで、土壌から除去し、その後の土壌の再利用を可能にすると推察される。

8.3.7 土壤含有量試験（環境省告示 19 号試験）

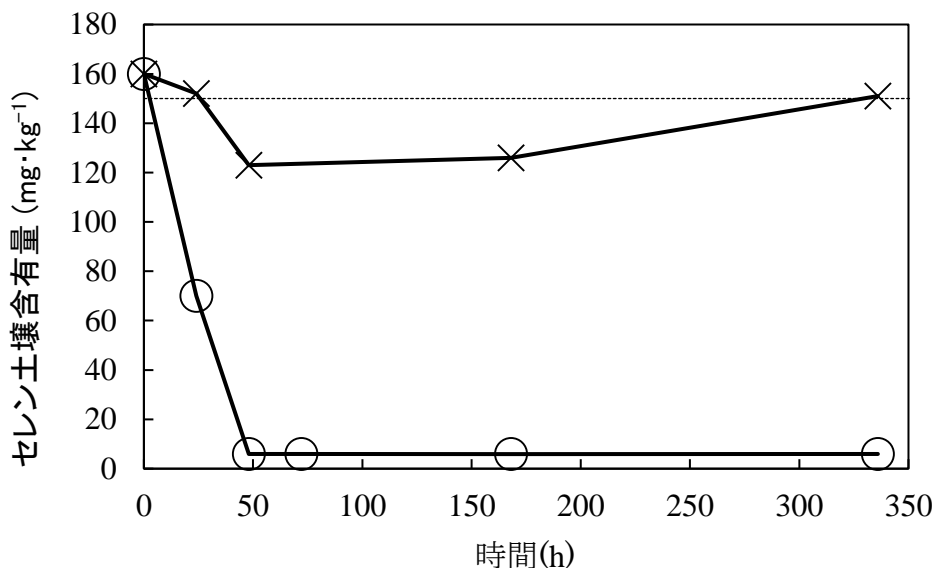


図 8-10 土壤含有量超過土壤のセレン不溶化試験 点線：土壤含有量基準値
×：NT-I 株未添加、○：NT-I 株添加

土壤溶出量超過土壤に関して NT-I 株が適用できることを明らかにした。土壤含有量は溶出溶媒に希塩酸を使用することから、土壤溶出量よりも多くの重金属量が溶出する傾向がある。土壤溶出量と土壤含有量には経験則的な相関が見られない。そのため土壤溶出量が基準値以内であっても土壤含有量が基準を超過する例もある。そこで土壤溶出量試験同様に含有量試験についても NT-I 株によって処理が可能かを検証した。土壤 YM にセレン酸を土壤含有量超過となるように添加し、模擬汚染土壤を作製しセレン不溶化試験をおこなった（図 8-10）。NT-I 株無添加（TSB 培地のみ）の場合、48 時間目には含有量が下がり基準値未満となったが、336 時間には基準値以上となった。この含有量の増減はサンプリング場所による実験誤差だと考える。一方で NT-I 株培養液を添加すると初期値 $159 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ から 24 時間後では、 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ に低減したことから基準値以下となった。48 時間目には含有量が $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ に低減し、以降 336 時間目まで基準値以下を維持した。以上の結果から NT-I 株は土壤含有量超過した土壤にも適用できることが示唆された。

8.4 要約

本章では NT-I 株を利用した土壌浄化についての知見を得るために、模擬汚染土壌を使用したセレン不溶化試験をおこなった。

このセレン不溶化試験によって NT-I 株は懸濁液中の NT-I 株濃度 $OD_{660}=1.0$ 以上、培養液添加量 5%以上、培養温度 $20\sim 38^{\circ}\text{C}$ 、初期 $\text{pH}5.0\sim 9.0$ の幅広い条件で土壌中のセレンを不溶化できることが示された。特に $OD_{660} = 1.0$ の NT-I 株懸濁液を土壌重量の 100%添加し、培養温度 38°C で静置した場合にセレン不溶化率が試験した中で最も高いことがわかった。土壌成分の異なる 4 県の土壌において、NT-I 株によるセレン不溶化効果が見られた。また実際の処理土壌量を考慮して、NT-I 株による処理スケールアップを試みたところ、100kg の土壌においてセレン不溶化効果を確認できた。これらの結果は NT-I 株が水溶液中だけでなく、土壌中でもセレン酸を還元できることを示唆している。さらに土壌中のセレン相変化を調べたところ、NT-I 株を添加して 72 時間目には不溶化セレンだけでなく、 DMDSe を合成し土壌中のセレンを大気へ揮発除去していることが示唆された。これは既存の不溶化薬剤にはない特長であり、NT-I 株によって処理された土壌の再利用可能性を示している。さらに土壌含有量を超過した模擬汚染土壌に対して、セレン不溶化試験をおこない 24 時間で基準を達成できることがわかった。

本章の試験結果から NT-I 株は水溶液中のセレン回収再資源化のみならず、土壌浄化プロセスに応用できることが明らかになった。さらに幅広い培養条件で土壌中のセレンを不溶化できることから、日本全国で利用できる可能性がある。本研究は微生物処理による土壌不溶化を考える上での重要な知見となる。

第9章 総論

本学位論文では廃水・廃棄物からのセレンの浄化回収と資源化を目的として *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株のセレノオキシアニオン還元特徴を明らかにし、バイオプロセスによるセレン浄化回収と資源化技術開発をまとめたものである。

第1章ではレアメタルであるセレンについて、第2章では現在のセレン処理工程及び現在までに報告されているセレン酸還元生物による処理工程について概観し、以下の知見を得た。セレン酸還元細菌の多くは嫌氣的にセレン還元をおこなっており、酸素がセレン酸還元を阻害している。しかし NT-I 株は好氣的にセレン還元をおこなうため、酸素がある状態でも大きな阻害を受けない。この特徴から多様な処理方法に応用できると期待されている。さらに NT-I 株を使った UASB 方式によりセレン酸 $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ を5日、亜セレン酸 $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ も5日程度で排水基準 ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 以下まで除去することに成功している。UASB 方式では除去されたセレンは元素態セレンとして繊維状担体に蓄積されたが、再資源化には至っていない。これまで NT-I 株のセレン還元特徴が調べられており、廃水への浄化適用がなされている。これらの報告は浄化処理のみ記載されており、回収再資源化まで踏み込んだ報告は調べた限り見当たらず、その可能性を示すにとどまっている。またセレノオキシアニオン還元が連続的に行われているために、亜セレン酸還元と DMDS_{Se} 合成速度をフラスコレベルで測定することが難しいために、詳細な還元特徴が明らかになっていないという問題がある。

第3章ではセレン酸、亜セレン酸還元に影響する培養条件因子の検討をおこなった。5L ジャーファーメンターを使い培養条件を制御した還元試験によって NT-I 株のセレン酸還元能力が $30\text{-}42^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH}6.0\text{-}9.5$ 、攪拌速度 $100\text{-}300 \text{ rpm}$ 、通気 $0\text{-}5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ で発揮されることを明らかにした。特にその中でも 38°C 、 $\text{pH}7.5$ 、 120 rpm 、 $0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ でセレン酸還元速度最高値 $8.8 \times 10^{-16} \text{ mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$ を得た。亜セレン酸還元能力も $30\text{-}42^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH}6.0\text{-}9.5$ 、攪拌速度 $100\text{-}300 \text{ rpm}$ 、通気 $0\text{-}5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ で発揮されることを明らかにした。中でも 38°C 、 $\text{pH}9.0$ 、 250 rpm 、 $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ で最高値 $8.8 \times 10^{-17} \text{ mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$ を得た。通気量や攪拌速度を増すと培養液中の溶存酸素量が大きくなり、その結果セレン酸還元速度は減少した。逆に溶存酸素量が大きくなると、亜セレン酸還元速度は増大した。以上の結果から NT-I 株では亜セレン酸還元速度最高値がセレン酸還元速度よりも小さく、亜セレン酸還元反応が律速となっているため 38°C 、 $\text{pH}9.0$ 、 250 rpm 、 $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ を最適培養条件と定義した。本研究で求めた最適培養条件でのセレノオキシアニオン還元に要する時間は黒田らが報告した培養条件と比較して、16時間短縮できることを明らかにした。次に、NT-I 株によって還元、回収したバイオセレンについて特徴づけをおこない、バイオセレンがアモルファスもしくは三方晶系セレンであることを明らかにした。回収したバイオセレンは市販のアモルファ

