



Title	Bacillus sp- SF-1株によると酸塩の還元特性及びその汚染土壤浄化技術への適用に関する基礎的研究
Author(s)	山村, 茂樹
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/160">https://hdl.handle.net/11094/160</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士論文

***Bacillus sp. SF-1* 株によるヒ酸塩の還元特性及びその汚染土  
壤浄化技術への適用に関する基礎的研究**

**2005**

大阪大学大学院工学研究科環境工学専攻  
生物圏・水環境工学領域

山村 茂樹

## 目次

緒論 .....	1
第1章 ヒ素汚染土壤の対策技術と生物学的ヒ酸塩還元に関する既往研究	
第1節 ヒ素汚染土壤の対策技術の現状 .....	5
第2節 生物学的ヒ酸塩還元による固相からのヒ素の可動化 .....	12
第3節 異化型ヒ酸塩還元細菌の特性 .....	15
第4節 要約 .....	23
第2章 <i>Bacillus</i> sp. SF-1 株によるヒ酸塩の還元能	
第1節 緒言 .....	24
第2節 実験材料及び方法 .....	24
第3節 実験結果及び考察 .....	26
第4節 要約 .....	36
第3章 <i>Bacillus</i> sp. SF-1 株のヒ酸塩還元機構に関する検討	
第1節 緒言 .....	38
第2節 実験材料及び方法 .....	38
第3節 実験結果及び考察 .....	42
第4節 要約 .....	50
第4章 <i>Bacillus</i> sp. SF-1 株を用いた固相からのヒ素可溶化	
第1節 緒言 .....	51
第2節 実験材料及び方法 .....	51
第3節 実験結果及び考察 .....	53
第4節 要約 .....	64
総括ならびに結論 .....	66
参考文献 .....	70
謝辞	
補遺 <i>Bacillus</i> sp. SF-1 株の系統学的特性	
第1節 緒言 .....	78
第2節 16S rRNA 遺伝子に基づく SF-1 株の系統学的分類 .....	78
第3節 要約 .....	83

## 緒論

人類は、幾多の困難をそのもてる技術で克服して繁栄を極め、地球の歴史からみればほんの瞬き程度の期間に生態系の頂点にまで上り詰めたが、この“一瞬”的歴史は、人類が自然な生態系の営みを攢乱し続けてきた歴史ともいえる。地球規模での元素循環の変化は、人類がもたらした地球攢乱のひとつであり、近年では炭素循環の乱れによる地球温暖化現象が深刻な問題として注目をあびている。人類活動は炭素と同様、自然環境中に極低濃度で広く分布している微量元素(trace element)に対しても、その循環に多大な影響を及ぼしている。多くの重金属・遷移金属類を含む微量元素は、貴重な資源として利用され科学技術の発展に貢献してきたが、その反面、高濃度で存在する場合には生体へ悪影響を及ぼすことが多く、人間活動の副産物として環境中へ放出され、局所的な汚染が生じた場合には生態系の破壊や、人の健康被害など深刻な汚染問題を引き起こす。

ヒ素(原子番号 33, 原子量 74.92)は、周期表 5B 族、第 4 周期に属し、金属と非金属の性質を兼ね備える半金属元素のひとつであり、微量元素の一つとして位置付けられる。古くから毒物の代名詞として有名であり、高い急性及び慢性毒性を有していることが知られている。ヒトの場合、約 0.5~1mg/day の無機ヒ素化合物を長期間連続して摂取すると慢性中毒症状が発症するとされているが、さらに症状が進行すると染色体異常やガン等にも発展する考えられている (Morton and Dunnette, 1994; 安藤, 眞柄, 1997; 久永, 石西, 1985)。一方で、地圏、水圏、大気圏、の各自然環境中では微量ながら至るところに存在し、多くの生物体中にも見出され、近年では高等生物にとって微量必須元素であることが明らかとなっている(Nielsen, 1991; 前田, 1999; 山崎, 1988)。

自然界におけるヒ素の起源は、地殻に由来し、主に硫ヒ鉄鉱や銅、亜鉛などの硫化鉱中に存在する。これらが起源となり侵食や風化、火山性のガスや温泉水などの自然作用によって環境中に放出されるが、近代ではこれに鉱山採掘や金属精錬などの人為的作用による排出が加わる。また、局所的にこれらの鉱物が多量に存在している場合、人為的な地下水の汲み上げ等が地表水へのヒ素の供給の原因となることもある。近年、インド西ベンガル地方からバングラディシュにかけて、大規模なヒ素中毒が進行しているが、これは、ヒ素を高濃度に含む地層からの地下水の取水が原因であると推察されている(Bagla and Kaiser, 1996; Karim, 2000; 安藤, 眞柄, 1997; 貝瀬, 2001; 横田ら, 2003)。またヒ素は、石炭などの化石燃料中にも含まれているため、その燃焼に伴い大気中へも放出される。石炭は通常 2 ~82mg /kg 程度のヒ素を含んでいるが、その濃度は採掘された地域の地質に依存し、旧チエコスロバキアでは石炭中に 1500mg/kg もの高濃度のヒ素が検出されたとの記録がある (Smith et al., 1998)。Nriagu (1990)の計算によれば、大気中へのヒ素の年間放出量 3 万 1 千トンのうち人為的作用によるものが約 1 万 9 千トンと約 60% を占め (Table 1)、さらに、生物圏への流入量のうち約 54% が人類の産業活動によるものであることが示されている。このことから、我々人類の活動が自然界における地化学的なヒ素の循環を狂わせ、自らの生活

圈へのヒ素の流入を促し、健康影響へのリスクを高めていることは明白であるといえる。

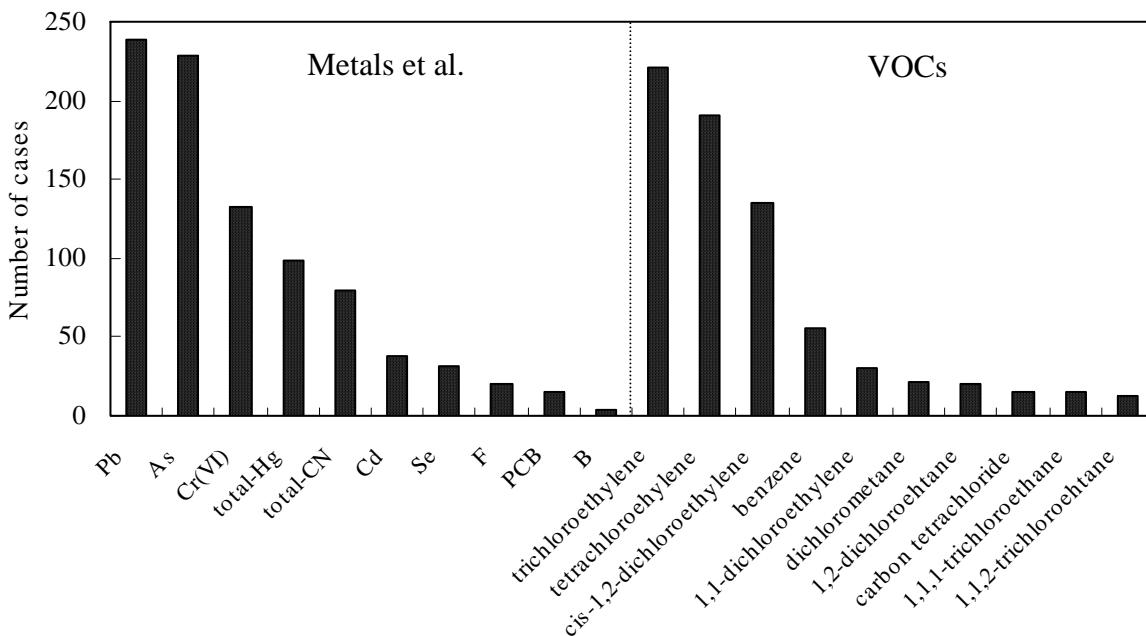
**Table 1** Worldwide atmospheric emissions of arsenic. (Nriagu, 1990)

Anthropogenic sources (kt/y)	Natural sources (kt/y)	
Energy production	2.2	Wind-borne soil particles
Mining	0.1	Sea salt spray
Smelting and refining	12.3	Volcanoes
Manufacturing processes	2.0	Forest fires
Commercial uses	2.0	Biogenic sources
Waste incineration	0.3	
Total	18.9	Total
		12.2

土壤に対しては、これまで地熱発電所や鉱山の廃水等を通じた農耕地の汚染 (Hiroki, 1993)、ヒ素含有物質の不注意な取り扱いによる漏洩事故、化石燃料の消費、殺虫剤や除草剤、木材防腐剤といったヒ素含有薬品の散布などによる汚染等が問題とされてきたが (Bhumbra and Keefer, 1994)、近年では、都市部の再開発等が進む中、しばしば工場跡地等から高濃度のヒ素が検出され新たな問題となっている。米国では、2003 年度版有害物質優先リストにおいて第 1 位に指定されており (ATSDR, 2003)、我が国においても環境省が行った全国調査によると、ヒ素は 2001 年度までに判明した土壤環境基準超過件数に占める割合が鉛について 2 位と高い位置を占めている (Fig.1, 環境省環境管理局水環境部, 2003)。また、土壤中へのヒ素の人為的排出源のうち約 40% を商業製品の廃棄が占め (Nriag and Pacyna 1988)、最近では、発光ダイオード、半導体レーザー、半導体ガラスなどといった各種工業製品の原材料としても多く使用されていることから (前田, 1999 ; 石黒, 田辺, 1999)、今後も半導体工場近辺や廃棄物処分場等で土壤を中心とした汚染問題を引き起こしていくことが懸念されている。さらに、金属という性質上、有機物による汚染とは異なり分解による無害化は期待できないため、なんらかの対策を施さない限り汚染現場に蓄積し、そのリスクとともに半永久的に残存することになる。

わが国では、工場・事業場等における自主的な汚染調査の実施や再開発・売却時の汚染調査の実施、水質汚濁防止法に基づく地下水モニタリングの拡充などが進むにつれて顕在化する土壤汚染の増加に対応するために、2003 年 2 月より土壤汚染対策法が施行され、土壤汚染により健康被害が生ずる恐れがあると認められる場合は汚染原因者に汚染の除去等の措置が課せられることとなった (土壤汚染対策法 第 4 章)。現在、このような汚染土壤に対しては、主に封じ込め、飛散防止、固化・不溶化、もしくは最終処分場への埋立などといった現場外処理が行われている (森澤, 2000 ; 環境省環境管理局水環境部, 2003)。しかし、このような処理は一般的には高コストである上、汚染土壤からヒ素そのものを除去する技術ではないことから、処理後の安全性についても疑問視する声がある。そのため、

低成本で実行でき、かつ処理後の安全性が確保されるヒ素除去プロセスを確立することが必要とされている。



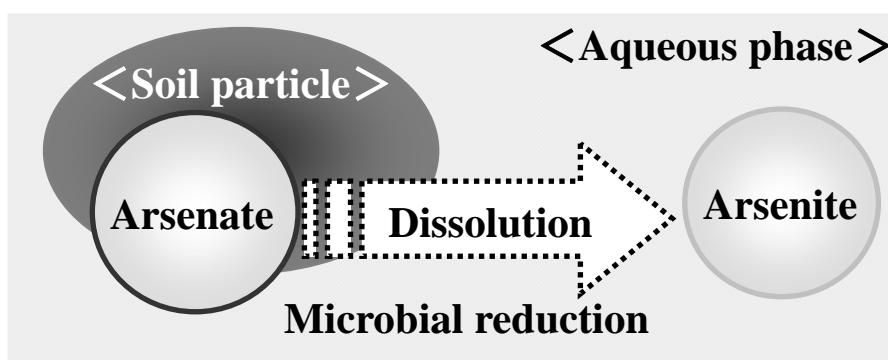
**Fig.1** Number of cases exceeding the environmental quality standard for soil in Japan. The values represent accumulated data in 2001.

ヒ素は自然環境中において炭素や窒素、硫黄などと同様、酸化や還元、メチル化による有機態への変換などの生物的作用を受け循環している。土壤環境中では、ほとんどが無機態であるヒ酸塩及び亜ヒ酸塩の形で存在するが、亜ヒ酸塩はヒ酸塩より毒性が高く、土壤や湖沼等の底泥中での移動性が高いことが知られている (Cullen and Reimer, 1989; Huang 1994; Bhunbla and Keefer 1994)。一般に、好気条件下では大半がヒ酸塩の形で存在し、鉄やアルミニウム酸化物などといった土壤粒子等に吸着・固定化されているためその溶解性は低いが、嫌気条件下ではその溶解性が増し、大半がより吸着性の低い亜ヒ酸塩の形になって水相へと可動化するものといわれている (Mok and Wai 1994)。このような嫌気条件下でのヒ素の可動化は、土壤中のヒ酸塩の吸着に大きく寄与している酸化鉄(III)鉱物の還元による可溶化や、ヒ酸塩の亜ヒ酸塩への還元によって促されるとされており、微生物作用の関与が指摘されている。近年、嫌気条件下においてヒ酸塩を呼吸の最終電子受容体として還元する細菌が発見され(Ahmann, et al., 1994)、これらの細菌が水相に存在するヒ酸のみならず、ヒ酸鉄や酸化鉄鉱物など固相中のものをも還元して亜ヒ酸塩を溶出し得ることが明らかとなったことから、土壤・底泥中でのヒ素の可動化およびそれに伴う水環境へのヒ素の流入との関連が指摘されるようになってきた(Ahmann, et al., 1997; Zobrist, et al., 2000)。

一方で、このような微生物作用をヒ素汚染土壤の浄化に利用することも提案されつつある(Dowdle et al., 1996; Lovley and Coates, 1997)。Fig.2 に示すように、その浄化のコンセプト

は、ヒ酸塩をより吸着性の低い亜ヒ酸塩へと還元することによって汚染土壤中に吸着・固定化されているヒ素を選択的に溶出させ水相へと移動させた後、凝集などの方法で水相から除去するものである。従って、溶出能力を最大限に活用することによって、低成本で汚染土壤からのヒ素除去を可能とするバイオレメディエーションプロセスが構築できるものと考えられる。しかしながら現状では、このような生物学的ヒ酸塩還元の汚染土壤浄化技術への応用は、概念的な提案にとどまっており、実用化に向けて実験的な検討を行った例は報告されていない。従って、その実現に向けては、これらの微生物作用が汚染土壤浄化に適用しうることを実証するとともに、本作用を用いた汚染浄化プロセスとして最適なバイオリアクターの形状や運転条件についても検討していくことが必要である。そこで本研究では、微生物学的ヒ酸塩還元作用を利用した新たなヒ素汚染土壤のバイオレメディエーションプロセスを構築するための基礎的知見を集積することを目的とした実験的検討を行った。我々の研究グループではすでに、当初セレン酸塩還元細菌として分離した *Bacillus* sp. SF-1 株がヒ酸塩に対しても還元能を示すという予備的研究データを得ていることから、本菌株のヒ酸塩還元能を確認するとともに、バイオレメディエーションへの適用性という観点からその特性を把握し、さらに合理的なバイオレメディエーションプロセスを構築するために必要な環境要因の影響等について検討した結果をふまえ、最終的に本菌株を用いた実用的な土壤汚染浄化プロセスの提案を行う目的で以下の研究を実施した。

本論文は、第 1 章では、ヒ素汚染土壤の対策及び浄化手法の現状ならびに既往研究を概観し、その問題点を明示するとともに、本研究と関連のある微生物学的ヒ酸塩還元についての既往研究をまとめた。第 2 章では、ヒ酸塩還元細菌として選定した *Bacillus* sp. SF-1 株のヒ酸塩還元能の評価を行うとともに基本的な還元特性を調べた。第 3 章では、SF-1 株のヒ酸塩に対する還元反応のメカニズムを理解し、より高度な利用を行うための基礎的知見を得ることを目的として、ヒ酸塩、セレン酸塩及び硝酸塩還元酵素の基本的な特性について調べた。第 4 章では、SF-1 株を用いて固相中のヒ素の還元的可溶化に関して種々の実験的検討を行い、ヒ素汚染土壤浄化バイオリアクターを構築するために必要な知見を集積したうえで実用プロセスの提案を行った。



**Fig.2** Concept of microbial arsenic removal from contaminated soil.

## 第1章 ヒ素汚染土壤の対策技術と生物学的ヒ酸塩還元に関する既往研究

### 第1節 ヒ素汚染土壤対策技術の現状

緒論において述べたように、ヒ素を含め金属類汚染土壤に対してこれまで行われてきた主な対策としては、撤去や封じ込め、固化・不溶化などの物理化学的処理が挙げられる。一般に、汚染土壤中においてヒ素は数百 ppm レベルで検出されることが多いが、場合によっては数千 ppm に達することもある(Wenzel et al., 2001; Gaucia-Manyes et al., 2002; Belluck et al., 2003; 大山, 小山, 2001)。そのため、これらの処理は土の性質や構成成分、ヒ素含有量、求められる処理期間や費用等を加味して使い分けられ、場合によっては併用されたりしている。また、現在では、薬剤を用いてヒ素を汚染土壤から抽出する土壤洗浄法や、生物学的処理についての研究がいくつか報告されている。本節では、これら既存のヒ素汚染土壤の処理手法を物理学的処理、化学的処理、生物学的処理に分類して概観し、利用の現状及び課題を明らかにした。

#### 1. 物理学的処理技術

現在行われている物理学的処理手法としては、汚染土壤を一般環境と隔離する封じ込めや汚染土壤をガラス化させるガラス固化処理、高温により揮発させる乾式冶金処理や電気泳動などの動電現象を利用した動電学的処理などが挙げられる (Mulligan et al., 2001; 木暮, 2000; 地盤環境技術研究会, 2003)。以下、それぞれの手法についての概略をまとめる。

##### ○ 封じ込め (Containment)

汚染物質の大気への飛散や地下水中への流入など、周辺環境への汚染の流出を防ぐため、汚染土壤を一般環境から隔離する処理を封じ込めと呼ぶ。封じ込めでは、主に汚染の程度が比較的低い場合には覆土・植栽工といった飛散・流出等の防止対策がなされ、中程度の場合には遮水工、高い場合には遮断工といった工法が用いられる (木暮, 2000)。

覆土・植栽工は、土の飛散や表面流出等を防止するため、必要に応じて土壤や植生等で汚染土壤表面を被覆する処理工法である。覆土には一般に、汚染されていない土壤を 50cm 程度以上用い、植栽を行う場合には 1.5~2m の厚さで用いることもある。植栽工には草本と樹木によるものがあるが、早急な緑化が求められる場合には草本類が用いられる。植栽工の代表的な工法としては、種子・肥料・ファイバーを水でスラリー状にしたものを覆土表面に散布する種子散布工、種子と肥料等を装着したマットもしくは芝で地表面を被覆する植生マット工・張芝工などが挙げられる (木暮, 2000)。また、飛散・流出防止対策としては、アスファルト等による舗装が行われることもある。

遮水工は、汚染土壤を遮水構造内へ封じ込めるにより、汚染物質が地下水などを通じて外部環境へと流出するのを防止する処理工法である。汚染土壤を掘削除去した後、必要に応じて固化あるいは不溶化を行い別に設けた遮水工内へ封じ込める表面遮水工（Horizontal barriers）と、汚染土壤の下層全体に不透水層がある場合に、汚染範囲を取り囲むように遮水壁を設けることによって原位置で封じ込める鉛直遮水工（Vertical barriers）とがある。表面遮水工は、汚染土壤の側面と底面に合成ゴムや合成樹脂、アスファルト等を用いた不透水シートを設けて、鉛直方向への水の流れを止めることで汚染物質の漏出を防ぐものである。鉛直遮水工は、コンクリートやセメントの連続壁もしくは鋼性の板を汚染土壤の周囲に鉛直に打ち込んだ構造をしており、水平方向の遮水効果が高い。

遮断工は、汚染土壤を掘削後、厚さ35cm以上の規定の鉄筋コンクリート製遮断槽内部に封じ込め、周辺環境からより厳重に隔離する処理工法である。高濃度の汚染土壤に適用され、通常は汚染土壤を固化もしくは不溶化処理した後に行われる。雨水の流入・滞留を防ぐ処置や腐食を防止する処置を施し、長期間の封じ込めに耐え得る構造であるため、遮水工よりも厳密で安全な処理工法ではあるが、同時に、設定場所の確保が困難であり、コストが高いなどといった欠点がある（木暮, 2000）。

このように、封じ込めは汚染濃度に応じて汚染土壤を一般環境から隔離し、周辺環境への拡散や流出を速やかに防止するという点において有効であるため、現在、我が国で実施されている土壤汚染対策においても金属汚染への適用事例が多い(Table 1-1.; 環境省環境管理局水環境部, 2003)。しかし、破損、事故及び周辺環境への影響などを含めた半永久的なモニタリングや施設の維持管理が必要であるためコストが高く、また、処理後の土地利用が制限されることなどがその問題点として挙げられる。

**Table 1-1.** Implementation of permanent measures for soil contamination in Japan.

	Number of cases		
	Metals et al.	VOCs	Complex pollution
<i>In situ</i> degradation	6	12	7
Bioremediation	1	7	2
Chemical degradation	3	5	5
Others	2	1	0
<i>In situ</i> extraction	14	168	33
Aspiration of soil gas	1	116	17
Pumping of groundwater	13	126	29
Others	1	1	2
Drilling removal	221	82	43
Treatment	19	41	19
Separation	14	18	13
Thermal desorption/volatilization	3	10	9
Soil washing	8	3	1
Others	3	5	3
Degradation	6	23	6
Bioremediation	1	3	1
Chemical degradation	2	8	2
Thermal decomposition	2	9	3
Others	2	3	0
Containment	45	5	11
Blocking method	26	2	4
Sealing method	24	20	9
Impermeable sheet	9	1	2
Steel sheet pile	8	2	6
Underground continuous wall	8	1	2
Clay layer	5	0	1
Solidification·stabilization	109	3	17
Solidification	39	2	4
Chemical stabilization	69	1	13
Other stabilization treatments	8	0	2
Scattering prevention	55	4	5
Soil covering	34	2	4
Planting method	4	0	1
Pavior	30	3	3
Others	198	28	29
Landfill disposal	171	15	27
Others	36	13	3
Total cases	362	247	65

\* The values represent accumulated data in 2001.

### ○ 原位置ガラス固化処理 (In-situ Vitrification)

原位置ガラス固化処理は、汚染土壤に電極を挿入し、通電することにより熱を発生させ、その熱により土を溶融した後に冷却して得られる安定なガラス固化体を用いて固化する手法である (Mulligan et al., 2001; 木暮, 2000)。その特徴としては、原位置での処理が可能であり、高温処理のため有機物等による複合汚染にも対応できる、ガラス固化体が極めて安定である、等を挙げることができる。しかし、その問題点として、場合によっては発生する有毒性ガスの適切な処理が必要となり、また、汚染物質を除去する方法ではないため、固化ガラスからの有害物質等の溶出をモニタリングする必要があるなどが挙げられる。ヒ素汚染土壤に対して英国などでは適用例があるものの、我が国ではほとんど見られないのが現状である (Mulligan et al., 2001; 木暮, 2000)。

### ○ 乾式（高温）冶金処理 (Pyrometallurgical separation)

乾式冶金処理は、汚染土壤を溶鉱炉に投入し、高温の熱処理を行って脱着や揮発させることで金属類を汚染土壤から分離する手法ある。一般に、高度に汚染された土壤 (5-20%) に対して適用が可能であり、分離した金属類はスラグとして回収される (Mulligan et al., 2001)。また、ヒ素、鉛、カドミウム、クロムなど、水銀以外の金属に適用する際には、還元剤の添加などの前処理が必要とされる。Frost ら (2003) は、ニッケルやコバルト、亜鉛やマグネシウム等とヒ酸とが結合した水和ヒ素鉱物 (vivianite arsenates) に加熱処理を行ったところ、750~800°Cにおいて鉱物中から五酸化ニヒ酸が分離することが明らかとなったため、高温処理が土壤汚染浄化の一手法として有効であると報告している。しかし、高温での処理となるため、土壤の性状にかなりの影響を及ぼし、処理後の土壤の再利用に関して疑問が残る。

### ○ 動電学的処理 (Electrokinetic process)

動電学的処理は、汚染土壤に挿入した陽極・陰極間に電流を印加させることにより発生する動電現象 (電気分解 : electrolysis、電気浸透 : electro-osmosis、電気泳動 : electrophoresis) を利用して、金属イオンを陽極もしくは陰極周辺に集中させて除去する手法である (Mulligan et al., 2001 ; Virkutyte et al., 2002)。原位置で汚染土壤から金属類を除去できることが、その特徴として挙げられる。酸素を配位した陰イオンとして存在する無機態のヒ素は、陽極周辺に濃縮され、イオン交換による電極への付着やポンプによる汲み上げ等により除去される。ヒ素の場合、土壤の性状によって異なるものの、およそ 5~7 割程度の除去が可能であるが、その反応速度が遅いため、処理に長期間を要するとされている (Virkutyte et al., 2002)。

## 2. 化学的処理技術

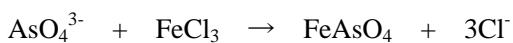
化学的処理手法としては、汚染物質の土壤からの溶出を抑制することを目的とした固

化・不溶化処理や、薬剤等により汚染物質を抽出する洗浄処理などが挙げられる (Mulligan et al., 2001; 木暮, 2000; 地盤環境技術研究会, 2003)。

### ○ 固化・不溶化(Solidification /Stabilization)

セメントやアスファルト、ポゾラン等の固化剤を汚染土壤へ添加して、安定化させる技術が固化である (Mulligan et al., 2001; Zarlinski et al., 1997; 木暮, 2000)。操作や施行が比較的簡単であることや、原位置においても掘削除去後においても実施可能であること等がその特長として挙げられる。Dutré ら (1998) は、ベルギー・Limburg 州の金属工場跡地のヒ素汚染土壤にセメントや石灰、もしくはその混合物を添加して固化を行い、固化処理後の土壤に蒸留水を加えて 24 時間後のヒ素の溶出量を調べた。その結果、汚染土壤と等量もしくはそれ以上の固化剤を用いた系において、ヒ素の溶出が産業廃棄物埋立処分場等における浸出水の基準値以下となったため、セメント等による固化処理が汚染土壤の処理手法として有効であるとしている。一方で、Akhter ら (1997) は、ヒ酸および亜ヒ酸塩を種々の固化剤と混合して固化し、その挙動を X 線回折法 (XRD) 等を用いて 3 年間モニタリングした。その結果、形成されている固化物質の構造が時間の経過とともに変化し、それに伴ってヒ素の溶出量が増加することなどが明らかとなった。よって、固化処理においては、短期的なヒ素の溶出は抑制されるものの、環境因子等の影響により固化土壤の構造が変化し、ヒ素の再溶出がおこることが懸念されるため、先に述べた封じ込めなどと同様、持続的なモニタリングと適切な維持管理が必要であるといえる。さらに、セメント系固化剤を用いると容積が増大し、固化処理を施した土壤の再利用が困難であることもその問題点としてあげられる (木暮, 2000)。

不溶化処理は、汚染土壤に各種の薬剤を添加・混合して、汚染物質を化学的に難溶性の形態に変化させて安定化するものである。ヒ素の場合、主に、塩化鉄 (III) や硫酸鉄 (III) を混合することにより難溶性のヒ酸鉄 ( $\text{FeAsO}_4$ ) を形成させる手法が用いられている (Mulligan et al., 2001; 木暮, 2000; 地盤環境技術研究会, 2003)。また、鉄 (III) 塩を用いる場合、水酸化鉄 (III) も生じるため、ヒ素の水酸化鉄への吸着による不溶化効果も期待できる (Mulligan et al., 2001; 地盤環境技術研究会, 2003)。以下に塩化鉄 (III) を添加した場合における化学反応式を示した。



しかし、不溶化されたヒ酸鉄は、土壤の酸化還元電位が低下するとともに還元されやすくなり、亜ヒ酸として溶出する可能性があるため、土壤が有機物等によって還元状態になりやすい場合には適用できない (木暮, 2000)。鉄塩以外の不溶化剤としては、ランタンやセリウムがあげられ (Tokunaga, and Hakuta, 2002; 大山, 2001)、さらに最近では、キレート剤を添加して処理する方法も検討されている (木暮, 2000)。この不溶化処理は、ほとんどが、従来用いられてきた廃水処理技術と同じ原理に基づくため、操作が比較的容易であるという特長をもつていいが、固化処理のように、環境因子の変化による再溶出が問題となる。

これらの固化・不溶化処理は先に述べた封じ込めと同様に、我が国での適用事例が多い

(Table 1-1.; 環境省環境管理局水環境部, 2003)。しかし、土地利用に制限のある我が国では汚染問題の根本的な解決にはならず、土壤汚染対策法の施行により環境基準として新たに含有量基準が示されたことからも、今後はその適用範囲が狭まっていくことが予想される。そのため、汚染土壤からのヒ素の除去を可能とする代替手法の開発が、早急に求められているといえる。

### ○ 土壤洗浄法 (Soil washing)

土壤洗浄法は、洗浄、分級、泡沫浮上、抽出等の技術を組み合わせた処理手法である (Mulligan et al., 2001; 地盤環境技術研究会, 2003)。この手法では、掘削除去した土壤を粒径により分級して高濃度の汚染物質を含む土壤粒子を分離し、洗浄液を用いて土壤中から溶出させる。また、原位置で薬剤を含む洗浄液を注入して、汚染物質を抽出除去する土壤フランシング法 (Soil flushing) も土壤洗浄の一種として位置付けられる。特徴としては、土壤からの汚染物質の除去が可能であり、薬剤の種類や条件を検討することで複合汚染にも対応することができる、といった点が挙げられる。しかしその反面、処理効果が土壤の性状等に大きく左右される、全ての汚染物質を取り除くことは困難である、比較的大量の水や薬剤を使用する、などが課題点として挙げられ、我が国での適用事例は少ないのが現状である(Table 1-1.; 環境省環境管理局水環境部, 2003)。

一般に、金属汚染の処理に用いる薬剤としては、硫酸や塩酸などの無機酸、酢酸やクエン酸などの有機酸、EDTA などのキレート剤等が知られている (Mulligan et al., 2001)。ヒ素の場合、洗浄に用いる薬剤としては、硫酸やリン酸、シュウ酸などが有効であることが報告されている (大山, 小山, 2001; Tokunaga, and Hakuta, 2002)。しかし、これらの酸を用いた洗浄では、高い抽出率が得られるものの、同時に Al、Fe、Mg などの土壤の主要な構成成分が溶出するため、土壤機能に深刻な損失を与える恐れがある。そのため、中性塩を用いた検討もなされている。Alam ら (2001) は、種々の中性塩溶液 (硫酸カリウム、塩化カリウム、リン酸カリウムなど) を用いて、様々な pH 域においてモデル汚染土壤からのヒ素の抽出実験を行った。その結果、リン酸カリウム溶液を用いた系において 30~50% のヒ素の溶出が認められたが、他の溶液ではほとんど溶出されなかった。また、リン酸カリウム溶液中に溶出した土壤成分 (Al、Fe、Mg、Ca) を測定したところ、Mg 以外の 3 物質は中性付近 (pH6~8) において低い溶出量を示した。ヒ素の溶出量に関しては、pH6.0 以下で高い値を示したことから、土壤へのダメージが少なく、かつ高い抽出率の得られる最適 pH を 6.0 としている。

