

助成番号 0625

## バイオレメディエーションへの利用を目的とした耐塩性、及び重金属耐性を備えたセレンオキサニオン還元性微生物の分離と重金属セレン酸塩への微生物変換に関する研究

阪口 利文

県立広島大学生命環境学部環境科学科

**概要** セレンにはレアエレメントとして戦略物質の希少性があり、元素としての循環利用技術が必要とされている。そのため、新規の処理技術素材として環境に流出したセレンオキサニオンのバイオレメディエーションや資源回収に微生物の利用をする動きが盛んである。ある種の微生物は毒性の高いセレン酸( $\text{SeO}_4^{2-}$ )や亜セレン酸( $\text{SeO}_3^{2-}$ )などを最終電子受容体としてエネルギーを獲得できる。そこで、本研究では、高塩濃度やカドミウムなどの重金属イオンの存在下においても、セレンオキサニオンを還元し沈澱できうる微生物の獲得について検討した。加えて、毒性の高い重金属であるカドミウムやセレン酸イオンをCdSeなどの含セレンナノ結晶として回収、変換できる可能性について検討し、実試料に適用できるような塩耐性、重金属耐性セレンオキサニオン還元性微生物を用いたセレン除去、さらに含セレンナノ結晶材料の合成による再資源化技術の開発を目的とした。

日本各地の様々な海洋泥質や海洋生物などから海洋環境の塩濃度3% NaClや高塩環境の塩濃度5%、10%において生育可能なセレンオキサニオン還元性微生物株の分離が可能であった。一般的な海洋環境の塩濃度3%のNaClの場合では、セレン酸を単体セレンまで還元できるNZ3-1株、亜セレン酸を還元し、単体セレンを生成できるNZ3-2、NZ3-3株などが分離され、(亜)セレン酸の嫌気代謝によるナノセレン単体結晶粒子への変換が確認できた。泥質の他にもシロギスの体表面から、5%のNaClにおいて亜セレン酸を還元しながら生育できるSK4-1株など合計4株を分離した。また、ホタテの中腸腺(ウロ)から10%のNaClでも亜セレン酸を最終電子受容体として、生育できるHU-1株など少なくとも3株の微生物株を獲得できた。

他方、NaClを加えず1mMのセレン酸と $\text{Cd}^{2+}$ を共存させて得られた集積培養体内、兵庫県西宮市夙川の泥質を接種して得られた集積培養体において、10~50nmの粒径を持つSeとCdで構成される結晶塩が微生物によって形成されていた。更に、セレンオキサニオンの代わりに亜テルル酸と1mMの $\text{Cd}^{2+}$ を添加した場合には、新潟県黒川村の原油湧出地から採取した試料を接種した集積培養体において5~25nmの粒径を持つCdTeのナノ結晶が確認された。また、集積培養体からSM-9株をはじめ数種の微生物株の分離に成功した。これらの純化株のみを同様の条件で培養したところ、集積培養体と同様にCdTeナノ微粒子の合成が確認された。そこで、純化株をアルギン酸ゲルで固定化し、Te、Cd回収用の循環型リアクターを作製した。その結果、運転後、およそ100時間で循環液中の両イオンをCdTeナノ結晶微粒子として回収できることが明らかになった。

### 1. 研究目的、背景

ガラスや家電製品の製造にはセレンなどのレアメタルが多く用いられ、特異的な色彩や電気・光学的挙動を生み出す材料元素として幅広く利用されている(加藤 1995)。また石油や石炭などの化石燃料にもセレンは含まれており、燃焼に伴って環境中に排出されている(Schroeder 1978)。このような工業的利用の副産物として排出されたセレン化合物、たとえばそのアニオン性酸化物質であるセ

レンオキサニオンは高い毒性を有し、生体に対し多くの弊害をもたらす可能性がある。さらに近年では、環境に排出された毒性セレンオキサニオンが水質、地質を汚染し、環境基準値を超えた環境汚染となる事例もしばしばみられている。いわゆる多くの「不良債権土地:ブランフィールド」問題を発生させており、有効な修復手段、素材の開発が望まれている。また、これら有害性と同時に、セレンにはレアエレメントとして戦略物質の希少性、有用性があり、元素

としての循環利用、回収技術が必要とされている。そのため、化学、物理的処理法のみならず新規の処理技術素材として、環境に流出したセレンオキサニオンのバイオレメディエーションや資源回収に微生物の利用をする動きが盛んである。