スセレンもしくは三方晶系セレンよりも純度が低く、セレン資源として利用するにはさらなる精製の必要があるといった課題が残った。

第4章では廃水中のセレンから DMDS_e を合成、揮発化、回収すべく NT-I 株の気化セレン合成特徴付けをおこなった。まず NT-I 株の気化基質を調べ、NT-I 株はバイオセレンだけでなく結晶セレンからでも DMDS_e を合成できることを明らかにした。さらにバイオセレン中に DMDS_e を合成促進する物質が含まれること、結晶セレンよりもアモルファスの方が DMDS_e 合成を促進することを明らかにした。ジャーファーメンターを使用した NT-I 株セレン気化試験によって培養温度 30-42°C、pH6.0-9.0、攪拌速度 100-300 rpm、通気量 0.5-5 L·min⁻¹ という幅広い条件で DMDS_e を合成することがわかった。さらに DMDS_e 合成最大速度は 38°C、pH9.0、250 rpm、1 L·min⁻¹ で $8.8 \times 10^{-17} \text{ mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1}$ と算出できた。NT-I 株を予め増殖した後に、攪拌を行いながら通気を止めた 0 L·min⁻¹ 条件では気化速度が顕著に下がったことから、嫌気条件では DMDS_e は合成阻害されることがわかった。この知見は廃水中のセレンを回収する際に重要であり、嫌気条件下で効率的に固化セレンを回収、好気条件下で効率的に DMDS_e を気化セレンとして回収できることが示唆された。

以上、第3章～4章において NT-I 株のセレノオキシアニオン還元の特徴付けをおこない、NT-I 株を利用した廃水からのセレン回収の実現可能性を示した。

第5章では廃水からのセレン回収・再資源化プロセスを考案し、実証するための検討をおこなった。第3章において DMDS_e が嫌気条件で合成阻害されることからセレンを固化回収するためには、予め培養した後に通気を止め、セレン酸含有廃水を添加するという固化回収方法を考案し、実証試験を行った。模擬廃水を用いた場合 22 時間で初期セレン濃度の 87.8%、実廃水からは 22 時間で初期セレン濃度の 78.8% を固化回収することに成功した。さらに回収したバイオセレンを酸化焙焼で精製再資源化を試みた。熱力学計算では焙焼温度 700°C においてバイオセレンから二酸化セレンを気体として抽出できることが示唆された。そこで実際にバイオセレンを酸化焙焼し、50 mL·min⁻¹、700°C の条件でバイオセレンから最大純度 96-97% を二酸化セレンとして回収することに成功した。次いで二酸化セレンをアスコルビン酸や亜硫酸ナトリウムで還元することにより純度 99% 以上の元素態セレンを精製することに成功した。この酸化焙焼による回収効率はバイオセレン中のセレン結晶状態に依存しないことがわかった。つまり浄化回収を複数回おこないバイオセレンを貯蔵し、一度に酸化焙焼することで資源化プロセスを簡単にすることができる。本プロセスは世界で初めて廃水から固化セレンを浄化回収再資源化した開発例である。

第6章では気化セレン回収プロセスを考案し、実証した。セレノオキシアニオン還元最適条件にて培養をおこない、揮発した DMDS_e をジャーファーメンターの排気口に繋いだガラス瓶内の硝酸溶液に回収することにした。模擬廃水からは 120 時間で初期濃度の 71.2%、実廃水からは 120 時間で初期濃度の 38.9% を回収することに成功した。回収したセレンは

メチルセレン酸として硝酸に溶解された。夾雑物として硫黄のみがごくわずかに検出され、純度が市販品よりも低いという問題が残った。そこで硝酸中のメチルセレン酸を酸化還元することで、純度 99%以上の元素態セレンに精製した。本プロセスは世界で初めて廃水から気化セレンを浄化回収再資源化した事例である (図 9-1)。

第 4 章～5 章において廃水からのセレン回収再資源化を試み、模擬廃水と実廃水から回収再資源化に成功した。固化回収は通気量を変更すること、固液分離をすること、それに伴う装置コストはかかるが、短時間でセレンを回収できる。気化回収は培養条件を変更するなど煩雑な操作は必要ないが、セレン回収まで長時間を要する。セレン含有排水を高い頻度で定期的処理する場合には気化回収、排水頻度が低い場合は固化回収を利用することが適していると考えられる (図 9-1)。

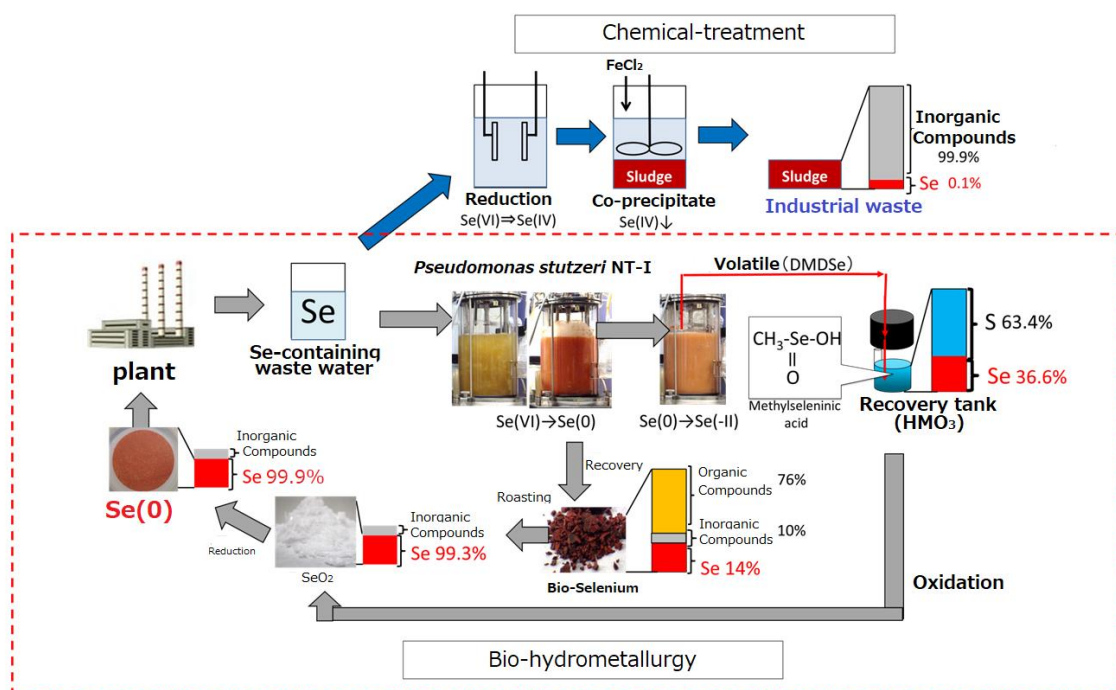


図 9-1 NT-I 株によるバイオプロセスを使ったセレン回収再資源化方法の概要

第 7 章では都市鉱山となり得る太陽光パネル製品からのセレンおよび、その他のレアメタルの分離回収を試みた。まず CIGS 系統の製品を破碎し、酸消化した。酸消化後に pH9 に中和調整することで上清に Ga と Se、沈殿に Cu と In が分離した。次いで Ga と Se を含む上清を NT-I 株で処理することで上清に Ga、沈殿もしくは気相にセレン Se が分離した。これら分離した Cu、In、Ga は既に分離後の精製方法が確立しており、Se は本報告による酸化焙焼によって再資源化が可能であることを示した。本実施例は世界で初めて多元素含有実廃棄物（実製品）からセレンを含む主要元素を浄化回収した事例である。

