

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2015～2017  
課題番号：15H02846  
研究課題名(和文)高性能ファイトリメディエーション法の研究開発

研究課題名(英文)R & D on advanced Phyto-remediation process

## 研究代表者

榊原 豊 (Sakakibara, Yutaka)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：80143204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は残留性有機汚染物質(POPs)などの難分解性有害物質を対象として、ファイトフェントン法の浄化能力について、室内実験およびフィールド試験より検討を行った。その結果、本法は鉄化合物(コロイド状第二鉄微粒子、マグネタイトナノ粒子)とイネ科植物を用いることにより、ペンタクロロフェノール(PCP)を2カ月程度で浄化できることがわかった。また、ベチパーを移植したベトナムDDT汚染土壌のフィールド浄化試験から、その有効性が示された。本法は低コスト・高性能修復技術として従来技術の代替法として発展する可能性がある。今後は異なるPOPs汚染土壌への適用が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Remediation performance of persistent organic pollutants (POPs) by Phyto-Fenton process was investigated in laboratory and field experiments. By using fine iron particles, such as colloidal ferric hydroxides and magnetite nanoparticles, and rice grasses, pentachlorophenol could be removed within two months. Moreover, the process could be successfully applied to an actual site contaminated with DDTs in Vietnam, demonstrating the process would be a feasible alternative to conventional phytoremediation processes with low cost and high performance. A further study will be needed to evaluate the process performances in different POPs-contaminated sites.

研究分野：工学

キーワード：土壤修復 植物 過酸化水素 ファイトリメディエーション法 ファイトフェントン法 残留性有機汚染物質 PCP DDT

### 1. 研究開始当初の背景

近年、世界中で有機・無機有害物質による比較的到低濃度ではあるが広範囲に広がる土壌・地下水汚染が顕在化している。ファイトリメディエーション法は、このような汚染箇所の修復技術として、オンサイト処理であるため汚染物質が外部に拡散せず、浄化コストが低廉であり、資源・エネルギーなどが殆ど必要ない等の特長を有し、他の修復技術に比べて優れているといわれている。しかしながら、浄化期間が長いことや全ての難分解性有害物質を必ずしも浄化できない等の問題がある。

筆者らは、先の挑戦的萌芽研究費（研究代表者：榊原）「バイオフェントン法に関する研究」（2011～2013）の助成により、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世界で初めて提案した。さらに、OHラジカルの検出プローブである蛍光試薬アミノフェニルフルオレセイン(APF)を用いた観察から、コロイド状の水酸化第二鉄、マグネタイトあるいはマグネタイト/ゼオライト担体などの鉄微粒子を用いると、植物から蛍光が発生し、生物学的フェントン様反応( $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{OOH}\cdot + \text{H}^+$ )および生物学的フェントン反応( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$ )が進行することを明らかにした。

また、植物が含有する  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度を測定した結果、その濃度は 0.1～数 mmol/kg-F.W.の範囲に分布し、イネ科のベチバー(*Vetiveria zizanioides*)やガマ(*Typha latifolia*)などは数 mmol/kg-F.W.以上の高濃度で  $\text{H}_2\text{O}_2$  を蓄積していることを明らかにした。なお、植物体内  $\text{H}_2\text{O}_2$  含有量は暗条件下でも1週間以上比較的安定して維持される。

### 2. 研究の目的

本研究は残留性有機汚染物質 (POPs) などの難分解性有害物質を確実に分解・浄化できるファイトリメディエーション法の開発を目的とする。このためにバイオフェントン反応およびバイオフェントン様反応を効率良く進行させるための設計・操作条件について以下を明らかにする。

- 1) 植物の根圏を利用して反応を進行させるために最適な鉄化合物の形態、寸法を明らかにする。
- 2) 実験室規模の汚染土壌に対する浄化能力を測定・評価する。
- 3) 実際の POPs 汚染サイトへ本法を適用し、浄化能力を検証する。

### 3. 研究の方法

本研究は実験室規模の PCP 浄化試験および DDT 汚染サイトに本法を適用したフィールド浄化試験よりなる。また、APF を用いた蛍光観察をおこなった。

図1はOHラジカル生成とAPFとの関係を示したものである。APFがOHラジカルと反応すると、蛍光物質が生成される。これに励起光(490nm)を照射すると、蛍光(515nm)が生ずる。

