

ヒ素除去に有用な微生物の探索

宮武 宗利¹⁾・林 幸男²⁾**Screening and characterization of useful microorganisms
to arsenic removal**

Munetoshi MIYATAKE, Sachio HAYASHI

Abstract

Microorganisms were isolated from soil and their arsenic removal abilities were evaluated. Seven out of the 100 isolated strains showed more than 20% arsenic removal. Time courses of arsenic removal and cell growth were investigated in three of these isolated strains. Although the growth rates were different, the dependence of arsenic removal on cell growth was similar in three strains (A-84, 88, 89). Strain A-89 showed highest arsenic removal rate of 63% after first day. Strain A-88 was best in terms of the amount of arsenic absorbed per one gram of dry cell, at 0.46 mg/g·cell after first day, although it showed the worst cell growth among the three strains. Strain A-89 was further examined to study the influence of arsenic concentration on arsenic removal and growth. The arsenic removal with 0.2 ppm and 1.0 ppm arsenic concentration in the culture solution was similar with a maximum of about 60% after 24 hours. With 10.0 ppm arsenic concentration in the culture solution, almost no cell growth was observed and arsenic in the culture solution was not removed. The forms of arsenic hardly changed in any of the culture solutions.

Key words:

microorganisms, arsenic removal, biosorption, isolation

1. 緒言

アジア諸国では、地下水が高濃度のヒ素に汚染され人々の健康を害していることがこれまでに数多く報告されている¹⁾⁻³⁾。近年、代替水供給システムが整備されつつある国もあるが、ヒ素除去装置中のヒ素汚泥の処分、生活廃水や灌漑用水によるヒ素の生態系中への蓄積や汚染土壌の修復など二次汚染問題の解決も求められている^{4),5)}。

微生物は大量に培養することで安価なヒ素除去プロセスを構築することができ、それ自体は環境に負荷をかけない物質であることから、これまで本研究室では微生物によるヒ素除去技術の開発を行ってきた。

本研究では、地下水からのヒ素除去だけではなく、ヒ素汚泥の処分やヒ素汚染土壌の修復に利用できる微生物の探索を行い、そのヒ素除去能について検討した。さらに、微生物のヒ素除去メカニズムの解明のために、微生物の増殖とヒ素の関係を調べたので報告する。

1) 宮崎大学工学部物質環境化学科助教

2) 宮崎大学工学部物質環境化学科教授

2. 実験

2.1 ヒ素除去能を有する菌の探索と分離

宮崎県内各地から採取した土壌 1g を滅菌水 5mL に懸濁し、その上清を 1.0ppm の三価のヒ素を含む普通寒天培地（肉エキス 0.5%、ペプトン 1.0%、塩化ナトリウム 0.5%、寒天 1.5%、pH 7.0）に接種し、30°C で 3 日間培養した。出現したコロニーをそれぞれ画線培養により単一な菌株を得た。

2.2 ヒ素除去能の評価

分離菌株のヒ素除去能の評価には、1.0ppm の三価のヒ素を含む液体培地（肉エキス 0.5%、ペプトン 1.5%、塩化ナトリウム 0.5%、リン酸一水素カリウム 0.5%、pH 7.0）に分離した菌株を接種し、30°C で 4 日間振とう（100 strokes/min）培養した。培養後、遠心分離（10,000rpm、15 分間）により菌体と培養上清に分け、培養上清中のヒ素濃度を測定した。

ヒ素除去率と増殖度の経時変化の実験では、三価のヒ素を含む液体培地に菌株を接種し、30°C で振とう（100 strokes/min）培養した。培養時間ごとに培養液の濁度を測定した後、遠心分離（10,000rpm、15 分間）により菌体と培養上清に分け、培養上清中のヒ素濃度を測定した。

2.3 ヒ素除去率と菌体量の測定

培養上清のヒ素濃度をヒ素形態別分析システム（ヒ素前処理装置 ASA-2sp-原子吸光光度計 AA-6650、島津製作所）で測定し、初期のヒ素濃度との差からヒ素除去率を算出した。培養液を紫外可視分光光度計（UV-1200、島津製作所）により濁度（660nm）を測定し菌体量とした。

3. 結果および考察

3.1 ヒ素除去能を有する菌の分離とヒ素除去能の評価

今回は宮崎県内の土壌を採取し、菌の分離を行った。ヒ素を含むプレートで培養することで、ヒ素耐性能を有する菌株を分離することにした。出てきたコロニー数はヒ素を含まない培地で培養したときと比較してもほとんどが減少しなかった。この結果は、土壌に生息しているほとんどの菌が 1ppm 程度のヒ素濃度では、菌

の増殖にそれほど影響しないことを示している。出てきたコロニーから、画線培養により単一な 100 菌株を分離した。分離した菌株について、ヒ素除去能の評価するために、1.0ppm のヒ素を含む液体培地中で 4 日間培養を行なった後の培養液中のヒ素濃度を測定し、それぞれに菌株についてヒ素の除去率を調べた。その結果、分離した菌株中 7 菌株で 20%以上のヒ素除去率を示した（Table 1）。

