

セレン代謝微生物を利用したセレン含有排水処理技術の開発

Development of Selenium-Containing Wastewater Treatment Technologies Using Microbial Selenium Transformation

池 道彦*, 惣田 訓, 黒田 真史

MICHIHIKO IKE*, SATOSHI SODA and MASASHI KURODA

大阪大学大学院工学研究科 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

* TEL: 06-6879-7672 FAX: 06-6879-7675

* E-mail: ike@see.eng.osaka-u.ac.jp

Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

キーワード: セレン含有排水, 処理, セレンの微生物代謝, *Pseudomonas stutzeri* NT-I

Key words: Selenium-containing wastewater, treatment, microbial selenium metabolism, *Pseudomonas stutzeri* NT-I

(原稿受付 2016 年 2 月 8 日 / 原稿受理 2016 年 2 月 15 日)

1. はじめに

セレンは感光体等の電子材料, ステンレス鋼の快削鋼用添加剤, 化学触媒など幅広い用途で利用されるレアメタルである一方, 生物毒性を有するため 0.1 mg/L という厳しい排水基準が定められている (平成 6 年 2 月施行)。セレンは, 排水中では主にセレン酸 (SeO_4^{2-} : Se(VI)), あるいは亜セレン酸 (SeO_3^{2-} : Se(IV)) というオキソアニオン (酸化イオン) の形で存在するが, その除去技術は水質環境基準が設定されて 20 年以上が経過した今でも実用的なものとして確立されているとはいえず, 特に Se(VI) の除去は相当に困難とされている。現状で最も有効なセレン含有排水の処理技術は, Se(VI) を Se(IV) にまで触媒還元した後, 鉄塩などの凝集剤を大量に加えて凝集沈殿し, 固液分離にて除去する方法であるが, エネルギーや薬剤等資源の消費が大きく, 経済的ではない (Lenz & Lens, 2009)⁷⁾。また, セレンは凝集沈殿により化学泥中に吸着されるが, その含量がリサイクルに供するには低すぎることから, 資源としての回収はなされておらず, 脱水された後, 産業廃棄物として高いコストをかけて廃棄処分するしかないという制約も有しており (Soda et al., 2011)⁹⁾, 真に有効なセレン含有排水処理技術の選択肢を与える技術開発が望まれている。

一般的には, 生物学的排水処理 (バイオトリートメント) は経済的とされ, セレン含有排水に対してもバイオのオプションが利用できれば, 現状の物理化学的処理技術に比べて安価な処理技術が確立できる可能性がある。このような可能性を探るうえでは, 自然界で生じているセレンの循環, 特に生物地化学的循環に関わる多様な作用 (Haygarth, 1994)²⁾ を検索し, 排水処理へと利用し得る生物学的反応をピックアップすることになる。図 1 に示したように, セレンは様々な作用によって気圏・水

圏・土壌圏・生物圏を循環しているが, このうち水圏に存在する Se(VI) や Se(IV) は微生物還元作用により, Se(0) などの固形セレンとなって土壌圏へ移行することが知られる (バイオミネラリゼーション, あるいはバイオプレシピテーション)。固形セレンはさらに還元, メチル化あるいは水素化されることで気相へ移行する (バイオボラタリゼーション)。これらの微生物学的セレン代謝作用を利用し, 排水中の水溶性セレンを固相, あるいは気相に移行させることができれば, 固液/気液分離によりセレン除去が可能となる。ここで, バイオミネラリゼーションで除去されたセレンは, 微生物細胞中に濃縮されることになるため, 有機成分を燃焼等で除去し灰分中のセレン含有率を高めれば, リサイクルする価値がでてくる (Soda et al., 2012)¹⁰⁾。また, バイオボラタリゼーションで気化されたセレンを, スクラバーなどで捕集すれば, 高純度のセレン溶液としてリサイクルできる (Kagami et al., 2013)³⁾。すなわち, セレン含有排水の低コスト化と排水からのセレンリサイクルの実現は, バイオ技術によってこそなし得るものであり, 実用化する価値は非常に高いものと考えている。ここでは, セレン代謝微生物を用いて排水中のセレンを安価に処理し, リサイクルしやすい形で回収できるセレン排水処理/セレン回収技術の開発研究を紹介する。

