

平成22年6月17日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20710063  
 研究課題名（和文） 異化型ヒ酸塩還元細菌と天然メディエーターを併用した汚染土壌からのヒ素除去  
 研究課題名（英文） Arsenic removal from contaminated soil by simultaneous use of a dissimilatory arsenate-reducing bacterium and naturally occurring mediators.  
 研究代表者  
 山村 茂樹 (YAMAMURA SHIGEKI)  
 独立行政法人国立環境研究所・水圏環境研究領域・研究員  
 研究者番号：90414391

研究成果の概要（和文）：本研究では、環境中での微生物を介したヒ素の可溶化反応に着目し、ヒ素汚染土壌の新たな浄化手法開発のための基礎的検討を行った。結果、固相から水相への効率的なヒ素除去には、異化型ヒ酸塩還元細菌による固相中のヒ酸塩還元が必須の反応であることが明らかとなった。また、ビタミンB<sub>2</sub>(リボフラビン)をメディエーターとして用いることによって、可溶化効率の大幅な改善が可能であることが明らかとなり、両者の併用が汚染土壌浄化に有効であることが示された。

研究成果の概要（英文）：We investigated a novel bioremediation strategy for arsenic-contaminated soil via microbial arsenic mobilization. The results indicate that solid phase arsenate reduction by a dissimilatory arsenate-reducing bacterium is vital for effective arsenic removal from solid phase. Also, vitamin B<sub>2</sub> could significantly enhance arsenic mobilization as a redox active mediator, suggesting that simultaneous use of dissimilatory arsenate-reducing bacteria and vitamin B<sub>2</sub> can be an effective strategy for remediation of arsenic-contaminated soil.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、環境技術・環境材料

キーワード：環境修復技術、土壌汚染、ヒ素、ヒ酸塩還元、メディエーター、嫌気性微生物

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では、土壌汚染対策法の施行を契機として、工場跡地の再開発等に伴う土壌汚染の顕在化が重要な社会問題となっており、特

に、環境省調査で環境基準超過数が例年第1～2位と高い位置を占めるヒ素による汚染が深刻となっている。現在その処理には、多くの場合、汚染された土壌の封じ込めや掘削除

去が適用されているが、一般的に極めて高コストであるうえ、処理によって土壤自体を失う、もしくは処理後の土地利用が大きく制限されてしまうという制約がある。そのため、コストの高さから処理を行う事ができない、あるいは処理後の土地利用の制限から低・未利用となる可能性の高い土地、いわゆる“ブラウンフィールド”問題の顕在化が急速に社会的関心を集めており、産業活動などにも影響を及ぼすようになってきている。

土壤環境中のヒ素は、ほとんどが無機態であるヒ酸塩〔As(V)〕及び亜ヒ酸塩〔As(III)〕の形で存在するが、As(III)はAs(V)より吸着性が低く、水の流れと共に移動しやすいことが知られている。好気条件下では大半がAs(V)として存在し、土壤中の鉄(III)やアルミニウム酸化物に吸着・固定化されているが、嫌気条件下ではAs(III)の形になって水相へと溶出し易くなる。このヒ素の可溶化現象は、As(V)自身の還元や、土壤中でのAs(V)の吸着に大きく寄与している酸化鉄(III)鉱物の還元的可溶化によって促され、微生物が重要な役割を担っていることが指摘されている。なかでも、As(V)を嫌気呼吸の最終電子受容体として利用する異化型ヒ酸塩還元細菌(以下、DARB)は、水相中のAs(V)のみならず、酸化鉄鉱物などの固相中に含まれるAs(V)を還元し、As(III)を溶出し得ることが明らかとなっていることから、環境中におけるヒ素の循環に重要な役割を果たしていると考えられている。

汚染土壤中でのヒ素は、有機態の場合もあるが、主にAs(V)として存在する傾向があるとの報告がなされている。そのため、DARBを利用して汚染土壤中のAs(V)をAs(III)へと還元することによって、ヒ素のみを特異的に水相へ抽出・除去することが理論的には十分可能である。しかしながら、浄化技術としての可能性を実験的に検討した例は、国内外を問わず報告されていない。

