

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870658

研究課題名(和文)ヒ素による土壌環境汚染を効率的に除去するための生物学的浄化技術の開発

研究課題名(英文)Development o phytoremediation to efficiently remove arsenic from polluted soil environment

研究代表者

簡 梅芳 (Chien, Mei-Fang)

東北大学・環境科学研究科・助教

研究者番号：20533186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生物による効率的なヒ素汚染修復技術の開発を目指し、本研究により得られた成果の概要を以下に示す：1、ヒ素を土壌から植物への挙動およびそれにおける微生物の関与を明らかにした。2、ヒ素超蓄積植物のモエジマシダおよびイノモトソウの根圏微生物相を解析したうえ、シダによるヒ素吸収を促すヒ素変換能および植物生育促進能を合わせ持つ微生物の単離に成功した。3、上記微生物とシダの共栽培により、植物のバイオマスおよび蓄積ヒ素濃度の上昇が認められた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop an efficient phytoremediation technology to remove arsenic from polluted soil using arsenic hyperaccumulator ferns. The results obtained from this study were as bellow: 1, the soil bacteria played an important role in arsenic oxidation which was necessary before being absorbed by the ferns; 2, the rhizobacterial community of arsenic hyper accumulator ferns was composed of soil bacteria with adapting to the ferns; 3, the rhizobacteria isolates that are capable of arsenite oxidation and plant growth promotion were obtained; 4, the results of co-cultivation experiment using above isolated strains and hyper accumulator ferns showed that both biomass and accumulated arsenic of inoculated ferns increased much more than that of non-inoculated ones did. These results provided hints when linking microbial arsenic transformation to arsenic uptake by ferns which is important when designing pre-treatment procedures of phytoremediation.

研究分野：環境生物学

キーワード：ファイトレメディエーション ヒ素汚染浄化 モエジマシダ 根圏微生物

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒ素は生物に対して急性および慢性の毒性を有し、土壌・水環境に存在する高濃度のヒ素は世界中で4千万人以上の人々に健康被害を与えると懸念されており、環境中のヒ素汚染を適切かつ経済的に浄化する技術の開発と活用が必要とされている。植物において「ヒ素超蓄積植物」として知られているモエジマシダ(*Pteris vittata* L.)を用いた環境浄化技術(ファイトレメディエーション)の適用は、ヒ素汚染を改善するための有効な対策の一つと考えられる。しかし、この技術の適用にはまだ十分な知見が蓄積されていない。土壌中のヒ素はヒ酸イオンとしてモエジマシダに吸収されるが、土壌中のヒ素形態の挙動がまだ明らかになっていない。一方、環境中のヒ素の形態変化は、微生物の活動が深く関わっていることが明らかになってきている。本研究は、植物のヒ素吸収・蓄積における根圏環境中の微生物の関与を明らかにするとともに、これらの微生物とシダとの共同作用によるヒ素汚染環境修復技術を開発する。

(2) 申請者は、2011年7月から、東北地方太平洋沖地震と津波による津波被災地の土壌中ヒ素含有量の調査を行い、宮城県沿岸部における津波堆積物によるヒ素の高濃度化を確認した。また、津波被災農地におけるモエジマシダを用いたヒ素浄化圃場実験を行った。その結果、シダの生育およびヒ素の蓄積は圃場によってかなり差があることが分かった。この違いには、環境中でヒ酸イオンを亜ヒ酸イオンに還元し細胞外に排出するヒ素還元微生物と、亜ヒ酸イオンをヒ酸イオンに酸化し沈着させて不溶化するヒ素酸化微生物があり、これらの微生物の活動が環境中ヒ素の形態変化に深く関わっていることによると推定された。モエジマシダのヒ素吸収・蓄積に関与すると考えられるヒ素変換微生物の役割の解明は、生物学的高度ヒ素汚染除去技術の開発と適用に大きな鍵になると確信し、本研究課題の着想および申請に至った。