Table 1 Evaluation on arsenic removal ability of isolated strains

strain	As removal(%)	strain	As removal(%)	strain	As removal(%)
A-41	6	A-61	6	A-80	22
A-42	1	A-62	6	A-81	0
A-43	0	A-63	12	A-82	0
A-44	3	A-64	4	A-83	14
A-45	1	A-65	4	A-84	24
A-46	3	A-66	11	A-85	13
A-47	0	A-67	1	A-86	5
A-48	9	A-68	10	A-88	25
A-49	16	A-69	21	A-89	29
A-50	4	A-70	23	A-90	10
A-51	14	A-71	14	A-91	20
A-52	10	A-72	14	A-92	2
A-53	10	A-73	9	A-93	12
A-54	15	A-74	12	A-94	0
A-55	10	A-75	2	A-96	5
A-57	8	A-76	10	A-97	0
A-58	5	A-77	2	A-99	16
A-59	11	A-78	0	A-100	2
A-60	14	A-79	18		

3.2 菌体量とヒ素除去率の経時変化

分離した菌株のうちでヒ素除去能に優れていた 3 菌株（A-84、A-88、A-89）について、1.0ppm のヒ素を含む培地中で 4 日間培養を行なったときの菌体量とヒ素除去率を調べた。その結果を Fig. 1 に示す。それぞれで菌の増殖速度に違いはあったが、3 菌株とも菌体量が増えると共にヒ素除去率も高く、菌体量が減少していくとヒ素除去率も低くなっていく傾向が見られた。このことは、ヒ素除去量に菌体量がかなり影響しているものと思われる。A-89 株で菌体量が最も高かった培養 1 日目に 63%のヒ素除去率を示し、3 菌株のうちで最も高いヒ素除去率を示した。菌体あたりのヒ素の除去量は A-88 株が最も高く 0.46mg/g・cell であった。最も菌体量が少なかったのにも関わらず A-88 株のヒ素除去量が大きかったのは、A-88 株が他の 2 株に比べ増殖時にヒ素の影響を受けやすく感受性が高かったため、増殖が抑制されたためではないかと考えられる。

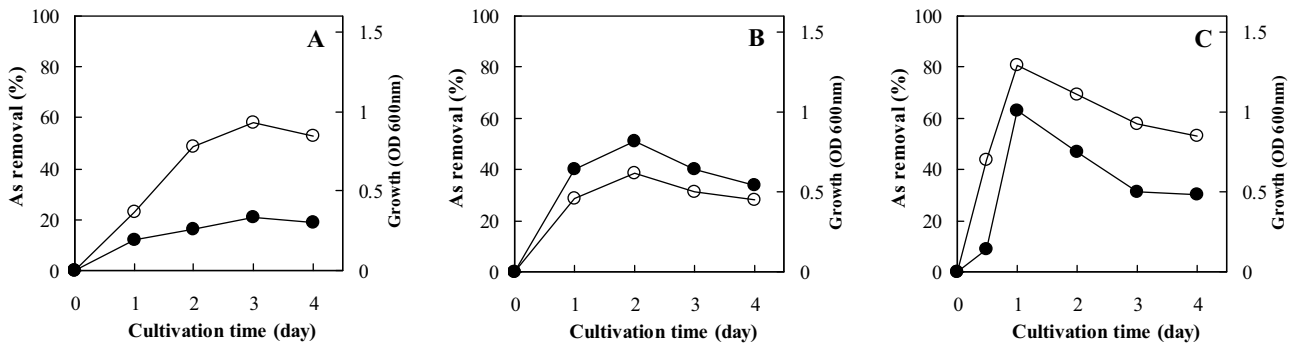


Fig.1 Time courses of arsenic removal and cell growth on strain A-84 (A), strain A-88, (B) and strain A-89 (C). Cells were grown on 1.0 ppm arsenic concentration. Symbols: solid circles, arsenic removal; open circles, cell growth.

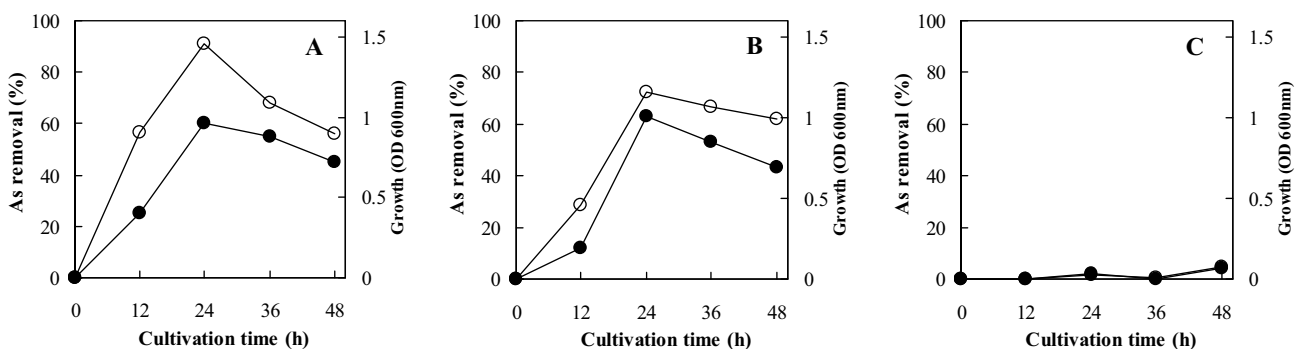


Fig.2 Time courses of arsenic removal and cell growth on strain A-89. Cells were grown on 0.2 (A), 1.0 (B), 10.0 (C) ppm arsenic concentration. Symbols: solid circles, arsenic removal; open circles, cell growth.