ある種の微生物は嫌気条件下で、毒性の高いセレン酸( $\text{SeO}_4^{2-}$ )や亜セレン酸( $\text{SeO}_3^{2-}$ )などを最終電子受容体として、生体活動のエネルギーを獲得するということが知られている。これらは(亜)セレン酸還元菌と呼ばれ、セレン化合物をより毒性の低い単体セレン( $\text{Se}^0$ )や亜セレン酸などの酸化度の低いイオン種にまで還元することができる(Stolz & Oremland 1999)。これらの還元能力は、汚染環境の修復(バイオレメディエーション)やセレンオキサニオンの低毒化・物質変換、資源回収といった広い範囲での応用が期待されている。微生物の呼吸によってこれらのセレンオキサニオンは容易に不溶性の単体セレンまでセレンオキサニオンの変換が可能であり、生じたセレン沈殿物を遠心分離やフィルター過などにより容易に除去が可能である。さらに微生物を用いた方法は、化学的及び物理的処理法と比較して安価に浄化を行える方法であると期待されている。現在では様々な環境中の微生物がセレン酸還元能を持つことが知られているが、詳細な研究が実施された微生物種は限られたものであり、(亜)セレン酸還元菌に関しては代謝機構や種系統などの詳しい特性において不明な点が多く、バイオレメディエーションや材料合成への利用を目的とした菌体内外へのセレン粒子の合成過程やその分子メカニズムに関する知見を得るためにも、培養特性などの把握が望まれるところである。加え

て、実試料への微生物の利用には高い塩濃度や毒性重金属イオンの存在が問題となっており、バイオレメディエーションを効率的に図る際の障害となっている。そこで、本研究では、高塩濃度やカドミウム、銅をはじめとする重金属イオンの存在下においても、セレンオキサニオンを還元し沈澱できうる微生物種の獲得について検討する。加えて、毒性の高い重金属であるカドミウムやセレン酸イオンをセレン化カドミウムなどの含セレンナノ結晶として回収、変換できる可能性について検討し、実試料に適用できるような塩耐性、重金属耐性セレンオキサニオン還元性微生物を用いたセレン除去、さらに含セレンナノ結晶材料の合成による再資源化技術の開発を目的とした。

## 2. 研究方法、装置

本研究では、酸素族に分類されるセレン酸などの金属様オキサニオンに対して還元代謝活性を有する新規の塩耐性・重金属耐性微生物を様々な環境から分離し、高塩濃度におけるセレン酸などの酸素族オキサニオンの除去、回収に利用できる生物素材としての利用可能性についての研究を以下の実験手法を用いて遂行した。

### 2.1 セレンオキサニオン還元能を有する塩耐性微生物の集積培養、スクリーニング

セレン酸などの金属様オキサニオンを最終電子受容体として、乳酸もしくは酢酸を電子供与体物質として含み、その他燐酸などの無機塩などから構成される培地に 3%以上(3%, 5%, 10%, 15%, 20%)の塩化ナトリウム濃度を含む集積培地を作製した(Table 1)。

Table 1 Medium composition for enrichment

Reagent	
Sodium acetate, or Lactate	0.6 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.2 g
Cysteine·HCl	0.05 g
Yeast extract (Difco)	0.05 g
Distilled water	1.0 l
Mineral solution*	4.0 ml
NaCl	0~20% wt/vol.

\* Selenium oxyanion such as sodium selenate solution was added at the final concentration of 1 mM.

* Mineral solution	
Sodium nitrilotriacetate	1.8 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.6 g
NaCl	1.0 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.136 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.13 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0146 g
$\text{ZnCl}_2$	0.01 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.01 g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
Distilled water	1.0 l

また、この培地にカドミウム・銅などの有害重金属イオン(主に塩化物塩)を1 mMの高濃度で添加した培地も同時に作製した。これらを窒素ガスによる置換、バブリングによって嫌気状態とした後、分離・集積培地として用いた。なお、これらの培地については、塩化ナトリウムを過剰添加していないものも作製し、微生物の集積状況を比較した。次に、日本各地の海洋環境などから海洋生物を中心に接種試料を採取した。また、塩田、炭坑・鉱山跡地、原油湧出地などからも泥質、水質を収集し、接種試料とした。その後、接種試料に不溶性物や沈殿物の生成、培地の色彩に大きく変化がみられたものを更に継代培養し、スクリーニングをおこなった。微生物の分離には、嫌気ボックスなどを用いる他、嫌気ジャー法、コロニー法などを用いて試料から微生物株の分離、純化を行った(Figure 1)。

## 2.2 セレンオキサニオンの変換効率、元素体セレンへの変換

得られた微生物株に対して、イオンクロマトグラフィー技術などを用いて、添加した重金属やセレンオキサニオン類の除去率、菌体内外から生成される微粒子の生成量などを調査し、微生物株によるこれら金属類の除去、回収効率を求めた。また、一部の分離株については16SrDNAの塩基配列にもとづく系統分類などをおこない、その微生物学的知見についても調査した。

## 2.3 生成微粒子の解析・同定、セレン(テルル)回収リアクターシステムの構築

微生物の培養に伴い、菌体内外に生成したナノ結晶粒子を超音波破碎機もしくは、リゾチーム、プロテアーゼ酵素処理によって抽出した(Figure 2)。その後、蒸留水で洗浄、メンブランフィルターなどを用いて粒径分画された生成微粒子について透過型電子顕微鏡観察の他、X線元素分析、結晶回折など解析を行った。更に、ディスプレインジャーやペリスターポンプなどを利用したフロー型バイオリアクターシステムを試作し、分離微生物を用いた毒性重金属存在下における連続型セレン(もしくは同族であるテルル)の回収について検討した。