2. 研究の目的

土壌および水環境中における高濃度のヒ素は、世界的な規模で環境の汚染と甚大な健康被害をもたらしている。しかし、このヒ素汚染を有効に浄化する技術的方法はまだ確立されていない。申請者は、ヒ素による汚染の処理に適用できる有効な生物学的環境修復技術を開発することを目的として、ヒ素超蓄積植物であるモエジマシダによるヒ素吸収・蓄積機構の解明に関する研究に取り組んでいる。本研究では、(1)モエジマシダによるヒ素の高濃度蓄積と微生物によるヒ素の化学形態変換との関連を解明することと、(2)解明できた植物と微生物との共同作用を強化する方法を見つけ出すこと、さらに

(3)実際の圃場における現地実験によるヒ素除去の有効性を評価し、技術として確立することを目的として実施する。

3. 研究の方法

(1)人工気象器を用いたモエジマシダの栽培実験：栽培土にヒ素を亜ヒ酸として添加し、モエジマシダの栽培実験を8週間行った。期間中、一定時間おきに土およびシダ植物の試料を採取し、ヒ酸・亜ヒ酸分離カラムおよびICP-MSを用いて、土壌中ヒ素の化学形態変化およびシダによるヒ素吸収・蓄積量の経時の変化を明らかにした。また、シダ根圏試料も採取し、下記(3)(4)の実験に供した。

(2)ヒ素形態変化における微生物の寄与の度合いの評価：人工気象器において、市販の栽培土に申請者が予備調査で行った研究で収集したヒ素濃度の高い畑土を微生物の植種源として添加することや、栽培土を湿熱滅菌による前処理および抗生物質を添加するなど、栽培土中の微生物活動を抑制する条件下での土壌中ヒ素の形態変化を比較し、ヒ素変化における微生物の寄与の度合いを評価した。

(3)植物根圏の細菌相の解析：モエジマシダの根圏土壌試料からDNAを抽出し、抽出したDNAを鋳型として、微生物の16S rDNAを標的にしたPCR-DNA Library作成とシーケンス解析を行い、栽培実験におけるシダ根圏微生物相の解析を行った。また、亜ヒ酸酸化酵素遺伝子*aroA*を標的にしたtRFLP解析を行い、シダのヒ素吸収を促進する微生物の情報を把握した。

(4)根圏微生物の単離と特徴づけ：モエジマシダの根圏試料から、ヒ素耐性かつヒ素酸化・還元能の持つ微生物の集積培養を行った。ヒ素酸化・還元能を示す微生物を100株以上単離し、16S rDNA配列の決定により単離菌株の同定をしたのち、ヒ素酸化・還元特性、植物生育促進活性などの特徴づけを行い、シダによるヒ素吸収を促進すると考えられる微生物を選定し、下記(5)の実験に供した。

(5)選定した微生物とモエジマシダの共同栽培実験：圃場において、選定した微生物をモエジマシダに感染(定着)させ、6ヶ月間の栽培実験を行った。期間中、植物のバイオマスおよび植物内のヒ素濃度(蓄積量)をICP-MSにより測定し、根圏微生物相の変化はDGGEにより追跡した。また、根圏中の水溶性ヒ素の形態の経時変化は、ヒ素分離カートリッジにより確認した。

4. 研究成果

(1) モエジマシダによるヒ素の吸収・蓄積: 人工気象器におけるモエジマシダの栽培実験では、シダ植えの有無および畑土添加の有無により、A, B, C, D, 4つの条件により設定し、8週間の栽培実験を行った。各実験の条件と一ポットあたりの土壌およびモエジマシダの全ヒ素含有量の経時変化は図1に記載した。

