ヒ素除去装置の汚泥槽内の微生物による ヒ素のメチル化に関する研究

宮武 宗利^{1*}・林 幸男¹

A Study on Arsenic Methylation by Microorganisms in Sludge Tank of Arsenic Removal Unit

Munetoshi MIYATAKE¹ and Sachio HAYASHI¹

¹Department of Applied Chemistry, University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192, Japan

Abstract

An arsenic removal unit was constructed by the Miyazaki University research group in Bangladesh. The sludge drained from the arsenic removal unit was directed to a sludge tank and allowed to settle down. Then the supernatant in the tank was released to an artificial pond. Biomethylation of arsenic is usually considered as a detoxification of arsenic because toxicity of most organic methylated arsenic is much less than that inorganic arsenic. Microorganisms in the sludge tank were evaluated growth characteristics and arsenic methylation. As a result, dimethylarsinic acid was detected in the broth, and the amount of total arsenic compounds in the broth decreased. It is thought that this loss was contributed by biogenic activity induced by inorganic arsenic biomethylation to gasified volatile organic species, such as monomethylarsine and dimethylarsine. These results suggested that microorganisms in the sludge tank may be utilized for natural attenuation of arsenic sludge from the arsenic removal unit.

Key words: Arsenic methylation, Organic methylated arsenic, Biologic gasification, Microorganisms

1. 緒 言

ヒ素による地下水の汚染は世界各地に広がっており、ヒ素による重大な健康被害が数多く報告されている¹⁻⁴。特にバングラデシュは国土の8割の土壌が高濃度のヒ素を含んでおり、それによる地下水汚染は深刻で5,000万人以上の住民がヒ素に汚染された地下水を飲んでおり、と言われている⁵⁻⁸。現在、宮崎大学の研究グループで開発した4基のコミュニティ用ヒ素除去装置がバングラデシュで稼動しており、安全な水を地域住民に供給している⁹。ヒ素除去装置は5価のヒ素と3価の鉄が吸着・共沈する性質を利用したものである。地下水中に含まれるヒ素と鉄を酸化し共沈させ、共沈物を砂利槽でトラップすることでヒ素を除去している。これらの装置において、常にヒ素濃度の低い安全な水を供給するためには、砂利槽が目詰まりを起こす前にヒ素汚泥（ヒ素・鉄共沈物）を引き抜く必要がある。現地では、砂利槽に設置された

排水バルブを定期的に開けたり、砂利層内の砂利を洗浄したりすることにより、ヒ素除去機能を維持しているが、排出される砂利槽の汚泥と砂利洗浄水の処理方法が問題となっている¹⁰。それらの処理方法を確立するため、2004年から排出された汚泥や洗浄水は沈殿処理のため汚泥槽に溜められ、その上澄み液は人工池に放流されている。汚泥槽内で沈殿した汚泥に関しては、セメントによる固化での処分方法が検討されている。人工池に関しては、生物機能を利用した自然浄化処理が試みられている。汚泥のセメント固化処分では、セメントを2%添加した場合に土壌汚染対策法に基づく汚染基準である第二溶出基準をクリアすることが分かった。一方人工池では、汚泥槽の上澄み液に0.1 mg/l以上のヒ素が含まれており、人工池への放流が長期間続くと人工池内のヒ素の蓄積がかなりの量になることが予想され、蓄積したヒ素の処理が問題となっている¹¹。

一般にヒ素の毒性はその化学形態によって異なり、無機ヒ素に比べ有機ヒ素化合物は極めて毒性が低いことが知られている。そのため、微生物によるヒ素のメチル化はヒ素の毒性の低減化に有効な手段として考えられている。これまで、ヒ素をメチル化する微生物は嫌気性菌によるモノメチルアルシン（MMA）やジメチルアルシン

