

令和元年6月18日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02979

研究課題名(和文)ヒ素可溶性細菌群とヒ素高蓄積植物を用いたハイブリッド土壌浄化システムの開発

研究課題名(英文) Development of a hybrid soil remediation system using arsenic-mobilizing bacteria and an arsenic hyperaccumulator plant

研究代表者

山村 茂樹 (Yamamura, Shigeki)

国立研究開発法人国立環境研究所・地域環境研究センター・主任研究員

研究者番号：90414391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：微生物のヒ素可溶性能と、モエジマシダのヒ素超吸収・蓄積能を組み合わせたハイブリッド土壌浄化システムの開発を行った。それぞれのプロセスの効率化を図ったうえで、湛水状態の土壌上部にモエジマシダ水耕栽培系を設置する土壌浄化システムをラボスケールで作成・運転し、汚染土壌の浄化実験を行った。200 mg-As/kgの汚染土壌中のヒ素濃度を、90日で66～117 mg-As/kgまで低減し、土壌汚染対策法の含有量基準値をクリアすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、ヒ素を含め金属類で汚染された土壌は、ほとんどが掘削除去により処理されているが、極めて高コストである。一方、より低コストな手法として、植物を用いたファイトレメディエーションの研究が長年行われてきたが、浄化効果が限定的なため、実用技術としてほとんど普及していない。本研究は、微生物と植物の機能を組み合わせ、双方の特長を活用することで、実用レベルの浄化効果が得られる事を示した。本研究の成果は、ヒ素汚染土壌浄化へのファイトレメディエーション適用において、大きな突破口となり得る。

研究成果の概要(英文)：We developed a hybrid soil remediation system that combined the microbially-mediated arsenic mobilization with an arsenic hyperaccumulator plant *Pteris vittata*. The remediation system was constructed on a laboratory scale, in which hydroponics system of *Pteris vittata* was floated on the flooded arsenic-contaminated soil, and remediation experiments of arsenic-contaminated soil (200 mg-As/kg) were conducted. After 90 d of the experiments, As levels in the soils decreased to 66-117 mg/kg, which is below the soil concentration standard set by the Soil Contamination Countermeasures Law in Japan.

研究分野：環境工学

キーワード：環境技術 土壌汚染浄化 ヒ酸塩還元細菌 鉄還元細菌 モエジマシダ バイオレメディエーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

工場跡地の再開発等に伴う土壌汚染の顕在化が深刻な問題となっており、原因物質としてヒ素が高い位置を占めている。現在、それらの汚染土壌は、ほとんどの場合で掘削除去により処理されているが、極めて高コストである。そのため、コストの高さから処理を行う事ができない、あるいは処理後の土地利用の制限から低・未利用となる可能性の高い土地の増加が、産業活動などにも影響を及ぼしつつある。

汚染土壌中のヒ素は、主にヒ酸塩〔As(V)〕として土壌中の Fe(III)や Al 酸化物等に吸着・固定化されている。そのため、微生物を利用して汚染土壌中の As(V)を吸着性の低い亜ヒ酸塩〔As(III)〕へ還元することで、ヒ素を特異的に水相へ可溶化・除去することが理論的に可能である。研究代表者らはこれまで、異化的 As(V)還元細菌の一種である *Bacillus selenatarsenatis* を用いて、工場跡地で採取した実際の汚染土壌から、ヒ素の可溶化・除去が可能なることを実証している。また、微生物と外的環境との電子授受を促進させる電子メディエーターを併用することで、土壌汚染対策法の含有量基準値をクリアする結果も得ている。しかし、実用に向けては、水相に溶出した As(III)を低コストかつ簡易に除去する技術も併せて開発する必要があり、真に浄化を達成できる一連のシステムの構築が求められる。