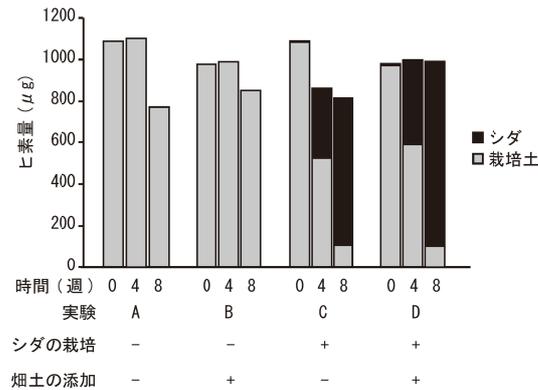


図1 栽培実験の各実験条件と一ポットあたりの土壌およびモエジマシダの全ヒ素含有量の経時変化

土壌中全ヒ素含有量について、実験開始4週間後、実験 A, B においては実験開始時とほぼ変化がなかったが、実験 C, D においてはそれぞれ開始時のヒ素全量の 48%と 60%まで低下したことが分かった。一方、モエジマシダを栽培した実験 C, D において、栽培開始4週間後では平均一株あたりにそれぞれ 334 μg と 406 μg のヒ素を蓄積し、8週間後には平均一株あたりに 700 μg と 870 μg のヒ素を蓄積したことが分かった(図1)。これらの結果から、土壌中のヒ素はモエジマシダにより吸収・蓄積され、また滅菌したピートモスだけで栽培した実験 C のシダよりも、畑土を混合して栽培した実験 D のシダのヒ素蓄積量が多かったことがわかった。

(2) 土壌中水溶性ヒ素の形態変化: 土壌中の水溶性ヒ素をヒ素分離カートリッジにてろ過し、亜ヒ酸とヒ酸に分別して測定した。一ポットあたりの水溶性亜ヒ酸とヒ酸量をそれぞれ算出した結果を図-2に示した。一ポットあたりに使用したピートモスおよび畑土壌に含まれた水溶性ヒ素はそれぞれ 0.00017 μg と 0.00004 μg であり、添加したヒ素(1200 μg)の 0.000014%と 0.000003%となるため、ピートモスと畑土壌に持ち込まれたヒ素量を無視して示した。実験開始1週間後、土壌中の水溶性亜ヒ酸はほぼなくなるまで減少したことが確認された(図2A)。水溶性ヒ酸は、実験開始時から検出され、4週間後においては、実験 A, B ではわずかな減少が観察されたが、実験 C, D では顕著な減少が確認された(図2B)。このことから、変換されたヒ酸がシダによって吸収されたこと

が強く示唆された。これらの結果により、栽培土に添加した亜ヒ酸は速やかにヒ酸に酸化され、酸化されたヒ酸はそのうち一部は不溶化するものの、その多くはモエジマシダにより吸収されることが示唆された。

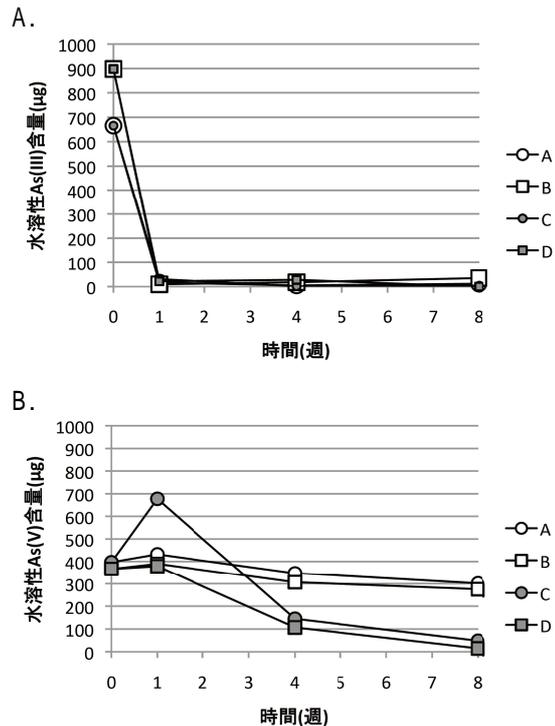


図2 栽培実験における一ポットあたりの土壌中(A)水溶性亜ヒ酸量および(B)水溶性ヒ酸量の経時変化

(3) ヒ素超蓄積シダ根圏微生物相の挙動:

ヒ素超蓄積植物モエジマシダ(Pv)とイノモトソウ(Pm)の栽培実験を4ヶ月行い、栽培前の土壌微生物相と、栽培して2ヶ月、4ヶ月後の両シダ根圏微生物相の調査結果を図3に示す。両シダの根圏微生物相は主に土壌微生物由来であり、その割合が栽培時間の経過とともに減少する傾向が示された。また、根圏微生物における優勢な微生物群として、Pvは γ -Proteobacteria に対し、Pmは Acidobacteria と異なることも明らかとなった。これらの結果から、根圏微生物相は土壌微生物が植物に適応して構成されることがわかった。

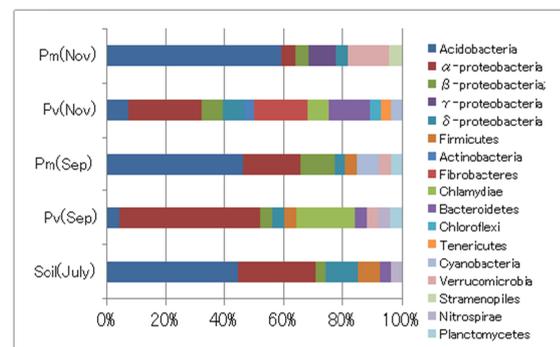


図3 栽培期間における根圏微生物相の変化

(4) 根圏単離菌による亜ヒ酸酸化およびその他特徴付け：両シダの根圏試料を採取し、根圏試料からヒ素耐性を示す微生物を計100株以上単離した(データ未表示)。これらの根圏単離菌に対し、亜ヒ酸酸化活性を調べたところ、48時間内に、培地中に添加した亜ヒ酸をほぼ全部(それぞれ98.8%と89.5%)ヒ酸に酸化する能力を示した微生物が確認できた(図4)、それぞれLane m-3-18とLane r-5-7株)。また、m-5-8株においては、亜ヒ酸の酸化能とヒ素の還元能を合わせ持つことが示唆された(図4、Lane m-5-8)。

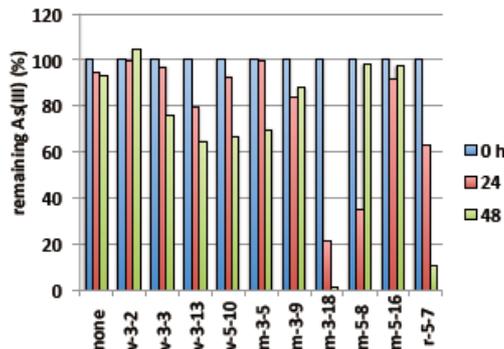


図4 根圏単離菌による亜ヒ酸酸化

これらの結果から、根圏には微生物によるヒ素の酸化還元反応が活発に起きていることが考えられる。代表研究者のこれまでの研究により、モエジマシダはヒ素をヒ酸として吸収することと、土壤中のヒ素酸化は微生物由来であることを明らかにしてきた。これらの結果により、単離した強い亜ヒ酸酸化活性をもつ微生物は、シダによるヒ素吸収に先立ち、ヒ素酸化を行う可能性を示した。また、単離した根圏微生物に対する植物生育促進能力を調べた結果、根圏微生物のうち、植物によるヒ素吸収の促進またはヒ素による毒性を軽減する効果のある物質の分泌能を示す微生物の割合が高かった(データ未表示)。