## 3. 結果、及び考察

### 3.1 海洋泥質からのセレンオキサニオン還元性微生物の分離と培養

日本各地の様々な海洋泥質や海洋生物などから海洋環境の塩濃度である3% NaClや高塩環境の塩濃度である5%、10%において生育可能なセレンオキサニオン還元性微生物株の分離が可能であった。まず、一般的な海洋環境の塩濃度である3%のNaClを含む培地からは、セレン酸ナトリウムを単体セレンまで還元できるNZ3-1株、亜セレン酸ナトリウムを還元し、単体セレンを生成できる

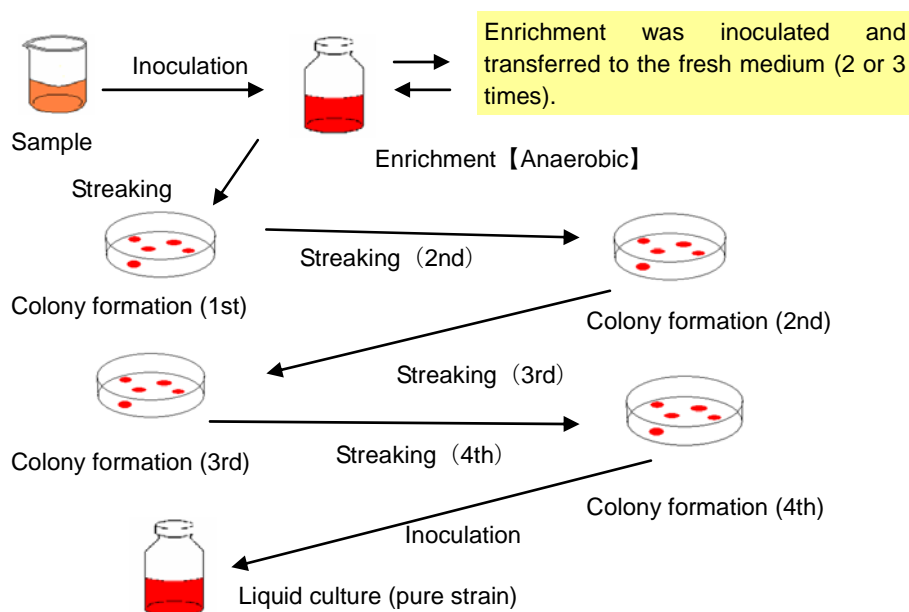


Figure 1 Screening procedure for the isolation of pure strain.

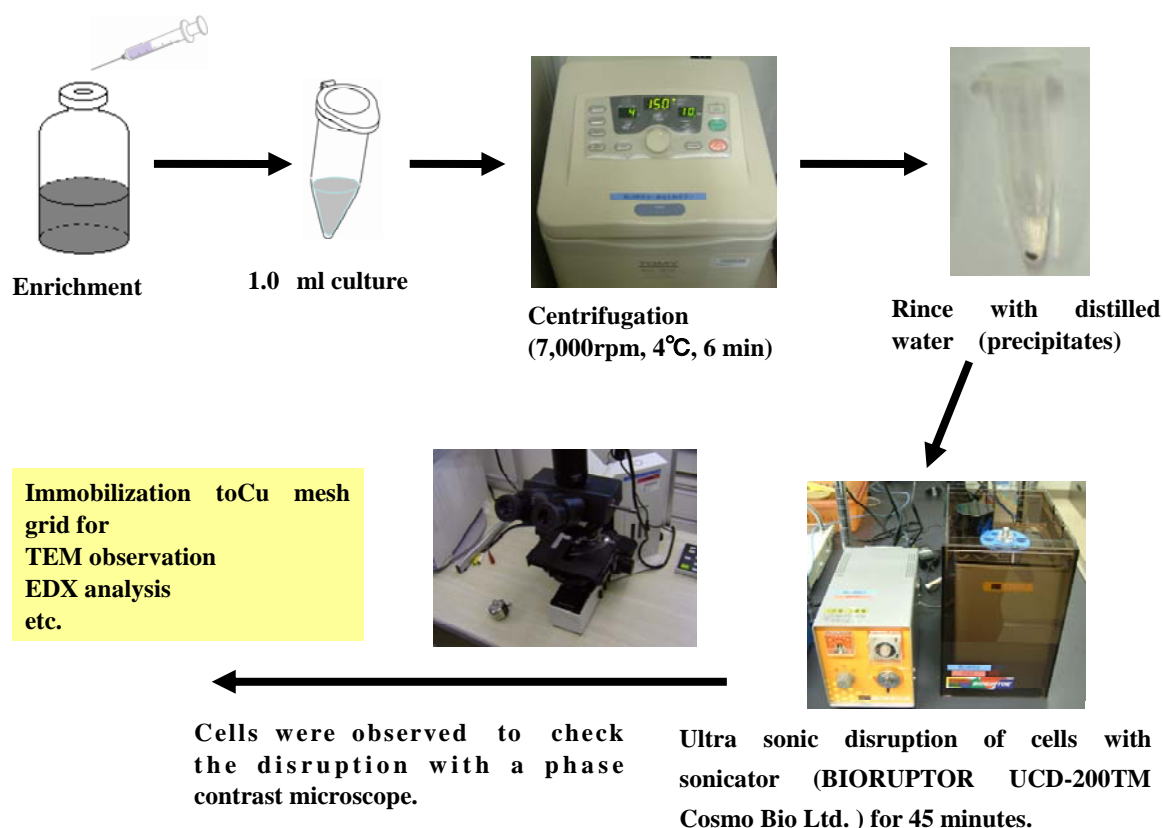


Figure 2 Extraction procedure for bacterial nano-particle precipitates.

