

## *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株による重金属混合汚染土壤中 6 価セレンのバイオレメディエーション

株式会社ケー・エフ・シー (正)○大塚治,(正)西里亮,(正)奥野稔,(正)武藤宏行  
芝浦工業大学工学部応用化学科 (非)山下光雄

### 1. 目的

トンネル工事に伴って発生する土や掘削ずりには自然由来の重金属が含まれることがある。その土に含まれる重金属が雨水で溶出し、その雨水が地下水に混入することで汚染範囲と健康被害が拡大することが懸念される。この健康被害を防止するために土壤汚染対策法の施行により、自然由来であっても環境基準値を超えた重金属を含む土壤の対策処理が必要となった。重金属の中でもセレン(Se)は主に火山堆積物に含まれ、日本では低濃度で広く分布している<sup>1)</sup>。セレンは土壤中で可溶性の 6 価セレン、4 価セレンとして存在している<sup>2)</sup>。自然由来のセレン汚染は単独で環境基準を超過する例は珍しく、多くはセレンと同時にヒ素や鉛も環境基準を超過する。土中のヒ素や鉛を不溶化するために鉄系薬剤が使用されている。しかし鉄系薬剤は 6 価セレンに対して反応性が低く処理が困難である。そこで現状の処理方法に代わる新たな 6 価セレン汚染土壤浄化方法が望まれており、生物の特異的な金属代謝を利用したバイオレメディエーションが提案されている。

筆者らは可溶性の 6 価セレンを不溶性の元素態セレンまで還元する好気性セレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を単離している。これまでに NT-I 株培養液を使用したバイオレメディエーションにより、幅広い培養条件で土中の可溶性セレンを環境基準値未満まで不溶化できることを報告した<sup>3)</sup>。しかし、NT-I 株の 6 価セレン還元能が重金属元素によってどのような影響を及ぼすかについての報告はない。そこで本報告ではヒ素(As)、鉛(Pb)、カドミウム(Cd)が共存する条件で 6 価セレン還元試験をおこない、NT-I 株のセレン酸還元能の特徴を調べた。次いでヒ素、鉛、6 価セレンの重金属 3 種混合汚染土壤を作製し、土中の 6 価セレンを NT-I 株によって不溶化できるか検証した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 重金属元素共存条件での 6 価セレンの還元試験

*Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を寒天培地から 1 白金耳コロニーをかきとり、50 mL の TSB 培地(pH7.0)に植菌し 38°C、24 時間振とう培養し、前培養液とした。100 mL 容量フラスコ中に 6 価セレンを終濃度 40mg/L 含む TSB 培地と前培養液 500 $\mu$ L を加えて本培養とした。本培養で使用する TSB 培地に As(III),As(V),Cd(II),Pb(II) をそれぞれ終濃度 100mg/L で添加した。38°C で振とう培養し、経時的に試料を採取し 6 価セレン濃度をイオンクロマトグラフィーによって分析した。

#### 2.2 模擬汚染土壤作製と土中 6 価セレン不溶化試験

ヒ素と鉛を含む掘削ずりを乳棒と乳鉢で砕き、1mm 以上 2mm 以下となるよう篩分けをした。この掘削ずりにセレン酸ナトリウム水溶液を土壤溶出量が 0.02 mg/L となるように添加し、72 時間風乾させたものを模擬汚染土壤とした。この模擬汚染土壤に OD<sub>600</sub>=1.0、pH7.0 の NT-I 株培養液を土壤重量の 10% 添加し、20°C で静置養生した。NT-I 株培養液を模擬汚染土壤に添加してから 0~72 時間目の試験土壤を採取した。採取した試験土壤は 50°C の恒温器で 2 時間乾燥し、土壤溶出試験を行った。対照実験は無菌の TSB 培地を同条件で添加養生し、同様な土壤溶出試験を行った。

#### 2.3 土壤溶出試験

土壤溶出試験は環境省告示第 18 号に定められた試験方法を一部修正し用いた。具体的には乾燥した試験土壤を 5.0g 定量し、50 mL の純水で 6 時間振とう溶出した。溶出液をフィルターろ過にて模擬汚染土壤を取り除き検液とした。検液中の各元素濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析装置にて定性定量した。分析を 3 回おこない、平均値を土壤溶出量とした。

キーワード：土壤処理、セレン、*Pseudomonas stutzeri* NT-I、バイオレメディエーション

連絡先 〒347-0010 埼玉県加須市大桑 1 丁目 19 株式会社ケー・エフ・シー加須技術研究所 TEL (0480)76-0095

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1 重金属元素共存条件下での6価セレンの還元試験

図1に重金属元素 100mg/L 共存時の6価セレン経時変化と NT-I 株菌体数を示す。As(V), Pb(II)が共存していても NT-I 株は6価セレンを約6時間で還元でき(図1(a)), 菌体数も6価セレンだけを添加した場合と同様に増殖した(図1(b))。したがって As(V)や Pb(II)は NT-I 株の6価セレン還元能に悪影響を及ぼさないことがわかった。As(III)が共存する場合, NT-I 株は6価セレンの還元が始まるまでに12時間を要したが48時間目までには初発濃度の80%以上を還元できた。これは NT-I 株の増殖に12時間を要したことが原因だと示唆された(図1(b))。24時間後には6価セレンだけを添加した場合と同等の菌体数まで増殖した。このことから As(III)は NT-I 株増殖には悪影響を及ぼすが, 6価セレン還元能にはほぼ影響がないと考える。Cd(II) 共存時では NT-I 株は6価セレンを全く還元せず, 菌体増殖もしなかった(図1)。したがって 100mg/L の Cd(II)は NT-I 株の増殖阻害因子だと示唆された。水溶液中では As(III), As(V), Pb(II)は6価セレンの還元に影響がないことから, As(III), As(V), Pb(II)同時汚染であっても NT-I 株は土壌中の6価セレンを還元できると推測された。

