

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12230

研究課題名(和文) 微生物機能を利用した廃水からのアンチモン除去技術の基礎開発

研究課題名(英文) Development of a biological removal method of antimony from wastewater

研究代表者

惣田 訓 (Soda, Satoshi)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：30322176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：微生物機能を活用した水中からのアンチモンの効果的な除去技術の基礎開発を目的とし、水中からSbを除去する微生物集積系を構築し、さらにその特徴を解明することを試みた。淀川の十三干潟、琵琶湖、阿蘇海、若狭湾の水試料、兵庫県の森林土壌、下水処理汚泥などの様々な微生物試料は、嫌気条件において硫化アンチモン(Sb₂S₃)に特有の橙色の沈殿物の形成し、水相からのアンチモン除去能力を示した。また、一部の試料からは、酸化アンチモン(Sb₂O₃)を示唆する沈殿物を形成し、水相からアンチモンを除去した。アンチモン還元能力を示す細菌コロニーが平板培地に形成され、アンチモン除去技術の開発に有望な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：For developing a biological treatment process for removing antimony from water, antimony-reducing bacteria were enriched and characterized. Various microbial samples collected from water of Yodo River, Lake Biwa, Aso Sea, Wakasa Bay, and soil of forests in Hyogo, and sewage treatment sludge showed orange precipitates of antimony sulfide (Sb₂S₃) under anaerobic conditions. Some samples showed white precipitates of antimony oxide (Sb₂O₃), resulting in removal of antimony from the water phase. Bacterial colonies with antimony reducing ability were formed on the solid media. In conclusion, promising results were obtained for developing antimony removal technology.

研究分野：排水処理工学

キーワード：アンチモン 微生物機能 廃水処理 資源回収

1. 研究開始当初の背景

アンチモンは、国内生産量が約 8 千 ton/年であり、主に三酸化アンチモン (Sb_2O_3) として繊維の難燃助剤として利用されているレアメタルである (恒見・和田, 2008)。関連産業の廃水中のアンチモン濃度は 0.02~11.5 mg/L であり (川喜多・上江須, 2007)、河川水中のアンチモンは、五価 $Sb(V)$ が 6~8 割と多く、三価 $Sb(III)$ が 2~4 割とされ、 $Sb(V)$ よりも $Sb(III)$ の毒性が 10 倍高いと報告されている (堀内ら, 2012)。その水道水質基準値は $15 \mu g/L$ 、水質環境基準の要監視項目の指針値は $20 \mu g/L$ であり、繊維染色事業所がある福井県狐川・馬渡川や、廃止鉱山のある愛媛県加茂川水域・砥部川水域などでは指針値超過が複数年で生じている (環境省中央環境審議会, 2008)。毒性と検出頻度の状況を鑑みると、近い将来、アンチモンは環境基準・排水基準項目に追加される可能性が高い。しかし、従来の凝集沈殿やイオン交換で除去することは難しく (川喜多・上江須, 2007)、廃水からの有効な除去技術の開発が必要とされている。

2. 研究の目的

水中のアンチモンは、主に 5 価または 3 価で存在するが、3 価のものは比較的沈殿物を形成しやすい。最近、液相のアンチモンを 5 価から 3 価に還元する微生物の存在が報告 (Kulp et al., 2014; Nguyen et al., 2014) され、生物学的除去技術の開発が期待できるようになった (図 1)。

そこで本研究では、水中から Sb を除去する微生物集積系を構築し、さらにその特徴を解明することを試みた。

3. 研究の方法

(1) 十三干潟底泥微生物のアンチモン除去ポテンシャル

100 mg-Sb/L の $K[Sb(OH)_6]$ 、乳酸 2 mM、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2mM を含む無機塩培地 20 mL に淀川の底質の微生物を植種して密封し、28°C の嫌気条件で静置培養した。約 7 日毎に培養液 200 μL を新しい培地に植え継ぐことを繰り返した。液相のアンチモン濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析装置で測定した。培地に形成された沈殿物を回収し、透過型電子顕微鏡とエネルギー分散型 X 線分析装置で観察した。