NZ3-2, NZ3-3 株が長崎県福島の海洋泥質から分離された (Figure 3)。これらはいずれも大きさが2~3  $\mu\text{m}$  のグラム陰性短桿菌であった。この他にも有明海、日本海、瀬戸内海、太平洋沿岸から採取された泥質から同様に多くの (合計20数株) グラム陰性短桿菌のセレンオキシアニオン還元性微生物の分離株を獲得できた。全体的な傾向として、これらの分離株の多くが、セレン酸よりも亜セレン酸に対して強い還元能を有しており、海洋泥質においては亜セレン酸を単体セレンまで還元できる微生物が多く分布していると考えられた。さらに、これらの菌体をネガティブ染色法によって染色し、透過型電子顕微鏡で観察を行った。その結果、菌体には電子線を通さない約300 nmセレンのみで構成される球状微粒子が形成されており、(亜)セレン酸の嫌気代謝によって、ナノサイズのセレン単体結晶粒子の形成が行われていることが明らかになった (Figure 3)。さらにこれらの微粒子から回折像が得られたことから、結晶体の微粒子であると示唆された。また、セレンオキシアニオンの減少モル量に相当する単体セレンの形成が確認され、これらの培養液中からの単体セレンの回収は可能であり、遠心分離などによって容易にセレンを除去できること

が確認された。

泥質の他にも、海洋生物の体内器官や体表面からも5%もしくは10%のNaCl濃度で良好に生育しながら、セレンオキシアニオンを還元できる微生物株を見出すことができた。中でも、日本海から得られたシロギス (*Sillago japonica*) の体表面のぬめりから、5%のNaCl存在下において亜セレン酸を還元しながら生育できるSK4-1株など合計4株の亜セレン酸還元性微生物の分離が可能であった。また、このほかにも貝類のタマキビ (*Littorina (Littorina) brevicula*) の内臓、ホタテ (*Patinopecten yessoensis*) の中腸腺(ウロ) (Figure 4) から10%のNaCl存在下でも酢酸を炭素源としながら亜セレン酸を最終電子受容体として、生育できるHU-1株など少なくとも3株の微生物株の獲得に成功した。これらはいずれも嫌気状態で大きさが2~3  $\mu\text{m}$  のグラム陰性と思われる短桿菌であった (Figure 5)。

これらの分離株の他にも、国内の塩田(石川県:揚浜式塩田、香川県:入浜式塩田)などの試料から、5~15%のNaCl濃度の間でセレンオキシアニオンとりわけ亜セレン酸を還元しながら生育すると思われる微生物群からなる集積培養体の形成が確認され、高塩濃度耐性の亜セレン酸還

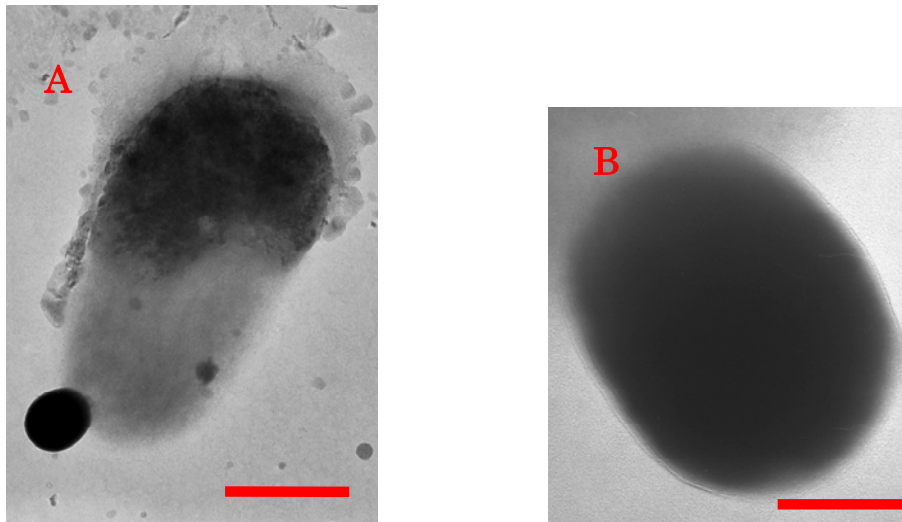


Figure 3 TEM observation of selenate-reducing pure isolate (strain NZ3-1) from marine sediment in Nagasaki (A: Cell, B: Bacterial Se precipitate). (Bars indicate A: 500 nm and B: 100 nm respectively)



Figure 4 A mid-gut grand of scallop (*Patinopecten yessoensis*).