キーワード：ヒ素のメチル化、メチル化有機ヒ素、生物学的ガス化、微生物

¹ 宮崎大学工学部物質環境化学科

平成23年9月3日受理

*e-mail: t0g205u@cc.miyazaki-u.ac.jp

(DMA) のような揮発性有機ヒ素化合物を生成するものが数多く報告されており¹²⁻¹⁴、それらの微生物の機能を利用して、無機ヒ素を揮発性の有機ヒ素化合物に変換することで、汚染土壌中のヒ素の気化による浄化が検討されている¹⁵。

そこで、汚泥槽内でのヒ素処理の効率化を図り、人工池へのヒ素の流出量の軽減を目的として、汚泥槽で行なっているヒ素の沈殿処理に加え、生物機能を利用して毒性の高い無機ヒ素をメチル化し毒性の低い揮発性のメチル化有機ヒ素化合物に変換することで、ヒ素の毒性の低減化を図った上でヒ素を気化させ大気中に拡散させることが可能かどうかを調べることにした。本研究では、汚泥槽内の微生物によるヒ素のメチル化について検討し、さらにヒ素のメチル化を促進させ汚泥中の無機ヒ素をより多くメチル化有機ヒ素化合物に変換させるために、ヒ素メチル化細菌を汚泥中の微生物と一緒に培養を行なったので、以下に報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

汚泥はバングラデシュのジェソール県マルア村に設置されたヒ素除去装置の汚泥槽より採取されたものを用いた。汚泥を採取したときの汚泥槽内の沈殿物の上部の表層水の pH (DKK-TOA HM-20P) は 7.6, 酸化還元電位 (DKK-TOA RM-20P) は 198 mV であり酸化状態であった。表層水のヒ素濃度は 0.131 mg/l で、その内 5 価のヒ素は全体の 84.7% であった。汚泥槽内の沈殿物を回収し汚泥とした。滅菌水 9.0 ml に汚泥 1.0 ml 加え懸濁した後、上澄み液 (pH 7.2) について、ヒ素と鉄の定量分析を行ない、生菌数を測定し、培養実験を行なった。

2.2 生菌数の測定

一般細菌の生菌数は平板表面塗布法にて行なった。培地に Nutrient agar (日水製薬) を用いて、希釈した上澄み液を塗布し 30°C で 24 時間培養した後、コロニー数を計測した。

2.3 培養実験

培地は Nutrient Broth (日水製薬) 3.00 g/l にグルコース 1.00 g/l, 硝酸アンモニウム 0.500 g/l, L-メチオニン 50.0 mg/l, 乳酸ナトリウム 2.50 g/l, ビタミン B₁₂ 0.500 mg/l を添加したもの (pH 5.8) を使用した。ヒ素は 3 価のヒ素 (As(III)) として亜ヒ酸ナトリウム (和光純薬) を、5 価のヒ素 (As(V)) としてヒ酸二ナトリウム (和光純薬) をヒ素濃度が 0.100 mg/l になるように添加した。

培養実験は上澄み液を培地に 2.0 v/v% 加え 30°C で 4 日間培養を行なった。ヒ素メチル化細菌の影響を調べる実験では、*Bacillus cereus* R2 株をヒ素の添加していない培

地で 30°C, 24 時間振とう培養した後の培養液を、上澄み液 2.0 v/v% 加えた培地に 2.0 v/v% 加え 30°C で 4 日間培養を行なった。好氣的培養は培地 100 ml を入れかぶせ式シリコ栓で蓋をした 500 ml 容振とうフラスコを用いて、100 strokes/min で振とう培養した。嫌氣的培養は培地 100 ml を入れシリコン栓で蓋をした 100 ml 容メジューム瓶を用いて、上部を窒素で置換した後、静置培養した。培養後、所定の時間培養した培養液を遠心分離 (10,000 × g, 15 分間) により、菌体と培養液上清に分けた。培養液上清はヒ素濃度を形態別に測定した。菌体は凍結乾燥後、重量を測定した。菌体中のヒ素量を調べるために、2.00 mol/l 水酸化ナトリウム水溶液で溶菌処理を行ない遠心分離 (10,000 × g, 15 分間) 後、上清のヒ素濃度を測定した。