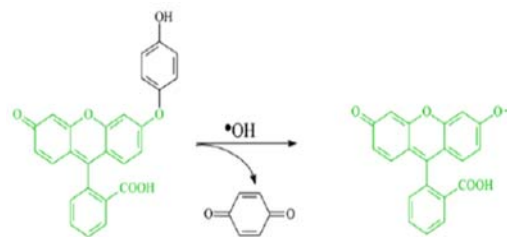


図1 OHラジカルとAPFの蛍光発生原理<sup>1)</sup>

### 3.1 実験室規模浄化試験

供試植物としてイネ目イネ科カラスムギ属のエンバク(学名: *Avena Sativa*)を用いた。当植物は入手および取り扱いが容易であり、比較的到高濃度(1.8mmol/kg-F.W.)の過酸化水素を根に含有することにより選定した。実験はII, III価鉄およびマグネタイト( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )を土壌中に添加した後、PCPの経時変化を2週間測定した。得られた結果から、より長期間の浄化試験が必要と考えられたため、イネ科のベチバーを用いた約2か月間の浄化試験を行った。それぞれの浄化試験の様子を図2と図3に示した。

なお、ベチバーを用いた実験では土壌の初期PCP濃度を測定後、2, 5, 7週間後の容器内土壌の残留PCP濃度等を測定した。

PCPは供試土壌をソックスレー抽出後にGC-ECD(Agilent, 6890)で分析した。また、APFを用いた蛍光観察は共焦点レーザー走査型顕微鏡(FV1000-D, Olympus)を用いて行った。

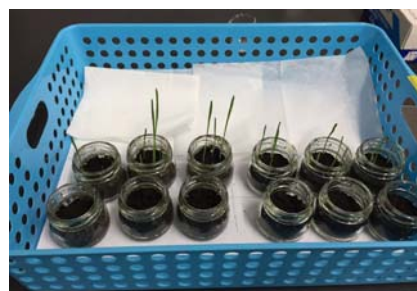


図2 実験室浄化試験(エンバク)



図3 実験室浄化試験(ベチバー)

### 3.2 ベトナム POPs 汚染土壌の浄化試験

図4はベトナムにおける現時点で POPs 農薬汚染が確認あるいは危惧されている汚染サイト(約1652カ所)を示したものである。このうち200カ所が高濃度汚染地域であるが、他は十分な調査が行われていない<sup>2)</sup>。中部から北部に汚染箇所が多いのはベトナム戦争の空爆が大きく影響している。



図4 ベトナムの POPs 汚染サイト<sup>2)</sup>

図5にベトナム北部のバクザン省で実施した浄化試験の様子を示した。主な汚染物質は DDT 類であり、ベトナム国家土壌基準の数倍のレベルにあった。試験は掘削した汚染土壌中にマグネタイト粒子をそれぞれ 25, 100 (mg kg-F.W.<sup>-1</sup>) 添加し、約 60cm 四方の区画に再投入後にベチバーを移植した。その後、土壌中の DDT 類、植物成長量、気温等の変化を7か月間分析・測定した。なお、DDT の分析はソックスレー抽出後に GC-ECD (Scion-456)を用いて分析した。



図5 ベトナムの POPs 汚染サイト

## 4. 研究成果

(1) 図6および図7に実験室規模の浄化試験結果の一例を示した。エンバクは1週間程度で成長し、根はカラスビーカーの底に達した。その後は成長が停止した。土壌内の PCP 濃度は最初の1週間に鉄触媒と植物を植えた場合に急激に減少したが、2週間後では植物のみ、鉄のみ、土壌のみと大差がなかった。これは植物の活性が低下したことも影響していると考えられる。II価鉄、III価コロイド鉄およびマグネタイト(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)ナノ粒子による大きな差はみられなかった。

(2) 一方、ベチバーおよびマグネタイトを用いた中期試験では植物と鉄を混合した場合に PCP はより大きく減少する傾向にあった。また、植物のみおよび植物と鉄を添加した系では土壌中に PCP 分解生成物質である 2,3,5,6-テトラクロロ-p-ベンゾキノンおよび 2,3-ジクロロマレイン酸が検出され、また鉄添加系がより高濃度にこれらの中間物質が蓄積する傾向にあった。

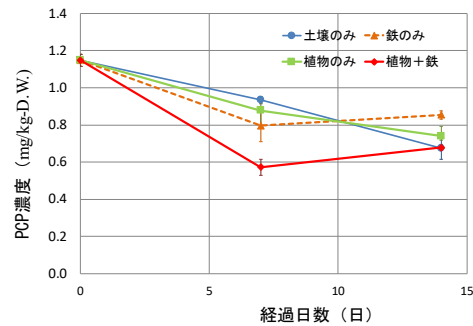


図6 実験室規模の浄化試験結果(1)