一方、植物の中には、金属を高濃度に蓄積するハイパーアキュミュレーターが存在が知られている。特に、モエジマシダ(*Pteris vittata*)は一般的な植物の数倍以上もヒ素を蓄積することで知られており、研究分担者らによって、汚染土壌浄化への適用が試みられてきた。しかし、モエジマシダの根圏は約 30cm 程度であるため、それ以深のヒ素は除去できない。また、根から吸収できるのは、溶存態ヒ素に限定されるため、Fe(III)や Al 鉱物に吸着した As(V)が優占する汚染土壌の浄化には、この植物の土壌における直接栽培では有効とは言えず、実用への障壁となってきた。そこで、微生物のヒ素可溶化能とモエジマシダのヒ素超吸収・蓄積能を組み合わせ、双方の特長を最大限に活用することで、上述のボトルネックを解消した新たな浄化システムを着想するに至った。

2. 研究の目的

既に述べたように、研究代表者らは、異化的 As(V)還元細菌と電子メディエーターの併用により汚染土壌から実用レベルのヒ素除去が可能なることを示している。しかし、これらは純粋培養系で確認された結果であり、土壌微生物群集からなる複合系でも有効に機能するかは定かでない。また、外来細菌を導入した際の生態系への影響も不明のため、実用化には土着の微生物群を活性化させるバイオスティミュレーションが理想的と言える。研究代表者らは予備的な培養実験から、ある種の炭素源や電子メディエーター(リボフラビンなど)を添加することで、土壌中に常在するヒ素可溶化細菌群を活性化し、実用レベルの溶出率を得る可能性を見出した。一方、研究分担者らは、水中からのヒ素除去を目的としたモエジマシダの水耕栽培実験を予備的に実施しており、同植物のヒ素超吸収・蓄積能が水系でも有効に機能し得ることを見出した。

そこで本研究では、ヒ素可溶化細菌群による土壌からのヒ素抽出プロセスと、モエジマシダ水耕栽培系による水中ヒ素除去プロセスを確立し、それらを組み合わせることで、土壌浄化からヒ素回収までを考慮した総合的浄化システムを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒ素可溶化細菌群を利用した土壌ヒ素抽出プロセス

千葉大学松戸キャンパス内の森林から採取した土壌サンプルを Tris-HCl バッファー (pH 7.2) で 3 回洗浄し、固相と液相の容積比がほぼ 1:4 となるよう同バッファーと混和したものを微生物植種源とした。As(V)溶液 (pH 7.2) に、Fe(III)塩もしくは Al 塩溶液を加えて水酸化物を生成させ、共沈殿作用により溶液中の As(V) (1mM) を全量固相へと移行させた。その後、この共沈殿物を含む溶液に上述の植種源と炭素源(乳酸塩)、及びリボフラビン(RF)を加え、嫌気条件下にて培養を行った(30℃)。また、乳酸塩及び RF を加えていない系でも同様の実験を行った。培養後、溶液中のヒ素及び鉄濃度を ICP-AES を用いて測定した。Fe(II)濃度は Ferrozine 法により測定した。また、サンプルから DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた微生物群集構造解析を行った。

(2) モエジマシダ水耕栽培系を利用した水中ヒ素除去プロセス

モエジマシダの水耕栽培に最も適当な水位を調べるために、(1)羽片、根茎 (rhizomes)、根の一部を水上にさらした状態、(2)羽片、根茎を水上にさらした状態、(3)羽片のみを水上にさらした状態、の 3 種類の水耕栽培条件を準備した(図 1)。全ての条件でエアレーションは行わず、週に一度、1/5 希釈 Hoagland 溶液 (8 mM of KNO_3 ; 4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 2 mM MgSO_4 ; 1 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 50 μM H_3BO_3 ; 9 mM MnSO_4 ; 1 μM ZnSO_4 ; 0.2 μM CuSO_4 ; 0.1 μM Na_2MoO_4 ; and 60 μM $\text{Fe}(\text{III})\text{-EDTA}$) を 2 ml、根茎に直接与えた。人工気象器は 1 日 14 時間の 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光照射、温度は通常 20℃ に設定し、運転した。加えるヒ素としては、As(V)と As(III)を用いた。As(III)酸化を測定する際は、サンプリングの後、As(V)分離カラムを通して As(V)を除いたサンプルのヒ素濃度を As(III)濃度とした。カラムを通さないサンプルを全ヒ素濃度とした。