## 2. 研究の目的

筆者らのグループはこの先駆けとなる研究を行っており、これまでに高い能力を持つDARBとして*Bacillus selenatarsonensis* SF-1株を取得している。また、実汚染土壌などの多様な固相系から、上述のコンセプトに基づいたヒ素の可溶化・除去が可能であることを既に実証し、予備的な実験から、微生物・酵素反応の還元メディエーターのモデル物質として anthraquinone-2, 6-disulfonate (AQDS) を処理系内に添加することで、DARBによるヒ素可溶化の効率が大幅に上昇することを見出している。しかし、合成メディエーターであるAQDSは、生分解性や生体への影響に不明な部分が多く、土壌への残存を考慮に入れると実利用に適さない可能性がある。

そこで本研究では、実用に向けて安全・安価かつ高効率のメディエーターを選定するために、天然由来物質の利用を検討した。また、効率の良い浄化系構築のための基礎的知見を得るために、効果の得られたメディエーターによるヒ素可溶化促進メカニズムの推定を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 供試菌株

本研究では、通性嫌気性のDARBである*Bacillus selenatarsonensis* SF-1株を実験に供した。本菌株は、嫌気条件下においてAs(V)、Fe(III)、セレン酸塩、硝酸塩、及びAQDSを還元できる。また、比較対照として、Fe(III)及びAQDS還元能を有するが、As(V)還元能を持たない近縁種の*B. jeotgali* JCM 10885株を用いた。

### (2) 供試メディエーター

微生物・酵素反応のメディエーターとして用いられており、可逆的な酸化・還元反応が可能であることが知られている天然由来物質(リボフラビン: RF、フラビンモノヌクレオチド: FMN、フラビンアデニンジヌクレオチド: FAD、シアノコバラミン: CNCB、ヒドロキソコバラミン: HCB、メチルコバラミン: MCB、バニリン酸: VA)を用いた。

### (3) Al及びFe(III)共沈殿物からのヒ素可溶化実験

汚染土壌中においてヒ素は多くの場合がAs(V)として存在し、その大半がFe(III)及びAl酸化物によって保持されていることから、ここではAlもしくはFe(III)共沈殿物を固相として使い、DARB並びに各種天然メディエーターを添加してヒ素の可溶化実験を行った。

50mL容バイアルビンに分注したAs(V)を含む9mLのTris-HCl buffer溶液(pH:8.0)に、 $Al_2(SO_4)_3$ もしくは $FeCl_3$ 溶液を1mL加えて全量を10mLとした。その後、室温で約1時間振盪し、共沈殿作用により溶液中のAs(V)を固相へと移行させた。この共沈殿物を含む溶液に、各メディエーター(0.1mM)を含む乳酸無機塩培地を10mL加えた。ブチルゴム栓とアルミシールで密栓して気相部を窒素置換し、室温で約12時間静置した後、好氣的に前培養を行った供試菌株(菌体濃度:  $3-5 \times 10^7$  cells/mL)を加え、回転振盪培養(120 rpm、30°C)を行った。

実験は全て2連で行い、各サンプリング時に溶液・沈殿物を全量回収した。溶液中の濃度を測定する際は、サンプルをマイクロフィルター(0.45  $\mu$ m)でろ過し、懸濁物質を除去した後、1N HClを加えて分析に供した。また、サンプルに先にHClを加えて攪拌することで沈殿物を溶解し、その後ろ過を行ったものを