第 8 章では NT-I 株を土壌浄化に活用すべく、セレン模擬汚染土壌を用いてセレン不溶化

試験をおこなった。第3章～7章までは主として廃水からのセレン浄化回収試験研究を行った。本章の試験結果から NT-I 株は水溶液中のセレン回収再資源化のみならず、土壌浄化プロセスにも応用できることを明らかにした。セレン土壌浄化法は不溶化工法を参考に、不溶化薬剤の代わりとして NT-I 株懸濁液を土壌に添加した。NT-I 株による 100g スケールのセレン不溶化試験によって、NT-I 株は懸濁液中の NT-I 株濃度 $OD_{660}=1.0$ 以上、培養液添加量 5%以上、培養温度 20～38℃、初期 pH5.0～9.0 の幅広い条件で土壌中のセレンを不溶化できることがわかった。また 100kg のスケールアップ試験でも、100 g スケールと処理時間、不溶化効率ともに同じく土壌不溶化できたことから、実証試験での NT-I 株処理の適用を計画している。さらに土壌中のセレン相変化を調べたところ、NT-I 株を添加して 72 時間目には不溶化セレンだけでなく、 $DMDS_{Se}$ を合成し土壌中のセレンを大気へ揮発除去していることが示唆された。これは既存の不溶化薬剤にはない特長であり、NT-I 株によって浄化処理された土壌の再利用可能性が示唆された。セレン汚染によって今まで遮水工法による埋め立てしか選択できなかった汚染土壌処理に対して、微生物によるセレン処理が可能となることで工法の実用性が広がると思われる。さらに NT-I 株による処理と吸着層工法や不溶化工法を併用することで、セレン含有汚染土壌を盛土材のように資源として再利用できる。

本論文で得られた知見は産業におけるセレンを含有する廃水・廃棄物・土壌の処理に大きく寄与するとともに、社会におけるセレン資源の循環利用の促進、さらに土壌資源の循環利用につながるものと大いに期待される。

今後の展望

本論文では物理化学処理と比較して常温常圧の穏やかな反応を有するバイオプロセスによって廃水廃棄物からセレンの浄化回収再資源化を検討し、実証した。しかしバイオプロセスを廃水処理に実際に用いるにはいくつかの課題がある。最も大きい課題は微生物の扱いに長けている人材の確保であり、現時点では誰でも簡単に使える技術ではない。しかし本論文で実証したバイオプロセスを根幹に置き他技術と組み合わせることで、この課題は解決できるものと考えられる。

具体的にはバイオプロセスを使った廃水処理を汎用するためには微生物固定化技術の利用が考えられる。NT-I 株をアルギン酸ナトリウムとポリアクリルアミドの二重カプセルに封入し、セレン酸溶液からセレン酸の除去を検討している[124]。この技術が実用化されればカプセルをセレン廃水に投入するだけで、誰でも簡単にセレンを浄化回収できる。この報告の中で(3-アクリルアミドプロピル)トリメチルアンモニウムクロリド(APTAC)のアクリルアミド単量体を使用したカプセルはセレン酸を 50 時間で除去できた。溶液中のセレン酸は 4 級アミン部分に吸着されていると推測されている。4 級アミン部分に吸着されたセレン酸が NT-I 株によって元素態セレンまで還元されるかは言及されていない。しかし二重カプセル内をイオンが移動できることから、カプセル内の NT-I 株とセレン酸イオンが接触する確率は高く、二重カプセル内で無毒な元素態セレンまで還元できる可能性が高い。さらにセレンを回収した後の有機物処理も不要にできると期待される。本学位論文第 7 章では NT-I 株のセレノオキシアニオン還元速度を上げるために栄養豊富な完全培地を用いて試験した。使用した完全培地は有機物を多く含有するために化学的酸素要求量 (COD)、生物学的酸素要求量 (BOD) が高くなり溶液中有機物の排水処理が別途必要となる。この二重カプセルを使用すれば、廃水に NT-I 株を増殖させるため完全培地を添加する必要がないために、セレン浄化後の有機物処理は必要なくなる。さらにカプセル内の溶存酸素は少ないと推測されるので、NT-I 株による DMDS_e 合成が阻害されると推測される。したがってセレン酸や亜セレン酸は元素態セレンのままに維持され、元素態セレンとしてカプセル回収できる。以上のことから、二重カプセル法によるバイオプロセスはレアメタル回収の簡易な方法であり、実用化に向けてのさらなる検討が必要である。

本論文ではセレンの代謝メカニズムを詳細に解明するに至らず、報告できなかった。NT-I 株のゲノム DNA の塩基配列は決定されているため (未公表)、分子生物学的アプローチにより NT-I 株のセレン代謝メカニズムは近い将来解明できる可能性がある。レアメタルの代謝メカニズムの解明は新たなバイオプロセスの開発につながる。NT-I 株のゲノム DNA からセレンメチル化に関わる遺伝子を網羅的に探索し、遺伝子クローニング後、メチル化遺伝子を大腸菌を形質転換することによって、DMDS_e 合成に関わる遺伝子や酵素を特定できると考える。DMDS_e 合成に関わる遺伝子を同定しリアルタイム PCR など発現解析することで、なぜ嫌気的条件下では DMDS_e は合成されないのかという疑問を解決できる。さらに亜セレン酸還元酵素やセレンメチル化酵素の単離、特徴解析や反応メカニズムを解明し、これ

ら酵素の基質結合部位や触媒活性部位を改変することによって、活性能力を増強することも可能かもしれない。引いては他のレアメタルへの応用が期待できる。これらレアメタルを代謝する酵素・遺伝子や反応メカニズムが解明できれば、その酵素を精製し酵素製剤としての利用も可能となる。酵素製剤の取り扱いにも化学の知識が必要ではあるが、微生物を扱うよりは酵素製剤の方が一般的には扱い易い。今後セレンの代謝メカニズムを解明することにより、バイオプロセスを活用した環境浄化と資源リサイクルという循環型社会の構築が期待できる。

本論文ではセレン代謝細菌 NT-I 株によるセレンの相変化（水相→固相→気相）を浄化回収に利用した。自然界の元素循環には相変化を伴う微生物の代謝が関係している。セレンを例にとると、土壌中の水溶液に含まれる Se(VI) 、 Se(IV) は微生物等によって元素態セレンへと還元され、固体となる。固相の元素態セレンから DMSe や DMDSe 、 H_2Se が合成されて気相へ移動する。その後大気中のオゾンによって Se(VI) や Se(IV) に酸化され、雨に溶解して再度地上へと降り注ぐと推測されている[125]。セレン以外のレアメタルを代謝する微生物（ヒ素[126], [127]、テルル[13]、マンガン[128]代謝微生物など）も発見されている。これらのレアメタルも産業にとって有益だが毒性を持つため、バイオプロセスを用いた回収再資源化の実用化は進んでいない。今後、セレン同様に、各々のメタルに特徴的な代謝微生物を探索、育種することによって、バイオプロセスを用いた回収再資源化が期待される。

