

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510091

研究課題名（和文） 重金属土壤汚染浄化のための新バイオレメディエーション戦略

研究課題名（英文） New bioremediation strategy for the treatment of soil polluted by heavy metal

研究代表者

杉山 友康（SUGIYAMA TOMOYASU）

東京工科大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：30367198

研究成果の概要（和文）：六価クロムを還元する新属新種の放線菌株を *Flexivirga alba* ST13^T として提案した。*F. alba* ST13 株は六価クロムを還元して三価クロムの沈殿に変換できることを明らかにした。ST13 株の六価クロム還元には有効な物質として廃糖蜜を見出し、廃糖蜜は ST13 株の有効な低コスト活性化剤として利用可能と考えられた。多孔質セラミックスへの ST13 株の生着はその孔径よりも組成が影響した。本研究は ST13 株の活性制御が培地成分などの化合物によって可能なこと、および本株の担体への生着がセラミックスという素材によって可能なことを示した。

研究成果の概要（英文）：*Flexivirga alba* gen. nov., sp. nov., an actinobacterial taxon in the family *Dermacoccaceae* aerobically reduces hexavalent chromium. Strain ST13 reduce Cr(VI) aerobically. XANES analysis shows the presence of Cr(OH)₃ in precipitate, indicating the bacterial reduction of Cr(VI) to trivalent chromium (Cr(III)). The bacterial Cr(VI) reduction was more efficient in minimal medium supplemented with molasses than with glucose. Strain ST13 can attach on the surface of porous ceramics. The composition of ceramics affects the efficiency of bacterial attachment. Our data provide a basic information for the bioremediation of Cr(VI) using Cr(VI)-reducing strain ST13.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,840,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：六価クロム、*F. alba* ST13^T、活性化剤、セラミック、土壤

1. 研究開始当初の背景

21世紀に実現が期待されている技術は、省資源・省エネルギー型で環境負荷を最小限に抑える製造技術、金属元素の持続的利用を可能とするリサイクル技術、そして20世紀型産業によって汚染された土壤・水環境を、環境

に優しく修復する技術である。従来、金属に関わる技術分野は、高温・高圧下や強酸を利用するなどの物理・化学的手法が広く採用されてきた。そのため本技術分野においては、有機物の分解や合成を担う生物学的なプロセス利用はあまり省みられていなかった。し

かし一方で、特殊な微生物や植物によって極めて多様な金属類が代謝され得ることがわかってきている。このような生物の金属に対する活性を活用することができれば、従来の発想にとらわれない革新的な技術が生み出されると期待されていた。

クロムはレアメタルのひとつで、工業製品の製造に不可欠な金属である。その大部分はステンレス棒の製造に使用され、環境問題とはあまり関係がない。しかし重クロム酸ソーダ、重クロム酸カリウム、無水クロム酸、クロム酸といった形態のクロムは人体有害性が高く、適切な処理が求められていた。これら化学用クロムの用途はメッキ加工、皮革、顔料、染料であり、特にメッキ加工が80%を占める。したがって六価クロム汚染の危険の高い土壌・水環境は、関連工場のある地域に限定されるという特徴があった。しかもそれが都市部に多く、周辺地域への汚染拡散防止や、工場閉鎖時の土地再利用のための土壌浄化が課題となっていた。

六価クロム含有水溶液の場合には一般に、酸性溶液中で亜硫酸水素ナトリウムを加えて六価を無害な三価のクロムに還元するといった処理法で汚染防止が実施されている。しかし、ひとたび土壌に浸入した六価クロムを除去するのは困難である。もし基準値以上の六価クロムが環境中に漏えいした場合は、土壌汚染対策法（平成15年策定）によって、汚染土壌の浄化処理が義務付けられている。その浄化作業は容易ではなく、多大な労力と費用を要していた。

六価クロム汚染土壌を処理する技術として、土壌の掘削除去が広く採用されている。この技術は問題を別の場所に移しているだけで根本的な解決をしていない。しかもコストが非常に高く、産業発展の循環に悪影響を及ぼしている。そのため近年では、汚染の源位置において六価クロムを漏出させない2つの技術が注目されていた。六価クロム不溶化技術は吸着性担体に六価クロムを吸着させる技術であり、汚染場所からの六価クロム拡散を抑制する効果が期待されるが、元素の電荷的には無害化していないため不慮の摂取による健康被害を起こす可能性は残る。これに対して六価クロムの還元無害化技術は有害物から無害物に変えることが特徴であり期待が大きい。

