

## 生物学的フェントン法における OH ラジカルの検出に関する研究

早稲田大学 正会員 ○稲垣 嘉彦  
ベトナム国立農業大学ハノイ校 Vo Huu Cong  
早稲田大学 学生会員 Li Cheng  
早稲田大学 正会員 榊原 豊

### 1. はじめに

筆者らは植物が産生する過酸化水素を利用して、鉄化合物の添加条件下で、ペンタクロロフェノール(PCP)などの難分解性有害物質を分解・無害化する生物学的フェントン法を提案した (Reis and Sakakibara, 2012)。しかし、二価鉄イオン ( $\text{Fe}^{2+}$ ) を用いると植物体内の全域で OH ラジカルが生成され植物自体が損傷を受けるため、鉄添加量によっては処理が安定しないこと、また水酸化第二鉄の沈殿物が処理槽内に蓄積する等の問題があった。本研究では、不均一鉄触媒としてコロイド粒子状の酸化鉄を用いて、生物学的フェントン法における OH ラジカルの検出を目的に研究を行った。

### 2. 実験方法

#### 2.1 鉄化合物の調製

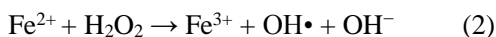
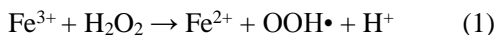
マグネタイト粒子は Feng ら (2013) の方法を参考にして、窒素雰囲気下で  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  および  $\text{FeCl}_3$  を鉄モル比 2 : 1 になるように混合し調製した。凝集を防ぐためジメルカプトコハク酸を添加し、粒子表面を覆った。コロイド粒子状  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  粒子は  $\text{FeCl}_3$  を用いて調製した。飽和  $\text{FeCl}_3$  溶液 [9.2 g/10 mL (20°C)] を用意し、それを沸騰させた蒸留水で攪拌しながら 100 倍に希釈した。鉄化合物の粒径分布は動的光散乱粒径分析器 (LB-550, HORIBA) を用いて測定した。

#### 2.2 蛍光観察

蛍光試薬 APF はそれ自体蛍光を発しないが、OH ラジカルと反応することで蛍光物質に変化する。なお過酸化水素やスーパーオキンドなど他の活性酸素種との反応は無視できる (Setstukinai et al., 2003)。浮遊植物 (*Phyllanthus fluitans*) 0.35g (湿潤重量) を、APF (5 $\mu\text{M}$ ) および鉄粒子 (マグネタイト粒子の場合 10mg Fe/L, コロイド状  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  の場合 5 mg Fe/L) を含んだリン酸緩衝液 (pH 7.4) に添加し、1 日以上放置した。その後植物試料を取り出し、蒸留水で洗浄した後、励起波長 490 nm、蛍光波長 515 nm で蛍光顕微鏡 (BX60, Olympus) を用いて観察を行った。画像は顕微鏡に接続したデジタルカメラ [Moticam 1000 (1.3MP), Motic, China] を通じて取得した。

### 3. 実験結果及び考察

図 1 (a) にマグネタイト粒子及びコロイド状  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  粒子の粒径分布を示した。粒径は数十 nm から数  $\mu\text{m}$  の範囲内にあることが分かる。中央値はマグネタイト粒子が 0.67  $\mu\text{m}$  で、コロイド状  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  粒子は 0.04  $\mu\text{m}$  であった。図 1 (b) (c) に蛍光顕微鏡による観察結果を示す。植物内の維束管表面あるいは根表面などで蛍光が生じていることが分かる。以下に三価鉄から OH ラジカルが生成されるまでの反応式を示す。