参考文献

- [1] J. Sachs, C. Kroll, G. Lafortune, G. Fuller, and F. Woelm, *Sustainable Development Report 2021*, 1st ed. Cambridge University Press, 2021. doi: 10.1017/9781009106559.
- [2] T. Takagi, “Securing a stable supply of critical raw metals,” *Synthesiology English edition*, vol. 9, no. 1, pp. 16–26, 2016, doi: 10.5571/syntheng.9.1_16.
- [3] “レアメタル・レアアース（リサイクル優先5鉱種）の現状,” 経済産業省資源エネルギー庁 非鉄金属課 鉱物資源課, 日本, May 2014. [Online]. Available: https://www.meti.go.jp/shingikai/sankoshin/sangyo_gijutsu/haikibutsu_recycle/pdf/026_04_00.pdf
- [4] Y. Ichinohe, “Study of ZnSe layer and transparent ITO electrode for CIGS solar cell,” *Bulletin of Hokkaido University of Science*, vol. 48, pp. 47–50, Sep. 2020.
- [5] 中田時夫, *CIGS 太陽電池の基礎技術*, 1st ed. 東京、日本: 日刊工業新聞社, 2010.
- [6] H. Homma, “Policies and Initiatives on the Natural Resource Supply by means of Science and Technology,” *表面科学*, vol. 35, no. 1, pp. 58–60, 2014, doi: <https://doi.org/10.1380/jsssj.35.58>.
- [7] H. S. Washington, “The chemistry of the earth’s crust,” *Journal of the Franklin Institute*, vol. 190, no. 6, pp. 757–815, Dec. 1920, doi: 10.1016/S0016-0032(20)90061-3.
- [8] T. Hoshino, “Realization of next generation technology for lithium resource cycle society,” *Journal of the Atomic Energy Society of Japan*, vol. 59, no. 9, pp. 510–514, 2017, doi: https://doi.org/10.3327/jaesjb.59.9_510.
- [9] Y. Matsumoto, A. Suzuki, Y. Chiba, and T. Arai, “A Propose of the High Efficiency Extraction Process for Rare Metals from Urban Mine using Triphenylphosphine Extractant,” *Journal of the Mining and Materials Processing Institute of Japan*, vol. 131, no. 8_9, pp. 481–486, 2015, doi: 10.2473/journalofmmij.131.481.
- [10] H. Takahashi *et al.*, “‘Urban Mines’ Recycling in Astec-irie Co., Ltd.,” *J. Japan Inst. Metals*, vol. 85, no. 8, pp. 279–284, Aug. 2021, doi: 10.2320/jinstmet.JA202103.
- [11] T. H. Okabe, “Challenge and Vision of Environment and Recycling Technologies for Rare Metals,” *Materia Japan*, vol. 56, no. 3, pp. 157–160, 2017, doi: 10.2320/materia.56.157.
- [12] T. Nakamura, “Toward to Establish a Sound Resource Recycling Society,” *J. Surf. Sci. Soc. Jpn.*, vol. 35, no. 10, pp. 577–579, 2014, doi: 10.1380/jsssj.35.577.

- [13] T. Horiike, O. Otsuka, Y. Tanaka, T. Terahara, C. Imada, and M. Yamashita, “Diversity of salt-tolerant tellurate-reducing bacteria in a marine environment,” *J. Gen. Appl. Microbiol.*, vol. 65, no. 5, pp. 246–253, 2019, doi: 10.2323/jgam.2018.11.003.
- [14] K. Kawarazaki, “Water Pollution Control Act,” *Jpn. J. Pestic. Sci.*, vol. 40, no. 2, pp. 223–228, 2015, doi: 10.1584/jpestics.W15-23.
- [15] “水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準等の施行等について (通知),” 環境省水・大気環境局, 日本, May 2020. [Online]. Available: <https://www.env.go.jp/water/impure/nt2005281.pdf>
- [16] P. Srivastava and M. Kowshik, “Anti-neoplastic selenium nanoparticles from *Idiomarina* sp. PR58-8,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 95, pp. 192–200, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.08.002.
- [17] J. K. MacFarquhar, “Acute Selenium Toxicity Associated With a Dietary Supplement,” *Arch Intern Med*, vol. 170, no. 3, p. 256, Feb. 2010, doi: 10.1001/archinternmed.2009.495.
- [18] M. Bajaj, E. Eiche, T. Neumann, J. Winter, and C. Gallert, “Hazardous concentrations of selenium in soil and groundwater in North-West India,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 189, no. 3, pp. 640–646, May 2011, doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.01.086.
- [19] *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. Washington, D.C.: National Academies Press, 2000, p. 9810. doi: 10.17226/9810.
- [20] T. Mizutani, K. Kanaya, and T. Osaka, “Map of Selenium Content in Soil in Japan.,” *Journal of health science*, vol. 47, no. 4, pp. 407–413, 2001, doi: 10.1248/jhs.47.407.
- [21] H. Yamada, A. Kamada, M. Usuki, and J. Yanai, “Total selenium content of agricultural soils in Japan,” *Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 55, no. 5, pp. 616–622, Oct. 2009, doi: 10.1111/j.1747-0765.2009.00397.x.
- [22] Y. Kang, N. Nozato, K. Kyuma, and H. Yamada, “Distribution and forms of selenium in paddy soil,” *Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 37, no. 3, pp. 477–485, Sep. 1991, doi: 10.1080/00380768.1991.10415061.
- [23] Y. Kang, H. Yamada, K. Kyuma, and T. Hattori, “Speciation of selenium in soil,” *Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 39, no. 2, pp. 331–337, Jun. 1993, doi: 10.1080/00380768.1993.10417004.
- [24] T. Hosokawa, K. Sugai, and M. Yamazaki, “Identification and Countermeasure of Tunnel Excavation Muck Leaching Heavy Metal-Yukisawa-Daini-Tunnel, in Nihonkai-Engan Tohoku Expressway from Oodate to Kosaka Section-,” *Journal*

- of the Japan Society of Engineering Geology, vol. 47, no. 6, pp. 346–353, 2007, doi: 10.5110/jjseg.47.346.
- [25] Y. Itaya and K. Kuninishi, “Development of selenium insolubilized material eluted from tunnel excavation rock,” *Jiban Kogaku Janaru*, vol. 15, no. 3, pp. 435–440, Sep. 2020, doi: 10.3208/jgs.15.435.
- [26] C. Wang, “Selenium minerals and the recovery of selenium from copper refinery anode slimes,” *J. South. Afr. Inst. Min. Metall.*, vol. 116, no. 6, pp. 593–600, 2016, doi: 10.17159/2411-9717/2016/v116n6a16.
- [27] A. Masuda, “Recent Situation and Future Prospects of Photovoltaics,” *Nippon gomu kyokaishi*, vol. 84, no. 5, pp. 153–160, 2011, doi: 10.2324/gomu.84.153.
- [28] “Best Research-Cell Efficiency Chart,” *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*. <https://www.nrel.gov/pv/assets/pdfs/best-research-cell-efficiencies-rev210726.pdf> (accessed Jan. 02, 2022).
- [29] F. Ahmad, A. Lakhtakia, and P. B. Monk, “Double-absorber thin-film solar cell with 34% efficiency,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 117, no. 3, p. 033901, Jul. 2020, doi: 10.1063/5.0017916.
- [30] A. S. Mueller and J. Pallauf, “Compendium of the antidiabetic effects of supranutritional selenate doses. In vivo and in vitro investigations with type II diabetic db/db mice,” *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 17, no. 8, pp. 548–560, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.10.006.
- [31] A. S. Muller, E. Most, and J. Pallauf, “Effects of a supranutritional dose of selenate compared with selenite on insulin sensitivity in type II diabetic dbdb mice,” *J Anim Physiol Anim Nutr*, vol. 89, no. 3–6, pp. 94–104, Apr. 2005, doi: 10.1111/j.1439-0396.2005.00559.x.
- [32] S. Biswas, G. Talukder, and A. Sharma, “Selenium salts and chromosome damage,” *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 390, no. 3, pp. 201–205, May 1997, doi: 10.1016/S1383-5718(97)00004-1.
- [33] K. Baek, N. Kasem, A. Ciblak, D. Vesper, I. Padilla, and A. N. Alshawabkeh, “Electrochemical removal of selenate from aqueous solutions,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 215–216, pp. 678–684, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.cej.2012.09.135.
- [34] K. Tokunaga and Y. Takahashi, “Effective Removal of Selenite and Selenate Ions from Aqueous Solution by Barite,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 51, no. 16, pp. 9194–9201, Aug. 2017, doi: 10.1021/acs.est.7b01219.
- [35] N. Börsig, A. C. Scheinost, S. Shaw, D. Schild, and T. Neumann, “Retention and multiphase transformation of selenium oxyanions during the formation of

