



Tokyo Gakugei University Repository  
東京学芸大学リポジトリ

<http://ir.u-gakugei.ac.jp/>

Title	砒素元素のバクテリア集積( fulltext )
Author(s)	本間, 久英; 小川, 雅代; 児玉, 真由美
Citation	東京学芸大学紀要. 自然科学系, 60: 19-23
Issue Date	2008-09-28
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2309/91029">http://hdl.handle.net/2309/91029</a>
Publisher	東京学芸大学紀要出版委員会
Rights	

## 砒素元素のバクテリア集積

本間 久英\*・小川 雅代\*・児玉 真由美\*

宇宙地球科学分野

(2008年5月26日受理)

HONMA, H., OGAWA, M. and KODAMA, M.: Bacterial accumulation of arsenic element. Bull. Tokyo Gakugei Univ. Natur. Sci., **60**: 19-23. (2008) ISSN 1880-4330

### Abstract

In the biological electric cells within arsenious and/or arsenic ions, the survived bacteria were certified in the electrolysis solutions. One or plural particles were formed in the survived bacteria cells. Based on the detail analyses of EDS equipped with electron-microscopy, arsenic element was certified to have been contained on the particles in the bacterial cell. The bacteria observed were identified to *Pseudomonas aeruginosa* for arsenious samples, *Burkholderia cepacia* for arsenic samples and *Stenotrophomonas maltophilia* and *Pseudomonas aeruginosa* for arsenious-arsenic mixed samples.

Key words: arsenic, bacterial accumulation, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*

Department of Astronomy and Earth Sciences, Tokyo Gakugei University, 4-1-1 Nukuikita-machi, Koganei-shi, Tokyo 184-8501, Japan

**要旨:** 3価や5価の砒素イオンを混入させた生物電池の電解液(ほうれん草の絞り汁)中でも、生き残っているバクテリアの存在が確認された。

それらのバクテリア細胞内には1個又は複数の球状物質が形成されていた。

電子顕微鏡付置のEDS分析装置で定性分析をした結果、バクテリア細胞内の球状物質にのみ砒素元素の存在が確認された。

生き残ったバクテリアとして、3価の砒素イオンを含む実験系では、*Pseudomonas aeruginosa*が、5価の砒素イオンを含む実験系では、*Burkholderia cepacia*が、そして、3価と5価の両砒素イオンを含む実験系では、*Stenotrophomonas maltophilia*と*Pseudomonas aeruginosa*が同定された。

### 1. はじめに

2004年に茨城県神栖町で砒素に汚染された井戸水を飲料用等として使用していた住民の一部に砒素中毒症状が出ていると言うショッキングな事実が大きく報道され

た。砒素元素による健康被害が出たことは、当然の事であるが社会問題、環境問題としてクローズアップされた事は周知の事である。翌年(2005)になって、問題の井戸の砒素汚染の原因が突き止められた。即ち、過去に環境対策の一環として砒素化合物をコンクリートで固めた

\* 東京学芸大学宇宙地球科学分野 (184-8501 小金井市貫井北町 4-1-1)

ものを埋設したそのものからの地下水への砒素イオンの溶出によるものである事が確かめられた。そして、緊急に対策がとられた事は言うまでもない。このように溶液中の砒素イオンまたは砒素化合物（複合イオン）は一般的に地層（主に粘土層等）に吸着され難く、地下水にとけ込んで移動する性質を持っている。

一方、世界に目を向けると、Chakraborty and Saha (1987, Chharlet and Polya, 2006より引用) がインドの西ベンガル地方で砒素を含んだ地下水を報告して以来、今日までに、西ベンガル地方 (Chowdhury et al., 1999; McArthur, 1999; Chakraborti et al., 2001等) のほか、バングラディッシュ (Lepkouski, 1998; Nickson et al., 1998; Cheng et al., 2005等) や南アジアの国々の地下水に砒素が含まれている事が報告されている (Charlet and Polya, 2006)。その原因としては、ヒマラヤ山脈の砒素を含む地層が注目されている。そして、砒素を含む水を飲料水や農業用水として用いた時の健康被害についての報告もなされている (Hopenhayn, 2006)。

その他、本邦では宮崎県土呂久（鉦山）（中村ほか, 1973）や中国南西部 (An et al., 1997) 等で大気中の砒素汚染、肥料や農薬・薬剤使用の結果としての砒素汚染、更に天然物の酸化 (Bowell et al., 1994)、還元による砒素汚染等さまざまな汚染原因が知られている。それゆえ、多くの研究者達が水溶液に溶解している砒素イオン等の減少や除去に関する研究成果を報告し、まとめられている (例えば、益田, 2000等)。