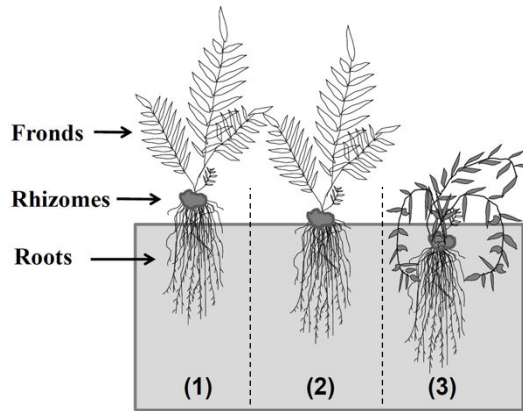


図1 モエジマシダ水耕栽培実験の概要

(3) 土壌ヒ素抽出プロセスと水中ヒ素除去プロセスの統合

微生物による土壌ヒ素抽出プロセスと、モエジマシダによる水中ヒ素除去プロセスを組み合わせたハイブリッド土壌浄化システムを、ラボスケールで作成した。実験には、5 L 容量のプラスチック容器を用い、ヒ素汚染土壌(200 mg-As/kg)200g と水 4 L を加え、その上に発泡スチロールに設置したモエジマシダ 4 株を浮かせる形で行った(図 2)。LED バーライトで照明を確保し、室温を 25 に設定して運転した。微生物の炭素源として 10 mM の乳酸塩を 10 日ごとに加えた系(L)、乳酸塩とリボフラビン(50 μM)を加えた系(LR)、及び無添加系(N)で実験を実施した。実験期間中、7 日ごとに液相サンプルを採取し、溶液中のヒ素濃度を測定した。また、90 日後にモエジマシダ及び土壌を回収し、それぞれからヒ素を抽出して、ヒ素蓄積量及び残留ヒ素濃度を測定した。モエジマシダを植栽しない対照系でも、同様の実験を行った。



図2 ハイブリッド浄化システムによる汚染土壌浄化実験の概要

4. 研究成果

(1) ヒ素可溶化細菌群を利用した土壌ヒ素抽出プロセス

これまでの研究により、土壌細菌群を活性化する電子メディエーターとしては、リボフラビン(RF)が安全性・効率の両面から有用であることが明らかとなっている。そこで、そのメカニズムを推定するため、Fe(III)及びAl 水酸化物を用いたヒ素可溶化試験を行い、可溶化に関わる主要細菌群の特定を試みた。

Fe(III)共沈殿物を用いた実験を行った結果、全ての系においてヒ素の溶出が確認され、乳酸塩を添加した系でより顕著にヒ素濃度が増加した(図 3A)。また、乳酸塩存在下では、RF によってヒ素可溶化が大幅に促進され、溶液中の Fe(II)濃度も同様の増加傾向を示した。一方、乳酸塩を添加しなかった場合は、RF によるヒ素溶出の促進効果は確認されなかった。また、RF の有無に関わらず、Fe(II)の溶出は見られなかった。これらの結果から、系内の Fe(III)還元細菌は主に乳酸塩を炭素源として利用し、RF がそれらの細胞外電子伝達を活性化することで、間接的にヒ素可溶化を促進していると考えられた。これに対して、乳酸塩非添加系では、As(V)還元細菌が主に内在性の炭素源を利用して As(V)を還元した結果、ヒ素可溶化が生じているものと推察された。

Al 共沈殿物を用いた同様の実験では、乳酸塩添加により大幅なヒ素濃度の増加が見られたものの、RF によってヒ素可溶化が阻害される結果となった(図 3B)。また、乳酸塩非存在下では、RF 添加によるヒ素可溶化への影響はほとんど見られなかった。これらの結果から、Fe(III)還元細菌の一部は、As(V)還元も担っている可能性が示唆された。

微生物群集構造は培養に伴って大きく変化し、全ての系において *Firmicutes* 門の相対存在量

が増加した。中でも、乳酸塩を添加した系において、優占化していた。OTU レベルでの解析では、Fe(III)・Al いずれの実験でも、乳酸塩添加により *Negativicutes* 綱の未知の細菌種が増加する傾向が見られた。一方、乳酸塩非添加の場合は、それらの割合は低く、*Clostridia* 綱の *Desulfitobacterium* 属に近縁な細菌種が優占化していた。以上の結果から、前者は Fe(III) と As(V) 双方の還元を、後者は As(V) の還元を担っていると推察された。