一方、微生物には六価クロムに対して耐性を示すもの、吸着性のあるもの、還元して三価クロムに変換するものが存在することが知られている。六価クロムの有害性が社会に認知されるのに伴って、1970年代から六価クロムを還元する微生物が探索された。その結果、限られた微生物が六価クロムの除去という用途に対して有用な性質を持っていることが発見された。そこでこういった微生物

を利用した源位置でのバイオレメディエーションはエネルギー負担も少なく、積極的に浄化することから脚光を浴びているが、実際の現場での採用数は少ない。

汚染土壌に存在する土着の細菌をその場で増やし、この細菌によって六価クロム汚染を除去する技術が提案されているが、その成功のカギは偶然に六価クロムを還元無害化する細菌が汚染土壌に存在した場合に限られる。これに対して有用細菌を土壌に接種する手法が期待されている。その候補細菌としてエンテロバクター・クロアカ HO1 株は高濃度六価クロム水溶液 (250 mg/L) を還元できるし、バチルス・セレウスは 2 mg/L の六価クロム水溶液を還元できると報告されているが、これらは病原性が指摘されている。シュードモナス・アンビグア G-1 株は 150 mg/L を 60 mg/L まで還元するが、活性が持続しないと報告されている。このようにまだ有用細菌の選択の余地がある。

経済産業省と環境省も 2005 年に微生物の開放系利用に関する指針を定め、生態系への影響および人への健康影響などの安全性を確保して微生物を使った環境浄化を実施するように指導している。すなわち適切な性質の微生物を選択すること、土壌浄化後の微生物に由来する危険についての安全性評価（例えば拡散防止、病原性、有害物質産生性）、必要に応じた効果的な処置、そして処置後の有害物質の残留調査を求めている。

以上の課題に加えて最近の研究から、バイオレメディエーション法による土壌汚染浄化の新たな課題が指摘されていた。すなわち土壌から単離して液体培養で増やした細菌を土壌に再接種した時、その細菌数が非常に短期間に減少し、汚染除去効果が十分に上がらないことが問題となっていた。これには細菌の生息する土壌粒子が影響するらしい。したがって細菌のバイオレメディエーションによる六価クロム汚染除去には、その安全性はもちろんのこと、「接種した有用細菌を土壌で安定的に保持させ、その細菌による浄化活性を制御する」といった新戦略が必要と考えられていた。

2. 研究の目的

重金属土壌汚染を安価に効率的に措置できる技術が求められていた。われわれの発見した新規な放線菌株 ST13 を汚染浄化に利用できれば、六価クロム汚染の浄化の低コスト化に大きく寄与すると期待された。新規放線菌株 ST13 は 50ppm の六価クロムを還元する活性を有する。この濃度は日本の環境基準値の 1000 倍濃度に相当する。新規放線菌株 ST13 は rRNA 塩基配列による分子系統樹解析の結果、*Dermaococaceae* 科の新種の放線菌株として同定された。液体培養下において放線菌株

ST13 は六価クロム還元の高い活性を示すが、土壌での活性は不明であった。有用細菌が土壌中で効率的に働く方法を開発できれば極めて有用である。土壌における細菌の活性は、土壌の pH や粒子表面への付着が大きく影響する。また細菌の生息においては土壌有機物の存在が栄養源として重要である。すなわち有用細菌にとっての最適な物理的環境と生化学的環境を整えることができれば、土壌の汚染浄化に有効と考えられた。

そこで本研究ではまず、放線菌株 ST13 の土壌での活性発現を検討することにした。そして物理的環境として、有用細菌をセラミックのような粒子表面にあらかじめ付着させて安定化して環境を整え、これを土壌に混合して汚染浄化する方法の有効性を検証することにした。多孔質セラミックの内部にまで微生物が生着すれば、水透過性の良いフィルターとして機能することが期待できる。生化学的環境として、有用細菌による汚染浄化を促進する有機物や無機物を検討し、その効果を検証することにした。新規放線菌株 ST13 を実施例として検討することで、実用化を目指した六価クロム汚染土壌を効率的に浄化する方法を開発することを目指した。