2. 多才なセレン代謝細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I

経済的な資源回収型セレン含有排水回収プロセスを実現する多才なセレン代謝微生物として, 我々は Se(VI) 還元細菌 *P. stutzeri* NT-I を取得している (Kuroda et al., 2011)⁵⁾。NT-I は好気条件下でも Se(VI) を Se(0) にまで還元する珍しいセレン酸塩還元細菌であり, 金属製錬工場の排水溝の生物膜より分離した。NT-I は振盪フラスコ

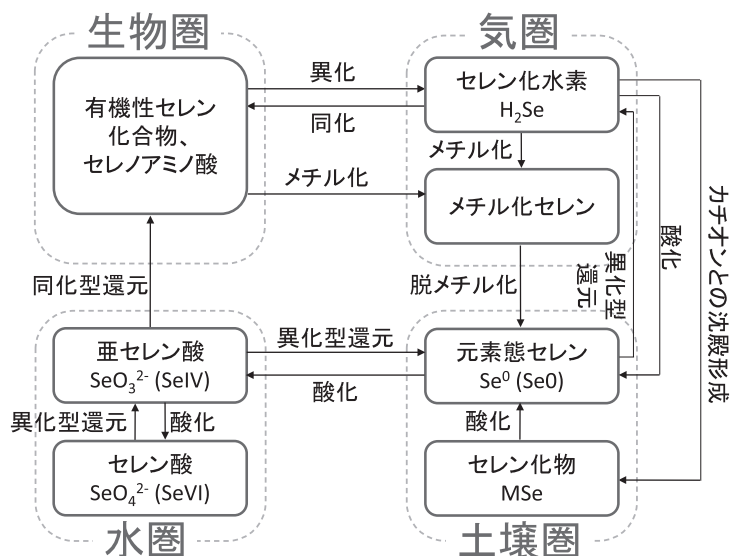


図 1. セレンの生物地化学的循環。

図 2. *Pseudomonas stutzeri* の異化型 Se(VI) 還元酵素遺伝子 *serABDC* と機能未知遺伝子群 *serXSR* のゲノム上の配置。

による好気培養で、例えば、TSB (Trypticase Soy Broth) のような高栄養培地を用いれば、80 mg-Se/L の Se(VI) を 18 時間のうちに Se(IV) を経て Se(0) にまで還元し水相から除去する。ここで、Se(VI)/Se(IV) の還元産物である Se(0) は、数 10~200 nm 径の粒子として細胞外に蓄積される。NT-I によって蓄積される不定形 Se(0) は赤色を呈するが、培養の継続に従ってこの色が消失したことから、NT-I は Se(0) をさらに還元・気化する能力を併せ持つことが明らかとなった (Kagami et al., 2013)³⁾。培養中の気相部の分析により気化産物としてジメチルジセレニド (DMDSe) が主要産物であることが分かった。セレンをメチル化して気化させることのできる微生物については多数が知られているが、主に DMDSe を生成するという報告は見られず、NT-I が特殊なセレン気化メカニズムを有している可能性が示唆されている。

通常のセレン還元微生物では、Se(VI) の Se(IV) への還元反応の進行に厳密な嫌気条件を必要とするものが多いが、NT-I は酸素が存在していても大きな阻害を受けることがなく、ハンドリングが容易で、安定な機能発現を期待できるという興味深い特徴を持つ。本反応は当初は嫌気呼吸に関わるものとは想定しておらず、セレン無毒化のための耐性機構によるものと推測したが、特定された Se(VI) 還元酵素遺伝子は、既知の Se(VI) 異化型還元酵素遺伝子である *Thauera selenatis* の *serABDC* (Krafft et al., 2000)⁴⁾ と非常に高い塩基配列の相同性を持つという逆説的な結果が得られている (Kuroda et al., 2013)⁶⁾。図 2 に NT-I の Se(VI) 還元酵素遺伝子 *serABDC* とその近傍の遺伝子のゲノム上の配置を示している。Se(VI) 還

元酵素の構造遺伝子である *serABC* は、酵素発現時の補因子挿入に関わる redox enzyme maturation proteins (REMPs) (Turner et al., 2004)¹¹⁾ をコードする *serD* とともにオペロンを形成しており、これは *T. selenatis* と全く同じである。一方で、*serABDC* の上流に逆向きに存在する 3 つの ORF は、基質結合タンパク質、2 成分制御系のセンサーヒスチジンキナーゼ、及びレスポンスレギュレーターをそれぞれコードしており、オペロンを形成しているものと推測される。これらは嫌気性 Se(VI) 還元細菌である *T. selenatis* では報告されていないものであることから、NT-I の好気条件下での Se(VI) 還元の転写制御を担う遺伝子群であると推測しており、これらを *serXSR* と名付けて解析を進めている。