2.4 分析

ヒ素の定量分析は形態別に還元気化-超低温捕集-原子吸光装置 (Shimadzu ASA-2sp-Shimadzu AA6650) を用いて測定した。鉄の定量分析はフェナントロリン法により測定した。全ての実験は 3 回行ない、それぞれの試料について 2 回測定し、本報に示している結果はそれらの平均値である。得られた値は全て平均値から 3% の範囲内であった。

3. 結果および考察

3.1 汚泥内のヒ素と鉄濃度および生菌数

汚泥中に可溶化しているヒ素と鉄濃度を調べた結果、ヒ素濃度は 0.286 mg/l, 鉄濃度は 0.1 mg/l 未満であった。

Fig. 1 Effect of arsenic on cell growth. Culture were carried out in the presence of 0.100 mg As/l of either As(III) or As(V) for 4 day at 30°C.

また、メチル化有機ヒ素を微量検出することが出来た。

汚泥内の一般細菌の生菌数は 1.2×10^7 CFU/mlであった。

3.2 菌の増殖に及ぼすヒ素の影響

汚泥中の微生物の増殖に及ぼすヒ素の影響を調べるために、培地に As(III) と As(V) を 0.1 mg As/l 添加して好気的および嫌氣的に 4 日間培養した時の乾燥菌体量 (dw) を測定した。得られた値から、上澄み液を培地に加えた直後、培養液を採取し遠心分離・凍結乾燥した後の重量 (<0.001 g dw/l broht) を差し引いた結果を Fig. 1 に示す。好氣的に培養した場合、As(III) より As(V) の方が培養 3 日目までの菌体量が少なく初期の菌の増殖に影響を及ぼしていることが分かった。一方嫌氣的に培養した場合は、As(III) と As(V) では違いは見られなかったが、全体的に好氣的培養に比べ菌体量が少なく菌の増殖に差が認めら

れた。また、As(III) と異なり As(V) を添加した好氣的、嫌氣的培養の両方で、培養 3 日目から 4 日目にかけて菌体量の増加が見られた。

3.3 ヒ素のメチル化における経時変化

汚泥中の微生物によるヒ素のメチル化について調べるために、培養液上清中のヒ素濃度を形態別に測定した結果を Fig. 2 に示す。その結果、各々の培養条件においても培養が進むにつれて無機ヒ素の濃度は減少し続け、特に好氣的培養において 1 日目から 2 日目にかけ急激に減少が見られた。無機ヒ素の濃度は好氣的培養 4 日目では As(III)、As(V) の両方で 0.009 mg As/l 以下まで、嫌氣的培養 4 日目では 0.037 mg As/l 以下まで低下し、好氣的培養において 3 日目からはジメチルアルシン酸 (DMAA) の濃度を下回った。一方 DMAA は、培養 2 日目からを検

Fig. 2 Time courses of arsenic methylation. Culture were carried out in the presence of 0.100 mg As/l of either As(III) or As(V) for 4 day at 30°C. (A) Aerobic culture [As(III)]; (B) aerobic culture [As(V)]; (C) anaerobic culture [As(III)]; (D) anaerobic culture [As(V)]. iAs, inorganic arsenic.

Table 1 Arsenic adsorbed from culture medium of microorganisms after 4 day.

Culture (4 day)	Cell amount (g dw/l broth)	As adsorption	
		(mg As/g dw)	(mg As/l broth)
Aerobic	0.19	0.036	0.0069
[As(III)]			
Aerobic	0.19	0.029	0.0056
[As(V)]			
Anaerobic	0.12	0.074	0.0089
[As(III)]			
Anaerobic	0.13	0.058	0.0075
[As(V)]			

Culture were carried out in the presence of 0.100 mg As/l of either As(III) or As(V) at 30°C.