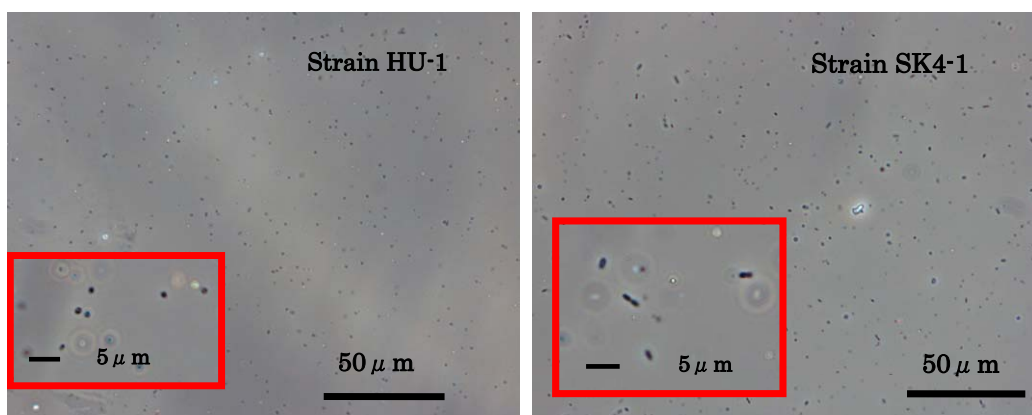


Figure 5 Selenite-reducing pure isolates (strains HU-1 and SK4-1) from marine organisms.



元微生物の存在が予想されたが、プレート法による分離株の獲得までには至らなかった。また、1 mM のカドミウムなどの重金属イオンを添加した試料からはいずれも、安定した集積培養体が形成されず、今回の研究では 5%以上の NaCl、1mM の重金属存在下でセレンオキシアニオンを還元しながら生育できる海洋もしくは高塩濃度環境由来の微生物を獲得することはできなかった。

### 3.2 セレン酸、及びカドミウムイオンのセレン化カドミウム塩への微生物変換

前節に対して、NaCl を加えずセレン酸(1 mM)及び塩化カドミウムなどの重金属(1 mM)を共存させた培地に様々な泥質試料を接種したものは、多くの集積培養体が形成され、継体試料においても安定した微生物や沈殿物形成が確認された(Figure 6)。これらの内、比較的安定して集積培養体の継代が可能である兵庫県西宮市夙川の泥質を接種して得られた集積培養体に形成される沈殿物について電子顕微鏡観察、元素分析を行ったところ、10~50 nm の粒径を持つセレンとカドミウムで構成される結晶塩であることがあきらかとなった(Figure 7)。これらの結果から、夙川の泥質試料を接種して形成された集積培養体にはセレン酸イオン、カドミウムイオンをセレン化カドミウムに変換できる微生物群が存在していると考えられた。さらにこの試料から微生物の分離、純化株の取得につい

て検討したところ、*Acetonea longum* に対して 92%の相同性を有する純化株(CdSeSR-1)が得られた。現在のところ、純化株のみを培養することによってセレン酸、およびカドミウムを安定にセレン化カドミウムに変換できず、CdSe 微粒子の合成には数種の微生物の複合的な関与が必要ではないかと考えられた。

### 3.3 微生物による CdTe 合成とバイオリクターによるテルル、カドミウムの同時回収

セレンオキシアニオンの代わりに同族元素の酸化物アニオンである亜テルル酸と 1 mM のカドミウムイオンを添加した培地に新潟県黒川村の原油湧出地から採取した試料を接種した集積培養体からは安定に黒色沈殿を形成するものが出現し、CdTe の微生物合成の可能性が示唆された。そこで、この集積培養体に形成された微粒子を抽出し、電子顕微鏡観察、元素分析を行ったところ、5~25 nm の粒径を持つ微粒子で構成される凝集体の存在が観察され、テルルとカドミウムで構成されていることが元素分析から判明した(Figure 8)。

また、回折像が得られたことから結晶性の微粒子であることが明らかとなった。さらに標準物質のテルル化カドミウム結晶微粒子(バルク体)との回折像を撮影し、カメラ常数などを決定し、各ミラー指数における格子面間隔を比較したところ、集積培養体から抽出されたナノ微粒子の格子面