## 3. 生物学的処理技術

ヒ素を含む金属類による汚染では、有機物質とは異なり微生物分解による無害化が期待できない。そのため、物理化学的処理より低コストでの実施が可能であり、土壤機能に与える影響も少ないと考えられる生物学的処理を用いた汚染土壤対策はこれまでほとんど行

われていなかった。しかし、自然環境中には、有害な金属化合物を体内に蓄積する能力を有する植物や、より毒性が低い、あるいは除去しやすい形態へと変換できる微生物が存在することが明らかとなっている。そのため、近年では、これらの生物作用の金属類汚染土壤処理プロセスへの適用に期待が集まっており、ヒ素に関するいくつかの報告がなされている。

### ○ ファイトレメディエーション (phytoremediation)

植物が環境汚染物質を蓄積・分解する能力や、環境の浄化能力を促進する効果を利用した汚染浄化・修復法をファイトレメディエーションと呼ぶ。ファイトレメディエーションはその浄化に関わる植物の機能によって分類されるが、金属類を対象とする場合、主に、物質吸収能を利用して茎や葉に蓄積させることで環境中からの分離を行う。なかでも、通常の植物と比較して極めて高い金属蓄積能力を有する植物は Hyperaccumulator (乾燥重量で 1000ppm 以上の金属を蓄積することができる) と呼ばれ、特に着目を集めている。

これまで、様々な植物がヒ素に対する耐性を有していることが明らかとなっているが (Fitz and Wenzl, 2002)、その生体への毒性の高さから高濃度での蓄積が植物体に影響を及ぼすため、実用化には至らなかった。しかし、近年、非常に高濃度のヒ素を蓄積することができる 2 種類のシダ植物、*Pteris vittata* (Ma et al., 2001; Lombi et al, 2002; Zhang et al., 2002; Tu et al., 2003) および *Pityrogramma calomelanos* (Visoottiviseth et al., 2002; Francesconi et al., 2002)、が発見され Nature 誌上でも発表される (Ma et al., 2001) など急速に注目を浴びるようになった (Fitz, and Wenzl, 2002)。一般的な植物が数 ppm～数十 ppm 程度でしかヒ素を蓄積できないのに対し、この 2 種類の植物は 6000～8000ppm のヒ素を蓄積することが可能であり (Ma et al., 2001; Visoottiviseth et al., 2002)、Hyperaccumulator として今後の利用が期待されている。現在、米国を中心にヒ素の吸収・蓄積メカニズムの解明や実汚染サイトの土壤を対象とした評価試験が精力的に実施されており、我が国においても、工場跡地の汚染土壤に対して *Pteris vittata* を用いた浄化試験が行われている (地盤環境技術研究会, 2003)。しかし、*Pteris vittata* を用いた実験では、ヒ酸鉄などの難溶性の形態にはあまり効果が発揮されないことも示されている (Ma et al., 2001)。

また、遺伝子組換え技術を用いて、植物体の金属蓄積能を向上させる試みもなされている。Nie ら (2002) は、環境ストレスへの耐性を高めるために、セイヨウアブラナの一変種であるカノーラ (Canola) に *Enterobacter cloacae* UW4 株由来の 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase をコードする遺伝子を導入した。その結果、形質転換体において、通常のカノーラと比較して 4 倍のヒ素を蓄積させることに成功している。

ファイトレメディエーションは一般的に、原位置での浄化が可能であり、また、他の浄化手法に比べてコストが低く、維持管理が容易であることが利点として挙げられる。また、植物体を使用するため、社会認知が得やすいこともその特徴の 1 つといえる。しかし、処理に長期間を要する、適用可能な深度が根茎の長さに制約される、気候条件に影響を受ける、などの点から、その適用範囲が制限され、早急に対策の必要のある高濃度汚染などに

は適さない。また、金属を蓄積した植物体の処理なども課題点として挙げられる。

### ○ 微生物を用いた検討

自然環境中のヒ素の循環には多くの微生物が関わっているが、一部の真菌類はヒ素をメチル化させ、気体状のアルシン類を生成する能力を有していることが知られている（広木, 1996）。Edvantoro ら (2003) は、このような真菌類を用いて、ヒ素をアルシン類へと変換し、揮発させることで汚染土壤中から除去する試みを行った。彼らは、ヒ素及び DDT で汚染された土壤に肥料等を加えて土着微生物を活性化させ、生成したアルシン類を経時にフィルターで回収した。その結果、ヒ素の揮発率は滅菌したコントロールに比べて高い値を示した（5ヶ月で約 8.3%）。また、実汚染土壤から単離した真菌類を添加した系においては、アルシン類の生成が 4~8 倍促進されたとしている。

土壤中におけるヒ素の吸着には酸化鉄(III)鉱物が大きく寄与していることが知られており、その還元によってヒ素の溶出が促されることが知られている。そこで Papassiopi ら (2003) は、鉄還元細菌、*Desulfuromonas palmitatis* を用いてヒ酸鉄(III)および汚染土壤からのヒ素の除去試験を行った。その結果、ヒ酸鉄を用いた系においては 16 日間で約 80% の Fe(III) が還元されたが、還元により溶出した Fe(II) がヒ酸と結合し、再沈殿することが明らかとなった。そこで、汚染土壤を用いた系では、その再沈殿を防ぐため、キレート剤である EDTA を加えた実験を行った。その結果、EDTA 非添加系ではヒ素の溶出率は 3% 程度と低い値を示したが、EDTA 添加系において 60% 程度の Fe が可溶化され、それに伴い 75% のヒ素が水溶液中へと除去された。このことから、鉄還元細菌とキレート剤の併用が、汚染土壤からのヒ素除去技術として有効である可能性を述べている。

このように、微生物作用のヒ素汚染土壤浄化技術への適用に関しては、ここで例示したラボレベルの検討以外にはほとんど報告が無く、また、これらについてもそれぞれ、揮発したアルシン類への対策や、Fe 溶出及びキレート剤添加の及ぼす土壤機能への影響の評価など、実用化に向けた課題点が残されているのが現状である。

## 第2節 生物学的ヒ酸塩還元による固相からのヒ素の可動化

前節では、ヒ素汚染土壤の処理技術を概観し、利用の現状や新規技術の開発動向、また、その課題を明らかとした。そこで本節では、微生物によるヒ酸塩の還元を概説したうえで、本研究において着目する生物学的ヒ酸塩還元によるヒ素の可動化に関する既往の研究をまとめ、汚染土壤浄化手法への適用に際して考慮されるべき課題について論じた。

緒言において述べたように、土壤や底泥環境においてヒ素は、好気条件下では大半がヒ酸塩として存在し土壤粒子等に吸着・固定化されているが、嫌気条件下になるとヒ酸塩

の還元などによって水相へと可動化されることが知られている。環境中においてヒ酸塩の還元を担う細菌は、ヒ素耐性機構（Arsenic resistance system）の一貫としてヒ酸塩還元を行うものとヒ酸塩を嫌気呼吸の電子受容体とする異化型ヒ酸塩還元細菌(Dissimilatory arsenate-reducing bacteria; DARB)との2群が存在している。

ヒ素耐性機構に関しては、染色体あるいはプラスミド上の *ars* オペロンにコードされた一連の酵素群が関わっていることが知られている(Cervantes et al., 1994; Silver, 1998; Xu et al., 1998; Mukhopadhyay et al. 2002)。ヒ酸塩はリン酸塩と化学的特性が類似しているため、細胞膜のリン酸輸送系を通じて誤って細胞内へと取り込まれることがある。ヒ素耐性機構を有する細菌は、取り込まれたヒ酸塩を *ars* オペロンにコードされている ArsC 酵素により亜ヒ酸塩へと還元した後、ArsA や ArsB 酵素の働きによって速やかに細胞外へと排出する。ここで、ATP 加水分解酵素である ArsA は、細胞外への亜ヒ酸塩排出のためのエネルギーを ArsB へと供給する。そのため、この場合、ヒ酸塩還元反応では細胞合成に必要なエネルギーの生産は行われず、むしろ、一連の耐性機構にエネルギーの消費が伴うこととなる。また、ArsC によるヒ酸塩還元は本来細胞内での反応であるため、細胞外反応となる土壤等固相中のヒ酸塩還元には関与していない可能性が指摘されている(Zobrist et al., 2000)。Langner と Inskeep(2000)は、耐性機構によりヒ酸塩を還元する細菌 CN8 株(Jones, et al., 2000)を用い、酸化鉄鉱物に吸着されているヒ酸塩の還元を試みたが、溶液中のヒ酸塩還元のみが認められ、固相中のヒ酸塩はほとんど還元されなかつたことを報告しており、この推測を裏付けるものとなっている。

これに対して DARB によるヒ酸塩の還元では、脱窒と類似の反応がおこり、ヒ酸塩は嫌気呼吸の最終電子受容体として用いられるため、還元反応に伴い細胞増殖に必要なエネルギーが獲得される。また、このような電子受容体の還元反応を担う異化型還元酵素は、電子伝達鎖の末端に位置し細胞表層に存在するため、ヒ酸塩を細胞内に取り込むことなく還元することが可能であることから、固相中のヒ酸塩をも還元する能力を有することが知られている。

Ahmann ら(1997)は、ヒ酸鉄鉱物、及びヒ素により汚染された底泥を用いて微生物によるヒ酸塩の還元とヒ素の溶出との関わりについて調べた。著者らはまず、Fe(III)もしくは Fe(II)の共存により形成されるヒ酸鉄鉱物を含む培地に、ヒ素により汚染された貯水池から採取した底泥を微生物群として添加して実験を行ったところ、いずれの系でも同程度のヒ素が溶液中へ移動することを認めた。このことから、実験系内でのヒ素の可動化は、Fe(III)の還元によるものではなく、ヒ酸塩の還元によるものであると推定した。そこで、固相からのヒ素の可動化に関わっている微生物を特定するため、Fe(III)還元菌、硫酸還元菌集積系および、DARB を植種して同様の実験を行ったところ、DARB を植種した系が最も高いヒ素溶出を示した。さらに、DARB をヒ素汚染の認められた底泥に植種しヒ素の溶出実験を行ったところ、亜ヒ酸塩の溶出が確認され、汚染土壤や底泥中からのヒ素の可動化には、微生物によるヒ酸塩の還元が大きく関与しており、なかでもヒ酸塩を嫌気呼吸により還元する DARB が大きな役割を担っていることを示唆した。

さらに Zobrist ら (2000) は、同様に DARB として知られる *Sulfurospirillum barnesii* SES-3 株によるヒ素の可動化能を調べるため、酸化鉄及び水酸化アルミニウムにヒ酸塩を吸着させ、ヒ素の溶出試験を行った。その結果、経時的な固相のヒ酸塩の減少、及び液相中の亜ヒ酸塩の増加が確認され、これにより、自然環境中におけるヒ素の可動化には DARB が大きく関与していることを確証している。

以上のように、DARB によるヒ酸塩還元反応は、環境中におけるヒ素の可動化に大きく寄与していることが指摘されている。ここで、汚染土壤中においてヒ素は主としてヒ酸塩として存在する傾向があるとの報告がなされていることから(Bissen and Frimmet, 2000; Garcia-Manyes et al., 2002)、この反応は汚染浄化への適用に充分なポテンシャルを有しているものといえる。特長としては、汚染土壤からのヒ素の除去が可能であり、微生物を用いた反応であるため物理化学的処理に比べてコストが低いことが挙げられる。さらに、ヒ酸塩を選択的に還元して溶出させるため、土壤成分の溶出にともなう機能損失を最小限にとどめることができ、アルミニウムなど鉄酸化物以外の土壤鉱物に固定されているヒ素をも溶出させることができる。一方で、還元反応に伴い亜ヒ酸塩が液相へと溶出することから原位置外での処理系を構築する必要があると予想されるため、ファイトレメディエーションや真菌類による揮発と比べるとコストが高くなる恐れがあるものの、DARB は植物体での処理が困難であるとされるヒ酸鉄など難溶性の形態のものを還元する能力を有しており、ヒ素への耐性が高いものが多いため、原位置での処理には適さない中・高程度の汚染への活用等その適用範囲が広いというメリットを持つものといえる。

### 第3節 異化型ヒ酸還元細菌 (DARB) の特性

すでに述べたように、DARB によるヒ素の可動化は汚染土壤からのヒ素の除去技術への活用が期待されているが、主としてヒ素の地化学的循環に着眼した研究が多く、現在までのところ環境浄化への適用を試みた報告はない。そこで以下では、汚染浄化に際しての特性を把握するため、DARB についての既往の報告をまとめる。

Table 1-2 にこれまでに報告されている DARB を示す。この表から、DARB は多様な細菌属に分類され、ヒ酸塩以外にも様々な物質を電子受容体として利用することがわかる。また、新種のものが多く含まれていることも特徴としてあげることができ、属レベルでの特定にとどまっているものに関しても新種の可能性が示唆されているものがある。全ての菌株が必ずしも DARB として単離されたものではなく、セレン酸塩還元細菌(Laverman et al., 1995)、あるいはクロロフェノール類の脱塩素化細菌として単離されたものもある(Niggemyer et al., 2001)。これら細菌類の他に、近年では、同様にヒ酸塩を電子受容体として利用することのできる古細菌が単離されている(Huber et al., 2000)。このような DARB に関しては、現在までに数報の概説が発表されており、ここで示したもの以外にも未発表の菌株がいくつか記されているものもある(Newman et al., 1998; Stolz and Oremland, 1999; Stolz et al., 2002; Oremland and Stolz, 2003)。以下ではそれぞれの特徴をまとめて示した。

**Table 1-2** Dissimilatory arsenate-reducing bacteria (DARB).

Species	Phylogeny	Electron acceptors	References
<i>Thermus</i> sp. HR13	Thermus	Arsenate, O <sub>2</sub>	Gihring et al. 2001
<i>Deferrribacter desulfuricans</i> SSM1 <sup>T</sup>	Deferrribacter	Arsenate, Nitrate, S(0)	Takai et al. 2003
<i>Chrysiogenes arsenatis</i> BAL-1 <sup>T</sup>	Chrysiogenes	Arsenate, Nitrate, Nitrite	Macy et al. 1996; Krafft and Macy 1998
<i>Bacillus arsenicosele-natis</i> E1H <sup>T</sup>	Low G+C Gram-positive	Arsenate, Nitrate, Selenite	Blum et al. 1998
<i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10 <sup>T</sup>	Low G+C Gram-positive	Arsenate, Nitrate, Nitrite, Selenite, Trimethylamine oxide, low-O <sub>2</sub>	Blum et al. 1998; Afkar et al. 2003
<i>Bacillus</i> sp. JMM-4	Low G+C Gram-positive	Arsenate, Nitrate	Santini et al. 2002
<i>Bacillus</i> sp. HT-1	Low G+C Gram-positive	Arsenate	Herbel et al. 2002
<i>Desulfitobacterium</i> sp. GBFH	Low G+C Gram-positive	Arsenate, Selenite, Thiosulfate, Sulfite, S(0), Fe(III), Mn(IV), Fumarate	Niggemyer et al. 2001
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1 <sup>T</sup>	Low G+C Gram-positive	Arsenate, Nitrate, Selenite, Thiosulfate, Sulfite, S(0), Fe(III), Mn(IV), Fumarate	Bouchard et al. 1996; Niggemyer et al. 2001
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2 <sup>T</sup>	Low G+C Gram-positive	Arsenate, Nitrate, Selenite, Thiosulfate, Sulfite, S(0), Fe(III), Mn(IV), Fumarate	Christiansen and Ahring 1996; Niggemyer et al. 2001
<i>Desulfosporosinus auripigmenti</i> OREX-4 <sup>T</sup>	Low G+C Gram-positive	Arsenate, Sulfate, Thiosulfate, Sulfite, Fumarate	Newman et al. 1997a, 1997b; Stackebrandt et al. 2003
Strain Y5	Low G+C Gram-positive	Arsenate, Nitrate, Sulfate, Thiosulfate, Fe(III)	Liu et al. 2004
<i>Citrobacter</i> sp. TSA-1	Gamma Proteobacteria	Arsenate	Herbel et al. 2002
<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	Gamma Proteobacteria	Arsenate, Nitrate, Thiosulfate, Fumarate, O <sub>2</sub> , MnO <sub>2</sub> , Fe(OH) <sub>3</sub> , AQDS	Saltikov et al. 2003, Saltikov and Newman 2003
Strain MLMS-1	Delta Proteobacteria	Arsenate	Hoeft et al. 2004
<i>Desulfomicrobium</i> sp. BEN-RB	Delta Proteobacteria	Arsenate, Sulfate	Macy et al. 2000
<i>Wolinella succinogenes</i> BSA-1	Epsilon Proteobacteria	Arsenate	Herbel et al. 2002
<i>Sulrospirillum arsenophilum</i> MIT-13 <sup>T</sup>	Epsilon Proteobacteria	Arsenate, Nitrate, Fumarate	Ahmann et al. 1994, 1997; Stolz et al. 1999
<i>Sulrospirillum barnesi</i> SES-3 <sup>T</sup>	Epsilon Proteobacteria	Arsenate, Nitrate, Nitrite, Selenite, Thiosulfate, S(0), Fe(III), Mn(IV), Fumarate, aspartate, Trimethylamine oxide	Oremland et al. 1994, 1999; Laverman et al. 1995; Stolz et al. 1997, 1999; Zobrist et al. 2000

<sup>T</sup> Type strain.

○ *Sulfurospirillum arsenophilum* MIT-13<sup>T</sup>

世界で初めてヒ酸塩を嫌気呼吸の電子受容体として還元することが認められた菌で、マサチューセッツの西に位置する Aberjona 流域のヒ素に汚染された底泥から、集積、分離された(Ahmann et al. 1994)。プロテオバクテリア  $\epsilon$  サブグループに属するグラム陰性菌で(Stolz et al. 1999)、運動性を有し、増殖を伴う培養系において 10mM までのヒ酸塩を 4 日以内に亜ヒ酸塩に還元することができるが、酸素の存在によりヒ酸塩還元及び菌体増殖は完全に阻害を受ける。また、ヒ酸鉄の形のヒ酸塩を還元する能力を有しており、ヒ素により汚染された底泥を用いた実験では、その還元により培養液中に亜ヒ酸塩を溶出させることができ確認されている(Ahmann et al. 1997: 第 2 節参照)。ヒ酸塩の他に、硝酸塩、フマル酸を電子受容体として利用することが可能であり、硝酸塩はアンモニアにまで還元される。また、電子供与体としては乳酸、ピルビン酸、フマル酸を用い、フマル酸を醸酵基質として増殖することも可能である(Stolz et al. 1999)。

○ *Sulfurospirillum barnesii* SES-3<sup>T</sup>

ネバダ州の西に位置する、セレンで汚染された淡水湖 Massie slough の底泥を起源とする集積培養系よりセレン酸塩還元細菌として分離された菌で(Oremland et al. 1994)、当初は *Geospirillum* 属に分類されていたが、MIT-13 株とともに *Sulfurospirillum* 属に修正された(Stolz et al. 1999)。プロテオバクテリア  $\epsilon$  サブグループに属するグラム陰性菌で、運動性を有する。セレン酸塩と同様にヒ酸塩を嫌気呼吸により還元する能力を有しており、増殖を伴う培養系において 5mM のヒ酸塩を 4 日間で亜ヒ酸塩に還元する。また、10mM のヒ酸塩については 120 時間で約 80%程度を還元するが、菌体の増殖は若干阻害される (Laverman et al. 1995)。後の研究では、酸化鉄や酸化アルミニウムに吸着されているヒ酸塩を還元できることも明らかとなっている(Zobrist et al. 2000: 第 2 節参照)。ヒ酸塩の他に、セレン酸塩、チオ硫酸塩、元素体硫黄、トリメチルアミノキシド、アスパラギン酸、Fe(III)、硝酸塩、亜硝酸塩、フマル酸、Mn(IV)等を電子受容体として利用することが可能であり、セレン酸塩は亜セレン酸塩を通じて元素体セレンに、硝酸塩はアンモニアに還元される。また、当初は絶対嫌気性細菌であるとされていたが、後に微好気条件下でも生育が可能であることが明らかとなつた(Laverman et al. 1995)。電子供与体としては、乳酸、ピルビン酸、水素等を利用できるが、水素を用いる場合には炭素源として酢酸が必要となる。セレン酸塩あるいは硝酸塩を電子受容体として培養した resting cell はヒ酸塩還元能を持ち(Laverman et al. 1995)、逆にヒ酸塩を電子受容体として培養した resting cell はセレン酸塩を還元することができるが (Oremland et al. 1999)、ヒ酸塩還元がセレン酸塩もしくは硝酸塩還元と同じ酵素系で行われているかは定かではない。一方、細胞膜画分を用いた一連の実験から、チオ硫酸塩、硝酸塩、セレン酸塩、フマル酸に対する還元活性が培養に用いた電子受容体に依存して大きく変化し、それに伴い細胞膜中の蛋白質やシトクロムの組成が変化することが示されている(Stolz et al. 1997)。また、その後の検討により、細胞膜画分において構成的なセレン酸塩および硝酸塩還元が確認されており、それに加えて、セレン酸塩にも弱い活性を示す誘導性

の硝酸還元酵素の存在が示唆されている (Oremland et al. 1999)。

○ *Chrysiogenes arsenatis* BAL-1<sup>T</sup> (Macy et al., 1996; Krafft and Macy 1998)

オーストラリア、Ballarat Goldfield(金鉱地)近くのアシ原の泥を起源とする嫌気集積系から分離された絶対嫌気性のグラム陰性細菌で、運動性を有する新属新種の細菌である。現在までに単離された DARB の中では、酢酸を炭素源及び電子供与体として利用できる数少ない菌株であることが特徴の1つとしてあげることができる。電子受容体として、ヒ酸塩、硝酸塩、亜硝酸塩を利用することが可能であり、硝酸塩は亜硝酸塩及びアンモニアに還元される。また、酸化鉄と結合した状態のヒ酸塩を用いても増殖が可能であるとされている。電子供与体及び炭素源としては、酢酸の他にピルビン酸、L-,D-乳酸(増殖は L-<D-)、マル酸、コハク酸、りんご酸を利用する。この菌については還元酵素系についての研究が進んでおり、ペリプラスマに水溶性のヒ酸還元酵素(arsenate reductase)を有することが明らかとなっている。分子量 123 kDa のこの酵素は、 $\alpha$  サブユニット(ArrA; 87 kDa)及び $\beta$  サブユニット(ArrB; 29 kDa)からなるヘテロダイマーを形成しており、亜鉛、モリブデン、鉄、酸変性硫黄(acid-labile sulfur)を含むことが明らかとなっている。このことから、補因子として亜鉛、モリブデン、補欠分子族として鉄-硫黄中心を含むことが示唆されている。さらに、ArrA 及び ArrB の両者について N 末端のアミノ酸解析が行われている。このヒ酸還元酵素は誘導性のものであり、ヒ酸塩に特異的に活性を示すが、硝酸塩、硫酸塩、セレン酸塩、及びフマル酸には活性を示さないことが確認されている。

○ *Desulfosporosinus auripigmenti* OREX-4<sup>T</sup> (Newman et al., 1997a, 1997b)

マサチューセッツ、Woburn に位置する Upper Mystic Lake から採取したヒ素で汚染された底泥から集積、分離された。グラム陽性の絶対嫌気性細菌で、運動性を持たない。増殖を伴う培養系において、5mM のヒ酸塩を約 6 日間で還元し、10mM のヒ酸塩を約 7 日間で 70% 還元するが、菌体増殖はヒ酸塩濃度 10mM で培養した場合の方が若干高い程度で、両者に顕著な差は認められなかった。また、ヒ酸鉄鉱物を用いた場合にもヒ酸塩による増殖が可能である。この菌は *S. arsenophilum*、*S. barnesii*、や *C. arsenatis* と異なり、硫酸塩を電子受容体として還元する能力を有している。増殖速度は硫酸塩を電子受容体とした場合より、ヒ酸塩を用いた場合の方が高く、ヒ酸塩と硫酸塩を含む培地で培養した場合には、ヒ酸塩の還元が優先して起こる。さらに、それに続く硫酸塩の還元は、モリブデン酸塩の存在により阻害を受けることが明らかとなっている。集積系を用いた実験では、1mM のヒ酸塩が 12 日間で  $\text{As}_2\text{S}_3$  に変換され 40~50% が除去された。電子受容体としてはヒ酸塩、硫酸塩の他に、チオ硫酸塩、亜硫酸塩、フマル酸を利用することができる。また、電子供与体としては乳酸、ピルビン酸、エタノール、グリセロール、蟻酸、リンゴ酸、酪酸、水素を利用し、ピルビン酸を醸酵基質に用いることもできる。水素を電子供与体として用いる場合、炭素源として  $\text{CO}_2$  および酢酸が利用可能となる。当初は *Desulfotomaculum* 属に分類され、

*Desulfomaculum auripigmentum* とされていたが、後に Stackebrandt ら(2003)により *Desulfosporosinus* 属に再分類され、種名にも若干の変更が加わった。

○ *Bacillus arsenicoselenatis E1H<sup>T</sup>* (Blum et al., 1998)

カリフォルニアの Mono Lake(pH9.8、塩濃度 90g/l、200-300 μM の As を含む)の底泥から分離された絶対嫌気性のグラム陽性菌で、運動性をもたず、内生胞子を形成する。最適塩濃度 60g/l、最適 pH8.5-10 という好アルカリ好塩細菌で、増殖を伴う培養系において 9mM のヒ酸塩を 2 日間で約 90% 還元できる。ヒ酸塩の他に電子受容体としてセレン酸塩、Fe(III)、硝酸塩、フマル酸を利用することが可能で、増殖速度はヒ酸塩を用いた場合よりセレン酸塩のほうが高い。電子供与体としては、乳酸、リンゴ酸、フルクトース、デンプン、ケエン酸を利用できるが、フルクトースを用いた場合、電子受容体が存在しなくても同程度の増殖が確認されている。セレン酸を電子受容体として得られた resting cell はセレン酸塩、亜セレン酸塩、ヒ酸塩、Fe(III)を還元したが、硝酸塩、フマル酸は還元できなかった。

○ *Bacillus selenitireducens MLS10<sup>T</sup>* (Blum et al., 1998; Afkar et al., 2003)

*B. arsenicoselenatis* と同様の由来をもつ運動性を持たないグラム陽性菌で、微好気条件下でも生育が可能である。最適塩濃度 60g/l、最適 pH10 という好アルカリ好塩細菌で、増殖を伴う培養系において 9mM のヒ酸を 2 日間で約 80% 程度還元できる。ヒ酸の他に、亜セレン酸、硝酸、亜硝酸、トリメチルアミンオキシド、フマル酸を電子受容体として利用できる。また、電子供与体として、乳酸、ピルビン酸等を利用し、グルコース、フルクトース、デンプンを醸酵基質に用いることもできる。亜セレン酸で培養した resting cell はセレン酸、亜セレン酸、ヒ酸、Fe(III)を還元したが、硝酸、フマル酸は還元できなかった。この菌についてもヒ酸還元酵素の精製及び特徴づけがなされているが、*C. arsenatis* とは異なり膜結合型のヒ酸還元酵素を有していることが明らかとなっている。一方で、*C. arsenatis* のものと分子量は異なるものの(150 kDa)、同様に α サブユニット(ArrA; 110 kDa)及び β サブユニット(ArrB; 34 kDa)からなるヘテロダイマーを形成しており、モリブデン及び鉄を補因子として含むことが示されている。また、N 末端のアミノ酸解析も行われており、ArrA はモリブデンを活性中心に含んでいることが示唆されている。

○ *Desulfomicrobium* sp. BEN-RB (Macy et al., 2000)

オーストラリア、Bendigo に位置するヒ素により汚染されたアシ原から採取した泥から、硫酸塩を電子受容体に用いる硫酸塩還元細菌として分離された。プロテオバクテリア δ サブグループに属するグラム陰性菌で、運動性を有する。また、ヒ酸塩に対する高い耐性を有しており、30mM という高濃度下でも増殖が可能である。*D. auripigmenti* と同様、硫酸塩を電子受容体として用いることが可能であり、増殖速度及びヒ酸塩還元速度は *D. auripigmenti* よりも高いとされている。一方、*D. auripigmenti* の場合とは異なり、ヒ酸塩と硫酸塩を含む培地で培養を行ったところ、還元は同時に進むことが確認されたことから、

ヒ酸塩と硫酸塩が別々の酵素系により還元されていることが示唆されている。酵素レベルの検討も行われており、ヒ酸塩及び硫酸塩を含む培地で培養した菌の菌体抽出液は、硫酸塩のみで培養したものよりも10倍以上高いArsenate reductase活性を示すが、その内の98.4%が細胞膜画分に存在することが確認されている。このことから、*C.arsenatis*とは異なる不溶性のヒ酸塩還元酵素を細胞膜に有することが示唆されている。また、ジチオニ酸ナトリウムにより還元されたシトクロム(主にC<sub>551</sub>)が、ヒ酸塩の添加により再酸化を受けることから、ヒ酸塩還元への電子伝達系の関与が明らかにされている。しかし、このシトクロム C<sub>551</sub>が直接 Arsenate reductaseとして働いているかどうかは定かではない。一方、同時に分離された *Desulfovibrio* sp. Ben-RA も硫酸塩とヒ酸塩を還元する能力を有しているが、ヒ酸塩のみを電子受容体とした場合増殖できず、また、シトクロム(主にC<sub>552</sub>)はヒ酸塩の添加により再酸化を受けないことから、ヒ酸塩を嫌気呼吸ではなく耐性機構により還元していることが示されている。

○ ***Desulfitobacterium* sp. GBFH** (Niggesmyer et al., 2001)