出すことができ2日目から4日目までほぼ一定であり、好氣的培養では As(III)、As(V) の両方で 0.016 mg As/l 以上、嫌氣的培養では 0.009 mg As/l 以上であった。モノメチルアルソン酸 (MMAA) は As(V) を添加した好氣的培養以外でわずかに検出することができた。トリメチルアルシンオキシド (TMAO) はどの培養条件においても検出することができなかった。培養液の全ヒ素濃度は初期の濃度に比べて、各々の培養条件においても培養が進むにつれて減少し続け、As(V) を添加した好氣的培養 4 日目で 24.5% まで減少した。全ヒ素濃度の減少の割合は嫌氣的培養より好氣的培養、As(III) より As(V) を添加した場合の方が高く、菌体量の変化と同じ傾向を示した。このことは、ヒ素のメチル化に関与した菌が増殖したことや、培養液中のヒ素濃度の低下により、ヒ素に対してあまり耐性を持たない菌の増殖が活発になったことが考えられる。

3.4 微生物によるヒ素の吸着

汚泥中の微生物によるヒ素の吸着量を調べるために、凍結乾燥した菌体に含まれるヒ素量を測定した。その結果、培養 2 日目まではヒ素の吸着量が増加したが、それ以降はほぼ一定であった。培養 4 日目の結果を Table 1 に示す。ヒ素の吸着量は初期のヒ素濃度の 1 割以下であり、As(III) を添加した嫌氣的培養で 0.0089 mg As/l broth であった。吸着の割合は好氣的培養より嫌氣的培養、As(V) より As(III) を添加した場合の方が高かった。

回収した菌体に 1 割以下のヒ素しか含まれていなかったことから推測すると、微生物の働きにより無機ヒ素が MMAA や DMAA に変換され、さらに MMA や DMA のような揮発性のメチル化有機ヒ素化合物に変換されたことで、培養液から気化したのではないかと考えられる。このことは、汚泥槽内に無機ヒ素を揮発性のメチル化有機ヒ素化合物に変換することができる微生物の存在を示唆するものであり、これらの微生物の働きはメチル化によるヒ素の毒性の低減化を図るとともに、揮発性メチル

Fig. 3 Effect of arsenic methylating bacterium on arsenic methylation. Culture were carried out in the presence of 0.100 mg As/l of either As(III) or As(V) for 4 day at 30°C. (A) Aerobic culture; (B) anaerobic culture. Slu, broth inoculated with supernatant solution of sludge; R2, broth inoculated with *B. cereus* strain R2; Slu + R2, broth inoculated with supernatant solution of sludge and broth of *B. cereus* strain R2.

化有機ヒ素化合物へ変換することで大気中に気化・拡散させることを可能にするものである。

3.5 ヒ素メチル化細菌の影響

ヒ素メチル化細菌 *Bacillus cereus* R2 株は、DMAA や TMAO のような非揮発性のメチル化有機ヒ素化合物を産生することが分かっており、特に 0.100 mg As/l の As(III) を添加した場合に好氣的培養時に 89.0% の割合で無機ヒ素をメチル化有機ヒ素化合物に変換する¹⁶。無機ヒ素のメチル化を促進させるために、R2 株の培養液を培地に加え汚泥内の微生物と一緒に培養を行なった。その結果を Fig. 3 に示す。その結果、各々の培養条件においても R2

株を添加した場合、無機ヒ素の濃度が減少し、特に As(III) を添加した好氣的培養では 0.005 mg As/l と、R2 株を添加していない場合に比べて 54.0% まで減少した。一方 DMAA は、R2 株を添加した場合でも添加しなかったときとほぼ同じ程度の濃度を示した。TMAO は As(V) を添加した好氣的培養以外で、R2 株を添加すると検出することができ、その濃度は As(III) を添加した好気、嫌氣的培養で 0.015 mg As/l 以上であった。培養液の全ヒ素濃度は TMAO を検出することができなかった As(V) を添加した好氣的培養以外で、R2 株を添加すると産生した TMAO 分だけ増加した。R2 株を添加することで、無機ヒ素をより多くメチル化有機ヒ素化合物に変化することができ、ヒ素の毒性の低減化は図れるが、培養液中の全ヒ素濃度は R2 株を添加することで増加した。