- magnetite *via* iron(II) hydroxide and green rust,” *Dalton Trans.*, vol. 47, no. 32, pp. 11002–11015, 2018, doi: 10.1039/C8DT01799A.
- [36] “太陽光発電設備のリサイクル等の推進に向けた ガイドライン (第二版),” 環境省 環境再生・資源循環局 総務課 リサイクル推進室, 日本. Accessed: Jan. 02, 2022. [Online]. Available: <https://www.env.go.jp/press/files/jp/110514.pdf>
- [37] M. Kuroda *et al.*, “Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 112, no. 3, pp. 259–264, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.05.012.
- [38] L. Lortie, W. D. Gould, S. Rajan, R. G. L. McCready, and K.-J. Cheng, “Reduction of Selenate and Selenite to Elemental Selenium by a *Pseudomonas stutzeri* Isolate,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 58, no. 12, pp. 4042–4044, Dec. 1992, doi: 10.1128/aem.58.12.4042-4044.1992.
- [39] M. Morita, H. Uemoto, and A. Watanabe, “Reduction of Selenium Oxyanions in Wastewater Using Two Bacterial Strains,” *Eng. Life Sci.*, vol. 7, no. 3, pp. 235–240, Jun. 2007, doi: 10.1002/elsc.200620188.
- [40] J. T. Leaver, D. J. Richardson, and C. S. Butler, “*Enterobacter cloacae* SLD1a-1 gains a selective advantage from selenate reduction when growing in nitrate-depleted anaerobic environments,” *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 35, no. 8, pp. 867–873, Aug. 2008, doi: 10.1007/s10295-008-0359-0.
- [41] J. Ma, D. Y. Kobayashi, and N. Yee, “Chemical Kinetic and Molecular Genetic Study of Selenium Oxyanion Reduction by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, no. 22, pp. 7795–7801, Nov. 2007, doi: 10.1021/es0712672.
- [42] P. Bao, H. Huang, Z.-Y. Hu, M. M. Häggblom, and Y.-G. Zhu, “Impact of temperature, CO₂ fixation and nitrate reduction on selenium reduction, by a paddy soil *Clostridium* strain,” *J Appl Microbiol*, vol. 114, no. 3, pp. 703–712, Mar. 2013, doi: 10.1111/jam.12084.
- [43] P. Narasingarao and M. M. Häggblom, “Identification of Anaerobic Selenate-Respiring Bacteria from Aquatic Sediments,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 73, no. 11, pp. 3519–3527, Jun. 2007, doi: 10.1128/AEM.02737-06.
- [44] J. C. Fisher and J. T. Hollibaugh, “Selenate-Dependent Anaerobic Arsenite Oxidation by a Bacterium from Mono Lake, California,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 74, no. 9, pp. 2588–2594, May 2008, doi: 10.1128/AEM.01995-07.
- [45] M. Fujita, M. Ike, S. Nishimoto, K. Takahashi, and M. Kashiwa, “Isolation and

- characterization of a novel selenate-reducing bacterium, *Bacillus sp.* SF-1,” *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 83, no. 6, pp. 517–522, Jan. 1997, doi: 10.1016/S0922-338X(97)81130-0.
- [46] M. Kashiwa, S. Nishimoto, K. Takahashi, M. Ike, and M. Fujita, “Factors affecting soluble selenium removal by a selenate-reducing bacterium *Bacillus sp.* SF-1,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 89, no. 6, pp. 528–533, Jan. 2000, doi: 10.1016/S1389-1723(00)80051-1.
- [47] J. M. Macy, S. Rech, G. Auling, M. Dorsch, E. Stackebrandt, and L. I. Sly, “*Thauera selenatis* gen. nov., sp. nov., a Member of the Beta Subclass of Proteobacteria with a Novel Type of Anaerobic Respiration,” *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 43, no. 1, pp. 135–142, Jan. 1993, doi: 10.1099/00207713-43-1-135.
- [48] I. Schröder, S. Rech, T. Krafft, and J. M. Macy, “Purification and Characterization of the Selenate Reductase from *Thauera selenatis*,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 38, pp. 23765–23768, Sep. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.38.23765.
- [49] E. J. Espinosa-Ortiz, G. Gonzalez-Gil, P. E. Saikaly, E. D. van Hullebusch, and P. N. L. Lens, “Effects of selenium oxyanions on the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 99, no. 5, pp. 2405–2418, Mar. 2015, doi: 10.1007/s00253-014-6127-3.
- [50] J. Zhang *et al.*, “Two selenium tolerant *Lysinibacillus sp.* strains are capable of reducing selenite to elemental Se efficiently under aerobic conditions,” *Journal of Environmental Sciences*, vol. 77, pp. 238–249, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.jes.2018.08.002.
- [51] R. Avendaño, N. Chaves, P. Fuentes, E. Sánchez, J. I. Jiménez, and M. Chavarría, “Production of selenium nanoparticles in *Pseudomonas putida* KT2440,” *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, p. 37155, Dec. 2016, doi: 10.1038/srep37155.
- [52] S. Fischer *et al.*, “*Bacillus safensis* JG-B5T affects the fate of selenium by extracellular production of colloiddally less stable selenium nanoparticles,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 384, p. 121146, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121146.
- [53] Y. Wang *et al.*, “Selenite Reduction and the Biogenesis of Selenium Nanoparticles by *Alcaligenes faecalis* Se03 Isolated from the Gut of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae),” *IJMS*, vol. 19, no. 9, p. 2799, Sep. 2018, doi: 10.3390/ijms19092799.
- [54] B. B. Negi, A. Sinharoy, and K. Pakshirajan, “Selenite removal from wastewater

- using fungal pelleted airlift bioreactor,” *Environ Sci Pollut Res*, vol. 27, no. 1, pp. 992–1003, Jan. 2020, doi: 10.1007/s11356-019-06946-6.
- [55] Z. Li, H. Li, and H. Hu, “Selenite removal and reduction by growing *Aspergillus sp.* J2,” *Biometals*, vol. 31, no. 1, pp. 45–50, Feb. 2018, doi: 10.1007/s10534-017-0063-5.
- [56] S. Dhanjal and S. Cameotra, “Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil,” *Microb Cell Fact*, vol. 9, no. 1, p. 52, 2010, doi: 10.1186/1475-2859-9-52.
- [57] A. A. Kamnev, P. V. Mamchenkova, Y. A. Dyatlova, and A. V. Tugarova, “FTIR spectroscopic studies of selenite reduction by cells of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 and the formation of selenium nanoparticles,” *Journal of Molecular Structure*, vol. 1140, pp. 106–112, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.molstruc.2016.12.003.
- [58] N. Yee and D. Y. Kobayashi, “Chapter 3 Molecular Genetics of Selenate Reduction by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1,” in *Advances in Applied Microbiology*, vol. 64, Elsevier, 2008, pp. 107–123. doi: 10.1016/S0065-2164(08)00403-6.
- [59] C. A. Watts, H. Ridley, K. L. Condie, J. T. Leaver, D. J. Richardson, and C. S. Butler, “Selenate reduction by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 is catalysed by a molybdenum-dependent membrane-bound enzyme that is distinct from the membrane-bound nitrate reductase,” *FEMS Microbiology Letters*, vol. 228, no. 2, pp. 273–279, Nov. 2003, doi: 10.1016/S0378-1097(03)00782-1.
- [60] N. Yee, J. Ma, A. Dalia, T. Boonfueng, and D. Y. Kobayashi, “Se(VI) Reduction and the Precipitation of Se(0) by the Facultative Bacterium *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 Are Regulated by FNR,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 73, no. 6, pp. 1914–1920, Mar. 2007, doi: 10.1128/AEM.02542-06.
- [61] R. S. Dungan and W. T. F. Jr, “Factors affecting the volatilization of dimethylselenide by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1,” *Soil Biology*, vol.32, pp.1353-1358, 2000, [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00044-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00044-4).
- [62] R. S. Dungan and W. T. Frankenberger, “Biotransformations of selenium by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1: Formation of dimethylselenide,” *Biogeochemistry*, vol.55, pp.73–86, 2001, <https://doi.org/10.1023/A:1010640307328>.
- [63] M. E. Losi and W. T. Frankenberger, “Reduction of Selenium Oxyanions by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1: Isolation and Growth of the Bacterium and Its Expulsion of Selenium Particles,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 63, no. 8, pp. 3079–3084, Aug. 1997, doi: 10.1128/aem.63.8.3079-3084.1997.