また、本実験系から単離した乳酸塩利用性の発酵細菌の特性を調べた結果、*Negativicutes* 綱 *Sporomusaceae* 科細菌が、ヒ素抽出プロセスにおいて重要な役割を果たしていることが明らかとなった(Yamamura et al. submitted)。

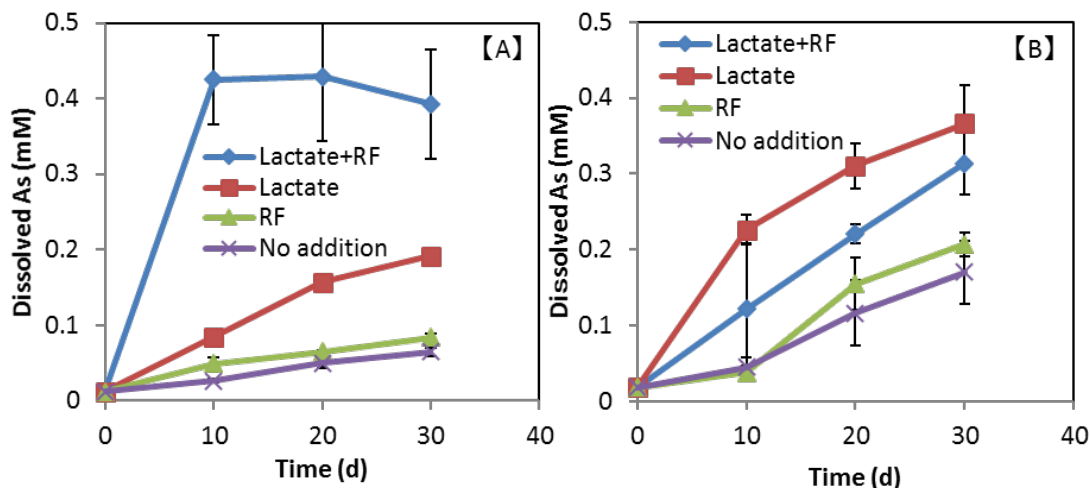


図3 土壤微生物群による Fe(III)【A】及び Al 水酸化物【B】からのヒ素可溶化

(2) モエジマシダ水耕栽培系を利用した水中ヒ素除去プロセス

まず、モエジマシダの水耕栽培系を確立するため、水面の高さを変えて人工気象器内で水耕栽培を行なった。その結果、モエジマシダの根茎が水に浸かると生長が大きく阻害されることが明らかとなった。また、水耕栽培時にはエアレーションは必要とせず、栄養源に関しても通常植物の培養に用いる Hogland 溶液を 5 倍希釈したものを週一回程度、根茎に直接与えるのみで十分生育が維持されることが明らかとなった。4 ヶ月の無曝気水耕栽培で、根の長さは 50cm を越えた。生育温度については、10 °C では生育可能であるが、5 °C では生育できないことも明らかとなった。

50 ppb の As(V) を加えた水で水耕栽培して部位別の濃度を測定した結果、羽片と根茎はそれぞれ根の 100 倍と 10 倍の濃度のヒ素を蓄積していた。これらの結果は、土壌で栽培した時と同様であった。

溶出された As(III) を吸収させるためのモデル実験として、500 ppb の As(III) を加えた精製水を用いてモエジマシダを水耕栽培した。その結果、As(III) 濃度は 5 日目までは変化がなかったが、その後 As(V) に変換され、さらにシダに吸収された。この水耕栽培液に As(III) を加えたところ速やかに酸化されたが、ろ過した液に As(III) を加えた場合は酸化されなかった。このことから、シダ根圏に存在する微生物によって As(III) 酸化が行われていることが示唆された。また、同様の実験を抗生物質の存在下で行ったところ、抗生物質非添加時に比べて As(III) 酸化が起こるまでに時間がかかったことから、モエジマシダ根圏における As(III) 酸化細菌の存在が強く示唆された。As(III) 酸化が活発に行われた時期の根圏から抽出した DNA を鋳型として用い、As(III) 酸化酵素遺伝子 (*aioAB*) のうち *aioA* 遺伝子をターゲットとした縮重プライマーを用いた PCR を行い、得られた産物の DNA 配列を決定した後相同性検索を行ったところ、多くの細菌種由来の *aioA* 遺伝子が観察された。同様の実験を複数回行ったが、優先的に存在する *aioA* 遺伝子、というものは観察されず、多様な細菌種がモエジマシダ根茎での As(III) 酸化に関与していることが明らかとなった。複数回の実験で *Rizobiales* 目に属する細菌の *aioA* 遺伝子が比較的多くの割合で検出されており、根圏での As(III) 酸化に主要な役割を担っている可能性が考えられた。