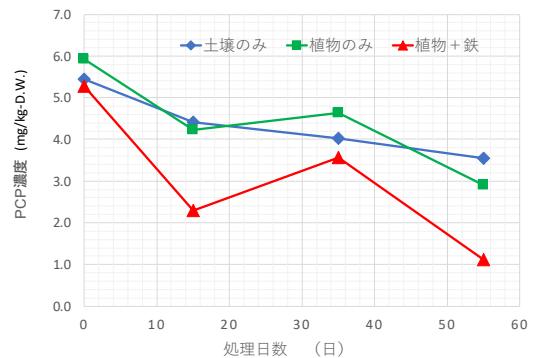


図7 実験室規模の浄化試験結果(2)

(3) 図8は APF を添加して植物が発生する蛍光 (515nm) を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した結果である。Fe<sup>2+</sup>イオン添加系 (A) では植物根の内部から蛍光が発生した。一方、3価鉄担持ゼオライト粒子および3価鉄コロイド粒子添加系 (B) では、植物根表面で多くの蛍光が観察された。レーザー走査型顕微鏡により植物体内における蛍光分布の3次元情報を得ることができた。植物体内で OH ラジカルが生成すると、植物自体を損傷する可



能性が高い。したがって、鉄酸化微粒子（マグネタイトナノ粒子や水酸化第二鉄コロイド粒子）を用いることが安定した処理を行ううえで重要であると考えられた。

(4) 酸化鉄ナノ粒子の表面を有機物（ポリエチレンジイミン、メノ-2,3-ジメチルカプトコハク酸など）で被覆すると粒子の分散性が向上することがわかった。また、これらの被覆鉄粒子と蛍光試薬(APF)を用いた場合の蛍光分布が観察された。さらに、PCPの植物に対する吸着量は Freundlich の吸着等温式により表わされることがわかった。

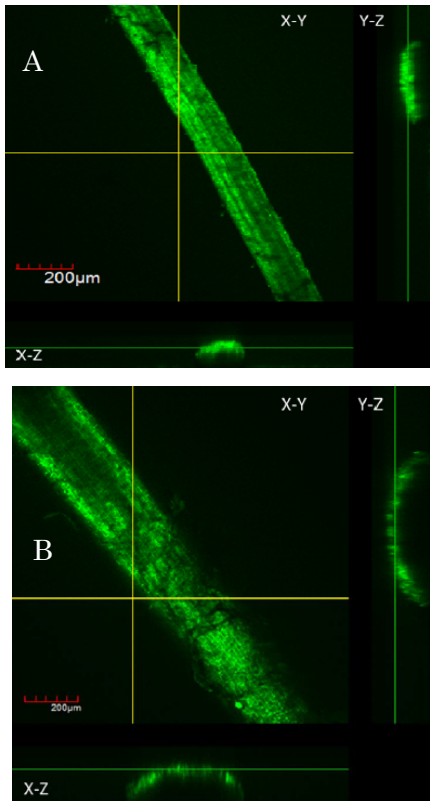


図8 APFを用いた蛍光観察結果

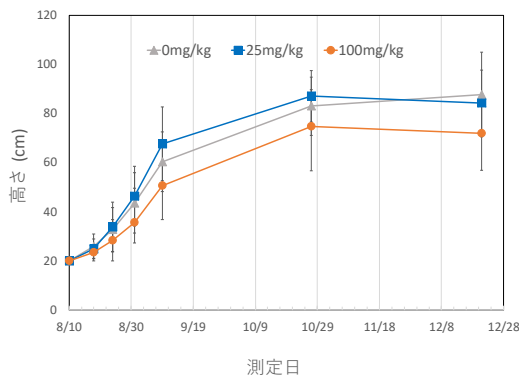


図9 ベチバーの成長過程

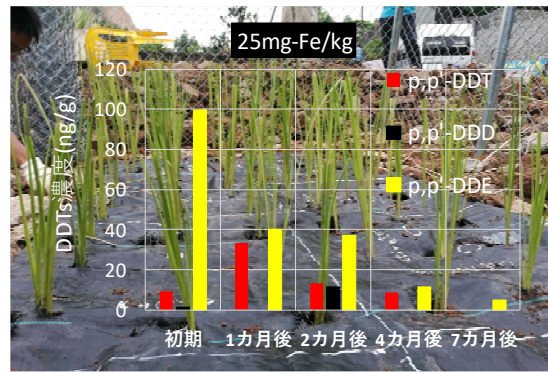


図10 DDTsの浄化過程

(5) 図9にベトナム POPs 汚染サイトのベチバーの成長状況を示す。フィールド試験では供試植物は鉄添加条件 (0~100 mg/kg) によらず、葉、茎および根部は概ね順調に成長した。ただし、試験開始後4か月程経過すると冬季になり、成長が若干停滞するようになった。