3.3 ヒ素濃度の影響

ヒ素除去率や菌体量に及ぼす培地中のヒ素濃度の影響を検討するために、A-89株について培地中のヒ素濃度を0.2~10ppmに変えて培養を行い、各ヒ素濃度におけるヒ素除去率と菌体量の経時変化を調べた。その結果、培地中のヒ素濃度が0.2ppmのときに培養24時間まで増殖し、1.0ppmのときに比べ1.5倍程度良かった。しかし、ヒ素除去率は0.2ppmのときでも60%程度しか示さず、1.0ppmのときとほぼ同じ結果を示した (Fig. 2)。この結果は、1ppm程度のヒ素濃度においてはヒ素濃度に関係なく培地中のヒ素を一定の割合で吸着することを示している。このことは無機担体のような普通の吸着剤では考えられないことであり、興味深い事実である。1.0ppmのヒ素濃度で最も良好に増殖したA-89株においても、培地中のヒ素濃度が10ppmのときには増殖はほとんど見られず、培養液中のヒ素は除去されなかった。また、それぞれのヒ素濃度において

培地中のヒ素の形態に関して、3価と5価のヒ素の割合は変化が見られず、有機ヒ素も検出することができなかった。このことは、ヒ素を菌体内へ取り込んでいるのではなく、菌体自体にヒ素が吸着しているのではないかと考えられる。

4. まとめ

今回の研究では、ヒ素除去能に優れた菌株の分離を行い、ヒ素除去のメカニズムの解明のために菌の増殖とヒ素除去率の関係を検討した。ヒ素を含まない土壌から菌を分離したが、その結果土壌に生息しているほとんどの菌が1ppm程度のヒ素濃度では、菌の増殖にそれほど影響しないことがわかった。分離した100菌株についてヒ素除去能の評価を行ったところ、20%以上のヒ素除去率を示す菌株が7株あった。そのうち、3菌株について菌体量とヒ素除去率の関係を明らかにす

るため経時変化について検討した。培地中のヒ素濃度が1.0ppmにおいて、A-89株で63%のヒ素除去率を示し、A-88株で0.46mg/g cellのヒ素を除去した。3菌株とも菌体量とヒ素除去率は同じような挙動を示した。

A-89株で菌体量とヒ素除去率に及ぼす培地中のヒ素濃度の影響を検討した。ヒ素濃度に関係なく培地中のヒ素を一定の割合で吸着することで分かり、無機担体のような普通の吸着剤とは違った挙動を示した。このことは菌体の周りのヒ素濃度により、菌体の状態が変化している可能性を示している。また、それぞれのヒ素濃度においても、培地中のヒ素の形態に関して、3価と5価のヒ素の割合にも変化が見られず、有機ヒ素も検出することができなかったことは、ヒ素を菌体内に取り込んでいるのではなく、菌体自体にヒ素が吸着しているのではないかと考えられる。

今後更なる研究により微生物のヒ素除去メカニズムの解明が行なわれ、微生物を利用したヒ素の除去プロセスの構築（バイオレメディエーション）につながっていくと考えられる。

参考文献

- 1) Das, D., Samanta, G., Mandal, B.K., Chowdhury, T.R., Chanda, C.R., Chowdhury P.P., Basu, G.K. and Chakraborti, D., *Environ. Geochem. Health*, **18**, pp.5-15 (1996).
- 2) Biswas, B.K., Dhar, R.K., Samanta, G., Mandal, B.K., Chakraborti, D., Faruk, I., Islam, K.S., Chowdhury, Md. M., Islam, A. and Roy, S., *Curr. Sci.*, **74**, pp.134-145 (1998).
- 3) Joseph, D.A., Denise, L.M., Sarah, M.F. and Keith, W.R., *Environ. Sci. Technol.*, **37**, pp.2075-2083 (2003).
- 4) Yokota, H., Tanabe, K., Sezaki, M., Akiyoshi, Y., Miyata, T., Kawahara, K., Tsushima, S., Hironaka, H., Takafuji, H., Rahman, M., Ahmad, Sk. A., Sayed, M. H. S. U. and Faruquee, M. H., *Engineering Geology*, **60**, pp.323-331 (2001).
- 5) Yokota, H., *Book of Abstracts for Seminar on Arsenic Mitigation for Community Health Promotion*, pp.116-120 (2004).