- [64] J. Ma, D. Y. Kobayashi, and N. Yee, “Role of menaquinone biosynthesis genes in selenate reduction by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 and *Escherichia coli* K12,” *Environmental Microbiology*, vol. 11, no. 1, pp. 149–158, Jan. 2009, doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01749.x.
- [65] T. Kagami *et al.*, “Effective selenium volatilization under aerobic conditions and recovery from the aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I,” *Water Research*, vol. 47, no. 3, pp. 1361–1368, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.watres.2012.12.001.
- [66] P. K. Petrov, J. W. Charters, and D. Wallschläger, “Identification and Determination of Selenosulfate and Selenocyanate in Flue Gas Desulfurization Waters,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 3, pp. 1716–1723, Feb. 2012, doi: 10.1021/es202529w.
- [67] Y. S. Shi, Y. Z. Shi, and L. Wang, “Removal of Se(VI) from Raw Water by Ion Exchange Process,” *AMR*, vol. 430–432, pp. 941–948, Jan. 2012, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.430-432.941.
- [68] M. Malhotra, M. Pal, and P. Pal, “A response surface optimized nanofiltration-based system for efficient removal of selenium from drinking Water,” *Journal of Water Process Engineering*, vol. 33, p. 101007, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.jwpe.2019.101007.
- [69] Y. K. Kharaka, G. Ambats, T. S. Presser, and R. A. Davis, “Removal of selenium from contaminated agricultural drainage water by nanofiltration membranes,” *Applied Geochemistry*, vol. 11, no. 6, pp. 797–802, Nov. 1996, doi: 10.1016/S0883-2927(96)00044-3.
- [70] S. O. Okonji, J. A. Dominic, D. Pernitsky, and G. Achari, “Removal and recovery of selenium species from wastewater: Adsorption kinetics and co-precipitation mechanisms,” *Journal of Water Process Engineering*, vol. 38, p. 101666, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.jwpe.2020.101666.
- [71] T. Nishimura, H. Hashimoto, and M. Nakayama, “Removal of Selenium(VI) from Aqueous Solution with Polyamine-type Weakly Basic Ion Exchange Resin,” *Separation Science and Technology*, vol. 42, no. 14, pp. 3155–3167, Oct. 2007, doi: 10.1080/01496390701513107.
- [72] K. Yuasa, T. Tsurusaki, and S. Yamasaki, “Environmental Load Reduction Effect by Recycling Used Photovoltaic Generation Panel Glass,” *Journal of Environmental Engineering (Transactions of AIJ)*, vol. 82, no. 741, pp. 949–955, 2017, doi: 10.3130/aije.82.949.
- [73] S. Soda, A. Hasegawa, M. Kuroda, A. Hanada, M. Yamashita, and M. Ike, “Selenium recovery from kiln powder of cement manufacturing by chemical

- leaching and bioreduction,” *Water Science and Technology*, vol. 72, no. 8, pp. 1294–1300, Oct. 2015, doi: 10.2166/wst.2015.339.
- [74] J. Mal, Y. V. Nancharaiah, E. D. van Hullebusch, and P. N. L. Lens, “Biological removal of selenate and ammonium by activated sludge in a sequencing batch reactor,” *Bioresource Technology*, vol. 229, pp. 11–19, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2016.12.112.
- [75] Y. Zhang and W. T. Frankenberger, “Factors affecting removal of selenate in agricultural drainage water utilizing rice straw,” *Science of The Total Environment*, vol. 305, no. 1–3, pp. 207–216, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0048-9697(02)00479-5.
- [76] C.-Y. Lai *et al.*, “Selenate and Nitrate Bioreductions Using Methane as the Electron Donor in a Membrane Biofilm Reactor,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 50, no. 18, pp. 10179–10186, Sep. 2016, doi: 10.1021/acs.est.6b02807.
- [77] S. Xia, X. Xu, and L. Zhou, “Insights into selenate removal mechanism of hydrogen-based membrane biofilm reactor for nitrate-polluted groundwater treatment based on anaerobic biofilm analysis,” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 178, pp. 123–129, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.04.005.
- [78] J.-H. Luo, H. Chen, S. Hu, C. Cai, Z. Yuan, and J. Guo, “Microbial Selenate Reduction Driven by a Denitrifying Anaerobic Methane Oxidation Biofilm,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 52, no. 7, pp. 4006–4012, Apr. 2018, doi: 10.1021/acs.est.7b05046.
- [79] T. Eregowda, E. R. Rene, and P. N. L. Lens, “Bioreduction of selenate in an anaerobic biotrickling filter using methanol as electron donor,” *Chemosphere*, vol. 225, pp. 406–413, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.02.158.
- [80] T. Zeng, E. R. Rene, Q. Hu, and P. N. L. Lens, “Continuous biological removal of selenate in the presence of cadmium and zinc in UASB reactors at psychrophilic and mesophilic conditions,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 141, pp. 102–111, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.bej.2018.10.013.
- [81] L. C. Tan, Y. V. Nancharaiah, S. Lu, E. D. van Hullebusch, R. Gerlach, and Piet. N. L. Lens, “Biological treatment of selenium-laden wastewater containing nitrate and sulfate in an upflow anaerobic sludge bed reactor at pH 5.0,” *Chemosphere*, vol. 211, pp. 684–693, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.079.
- [82] S. L. Wadgaonkar, J. Mal, Y. V. Nancharaiah, N. O. Maheshwari, G. Esposito, and P. N. L. Lens, “Formation of Se(0), Te(0), and Se(0)–Te(0) nanostructures during simultaneous bioreduction of selenite and tellurite in a UASB reactor,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 102, no. 6, pp. 2899–2911, Mar. 2018, doi: 10.1007/s00253-018-8781-3.

- [83] S. Soda, M. Kashiwa, T. Kagami, M. Kuroda, M. Yamashita, and M. Ike, "Laboratory-scale bioreactors for soluble selenium removal from selenium refinery wastewater using anaerobic sludge," *Desalination*, vol. 279, no. 1–3, pp. 433–438, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.desal.2011.06.031.
- [84] E. J. Espinosa-Ortiz, E. R. Rene, E. D. van Hullebusch, and P. N. L. Lens, "Removal of selenite from wastewater in a *Phanerochaete chrysosporium* pellet based fungal bioreactor," *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 102, pp. 361–369, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.ibiod.2015.04.014.
- [85] R. Jain, S. Matassa, S. Singh, E. D. van Hullebusch, G. Esposito, and P. N. L. Lens, "Reduction of selenite to elemental selenium nanoparticles by activated sludge," *Environ Sci Pollut Res*, vol. 23, no. 2, pp. 1193–1202, Jan. 2016, doi: 10.1007/s11356-015-5138-7.
- [86] Y. Zhang, M. Kuroda, Y. Nakatani, S. Soda, and M. Ike, "Removal of selenite from artificial wastewater with high salinity by activated sludge in aerobic sequencing batch reactors," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 127, no. 5, pp. 618–624, May 2019, doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.11.002.
- [87] H. Chen, C. Shepsko, and A. K. SenGupta, "Use of a Novel Bio-Nano-IX Process to Remove SeO_4^{2-} or Se(VI) from Contaminated Water in the Presence of Competing Sulfate (SO_4^{2-})," *ACS EST Water*, vol. 1, no. 8, pp. 1859–1867, Aug. 2021, doi: 10.1021/acsestwater.1c00126.
- [88] A. W. Cantafio, K. D. Hagen, G. E. Lewis, T. L. Bledsoe, K. M. Nunan, and J. M. Macy, "Pilot-Scale Selenium Bioremediation of San Joaquin Drainage Water with *Thauera selenatis*," *Appl Environ Microbiol*, vol. 62, no. 9, pp. 3298–3303, Sep. 1996, doi: 10.1128/aem.62.9.3298-3303.1996.
- [89] M. Lenz, A. M. Enright, V. O'Flaherty, A. C. van Aelst, and P. N. L. Lens, "Bioaugmentation of UASB reactors with immobilized *Sulfurospirillum barnesii* for simultaneous selenate and nitrate removal," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 83, no. 2, pp. 377–388, May 2009, doi: 10.1007/s00253-009-1915-x.
- [90] J. T. Tenedezai, E. M. N. Chirwa, and H. G. Brink, "Reduction of selenite by use of *Pseudomonas stutzeri* NT-I cell-free extract," *Chemical Engineering Transactions*, vol. 79, pp. 373–378, 2020, doi: 10.3303/CET2079063.
- [91] O. Otsuka and M. Yamashita, "Selenium recovery from wastewater using the selenate-reducing bacterium *Pseudomonas stutzeri* NT-I," *Hydrometallurgy*, vol. 197, p. 105470, 2020, doi: 10.1016/j.hydromet.2020.105470.
- [92] J. W. Doran and M. Alexander, "Microbial Transformations of Selenium," *Appl Environ Microbiol*, vol. 33, no. 1, pp. 31–37, Jan. 1977, doi: 10.1128/aem.33.1.31-