アイダホ、Coeur d'Alene Lake から採取したヒ素で汚染された底泥を起源とする集積系より分離された。運動性を有する絶対嫌気性細菌で、内生胞子形成能を持つ。気相中の大気成分が2%程度までならヒ酸塩を電子受容体として増殖することが可能である。増殖を伴う培養系において、10mMのヒ酸塩を90時間で約90%程度還元できる。また、他の属のものとは異なり、蟻酸を単一炭素源および電子供与体として増殖可能である。ヒ酸塩の他に、電子受容体として元素体硫黄、亜硫酸塩、チオ硫酸塩、フマル酸、Mn(IV)、Fe(III)、Se(VI)を利用することができ、電子供与体としてはピルビン酸、乳酸、蟻酸、フマル酸を利用することができる。また、ピルビン酸を発酵基質に用いて増殖することも可能である。16SrDNA 塩基配列を解析、比較した結果、クロロフェノール類脱塩素化菌として知られる *Desulfitobacterium hafniense* および *Desulfitobacterium frappieri* の近縁種であることが明らかとなっている。

○ ***Desulfitobacterium hafniense* DCB-2<sup>T</sup>, *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1<sup>T</sup>**

(Niggesmyer et al., 2001)

両菌株ともクロロフェノール類脱塩素化菌として知られているが(Bouchard et al., 1996; Christiansen and Ahring, 1996)、Niggesmyer らにより、GBFH 株とともに、ヒ酸塩や他の様々なオキソアニオン類、金属類を電子受容体として増殖可能であることが明らかとされた。両菌株ともその特性は GBFH 株とほぼ同様であるが、利用可能な電子受容体等が若干異なる(Table 3-1 参照)。また、DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果および生理的特性の比較から、GBFH 株を含めた3菌株全てを *Desulfitobacterium hafniense* として分類することが提案されている。

○ ***Thermus* sp. HR13** (Gihring et al., 2001)

カリフォルニア州の北に位置する Growler Hot Spring から採取したバイオフィルムより分離された。増殖の最適温度が 75°C という好熱細菌で、嫌気条件下において乳酸を電子供与体、ヒ酸塩を電子受容体として増殖することが可能である。一方、酸素を電子受容体とした好気呼吸で増殖することも可能であり、亜ヒ酸塩を酸化する能力をも有している。しかし、ヒ酸塩還元の場合とは異なり亜ヒ酸塩の酸化には増殖は伴わず、亜ヒ酸塩を電子供与体として利用することはできない。また、静置条件下では、亜ヒ酸塩酸化により生成したヒ酸塩を亜ヒ酸塩へと還元し、再酸化・還元を繰り返すという特異な能力を有している。

○ ***Bacillus* sp. HT-1, *Citrobacter* sp. TSA-1, *Wolinella succinogenes* BRA-1**

(Herbel et al., 2002)

それぞれ、ハムスターの糞便、牛の反芻液、シロアリの後腸という特殊な環境から分離された桿菌で、水素を電子供与体、ヒ酸塩を電子受容体として増殖することが可能である。また、その際に炭素源として酢酸が必要となる。詳細な特性は不明であるが、16S rRNA 遺伝子の塩基配列から上記の属種に分類されている。

○ ***Bacillus* sp. JMM-4** (Santini et al., 2002)

オーストラリア、Bendigo に位置する金鉱から採取されたヒ素により汚染された泥を起源とする。グラム陽性の絶対嫌気性桿菌で、運動性及び内生胞子形成能を有する。ヒ酸塩を電子受容体とした場合、乳酸、酢酸、ピルビン酸、コハク酸、リンゴ酸、グルタミン酸及び水素を電子供与体として利用可能であるが、水素を用いる場合は炭素源として酢酸が必要となる。また、ヒ酸塩の他に硝酸塩を電子受容体として利用することが可能である。16S rRNA 遺伝子の塩基配列から *Bacillus* 属に分類され、*B.arsenicoselenatis* の近縁種であることが明らかとなっているがその相同意は 97.3% にとどまり、電子供与体の利用能や至適 pH(JMM4: pH 7.8)などの生理的特性の違いから、*Bacillus* 属の新種である可能性が指摘されている。

○ ***Deferribacter desulfuricans* SSM1T** (Takai et al., 2003)

伊豆小笠原弧上の水曜海山に存在する深海の热水地帯から分離された絶対嫌気性の好熱細菌で、ヒ酸塩の他に硝酸塩及び元素態硫黄を嫌気呼吸の電子受容体として利用する能力を持つ。絶対従属栄養性のグラム陰性細菌で、40-70°C の範囲で増殖が可能であり、エタノール、クエン酸、酒石酸、フマル酸、リンゴ酸、コハク酸、プロピオン酸、乳酸、シュウ酸、ピルビン酸、及び蟻酸等を電子供与体として利用することができる。

○ ***Shewanella* sp. ANA-3** (Saltikov et al., 2003; Saltikov and Newman, 2003)

ヒ素による防腐処理を受けた木造桟橋から分離された通性嫌気性のグラム陰性桿菌で、嫌気条件下ではヒ酸塩や鉄及びマンガン酸化物などを電子受容体として利用することができる。

能である。利用可能な電子供与体としては、乳酸及びピルビン酸があげられる。この菌株は異化型ヒ酸還元系の分子的機序の解析を目的として単離されたことから、主に遺伝子レベルでの研究が行われており、*arrA* 及び *arrB* 遺伝子の配列が特定されている。また、解析されたこれらの遺伝子配列などから、ヒ酸塩還元酵素の分子量(ArrA, 95.2kDa; ArrB, 25.7kDa)や構造などが推測されている。さらに ANA-3 株は他の菌株と異なり、異化型ヒ酸還元能のみならず、ヒ素耐性機構をコードする *ars* オペロンをも有していることが明らかとなっている。

#### ○ Strain Y5 (Liu, et al., 2004)

ニューヨーク州、シラキュースに位置する Onondaga Lake から分離された絶対嫌気性の桿菌で、運動性を有する。分離源である Onondaga Lake は、1800 年代後半からの産業廃棄物等の投棄によって水銀、石油、有機塩素化合物等で汚染されており、現在ではスーパーファンドサイトに指定されている。そのため、他の菌株とは異なりフェノール、安息香酸、トルエン、フェルラ酸等の芳香族化合物を電子供与体として利用できることが特徴としてあげられる。他にも、乳酸及びコハク酸を利用可能であり、さらに、水素を電子供与体とした場合  $\text{CO}_2$  を炭素源として増殖することもできる。電子受容体としては、ヒ酸塩の他に、硝酸塩、硫酸塩、チオ硫酸塩、Fe(III)を利用する。生理・生化学的試験ではグラム陰性を示し、グラム陰性細菌特有の外膜を有することが観察されているが、16S rRNA 遺伝子に基づく系統学的解析ではグラム陽性に分類される *Desulfosporosinus meridiei* 及び *D. auripigmenti* との相同性が最も高いため(97% 及び 96%)、*Peptococcaceae* 科に属することが示されている。

#### ○ Strain MLMS-1 (Hoeft, et al., 2004)

カリフォルニア州の Mono Lake より採取した底層水から分離されたグラム陰性桿菌で、運動性を有する。16S rRNA 遺伝子の解析からプロテオバクテリア  $\delta$  サブグループに属することが示されているが、既知の細菌属との相同性が低いため、新属新種の細菌である可能性が指摘されている。他の菌株とは異なり、ヒ酸塩還元の電子受容体として硫化物を利用する独立栄養細菌であるという特徴を有している。

以上のように、これまで分離された DARB は数 mM レベルから 30mM という高濃度のヒ酸塩存在下でも増殖が可能であることが示されている。これらは溶液中での試験により得られたものであるため、そのまま土壤での濃度と比較することはできないが、概して数百から 2250ppm 程度のヒ酸塩存在下でも処理が可能であり、処理系内の含水率を変化させることで更なる高濃度汚染にも対応できるものと考えられる。一方で、多くのものが硝酸還元能を有するにもかかわらず酸素への耐性が低いものが多く、ほとんどのものがその培養に絶対嫌気や高温のような特殊な環境条件を要することがわかる。DARB をヒ素汚染環境の浄化技術へ適用することを想定した場合、浄化を担うバイオリアクターの制御にかかるコストを出来得る限り低減する必要があるため、酸素への感受性が低

く取り扱いが容易な DARB を取得し、その特性を明らかにしておくことが重要であるといえる。

#### 第4節 要約

本章では、ヒ素汚染土壤の対策技術の現状及び生物学的ヒ酸塩還元を既往の研究から概観し、以下の知見を得た。

一般に、汚染土壤中においてヒ素は数百 ppm レベルで検出されることが多いが、場合によっては数千 ppm に達することもある。現在我が国での適用事例が多い封じ込め及び固化・不溶化処理は、土地利用に制限のあるわが国では汚染問題の根本的な解決にはならず、今後はその適用範囲が狭まっていくことが予想されるため、汚染土壤からのヒ素の除去を可能とする代替手法の開発が早急に求められているといえる。土壤洗浄法は、ヒ素除去を可能とする点では有効であるものの、比較的大量の水や薬剤を使用し、場合によっては土壤機能に損失を与える恐れがあるため、処理後の土壤の再利用やコスト面に関して疑問が残る。物理化学的処理より低コストでの実施が可能である生物学的処理に関しては、Hyperaccumulator を用いたファイトレメディエーションが注目を集めており、実汚染サイトの土壤を対象とした評価試験などが精力的に実施されているが、処理に長期間を要するところから、その適用範囲は低濃度での汚染などに限られる。

異化型ヒ酸塩還元細菌(DARB)によるヒ素の可動化は、土壤や底泥中のヒ酸を選択的に還元し溶出させることができるのであるため、汚染浄化への適用に充分なポテンシャルを有しているものといえる。また、ファイトレメディエーションと比べるとコストが高くなる懼れがあるものの、原位置での処理には適さない中・高程度の汚染にも対応できる可能性があることから、現状の汚染問題に対する解決策のひとつとして有望であるといえる。現在までに分離されている DARB は数 mM レベルから 30mM のヒ酸塩存在下で増殖が可能であることから、概して数百から 2250ppm 程度の濃度下でも処理が可能であり、処理系内の含水率を変化させることで更なる高濃度汚染にも対応できるものと考えられる。一方、多様な細菌属に分類され、ヒ酸塩以外にも様々な物質を電子受容体として利用することができるが、培養に特殊な環境条件を要するものが多く、土壤浄化への適用に向けては、取り扱いが容易なものを取得しその特性を明らかにしておく必要がある。

## 第2章 *Bacillus* sp. SF-1 株によるヒ酸塩の還元能

### 第1節 緒言

先に述べたように、生物学的ヒ酸塩還元を利用したバイオレメディエーションプロセスの実現には、酸素への感受性が低く取り扱いの容易なDARBの取得が重要であるといえる。当研究室では、通性嫌気性のセレン酸塩還元菌 *Bacillus* sp. SF-1 株を保有しているが、この菌株はセレン酸塩を嫌気呼吸の電子受容体として還元するのと同様に、ヒ酸塩を還元する能力をも有している可能性が予備的実験の結果から示唆されている(Fujita et al., 1997; Kashiwa et al., 2000; 柏, 2000)。また、セレン酸塩の還元菌はヒ酸塩還元能を併せ持つことが比較的多数の研究で報告されていることから、この予備的観察は妥当なものと考えられる。そこで本章では、*Bacillus* sp. SF-1 株のヒ酸塩還元能を確認するとともに、土壤浄化に適用するという視点から基本的な還元特性について調べた。

### 第2節 実験材料及び方法

#### 1. 供試培地

本研究では、Table 2-1 に示した無機塩培地に炭素源として 20mM 乳酸ナトリウム(乳酸無機塩培地)、もしくは 2 g/L グルコース(グルコース無機塩培地)を添加したもの液体培地として用いた。ここで、特に記載のない限り、培地の調製には 50mM Tris-HCl buffer を用い、pH を 8.0 としている。また、菌体の短期的保存に用いる固形平板培地として、セレン酸をナトリウム塩として 5mM 含む CGY 培地(Casitone 5 g/L, Glycerol 5 g/L, Yeast extract 1.0 g/L, Agar 18 g/L)を、NaOHにより pH 8.0 に調整して用いた。

**Table 2-1** Basal salt medium containing 0.1% yeast extract.

Ingredients	Concentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.3 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.14 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2 g/l
NaCl	0.1 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.05 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.05 g/l
Yeast extract	1.0 g/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.6 mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.169 mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.085 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.099 mg/l
$\text{ZnCl}_2$	0.22 mg/l

#### 2. 増殖を伴う培養系

50mL 容バイアルビン内に分注したグルコース無機塩培地 20mL に、セレン酸塩 5mM を含む CGY 平板培地上の SF-1 株を 1 白金耳接種し、綿栓でふたをした好気条件下において回転振盪培養(120 rpm, 30°C)を 12 時間行った(前々培養)。さらに、培養液 1mL を同組成の

培地に植え継ぎ、同様の条件下で 8 時間培養(前培養)後、菌体を遠心分離で回収し( $6000 \times g$ , 10 min.)、3.0mL の Tris-HCl buffer(pH 8)に懸濁したものを植種源としてヒ酸塩還元試験に用いた。本試験ではこれを、所定濃度のヒ酸塩( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ )を含む乳酸無機塩培地 20mL に 0.2mL ずつ接種し(初期菌体濃度：約  $3-5 \times 10^7$  cells/mL)、嫌気条件下(ブチルゴム栓およびアルミキャップでバイアルビンを密栓、気相部を窒素置換)において回転振盪培養した(120 rpm, 30°C)。還元に及ぼす酸素の影響を調べる場合には、好気条件下(綿栓でふたをして回転振盪: 120 rpm, 30°C)、及び静置条件下(綿栓でふたをして 30°C インキュベーターに静置)においても同様の実験を行った。また、共存物質の影響を調べる場合は、1mM ヒ酸塩、硝酸塩、セレン酸塩をそれぞれ組み合わせて添加した乳酸無機塩培地を用い、嫌気条件下において実験を行った。なお、本試験用の培養系バイアルビンはサンプリングの数に応じて用意し、各サンプリング時に溶液全量を回収して分析に供した。

### 3. Resting cell 系

上記増殖を伴う培養系と同様に前々培養を 12 時間行った後、培養液 1mL を 10mM ヒ酸塩を含む乳酸無機塩培地 20mL に植え継ぎ、嫌気条件下(ブチルゴム栓およびアルミキャップでバイアルビンを密栓、気相部を窒素置換)において 8 時間回転振盪培養(120rpm, 30°C)を行った。培養終了後、菌体を遠心分離( $6000 \times g$ , 10min.)で回収し、5mL Tris-HCl バッファー(pH 8)に懸濁した。その後、同様に作成した 5mL 菌体懸濁液 5 本を 1 つにまとめボルテックスで攪拌し遠心分離を行うことによって菌体の洗浄・回収を行い、3mL Tris-HCl バッファーで懸濁したものを植種源としてヒ酸塩還元試験に用いた。本試験ではこれを、所定濃度のヒ酸塩と 5mM 乳酸ナトリウムを含む Tris-HCl buffer(pH 8)に 0.2mL ずつ接種し、嫌気条件下において回転振盪(120rpm, 30°C)を行った。ヒ酸塩還元試験において、pH を変化させる場合には、試験に供する溶液を Tris-HCl buffer(pH 7.2-9.0)、あるいは glycine-NaOH buffer (pH 9.4-10.0)を用いて調製した(阿南ら, 1976)。また、pH 6.5 の条件にするため、Phosphate buffer、及び Citrate Na-NaOH buffer により試験を試みたが、高濃度のリン酸、及びクエン酸がヒ酸塩測定を妨害したため、buffer を加えずに pH を調整した(実験開始前 pH:6.51—終了時:6.61)。炭素源の影響を調べる場合には、乳酸ナトリウムの代わりに各種炭素源 5mM(合成下水を炭素源とした場合は TOC 1.0 g/L: 肉エキス 0.4 g/L, ペプトン 0.6 g/L, 尿素 0.1 g/L、Yeast extract を炭素源とした場合は 1.0 g/L)を含む Tris-HCl buffer(pH 8)を用いた。なお、植種源の調製にも所定 pH の buffer を使用した。サンプリングは培養を伴う系と同様とした。

### 4. 分析

溶液中の全ヒ素濃度は原子吸光度計(Seiko SAS 7500A, フレーム分析)を用いて測定した。ヒ酸塩、硝酸塩、亜硝酸塩、セレン酸塩、及び亜セレン酸塩の分析はイオンクロマトグラフィー(ダイオネクス社 DX-300, 分析条件: Table 2-2)を用いて行った。また、溶液中の亜ヒ酸塩濃度は、サンプルに 9.1mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加して全量をヒ酸塩に酸化し、酸化したサンプルと未酸化サンプル中のヒ酸塩濃度の差から算出した。サンプルはマイクロフィルター

(DISMIC-25cs Disposable syringe filter unit :Cellulose acetate 0.45  $\mu$ m、ADVANTEC)でろ過し、元素態セレンの蓄積の見られるものについてはさらに遠心分離を行い、懸濁物質を除去して分析に供した。

## 5. 菌体数の計測

総菌数はカウンティングチャンバーの 60～100 区画内の菌数を位相差顕微鏡 AFX-DX(Nikon)により直接計測し、その平均値によって示した。また、菌体増殖の指標として分光光度計(UV-1200 SHIMADZU)により測定した OD<sub>650</sub> を用いた。

**Table 2-2** Analysis condition of ion chromatography.

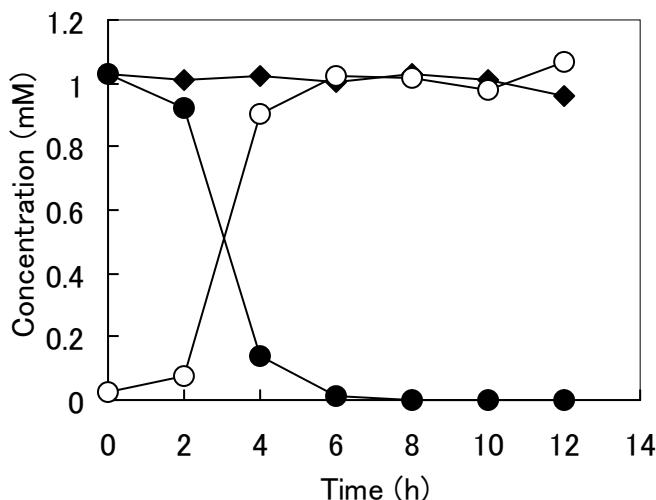
	Arsenate, selenate, selenite	Nitrate, nitrite
Guard column	AG4S-SC	AG4S-SC
Column	AS4A-SC	AS4A-SC
Suppresser	ASRI-ULTRA	
Detector	Conductivity	UV/VIS (215nm)
Eluent	17mM NaHCO <sub>3</sub> + 18mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> or 30mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	17mM NaHCO <sub>3</sub> + 18mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Flow rate	1.0ml/min	1.0ml/min

## 第3節 実験結果及び考察

### 1. SF-1 株によるヒ酸塩還元の基本的特性

#### ○ ヒ酸塩還元能の確認

SF-1 株のヒ酸塩還元能の確認を行うため、増殖を伴う培養系においてヒ酸塩の初期濃度 1mM として還元実験を行った。結果を Fig. 2-1 に示す。実験開始 6 時間以内にはほぼすべてのヒ酸塩が還元され、それに伴って等量の亜ヒ酸塩の生成が確認された。実験期間中、蓄積された亜ヒ酸塩及び全ヒ素濃度の減少は見られず、培養時間を 24 時間まで延長した際にもその減少は確認されなかった。このことから、SF-1 株は、ヒ酸を亜ヒ酸に還元する能力は有しているが、亜ヒ酸をさらに還元することはできないことが明らかとなった。菌体を加えていないコントロール系では、溶液中のヒ酸の減少及び亜ヒ酸の増加は認められなかつた(データ不掲載)。



**Fig. 2-1** The time course of arsenate reduction and arsenite accumulation by strain SF-1. Cultures were incubated with 20 mM lactate and 1 mM arsenate. Symbols: diamonds, total arsenic; solid circles, arsenate; open circles, arsenite.

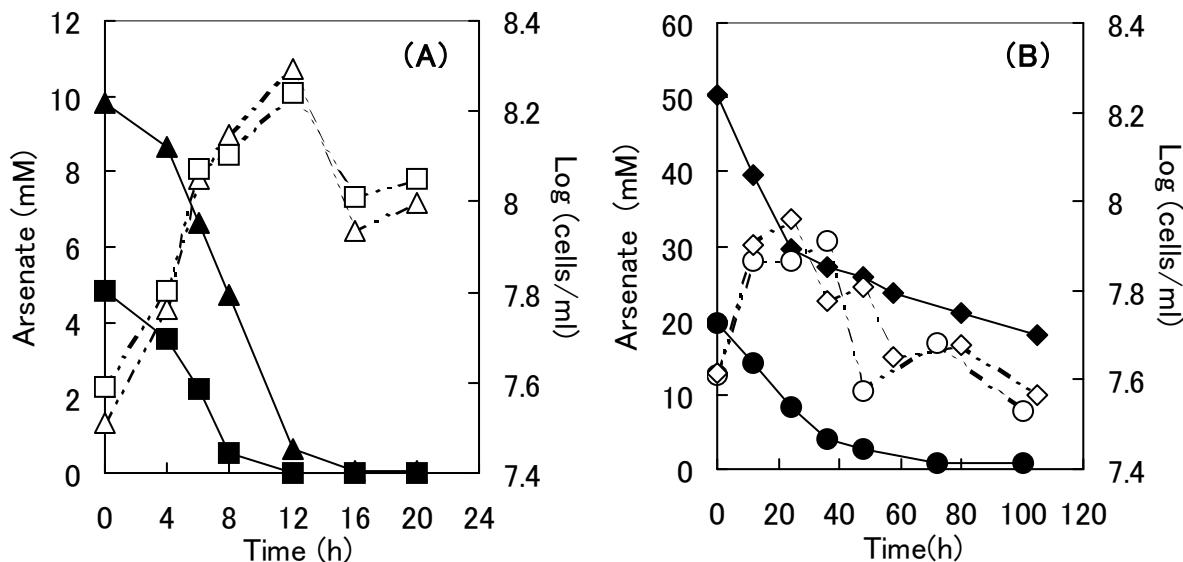
### ○ ヒ酸塩還元及び増殖特性

SF-1 株のヒ酸塩還元能、及びヒ酸塩還元に伴う菌体増殖の有無を確認し、また化学両論的関係を把握するために、増殖を伴う培養系においてさらに高濃度域での還元実験を行った結果を Fig.2-2 に示す。初期ヒ酸塩濃度 5、及び 10mM で実験を行った系では、実験開始 16 時間後にはほぼ全てのヒ酸塩が還元された(Fig.2-2A)。また、還元の進行に伴って菌体の増殖が認められ、還元終了とともに増殖が停止したことから、SF-1 株はヒ酸塩を嫌気呼吸の最終電子受容体として利用し、還元しているものと推測された。さらに、初期ヒ酸塩濃度 20、及び 50mM で実験を行った系においてもヒ酸塩の還元が確認された(Fig.2-2B)。これまで、50mM という高濃度下での還元試験の報告例はないことから、SF-1 株が高いヒ酸塩還元能を有していることが示唆された。しかしながら、菌体の増殖は 5~10mM の場合よりも低く、約 20mM 程度のヒ酸塩が還元された後に菌体濃度が低下する傾向が示され、実験後期では初期菌体濃度付近にまで減少した。また、それに伴い還元速度の低下が認められた。

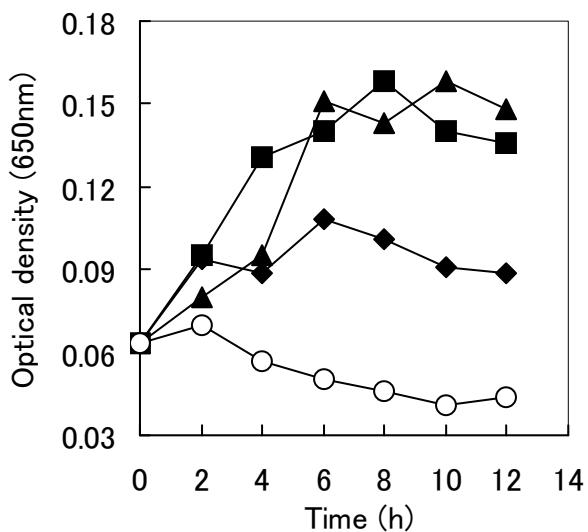
ヒ酸塩を電子受容体とした嫌気条件下での SF-1 株の増殖特性をさらに詳細に評価するため、ヒ酸塩存在下及び非存在下における菌体増殖を比べたものを Fig. 2-3 に示す。ヒ酸塩を添加しないコントロール系でも若干の菌体増殖が認められたものの、その増殖量はヒ酸塩を添加した実験系に比べ明らかに低く、ヒ酸塩が SF-1 株の菌体増殖を促進していることが確認された。また、ヒ酸塩の還元量と菌体生成量との間には極めて高い相関関係が認められた(Fig. 2-4)。従って、これらの結果から SF-1 株は、ヒ酸塩を電子受容体として細胞増殖のためのエネルギーを獲得する DARB であることが示された。また、10mM ヒ酸塩に等濃度の亜ヒ酸塩を共存させた系では、菌体の増殖が確認されなかったことから、高濃度の亜ヒ酸塩は菌体増殖を阻害することが示され、先の高濃度域(20~50mM)での還元試験

における菌体濃度の低下は、蓄積された亜ヒ酸塩による阻害影響に起因しているものと考えられた。

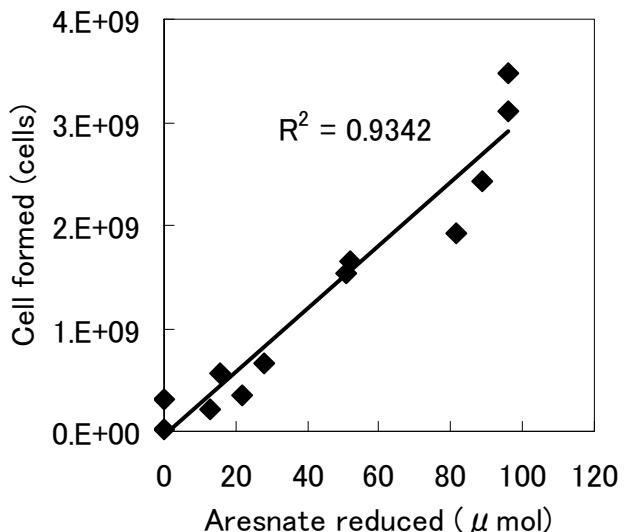
以上の結果よりヒ酸塩濃度 5~50mM における SF-1 株のヒ酸塩還元速度を算出したところ、 $1.1 \sim 2.3 \times 10^{-13}$ (mol/cells/d)となり、DARB として知られている *Sulfospirillum arsenophilum* 及び *S. barnesii* のヒ酸塩還元速度  $2 \sim 5 \times 10^{-13}$ (mol/cells/d)より若干低い値となった(Newman et al., 1998)。しかしながら、*S. arsenophilum* 及び *S. barnesii* を含め、現在までに特徴づけがなされている多くの DARB は還元を開始するまでに 12 時間以上の誘導期を有し、10mM のヒ酸塩をすべて還元し終えるまでに数日間を要するのに対して(Ahmann et al., 1994; Laverman et al., 1995; Newman et al., 1997a; Blum et al., 1998; Macy et al., 2000; Niggemyer et al., 2001; Hoefer et al., 2004; Liu et al., 2004)、実験条件の違いはあるものの、SF-1 株はわずか 2~4 時間の誘導期の後速やかにヒ酸塩還元を開始し、10mM のヒ酸塩を実験開始 16 時間後にはほぼすべて還元し終えるという高い活性を示した。ここで、10mM ヒ酸塩存在下における SF-1 株の倍加時間(doubling time)を算出したところ、4.4 時間となり、これまでに報告されているものよりも短い値を示した(6.7-14 時間: Ahmann et al., 1994; Laverman et al., 1995; Macy et al., 1996; Macy et al., 2000; Santini et al., 2002)。以上の結果から、SF-1 株は DARB の中でも高いヒ酸塩還元能を有していることが確認されたものといえ、バイオレメディエーションプロセスへ導入する菌株として有望であると考えられた。



**Fig. 2-2** Growth of and arsenate reduction by strain SF-1. Cultures were incubated with 20 mM lactate and 5, 10, 20, 50 mM arsenate. Solid symbols represent values for arsenate concentrations; open symbols represent cell numbers. (A) Squares, 5 mM arsenate; triangles, 10 mM arsenate. (B) Circles, 20 mM arsenate; diamonds, 50 mM arsenate.



**Fig. 2-3** Cell growth of strain SF-1 in the absence and presence of arsenic. Cultures were grown on 20 mM lactate and 0, 5, 10 mM arsenate and 10 mM arsenite as indicated. Diamonds, 0 mM arsenate (control); squares, 5 mM arsenate; triangles, 10 mM arsenate; circles, 10 mM arsenate plus 10 mM arsenite.

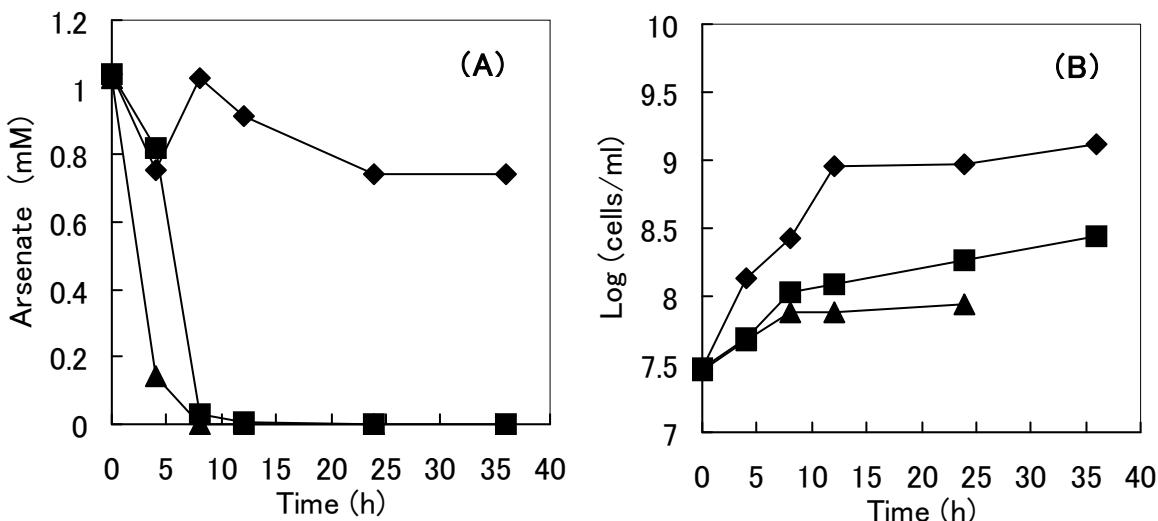


**Fig. 2-4** Relationship between the quantity of arsenate reduced and cells formed. Plotted data were obtained from cultures incubated with 20 mM lactate and 1 mM or 5 mM arsenate to minimize the inhibitory effect of accumulated arsenite on cell growth.