一方、筆者等は生物、特にバクテリアによる重金属元素の集積実験を行ない、その幾つかの成果を報告している (本間ほか, 1997; Honma et al., 1999; 本間ほか, 2001; 本間ほか, 2007)。今回は、筆者等が従来行なって来た実験法と同様な方法で溶液中の砒素イオン（3価と5価）をバクテリア体内に集積させる事を目的として実験を行なったので、その結果を報告し、合わせて考察を加えた。

尚、砒素とバクテリアとの関係について扱った研究では、バクテリアが砒素を酸化 (Sanders, 1979) したり、還元 (Harrington et al., 1998) したりする事や、砒素を無機態から有機態へと変換 (益田, 2000) 等が研究され、報告されている。最近では、微生物（バクテリアを含む）による砒素の解毒作用のメカニズムについても報告されている (Lloyd and Oremland, 2006)。

## 2. 実験

今回の実験は従来の場合と同様に、所謂、生物電池 (Fig. 1) による方法を用いた。即ち、ボルタの電池の電

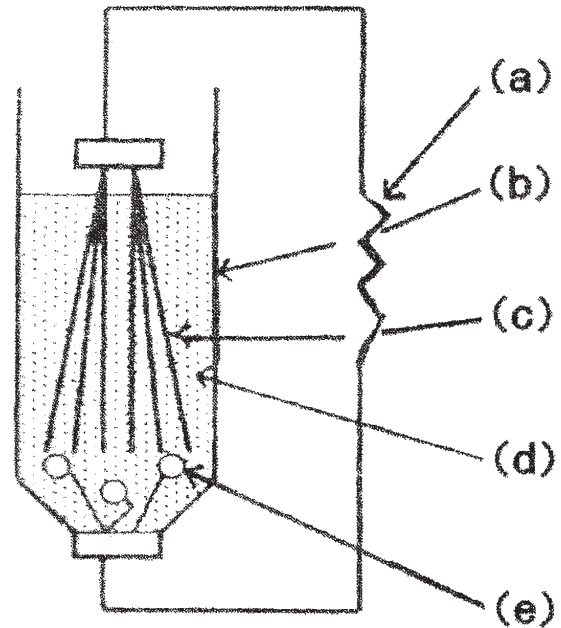


Fig. 1: Scheme of bio-electric cell used.

a: Electric resistance of  $100\Omega$ . b: Syringe cell (10ml).  
c: Copper broom-like electrode (cathode).  
d: Squashy electrolyte solution of spinach squeezed.  
e: Zinc electrode (anode)

解液（希硫酸液）に換えて、市販のほうれん草の絞り汁を電解液として用いたものである。電解液は酢酸溶液とアンモニア溶液によってpHを $5.5 \pm 0.5$ ,  $7.0 \pm 0.5$ ,  $8.5 \pm 0.5$ に調製したものをを用いた。

また、砒素化合物は市販特級試薬（亜砒酸と砒酸）を用いて、蒸留水に溶かしたものをを用いた。実験用容器はシリンジ（10ml用）を用いた。

試料は砒素イオンの入っていないもの及び砒素濃度約1, 5, 10, 50と100 ppmに調製したものを用意した。3種類のpH溶液（電解液）のため、16試料を1組とし、それを3組準備した。

実験期間は6週間とした。試料容器はラップをのせただけのものである。電解液は蒸発をするため、減量する。減量分は2日おきに蒸留水で補給し、10mlを保持した。6週目は蒸留水の補給をしなかった。

## 3. 電子顕微鏡観察

実験を終了した試料は、電解液の上澄み液を取り、それをカーボン膜コーティングを施された電子顕微鏡用銅メッシュ上に滴下し、自然乾燥をさせた。

上記の様に作成した電顕用試料を蒸着をしないまま観察した。その結果、観察した全ての試料においてバクテリアの存在が確認された。また、それらのバクテリア細胞内には1個 (Fig. 2) または複数個のパーティクルが