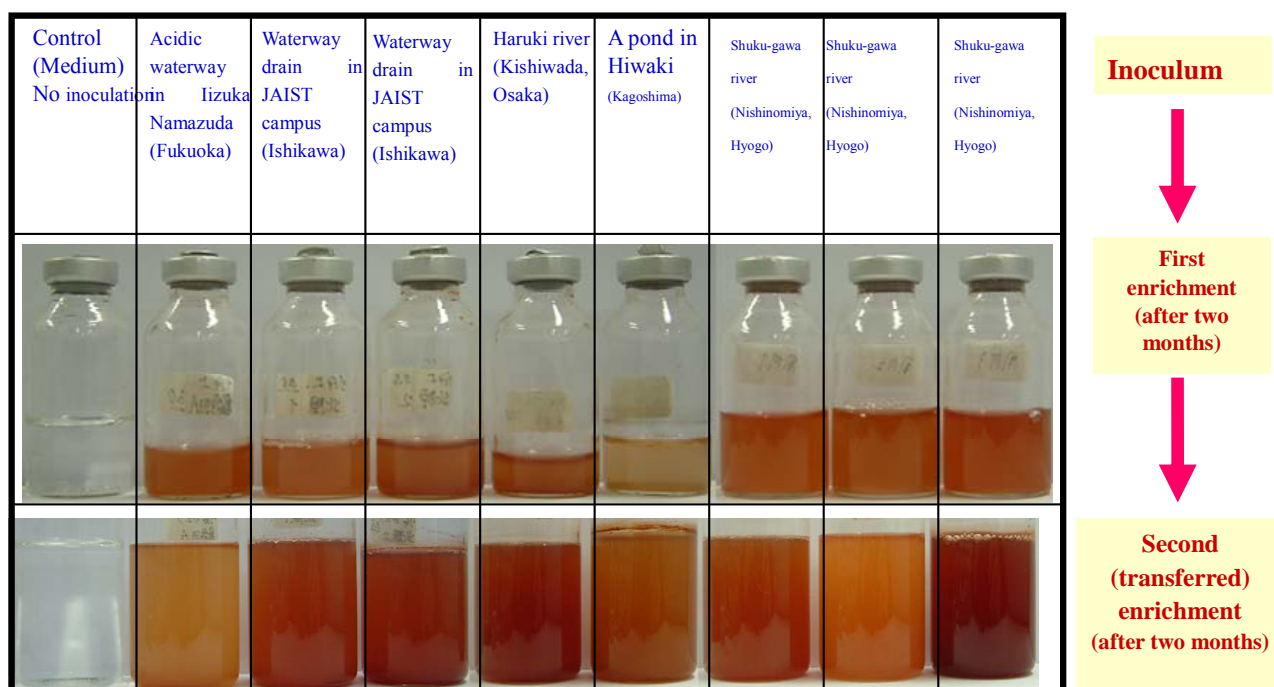


Figure 6 Appearance change in enrichments contained 1 mM selenate and 1mM Cd<sup>2+</sup>.

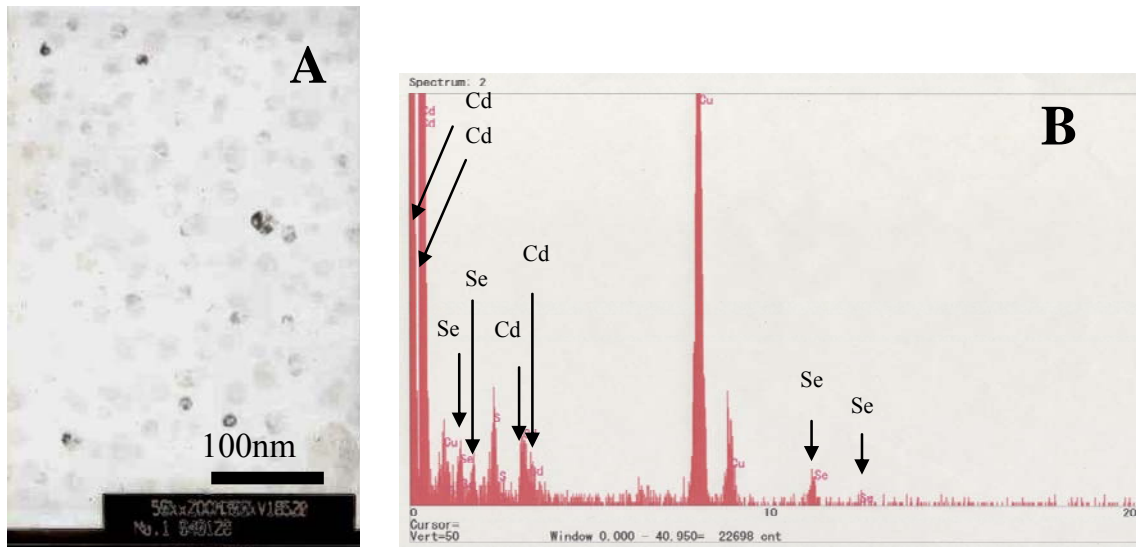


Figure 7 TEM and EDX analyses of biogenic precipitates in the enrichment (Shukugawa).  
 (A: HRTEM observation, B: EDX elemental analysis, Hitachi H-9000NAR)  
 Cu signals are from the mesh grid.