4. 結 言

ヒ素除去装置の汚泥槽内から無機ヒ素を揮発性のメチル化有機ヒ素化合物に変換することができる微生物の存在を確認した。そのため、培養液中の全ヒ素濃度は初期の濃度に比べて、各々の培養条件において減少したが、好気や嫌気、添加するヒ素の形態により違いが生じた。As(V) を添加した好氣的培養が最も良い結果を示し、4 日目で培養液中の全ヒ素濃度は 24.5%、無機ヒ素の濃度は 0.009 mg As/l まで減少した。

ヒ素メチル化細菌と組み合わせると、毒性の極めて低い TMAO にも無機ヒ素を変換することができ無機ヒ素の濃度を下げることができたため、毒性の低減化は図れたが、TMAO 分だけ培養液中の全ヒ素濃度は増加した。このことは、汚泥中に TMAO を還元してトリメチルアルシンに変換できる微生物が存在しなかったためと考えられる。

今回、汚泥槽内に蓄積した無機ヒ素を汚泥槽内の微生物の働きによって、無機ヒ素をメチル化し揮発性のメチル化有機ヒ素化合物に変換することで、汚泥内のヒ素の毒性の低減化を図った上でヒ素を気化させ大気中に拡散させることが可能であることが分かった。このことは、ヒ素除去装置から排出されるヒ素汚泥の処理を考える上

で有用な知見となる。汚泥内にメチル化有機ヒ素化合物を微量しか検出することができなかったことから、今回の結果を参考にしながら、今後これらの有用な微生物の機能を汚泥槽内で発現させていきたい。

References

1. D. Das, G.B. Samanta, K. Mandal, T.R. Chowdhury, C.R. Chanda, P.P. Chowdhury, G.K. Basu, D. Chakraborti: *Geochem. Health*, **18**, pp. 5–15 (1996)
2. M.F. Hughes: *Toxicol. Lett.*, **133**, pp. 1–16 (2002)
3. P.L. Smedley and D.G. Kinniburgh: *Appl. Geochem.*, **17**, pp. 517–568 (2002)
4. J.S. Wang and C.M. Wai: *J. Chem. Educ.*, **81**, pp. 207–213 (2004)
5. R.T. Nickson, J.M. McArthur, W.G. Burgess, K.M. Ahmed, P. Ravenscroft, M. Rahman: *Nature*, **395**, pp. 338 (1998)
6. R.T. Nickson, J.M. McArthur, P. Ravenscroft, W.G. Burgess, K.M. Ahmed: *Appl. Geochem.*, **15**, pp. 403–413 (2000)
7. K. Tanabe, H. Yokota, H. Hironaka, S. Tsushima, Y. Kubota: *J. Organomet. Chem.*, **15**, pp. 241–251 (2001)
8. A. Mushtaque and R. Chowdhury: *Scientific Am. Aug.*, 86–91 (2004)
9. M.M. Hussainuzzaman and H. Yokota: *J. ASTM Intern.*, **3**, pp. 1–9 (2006)
10. H. Yokota, K. Tanabe, M. Sezaki, Y. Akiyoshi, T. Miyata, K. Kawahara, S. Tsushima, H. Hironaka, H. Takafuji, M. Rahman, S.A. Ahmad, M.H.S.U. Sayed, M.H. Faruquee: *J. Engineering Geology*, **60**, pp. 323–331 (2001)
11. M. Miyatake, H. Yokota, K. Tanabe, S. Hayashi: *Mizukankyou Gakkai*, **32**, pp. 495–500 (2009)
12. W.R. Cullen and K.J. Reimer: *Chem. Rev.*, **89**, pp. 713–764 (1989)
13. R. Bentley and T.G. Chasteen: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**, pp. 250–271 (2002)
14. S. Wang and C.N. Mulligan: *J. Hazardous Materials*, **13**, pp. 459–470 (2006)
15. S.M.A. Islam, K. Fukushi, K. Yamamoto: *Biotechnol. Lett.*, **27**, pp. 1885–1890 (2005)
16. M. Miyatake and S. Hayashi: *Shigen Kankyou Kougaku*, **56**, pp. 153–158 (2009)