また、Se(VI) 還元は好気/嫌気のいずれの条件でも生じるのに対し、Se(IV) の還元およびセレンの気化 (メチル化) は絶対好気条件下のみ進行することが明らかとなったことから、Se(IV) の還元およびセレンの気化は嫌気呼吸ではなく同化型還元を経由するものであり、NT-I の一連のセレン代謝は異なる生理的機能のバッチワーク的な組合せによるものであると考えている。NT-I のゲノム上でも Se(VI) 還元に関わる遺伝子群の近傍に Se(IV) 還元やセレンメチル化に関わると考えられる遺伝子群は見いだされておらず、これを裏付けているものといえる。

NT-I を含めて細菌による Se(IV) から DMDSe に至る代謝に関わる分子機構は、未だ十分に明らかにされておらず、今後の研究が望まれる。NT-I では、セレン気化が進行している培養液の気相部から DMDSe のみならずジメチルジスルフィド (DMDS) 等の硫黄化合物も多

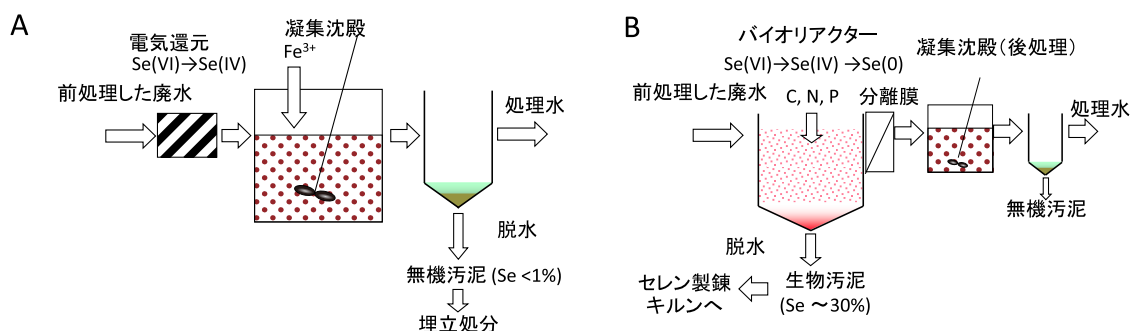


図3. セレン製錬工場の廃水処理システム。(A) 従来の物理化学処理, (B) 生物学的処理。

く検出されることから、 Se(IV) 代謝は硫黄代謝と密接に関わるものと推測される。そこで、我々は、亜硫酸から硫化水素を生成する反応を触媒する亜硫酸還元酵素遺伝子 *cysI*、及び硫化水素と *O*-acetyl-L-serine から L-cysteine を合成するシステイン合成酵素遺伝子 *cysK* のそれぞれについて、NT-I のゲノムに存在するホモログを相同組換えにより破壊し、その表現型を調べたが、いずれの変異株についても明確なセレン代謝の変化は観察されなかった。セレン代謝の全体像の解明に向けて、トランスクリプトームやメタボロームなどの手法を用いることで、硫黄代謝との関連も含め細胞の包括的な活動の中でセレン代謝を理解することが重要であると考えられる。NT-I のセレン代謝に関連する全ての遺伝子が同定され、それぞれの発現制御や詳細な機能の解析が行われれば、本株をより効果的に利用する戦略が明確化されるものと期待している。

3. *P. stutzeri* NT-I を利用したセレン含有排水処理技術の開発

以上のように、NT-I はセレンに対する多様な代謝作用を有しており、その高いポテンシャルを利用した排水処理の実用技術開発に取り組んできている。

3.1 セレン製錬排水

セレン製錬工場の廃水処理のための従来の物理化学的処理プロセスと新たに提案する生物学的処理プロセスを図3に示す。このバイオリアクターを想定したパイロットスケール実験をNT-Iを用いた連続回分処理方式で行った (Soda et al., 2012)¹⁰。NT-I の分離源であるこの金属製錬工場では、廃電子基板などをキルンで焙焼し、二酸化セレンとしてガス化したものをスクラパーで亜セレン酸溶液として回収している。その過程で発生するセレン含有廃水は、強酸性 (pH 1) であり、塩分濃度が高い (6~7%) (Soda et al., 2011)⁹。NT-I は、 Se(VI) を pH 7.0~9.0、NaCl 濃度 0.05~20 g/L の条件下で還元することができ、 Se(VI) を pH 6.0~9.0、NaCl 濃度 0.05~50 g/L の条件下で還元できる。そのため、生物処理のための前処理として中和 (pH 6~7) と希釈 (塩分2%以下) を行い、炭素源としてエタノール、栄養塩類を適量添加した。なお、中和と希釈は従来の物理化学的な廃水処理を適用した場合にも、処理水の放流基準を遵守するために最終的に必要な操作である。繊維状担体を設置