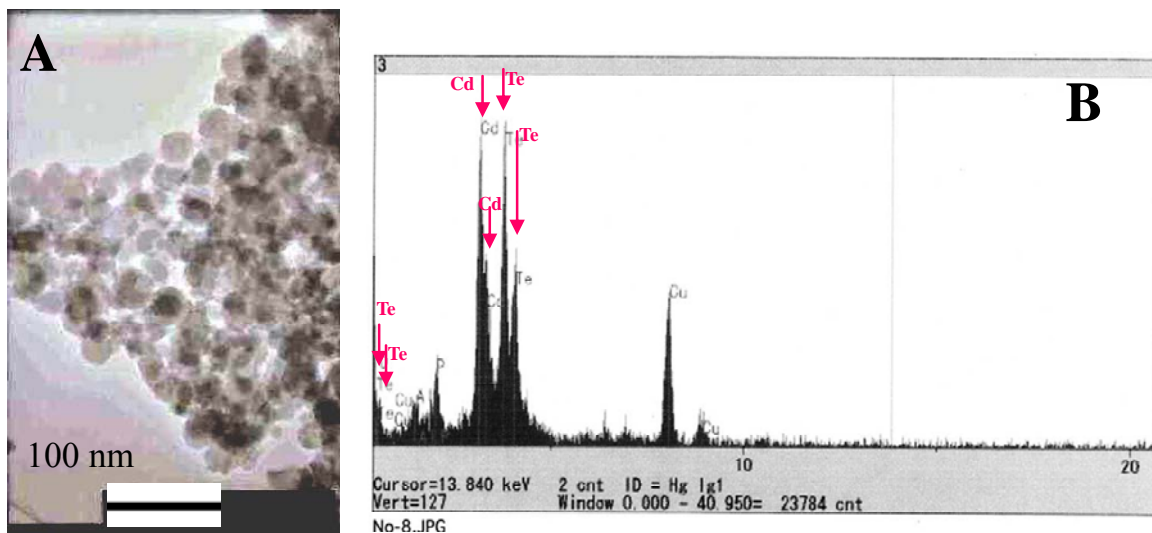


Figure 8 TEM and EDX analyses of biogenic precipitates in the enrichment (Kurokawa).  
 (A: HRTEM observation, B: EDX elemental analysis, Hitachi H-9000NAR)  
 Cu signals are from the mesh grid.

間隔は標準物質(CdTe)の閃亜鉛鉱構造の格子面間隔のデータと一致した。この結果から、抽出された微粒子はCdTeのナノ結晶であることが確認された。さらに、CdTeの合成が確認された集積培養体から、純化株の獲得について検討したところ、SM-9株をはじめ数種の微生物株の分離に成功した。これらの純化株のみを同様の条件で培養し、合成された微粒子を抽出後、電子顕微鏡観察、元素分析、回折像の解析を行ったところ、集積培養体と同様に

CdTe ナノ微粒子の合成が確認された。そこで、この純化株をアルギン酸ナトリウムゲルで固定化し、循環型リアクターを作製することで、テルル、カドミウムの同時回収リアクターを構築した(Figure 9)。このリアクターを運転し、それぞれ1 mMの亜テルル酸、カドミウムイオンの回収を行ったところ、リアクター運転後、約4日(およそ100時間)で循環液中の両イオンをCdTeナノ結晶微粒子として回収できることが明らかになった。

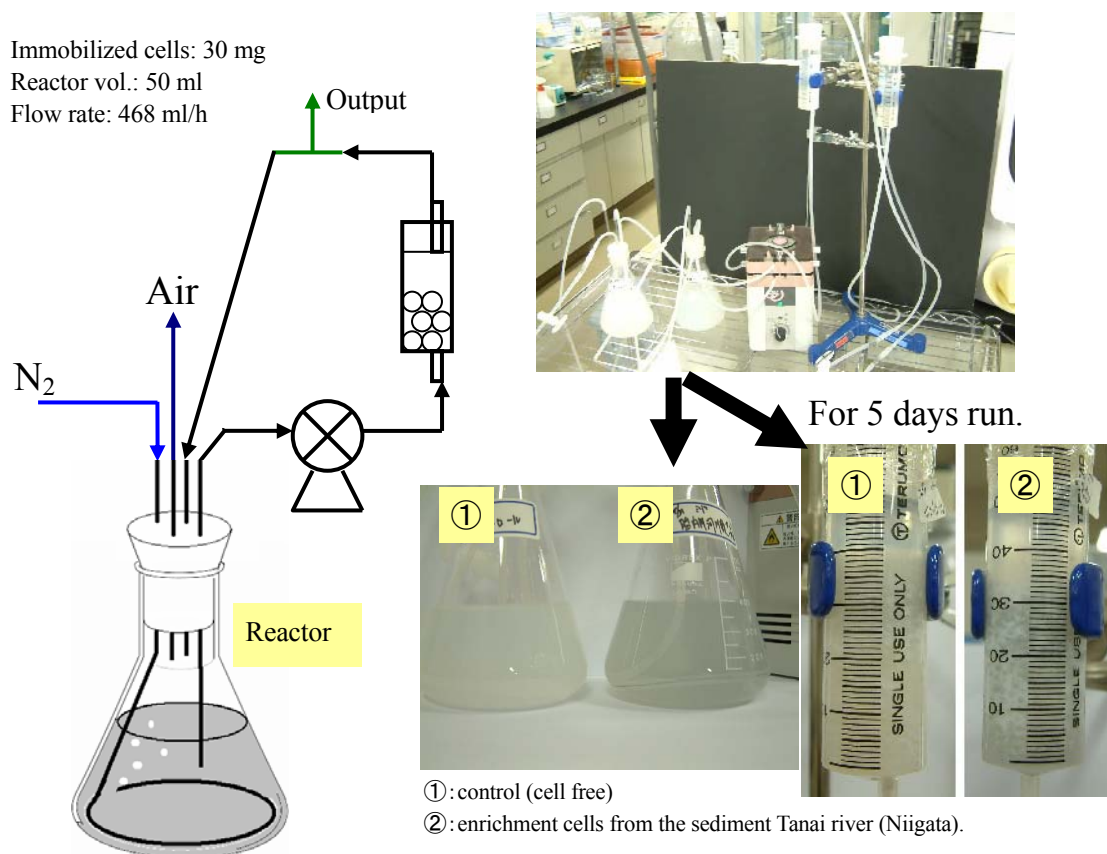


Figure 9 Flow type bioreactor system for simultaneous removal of Te and Cd.