- 37.1977.
- [93] R. W. Fleming' and M. Alexander, "Dimethylselenide and Dimethyltelluride Formation by a Strain of *Penicillium*," *Appl. Microbiol.*, 24(3),pp.424-429. doi: 10.1128/am.24.3.424-429.1972.
- [94] V. Van Fleet-Stalder, H. Gu'rleyu'k, R. Bachofen, and T. G. Chasteen, "Effects of growth conditions on production of methyl selenides in cultures of *Rhodobacter sphaeroides*," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 19, no. 2, pp. 98–103, Aug. 1997, doi: 10.1038/sj.jim.2900423.
- [95] M. Ike, S. Soda, and M. Kuroda, "Development of Selenium-Containing Wastewater Treatment Technologies Using Microbial Selenium Transformation," *Journal of Environmental Biotechnology*, vol. 15, no. 2, pp. 71–75, 2016.
- [96] M. Ike, S. Soda, and M. Kuroda, "Bioprocess Approaches for the Removal of Selenium from Industrial Waste and Wastewater by *Pseudomonas stutzeri* NT-I," in *Bioremediation of Selenium Contaminated Wastewater*, E. D. van Hullebusch, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 57–73. doi: 10.1007/978-3-319-57831-6_3.
- [97] R. Tobe and H. Mihara, "Delivery of selenium to selenophosphate synthetase for selenoprotein biosynthesis," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1862, no. 11, pp. 2433–2440, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.bbagen.2018.05.023.
- [98] S. Lampis, E. Zonaro, C. Bertolini, P. Bernardi, C. S. Butler, and G. Vallini, "Delayed formation of zero-valent selenium nanoparticles by *Bacillus mycooides* SeITE01 as a consequence of selenite reduction under aerobic conditions," *Microb Cell Fact*, vol. 13, no. 1, p. 35, 2014, doi: 10.1186/1475-2859-13-35.
- [99] S. Soda *et al.*, "Biotreatment of Selenium Refinery Wastewater Using Pilot-Scale Granular Sludge and Swim-Bed Bioreactors Augmented with a Selenium-Reducing Bacterium *Pseudomonas stutzeri* NT–I," *Japanese J. Wat. Treat. Biol.*, vol. 48, no. 2, pp. 63–71, 2012, doi: 10.2521/jswtb.48.63.
- [100] K. R. Hladun, O. Kaftanoglu, D. R. Parker, K. D. Tran, and J. T. Trumble, "Effects of selenium on development, survival, and accumulation in the honeybee (*Apis mellifera* L.): Selenium's impact on survival in honeybees," *Environ Toxicol Chem*, vol. 32, no. 11, pp. 2584–2592, Nov. 2013, doi: 10.1002/etc.2357.
- [101] M. J. T. Ranzani-Paiva, J. V. Lombardi, and A. Gonçalves, "Acute toxicity of sodium selenite and sodium selenate to tilapia," *Bol. Inst. Pesca*, 37(2),pp.191-197,2018.ISSN 1678-2305.
- [102] V. S. Minaev, S. P. Timoshenkov, and V. V. Kalugin, "Structural and phase

- transformations in condensed selenium,” *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, vol. 7, no. 4, pp. 1717–1741, Aug. 2005.
- [103] L. Winkel, J. Feldmann, and A. A. Meharg, “Quantitative and Qualitative Trapping of Volatile Methylated Selenium Species Entrained through Nitric Acid,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, no. 1, pp. 382–387, Jan. 2010, doi: 10.1021/es902345m.
- [104] A. W. Cantafio, K. D. Hagen, G. E. Lewis, T. L. Bledsoe, K. M. Nunan, and J. M. Macy, “Pilot-scale selenium bioremediation of San Joaquin drainage water with *Thauera selenatis*,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 9, pp. 3298–3303, 1996, doi: 10.1128/aem.62.9.3298-3303.1996.
- [105] M. Lenz, A. M. Enright, V. O’Flaherty, A. C. Van Aelst, and P. N. L. Lens, “Bioaugmentation of UASB reactors with immobilized *Sulfurospirillum barnesii* for simultaneous selenate and nitrate removal,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 83, no. 2, pp. 377–388, 2009, doi: 10.1007/s00253-009-1915-x.
- [106] R. Hata, T. Nichimura, and Y. Umetsu, “セレン含有物および水溶液からのセレンの除去,” *Institute for Advanced Materials Processing, Tohoku*, vol. 52, no. 1, pp. 145–159, 1997, doi: <http://hdl.handle.net/10097/34089>.
- [107] T. Sagawa, “Reuse/Recycling of PV Modules and Guidelines from the MOE,” *Material Cycles and Waste Management Research*, vol. 30, no. 6, pp. 365–370, Nov. 2019, doi: 10.3985/mcwmr.30.365.
- [108] T. Takeda, M. Kodama, K. Ochiai, and M. Kukizaki, “Recovery of Rare Metals from Thin-film-type Solar Cells,” 宮崎県工業技術センター, 宮崎, 日本, 2012. [Online]. Available: <https://www.iri.pref.miyazaki.jp/pdf/H24/2012-12.pdf>
- [109] H. Yamada, A. Kamada, M. Usuki, and J. Yanai, “Total selenium content of agricultural soils in Japan,” *Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 55, no. 5, pp. 616–622, 2009, doi: 10.1111/j.1747-0765.2009.00397.x.
- [110] A. Ohtsubo, “Pollution and Chronic Arsenic Poisoning Associated with the Operation of Former Toroku Mine in Takachiho Town, Miyazaki Prefecture,” *Nippon Eiseigaku Zasshi (Japanese Journal of Hygiene)*, vol. 73, no. 3, pp. 275–276, 2018, doi: 10.1265/jjh.73.275.
- [111] K. Ashida, J. Yamamoto, and Y. Kobuke, “Spatial and Temporal Distributions of Arsenic and Other Heavy Metals and Their Causes in the Ina River System,” *Journal of Japan Society on Water Environment*, vol. 24, no. 7, pp. 466–472, 2001, doi: 10.2965/jswe.24.466.
- [112] N. Saijo, T. Hashimoto, and M. Tsuji, “自然由来重金属含有土砂に対する汚染対策について-近年の動向と旧トンネルを利用した遮水シートの施工事例

