

地下水ヒ素汚染メカニズム解明に向けた微生物によるヒ素溶出実験と遺伝子解析・脂肪酸分析

As-releasing experiments and gene analysis and fatty acid analysis of the cultured microbes

赤井 純治[1], 長沼 毅[2], 兼清 温子[3], 菱田 直人[4]
Junji Akai[1], Takeshi Naganuma[2], Atsuko Kanekiyo[3], Naoto Hishida[4]

[1] 新潟大・理・地質, [2] 広大・院・生物圏, [3] 広大・生学, [4] 広大・生物生産

[1] Departm. Geol. Fac. Sci. Niigata Univ., [2] School of Biosphere Sci., Hiroshima Univ., [3] Faculty of Applied Biol. Sci., Hiroshima Univ., [4] Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima Univ

バングラデシュ等での地下水ヒ素汚染は極めて深刻な環境問題である。ヒ素の濃集、溶出、汚染水浄化で、微生物-鉱物相互作用が重要な役割を果たし働いていると考えられる。バングラデシュの汚染地下水の一般的な特徴は高濃度ヒ素の他に、2価鉄（数ppm~10ppm以上）、アンモニア（数ppm~17ppm）、リン酸イオン（数ppm~）が非常に高く、重炭酸イオンも高濃度（300~500ppm）である。

溶解実験：シャムタ村ボーリングコアの堆積物中（ヒ素の含有量は36.8mg/kg；また用いた泥のなかのヒ素の存在形態は、Acid soluble form 1.7 mg/kg；Reducible form 10.4 mg/kg；Organic form 6.2 mg/kg；Insoluble form 13.2 mg/kg；Total As 36.8mg/kg）20gに対し、蒸留水 300cc グルコースを 0.15g 加えて、その変化をみた。これの添加後、3日後（A）と5日後（B）には、溶出ヒ素量、ORP値は 以下のようである。

(A)	3日後	As	0.2ppm	ORP値	-456 mV	
(B)	5日後	As	0.3ppm	ORP	-46 mV	このうち、

5日後のサンプル（B）について、増殖したバクテリアを以下のように解析した。

遺伝子解析：サンプルからのDNA抽出はMO BIOのUltraClean Soil DNA Isolation Kitを用いた。抽出したDNAから系統分類用の遺伝子（16S rDNA）をPCR反応を用いて増幅し、得られたPCR産物をTOPO TA Cloning Kitを用いてpCR2.1TOPO（vector）の中に組み込み、キットに付属しているEscherichia coliにとりこませ形質転換をおこさせた。58クローンのプラスミドを回収し、その内28クローンの塩基配列を読み、系統解析を行なった。サンプルBについて、系統分類用の遺伝子（16S rDNA）をランダムに30個拾い、塩基配列を決定したところ、5グループが確認でき、これらは全て、クロストリジウム属に分類される細菌の遺伝子であることがわかった。Clostridium beijerinckiiのある株は鉄還元をするとされるが、この遺伝子解析では特定できなかったため以下の脂肪酸分析をあわせて行った。

脂肪酸分析：鉄還元菌の脂肪酸マーカー（分枝一価不飽和脂肪酸）を検討した。ECLというGC指標を用い、既存データの中から分枝一価不飽和脂肪酸の（推定的）同定と定量を行い、脂肪酸組成比が得られた。また偶数直鎖脂肪酸または分枝脂肪酸を主とする細菌群を大別した表も得られた。バイオマーカー脂肪酸を元に微生物相を推定した。

B試料：直鎖脂肪酸（16;0と16;1）や硫酸還元細菌のバイオマーカー（14;0、i15;0、a15;0）が見られ、また、鉄還元能をもつClostridium属にみられる脂肪酸（18;1?9cis）がA試料に比し、B試料では100倍以上にも増加していることがわかった。このことからグラム陽性細菌の直鎖型の細菌群（Clostridium属など）や硫酸還元細菌が特に増殖したと考えられる。

また、詳細はのちに報告するが、エアレーションだけを行ってもヒ素は溶出せず、本実験の結果から還元条件下でヒ素溶出が実験的に証明されたことになる。そして本実験で、この還元条件をつくりヒ素溶解に寄与しているバクテリアは、クロストリジウムを主体としているものであることがわかった。天然でもこのグルコースに相当するものが堆積物中に存在あるいは付加されるならばヒ素溶出がありうると考えられる。