## 2. SF-1株のヒ酸塩還元に影響を及ぼす環境因子の検討

### ○ 酸素の影響

ヒ酸塩還元に及ぼす酸素の影響を検討するため、好気、静置、嫌気の各条件下で増殖を伴う培養系により 1mM ヒ酸塩の還元試験を行った。その結果、好気条件下では菌体の旺盛な増殖が認められたものの、ヒ酸塩還元はほとんど進まなかった(Fig.2-5)。これは酸素がヒ酸塩と比較して、優先的に電子受容体として利用されたためであると考えられた。ここで、ヒ素耐性機構を有する細菌では、ヒ酸塩は電子受容体とならないため酸素との競合が起こらず、還元は好気条件下でも同様に行われることから(Macur et al., 2001)、SF-1株によるヒ酸塩の還元が耐性機構によるものではなく、嫌気呼吸によるものであることが裏付けられたといえる。一方、静置条件下では嫌気条件下と比べ若干のラグが認められたものの、実験開始 8 時間後までは 1mM のヒ酸塩がほぼ全量亜ヒ酸塩に還元された。このことから、SF-1株によるヒ酸塩の還元は、酸素の存在により阻害を受けるため、嫌気条件下を保つことが必要であるといえるが、厳密に嫌気条件を保つ必要はないことが明らかとなった。これまでに分離されている DARB は酸素への抵抗性が低いものが多く、絶対好気条件下において増殖可能なものとして報告されているのは *Shewanella* sp. ANA-3株及び好熱細菌である *Thermus* sp. HR13株の2菌株のみであり(第1章参照)、また、DARB により微妙好気条件下においてヒ酸塩還元を試みた報告例はこれまでになされていない。従って、SF-1株は酸素に対する反応という面で稀な特性を有する DARB であるといえ、好気条件下で大量培養が可能であるうえ、取り扱いが容易であるという実用上優れた利点を有しているといえる。



**Fig. 2-5** Effect of oxygen on arsenate reduction (A) and cell growth (B). Cultures were incubated with 20 mM lactate and 1 mM arsenate under aerobic (diamonds), static (squares), and anaerobic (triangles) conditions.

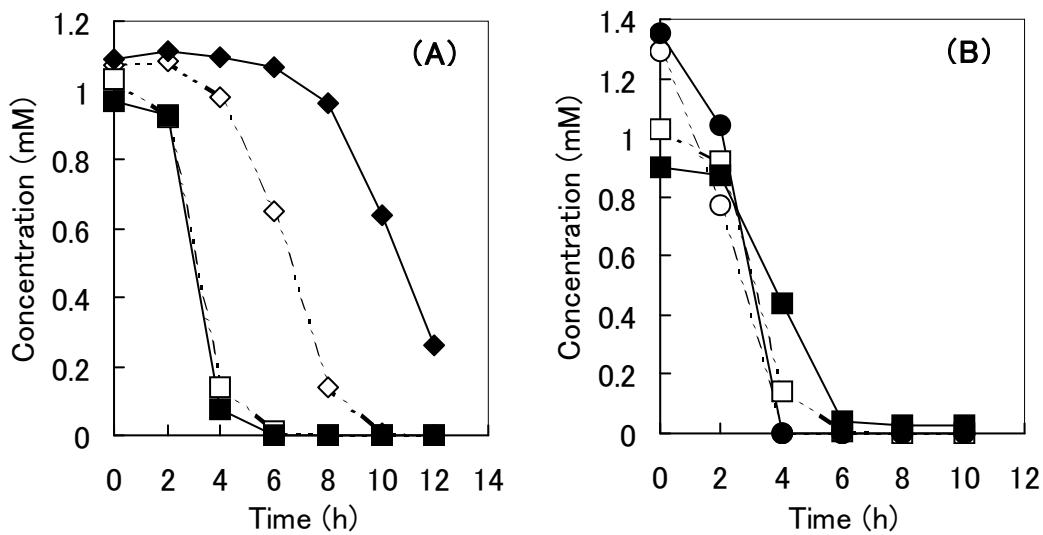
### ○ 他の電子受容体の影響

先の研究により、SF-1株はヒ酸塩のみでなく、セレン酸塩及び硝酸塩を嫌気呼吸の電子受容体として利用することが示されている(柏, 2000; Kahiwa et al., 2000)。そこで、これらの電子受容体の共存がヒ酸塩還元へ及ぼす影響を調べるため、増殖を伴う培養系により一連の実験を行った。

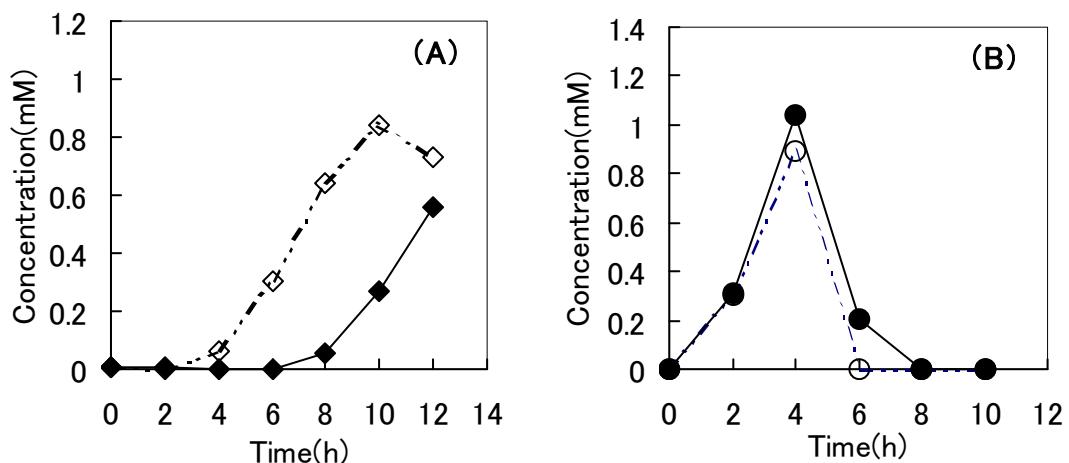
ヒ酸塩-セレン酸塩共存系で実験を行った結果、ヒ酸塩の還元はセレン酸塩の存在による影響をほとんど受けないことが明らかとなった(Fig.2-6A)。一方で、セレン酸塩の還元はヒ酸塩の存在により明らかな阻害を受けた。このことから、SF-1株はセレン酸塩よりもヒ酸塩を嫌気呼吸の電子受容体として優先的に利用すること示唆された。あるいは、ヒ酸塩やその還元によって生じる亜ヒ酸塩による阻害的影響が認められたものとも解釈できる。ここで、ヒ酸塩が還元によりほぼ完全に除去された後でも、セレン酸塩還元が開始されるまでにはラグタイムが認められたことから、セレン酸塩還元の阻害は拮抗作用によるものではないと考えられた。従って、ヒ酸塩とセレン酸塩の還元は異なる酵素系により行われている可能性が示唆された。セレン酸塩のみの系、及びセレン酸塩-ヒ酸塩共存系の両者において、セレン酸塩の還元に伴い亜セレン酸塩の蓄積、及び亜セレン酸塩の更なる還元が確認され(Fig.2-7A)、実験後期では培養液中に元素態セレンの生成を示す赤色が確認された。

ヒ酸塩-硝酸塩共存系では、ヒ酸塩の還元は硝酸塩の存在により若干の阻害を受けた(Fig.2-6B)。しかしながら、ヒ酸塩還元は硝酸塩還元と同時、もしくは硝酸塩還元終了直後に開始されていることから、硝酸塩共存下においても速やかにヒ酸塩還元が進むことが明らかとなった。一方、硝酸塩還元もヒ酸塩の存在により若干の阻害を受け、それに伴って亜硝酸塩の蓄積、及び還元も阻害を受けたことから(Fig.2-7B)、SF-1株の有する硝酸塩-亜硝酸塩還元系とヒ酸塩還元系には何らかの関連があることも考えられた。

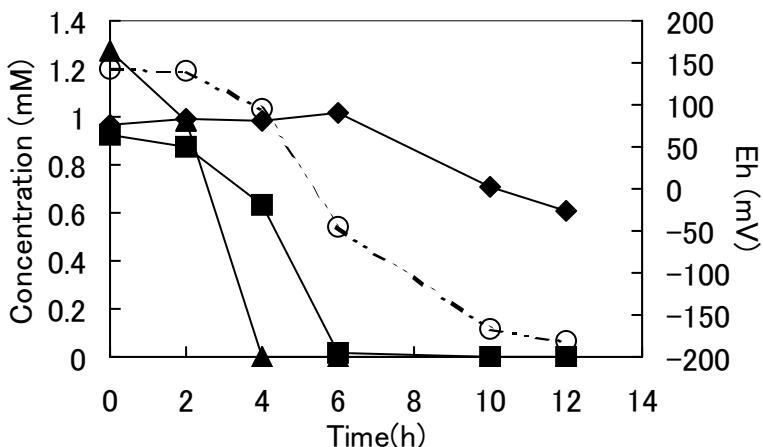
ヒ酸塩-硝酸塩-セレン酸塩の3者が共存する系では、ヒ酸塩及び硝酸塩の還元はヒ酸塩-硝酸塩共存系の場合とほぼ同様の傾向を示した(Fig.2-8)。このことから、ヒ酸塩の還元はセレン酸塩の存在により影響を受けないことが確認され、さらに硝酸塩還元もセレン酸塩の存在により影響を受けないことが明らかとなった。一方、セレン酸塩還元は、ヒ酸塩及び硝酸塩の存在により更に阻害を受け、セレン酸塩還元が開始されるまでのラグはヒ酸塩-セレン酸塩共存系よりも長くなっていた。このことから、セレン酸塩還元酵素の生産は、硝酸塩やヒ酸塩などの電子受容体が全て利用された後に誘導されていることが示唆された。また、実験系内の酸化還元電位は、オキソアニオン類の還元に伴い低下する傾向が認められたものの、ヒ酸塩還元は0~0.15V程度で開始されたことから、硫酸塩還元細菌による硫酸塩還元(-0.22V)やメタン生成菌によるメタン生成(-0.24V)のような厳密な嫌気条件を必要としないことが確認された(アンダーソン, 1997)。



**Fig. 2-6** Effect of selenate (A) and nitrate (B) on arsenate reduction. (A) Cultures were incubated with 20 mM lactate and 1 mM arsenate and/or 1 mM selenate as indicated. (B) Cultures were incubated with 20 mM lactate and 1 mM arsenate and/or 1 mM nitrate as indicated. Solid squares, Arsenate reduction in the presence of selenate (A) or nitrate (B); open squares, arsenate reduction in the absence of other electron acceptors; solid diamonds, selenate reduction in the presence of arsenate; open diamonds, selenate reduction in the absence of other electron acceptors; solid circles, nitrate reduction in the presence of arsenate; open circles, nitrate reduction in the absence of other electron acceptors.



**Fig. 2-7** Selenite (A) and nitrite (B) accumulation and reduction following selenate and nitrate reduction respectively. (A) Cultures were incubated with 20 mM lactate and 1 mM arsenate and/or 1 mM selenate as indicated. (B) Cultures were incubated with 20 mM lactate and 1 mM arsenate and/or 1 mM nitrate as indicated. Solid symbols represent values for selenite (A) or nitrite (B) concentrations in the presence of arsenate; open symbols represent selenite (A) or nitrite (B) concentrations in the absence of arsenate.



**Fig. 2-8** Arsenate reduction in the presence of both selenate and nitrate. Cultures were incubated with 20 mM lactate, 1 mM arsenate, 1 mM selenate, and 1 mM nitrate. Squares, arsenate concentration; diamonds, selenate concentration; triangles, nitrate concentration; circles, Eh.

### ○ 炭素源の影響

先の研究により、SF-1 株は Yeast extract を増殖の炭素源として用いている可能性が示されている(柏, 2000)。そのため、培地中の Yeast extract 濃度を 0.1g/L におさえ、増殖を伴う培養系においてヒ酸塩還元に及ぼす炭素源の影響を検討したところ、炭素源を加えていないコントロール系においても培養開始 8 時間後に 60%程度のヒ酸塩が還元された(データ不掲載)。そこで、炭素源の影響を確実に評価するために、バッファーに炭素源とヒ酸塩のみを加えた resting cell 系を用いて還元実験を行った。その結果、乳酸等の有機酸やグルコース等の糖類を添加した系ではヒ酸塩の還元が見られたものの、炭素源を添加していないコントロール系やフェノール、エタノール、メタノールを添加した系ではヒ酸塩還元が確認されなかった(Table 2-3)。このことから、SF-1 株は有機酸や糖類を幅広くヒ酸塩還元の電子供与体として利用することができるが、フェノール等芳香族化合物やエタノール、メタノール等は利用できないことが明らかとなった。また、効率は必ずしも高くなかったが、発酵の最終代謝産物であり廃棄物の嫌気性消化により容易に得られる酢酸を利用できたうえ、合成下水を添加した系においても速やかな還元が見られたことから、実際の汚染土壤に適用する際には、比較的容易に炭素源を確保することができるものと考えられた。

**Table 2-3.** Arsenate reduction by arsenate-grown washed cell suspensions of strain SF-1 provided with various electron donors<sup>a</sup>.

Electron donor	Arsenate reduced (%) after	
	4 h	8 h
Control <sup>b</sup>	2.7	0
Acetate	8.3	15.4
Lactate	62.3	98.2
Pyruvate	36.8	39.5
Fuructose	23.0	54.0
Glucose	51.9	82.0
Sucrose	25.1	49.4
Glycerol	13.3	31.1
Synthetic sewage <sup>c</sup>	75.1	97.1
Yeast extract <sup>d</sup>	97.4	98.1
Phenol	0	0
Ethanol	0	0
Methanol	0	0

<sup>a</sup> Arsenate concentration was 1 mM, electron donors were supplemented to suspensions at 5 mM.

<sup>b</sup> Control experiment without electron donor.

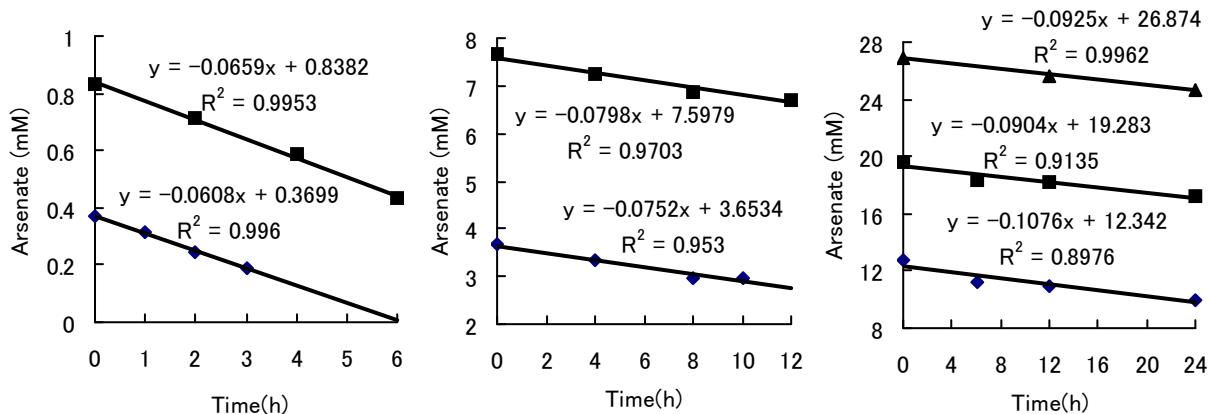
<sup>c</sup> Synthetic sewage without inorganic compounds (TOC=1000 mg/L).

<sup>d</sup> Yeast extract 1000 mg/L.

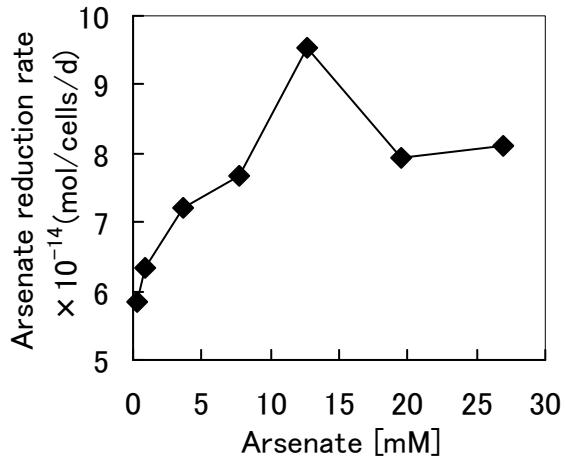
Cell density =  $3.25 \times 10^7$  cells/ml.

### ○ ヒ酸塩濃度の影響

SF-1 株によるヒ酸塩還元が 50mM という高濃度下においても進むことが明らかとなったが、このような高濃度域においては増殖阻害が認められ、それに伴ってヒ酸塩還元が低下する傾向が示された。そのため、還元に及ぼすヒ酸塩濃度の影響を確実に評価するため、resting cell 系により実験を行い、各濃度におけるヒ酸塩還元速度を Fig.2-9 に示した近似直線及び菌体数から算出した。その結果、ヒ酸塩濃度 13mM 付近までは濃度の上昇に伴い還元速度の増加が確認されたが、約 20mM からは低下傾向が見られ、その後はほぼ一定となった(Fig2-10)。このことから、高濃度域においてもヒ酸塩還元は進むものの、20mM 以上で阻害を受けることが明らかとなった。ここで、Fig.2-5 に示した近似直線の  $R^2$  値はほとんどが 0.9 以上の高い値を示したことから、実験期間内には還元に伴い生成した亜ヒ酸塩による阻害影響はなかったものと考えられた。従って、ここで認められた高濃度域における還元速度の低下はヒ酸自体の高濃度阻害によるものと考えられた。



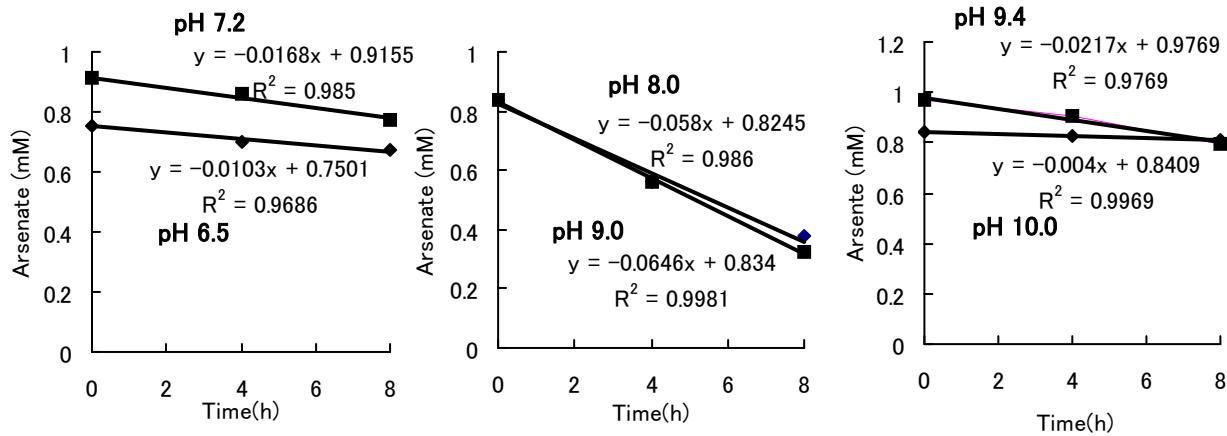
**Fig. 2-9** The time course of arsenate reduction by resting cell suspensions of strain SF-1.  
Cell density:  $2.5\text{--}2.7 \times 10^7$  (cells/ml)



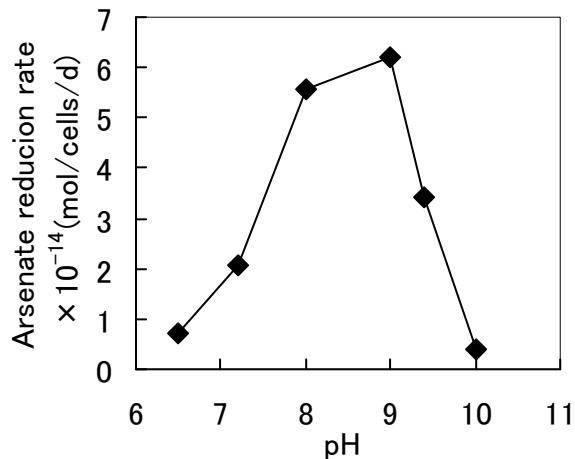
**Fig. 2-10** Effect of arsenate concentration on arsenate reduction.

### ○ pH の影響

先の研究により、SF-1 株は pH7.5~9.0 のアルカリ域で増殖が可能であり、最適 pH は 8.0 であることが明らかとなっている(柏, 2000)。そこで、SF-1 株のヒ酸塩還元に及ぼす pH の影響を評価するため、resting cell 系を用いて実験を行い、Fig.2-11 に示した近似直線及び菌体数からヒ酸塩還元速度を算出した。その結果、SF-1 株は pH7.2~9.4 の範囲でヒ酸塩の還元が可能であり、SF-1 株によるヒ酸塩還元反応の最適 pH は 9.0 であることが明らかとなつた(Fig.2-12)。また、pH6.5 においても若干の還元が確認され、pH7.2 及び 9.4 においてもヒ酸塩還元が確認されたことから、中性付近や高アルカリ域においても菌体濃度を高く保つことによって、効率の良い還元が可能であると考えられた。



**Fig. 2-11** The time course of arsenate reduction by resting cell suspensions of strain SF-1 at different pH. Cell density: 3.48(pH 6.5), 1.94(pH 7.2), 2.50(pH 8.0-10.0), 1.54(pH 9.4)  $\times 10^7$  (cells/ml)



**Fig. 2-12** Effect of pH on arsenate reduction.

#### 第4節 要約

本章では、当研究室保有のセレン酸塩還元細菌 *Bacillus* sp. SF-1 株のヒ酸塩還元能を確認し、ヒ素汚染土壤浄化への適用という視点から、そのヒ酸塩還元の基本的特性を明らかにした。その結果、SF-1 株がヒ酸塩還元能を有しており、ヒ酸塩を嫌気呼吸の電子受容体として還元する DARB であることが確認された。また、ヒ酸塩濃度 50mM という高濃度下でも還元能を示し、既往の DARB に比べヒ酸塩還元開始までの誘導期が短いことから、バイオレメディエーションプロセスへ導入する菌株として有望な菌株であることが示された。

SF-1 株のヒ酸塩還元特性をさらに詳細に調べ、実用する際の特徴を評価することを目的として、還元に影響を及ぼす諸因子の検討を行った結果、好気条件下においてヒ酸塩還元

## 第2章 *Bacillus* sp. SF-1 株によるヒ酸塩の還元能

が阻害を受けることから、SF-1 株によるヒ酸塩還元が嫌気呼吸によるものであることが裏付けられると同時に、微好気条件下でもヒ酸塩還元が可能であることが示された。また、多様な有機酸や糖類をヒ酸塩還元の電子供与体として利用することが可能であり、合成下水を用いた系においても速やかなヒ酸塩還元を行うことが明らかとなった。従って、実際の汚染土壌に適用する際には、比較的容易に炭素源を確保することが可能であり、厳密な嫌気条件下を保つ必要が無いものといえる。また、SF-1 株によるヒ酸塩還元はセレン酸塩の存在には影響を受けず、一方、硝酸塩の共存下では若干の阻害を受けるものの、概して速やかな還元が可能であることが明らかとなった。また、ヒ酸塩還元速度はヒ酸塩濃度の上昇に伴い増加するが、20mM 以上の高濃度域では低下することが明らかとなった。さらに、pH7.2~9.4 の範囲でヒ酸塩還元が可能であり、中性付近や高アルカリ域でも菌体濃度を高く保つことで、効率の良いヒ酸塩還元が可能であることが示唆された。

## 第3章 *Bacillus* sp. SF-1 株のヒ酸塩還元機構に関する検討

### 第1節 緒言

第2章において、SF-1 株がヒ酸塩を嫌気呼吸の電子受容体として還元する DARB であることが裏付けられたが、この還元反応に関わる酵素系に関しては検討していない。現在までに報告されている DARB は、ヒ酸塩以外にも様々な金属類やオキソアニオン類などを電子受容体として還元することが可能であることは、すでに第1章において述べたが、SF-1 株についてもヒ酸塩以外にセレン酸塩や硝酸塩を電子受容体として還元することが明らかとなっている(Kashiwa et al., 2000)。これら各種還元酵素系の関連や誘導などについて検討した例は少ないが、本研究で提案しているように、ヒ酸塩還元菌を用いてバイオレメディエーションプロセスを構築しようとする場合には、ヒ酸塩還元酵素の誘導や他の電子受容体の還元酵素系との関連を十分に把握し、プロセスの合理的な設計と運転・管理を行うための戦略をたてることが望まれる。例えば、ヒ酸塩還元が硝酸塩還元酵素の非特異的な活性により行われる場合には、処理工程における拮抗的な阻害を避けるために、硝酸塩の共存を防止する前処理等が求められる。そこで本章では、SF-1 株のヒ酸塩還元酵素の生化学特性、並びにセレン酸塩、及び硝酸塩還元酵素系との関連を解明することを目的として、resting cell 及び粗酵素液を用いた種々の検討を行った。

### 第2節 実験材料及び方法

#### 1. 供試培地

本章で使用した培地の基本的組成は第2章に準じた。嫌気条件下における培養では、電子受容体として 10mM ヒ酸塩、セレン酸塩、もしくは硝酸塩を加えた乳酸無機塩培地を用い、50mL 容バイアルビンを用いる場合には、ブチルゴム栓およびアルミキャップで密栓、500mL 容三角フラスコでは、滅菌流動パラフィンを重層してブチルゴム栓で蓋をし、気相部を窒素置換した。SF-1 株のヒ酸塩、セレン酸塩、及び硝酸塩還元に及ぼすタングステン酸塩の影響を調べる際には、1mM タングステン酸塩を培地中に加え、各電子受容体の濃度は 1mM とした。

#### 2. resting cell を用いた実験

##### ○ Oxygen-grown resting cell 系

第2章増殖を伴う培養系と同様に前々培養を 12 時間行った後、培養液 1mL を同組成の培

地に植え継ぎ、同様の条件下で 8 時間回転振盪培養(120rpm, 30°C)を行った。培養終了後、菌体を遠心分離( $6000 \times g$ , 10min.)で回収し、5mL Tris-HCl buffer(pH 8)に懸濁した。その後、ボルテックスで攪拌し遠心分離を行うことによって菌体の洗浄・回収を行い、3mL Tris-HCl buffer で懸濁したものを植種源としてヒ酸塩、セレン酸塩及び硝酸塩還元試験に用いた。還元試験ではこれを 50mL 容バイアルビンに分注した 1mM ヒ酸塩、セレン酸塩、もしくは硝酸塩と 5mM 乳酸ナトリウムを含む Tris-HCl buffer 20mL に 0.2mL ずつ接種し、嫌気条件下において回転振盪(120rpm, 30°C)を行った。なお、サンプリング方法は第2章に準じ、ヒ酸塩、セレン酸塩、及び硝酸塩はナトリウム塩として加えた。

#### ○ Arsenate-、Selenate-、及び Nitrate-grown resting cell 系

第2章増殖を伴う培養系と同様に前々培養を 12 時間行った後、培養液 1mL を 10mM ヒ酸塩、セレン酸塩、もしくは硝酸塩を含む乳酸無機塩培地 20mL に植え継ぎ、嫌気条件下において 8 時間(Arsenate-及び Nitrate-grown cell 系の場合)もしくは 20 時間(Selenate-grown cell 系の場合)回転振盪培養を行った。培養終了後、菌体を遠心分離で回収し、5mL Tris-HCl buffer(pH 8)に懸濁した。その後、同様に作成した 5mL 菌体懸濁液 5 本(Arsenate-及び Selenate-grown cell 系の場合)もしくは 3 本(Nitrate-grown cell 系の場合)を 1 つにまとめボルテックスで攪拌し遠心分離を行うことによって菌体の洗浄・回収を行い、3mL Tris-HCl buffer で懸濁したものを植種源としてヒ酸塩、セレン酸塩及び硝酸塩還元試験に用いた。還元試験の方法は、Oxygen-grown resting cell 系に準じた。また、セレン酸塩を電子受容体として培養した菌体に対しては、セレン酸塩(1mM)及び硝酸塩(1mM)を両方含む系においても還元試験を行った。

#### ○ 阻害物質の影響

還元試験において、クロラムフェニコールの影響を調べる際には、メタノールに溶解して超純水で希釈したものを用い、終濃度が  $20 \mu\text{g/mL}$  となるように試験溶液に加えた(0.2mL/L のメタノールを含む)。また、アジ化物は、終濃度が 0.5mM となるようにナトリウム塩として試験溶液に加えた。

### 3. 粗酵素液を用いた実験

#### ○ 粗酵素液の調整及び細胞破碎液の分画

5 mM セレン酸を含む CGY 平板培地上の SF-1 株を、試験管内に分注したグルコース無機塩培地 5 mL に白金耳を用いて植菌し、好気条件下において回転振盪培養(120 rpm, 28°C)を 14 時間行った(前々培養)。さらに、培養液 10 mL をシリコ栓で蓋をした 2 L 容量坂口フラスコ中の同組成の培地 500 mL に植え継ぎ、同様の条件下で 9.5 時間培養(前培養)後、菌体を遠心分離で回収( $8000 \times g$ , 10 min, 20°C)した。回収した菌体を乳酸無機塩培地 120 mL に懸濁し、植種源とした。本培養ではこれを 500 mL 容量三角フラスコ中のヒ酸塩、セレン酸

塩、もしくは硝酸塩を含む乳酸無機塩培地 500 mL に 10 mL ずつ接種し、嫌気条件下において、20 時間もしくは 10 時間(ヒ酸塩もしくはセレン酸塩を電子受容体とした場合)、8 時間(硝酸塩を電子受容体とした場合)、回転振盪培養(90 rpm, 30°C)を行った。この培養液を遠心分離( $8000 \times g$ , 10 min, 4°C)することにより集菌し、氷冷した 1 mM DTT(dithiothreitol)を含む Tris-HCl buffer(pH 8.0) (BufferA)50 mL で懸濁した後、再び遠心分離を行った。この操作を 2 回繰り返すことにより菌体の洗浄・回収を行った後、菌体を液体窒素で瞬間冷凍して、一時保存した。