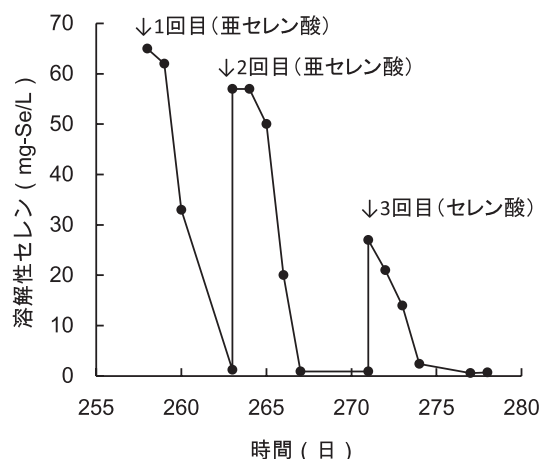


図4. *P. stutzeri* NT-I を用いたパイロットスケールリアクターによるセレン製錬工場廃水の連続回分処理。

した実容積 255 L のリアクターに当初は嫌気汚泥を付着させて処理を試みていたが、セレンの還元が進行しなかったため、NT-I をバイオオーグメンテーションし、底部から曝気をすることで内部を好気条件にした。1回のバッチが終了した後、リアクター内の反応液を7割ほど処理水として排出し、新たな廃水を流入させることを繰り返したところ、図4に示すように 55~60 mg-Se/L の Se(IV) を含む廃水を5日程度で 0.1~1 mg-Se/L にまで除去することができた。さらに約 30 mg-Se/L の Se(VI) を含む廃水を処理したところ、やはり5日程度で除去することができた。除去されたセレンはバイオミネラル化によって Se(0) として蓄積され、リアクターの反応液は特有の赤色を示した。なお、TSB 培地のようなタンパク質を豊富に含む炭素源を添加すれば、バイオボラタリゼーションさせたセレンを硝酸溶液でトラップすることで回収することも可能である (Kagami et al., 2013)³。

3.2 汚泥焼却灰洗浄排水

下水汚泥の焼却灰には、セレンが高濃度に含まれることがあり、基準値 (廃棄物処理法 0.3 mg/L, 土壤汚染対策法 0.01 mg/L) を超えて溶出することがある。その溶出抑制には、焼却灰への鉄系薬剤の添加が有効であるが、長期的には再溶出するリスクが残る。言い換えれば、セレンを十分に溶出・除去すれば、焼却灰の埋立処分および有効利用のリスクを低減することができる。そ

ここで、図5に示すコンセプトのように、化学溶出によってセレンを焼却灰から十分に溶出させ、そこで発生する溶出液中のセレンをバイオミネラリゼーションによって回収することを試みた(惣田ら, 2014)¹²⁾。

実験に用いた焼却灰は、下水汚泥を処理する焼却炉のバグフィルタで捕集されたものであり、3.8 mg-Se/Lのセレンに加え、カドミウムやヒ素も含んでいた。この焼却灰 10.0 g に純水 100 mL を加えた対照実験では、その53%に相当する量が溶出することで全水溶性セレン濃度は0.20 mg-Se/Lとなり、その主成分はSe(IV)であった。0.2 Mの炭酸ナトリウムを用いた溶出試験では、その74%に相当する量が溶出することで全水溶性セレン濃度は0.28 mg-Se/Lとなり、Se(IV)が54%、残りがSe(VI)であることが示唆された。セレンの溶出が促進された理由としては、焼却灰中のセレン酸化物が炭酸塩によって置換されるためと考えられ、リン酸塩によっても溶出が促進する結果が得られている(惣田ら, 2014)¹²⁾。また、溶出後の汚泥焼却灰の残渣量は9.7 gであり、セレン以外の成分も焼却灰から溶出したことが確認された。この残渣の再溶出試験を行ったところ、セレンの溶出量は0.06 mg-Se/Lにまで大幅に低減できた。