HCl 抽出液として同様の分析に用いた。

(4) 分析

液中の As、Al 及び Fe 濃度は、ICP-AES を用いて測定した。また、Fe(II)濃度の測定には、Ferrozine 法を用いた。

4. 研究成果

(1) Al 共沈殿物からのヒ素可溶化

Al 共沈殿物を含む培養液に *B. selenatarseenatis* を加え、ヒ素可溶化実験を行った。図 1 には、実験開始 7 日後の溶液中ヒ素濃度を示した。全ての実験系においてある程度のヒ素が溶液中から検出されたが、その濃度はメディエーターの種類、またその有無に関わらず同程度であり、メディエーター添加によるヒ素可溶化の促進は認められなかった。ここで、Al は自身が還元を受けることがないため、Al 共沈殿物を用いた系では、固相中 As(V)の還元による直接的メカニズムでのみヒ素可溶化が起こりうる。従って、メディエーターでは、固相中 As(V)の還元は促進できないと考えられた。なお、図には示していないが、菌体を加えていない対照系では、溶液中ヒ素濃度は全て 0.1mM 以下と実験前に比べた変化はなく、メディエーターのみではヒ素可溶化が起こらないことを確認している。

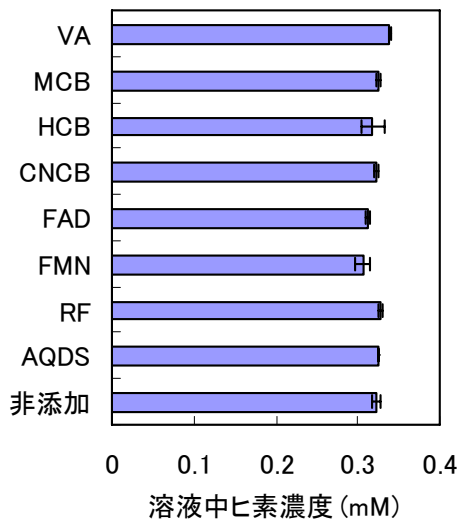


図 1 Al 共沈殿物からのヒ素可溶化

(2) Fe(III) 共沈殿物からのヒ素可溶化

Fe(III) 共沈殿物を含む培養液に *B. selenatarseenatis* を植種してヒ素可溶化実験を行った。実験開始 7 日後の溶液中のヒ素濃度を測定した結果を図 2 に示した。菌体を加えた全ての実験系において、ヒ素の可溶化

が認められた。なかでも、RF とその補酵素型である FMN 及び FAD を添加した系では、菌体のみでの非添加系にくらべて大幅なヒ素濃度の増加が見られ、AQDS と同様、可溶化の促進が確認された。このことから、RF、FMN 及び FAD が、DARB によるヒ素可溶化と併用する天然メディエーターとして有望であることが示された。なお、菌体を加えていない対照系では、いずれのメディエーターを添加しても、ヒ素の溶出はほとんど見られなかった(データ不掲載)。

また、同実験における溶液及び HCl 抽出液中の Fe 濃度を測定した。溶液中では、ヒ素と同様、AQDS、RF、FMN 及び FAD を添加した系において大幅な Fe 濃度の増加が認められ、そのほとんどが Fe(II)として検出された(図 3)。さらに、これらの系では、HCl 抽出液の Fe もほぼ全量が Fe(II)となっていた(図 4)。これらの現象は、菌体を加えていない対照系では見られなかった(データ不掲載)。従って、AQDS、RF、FMN 及び FAD がメディエーターとなって固相中 Fe(III)と *B. selenatarseenatis* との間での電子授受を媒介し、Fe(III)の還元及び可溶化を促したものと考えられた。以上の結果から、これらのメディエーターの共存によって、間接的メカニズム、即ち、Fe(III)酸化物の還元的可溶化に付随したヒ素可溶化が促進されることが示された。

