

## 論文の要旨

論文題目 嫌気性消化プロセスにおけるヒ素の気化特性およびメタン生成細菌の挙動に関する研究

氏名 橋本 崇史

### 論文の要旨

ヒ素(Arsenic)汚染は広い地域で問題となっているが、中でも東南アジア、南アジアにおいては飲料水として用いている地下水のヒ素汚染が深刻であり、数千万人が汚染された地下水を摂取していると言われている。飲料目的として地下水等からのヒ素除去には水酸化鉄との共沈作用を用いた手法が広く用いられている。水酸化鉄との共沈では、ヒ素を高濃度に含む汚泥が発生し、さらに汚染された汚泥が適性に処理されないことによる二次汚染の問題が懸念されている。このような汚泥、また汚染土壌などの固形物からのヒ素除去技術は、土壌固化、土壌洗浄(化学的洗浄)などの方法が知られているが、発展途上国などではコストや技術水準等の課題で導入が難しい側面がある。そこで微生物を用いた処理が着目されてきている。その一つとして微生物の持つヒ素を気化する作用を利用し、汚染汚泥などからヒ素を気化させ回収する、という手法が考えられている。ヒ素を気化する微生物として、下水汚泥の嫌気性処理(嫌気性消化)プロセス内の微生物(酸生成菌やメタン生成菌)はヒ素やアンチモン、ビスマスなどの半金属をメチル化し、気化することが知られている。また汚染土壌や牛糞中の微生物もヒ素を気化することが知られており、それら嫌気性混合微生物を利用したヒ素の気化の浄化への応用可能性も示されている。しかし、実際にそのような嫌気性微生物によるヒ素の気化を浄化へと応用するに際し、気化特性やヒ素気化を担う微生物に関する知見が重要となる。特に先述のヒ素汚染が問題とされている地域での応用を視野に入れると、実汚染土壌や牛糞、嫌気性消化汚泥などの混合微生物の応用が現実的である。そのような観点からもヒ素を気化する微生物叢とそのヒ素気化特性という知見は重要である。

このような背景を踏まえ、本研究では嫌気性処理プロセスのヒ素気化作用のヒ素浄化技術への応用を最終ゴールとして据え、異なる環境条件における嫌気性処理プロセスにおけるヒ素気化特性を調べることで、その中のヒ素の気化を担う微生物種を特定すること、ヒ素を気化するメタン生成細菌のヒ素の気化特性を調べることで、嫌気性処理プロセス内におけるヒ素を気化するメタン生成細菌の挙動を調べることで、またヒ素を気化するメタン生成細菌によるヒ素の気化に関わる酵素群を調べることで、を目的として研究を進めた。

異なる環境条件として、ヒ素濃度を変化させた嫌気性消化プロセスにおけるヒ素の気化特性を調べるにあたり、中温域で運転されている嫌気性消化槽からの汚泥を用い、2.5、7.5、22.5、37.5、75 mg l<sup>-1</sup>のヒ素濃度条件下で嫌気性消化槽の運転を行った。いずれのヒ素濃度条件下においても気体ヒ素の生成が確認され、また気体ヒ素の形態はどの場合もトリメチルアルシン(TMA)のみであった。これまでの知見では、嫌気性消化汚泥からアルシン、モノメチルアルシン(MMA)、ジメチルアルシン(DMA)、TMAの4種の気体ヒ素の生成が確認さ

れた報告、また牛糞由来微生物、汚染土壌由来微生物を用いてメタン生成槽からアルシンと MMA の生成が確認された報告がある。本研究では TMA のみであり、これまでの報告と関与している微生物群が異なる可能性が示唆された。気体ヒ素生成速度に関しては、ヒ素濃度が高くなるにつれて大きくなることが分かった。ヒ素の毒性のメタン生成活性に与える影響は、加えたヒ素濃度が高くなるにつれ(2.5 mg l<sup>-1</sup> → 75 mg l<sup>-1</sup>)、メタン生成速度の低下が大きくなる(ヒ素を加えない場合のメタン生成速度に対して、53.6 %、46.9 %、19.4 %、9.15 %、6.1 %)という結果となった。ヒ素濃度 が 2.5-37.5 mg l<sup>-1</sup> の場合ではその後回復が見られたが、75 mg l<sup>-1</sup> では回復は見られなかった。このことから37.5 mg l<sup>-1</sup>までのヒ素濃度に対しては馴化する能力があることが分かった。ヒ素濃度が 75 mg l<sup>-1</sup>の場合ではメタン生成がほぼ停止していたが、TMA の生成は起きていた。このことよりメタン生成細菌以外の微生物もヒ素の気化に関与していることが示唆された。

メタン生成活性に対する気体ヒ素生成活性を調べると 0.042、0.064、0.070、0.138 μmol As mmol CH<sub>4</sub><sup>-1</sup> という値が得られた。Islam(2005)の場合におけるこのメタン生成速度に対する気体ヒ素生成速度の比は 0.089(牛糞由来微生物)、0.022(汚染土壌由来微生物) μmol As mmol CH<sub>4</sub><sup>-1</sup> となり、本研究で用いた嫌気性消化槽によるヒ素気化活性は、Islam によるメタン生成槽と比較しても遜色のないことが示された。