キーワード 生物学的フェントン法, 水生植物, 不均一鉄触媒

連絡先 〒169-8555 東京都新宿区大久保 3 丁目 4 - 1 早稲田大学創造理工学部社会環境工学科 TEL 03-5286-3902

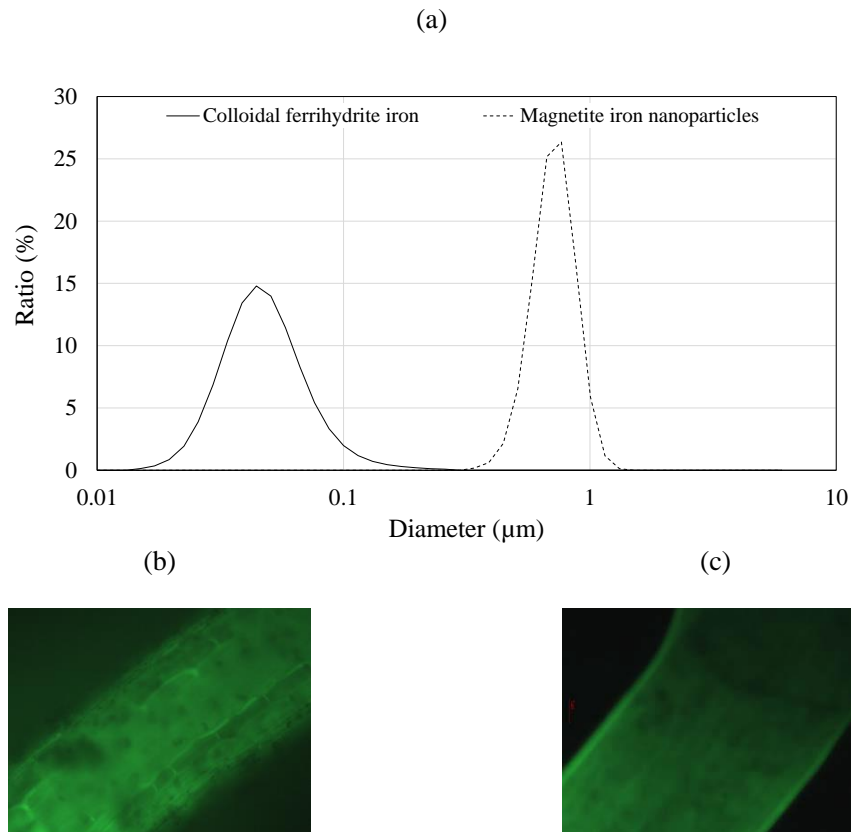


図1：粒径分布図 (a) および水生植物の蛍光画像：(b) マグネタイト粒子を用いた場合 (c) コロイド状 Fe(OH)<sub>3</sub> 粒子を用いた場合

コロイド粒子状の酸化鉄（水酸化第二鉄あるいはマグネタイト）を用いると、律速段階にあるフェントン様反応 [反応式(1)] によって三価鉄が二価鉄に還元され、同時にフェントン反応 [反応式(2)] が連続して進行し OH ラジカルが生成されたと推察される。不均一鉄触媒を用いることで生物学的フェントン反応を中性域で進行させることができるため、従来の二価鉄を用いた場合に比べ、植物細胞への損傷が少なくなり浄化安定性が向上すること、また鉄化合物の連続供給が不要になることが期待できる。結果として、植生浄化能力を格段に向上させることができると考えられる。

#### 4. まとめ

OH ラジカルの検出プローブである蛍光試薬を用いた観察から、コロイド状の水酸化第二鉄、あるいはマグネタイトなどの鉄微粒子を用いると、植物内の維管束表面あるいは根表面などで蛍光が生じた。この結果から、生物学的フェントン様反応および生物学的フェントン反応が進行し OH ラジカルが生成されることが示唆された。

#### 謝辞

本研究の一部は科学研究費基盤 B (No. 24360219) の助成を受けて実施した。

#### 参考文献

- Feng, Y.; Cui, X.; He, S.; Dong, G.; Chen, M.; Wang, J.; Lin, X. The role of metal nanoparticles in influencing arbuscular mycorrhizal fungi effects on plant growth. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47* (16), 9496–9504.
- Reis, A. R.; Sakakibara, Y. Enzymatic Degradation of Endocrine-disrupting Chemicals in Aquatic Plants and Relations to Biological Fenton Reaction, *Water Sci. Technol.*, **2012**, *66* (4), 775–782.
- Setsukinai, K.; Urano, Y.; Kakinuma, K.; Majima, H. J.; Nagano, T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (5), 3170–3175.