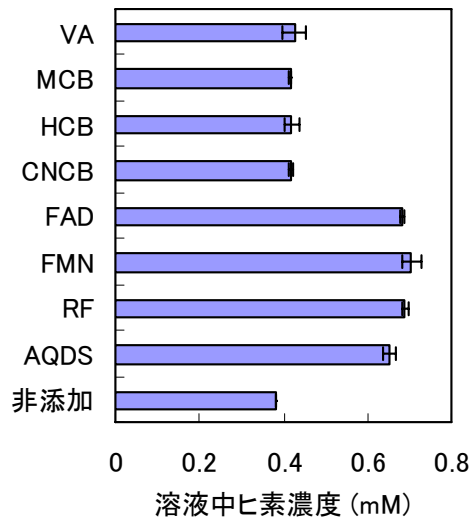


図 2 Fe(III)共沈殿物からのヒ素可溶化

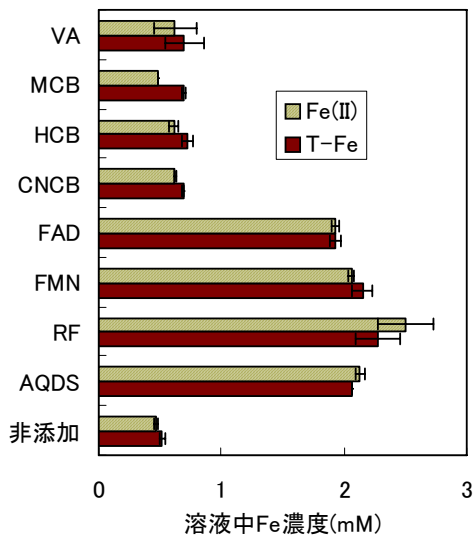


図3 Fe(III)共沈殿物からのFe可溶化

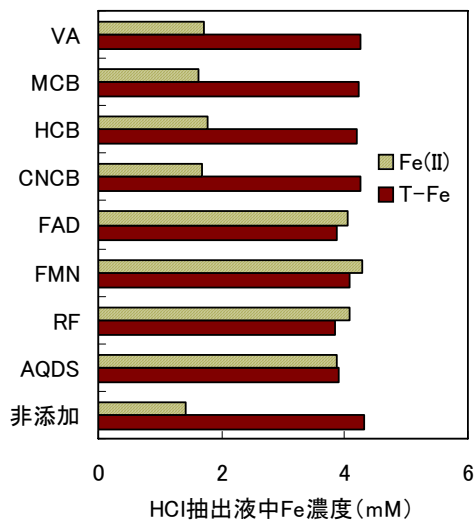


図4 Fe(III)共沈殿物中でのFe還元

(3) 汚染土壌からのヒ素除去におけるAs(V)及びFe(III)還元的作用

DARBとメディエーターを併用したヒ素可溶化・除去において、As(V)及びFe(III)還元の両反応が担う役割を解明するために、Fe(III)共沈殿物を含む培養液にAs(V)還元能を持たない*B. jeotgali* (B. j.)を植種し、RF存在下でヒ素可溶化実験を行った。実験開始7日後の溶液中のヒ素濃度を測定した結果を図5に示した。相当量のFe(II)溶出が確認されたが、DARBの*B. selenatarsenatis* (B. s.)の場合とは異なり、ヒ素の可溶化はほとんど起きなかった。また、*B. selenatarsenatis*と*B. jeotgali*を用いた双

方の実験において、溶液中のヒ素及びFe濃度を経時的に測定し、その関係をプロットした(図6)。*B. selenatarsenatis*の場合は、Fe濃度の増加とともに、ヒ素濃度が増加する傾向が見られた( $r = 0.976, p < 0.01, n = 8$ )。一方、*B. jeotgali*ではヒ素濃度が逆に減少する傾向が得られた( $r = -0.853, p < 0.01, n = 8$ )。As(V)はAs(III)よりもFe(III)酸化物に吸着されやすいことが知られているが、近年の研究から、微生物によるFe(III)還元の結果生じたFe(II)を含む鉱物は、その結晶構造によってAs(V)に対する高い吸着能を持つ場合があることが明らかとなっている。本実験系において、Fe(III)が全て還元された場合でも、全てが液中に移行するわけではなく、かなりのFe(II)が固相に残存していた。このことを考慮に入れると、Fe(III)のみが還元されるとFe(II)鉱物へのAs(V)の再吸着が生じ、その結果、ヒ素可溶化が生じ難くなるものと考えられた。以上の結果を総合的に解釈すると、メディエーターを介したFe(III)還元の促進は、As(V)還元が生じる場合のみ、ヒ素可溶化の促進に寄与し得ると考えられた。