(3) 土壌ヒ素抽出プロセスと水中ヒ素除去プロセスの統合

微生物による土壌ヒ素抽出プロセスと、モエジマシダによる水中ヒ素除去プロセスを組み合わせるため、湛水状態の土壌上部にモエジマシダ水耕栽培系を設置するハイブリッド土壌浄化システムを作成し、汚染土壌の浄化実験を行った。実験開始後、L(乳酸塩添加系)及び LR(乳酸塩+RF 添加系)では液相中ヒ素濃度が急激に上昇し、実験中期(40 日目ごろ)から減少する傾向が見られた(図 4 左)。一方 N(無添加系)では、開始直後から液相中ヒ素濃度が減少し、その後ほとんど検出されなかった(図 4 左)。これらの結果から、本実験系の条件下においても、乳酸塩の添加により、ヒ素可溶化細菌群が活性化されていることが示された。モエジマシダを植栽し

ない対照系では、N 以外で同様に液相中ヒ素濃度が上昇したが、植栽系のような中期以降の濃度減少は見られなかった(図 4 右)。従って、溶出したヒ素がモエジマシダにより水中から除去されており、水耕栽培系が本実験系でも有効に機能していると考えられた。実験開始 90 日目に土壌からヒ素を抽出し、残留濃度を測定したところ、L で 66 mg-As/kg、LR で 68 mg-As/kg、N で 117 mg-As/kg と、大幅な濃度の低下が見られ、いずれの系においても土壌汚染対策法の含有量基準(150 mg-As/kg)を下回る値が得られた。RF 添加によるヒ素除去量の上昇は確認されなかったが、乳酸塩のみの添加で十分な結果が得られた。また、同様にモエジマシダを回収し、部位別(羽片、根茎、根)にヒ素を抽出・分析した結果、いずれの系においてもモエジマシダへのヒ素の蓄積が確認され、50%以上が羽片に移行していた。以上の結果から、本ハイブリッド土壌浄化システムが、ヒ素汚染土壌の浄化に有効であることが示された。

