

金属回収ファイトレメディエーション を促す金属無機化細菌の応用

Application of organometallic-mineralizing bacteria inducing phytoremediation of hyperaccumulator

牧輝弥 金沢大学大学院 自然科学研究科 助手

Teruya Maki, Ph.D

Associate Professor, Graduate School of Natural Science, Kanazawa University,

産業廃棄物から効率よく有用微量元素（金，白金等）が回収されれば，資源の有効活用につながる。また，金属汚染環境から重金属（カドミウム，鉛，ヒ素等）を取り除くことは緊急の課題となっている。そのため，微量元素の回収にむけ，有用微量元素と特異的に結合する配位子に注目が集まる。本研究では，有効利用可能な有機配位子として，シダ植物のヘビノネゴザが産出する配位子に着目した。ヘビノネゴザは鉱山に好んで繁茂し，金属と特異的に結合する配位子を産出し，植物体内に高濃度の金属を濃縮することが知られている。そこで，ヘビノネゴザの金属濃縮機構を解明するとともに，金属と結合する有機配位子の機能を解明する。

Phytoremediation, the use green plants to clean up metal-contaminated environments, has attracted attention as an environmentally friendly useful metal-extraction technique for industrial waste water treating. This technology makes use of hyperaccumulator plants that extract the precious metals (Au, Pt etc.) as well as the toxic metals (Cd, Pb, As etc.) from waste water and accumulate in the harvestable above-ground biomass. Finally the purification of above-ground biomass would provide pure metals. The hyperaccumulator can uptake dissolved inorganic metals, while it hardly uptakes organometals suspending within the waste water. For effectively extracting all amounts of metals from the waste water, the organometals have to be converted to the inorganic forms. This study has focused on the use of bacterial mineralization, demonstrating that the 200 isolates mineralize the organometals to the inorganic forms, slightly enhancing the metal uptake activities of a hyperaccumulator (Chinese Brake fern). But practical application of the bacterial mineralization requires more remarkable enhance of the metal uptakes. This study will determine the optimum of culture condition allowing the bacteria mineralize the organometals and increase the efficiency of

plant metal extraction. Additionally, the physiological mechanisms of plant metal uptakes are clarified to provide suggestions for the enhance experiments of metal uptakes.

1 研究目的

金及び白金をはじめとする白金属は、電子部品や工業用触媒に用いられ、自動車の製造にも必須である。しかし、廃液及び廃棄物に含まれる貴金属の回収率は極めて低く、コストが高くつく。一方、自動車の原料となる金属を鉱山から採掘するにあたり、大量の有害金属が自然界に散逸してしまう。これより、環境中の金属汚染は深刻であり、その除去が求められる。従って、貴金属資源の有効利用及び有害金属の環境浄化のためにも、金属の回収技術の改善は必須である。現在、金属の回収方法として、植物に金属を集積させ、植物ごと金属を回収するファイトレメディエーションが注目を集めている（図1）。

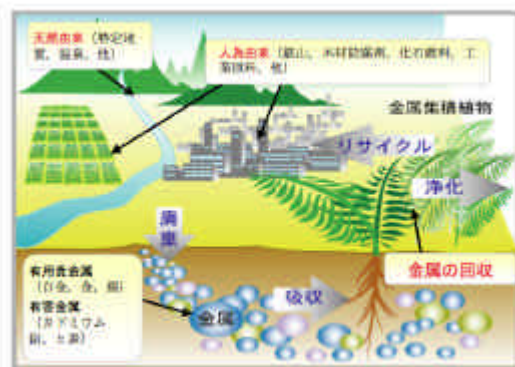


図1 植物を利用した金属回収

本研究では、金属集積植物に微生物活性を組み合わせ、金属回収の向上を目差した。具体的には以下の項目について検討した。(1) 金属蓄積植物の水耕栽培法を確立し、植物体内の金属定量法を確立する。(2) 金属集積植物の

生理機構を解明する一環として、金属化学種があたえる集積率への影響を検証する。(3) 環境中から強力な有機金属の分解細菌株を分離する。(4) 植物と細菌の栽培条件を改良し、植物の金属集積率(特にヒ素を重点的に扱う)を向上させる。