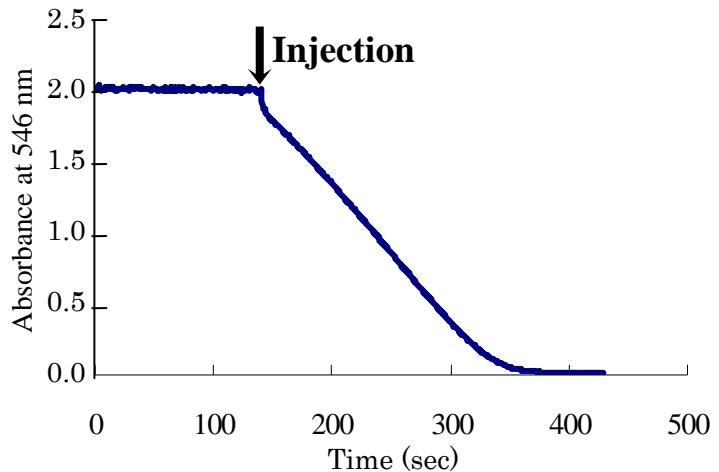
上記のように回収した菌体(乳酸無機塩培地 1 L 培養分)を、氷中で解凍して、氷冷した BufferA 10 mL で懸濁し、プロテアーゼ阻害剤である PMSF(phenylmethane sulfonyl fluoride, イソプロパノールにより溶解)を終濃度 1 mM となるように添加した後、フレンチプレス (SLM AMINCO Instruments Inc. 圧力 1000 kg/cm<sup>2</sup>)を用いて破碎したものを細胞破碎液とした。10 mg/mL DNase 及び 10 mg/mL RNase を 100 μL ずつ添加することにより核酸を分解し、 $2600 \times g$  で遠心分離(5 min, 4°C)した上澄み液を粗酵素液とした。

酵素の細胞内での局在化を同定する際には、Kaback(1971)の方法に従って、細胞破碎液を低速で遠心分離( $900 \times g$ , 15 min, 4°C)することにより、細胞壁や未破碎の細胞(細胞残屑)を除いた後、高速での遠心分離( $45000 \times g$ , 1 h, 4°C)を行い、細胞膜画分(沈殿)と細胞質画分(上澄み液)に分画した。

### ○ ヒ酸塩、セレン酸塩及び硝酸塩還元酵素活性の測定方法

ヒ酸塩、セレン酸塩及び硝酸塩還元酵素活性の測定は、Stolz らの方法(Stolz *et al.*, 1997)を一部修正して行った。この方法は、亜ジチオニ酸ナトリウムで還元した還元型ベンジルビオロゲンを人工的な電子供与体として用いるが、ベンジルビオロゲンは空气中で急速に酸化されるため、反応溶液の調製は全て、嫌気チャンバー内で行った。

基質である 2 mM ヒ酸塩、セレン酸塩、もしくは硝酸塩を含んだ Tris-HCl buffer(pH 7.4)を調製し、N<sub>2</sub>置換及び He 置換により、溶液の脱気を行った。その後、この緩衝液に、電子供与体である 0.40 mM ベンジルビオロゲン、及び酵素のチオール基の保護剤である 0.10 mM DTT を添加し、さらに還元剤である 0.23 mM 亜ジチオニ酸ナトリウムを加えて、溶液中の酸素を除去し、ベンジルビオロゲンを還元型としたものを反応溶液とした(Table 3-1)。反応溶液を、試験管(13 × 100 m/m)に 3.4 mL ずつ分注し、ブチルゴムで蓋をした後、分光光度計 (Ocean Optics Inc. USB2000)に設置した。その後、30°Cで 60 分以上放置して、546 nm における吸光度のベースラインが一定であることを確認してから、100 μL マイクロシリンドリで酵素溶液(粗酵素液、細胞膜画分、細胞質画分等) 50 μL を添加することにより反応を開始した。酵素溶液の各基質に対する還元酵素活性は、還元型ベンジルビオロゲンの 546 nm における吸光度の経時変化を測定し(Fig. 3-1)、30°Cにおいて、1 分間当たりに 1 μ mol の基質を還元する酵素量を 1 unit(U)と定義して、酵素溶液中に含まれる酵素活性の総活性値を、次式によって求めた。



$$\text{総活性値(U)} = \frac{\Delta A_{546} \times 60 \times Rv \times Ev}{\epsilon \times 1 \times Iv}$$

ここで、

$\Delta A_{546}$ : 546 nm における一秒間の吸光度の変化( $\text{sec}^{-1}$ )

Rv: 反応液量(mL)

Ev: 酵素溶液の全量(mL)

$\epsilon$  : 吸光係数;  $19.5(\text{cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1})$

1 : 光路長; 1(cm)

Iv: 添加した酵素溶液の量(mL)

である。

各酵素溶液のタンパク質定量は、DC プロテインアッセイキット(BIO-RAD)を用いて、Lowry 法(Lowry et al., 1951)に準じて行った。標準タンパク質として牛血清アルブミンを使用した。

**Table 3-1** Reaction mixture of enzyme assay.

Ingredients	Concentration (mM)
Selenate/Arsenate/Nitrate	2.0
Benzyl viologen	0.40
Sodium dithionite	0.23
Dithiothreitol (DTT)	0.10
Tris-HCl buffer (pH 7.4)	50

#### 4. 分析及び菌体数の計測

第2章に準じた。

### 第3節 実験結果及び考察

#### 1. ヒ酸塩還元能の誘導性に関する検討

SF-1 株の有するヒ酸塩還元酵素の誘導特性を検討するため、ヒ酸塩、セレン酸塩、硝酸塩、及び酸素(好気条件下)を電子受容体として培養した resting cell(Arsenate-, Selenate-, Nitrate-, 及び Oxygen-grown cell )のヒ酸塩還元能を調べた。その結果、ヒ酸塩の還元は Arsenate-grown cell でのみ確認された(Table 3-2)。このことから、SF-1 株の有するヒ酸塩還元酵素が構成性のものではなく誘導性のものであることが示唆された。さらに、 Arsenate-grown cell は、ヒ酸塩還元能を有するものの、セレン酸塩、及び硝酸塩還元能を示さなかったことから(Table 3-3)、SF-1 株によるヒ酸塩還元には、ヒ酸塩に特異的に活性を示す還元酵素が関わっていることが示唆された。一方、タンパク質合成を阻害することで知られるクロラムフェニコールの共存下においても、ヒ酸塩還元は阻害を受けることなく進行した(Table 3-4)。従って、実験系内におけるヒ酸塩還元は、前培養において誘導された還元酵素によるものであると考えられた。また、ヒ酸塩還元が、好気呼吸の主たる末端酸化酵素であるシトクロム c オキシダーゼの阻害剤として知られるアジ化物(NaN<sub>3</sub>)により阻害を受けなかったことから(Table 3-4)、SF-1 株によるヒ酸塩還元が酸素を電子受容体とした好気呼吸系とは異なる酵素により行われていることが示唆された。

以上の結果を総合すると、SF-1 株によるヒ酸塩還元には、ヒ酸塩存在下のみで誘導を受け、かつヒ酸塩に特異的に活性を示すヒ酸塩還元酵素が関わっているものと考えられた。現在分離されている DARB のなかで、酵素の精製が試みられたグラム陰性菌の *Chrysogenes arsenatis* は、ペリプラズムに水溶性のヒ酸還元酵素を有することが確認されており(Krafft and Macy 1998)、一方で、グラム陽性菌である *Bacillus selenitireducens* は膜結合型のヒ酸塩還元酵素を有することが示されている(Afkar et al., 2003: 第1章参照)。また、これらの両ヒ酸塩還元酵素は誘導性のものであることが明らかとなっている。第2章で示されたように、 SF-1 株によるヒ酸塩還元が嫌気呼吸によるものであることを考えると、SF-1 株も同様に、細胞表層に誘導性のヒ酸塩還元酵素を有している可能性が高いといえる。一般に、グラム陽性菌はグラム陰性菌と細胞表層の構造が異なり外膜を持たないため、ペリプラズム等に存在する水溶性の細胞外酵素は容易に菌体外へ分泌されることが知られている。そのため、グラム陽性菌である SF-1 株が前培養において細胞表層に水溶性の酵素を生産した場合、そのほとんどが菌体の洗浄過程で取り除かれている可能性が高い。ヒ酸塩を電子受容体として培養した菌体がヒ酸塩還元能を示し、さらに、系内のヒ酸塩還元が前培養において誘導された還元酵素によるものであったことを考慮に入れると、SF-1 株の有するヒ酸塩還元酵素は、菌体外分泌酵素というよりは *B. selenitireducens* と同様に、主として不溶性の細胞膜結合型酵素であるものと推測された。

**Table 3-2** Arsenate-reducing activity in arsenate-, selenate-, nitrate-, and oxygen-grown resting cell suspensions of strain SF-1 with lactate as a electron donor<sup>a</sup>.

Resting cell	Reduced arsenate (%) <sup>b</sup> after		Cell density <sup>c</sup> (× 10 <sup>7</sup> cells/mL)
	4 h	8 h	
Arsenate-grown	62.4	98.2	3.3
Selenate-grown	0	8.1	3.0
Nitrate-grown	0	0	1.6
Oxygen-grown	5.2	0	2.8

<sup>a</sup> Initial lactate concentration was 5 mM, arsenate concentration was 1 mM.<sup>b</sup> Results were expressed as the percentage of reduced arsenate after 4 h or 8 h incubation. Initial percentage before incubation was considered as 0%.<sup>c</sup> Cell density indicates cell number per ml of the suspension. Cell growth was not observed during incubation.**Table 3-3** Arsenate-, selenate-, and nitrate-reducing activity in arsenate-grown resting cell suspensions of strain SF-1 with lactate as a electron donor<sup>a</sup>.

Electron acceptors	Reduced arsenate (%) <sup>b</sup> after		Cell density <sup>c</sup> (× 10 <sup>7</sup> cells/mL)
	4 h	8 h	
Arsenate	62.4	98.2	3.3
Selenate	0.5	0.4	1.3
Nitrate	3.2	0.9	1.3

<sup>a</sup> Initial lactate concentration was 5 mM, arsenate concentration was 1 mM.<sup>b</sup> Results were expressed as the percentage of reduced arsenate after 4 h or 8 h incubation. Initial percentage before incubation was considered as 0%.<sup>c</sup> Cell density indicates cell number per ml of the suspension. Cell growth was not observed during incubation.

**Table 3-4** Arsenate-reducing activity in arsenate-grown resting cell suspensions of strain SF-1 in the presence of inhibitors with lactate as a electron donor<sup>a</sup>.

Electron acceptors	Reduced arsenate (%) <sup>b</sup> after		Cell density <sup>c</sup> (× 10 <sup>7</sup> cells/mL)
	4 h	8 h	
No addition	94.7	100	7.22
Sodium azide	93.9	99.7	7.22
Chloramphenicol	96.2	99.8	7.22

<sup>a</sup> Initial lactate concentration was 5 mM, arsenate concentration was 1 mM.

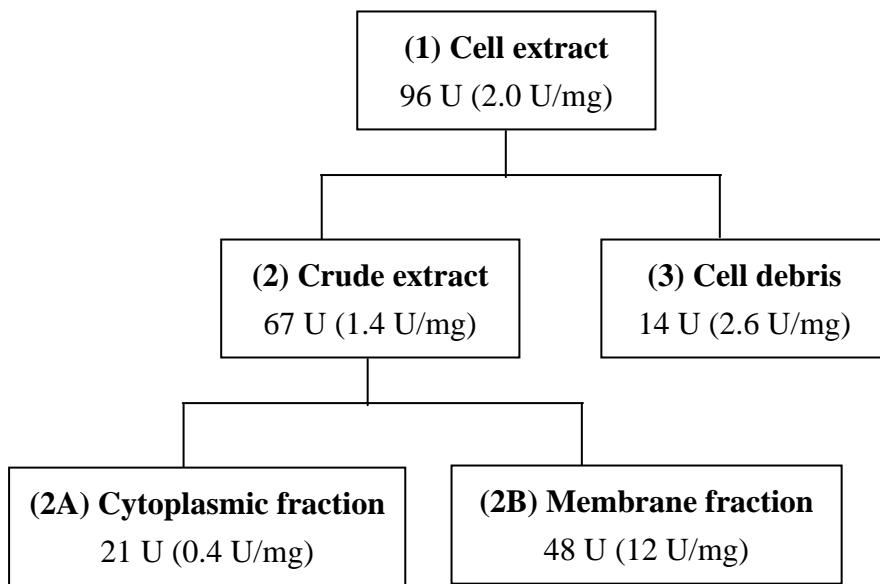
<sup>b</sup> Results were expressed as the percentage of reduced arsenate after 4 h or 8 h incubation. Initial percentage before incubation was considered as 0%.

<sup>c</sup> Cell density indicates cell number per ml of the suspension. Cell growth was not observed during incubation.

## 2. ヒ酸塩還元酵素の局在化の同定

上記で推定された SF-1 株の有するヒ酸塩還元酵素の局在化を同定するために、ヒ酸塩を電子受容体として培養した細胞破碎液を遠心分離することにより分画し、それぞれの画分のヒ酸塩に対する還元酵素活性を調べた(Fig. 3-2)。

その結果、細胞膜画分(2B: 48U)の総活性値(Total activity)が細胞破碎液(1: 96U)に対して 50%と高い値を示した。また、総活性値を画分中のタンパク質量で除して求めた比活性値(Specific activity)も細胞膜画分(2B: 12U/mg-protein)が他の画分に比べて最も高い値を示したことから、SF-1 株のヒ酸塩還元酵素は細胞膜に存在することが示された。このことから、SF-1 株の有するヒ酸塩還元酵素は、*B. selenitireducens* の異化型ヒ酸塩還元酵素と同様に、細胞膜に結合している膜結合型の酵素であることが確認された。



**Fig. 3-2** Localization of the arsenate reductase in strain SF-1. The data represents total activity (specific activity) of each fraction with arsenate. The enzyme activity was measured as benzyl viologen (artificial electron donor) oxidized per min.

### 3. ヒ酸塩、セレン酸塩及び硝酸塩還元酵素の関連性の検討

SF-1 株の有するヒ酸塩、セレン酸塩、及び硝酸塩を還元する酵素群の関連性を検討するため、Arsenate-、Selenate-、Nitrate-、及び Oxygen-grown cell について各々セレン酸塩、及び硝酸塩還元能を調べた。

その結果、セレン酸塩の還元は、Selenate-grown cell でのみ確認された(Table 3-5)。このことから、SF-1 株によるセレン酸塩還元には、ヒ酸塩還元の場合と同様に、セレン酸塩存在下でのみ誘導を受ける誘導性のセレン酸塩還元酵素が関わっていることが示唆された。これに対して、硝酸塩の還元は、Nitrate-grown cell のみでなく、Selenate-及び Oxygen-grown cell においても確認された(Table 3-6)。しかし、両 resting cell にタンパク質合成を阻害することで知られるクロラムフェニコールを加えて同様の実験を行ったところ硝酸塩還元が阻害を受けたことから、硝酸還元酵素も誘導性のものであることが示唆された。また、セレン酸塩及び硝酸塩の両方に対して還元能を示した Selenate-grown cell を、セレン酸塩と硝酸塩を含む系に加え実験を行ったところ、セレン酸塩と硝酸塩の還元は同時に進行し、明確な拮抗的阻害は認められなかった(Fig.3-3)。加えて、同様の系にクロラムフェニコールを添加したところ、セレン酸塩の還元はほとんど影響を受けなかったのに対し、硝酸塩の還元は明確な阻害を受けた(Fig.3-3)。このことから、SF-1 株のセレン酸塩と硝酸塩の還元は異なる還元酵素により行われていることが示唆された。一方、Arsenate-grown cell は硝酸塩還元能を有さないという結果が得られ(Table 3-6)、これにより、ヒ酸塩還元酵素の誘導によって硝酸塩

還元酵素の誘導が阻害を受けることが示唆された。

以上の結果から、SF-1 株は少なくとも、ヒ酸塩、セレン酸塩、及び硝酸塩それぞれに対して、独立して誘導される別個の還元酵素を有することが示唆された。SF-1 株と同様にセレン酸塩還元菌として単離された *Sulfurospirillum barnesii* SES-3 株の resting cell を用いた還元能試験では、SF-1 株とは異なり、Selenate-grown cell あるいは Nitrate-grown cell が構成的なヒ酸塩還元能を有し、逆に Arsenate-grown cell がセレン酸塩を有することが報告されている(Laverman et al., 1995; Oremland et al., 1999: 第1章参照)。さらに、SF-1 株と同属の *Bacillus arsenicoselenatis* E1H 株においても、Selenate-grown cell が硝酸塩還元能を持たず、ヒ酸塩還元能を有するという異なった結果が報告されている(Blum et al., 1998: 第1章参照)。そのため、これらの菌株ではセレン酸塩もしくは硝酸塩還元酵素がヒ酸塩還元能を持つ可能性があるといえ、DARB の有するヒ酸塩や他の電子受容体還元酵素の特性は菌株ごとに異なっていることが示唆された。

ここで、以上の resting cell を用いた還元試験より得られた知見を酵素レベルで実証するために、粗酵素液を用いた還元活性試験を行った。実験は、ヒ酸塩、セレン酸塩、及び硝酸塩を電子受容体として培養した菌体の粗酵素液それぞれに対して、ヒ酸塩、セレン酸塩、及び硝酸塩還元酵素の活性を測定することにより行った。その結果、ヒ酸塩、セレン酸塩、及び硝酸塩を電子受容体として培養した菌体の粗酵素液全てにおいて、培養時に用いた電子受容体を基質とした際の総活性値(Total activity)が最も高かった(Table 3-7)。このことから、SF-1 株のヒ酸塩、セレン酸塩、及び硝酸塩還元は、異なる誘導性の還元酵素により触媒されていることが確認できたものといえる。従って、SF-1 株を土壤浄化バイオレメディエーションに適用する際、反応の中核を担うヒ酸塩還元酵素は汚染サイト中のヒ酸塩によって誘導されるため、ヒ酸塩還元活性を維持するためにセレン酸塩や硝酸塩を汚染サイト中に添加する必要はないと考えられた。また、これら 2 種の電子受容体に拮抗的な阻害を受けることなくヒ酸塩を還元できることが酵素レベルで実証されたことから、これらが汚染サイトに共存する場合にも、それらの除去のための前処理工程を設置する必要がないことが示唆された。

ヒ酸塩、及び硝酸塩を電子受容体として培養した菌体の粗酵素液に関しては、他の基質に対する総活性値が、それぞれヒ酸塩、硝酸塩を基質とした際の総活性値の 10 分の 1 以下と低い値を示した。このことから、SF-1 株の有するヒ酸塩、及び硝酸塩還元酵素は高い基質特異性を有していることが示唆された。これに対して、セレン酸塩を電子受容体として培養した菌体の粗酵素液では、ヒ酸塩に対する活性が、セレン酸塩に対する総活性値の 27% と比較的高い値を示したことから(Table 3-7)、セレン酸塩還元酵素の基質特異性は比較的広く、その特性が他の 2 種と異なることが示唆された。

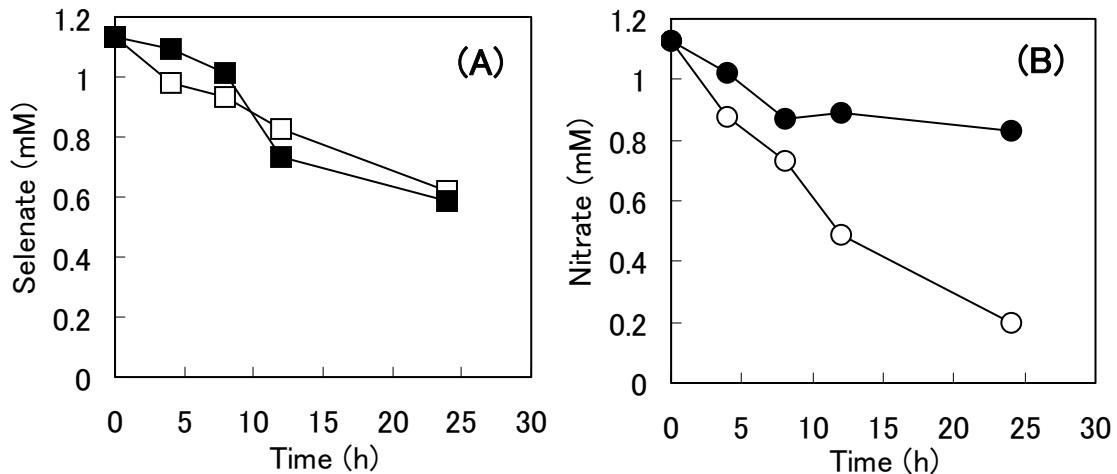
**Table 3-5** Selenate-reducing activity in arsenate-, selenate-, nitrate-, and oxygen-grown resting cell suspensions of strain SF-1 with lactate as a electron donor<sup>a</sup>.

Resting cell	Reduced selenate (%) <sup>b</sup> after		Cell density <sup>c</sup> (× 10 <sup>7</sup> cells/mL)
	4 h	8 h	
Arsenate-grown	0.5	0.4	1.3
Selenate-grown	5.1	13.7	1.5
Nitrate-grown	2.2	0	1.2
Oxygen-grown	0.5	0	2.8

<sup>a</sup> Initial lactate concentration was 5 mM, selenate concentration was 1 mM.<sup>b</sup> Results were expressed as the percentage of reduced selenate after 4 h or 8 h incubation. Initial percentage before incubation was considered as 0%.<sup>c</sup> Cell density indicates cell number per ml of the suspension. Cell growth was not observed during incubation.**Table 3-6** Nitrate-reducing activity in arsenate-, selenate-, nitrate-, and oxygen-grown resting cell suspensions of strain SF-1 with lactate as a electron donor<sup>a</sup>.

Resting cell	Reduced nitrate (%) <sup>b</sup> after		Cell density <sup>c</sup> (× 10 <sup>7</sup> cells/mL)
	4 h	8 h	
Arsenate-grown	3.2	0.9	1.3
Selenate-grown	16.6	43.6	3.7
Selenate-grown with Cm <sup>d</sup>	11.7	30.2	3.7
Nitrate-grown	35.8	49.1	3.9
Oxygen-grown	8.3	19.7	2.8
Oxygen-grown with Cm <sup>d</sup>	6.2	2.1	3.9

<sup>a</sup> Initial lactate concentration was 5 mM, nitrate concentration was 1 mM.<sup>b</sup> Results were expressed as the percentage of reduced nitrate after 4 h or 8 h incubation. Initial percentage before incubation was considered as 0%.<sup>c</sup> Cell density indicates cell number per ml of the suspension. Cell growth was not observed during incubation.<sup>d</sup> Cell suspensions were incubated with 20 mg/l chloramphenicol (Cm).



**Fig. 3-3** Effect of chloramphenicol (Cm) on the selenate (A) and nitrate (B) reduction by selenate-grown resting cell suspensions in the co-presence of both oxyanions. Cell suspensions containing 5 mM lactate, 1 mM selenate and 1 mM nitrate were incubated with 20 mg/l Cm (solid symbols) or without (open symbols). Symbols: squares, selenate concentration; circles, nitrate concentration.

**Table 3-7** Comparison of the reductase activity in the different crude cell extracts with each of terminal electron acceptors<sup>a</sup>.

Crude extracts from cells grown on:	Enzyme activity (%) <sup>b</sup> for each electron acceptors		
	Arsenate	Selenate	Nitrate
Arsenate	100 <sup>c</sup>	7	2
Selenate	27	100 <sup>d</sup>	3
Nitrate	2	1	100 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> The enzyme activity was measured as benzyl viologen (artificial electron donor) oxidized per min.

<sup>b</sup> The percent enzyme activity was calculated by giving a value of 100% to the enzyme activity of each crude cell extracts on its specific substrate. Each value represents an average of two analyses.

<sup>c</sup> The activity of arsenate-grown cell extracts with arsenate was 47.3 U.

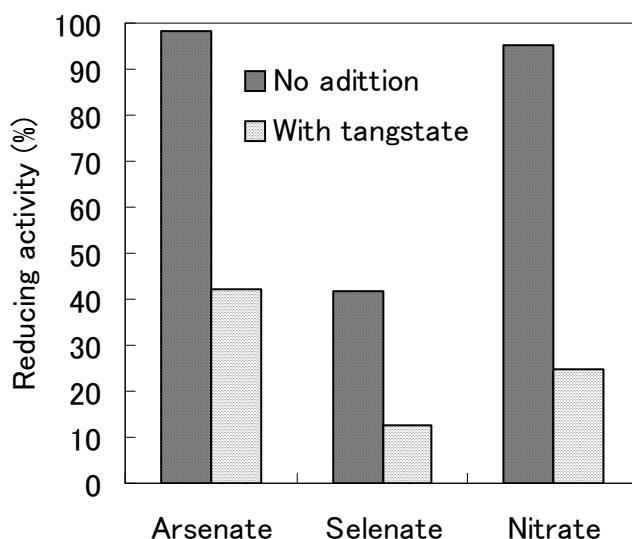
<sup>d</sup> The activity of selenate-grown cell extracts with selenate was 17.6 U.

<sup>e</sup> The activity of nitrate-grown cell extracts with nitrate was 48.4U.

#### 4. ヒ酸塩、セレン酸塩及び硝酸塩還元に及ぼすタングステン酸塩の影響

現在までに精製されている異化型ヒ酸塩、セレン酸塩及び硝酸塩還元酵素はその多くがモリブデンを補因子として活性中心に有するモリブデン酵素であることが示唆されている(van 't Riet et al., 1979; Prins et al., 1980; Chilkwem and Downey, 1982; Schroder et al., 1997; Kraft and Macy, 1998; Afkar et al., 2003)。タングステンはモリブデンと同族元素であるため、モリブデン酵素の生合成の際にタングステン酸塩が高濃度で存在すると、誤って活性中心に取りこまれ、基質に対する還元能の低下を招くことが知られている(Prins et al., 1980; Chauret and Knowles, 1991; Dowdle et al., 1996; Gates et al., 2003; Watts et al., 2003)。そこで、SF-1株を嫌気培養する際に電子受容体であるヒ酸塩、セレン酸塩、及び硝酸塩に加えてタングステン酸塩を添加して、それぞれの還元に及ぼす影響を調べた(Fig. 3-4)。図は8時間(ヒ酸塩、及びセレン酸塩)、もしくは4時間(硝酸塩)嫌気培養を行った後の培養液中のそれぞれの電子受容体の還元率で示している。

タングステン酸塩を添加していない系に比べてタングステン酸塩を添加した系では、ヒ酸塩、セレン酸塩、硝酸塩すべてにおいて還元の大幅な低下が見られた。したがって、SF-1の有するヒ酸塩、セレン酸塩、及び硝酸塩還元酵素は全てこれまでに報告されているものと同様に、モリブデンを活性中心とするモリブデン酵素であることが示唆された。



**Fig. 3-4** Effect of tungstate on the arsenate, selenate and nitrate reduction in anaerobic growth experiments. Cultures were incubated with 20 mM lactate and 1 mM arsenate, 1 mM selenate or 1 mM nitrate in the presence or absence of 1 mM tungstate. Reducing activity was expressed as the percentage of initial arsenate, selenate or nitrate reduced after 4 h (nitrate) or 8 h (arsenate, selenate) incubation.