3. 研究の方法

高効率化を検討するためには ST13 株による六価クロム還元のマカニズム解明が必要である。ST13 株の至適培養温度、至適 pH 検討、ST13 株による六価クロム還元について、種々の有機・無機化合物の添加効果をジフェニルカルバジド吸光光度法にしたがって六価クロム濃度を測定して評価した。全クロム濃度の測定は溶液中のクロムを酸化して得た六価クロムを試料にし、この測定した六価クロム濃度を全クロム濃度とした。クロム沈殿物の詳細な分析は X 線吸光近傍微細構造解析法 (XANES) によって行った。ST13 株の六価クロム還元に関わる遺伝子は本細菌の DNA を電気泳動解析してプラスミド保持の有無を検討した。ST13 株の使用安全性の確認のため、ミミズの生育試験 (ISO 11268-1) を実施した。

ST13 株の支持体への固定性は細菌の ATP 生産性と走査型電子顕微鏡観察によって評価した。支持体に固定した ST13 株による六価クロムの還元については、実験室レベルのカラム法に基づく簡単な浄化システムを試作して検討した。

汚染土壌は六価クロム汚染の無い適当な土壌に六価クロム水溶液を注入して調製した。このモデル汚染土壌に対する ST13 株の効果を六価クロム還元について検討した。

4. 研究成果

(1) 新規六価クロム還元性細菌株 ST13 の

同定 リボソーマル DNA (16S) の分子系統樹解析、細胞壁成分解析、糖鎖解析、種々の生化学解析、および形態解析等によって ST13 株は放線菌 *Dermaococcaceae* 科の親族新種株であることが強く示唆された。そこで *Flexivirga alba* ST13^T 基準株として本菌株を提案した。*Flexivirga* は本菌株の形態が変わることに由来した名前で、*alba* はコロニーが白いことに由来する名前である。ST13 株は放線菌 *Dermaococcaceae* 科に属する細菌で六価クロム還元性を示した最初の細菌である。

(2) ST13 株の好気培養による六価クロムの還元 六価クロムを還元する細菌の多くは嫌気的な培養条件で六価クロムを還元すると報告されている。一方、ST13 株は好気的な培養条件で六価クロムをよく還元することがわかった。ST13 株は 15-37°C で良く増殖し、5°C や 50°C では増殖性を示さない中温菌であった。ST13 株は pH が 5-9 で増殖を示し、6-8 で良く増殖する pH が中性を好む細菌であった。興味深いことに、活発に増殖する ST13 株において六価クロム還元活性が必ずしも高くなかった。ST13 株は細菌の対数増殖期よりも定常期以降のステージにおいて六価クロムをよく還元し、ほとんど増殖しない状態でも高濃度六価クロム (9 mM) を還元することがわかった。ST13 株は増殖中でなくても六価クロムを還元することから、増殖に直接かわらない代謝化学反応が六価クロム還元に関わっていると考えられた。一方、炭素源としてのグルコースが無い培地では ST13 株による六価クロム還元が認められない。したがって ST13 株はグルコースから得た電子を細胞増殖と無関係に六価クロムに供与することが可能と考えられる。本性質は、細胞増殖のための炭素源および六価クロム還元のための電子供与体としての栄養源が ST13 株を利用した六価クロムの還元に必要なことを示唆している。

(3) ST13 株によって減少した六価クロムの性状 ST13 株が除去した培養液中の六価クロムは水溶性の六価クロム以外の三価クロムなどに变化した。そして長期に培養を続けると、その六価クロムではない水溶性のクロムは水に不溶性の三価クロムである水酸化クロムに変化して沈殿性を示すことがわかった。水酸化クロムは極めて安定な水に不溶性の化合物であることが知られている。この反応がすべて pH6-8 の中性付近で起きることから、ST13 株による六価クロムの還元は化合物還元剤によって化学的に還元する反応とは異なることが示唆された。後者は早い反応だが、六価クロムを還元して水に不溶性の沈殿物にするために溶液の pH 管理を必要とする。一方 ST13 株は三価クロムの沈殿物を生じるまでに時間を要すること、および還元後に生じる三価クロムは水溶性物質として存