ヒ素の気化を担っている微生物を特定するため、運転している嫌気性消化槽において、ヒ素を気化することが知られている水素資化性メタン生成細菌および酢酸資化性メタン生成細菌の存在を調べたところ、水素資化性メタン生成細菌 *Methanobacterium* spp. の存在が確認された。*Methanobacterium* spp. には高いヒ素気化能を持つと言われる(Bentley and Chasteen, 2002) *Methanobacterium formicicum* が属しており、運転した嫌気性消化槽におけるヒ素の気化に対し *Methanobacterium* spp. の寄与が示唆された。

嫌気性消化槽からのヒ素気化において *Methanobacterium* spp. の関与が示唆されたことより、そのヒ素気化特性を調べることとした。*Methanobacterium* spp. として、*M. formicicum* および *M. bryantii* を用いた。いずれもヒ素を気化することが報告されている(Michalke et al., 2002; McBride and Wolfe, 1971)。この2種の水素資化性メタン生成細菌を異なるヒ素濃度条件(2.5、7.5、22.5、37.5、75 mg l<sup>-1</sup>) 下において純粋培養を行い、ヒ素の気化特性を調べた。*M. formicicum*、*M. bryantii* ともに 37.5 mg l<sup>-1</sup> のヒ素濃度までの培養系において気体ヒ素が確認され、その気体ヒ素形態はアルシン、モノメチルアルシン(MMA)、ジメチルアルシン(DMA)、TMA の4種であった。37.5 mg l<sup>-1</sup> までのヒ素濃度におけるヒ素のメタン生成速度への影響として 15 %ほどの低下が見られた。しかし 75 mg l<sup>-1</sup> のヒ素濃度においてはほぼメタン生成が停止するという結果となった。このことよりこれら水素資化性メタン生成細菌は 37.5 mg l<sup>-1</sup> までのヒ素濃度には耐性があることが分かった。培養系内の各形態別ヒ素濃度(As(III)、MMAA、DMAA、TMAO)と各気体ヒ素生成速度(アルシン、MMA、DMA、TMA)を比較したところ、DMA の生成のみ DMAA の濃度変化に対して遅滞して起きていることが分かった。また、DMAA から TMAO への変換に関しても遅滞して起きていることが確認された。

気体ヒ素の生成速度(最大)に関しては、*M. formicicum* の方が *M. bryantii* に比べ 1.6-6 倍高いヒ素気化能を持つことが示された。メタン生成速度に対する気体ヒ素生成速度を算出した結果を嫌気性消化プロセスにおける値と比較すると、各ヒ素濃度において純粋培養系の方が 2.5-12 倍大きいことが分かった。

純粋培養によりヒ素の気化特性が調べられたメタン生成細菌が嫌気性消化プロセスにおいてどのようにヒ素の気化に寄与しているかを調べるために、*M. formicicum*、*M. bryantii* が属する *Methanobacterium* spp. の嫌気性消化プロセスにおける挙動を定量 PCR 法により追った。その結果、*Methanobacterium* spp. の 16S rDNA のコピー数は  $10^3$ - $10^5$  ml<sup>-1</sup> のオーダーであり、純粋培養によりヒ素の気化特性を調べた *M. bryantii* の同コピー数と比較すると  $10^4$  分の 1 ほどであった。つまり、検出された *Methanobacterium* spp. が *M. bryantii* であると仮定したとして、先に得られた *M. bryantii* の最大ヒ素気化活性の  $10^4$  分の 1 程度の寄与になると言え、嫌気性消化プロセスにおけるヒ素の気化に対する *Methanobacterium* spp. としての寄与は非常に小さいものであることが分かった。このことより、嫌気性消化プロセスにおけるヒ素の気化には *Methanobacterium* spp. 以外の微生物の寄与が示唆された。

ヒ素を気化することが知られている水素資化性メタン生成細菌から、ヒ素の気化を担う酵素群に関して調べるために、ヒ素のメチル化におけるメチル基を供与する物質の特定を行った。*M. formicicum*、*M. bryantii* の細胞抽出物に対し、ヒ素のメチル化におけるメチル基を供与する物質としてアデノシルメチオニン、メチルコバラミンの 2 種の比較を行った。メチルコバラミンを用いた場合は、アデノシルメチオニンの場合の 7-8 倍のメチル化されたヒ素が検出された。このことより、アデノシルメチオニンではなくメチルコバラミンがヒ素のメチル化におけるメチル基の供与に関わっている可能性が分かった。

以上、異なる環境条件における嫌気性消化プロセスおよび水素資化性メタン生成細菌のヒ素の気化特性が示された。また嫌気性消化プロセスのヒ素の気化に対する水素資化性メタン生成細菌の寄与は予想されたほど大きくなく、他の微生物の寄与が大きいことが分かった。またメタン生成細菌におけるヒ素のメチル化ではメチルコバラミンがメチル基を供与する物質であることが支持される結果となった。

(3972 字)