(5) 選定した微生物とモエジマシダの共同栽培実験：

上記の結果を受け、亜ヒ酸酸化活性および植物生育促進能を持つ根圏単離菌を2株選出し、実際の圃場において、モエジマシダに定着した微生物とシダの共同栽培実験を6ヶ月行った。その結果、微生物との共同栽培により、シダのバイオマスおよび植物内のヒ素濃度ともに上昇する傾向が示された(図5A, 図5B)。また、DGGEによる微生物相を追跡した結果から、微生物は少なくとも3-4ヶ月に根に定着していることがわかった(図6)。これらのことから、本研究により選出した根圏微生物はモエジマシダに定着し、シダの生育を促進するとともに、シダによるヒ素吸収の効果を向上することができると示唆された。

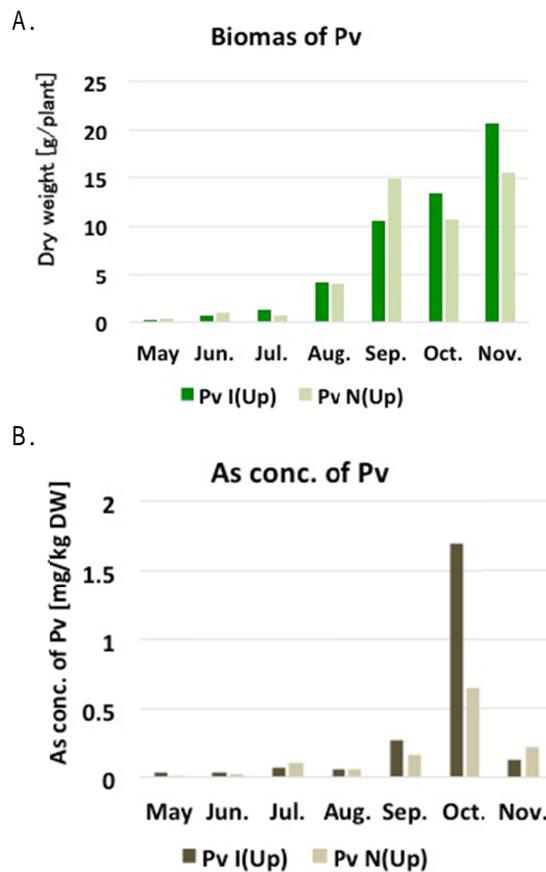


図5 微生物・植物共同栽培実験における(A)モエジマシダのバイオマスおよび(B)シダ植物内のヒ素濃度の変化

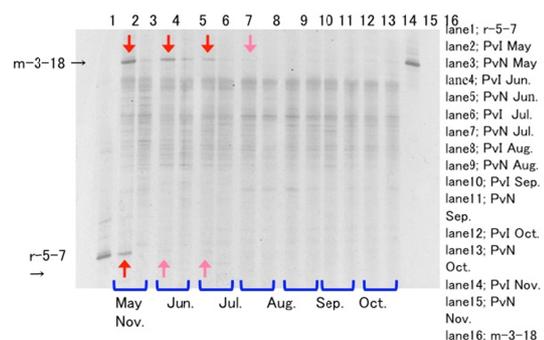


図6 微生物・植物共同栽培実験における根圏中微生物相の推移

<引用文献>

Mei-Fang Chien, Ryota Makita, Kazuki Sugawara, Chihiro Inoue, Study on As uptake and rhizobacteria of two As hyperaccumulators forward to As phytoremediation, Advanced Materials Research, 1130 巻, 2015, 568-571

簡梅芳、小畑和貴、黄毅、宮内啓介、遠藤銀朗、ヒ素高蓄積植物による土壌ヒ素の吸収・除去と土壌微生物の亜ヒ酸酸化に関する研究、土木学会論文集 G(環境) 69 巻, 2013, III9-III15

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Mei-Fang Chien, Ryota Makita, Kazuki Sugawara, Chihiro Inoue, Study on As uptake and rhizobacteria of two As hyperaccumulators forward to As phytoremediation, *Advanced Materials Research*, 査読有, 1130 巻, 2015, 568-571
10.4028/www.scientific.net/AMR.1130.568