在しうるが、長期的には水に不溶化して沈殿することを示唆している。

(4) ST13 株による六価クロム還元を促進する栄養源 電子供与体としての栄養源が ST13 株による六価クロム還元に必要な。検討した結果、黒糖と一緒に培養した ST13 株はその黒糖の産地（沖縄県および鹿児島県の主要な産地）によらず六価クロムを良く還元することがわかった。さらに製糖後の廃糖蜜はグルコースを使用した場合に比べて ST13 株の増殖性は悪いが、六価クロムの還元性は良いことを見出した。廃糖蜜はグルコースと比較してコスト的に有利なことが知られている。廃糖蜜は精糖後に生じる産業廃棄物のひとつであり、その有効利用が求められている。廃糖蜜は ST13 株を利用して六価クロム汚染除去する方法を開発する上で、極めて有望な栄養源と考えられた。

(5) ST13 株を効率良く固定する担体 ST13 株が生着するセラミックスを検討し、ハイドロキシアパタイトやアルミナシリカといった材料で作製された素材に生着しやすい傾向にあった。多孔質のセラミックスの細孔に ST13 株が付着したことを確認したが、その孔径の大きさと付着性については関連性を認められず、材質のほうが ST13 株の付着性に対する影響が大きいことがわかった。粘土を高温で焼成した発泡煉石を ST13 株の生着に利用すると、発泡煉石自体は六価クロム還元を示さないが ST13 株単独に比べて六価クロムの還元効率が良くなる傾向があることがわかった。

(6) 六価クロムを含有する土環境の浄化 六価クロムで汚染した土環境を作る検討をして、添加した六価クロムの土壌から溶出のしやすさがその組成や性質に影響されることを確認した。土壌重量の 15% の ST13 株培養液を土壌に添加すると、その土壌から溶出する六価クロムは経過日数とともに減少することがわかった。溶出する六価クロム濃度が検出限界以下になるのに要する時間は同じ濃度の六価クロム水溶液を還元するのに要する時間よりも長い傾向にあった。ST13 株で土壌を処理するとき溶出した六価クロムは添加した水分量によって六価クロム濃度が大きく影響を受けると考えられる。ST13 株は六価クロムを含有する固体培地で 0.3 mM 以上の六価クロムが存在すると増殖しにくくなる。液体培地で培養する場合も 3 mM 六価クロム濃度では増殖性が悪くなるのが我々の研究で明らかになっている。細菌数が多いほど六価クロム濃度が早く減少するので、十分量の ST13 株を投与することが汚染土壌の浄化効率化に重要と考えられた。

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 2 件)

- (1) Sugiyama T., Sugito H., Mamiya K., Suzuki Y., Ando K. and Ohnuki T. Hexavalent chromium reduction by an actinobacterium *Flexivirga alba* ST13^T in the family *Dermacoccaceae*. (2012 年 3 月 20 日) *J Biosci Bioeng* 113, 367-371 (査読あり)
- (2) K. Anzai, T. Sugiyama, M. Sukisaki, Y. Sakiyama, M. Otaguro and K. Ando *Flexivirga alba* gen. nov., sp. nov., an actinobacterial taxon in the family *Dermacoccaceae*. (2011 年 8 月 17 日) *J Antibiot.* 64, 613-616 (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 杉山友康 新規放線菌 ST13 株で処理したクロム含有沈殿物の XANES 解析 (2011 年 9 月 26 日) 日本生物工学会年会 (東京)
- (2) 杉山友康 六価クロム除去システムに有用な微生物 (2011 年 1 月 22 日) メタルバイオテクノロジー研究会シンポジウム (東京)
- (3) 足立幸恵、加藤悠、杉山友康 新規放線菌 ST13 株による六価クロム除去に有用な培地の検討 (2010 年 10 月 27 日) 日本生物工学会年会 (宮崎)
- (4) 杉戸浩則、間宮興、杉山友康 新規六価クロム還元細菌 ST13 株の六価クロム還元関連遺伝子の解析 (2009 年 9 月 23 日) 日本生物工学会年会 (名古屋)

[図書] (計 1 件)

- (1) 杉山友康、他 8 名、日刊工業新聞社、環境バイオテクノロジー入門(2012 年 3 月 30 日) 17-21、43-48

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：六価クロム還元能を有する微生物の活性化方法

発明者：杉山友康

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2010-94794

出願年月日：平成 22 年 4 月 16 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://www.teu.ac.jp/sugiyama/index.html>
1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 友康 (SUGIYAMA TOMOYASU)
東京工科大学・応用生物学部・准教授
研究者番号：30367198

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：