2 研究経過

2-1 金属集積植物内の金属定量

金属集積植物であるモエジマシダ及びヘビノネゴザを水耕栽培した。さらに、植物体を4通りの前処理法で処理することで、有機物を焼却させ、植物体内の全金属濃度を原子吸光分析あるいは誘導結合高周波プラズマ発光分光分析によって測定し、金属の定量に適した手法を選択した。

2-2 金属集積植物の生理機能の解明

金属化学種が植物のヒ素集積に及ぼす影響を明らかにするため、水耕栽培したモエジマシダの培地に無機ヒ素、モノメチルヒ素及びジメチルヒ素をそれぞれ加え、2週間栽培し、ヒ素の集積量を定量した。ヒ素は、コールドとラップ法を用いた還元気化原子吸光法をもちいて定量した。

2-3 有機金属無機化細菌の探索

金属汚染土壌および湖沼試水をMPN(most probable number)法に供し、有機金属の無機化細菌を計数及び分離した。さらに、分離細菌

株の無機化能力を培養実験によって検証するとともに、16S rDNA塩基配列を用いたRFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析によって遺伝学的にグループ分けを行った。

2-4 細菌存在下での植物の金属集積率の向上

金属集積率の向上を検討するにあたり、有機金属としてメチル基を有するヒ素を対象とした。無機化細菌株と共に栽培した金属集積植物にジメチルヒ素を与え、ヒ素の集積量を測定した。また、根圏を嫌気条件下にして無機化細菌とともに栽培したモエジマシダで、ヒ素集積の向上を検証した。

3 研究成果

金属集積植物であるモエジマシダ及びヘビノゴザを水耕栽培に供し、既知成分を含む植物栽培用液体培地で2ヶ月間育成させることに成功した。植物体内の金属定量にむけて、4つの前処理法を比較したところ、Matrix法で灰化した植物体では金属成分が完全に無機化され、植物体内の全金属量を精度良く定量できた。本定量法によって、水耕栽培したモエジマシダは無機ヒ素を約560mg/kgまで集積することが明らかとなった。また、ヘビノゴザでは、銅、亜鉛および鉛の蓄積が顕著に見られた(発表論文1)。

次に、植物の金属集積へ金属化学種が及ぼす影響を検証するため、ヒ素化学種(無機ヒ素、メチルヒ素)を変えて加えた培地でモエジマシダを栽培し、ヒ素の集積量を定量した。モエジマシダは、無機ヒ素を約560mg/kg蓄積したのに対し、モノメチルヒ素及びジメチルヒ素をそれぞれ約7mg/kg及び20mg/kgと少量しか蓄積しなかった。モエジマシダは、無機ヒ素に比べ、メチルヒ素を1/20程度と少

量しか集積せず、有機ヒ素を集積しにくいと考えられる。この結果を受け、モエジマシダのヒ素集積を上げるには、有機ヒ素を無機化する必要があり、本研究では無機化細菌に着目した。

環境試料をMPN法に供し、有機金属の無機化細菌を計数及び分離した結果、無機化細菌が土壌中から 10^6 cells/g-soil(発表論文2)、および湖沼中から 10^3 cells/ml-lake water(発表論文3)のオーダーで検出された。これら無機化細菌を全256株分離し、無機化能力を検証したところ、分離細菌株は、2週間で $1\mu\text{M}$ のジメチルヒ素を10%程度無機化した。RFLP解析を用いた遺伝学的グループ分けによると、細菌株の種組成は多様であり(少なくとも10種類以上)、種が季節に応じて変動すると結論づけられた(発表論文3)。また、環境試料(湖沼、土壌)中において、好気条件より嫌気条件で細菌による有機金属の無機化が進みやすいことを突き止めた(図2)。この裏付けとして、沿岸海域においても嫌気条件下