- ,” presented at the 国立研究開発法人土木研究所 寒地土木研究所平成 18 年度技術研究発表会, Feb. 2007. [Online]. Available: <https://thesis.ceri.go.jp/db/files/GR0002400264.pdf>
- [113] T. Kamei and H. Horai, “Insolubilization of hexavalent chrome, cadmium and lead using composite recycling materials,” *Jiban Kogaku Janaru*, vol. 12, no. 4, pp. 397–408, 2017, doi: 10.3208/jgs.12.397.
- [114] R. Hino *et al.*, “A Study on long – term stability of contaminated soils with mercury and fluorine treated by *in-situ* insolubilization method,” *Jiban Kogaku Janaru*, vol. 15, no. 3, pp. 563–571, Sep. 2020, doi: 10.3208/jgs.15.563.
- [115] T. Konagawa, S. Sasaki, K. Arai, and Y. Nagaosa, “Immobilization of Some Heavy Metals in Contaminated Soils by Stabilization with Spent Carbide,” *Journal of the Japan Society of Material Cycles and Waste Management*, vol. 23, no. 5, pp. 207–216, 2012, doi: 10.3985/jjsmcwm.1110304.
- [116] H. Nakata, M. Yokoshima, T. Suzuki, and M. Niinae, “Immobilization Process of Soil Contaminated with Selenium (VI) Using Magnesium Oxide and Iron (II) Compounds,” *Journal of the Mining and Materials Processing Institute of Japan*, vol. 135, no. 11, pp. 101–108, Nov. 2019, doi: 10.2473/journalofmmij.135.101.
- [117] O. Otsuka *et al.*, “Fundamental Study of Adsorption Thin Layers for Safe Storage of Heavy Metal Contaminated Soil,” in *Advances in Sustainable Construction and Resource Management*, vol. 144, pp. 467–476. doi: 10.1007/978-981-16-0077-7_40.
- [118] T. Tatsuhara, S. Jikihara, T. Tatsumi, and T. Igarashi, “Effects of the layout of adsorption layer on immobilizing arsenic leached from excavated rocks,” *Jiban Kogaku Janaru*, vol. 10, no. 4, pp. 635–640, 2015, doi: 10.3208/jgs.10.635.
- [119] M. C. Zambonino *et al.*, “Green Synthesis of Selenium and Tellurium Nanoparticles: Current Trends, Biological Properties and Biomedical Applications,” *IJMS*, vol. 22, no. 3, p. 989, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijms22030989.
- [120] S. L. Wadgaonkar, Y. V. Nancharaiah, G. Esposito, and P. N. L. Lens, “Environmental impact and bioremediation of seleniferous soils and sediments,” *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 38, no. 6, pp. 941–956, Aug. 2018, doi: 10.1080/07388551.2017.1420623.
- [121] L. C. Tan, Y. V. Nancharaiah, E. D. van Hullebusch, and P. N. L. Lens, “Selenium: environmental significance, pollution, and biological treatment technologies,” *Biotechnology Advances*, vol. 34, no. 5, pp. 886–907, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.05.005.
- [122] P. P. Manca, P. Caredda, and G. Orrù, “The applicability of soil flushing

- technology in a metallurgical plant,” *Int J Coal Sci Technol*, vol. 5, no. 1, pp. 70–77, Mar. 2018, doi: 10.1007/s40789-018-0190-9.
- [123] S. L. Wadgaonkar *et al.*, “Optimization of Soil Washing to Reduce the Selenium Levels of Seleniferous Soil from Punjab, Northwestern India,” *J. Environ. Qual.*, vol. 47, no. 6, pp. 1530–1537, Nov. 2018, doi: 10.2134/jeq2018.05.0187.
- [124] N. Naga, T. Hiratani, F. Kotake, O. Otsuka, and M. Yamashita, “Purification and recycling of selenium in wastewater using polyacrylamide capsule containing selenate-reducing bacterium,” *J Chem Technol Biotechnol*, vol. 96, no. 7, pp. 2006–2013, Jul. 2021, doi: 10.1002/jctb.6730.
- [125] L. H. E. Winkel *et al.*, “Environmental Selenium Research: From Microscopic Processes to Global Understanding,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 2, pp. 571–579, Jan. 2012, doi: 10.1021/es203434d.
- [126] L. Rodriguez-Freire, R. Sierra-Alvarez, R. Root, J. Chorover, and J. A. Field, “Biomining of arsenate to arsenic sulfides is greatly enhanced at mildly acidic conditions,” *Water Research*, vol. 66, pp. 242–253, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.watres.2014.08.016.
- [127] X. Luo *et al.*, “Arsenic biomining by iron oxidizing strain (*Ochrobactrum* sp.) isolated from a paddy soil in Hunan, China,” *Land Degrad Dev*, vol. 32, no. 6, pp. 2082–2093, Apr. 2021, doi: 10.1002/ldr.3842.
- [128] Q. Li, D. Liu, Z. Jia, L. Csetenyi, and G. M. Gadd, “Fungal Biomining of Manganese as a Novel Source of Electrochemical Materials,” *Current Biology*, vol. 26, no. 7, pp. 950–955, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.cub.2016.01.068.

謝辞

本研究の遂行と本論文の作成にあたり、芝浦工業大学 工学部 応用化学科 教授 山下光雄先生には終始御懇篤なる御指導と御助言を賜りました。深甚なる感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、貴重な御指導を賜りました、大阪大学大学院工学研究科 環境エネルギー工学専攻 教授 池道彦先生に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、貴重な御指導を賜りました、立命館大学 理工学部 環境都市工学科 教授 惣田訓先生に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、貴重な御指導と御助言を賜りました、東京大学大学院 工学系研究科 マテリアル工学専攻 准教授 吉川健先生に、心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、貴重な御指導と御助言を賜りました、常葉大学 社会環境学部 社会環境学科 講師 黒田真史先生に、心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、貴重な試料の提供を頂きました、JX 金属株式会社 技術開発センター 資源グループ グループ長 三浦彰氏に、心より感謝申し上げます。

本論文執筆にあたり、多大なる御協力と御助言を賜りました、株式会社ケー・エフ・シー 代表取締役社長 高田俊太氏、常務取締役 兼 常務執行役員 羽馬徹氏、技術部トンネル・基礎技術室 室長 松尾勉博士、技術部トンネル・基礎技術室 部長 奥野稔氏、技術部トンネル・基礎技術室 部長 渡邊直人博士、技術部加須技術研究所 所長 井本厚氏に心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多大なる御指導と御助言を賜りました、芝浦工業大学 SIT 総合研究所 レアメタルバイオリサーチセンター諸兄、株式会社ケー・エフ・シーの皆様心より感謝致します。

最後に本論文作成に理解を示し暖かく応援頂いた家族に感謝の意を表して、本論文の謝辞と致します。

2022年3月
大塚 治

博士論文に関する報告文 第一著者 5 編

1. O. Otsuka, Y. Yanaba, T. Yoshikawa, and M. Yamashita, “酸化焙焼によるバイオセレンからのセレン分離の検討,” pp. 330 - 337, 2015. <https://doi.org/10.2320/jinstmet.J2015008> 査読有
2. O. Otsuka and M. Yamashita and M. Kuroda and S. Soda and M. Ike, “Selenium recovery from simulated wastewater using selenium reducing bacteria *Pseudomonas stutzeri* NT-I,” Hydroprocess 2015, pp. 1-4, 2015. 査読有
3. O. Otsuka, Y. Yanaba, T. Yoshikawa, and M. Yamashita, “Fundamental studies on oxidizing roasting of the ‘bioselenium,’” Mater. Trans., vol. 57, no. 7, pp. 1183-1191, 2016, doi: 10.2320/matertrans.M2016060. 査読有
4. O. Otsuka and M. Yamashita, “Selenium recovery from wastewater using the selenate-reducing bacterium *Pseudomonas stutzeri* NT-I,” Hydrometallurgy, vol. 197, no. August, p. 105470, 2020, doi: 10.1016/j.hydromet.2020.105470. 査読有
5. O. Otsuka, R. Nishizato, and M. Okuno *et.al.*, “Fundamental Study of Adsorption Thin Layers for Safe Storage of Heavy Metal Contaminated Soil,” Advances in Sustainable Construction and Resource Management pp. 467-476., 2020, https://doi.org/10.1007/978-981-16-0077-7_40 査読有

博士論文に参考とする報告文

1. 山下光雄、大塚治：「セレン酸還元細菌 NT-I 株を用いた廃水からのセレン回収」水環境学会誌、37 巻、2 号、66-70 (2014)。 NAID : 40019974942
2. 山下光雄、大塚治：「セレン酸等の揮発化回収」バイオベース元素戦略 —都市鉱山・海底鉱山に眠る貴金属・レアメタル回収技術— 2015 年 7 月 (株) シーエムシー出版
3. T. Horiike, O. Otsuka, Y. Tanaka, T. Terahara, C. Imada, and M. Yamashita, “Diversity of salt-tolerant tellurate-reducing bacteria in a marine environment,” J. Gen. Appl. Microbiol., vol. 65, no. 5, pp. 246–253, 2019, doi: 10.2323/jgam.2018.11.003. 査読有
4. N. Naga, T. Hiratani, F. Kotake, O. Otsuka, and M. Yamashita, “Purification and recycling of selenium in wastewater using polyacrylamide capsule containing selenate - reducing bacterium,” J. Chem. Technol. Biotechnol., no. March, 2021, doi: 10.1002/jctb.6730. 査読有