純水と炭酸ナトリウム溶液による溶出液は、pHがそれぞれ6.7と10.8であった。そのため、生物処理の前処理としてpHを8.5に調整し、炭素源として乳酸塩と栄養塩類を適量添加した。この溶出液をバイアル瓶に入れ、NT-Iを植菌して好気条件で処理した結果を図6に

示す。反応48時間後には、全水溶性セレンを排水基準値以下にまで除去できた。しかし、炭酸ナトリウムによる溶出液には、Se(VI)がわずかながら残存してしまった。NT-Iは銅やカドミウム、亜ヒ酸の存在によって、その増殖が阻害されるため(Soda et al., 2012)¹⁰⁾、焼却灰から溶出したそれらの物質が悪影響を及ぼした可能性がある。水相から除去されたセレンは、バイオミネラリゼーションによってSe(0)として沈殿しており、有害物質として適切に管理することになる。また、セレンはレアメタルとしての需要が増大しており、セレン化カドミウム(CdSe)のナノ粒子のように付加価値の高いものとして回収する方法(Ayano et al., 2014)¹⁾を開発することも望ましい。

4. おわりに

NT-Iという多才なセレン代謝微生物を用いることによって、既存の物理化学のプロセスと比較して、安価で、セレンの資源としてのリサイクルも可能な生物学的セレン含有排水処理プロセスの構築が可能であることを実証することができた。ただし、実排水の組成は複雑かつ千差万別であることから、生物反応を阻害する夾雑物も含まれており、NT-Iの機能を十分に発揮させるには、排水の適切な前処理や処理条件のより適正な制御が重要であることも浮き彫りとなってきた。特に、製錬排水のようにセレンを高濃度で含む排水の多くは、それ自体が

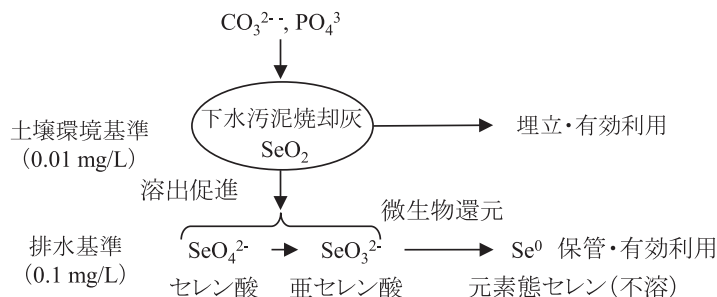


図5. 化学溶出および微生物還元を用いた下水汚泥の焼却灰からのセレンの除去方法。

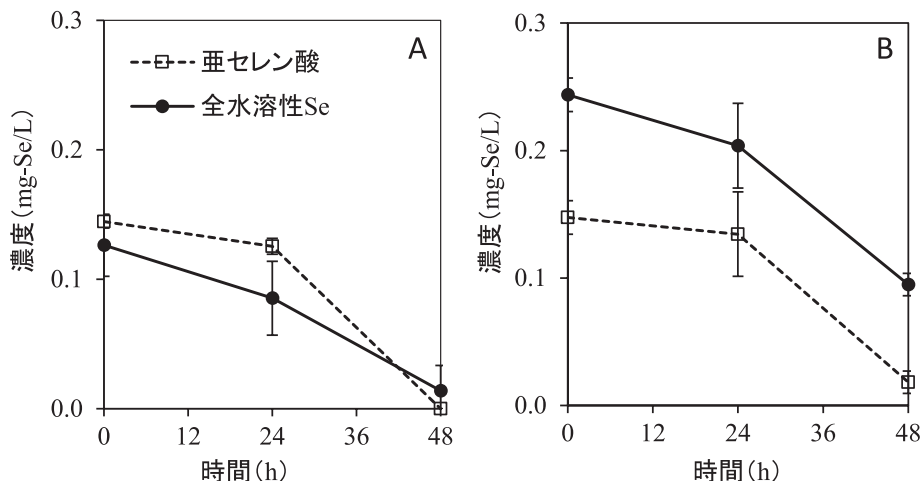


図6. *P. stutzeri* NT-Iを用いた下水汚泥焼却灰の溶出液からのセレン除去。(A) 純水による溶出液, (B) 25 M炭酸ナトリウムによる溶出液。