#### 4. 今後の課題(まとめ)

本研究では、バイオレメディエーションへの利用を踏まえ、酸素族のセレン(テルル)の微生物回収を目的として、様々な海洋環境、海洋生物から NaCl 耐性を有し、セレンオキシアニオンを還元できる微生物株の獲得、ならびにその還元機構を利用したセレン(テルル)オキシアニオンと重金属イオンの重金属セレン(テルル塩)の形成の可能性について研究を遂行した。結果的に目的とするいくつかの分離株が得られたが、最終目的である5%以上のNaCl耐性、並びに1 mM程度の重金属(カドミウムイオン)耐性を有し、重金属セレン塩を合成できる微生物株の獲得には至らなかった。今後はさらにスクリーニングを継続させることで目的株の獲得を目指したい。また、得られた純化株に対する系統分析が現在ところの不十分であり、新規の微生物であることが予想されることから早急に16SrDNAにもとづく解析を実行したいと考えている。さらに、純化微生物株、集積培養コンソーシアによるバイオレメディエーション、元素資源回収をリアクターなどのモデルシステムを用いて評価、実行する必要があると考えている。

#### 参考文献

- 1) 加藤 勇、(1995) 五訂 公害防止の技術と法規 “3 水質関係有害物質処理技術” pp.281~282, 公害防止の技術と法規編集委員会 編, 丸善株式会社, 東京.
- 2) H. J. Schroeder (1978) 環境汚染物質の生体への影響 4 セレン “4. 循環” pp.44, 桜井 治彦, 土屋 健三郎 訳, 東京化学同人, 東京.
- 3) J. F. Stolz and R. S. Oremland (1999) Bacterial respiration of arsenic and selenium. FEMS Microbial Rev. 23, 615-627.

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、高分解能透過型電子顕微鏡に微粒子観察、EDX、結晶回折による解析におきまして、北陸先端科学技術大学院大学(現大阪大学)民谷栄一教授、ならびに同ナノマテリアルセンター東峰孝一技官には御協力を賜りました。この場を借りまして感謝申し上げます。



No. 0625

## Isolation and Characterization of Salt-Tolerant Selenium-Oxyanion-Reducing Microorganisms for Microbial Formation of Selenium Containing Heavy Metal Salts and the Application to Bioremediation Fields

Toshifumi SAKAGUCHI

Department of Environmental Sciences, Prefectural University of Hiroshima

### Summary

Selenium is one of metalloid element widely distributing in terrestrial ores and aquatic zones on the earth. It is found in a variety of chemical forms in soil, sediment, ground water, and biological components. Its soluble oxyanions as selenate and selenite are lethal toxicants to animals, and cause the serious toxication and carcinoma. Although metalloid elements such as selenium can be essential to industrial material production as rare earth element, the effective recovery method of these released or contaminated elements have not been required. Further research should explore the biological function which can apply to develop the recovery and recycling technology. In this study, we have isolated and characterized newly isolated selenium-oxyanion-reducing bacteria from various marine organisms and environments. Furthermore, microbial formation of CdSe and CdTe has been carried out and we have attempted and performed the simultaneous removal of potassium tellurite and cadmium chloride due to conversion to CdTe crystal with anaerobic reactions of microbial consortia and its isolates.

Many short rod-shaped, selenate or selenite-reducing bacteria were isolated from marine sediments which were not contaminated with selenium or from marine organisms such as whiting fish and scallop. The one of isolate, strain NZ3-1 was able to reduce selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) to elemental selenium ( $\text{Se}^0$ ) under anaerobic conditions. TEM observation of the red cells grown under anaerobic conditions showed that nano-sized crystalline elemental selenium was deposited in their cells. Many soil and sediment samples were collected from terrestrial, freshwater and marine environments. These samples were inoculated to the anaerobic isolation medium contained at 1 mM of  $\text{SeO}_4^{2-}$  (or  $\text{TeO}_3^{2-}$ ) and  $\text{CdCl}_2$  respectively. EDX analysis and HRTEM observation showed the microbial depositions in the enrichments were nano-sized particles that were composed of Cd and Se (or Te) with 5 to 25 nm in diameter. Furthermore, we have obtained pure isolates from enrichments, which can sustain in the presence of 1 mM of  $\text{TeO}_3^{2-}$  and  $\text{CdCl}_2$  respectively. HRTEM, EDX and electron diffraction analyses on the produced particles indicated that microbial formation of CdTe with sphalerite (zincblende) structure has been achieved.