#### 第4節 要約

本章では、SF-1 株の有するヒ酸塩還元酵素の基本的特性やセレン酸塩及び硝酸塩還元酵系との関連を解明することを目的として、resting cell 及び粗酵素液を用いた検討を行った。SF-1 株によるヒ酸塩還元には、ヒ酸塩存在下のみで誘導を受け、かつヒ酸塩に特異的に活性を示すヒ酸塩還元酵素が関わっていることが示された。また、SF-1 株の有するヒ酸塩還元酵素は *Bacillus selenitireducens* の異化型ヒ酸塩還元酵素と同様に、細胞膜に結合している不溶性の膜結合型酵素であることが明らかとなった。セレン酸塩還元及び硝酸塩還元にも同様に、それぞれの基質存在下で誘導を受ける誘導性の還元酵素が関わっていることが示され、SF-1 株は少なくとも、ヒ酸塩、セレン酸塩、硝酸塩それぞれに対して独立して誘導される別個の還元酵素を有することが示された。従って、SF-1 株を土壤浄化バイオレメディエーションに適用する際には、ヒ酸塩還元を担う酵素の誘導やセレン酸塩や硝酸塩除去のための前処理工程を設ける必要がないものと考えられた。また、SF-1 株の有するヒ酸塩及び硝酸塩還元酵素の基質特異性は狭いが、セレン酸塩還元酵素の基質特異性は比較的広く、その特性が異なることが示唆された。これらの還元酵素は、モリブデンを活性中心とするモリブデン酵素であることが示唆された。

## 第4章 *Bacillus* sp. SF-1 株を用いた固相からのヒ素可溶化

### 第1節 緒言

第2章において、*Bacillus* sp. SF-1 株は既往の DARB に比べヒ酸塩還元開始までの誘導期が短く、好気条件下でも増殖が可能であるなど、実用上優れた利点を有していることが明らかとなった。また、高濃度のヒ酸塩存在下でもその還元が可能であることなどから、特に汚染濃度の高い環境での活用が期待される。しかしながらこれらの知見はすべて、溶液中の実験で得られた結果であるため、実際の土壤汚染浄化プロセスへの適用を検討するためには、SF-1 株が固相中のヒ酸塩をも還元し得ることを実証することが必要不可欠である。また、本プロセスをヒ素汚染土壤浄化バイオレメディエーションとして実用化するためには、SF-1 株のヒ素可溶化能に影響を及ぼす諸元を把握したうえで、最適なバイオリアクターをデザインする必要がある。よって、本章では、SF-1 株をヒ素汚染土壤浄化プロセスへと導入することが可能であることを確認し、バイオリアクターを構築するために必要な知見を獲得することを目的として、ヒ素を含む種々の固相を用いて可溶化について実験的な検証を行うとともに、SF-1 株によるヒ素可溶化に影響を及ぼす各種因子：植種濃度、硝酸、酸素、攪拌速度、スラリー濃度、腐植物質等、について検討を行った。

### 第2節 実験材料及び方法

#### 1. 供試培地

本章で使用した培地の基本的組成は第2章に準じた。

#### 2. 共沈殿物を用いたヒ素の可溶化試験

50mL 容バイアルビンに分注した 2mM ヒ酸塩を含む Tris-HCl buffer(pH8)に、塩化第二鉄(FeCl<sub>3</sub>)10mM もしくは硫酸アルミニウム(Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·16H<sub>2</sub>O)5mM を加え全量を 10mL とした後、約 1 時間振盪し(120 rpm, 30°C)共沈殿作用により溶液中のヒ酸を全量固相へ移行させた。その後、2 倍濃度の乳酸無機塩培地を 10mL 加え、ブチルゴム栓及びアルミキャップで密栓して気相部を窒素置換した後、約 12 時間静置した。実験は、第2章増殖を伴う培養系と同様に用意した植種源 0.2mL を上記のバイアルビンに接種し、嫌気条件下において回転振盪培養を行った(120rpm, 30°C)。なお、バイアルビン内のヒ酸、Fe 及び Al の終濃度は、それぞれ 1mM、及び 5mM とした。サンプリング方法は第2章に準じた。

### 3. 活性アルミナを用いたヒ素可溶化試験

50mL 容のバイアルビンに活性アルミナ粉末 0.3g を加え、オートクレーブ処理を行って滅菌した。この活性アルミナ粉末に Tris-HCl buffer 溶液で pH を 8.0 に調整した 4mM のヒ酸塩を 10mL 添加し、回転振盪を 24 時間行って(120rpm, 30°C)溶液中のヒ酸塩を固相へと吸着させた。その後、2 倍濃度の滅菌乳酸無機塩培地を 10mL 加え、ブチルゴム栓及びアルミキャップで密栓し、気相部を窒素置換した。このバイアルビンに、上記と同様の植種源を 0.2mL ずつ接種し、嫌気条件下において回転振盪培養を行った(120rpm, 30°C)。サンプリング方法は第2章に準じた。

### 4. モデル汚染土壌の作成

モデル汚染土壌の作成には、大阪大学吹田キャンパス内の森林および大阪府箕面市内の水田で採取した土壌を用いた (Table 4-1)。採取した土壌は、70°Cで乾燥させた後、2mm のふるいにかけた。これらの土壌に対して、ヒ酸塩溶液を 1124mg/kg D.W.となるように添加し、室温下で往復振盪器を用いて約 12 時間 (森林土壌) もしくは 70 時間 (水田土壌) 搅拌した後 ( $340\text{min}^{-1}$ )、再び 70°Cで乾燥させ、乳鉢にて混合して粒子を均一にそろえたものをモデルヒ素汚染土壌として実験に供した。なお、作成したモデル汚染土壌中の適量を採取し、 $\text{HNO}_3\text{-HCl}$  消化法 (Marin, 2001) によりヒ素の全量抽出を数回行ったところ、99%程度の高い抽出率が認められたため、添加したヒ素は土壌中で均一に分散していることが確認された。

**Table 4-1** Characteristics of soils used preparation of model-contaminated soils.

	Forest soil	Paddy field soil
pH	5.29	5.59
Water content (%)	12.7	21.7
Ignition loss (%)	3.05	5.48

### 5. モデル汚染土壌を用いたヒ素可溶化試験

50mL 容のバイアルビンにモデル汚染土壌 1g を加え、オートクレーブ処理を行って滅菌した。その後、乳酸無機塩培地 20mL を分注し、ブチルゴム栓及びアルミキャップで密栓した後、気相部を窒素置換した。特に記載のない限り、このバイアルビンに、上記と同様の植種源を 0.2mL ずつ接種し、嫌気条件下において回転振盪培養を行った(120rpm, 30°C)。可溶化に及ぼす酸素の影響を調べる場合には、綿栓でふたをして 30°Cインキュベーターに静置した条件下においても同様の実験を行った。また、硝酸塩の影響を調べる場合は硝酸ナトリウムを、腐植物質の影響を調べる場合はフミン酸ナトリウムもしくは anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS)を所定濃度となるように添加した乳酸無機塩培地を用い、嫌気条件下において実験を行った。スラリー濃度の影響を調べる場合は、モデル汚染土壌の添加量を変化させて(1.0、2.0、4.0、もしくは 10.0g)実験を行った。

## 6. 分析

溶液中の全ヒ素及び鉄濃度は原子吸光度計(Seiko SAS 7500A, フレーム分析)を用いて測定した。ヒ酸塩の測定方法は第2章に準じた。Fe(II)、およびFe(III)の測定にはイオンクロマトグラフィー (DIONEX Corp. DX-300, Detector; UV/VIS (520nm), Column; CS5A, Guard column; CG5A, Eluent; 6mM Pyridinedicarboxylic acid (PDCA)+50mM CH<sub>3</sub>COOH+50mM CH<sub>3</sub>COONa, Post column reagent; 0.2mM PAR+0.3mM NH<sub>4</sub>(OH)+1M CH<sub>3</sub>COOH, Flow rate; 1.0mL/min. (Post column 0.7ml/min.)) を用いた。

## 第3節 実験結果及び考察

### 1. 種々の固相系を用いたヒ素可溶化の実証実験

#### ○ 共沈殿物からのヒ素の還元的可溶化

予備検討として硫酸アルミニウムおよび塩化鉄(III)とヒ酸塩の共沈殿物への亜ヒ酸塩の吸着性を調べた。即ち、第2節2.と同様に作成した共沈殿物を含む培地に、亜ヒ酸塩を0.5、1、5mMとなるようにナトリウム塩として加え、回転振盪(120rpm, 30°C)を行って液相中の亜ヒ酸塩の減少をモニタリングした。なお、本実験とは異なり、バイアルビン内のヒ酸塩の終濃度は0.5mMとした。その結果、いずれの系においてもある程度の亜ヒ酸塩の吸着が確認された(Table 4-2)。従って、系内にSF-1株を加えた場合、ヒ酸塩還元反応に伴い溶液中へ亜ヒ酸塩が溶出した場合にも、その一部が再び固相へ吸着する可能性があり、ヒ酸塩の還元率と土壤からのヒ素の抽出率は必ずしも一致しないことが示唆された。

**Table 4-2** Arsenite adsorption onto coprecipitates.

Arsenite concentration (mM)	Adsorbed arsenite after 12 h <sup>a</sup>	
	Al-arsenate	Fe(III)-arsenate
0.5	41.4	62.8
1	19.0	51.4
5	16.4	34.2

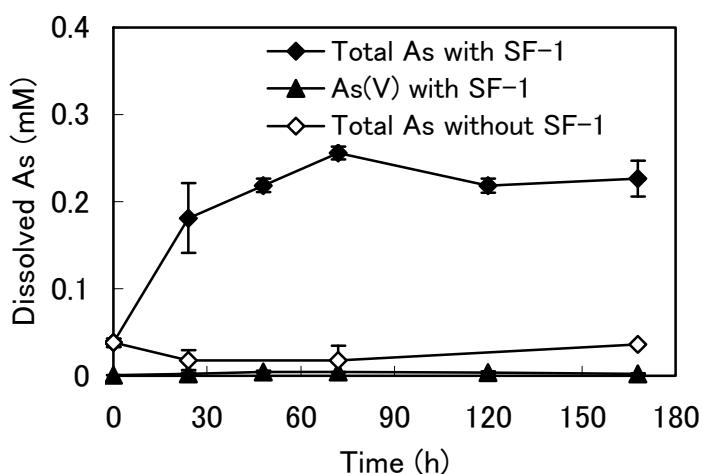
<sup>a</sup> Results were expressed as the percentage of adsorbed arsenite after 12 h incubation. Initial percentage before incubation was considered as 0%.

硫酸アルミニウムとヒ酸塩の共沈殿物を用いたヒ素溶出試験の結果をFig.4-1に示す。時間の経過に伴い、溶液中のヒ素濃度の増加が認められたが、液相中に有意なヒ酸塩の溶出は認められなかつたことから、溶出したヒ素の大半は亜ヒ酸塩の形で溶出していったものと考えられた。また、菌体を加えていないコントロール系では溶液中へのヒ素の溶出は認められなかつたことから、このヒ素の溶出は、SF-1株による固相のヒ酸塩の亜ヒ酸塩への還

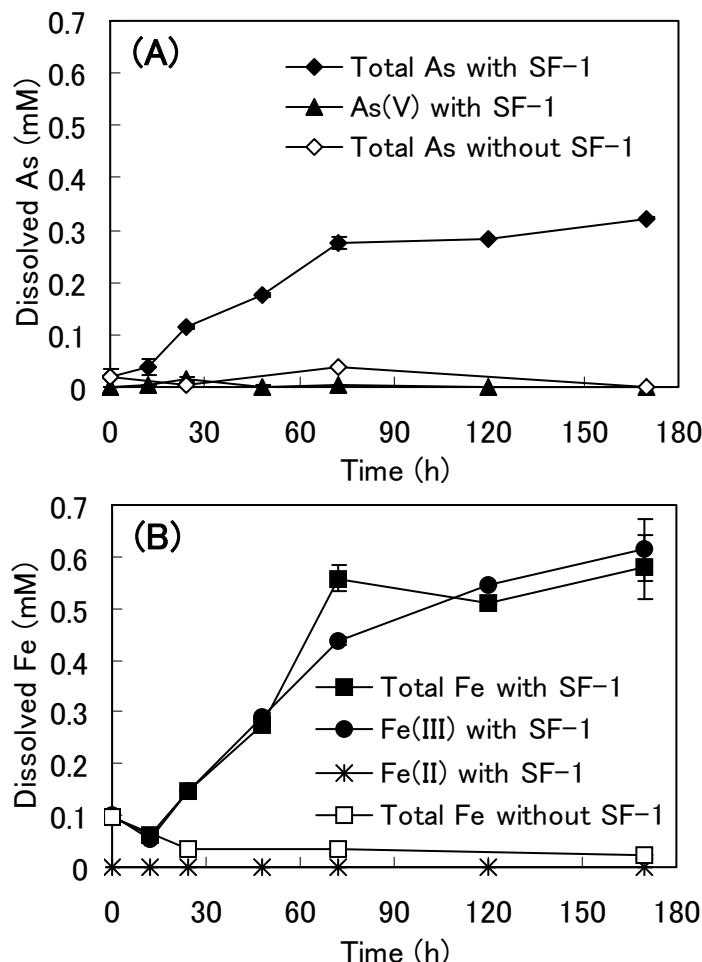
元によって発生したものであることが明らかとなった。一般に、アルミニウム塩によるヒ酸塩の共沈殿反応は、ほとんどがヒ酸塩の水酸化アルミニウムフロックへの吸着によるものであると考えられており (Gregor, 2001)、水中のヒ酸塩の除去率にはフロックの生成量が関係しているとされている(徳永, 1997)。このことから、SF-1 株はフロック状の固体物に吸着されたヒ酸塩を還元し溶出する能力を有していることが示されたものといえる。

また、塩化鉄(III)とヒ酸塩の共沈殿物を用いた系におけるヒ素溶出試験の結果を Fig.4-2 に示す。この系においてもアルミニウム塩の場合と同様、時間の経過とともに溶液中のヒ素濃度の増加が認められたが、ヒ酸塩の溶出は認められず、また、菌体を加えていないコントロール系ではヒ素の溶出が認められなかつたことから、ヒ素の溶出は SF-1 株による固相中のヒ酸塩の還元によるものであると考えられた(Fig. 4-2A)。また、亜ヒ酸塩の溶出に伴い鉄の溶出が認められたが、そのほとんどが Fe(III) であり、Fe(II) は検出されなかつた (Fig. 4-2B)。鉄(III)塩を用いたヒ酸塩の共沈殿反応には、難溶性のヒ酸鉄( $\text{FeAsO}_4$ )の沈殿生成反応と、オキシ水酸化鉄(III) ( $\text{Fe(III)}x\text{O}_y(\text{OH})_z$ ) コロイドへのヒ酸の吸着という二通りのメカニズムが考えられている(徳永修三, 1997)。以上の結果を総合的に解釈すると、SF-1 株は Fe(III) を Fe(II) へ還元する能力は有しておらず、ヒ酸鉄( $\text{FeAsO}_4$ ) 中のヒ酸塩を直接還元することで亜ヒ酸塩を溶出しているものといえる。

これらの結果から、SF-1 株は、フロック状の固体物に吸着された状態のヒ酸塩のみでなく、ヒ酸鉄のような化合物を形成しているものをも還元し、溶出する能力を有していることが明らかとなった。しかしながら、固相からのヒ素の溶出率は全体の 25~32% 程度に達した段階で平衡に達し、それ以上の溶出は進行しなかつた。この一因としては、溶出した亜ヒ酸塩の一部が再度固相へと吸着・移行した可能性が考えられる。さらに、実験開始直後に培地中のリン酸イオンが検出されなかつたことから(データ不掲載)、培地中のリン成分が固相へと移行していた可能性も示されたため、ここでの SF-1 株によるヒ酸塩還元は、必ずしも最適条件下で行われていなかつたものとも考えられた。



**Fig. 4-1** Extraction of arsenic from Al-arsenate coprecipitates. Cultures were incubated with 20 mM lactate. Symbols represent values for arsenic concentrations dissolved into solution. Data represent the averages of two separate experiments, and bars indicate ranges of values.

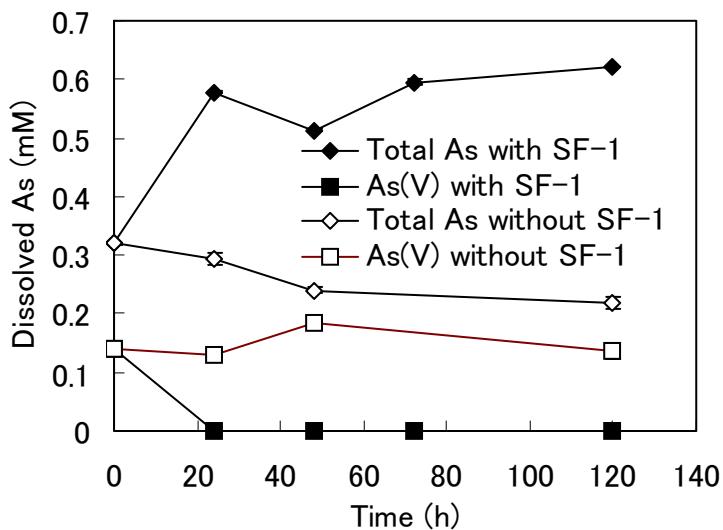


**Fig. 4-2** Extraction of arsenic (A) and dissolution of iron (B) from Fe(III)-arsenate coprecipitates. Cultures were incubated with 20 mM lactate. Symbols represent values for concentrations of arsenic (A) and iron (B) dissolved into solution. Data represent the averages of two separate experiments, and bars indicate ranges of values.

### ○ 活性アルミナからのヒ素の還元的可溶化

先に述べたように、土壤環境中におけるヒ酸塩の吸着には鉄やアルミニウム酸化物が大きく寄与していることが知られている。そこで、そのモデルとして特にヒ素への高い吸着性を持つ活性アルミナを選定し、ヒ酸塩を吸着させたものを用いてヒ素可溶化試験を行った (Fig.4-3)。

その結果、先の共沈殿物を用いた実験と同様、溶液中に経時的なヒ素の増加及びヒ酸塩の減少が認められ、また、菌体を加えていないコントロール系では、実験開始直後からヒ素濃度に顕著な変化が認められなかったことから、SF-1 株のヒ酸塩還元作用によるヒ素の可動化が生じていたといえる。この結果から、SF-1 株は共沈殿作用により生成した固形物に加え、鉱物粒子へと吸着したヒ酸塩に対しても還元能を示すことが明らかとなり、土壤環境中において様々な状態で保持されているヒ素を抽出できることが示唆された。



**Fig. 4-3** Extraction of arsenic from activated alumina. Cultures were incubated with 20 mM lactate. Symbols represent values for arsenic concentrations dissolved into solution. Data represent the averages of two separate experiments, and bars indicate ranges of values.

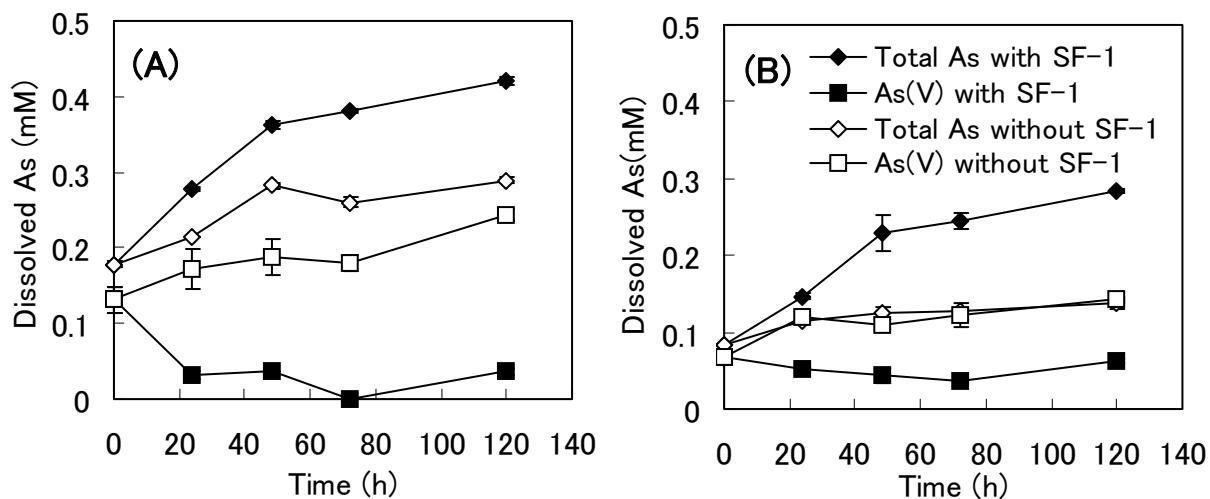
## 2. モデル汚染土壌を用いた実証試験

SF-1 株によるヒ酸塩還元・可溶化反応が実際の土壌においても適用可能であることを示すため、森林及び水田から採取した 2 種類の土壌を用いてモデルヒ素汚染土壌を作成し、ヒ素の可溶化試験を行った。結果を Fig.4-4 に示す。

森林土壌を用いて行った実験の結果、実験開始時点においてある程度のヒ素が溶液中から検出されており、一部のヒ素は十分に土壌に取り込まれていなかったことが示されたが、時間の経過に伴い明確な溶出ヒ素濃度の増加が認められ、120 時間後にはモデル汚染土壌に含まれていたヒ素の 60% 近くを溶出させることができた(Fig.4-4A)。また、溶液中のヒ酸塩濃度は実験開始直後から速やかに減少し、その後ほとんど検出されなかつたことから、SF-1 株により可溶化されたヒ素の大半が亜ヒ酸塩として溶出していることが確認された。一方で、SF-1 株を植種していないコントロール系においても緩やかなヒ素濃度の上昇が認められたが、その値は植種系に比べて低いものであった。コントロール系では同様に、溶液中のヒ酸塩濃度の増加が認められたため、このヒ素濃度の上昇は汚染土壌からの緩やかな脱着によるものであると考えられた。このことを実証するため、オートクレーブに加えて、塩化水銀(1mM)を添加することによって、より確実に滅菌を行ったコントロール試験を行った場合においても、同程度の全ヒ素及びヒ酸濃度の上昇が認められ (データ不掲載)、この推測が支持された。

また、水田土壌を用いてヒ素の可溶化試験を行った結果、森林土壌を用いた場合と同様に、コントロール系においてもヒ酸塩の脱着が認められたが、SF-1 株のヒ酸塩還元に伴うヒ素溶出促進のより顕著な効果が認められた (Fig.4-4B)。

ここで実験に用いたモデル汚染土壤は、作成直後に実験に供し、ヒ酸塩との接触期間が比較的短期であることから、長期にわたる汚染を受けた汚染土壤に対して正確に反映できるものとは言い切れないが、実環境の土壤においても SF-1 株が吸着・固定化されているヒ酸塩に対して還元能を有することが示唆されたといえる。



**Fig. 4-4** Extraction of arsenic from forest (A) and paddy field (B) soils artificially contaminated with arsenate. Cultures were incubated with 20 mM lactate. Symbols represent values of arsenic concentrations dissolved into solution. Data represent the averages of two separate experiments, and bars indicate ranges of values.

以上の結果から、SF-1 株は固相中のヒ酸塩を還元し、抽出する能力を有していることが示された。また、ヒ酸鉄のような化合物を形成しているものや吸着状態のものなどを全般的に還元することが可能であり、共沈物、活性アルミナ、及び土壤などの様々な固相系からヒ素を抽出することが可能であったことから、SF-1 株を用いたヒ素汚染土壤浄化プロセスの構築が可能であることが実証されたものといえる。

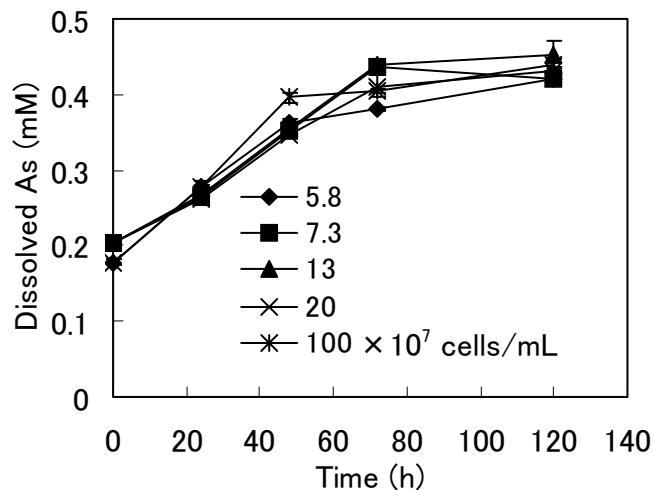
### 3. ヒ素可溶化に影響を及ぼす因子の検討

本項での可溶化試験には、特に記載のない限り森林土壤を基に作成したモデル汚染土壤を用いた。

#### ○ 植種濃度の影響

SF-1 株を用いて汚染土壤からヒ素を抽出・除去する際の植種濃度の影響を調査するため、SF-1 株の初期菌体濃度を変化させてヒ素溶出試験を行った。その結果を Fig.4-5 に示す。図示した通り、SF-1 株の初期菌体濃度の変化による顕著なヒ素溶出量の差は認められなかった。このことから、本実験の条件下では、ヒ素の還元的可溶化に及ぼす植種濃度の影響は低いことが示唆された。よって、バイオリアクター構築の際には菌体を  $5.8 \times 10^7$  cells/mL 以

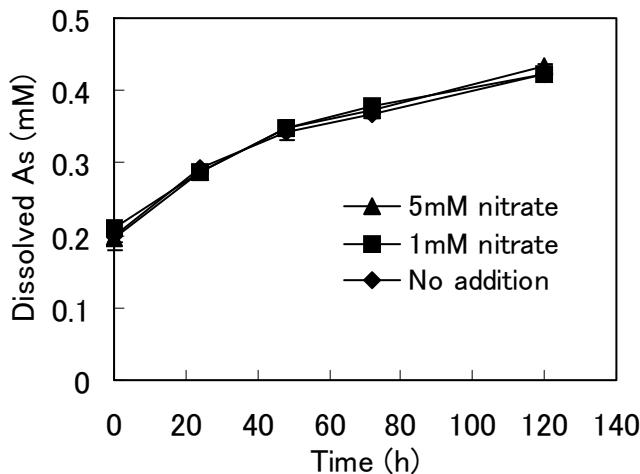
上の高濃度で接種する必要はないため、植種源の調製が比較的容易に行えるものと考えられた。



**Fig. 4-5** Effect of initial cell density on arsenic extraction. Cultures were incubated with 20 mM lactate. Symbols represent values of arsenic concentrations dissolved into solution. Data represent the averages of two separate experiments, and bars indicate ranges of values.

### ○ 硝酸塩の影響

第3章において、SF-1株を土壤浄化バイオレメディエーションに適用する際には、セレン酸塩や硝酸塩除去のための前処理工程を設置する必要がないことが示唆されたが、第2章の培養液を用いた還元試験では、硝酸塩が共存する場合にはヒ酸塩還元がわずかに阻害された。そこで、固相からのヒ素の還元的可溶化に及ぼす硝酸塩の影響を調査した。その結果、硝酸塩添加系及び非添加系において、培養液中に同程度のヒ素の溶出が認められ、その速度もほぼ同じであった (Fig.4-6)。従って、SF-1株によるヒ素の還元的可溶化には、硝酸塩の存在は影響を及ぼさないことが示され、高濃度の硝酸塩を含む可能性のある農用地等の汚染土壤に適用する際に、硝酸塩除去のための前処理等を行う必要がないことが確認されたものといえる。

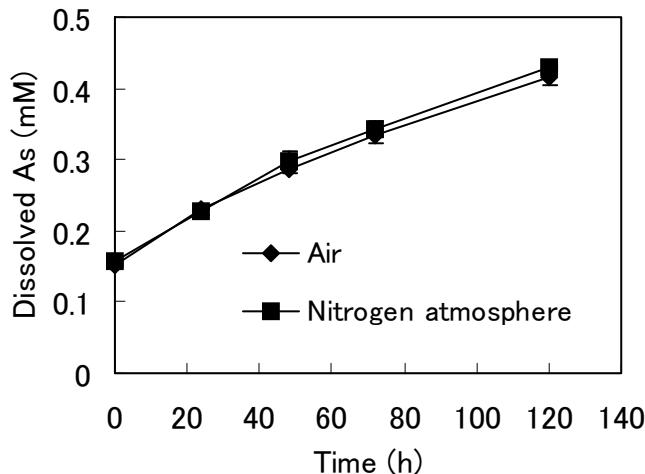


**Fig. 4-6** Effect of nitrate on arsenic extraction. Cultures were incubated with 20 mM lactate. Symbols represent values of arsenic concentrations dissolved into solution. Data represent the averages of two separate experiments, and bars indicate ranges of values.

### ○ 酸素の影響

第2章において示したように、SF-1株は通性嫌気性細菌であるため、好気条件下における回転振盪培養により旺盛に増殖することが可能であるが、嫌気条件下での反応となるヒ酸塩の還元は阻害を受けることが明らかとなっている。しかし、振盪を行わない静置培養では、気相部を窒素置換した嫌気条件下に比べると還元開始までに若干のラグが認められるものの、その後速やかな還元が確認されている。そこで、気相部を窒素置換せずに静置した微妙気条件下において可溶化試験を行い、ヒ素の可溶化に及ぼす酸素の影響を調査した。また、比較として、気相部の窒素置換を行い静置した系でも同様の実験を行った。

その結果、両実験系でのヒ素の溶出量は実験期間を通じて同程度であった (Fig.4-7)。従って、SF-1株は微妙気条件下においても、培養液の場合と同様ヒ酸塩を還元し、ヒ素を可動化し得ることが明らかとなった。このことから、SF-1株を用いたバイオレメディエーションプロセスでは、系内の酸素を完全に除去し厳密な嫌気条件を確保する必要はないことが示された。



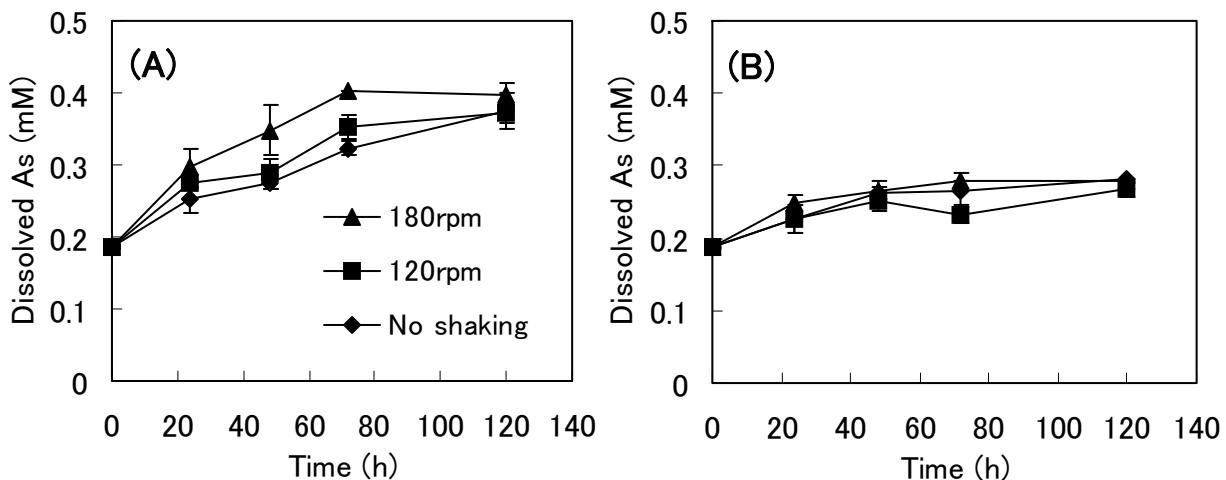
**Fig. 4-7** Effect of oxygen on arsenic extraction. Cultures were incubated with 20 mM lactate statically. Symbols represent values of arsenic concentrations dissolved into solution. Data represent the averages of two separate experiments, and bars indicate ranges of values.

### ○攪拌の影響

ヒ素溶出に影響を及ぼす因子の一つとして、土壤粒子(固相)に対する菌体の接触状態が挙げられる。そこで、実験系の振盪速度を変化させて可溶化試験を行い、ヒ素の可溶化に及ぼす攪拌の影響を調査した。

その結果、静置系に比べて回転振盪を行った系において、ヒ素の溶出量がわずかに高い値を示した(Fig.4-8A)。特に 180rpm で強度に攪拌を行った系では、実験開始から 72 時間後において、静置系とのヒ素溶出量の差が最大値を示した。また、同様の実験を、SF-1 株を接種しないコントロール系で行ったが、いずれの系においても同程度の値を示したことから(Fig.4-8B)、SF-1 株植種系におけるヒ素可溶化の促進は、土壤粒子に対する菌体の接触機会の増加によるものであると考えられた。

しかし一方で、振盪を行わなかった静置系においてもある程度ヒ素の溶出の促進が認められ、特に実験後期(120h)においては、攪拌を行わなかった静置系と回転振盪系(180rpm)のヒ素溶出率の差は 2.7% にとどまり、有意な差は認められなかった。このことから、SF-1 株によるヒ素可溶化においては、連続的な攪拌を行うことで系内を完全に混合することは必ずしも必要ではないことが示唆された。従って、SF-1 を用いたバイオリアクターでは、系内の攪拌を省略することでその動力に要するエネルギーの消費が抑えられ、処理にかかるコストの低減が可能であると考えられた。

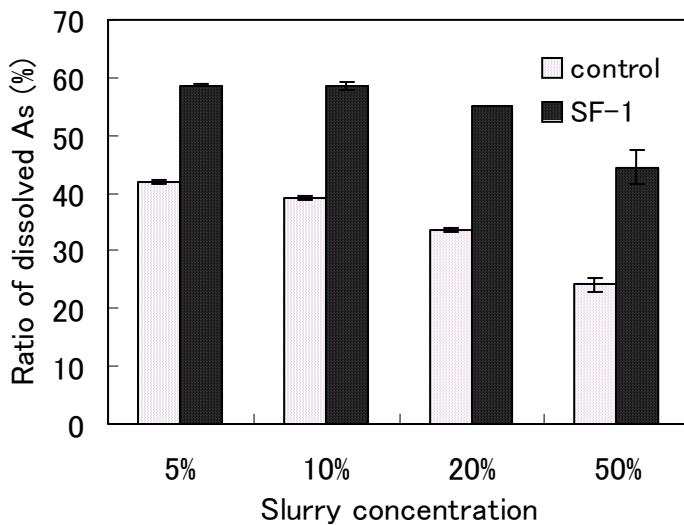


**Fig. 4-8** Effect of rotary shaking rate on arsenic extraction. Cultures were incubated with 20 mM lactate in the presence (A) or absence (B) of strain SF-1. Symbols represent values of arsenic concentrations dissolved into solution. Data represent the averages of two separate experiments, and bars indicate ranges of values.