(6) 図10にベチバーを移植してマグネタイト微粒子を 25mg/kg を添加した場合の DDTs の減少過程を示した。現地の主要な汚染物質 POPs 成分は DDT 類で、時間の経過につれ DDT 濃度が減少することがわかった。ここで、鉄無添加条件と比較すると、鉄添加条件下ではより高濃度の中間物質 (主に DDD) が生成され、その後消滅することがわかった。鉄添加 100 mg/kg の条件でもほぼ同様の結果が得られた。このような傾向は、PCP 汚染土壌の実験室規模浄化試験と同様であった。

(7) 図10より、約5か月間の試験で80%以上の DDT が浄化されることがわかった。なお、今回は予算の制約上、汚染サイト一箇所のみで試験を実施したが、浄化能力を的確に評価するためには異なる POPs 成分および汚染レベルにおける浄化試験が今後必要である。

(8) 本研究からファイトフenton法の有効性がある程度示された。低コスト・高性能な修復技術として、異なる地域や気候条件下における現地植物を活用した検討も望まれる。

#### 【参考文献】

- 1) K. Setsukunai et al.: Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species, *The Journal of biological chemistry*, **278**(5), 3170-3185 (2003).
- 2) Vietnam Environment Administration (VEA)-Ministry of Natural Resources and Environment (in Vietnamese) (2015).

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

1) Y. Inagaki, V. H. Cong and Y. Sakakibara : Identification and application of Phyto-Fenton reactions, 査読有, *Chemosphere* **144**, 1443-1450 (2016). 10.1016/j.chemosphere.2015.10.039

〔学会発表〕(計27件)

1) R. Sasaki, Y. Sakakibara , V. H. Cong , D. T. Tran, N. D. Thi, H. M. Dang: Application of Phyto-Fenton Process to POPs-contaminated site, 7th European Bioremediation Conference & 11th ISEB Conference, 2018年6月25日, クレタ島, ギリシャ (採択) .

2) 小池海希, 榊原豊, 稲垣嘉彦: Phyto-Fenton法の浄化過程における鉄の存在箇所に関する基礎的研究, 第52回日本水環境学会年会, 2018年3月15日, 札幌.

3) 松本和久, 根本裕, 平原壮, 榊原豊: フェイトフェントン法による抗生物質耐性菌除去に関する研究, 第52回日本水環境学会年会, 2018年3月15日, 札幌.

4) 平原壮, 邵一凡, 榊原豊, 松本和久, 稲垣嘉彦: フェイトフェントン法による抗生物質除去に関する実験的検討, 第52回日本水環境学会年会, 2018年3月15日, 札幌.

5) 笹木怜, 榊原豊, V. H. Cong, T. D. Trinh: Phyto-Fenton法を用いたベトナム北部における農薬汚染土壌の修復実験, 第52回日本水環境学会年会, 2018年3月15日, 札幌.

6) V. P. Ranjusha and Y. Sakakibara: Treatment of Tetracycline by Bio-Fenton Process in Diatoms in SBR, Advanced Oxidation Technologies for Treatment of Water, Air and Soil (AOTs-23), 2017年11月14日, フロリダ (招待講演) .

7) K. Harada, T. Kurihara, S. Yanachi, Y. Inagaki and Y. Sakakibara: Application of Phyto-Fenton Process to PCP-contaminated soil, 7th IWA-ASPIRE Conference 2017 & Water Malaysia Exhibition 2017, 2017年9月, クアラルンプール, マレーシア.

8) V. P. Ranjusha and Y. Sakakibara: Continuous Treatment of Tetracycline by Bio-Fenton Process in Diatoms, 第51回日本水環境学会年会, 2017年3月15日, 熊本.

9) 梁池秀介, 原田恵多, 栗原孝明, 稲垣嘉彦, 榊原豊: フェイトフェントン法による汚染土壌の浄化, 第51回日本水環境学会年会, 2017年3月15日, 熊本.