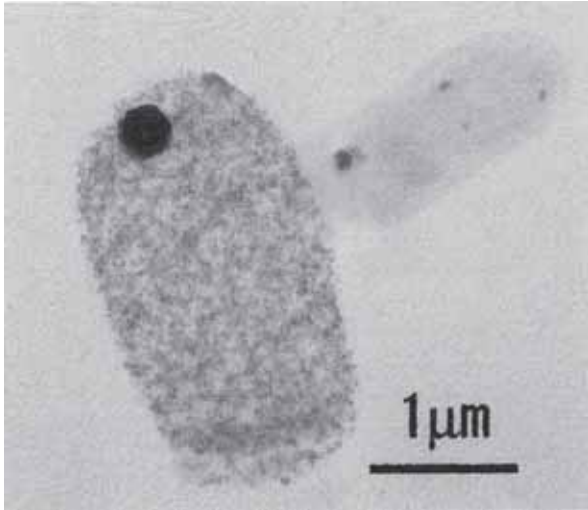


Fig. 2: Electron microscopic photograph of one particle in bacterial cell in the electrolyte solution of an bio-electric cell.

認められた。

一方、バクテリア以外の場所、所謂背景において、バクテリア細胞内で認められたパーティクルと同じような大きさや形を持つパーティクルが時折認められた。また、きわめてまれであるが、破壊されたバクテリア細胞からパーティクルが背景に出て行ってる (Fig. 3) ようなものが見られた。

尚、電子線回折像で見える限り、電子線回折を行なった全てのパーティクルが非晶質物質である事が分かった。

#### 4. EDS分析

電子顕微鏡付置のEDS機能を用いて、バクテリア試

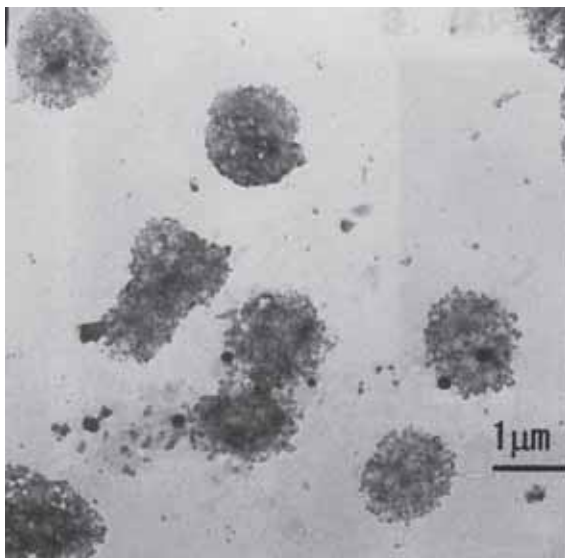


Fig. 3: Electron microscopic photograph of particles which have gone out into the electrolyte solution from destroyed bacterial cells.

料等を定性分析した。pHごとに最初の試料のみ3カ所を分析した。即ち、背景の部分、バクテリア細胞そして、バクテリア細胞内に見られるパーティクルである。それ以降はパーティクルのみに焦点を当てて分析を行なった。その結果、背景とバクテリア細胞 (Fig. 4 upper) には全ての分析パターンに砒素のピークは認められなかった。しかし、バクテリア細胞内のパーティクルにはFig. 4 lower に示したように、明らかに砒素の存在を示すピーク (10.4 KeV付近) が認められた。このパーティクルについては分析した全てで確認はされなかった。

一方、背景に認められたパーティクルについても分析を行なった。その結果、バクテリア細胞内のパーティクルと同様に、砒素のピークが認められた場合と認められない場合があった。

パーティクルには例外無しに亜鉛元素のピークが認められる。

#### 5. バクテリアの同定

実験終了後、pH 7の系のみにおいて、3価の砒素イオンで調製した試料、5価の砒素イオンで調製した試料及び、3価と5価の両方を入れて調製した試料について、生き残ったバクテリアの属種の同定を行なった (分離培養法、30°C好気培養、TRYPTICASE SOY AGARによる)。