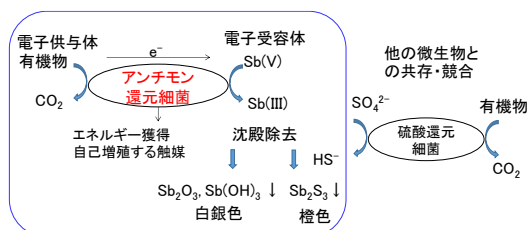


図 1 アンチモン還元細菌を用いたアンチモン除去方法の提案

培養液中の 16SrRNA 遺伝子を PCR で増幅し、HhaI で消化して末端標識制限酵素断片多型分析 (T-RFLP 法) によって解析した。

(2) 土壌・廃水処理系の微生物のアンチモン除去ポテンシャル

採取した試料の特徴を表 1 に示した。兵庫県内の里山から多様な土壌や環境水を選び、試料 1~8 を採取した。膜分離 (MBR) 活性汚泥から試料 9 を、回分式活性汚泥から試料 10 を採取した。土壌試料は湿重量 1 g を 9 mL の 5%トリポリリン酸ナトリウム溶液に懸濁して調製した。水試料 (活性汚泥) はそのまま使用した。100 mg-Sb/L の $K[Sb(OH)_6]$ 、硫黄源として 2mM の $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、炭素源として 2 mM の乳酸を含む無機塩培地 20 mL に試料 200 μL を加え、バイアル瓶中に密封した。その気相部を N_2 ガスで置換し、嫌気条件下で回転振盪 (120rpm, 28°C) した。水溶性の Sb 濃度は誘導結合プラズマ発光分光分析装置で測定した。また、オートクレーブ滅菌した培地に試料を接種しない系を無菌系として用い、対照実験を行った。

(3) 淡水・汽水・海水の微生物のアンチモン除去ポテンシャル

琵琶湖北湖 (竹生島付近) と南湖 (雄琴沖)、阿蘇海、若狭湾 (松原海水浴場) から、それぞれ淡水、汽水、海水の底質試料を採取した。100mg-Sb/L の $K[Sb(OH)_6]$ と 2mM 乳酸を含む無機塩培地を Sb 除去試験に用いた。橙色の Sb_2S_3 または白色の $Sb_2(OH)_3$ が沈殿することを仮定し、硫黄源として $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ を高濃度 (0.48 g/L) または低濃度 (0.048 g/L) で添加した。汽水・海水の底質試料用の培地には、26g/L 分の $NaCl$ を追加した。50mL 容積のバイアル瓶に培地 20mL を分注し、底質試料 4mg-wet を植種した。密栓したバイアル瓶の気相部を N_2 ガスで置換し、嫌気条件で回転振盪 (28°C, 100rpm) した。一定期間後、培養液 200 μL を新しい培地に植え継ぎ、2、3 回目の除去試験を行った。経時的に培養液 1.0mL を採取し、誘導結合プラズマ発光分光分析装置で Sb 濃度を測定した。混釈法によって平板寒天培地で生菌数を計数した。

4. 研究成果

(1) 十三干潟底泥微生物のアンチモン除去ポテンシャル

集積培養を始めたころは、アンチモンの除去率が安定しなかったが、植え継ぎを数回すると除去率が 80~90% 以上に安定した。アンチモンの除去率が安定した培養系からは、16SrRNA 遺伝子の T-RF が 10 個以上検出され、多様な微生物が存在していることが明らかとなった。また、植え継ぎ後にオートクレーブをした場合や培養系を好気条件にした場合は、アンチモンは液相から除去されなかった。

培養液には、数日で硫化アンチモン (Sb_2S_3)

表 1. 環境試料の特徴と水溶性 Sb 除去率

試料 No.	試料内容	採取場所	pH	含水率 [%]
1	山林土壌	兵庫県	4.3	17
2	山林水溜り	兵庫県	6.6	41
3	山林土壌	兵庫県	5.6	29
4	山林浸出水	兵庫県	7.0	-
5	山林水溜り	兵庫県	7.1	-
6	山林土壌	兵庫県	4.4	15
7	山林土壌	兵庫県	5.7	33
8	山林土壌	兵庫県	5.4	50
9	MBR 汚泥	研究室 保有	7.9	-
10	回分式汚泥	研究室 保有	6.3	-

試料	生菌数 [cfu/mL]	水溶性 Sb 除去率 [%]		
		7 日目	9 日目	29 日目
1	3.8×10^1	0	-	99
2	2.5×10^1	1	-	99
3	2.5×10^0	0	-	100
4	5.0×10^0	0	-	80
5	1.0×10^1	0	-	17
6	1.3×10^2	0	-	81
7	1.0×10^2	3	-	50
8	2.4×10^2	2	-	99
9	-	32	71	-
10	-	0	1	-

に特有のオレンジ色の沈殿物が形成され、回収した沈殿物中のアンチモンとイオウの空間分布は一致しており、その比率は約 1:1.5 であったことから、微生物によるアンチモン還元と硫酸還元によって Sb_2S_3 が形成されたことが示唆された (図 2)。