### ○ スラリー濃度の影響

土壤浄化バイオリアクターを構築するうえで重要な因子の 1 つとして、処理系内のスラリー濃度があげられる。そこで、実験系内に添加するモデル汚染土壤の量を変化させ、スラリー濃度をそれぞれ 5、10、20、50% として、ヒ素の可溶化試験を行った。

その結果、SF-1 株を接種した系において、実験開始 120 時間後におけるヒ素の溶出率がスラリー濃度の増加とともに低くなる傾向が認められた (Fig.4-9)。系内のスラリー濃度が高くなると、土壤と溶液との混合が不完全となって菌体とヒ酸塩の接触が良好に行われなくなる可能性がある。しかしながら、コントロール系においても同様に溶出率の低下が認められ、実験開始 120 時間後における植種系とコントロール系の溶出率の差は、スラリー濃度にかかわらずほぼ同程度であった。このことから、スラリー濃度の上昇に伴うヒ素溶出率の低下は、SF-1 株によるヒ酸塩還元が抑制されたことに起因するものではなく、液相へのヒ素の蓄積によって液相と土壤間の吸着が平衡に達し、亜ヒ酸塩の溶出が抑制されたためであると考えられた。従って SF-1 株は、50% という高いスラリー濃度においても効率よくヒ酸塩を還元し、可溶化することが可能であることが明らかとなり、系内を完全な混合状態とする必要がないことが確認された。また、溶出した亜ヒ酸塩が系内に蓄積する回分式ではなく、連続流入式のリアクターを検討することで、溶出率の向上が図れることが示唆された。



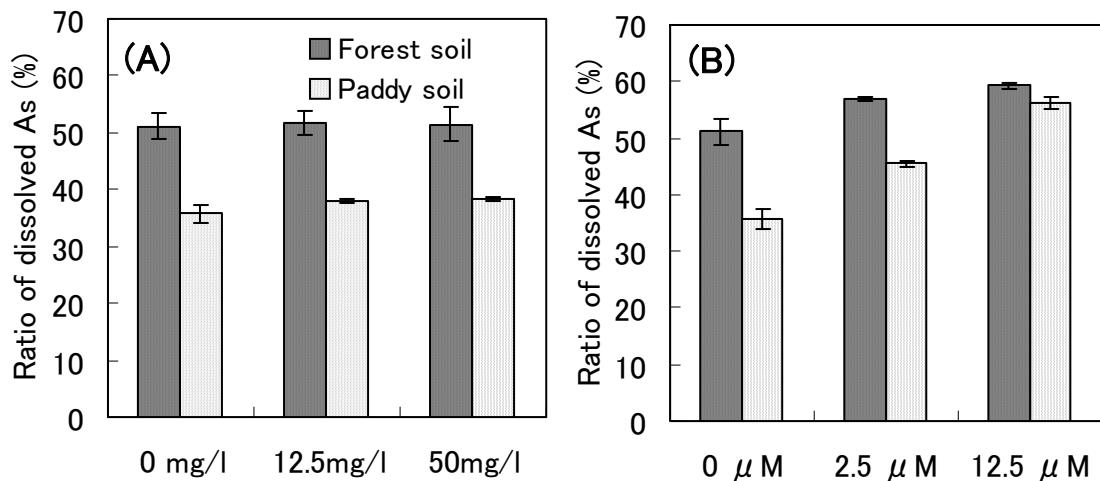
**Fig. 4-9** Effect of soil concentration on arsenic extraction. Cultures were incubated with 20 mM lactate. Columns represent values for ratio of arsenic concentration dissolved into solution after 120 h incubation. Data represent the averages of two separate experiments, and bars indicate ranges of values.

### ○ 腐植物質の影響

腐植物質は、植物残渣や微生物遺体が土壤中で微生物によって分解され、その分解産物が縮重合を受けて生成した暗色の高分子有機化合物であり、土壤有機物の主要な構成成分として知られている。極めて広い分子量の分布を示す無定形物質であり、微生物による分解を受けにくいため、環境中における微生物の代謝に直接関わりは持たない物質と考えられていたが、Lovley ら(1996)によって嫌気呼吸の電子受容体として機能し得ることが明らかとされ、さらに、Fe(III)還元細菌が不溶性の鉄(III)酸化物鉱物を還元する際のメディエーターとなることが示されているため(Nevin and Lovley, 2000)、近年では、嫌気的環境での微生物の電子授受やそれに伴う物質の挙動に大きな役割を果たすものとして注目されている。そこで、このようなメディエーターの共存が SF-1 株によるヒ素可溶化に及ぼす影響を調べるために、腐植物質の構成成分の 1 つであるフミン酸、及び腐植物質のキノン部分のモデル物質として知られる AQDS を用いて可溶化試験を行った。

その結果、フミン酸を添加した系では、その添加量に関わらず非添加系とほぼ同程度のヒ素溶出量を示したが(Fig.4-10A)、一方で、AQDS を添加した場合、添加量の増加に伴って溶出率が向上する傾向がみられた(Fig. 4-10B)。また、その傾向をより詳細に評価するために、前項において森林土壤に比べて全体的なヒ素溶出率の低かった水田土壤を用いて同様の実験を行ったところ、より顕著なヒ素溶出の促進効果が確認された(Fig. 4-10B)。SF-1 株を植種していないコントロール系では、いずれの実験系においてもヒ素溶出率の向上は確認されなかったことから(データ不掲載)、AQDS は SF-1 株によるヒ素可溶化を促進する効果を持つことが明らかとなった。従って、バイオレメディエーションプロセスを構築する

際には、AQDSのようなキノン物質を処理系に添加することによって、汚染土壤からのヒ素の抽出率を向上させることが可能であるといえる。

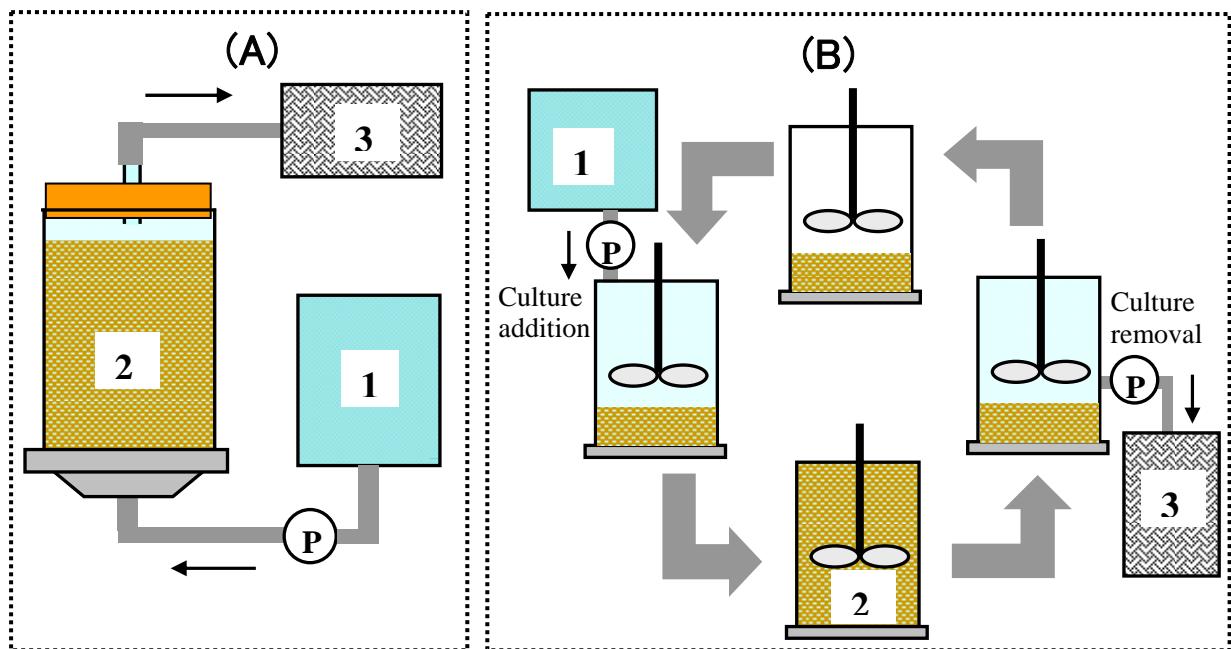


**Fig. 4-10** Effect of humic substances on arsenic extraction. Cultures were incubated with 20 mM lactate and humic acid (A) or AQDS (B). Columns represent values for ratio of arsenic concentration dissolved into solution after 120 h incubation. Data represent the averages of two separate experiments, and bars indicate ranges of values.

#### 4. SF-1株を用いたヒ素汚染浄化バイオリアクターの提案

以上の諸検討から、SF-1株を用いたヒ素汚染土壤浄化バイオリアクターを構築する際には、菌体を高濃度で植種する必要はなく、また、硝酸除去のための前処理をプロセスに加える必要がないことが示された。原位置外での土壤浄化バイオレメディエーションでは、スラリーリアクターによる処理が最適であると考えられているが、効率的な処理を行うためには、しばしば高い含水率や処理系内の混合状態の確保が求められる。しかし、SF-1株によるヒ素の可溶化では、高スラリー濃度でも効率の良い反応が可能であったことから、高い含水率を保つために大量の溶液を添加する必要がなく、比較的小規模のリアクターを構築することが可能であるといえる。また、処理系内を厳密な嫌気条件、ならびに完全な混合状態に保つ必要がないことから、攪拌装置を省略しその動力にかかるエネルギーを節減することによって、従来のスラリーリアクターに比べて低コストでの運転が可能であるといえる。従って、本プロセスに適用する最適な土壤浄化バイオリアクターとしては、Fig. 4-11(A)に示すように、汚染土壤をカラム内に充填し、培養液を通水するカラム式のリアクターが提案できる。同リアクターを採用することによって、さらに、スラリー処理において問題となる固液分離を簡略化することが可能であり、また、連続的に培養液を通水することでリアクター内での亜ヒ酸塩の溶出を促進し、抽出率の向上が図れるものと考えられる。一方、反応初期においては系内を攪拌することでヒ素抽出の促進効果が見られたこ

とから、処理速度を重視した場合には、スラリーリアクターを用いた処理が適しているが、高効率で処理を行うには処理系内への亜ヒ酸塩の蓄積による再吸着を防止する必要があるため、Fig.4-11(B)に示したように、処理期間中は適時培養液を回収・再添加を行うことが望まれる。



**Fig. 4-11** Proposed bioremediation system for arsenic contaminated soil using strain SF-1. (A), column reactor; (B), slurry reactor. 1, culture storage; 2, reductive extraction of arsenic from contaminated soil; 3, wastewater treatment; →, water flow.

#### 第4節 要約

本章では、*Bacillus* sp. SF-1 株を用いたヒ素汚染土壤浄化プロセスの構築が可能であることを確認するため、種々の固相を用いて実験的検証を行うとともに、バイオリアクター構築の際に必要となる諸因子を解明するために、SF-1 株によるヒ素可溶化に影響を及ぼすと考えられる植種濃度、硝酸、酸素、攪拌速度、スラリー濃度、腐植物質等の影響について検討を行った。塩化鉄(III)、又は硫酸アルミニウムとヒ酸の共沈殿物を用いて固相からの還元的可溶化試験を行った結果から、SF-1 株はフロック状の固形物に吸着された状態のヒ素塩のみだけでなく、ヒ酸鉄のような化合物を形成しているものをも還元する能力を有していることが示された。また、SF-1 株は、ヒ素塩に対して高い吸着性を持つ活性アルミナや、実環境から採取した土壤をもとに作成したモデル汚染土壤など、多様な固相系からヒ素を抽出できることが示され、バイオレメディエーションプロセスへの導入菌株として適して

いることが実証された。

バイオリアクターを構築する際には、菌体を  $5.8 \times 10^7$  cells/mL 以上の高濃度で植種する必要はなく、また、高濃度の硝酸を含む汚染土壌に対して硝酸除去のための前処理をプロセスに加える必要がないことが明らかとなった。SF-1 株によるヒ素可溶化においては、系内を厳密な嫌気条件、ならびに完全な混合状態に保つ必要がないことから、攪拌装置を省略しその動力にかかるエネルギーを節減できることが示された。さらに、SF-1 株は、50%という高いスラリー濃度においても効率よくヒ酸塩を還元し、可溶化することが可能であることから、高い含水率を保つために大量の溶液を添加する必要がなく、比較的小規模のリアクターを構築することが可能であることが明らかとなった。以上の結果から、本プロセスに適用する最適な土壤浄化バイオリアクターとして、汚染土壤をカラム内に充填し培養液を通水するカラム式のリアクターが提案され、AQDS のようなメディエーター添加の検討を行うことで、更なるヒ素抽出率の向上が図れるものと考えられた。

## 総括並びに結論

近年、主に先進国において都市部の再開発等が進む中、しばしば工場跡地等から高濃度のヒ素が検出され問題となっている。現在、このような汚染土壤に対しては、主に封じ込め、飛散防止、固化・不溶化、もしくは最終処分場への埋立などといった現場外処理が行われているが、これらの処理は高コストであるうえ処理後の安全性についても疑問視する声がある。そのため、低コストで汚染土壤中のヒ素を除去することのできる効率の良い汚染土壤浄化プロセスの構築が望まれている。一方、土壤環境においてヒ素は、ほとんどが無機態であるヒ酸塩、及び亜ヒ酸塩として存在するが、近年、ヒ酸塩を嫌気呼吸の最終電子受容体として還元する菌が発見され、これらの菌が固相中のヒ酸塩を亜ヒ酸塩へと還元することで水相へ溶出させることができると想定される。このように微生物作用を汚染土壤からのヒ素の除去技術へ活用する提案がなされるようになってきた。即ち、バイオプロセスは本来、安価な技術となりうる特徴をもつことから、ヒ酸塩還元細菌を利用することにより、低コストでのバイオレメディエーションプロセスを構築することが期待されている。しかしながら現状では、このような生物学的ヒ酸塩還元の汚染土壤浄化技術への応用は概念的な提案にとどまっており、実用化に向けて実験的な検討を行った例は認められておらず、実用化に向けて今後の検討が望まれている。

以上のような背景から本研究では、微生物学的ヒ酸塩還元作用を利用した新たなヒ素汚染土壤のバイオレメディエーションプロセスを構築するための基礎的知見を集積することを目的とした実験的検討を行った。我々の研究グループではすでに、当初セレン酸塩還元細菌として分離した *Bacillus* sp SF-1 株がヒ酸塩に対しても還元能を示すという予備的研究データを得ていることから、本菌株のヒ酸塩還元能を確認するとともに、合理的なバイオレメディエーションプロセスを構築するために必要な環境要因の影響等について検討した結果をふまえ、最終的に本菌株を用いた実用的な土壤汚染浄化プロセスの提案を行った。

第 1 章では、ヒ素汚染土壤の対策技術の現状及び生物学的ヒ酸塩還元に関する既往研究を概観し、以下の知見を得た。

一般に、汚染土壤においてヒ素は数百 ppm レベルで検出されることが多いが、場合によっては数千 ppm に達することもある。現在我が国での適用事例が多い封じ込め及び固化・不溶化処理は、土地利用に制限のあるわが国では汚染問題の根本的な解決にはならないことから、汚染土壤からのヒ素の除去を可能とする代替手法の開発が早急に求められているといえる。土壤洗浄法は、ヒ素除去を可能とする点では有効であるものの、比較的大量の水や薬剤を使用し、場合によっては土壤機能に損失を与える恐れがあるため、処理後の土壤の再利用やコスト面に関して疑問が残る。物理化学的処理より低コストでの実施が可能な生物学的処理に関しては、Hyperaccumulator を用いたファイトレメディエーションが注目を集めており、実汚染サイトの土壤を対象とした評価試験などが精力的に実施されて

いるが、処理に長期間を要することから、その適用範囲は低濃度での汚染などに限られる。

異化型ヒ酸塩還元細菌(DARB)によるヒ素の可動化は、土壤や底泥中のヒ酸を選択的に還元し溶出させることが可能であるため、汚染浄化への適用に充分なポテンシャルを有しているものといえる。また、ファイトレメディエーションと比べるとコストが高くなる懼れがあるものの、原位置での処理には適さない中・高程度の汚染にも対応できる可能性があることから、現状の汚染問題に対する解決策のひとつとして有望であるといえる。現在までに分離されている DARB は数 mM レベルから 30mM のヒ酸塩存在下で増殖が可能であることから、概して数百から 2250ppm 程度の濃度下でも処理が可能であり、処理系内の含水率を変化させることで更なる高濃度汚染にも対応できるものと考えられる。一方、多様な細菌属に分類され、ヒ酸塩以外にも様々な物質を電子受容体として利用することができるが、培養に特殊な環境条件を要するものが多く、土壤浄化への適用に向けては、取り扱いが容易なものを取得しその特性を明らかにしておく必要がある。

第 2 章では、当研究室保有のセレン酸塩還元細菌 *Bacillus* sp. SF-1 株のヒ酸塩還元能を確認するとともに、ヒ素汚染土壤浄化への適用という視点からそのヒ酸塩還元能を明らかにした。その結果、SF-1 株がヒ酸塩還元能を有しており、ヒ酸塩を嫌気呼吸の電子受容体として還元する DARB であることが確認された。また、ヒ酸塩濃度 50mM という高濃度下でも還元能を示し、既往の DARB に比べヒ酸塩還元開始までの誘導期が短いうえ、ヒ酸塩を電子受容体とした際の増殖速度が速いことから、バイオレメディエーションプロセスへ導入する菌株として有望な菌株であることが示された。

SF-1 株のヒ酸塩還元特性をさらに詳細に調べ、実用する際の特徴を評価することを目的として、還元に影響を及ぼす諸因子の検討を行った結果、好気条件下においてヒ酸塩還元が阻害を受けることから、SF-1 株によるヒ酸塩還元が嫌気呼吸によるものであることが裏付けられる一方、微好気条件下でもヒ酸塩還元が可能であることが示された。また、多様な有機酸や糖類をヒ酸塩還元の電子供与体として利用することが可能であり、合成下水を用いた系においても速やかなヒ酸塩還元を行うことが明らかとなった。従って、実際の汚染土壤に適用する際には、比較的容易に炭素源を確保することが可能であり、厳密な嫌気条件下を保つ必要が無いものといえる。また、SF-1 株によるヒ酸塩還元はセレン酸塩の存在には影響を受けず、一方、硝酸塩の共存下では若干の阻害を受けるものの、概して速やかな還元が可能であることが明らかとなった。また、ヒ酸塩還元速度はヒ酸塩濃度の上昇に伴い増加するが、20mM 以上の高濃度域では低下することが明らかとなった。さらに、pH7.2～9.4 の範囲でヒ酸塩還元が可能であり、中性付近や高アルカリ域でも菌体濃度を高く保つことで、効率の良いヒ酸塩還元が可能であることが示唆された。

第 3 章では、SF-1 株の有するヒ酸塩還元酵素の基本的特性やセレン酸塩及び硝酸塩還元酵素との関連を解明することを目的として、resting cell 及び粗酵素液を用いた検討を行った。SF-1 株によるヒ酸塩還元には、ヒ酸塩存在下のみで誘導を受け、かつヒ酸塩に特異的に活

性を示すヒ酸塩還元酵素が関わっていることが示された。また、SF-1 株の有するヒ酸塩還元酵素は *Bacillus selenitireducens* の異化型ヒ酸塩還元酵素と同様に、細胞膜に結合している不溶性の膜結合型酵素であることが明らかとなった。セレン酸塩還元及び硝酸塩還元にも同様に、それぞれの基質存在下で誘導を受ける誘導性の還元酵素が関わっていることが示され、SF-1 株は少なくとも、ヒ酸塩、セレン酸塩、硝酸塩それぞれに対して独立して誘導される別個の還元酵素を有することが示された。従って、SF-1 株を土壤浄化バイオレメディエーションに適用する際には、ヒ酸塩還元を担う酵素の誘導やセレン酸塩や硝酸塩除去のための前処理工程を設ける必要がないものと考えられた。また、SF-1 株の有するヒ酸塩及び硝酸塩還元酵素の基質特異性は狭いが、セレン酸塩還元酵素の基質特異性は比較的広く、その特性が異なることが示唆された。これらの還元酵素は、モリブデンを活性中心とするモリブデン酵素であることが示唆された。

第 4 章では、*Bacillus* sp. SF-1 株を用いたヒ素汚染土壤浄化プロセスの構築が可能であることを確認するため、種々の固相を用いてヒ素の抽出が可能であることを実験的に検証するととともに、バイオリアクターの設計や運転制御を合理的に行うために必要な各種環境因子の影響を調べた。ここでは特に、植種濃度、硝酸、酸素、攪拌速度、スラリー濃度、腐植物質等をとりあげている。まず、塩化鉄(III)、又は硫酸アルミニウムとヒ酸の共沈殿物を用いて固相からのヒ素の還元的可溶化試験を行った結果から、SF-1 株はフロック状の固形物に吸着された状態のヒ酸塩のみだけでなく、ヒ酸鉄のような化合物を形成しているものをも還元する能力を有していることが示された。また、SF-1 株は、ヒ酸塩に対して高い吸着性を持つ活性アルミナや、実環境から採取した土壤をもとに作成したモデル汚染土壤など、多様な固相系からヒ素を抽出できることが示され、バイオレメディエーションプロセスへの導入菌株として適していることが実証された。

バイオリアクターを構築する際には、菌体を  $5.8 \times 10^7$  cells/mL 以上の高濃度で植種する必要はなく、また、高濃度の硝酸を含む汚染土壤に対して硝酸除去のための前処理をプロセスに加える必要がないことが明らかとなった。SF-1 株によるヒ素可溶化においては、系内を厳密な嫌気条件、ならびに完全な混合状態に保つ必要がないことから、攪拌装置を省略しその動力にかかるエネルギーを節減できることが示された。さらに、SF-1 株は、50% という高いスラリー濃度においても効率よくヒ酸塩を還元し、可溶化することができるることから、高い含水率を保つために大量の溶液を添加する必要がなく、比較的小規模のリアクターを構築することが可能であることが明らかとなった。以上の結果から、本プロセスに適用する最適な土壤浄化バイオリアクターとして、汚染土壤をカラム内に充填し培養液を通水するカラム式のリアクターを提案し、また、AQDS のようなメディエーター添加の検討を行うことで、更なるヒ素抽出率の向上が図れるものと考えられた。

以上、本研究の結果から、異化型ヒ酸塩還元細菌 *Bacillus* sp. SF-1 株を活用することで、微生物学的ヒ酸塩還元作用を利用したヒ素汚染土壤浄化バイオレメディエーションプロセ

## 総括並びに結論

スを設計することは十分可能であると結論することができた。また、SF-1 株の実用上優れた諸特性をふまえて、本論文において提案したバイオリアクターシステムは、現状のヒ素汚染土壤対策技術の課題点の多くを解決することの出来る新たな浄化技術となり得るものと考えられる。本プロセスの実用化に向けた課題点としては、ここで提案したバイオリアクターをラボスケールやパイロットスケールにおいて実証研究を行うとともに、そのデザインや運転モードの最適化を図ることがあげられる。また、性状の異なる種々の実汚染土壤への適用性を検討しておくことも重要である。さらに、バイオリアクターでの処理に伴い亜ヒ酸塩を含む廃液が発生することから、廃液中の亜ヒ酸塩を除去する技術の開発が求められる。ここで、ヒ素は汚染物質である反面、半導体産業の原材料等として工業生産でも幅広く利用されている貴重な資源でもあることから、亜ヒ酸塩を資源として回収し得る技術を確立することが理想であるといえ、土壤浄化達成後のヒ素の管理・資源化を考慮に入れた総合的なヒ素汚染土壤浄化プロセスを設計することが期待される。

## 参考文献

- Afkar, E., Lisak, J., Saltikov, C., Basu, P., Oremland, R. S., and Stoltz, J. F.:** The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10. *FEMS Microbiol. Lett.*, 226, 107-112 (2003).
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR; an agency of U. S. Department of Health and Human Services):** 2003 CERCLA priority list of hazardous substances. <http://www.atsdr.cdc.gov/clist.html> (2003).
- Ahmann, D., Roberts, A. L., Krumholz, L. R., and Morel, F. M. M.:** Microbe grows by reducing arsenic. *Nature*, 371, 750 (1994).
- Ahmann D., Krumholz, L. R., Hemond, H. F., Lovley, D. R., and Morel, F. M. M.:** Microbial mobilization of arsenic from sediments of the Aberjona watershed. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 2923-2930 (1997).
- Akhter, H., Cartledge, F. K., Roy, A., and Tittlebaum, M. E.:** Solidification/stabilization of arsenic salts: effects of long cure times. *J. Hazard. Mater.*, 52, 247-264 (1997).
- Alam, M. G. M., Tokunaga, S., Maekawa, T.:** Extraction of arsenic in a synthetic arsenic-contaminated soil using phosphate. *Chemosphere*, 43, 1035-1041 (2001).
- Bagla, P. and Kaiser, J.:** India's spreading health crisis draws global arsenic experts. *Science*, 274, 174-175 (1996).
- Belluck, D. A., Benjamin, S. L., Baveye, P., Sampson, J., and Johnson, B.:** Widespread arsenic contamination of soils in residential areas and public space: an emerging regulatory or medical crisis? *Int. J. Toxicol.*, 22, 109-128 (2003).
- Blum, J. S., Bindi, A. B., Buzzelli, J., Stoltz, J. F., and Oremland, R. S.:** *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Arch. Microbiol.*, 171, 19-30 (1998).
- Bhumbra, D. K. and Keefer, R. F.:** Arsenic mobilization and bioavailability in soils, p. 51-82. In Nriagu, J. O. (ed.), Arsenic in the environment, partI: cycling and characterization. Willy-Interscience, New York (1994).
- Bissen, M. and Frimmet, H. F.:** Speciation of As(III), As(V), MMA and DMA in contaminated soil extracts by HPLC-ICP/MS. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 367, 51-55 (2000).
- Bouchard, B., Beaudet, R., Villemur, R., McSween, G., Lépine, F., and Bisailon, J.-G.:** Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 1010-1015 (1996).
- Cervantes, C., Ji, G., Ramírez, J. L., and Silver, S.:** Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.*, 15, 355-367 (1994).