その結果、3価の砒素イオンで調製した試料では、

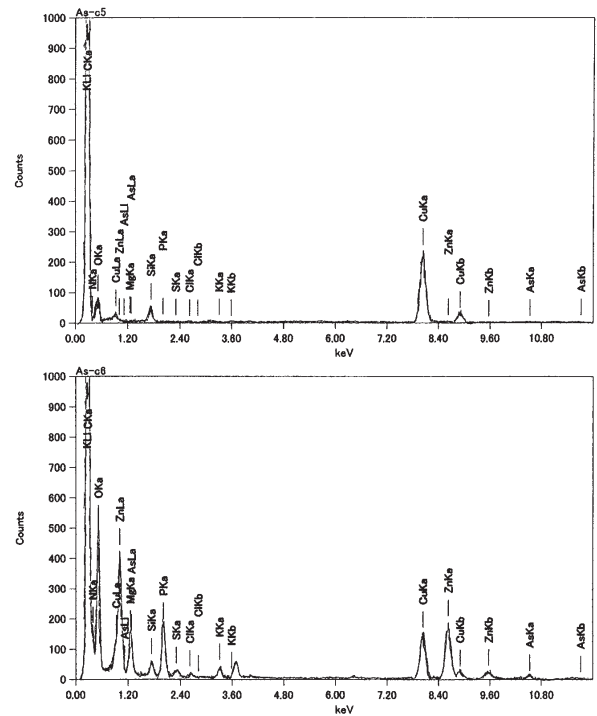


Fig. 4: Patterns of Energy-dispersive X-ray (upper): bacterial cell except for a particle. (lower): a particle in bacterial cell. (As K $\alpha$  is about 10.5 KeV).

*Pseudomonas aeruginosa* が、5 価の砒素イオンで調製した試料では、*Burkholderia cepacia* が、3 価と 5 価の砒素イオンで調製した試料では *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* が同定された。なお、バクテリアの同定は、小迫芳正博士（理化学研究所微生物系統保存施設微生物分類室）をお願いをした。

## 6. 考察

市販特級試薬の亜砒酸（3 価）と砒酸（5 価）溶液を含んだ生物電池において、ほうれん草に寄生するバクテリアが最大約 100ppm の砒素イオンを含む環境においても生き残る種類がいる事を確認した。しかも、確認されたバクテリア細胞内には 1 個または複数個の非晶質なパーティクルが含まれている事も確認された。更に、分析結果から、このパーティクルがポリリン酸塩物質であると考えられる (Fig. 4 lower)。分析結果、すなわち、パーティクルの表面における分析では、パーティクルの全てで砒素が検出されている訳ではない事から、ポリリン酸非晶質体の内部にも砒素は吸着されているものと考えられる。もし、そうであるならば、実験終了後の電解液中の砒素含有量の定量はしていないが、かなりの砒素がバクテリアに取り込まれたものと考えられる。

また、バクテリア細胞が死滅後に破壊しても、そこで形成されたパーティクルはそのままの形で溶液には溶けずに残っている。この事は、溶液中の砒素イオンの減少または除去に関して、興味深い事実である。

一方、3 価や 5 価の砒素試薬を用いた系では、それぞれ異なるバクテリアが 1 種しか認められていないのに対し、3 価と 5 価の両者の砒素イオンを含む系では 2 種類のバクテリアが同定されている事も興味深い。

ところで、毒性を持つ砒素をバクテリアが細胞内に取り込むのは、砒素の挙動が必須元素であるリンに似ているからであると言われている。最近の研究では、バクテリアをはじめとする微生物は、それ自身砒素から身を守るための多くの方法を持っていると言われている。例えば、バクテリア等の原核生物は、揮発性のメチル化アルシンを生成し、その場の砒素の除去を可能にしている。また、ある種のものには“Ars C”という砒酸塩還元酵素によって砒素の解毒化をしているようである (Mukhopadhyay et al., 2002)。そして、バクテリアの一部のものには、細胞質や細胞周辺質に含まれるある酵素によって、細胞内に取り込まれた砒素が酸化や還元をされて細胞外へと出て行く事が述べられている (Lloyd and Oremland, 2006)。更に、砒素の解毒作用には ATP 生成時のエネルギーを必要としているので、多くの ATP が生成

され、そして分解していくものと思われる。この ATP の分解物こそがパーティクルの主要材料となったのであろう。

恐らく、当初、主たる更には従たる個体数の多種類のバクテリアが存在していたほうれん草の絞り汁に砒素イオン種を入れたため、ほとんどのバクテリアが死滅し、砒素イオンの存在する環境に適した一種類のバクテリアのみが生き残れたのは、まさに、砒素イオンを細胞内に取り入れた後、一部の砒素イオンは細胞内である種の酵素により、酸化や還元をされて細胞外へ排出させるメカニズムを持っているからと思われる。逆を言えば、死滅したバクテリアは砒素を細胞外へ排出するメカニズム（砒素排出酵素）を持っていなかったと考えられる。そして、生き残ったバクテリアも排出できなかった砒素を ATP 等の分解物に吸着させて細胞内にパーティクルとして残したものと考えられる。