#### 3.2 模擬汚染土壌中6価セレンの不溶化試験

ヒ素 0.07mg/L, 鉛 0.06mg/L が含まれている掘削ずりに Se(VI)を 0.02 mg/L となるよう添加してヒ素, 鉛, 6価セレン混合模擬汚染土壌を作製した。この模擬汚染土壌に NT-I 株培養液を添加し, 経時的に土壌溶出量を調べた。無菌の TSB 培地を添加した対照実験では72時間たってもセレン, ヒ素, 鉛の溶出量は環境基準値 (0.01 mg/L) を下回ることはなかった(図2)。一方で NT-I 株培養液を添加するとセレン溶出量が低減し24時間後には環境基準値を達成した(図2(a))。ヒ素溶出量は対照実験同様に変化なかったが, 鉛溶出量は環境基準値に達しなかったが初発時の約60%低減した(図2(c))。これは NT-I 株の代謝産物と鉛が反応し不溶性となったと推測される<sup>4)</sup>。

#### 4. まとめ

本報告によって NT-I 株は6価セレンと As(III), As(V), Pb(II)の同時汚染であっても6価セレンの還元に影響がないことを明らかにした。また 100mg/L の Cd(II)は NT-I 株にとって増殖阻害因子だと示唆された。さらにヒ素, 鉛, 6価セレン混合汚染土壌に対して NT-I 株を添加すると土中のセレン溶出量を基準値以下まで低減できること, 基準は達成していないが鉛の溶出量が低減することがわかった。今後は本技術の実用化に向けて作業工程の少ない簡便な処理方法を検討していく。

**参考文献** 1) T. Mizutani *et al.*, *J. Health Sci.*, 47, pp.407-413, 2001. 2) Y. Kang *et al.*, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 39, pp.331-337, 1993. 3)大塚 他, 令和2年度土木学会年次学術講演会. 4) C.C.C. Waite. *et al.*, *PLOS ONE*, 15(10), pp.1-17, 2020.

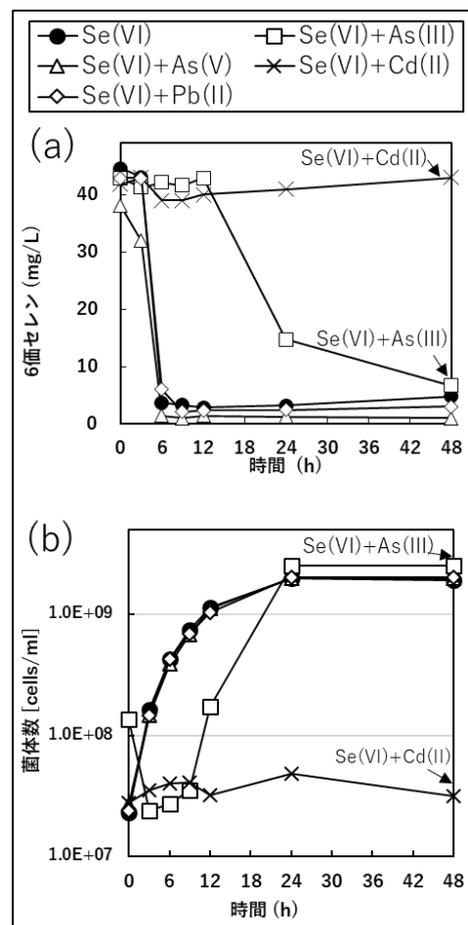


図1 重金属元素100mg/L共存時の (a)6価セレン, (b)NT-I株菌体数の経時変化

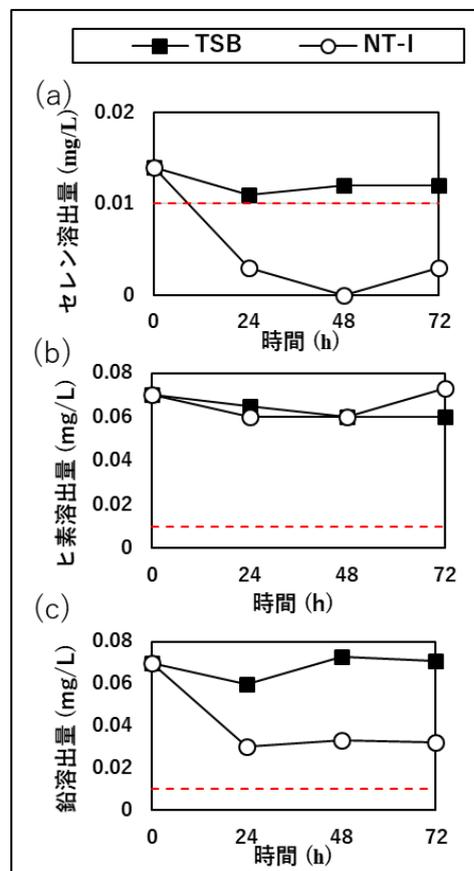


図2 混合汚染土壌中の (a)Se, (b)As, (c)Pb溶出量経時変化