- Chauret, C. and Knowles, R.:** Effect of tungstate on nitrate and nitrite reductases in *Azospirillum brasiliense* Sp7. *Can. J. Microbiol.*, 37, 744-750 (1991).
- Chikwem, J. O. and Downey, R. J.:** Purification and characterization of the respiratory nitrate reductase of *Bacillus stearothermophilus*. *Anal. Biochem.*, 126, 74-80 (1982).
- Christiansen, N. and Ahring, B. K.:** *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 442-448 (1996).
- Cullen, R. W. and Reimer, K. J.:** Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.*, 89, 713-764 (1989).
- Dowdle, P. R., Laverman, A. M., and Oremland, R. S.:** Bacterial dissimilatory reduction of arsenic(V) to arsenic(III) in anoxic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1664-1669 (1996).
- Dutrè, V., Kestens, C., Schaep, J., and Vandecasteele, C.:** Study of the remediation of a site contaminated with arsenic. *Sci. Total Environ.*, 220, 185-194 (1998).
- Edvantoro, B. B., Naidu, R., Megharaj, M., Merrington, G., and Singleton, I.:** Microbial formation of volatile arsenic in cattle dip site soils contaminated with arsenic and DDT. *Appl. Soil Ecol.*, 25, 207-217 (2004).
- Fitz, J. W. and Wenzel, W. W.:** Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *J. Biotech.*, 99, 259-278 (2002).
- Francesconi, K., Visoottiviseth, P., Sridokchan, W., and Goessler, W.:** Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. *Sci. Total Environ.*, 284, 27-35 (2002).
- Frost, L. R., Weier, M. L., Martens, W., Kloprogge, J. T., and Ding, Z.:** Thermal decomposition of the vivianite arsenates-implications for soil remediation. *Thermochimica Acta*, 403, 237-249 (2003).
- Fujita, M., Ike, M., Nishimoto, S., Takahashi, K., and Kashiwa, M.:** Isolation and characterization of a novel selenate-reducing bacterium, *Bacillus* sp. SF-1. *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 517-522 (1997).
- Garcia-Manyes, S., Jiménez, G., Padró, A., Rubio, R., and Rauret, G.:** Arsenic speciation in contaminated soils. *Talanta*, 58, 97-109 (2002).
- Gates, A. J., Hughes, R. O., Sharp, S. R., Millington, P. D., Nilavongse, A., Cole, J. A., Leach, E.-R., Jepson, B., Richardson, D. J., and Butler, C. S.:** Properties of the periplasmic nitrate reductases from *Paracoccus pantotrophus* and *Escherichia coli* after growth in tungsten-supplemented media. *FEMS Microbiol. Lett.*, 220, 261-269 (2003).
- Gregor, J.:** Arsenic removal during conventional aluminum-based drinking-water treatment. *Wat. Res.*, 35, 1659-1664 (2001).
- Gihring, T. M. and Banfield, J. F.:** Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. *FEMS Microbiol. Lett.*, 204, 335-340 (2001).
- Herbel, M. J., Blum, J. S., Hoeft, S. E., Cohen, S. M., Arnold, L. L., Lisak, J., Stolz, J. F., and**

- Oremland, R. S.**: Dissimilatory arsenate reductase activity and arsenate-respiring bacteria in bovine rumen fluid, hamster feces, and the termite hindgut. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 41, 59-67 (2002).
- Hiroki M.**: Effect of arsenic pollution on soil microbial population. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 39, 227-235 (1993).
- Hoeft, S. E., Kulp, T. R., Stoltz, J. F., Hollibaugh, J. T., and Oremland, R. S.**: Dissimilatory arsenate reduction with sulfide as electron donor: experiments with Mono lake water and isolation of strain MLMS-1, a chemoautotrophic arsenate respirer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2741-2747 (2004).
- Huang, Y.-C.**: Arsenic distribution in soils, p. 17-49. In Nriagu, J. O (ed.), Arsenic in the environment, partI: cycling and characterization. Willy-Interscience, New York (1994).
- Huber, R., Sacher, M., Vollmann, A., Huber, H., and Rose, D.**: Respiration of arsenate and selenate by hyperthermophilic archaea. *System. Appl. Microbiol.*, 23, 305-314 (2000).
- Jones, A. C., Langner, H. W., Anderson, K., Mcdermott, T. R., and Inskeep, W. P.**: Rates of microbially mediated arsenate reduction and solubilization. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64, 600-608 (2000).
- Kaback, H. R.**: Bacterial membranes, p. 99-120. In William, B. J. (ed.), Method in enzymology: enzyme purification and related techniques. New York (1971).
- Karim, MD. M.**: Arsenic in groundwater and health problems in Bangladesh. *Wat. Res.*, 34, 304-310 (2000).
- Kashiwa, M., Nishimoto, S., Takahashi, K., Ike, M., and Fujita, M.**: Factors affecting soluble selenium removal by a selenate-reducing bacterium *Bacillus sp. SF-1*. *J. Biosci. Bioeng.*, 89, 528-533 (2000).
- Kraft, T. and Macy, J. M.**: Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *Eur. J. Biochem.*, 255, 647-653 (1998).
- Langner, H. W. and Inskeep, W. P.**: Microbial reduction of arsenate in the presence of ferrihydrite. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 3131-3136 (2000).
- Laverman, A. M., Blum, J. S., Schaefer, J. K., Phillips, E. J. P., Lovley, D. R., and Oremland, R. S.**: Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3556-3561 (1995).
- Liu, A.**, Garcia-Dominguez, E., Rhine, E. D., and Young, L. Y.; A novel arsenate respiring isolate that can utilize aromatic substrates. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 48, 323-332 (2004).
- Lombi, E., Zhao, F.-J., Fuhrmann, M., Ma, L. Q., and McGrath, P. S.**: Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytol.*, 156, 195-203 (2002).
- Lovley, D. R. and Coates, J. D.**: Bioremediation of metal contamination. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 285-289 (1997).
- Lovley, D. R., Coates, J. D., Blunt-Harris, E. L., Phillips, E. J. P., and Woodward, J. C.**: Humic

- substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 382, 445-448 (1996).
- Ma, L. Q., Komar, K. M. M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., and Kennelley, E. D.:** A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature*, 409, 579 (2001).
- Macur, R. E., Wheeler, J. T., Mcdermott, T. R., and Inskeep, W. P.:** Microbial populations associated with the reduction and enhanced mobilization of arsenic in mine tailings. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 3676-3682 (2001).
- Macy, J. M., Nunan, K., Hagen, K. D., Dixon, D. R., Harbour, P. J., Cahill, M., and Sly, L. I.:** *Chrysogenes arsenatis* gen. nov., sp. nov., a new arsenate-respiring bacterium isolated from gold mine wastewater. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 1153-1157 (1996).
- Macy, J. M., Santini, J. M., Pauling, B. V., O'Neill, A. H., and Sly, L. I.:** Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria: mechanisms of arsenate reduction. *Arch. Microbiol.*, 173, 49-57 (2000).
- Marín, A., López-Gonzálevs, A., and Barbas, C.:** Development and validation of extraction methods for determination of zinc and arsenic speciation in soils using focused ultrasound: application to heavy metal study in mud and soils. *Anal. Chim. Acta*, 442, 305-318 (2001).
- Mok, M. W. and Wai, C. M.:** Mobilization of arsenic in contaminated river waters, p. 99-117. In Nriagu, J. O. (ed.), Arsenic in the environment PartI: cycling and characterization. Willy-Interscience, New York (1994).
- Morton, W. E. and Dunnette, D. A.:** Health effects of environmental arsenic, p. 17-34. In Nriagu, J. O. (ed.), Arsenic in the environment PartII: human health and ecosystem effects. Willy-Interscience, New York (1994).
- Mukhopadhyay, R. and Rosen, B. P.:** Arsenate reductases in prokaryotes and Eukaryotes. *Environ. Health Perspect.*, 110, 745-748 (2002).
- Mulligan, C. N., Yong, R. N., and Gibbs, B. F.:** Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineer. Geol.*, 60, 193-207 (2001).
- Nevin, K. P. and Lovley, D. R.:** Potential for nonenzymatic reduction of Fe(III) via electron shuttling in subsurface sediments. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 2472-2478 (2000).
- Newman, D. K., Kennedy, E. K., Coates, J. D., Ahmann, D., Ellis, D. J., Lovley, D. R., and Morel, F. M. M.:** Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, 168, 380-388 (1997a).
- Newman, D. K., Bveridge, T. J., and Morel, F. M. M.:** Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2022-2028 (1997b).
- Newman, D. K., Ahmann, D., and Morel, F. M. M.:** A brief review of microbial arsenate respiration. *Geomicrobiol. J.*, 15, 255-268 (1998).
- Nie, L., Shah, S., Rashid, A., Burd, G. I., Dixon, D. G., and Glick, B. R.:** Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 355-361 (2002).

- Nielsen, F. H.**: Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel, and arsenic: current knowledge and speculation. *FASEB J.*, 5, 2661-2667 (1991).
- Niggemyer, A., Spring, S., Stackebrandt, E., and Rosenzweig, R. F.**: Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: implication for arsenic mobilization and the genus *Desulfotobacterium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5568-5580 (2001).
- Nriagu, J. O. and Pacyna, J. M.**: Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace element. *Nature*, 333, 134-139 (1988).
- Nriagu, J. O.**: Global metal pollution. *Environment*, 32, 7-11, 28-33 (1990).
- Oremland R. S., Blum, J. S., Culbertson, C. W., Visscher, P. T., Miller, L. G., Dowdle, P., and Strohmeier, F. E.**: Isolation, growth, and metabolism of an obligately anaerobic, selenate-respiring bacterium, strain SES-3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3011-3019 (1994).
- Oremland, R. S., Blum, J. S., Bindi, A. B., Dowdle, P. R., Herbel, M., and Stolz, J. F.**: Simultaneous reduction of nitrate and selenate by cell suspensions of selenium-respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4385-4392 (1999).
- Oremland, R. S. and Stolz, J. F.**: The ecology of arsenic. *Science*, 300, 939-944 (2003).
- Papassiopi, N., Vaxevanidou, K., and Pspaliaris, I.**: Investigation the use of iron reducing bacteria for the removal of arsenic from contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.*, 3, 81-90 (2003).
- Prins, R. A., Cline-Theil, W., Malestein, A., and Counotte, G. H. M.**: Inhibition of nitrate reduction in some rumen bacteria by tungstate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 163-165 (1980).
- Saltikov, C. W., Cifuentes, A., Venkateswaran, K., and Newman, D. K.**: The *ars* detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella* species strain ANA-3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2800-2809 (2003).
- Saltikov, C. W. and Newman, D. K.**: Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 10983-10988 (2003).
- Santini, J. M., Stolz, J. F., and Macy, J. M.**: Isolation of a new arsenate-respiring bacterium-physiological and phylogenetic studies. *Geomicrobiol. J.*, 19, 41-52 (2002).
- Schroder, I., Rech, S., Kraft, T., and Macy, J. M.**: Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis*. *J. Biol. Chem.*, 272, 23765-23768 (1997).
- Silver, S.**: Genes for all metals-a bacterial view of the periodic table. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 1-12 (1998).
- Smith, E., Naidu, R., and Alston, A. M.**: Arsenic in the soil environment: a review. *Adv. Agron.*, 64, 149-195 (1998).
- Stackebrandt, E., Schumann, P., Schüler, E., and Hippe, H.**: Reclassification of *Desulfotomaculum auripigmentum* as *Desulfosporosinus auripigmenti* corrug., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1439-1443 (2003).
- Stolz, J. F. and Oremland, R. S.**: Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiol. Rev.*, 23, 615-627 (1999).

- Stoltz, J. F., Gugliuzza, T., Blum, J. S., Oremland, R., and Murillo, F. M.:** Differential cytochrome content and reductase activity in *Geospirillum barnesii* strain SeS3. *Arch. Microbiol.*, 167, 1-5 (1997).
- Stoltz, J. F., Ellis, D. J., Blum, J. S., Ahmann, D., Lovley, D. R., and Oremland, R. S.:** *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov. and *Sulfurospirillum arsenophilum* sp. nov., new members of the *Sulfurospirillum* clade of the  $\varepsilon$  proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 1177-1180 (1999).
- Stoltz, J. F., Basu, P., and Oremland, R. S.:** Microbial transformation of elements: the case of arsenic selenium. *Int. Microbiol.*, 5, 201-207 (2002).
- Takai, K., Kobayashi, H., Nealson, K. H., and Horikoshi, K.:** *Deferrribacter desulfuricans* sp. nov., a novel sulfer-, nitrate- and arsenate-reducing thermophile isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 839-846 (2003).
- Tokunaga, S. and Hakuta, T.:** Acid washing and stabilization of an artificial arsenic contaminated soil. *Chemosphere*, 46, 31-38 (2002).
- Tu C., Ma, L. Q., Zhang, W., Cai, Y., and Harris, W. G.:** Arsenic species and leachability in the fronds of the hyperaccumulator Chinese brake (*Pteris vittata* L.). *Environ. Pollut.*, 124, 223-230 (2003).
- Van 't Riet, J., Wientjes, F. B., van Doorn, J., and Planta, R. J.:** Purification and characterization of the respiratory nitrate reductase of *Bacillus licheniformis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 576, 347-360 (1979).
- Virkutyte, J., Sillanpää, M., and Latostenmaa.:** Electrokinetic soil remediation-critical overview. *Sci. Total Environ.*, 289, 97-121 (2002).
- Visoottiviseth P., Francesconi, K., and Sridokchan, W.:** The potential of Thai indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic contaminated land. *Environ. Pollut.*, 118, 453-461 (2002).
- Watts, C. A., Ridley, H., Condie, K. L., Leaver, J. T., Richardson, D. J., Butler, C. S.:** 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 Microbiol. Lett.*, 228, 273-279 (2003).
- Wenzel, W. W., Kirchbaumer, N., Prohaska, T., Stingereder, G., Lombi, E., and Adriano, D. C.:** Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Anal. Chim. Acta*, 436, 309-323 (2001)
- Xu, C., Zhou, T., Kuroda, M., and Rosen, B. P.:** Metalloid resistance mechanisms in prokaryotes. *J. Biochem.*, 123, 16-23 (1998).
- Zhang, W., Cai, Y., Tu, C., and Ma, L. Q.:** Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. *Sci. Total. Environ.*, 300, 167-177 (2002).
- Zobrist, J., Dowdle, P. R., Davis, J. A., and Oremland R. S.:** Mobilization of arenite by dissimilatory reduction of adsorbed arsenate. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 4747-4753 (2000).

## 参考文献

- 阿南功一, 紺野邦夫, 田村善蔵, 松橋通生, 松本重一郎 編: 基礎生化学実験法 6: 生化学測定, 丸善, 271-285 (1976)
- アンダーソン C. ウィリアム 編: バイオレメディエーション-微生物による環境修復技術の実際-, シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社 49 (1997)
- 安藤正典, 眞柄泰基: インド・西ベンガル州に起きた世界最悪のヒ素汚染—ヒ素の健康影響と西ベンガル州における地下水汚染—. 資源環境対策, 33 (2), 113-122 (1997).
- 石黒三郎, 田辺誠: 高純度ヒ素, リン. 工業レアメタル, 115, 28-30 (1999).
- 大山将, 小山孝: ヒ素汚染土壤の特性と洗浄処理及び安定化処理に関する検討. 第 12 回廃棄物学会研究発表会講演論文集, 1082-1084 (2001)
- 貝瀬利一: 水環境中の重金属の存在形態と動態—特に水銀とヒ素を中心として—. 水環境学会誌, 22 (5), 336-340 (1999).
- 貝瀬利一: 自然界におけるヒ素の循環. 資源環境対策, 37 (7), 666-671 (2001).
- 柏雅美: 微生物による水溶性セレンの還元とその廃水処理への応用に関する研究. 大阪大学大学院工学研究科環境工学専攻 博士論文 (2000)
- 環境省環境管理局水環境部: 平成 13 年度土壤汚染調査・対策事例及び対応状況に関する調査結果の概要 (2003).
- 久永明, 石西伸 訳: 環境汚染物質の生体への影響 16 ヒ素 東京化学同人 (1985).
- 木暮敬二: 地盤環境の汚染と浄化修復システム. 技報堂出版, 108-114, 129-150 (2000)
- 地盤環境技術研究会 編: 土壤汚染対策技術. 日科技連出版社, 126-157, 280-305 (2003)
- 徳永修三: 水中からのヒ素除去技術, 水環境学会誌, 20, (1997).
- 前田滋: ヒ素・アンチモン化合物の環境影響, 別冊化学工業; 化学物質とダイオキシン対策, 42 (2), 68-71 (1999).
- 森澤眞輔: 地下水・土壤汚染の生物利用浄化修復技術の現状と課題. 環境技術, 29, 361-366 (2000).
- 山崎素直: 重金属の生化学. 茅野光男, 斎藤寛 編 重金属と生物 博友社, 246-251 (1988).
- 横田漠, 濱部和宏, 田辺公子: バングラデシュにおける地下水ヒ素汚染とその浄化. 用水と廃水, 45 (10), 980-985 (2003).

## 謝辞

本研究の遂行と本論文の作成にあたり、終始御懇篤なる御指導と御助言を賜りました大阪大学大学院 工学研究科 教授 藤田正憲博士に、心より感謝の意を表します。

本論文の査読並びに御校閲を賜り、その完成に多くの貴重な御助言を賜りました大阪大学大学院 工学研究科 教授 加賀昭和博士、同 助教授 山下光雄博士、並びに本研究全般にわたり丁寧な御指導と貴重な御助言を賜り、本論文の査読並びに御校閲を賜りました同 助教授 池道彦博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究に関して、終始御指導並びに御援助を賜りました富山県立大学短期大学部 助教授 立田真文博士、大阪大学大学院 工学研究科 助手 清和成博士、同 技官 山岡ゆり子氏、同事務補佐官 多胡知子氏に深謝致します。

また、御尽力並びに有益な御助言を頂きました大阪大学大学院 工学研究科 助手 惣田訓博士、独立行政法人 海洋研究開発機構 柏雅美博士に謹んで御礼を申し上げます。

共同研究者として御尽力頂きました(株)日東電工 寺師左知子氏、大阪大学大学院 工学研究科 山本哲史氏、(株)クボタ 久下浩生氏に深く感謝致しますとともに、本研究に直接間接のご協力を頂きました本研究室の諸兄諸氏に厚く御礼を申し上げます。

最後に、研究生活に理解を示し、また終始多大なる支援を賜りました両親、そして妻 真弓に心より感謝致します。

## 補遺 *Bacillus* sp. SF-1 株の系統学的特性

### 第1節 諸言

本論において *Bacillus* sp. SF-1 株は DARB として優れたヒ酸塩還元能を有しており、ヒ素汚染土壤浄化バイオレメディエーションプロセスへの導入に適した菌株であることを示したが、実際の汚染サイトに導入するためには、その浄化に関する能力のみならず、病原性の有無など菌株自身の特性を明確に把握し、環境への影響等を把握しておく必要がある。そのためには、系統学的分類によって微生物を種レベルで把握しておくことが重要であるが、SF-1 株については、生理・生化学試験の結果から *Bacillus* 属とされるにとどまっている (Fujita et al., 1997; 柏, 2000)。近年では遺伝子を用いた解析技術の進歩から、系統学的解析に際しては多くの場合、従来の表現型質に基づく分類に加えて分子生物学的手法が取り入れられており、その必要性及び有効性が広く認知されているため、SF-1 株の系統学的分類の評価にもこれらの知見を考慮に入れる必要がある。またこのような SF-1 株の系統学的解析は、ヒ素の生物地球化学的循環に関わる特徴的な微生物群として、近年着目を集めている DARB の知見を獲得するという学術的観点からも重要であるといえる。そこで本章では、SF-1 株の系統学的位置付けを把握することを目的として、分子生物学的手法を用いた系統学的分類において最も一般的に行われる 16S rRNA 遺伝子に基づいた系統学的分類・解析を行った。

### 第2節 16S rRNA 遺伝子に基づく SF-1 株の系統学的分類

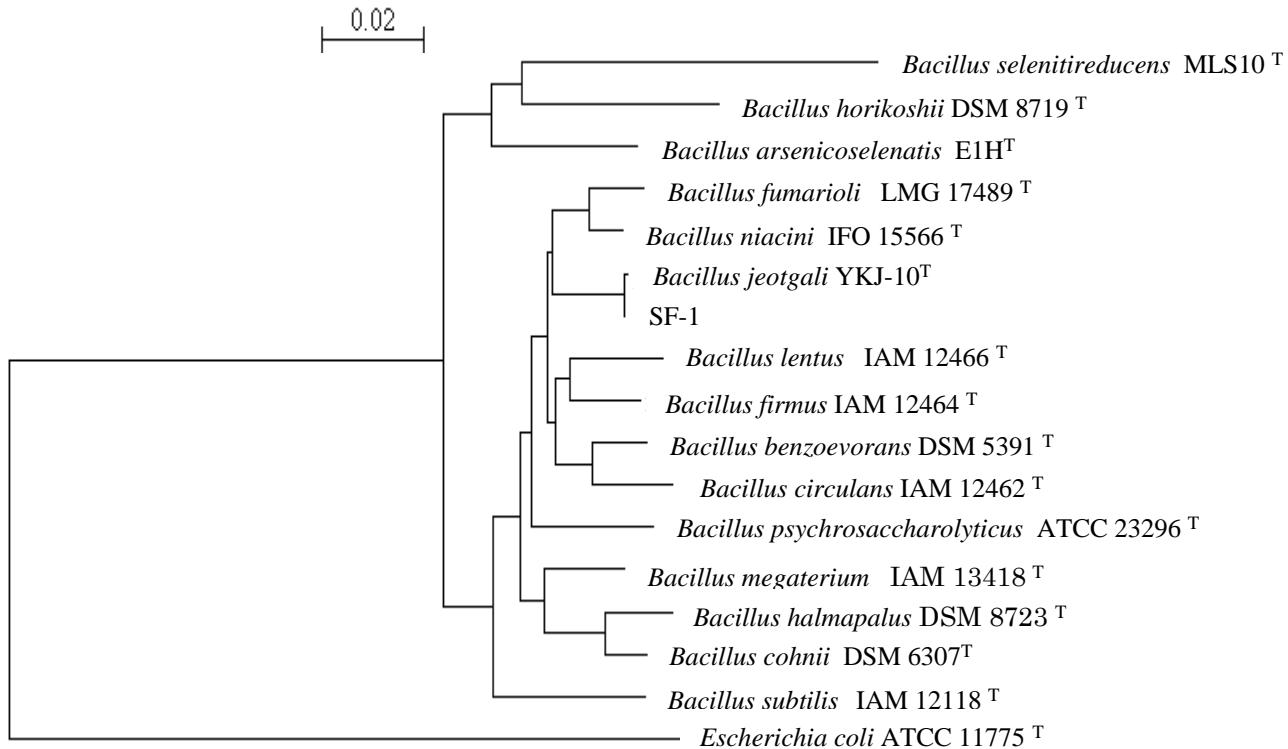
Kashiwa ら(2001)により決定された SF-1 株の 16S rDNA 塩基配列(Fig.5-1)を BLAST によるホモジジサーチに供し、高い相同意を示した細菌種及び SF-1 株の塩基配列を基に、CLASTAL X を用いて系統樹を作成した。その結果、SF-1 株は、生理・生化学的同定試験と同様、*Bacillus* 属に分類されることが確認された(Fig.5-2)。これまで分離された DARB には 16S rDNA の解析から同様に *Bacillus* 属に分類されるものが数種報告されているが、これらの菌株はすべて一般的に *Bacillus* 属の生理的特性として認識されている好気条件下での増殖能を有さず(第1章 Table 1-1 参照)、中には運動性や内生胞子形成能を持たないものもいる(第1章 第3節参照)。そのため、通性嫌気性細菌である SF-1 株は、DARB の中で唯一の典型的な *Bacillus* 属の特性を有する菌株であるといえる。また、SF-1 株は *Bacillus jeotgali* の近縁に位置付けられ(Fig.5-2)、基準株である YKJ-10 株との塩基配列の相同意が 99.6% と極めて高い値を示した。16S rRNA 遺伝子は既知種との相同意が 97% 以下であれば別種であるとみなす提案がなされていることから(Stackebrandt and Goebel, 1994)、SF-1 株は同細菌種に属する可能性が高いものといえる。*B. jeotgali* は、韓国の発酵海産食品である Jeotgal から分

離されたため病原性等は有さず(Yoon et al., 2001)、SF-1 株も同様に生物体や環境に悪影響を及ぼす可能性は極めて低いといえる。従って、SF-1 株は使用に際しての安全面からも、バイオレメディーションプロセスへの導入に適した菌株であると考えられる。ただし、16S rRNA 遺伝子の塩基配列は同じ属内の菌種の系統関係を知る目的で使用できるものの、種レベルでの同定情報としては解析度が低いため、SF-1 株の種を明確に決定するには、全染色体レベルでの DNA の相同性を巨視的に比較する DNA-DNA ハイブリダイゼーションなど、さらなる検討が必要である。

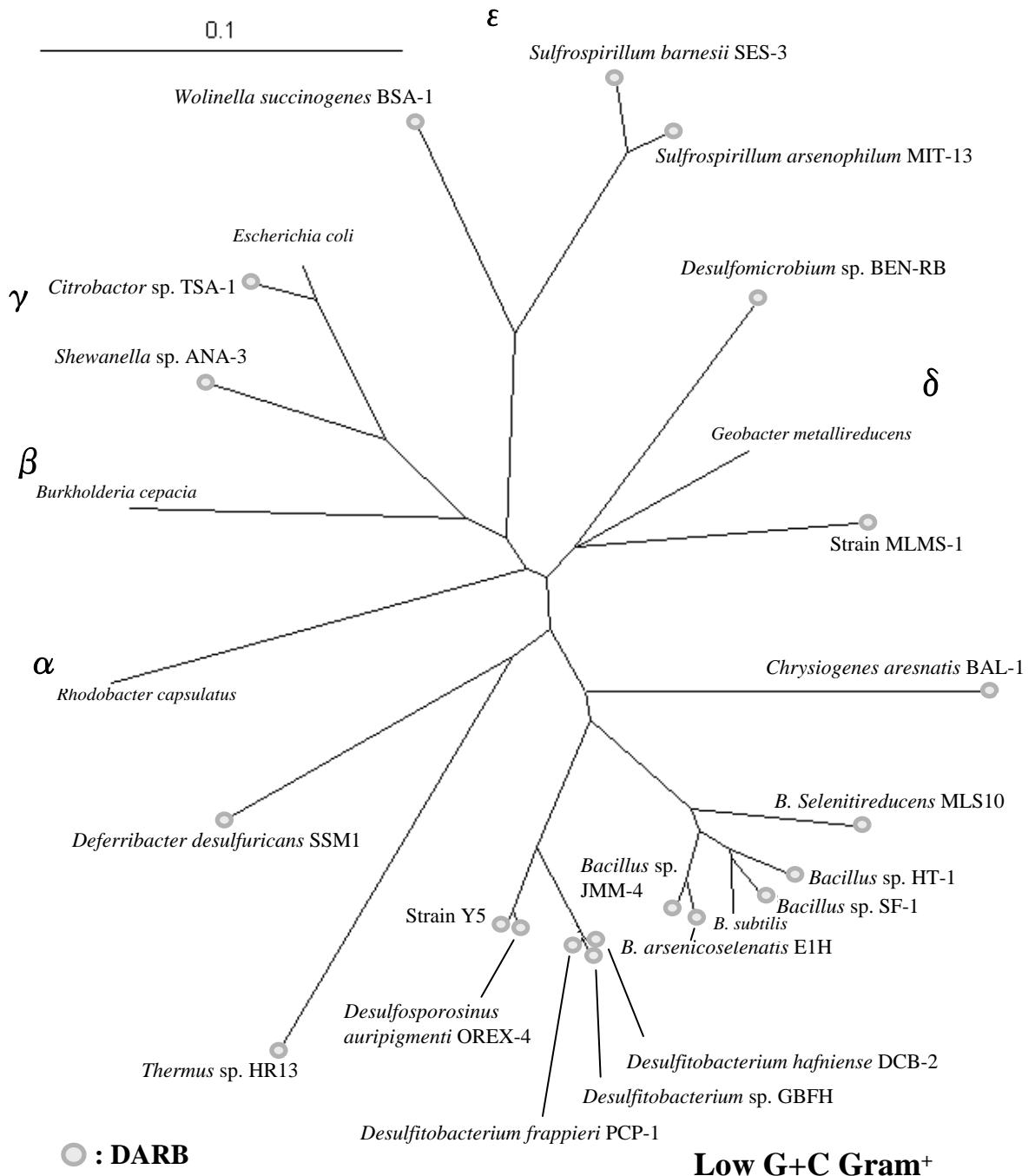
ここで、SF-1 株を含め現在までに分離されている DARB の 16S rRNA 遺伝子を基にして系統樹を作成し、Fig.5-3 に示した。この図から、DARB は原核生物のある特定のグループに限られているわけではなく、細菌領域全体に分布していることがわかる。先にも述べたように、これらの細菌は新種のものも多く、生理学的特性も多岐にわたることが知られている。SF-1 株はこれらの細菌群の中においても、*Bacillus* 属のクラスターに位置付けられるものの、種レベルで近縁のものではなく、他の菌株とは明確に異なる分類学的位置にあることがわかる。

AGCTCAGACGAACGCTCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGATCTCATTAGCTTGC  
TTTGAAAGATCAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGAT  
AACTTCGGAAACCGGAGCTAACCGATAATCCTTCCCTCACATGAGGGAAAGCTGAAA  
GACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG  
CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA  
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGAAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA  
CGGAGCAACGCCCGTGAACGATGAAGGCTTCGGTCGAAAGTTCTGTTGTCAAGGAAGA  
ACAAGTACCGGAGTAACGCGGTACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTA  
CGTGCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGGAATTATTGGCGTAAAG  
CGCGCGAGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCGGGGAGGGTCATT  
GGAAACTGGGAACTTGAGTGAGAAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATG  
CGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTGGTCTGTAACGTGAG  
GCGCAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA  
GTGCTAAGTGTAGAGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCT  
GGGAGTACGGCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGG  
AGCATGTGGTTAACCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGTCTGACATCCTCTGACAAC  
CCTAGAGATAGGGCGTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAG  
CTCGTGTGAGATGTTGGGTTAACGAGTGTGACTGCCGGTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAAAGGGTC  
CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGAACAAAGGGTC  
GCGAAGCCGCGAGGTCGAGCCAATCCCATAAATCCATTCTCAGTCGGATTGCAGGCTGCAAC  
TCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCC  
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGT  
AACCTTATGGAGCCGAGCCGCCTCA

**Fig. 5-1** Nucleotide sequence of nearly full-length 16S rDNA of strain SF-1.



**Fig. 5-2** Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of strain SF-1. The scale bar represents 0.02 substitutions per nucleotide position.



**Fig. 5-3** Phylogenetic diversity of representative dissimilatory arsenate-reducing bacteria (DARB). DARB are indicated by circles. The scale bar represents 0.1 substitutions per nucleotide position.

### 第3節 要約

*Bacillus* sp. SF-1 株の系統学的特性を把握し、バイオレメディエーションプロセスに導入する際の安全性を評価することを目的として、16S rRNA 遺伝子に基づく SF-1 株の系統学的分類を試みた。SF-1 株は生理・生化学同定試験と同様、16S rRNA 遺伝子に基づく系統学的解析においても *Bacillus* 属に分類されることが確認された。また、韓国の発酵海産食品から分離された *Bacillus jeotgali* との 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性が 99.6% と高い値を示したことから、SF-1 株は同細菌種に属する可能性が高いことが示された。従って、同菌株はバイオプロセスでの使用に際して、安全な菌株であると考えられた。SF-1 株を含めこれまでに分離されている DARB の系統樹を作成し、その系統学的分布を調べた結果、DARB は、特定の属種に限らず多様な細菌属に分布し、SF-1 株はこれらの細菌群の中でも *Bacillus* 属のクラスターに分類されるものの、種レベルで近縁のものではなく、他の菌株とは明確に分類された。

### 参考文献

- Fujita, M., Ike, M., Nishimoto, S., Takahashi, K., and Kashiwa, M.: Isolation and characterization of a novel selenate-reducing bacterium, *Bacillus* sp. SF-1. *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 517-522 (1997).
- Kashiwa, M., Ike, M., Mihala, H., Esaki, N., and Fujita, M.: Removal of soluble selenium by a selenate-reducing bacterium *Bacillus* sp. SF-1. *Biofactors*, 14, 261-265 (2001).
- Stachebrandt, E. and Gobel, B. M.: Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 846-849 (1994).
- Yoon, J.-H., Kang, S.-S., Lee, K.-C., Kho, Y. H., Choi, S. H., Kang, K. H., and Park, Y.-H.: *Bacillus jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal. Korean traditional fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 1087-1092 (2001).

柏雅美: 微生物による水溶性セレンの還元とその廃水処理への応用に関する研究. 大阪大学大学院工学研究科環境工学専攻 博士論文 (2000)

## 本論文に関する報文

### 投稿論文

- 1) Yamamura, S., Ike, M., and Fujita, M.: Dissimilatory arsenate reduction by a facultative anaerobe, *Bacillus* sp. strain SF-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 454-460 (2003).
- 2) Yamamura, S., Terashi, S., Ike, M., Yamashita, M., and Fujita, M.: Characterization of arsenate-, selenate- and nitrate-reducing activities in *Bacillus* sp. SF-1. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, 40, (2004) (印刷中).
- 3) Yamamura, S., Yamamoto, N., Ike, M., and Fujita, M.: Arsenic extraction from solid phase using a dissimilatory arsenate-reducing bacterium. *Chemosphere* (審査中).
- 4) Yamamura, S., Yamamoto, N., Ike, M., and Fujita, M.: Enhancement of microbial arsenic dissolution by electron shuttling. (投稿準備中).
- 5) Yamamura, S., Yamamoto, N., Ike, M., and Fujita, M.: Bioremediation of arsenic-contaminated soil using slurry and column reactors. (投稿準備中).

### 国際会議録

- 1) Yamamura, S., Ike, M., and Fujita, M.: Arsenate, selenate and nitrate reducing activities in *Bacillus* sp. strain SF-1. 16th International Symposium on Environmental Biogeochemistry: Abstracts (II), (2003).
- 2) Yamamura, S., Yamamoto, N., Sei, K., Ike, M., and Fujita, M.: Arsenic extraction from contaminated soil using microbial arsenate reduction as a novel bioremedial technique. Chemical Industries 2005 –Waste and Wastewater Management- (審査中).