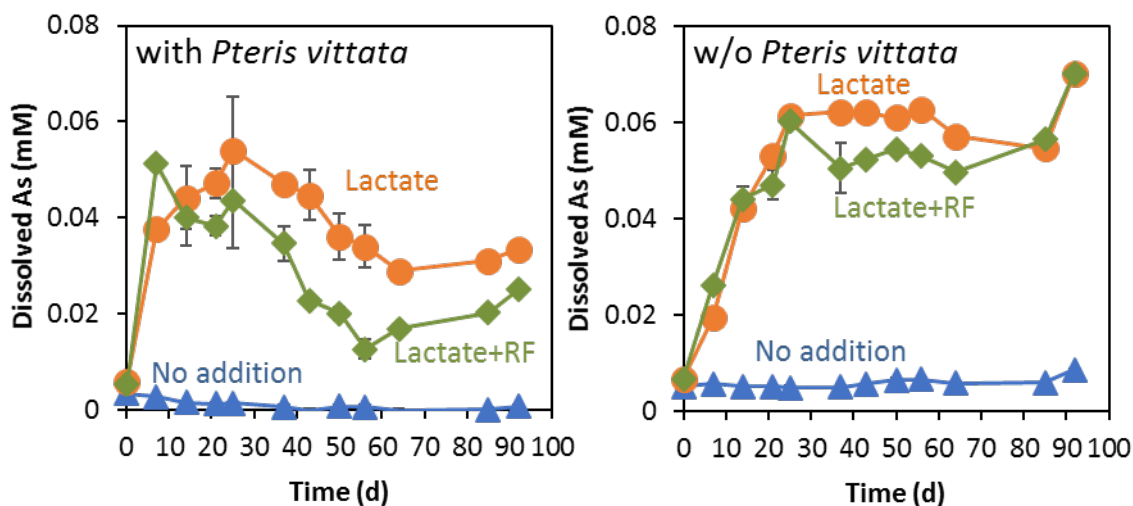


図 4 ハイブリッド浄化システムを用いた汚染土壌浄化実験における液相ヒ素濃度の推移

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Tsuchiya T., Ehara A., Kasahara Y., Hamamura N., Amachi S. (2019) Expression of genes and proteins involved in arsenic respiration and resistance in dissimilatory arsenate-reducing *Geobacter* sp. OR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, in press (Epub ahead of print) <査読有>

DOI: 10.1128/AEM.00763-19

Aoyagi T., Kashiwabara Y., Kurasawa H., Amachi S., Nakajima N., Hori T., Yamamura S. (2019) Draft genome sequence of a novel lactate-fermenting bacterial strain of the family *Sporomusaceae* within the class *Negativicutes*. *Microbiology Resource Announcements*, 8 (10), e01735-18 <査読有>

DOI: 10.1128/MRA.01735-18

Yamamura S., Sudo T., Watanabe M., Tsuboi S., Soda S., Ike K., Amachi S. (2018) Effect of extracellular electron shuttles on arsenic-mobilizing activities in soil microbial communities. *Journal of Hazardous Materials*, 342, 571-578 <査読有>

DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.08.071

[学会発表](計 8 件)

天知誠吾, 堀知行, 山村茂樹 (2018) 微生物を用いた土壌からのヒ素可溶化: 知られざる発酵細菌の重要性. 第 70 回日本生物工学会大会

山村茂樹, 柏原湧太, 堀知行, 青柳智, 天知誠吾 (2018) ヒ素可溶化微生物群に及ぼす乳酸とリボフラビンの影響. 日本微生物生態学会第 32 回大会

宮内啓介, 黄毅, 高木正樹, 東海林翼, 北島信行, 井上千弘, 遠藤銀朗 (2017) ヒ素超蓄積植物モエジマシダを用いたヒ素汚染土壌の浄化. 日本農芸化学会 2017 年度大会

Yamamura S., Amachi S. (2017) Enhancement of arsenic-mobilizing activities in soil microbial communities by electron shuttles. 23rd International Symposium on Environmental Biogeochemistry

Kurasawa H., Amachi S., Hori T., Yamamura S. (2017) Characterization of soil microbial community involved in reductive dissolution of arsenic with different carbon sources. 23rd International Symposium on Environmental Biogeochemistry

倉澤響, 天知誠吾, 堀知行, 山村茂樹 (2017) 土壌からのヒ素可溶化に関する微生物群

集の網羅的解析．環境微生物系学会合同大会 2017
山村茂樹，倉澤響，堀知行，天知誠吾（2017）土壌細菌群と電子メディエーターによるヒ素可溶化メカニズムの推定．第 51 回日本水環境学会年会
宮内啓介，黄毅，菅原一輝，水戸光昭，成瀬美樹，中村真理子，門間聖子，井上千弘，遠藤銀朗（2016）ヒ素高蓄積植物を用いたヒ素汚染水処理技術の開発．化学工学会第 48 回秋季大会．

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮内 啓介

ローマ字氏名：MIYAUCHI, Keisuke

所属研究機関名：東北学院大学

部局名：工学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：20324014

研究分担者氏名：天知 誠吾

ローマ字氏名：AMACHI, Seigo

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院園芸学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：80323393

研究分担者氏名：堀 知行

ローマ字氏名：HORI, Tomoyuki

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：環境管理研究部門

職名：主任研究員

研究者番号（8桁）：20509533

(2)研究協力者

研究協力者氏名：黄田 毅

ローマ字氏名：KOHDA, Takeshi

研究協力者氏名：青柳 智

ローマ字氏名：AOYAGI, Tomo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。