簡梅芳、小畑和貴、黄毅、宮内啓介、遠藤銀朗、ヒ素高蓄積植物による土壌ヒ素の吸収・除去と土壌微生物の亜ヒ酸酸化に関する研究、土木学会論文集 G (環境) 査読有、69 巻、2013、III9-III15
http://dx.doi.org/10.22.8/jscej.69.III_9

〔学会発表〕(計 12 件)

日本農芸化学会 2016 年度大会・魏書君、Han Wang、菅原一輝、簡梅芳、井上千弘。The arsenic accumulation and arsenate reductase gene of three *Pteris* ferns. 2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)

12th International Phytotechnologies Conference. Mei-Fang Chien, Ryota Makita, Hirofumi Nagayama, Kazuki Sugawara, Chihiro Inoue. Characterization of rhizobacteria isolated from arsenic hyperaccumulator ferns. 2015 年 9 月 28 日、Kansus (U.S.A)

12th International Phytotechnologies Conference. Kazuki Sugawara, Mei-Fang Chien, Chihiro Inou. Evaluation of arsenic behavior in temperate-zone plant, *Pteris multifida*. 2015 年 9 月 28 日、Kansus (U.S.A)

2015 資源・素材関係学協会合同秋季大会・牧田涼太、簡梅芳、井上千弘。ヒ素超蓄積植物の栽培実験およびその根圏微生物相の解析。2015 年 9 月 9 日。愛媛大学 (愛媛県、松山市)

環境バイオテクノロジー学会 2015 年度大会・簡梅芳、牧田涼太、永山浩史、井上千弘。植物のヒ素吸収とヒ素耐性に寄与する根圏微生物の機能解析。2015 年 6 月 29 日、東京大学 (東京都、文京区)

第 49 回日本水環境学会年会・簡梅芳、牧田涼太、菅原一輝、井上千弘。ヒ素超蓄積シダ植物モエジマシダとイノモトソウの根圏微生物の特徴づけ。2015 年 3 月 16 日。金沢大学 (石川県、金沢市)

12th International workshop on WATER DYNAMICS. Mei-Fang Chien, Chihiro Inoue. Little helpers which assist in efficient arsenic phytoextraction by *Pteris vittata*. 2015 年 3 月 10 日。東北大学 (宮城県、仙台市)

11th International Phytotechnologies Conference. Mei-Fang Chien, Kazuki Obata, Yi Huang, Keisuke Miyauchi, Ginro Endo and Chihiro Inoue. Study on arsenic uptake and removal by arsenic hyper-accumulator *Pteris vittata* and its rhizosphere bacteria. 2014 年 10 月 2 日。Crete (Greece)

第 66 回日本生物工学会・簡梅芳、羅佩昕、牧田涼太、宮内啓介、遠藤銀朗、井上千弘。ヒ素超蓄積植物モエジマシダの根圏微生物の分離および特徴づけ。2014 年 9 月 11 日、札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)

日本農芸化学会 2014 年度大会・簡梅芳、宮内啓介、黄毅、遠藤銀朗。亜ヒ酸酸化を指標にしたモエジマシダによるヒ素の吸収を触媒する微生物の探索。2014 年 3 月 25 日。明治大学 (神奈川県、川崎市)

11 環境工学フォーラム・簡梅芳、小畑和貴、黄毅、宮内啓介、遠藤銀朗。ヒ素高蓄積植物による土壌ヒ素の吸収・除去と土壌微生物の亜ヒ酸酸化に関する研究。2013 年 11 月 20 日。北海道大学 (北海道、札幌市)

12 環境バイオテクノロジー学会 2013 年度大会・簡梅芳、小畑和貴、宮内啓介、遠藤銀朗。モエジマシダによるヒ素吸収に関する微生物の特性解析。2013 年 5 月 30 日、北九州国際会議場 (福岡県、北九州市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

簡梅芳 (CHIEN, Mei-Fang)

東北大学・大学院環境科学研究科・助教

研究者番号：20533186

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：