培地中のアンチモン濃度を 0.2 倍、0.5 倍にしても、その除去率は 90%以上であったが、濃度を 2 倍にすると除去率は 40%に低下したことから、アンチモンによる高濃度阻害が生じることが示唆された。また、培地中のイオウ濃度を 0.5 倍または 2 倍にするとアンチモンの除去率が低下した。イオウ源が少なければ、アンチモンと反応する S^{2-} の量が低下し、イオウが多過ぎると、その毒性によって反応が阻害されたものと考えられる。培地中の乳酸濃度を 0.5 倍または 2 倍にしても、アンチモンの除去率が低下した。乳酸は、アンチモン還元微生物の炭素源や電子供与体として働いている一方、硫酸還元微生物などの他の微生物にも利用されており、複雑な競合関係があることが考えられる。

これらの結果から、本研究における液相からのアンチモンの微生物学的除去には、アンチモン還元微生物と硫酸還元微生物が関与しており、嫌気条件下で硫化アンチモンの沈殿が形成され、炭素源とイオウ源の適切な供給バランスが必要であるといえる。

(2) 土壌・廃水処理系の微生物のアンチモ

ン除去ポテンシャル

試料 1、2、3、8 において 10 日目頃から硫化アンチモン (Sb_2S_3) に特有の橙色の沈殿物の形成が確認され、29 日目には 99%以上の溶存 Sb が除去された。一方、滅菌系では沈殿物の形成はみられず、また水溶性 Sb 濃度も変化しなかった。このことから、乳酸を電子供与体、 $Sb(OH)_6^-$ を電子受容体とする微生物反応が起こり、生成された $Sb(OH)_3$ が培地中の硫黄と反応することで難溶性の Sb_2S_3 が形成したと考えられる。

試料 4、5、6、7 においても溶存 Sb 濃度が減少したが、橙色沈殿物の顕著の形成は観察されなかった。また、酸化アンチモン (Sb_2O_3) に特有の白色沈殿物も生じなかったことから、微生物細胞への吸着によって水溶性 Sb が減少したと考えられる。

試料 9 (MBR 活性汚泥) では 7 日目に橙色沈殿物の形成および溶存 Sb 濃度の減少がみられ、9 日目には除去率が 70%に達した。一方で試料 10 (回分式活性汚泥) では沈殿物の形成や溶存 Sb 濃度の変化は見られなかった。回分式活性汚泥に比べ、MBR 活性汚泥は滞留時間が長いことから、微生物相が多様であり、水溶性 Sb の除去に関わる微生物も多く存在していたと考えられる。

環境試料の pH や含水率、生菌数と水溶性 Sb 除去率に明確な関連は確認できなかった。

以上より、一般的な土壌や活性汚泥試料にも水溶性 Sb の除去能力があることが確認された。その除去能力は微生物に依存しており、硫化アンチモンの形成や細胞吸着など、複数の除去機構が存在していることが示唆された。

(3) 淡水・汽水・海水の微生物のアンチモン除去ポテンシャル

琵琶湖の底泥試料は、1 回目の除去試験において、南湖のものが高濃度硫黄培地から Sb を 20%除去した。除去率は低かったものの、北湖の試料は高濃度硫黄培地において、南湖の試料は、高濃度・低濃度硫黄培地において、不定形の Sb_2S_3 に類似した橙色沈殿を形成した (図 3、図 4)。この結果は Sb(V) が Sb(III) に細菌によって還元され、 S^{2-} と沈殿したことを示唆している。2、3 回目の試験でも、除去率は大きくは増加しなかったものの、同様の結果が得られた。

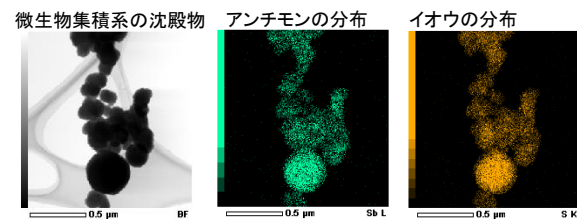


図 2 沈殿物の元素分析

阿蘇海と若狭湾の試料は、1 回目の除去試験において、高・低濃度の硫黄を含む両培地から 80~90%の Sb を除去した。阿蘇海の底泥試料は、低濃度硫黄培地において橙色沈殿を生じたが、その他は $Sb_2(OH)_3$ の形成を示唆する白色沈殿を生じた。しかし、若狭湾の底泥試料は、高濃度硫黄培地においては、2 回目の除去試験では橙色沈殿を、3 回目の除去試験では再び白色沈殿を形成した。若狭湾の底泥試料には、 Sb_2S_3 と $Sb(OH)_3$ のどちらも形成できる細菌群集が存在していたと考えられる。

琵琶湖の底泥試料の高濃度硫黄培地、阿蘇海の底泥試料の低濃度硫黄培地からは、 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL オーダーの黄・橙色のコロニーが得られた(図 5)。阿蘇海の底泥試料の低濃度硫黄培地からは、同オーダーの白色コロニ