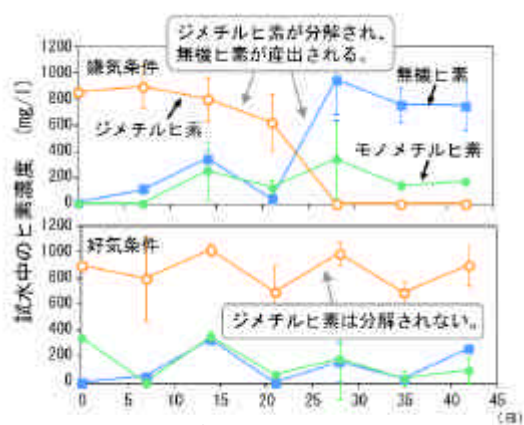


図2 湖沼試水にジメチルヒ素を加えた後の各種ヒ素化合物の濃度変化。

く有機汚染物質が微生物分解を受けやすいことも分かっている(発表論文4)。

この結果を受けて、水耕栽培したモエジマシダに、湖沼より採取した有機ヒ素無機化細菌

菌株を接種し、ヒ素集積の向上を試みた。ジメチルヒ素を添加した培地において、無機化細菌とともに栽培したモエジマシダで、細菌無添加区に較べてヒ素集積が約 20 倍に促進された(図3)。環境中において有機ヒ素は嫌

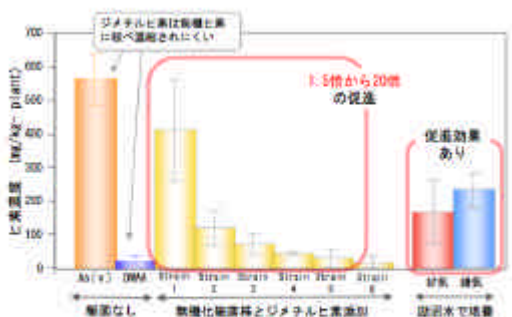


図3 細菌による植物のヒ素濃縮の向上

気性細菌によって顕著に無機化されたため、根圏を嫌気状態にすることでヒ素の集積は増大した。細菌によってジメチルヒ素が無機化され、植物が無機ヒ素を吸収したため、集積率が増大したと考察できる。

4 今後の課題と発展

今回、ヒ素についてファイトレメディエーションの向上化を示唆する結果が得られた。ヒ素による環境汚染箇所は金属被害では日本最多であり、有機ヒ素化合物は強い毒性を持つ。環境中には、防虫剤および化学兵器として使用された有機ヒ素が残存し、基準値濃度(10 μ g/L)の10倍以上で地下水へと溶出する危険性があり、飲料水の汚染が危惧される。従って、ヒ素に関する成果が得られた意義は大きい。今後、有機ヒ素汚染の浄化に焦点を絞り、実汚染サイトでのファイトレメディエーションの実施を見据えた研究を展開する。

現在、株式会社フジタ(総合建設業)では、

モエジマシダを用いた実汚染サイトの浄化事業を推進しつつある。今回の知見に基づき、汚染土壤中で無機化細菌の活性をコントロールできれば、ヒ素浄化の促進につながる。今後は、(1) 汚染土壤中モエジマシダを室内栽培し、細菌による植物のヒ素集積促進に適した条件を室内実験で見いだす。(2) 植物が汚染土壤中の微生物生態系へ与える影響を検証し、細菌の無機化活性を持続させる条件を特定する。(3) 実汚染サイトの浄化事業において、細菌による植物のヒ素浄化促進の実用化に目処を立てる。本研究が進展すれば、微生物生態および化学形態を重視したファイトレメディエーションが実用化されるであろう。

5 研究論文リスト

- (1) Kobayashi F, Maki, T., Nakamura Y., Ueda K., Determination of Cu, Pb, Fe, and Zn in polymer fractions of a hyperaccumulating plant, *Anal. Sci.* **21** 1553-1556, 2005.
- (2) Maki T., Takeda N., Hasegawa H., Ueda K., Isolation of monomethylarsonic acid (MMAA)-mineralizing bacteria from arsenic contaminated soils of Island Ohkunoshima, *Appl. Organometallic Chem.*, in press 2006.
- (3) Maki T., Watarai H., Kakimoto T., Takahashi M., Hasegawa H., Ueda K., Seasonal dynamics of dimethylarsenic acid degrading bacteria dominated in Lake Kibagata, *Geomicrobiol. J.*, in press 2006.
- (4) Maki T., Hasegawa H., Kitami H., Fumoto K., Munekage Y., Ueda K., Bacterial degradation of antibiotic residues in a marine fish farm sediment of Uranouchi Bay and phylogenetic analysis of the antibiotic-degrading bacteria using 16S rDNA sequences, *Fisheries Sci.*, in press 2006.