塩濃度が高いものであったり、低 pH であるものを中和する必要があることから、高塩濃度は重要な阻害要因である。適当な希釈により、NT-I が活躍できる範囲まで塩濃度を下げることで対応することは可能ではあるが、排水処理リアクターの容量を大幅に増大することで、安価という生物処理のせっきくのメリットを相殺しかねない。このような視点から、NT-I を超える有望な生物触媒として、耐塩性／好塩性のセレン代謝微生物の検索に着手している (Nakatani et al., 2015)⁹⁾。また、NT-I による一連のセレン代謝のメカニズムを分子レベルで明らかにすることで、遺伝子操作の適用等も視野に入れた、より合理的な処理システムの構築につながるものと考えられ、ドラフトゲノムのより詳細な解析を進めている。

謝 辞

ここで示した成果は部分的に、平成 22～24 年度文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (B) (課題番号: 22310047) (池代表)、平成 19 年度地域新生コンソーシアム研究開発事業 (池代表)、平成 21 年度経済産業省産業技術研究開発委託費 (レアメタル抽出技術開発) (芝浦工業大学 山下光雄教授代表) によるものであることを記して、謝意を表する。また、研究に携わってくれた研究コンソーシアのメンバー、学生諸氏に感謝する。

文 献

- 1) Ayano, H., M. Miyake, K. Terasawa, M. Kuroda, S. Soda, T. Sakaguchi, and M. Ike. 2014. Isolation of a selenite-reducing and cadmium-resistant bacterium *Pseudomonas* sp. strain RB for microbial synthesis of CdSe nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* 117: 576–581.
- 2) Haygarth, P.M. 1994. Global importance and global cycling of selenium. pp. 1–7. In W.T. Frankenberger Jr. and S. Benson, editors. *Selenium in environment*. New York: Marcel Dekker.
- 3) Kagami, T., T. Narita, M. Kuroda, E. Notaguchi, M. Yamashita, K. Sei, S. Soda, and M. Ike. 2013. Effective selenite volatilization under aerobic conditions and recovery from the aqueous phase by *Pseudomonas stutzeri* NT-I. *Water Res.* 47: 1361–1368.
- 4) Krafft, T., A. Bowen, F. Theis, and J. M. Macy. 2000. Cloning and sequencing of the genes encoding the periplasmic-cytochrome *B*-containing selenate reductase of *Thauera selenatis*. *DNA Seq.* 10: 365–377.
- 5) Kuroda, M., E. Notaguchi, A. Sato, M. Yoshioka, A. Hasegawa, T. Kagami, T. Narita, M. Yamashita, K. Sei, S. Soda, and M. Ike. 2011. Characterization of *Pseudomonas stutzeri* NT-I capable of removing soluble selenium from the aqueous phase under aerobic conditions. *J. Biosci. Bioeng.* 112: 259–264.
- 6) Kuroda, M., E. Miwa, K. Sei, M. Yamashita, and M. Ike. 2013. Selenate-reduction mechanism in *Pseudomonas stutzeri* NT-I, a promising biocatalyst for selenium removal and selenium recovery from contaminated water, Abstracts of IWA Metals in Water-Health Protection and Sustainable Through Technical Innovation 2013. November 6–9, 2013, Shanghai, China. The International Water Association.
- 7) Lenz, M. and P.N.L. Lens. 2009. The essential toxin: the changing perception of selenium in environmental sciences. *Sci. Total. Environ.* 407: 3620–3633.
- 8) Nakatani, Y., M. Kuroda, S. Soda, and M. Ike. 2015. Treatment of selenite-containing wastewater with high salinity by activated sludge and analysis of its microbial communities. Abstracts of International Anammox Symposium, pp. 165–166.
- 9) Soda, S., M. Kashiwa, T. Kagami, M. Kuroda, M. Yamashita, and M. Ike. 2011. Laboratory-scale bioreactors for soluble selenium removal from selenium refinery wastewater using anaerobic sludge. *Desalination* 279: 433–438.
- 10) Soda, S., H. Takahashi, T. Kagami, M. Miyake, E. Notaguchi, K. Sei, N. Iwasaki, and M. Ike. 2012. 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.* 48: 63–71.
- 11) Turner, R.J., A.L. Papish, and F. Sargent. 2004. Sequence analysis of bacterial redox enzyme maturation proteins (REMPs). *Can. J. Microbiol.* 50: 225–238.
- 12) 惣田 訓, 長谷川愛, 池 道彦, 藤平弘樹, 藤川宗治. 2014. 化学溶出と微生物還元による下水汚泥焼却灰中のセレンの除去. *環境技術*. 43: 96–101.