10) 稲垣嘉彦, 奈良茂樹, Pariyarath Ranjusha, 榊原豊: 珪藻類を用いた Phyto-Fenton 法によるペンタクロフェノール分解処理, 第51回日本水環境学会年会, 2017年3月15日, 熊本.

11) S. Nara, Y. Inagaki and Y. Sakakibara: Degradation of pentachlorophenol by *Oryza sativa* L. with different iron catalysts, 7th International Conference on Water, Energy & Environment, 2017年2月28日, アラブ首長国

連邦.

12) T. Kurihara, Y. Inagaki, M. D. Hieu, V. H. Cong and Y. Sakakibara: Phyto-Fenton Process—Fenton reaction with vegetation systems —, 7th International Conference on Water, Energy & Environment, 2017年2月28日, アラブ首長国連邦.

13) Y. Sakakibara, Y. Inagaki, V. P. Ranjusha, S. Nara, and S. Nagahashi: Biological Fenton Process for Treatment of Toxic Compounds, The 22nd International Conference on Advanced Oxidation Technologies for Treatment of Water, Air and Soil (AOTs-22), 2016年11月13日, アトランタ, アメリカ合衆国 (招待講演) .

14) V. P. Ranjusha and Y. Sakakibara: Treatment of antibiotics by bio-Fenton process in diatoms, 土木学会 第71回年次学術講演会, 2016年9月7日, 仙台.

15) 奈良茂樹, 稲垣嘉彦, 榊原豊: フェイトフェントン法の浄化メカニズムの解明, 土木学会 第71回年次学術講演会, 2016年9月7日, 仙台.

16) S. Nara, Y. Inagaki, and Y. Sakakibara: OH radical formations in Phyto-Fenton process-detection and application-, The 8th International Conference on Environmental Science and Technology (ICEST2016), 2016年6月6日, ヒューストン, アメリカ合衆国.

17) Y. Sakakibara, V. P. Ranjusha, S. Nara, S. Nagahashi, and Y. Inagaki: Biological Fenton process for treatment of contaminants of emerging concern, The 6th International Conference on Environmental Technology and Knowledge Transfer, 2016年05月19日, 合肥市, 中国 (招待講演) .

18) Y. Sakakibara: Research and Development for Water Reuse Technology in Tropical Regions, SATREPS Symposium, 2015年11月04日, ネパール (招待講演) .

19) V.P. Ranjusha, Y. Inagaki, Y. Sakakibara: Identification of Bio-Fenton Process in Diatoms and Its Capability to Degrade Tetracycline hydrochloride, SATREPS Symposium, 2015年11月04日, ネパール.

20) S. Nara, C. Li, S. Suzuki, Y. Kasai, Y. Inagaki, Y. Sakakibara, M. Milintawisamai, and S. Srilachai: Advanced Constructed Wetland(ACW), SATREPS Symposium, 2015年11月04日, ネパール.

21) C. Li, V.H. Cong, Y. Inagaki, Y. Sakakibara : A biological Fenton reaction catalyzed by ferrihydrite colloids, 5th International Colloids Conference, 2015年06月21日, アムステルダム.

22) 奈良茂樹, 稲垣義彦, 榊原豊: フェイトフェントン法によるPCPの分解, 第50回日本水環境学会年会, 2016年03月16日, 徳島.

23) V. P. Ranjusha and Y. Sakakibara : Degradation of Antibiotics by Bio-Fenton Process in Diatoms, 第50回日本水環境学会

年会, 2016年03月16日, 徳島.

24) 稲垣嘉彦, V. H. Cong, 榊原豊: フェイトフェントン法における OH ラジカルの同定および微量有害物質処理への適用, 第50回日本水環境学会年会, 2016年03月16日, 徳島.

25) V. P. Ranjusha Y. Inagaki and Y. Sakakibara: Identification of Bio-Fenton process in diatoms and its capability to degrade Antibiotics in aqueous medium, Honda YES Forum 2015, 2015年11月18日, 東京.

26) 稲垣嘉彦, V. H. Cong, C. Li, 榊原豊: 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, 土木学会第70回年次学術講演会, 2015年9月16日, 岡山.

27) 栗原孝明, 稲垣嘉彦, 榊原豊: バイオフィントン法による PCP の連続除去・無害化に関する研究, 土木学会第70回年次学術講演会, 2015年9月16日, 岡山.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

<http://www.waseda.jp/sem-sakaki01/sakakibara1-top.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榊原 豊 (Sakakibara Yutaka)  
早稲田大学・理工学術院・教授  
研究者番号: 80143204

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

( )