電子顕微鏡観察からは、このパーティクルが形成されているバクテリアは、そのパーティクルの大きさが不規則では無く、ある大きさのものまでしか生成されていない（真核生物の核の様である）。更に、バクテリア細胞中に含まれる複数個のパーティクルは、通常、細胞中に一つしかないパーティクルに比べ、かなり小さいものである。恐らく、これら複数の小さいパーティクルはその後一カ所に集約し、まるで核のような形になって終わる（死滅する）ものと思われる。尚、一つのパーティクルを持つバクテリアが分裂をする時には、分裂した両者に同じ大きさのパーティクルが存在している（桜井、私信）。言ってみれば、このパーティクルは遺伝されるという事である。この事を考えれば、砒素の集積は生き残った全てのバクテリア細胞内のパーティクルで認められるのは必然と考えられる。しかし、なぜ、イオン価数の違いにより、異なるバクテリアが生き残るのかは不明なところが多い。

この実験が実験室規模でなく、工業的なオーダーで生かされれば、砒素を含んだ井戸水を飲料水として利用せざるを得ない地域に、バクテリア反応槽を造り、砒素を含んだバクテリアやパーティクルを濾過する事によって飲料用の水になる事が期待される。

## 7. 謝辞

砒素を含む電解液中で生き残ったバクテリアの同定に関しては、全て理化学研究所微生物系統保存施設の小迫芳正博士をお願いをした。記して深謝の意を表す。

引用文献

- An, D., He, Y.G. and Hu, Q.X. (1997): Fluoride, 30, 29-32
- Bowell, R. J., Morley, N. H. and Din, V.K. (1994): Applied Geochemistry, 9, 9-14
- Chakraborti, D., Basu, G. K., Biswas, B. K., Chowdhury, U. R., Rahman, M. R., Paul, K., Chowdhury, T. R., Chanda, C. R., and Lodh, D. (2001): Arsenic Exposure and Health Effects (eds. By Chappell, Abernathy and Calderon), 22-52, Elsevier Science. Amsterdam-Lausanne-New York- Oxford-Tokyo.
- Chakraborty, A. K. and Saha, K. C. (1987): Indian Journal of Medical Research, 85, 326-334 (Charlet and Polya, 2006より引用)
- Charlet, L. and Polya, D. A. (2006): Elements, 2, 91-96
- Cheng, Z., van Geen, A., Seddique, A.A. and Ahmed, K.M. (2005): Environmental Science and Technology, 39, 4759-4766
- Chowdhury, T. R., Basu, G. K., Mandel, B. K., Biswas, B. K., Samanta, G., Chowdhury, U. K., Chauda, C. R., Lodh, D., Roy, S. L., Saha, K. C., Roy, S., Kabir, S., Quamruzzaman, Q. and Chakraborti, D. (1999): Nature, 401, 545-546
- Harrington, J. M., Fendorf, S. E. and Rosenzweig, R. F. (1998): Environmental Science and Technology, 32, 2425-2430
- 本間久英, 中田正隆, 崎永麻実子 (1997): 鉱物学雑誌, 26, 51-54
- Honma, H., Nakata, M. and Amano, F. (1999): Resource Geology, Special Issue 20, 75-78
- 本間久英, 中田正隆, 長沢理恵 (1999): 学芸大紀要, 第4部門, 51, 33-37
- 本間久英, 児玉真由美, 小川雅代 (2006): 学芸大紀要, 自然科学系, 58, 127-130
- Hopenhayn, C. (2006): Elements, 2, 103-107
- Lepkowski, W. (1998): Chemical and Engineering News, 76,
- Lloyd, J. R. and Oremland, R. S. (2006): Elements, 2, 85-90
- 益田晴恵 (2000): 地下水学会誌, 42, 295-313
- McArthur, J. M. (1999): Nature, 401, 546-547
- 中村家政, 荒尾龍喜, 井上勝平, 小野友道, 石井芳満, 佐藤隆久, 阿南憲太郎, 前川嘉洋, 桑原宏始 (1973): 熊本医学会誌, 47, 86-515
- Mukhopadhyay, R., Rosen, B.P., Phung, L.T. and Silver, S. (2002): FEMS Microbiology Reviews, 26, 311
- Nickson, R., Arthur, J., Burgess, W., Ahmed, K. M., Ravenscroft, P. and Rahman, M. (1998): Nature, 394, 338
- Sanders, J. M. (1979): Chemosphere, 3, 135-137