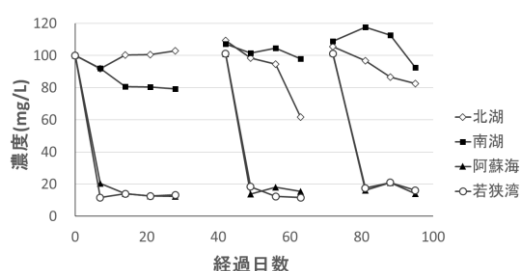


図 3 底泥試料による Sb 除去試験
(高濃度硫黄培地)

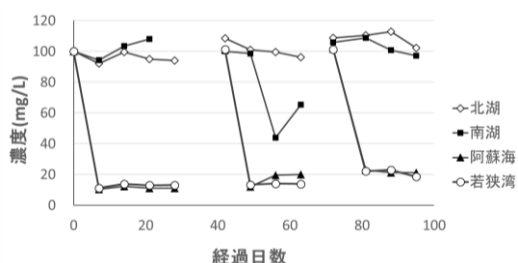


図 4 底泥試料による Sb 除去試験
(高濃度硫黄培地)

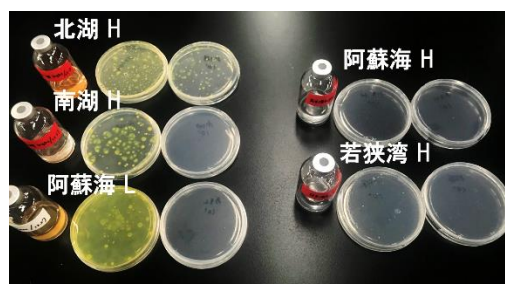


図 5 底質微生物の培養系の L-Sb(V)-BSM 平板培地上のコロニー (H:高濃度硫黄培地、L:低濃度硫黄培地)

ーが得られた。このことから、底泥中の細菌が Sb の除去に関与していることが示唆された。

<引用文献>

- 川喜多・上江州 (2007) アンチモンの特性と受給およびリサイクル動向, 貴金属・レアメタルのリサイクル技術集成, 373-378, NTS 出版.
- 環境省中央環境審議会水環境部会環境基準健康項目専門委員会 (2008) アンチモンに係る課題の整理. https://www.env.go.jp/council/09water/y095-09/mat03_4.pdf
- 恒見・和田 (2008) リスク評価のための日本国内におけるアンチモンの物質フロー分析. 日本金属学会誌, 72, 91-98.
- 堀内・齋藤・森 (2012) 津具鉾山跡地周辺環境のアンチモン汚染調査. 土木会論文集, G68, III545-III555.
- Kulp T. R., Miller L. G., Braiotta F., Webb S. M., Kocar B. D., Blum J. S., Oremland R. S. Microbiological reduction of Sb(V) in anoxic freshwater sediments. (2014) Environ. Sci. Technol., 48, 218-226.

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)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Soda, S., and Oka, K. Biochemical potential of freshwater, brackish, and sea sediments for removing antimony from water environment. The 17th World Lake Conference, 2018
- ② 黒田真史, 森健太郎, 細川久顕, 西川宏, 井上大介, 惣田訓, 池道彦, 水相のアンチモンを不溶化させる細菌群集の集積、日本微生物生態学会第 32 回大会、2018 年
- ③ 森健太郎, 馬形さやか, 黒田真史, 惣田訓, 池道彦, 水中からアンチモンを除去する微生物集積系の構築と特性評価、第 69 回日本生物工学会大会、2017 年
- ④ 馬形さやか, 森健太郎, 惣田訓, 池道彦, 環境水・土壌試料の有する水溶性アンチモンの除去能力の評価、第 51 回日本水環境学会年会、2017 年
- ⑤ 森健太郎, 長尾知明, 仲谷良晃, 黒田真史, 惣田訓, 池道彦, 微生物集積系による水中からのアンチモンの除去特性、第 15 回環境技術学会年次大会、2016 年
- ⑥ 森健太郎, 長尾知明, 仲谷良晃, 黒田真史, 惣田訓, 池道彦, 水中からアンチモンを除去する微生物集積培養系の構築、第 50 回日本水環境学会年会、2016 年
- ⑦ 惣田訓, 森健太郎, 長尾知明, 仲谷良晃, 黒田真史, 池道彦, 水中からアンチモン

を除去する混合微生物系の構築とその特徴づけ、第52回日本水処理生物学会大会、2015年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

惣田 訓 (SODA, Satoshi)
立命館大学・理工学部・教授
研究者番号：30322176

(2) 研究分担者

黒田 真史 (KURODA, Masashi)
大阪大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：20511786

池 道彦 (IKE, Michihiko)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：40222856