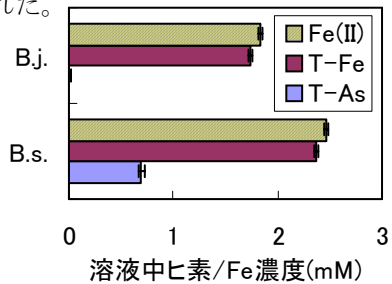


図5 ヒ素可溶化におけるAs(V)還元の影響

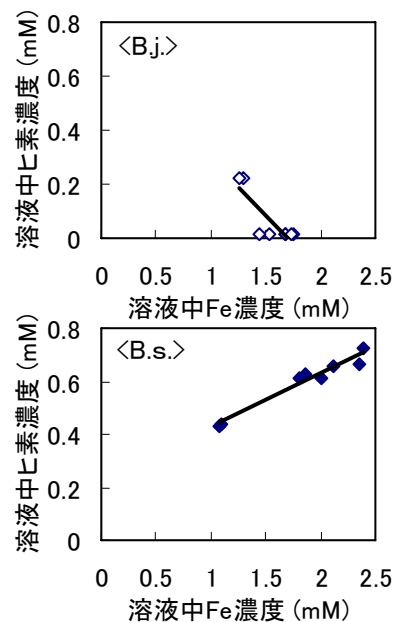


図6 溶出ヒ素とFeの関係

本研究の結果から、DARB を用いた汚染土壌からのヒ素可溶化・除去において、RF、FMN 及び FAD がその効率を改善するメディエーターとして利用できることが明らかとなった。なかでも、比較的安価で入手・生産可能な RF が、実利用に有望であると考えられた。また、これらのフラビン類は、AQDS と同様、固相中の As(V)還元を促すことはできず、Fe(III)還元に伴った間接的メカニズムによってヒ素可溶化を促進すること明らかとなった。従って、ヒ素の可溶化・除去には、DARB 等の As(V)還元細菌の存在が必須であり、汚染土壌のバイオレメディエーションには As(V)還元細菌と RF の併用が有効であるといえる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 山村茂樹、渡邊未来、惣田訓、池道彦、天然メディエーターを利用した微生物学的ヒ素可溶化の促進、用水と廃水、査読有、52、2010、401-406
- ② Yamamura S., Watanabe M., Yamamoto N., Sei K., Ike M., Potential for microbially mediated redox transformations and mobilization of arsenic in uncontaminated soils, Chemosphere, 査読有, 77, 2009, 169-174
- ③ 山村茂樹、渡邊未来、ヒ酸塩還元菌とメディエーターを併用したヒ素汚染土壌浄化技術、生物工学会誌、査読無、86、2008、611-613

[学会発表] (計 3 件)

- ① 山村茂樹、渡邊未来、惣田訓、池道彦、ヒ酸塩還元細菌と天然メディエーターを用いたヒ素の可溶化、日本水処理生物学会第 46 回大会、2009 年 11 月 12 日、高知市文化プラザかるぽーと
- ② Yamamura S., Watanabe M., Soda S., Ike M., Enhancement of microbial arsenic mobilization by natural mediators, 19th International Symposium on Environmental Biogeochemistry, 2009 年 9 月 14 日, University of Hamburg
- ③ 山村茂樹、渡邊未来、惣田訓、池道彦、微生物によるヒ素可溶化に及ぼすメディエーターの影響、第 43 回日本水環境学会年会、2009 年 3 月 18 日、山口大学

[図書] (計 1 件)

- ① 吉田和哉 名誉監修；植田充美、池道彦監修、山村茂樹 他 55 名、株式会社シーエ

ムシー出版、メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回収－新元素戦略の新しいキーテクノロジー－、2009、291

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山村 茂樹 (YAMAMURA SHIGEKI)  
独立行政法人国立環境研究所・  
水圏環境研究領域・研究員  
研究者番号：90414391

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし